

P-ISSN 1859-4794 * E-ISSN 2615-9929

TẬP 66, SỐ 9, THÁNG 9 NĂM 2024
VOLUME 66, NUMBER 9, SEPTEMBER 2024

TẠP CHÍ **KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ**

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST **VIỆT NAM**



HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Chủ tịch

Châu Văn Minh - Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Thành viên

Nguyễn Việt Anh - Trường Đại học Xây dựng, Việt Nam

Bùi Chí Bửu - Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam, Việt Nam

Vũ Dũng - Hội Tâm lý học Việt Nam, Việt Nam

Trần Thọ Đạt - Trường Đại học Kinh tế Quốc dân, Việt Nam

Nguyễn Đình Đức - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Vũ Minh Giang - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trương Nam Hải - Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, Việt Nam

Trần Thanh Hải - Trường Đại học Mở - Địa chất, Việt Nam

Phạm Huy Khang - Trường Đại học Giao thông Vận tải, Việt Nam

Phạm Gia Khánh - Hội Ghép tạng Việt Nam, Việt Nam

Hồ Đắc Lộc - Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nguyễn Thị Mỹ Lộc - Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Bành Tiến Long - Đại học Bách khoa Hà Nội, Việt Nam

Lê Quan Nghiêm - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Trần Hữu Phúc - Hội đồng Giáo sư Nhà nước, Việt Nam

Nguyễn Thanh Phương - Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

Nguyễn Thanh Thủy - Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Phạm Hùng Việt - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

Tổng biên tập

Nguyễn Thị Hương Giang - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Phó Tổng biên tập

Phạm Thị Minh Nguyệt - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ban biên tập

Phí Công Thường - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Vũ Văn Hưng - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Ninh Văn Diện - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Bắc - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Tăng Xuân Bình - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Lê Thị Tuyết Hạnh - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

Trương Thị Thảo Dương - Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

EDITORIAL BOARD

Chairman

Chau Van Minh - Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Members

Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering, Vietnam

Bui Chi Bui - Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Vietnam

Vu Dung - Vietnam Association of Social Psychology, Vietnam

Tran Tho Dat - National Economics University, Vietnam

Nguyen Dinh Duc - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Vu Minh Giang - VNU, Hanoi, Vietnam

Truong Nam Hai - Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam

Tran Thanh Hai - Hanoi University of Mining and Geology, Vietnam

Pham Huy Khang - University of Transport and Communications, Vietnam

Pham Gia Khanh - Vietnam Society of Organ Transplantation, Vietnam

Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam

Nguyen Thi My Loc - University of Education, VNU, Hanoi, Vietnam

Banh Tien Long - Hanoi University of Science and Technology, Vietnam

Le Quan Nghiem - University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, Vietnam

Mai Trong Nuan - VNU, Hanoi, Vietnam

Tran Huu Phuc - The State Council for Professorship, Vietnam

Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University, Vietnam

Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi, Vietnam

Pham Hung Viet - University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam

Editor-in-Chief

Nguyen Thi Huong Giang - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Deputy Editor-in-Chief

Pham Thi Minh Nguyệt - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Managing Editors

Phi Cong Thuong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Vu Van Hung - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Ninh Van Dien - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Bac - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Tang Xuan Binh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Le Thi Tuyen Hanh - Ministry of Science and Technology, Vietnam

Truong Thi Thao Duong - Ministry of Science and Technology, Vietnam

TÒA SOẠN

113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội - Việt Nam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 459/GP-BTTTT ngày 20/7/2021

Số 50/GP-BTTTT ngày 01/02/2023

Giá: 18000^d

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi - Vietnam

Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794

Email: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn

E-journal: b.vjst.vn

PUBLICATION LICENCE

No. 459/GP-BTTTT 20th July 2021

No. 50/GP-BTTTT 1st February 2023

Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất của vật liệu phân hủy sinh học chế tạo từ nhựa polyhydroxyalkanoates gia cường cellulose vi khuẩn

Nguyễn Ngọc Diệp, Đoàn Hoàng Linh, Nguyễn Tiến Đạt, Đặng Thảo Yên Linh, Trương Thị Nguyệt Ánh*

Trung tâm Công nghệ Vật liệu, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/7/2024; ngày chuyển phản biện 31/7/2024; ngày nhận phản biện 16/8/2024; ngày chấp nhận đăng 19/8/2024

Tóm tắt:

Nhằm mục tiêu phát triển các tính chất của nhựa phân hủy sinh học để thay thế nhựa gốc dầu mỏ, giảm thiểu ô nhiễm rác thải nhựa, nghiên cứu này khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất của vật liệu phân hủy sinh học dựa trên nhựa polyhydroxyalkanoates (PHAs) gia cường sợi cellulose vi khuẩn (BC). Trong khuôn khổ nghiên cứu, hàm lượng chất trợ tương hợp 3-6% và hàm lượng sợi gia cường 2-8% được đưa vào nền nhựa PHA. Hiệu quả của chất trợ tương hợp được đánh giá thông qua độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt, ảnh hưởng của hàm lượng sợi gia cường được đánh giá dựa trên tính chất nhiệt, phổ hồng ngoại, độ hấp thụ nước, góc thấm ướt và độ bền kéo. Kết quả khảo sát đã lựa chọn được tỷ lệ trợ tương hợp phù hợp là 5% và tỷ lệ gia cường tối ưu là 4% với các tính chất như: độ bền kéo đứt của vật liệu đạt 12,08 Mpa, độ giãn dài 86%, khả năng hấp thụ nước 0,7%, góc tiếp xúc 82°. Tính chất nhiệt và phổ hồng ngoại của vật liệu ít bị ảnh hưởng bởi hàm lượng gia cường thêm vào. Tối ưu hoá hàm lượng trợ tương hợp và hàm lượng gia cường trong chế tạo vật liệu phân hủy sinh học PHA/BC góp phần làm giảm giá thành và cải thiện được tính chất cơ học của PHA.

Từ khóa: bacterial cellulose, gia cường, phân hủy sinh học, polyhydroxyalkanoate.

Chỉ số phân loại: 1.3, 2.5

Factors affecting the properties of biodegradable material based on polyhydroxyalkanoates reinforced with bacterial cellulose

Ngoc Diep Nguyen, Hoang Linh Doan, Tien Dat Nguyen, Thao Yen Linh Dang, Thi Nguyet Anh Tuong*

Center for Advanced Materials and Environmental Technology, National Center for Technological Progress,
C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 26 July 2024; revised 16 August 2024; accepted 19 August 2024

Abstract:

Aiming to enhance the properties of biodegradable plastic to gradually replace petroleum-based plastic products and reduce plastic waste pollution, this study examines the fabrication and characterisation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) reinforced with bacterial cellulose (BC) fibre. The study investigates the properties of PHA/BC composite by varying the content of compatibiliser PHA-g-MA from 3-6% and reinforcement BC fibres from 2-8%, thereby selecting the optimal reinforcement content. The performance of the compatibilisers will be measured with tensile strength and elongation at break, while the reinforcements will be evaluated based on thermal properties, infrared spectrum, water absorption, contact angle, and tensile strength. The results indicated a suitable matching rate of 5%, an optimal reinforcement ratio of 4%, a tensile strength of 12.08 MPa, an elongation at break of 86%, a water absorption of 0.7%, and a contact angle of 82°. Thermal behaviour and infrared spectrum were not significantly affected by the added reinforcement content. Optimising the compatibiliser and BC reinforcement content for manufacturing PHA/BC biodegradable materials will contribute to reducing the cost of the product and improving the mechanical properties of PHA.

Keywords: bacterial cellulose, biodegradable, polyhydroxyalkanoate, reinforce.

Classification numbers: 1.3, 2.5

*Tác giả liên hệ: Email: nguyetanhk28@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ, polyme ngày càng được ứng dụng rộng rãi và trở thành vật liệu thay thế cho rất nhiều vật liệu truyền thống như gỗ, kim loại, silicat... So với vật liệu làm bằng kim loại, polyme có nhiều ưu điểm như nhẹ hơn, khả năng chống ăn mòn tốt hơn và rất khó hoặc không bị phân hủy dưới tác động của môi trường. Tuy nhiên, chính những ưu điểm này đã làm cho polyme, cụ thể là nhựa, trở thành loại chất thải gây ra nhiều vấn đề môi trường nan giải không thể tránh khỏi trong quá trình xử lý và chôn lấp.

Trong những năm trở lại đây, đã có một sự thay đổi mạnh mẽ trong nhận thức của con người về những tác hại của nhựa thải gây ra cho môi trường và từ đó đã có những giải pháp rõ ràng về việc khắc phục những hậu quả này. Một cách tiếp cận tiềm năng là khuyến khích sử dụng các nhựa sinh học thân thiện môi trường. Với khả năng phân hủy hoàn toàn thành CO_2 , H_2O và mùn nhờ vào các vi sinh vật trong thời gian ngắn, có thể nói rằng, ứng dụng các loại vật liệu phân hủy sinh học (PHSH) đang là một trong những xu thế phát triển của ngành sản xuất vật liệu góp phần quan trọng vào việc bảo vệ môi trường, tiết kiệm và phát triển nguồn tài nguyên. Các loại vật liệu mới được khuyến khích nghiên cứu và chế tạo nhằm giảm giá thành của các loại vật liệu thô và quá trình sản xuất.

Bên cạnh các loại nhựa phổ biến trên thị trường, nhựa phân hủy sinh học như polylactic acid (PLA) hay polybutylene adipate terephthalate (PBAT), PHA cũng dần được biết đến rộng rãi hơn. Mang nhiều đặc tính giống như nhựa tổng hợp có nguồn gốc từ dầu mỏ nhưng PHA có ưu điểm là phân hủy hoàn toàn bởi các vi sinh vật để tạo thành CO_2 (hoặc CH_4) và H_2O nghĩa là không sản sinh độc tố trong quá trình phân hủy. Thời gian phân hủy của PHA đã được xác định bằng các phương pháp đánh giá ngoại quan, phương pháp phổ, suy giảm khối lượng hay tính thể tích CO_2 trong nhiều điều kiện khác nhau như trong đất, bùn, nước biển chỉ mất vài tháng, ngắn hơn rất nhiều so với nhựa tổng hợp [1]. Hơn nữa, đây là loại polyme được tổng hợp bởi vi sinh vật do đó không có nguy hại trong quá trình tổng hợp, sản xuất cũng như không có monome dư và các phụ gia ảnh hưởng đến sức khỏe và môi trường trong quá trình sử dụng. Ngoài ra, phân hủy sinh học còn đóng góp tích cực vào chu trình tuần hoàn cacbon toàn cầu bởi thời gian phân hủy ngắn và gần như không phát thải cacbon. Điều này có thể đóng góp vào việc hiện thực hóa cam kết của Chính phủ Việt Nam về việc xây dựng và triển khai các biện pháp giảm phát thải khí nhà kính để đạt mức phát thải ròng bằng “0” (Net Zero) vào năm 2050.

PHA là vật liệu xanh đặc trưng, chúng có nguồn gốc sinh học, được tổng hợp sinh học, có thể phân hủy sinh học, tạo compost và tương thích sinh học. Điều quan trọng là PHA có thể được dễ dàng gia công bằng các phương pháp thông thường như các loại nhựa có nguồn gốc dầu mỏ khác. PHA nóng chảy vô cùng linh động cho

phép chế tạo các sản phẩm có thành mỏng hoặc có cấu trúc phức tạp, có ý nghĩa quan trọng trong lĩnh vực y sinh [2]. Tuy nhiên, PHA còn tồn tại một số nhược điểm như: tính chất cơ học chưa tốt, khả năng biến tính hạn chế bởi ít nhóm chức, dễ bị nhiệt phân khi gia công, chi phí sản xuất cao, năng suất thấp. Dù vậy, nếu được phối trộn và xử lý phù hợp, sẽ có nhiều tính chất tương tự như PP, PE là các vật liệu nhựa thông dụng khác.

Một polyme xanh thường được xem xét bổ sung vào nền nhựa phân hủy sinh học là BC hay còn được biết tới với tên gọi cellulose sinh học, cellulose vi sinh, là cellulose do vi khuẩn tổng hợp. Bản chất của nó là một polysaccharit mạch thẳng được hình thành nhờ các đơn phân glucose liên kết với nhau theo liên kết β -1,4 glycosid tương tự như cellulose có nguồn gốc thực vật [3]. Trong công nghiệp, BC thường được sản xuất bởi vi khuẩn *Acetobacter xylinum*. Sợi BC có kích thước nhỏ hơn khoảng 100 lần so với cellulose từ thực vật và có cấu trúc chặt chẽ, thành phần hóa học tinh khiết không lẫn hemicellulose và lignin. Hơn nữa, các tính chất cơ học như khả năng chịu kéo, độ dẻo và khả năng giữ nước của BC tốt hơn so với sợi thực vật nói chung. Do đó, BC phù hợp hơn để sử dụng làm chất gia cường cho các vật liệu cần tính bền. Bên cạnh tính chất cơ học tốt, BC còn là một sản phẩm rất phổ biến trong tự nhiên với giá thành tương đối rẻ. Việc lựa chọn BC để bổ sung vào nền nhựa PHA được kỳ vọng vừa cải thiện tính chất vừa góp phần làm giảm giá thành của sản phẩm.

Trên thực tế, các sản phẩm từ nhựa phân hủy sinh học đang thiếu tính cạnh tranh với các sản phẩm cùng loại có nguồn gốc dầu mỏ do các hạn chế về tính chất và giá thành cao hơn gấp nhiều lần. Vì thế, việc bổ sung các chất độn và gia cường nhằm gia tăng tính chất và giảm thiểu giá thành của các sản phẩm từ nhựa phân hủy sinh học đang là vấn đề nóng. Tuy nhiên, quá trình đưa các loại gia cường tự nhiên vào nền nhựa PHA còn gặp nhiều khó khăn do bản chất các loại sợi tự nhiên ưa nước trong khi PHA lại có tính kỵ nước nên tương tác giữa hai pha kém. Điều này có thể được khắc phục bằng cách bổ sung thêm phụ gia trợ tương hợp [4]. Vì vậy, nghiên cứu này tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng chất trợ tương hợp PHA-g-MA và hàm lượng chất gia cường khả năng tương hợp của PHA và BC và hàm lượng BC thích hợp có thể đưa vào nền PHA để cải thiện các tính chất.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

PHA được sản xuất bởi Shenzhen Ecomann Biotechnology Co., Ltd., Trung Quốc, có tên thương mại là Ecomann® Bioresin EM30010. Cellulose vi khuẩn (BC) được nuôi cấy từ nước dừa dạng tấm tại Bến Tre, Việt Nam; dung môi dimethylformamide (DMF) và maleic aldehyde (MA) của Xilong Scientific, Trung Quốc, Dicumyl peroxide (DCP) từ MERCK, Đức.

2.2. Phương pháp công nghệ

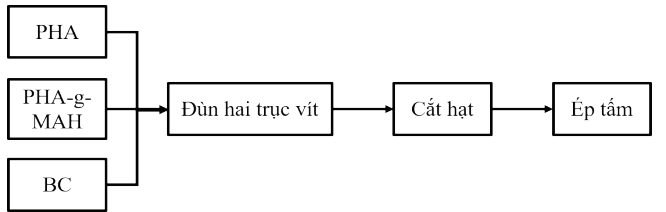
Chuẩn bị BC: Ngâm các tấm BC trong nước khoảng 1-2 giờ để BC hút nước, trương nở lên. Sau đó, dùng kéo cắt nhỏ các tấm BC, cho vào máy xay nhuyễn. Hỗn hợp BC/nước thu được đem đi lọc rửa 3-4 lần bằng nước thường, thử bằng giấy tím cho đến khi giấy không đổi màu xanh nữa thì lọc rửa lần cuối bằng nước cất. Sau đó, vắt cho bớt nước trong hỗn hợp. Sau khi vắt khô, đem BC đã xay đi sấy ở 50°C đến khi khối lượng không đổi. Nghiền BC một lần nữa bằng máy nghiền bi hành tinh sau đó sàng qua sàng cỡ micro để thu được BC ở dạng bột mịn.

Chế tạo trợ tương hợp PHA-g-MA: PHA được sấy khô ở 50°C trước khi tiến hành ghép. Quá trình ghép MA lên mạch PHA được thực hiện trong máy trộn kín ở 130°C với chất khơi mào là DCP. Đầu tiên, cho PHA vào máy trộn 2-3 phút đến khi nóng chảy hoàn toàn sau đó thêm từ từ MA, rồi đến DCP vào hỗn hợp nhựa. Hỗn hợp tiếp tục được gia nhiệt thêm 10 phút đến khi kết thúc quá trình. Để loại bỏ MA và DCP dư, hỗn hợp nhựa được hòa tan trong DMF nóng sau đó rửa lại bằng methanol. Lọc lấy kết tủa, sấy PHA-g-MA đã được tinh chế ở 50°C đến khối lượng không đổi [5].

Chế tạo vật liệu nhựa phân hủy sinh học PHA gia cường BC: Composite PHA gia cường BC được phối trộn trên thiết bị đun 2 trục vít Labtech LTE16-52 với tốc độ trục vít là 120 rpm, tốc độ nạp liệu 18 rpm và nhiệt độ của các khoang ở phạm vi 130-155°C cụ thể như trong bảng 1. Sau khi trộn, nhựa được cắt thành hạt rồi mang đi ép thành các tấm dày 2mm để đo tính chất. Quy trình chế tạo vật liệu được trình bày ở hình 1.

Bảng 1. Điều kiện gia công composite polyhydroxylalkanoat/cellulose vi khuẩn trong thiết bị đun hai trục vít.

Tốc độ trục vít	Áp suất đầu ra	Vùng nhiệt độ (°C)												Đầu ra
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
120 RPM	14 PSI	130	140	145	145	150	150	155	150	145	145	140	135	140



Hình 1. Sơ đồ chế tạo mẫu composite polyhydroxylalkanoat/cellulose vi khuẩn.

2.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát hàm lượng trợ tương hợp. Thí nghiệm này cố định hàm lượng BC là 5% và thay đổi hàm lượng trợ tương hợp PHA-g-MA trong khoảng 1-5%. Đơn phối liệu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Đơn phối liệu khảo sát ảnh hưởng trợ tương hợp polyhydroxylalkanoat-g-maleic alhydride.

Thành phần	Mẫu					
	PHA	MA 0%	MA 3%	MA 4%	MA 5%	MA 6%
PHA (%)	100	95	92	91	90	89
PHA-g-MA (%)	0	0	3	4	5	6
BC (%)	0	5	5	5	5	5

Thí nghiệm 2: Khảo sát hàm lượng gia cường. Trong nghiên cứu này, BC được bổ sung vào nền nhựa PHA với các tỷ lệ 2, 4, 6 và 8% cùng với chất trợ tương hợp PHA-g-MA. Đơn phối liệu được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Đơn phối liệu khảo sát ảnh hưởng gia cường cellulose vi khuẩn.

Thành phần	Mẫu				
	PHA	BC 2%	BC 4%	BC 6%	BC 8%
PHA (%)	100	93	91	89	87
PHA-g-MA (%)	0	5	5	5	5
BC (%)	0	2	4	6	8

2.4. Phương pháp phân tích

Mẫu được phân tích thông qua phổ FTIR bằng thiết bị Nicolet™ iS20 FTIR Spectrometer trong giải số sóng từ 400 cm⁻¹ đến 4000cm⁻¹ ở độ phân giải 4 cm⁻¹; độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của vật liệu được xác định trên thiết bị đo cơ lý vạn năng Instron theo tiêu chuẩn ASTM D-638; độ hấp thụ nước của màng được xác định theo tiêu chuẩn ISO-2896. Các mẫu được cắt từ tấm thành các hình vuông có kích thước bằng nhau là 2x2 cm, sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến khối lượng không đổi (W₀) chính xác đến 10⁻³ g. Mẫu được ngâm trong nước cất và cân lại khối lượng (W_i) sau các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96 và 168 giờ. Phần trăm khối lượng nước hấp thụ trong mẫu nhựa composite được xác định theo công thức:

$$\text{Độ hấp thụ nước (\%)} = \left(\frac{W_i - W_0}{W_0} \right) \times 100$$

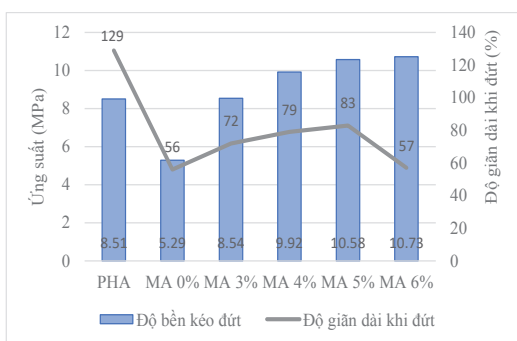
trong đó: W₀ là khối lượng màng ban đầu (g); W_i là khối lượng màng sau khi ngâm trong i giờ (g).

Góc tiếp xúc của chất lỏng là nước trên nền vật liệu PHA gia cường BC được xác định theo tiêu chuẩn ASTM D7334-08. Góc tiếp xúc là góc được tạo ra giữa chất nền và đường tiếp tuyến được vẽ tại điểm giao nhau giữa giọt chất lỏng và chất nền ngay khi giọt chất lỏng rơi xuống bề mặt vật liệu. Đây là góc được tạo bởi chất lỏng ở ranh giới ba pha trong đó một chất lỏng, khí (không khí) và chất rắn (vật liệu).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng trợ tương hợp đến tính chất vật liệu

Kết quả đo độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của vật liệu khi thay đổi hàm lượng chất trợ tương hợp 3-5% được thể hiện ở hình 2.



Hình 2. Ảnh hưởng của hàm lượng chất trợ tương hợp đến độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của vật liệu composite polyhydroxylalkanoat/cellulose vi khuẩn.

Từ hình 2 có thể thấy, khi không có mặt của chất trợ tương hợp, cả độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của vật liệu composite PHA/BC đều giảm. Độ bền kéo đứt của vật liệu khi không có trợ tương hợp chỉ đạt 5,29 MPa, thấp hơn gần một nửa so với nhựa nền. Khi hàm lượng trợ tương hợp PHA-g-MA tăng dần, độ bền kéo đứt của vật liệu tăng tỷ lệ thuận với hàm lượng PHA-g-MA thêm vào, độ bền kéo đứt của vật liệu cao nhất đạt 10,73 MPa khi hàm lượng trợ tương hợp là 6%. Điều này được lý giải do khi bổ sung BC vào PHA dù chỉ với một hàm lượng nhỏ, sự tương tác kém giữa hai pha đã khiến cho vật liệu xuất hiện điểm yếu tại bề mặt phân tách pha, vì thế khiến tính chất vật liệu bị suy giảm. Nhưng khi có mặt của chất trợ tương hợp, các nhóm hydroxyl của chất xơ tự nhiên có thể dễ dàng phản ứng với nhóm chức anhydride của chất trợ tương hợp để hình thành các tương tác tốt hơn và thành phần chính của chất trợ tương hợp vẫn là nhựa PHA cùng loại với nhựa nền [6]. Thêm vào đó, tương tác thứ cấp cũng có thể được hình thành thông qua liên kết hydro giữa nguyên tử oxy của nhóm anhydride và nguyên tử hydro của sợi tự nhiên hoặc ngược lại [7].

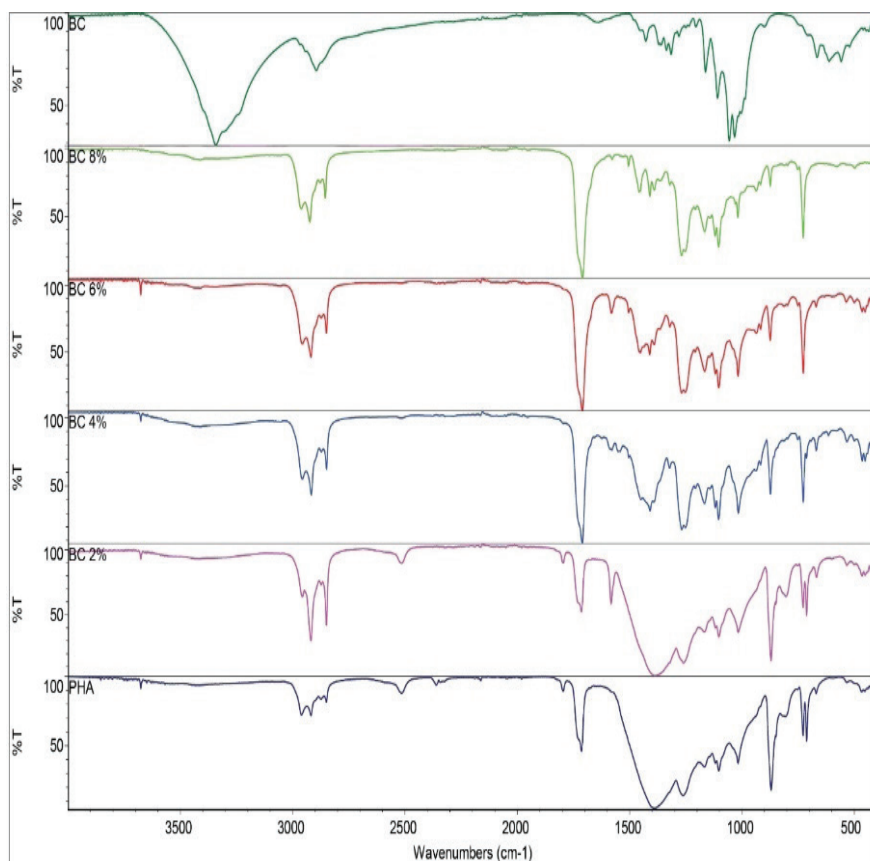
Tuy nhiên, độ giãn dài khi đứt của vật liệu lại theo một xu hướng khác. Khi hàm lượng PHA-g-MA tăng 3-5%, độ giãn dài khi đứt của vật liệu tăng nhẹ từ 72 lên đến 83%, khi hàm lượng PHA-g-MA tiếp tục tăng đến 6%, độ giãn dài khi đứt lại giảm mạnh và nhìn chung, độ giãn dài khi đứt của vật liệu dù đã thêm trợ tương hợp vẫn không thể đạt được như ban đầu. Điều này có thể giải thích do khi chế tạo chất trợ tương hợp, một phần chất khơi mào peroxit đã tham gia phản ứng khâu mạch của nhựa nền tạo thành cấu trúc mạng không gian cứng chắc. Khi

hàm lượng trợ tương hợp tăng lên cũng đồng nghĩa với mật độ mạng không gian trong cấu trúc vật liệu tăng lên dẫn đến kết quả là độ bền kéo bị suy giảm.

Dựa vào kết quả độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt, có thể thấy hàm lượng tương hợp PHA-g-MA 5% là hàm lượng tối ưu nhất trong khoảng khảo sát. Tuy giá trị độ bền kéo đứt của mẫu MA 5% thấp hơn so với mẫu MA 6% nhưng mật độ mạng không gian tăng cao khi bổ sung quá nhiều trợ tương hợp sẽ khiến cho độ giãn dài giảm xuống, làm giảm tác dụng cải thiện cơ tính của vật liệu. Do đó, với mục đích đồng thời cải thiện độ bền kéo đứt và độ giãn dài của hệ vật liệu composite PHA/BC, hàm lượng tương hợp PHA-g-MA 5% sẽ được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khảo sát hàm lượng sợi cellulose vi khuẩn gia cường đến tính chất vật liệu

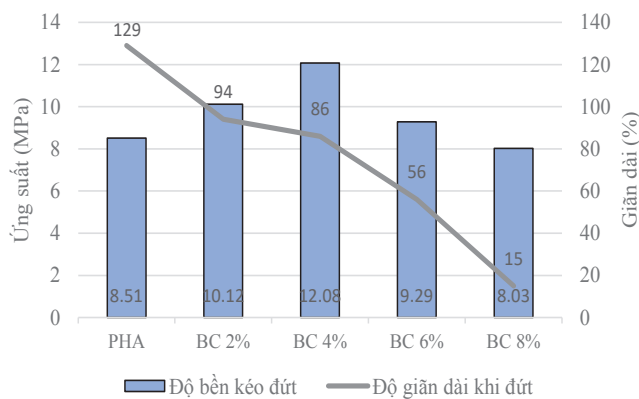
Phổ hồng ngoại FTIR: Phổ hồng ngoại của nhựa nền PHA, sợi gia cường BC và các mẫu vật liệu composite chế tạo từ nhựa PHA gia cường các hàm lượng sợi BC khác nhau được thể hiện ở hình 3. Phổ hồng ngoại của PHA được đặc trưng bởi các peak dao động giãn đối xứng và bất đối xứng của liên kết C-H trong phạm vi khoảng 2800 đến 2900 cm^{-1} , peak ở khoảng 1720 cm^{-1}



Hình 3. Phổ hồng ngoại của nhựa nền polyhydroxylalkanoat, sợi gia cường cellulose vi khuẩn và các mẫu vật liệu composite chế tạo từ nhựa polyhydroxylalkanoat gia cường các hàm lượng sợi cellulose vi khuẩn khác nhau.

đặc trưng cho liên kết C=O và peak đặc trưng cho dao động uốn của C-H ở 1420, 1375, 1335 và 1278 cm^{-1} [8, 9]. Trong khi đó, phổ hồng ngoại của BC lại có các peak đặc trưng của nhóm OH ở vị trí 3400 cm^{-1} và các đỉnh khác nằm ở 900 cm^{-1} và 1160 cm^{-1} được gán cho dao động giãn của liên kết glycosid C-O-C [9, 10]. Từ kết quả phổ hồng ngoại có thể thấy được hàm lượng BC trong vật liệu tăng lên thì đỉnh đặc trưng cho nhóm OH cũng có sự tăng nhẹ, điều này được giải thích do sự xuất hiện của BC trong vật liệu và một phần do sự hình thành các liên kết hydro giữa BC và chất trợ tương hợp. Sự thay đổi lớn nhất trong phổ hồng ngoại là ở vị trí khoảng từ 1300-1400 cm^{-1} của liên kết C-H, khi hàm lượng BC trong vật liệu tăng, cường độ của các đỉnh này suy giảm mạnh. Kết quả này cũng được củng cố bởi các kết quả đo tính chất cơ học trong các thử nghiệm tiếp theo dưới đây.

Độ giãn dài khi đứt: Độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của nhựa nền PHA và các mẫu vật liệu composite PHA/BC với hàm lượng gia cường khác nhau được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của vật liệu dựa trên các tỷ lệ cellulose vi khuẩn khác nhau.

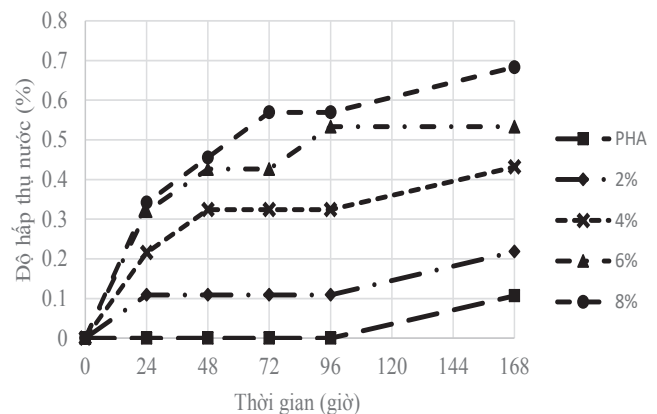
Kết quả khảo sát từ hình 4 cho thấy, khi tăng hàm lượng sợi gia cường BC 2-8%, độ bền kéo đứt của vật liệu có xu hướng tăng nhẹ rồi sau đó giảm dần. Liên kết tốt giữa hydro với nguyên tử oxy của nhóm anhydride và nguyên tử hydro sợi tự nhiên có thể là nguyên nhân khiến cho độ bền đứt của vật liệu tăng. Với hàm lượng BC 4% độ bền kéo đứt đạt cao nhất là 12,08 MPa, tăng thêm 42% so với nhựa nền và độ bền kéo đứt thấp nhất là 8,03 MPa, giảm 6% so với nhựa nền khi gia cường 8% BC. Điều này có thể được giải thích do BC có bản chất ưa nước trong khi PHA lại là polyme kỵ nước khiến cho nếu hàm lượng sợi BC gia cường quá cao sẽ dẫn đến tình trạng hai pha rất khó kết hợp với nhau dẫn đến làm giảm tính chất vật liệu.

Độ giãn dài khi đứt của vật liệu lại giảm đi khi tăng dần hàm lượng BC. Nhựa nền PHA có tính mềm dẻo, độ giãn dài khi đứt lên đến 129% nhưng khi thêm hàm lượng nhỏ BC, độ giãn dài khi đứt của vật liệu lại giảm xuống chỉ còn 94%. Hàm lượng BC càng tăng thì khả năng giãn dài khi đứt của vật liệu càng có xu hướng giảm mạnh. Khi hàm lượng BC trong vật liệu đạt đến

8%, giá trị độ giãn dài khi đứt của vật liệu là 15%, giảm hơn 100% so với nhựa nền không có gia cường. Một trong những nguyên nhân lý giải hiện tượng này là do sự tương tác pha kém hình thành nên những điểm yếu giữa bề mặt phân chia pha. Một nguyên nhân khác có thể giải thích cho hiện tượng này là sự xuất hiện của BC đã làm hạn chế tính linh động của mạch polyme [11] Khả năng giãn dài ban đầu của vật liệu nền tương đối tốt, khi suy giảm vẫn một phần vẫn có thể đáp ứng được các yêu cầu sử dụng trong một số lĩnh vực như chế tạo các sản phẩm gia dụng, y tế hay màng phủ nông nghiệp. Tuy nhiên, khi độ giãn dài giảm mạnh sẽ hạn chế các ứng dụng của vật liệu, do đó cần cân nhắc các yêu cầu của ứng dụng để có thể điều chỉnh hàm lượng gia cường phù hợp.

Thông qua quá trình khảo sát độ bền cơ học của vật liệu composite PHA/BC, lựa chọn hàm lượng gia cường BC là 4% với mục đích tối ưu hóa độ bền kéo đứt và độ giãn dài khi đứt của hệ vật liệu.

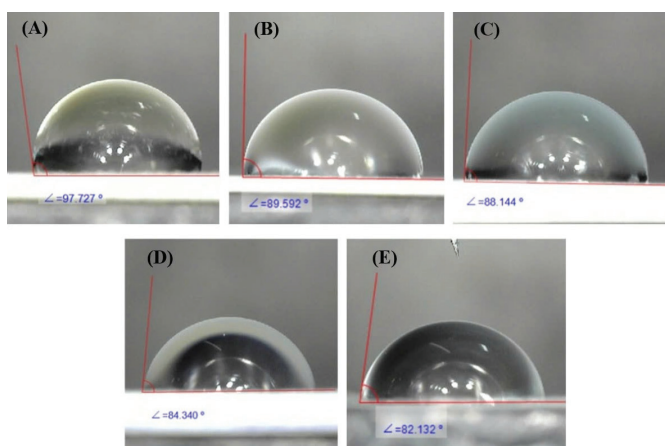
Độ hấp thụ nước: Độ hấp thụ nước của các mẫu được xác định trong khoảng thời gian 24, 48, 72, 96 và 168 h, kết quả được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Khả năng hấp thụ nước của vật liệu composite polyhydroxylalkanoat/cellulose vi khuẩn dựa trên các tỷ lệ cellulose vi khuẩn khác nhau.

Từ hình 5 có thể thấy, nhựa PHA thể hiện rõ bản chất kỵ nước khi khối lượng mẫu không thay đổi trong những ngày đầu tiên. Trong khi đó, bổ sung thêm BC ưa nước vào nền PHA làm tăng độ hấp thụ nước. Khả năng hấp thụ nước của vật liệu tăng dần lên khi hàm lượng BC tăng dần 2-8%. Sau chu kỳ thử nghiệm (7 ngày), khả năng hấp thụ nước của vật liệu 0,1% và đạt đến 0,7% khi hàm lượng BC trong vật liệu là 8%. Giai đoạn hấp thụ nước mạnh nhất là ở 48 h đầu, tuy nhiên, nếu so sánh với BC nguyên bản có thể hấp thụ nước gấp nhiều lần khối lượng khô của nó thì khả năng hấp thụ nước của BC gia cường trong nền PHA kém hơn hẳn. Nguyên nhân có thể do sự bao bọc của nền nhựa xung quanh đã là cản trở quá trình hấp thụ.

Góc tiếp xúc của màng: Kết quả đo góc tiếp xúc của vật liệu được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Góc tiếp xúc của nước và vật liệu composite polyhydroxylalkanoat/cellulose vi khuẩn với các hàm lượng cellulose vi khuẩn khác nhau. (A) polyhydroxylalkanoat; (B) cellulose vi khuẩn 2%; (C) cellulose vi khuẩn 4%; (D) cellulose vi khuẩn 6%; (E) cellulose vi khuẩn 8%.

Đặc tính kỵ nước của PHA được thể hiện rất rõ thông qua góc tiếp xúc của nước với bề mặt PHA. Khi chưa có sự xuất hiện của BC, tiếp tuyến của giọt nước tại điểm tiếp xúc tạo với bề mặt nhựa một góc 97° . Góc này giảm dần đi khi hàm lượng BC trong mẫu tăng lên, nhỏ nhất là 82° khi hàm lượng BC thêm vào đạt 10%. Từ kết quả này có thể giải thích là do BC có tính ưa nước nên khi bổ sung vào PHA nhìn chung đã làm giảm tính kỵ nước của vật liệu [12].

Khả năng hấp thụ nước cùng với tính ưa nước của vật liệu tăng lên rất có ý nghĩa trong quá trình phân hủy sinh học của vật liệu. Thứ nhất, khi tính ưa nước của vật liệu tăng lên, các vi sinh vật và nấm mốc sẽ dễ dàng bám dính vào bề mặt vật liệu. Thứ hai, môi trường ẩm và độ ẩm cao rất thích hợp cho chúng phát triển, mà đây là tác nhân chính gây nên sự phân rã của nhựa trong môi trường tạo compost. Do đó, khi bổ sung thêm hàm lượng nhỏ BC vào nền nhựa PHA, vật liệu sẽ có khả năng phân rã nhanh hơn trong môi trường tạo compost. Sự thay đổi này sẽ thích hợp khi vật liệu được sử dụng cho các ứng dụng ngăn ngừa.

4. Kết luận

Trong phạm vi nghiên cứu này, ảnh hưởng của hàm lượng chất trợ tương hợp PHA-g-MA và sợi gia cường BC đến tính chất vật liệu composite PHA/BC đã được khảo sát. Việc bổ sung sợi gia cường BC vào nền nhựa PHA với trợ tương hợp đã làm thay đổi tính chất cơ học, khả năng hấp thụ nước và góc tiếp xúc của nước với vật liệu. Các kết quả đã cho thấy, khi thêm từ 2-8% BC vào PHA độ bền kéo đứt tăng và giảm độ giãn dài khi đứt. Với hàm lượng BC gia cường 4%, độ bền kéo của vật liệu tăng cao nhất là 42%, độ giãn dài khi đứt giảm từ 129 xuống 86%. Các tính chất cơ học này phù hợp với các ứng dụng yêu cầu khả năng chịu kéo và độ giãn dài khi đứt tương đối với vòng đời ngắn như ngành hàng gia dụng, y tế, nông nghiệp. Sự có mặt của BC trong PHA cũng làm tăng khả năng hấp thụ nước và giảm

tính kỵ nước của vật liệu thể hiện qua sự giảm góc tiếp xúc. Các yếu tố này nhìn chung ảnh hưởng có lợi cho quá trình phân hủy sinh học của vật liệu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp cơ sở năm 2024: “Nghiên cứu xây dựng quy trình chế tạo vật liệu phân hủy sinh học từ nhựa polyhydroxyalkanoates (PHA) gia cường cellulose vi khuẩn (BC)” do Trung tâm Công nghệ Vật liệu chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho nhiệm vụ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Ruggero, R. Gori, C. Lubello (2019), “Methodologies to assess biodegradation of bioplastics during aerobic composting and anaerobic digestion: A review”, *Waste Manag. Res.*, **37**(10), pp.959-975, DOI: 10.1177/0734242X19854127.
- [2] A.R. Contreras (2019), “Recent advances in the use of polyhydroxyalkanoates in biomedicine”, *Bioengineering*, **6**(3), pp.1-14, DOI: 10.3390/bioengineering6030082.
- [3] J. K. Park, J.Y. Jung, T. Khan (2019), *Bacterial Cellulose*, Woodhead Publishing, pp.724-739, DOI: 10.1533/9781845695873.724.
- [4] C. Zhao, J. Li, B. He, et al. (2017), “Fabrication of hydrophobic biocomposite by combining cellulosic fibers with polyhydroxyalkanoate”, *Cellulose*, **24**(5), pp.2265-2274, DOI: 10.1007/s10570-017-1235-8.
- [5] M.F.D. Souza, C.B.B. Luna, D.D. Siqueira, et al. (2023), “Toward the improvement of maleic anhydride functionalisation in polyhydroxybutyrate (PHB): Effect of styrene monomer and $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ catalyst”, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(19), DOI: 10.3390/ijms241914409.
- [6] C.W. Huang, T.C. Yang, K.C. Hung, et al. (2018), “The effect of maleated polypropylene on the non-isothermal crystallisation kinetics of wood fiber-reinforced polypropylene composites”, *Polymers*, **10**(4), DOI: 10.3390/polym10040382.
- [7] M.E.G. López, J.R.R. Ortiz, R.M. González, et al. (2018), “Polylactic acid functionalisation with maleic anhydride and its use as coupling agent in natural fiber biocomposites: A review”, *Compos. Interfaces*, **25**(5-7), pp.515-538, DOI: 10.1080/09276440.2018.1439622.
- [8] I. Chiulan, D.M. Panaitescu, A.N. Frone, et al. (2016), “Biocompatible polyhydroxyalkanoates/bacterial cellulose composites: Preparation, characterisation, and in vitro evaluation”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **104**(10), pp.2576-2584, DOI: 10.1002/jbm.a.35800.
- [9] H.S.Barud, J.L. Souza, D.B. Santos, et al. (2011), “Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes”, *Carbohydr. Polym.*, **83**(3), pp.1279-1284, DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.049.
- [10] G.M.D. Olyveira, M.L.D Santos, P.B. Daltro, et al. (2014), “Bacterial cellulose/chondroitin sulfate for dental materials scaffolds”, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **4**(2), pp.150-154, DOI: 10.1166/jbt.2014.1155.
- [11] D.M. Panaitescu, I. Lupescu, A.N. Frone, et al. (2017), “Medium chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer modified by bacterial cellulose for medical devices”, *Biomacromolecules*, **18**(10), pp.3222-3232, DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00855.
- [12] M. Rapa, E. Grosu, C. Degeratu, et al. (2010), “Biodegradable blends prepared from poly(3-hydroxybutyrate) and wood/cellulose fibers”, *Mater. Plast.*, **47**(4), pp.503-508.

Thiết kế cấu trúc nano bạc tuần hoàn 2D tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt vùng hồng ngoại gần ứng dụng cho cảm biến

Nguyễn Xuân Bách¹, Nguyễn Hữu Tu^{2,3}, Phạm Thanh Sơn², Ngô Quang Minh^{1,3*}

¹Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/10/2023; ngày chuyển phản biện 15/10/2023; ngày nhận phản biện 31/10/2023; ngày chấp nhận đăng 6/11/2023

Tóm tắt:

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu lý thuyết và mô phỏng cấu trúc nano bạc (Ag) tuần hoàn 2D tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt vùng hồng ngoại gần. Để làm rõ cơ chế cộng hưởng plasmon bề mặt của cấu trúc, lý thuyết cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ và không định xứ đã được trình bày. Phương pháp đạo hàm hữu hạn trong miền thời gian (FDTD) được sử dụng để mô phỏng các tính chất quang của cấu trúc nano Ag sắp xếp tuần hoàn 2D và kiểm chứng kết quả tính toán lý thuyết thu được. Các tính toán, mô phỏng về sự phụ thuộc của cộng hưởng plasmon bề mặt vào chiết suất của môi trường xung quanh cho thấy cấu trúc được đề xuất nhạy với môi trường chất khí, với độ nhạy trung bình 1423,7 nm/RIU (đơn vị chiết suất) và hệ số phẩm chất (FOM) trung bình đặc trưng cho độ chọn lọc là 110,2 RIU⁻¹. Các kết quả tính toán và mô phỏng làm nền tảng cho việc chế tạo các cảm biến chiết suất plasmonic vùng hồng ngoại gần nhạy với sự thay đổi nhỏ của môi trường xung quanh.

Từ khóa: cảm biến plasmonic, cộng hưởng plasmon bề mặt, đạo hàm hữu hạn trong miền thời gian.

Chỉ số phân loại: 1.3, 2.9

Near-infrared plasmonic sensors based on surface plasmon resonances in two-dimensional metasurfaces of silver nanostructures

Xuan Bach Nguyen¹, Huu Tu Nguyen^{2,3}, Thanh Son Pham², Quang Minh Ngo^{1,3*}

¹University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

²Institute of Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 13 October 2023; revised 31 October 2023; accepted 6 November 2023

Abstract:

This paper presents the results of theoretical research and numerical simulation of two-dimensional (2D) metasurfaces of silver (Ag) nanostructures that enable the surface plasmon resonances in the near-infrared regions. To clarify the mechanism of surface plasmon resonance that appears in the designed structures under electromagnetism stimuli, the theory of localised surface plasmon resonance and propagating surface plasmon resonance was presented. The finite-difference time-domain (FDTD) method was used to simulate the optical properties of 2D periodically arranged Ag nanostructures and to verify the theoretical prediction results. Calculated and simulated results for the dependence of the surface plasmon resonance and the refractive index of the surrounding medium are performed and show that the proposed structure is sensitive to the gas environment, with an average sensitivity of 1423.7 nm/RIU (refractive index unit) and the average quality factor (FOM) characterising the selectivity is 110.2 RIU⁻¹. The calculation and simulation results provide a general guideline for plasmonic metasurface sensing device designs that are sensitive to small changes in the surrounding environment.

Keywords: finite-difference time-domain, plasmonic sensors, surface plasmon resonance.

Classification numbers: 1.3, 2.9

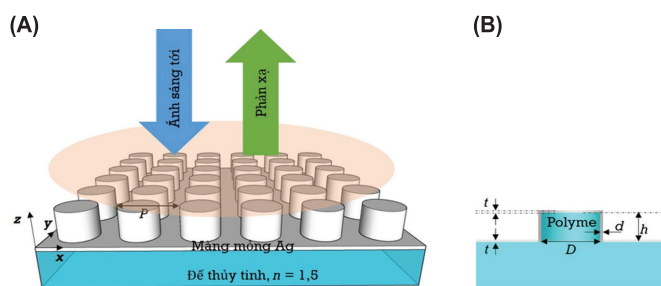
*Tác giả liên hệ: Email: ngo-quang.minh@usth.edu.vn

1. Mở đầu

Hiệu ứng plasmon bề mặt (Surface Plasmon - SP) xảy ra do sự tương tác của sóng điện từ và điện tử tự do tại bề mặt kim loại có kích thước nhỏ hơn bước sóng, đặc biệt với các kim loại quý như vàng (Au), bạc (Ag), bạch kim (Pt)... Dưới tác động đủ lớn của năng lượng điện từ, các điện tử tự do tại bề mặt kim loại sẽ được kích thích. Tại tần số (bước sóng) phù hợp, cộng hưởng sẽ xảy ra, biên độ dao động tập thể của các điện tử đạt giá trị cực đại. Cộng hưởng plasmon bề mặt gây ra sự tăng cường điện từ trường tại bề mặt phân cách kim loại-điện môi, dẫn tới các tương tác quang mạnh tại bề mặt: tán xạ, hấp thụ... [1].

Theo S.A. Maier (2007) [2], một trong những đối tượng nghiên cứu plasmonic hiện nay là các ứng dụng tiềm năng dựa trên các tính chất đặc biệt của cộng hưởng plasmon bề mặt. Các cấu trúc nano kim loại tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt hấp thụ hoàn toàn ánh sáng tới thu hút ngày càng nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học [3]. Các cấu trúc này hấp thụ hầu hết ánh sáng tới, ngăn cản bất kỳ sự phản xạ hay truyền qua nào tại vị trí cộng hưởng. Bên cạnh đó, những tính chất quang học này nhạy với sự thay đổi của môi trường xung quanh cấu trúc, mang lại tiềm năng cho những ứng dụng về cảm biến, ví dụ như: cảm biến sinh học [4], chẩn đoán hình ảnh [5], phát hiện thuốc trừ sâu [6]. Ngoài ra, các nhà khoa học còn phát hiện cấu trúc plasmonic cũng có thể ứng dụng cho tăng cường huỳnh quang và quang phổ Raman [7]. Không dừng lại tại đó, các vật liệu plasmonic cho các ứng dụng liên quan đến năng lượng cũng thu hút được nhiều sự quan tâm nghiên cứu [8].

Do đó, hướng nghiên cứu về các cấu trúc nano kim loại tuần hoàn tạo ra các tính chất quang đặc biệt thông qua hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt ngày càng nhận được nhiều sự chú ý. Đó cũng là lý do nhóm tác giả lựa chọn nghiên cứu về cấu trúc nano Ag tuần hoàn tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt vùng hồng ngoại gần định hướng ứng dụng cho cảm biến chiết suất bằng tính toán lý thuyết



Hình 1. Minh họa cấu trúc nano Ag sắp xếp tuần hoàn 2D. (A) Minh họa cấu trúc 3D; (B) Mặt cắt của một ô đơn vị. Cấu trúc được xác định bởi các thông số bao gồm hằng số mạng P , đường kính cột polyme D , chiều cao cột polyme h , độ dày lớp Ag t trên đế thủy tinh và trên đỉnh cột polyme và độ dày lớp Ag bao xung quanh cột polyme d .

và mô phỏng số. Cụ thể hơn, cấu trúc được lựa chọn nghiên cứu là mảng hai chiều (2D) của các phần tử dạng cột polyme trên đế thủy tinh được phủ bởi một lớp màng mỏng Ag (hình 1). Cấu trúc này được đặc trưng bởi hằng số mạng (chu kỳ tuần hoàn) P , đường kính D và chiều cao h của cột polyme, độ dày t của lớp Ag trên đế thủy tinh và trên đỉnh của cột polyme và độ dày d của lớp Ag bao xung quanh cột polyme.

2. Phương pháp nghiên cứu

Như đã đề cập, khi nguồn sáng kích thích (ánh sáng tới) tương tác với cấu trúc kim loại - điện môi, hiệu ứng plasmon bề mặt (có thể) xuất hiện. Dựa trên bản chất của hiện tượng, hiệu ứng plasmon bề mặt được phân loại thành hiệu ứng plasmon bề mặt định xứ (Localised Surface Plasmon - LSP) và hiệu ứng plasmon bề mặt không định xứ (Delocalised Surface Plasmon - DSP hay Propagating Surface Plasmon - PSP).

Hiệu ứng plasmon bề mặt không định xứ gắn liền với các bề mặt kim loại tiếp xúc với môi trường điện môi. Tại mặt tiếp xúc kim loại - điện môi, hiệu ứng plasmon bề mặt biểu hiện bởi các sóng điện từ liên kết chặt chẽ với bề mặt kim loại. Điều này làm tăng cường điện trường gần bề mặt theo hướng vuông góc với bề mặt tiếp xúc kim loại - điện môi, điện trường này suy giảm theo hàm mũ của khoảng cách từ bề mặt kim loại. Mặc dù plasmon bề mặt có thể lan truyền khi chúng được tạo thành tại tiếp xúc kim loại - điện môi phẳng, thực tế là chúng khó có thể bị kích thích bởi ánh sáng lan truyền tự do, vì động lượng của plasmon bề mặt lớn hơn của ánh sáng kích thích ở cùng tần số (bước sóng) [9]. Để tạo ra plasmon bề mặt, nhiều phương pháp đã được đề xuất để làm cân bằng động lượng, bao gồm: (i) Sử dụng kết hợp lăng kính nhằm tăng động lượng của ánh sáng tới; (ii) Tán xạ từ khuyết tật hình học (dạng lỗ) của màng mỏng kim loại có thể tạo các plasmon bề mặt cục bộ và (iii) Cấu trúc cách tử (grating) trên bề mặt kim loại [10].

Trái ngược với bản chất lan truyền sóng trên tiếp xúc kim loại - điện môi của hiệu ứng plasmon bề mặt không định xứ, hiệu ứng plasmon bề mặt định xứ là kết quả của quá trình dao động tập thể của các điện tử tự do dưới kích thích của sóng điện từ và bị giới hạn ở bề mặt của phần tử kim loại. Khác với kim loại khối, hiệu ứng plasmon bề mặt ở các phần tử kim loại kích thước nano có thể được kích thích trực tiếp bởi sóng điện từ lan truyền trong vùng nhìn thấy. Các điện tử tự do dao động điều hòa do trường điện từ dao động khi nguồn sáng kích thích tương tác với phần tử kim loại. Cộng hưởng xảy ra khi tần số (bước sóng) của ánh sáng tới phù hợp với dao động tập thể của các điện tử tự do tại bề mặt phần tử kim loại, dẫn tới xuất hiện các tính chất quang đặc biệt [11].

Theo đó, cấu trúc Ag tuần hoàn 2D được giới thiệu ở phần 1 có thể mang lại cả hiệu ứng plasmon bề mặt định xứ và không định xứ. Đối với hiệu ứng plasmon bề mặt không định xứ hình thành trên bề mặt cấu trúc Ag tuần hoàn 2D, điều kiện cộng hưởng được mô tả bởi lý thuyết nhiễu xạ cách tử như sau [2]:

$$\vec{k}_{PSP} = \vec{k}_{xy} + m\vec{G}_x + l\vec{G}_y \quad (1)$$

trong đó, $\vec{k}_{PSP}$ là vec-tơ sóng của PSP và được biểu diễn bởi:

$$\vec{k}_{PSP} = \vec{k}_0 \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_{Ag}}{\epsilon_d + \epsilon_{Ag}}} \quad (2)$$

với $\vec{k}_{xy}$ là hình chiếu trên mặt phẳng xoy của vec-tơ sóng tới $\vec{k}_0$ với góc tới θ :

$$\vec{k}_{xy} = \vec{k}_0 \sin \theta \quad (3)$$

$\vec{G}_x$ và $\vec{G}_y$ là các vec-tơ mạng đảo theo trục x và y , được định nghĩa bởi:

$$\begin{aligned} \vec{G}_x &= \frac{2\pi}{P_x} \vec{i}_x \\ \vec{G}_y &= \frac{2\pi}{P_y} \vec{i}_y \end{aligned} \quad (4)$$

Trong trường hợp $P_x = P_y = P$, bước sóng cộng hưởng có thể được xấp xỉ như sau:

$$\lambda_{m,l} = \frac{P}{\sqrt{m^2 + l^2}} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_{Ag}}{\epsilon_d + \epsilon_{Ag}}} \quad (5)$$

trong đó, m, l lần lượt là bậc nhiễu xạ theo hướng x và y ; ϵ_d và ϵ_{Ag} mô tả hàm điện môi của môi trường xung quanh và kim loại Ag. Hiệu ứng plasmon bề mặt không định xứ phụ thuộc vào hàm điện môi của môi trường và kim loại, bậc nhiễu xạ và hằng số mạng của cấu trúc tuần hoàn.

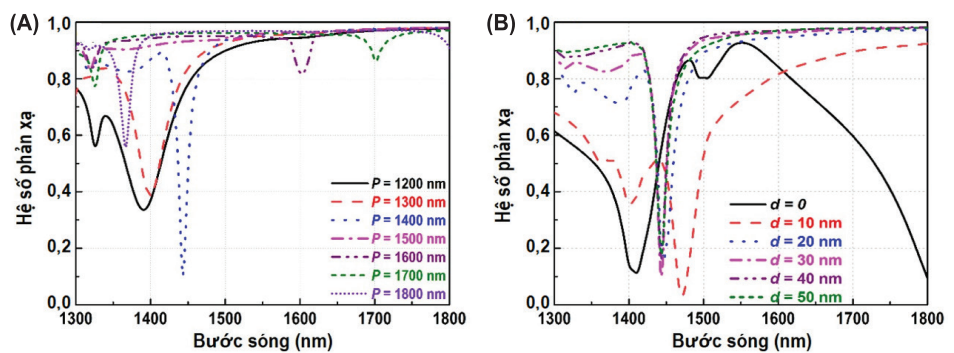
Cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ đối với cấu trúc nano Ag trong nghiên cứu này có thể được kích thích bởi ánh sáng có tần số (bước sóng) thích hợp. Tuy nhiên, việc dự đoán chính xác tần số (bước sóng) cộng hưởng là không thực tế. Các nghiên cứu về hiệu ứng plasmon bề mặt định xứ chỉ ra rằng, hiệu ứng này phụ thuộc mạnh vào mật độ điện

tử tự do tại bề mặt kim loại, hình dạng và kích thước của phân bố điện tích [11]. Theo cách đó, tần số (bước sóng) cộng hưởng và tính chất quang của cấu trúc tại cộng hưởng plasmon bề mặt sẽ thay đổi theo kích thước của phần tử kim loại, hình dạng của phần tử kim loại và môi trường điện môi xung quanh [12].

Bên cạnh các tính toán lý thuyết, để xem xét các đặc tính quang học của cấu trúc nano Ag đã được giới thiệu trong phần 1 dưới kích thích của sóng điện từ, các tính toán mô phỏng số cũng được thực hiện thông qua việc sử dụng phương pháp đạo hàm hữu hạn trong miền thời gian (Finite-Difference Time-Domain - FDTD) được tích hợp trong phần mềm thương mại Lumerical [13]. Đối với cấu trúc tuần hoàn 2D, đặc tính của cấu trúc có thể thu được từ một ô đơn vị với điều kiện biên phù hợp. Ô tính toán đơn vị cần được định nghĩa trước khi miền FDTD được xác định; kích thước của chúng phụ thuộc vào cấu hình nghiên cứu. Không gian tính toán được rời rạc hóa bằng phương pháp chia lưới đồng nhất với phần tử lưới có kích thước 1 nm. Đỉnh và đáy của miền FDTD được sử dụng lớp hấp thụ hoàn hảo (Perfect Matched Layers), cùng với các mặt xung quanh tuần hoàn (Periodic Condition). Nguồn sóng phẳng với phân cực điện trường theo phương x được sử dụng làm sóng tới. Phía trên và dưới cấu trúc, hai bộ thu được sử dụng để thu nhận ánh sáng (sóng điện từ) phản xạ và truyền qua cấu trúc.

3. Kết quả và bàn luận

Hình 2 mô tả phổ phản xạ của cấu trúc được đề xuất tại hình 1 dưới góc tới vuông góc mặt phẳng cấu trúc. Các tham số cấu trúc bao gồm đường kính cột polyme $D=1000$ nm, chiều cao cột polyme $h=800$ nm, độ dày lớp Ag $t=100$ nm và (i) độ dày lớp Ag bao xung quanh cột polyme $d=30$ nm và chu kỳ tuần hoàn P của cấu trúc có các giá trị 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700 và 1800 nm hoặc (ii) chu kỳ tuần hoàn $P=1400$ nm và độ dày lớp Ag bao xung quanh cột



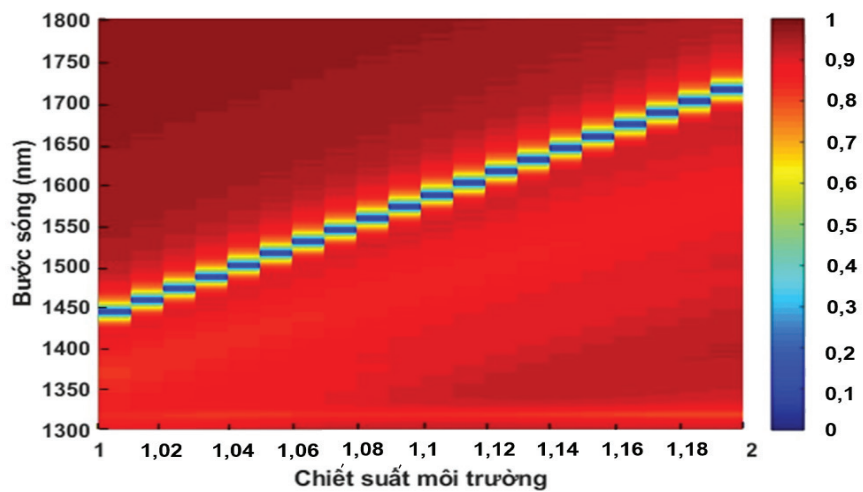
Hình 2. Phổ phản xạ của cấu trúc nano Ag tuần hoàn 2D được minh họa tại hình 1 dưới tác động của nguồn sáng tới vuông góc với mặt phẳng cấu trúc. (A) $D=1000$ nm, $d=30$ nm, $h=800$ nm, $t=100$ nm và P thay đổi trong khoảng 1200-1800 nm; (B) $D=1000$ nm, $P=1400$ nm, $h=800$ nm, $t=100$ nm và d thay đổi trong khoảng 0-50 nm.

polyme $d=0, 10, 20, 30, 40$ và 50 nm. Cấu trúc tuần hoàn 2D của các cột polyme để làm nền cho cấu trúc được nghiên cứu. Có thể nhận thấy tại hình 2A, tại mỗi chu kỳ P , phổ phản xạ của cấu trúc đều xuất hiện hai đáy tại đó độ phản xạ thấp hơn mức nền trung bình. Đặc tính này xuất phát từ cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ và không định xứ. Quan sát chi tiết cho thấy trên phổ phản xạ của cấu trúc tương ứng với tất cả các chu kỳ P được xem xét đều xuất hiện một vị trí cộng hưởng lân cận tại bước sóng 1325 nm và hầu như không thay đổi khi chu kỳ tuần hoàn P thay đổi. Kết quả này phù hợp với tính chất đã được trình bày phía trên của cộng hưởng plasmon bề mặt định xứ. Ngược lại, đáy cộng hưởng còn lại dịch chuyển sang vùng bước sóng lớn hơn khi chu kỳ tuần hoàn P của cấu trúc tăng lên. Phân tích chi tiết hơn cho thấy, các bước sóng cộng hưởng có xu hướng thay đổi tuyến tính với chu kỳ tuần hoàn, vị trí bước sóng cộng hưởng phù hợp với công thức. Điều này đưa tới kết luận rằng, bước sóng cộng hưởng này có nguồn gốc là các plasmon bề mặt không định xứ. Đối với các giá trị khác nhau của hằng số mạng, $P=1400$ nm mang lại phổ phản xạ với một đáy phản xạ rõ ràng, độ tương phản cao nhất tại bước sóng ~ 1443 nm.

Quan sát hình 2B nhận thấy, khi độ dày của lớp Ag bao quanh cột polyme thay đổi, phổ phản xạ của cấu trúc thay đổi. Lớp Ag xuất hiện, ngăn cản ánh sáng truyền qua, đồng thời làm thay đổi tính chất của hiệu ứng plasmon bề mặt do làm thay đổi phân bố của điện từ tự do. Điều này được thể hiện đặc biệt rõ ràng khi thông số này thay đổi từ 0 lên 10 nm, khi đó đáy cộng hưởng thứ 2 trong phổ phản xạ tại $d=0$ nm tại bước sóng ~ 1500 nm trở nên tương phản hơn và có xu hướng dịch về bước sóng ngắn hơn khi $d=10$ nm. Khi tiếp tục tăng độ dày lớp Ag d bao quanh cột polyme, có thể nhận thấy bước sóng cộng hưởng tiếp tục dịch về bước sóng ngắn, đạt giá trị ổn định với $d=30$ nm (khi độ dày lớp Ag tăng lên, phổ phản xạ của cấu trúc gần như không đổi). Bên cạnh đó, có thể nhận thấy, trong các độ dày lớp Ag được xem xét, $d=30$ nm cho phổ phản xạ với đáy cộng hưởng ổn định, tương phản cao, tách biệt khỏi nền phản xạ.

Vì vậy, cấu trúc với các thông số $P=1400$ nm, $t=100$ nm, $D=1000$ nm, $h=800$ nm và $d=30$ nm được lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo khi các chiết suất của môi trường xung quanh thay đổi.

Hình 3 mô tả phổ phản xạ của cấu trúc được đề xuất khi chiết suất môi trường xung quanh thay đổi từ $1,0$ đến $1,20$, tương ứng với môi trường khí - hơi. Trong phạm vi phổ được xem xét, một vị trí đáy phản xạ tương ứng với màu xanh



Hình 3. Bản đồ màu thể hiện sự thay đổi bước sóng cộng hưởng và hệ số phản xạ của cấu trúc nano Ag tuần hoàn 2D với các thông số $P=1400$ nm, $t=100$ nm, $h=800$ nm, $D=1000$ nm và $d=30$ nm khi chiết suất môi trường xung quanh thay đổi trong khoảng $1,0$ đến $1,2$. Màu xanh đậm và màu đỏ đậm mô tả tương ứng hệ số phản xạ đạt giá trị cực tiểu (~ 0) và giá trị cực đại (100%) trong chiết suất nghiên cứu.

đậm được quan sát khá rõ ràng. Có thể nhận thấy, vùng màu xanh đậm dịch chuyển lên trên khi chiết suất môi trường xung quanh tăng lên, điều này biểu thị sự dịch chuyển cộng hưởng sang bước sóng dài hơn. Ngoài ra, mỗi sự thay đổi nhỏ trong chiết suất của môi trường xung quanh dẫn đến sự dịch chuyển đáng kể của bước sóng cộng hưởng, điều này phù hợp cho ứng dụng cảm biến chiết suất có độ nhạy cao. Thêm vào đó, có thể nhận thấy cộng hưởng quan sát được có độ tương phản cao, như vậy đảm bảo hiệu suất của các linh kiện cảm biến khi hoạt động trong môi trường có nhiễu.

Bảng 1 liệt kê các thông số quang học của linh kiện cảm biến khi chiết suất thay đổi từ $1,0$ (không khí) đến $1,20$ (hơi nước), bước sóng cộng hưởng tương ứng cùng độ nhạy và hệ số phẩm chất. Độ nhạy, được định nghĩa bằng $S = \Delta\lambda/\Delta n$, thay đổi trong khoảng 1350 - 1500 nm/RIU cho khoảng chiết suất được xem xét với Δn và $\Delta\lambda$ là độ thay đổi chiết suất và độ dịch chuyển bước sóng tương ứng. Giá trị trung bình của độ nhạy tính toán được là $\sim 1423,7$ nm/RIU. Ngoài ra, một yếu tố quan trọng khác khi xem xét đến hoạt động của cảm biến đó là độ chọn lọc, được đánh giá bằng hệ số phẩm chất FOM. Thông số này được xác định tại vị trí cộng hưởng bởi tỷ số giữa độ nhạy và bán độ rộng của phổ cộng hưởng (FWHM) $FOM = S/FWHM$ [14] và thay đổi trong khoảng từ 99 đến 124 RIU⁻¹ đối với vùng chiết suất được nghiên cứu. Giá trị trung bình của thông số này khoảng $110,2$ RIU⁻¹ cho vùng chiết suất từ $1,0$ đến $1,20$. So sánh với kết quả công bố của T.K. Nguyen và cs (2017) [15] khi môi trường chiết suất tương đồng, cấu trúc cảm biến được đề xuất có độ nhạy cao hơn $\sim 1,3$ lần ($1423,7$ so với 1109 nm/RIU) và độ chọn lọc cao hơn $\sim 2,8$ lần ($110,2$ so với $38,8$ RIU⁻¹).

Bảng 1. Tính chất quang của linh kiện cảm biến khi chiết suất môi trường thay đổi 1,0-1,2.

Chiết suất (RIU)	Bước sóng cộng hưởng (nm)	Độ nhạy (nm/RIU)	Hệ số phẩm chất (RIU ⁻¹)
1,0	1442,9	-	-
1,01	1457,5	1460,0	123,73
1,02	1471,4	1390,0	106,60
1,03	1485,6	1417,0	126,07
1,04	1500,0	1444,0	115,52
1,05	1514,7	1473,0	115,53
1,06	1528,7	1393,0	107,32
1,07	1542,9	1420,0	117,07
1,08	1557,3	1446,0	107,35
1,09	1570,9	1359,0	108,11
1,10	1585,9	1499,0	107,30
1,11	1600,0	1410,0	108,13
1,12	1614,4	1435,0	108,06
1,13	1629,0	1461,0	118,97
1,14	1642,6	1363,0	99,13
1,15	1656,4	1385,0	99,00
1,16	1671,8	1539,0	118,93
1,17	1686,2	1435,0	99,17
1,18	1700,8	1461,0	121,35
1,19	1714,3	1350,0	99,19
1,20	1728,0	1371,0	110,12
Trung bình		1423,7	110,2

4. Kết luận

Bài báo trình bày cấu trúc nano Ag sắp xếp tuần hoàn 2D tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt vùng hồng ngoại gần bằng nghiên cứu lý thuyết và mô phỏng. Lý thuyết về hiệu ứng plasmon bề mặt, phương pháp số để giải bài toán điện từ của cấu trúc nano Ag đã được trình bày. Kết quả mô phỏng số với sự thay đổi của hằng số mạng và độ dày lớp Ag bao quanh cột polyme đã được trình bày, phân tích và kiểm chứng lý thuyết. Tiếp đó, sự thay đổi của hiện tượng cộng hưởng đối với chiết suất môi trường khí-hơi được nghiên cứu. Kết quả cho thấy, cấu trúc đề xuất có độ nhạy cao hơn ~1,3 lần và độ chọn lọc cao hơn ~2,8 lần so với một số cấu trúc tương tự được nghiên cứu trước đó. Cấu trúc mà bài báo đề xuất có triển vọng phát triển thành linh kiện plasmonic ứng dụng cho y sinh học hoạt động trong vùng hồng ngoại gần. Đây là hướng nghiên cứu mới mà nhóm tác giả là một trong số ít nhóm đang nghiên cứu tại Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài mã số USTH.AE.01/23-24. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.I. Stockman (2011), “Nanoplasmonics: Past, present, and glimpse into future”, *Opt. Express*, **19**(22), pp.22029-22106, DOI: 10.1364/OE.19.022029.
- [2] S.A. Maier (2007), *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer, 234pp.
- [3] Y. Cheng, Z. Li, Z. Cheng (2021), “Terahertz perfect absorber based on InSb metasurface for both temperature and refractive index sensing”, *Opt. Mater.*, **117**, DOI: 10.1016/j.optmat.2021.111129.
- [4] A. Prasad, J. Choi, Z. Jia, et al. (2019) “Nanohole array plasmonic biosensors: Emerging point-of-care applications”, *Biosens. Bioelectron.*, **130**, pp.185-203, DOI: 10.1016/j.bios.2019.01.037.
- [5] Y. Yanase, T. Hiragun, T. Yanase, et al. (2013), “Application of SPR imaging sensor for detection of individual living cell reactions and clinical diagnosis of type I allergy”, *Allergol. Int.*, **62**(2), pp.163-169, DOI: 10.2332/allergolint.12-RA-0505.
- [6] E. Mauriz, A. Calle, J.J. Manclús, et al. (2007), “Multi-analyte SPR immunoassays for environmental biosensing of pesticides”, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**(4), pp.1449-1458, DOI: 10.1007/s00216-006-0800-z.
- [7] J.F. Li, C.Y. Li, R.F. Aroca (2017), “Plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy”, *Chem. Soc. Rev.*, **46**(13), pp.3962-3979, DOI: 10.1039/C7CS00169.
- [8] S.V. Boriskina, H. Ghasemi, G. Chen (2013), “Plasmonic materials for energy: From physics to applications”, *Mater. Today*, **16**(10), pp.375-386, DOI: 10.1016/j.mattod.2013.09.003.
- [9] W.L. Barnes, A. Dereux, T.W. Ebbesen (2003), “Surface plasmon subwavelength optics”, *Nature*, **424**(6950), pp.824-830, DOI: 10.1038/nature01937.
- [10] T. Maurer, P.M. Adam, G. Lévêque (2015), “Coupling between plasmonic films and nanostructures: From basics to applications”, *Nanophotonics*, **4**(3), pp.363-382, DOI: 10.1515/nanoph-2014-0015.
- [11] K.L. Kelly, E. Coronado, L.L. Zhao, et al. (2003), “The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment”, *J. Phys. Chem. B*, **107**(3), pp.668-677, DOI: 10.1021/jp026731y.
- [12] M.C. Daniel, D. Astruc (2004), “Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology”, *Chem. Rev.*, **104**(1), pp.293-346.
- [13] A. Taflove, S.C. Hagness, M.P. May (2005), *Computational Electromagnetics: The Finite-Difference Time-Domain Method (Electrical Engineering Handbook)*, Elsevier, pp.629-670, DOI: 10.1016/B978-012170960-0/50046-3.
- [14] T.T. Hoang, T.S. Pham, X.B. Nguyen, et al. (2022), “High contrast and sensitive near-infrared refractive index sensors based on metal-dielectric-metal plasmonic metasurfaces”, *Phys. B Condens. Matter*, **631**, DOI: 10.1016/j.physb.2021.413469.
- [15] T.K. Nguyen, T.D. Le, P.T. Dang, et al. (2017), “Asymmetrically engineered metallic nanodisk clusters for plasmonic Fano resonance generation”, *J. Opt. Soc. Am. B*, **34**(3), DOI: 10.1364/JOSAB.34.000668.

Bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào chủng nấm sợi thực phẩm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Thái Hạnh Dung¹, Trịnh Thị Minh¹, Ngô Ánh Ngọc¹, Nguyễn Thị Ngân Giang¹, Trần Văn Tuấn^{1, 2*}

¹Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/7/2024; ngày chuyển phân biện 4/7/2024; ngày nhận phân biện 9/8/2024; ngày chấp nhận đăng 19/8/2024

Tóm tắt:

Aspergillus luchuensis là loài nấm sợi nổi tiếng trong công nghiệp sản xuất rượu truyền thống tại Nhật Bản. Đây là loài nấm sợi an toàn và không sinh độc tố nấm. Nấm sợi *A. luchuensis* có khả năng sử dụng nhiều loại cơ chất giá rẻ và sinh tổng hợp nhiều loại enzyme có giá trị như amylase, protease, xylanase. Tuy nhiên, các nghiên cứu về cải biến di truyền ở *A. luchuensis* vẫn còn tương đối hạn chế, đặc biệt là tại Việt Nam. Nghiên cứu này giới thiệu chủng *A. luchuensis* AL1 có nguồn gốc từ thực phẩm, được phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và phân tích trình tự ba vùng gen độc lập gồm ITS của rDNA, gen β -tubulin (*benA*) và calmodulin (*CaM*). Bước đầu nghiên cứu này đã thành công trong chuyển gen vào *A. luchuensis* AL1 nhờ sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và gen kháng hygromycin B. Hiệu suất chuyển gen đạt 40 thể chuyển gen/10⁶ bào tử nấm và không xuất hiện các khuẩn lạc dương tính giả. Với phương pháp chuyển gen này, chủng *A. luchuensis* AL1 đã được tích hợp thành công thêm gen mã hóa protein huỳnh quang xanh (GFP) dưới sự điều hòa của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans*. Phân tích các chủng chuyển gen GFP dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy sự biểu hiện mạnh của protein GFP ở toàn hệ sợi của nấm.

Từ khoá: *Aspergillus luchuensis*, chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, gen kháng hygromycin B, huỳnh quang xanh (GFP).

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.10, 4.6

A preliminary study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the food filamentous fungus *Aspergillus luchuensis* AL1

Hanh Dung Thai¹, Thi Minh Trinh¹, Anh Ngoc Ngo¹, Thi Ngan Giang Nguyen¹, Van Tuan Tran^{1, 2*}

¹Genomics Unit, National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Department of Microbiology, Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 1 July 2024; revised 9 August 2024; accepted 19 August 2024

Abstract:

Aspergillus luchuensis is a filamentous fungus renowned in the traditional alcohol production industry in Japan. This species has been proven to be safe and does not produce fungal toxins. The *A. luchuensis* fungus is capable of utilising various inexpensive substrates and synthesising many valuable enzymes such as amylase, protease, and xylanase. However, research on genetic modification in *A. luchuensis* remains relatively limited, especially in Vietnam. This study introduced an *A. luchuensis* AL1 strain derived from food, which was classified based on morphological characteristics and sequence analysis of three independent gene regions, including the ITS of rDNA, β -tubulin (*benA*) gene, and calmodulin (*CaM*) gene. Initial research on gene transfer into *A. luchuensis* AL1 using *Agrobacterium tumefaciens* and the hygromycin B resistance gene has been successful. The efficiency of genetic transformation reached 40 transformants per 10⁶ fungal spores, and no false-positive colonies were observed. With this gene transfer method, the gene encoding green fluorescent protein (GFP), regulated by the *gpdA* promoter from *Aspergillus nidulans*, was successfully transferred into the *A. luchuensis* AL1 strain. Analysis of the GFP-tagged transformants under a fluorescence microscope showed strong expression of the GFP protein in the fungal mycelia.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT), *Aspergillus luchuensis*, green fluorescent protein (GFP), hygromycin B antibiotic resistance gene.

Classification numbers: 1.6, 2.10, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: tuantran@vnu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Nấm *Aspergillus luchuensis* đã được sử dụng rộng rãi trong quá trình sản xuất hai loại rượu chưng cất truyền thống của Nhật Bản là rượu shochu và rượu awamori. Ngoài ra, *A. luchuensis* cũng được dùng để sản xuất rượu sake, rượu gạo, makgeolli, meju, tương đậu nành và nước tương ở Trung Quốc và Hàn Quốc [1, 2]. Nấm sợi *A. luchuensis* tiết ra nhiều loại enzyme giúp thủy phân các nguyên liệu thô như gạo, lúa mì, khoai lang thành đường, phù hợp cho lên men rượu. Bên cạnh đó, *A. luchuensis* cũng tiết lượng lớn axit citric vào môi trường nuôi cấy, giúp duy trì pH thấp và hạn chế vấn đề tạp nhiễm vi sinh vật khác trong quá trình lên men [3]. Nấm *A. luchuensis* có các đặc điểm hình thái tương tự với *Aspergillus niger* và *Aspergillus tubingensis* trong cùng phân nhóm *Aspergillus* đen Nigri. Tuy nhiên, cụm gen tham gia vào sinh tổng hợp các loại độc tố nấm (mycotoxin) như ochratoxin A và fumosinin B2 không có mặt trong hệ gen của *A. luchuensis* khi so sánh với nấm *A. niger*. Điều này xác nhận sự an toàn của nấm *A. luchuensis* trong sản xuất thực phẩm và đồ uống [2].

Hiện nay, việc thực hiện cải biến di truyền đối với nấm *A. luchuensis* vẫn còn tương đối hạn chế. Một số nghiên cứu về CRISPR/Cas9 trong bất hoạt gen, chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast), hay chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) đã được áp dụng ở *A. luchuensis*. Trong đó, các marker chọn lọc thường được sử dụng là gen kháng kháng sinh như hygromycin B, phleomycin. Tuy nhiên, các thể chuyển gen thường kém bền khi cấy truyền và chỉ đạt khoảng 21% thể chuyển gen bền thông qua hệ thống CRISPR/Cas9 khi gen kháng hygromycin B được lựa chọn làm marker chọn lọc [4]. Phương pháp chuyển gen ATMT được cho là có lợi thế hơn trong chuyển gen ở nấm sợi nhờ hiệu quả chuyển gen cao, giá thành rẻ do không cần phải tạo tế bào trần và vùng T-DNA được tích hợp bền vào trong hệ gen của vật chủ [5]. Gần đây, các hệ thống chuyển gen hiệu suất cao sử dụng phương pháp ATMT cho nấm *A. niger* đã được phát triển [6, 7]. Đặc biệt, sự xuất hiện của các thể chuyển gen dương tính giả ở các chủng *A. niger* khác nhau đã bị ức chế đáng kể nhờ kỹ thuật phủ màng [6]. Nghiên cứu này đã cho thấy việc sử dụng phương pháp ATMT để cải biến di truyền ở nấm *A. luchuensis* với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B với kỹ thuật phủ màng rất hiệu quả. Chúng tôi cũng đã thực hiện thành công việc biểu hiện protein huỳnh quang xanh (GFP) ở nấm *A. luchuensis* AL1.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng nấm sợi *A. luchuensis* AL1 có nguồn gốc từ thực phẩm được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống của Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym

và Protein. Chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 chứa plasmid Ti siêu độc lực (plasmid pTiBo542 với các gen *vir* bổ sung từ chủng *Ag. tumefaciens* A281) với phạm vi vật chủ rộng và hiệu suất chuyển gen cao được sử dụng cho các thí nghiệm chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT [8].

Vector nhị thể pGreen2 bao gồm gen kháng kháng sinh hygromycin dưới sự điều hoà của promoter *gpdA* từ nấm *Aspergillus nidulans* và đoạn gen mã hoá protein huỳnh quang xanh GFP dưới sự điều hoà của promoter *gpdA* từ nấm *A. nidulans*. Vector pGreen2 được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein [9].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu bào tử nấm

Chủng nấm sợi *A. luchuensis* AL1 được nuôi trên môi trường PDA (potato dextrose agar) trong 5 ngày ở 30°C. Nước cất vô trùng được bổ sung lên bề mặt đĩa và bào tử được tách ra khỏi hệ sợi nấm nhờ que gạt vô trùng. Hỗn hợp dịch thu được từ đĩa nuôi cấy được lọc qua màng Miracloth (Đức) và ly tâm trong 15 phút với tốc độ 4000 vòng/phút. Bào tử nấm AL1 trong phần cặn ly tâm được tiếp tục rửa thêm 2 lần với nước cất vô trùng và được pha về nồng độ 10⁶ bào tử/ml phục vụ các thí nghiệm kế tiếp.

2.2.2. Xác định đặc điểm hình thái của chủng *Aspergillus luchuensis* AL1

5 µl dịch bào tử của chủng AL1 ở nồng độ 10⁶ bào tử/ml được nhỏ lên môi trường CYA (Czapek Yeast Extract Agar) (0,5% cao nấm men, 3% sucrose; 0,3% NaNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄·7H₂O; 0,001% FeSO₄·7H₂O; 0,005% CuSO₄·5H₂O; 0,001% ZnSO₄·7H₂O; 2% agar; pH 5,5) để quan sát hình thái hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử. Mẫu được nuôi ở 30°C trong 4 ngày.

2.2.3. Định danh chủng *Aspergillus luchuensis* AL1 bằng giải trình tự

DNA hệ gen của chủng *A. luchuensis* AL1 được tách chiết từ hệ sợi nấm [9]. Khuếch đại vùng trình tự ITS, β-tubulin (*benA*) và calmodulin (*CaM*) từ DNA hệ gen với các cặp mồi đặc hiệu (ITS1/ITS4 dùng cho khuếch đại đoạn ITS, Bt2a/Bt2b dùng cho khuếch đại đoạn gen *benA*, Cmd5/Cmd6 dùng cho khuếch đại đoạn gen *CaM*) và tinh sạch (bảng 1). Vùng ITS, β-tubulin và calmodulin được giải trình tự bởi 1st BASE (Singapore) và được phân tích, so sánh với dữ liệu GenBank. Từ các thông tin thu được, cây phát sinh chủng loại được xây dựng nhờ phần mềm MEGA11, dựa trên phương pháp Neighbor Joining với mô hình sao chép mẫu (bootstrap) 1000 lần.

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nguồn tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[10]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Bt2a	GGTAACCAAAATCGGTGCTGCTTTC	[11]
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
Cmd5	CCGAGTACAAGGAGGCCTTC	[12]
Cmd6	CCGATAGAGGTCATAACGTGG	
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	[9]
GFP-R	TCACTGTACAGCTCGTCCATGC	

2.2.4. Đánh giá mức độ miễn dịch của chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 với kháng sinh hygromycin B

10 µl dịch bào tử nấm ở nồng độ 10^6 bào tử/ml được nhỏ lên môi trường CDA (Czapek Dox Agar) (3% sucrose; 0,3% NaNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 0,001% FeSO₄.7H₂O; 0,005% CuSO₄.5H₂O; 0,001% ZnSO₄.7H₂O; 2% agar; pH 5,5) đã được thêm 300, 600 và 900 mg/l kháng sinh hygromycin B và nuôi cấy trong 5 ngày ở 30°C. Nồng độ kháng sinh hygromycin B ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của chủng nấm *A. luchuensis* AL1 sẽ được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen.

2.2.5. Chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 và xác nhận các thể chuyển gen

Việc chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1 được thực hiện tương tự với chuyển gen nhờ vi khuẩn *Ag. tumefaciens* vào nấm *A. niger* sử dụng kỹ thuật phủ màng [6]. Vector nhị thể pGreen2 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 bằng xung điện. Bổ sung 200 ng vector pGreen2 vào ống chứa sẵn 50 µl tế bào AGL1 khả biến, trộn nhẹ và chuyển toàn bộ hỗn hợp sang cuvet 2 mm cấm trên đá. Đặt cuvet vào buồng dung hợp của hệ thống chuyển gen bằng xung điện Gene Pulse Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad, Hoa Kỳ) và kích hoạt xung điện với các thông số 2500 V, 400 Ω và 25 µF. Thêm vào cuvet biến nạp 500 µl môi trường LB (Luria Bertani) lỏng và trộn đều. Tiến hành nuôi lắc hỗn hợp chứa AGL1 đã biến nạp trong 1 giờ ở 28°C với tốc độ 200 vòng/phút. Sau 1 giờ, dịch nuôi được ly tâm trong 20 giây ở tốc độ 8000 vòng/phút. Tiến hành cấy trải phần cấy ly tâm trên đĩa LB có bổ sung kháng sinh kanamycin ở nồng độ 100 mg/l và nuôi cấy 2-3 ngày ở 28°C. Các khuẩn lạc được kiểm tra đã nhận được vector pGreen2 nhờ PCR với cặp mồi dùng cho khuếch đại đoạn gen mã hoá protein huỳnh quang xanh: GFP-F/GFP-R.

Vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 đã được xác nhận là mang vector pGreen2 được sử dụng để thực hiện chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1. Vi khuẩn và bào tử nấm (nồng độ 10^6 bào tử/ml) được đồng nuôi cấy trên môi trường IM (Induction Medium) có chứa 200 µM acetosyringone (AS) trong 60 giờ ở 20°C. Màng giấy lọc cellulose được chuyển sang môi trường chọn lọc CDA bổ sung kháng

sinh hygromycin B (300 mg/l) và kháng sinh cefotaxime (300 mg/l). 10 ml môi trường CDA có hygromycin B và cefotaxime tiếp tục được đổ lên màng cellulose. Tiếp tục sàng lọc trên môi trường CDA có chứa hygromycin B (300 mg/l) các khuẩn lạc nấm xuất hiện trên môi trường chọn lọc sau 4 ngày ủ ở 30°C.

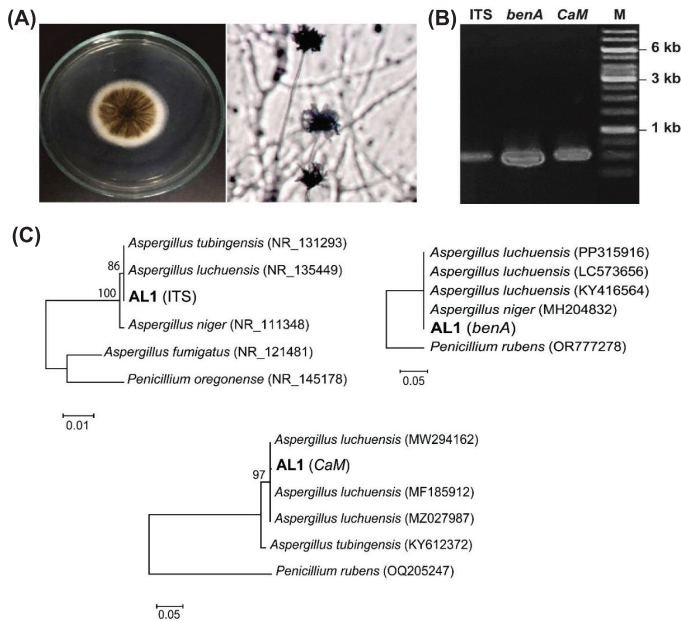
Các thể chuyển gen kháng kháng sinh hygromycin sau đó được thuần khiết và nuôi cấy để tách chiết DNA tổng số. Sự tích hợp của cấu trúc biểu hiện protein GFP vào hệ gen nấm được kiểm tra nhờ PCR với cặp mồi GFP-F/GFP-R. Sự biểu hiện của protein GFP ở hệ sợi của các thể chuyển gen được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xác định chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1

Sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường CYA, chủng AL1 đã sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng và bào tử màu đen (hình 1A). Quan sát dưới kính hiển vi, hệ sợi của nấm AL1 bao gồm cấu trúc sợi phân nhánh, cấu trúc sinh bào tử dạng hoa cúc (hình 1A). Các đặc điểm trên tương đồng với các đặc điểm của nấm *Aspergillus* thuộc phân nhóm Nigri [13].

Do các đặc điểm hình thái của *A. luchuensis* tương tự với *A. niger* và *A. tubingensis* trong phân nhóm Nigri nên rất khó phân biệt các loài này với nhau nếu dựa trên đặc điểm kiểu hình [3]. Phân tích tổng hợp các trình tự rDNA-ITS, β-tubulin, calmodulin cho thấy các chủng *A. luchuensis* khác biệt với *A. tubingensis* và *A. niger* [14]. Chúng tôi tiếp tục định danh dựa trên trình tự của 3 vùng gen bảo thủ: trình tự vùng ITS của rDNA, trình tự gen β-tubulin (*benA*) và gen calmodulin (*CaM*). Kể từ năm 2012, trình tự vùng ITS được chấp nhận là mã vạch DNA chính thức dùng cho phân loại nấm. Tuy nhiên, trình tự vùng ITS không đủ để xác định chính xác tất cả các loài nấm thuộc chi *Aspergillus* và do đó, cần phải có các marker thứ cấp để phân loại. Vì lý do này, calmodulin, β-tubulin hoặc tiêu đơn vị lớn thứ hai RNA polymerase II (*rpb2*) đã được đề xuất làm các marker thứ cấp. Gen *rpb2* không dễ khuếch đại, khiến việc sử dụng nó như một marker thứ cấp tương đối khó khăn đối với một số loài nấm. Gen *benA* rất dễ khuếch đại, nhưng đã được báo cáo là có sự khác nhau về số lượng intron và đôi khi thực hiện phản ứng PCR dẫn đến việc khuếch đại các gen paralogous [15]. Mặt khác, *CaM* rất dễ khuếch đại và có thể dùng để phân biệt giữa hầu hết tất cả các loài nấm thuộc chi *Aspergillus*. Ngoài ra, cơ sở dữ liệu về trình tự *CaM* gần như hoàn chỉnh cho tất cả các loài được chấp nhận. Nói chung, để có thể xác định chính xác loài thuộc chi *Aspergillus* và *Penicillium*, các gen *benA* và *CaM* thường được lựa chọn để có thể cung cấp các thông tin tốt hơn [14]. Thông tin về trình tự ITS, *benA* và *CaM* được so sánh với dữ liệu trên GenBank. Các thông tin thu được đã cho phép xây dựng cây phát sinh chủng loại (hình 1C).

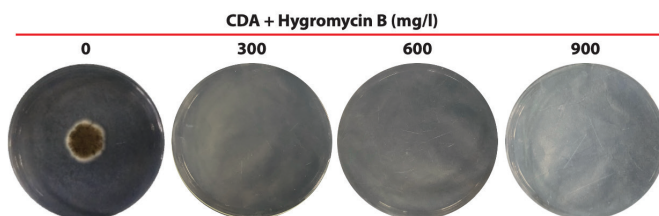


Hình 1. Đặc điểm hình thái, cấu trúc sinh bào tử và định danh chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 dựa trên trình tự vùng ITS, gen *benA* và *CaM*. (A) Hình thái chủng nấm AL1 nuôi cấy trên CYA sau 4 ngày ở 30°C và cấu trúc sinh bào tử quan sát dưới kính hiển vi; (B) Kết quả khuếch đại vùng ITS, gen *benA* và *CaM* nhờ PCR của chủng AL1; (C) Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự của vùng ITS, gen *benA* và *CaM*. M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

Kết quả cho thấy nấm AL1 là *A. luchuensis* với độ tương đồng là 100%. Trước đây, *A. luchuensis* được gộp chung vào *A. niger*. Tuy nhiên, đến năm 2014, *A. luchuensis* (cũng từng được đặt tên là *A. awamori*) được tách ra [13].

3.2. Chủng nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 miễn cảm với kháng sinh hygromycin B

Kháng sinh hygromycin B được lựa chọn để sử dụng cho chuyển gen vào nấm *A. luchuensis*. Khả năng sinh trưởng của chủng nấm *A. luchuensis* AL1 trên môi trường với các nồng độ kháng sinh hygromycin B: 0, 300, 600, 900 mg/l đã được đánh giá nhằm lựa chọn nồng độ kháng sinh thích hợp cho chuyển gen. Kể từ nồng độ 300 mg/l, chủng *A. luchuensis* AL1 bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn (hình 2).



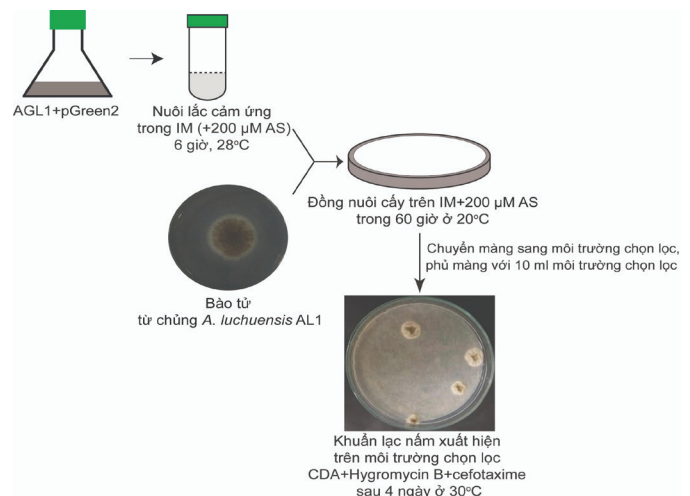
Hình 2. Mức độ miễn cảm của *Aspergillus luchuensis* AL1 với kháng sinh hygromycin B. Chủng *Aspergillus luchuensis* AL1 được nuôi trên CDA bổ sung hygromycin B với các nồng độ (0, 300, 600 và 900 mg/l) trong 5 ngày ở 30°C.

Hygromycin B là một trong những kháng sinh phổ biến trong các nghiên cứu chuyển gen vào cả thực vật và nấm. Hygromycin B (HmB) được phân lập từ xạ khuẩn *Streptomyces hygroscopicus* và *Escherichia coli* là kháng sinh thường được sử dụng nhằm ức chế quá trình sinh tổng hợp polypeptide bằng cách cố định tRNA-ribosomal và ức chế dịch mã [16]. Cassette kháng kháng sinh hygromycin B bắt nguồn từ vector pAN7-1 được sử dụng rộng rãi cho chuyển gen vào nấm sợi. Cassette này chứa trình tự của vùng promoter từ nấm *A. nidulans* glyceraldehyde dehydrogenase (*gpdA*), khung đọc mở của gen kháng kháng sinh hygromycin B và vùng terminator anthranilate synthase (*trpC*) [17]. Vector pGreen2 cung cấp bởi phòng Genomic dùng cho chuyển gen cũng có cassette kháng kháng sinh hygromycin B tương tự (hình 4B).

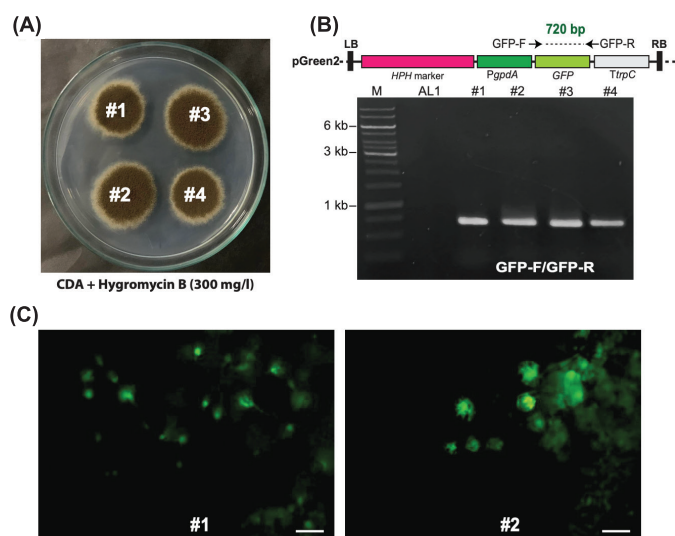
Nồng độ kháng sinh hygromycin B dùng cho chọn lọc các thể chuyển gen đối với nấm sợi *A. niger* dao động từ 300-900 mg/l, tùy thuộc vào khả năng miễn cảm với kháng sinh của chủng nấm khảo sát [6, 18]. 300 mg/l cũng là nồng độ kháng sinh hygromycin B được sử dụng cho chuyển gen vào nấm *Colletotrichum gloeosporioides* [19]. Trong nghiên cứu này, chủng nấm AL1 bị ức chế sinh trưởng hoàn toàn khi 300 mg/l kháng sinh hygromycin B được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Như vậy, 300 mg/l là nồng độ hygromycin B được sử dụng để nghiên cứu chuyển gen vào *A. luchuensis* AL1.

3.3. Chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Quá trình chuyển cấu trúc biểu hiện protein huỳnh quang xanh GFP vào nấm *A. luchuensis* được mô tả như trong hình 3. Sau 4 ngày ở 30°C, 4 khuẩn lạc đã quan sát được trên màng giấy lọc (hình 3). Các khuẩn lạc này sau đó được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung kháng sinh hygromycin B (300 mg/l) và cả 4 thể chuyển gen này đều kháng kháng sinh hygromycin B (hình 4A).



Hình 3. Sơ đồ chuyển gen vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp ATMT.



Hình 4. Chuyển gen huỳnh quang vào nấm *Aspergillus luchuensis* AL1. (A) Sàng lọc các thể chuyển gen trên môi trường CDA bổ sung hygromycin B (300 mg/l); (B) Sơ đồ vùng T-DNA của vector pGreen2, vị trí bám mỗi GFP-F/GFP-R và xác nhận các thể chuyển gen nhờ PCR với cặp mồi GFP-F/GFP-R; (C) Sự biểu hiện của protein huỳnh quang xanh GFP ở các chủng chuyển gen; M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ).

Sau khi đồng nuôi cấy vi khuẩn và nấm trong 60 giờ ở 22°C, màng giấy lọc được chuyển sang môi trường CDA có bổ sung kháng sinh hygromycin B (300 mg/l) và một lớp mỏng môi trường chọn lọc có kháng sinh hygromycin B được phủ lên màng giấy lọc (phủ màng) nhằm hạn chế hiện tượng dương tính giả. Ở nấm sợi *A. niger*, khi tiến hành chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B, một số thể chuyển gen xuất hiện trên màng chuyển gen nhưng không thể sinh trưởng được khi sàng lọc trên môi trường có bổ sung hygromycin B [6]. Việc bổ sung thêm một lượng môi trường lên trên màng giấy lọc đã giúp chọn lọc các thể chuyển gen và ức chế hiện tượng dương tính giả ở nấm *A. niger*. Hiệu suất chuyển gen khi tiến hành phủ màng tăng lên từ 10-20 lần ở *A. niger* [18]. Trong nghiên cứu này, hiệu quả chuyển gen ở nấm *A. luchuensis* đạt 40 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử và tất cả các thể chuyển gen xuất hiện trên màng đều kháng kháng sinh hygromycin B, không thấy xuất hiện hiện tượng dương tính giả (hình 4A).

Bên cạnh đó, hiệu quả chuyển gen vào nấm sử dụng phương pháp ATMT phụ thuộc vào nhiều yếu tố, chẳng hạn như vật chủ, chủng *Ag. tumefaciens*, nồng độ AS, thời gian và nhiệt độ đồng nuôi cấy... AS được sử dụng để kích thích quá trình cảm ứng các gen *vir* và kích hoạt quá trình chuyển T-DNA. Vì vậy, nồng độ AS có ảnh hưởng rất lớn đối với hiệu quả chuyển gen ở nhiều loài nấm và nồng độ AS tối ưu khác biệt ở các chủng nấm [20, 21]. Nếu không bổ sung AS trong quá trình chuyển gen ở nấm *Aspergillus terreus* thì hiệu quả chuyển gen rất thấp hoặc chuyển gen không thành

công [18]. Lượng AS là một trong các nhân tố đóng vai trò quyết định tới số lượng các thể chuyển gen đối với loài nấm *A. awamori* [22]. Trong một số nghiên cứu chuyển gen hiệu quả cao ở nấm *A. niger*, *A. oryzae* trước đó, 200 μ M được lựa chọn là nồng độ AS trong môi trường đồng nuôi cấy và hiệu quả chuyển gen có thể đạt 1060 ± 143 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử [6, 7, 23]. Một số thông số như đồng nuôi cấy ở 22°C, đồng nuôi cấy trong 60 giờ đã được xác định là các thông số tối ưu cho chuyển gen sử dụng phương pháp ATMT ở *A. niger* khuyết dưỡng histidine [7]. Ngoài ra, sử dụng vector pGreen2 cho chuyển gen vào nấm *A. niger* cho hiệu quả chuyển gen đạt 87 ± 18 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử [6]. Áp dụng các thông số cho chuyển gen với nấm *A. niger* để thực hiện cải biến di truyền ở loài nấm sợi *A. luchuensis*, hiệu quả chuyển gen đạt tới 40 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử.

Các thể chuyển gen xuất hiện trên màng giấy lọc được kiểm tra sự có mặt của gen mã hoá protein huỳnh quang GFP thông qua PCR. Có thể quan sát thấy sản phẩm 720 bp ở tất cả các thể chuyển gen, tương ứng với kích thước của gen GFP (hình 4A). Sự biểu hiện của protein GFP trong hệ sợi và bào tử nấm được đánh giá bằng cách quan sát các thể chuyển gen này dưới kính hiển vi huỳnh quang (hình 4C). Tín hiệu rõ ràng màu xanh lá cây đã khẳng định rằng gen mã hoá protein huỳnh quang GFP đã được tích hợp vào hệ gen của nấm *A. luchuensis* AL1 sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin B.

Sự tích hợp ngẫu nhiên T-DNA nhờ vi khuẩn *Agrobacterium* vào hệ gen nấm đã được ứng dụng để xác định, phân lập các đột biến với các kiểu hình mong muốn, từ đó khám phá được chức năng gen hoặc dùng để sàng lọc các chủng có đặc tính tốt phục vụ cho sản xuất công nghiệp một số sản phẩm có giá trị kinh tế. Thông qua việc gây đột biến chèn ngẫu nhiên, có thể thu được các thể đột biến *Penicillium digitatum* không gây bệnh hoặc giảm độc tính trên quả có múi, hoặc các chủng tăng sản xuất chitinase ở nấm *Purpureocillium lilacinum* [24, 25]. Các thể chuyển gen *A. luchuensis* tạo ra trong nghiên cứu này sẽ tiếp tục được kiểm tra các đặc tính chống chịu stress, khả năng sinh enzyme, khả năng phân giải các hợp chất...

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, việc chuyển gen vào chủng nấm sợi thực phẩm *A. luchuensis* AL1 với phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Ag. tumefaciens* đã bước đầu thành công. Hiệu suất chuyển gen vào chủng *A. luchuensis* AL1 đạt 40 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử và không có hiện tượng khuẩn lạc dương tính giả khi sử dụng marker chọn lọc là gen kháng hygromycin. Nghiên cứu cũng xác nhận sự hiệu quả của promoter *gpdA* từ *A. nidulans* trong điều hòa biểu hiện gen huỳnh quang GFP cung cấp ở nấm sợi *A. luchuensis*. Các chủng chuyển gen GFP cho tín hiệu huỳnh quang xanh rõ ràng ở toàn hệ sợi nấm khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan của hãng Carl Zeiss, Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Hayashi, Y. Kajiura, T. Futagami, et al. (2021), "Making traditional Japanese distilled liquor, shochu and awamori, and the contribution of white and black koji fungi", *Journal of Fungi*, **7**(7), DOI: 10.3390/jof7070517.
- [2] J.M. Mogensen, J. Varga, U. Thrane, et al. (2009), "*Aspergillus acidus* from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B2", *International Journal of Food Microbiology*, **132**(2-3), pp.141-144, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.011.
- [3] S.B. Hong, M. Lee, D.H. Kim, et al. (2013), "*Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia", *PLOS ONE*, **8**(5), DOI: 10.1371/journal.pone.0063769.
- [4] C. Kadooka, M. Yamaguchi, K. Okutsu, et al. (2020), "A CRISPR/Cas9-mediated gene knockout system in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **84**(10), pp.2179-2183, DOI: 10.1080/09168451.2020.1792761.
- [5] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J.V.D. Hondel, et al. (2005), "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi", *Current Genetics*, **48**(1), pp.1-17, DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0.
- [6] H.D. Thai, M.T. Trinh, L.T.B.X. Do, et al. (2024), "Gene function characterization in *Aspergillus niger* using a dual resistance marker transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens*", *Journal of Microbiological Methods*, **224**, DOI: 10.1016/j.mimet.2024.106989.
- [7] H.D. Thai, L.T.B.X. Do, X.T. Nguyen, et al. (2023), "A newly constructed *Agrobacterium*-mediated transformation system based on *hisB* auxotrophic marker for genetic manipulation in *Aspergillus niger*", *Archives of Microbiology*, **205**, DOI: 10.1007/s00203-023-03530-y.
- [8] S.G. Jin, T. Komari, M.P. Gordon, et al. (1987), "Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281", *Journal of Bacteriology*, **169**(10), pp.4417-4425, DOI: 10.1128/jb.169.10.4417-4425.1987.
- [9] T.K. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, et al. (2016), "The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.
- [10] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322.
- [11] N.L. Glass, G.C. Donaldson (1995), "Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes", *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(4), pp.1323-1330, DOI: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.
- [12] S.B. Hong, S.J. Go, H.D. Shin, et al. (2005), "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species", *Mycologia*, **97**(6), pp.1316-1329, DOI: 10.3852/mycologia.97.6.1316.
- [13] S.B. Hong, O. Yamada, R.A. Samson (2014), "Taxonomic re-evaluation of black koji molds", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, pp.555-561, DOI: 10.1007/s00253-013-5332-9.
- [14] R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbaken, et al. (2014), "Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*", *Studies in Mycology*, **78**, pp.141-173, DOI: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- [15] S.W. Peterson (2008), "Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci", *Mycologia*, **100**(2), pp.206-226, DOI: 10.3852/mycologia.100.2.205.
- [16] P.J. Punt, C.A.V.D. Hondel (1992), "Transformation of filamentous fungi based on hygromycin B and phleomycin resistance markers", *Methods in Enzymology*, **216**, pp.447-457, DOI: 10.1016/0076-6879(92)16041-h.
- [17] P.J. Punt, R.P. Oliver, M.A. Dingemans, et al. (1987), "Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*", *Gene*, **56**(1), pp.117-124, DOI: 10.1016/0378-1119(87)90164-8.
- [18] S.M. Park (2001), "Improved transformation of the filamentous fungus *Aspergillus niger* using *Agrobacterium tumefaciens*", *Mycobiology*, **29**(3), pp.132-134, DOI: 10.1080/12298093.2001.12015774.
- [19] T.X. Vu, T.B. Tran, M.B. Tran, et al. (2023), "Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains", *Heliyon*, **9**(2), DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13663.
- [20] D. Li, Y. Tang, J. Lin, et al. (2017), "Methods for genetic transformation of filamentous fungi", *Microbial Cell Factories*, **16**, DOI: 10.1186/s12934-017-0785-7.
- [21] D. Wang, D. He, G. Li, et al. (2014), "An efficient tool for random mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*", *Journal of Microbiological Methods*, **98**, pp.114-118, DOI: 10.1016/j.mimet.2014.01.007.
- [22] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J.V.D. Hondel, et al. (2008), "*Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*", *Nature Protocols*, **3**(10), pp.1671-1678, DOI: 10.1038/nprot.2008.154.
- [23] T.K. Nguyen, N.Q. Ho, T.B.X.L. Do, et al. (2017), "A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33**(6), DOI: 10.1007/s11274-017-2275-9.
- [24] X.T. Vu, T.T. Ngo, T.D.L. Mai, et al. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.
- [25] C.T. Binh, H.D. Thai, B.T.V. Ha, et al. (2021), "Establishment of a new and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system in the nematocidal fungus *Purpureocillium lilacinum*", *Microbiological Research*, **249**, DOI: 10.1016/j.micres.2021.126773.

Tổng quan về phân loại nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) và một số góc nhìn mới về nấm Thượng hoàng ở Việt Nam

Lê Thị Hoàng Yên^{1*}, Đồng Thị Hoàng Anh¹, Lê Thị Thanh Huyền², Nguyễn Duy Trinh³, Trịnh Tam Kiệt⁴

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, C6 phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường, 41A Phú Diễn, phường Phú Diễn, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm, Viện Di truyền Nông nghiệp, Km 2 đường Phạm Văn Đồng, phường Cổ Nhuế 1, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/7/2024; ngày chuyển phân biên 20/7/2024; ngày nhận phân biên 6/8/2024; ngày chấp nhận đăng 11/8/2024

Tóm tắt:

Nấm Thượng hoàng - Sanghuang là tên gọi dân gian cho một loài nấm dược liệu cổ truyền nổi tiếng được biết nhiều ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Việt Nam và nhiều quốc gia khác trên thế giới. Loài nấm này được ví như thần dược dựa vào các hoạt tính dược học quý như chống ung thư, chống tiểu đường, bảo vệ gan, bảo vệ thần kinh, kháng viêm, điều hoà miễn dịch, chống ôxy hóa, kháng khuẩn và kháng virus... Năm 1968, *Phellinus linteus* là tên khoa học chính thức được sử dụng cho nấm Thượng hoàng. Kể từ đó, *P. linteus* được các nhà khoa học sử dụng rộng rãi trên thế giới và Việt Nam. Tuy nhiên, vào năm 1992, *P. linteus* đã bị chuyển sang *Inonotus*. Năm 2016, dựa vào kết quả phân tích hình thái học và trình tự gen rDNA vùng ITS và nLSU, *P. linteus* đã được chuyển sang *Tropicoporus linteus*. Đồng thời, các tác giả cũng chia *Inonotus* thành ba chi: *Inonotus*, *Tropicoporus* và *Sanghuangporus*. *Sanghuangporus* đã trở thành chi mới và đại diện cho nấm Thượng hoàng theo quan điểm hiện đại. Trong bài báo này, chúng tôi nêu khái quát một số quan điểm mới trong hệ thống phân loại nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* và một số loài gần gũi khác nhằm đưa ra một góc nhìn mới về loại nấm dược liệu này ở Việt Nam.

Từ khóa: hệ thống phân loại, *Phellinus linteus*, *Sanghuangporus*, *S. sanghuang*, Thượng hoàng.

Chỉ số phân loại: 1.6, 3.4, 4.6

A review: The classification system of the medicinal mushroom Sanghuang *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) and some new perspective on Sanghuang in Vietnam

Thi Hoang Yen Le^{1*}, Thi Hoang Anh Dong¹, Thi Thanh Huyen Le², Duy Trinh Nguyen³, Tam Kiet Trinh⁴

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Natural Resources and Environment, 41A Phu Dien Street, Phu Dien Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³Center for Research and Development of Mushroom, Agricultural Genetics Institute, Km 2 Pham Van Dong Street, Co Nhue 1 Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

⁴Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University - Hanoi, 144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 17 July 2024; revised 6 August 2024; accepted 11 August 2024

Abstract:

Sanghuang is the common name for a well-known traditional medicinal mushroom in China, Korea, Vietnam, and many other countries around the world. The mushroom is considered a miracle drug due to its valuable medicinal properties, such as anti-cancer, anti-diabetic, liver protection, neuroprotection, anti-inflammatory, immune regulation, antioxidant, antibacterial, and antiviral effects, etc. In 1968, *Phellinus linteus* was the official scientific name for this Sanghuang mushroom. Since then, *P. linteus* has been widely used around the world and in Vietnam. However, in 1992, *P. linteus* was reclassified to *Inonotus*. In 2016, based on morphological analysis and ITS and nLSU rDNA sequence data, renamed *P. linteus* to *Tropicoporus linteus*. At the same time, the *Inonotus* complex was split into three genera: *Inonotus*, *Tropicoporus*, and *Sanghuangporus*. Especially in Zhou and colleagues's report, the *Sanghuangporus* was regarded as a new genus representing Sanghuang from a modern perspective. In this article, we provide an overview of some new viewpoints in the taxonomy of the Sanghuang mushroom - *Tropicoporus linteus* and some closely related species, providing a new viewpoint on this medicinal mushroom in Vietnam.

Keywords: *Phellinus linteus*, Sanghuang, *Sanghuangporus*, *S. sanghuang*, taxonomy.

Classification numbers: 1.6, 3.4, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Từ xa xưa đến nay nấm Thượng hoàng đã được coi là một loại nấm có giá trị dược liệu đặc biệt quý, như kháng viêm, chống ôxy hóa, kháng khuẩn và kháng virus, chống ung thư, chống tiểu đường, bảo vệ gan, và khả năng bảo vệ thần kinh... Trong tiếng Trung Quốc nấm Thượng hoàng được gọi là “Sanghuang”, “Sang” (桑) có nghĩa là cây dâu tằm (Morus) - cây chủ để quả thể nấm mọc lên. “Huang” (黄) có nghĩa là màu vàng của quả thể nấm. “Sanghuang” còn được gọi là “Sanghwang” ở Hàn Quốc và “Meshimakobu” ở Nhật Bản. Việc phân loại loài nấm này có nhiều khó khăn và thay đổi. Trong lịch sử Trung Quốc, chúng được gọi chung là “Sanghuang” mà không có tên Latin. Điều này đã gây nhiều tranh cãi trong việc nghiên cứu và sản xuất thành sản phẩm thương mại của loài nấm này. Tên Latin đầu tiên của loài nấm này là *Polyporus linteus* Berk. & M.A. Curtis 1860. Sau đó, chúng lần lượt được chuyển đổi thành *P. linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng 1968, *Inonotus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teixeira 1992 và hiện nay là *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015. Việc thay đổi vị trí phân loại của nấm không chỉ có ý nghĩa trong phân loại học, định rõ hơn mối quan hệ tiến hóa giữa các loài nấm mà còn có tác động đến các nghiên cứu dược lý của chúng. Trong giai đoạn hiện tại, một số loài nấm dược liệu quý trong phức hợp chi *Phellinus*/*Inonotus* như *Phellinus baumii* Pilát 1932 (*Inonotus baumii* (Pilát) T. Wagner, M. Fisch 2002); *Phellinus weirianus* (Bres.), Gilb. 1972, (*Inonotus weirianus* (Bres.), T. Wagner & M. Fisch 2002 và *Phellinus vaninii* Ljub 1962 (*Inonotus vaninii* (Ljub.) T. Wagner & M. Fisch 2002) đã được chuyển sang chi mới *Sanghuangporus* - đại diện cho các loài nấm Thượng hoàng trong giai đoạn hiện tại. Các nghiên cứu về dược lý của các loài trong chi *Sanghuangporus* đã được tập trung hơn, thay vì chỉ tập trung vào *Phellinus*/*Inonotus*, mở ra những hướng nghiên cứu mới, đặc biệt trong việc khám phá các hoạt chất mới chống ung thư, chống viêm và bảo vệ gan, thận của các hợp chất từ loài nấm này. Điều này cho thấy sự quan trọng của việc phân loại chính xác trong việc mở rộng và phát triển các nghiên cứu khoa học ứng dụng liên quan đến nấm Thượng hoàng. Trong khi các nghiên cứu quốc tế đã chuyển hướng sang *Sanghuangporus*, ở Việt Nam, các nghiên cứu về nấm Thượng hoàng vẫn tập trung vào *P. linteus*. Sự chậm trễ trong việc cập nhật thông tin phân loại và nghiên cứu quốc tế có thể ảnh hưởng đến sự phát triển các ứng dụng dược liệu của loài nấm này tại Việt Nam. Do đó, việc hiểu rõ và áp dụng các phân loại mới có thể giúp các nhà khoa học Việt Nam tiếp cận nhanh hơn với các phát hiện quốc tế và thúc đẩy nghiên cứu ứng dụng các loài nấm dược liệu này trong nước.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Loài nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015 (*P. linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng 1968) và một số chi gần gũi: *Inonotus* P. Karst 1879, *Sanghuangporus* Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tìm kiếm tài liệu: Tài liệu về nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* và các chi gần gũi *Inonotus*, *Sanghuangporus* trên PubMed, Google Scholar, Scopus, trong thư viện sách của Đại học Quốc gia Hà Nội.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015 (*P. linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng 1968)

3.1.1. Lịch sử *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*)

Nấm Thượng hoàng “Sanghuang” được xuất hiện từ khoảng 2000 năm trước trong Shen Nong Materia Medica - cuốn sách y học cổ truyền đầu tiên của Trung Quốc, với tên gọi Sang”er (Dược điển cổ truyền Shen Nong - Trung Quốc). Mặc dù “Sanghuang” đã được ghi chép trong hơn 2000 năm, nhưng chưa được sắp xếp, phân loại theo tên Latinh, gây ra nhiều tranh cãi trong việc nghiên cứu và sản xuất thành sản phẩm thương mại ở Trung Quốc [1, 2]. Năm 1968, trong một công bố đầu tiên về chức năng chống khối u, nấm Thượng hoàng đã được chuyển sang chi *Phellinus* với tên đầy đủ là *P. linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng 1968, thuộc họ Hymenochaetaceae, lớp nấm đảm Basidiomycetes [3]. Kể từ đó *P. linteus* là tên khoa học chính thức cho loài nấm này. Đây là loài nấm dược liệu quý, với nhiều đặc tính dược học như: hoạt tính kháng viêm, chống ôxy hóa, kháng khuẩn và kháng virus, chống ung thư, chống tiểu đường, bảo vệ gan, và khả năng bảo vệ thần kinh... [4-6].

3.1.2. Hình thái, sự phân bố và vật chủ của *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*)

Tropicoporus linteus (*P. linteus*) phân bố ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, quả thể hàng năm hoặc đa niên, hình móng ngựa, bề mặt phía trên là màu nâu đen khi tươi và đen khi khô, có thể hơi nhám đến vân lồi, hiếm khi là màu vàng nhạt, có lông tơ hoặc không có lông, thường có rãnh và đôi khi nứt theo chiều bán kính của quả thể nấm già hơn; bề mặt phía dưới là màu nâu đỏ khi tươi và nâu vàng khi khô, phần thịt nấm bên trong có màu nâu; ống nấm có màu vàng nhạt khi khô, nấm có vị đắng; lỗ biến đổi, nhưng phổ biến là lỗ nhỏ, ống lỗ thường được xếp thành lớp, phần thịt mỏng và đặc. Hệ thống hệ sợi của nấm là hai kiểu sợi (dimitic), trong suốt, mỏng và hẹp, hiếm khi rộng và màu nâu vàng nhạt, không có sợi cứng. Bào tử có hình dạng biến đổi, trong

suốt đến màu nâu sẫm, mỏng đến dày, hầu hết âm tính với i ốt, có thể bắt màu đỏ hoặc màu nâu đỏ dextrinoid ở một số loài [7].

Tất cả các loài đều sống trên gỗ, phân bố rộng khắp nơi với nhiều loài, khó phân biệt giữa các loài, hiện có 496 loài đã được công bố trên thế giới. Chúng thường được gọi là nấm gây trắng rêu và gây bệnh một số loài thực vật chẳng hạn thối rữa, tổn thương vỏ hoặc từ bên trong mạch, gây chết cây. Chúng có thể kí sinh ở cành hoặc thân các cây gỗ cứng như *Quercus* Linn. (cây Sồi), *Toxicodendron vernicifluum* (cây Sơn mài, thuộc họ Đào lộn hột) và *Morus alba* Linn. (cây dâu), thời điểm thu mẫu tốt nhất là từ tháng 4 đến tháng 5. *P. linteus* chủ yếu có ở khu vực nhiệt đới ở châu Mỹ, châu Phi và Đông Á, đặc biệt phong phú ở Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [8]. Trong nghiên cứu đa dạng nấm Thượng hoàng tại Việt Nam, chúng tôi đã phát hiện được loài nấm này tại Núi Thung, Trùng Khánh, tỉnh Cao Bằng và Vườn Quốc gia Xuân Sơn, tỉnh Phú Thọ (hình 1).



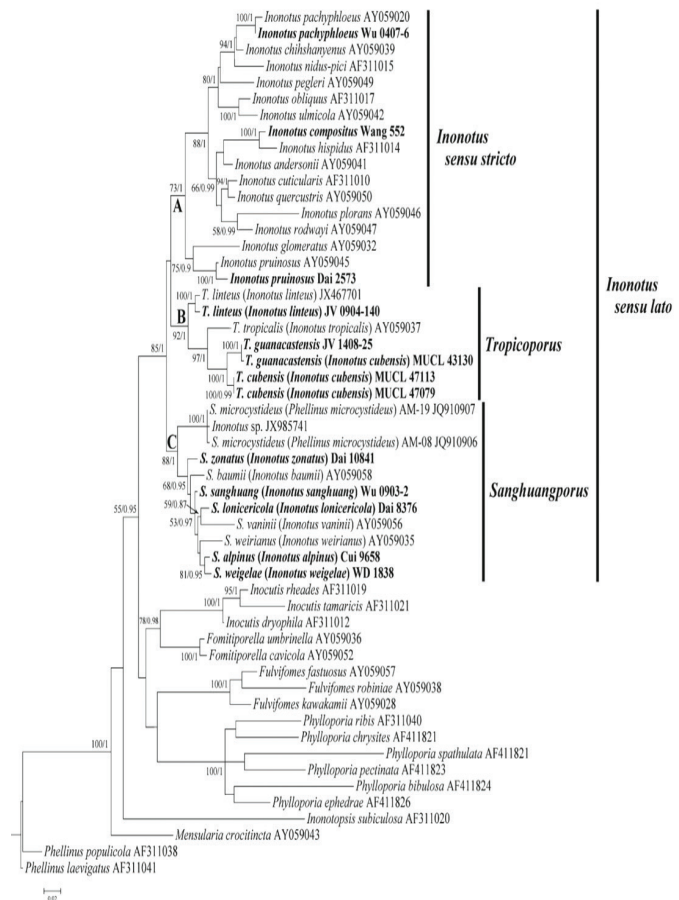
Hình 1. Quả thể nấm *Phellinus linteus* tại Vườn quốc gia Xuân Sơn - Phú Thọ.

3.1.3. Sự dịch chuyển trong phân loại nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) dựa vào hình thái học

Nấm Thượng hoàng lần đầu tiên được công bố bởi Berk. & M.A. Curtis năm 1860, dựa vào các đặc điểm hình thái học, loài nấm Thượng hoàng này đã được Berk. & M.A. Curtis phân loại vào họ nấm lỗ Polyporaceae, chi *Polyporus*, loài *Polyporus linteus*. Sau đó, chúng được chuyển sang *Fomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Cooke, Grevillea (1885), *Scindalma linteum* (Berk. & M.A. Curtis) Kuntze (1898), *Pyropolyporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill (1903), *Fulvifomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Murrill (1915) (<https://www.indexfungorum.org/Names>) [9]. Năm 1968, trong một công bố đầu tiên về chức năng chống khối u, nấm Thượng hoàng đã được chuyển sang chi *Phellinus* với tên đầy đủ là *P. linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng 1968, thuộc họ Hymenochaetaceae, lớp nấm đảm Basidiomycetes [3, 4].

3.1.4. Phân loại nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) dựa vào sinh học phân tử

Trong nghiên cứu hiện đại, việc phân loại nấm không chỉ dựa vào phân tích hình thái mà còn kết hợp với phân tích trình tự gen để đưa ra kết luận chính xác về vị trí phân loại của chúng trong hệ thống phân loại nấm. L.W. Zhou và cs (2016) [10] đã thu thập 70 loài nấm Thượng hoàng *Inonotus* trên toàn cầu và phân tích chúng dựa vào hình thái kết hợp phân tích trình tự rDNA-nLSU (53 loài) và rDNA vùng ITS (70 trình tự). Kết quả phân tích cây chủng loại phát sinh dựa vào các trình tự rDNA vùng nLSU và rDNA vùng ITS cho thấy vị trí phân loại của *Inonotus* phức tạp, gồm 3 nhánh: Nhánh A - nhánh chính của *Inonotus*, *Inonotus hispidus* là loài chuẩn. Nhánh B và nhánh C là hai chi mới: *Sanghuangporus* và *Tropicoporus*. Nhánh B (*Tropicoporus*) gồm 51 loài, *Tropicoporus excentrodendri* là loài chuẩn; *P. linteus* nằm trong nhánh này và được chuyển thành *Tropicoporus linteus*. Nhánh C (*Sanghuangporus*) gồm 14 loài, *Sanghuangporus sanghuang* (S.H. Wu, T. Hatt, Y.C. Dai) (*Inonotus sanghuang* S.H. Wu, T. Hatt. & Y.C. Dai) là loài chuẩn (hình 2) [10].



Hình 2. Cây chủng loại phát sinh của *Inonotus sensu lato* dựa vào phân tích trình tự rDNA-nLSU. Giá trị bootstrap >50% được thể hiện trên cây; một số loài mới được in đậm; các loài để trong ngoặc đơn là tên cũ [10].

3.1.5. Thành phần hoá học và các hoạt tính dược học của nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*)

P. linteus sinh các hợp chất sinh học có tác dụng dược lý đáng kể như: Polysaccharide có tác động chống ung thư trong nghiên cứu quy mô phòng thí nghiệm và trên động vật, ức chế mạnh mẽ sự phát triển khối u trong mô hình chuột mang tế bào ung thư đại trực tràng (HT29) [11]; ức chế sự tăng trưởng tế bào HepG2; giảm tác dụng phụ của camptothecin 11 khi điều trị tế bào ung thư đại tràng HCT116 và HT29 với liều lượng thấp (50 µg/ml) [5]. Các phenylpropanoids có các hoạt tính chống viêm, kháng oxy hóa, chống ung thư, giảm đường huyết, kháng khuẩn, kháng virus; bảo vệ tim, gan và bảo vệ dạ dày. Các polyphenol của *P. linteus* cũng có khả năng chống ung thư. Tất cả các polyphenol đã được đặc trưng đều có hoạt tính độc tính tế bào chống lại nhiều loại ung thư khác nhau, bao gồm tế bào ung thư tụy, tế bào ung thư da, tế bào bạch cầu NB4, tế bào ung thư đường ruột, tế bào ung thư vòm họng, tế bào ung thư gan, tế bào ung thư phổi thùy nhỏ và nhiều loại khác [5, 12]. Ngoài ra, còn có một số các chất khác như: Phellinulin D, phellinulin E, phellinulin F, phellinulin G, phellinulin H, phellinulin I, phellinulin K, phellinulin M và phellinulin N, Phellilin C, axit γ -ionylideneacetic và phellinulin A được tách ra từ hệ sợi nấm *P. linteus* được cho là có tác dụng bảo vệ gan [13]. Furan- một loại hợp chất nguyên tử pentacyclic chứa oxy, là một chất trung gian của các loại thuốc tổng hợp (phellinone phellinusfuran A và phellinusfuran B) [14]. Acid ellagic có tác dụng chống tiêu đường; Hispolon có hoạt tính chống viêm, chống ung thư; ergothioneine có tác dụng chống tiêu đường [5].

3.1.6. Nghiên cứu về nuôi trồng quả thể và sinh khối của nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*)

Nghiên cứu nuôi trồng tạo quả thể: Trong nghiên cứu của I.P. Hong và cs (2002) [15], H. Hur (2008) [16] cho rằng thời gian để nuôi trồng được nấm Thượng hoàng phải mất tới 3 năm. Thời gian này đã được rút ngắn trong nghiên cứu của G.J. Min và cs (2021) [17] đã nuôi trồng ra quả thể của nấm Thượng hoàng trên thân cây dâu *Morus alba*, cây sồi *Quercus acutissima* và cây gỗ cứng (cây căng lòn) *Betula schmidtii*. Tuy nhiên, hiệu quả của việc nuôi trồng này là được đánh giá là chưa thành công, phải mất 160-325 ngày thì quả thể nấm bắt đầu hình thành, việc tạo thành sản phẩm thương mại từ việc nuôi trồng này là khó thành công. Hơn nữa, hàm lượng hoạt chất sinh học trong quả thể của các chủng nấm này cũng chỉ đạt 24,64-32,08 mg/g quả thể.

Nghiên cứu lên men nhân sinh khối: Nuôi trồng tạo quả thể nấm Thượng hoàng *P. linteus* đòi hỏi thời gian dẫn đến chi phí cao, lợi nhuận thấp nên nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu lên men thu sinh khối loài nấm này, sử dụng các môi trường, các điều kiện nhiệt độ, pH, tốc độ khuấy khác nhau để thu được lượng sinh khối lớn và có tác dụng dược lý không kém so với quả thể của chúng [13].

3.2. Một số chi/loài khác của nấm Thượng hoàng

3.2.1. Chi *Inonotus* P. Karst. (1879)

Inonotus P. Karst. được Karsten mô tả năm 1879 và *Inonotus hispidus* (Bull.) P. Karst. là loài chuẩn. *Inonotus* sensu lato được phân loại dựa vào hình thái quả thể và các cơ quan sinh sản. Chúng có quả thể dạng gỗ, xốp, mọc hàng năm, có lớp xơ màu nâu gỉ, thịt sẫm màu khi tiếp xúc với chất kiềm (do phản ứng xanthochromic ion hoá hispidin tạo màu sẫm). Hệ thống sợi nấm của *Inonotus* dạng monomitic bao gồm các sợi nấm sinh sản không có mẫu nôi, có xuất hiện các sợi cứng, màu sắc tương tự màu của bề mặt lỗ và bề mặt quả thể [7].

S.H. Wu và cs (2012) [2] cho rằng, nấm các loài nấm Thượng hoàng có hoạt tính dược liệu được nghiên cứu chủ yếu thuộc về nhóm *P. linteus* và *P. baumi* - sợi kép, quả thể cứng và thường là lâu niên - lại được chuyển sang chi *Inonotus* dựa vào phân tích trình tự của 60 trình tự rDNA vùng ITS của nấm *Inonotus/Phellinus*. Cũng trong nghiên cứu này, tác giả đã mô tả và đặt tên khoa học *Inonotus sanghuang* S.H. Wu, T. Hatt, Y C. Dai cho loài nấm được liệu phân lập từ cây dâu *Morus*. Theo tác giả, đây chính là loài nấm Thượng hoàng “Sanghuang” *P. linteus/P. baumi* đã được mô tả và nghiên cứu dược liệu từ thế kỷ thứ 7 thời nhà Đường ở Trung Quốc. Đây cũng là lần đầu tiên “sanghuang” xuất hiện dưới dạng nhĩ thức khoa học. Trong nghiên cứu này, dựa vào phân tích trình tự rDNA-ITS, tác giả đã phân chia nhóm *P. linteus/P. baumi* đã được công bố trước đó vào 1 loài: *Inonotus sanghuangporus* (gồm một số chủng thuộc các loài *P. linteus* - *P. baumii* cũ), *Inonotus vanini* (gồm một số chủng thuộc các loài *P. Vanini* - *P. baumii* cũ), *Inonotus baumi* (*P. baumii* cũ), *Inonotus loncicericola* (*P. loncicericola/P. loncicericonus* cũ), *Inonotus weigela* (*P. loncicericonus* cũ), *Inonotus weirianus* (*P. weirianus* cũ), *Inonotus linteus* (*P. weirianus* cũ).

Cùng với sự phát triển của khoa học về nấm đến nay số loài trong chi này đã lên tới con số trên 200 loài (<https://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) [9]. Trong số đó, có 9 loài được chuyển từ chi *Phellinus* sang, đó là:

1) *Inonotus calcitratus* (Berk. & M.A. Curtis) Gomes-Silva & Gibertoni (2013). Tên đồng nghĩa: *P. calcitratus* (Berk. & M.A. Curtis) Ryvarden (1972)

2) *Inonotus fibrosus* (Ryvarden, Gomes-Silva & Gibertoni) J.R.C. Oliveira-Filho & Gibertoni (2018). Tên đồng nghĩa: *P. fibrosus* Ryvarden, Gomes-Silva & Gibertoni (2012)

3) *Inonotus lloydii* (Cleland) P.K. Buchanan & Ryvarden (1993). Tên đồng nghĩa: *P. lloydii* (Cleland) G. Cunn. (1965)

4) *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát (1942). Tên đồng nghĩa: *P. obliquus* var. *antillarum* Pat. (1903), *Fomes igniarius f. sterilis* Vanin (1934), *Phaeoporus obliquus f. sterilis* (Vanin)

Spirin, Zmitr. & Malysheva (2006), *Inonotus obliquus f. sterilis* (Vanin) Baland. & Zmitr. (2015).

5) *Inonotus pachyphloeus* (Pat.) T. Wagner & M. Fisch. (2002). Tên đồng nghĩa: *P. pachyphloeus f. stipitatus* (Bres.) O. Fidalgo (1968)

6) *Inonotus portoricensis* (Overh.) Baltazar & Gibertoni (2010). Tên đồng nghĩa: *P. portoricensis* (Overh.) M. Fidalgo (1968).

7) *Inonotus tropicalis* (M.J. Larsen & Lombard) T. Wagner & M. Fisch. (2002). Tên đồng nghĩa: *Tropicoporus tropicalis* (M.J. Larsen & Lombard) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015), *P. rickii* (Bres.) A. David & Rajchenb. (1985), *P. tropicalis* M.J. Larsen & Lombard (1988).

8) *Inonotus sousae* (Ryvarden, Gomes-Silva & Gibertoni) J.R.C. Oliveira-Filho & Gibertoni (2018). Tên đồng nghĩa: *P. sousae* Ryvarden, Gomes-Silva & Gibertoni (2012).

9) *Inonotus luteoumbinus* (Romell) Ryvarden (2005). Tên đồng nghĩa: *P. sublineatus* (Murrill) Ryvarden (1972).

Trong số 9 loài được chuyển từ *Phellinus* sang, *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilát (1942) là loài nấm được liệu nổi tiếng, còn gọi là nấm Chaga, là một loài nấm được liệu đã được sử dụng cho mục đích chữa bệnh từ thế kỷ 16. Theo các ghi chép trong y học dân gian, Chaga được ứng dụng để điều trị nhiều bệnh lý như ung thư đường tiêu hóa, tiểu đường, nhiễm trùng do vi khuẩn và bệnh gan. Nghiên cứu hiện đại đã cung cấp bằng chứng khoa học về các đặc tính trị liệu của chiết xuất từ *I. obliquus* bao gồm các hoạt động chống viêm, chống oxy hóa, chống ung thư, chống tiểu đường, chống béo phì, bảo vệ gan, bảo vệ thận, chống mệt mỏi, kháng khuẩn và kháng virus. Nhiều hợp chất hoạt tính sinh học khác nhau đã được tìm thấy trong nấm này, bao gồm polysaccharides, triterpenoids, polyphenols và các chất chuyển hóa lignin, đóng vai trò quan trọng trong các đặc tính có lợi cho sức khỏe của *I. obliquus* [18]. Tuy nhiên, do giới hạn độ dài của bài báo, trong bài viết này, chúng tôi không đề cập chi tiết đến các hoạt tính dược lý của loài/chi nấm này.

3.2.2. Chi *Sanghuangporus* S.H. Wu, T. Hatt, Y. C. Dai 2015

Chi *Sanghuangporus* được L.W. Zhou và cs (2016) [10] giới thiệu vào năm 2016, với loài chuẩn là *Sanghuangporus sanghuang* (S.H. Wu, T. Hatt & Y.C. Dai) S.H. Wu, L.W. Chu & Y.C. Dai. Chi nấm này được tách ra khỏi chi *Inonotus* với các đặc điểm hình thái như sau: quả thể (basidiocarps) lâu năm, mọc sát cây chủ hoặc có thể có cuống. Mặt trên của quả thể nấm có màu nâu, xám đậm đến đen, có lông ngắn, lông tơ, mượt mà đến nhẵn với lớp vỏ nứt theo hướng tia. Bề mặt lỗ có màu vàng đến vàng nâu. Phần thịt đồng nhất hoặc

có hai lớp với một đường màu đen. Hệ thống sợi nấm đơn hoặc kép trong phần thịt, kép trong phần mô; sợi nấm tạo bào tử đơn giản; các mô tối màu trong KOH, sợi nấm không thay đổi trong KOH. Có sự hiện diện các sợi nấm ở bề mặt dưới, không có sợi nấm hyphoid. Bào tử hình elip, elip rộng đến gần cầu, màu vàng nhạt, vách tế bào hơi dày đến dày, mịn màng, không phản ứng với IKI, CB– hoặc hơi phản ứng CB+. Mọc trên gỗ của thực vật hạt kín, gây ra hiện tượng mục trắng. Phân bố ở vùng ôn đới, cận nhiệt đới đến nhiệt đới [10-19]. Các loài thuộc *Inonotus* được chuyển sang *Sanghuangporus* bao gồm: (1) *Sanghuangporus alpinus* (Y.C. Dai & X.M. Tian) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Inonotus alpinus*; (2) *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *P. baumii*; *Inonotus baumii*; (3) *Sanghuangporus lonicericola* (Parmasto) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *P. lonicericola*; *Inonotus lonicericola*; (4) *Sanghuangporus lonicerinus* (Bondartsev) Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Fomes lonicerinus*; (5) *Sanghuangporus microcystideus* (Har. & Pat.) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *P. microcystideus*; (6) *Sanghuangporus sanghuang* (Sheng H. Wu, T. Hatt. & Y.C. Dai) Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Inonotus sanghuang*; (7) *Sanghuangporus vaninii* (Ljub.) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *P. vaninii*, *Inonotus vaninii*; (8) *Sanghuangporus weigela* (T. Hatt. & Sheng H. Wu) Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Inonotus weigela*; *Inonotus tenuicontextus*; (9) *Sanghuangporus weirianus* (Bres.) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Fomes weirianus*, *Inonotus weirianus*; (10) *Sanghuangporus zonatus* (Y.C. Dai & X.M. Tian) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015) - Tên đồng nghĩa: *Inonotus zonatus*.

Sau đó, một số thành viên khác đã được thêm vào chi *Sanghuangporus*: *Sanghuangporus pilatii* (Černý) M. Tomšovský (2016) [20], *Sanghuangporus quercicola* L. Zhu và cs (2017) [21], *Sanghuangporus toxicodendri* S.H. Wu và cs (2019) [22], *Sanghuangporus subbaumii* S. Shen và cs (2021) [23], *Sanghuangporus australianus* Y.C. Dai & F. Wu 2022, *Sanghuangporus lagerstroemiae* F. Wu và cs (2022) [24] và *Sanghuangporus mongolicus* W. Hou và cs (2023) [25]. Cho đến nay đã có 20 loài *Sanghuangporus* được chấp nhận và được coi là thành viên của nấm Thượng hoàng “Sanghuang” [9, 26].

Hầu hết các thành viên trong chi *Sanghuangporus* này đều là các loài nấm được liệu quý, chủ yếu được tiêu thụ dưới dạng các sản phẩm bổ sung đã qua chế biến dạng cao, được coi là một trong những nhóm nấm được liệu quan trọng nhất. Các chức năng dược lý chính của “Sanghuang” bao gồm chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, điều hòa miễn dịch, chống tiểu đường và bảo vệ gan, chủ yếu nhờ

vào các hợp chất chuyển hóa thứ cấp như polysaccharides, polyphenols, pyrones và terpenes. Ngoài ra, bột từ quả thể của nấm đã được chứng minh là không gây độc trong các thí nghiệm trên chuột. Tuy nhiên, tiềm năng của “Sanghuang” vẫn chưa được khai thác hoàn toàn, một phần do sự khan hiếm của nấm và quan trọng hơn là do thiếu hiểu biết về hệ thống phân loại và sinh học của nó. Trong tương lai, với sự nỗ lực liên tục từ các góc độ lý thuyết, công nghiệp và truyền thông, “Sanghuang” sẽ mang lại nhiều lợi ích hơn cho loài người. Các nghiên cứu trên mọi khía cạnh của “Sanghuang” cũng sẽ đóng vai trò quan trọng làm tài liệu tham khảo có ý nghĩa trong việc sử dụng các loài nấm gỗ tiềm năng khác [26].

3.3. Các nghiên cứu về nấm Thượng hoàng ở Việt Nam

3.3.1. Các công bố về ghi nhận và công bố loài mới nấm Thượng hoàng ở Việt Nam

Chi *Phellinus*: Các công bố trong giai đoạn 2011-2013 của T.T. Kiet (2011, 2012, 2013) [27-29] đã ghi nhận 30 loài nấm Thượng hoàng thuộc chi *Phellinus* ở Việt Nam. Tuy nhiên, trong phân loại hiện đại, một số loài thuộc chi này đã chuyển sang các chi khác như: *Fomes*, *Phellinidium*, *Fomitiporia*, *Pyrrhoderma*, *Phylloporia*, *Fuscoporia* và *Fuscoporia* [9].

Bên cạnh đó, cũng có một số công bố bổ sung các loài nấm mới cho Việt Nam. Đặc biệt là công bố phát hiện loài nấm Thượng hoàng mới ở Việt Nam *Phellinus vietnamensis* L. Zhu và cs (2018) [30]. Loài nấm này được phân lập từ gốc cây hạt kín ở Bidoup Núi Bà, Đà Lạt, Lâm Đồng, quả thể đa niên, không có cuống, hệ thống sợi kép, có sợi cứng hình ngoắc, không màu xuất hiện trên bề mặt lỗ đâm hình gần cầu lớn tới hình ovan, nhẵn, vách dày, kích thước bào tử đám $5.5-6 \times 4.8-5,2 \mu\text{m}$ [30]. H.V. Vu và cs (2022) [31] mô tả 04 loài *Phellinus* phân lập từ cây Dầu tằm ở khu Bảo tồn thiên nhiên Ba Bể (Bắc Kạn), Phín Oắc - Phín Đén Cao Bằng. Một số nghiên cứu khác lại tập trung vào hoạt tính, sản xuất và ứng dụng nấm Thượng hoàng, như nghiên cứu của D.M. Pham và cs (2021) [32] về đặc điểm lên men sinh khối nấm Thượng hoàng *P. linteus* ở Việt Nam. Nghiên cứu nấm Thượng hoàng ở Việt Nam còn ghi nhận thêm 5 loài: (1) *Phellinus baumii* Pilát, 1932 (tên hiện tại: *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015, (2) *Phellinus igniarius* (L.) Quél, 1886, (3) *Phellinus gilvus* (Schwein.) Pat., 1900 (tên hiện tại là *Inninotus gilva* (Schwein.) T. Wagner & M. Fisch (2002) (4) *Phellinus pini* (Brot.) Pilát (1941) (tên hiện tại *Porodaedalea pini* (Brot.) Murrill 1905 và (5) *P. robiniae* (Murrill) A. Ames 1913 [30-43], nâng số loài nấm này ở Việt Nam lên con số 36 loài. Tuy nhiên, có tới 19 loài đã được chuyển sang các chi khác (bảng 1).

Bảng 1. Danh sách các loài nấm Thượng hoàng thuộc chi *Phellinus* ở Việt Nam đã được chuyển sang các chi khác [9].

Thứ tự	Tên phân loại cũ	Tên phân loại hiện đại
1	<i>Phellinus baccharidis</i> (Pat.) Pat., 1900	<i>Fomitiporia baccharidis</i> (Pat.) Decock, Robledo & Amalfi, 2014
2	<i>Phellinus ferrugineo-velutinus</i> (Henn.) Ryv., 1972	<i>Phellinidium ferrugineofuscum</i> (P. Karst.) Fiasson & Niemelä, 1984
3	<i>Phellinus discipes</i> (Berk.) Ryv., 1976	<i>Fuscoporia discipes</i> (Berk.) Y.C. Dai & Ghob.-Nejh., 2007
4	<i>Phellinus extensus</i> (Lev.) Pat., 1900	<i>Fomes extensus</i> (Lév.) Cooke, 1885
5	<i>Phellinus gilvus</i> (Schw.) Pat., 1900	<i>Fuscoporia gilva</i> (Schwein.) T. Wagner & M. Fisch., 2002
6	<i>Phellinus lamaensis</i> (Murr.) Pat., 1923	<i>Pyrrhoderma lamaense</i> (Murrill) L.W. Zhou & Y.C. Dai, 2018
7	<i>Phellinus linteus</i> (Berk. & Br.) Teng, 1964	<i>Tropicoporus linteus</i> (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai, 2015
8	<i>Phellinus noxius</i> (Berk.) G. H. Cunn., 1965	<i>Pyrrhoderma noxium</i> (Corner) L.W. Zhou & Y.C. Dai, 2018
9	<i>Phellinus pachiploeus</i> (Pat.) Pat., 1900	<i>Phellinus dingleyae</i> P.K. Buchanan & Ryvarden, 2000
10	<i>Phellinus pectinatus</i> (Klotzsch) Quél., 1886	<i>Phylloporia pectinata</i> (Klotzsch) Ryvarden, 1991
11	<i>Phellinus pullus</i> (Berk. & Mont.) Ryv., 1972	<i>Phylloporia pulla</i> (Mont. & Berk.) Decock & Yombiy, 2015
12	<i>Phellinus punctatus</i> (Fr.) Pilát, 1942	<i>Fomitiporia punctata</i> (P. Karst.) Murrill, 1947
13	<i>Phellinus salicinus</i> (Pers. ex J.F. Gmel.) Quél., 1886	<i>Phellinopsis conchata</i> (Pers.) Y.C. Dai, 2010
14	<i>Phellinus senex</i> (Nees & Mont.) Imaz., 1952	<i>Fuscoporia senex</i> (Nees & Mont.) Ghob.-Nejh., 2007
15	<i>Phellinus umbrinellus</i> (Bres.) S. Herrera & Bondartseva, 1980	<i>Fomitiporella coruscans</i> (Bres.) Salvador-Montoya & Popoff, 2020
16	<i>Phellinus wahlbergii</i> (Fr.) Reid., 1975	<i>Fuscoporia wahlbergii</i> (Fr.) T. Wagner & M. Fisch., 2001
17	<i>Phellinus baumii</i> Pilát, 1932	<i>Sanghuangporus baumii</i> (Pilát) L.W. Zhou & Y.C. Dai, 2015
18	<i>Phellinus gilvus</i> (Schwein.) Pat., 1900	<i>Inninotus gilva</i> (Schwein.) T. Wagner & M. Fisch., 2002
19	<i>Phellinus pini</i> (Brot.) Pilát, 1941	<i>Porodaedalea pini</i> (Brot.) Murrill, 1905

Chi *Inonotus*: Ngoài chi *Phellinus*, T.T. Kiet (2011, 2012, 2013) [27-29] cũng đã cung cấp cho ngành nấm học Việt Nam 8 loài nấm Thượng hoàng thuộc chi *Inonotus* (bảng 2).

Bảng 2. Danh sách các loài nấm Thượng hoàng thuộc chi *Inonotus* ghi nhận ở Việt Nam [27-29].

Thứ tự	Tên phân loại cũ	Tên phân loại hiện tại
1	<i>Inonotus circinatus</i> (Fr.) Teng, 1964	<i>Onnia circinata</i> (Fr.) P. Karst., 1889
2	<i>Inonotus cuticularis</i> (Bull.: Fr.) P. Karst., 1879	<i>Inonotus cuticularis</i> (Bull.: Fr.) P. Karst., 1879
3	<i>Inonotus gilvoides</i> (Lloyd) Teng, 1963	<i>Trametes gilvoides</i> Lloyd, 1916
4	<i>Inonotus glomeratus</i> (Pers.) Murr., 1920	<i>Inonotus glomeratus</i> (Pers.) Murr., 1920
5	<i>Inonotus hastifer</i> Pouz., 1981	<i>Inonotus hastifer</i> Pouz., 1981
6	<i>Inonotus radiatus</i> (Sow.: Fr.) P.Karst., 1881	<i>Inonotus radiatus</i> (Sow.: Fr.) P.Karst., 1881
7	<i>Inonotus rheades</i> (Pers.) Bondartsev & Singer, 1941	<i>Inonotus rheades</i> (Pers.) Bondartsev & Singer, 1941
8	<i>Inonotus sinensis</i> Teng, 1963	<i>Inonotus sinensis</i> Teng, 1963

3.3.2. Các nghiên cứu về xác định cấu trúc các hợp chất có trong nấm Thượng hoàng ở Việt Nam

Không chỉ các công bố về loài mới và mới ghi nhận, các công bố về nghiên cứu xác định cấu trúc các hợp chất trong nấm Thượng hoàng ở Việt Nam cũng đã được công bố. Các hợp chất igniarine, styrylpyrone (inoscavin A, meshimakobnol A và meshimakobnol B), nhóm flavonoids (daidzin, pterocarpin, 5-hydroxy-7-methoxy-flavone), ergosterol và ergosterol peroxid... được phân lập từ *P. igniarius* [37, 40, 43]. Nhóm các hợp chất phenolic (3,4-dihydroxybenzoic aldehyde, methyl 3,4-dihydroxybenzoate, (E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-en-2-one) hay 1,2,4,5-tetrachloro-3,6-dimethoxybenzene phân lập từ *P. baumii* thu thập được ở Pù Mát - Nghệ An [33, 43].

Các hoạt chất ergosterol, ergosterol peroxide, 1,2,4,5-Tetrachloro-3,6-dimethoxybenzene, 4,4"-Dihydroxy-3,3, 6,6"-tetramethyl-[1,1"-bi(cyclohexane)]-3,3", 6,6"-tetraene-2,2",5,5"-tetraone, (E)-4-(3,4-dihydroxyphenyl)but-3-en-2-one, phenolics, gallic acid, quercetin đã được phân lập thành công từ *Phellinus gilvus* Pù Mát, tỉnh Nghệ An [33-43].

Một nghiên cứu khác của N.T. Nguyen và cs (2015) [42] cho rằng chiết xuất thô của *P. igniarius* và *P. pini* Việt Nam ở nồng độ 10^{-1} mg/ml đã ức chế 67,7% và 87,42% hoạt động tan huyết của His-tag-VpC *Vibrio parahaemolyticus* (Vptlh) [42].

Trametenolic acid B, phellinol, senexonol, sterols từ *Phellinus* sp. phân lập được từ Nho Quan, tỉnh Ninh Bình có khả năng chống viêm [36]. Hay gilvsin A, gilvsin B, rgosta-7,22-dien-3 β -ol, ergosterol peroxide và ergosterol phân lập từ loài *P. igniarius* và *P. pini* có khả năng gây độc một số tế bào ung thư như tế bào ung thư vú MCF-7, tế bào ung thư gan HepG2 và tế bào ung thư phổi Lu [37, 42].

M.T. Nguyen và cs (2023) [43] đã nghiên cứu khả năng chống oxy hoá và kháng vi sinh vật của quả thể và sinh khối sợi nấm Thượng hoàng *P. robiniae*. Giá trị EC₅₀ về khả năng chống oxy hoá DPPH của quả thể và sinh khối sợi nấm Thượng hoàng *P. robiniae* ở nồng độ 260,62 - 298,21 μ g/ml dịch chiết. Quả thể và sinh khối loài nấm này còn có khả năng kháng vi khuẩn gram âm và gram dương ở nồng độ 25-100 mg/ml dịch chiết.

4. Kết luận

Như vậy, tên "Sanghuang" (Thượng hoàng) là tên thường gọi từ hàng ngàn năm trước cho một loài nấm dược liệu quý dựa vào màu sắc quả thể và vật chủ mà chúng thường ký sinh. Cho đến nay, trong nấm học hiện đại, *sanghuang* đã trở thành một nhân tố trong nhĩ thức tên khoa học của loài nấm dược liệu này. Một chi nấm Thượng hoàng mới ra đời *Sanghuangporus* (Sheng H. Wu, T. Hatt. & Y.C. Dai) Sheng H. Wu, L.W. Zhou & Y.C. Dai và *Sanghuangporus sanghuang* là loài đại diện cho chi. Trong khi đó, *P. linteus* - loài nấm Thượng hoàng nổi tiếng từ hàng ngàn năm trước nay đã chuyển sang một chi mới *Tropicoporus*

linteus (Berk. & M.A. Curtis) L.W. Zhou & Y.C. Dai 2015. Ngoài ra, một số loài khác thuộc chi *Phellinus* được chia vào một số chi: *Fulvifomes*, *Fuscoporia*, *Tropicoporus*,... Ở Việt Nam đã ghi nhận được 34 loài nấm Thượng hoàng thuộc chi *Phellinus*, và 19 loài đã chuyển sang các chi khác, gồm *Fomes*, *Phellinidium*, *Fomitiporia*, *Pyrrhoderma*, *Phylloporia*, *Fuscoporia* và *Fuscoporia*. Đặc biệt, *Phellinus baumii* được chuyển sang *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L.W. Zhou & Y.C. Dai (2015). Đây là một trong những loài nấm Thượng hoàng quý đã được phát hiện và nghiên cứu hoạt tính dược liệu ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Bài báo này nhận được hỗ trợ từ nhiệm vụ Khoa học và Công nghệ cấp Bộ: "Nghiên cứu đa dạng, tuyển chọn chủng nấm dược liệu Thượng hoàng (*Phellinus* spp.) ở Việt Nam và công nghệ lên men bề mặt dịch thể giàu β -glucan và polysaccharide nhằm phát triển một số sản phẩm bảo vệ sức khỏe" giai đoạn 2023-2025 của Viện Ứng dụng Công nghệ - Bộ Khoa học và Công nghệ. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.K. Zeng, Q.Y. Wang, M.S. Su (2008), "Discussion on the mushroom used for traditional Chinese medicine "Sanghuang"", *Edible Fungi of China*, **27**(2), pp.56-59.
- [2] S.H. Wu, S.H. Yu, C. Dai, et al. (2012), "Species clarification for the medicinally valuable "sanghuang" mushroom", *Botanical Studies*, **53**(1), pp.135-149.
- [3] T. Ikekawa, M. Nakanishi, N. Uehara, et al. (1968), "Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*", *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, **59**(2), pp.155-157, DOI: 10.20772/cancersci1959.59.2_155.
- [4] W. Chen, H. Tan, Q. Liu, et al. (2019), "A review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*", *Molecules*, **24**(10), pp.1-20, DOI: 10.3390/molecules24101888.
- [5] Y.C. Dai, L.W. Zhou, B.K. Cui, et al. (2010), "Current advances in *Phellinus* sensu lato: Medicinal species, functions, metabolites and mechanisms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, pp.1587-1593, DOI: 10.1007/s00253-010-2711-3.
- [6] F. Luan, X. Peng, G. Zhao, et al. (2022), "Structural diversity and bioactivity of polysaccharides from medicinal mushroom *Phellinus* spp.: A review", *Food Chemistry*, **397**, DOI:10.1016/j.foodchem.2022.133731.
- [7] T. Wagner, M. Fischer (2002), "Proceedings towards a natural classification of the worldwide taxa *Phellinus* s.l. and *Inonotus* s.l., and phylogenetic relationships of allied genera", *Mycologia*, **94**, pp.998-1016, DOI: 10.1080/15572536.2003.11833156.
- [8] K. Ranadive, N. Jagtap, J. Vaidya (2012), "Vaidya, host diversity of genus *Phellinus* from world", *Elixir Appl. Botany*, **52**, pp.11402-11408.
- [9] Index Fungorum (2024), <https://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>, accessed 5 May 2024.
- [10] L.W. Zhou, J. Vlasák, C. Decock, et al. (2016), "Global diversity and taxonomy of the *Inonotus linteus* complex (Hymenochaetales, Basidiomycota): *Sanghuangporus* gen. nov., *Tropicoporus excentrodendri* and *T. guanacastensis* gen. et spp.nov., and 17 new combinations", *Fungal Diversity*, **77**, pp.335-347, DOI: 10.1007/s13225-015-0335-8.

- [11] S. Zhong, D.F. Ji, Y.G. Li, et al. (2013), "Activation of P27kip1-cyclin D1/E-CDK2 pathway by polysaccharide from *P. linteus* leads to S-phase arrest in HT-29 cells", *Chem. Biol. Interact.*, **206**, pp.222-229, DOI: 10.1016/j.cbi.2013.09.008.
- [12] X. Meng, H. Liang, L. Luo (2016), "Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities", *Carbohydr. Res.*, **424**, pp.30-41, DOI: 10.1016/j.carres.2016.02.008.
- [13] S.C. Huang, P.W. Wang, P.C. Kuo, et al. (2018), "Hepatoprotective principles and other chemical constituents from the mycelium of *Phellinus linteus*", *Molecules*, **23**(7), DOI: 10.3390/molecules23071705.
- [14] Y. Yeo, W.H. Hwang, E.I. So, et al. (2007), "Phellinone, a new furanone derivative from the *P. linteus* KT&G PL-2", *Arch. Pharm. Res.*, **30**, pp.924-926, DOI: 10.1007/BF02993957.
- [15] I.P. Hong, I.Y. Jung, S.H. Nam, et al. (2002), "Cultural characteristics of a medicinal mushroom *Phellinus linteus*", *Mycobiology*, **30**, pp.208-212, DOI: 10.4489/MYCO.2002.30.4.208.
- [16] H. Hur (2008), "Cultural characteristics and log-mediated cultivation of the medicinal mushroom, *Phellinus linteus*", *Mycobiology*, **36**, pp.81-87, DOI: 10.4489/MYCO.2008.36.2.081.
- [17] G.J. Min, H.W. Kang (2021), "Artificial cultivation characteristics and bioactive effects of novel *Tropicoporus linteus* (Syn. *Phellinus linteus*) Strains HN00K9 and HN6036 in Korea", *Mycobiology*, **49**(2), pp.161-172, DOI: 10.1080/12298093.2021.1892568.
- [18] P.T.Y. Ern, T.Y. Quan, F.S. Yee, et al. (2024), "Therapeutic properties of *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom): A review", *Mycology*, **15**(2), pp.144-161, DOI: 10.1080/21501203.2023.2260408.
- [19] H.S. Yuan, Y.L. Wei, X.G. Wang (2015), "Maxent modeling for predicting the potential distribution of Sanghuang, an important group of medicinal fungi in China", *Fungal Ecol.*, **17**, pp.140-145, DOI: 10.1016/j.funeco.2015.06.001.
- [20] M. Tomšovský (2016), "*Sanghuangporus pilatii*, a new combination, revealed as European relative of Asian medicinal fungi", *Phytotaxa*, **239**(1), pp.82-88, DOI: 10.11646/phytotaxa.239.1.8.
- [21] L. Zhu, J.H. Xing, B.K. Cui (2017), "Morphological characters and phylogenetic analysis reveal a new species of *Sanghuangporus* from China", *Phytotaxa*, **311**(3), pp.270-276, DOI: 10.11646/phytotaxa.311.3.7.
- [22] S.H. Wu, C.C. Chang, C.L. Wei, et al. (2019), "*Sanghuangporus toxicodendri* sp. nov. (Hymenochaetales, Basidiomycota) from China", *MycoKeys*, **57**, pp.101-111, DOI: 10.3897/mycokeys.57.36376.
- [23] S. Shen, S.L. Liu, J.H. Jiang, et al. (2021), "Addressing widespread misidentifications of traditional medicinal mushrooms in *Sanghuangporus* (Basidiomycota) through ITS barcoding and designation of reference sequences", *IMA Fungus*, **12**, pp.1-21, DOI: 10.1186/s43008-021-00059-x.
- [24] F. Wu, L.W. Zhou, J. Vlasák, et al. (2022), "Global diversity and systematics of Hymenochaetales with poroid hymenophore", *Fungal Diversity*, **113**(1), pp.1-192, DOI: 10.1007/s13225-021-00496-4.
- [25] W. Hou, K. Chao, T. Bau (2023), "A new species of *Sanghuangporus* (Hymenochaetales, Basidiomycota) from Inner Mongolia of China", *Mycosystema*, **42**(4), pp.874-882.
- [26] L.W. Zhou, M.G. Nejhad, X.M. Tian, et al. (2022), "Current status of "Sanghuang" as a group of medicinal mushrooms and their perspective in industry development", *Food Reviews International*, **38**(4), pp.589-607, DOI: 10.1080/87559129.2020.1740245.
- [27] T.T. Kiet (2011), *Mushroom in Vietnam Series 1*, Science and Technics Publishing House, 334pp (in Vietnamese).
- [28] T.T. Kiet (2012), *Mushroom in Vietnam Series 2*, Science and Technics Publishing House, 365pp (in Vietnamese).
- [29] T.T. Kiet (2013), *Mushroom in Vietnam Series 3*, Science and Technics Publishing House, 513pp (in Vietnamese).
- [30] L. Zhu, X. Ji, J. Si, et al. (2018), "Morphological characters and phylogenetic analysis reveal a new species of *Phellinus* with hooked hymenial setae from Vietnam", *Phytotaxa*, **356**(1), pp.91-99, DOI: 10.11646/phytotaxa.356.1.8.
- [31] H.V. Vu, T.B.H. Do, M.T. Nguyen (2022), "Morphological and cultural characterisation of *Phellinus* species collected in the north mountain provinces, Vietnam", *TNU Journal of Science and Technology*, **25**(5), pp.171-177, DOI: 10.34238/tnu-jst.5074 (in Vietnamese).
- [32] D.M. Pham, T.H. Nguyen, T.L. Nguyen, et al. (2021), "A report on characterization of submerged fermentation of *P. linteus* in Vietnam", *Vietnam Journal of Food Control*, **4**(4), pp.277-284, DOI: 10.47866/2615-9252/vjfc.3849.
- [33] D.X. Hung (2020), *Research on The Chemical Composition and Biological Activities of Mushrooms Hexagoniatenuis, Phellinus gilvus, Phellinus Baumii and Ganoderma Australe in The North Central Region*, PhD Thesis, Vinh University (in Vietnamese).
- [34] T.H. Duong, N.Q. Dang (2022), "Total phenolic, flavonoid content and antioxidative, α -amylase inhibitory activity of *Phellinus gilvus* fruiting body extracts", *Vietnam J. Sci. Technol.*, **38**(1), pp.71-79, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.5171.
- [35] D.X. Hung, L.H. Nga, T.D. Thang, et al. (2018), "Chemical constituents of the ethyl acetate fraction of the fruit bodies of *Phellinus gilvus*", *Vietnam J. Sci. Technol.*, **56**(4A), pp.246-251, DOI: 10.15625/2525-2518/56/4A/12750.
- [36] T.H. Tran, P.T. Ha, T.N. Nguyen, et al. (2023), "The responsibility of C-terminal domain in the thermolabile haemolysin activity of *Vibrio parahaemolyticus* and inhibition treatments by *Phellinus* sp. Extracts", *Fisheries and Aquatic Sciences*, **26**(3), pp.204-215, DOI: 10.47853/FAS.2023.e17.
- [37] T.T. Nguyen, N.T. Nguyen, V.T. Hoang, et al. (2016), "Phenolic compounds and steroids from *Phellinus igniarius* fruiting bodies in Vietnam", *VNU. Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **32**(4), pp.264-268 (in Vietnamese).
- [38] T.M. Nguyen, J. Kim, N.H. Tho (2023), "Antioxidant and antimicrobial properties of fruiting body and submerged mycelium of medicinal mushroom *Phellinus robiniae* (Agaricomycetes)", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **25**(3), pp.37-46, DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2022047243.
- [39] N.Q. Dang, D.B. Dang, Y. Asakawa, et al. (2007), "Sterols from a Vietnamese wood-rotting *Phellinus* sp.", *Z. Naturforsch.*, **62B**, pp.289-292, DOI: 10.1515/znB-2007-0224.
- [40] T.T. Nguyen, N.T. Nguyen, P.C. Kuo, et al. (2018), "Chemical constituents from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*", *Nat. Prod. Res.*, **32**(20), pp.2392-2397, DOI: 10.1080/14786419.2017.1413572.
- [41] T.T. Nguyen, X.H. Do, D.T. Tran, et al. (2019), "Cytotoxic constituents of the fruit bodies of *Phellinus baumii* collected in Nghe An province", *Vietnam J. Chem.*, **57**, pp.335-339 (in Vietnamese).
- [42] N.T. Nguyen, T.T. Nguyen, T.H.D. Nguyen, et al. (2015), "Chemical constituents of the fruiting bodies of *Phellinus pini* in Viet Nam", *Vietnam J. Chem.*, **53**(6e1), pp.305-308 (in Vietnamese).
- [43] N.T. Nguyen, T.H. Tran, T.N. Nguyen, et al. (2022), "Secondary metabolites from higher fungi in Vietnam: Discovery, chemodiversity and bioactivity", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **60**(1), pp.1-20, DOI: 10.15625/2525-2518/16322.

Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng phòng trừ sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker) gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre

Đỗ Thị Mai Trinh^{1*}, Lê Thanh Bình¹, Hồ Thị Nguyệt¹, Nguyễn Đào Thanh Hương¹,
Nguyễn Thị Liên¹, Đặng Ngọc Tân², Trương Minh Ngọc¹

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 Bách khoa - Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 31/7/2024; ngày chuyển phản biện 8/8/2024; ngày nhận phản biện 26/8/2024; ngày chấp nhận đăng 30/8/2024

Tóm tắt:

Tỉnh Bến Tre có diện tích trồng dừa lớn nhất cả nước, hơn 79.000 hecta. Tuy nhiên, loài cây này đang bị gây hại bởi sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker), ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây dừa tại tỉnh Bến Tre. Trong nghiên cứu này, từ 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dừa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre đã phân lập được 96 chủng vi khuẩn *Bacillus*, và đã sàng lọc được 30 chủng sinh chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong đó, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng gây chết sâu đầu đen với hiệu lực lần lượt là 100,00 và 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Phân tích hàm lượng surfactin bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có sự xuất hiện của hoạt chất surfactin, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 đạt hàm lượng surfactin là 0,60 mg/g và chủng *Bacillus velezensis* D13 đạt hàm lượng surfactin là 0,42 mg/g.

Từ khóa: *Bacillus*, cây dừa, chất hoạt động bề mặt sinh học, *Opisina arenosella* Walker, sâu đầu đen, surfactin.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.1, 4.6

Isolation and selection of active *Bacillus* strains that have the ability to control black-headed insect (*Opisina arenosella* Walker) causing damage to coconut trees in Ben Tre province

Thi Mai Trinh Do^{1*}, Thanh Binh Le¹, Thi Nguyet Ho¹, Dao Thanh Huong Nguyen¹,
Thi Lien Nguyen¹, Ngoc Tan Dang², Minh Ngoc Truong¹

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

²Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 31 July 2024; revised 26 August 2024; accepted 30 August 2024

Abstract:

Ben Tre province has the largest coconut growing area in the country, more than 79,000 hectares. However, this tree species is being damaged by the black-headed caterpillar (*Opisina arenosella* Walker), seriously affecting coconut tree productivity in Ben Tre province. In this study, from 32 soil samples collected in coconut garden areas and perennial uncultivated land in Ben Tre province, 96 *Bacillus* spp. strains were isolated and 30 biosurfactant strains were screened. Among them, the bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 and *Bacillus velezensis* D13 are capable of killing black-headed worms with an effectiveness of 100.00% and 86.67%, respectively, after 24 hours of monitoring. Analysis of surfactin content using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) showed that both strains of *Bacillus* spp. all have the presence of the active ingredient surfactin, strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 reached a surfactin content of 0.60 mg/g and strain *Bacillus velezensis* D13 reached a surfactin content of 0.42 mg/g.

Keywords: *Bacillus*, biosurfactant, black-headed caterpillar, coconut tree, *Opisina arenosella* Walker, surfactin.

Classification numbers: 1.6, 4.1, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: dothimaitrinh24@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tỉnh Bến Tre có diện tích trồng dừa lớn nhất cả nước, tính đến hết quý I/2024, tổng diện tích dừa toàn tỉnh khoảng 79.078 hecta, tăng 1,36% so với cùng kỳ. Tuy nhiên, nhiều vườn dừa ở tỉnh Bến Tre đang bị thiệt hại rất nặng bởi sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker), từ đầu năm đến nay tổng diện tích vườn dừa bị nhiễm sâu đầu đen trên 388 ha. Lũy kế diện tích nhiễm sâu đầu đen trên vườn dừa từ trước đến nay trên 2.680 ha [1].

Sâu đầu đen có tên khoa học là *Opisina arenosella* Walker là loài sâu bản địa và có thể được tìm thấy rộng rãi ở khu vực Nam Á và Đông Nam Á [2]. Sâu ẩn mình dưới bề mặt lá để ăn chất diệp lục của lá và tạo thành màng tơ ở mặt dưới của lá, dẫn đến việc phun thuốc bảo vệ thực vật không đạt hiệu quả [3]. Bên cạnh đó, việc dùng thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hoá học còn ảnh hưởng đến sức khỏe con người, gây hiện tượng kháng thuốc, ảnh hưởng đến môi trường, gây mất cân bằng sinh thái.

Ngày nay, việc sử dụng các chủng vi sinh vật có khả năng diệt sâu được xem là một biện pháp hiệu quả và có tiềm năng trong tương lai. Trong đó, những loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học có tác dụng kiểm soát côn trùng hoặc đối kháng với một số nấm bệnh, vi khuẩn gây hại cho cây trồng. Các chất hoạt động bề mặt sinh học được hình thành bởi một số lipopeptide và polyketide bao gồm iturin, fengycin, surfactin, bacylomycin, bacillaene, macrolactin và difficidin. Trong tất cả các lipopeptide, surfactin có hoạt tính diệt côn trùng mạnh nhất có thể ảnh hưởng đến các bộ khác nhau như bộ cánh đều Homoptera; bộ cánh vảy Lepidoptera, và bộ ruồi Diptera [4-8]. Một số nghiên cứu ngoài nước cũng đã công bố một số loài vi khuẩn *Bacillus* sinh tổng hợp chất surfactin đều có tác dụng kiểm soát sâu hại cây trồng. Theo nghiên cứu của L. Assié và cs (2002) [7] cho thấy, hoạt chất surfactin C14 và C15 được chiết xuất từ chủng *Bacillus subtilis* S499 với nồng độ 100 ppm đã gây tỷ lệ tử vong ở ruồi đục quả trưởng thành tương ứng là 85,4 và 92,6% sau một ngày tiếp xúc; khả năng ức chế xuất hiện ruồi con F1 của surfactin C14 và C15 lần lượt là 79,8 và 91,3%. Hoạt chất surfactin được chiết xuất từ chủng *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (VCRC B471), có hiệu quả diệt muỗi *Anopheles stephensi* ở giai đoạn ấu trùng và nhộng [8].

Do vậy, mục tiêu nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn *Bacillus* sinh hoạt chất surfactin có khả năng gây chết sâu đầu đen. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học phòng trị sâu đầu đen gây hại cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Sâu đầu đen được thu thập tại vườn dừa tại tỉnh Bến Tre.
- 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dừa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre. Dùng túi nilon khử trùng sẵn thu mẫu đất ở những gốc dừa phát triển khỏe mạnh trong những

vườn dừa bị dịch hại sâu đầu đen và đất thuộc vùng đất tự nhiên trên địa bàn tỉnh Bến Tre, vị trí lấy mẫu: 0-10 cm lớp đất bề mặt dưới lớp lá mục. Ngoài túi ghi rõ các thông tin: mẫu, ngày lấy mẫu, nơi lấy mẫu. Mẫu được mang về phòng thí nghiệm, bảo quản trong điều kiện lạnh 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ mẫu đất thu thập được tại tỉnh Bến Tre: Cân 10 g đất mẫu cho vào bình thủy tinh chứa 90 g nước cất vô trùng (thực hiện trong tủ cấy vô trùng) lắc đều. Sau đó, bình thủy tinh chứa mẫu đất được đun cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để chọn lọc và làm thuần *Bacillus*. Phân lập bằng phương pháp pha loãng và cấy trải trên đĩa petri có chứa môi trường Luria Bertani (LB) agar, nuôi cấy 37°C trong vòng 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng *Bacillus* và cấy chuyển nhiều lần để làm thuần. Các chủng thuần được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các chủng vi khuẩn được định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái (khuẩn lạc và tế bào), đặc điểm sinh lý, sinh hóa [9].

Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt sinh học: Định tính khả năng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học được thử nghiệm bằng cách sử dụng môi trường Nutrient Broth (NB). Các chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong bình nuôi cấy có chứa 20 ml NB và được ủ trong 48 giờ mà không cần lắc, nhiệt độ 37°C. Sự hình thành màng sinh học trên bề mặt của môi trường là dấu hiệu của quá trình sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học [10].

Đánh giá khả năng phòng trị sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm: Bỏ sung 5 ml dịch tăng sinh vi khuẩn *Bacillus* đạt mật độ 10^5 CFU/ml (OD 600 nm=0,1) vào 95 ml môi trường LB lỏng và được nuôi cấy lắc (250 rpm) ở 37°C trong 48 giờ. Sau 48 giờ dịch lên men được thu nhận bằng ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút [11].

Sâu đầu đen 2-5 ngày tuổi được khử trùng sơ bộ bằng nước cất vô trùng và phân vào các hộp nhựa, mỗi hộp 15 con, các hộp nhựa có chứa lá dừa tươi và sâu đầu đen, dịch nuôi cấy các chủng vi sinh đã loại tế bào được phun lên bề mặt sâu đầu đen với thể tích 2,0 ml/hộp. Mẫu được để ở điều kiện nhiệt độ 28-30°C và theo dõi tình trạng sâu đầu đen sau 6, 12, 18, 24 giờ. Mỗi hộp nhựa tương ứng với 01 nghiệm thức thí nghiệm (01 chủng vi khuẩn), mỗi nghiệm thức được lặp lại 03 lần. Thí nghiệm đối chứng được xử lý bằng nước cất vô trùng.

Hiệu lực tiêu diệt sâu đầu đen của chủng vi nấm được tính theo công thức W. Abbott (1925) [12]:

$$E(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

trong đó: E: hiệu lực của dịch chiết tính theo (%); C: số côn trùng sống ở nghiệm thức đối chứng; T: số côn trùng sống ở nghiệm thức có xử lý vi khuẩn.

Định danh chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn: Các chủng vi khuẩn có khả năng phòng trị sâu đầu đen được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Các mẫu DNA chiết xuất từ vi khuẩn được sử dụng để khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng PCR với cặp mồi 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGGCTCAG-3 và 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3. Chu trình phản ứng PCR gồm: Biến tính ban đầu ở 94°C trong 4 phút, 30 chu kỳ 94°C trong 40 giây, bắt cặp 56°C trong 50 giây, kéo dài 72°C trong 100 giây và bước cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit thương mại và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger [13]. Trình tự gen 16S rRNA được phân tích so sánh với dữ liệu có trên GenBank sử dụng công cụ BLAST.

Xác định hoạt chất surfactin có trong chủng vi khuẩn tuyển chọn: Mẫu dịch vi khuẩn *Bacillus* tuyển chọn sau khi tăng sinh trong 48 giờ, nhiệt độ 37°C được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch nổi không có tế bào (CFS). Một phần của CFS được axit hóa đến pH 2,0 bằng HCl 6 N trong các ống nhựa đã được cân trước, để qua đêm ở 4°C, sau đó ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, phần nổi phía trên được loại bỏ và kết tủa được hòa tan trong metanol nguyên chất tỷ lệ (1:10) (w/v). Dịch chiết metanol được lọc qua giấy lọc whatman (11µm), sau đó làm bay hơi đến cạn bằng thiết bị cô quay chân không. Cặn được hòa tan trong metanol và được đo bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần tương ứng 01 mẫu [14].

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Dùng phần mềm excel để xử lý các số liệu. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA trên phần mềm Statgraphics phiên bản 19.

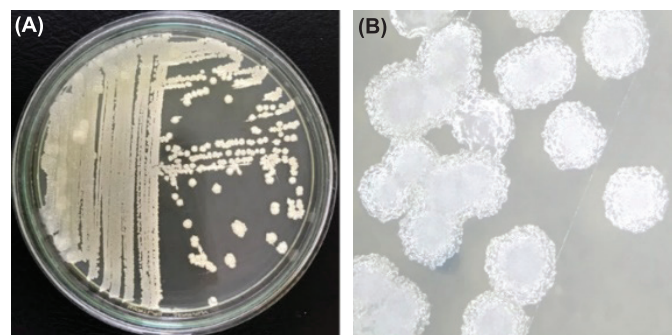
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có tiềm năng phòng trị sâu đầu đen hại cây dừa

Phân lập và làm thuần: Sau khi phân lập 32 mẫu đất trồng dừa và đất không canh tác lâu năm lấy tại 16 điểm trên địa bàn tỉnh Bến Tre thu được 96 chủng vi khuẩn phân lập được có đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, có các màu như trắng ngà, trắng sữa, trắng đục, vàng, vàng ngà, xám, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa (hình 1). Trong 96 chủng vi khuẩn phân lập được có 30 mẫu có khuẩn lạc màu trắng ngà (chiếm 31,25%), 15 mẫu có khuẩn lạc màu trắng sữa (chiếm 15,63%), 22 mẫu có khuẩn lạc màu trắng đục (chiếm 22,92%), 10 mẫu có khuẩn lạc màu vàng (chiếm 10,42%), 17 mẫu có khuẩn lạc màu vàng ngà (chiếm 17,71%) và 2 mẫu có khuẩn lạc màu xám (chiếm 2,08%). Mật độ vi khuẩn *Bacillus* phân lập trong hai nhóm đất có sự chênh lệch lớn (đất canh tác dừa: $1,8 \times 10^3$ - $2,7 \times 10^5$ CFU/g đất; đất không canh tác lâu năm: $2,1 \times 10^5$ - $5,6 \times 10^7$ CFU/g đất) (bảng 1).

Bảng 1. Mật độ vi khuẩn trong mẫu đất thu nhận tại tỉnh Bến Tre.

Thứ tự	Địa điểm lấy mẫu	Loại đất	Mật độ vi khuẩn (CFU/g đất)	Số chủng phân lập được
1	Xã An Ngãi Trung, Ba Tri 10°04'28.3"N 106°31'43.9"E	Đất trồng dừa	$1,8 \times 10^3$	3
2	Xã An Ngãi Trung, Ba Tri 10°04'31.6"N 106°31'35.4"E	Đất không canh tác lâu năm	$2,1 \times 10^5$	6
3	Xã Phú Phụng, Chợ Lách 10°16'24.2"N 106°02'45.9"E	Đất trồng dừa	$2,6 \times 10^3$	4
4	Xã Vĩnh Thành, Chợ Lách 10°12'03.4"N 106°13'11.7"E	Đất không canh tác lâu năm	$3,7 \times 10^6$	7
5	Xã Phú Đức, Châu Thành 10°17'39.9"N 106°18'47.0"E	Đất trồng dừa	$5,9 \times 10^4$	6
6	Xã Tường Đa, Châu Thành 10°17'39.9"N 106°18'47.0"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,1 \times 10^5$	8
7	Xã Thanh An, Mỏ Cày Bắc 10°10'54.3"N 106°18'06.5"E	Đất trồng dừa	$5,2 \times 10^3$	5
8	Xã Phước Mỹ Trung, Mỏ Cày Bắc 10°11'02.1"N 106°16'07.2"E	Đất không canh tác lâu năm	$6,4 \times 10^6$	6
9	Xã Thuận Điền, Giồng Trôm 10°11'05.2"N 106°24'40.7"E	Đất trồng dừa	$2,7 \times 10^5$	8
10	Xã Phước Long, Giồng Trôm 10°08'48.0"N 106°24'50.8"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,9 \times 10^7$	8
11	Xã Lộc Thuận, Bình Đại 10°13'11.8"N 106°34'25.6"E	Đất trồng dừa	$7,1 \times 10^4$	7
12	Xã Thới Lai, Bình Đại 10°12'58.0"N 106°31'50.9"E	Đất không canh tác lâu năm	$3,9 \times 10^7$	8
13	Xã An Điền, Thạnh Phú 9°56'00.0"N 106°35'17.5"E	Đất trồng dừa	$7,6 \times 10^4$	3
14	Xã Bình Thạnh, Thạnh Phú 9°54'53.9"N 106°30'37.6"E	Đất không canh tác lâu năm	$5,6 \times 10^7$	6
15	Xã Bình Phú, TP. Bến Tre 10°14'25.2"N 106°21'12.4"E	Đất trồng dừa	$3,6 \times 10^3$	4
16	Xã Mỹ Thạnh, TP. Bến Tre 10°11'53.7"N 106°24'48.1"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,5 \times 10^6$	7
Tổng cộng				96



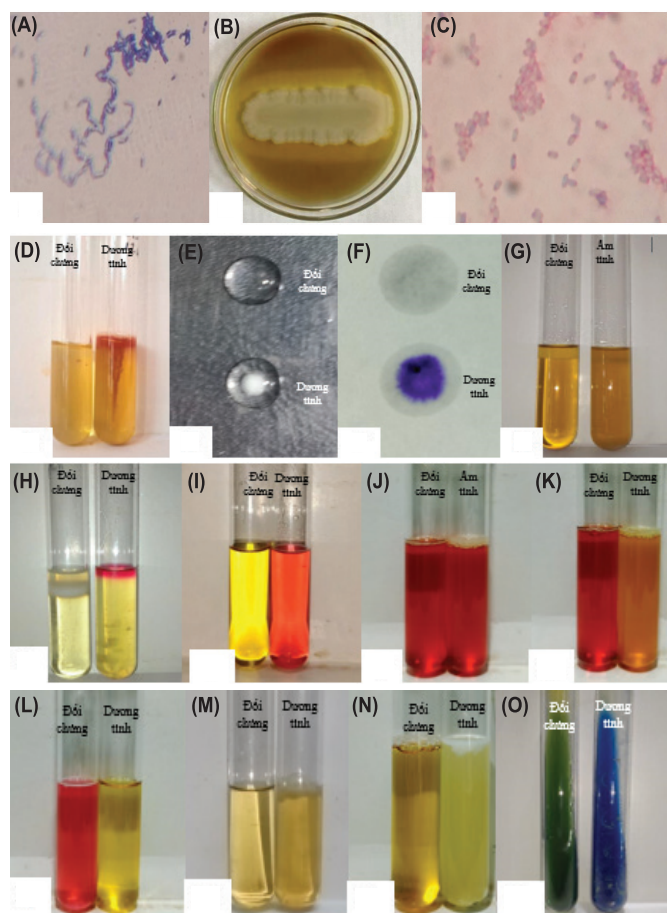
Hình 1. Khuẩn lạc chủng vi khuẩn *Bacillus* B9.10. (A) Trên môi trường LB-Agar sau 48 giờ nuôi cấy; (B) Đại thể ở vật kính 10X.

Để xác định các chủng có khả năng là *Bacillus*, 96 chủng vi khuẩn sau khi làm thuần được kiểm tra các đặc tính sinh hóa. Kết

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất.

Thứ tự	Thử nghiệm sinh hóa	Các chủng vi khuẩn phân lập
1	Gram	+
2	Sinh nội bào tử (endospore)	+
3	Voges-Proskauer	+
4	Methyl Red	+
5	Sinh oxidase	+
6	Sinh catalase	+
7	Sinh indole	-
8	Sinh citrate	+
9	Lên men đường Lactose	-
10	Lên men đường Saccharose	+
11	Lên men đường Maltose	+
12	Tăng trưởng trong môi trường NaCl 7%	+
13	Phát triển ở 50°C	+
14	Khả năng di động	+
15	Phân giải tinh bột	+

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.



Hình 2. Kết quả kiểm tra sinh hóa của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất. (A) Nhuộm gram; (B) Phân giải tinh bột; (C) Khả năng hình thành nội bào tử; (D) Khả năng di động; (E) Sinh catalase; (F) Sinh oxidase; (G) Sinh indole; (H) Voges-Proskauer; (I) Methyl Red; (J) Lên men đường lactose; (K) Lên men đường maltose; (L) Lên men đường saccharose; (M) Sinh trưởng ở 50°C; (N) Sinh trưởng trong môi trường chứa 7% NaCl; (O) Sinh citrate.

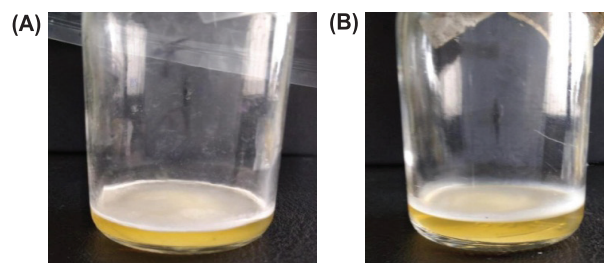
qua ở bảng 2 cho thấy, 96 chủng vi khuẩn bắt màu tím chứng tỏ các chủng vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh bào tử, có enzyme catalase giúp phân giải H_2O_2 thành H_2O và O_2 , xuất hiện phức hợp màu tím hoặc xanh đậm ở thử nghiệm oxidase, có khả năng di động trong môi trường thạch mềm có 50 ppm TTC (Triphenyl tetrazolium chloride), các chủng đều có khả năng sử dụng saccharose và maltose làm nguồn carbon đồng thời không thể lên men đường lactose. Trong thử nghiệm Voges-Proskauer và các thử nghiệm còn lại cho kết quả các chủng vi khuẩn đều có khả năng tạo ra acetoin trong môi trường glucose-phosphate, tăng trưởng tốt ở nhiệt độ 50°C, chịu được nồng độ muối 7% và phân hủy tinh bột đồng thời biến dưỡng citrate.

Dựa theo khóa phân loại Bergey cho thấy 96 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất có đặc điểm thuộc chi vi khuẩn *Bacillus* (hình 2) [15]. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố về đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* [16, 17].

Khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng *Bacillus*: Toàn bộ 96 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được tăng sinh trong môi trường NB lỏng không lắc ở nhiệt độ 37°C trong vòng 48 giờ để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học. Kết quả cho thấy, có 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* có xuất hiện lớp màng màu trắng đục trên bề mặt môi trường (hình 3, bảng 3) tương đồng với kết quả nghiên cứu của Y. Yanti và cs (2017) [10]. Do vậy, có thể kết luận 30 chủng vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học.

Bảng 3. Các chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu đất có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học.

Thứ tự	Chủng	Thứ tự	Chủng	Thứ tự	Chủng
1	B2.1	11	D2.2	21	D12.1
2	B9.9	12	D3	22	D10
3	B9.10	13	D4.1	23	D13
4	B14.3	14	D5.3	24	D14.2
5	B22.4	15	D6.2	25	D15
6	BA	16	D6.3	26	D18.5
7	BT411	17	D7	27	D22.4
8	BTN25	18	D8.10	28	D25.6
9	BTD	19	D11.10	29	D27.1
10	D1.1	20	D11.12	30	D32.5



Hình 3. Màng sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất. (A) Chủng B9.10; (B) Chủng D13.

Do đó, từ kết quả sàng lọc khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trong môi trường NB lỏng, chọn 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* tiến hành thí nghiệm khảo sát khả năng gây chết sâu đầu đen gây hại trên cây dừa.

3.2. Nghiên cứu khả năng phòng trừ sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm

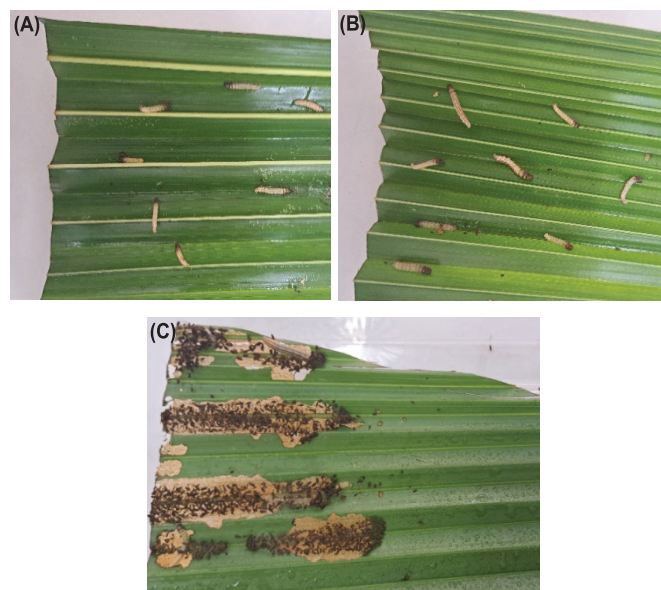
Từ 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt, tiến hành đánh giá khả năng gây chết sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm.

Bảng 4. Hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen của 30 chủng *Bacillus* tăng sinh 48 giờ trên môi trường LB lỏng.

Thứ tự	Ký hiệu	Hiệu lực diệt sâu sau 8 giờ theo dõi (%)	Hiệu lực diệt sâu sau 16 giờ theo dõi (%)	Hiệu lực diệt sâu sau 24 giờ theo dõi (%)
1	DC	0,00	0,00	0,00
2	B2.1	26,67 ^{defg}	57,78 ^{hi}	66,67 ^{efg}
3	B9.9	37,78 ^{hijk}	60,00 ^{ij}	73,33 ^{fg}
4	B9.10	62,22^m	66,67^{jk}	100,00ⁱ
5	B14.3	24,44 ^{def}	40,00 ^{de}	66,67 ^{efg}
6	B22.4	20,00 ^{bcd}	60,00 ^{ij}	53,33 ^{bcd}
7	BA	22,22 ^{cde}	33,33 ^{cd}	62,22 ^{cdef}
8	BT411	11,11 ^{ab}	31,11 ^{bc}	60,00 ^{bcd}
9	BTN25	13,33 ^{abc}	31,11 ^{bc}	53,33 ^{bcd}
10	BTD	6,67 ^a	24,47 ^{ab}	48,89 ^c
11	D1.1	17,78 ^{bcd}	33,33 ^{cd}	71,11 ^{efg}
12	D2.2	40,00 ^{ijk}	53,33 ^{ghi}	73,33 ^{fg}
13	D3	37,78 ^{hijk}	51,11 ^{gh}	75,56 ^{gh}
14	D4.1	44,44 ^{kl}	68,89 ^k	75,56 ^{gh}
15	D5.3	51,11 ^l	60,00 ^{ij}	73,33 ^{fg}
16	D6.2	40,00 ^{ijk}	53,33 ^{ghi}	73,33 ^{fg}
17	D6.3	37,78 ^{hijk}	42,22 ^{ef}	51,11 ^{bc}
18	D7	35,56 ^{ghij}	42,22 ^{ef}	71,11 ^{efg}
19	D8.10	37,78 ^{hijk}	48,89 ^{fg}	66,67 ^{efg}
20	D10	44,44 ^{kl}	57,78 ^{hi}	73,33 ^{fg}
21	D11.10	42,22 ^{kl}	57,78 ^{hi}	64,44 ^{defg}
22	D11.12	33,33 ^{fghi}	48,89 ^{fg}	68,89 ^{efg}
23	D12.1	35,56 ^{ghil}	46,67 ^{efg}	66,67 ^{efg}
24	D13	37,78^{hijk}	46,67^{efg}	86,67ⁿ
25	D14.2	37,78 ^{hijk}	46,67 ^{efg}	73,33 ^{fg}
26	D15	26,67 ^{defg}	40,00 ^{de}	51,11 ^{bc}
27	D18.5	33,33 ^{fghi}	42,22 ^{ef}	51,11 ^{bc}
28	D22.4	4,44 ^a	22,22 ^a	33,33 ^a
29	D25.6	22,22 ^{cde}	31,11 ^{bc}	60,00 ^{bcd}
30	D27.1	28,89 ^{efgh}	42,22 ^{ef}	64,44 ^{defg}
31	D32.5	26,67 ^{defg}	33,33 ^{cd}	48,89 ^b

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

Dịch lên men của 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* nuôi cấy trong môi trường LB lỏng được thu nhận sau tăng sinh 48 giờ, ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút để loại bỏ sinh khối và được phun trực tiếp trên sâu đầu đen đã tuyển chọn. Kết quả phòng trừ sâu đầu đen thể hiện qua bảng 4 cho thấy, hiệu lực gây chết sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn có sự khác biệt có ý nghĩa. Sau 8 giờ theo dõi, chỉ có duy nhất chủng B9.10 đạt hiệu lực gây chết sâu đầu đen trên 50%, các chủng vi khuẩn còn lại có hiệu lực diệt sâu dưới 50%. Sau 24 giờ theo dõi, hiệu lực gây chết sâu đầu đen đã tăng số lượng chủng đạt hiệu quả trên 50%, trong đó có 27/30 chủng, tỷ lệ gây chết từ 50,00% đến 100,00% chiếm 90% số chủng phân lập có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt. Trong đó, có 2 chủng có hiệu lực gây chết sâu đầu đen mạnh trên 85% sau 24 giờ theo dõi là chủng *Bacillus* B9.10 và chủng *Bacillus* D13. Chủng *Bacillus* B9.10 đạt hiệu quả gây chết sâu đầu đen cao nhất là 100,00% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại, tiếp đến là chủng *Bacillus* D13 có hiệu lực gây chết sâu đầu đen đạt 86,67% sau 24 giờ theo dõi (hình 4).



Hình 4. Kết quả thử nghiệm khả năng phòng trừ sâu đầu đen sau 48 giờ tăng sinh. (A) Chủng B9.10; (B) Chủng D13; (C) Đối chứng.

So sánh kết quả của các nghiên cứu khác cho thấy khả năng phòng trừ sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* có thể thông qua cơ chế tác động của chất hoạt động bề mặt sinh học được hình thành bởi một số lipopeptide và polyketide bao gồm surfactin, iturin, fengycin, bacylomycin, bacillaene, macrolactin, difficidin; được tổng hợp trong quá trình lên men vi khuẩn [8, 11, 18]. Một số nghiên cứu cho thấy các lipopeptide trực tiếp gây phá vỡ và phân hủy lớp biểu mô, gây tổn thương mô ruột giữa của ấu trùng, dẫn đến ấu trùng bị chết [19-21].

Như vậy, trong 30 chủng vi khuẩn *Bacillus*, chủng *Bacillus* B9.10 có hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen cao nhất (100,00%), kể đến là chủng *Bacillus* D13 có hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen đạt 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Do đó, hai chủng *Bacillus* này được tuyển chọn và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.3. Kết quả định danh

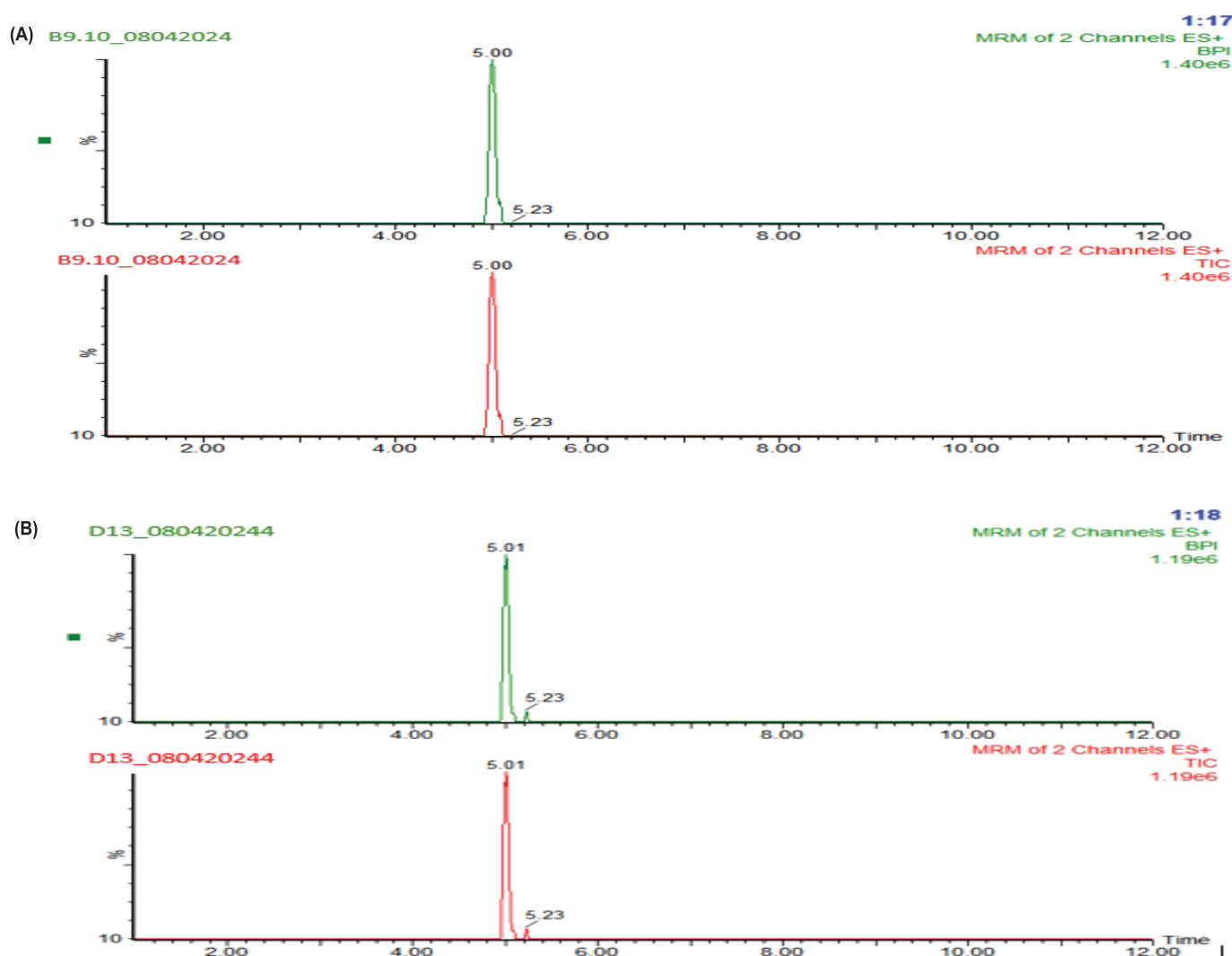
Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen có kích thước 1.500 bp ở 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* B9.10 và D13. Để xác định danh pháp đến mức loài, các chủng vi khuẩn sau khi thực hiện phản ứng PCR sẽ tiến hành giải trình tự nucleotide ở đoạn gen 16S rRNA. Trình tự nucleotide của 02 chủng vi khuẩn được chọn sau khi giải mã tiến hành so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI-Blast cho thấy chủng B9.10 là chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* độ tương đồng 99,86% và chủng D13 là chủng *Bacillus velezensis* độ tương đồng 99,93%.

3.4. Phân tích hàm lượng surfactin có trong dịch vi khuẩn *Bacillus*

Mẫu dịch vi khuẩn *Bacillus* B9.10 và D13 được tăng sinh trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó tiến hành chiết tách bằng dung môi và làm sạch, làm giàu qua cột chiết pha rắn SPE C18 trước

khi phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng ghép 02 lần khối phổ UPLC-MS/MS. Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách so sánh với chất chuẩn. Đối với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10, surfactin được phát hiện ở thời gian lưu là 5,00 phút (hình 5A). Cấu hình tương tự thu được đối với chủng *Bacillus velezensis* D13 ở thời gian lưu là 5,01 phút (hình 5B).

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng diệt sâu đầu đen đạt trên 85% đều có sự xuất hiện hoạt chất surfactin. Trong đó, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 có hàm lượng surfactin đạt 0,60 mg/g và chủng *Bacillus velezensis* D13 có hàm lượng surfactin đạt 0,42 mg/g. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu đã chứng minh các chủng vi khuẩn *Bacillus* có sự hiện diện của chất hoạt động bề mặt sinh học, điển hình là hoạt chất surfactin đều có khả năng gây độc cho côn trùng [7, 8, 22].



Hình 5. Sắc ký đồ phân tích UPLC-MS/MS của dịch vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 (A) và vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13 (B) có chứa surfactin.

Bảng 5. Hàm lượng surfactin trong dịch vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13.

Thứ tự	Tên chủng	Hàm lượng surfactin (mg/g)
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> B9.10	0,60
2	<i>Bacillus velezensis</i> D13	0,42

Từ những nghiên cứu trên cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13 được đánh giá là 02 chủng vi khuẩn tiềm năng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học phòng trị sâu đục đẹn gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

4. Kết luận

Từ 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dừa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre đã phân lập được 96 chủng vi khuẩn *Bacillus*, sàng lọc được 30 chủng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong đó, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng gây chết sâu đục đẹn với hiệu lực lần lượt là 100,00 và 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất surfactin của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và chủng *Bacillus velezensis* D13 lần lượt là 0,60 và 0,42 mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ben Tre Province (2024), *Report on The Socio-Economic Situation in April 2024*, <https://www.thongkebentre.gov.vn/Bao-cao-tinh-hinh-Kinh-te-Xa-hoi-thang-4-nam-2024-post102>, accessed 5 May 2024 (in Vietnamese).
- [2] M. Cock, P. Perera (1987), "Biological control of *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera, Oecophoridae)", *Biocontrol News and Information*, **4**(8), pp.283-310.
- [3] B. Sathiamma, C. Mohan, M. Gopal (2001), "Biocontrol potential and its exploitation in coconut pest management", *Biocontrol Potential and Its Exploitation in Sustainable Agriculture*, **2**, pp.261-283, DOI: 10.1007/978-1-4615-1377-3_16.
- [4] D. Yun, S. Yang, Y. Kim, et al. (2013), "Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1", *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **56**, pp.751-753, DOI: 10.1007/s13765-013-3238-y.
- [5] D. Guo, B. Wan, S. Xiao, et al. (2015), "Cyclic lipopeptides with herbicidal and insecticidal activities produced by *Bacillus clausii* DTM1", *Natural Product Communications*, **10**(12), pp.2151-2153, DOI: 10.1177/1934578X1501001235.
- [6] S. Yang, D. Lim, M. Noh, et al. (2017), "Characterisation of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9", *Entomological Research*, **47**(1), pp.55-59, DOI: 10.1111/1748-5967.12200.
- [7] L. Assié, M. Deleu, L. Arnaud, et al. (2002), "Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain)", *Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, **67**(3), pp.647-655.
- [8] I. Geetha, K. Paily, A. Manonmani (2012), "Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*", *Pest Management Science*, **68**(11), pp.1447-1450, DOI: 10.1002/ps.3324.
- [9] N. Dung, N. Quyen, P. Ty (2010), *Experimental Method Used to Identify Bacterial Strains*, Vietnam Educational Publishing House, pp.162-218 (in Vietnamese).
- [10] Y. Yanti, T. Habazar, R. Refinaldon, et al. (2017), "Indigenous *Bacillus* spp. ability to growth promoting activities and control bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*)", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **18**(4), pp.1562-1567, DOI: 10.13057/biodiv/d180435.
- [11] S. Khedher, H. Boukedi, O.K. Feki, et al. (2015), "*Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut", *Journal of Invertebrate Pathology*, **132**, pp.42-47, DOI: 10.1016/j.jip.2015.08.010.
- [12] W. Abbott (1925), "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *J. Econ. Entomol.*, **18**(2), pp.265-267, DOI: 10.1093/je/18.2.265a.
- [13] Y. Chen, S. Liu, H. Mou, et al. (2017), "Characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* mb01 from marine sediments", *Frontiers in Microbiology*, **8**, pp.1-11, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00871.
- [14] N. Alloui, F. Driss, H. Dhoubi, et al. (2021), "Two novel *Bacillus* strains (*subtilis* and *simplex* species) with promising potential for the biocontrol of *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of septoria tritici blotch of wheat", *Bio. Med. Research International*, **2021**(1), pp.1-10, DOI: 10.1155/2021/6611657.
- [15] P. Vos, G. Garrity, D. Jones, et al. (2009), "Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes", *Springer Science & Business Media*, **3**, pp.21-128, DOI: 10.1007/b92997.
- [16] M. Abuzeid, M. Khalif, E. Mohamed, et al. (2022), "Isolation and identification of microbes (fungi and bacillus species) from soil and evaluation of their antimicrobial properties", *Journal of Medical Sciences*, **17**(2), pp.29-36, DOI: 10.51984/JOMS.V17I2.220.
- [17] P. Nhut, V. Huong, D. Trinh (2019), "Isolation, screening and investigation of biological activity of bioflocculating bacteria in whiteleg shrimp ponds in Tra Vinh province", *Can Tho University Journal of Science*, **55**(1), pp.270-276, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2019.035 (in Vietnamese).
- [18] A.A.E. Salam, A. Nemat, A. Magdy (2011), "Potency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Bosid.) larvae", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **44**(3), pp.204-215, DOI: 10.1080/03235400902952129.
- [19] S. Khedher, H. Boukedi, M. Dammak, et al. (2017), "Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae", *Journal of Invertebrate Pathology*, **144**, pp.11-17, DOI: 10.1016/j.jip.2017.01.006.
- [20] M. Torres, V. Rocha, G. Petroselli, et al. (2022), "Entomopathogenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* strains against *Musca domestica* under controlled conditions", *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **170**(7), pp.584-592, DOI: 10.1111/eea.13186.
- [21] D. Ramesar, C. Hunter (2023), "First reported incidence of *Bacillus velezensis* exhibiting effective antagonism against a blowfly species, *Lucilia cuprina*", *Bio. Control*, **68**(1), pp.25-37, DOI: 10.1007/s10526-022-10172-4.
- [22] T. Denoirjean, A. Ameline, A. Couty, et al. (2022), "Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid", *Pest Management Science*, **78**(3), pp.929-937, DOI: 10.1002/ps.6702.

Nghiên cứu chọn giống nấm *Cordyceps militaris* mang gen giới tính đơn cho năng suất, chất lượng quả thể cao và ổn định

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Trần Bảo Trâm¹, Đào Ngọc Ánh¹, Trương Thị Chiên¹, Bùi Lan Phương², Đỗ Thị Kim Trang¹

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, C6 Thanh Xuân Bắc, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường THPT Chuyên Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 182 Lương Thế Vinh, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 25/6/2024; ngày chuyển phản biện 27/6/2024; ngày nhận phản biện 12/7/2024; ngày chấp nhận đăng 18/7/2024

Tóm tắt:

Nấm dược liệu *Cordyceps militaris* được sử dụng phổ biến trong y học truyền thống và thực phẩm ở các nước châu Á. Loài nấm này đang được nuôi trồng quy mô lớn tại nhiều nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Thái Lan, Việt Nam... Tuy nhiên, việc nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với tình trạng thoái hóa giống qua các thế hệ nuôi trồng. Gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được xác định giữ vai trò quan trọng trong quá trình hình thành quả thể và thoái hóa ở nấm *C. militaris*. Nghiên cứu này đã xác định được gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở sáu chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. Bốn chủng nấm (TN04, SH01, SH02 và SH04) mang cả hai gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, hai chủng nấm (TN03 và SH06) chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Các chủng nấm *C. militaris* nuôi trồng tại các đơn vị được ghi nhận xảy ra hiện tượng thoái hóa giống mạnh là các chủng nấm mang cả hai gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong sáu chủng nấm *C. militaris*, đã tuyển chọn được hai chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao vượt trội. Năng suất sinh học của hai chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng đạt 14,36 và 16,7%. Hàm lượng cordycepin trong quả thể của hai chủng nấm trên tương ứng là 14 và 13,97 mg/g quả thể khô. Đặc biệt, hai chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao và ổn định qua năm thế hệ nuôi trồng. Đây là các chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao và có thể sử dụng trong sản xuất quy mô công nghiệp.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*, quả thể, thoái hóa.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Research on selecting high and stable yield and fruiting body quality strains of *Cordyceps militaris* mushroom carrying a single mating-type gene

Xuan Tao Vu^{1*}, Bao Tram Tran¹, Ngoc Anh Dao¹, Thi Chien Truong¹, Lan Phuong Bui², Thi Kim Trang Do¹

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology; C6 Thanh Xuan Bac, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²HUS High School for Gifted Students, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 182 Luong The Vinh Street, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 25 June 2024; revised 12 July 2024; accepted 18 July 2024

Abstract:

The medicinal mushroom *Cordyceps militaris* is commonly used in traditional medicine and utilised as food in Asian countries. This mushroom is being cultivated on a large scale in many countries, including China, Korea, Thailand, Vietnam, etc. However, the cultivation of *C. militaris* fruiting bodies is facing degeneration through cultivation batches. The mating-type genes (*MAT1-1-1* and *MAT1-2-1*) have been identified as playing important roles in the fruiting body formation and degeneration processes in *C. militaris*. This study identified the *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes in six strains of *C. militaris* currently being cultivated in Vietnam. Four strains (TN04, SH01, SH02 and SH04) possessed both the *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* genes, while the other two strains (TN03 and SH06) had only the *MAT1-1-1* gene. The mushrooms were cultivated for production with great degeneration carry both the *MAT1-1-1* and *MAT1-2-1* mating-type genes. Among the six strains of *C. militaris*, two strains (TN03 and SH06) were selected for their superior fruiting body yield and cordycepin content. The biological efficiencies of the TN03 and SH06 strains were 14.36 and 16.7%, respectively. The cordycepin contents in the fruiting bodies of these two strains were 14 and 13.97 mg/g of dried fruiting bodies, respectively. Notably, the two strains TN03 and SH06 produced high and stable fruiting body yields and cordycepin contents over five generations of cultivation. These high-quality *C. militaris* strains are suitable for industrial-scale production.

Keywords: *Cordyceps militaris*, degeneration, fruiting body, *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Cordyceps militaris là một loại nấm dược liệu nổi tiếng, đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quý như điều hòa miễn dịch, kháng viêm, chống ung thư, hỗ trợ điều trị tiểu đường, đột quỵ và một số bệnh tim mạch. *C. militaris* được sử dụng trong y học cổ truyền ở châu Á và trở nên phổ biến ở châu Âu và châu Mỹ trong những năm gần đây [1, 2]. Cordycepin - hoạt chất chính được quan tâm nhiều trong nấm *C. militaris* với tiềm năng trong phát triển các loại thuốc hỗ trợ điều trị các bệnh do virus, nấm hay ung thư [3, 4]. Do vậy hiện nay, nấm *C. militaris* được nuôi trồng phổ biến với quy mô lớn ở nhiều nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Việt Nam... làm nguyên liệu thực phẩm và dược phẩm. Tại Việt Nam, việc nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* đang phát triển với nhiều cơ sở sản xuất quy mô lớn ở nhiều tỉnh, thành phố như Hà Nội, Lai Châu, Bắc Ninh, Thái Nguyên, Lâm Đồng... cung ứng cho thị trường trong và ngoài nước. Nhiều nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã thực hiện tối ưu điều kiện nuôi trồng nấm *C. militaris* cho năng suất sinh học đạt 11,6-11,9% và hàm lượng cordycepin trong quả thể đạt 4,33-4,54 mg/g [5-7]. Tuy nhiên, năng suất và chất lượng quả thể nấm *C. militaris* đạt được chưa cao. Hơn nữa, việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nhanh của các chủng giống. Biểu hiện thoái hóa ở nấm *C. militaris* có thể nhìn thấy ngay ở hiện tượng giảm hoặc mất khả năng hình thành quả thể. Sự thoái hóa cũng dẫn đến tốc độ tăng trưởng của nấm chậm hơn, chu kỳ sinh trưởng của nấm kéo dài và hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp giảm xuống [8, 9]. Như vậy, thoái hóa giống ảnh hưởng trực tiếp tới năng suất và chất lượng nấm, gây tổn thất về kinh tế cho hoạt động sản xuất nấm *C. militaris*.

Hiện nay, các nghiên cứu về nấm *C. militaris* chủ yếu tập trung vào nuôi trồng nhân tạo, tách chiết các thành phần có hoạt tính sinh học và đánh giá tác dụng dược lý của các thành phần đó. Các nghiên cứu về sự thoái hóa của nấm *C. militaris* còn rất hạn chế. Một số nghiên cứu về cơ chế hình thành quả thể ở nấm *C. militaris* cho thấy, quả thể nấm được hình thành theo cơ chế sinh sản hữu tính và được điều hòa bởi gen giới tính *MAT*. Locus gen giới tính bắt cặp tồn tại ở hai dạng đối ngược nhau là *MAT1-1* và *MAT1-2* ở trên 2 bào tử khác nhau [10]. Locus *MAT1-1* chứa 2 gen *MAT1-1-1* và *MAT1-1-2*, trong khi locus *MAT1-2* chỉ chứa gen *MAT1-2-1*. Hoạt động của hệ thống gen giao phối này dẫn đến sự hình thành quả thể nấm hoàn chỉnh [11]. T.X. Vu và cs (2023) [12] đã tiến hành nghiên cứu về hiện tượng thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* cho thấy, các chủng nấm này xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh ngay từ thế hệ thứ 3. Thông qua việc nghiên cứu phân lập các chủng nấm mang đơn gen giới tính từ các mẫu quả thể và phối trộn 2 loại bào tử có giới tính đối ngược nhau cho thấy, sự mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử này hay cụ thể là sự tăng quá mức của tỷ lệ bào tử mang gen *MAT1-2-1* dẫn tới hiện tượng thoái hóa mạnh. Đây được

coi là nguyên nhân chính gây ra hiện tượng thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* sinh sản hữu tính. Trong khi đó, một số nghiên cứu đáng chú ý cho thấy tồn tại các chủng nấm thuộc loài *C. militaris*, *C. takaomontana* và *C. cardinalis* chỉ mang locus gen *MAT1-1* đơn lẻ cũng có khả năng hình thành quả thể [13-15]. Các chủng nấm này không có gen *MAT1-2-1* dẫn tới không xảy ra hiện tượng mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử mang gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Như vậy rất có thể các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn sẽ hạn chế được hiện tượng thoái hóa giống xảy ra. Việc đánh giá khả năng thoái hóa của các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn so với các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* sẽ giúp xác định được giải pháp chọn giống nấm *C. militaris* có năng suất và chất lượng ổn định. Các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn có năng suất và chất lượng ổn định rất cần thiết trong sản xuất quy mô lớn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Sáu chủng nấm *C. militaris* được thu thập tại các cơ sở nuôi trồng nấm tại Thái Nguyên và Hà Nội. Toàn bộ các chủng nấm đã được xác nhận thuộc loài *C. militaris* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. Trình tự ITS của 6 chủng nấm này đã được đăng ký trên GenBank - NCBI với mã số tương ứng cho từng chủng: TN03 (OQ674702.1); TN04 (OQ674703.1); SH01 (OQ674705.1); SH02 (OQ674708.1); SH04 (OQ676497.1); SH06 (OQ674711.1). Chủng nấm *C. militaris* QN6 đã được công bố mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* [16] được sử dụng để so sánh khả năng thoái hóa với các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn xác định trong nghiên cứu này. Các chủng nấm đang được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm của Trung tâm Sinh học thực nghiệm - Viện Ứng dụng Công nghệ (Bộ Khoa học và Công nghệ).

Các cặp mồi đặc hiệu dùng cho phản ứng PCR sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1.

Bảng 1. Các mồi đặc hiệu sử dụng trong nghiên cứu.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
MAT1-1-1-F	ATGGAACACAGATCGAGCGACAC	457	[17]
MAT1-1-1-R	ATATACCTTCGCGATCATTGCCCGAG		
MAT1-2-1-F	TGTTTGTG CGCGATGGTTCTGG	368	[17]
MAT1-2-1-R	CCTCTGGAGGTTCTGCATCCA		

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*: Các chủng nấm *C. militaris* được nuôi trong môi trường khoai tây dạng lỏng (PDB) (lắc 200 vòng/phút ở 25°C trong 3 ngày) để thu hệ sợi nấm dùng cho tách chiết DNA tổng số. Quy

trình tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm được thực hiện theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [18]. Mẫu DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng là *MAT1-1-1-F/MAT1-1-1-R* và *MAT1-2-1-F/MAT1-2-1-R* (bảng 1). Chu trình nhiệt của phản ứng khuếch đại gen như sau: 94°C (3 phút); 30 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (40 giây); 72°C (10 phút). Gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* của các chủng nấm *C. militaris* được xác định dựa trên kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%.

Phương pháp nhân giống nấm *Cordyceps militaris* dạng dịch thể qua 5 thế hệ liên tiếp: Quy trình nhân giống nấm *C. militaris* dạng dịch thể được thực hiện theo T.X. Vu và cs (2023) [12]. Bào tử các chủng nấm *C. militaris* được dùng để cấy chuyển liên tiếp trên môi trường thạch PDA để thu bào tử liên tục 5 thế hệ. Bào tử chủng ban đầu được nuôi cấy và thu bào tử (F1), bào tử F1 tiếp tục được nuôi cấy và thu bào tử (F2). Chu kỳ này được lặp lại để có các thế hệ tiếp theo (F3, F4, F5). Quy trình thu dịch bào tử từ đĩa PDA nuôi nấm được thực hiện theo T.X. Vu và cs (2023) [12]. Dịch bào tử của từng thế hệ (1 ml 10^6 bào tử/ml) được cấy vào bình nuôi giống lỏng chứa 100 ml môi trường PDB có bổ sung 0,1% peptone. Giống lỏng được nuôi lắc 150 vòng/phút trong 3 ngày trong tối ở 22-25°C.

Phương pháp đánh giá năng suất quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* qua 5 thế hệ liên tiếp: Để đánh giá năng suất quả thể của các chủng nấm *C. militaris* qua 5 thế hệ liên tiếp, các chủng nấm được nuôi trồng dựa theo quy trình của T.X. Vu và cs (2023) [12]. 3-4 ml dịch giống nấm ở mỗi thế hệ được cấy đều lên bề mặt giá thể đựng trong hộp nhựa hình trụ có thể tích 650 ml (Song Long, Việt Nam). Thành phần giá thể trong 1 hộp nuôi gồm: 30 g gạo lứt huyết rồng và 60 ml dịch dinh dưỡng. Thành phần 1 lít dịch dinh dưỡng: dịch chiết 200 g khoai tây, 15 g glucose, 15 g sucrose, 1 g $MgSO_4$, 1 g KH_2PO_4 , 1 g pepton, 100 g nhộng tằm. Tất cả môi trường được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút và để nguội. Sau khi cấy giống, hộp nuôi được đặt trong tối 5 ngày, ở 25°C để hệ sợi nấm mọc một lớp mỏng trên toàn bộ bề mặt giá thể. Hộp nuôi nấm được chuyển qua giai đoạn hình thành quả thể ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày (500 Lux) ở 22-23°C, độ ẩm 85-90% trong 60 ngày. Thí nghiệm nuôi quả thể được thực hiện trên 50 hộp nuôi cho 1 thế hệ, lặp lại 3 lần độc lập. Chỉ tiêu theo dõi gồm: (1) khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi thể tích 650 ml và (2) năng suất sinh học (Biological Efficiency - BE) [19].

Phương pháp phân tích hàm lượng cordycepin trên hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): Hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* được xác định trên hệ thống HPLC theo T.X. Vu và cs (2024) [4]. Quả thể nấm *C. militaris* tươi được sấy khô trên thiết bị sấy thăng hoa ở -40°C tới khi độ ẩm đạt 5%. Mẫu quả thể nấm đã nghiền

nhỏ và qua rây số 180 được tiến hành chiết hồi lưu trong methanol 80% trong 30 phút. Dịch chiết được lọc qua màng cellulose acetate 0,45 μm để sử dụng cho phân tích HPLC. Hệ thống HPLC sử dụng trong phân tích (hãng Shimadzu, Nhật Bản) gồm: bơm LC 20AD, bộ tiêm mẫu tự động SIL-20A HT, Detector SPD 20A. Sử dụng cột C18 (Agilent) với kích thước cột là 250x4,6 mm và kích thước hạt 5 μm . Tốc độ rửa giải là 0,5 ml/phút, pha động gồm dung môi nước và acetonitril. Nhiệt độ lò cột được đặt ở 25°C. Detector UV được đặt quan sát tại bước sóng 260 nm.

Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Microsoft Excel 2016 và kiểm định T-test (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$).

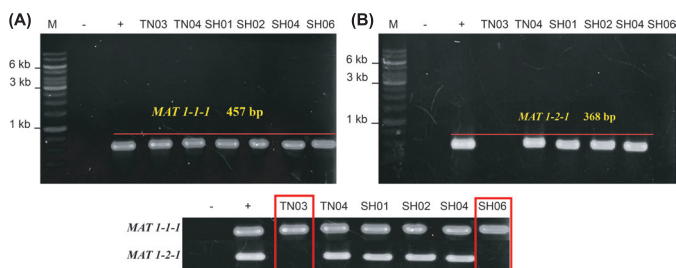
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*

Gen *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* được xác định là 2 gen giới tính đối lập nhau, giữ vai trò quan trọng trong quá trình sinh sản hữu tính hình thành quả thể và thoái hóa ở các chủng nấm *C. militaris* lưỡng bội [12]. Trong khi đó tại Việt Nam, việc xác định 2 gen giới tính *MAT1-1-1*, *MAT1-2-1* và đánh giá tỷ lệ các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng mang các gen giới tính khác nhau để từ đó cho thấy hiện trạng thoái hóa giống chưa có nhiều nghiên cứu đề cập.

Kết quả xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 6 chủng nấm *C. militaris* nghiên cứu cho thấy, 4 chủng nấm *C. militaris* TN04, SH01, SH02, SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*; 2 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* (hình 1) và không ghi nhận chủng nấm nào chỉ mang gen giới tính *MAT1-2-1*. Trong báo cáo trước của nhóm nghiên cứu đã tiến hành phân lập, định danh và xác định gen giới tính *MAT* của 8 chủng nấm *C. militaris*, trong đó 5 chủng nấm (QN6, HL11, HL12, TN01 và TN02) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, 3 chủng nấm bao gồm SH03, HL13 và HN01 chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1* [16]. Từ kết quả này cho thấy tỷ lệ các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* đang được nuôi trồng tại Việt Nam khá cao. Kết quả này phù hợp với thực trạng thoái hóa giống xảy ra phổ biến tại các cơ sở nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* và cụ thể là xảy ra ở các cơ sở sử dụng chủng *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Hiện tượng này là do ở các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT* xảy ra hiện tượng mất cân bằng tỷ lệ bào tử mang 2 gen giới tính nêu trên, dẫn tới quá trình thoái hóa xảy ra [12]. Các cơ sở sử dụng chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn không xảy ra hiện tượng thoái hóa giống. Như vậy, nghiên cứu này đã cung cấp các dữ liệu về gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam và bước đầu cho thấy mối liên quan giữa gen giới tính với hiện tượng thoái hóa giống. Tuy

hiện, cần có thêm những nghiên cứu với số lượng chủng nấm lớn hơn, thu thập tại nhiều đơn vị nuôi trồng nấm trong cả nước để cho thấy rõ về việc liên quan giữa gen giới tính *MAT* và hiện tượng thoái hóa.

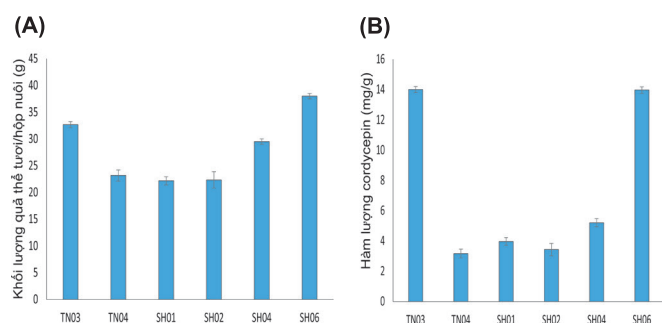


Hình 1. Xác định gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở các chủng nấm *Cordyceps militaris*. (A) Kết quả điện di xác nhận gen giới tính *MAT1-1-1*; (B) Kết quả điện di xác nhận gen giới tính *MAT1-2-1*; M: DNA marker 1 kb.

3.2. Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của các chủng nấm *Cordyceps militaris*

Trong nghiên cứu này, các mẫu quả thể nấm được thu thập tại các cơ sở nuôi trồng nấm ở các độ tuổi khác nhau. Hơn nữa, mỗi cơ sở lại có công nghệ nuôi trồng riêng biệt (môi trường nuôi, điều kiện nuôi...), nên các mẫu quả thể nấm không được đánh giá về mặt năng suất và chất lượng tại thời điểm thu mẫu. Cả 6 chủng nấm *C. militaris* được đánh giá năng suất và chất lượng quả thể trong cùng điều kiện nuôi trồng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 6 chủng nấm đều hình thành quả thể. Trong đó, 2 chủng nấm TN03 và SH06 (chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*) cho năng suất quả thể cao nhất, khối lượng quả thể tươi trung bình/hộp nuôi là 32,67 và 38 g tương ứng với năng suất sinh học là 14,36 và 16,7 %. Đồng thời, đây cũng là 2 chủng nấm *C. militaris* cho hàm lượng cordycepin trong quả thể cao nhất tương ứng trung bình đạt 14 và 13,97 mg/g quả thể khô (hình 2).



Hình 2. Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris*. (A) Khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi; (B) Hàm lượng cordycepin trong quả thể khô.

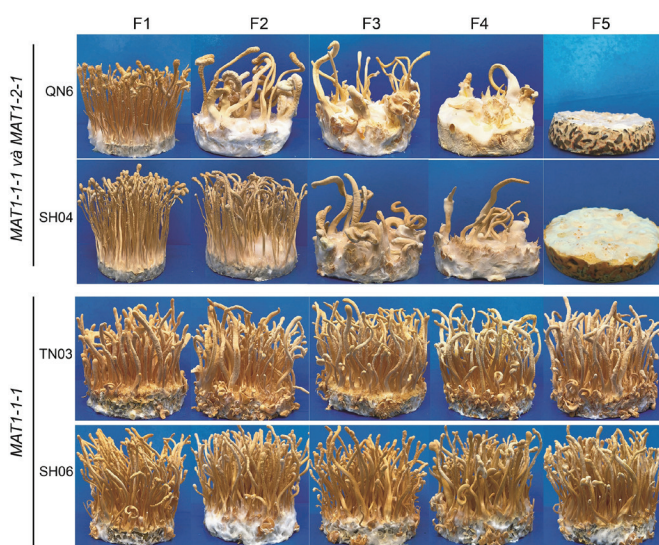
Năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể là các yếu tố quan trọng của việc sản xuất nấm *C. militaris*. Nhiều nhóm nghiên cứu tại Việt Nam đã tiến hành

tối ưu các điều kiện nuôi trồng đối với nhiều chủng nấm *C. militaris* khác nhau cho năng suất sinh học đạt 11,6-11,9% và hàm lượng cordycepin trong quả thể đạt 4,33-4,54 mg/g [5-7]. Nghiên cứu của L. Huang và cs (2009) [20] cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* đạt 2,654 mg/g. Nghiên cứu của H.H. Lee và cs (2017) [21] cũng đã cho thấy hàm lượng cordycepin trong một số chủng nấm *C. militaris* lưu giữ tại Trung tâm Sưu tập Văn hóa Nông nghiệp Hàn Quốc (KACC) có hàm lượng cordycepin trung bình khoảng 2,13 mg/g. Như vậy, 2 chủng nấm TN03, SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin vượt trội, việc đánh giá sự ổn định năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể là cần thiết để ứng dụng các chủng nấm trên vào sản xuất thực tế.

3.3. Đánh giá sự ổn định về năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin của chủng nấm *Cordyceps militaris* mang gen giới tính đơn

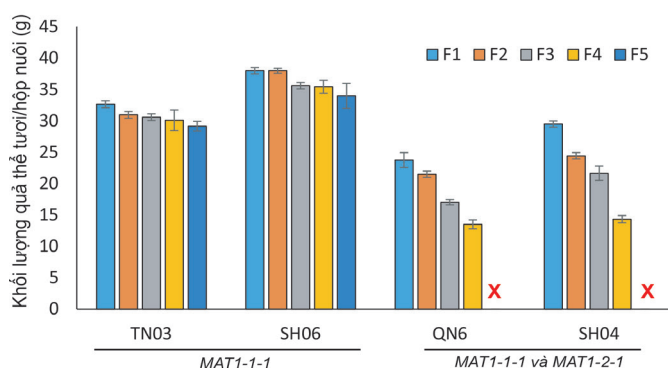
Việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đang phải đối mặt với sự thoái hóa nhanh của các chủng giống, biểu hiện của hiện tượng thoái hóa là sự giảm mạnh về năng suất và chất lượng quả thể [8, 9]. Để việc sản xuất nấm *C. militaris* được ổn định, điều kiện quan trọng cần có là công nghệ cùng với các chủng giống có năng suất và hàm lượng hoạt chất cao và ổn định. Chủng *C. militaris* TN03 và SH06 là các chủng nấm mang gen giới tính đơn có năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin cao.

Trong nghiên cứu này, năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 được đánh giá qua 5 thế hệ liên tiếp và so sánh với năng suất quả thể của 2 chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* là SH04 và QN6. QN6 là chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* đã được nhóm nghiên cứu được công bố [16], nhưng chưa được đánh giá khả năng thoái hóa qua các thế hệ nuôi trồng. Hơn nữa, nghiên cứu T.X. Vu và cs (2023) [12] đã cho thấy, các chủng nấm *C. militaris* mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh do sự mất cân bằng tỷ lệ 2 loại bào tử mang gen giới tính đối lập nhau. Do vậy trong nghiên cứu này, chủng QN6 và SH04 được sử dụng để so sánh khả năng thoái hóa với các chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn là TN03 và SH06. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng hình thành quả thể và hình dạng quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* không có sự khác biệt lớn tại 5 thế hệ. Trong khi đó, khả năng hình thành quả thể và hình dạng quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* có sự khác biệt lớn tại 5 thế hệ. Từ thế hệ thứ 2 (chủng QN6) và thế hệ thứ 3 (chủng SH04) hình dạng quả thể đã biến đổi bất thường so với quả thể ở thế hệ thứ 1. Đặc biệt tại thế hệ thứ 5, cả 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 đã mất khả năng hình thành quả thể (hình 3).



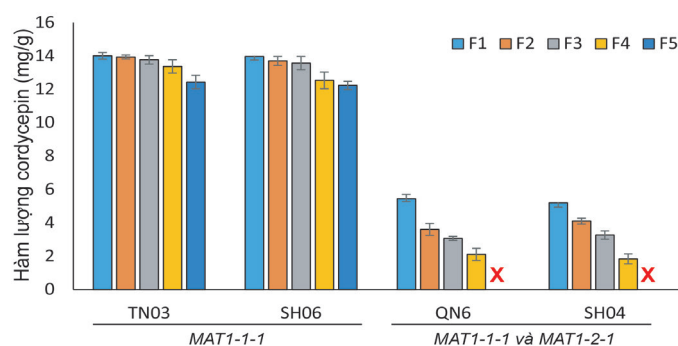
Hình 3. Quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp. F1-F5: thế hệ thứ 1 tới thế hệ thứ 5.

Năng suất quả thể (khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi) của cả 4 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06, QN6 và SH04 tại 5 thế hệ đã được xác định (hình 4). Năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 giảm nhẹ tương ứng 7,9 và 6,8% tại thế hệ thứ 4 và giảm 10,7 và 10,5% tại thế hệ thứ 5 so với thế hệ thứ 1. Trong khi đó, năng suất quả thể 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 giảm mạnh sau 4 thế hệ, cụ thể tương ứng giảm 43,2 và 51,4%. Sự khác biệt về năng suất quả thể ở các thế hệ so với thế hệ thứ 1 của mỗi chủng nấm đều có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, nấm *C. militaris* bắt đầu có hiện tượng thoái hóa khi cấy chuyển đến thế hệ thứ 3, sự thoái hóa nghiêm trọng xuất hiện ở thế hệ thứ 4 và thế hệ thứ 5 có thể dẫn tới chủng nấm mất khả năng tạo quả thể [9]. Đặc điểm thoái hóa này phù hợp với kết quả nghiên cứu về năng suất quả thể qua 5 thế hệ của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Trong khi đó, năng suất quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* ổn định không khác biệt nhiều qua 5 thế hệ (hình 4).



Hình 4. Năng suất quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp.

Các nghiên cứu về thoái hóa ở nấm *C. militaris* thường quan tâm nhiều tới khả năng hình thành quả thể. Hàm lượng hoạt chất cordycepin ở các thế hệ thoái hóa không có nhiều các nghiên cứu đề cập. Trong khi đó, cordycepin là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng nấm *C. militaris* [4, 20]. Do vậy, nghiên cứu này tiến hành xác định hàm lượng cordycepin trong quả thể của cả 4 chủng nấm *C. militaris* TN03, SH06, QN6 và SH04 tại 5 thế hệ (hình 5).



Hình 5. Hàm lượng cordycepin trong quả thể của các chủng nấm *Cordyceps militaris* tại 5 thế hệ liên tiếp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* QN6 và SH04 giảm mạnh sau 4 thế hệ, cụ thể tương ứng giảm 61,4 và 64,7% so với thế hệ đầu tiên (khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Tại thế hệ thứ 4, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng QN6 và SH04 đạt 2,1 và 1,83 mg/g. Trong khi đó, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 giảm nhẹ sau 5 thế hệ. Cụ thể tại thế hệ thứ 4, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng giảm 4,5 và 10,3% và giảm 11,19 và 12,4% tại thế hệ thứ 5. Tại thế hệ thứ 4 và thứ 5, hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng TN03 và SH06 đạt 12,2-13,3 mg/g quả thể khô. Đây là nghiên cứu đầu tiên chỉ ra sự khác nhau về tính ổn định năng suất quả thể và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể giữa các chủng nấm *C. militaris* mang 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* và chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1*.

Như vậy, nghiên cứu này đã tuyển chọn được 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 mang gen giới tính đơn *MAT1-1-1* cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin cao và ổn định. Đây là 2 chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao, hoàn toàn có khả năng đưa vào sản xuất. Việc ứng dụng 2 chủng nấm *C. militaris* TN03 và SH06 vào thực tế sẽ giúp các đơn vị sản xuất khắc phục được tình trạng thoái hóa giống đang xảy ra phổ biến. Đồng thời, quả thể nấm *C. militaris* TN03 và SH06 với hàm lượng hoạt chất cordycepin cao góp phần làm tăng giá trị của sản phẩm nấm, từ đó đem lại lợi thế cạnh tranh cho các đơn vị nuôi trồng loài nấm này.

Nghiên cứu này thực hiện tuyển chọn chủng nấm *C. militaris* mang gen giới tính đơn cho năng suất, chất lượng cao và ổn định trên số lượng chủng nấm chưa nhiều. Do đó, cần có thêm các nghiên cứu tuyển chọn trên số lượng chủng nấm lớn để tìm kiếm được các chủng nấm cho năng suất và chất lượng cao hơn. Việc liên tục nâng cấp chất lượng giống nấm *C. militaris* là vấn đề cần thiết trong sản xuất.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1* ở 6 chủng nấm *C. militaris* đang được nuôi trồng Việt Nam, trong đó 4 chủng nấm (TN04, SH01, SH02, SH04) mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*, 2 chủng nấm (TN03 và SH06) chỉ mang gen giới tính *MAT1-1-1*. Các chủng nấm *C. militaris* ở các cơ sở nuôi trồng được ghi nhận xảy ra hiện tượng thoái hóa mạnh là các chủng nấm mang cả 2 gen giới tính *MAT1-1-1* và *MAT1-2-1*. Nghiên cứu đã tuyển chọn được 2 chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao vượt trội. Năng suất sinh học và hàm lượng cordycepin trong quả thể của 2 chủng nấm TN03 và SH06 tương ứng đạt 14,36 và 16,7%; 14 và 13,97 mg/g quả thể khô. Đặc biệt, 2 chủng nấm TN03 và SH06 cho năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao và ổn định qua 5 thế hệ. Đây là các chủng nấm *C. militaris* chất lượng cao và có thể sử dụng trong sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.R. Phull, M. Ahmed, H.J. Park (2002), “*Cordyceps militaris* as a bio functional food source: Pharmacological potential, anti-inflammatory actions and related molecular mechanisms”, *Microorganisms*, **10**, pp.1-31, DOI: 10.3390/microorganisms10020405.

[2] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, et al. (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968, DOI: 10.1016/j.fitote.2010.07.010.

[3] A.K. Verma, R. Aggarwal (2021), “Repurposing potential of FDA approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm”, *Chemical Biology & Drug Design*, **97**(4), pp.836-853, DOI: 10.1111/cbdd.13812.

[4] T.X. Vu, T.B. Tran, H.H. Vu, et al. (2024), “Ethanol extract from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* HL8 exhibits cytotoxic activities against cancer cells, skin pathogenic yeasts, and postharvest pathogen *Penicillium digitatum*”, *Archives of Microbiology*, **206**(3), pp.1-11, DOI: 10.1007/s00203-024-03833-8.

[5] T.B. Do, H.N. Vu, T.T. Ma, et al. (2017), “Evaluation on cultivation techniques to fruiting body formation of *Cordyceps militaris*”, *TNU Journal of Science and Technology*, **161**(01), pp.113-118 (in Vietnamese).

[6] V.V. Le, T.H. Tran, T.B.T. Nguyen, et al. (2017), “The preliminary investigation on cultivation technology of orange caterpillar fungus *Cordyceps militaris* L. ex Fr. in Vietnam”, *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **13**(3), pp.445-454 (in Vietnamese).

[7] T.L. Pham, H.L. Do, T.H.H. Nguyen, et al. (2016), “Study the effect of temperature and light on growth, fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris* NBRC 100741 on silkworm”, *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, **32**(2), pp.63-72 (in Vietnamese).

[8] H. Lou, J. Lin, L. Guo, et al. (2019), “Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**(19), pp.7835-7841, DOI: 10.1007/s00253-019-10074-z.

[9] J. Yin, X. Xin, Y. Weng, et al. (2017), “Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration”, *PLOS ONE*, **12**(10), pp.1-14, DOI: 10.1371/journal.pone.0186279.

[10] B. Shrestha, H.K. Kim, G.H. Sung, et al. (2004), “Bipolar heterothallism, a principal mating system of *Cordyceps militaris* in vitro”, *Biotechnology and Bioengineering*, **9**(6), pp.440-446, DOI: 10.1007/BF02933483.

[11] Y. Lu, Y. Xia, F. Luo, et al. (2016), “Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*”, *Fungal Genetics and Biology*, **88**, pp.35-43, DOI: 10.1016/j.fgb.2016.01.013.

[12] T.X. Vu, H.D. Thai, B.H.T. Dinh, et al. (2023), “Effects of MAT1-2 spore ratios on fruiting body formation and degeneration in the heterothallic fungus *Cordyceps militaris*”, *Journal of Fungi*, **9**(10), pp.1-11, DOI: 10.3390/jof9100971.

[13] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2011), “Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine”, *Genome Biology*, **12**, pp.1-22, DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.

[14] E. Yokoyama, K. Yamagishi, A. Hara (2005), “Heterothallism in *Cordyceps takaomontana*”, *FEMS Microbiology Letters*, **250**(1), pp.145-150, DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.004.

[15] G.H. Sung, B. Shrestha, S.K. Han, et al. (2010), “Heterothallic type of mating system for *Cordyceps cardinalis*”, *Mycobiology*, **38**(4), pp.282-285, DOI: 10.4489/MYCO.2010.38.4.282.

[16] X.T. Vu, B.T. Tran, T.M. Nguyen, et al. (2022), “Identification of mating-type (MAT) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam”, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **64**(7), pp.60-64 (in Vietnamese).

[17] N. Kang, H.H. Lee, I. Park, et al. (2017), “Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains”, *Mycobiology*, **45**(1), pp.31-38, DOI: 10.5941/MYCO.2017.45.1.31.

[18] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), “A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications”, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74 (in Vietnamese).

[19] B. Shrestha, S.K. Han, J.M. Sung, et al. (2012), “Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains”, *Mycobiology*, **40**(2), pp.100-106, DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.2.100.

[20] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.”, *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961.

[21] H.H. Lee, N. Kang, I. Park, et al. (2017), “Characterization of newly bred *Cordyceps militaris* strains for higher production of cordycepin through HPLC and URP-PCR analysis”, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(7), pp.1223-1232, DOI: 10.4014/jmb.1701.01043.

Nghiên cứu thiết kế hệ thống giám sát không dây, từ xa hàm lượng nước trong dầu máy biến áp truyền tải

Hoàng Ngọc Nhân^{1*}, Khổng Minh Đăng¹, Phạm Chí Công²

¹Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, 24 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Điện tử, Tin học, Tự động hóa, Bộ Công Thương, 156A Quán Thánh, phường Quán Thánh, quận Ba Đình, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/8/2023; ngày chuyển phản biện 18/8/2023; ngày nhận phản biện 28/8/2023; ngày chấp nhận đăng 5/9/2023

Tóm tắt:

Bài báo này trình bày giải pháp xây dựng hệ thống giám sát không dây, từ xa hàm lượng nước trong dầu máy biến áp truyền tải. Trong giải pháp này, thiết bị đo cấp trường (tại hiện trường) được thiết kế để chuẩn hóa tín hiệu, xử lý tín hiệu, chuyển đổi, hiển thị và truyền thông tín hiệu từ cảm biến đo hàm lượng nước trong dầu (nguyên lý điện dung). Thiết bị cấp trường có thể sử dụng nguồn cung cấp độc lập từ pin 4,5V hoặc có thể từ nguồn điện mặt trời nhằm tránh ảnh hưởng không mong muốn từ lưới điện phân phối tới máy biến áp. Giao thức truyền thông LoRa từ các thiết bị đo cấp trường đến bộ thu thập trung tâm được sử dụng. Thiết bị thu thập trung tâm đa kênh thu thập dữ liệu từ các thiết bị cấp trường theo chuẩn truyền thông LoRa, có thể hiển thị tại chỗ hoặc truyền dữ liệu lên đám mây (cloud). Toàn bộ dữ liệu được đọc về, hiển thị, xử lý, cảnh báo, báo cáo trên máy tính trên nền tảng web. Hệ thống đã được hoàn thiện, chạy ổn định, với sai số tương đối nhỏ hơn 1%, tại giá trị 25 ppm nước trong dầu.

Từ khóa: hàm lượng nước trong dầu, thiết bị cấp trường, truyền thông LoRa.

Chỉ số phân loại: 2.2

Research to design a wireless and remote surveillance system for water content in transmission transformer oil

Ngoc Nhan Hoang^{1*}, Minh Dang Khong¹, Chi Cong Pham²

¹National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, 24 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Vietnam Research Institute of Electronics, Informatics and Automation, Ministry of Industry and Trade, 156A Quan Thanh Street, Quan Thanh Ward, Ba Dinh District, Hanoi, Vietnam

Received 15 August 2023; revised 28 August 2023; accepted 5 September 2023

Abstract:

This article presents a solution to build a wireless and remote surveillance system for water content in transmission transformer oil. In this solution, the field measuring device is designed to standardise the signal, process the signal, convert, display and communicate the signal from the water content in the oil sensor (capacitance principle). The field measuring device can use an independent power supply from a 4.5 V battery or from a solar power source to avoid unwanted effects from the distribution grid to the transformer. The LoRa communication protocol from the field measuring devices to the multi-channel central collector (MCC) is used. The MCC collected data from the field devices according to the LoRa communication standard, which can be displayed on-site or transmitted to the cloud. All data is read, displayed, processed, warned, and reported on a computer on a web platform. The system has been completed and is running stably, with a relative error of less than 1% at a value of 25 ppm water in oil.

Keywords: field device, LoRa communication protocol, water in oil.

Classification number: 2.2

*Tác giả liên hệ: Email: hnnhan@most.gov.vn

1. Đặt vấn đề

Dầu trong máy biến áp có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc làm mát cuộn dây máy biến áp, cách điện, bảo vệ lõi và cuộn dây khi được ngâm hoàn toàn trong dầu, ngăn cản tiếp xúc trực tiếp của oxy trong khí quyển với cellulose làm giấy cách điện của cuộn dây. Để đảm bảo hoạt động bình thường của máy biến áp, các thông số của dầu cách điện phải được đảm bảo như: thông số về điện (độ bền điện môi, điện trở riêng...), thông số hóa lý (hàm lượng nước trong dầu, độ axit, sức căng bề mặt, độ nhớt, điểm chớp cháy...).

Các thông số hóa lý của dầu cách điện cũng có ảnh hưởng đến nhau và ảnh hưởng đến thông số về điện của dầu. Ví dụ hàm lượng nước trong dầu ảnh hưởng đến điện áp đánh thủng dầu, ảnh hưởng đến độ nhớt, điểm chớp cháy...

Độ ẩm trong dầu cách điện máy biến áp làm giảm độ bền điện môi của dầu, đồng thời làm tăng nguy cơ hỏng giấy cách điện. Nó có thể hình thành các bong bóng khí và đẩy nhanh quá trình lão hóa của lớp cách nhiệt cellulose. Sự gia tăng hàm lượng nước trong dầu trong môi trường điện áp cao có thể sinh ra phóng điện cục bộ. Ngay cả khi máy biến áp không bị rò rỉ, nước trong dầu vẫn hình thành như một sản phẩm phụ của quá trình lão hóa cũng như độ ẩm từ giấy cách điện hòa cùng với dầu. Theo nghiên cứu của Y. Du và cs (1999) [1] thì hàm lượng nước trong dầu tăng lên gấp đôi sẽ làm giảm hiệu suất của máy biến áp đi một nửa. Do đó, độ ẩm là một thông số quan trọng ảnh hưởng bất lợi đến hiệu suất của máy biến áp và cần giám sát liên tục. Phương pháp đo hàm lượng nước trong dầu máy biến áp sử dụng sợi quang như cảm biến cũng được nghiên cứu, tuy nhiên các giá trị đo mới trình bày ở mô hình thực nghiệm [2]. Theo nghiên cứu của S.F.A.Z. Yusoff và cs (2018) [3] có đo độ ẩm trong mẫu dầu bằng cách xử lý ảnh hưởng của lớp phủ kim loại bạch kim lên sợi quang hình chữ D. Đây là cơ sở cho việc xây dựng hệ thống đo hàm lượng nước trong dầu máy biến áp. Tuy nhiên đây mới là thử nghiệm, chưa đảm bảo được độ chính xác, dải đo cần thiết, chưa xây dựng hệ thống đo online được. Trong nghiên cứu của V.V. Kondalkar và cs (2019) [4] đề cập đến việc phát triển cảm biến độ ẩm điện dung thu nhỏ loại metal-polyimide-interdigital transducer (IDT) có độ nhạy cao để đo hàm lượng nước trong dầu máy biến áp. Cảm biến này có thể phát triển để đo độ ẩm trong dầu máy biến áp.

Hiện nay, đo độ ẩm trong dầu cách điện máy biến áp có thể sử dụng phương pháp Karl Fischer (theo chuẩn ASTM D1744), phương pháp này có độ chính xác cao, nhưng chỉ phù hợp cho đo mẫu trong phòng thí nghiệm bởi thử nghiệm có thể ảnh hưởng các chất phụ gia khác trong quá trình thử nghiệm... [6].

Để đo hàm lượng nước trong dầu trực tuyến, người ta sử dụng cảm biến kiểu điện dung như thiết bị NP330F có dải đo từ 10 ppm đến bão hòa. Hoặc thiết bị của Vaisala cũng có thể đo hàm lượng nước trong dầu từ vài ppm đến bão hòa.

Tại Việt Nam, số lượng máy biến áp cấp điện áp 110 kV trở lên có số lượng rất lớn, nhu cầu trang bị hệ thống đo hàm lượng nước trong dầu cho máy biến áp cũng như trong quá trình đại tu máy biến áp là rất lớn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng cảm biến của Vaisala để xây dựng hệ thống giám sát hàm lượng nước trong dầu máy biến áp trực tuyến từ xa để có thể cảnh báo sự gia tăng hàm lượng nước trong dầu hoặc có thể giám sát chất lượng dầu trong quá trình lọc dầu máy biến áp.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

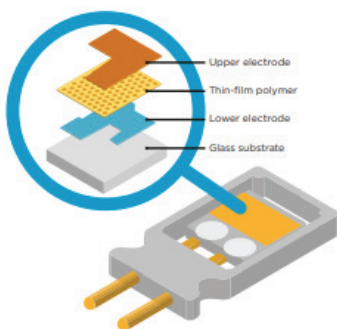
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là hàm lượng nước trong dầu cách điện gốc khoáng sử dụng trong máy biến áp cấp điện áp >110 kV.

Khi mới xuất xưởng, dầu cách điện máy biến áp có hàm lượng nước trong dầu khoảng trên 30 ppm. Theo tiêu chuẩn vận hành được ban hành trong ngành điện, thì hàm lượng nước trong dầu mới là dưới 10 ppm, còn trong quá trình vận hành dưới 25 ppm [5]. Ngày nay, các trạm điện đang hướng tới trạm không người trực, do vậy việc giám sát hàm lượng nước trong dầu máy biến áp từ xa là việc làm cấp thiết phù hợp với xu hướng chung của ngành cũng như của thế giới.

2.2. Phương pháp đo không dây, từ xa hàm lượng nước trong dầu

Để giám sát trực tuyến hàm lượng nước trong dầu cần phải lựa chọn cảm biến đo và phương pháp đo phù hợp. Cảm biến đo hàm lượng nước trong dầu được phân tích lựa chọn phù hợp với ứng dụng đo hàm lượng nước trong dầu máy biến áp hoạt động theo nguyên lý điện dung.

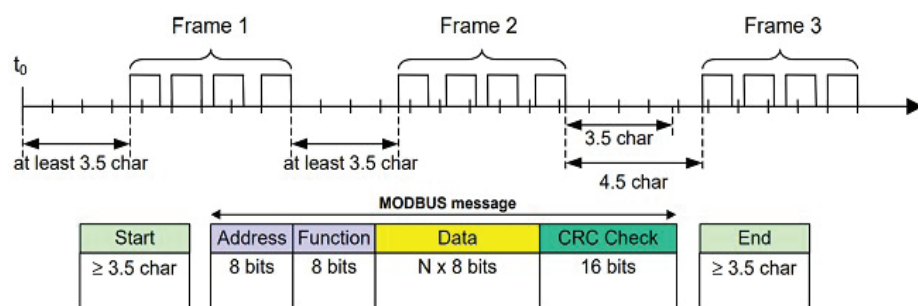


Hình 1. Cấu trúc của cảm biến đo độ ẩm HUMICAP và MMP8 của Vaisala [5].

Hình 1 là cấu trúc của cảm biến đo độ ẩm của Vaisalla theo nguyên lý điện dung, được hình thành từ một tấm polyme mỏng giữa hai điện cực. Tấm polyme hấp thụ hay giải phóng hơi nước khi độ ẩm tương đối của môi trường xung quanh tăng lên hay giảm xuống. Sự thay đổi này dẫn đến điện môi của cảm biến thay đổi. Dựa vào sự thay đổi điện môi này mà có thể biết được hàm lượng nước trong dầu.

Trong nghiên cứu này, các tác giả sử dụng cảm biến của Vaisalla model MMP8, có tích hợp sẵn bộ chuyển đổi, xử lý tín hiệu, đầu ra dạng Modbus RTU để đo hàm lượng nước trong dầu từ xa không dây.

Hình 2 trình bày cấu trúc của khung dữ liệu theo chuẩn Modbus RTU, với N byte dữ liệu, 8 bit mã hàm, dữ liệu có thể là nhiều byte (tùy theo số lượng dữ liệu gửi tương ứng với các thông số cần đo), 2 byte cho kiểm tra lỗi.



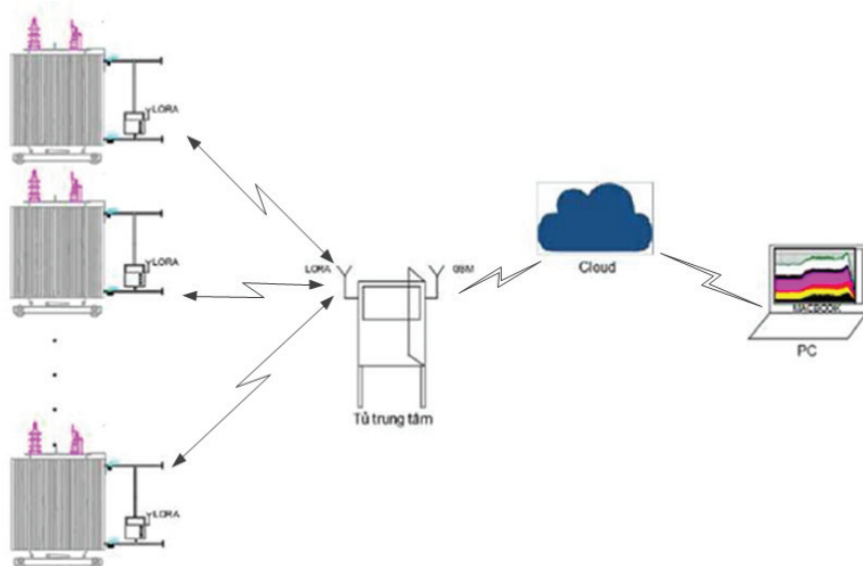
Hình 2. Cấu trúc của khung dữ liệu theo chuẩn Modbus RTU.

Thường một trạm biến áp 100 kV trở lên (220 hoặc 500 kV) thì số lượng máy biến áp trung bình là 4 máy. Khoảng cách từ máy biến áp đến phòng điều khiển trung tâm lớn nhất là 300 đến 400 m. Do vậy, sử dụng phương thức truyền thông Lora trong trạm biến áp là hoàn toàn phù hợp với mức năng lượng thấp và phân tán.

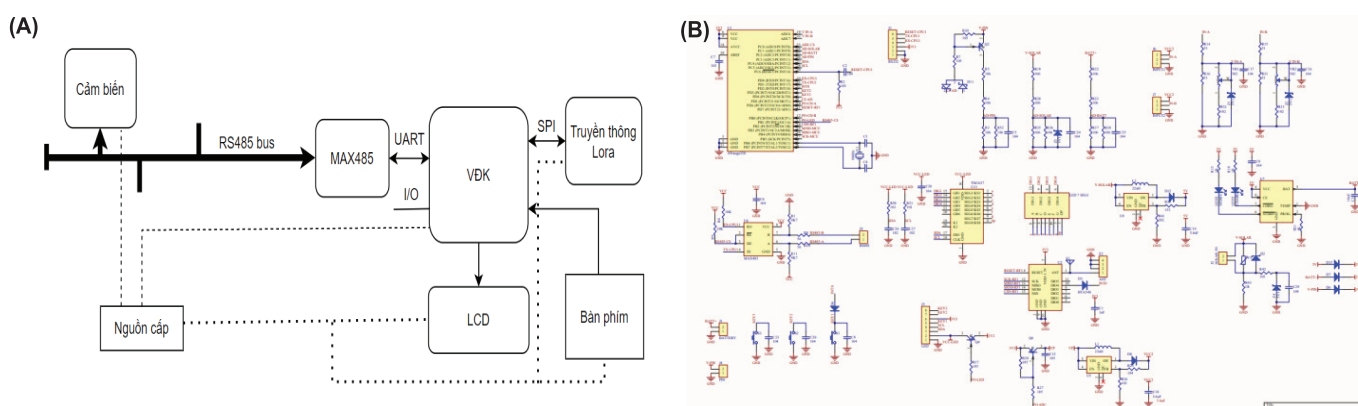
Hình 3 trình bày sơ đồ cấu trúc của hệ thống giám sát hàm lượng nước trong dầu từ xa.

Các thông tin về hàm lượng nước trong dầu được đo lường và truyền LoRa về tủ trung tâm đặt trong phòng điều khiển trung tâm. Tủ trung tâm xử lý dữ liệu, hiển thị dữ liệu, cảnh báo hoặc chuẩn hóa dưới dạng Modbus RTU, hoặc truyền GSM lên Cloud. Dữ liệu về hàm lượng nước có thể đọc về hiển thị trên máy tính PC trên nền tảng web.

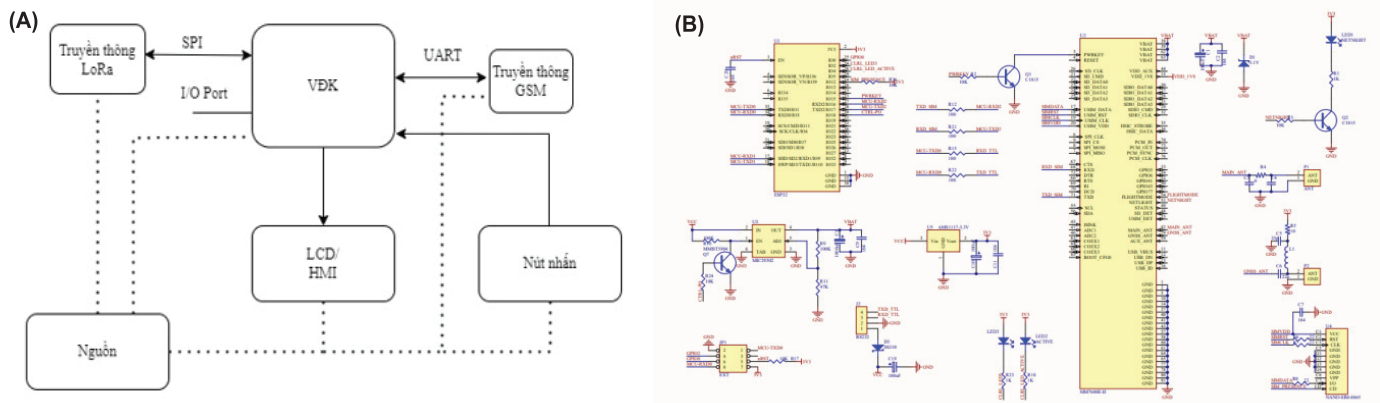
Hình 4 trình bày sơ đồ khối và sơ đồ nguyên lý của thiết bị đo hàm lượng nước cấp trường. Cảm biến đo hàm lượng nước trong dầu được



Hình 3. Sơ đồ cấu trúc của hệ thống giám sát hàm lượng nước trong dầu từ xa.



Hình 4. Sơ đồ khối (A) và sơ đồ nguyên lý (B) của thiết bị đo hàm lượng nước tại hiện trường.



Hình 5. Sơ đồ khối (A) và sơ đồ nguyên lý (B) của thiết bị thu thập trung tâm.

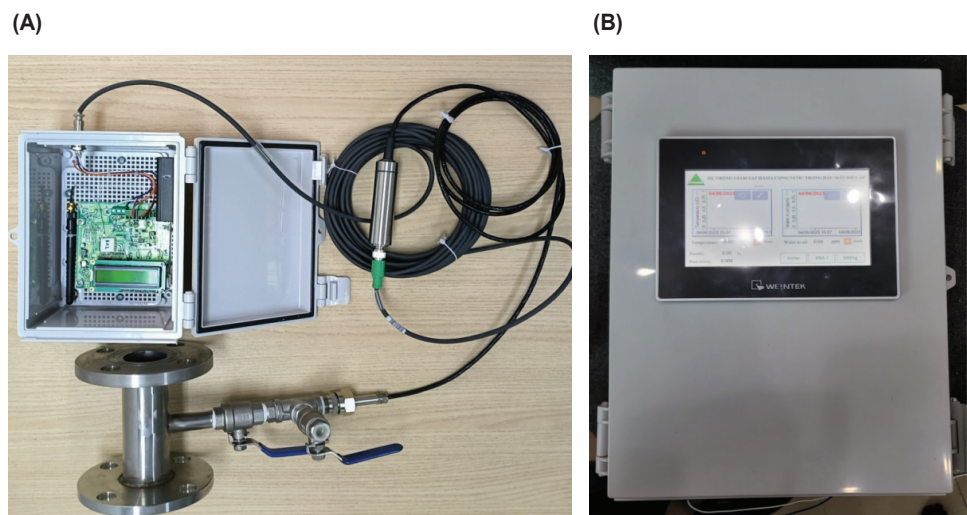
chuẩn hóa tín hiệu dưới dạng Modbus RTU, được nối với bộ vi điều khiển 8 bit ATmega238P để xử lý dữ liệu, đọc, hiển thị và truyền thông dưới dạng giao thức LoRa. Năng lượng cung cấp cho thiết bị cấp trường sử dụng bằng nguồn pin Li-ion 3x1,5 VDC. Thiết bị đo cấp trường được thiết kế ở chế độ tiết kiệm năng lượng và có thể giám sát được mức năng lượng của nguồn cung cấp, từ đó biết được khi nào phải thay pin mới. Trong thiết kế thời gian dự kiến hoạt động của một lần thay pin là 6 tháng.

Thiết bị đo hàm lượng nước tại hiện trường sẽ được kết nối với thiết bị thu thập trung tâm (hình 5) thông qua truyền thông LoRa. Bộ vi điều khiển trung tâm ATSAM3X8E được sử dụng để thu thập dữ liệu từ các thiết bị đo cấp trường thông qua truyền thông LoRa EPS32 và truyền dữ liệu lên cloud qua GSM SIM7600E-H. Thiết bị thu thập trung tâm có thể thu thập dữ liệu từ nhiều thiết bị cấp trường (trong nghiên cứu này được thực hiện với 4 thiết bị cấp trường), có thể hiển thị tại chỗ, có thể cấu hình hóa và truyền thông dữ liệu lên cloud.

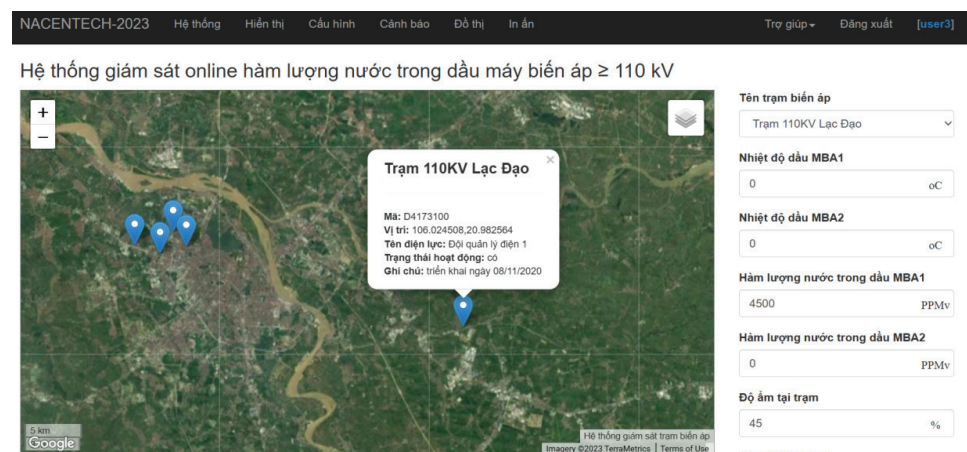
3. Kết quả và bàn luận

Trên cơ sở nghiên cứu thiết kế, thiết bị đo hàm lượng nước trong dầu tại hiện trường và tủ thu thập trung tâm được nhóm nghiên cứu thiết kế và hoàn thiện ở hình 6 và 7. Hệ thống đã được thử nghiệm trong phòng thí nghiệm một cách ổn định trước khi đưa vào chạy thực tế.

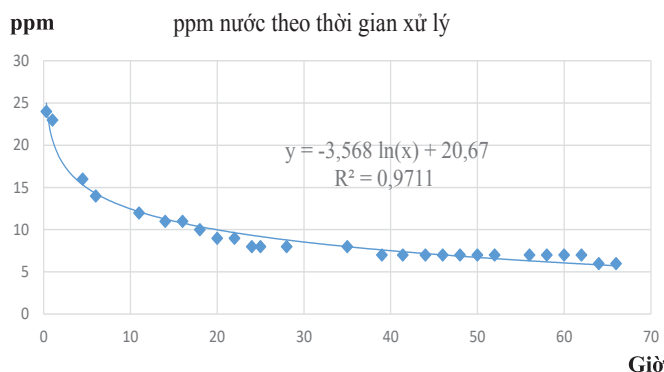
Hệ thống đã được thử nghiệm để giám sát hàm lượng nước trong dầu máy biến áp 63 MVA trong quá trình lọc dầu chân không máy biến áp 220 kV thực hiện bằng máy lọc dầu MAS4000 (của Hãng ARRAS-MAXEI, CH Pháp), tại đơn vị trong ngành điện (khối lượng dầu cần lọc khoảng 30.000 lít dầu).



Hình 6. Thiết bị giám sát hàm lượng nước cấp trường (A), thiết bị thu thập từ xa đa kênh (B).



Hình 7. Các thông số về hàm lượng nước trong dầu máy biến áp được hiển thị từ xa trên máy tính.



Hình 8. Hàm lượng nước trong dầu máy biến áp theo thời gian xử lý dầu.

Máy lọc dầu được nối với máy biến áp, hệ thống giám sát hàm lượng nước trong dầu được nối với đầu ra của máy lọc dầu. Máy biến áp được gia nhiệt trong quá trình lọc dầu với nhiệt độ 70°C. Hàm lượng nước trong dầu được giám sát trực tuyến với giá trị đo hiển thị theo thời gian thể hiện ở hình 8.

Ở thời điểm ban đầu, hàm lượng nước trong dầu là 25 ppm, giá trị thí nghiệm của phòng thí nghiệm VILAS17025 là 24,8 ppm tương ứng với giá trị được thí nghiệm. Sai số tương đối lớn nhất khoảng 1% nguyên nhân sai số này đến từ thời gian thử nghiệm và phương pháp lấy mẫu theo chuẩn VILAS17025.

Khi lọc dầu ở công suất 4.000 lít/giờ, gia nhiệt ở 70°C, sau 20 giờ lọc thì hàm lượng nước trong dầu xuống còn 10 ppm. Để đảm bảo hàm lượng nước trong dầu đáp ứng quy trình vận hành, sau 70 giờ lọc, hàm lượng nước trong dầu còn 6 ppm (giá trị đo bởi phòng thí nghiệm là 6 ppm). Điều này chứng tỏ hệ thống đã vận hành một cách chính xác, đáp ứng được các yêu cầu kỹ thuật trong ngành điện.

Theo mô hình thực nghiệm trong hình 8 thì thời gian để chắc chắn đảm bảo hàm lượng nước trong dầu dưới 10 ppm là khoảng 30 giờ lọc với lưu lượng 4.000 lít/giờ, tương ứng

với 5 chu kỳ lọc. Điều này hoàn toàn tương thích với tư vấn của Hãng máy lọc dầu của ARRAS-MAXEI của Cộng hòa Pháp.

4. Kết luận

Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu đã trình bày phương pháp đo hàm lượng nước trong dầu tại hiện trường và từ xa với độ chính xác cao. Sai số tương đối nhỏ hơn 1% (chủ yếu đến từ thời gian lấy mẫu). Giải pháp này cho phép giám sát hàm lượng nước trong dầu máy biến áp online giúp cho người vận hành biết được tình trạng của máy biến áp nhằm đảm bảo vận hành an toàn máy biến áp. Bên cạnh đó, phương pháp này giúp tính toán chính xác thời gian cần thiết để dùng máy lọc dầu cho máy biến áp trong quá trình bảo dưỡng máy biến áp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Du, M. Zahn, B.C. Lesieurt, et al. (1999) "Moisture equilibrium in transformer paper-oil systems", *IEEE Electrical Insulation Magazine*, **15**(1), pp.11-20.
- [2] S. Laskar, S. Bordoloi (2013), "Monitoring of moisture in transformer oil using optical fiber as sensor", *Journal of Photonics*, **2013**, DOI: 10.1155/2013/528478.
- [3] S.F.A.Z. Yusoff, M.H. Mezher, I.S. Amiri, et al. (2018), "Detection of moisture content in transformer oil using platinum coated on D-shaped optical fiber", *Optical Fiber Technology*, **45**, pp.115-121, DOI: 10.1016/j.yofte.2018.07.011.
- [4] V.V. Kondalkar, G. Ryu, Y. Lee, et al. (2019), "Development of highly sensitive and stable humidity sensor for real-time monitoring of dissolved moisture in transformer-insulating oil", *Sensors and Actuators*, **286**(1), pp.377-385, DOI: 10.1016/j.snb.2019.01.162.
- [5] Vaisala (2020), *HUMICAP Humidity Sensor Datasheet*, Ref. B210781EN-D ©Vaisala 2020, <https://docs.vaisala.com/v/u/B211795EN-E/en-US>, accessed 10 July 2023.
- [6] Northern Power Corporation (2016), *Unified Technical Standards for Equipment Selection in The Northern Power Corporation*, EVNNPC. KT/QD.01 (in Vietnamese).

Báo cáo ca bệnh rối loạn dự trữ glycogen do đột biến dị hợp tử phức trên gen *G6PC*

Trần Thị Hải¹, Nguyễn Khánh Linh², Phạm Quang Anh², Nguyễn Thị Hòa³, Nguyễn Hải Hà^{2*}

¹Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Học viện Chính trị, Bộ Quốc phòng, 124 Ngô Quyền, phường Quang Trung, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 7/7/2023; ngày chuyển phân biên 10/7/2023; ngày nhận phân biên 1/8/2023, ngày chấp nhận đăng 3/8/2023

Tóm tắt:

Bệnh dự trữ glycogen tuýp Ia (GSD Ia) là một bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường do các đột biến gen glucose-6-phosphatase (*G6PC*) gây nên. Các triệu chứng của bệnh bao gồm: chậm phát triển, gan to, hạ đường huyết, axit lactic máu, tăng lipid máu dẫn đến tích tụ quá nhiều glycogen và chất béo trong gan. Nghiên cứu này báo cáo một ca bệnh nam giới người Việt Nam 24 tuổi, nhập viện với các biểu hiện bệnh phức tạp. Bệnh nhân được kiểm tra lâm sàng, cận lâm sàng và dự đoán mắc hội chứng rối loạn chuyển hóa. Kiểm tra nhiễm sắc thể đồ cho thấy bệnh nhân có lượng nhiễm sắc thể bình thường. Giải trình tự hệ gen mã hóa (WES) đã xác định bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử phức gây bệnh trên gen *G6PC* gồm c.T518C (p.Leu173Pro) và c.G648T (p.Leu216Leu). Do đó, bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh dự trữ glycogen tuýp Ia, áp dụng phác đồ điều trị tiêu chuẩn và tư vấn chế độ dinh dưỡng phù hợp. Trong hai đột biến gen đã phát hiện, đột biến c.G648T (p.Leu216Leu) lần đầu tiên được ghi nhận trên người Việt Nam. Nghiên cứu này đã bổ sung thông tin vào cơ sở dữ liệu di truyền các bệnh rối loạn chuyển hóa ở quần thể người Việt Nam, đóng góp vào công tác chẩn đoán và điều trị bệnh chính xác cho bệnh nhân.

Từ khóa: biến thể gây bệnh, dự trữ glycogen kiểu Ia, gen *G6PC*.

Chỉ số phân loại: 3.1, 3.2

A case report of glycogen storage disease caused by compound heterozygous variants in the *G6PC* gene

Thi Hai Tran¹, Khanh Linh Nguyen², Quang Anh Pham², Thi Hoa Nguyen³, Hai Ha Nguyen^{2*}

¹Hanoi Medical University Hospital, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

³Political Academy, Ministry of National Defense, 124 Ngo Quyen Street, Quang Trung Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 7 July 2023; revised 1 August 2023; accepted 3 August 2023

Abstract:

Glycogen storage disease type Ia (GSD Ia) is an autosomal recessive inherited disease resulting from glucose-6-phosphatase catalytic (*G6PC*) gene mutations. Common symptoms of glycogen storage disease type Ia include growth retardation, hepatomegaly, hypoglycemia, lactic acidemia, and hyperlipidemia, leading to excessive glycogen and fat accumulation in the liver. The present study reported one case of a 24-year-old Vietnamese male hospitalised with complicated manifestations. The patient was examined clinically, and subclinically and predicted to have metabolic syndrome. The karyotype test revealed the usual number of chromosomes of the patient. Whole exome sequencing (WES) analysis identified that the patient harboured compound heterozygous pathogenic variants in the *G6PC* gene as c.T518C (p.Leu173Pro) and c.G648T (p.Leu216Leu). Therefore, the patient was diagnosed with glycogen storage disease type Ia and applied standard treatment and appropriate nutrition counselling. Among the detected gene variants, the c.G648T (p.Leu216Leu) variant was first detected in Vietnamese patients. This study provided more information to the genetic database of metabolic disorders in the Vietnamese population, effectively contributing to further studies and the accurate diagnosis and treatment of patients.

Keywords: glycogen storage type Ia, *G6PC* gene, pathogenic variants.

Classification numbers: 3.1, 3.2

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenhaiha@igr.ac.vn

1. Đặt vấn đề

Bệnh dự trữ glycogen là một rối loạn chuyển hóa hiếm gặp, gây ra bởi các đột biến gen dẫn đến thiếu hụt enzyme phân hủy hoặc tổng hợp glycogen với tỷ lệ xuất hiện ước tính khoảng 1/20.000 đến 1/43.000 ca sinh [1]. Đặc điểm của các bệnh dự trữ glycogen là bệnh di truyền lặn trên nhiễm sắc thể thường, ngoại trừ tuýp VIII và IX di truyền lặn liên kết nhiễm sắc thể (NST) giới tính X [2]. Bệnh này được chia thành 12 loại nhỏ, chúng có các biểu hiện khác nhau dựa vào enzyme bị thiếu hụt và các cơ quan bị ảnh hưởng, nhưng nhìn chung, hầu hết chúng đều ảnh hưởng đến gan và thần kinh cơ. Những biểu hiện thường thấy của bệnh bao gồm hạ đường huyết, gan to, trương lực cơ thấp, nhiễm toan, chậm lớn ở trẻ em và tăng lipid máu [3]. Trong số đó, bệnh tuýp I là phổ biến nhất, biểu hiện ở 80% các ca bệnh [4]. Ngoài những biểu hiện chung trên, người mắc bệnh có xu hướng bị hạ đường huyết, đau vùng thượng vị và chảy máu mũi do suy giảm chức năng tiêu cầu [5]. Gan có thể phình to khi mới sinh hoặc sau này. Hơn nữa, khi trẻ lớn hơn có thể bị ảnh hưởng bởi u vàng phát ban, thiếu máu, bệnh thận mãn tính do tăng axit uric máu và sỏi thận. Tầm vóc thấp bé và còi xương là những biểu hiện điển hình [6]. Các rối loạn chuyển hóa này xuất hiện do cơ thể thiếu hụt enzyme đơn vị xúc tác glucose 6-phosphatase (G6Pase) và là hậu quả của đột biến gây bệnh trong gen *G6PC*. *G6PC* là một gen đơn bản, có kích thước khoảng 12,5 kb, nằm tại vị trí 17q21 trên nhiễm sắc thể số 17, với 5 exon. Hầu hết các đột biến gây bệnh đã biết của gen *G6PC* là đột biến sai nghĩa dẫn đến thay thế axit amin. Theo cơ sở dữ liệu đột biến gen người (HGMD) năm 2020, có ít nhất 120 đột biến gen *G6PC* đã được tìm thấy trong số 550 bệnh nhân mắc bệnh GSD tuýp Ia. Các phương pháp phát hiện nguyên nhân di truyền gây bệnh dự trữ glycogen bao gồm giải trình tự gen trực tiếp hoặc giải trình tự gen thể hệ mới cho bộ gen, cho hệ gen mã hóa [7, 8].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Nam thanh niên 24 tuổi, khám và điều trị tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các kiểm tra lâm sàng được chỉ định bởi các bác sỹ và nhân viên y tế chuyên khoa nội tiết. Với biểu hiện bệnh phức tạp, khó xác định chính xác nguyên nhân và có gợi ý chẩn đoán hướng tới bệnh dự trữ glycogen. Bệnh nhân và người mẹ đã được giải thích tình trạng bệnh và tiếp nhận tư vấn di truyền trước khi đồng ý tham gia nghiên cứu và kiểm tra di truyền.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết ADN hệ gen

Mẫu máu ngoại vi (2 ml) của bệnh nhân được thu giữ vào ống chứa chất chống đông EDTA.K3 và giữ ở -20°C

đến khi sử dụng. ADN bộ gen được tách chiết từ mẫu máu bằng cách sử dụng kit Exgene™ Blood SV mini 250p của Hãng Geneall (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.2. Giải trình tự hệ gen mã hóa (WES) và phân tích

Giải trình tự hệ gen mã hóa được thực hiện trên hệ thống Illumina theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Dữ liệu tạo ra được đánh giá chất lượng, so sánh và xử lý trình tự bởi các công cụ FastQC, BWA 0.7.10 [9], Picard tools (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) dựa trên trình tự hệ gen người tham chiếu mã số GRCh37/hg19. Chú giải biến thể gen được thực hiện bằng Genome Analysis Toolkit v4.1 [10]. Các biến thể nhằm nghĩa được dự đoán chức năng bằng các công cụ SIFT [11] và MutationTaster [12].

Các biến thể thuộc nhóm 30 gen (*AGL*, *ALDOA*, *ALDOB*, *AMPD1*, *CPT2*, *ENO3*, *EPM2A*, *FBP1*, *G6PC*, *GAA*, *GBE1*, *GYG1*, *GYS1*, *GYS2*, *LAMP2*, *LDHA*, *NHLRC1*, *PFKM*, *PGAM2*, *PGK1*, *PGM1*, *PHKA1*, *PHKA2*, *PHKB*, *PHKG2*, *PRKAG2*, *PYGL*, *PYGM*, *SLC2A2*, *SLC37A4*) liên quan đến rối loạn dự trữ glycogen được sàng lọc đầu tiên. Trong trường hợp không xác định được biến thể gây bệnh ở nhóm gen trên, các phân tích sàng lọc gen liên quan đến các bệnh lý khác sẽ tiếp tục được tiến hành.

Các biến thể đã báo cáo là lành tính, không gây bệnh trong cơ sở dữ liệu ClinVar được loại khỏi danh sách sàng lọc. Các biến thể còn lại được coi là có khả năng gây bệnh được sàng lọc lần lượt theo các tiêu chí sau: (i) các biến thể thuộc các gen liên quan tới bệnh dự trữ glycogen; (ii) các biến thể đã báo cáo là gây bệnh/có khả năng gây bệnh (pathogenic/likely pathogenic) trong cơ sở dữ liệu ClinVar; (iii) các biến thể có chỉ số MAF (Minor Allele Frequency) <0,1% (iiii) ưu tiên đánh giá các biến thể được dự đoán “gây hại - Damaging” hoặc “gây bệnh -Disease causing”. Biến thể được coi là gây bệnh nếu phù hợp tiêu chuẩn quy định của Hiệp hội Bệnh học phân tử và Di truyền y học Hoa Kỳ (ACMG) và mô hình di truyền gây bệnh đã biết.

2.2.3. Giải trình tự Sanger

Giải trình tự Sanger sử dụng bộ sinh phẩm ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) trên hệ thống 3500 Genetic Analyzer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) được sử dụng để kiểm tra, xác nhận biến thể gây bệnh trên mẫu bệnh nhân và thành viên gia đình của họ. Đoạn DNA chứa exon 4 và 5 của gen *G6PC* được khuếch đại sử dụng cặp mồi ở bảng 1. Điều kiện PCR như sau: 95°C/5 phút; (95°C/30 giây; 64°C/30 giây; 72°C/30 giây) x 35 chu kỳ và 72°C/8 phút. Sản phẩm PCR được giải trình tự trực tiếp và phân tích bởi phần mềm BioEdit. Trình tự gen *G6PC* tham chiếu của người có mã số NM_000151 trong ngân hàng gen.

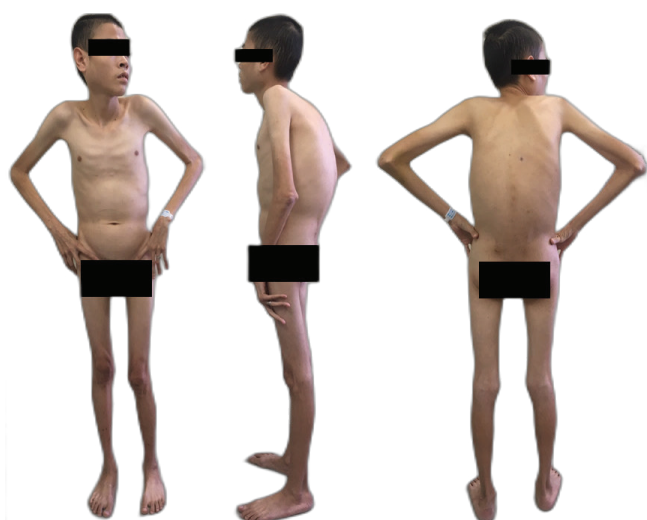
Bảng 1. Các cặp mồi được thiết kế cho giải trình tự Sanger.

Tên mồi	Trình tự 5'...3'	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
G6PC_E4F	CCAACAGGCATCTTTGGACT	359
G6PC_E4R	CTGGAATGCTGGGATTTTGT	
G6PC_E5F	ACTCCTCCAAACCCACCTCT	388
G6PC_E5R	GAGCCACTTGCTGAGTTTCC	

3. Kết quả

3.1. Biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân

Bệnh nhân nam, 24 tuổi là con thứ 3 trong gia đình không có tiền sử bệnh rối loạn chuyển hóa, 2 anh trai của bệnh nhân phát triển bình thường. Sau khi sinh, bệnh nhân chậm tăng cân và phát triển thể chất. Từ năm 2 tuổi, bệnh nhân thường xuyên có các đợt chảy máu mũi, vàng da, bụng chướng, đau bụng, đi khám và điều trị tại nhiều bệnh viện, trong đó có Bệnh viện Nhi Trung ương và được chẩn đoán xơ gan bẩm sinh. Bệnh nhân không khám và theo dõi định kỳ tại bệnh viện, trong quá trình phát triển luôn ở tình trạng thấp còi, suy dinh dưỡng, có nhiều lần phải vào viện vì đau bụng không rõ nguyên nhân, thiếu máu nặng phải truyền máu.



Hình 1. Hình ảnh bệnh nhân khi vào viện.

Bệnh nhân vào khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội tháng 3 năm 2021 trong tình trạng đau bụng, chướng bụng, buồn nôn, nôn nhiều và đi ngoài phân đen. Thăm khám lâm sàng thấy các dấu hiệu và triệu chứng sau: thể trạng suy kiệt (BMI 14,7 kg/m²), teo các cơ chi trên, chi dưới, cơ thái dương, cơ trên đòn, dưới đòn, cơ liên sườn mức độ nặng, da niêm mạc nhợt nhiều, bụng chướng, ấn đau thượng vị, gan to quá rốn, lách và các hạch ngoại vi không to (hình 1). Các thăm khám cận lâm sàng cho kết quả như sau: thiếu máu mức độ nặng (số lượng hồng cầu: 2,14 T/l, Hb: 71 G/l, hồng cầu to), tiểu cầu: 515 G/l, bạch cầu: 7,8 G/l, triglyceride: 87 mmol/l, cholesterol: 36 mmol/l, CRPhs: 0,47 mg/dl, ALT/AST: 1989/328 U/l, GGT: 3860 U/l, prothrombin: 104%, bilirubin toàn phần: 69,5 μmol/l, men tụy trong giới hạn bình thường (bảng 2). Siêu âm ổ bụng có hình ảnh gan to (đọc gan 136 cm), lách không to, giãn các quai ruột, nội soi dạ dày tá tràng cho thấy loét hành

tá tràng và không thấy hình ảnh xuất huyết. Chẩn đoán sơ bộ cho thấy các dấu hiệu của rối loạn lipid máu nặng, viêm gan, thiếu máu nặng. Bệnh nhân được đề nghị theo dõi xuất huyết tiêu hóa do loét hành tá tràng và tiến hành điều trị bằng truyền khối hồng cầu, PPIs truyền tĩnh mạch liên tục theo đúng phác đồ trong 72 giờ để điều trị xuất huyết tiêu hóa, Insulin Actrapid truyền tĩnh mạch liên tục và theo dõi đường máu 3 giờ/lần kết hợp truyền đường khi hạ đường huyết để giảm triglyceride máu.

Bảng 2. Đặc điểm cận lâm sàng của bệnh nhân.

Chỉ số	Kết quả	Chỉ số	Kết quả
Số lượng hồng cầu (4-5,9 T/l)	2,14	ALT (<40 U/l)	1.989
Hb (125-175 g/l)	71	AST (<41 U/l)	328
MCV (80-100 fl)	105,2	GGT (8-61 U/l)	3.860
MCH (315-363 g/l)	314	Bilirubin toàn phần (<15 μmol/l)	69,5
Số lượng TC (150-450 G/l)	515	Cholesterol (<5,2 mmol/l)	36
Số lượng BC (4-10 G/l)	7,8	Triglycerid (<1,7 mmol/l)	87
Prothrombin (70-140%)	104	HAV - IgM	Âm tính
FT4 (9,01-19,05 pmol/l)	10,92	HBsAg	Âm tính
TSH (0,27-4,2 μIU/ml)	0,696	Anti HCV	Âm tính
Cortisol (133-537 nmol/l)	489	HEV - IgM	Âm tính
Calci ion hóa (1,11-1,35 mmol/l)	1,12	CMV - IgM	Âm tính
Vitamin D (>30 ng/ml)	3	EBV - IgM	Âm tính
Protein (64-83 g/l)	64,8	HSV - IgM	Âm tính
Albumin (35-52 g/l)	30,8	Ceruloplasmin (15-30 mg/dl)	36
Pre-albumin (20-40 mg/dl)	12	Ferritin (30-400 ng/ml)	496
Phospho (0,81-1,45 mmol/l)	0,9	Test Coom trực tiếp/gián tiếp	Âm tính
Ure (2,76-8,07 mmol/l)	2,8	Vitamin B12 (138-652 pmol/l)	411
Creatinin (62-106 μmol/l)	30	Acid Folic (7-46,4 nmol/l)	9,7
Huyết tủy đồ	Tủy tăng sinh phản ứng, không thấy tế bào bất thường		
Siêu âm ổ bụng	Gan to, đọc gan 163 mm. Lách không to. Sỏi thận phải 4 mm		
Nội soi dạ dày - Tá tràng	Loét hành tá tràng, không thấy hình ảnh xuất huyết		

MCH: lượng huyết sắc tố trung bình có trong một tế bào hồng cầu, MCV: thể tích các tế bào máu, TC: tiểu cầu, HC: hồng cầu, BC: bạch cầu, FT4: lượng thyroxine lưu hành trong máu, TSH: hormone kích thích tuyến giáp, ALT: phát hiện các tổn thương gan được gây nên bởi bệnh lý, thuốc, hoặc chấn thương, AST: xác định nồng độ men aspartate transaminase trong máu, GGT: Gamma Glutamyl Transferase, đánh giá những tổn thương ở gan và mật, HAV-IgM: kháng thể IgG kháng virus viêm gan A, HBsAg: kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B, anti-HCV: sàng lọc virus viêm gan C, HEV-IgM: kháng thể IgG kháng virus viêm gan E, CMV-IgM: kháng thể kháng virus cytomegalo, EBV-IgM: kháng thể kháng virus Epstein-Barr, HSV-IgM: kháng thể kháng virus Herpes.

Sau khi bệnh nhân tạm ổn định, hết đau bụng, ăn lại được, bệnh nhân được thực hiện các thăm dò cận lâm sàng khác để tìm thêm nguyên nhân gây bệnh. Xét nghiệm tìm nguyên nhân viêm gan cho kết quả: viêm gan virus âm tính (bao gồm viêm gan A, B, C, E), virus cytomegalo (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus Herpes Simplex (HSV) âm tính, ceruloplasmin bình thường, ferritin 496

ng/ml. Kết quả huyết tủy đồ cho thấy, hình ảnh tủy tăng sinh phản ứng, không thấy tế bào bất thường, test Coom trực tiếp, gián tiếp đều âm tính. Các nguyên nhân gây tăng mỡ máu thứ phát như suy giáp, hội chứng Cushing, hội chứng thận hư đều được loại trừ. Đánh giá về dinh dưỡng cho các kết quả: protein, albumin, pre-albumin đều giảm, phospho, calci trong giới hạn bình thường nhưng thiếu vitamin D trầm trọng (xét nghiệm vitamin D là 3 ng/ml). Trong quá trình theo dõi, bệnh nhân được phát hiện có tình trạng tăng đường máu sau ăn nhiều và có lúc hạ đường huyết vào buổi sáng.

Các kết quả cận lâm sàng ở trên chưa giúp xác định được nguyên nhân gây bệnh một cách rõ ràng. Một số đặc điểm như tình trạng suy dinh dưỡng nặng, gan to nhiều, tăng men gan mà chủ yếu là thành phần GGT, rối loạn lipid máu trầm trọng, tăng đường máu sau ăn và hạ đường huyết lúc đói gợi ý bệnh dự trữ glycogen. Vì vậy, bệnh nhân và gia đình đã được tư vấn kiểm tra di truyền nhiễm sắc thể đồ (Karyotype) và các gen liên quan đến các rối loạn trao đổi chất để có chẩn đoán cuối cùng.

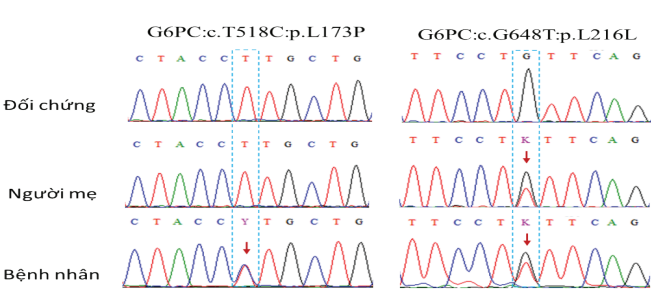
3.2. Phân tích biến thể di truyền gây bệnh

Kết quả kiểm tra nhiễm sắc thể đồ cho thấy, bệnh nhân mang số lượng nhiễm sắc thể bình thường, giới tính nam (46, XY). Sau khi xác định bệnh nhân không có bất thường số lượng nhiễm sắc thể, mẫu ADN của bệnh nhân đã được sử dụng cho giải trình tự WES. Kết quả giải trình tự và phân tích đột biến gây bệnh cho thấy, bệnh nhân mang hai đột biến dị hợp tử c.T518C (p.Leu173Pro) và c.G648T (p.Leu216Leu) nằm tương ứng trên exon 4 và 5 của gen *G6PC* (bảng 3). Các đột biến trên gen *G6PC* đã được biết là liên quan tới hội chứng dự trữ glycogen tuýp Ia. Đột biến thứ nhất *G6PC* c.T518C làm thay đổi axit amin leucine tại vị trí 173 của phân tử protein thành proline, thuộc loại đột biến nhầm nghĩa (missense mutation). Đột biến thứ hai c.G648T không làm thay đổi axit amin leucine tại vị trí 216 của phân tử protein, thuộc loại đột biến câm (silent mutation). Cả 2 đột biến mới trên đều được công nhận là đột biến gây bệnh trong cơ sở dữ liệu ClinVar. Hai đột biến này đã được xác nhận bằng giải trình tự trực tiếp Sanger. Mẫu người mẹ cung cấp cũng được kiểm tra sau đó, kết quả cho thấy, người mẹ mang 1 đột biến dị hợp tử c.G648T (p.Leu216Leu). Do người cha bệnh nhân đã qua đời nên không thể được kiểm tra di truyền (hình 2).

Bảng 3. Kết quả sàng lọc biến thể gen từ dữ liệu WES của bệnh nhân.

Gen	Vị trí	Biến thể	1000 G database	SNP ID	Trạng thái	ClinVar	Kiểu di truyền
<i>EPH2A</i>	Intronic		.	.	het	.	Lặn
<i>EPH2A</i>	Intronic		0.0115815	rs117584433	het	.	Lặn
<i>G6PC</i>	Exonic	c.T518C (p.L173P)	.	rs775826449	het	Gây bệnh	Lặn
<i>G6PC</i>	Exonic	c.G648T (p.L216L)	.	rs80356484	het	Gây bệnh	Lặn
<i>GAA</i>	Exonic	c.G2478A (p.L826L)	0.00319489	rs201183207	het	Chưa xác định	Lặn
<i>PFKM</i>	Intronic		.	rs779692572	het	.	Lặn

SNP: đa hình đơn nucleotide đơn.



Hình 2. Kết quả giải trình tự gen bằng Sanger. Mũi tên chỉ vị trí đột biến gen dạng dị hợp tử.

4. Bàn luận

GSD Ia là một rối loạn di truyền lặn nhiễm sắc thể thường với các triệu chứng và dấu hiệu biểu hiện thay đổi theo độ tuổi của bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, bệnh nhân với những rối loạn chuyển hóa phức tạp đã được chẩn đoán chính xác bệnh dựa trên đặc điểm lâm sàng kết hợp với xét nghiệm di truyền. Do đặc điểm của bệnh hiếm gặp và khó khăn của việc tiếp cận xét nghiệm di truyền trước ở Việt Nam nên bệnh nhân đã không được chẩn đoán mắc GSD từ sớm mặc dù có những biểu hiện như chậm lớn, thiếu máu, vàng da, chảy máu mũi từ năm 2 tuổi. Những triệu chứng này tiếp tục diễn tiến và tồn tại đến hiện tại, khi bệnh nhân đã 24 tuổi. Trong lần nhập viện này, bệnh nhân có một vài dấu hiệu lâm sàng gợi ý đến bệnh rõ ràng hơn như gan to, rối loạn lipid máu trầm trọng và viêm gan. Kiểm tra di truyền của bệnh nhân cho thấy sự hiện diện của đột biến dị hợp tử phức trên gen *G6PC*.

Protein *G6PC* là một glycoprotein gồm 357 axit amin, gắn với màng nội chất bởi 9 vòng xoắn xuyên màng, trung tâm hoạt động enzyme nằm quay vào trong xoang nội chất. Các đột biến *G6PC* có thể nằm tại các vị trí vòng xoắn, không xoắn hoặc ở trung tâm hoạt động theo các phân tích dự đoán cấu hình protein [13].

Trong nghiên cứu này, đột biến thứ nhất *G6PC* c.T518C làm thay đổi leucine thành proline, được dự đoán ảnh hưởng đến vùng không xoắn, là vùng gây ít ảnh hưởng đến chức năng của enzyme *G6Pase* hơn so với vùng xoắn trong màng tế bào. Do đó, đột biến này gây ra GSD Ia thể nhẹ trên lâm sàng. Trên thế giới, một số báo cáo trước đó cũng đã ghi nhận khả năng gây bệnh của đột biến này. Theo một báo cáo từ Trung Quốc, 1 bé gái 3 tháng tuổi có biểu hiện gan to, hạ đường huyết nghiêm trọng, nhiễm toan, tăng triglycerid máu và rối loạn chức năng gan. Dựa vào các biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm sinh hóa gợi ý đến chứng bệnh GSD, bệnh nhân đã được kiểm tra di truyền và xác định có mang đột biến c.T518C (p.L173P) dạng đồng hợp tử [13]. Ở trong nước gần đây cũng đã báo cáo một trường hợp GSD tuýp Ia do đột biến đồng hợp tử *G6PC* c.T518C (p.L173P) ở một bé trai 6 tháng tuổi. Bệnh nhân cũng có biểu hiện hạ đường huyết nặng, vàng da, gan to và rối loạn chức năng tế bào gan [14]. Như vậy, giống như hai bệnh nhân mô tả ở trên, bệnh nhân trong nghiên cứu này cũng có kiểu hình

gợi ý bệnh như tăng triglyceride máu trầm trọng, gan to nhiều, tăng men gan, hạ đường huyết xa bữa ăn, tăng đường máu sau ăn và xét nghiệm di truyền cho kết quả tương tự.

Đột biến thứ hai c.G648T (p.Leu216Leu) đã xuất hiện phổ biến hơn trong các báo cáo gây bệnh liên quan đến gen *G6PC*. Tỷ lệ đột biến c.G648T là 86,2% trong nhóm bệnh nhân Hàn Quốc và 86,4% trong nhóm bệnh nhân Nhật Bản mắc GSD tuýp Ia [15, 16]. Một báo cáo khác năm 2022 đã mô tả một bệnh nhân trẻ tuổi có biểu hiện chậm phát triển thể chất và các triệu chứng về chuyển hóa GSD. Xét nghiệm di truyền cho thấy, bệnh nhân mang đột biến dị hợp tử phức của *G6PC* bao gồm c.G248A (p.R83H) và c.G648T (p.L216L) đã giúp khẳng định chẩn đoán GSD tuýp Ia [5]. Áp dụng liệu pháp điều trị bằng hormone tăng trưởng kết hợp chế độ dinh dưỡng phù hợp đã giúp bệnh nhân cải thiện đáng kể chiều cao cũng như các triệu chứng lâm sàng. Mặc dù đột biến c.G648T không làm thay đổi trình tự axit amin được mã hóa của protein *G6PC*, nhưng nó làm thay đổi quá trình nổi và có khả năng phá vỡ đầu carboxyl của protein này dẫn đến mất chức năng bình thường của protein *G6PC* [17, 18]. Đây là công bố đầu tiên về sự xuất hiện của đột biến *G6PC* c.G648T (p.Leu216Leu) gây bệnh GSD tuýp Ia ở Việt Nam, bổ sung vào danh sách biến thể gây bệnh của *G6PC* ở quần thể người Việt Nam.

Với bệnh nhân của chúng tôi, sau 10 ngày điều trị, xét nghiệm men gan và lipid máu cải thiện. Bệnh nhân được cho ra viện và tiếp tục điều trị giảm mỡ máu bằng Fibrat, bổ sung calci và vitamin D. Khi có chẩn đoán xác định bệnh nhờ xét nghiệm di truyền, bệnh nhân đã được tư vấn với bác sỹ chuyên khoa dinh dưỡng về chế độ ăn nhiều bữa với 3 bữa chính và 3 bữa phụ nhằm làm giảm nguy cơ hạ đường huyết, 50% năng lượng từ khẩu phần ăn là tinh bột, 20% từ protein và 30% từ lipid. Bệnh nhân được tư vấn tái khám thường xuyên để điều chỉnh chế độ ăn cũng như theo dõi tình trạng rối loạn lipid máu và rối loạn chức năng gan.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã phát hiện nguyên nhân di truyền gây bệnh dự trữ glycogen cho một bệnh nhân có biểu hiện kiểu hình phức tạp, chưa được chẩn đoán chính xác trước đây. Trên cơ sở chẩn đoán phân tử, bệnh nhân được tiếp nhận liệu pháp điều trị và tư vấn dinh dưỡng phù hợp và cho thấy khả năng cải thiện sức khỏe tốt. Điều này cho thấy tầm quan trọng và hiệu quả của việc áp dụng chẩn đoán di truyền đối với các ca bệnh phức tạp, khó chẩn đoán.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F.S. Ludwig, F.C. Pinheiro, M.B. Soares, et al. (2019), "Glycogen storage diseases: Twenty-seven new variants in a cohort of 125 patients", *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, **7**(11), DOI: 10.1002/mgg3.877.

[2] P. Burda, M. Hochuli (2015), "Hepatic glycogen storage disorders: What have we learned in recent years?", *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, **18**(4), pp.415-421, DOI: 10.1097/MCO.0000000000000181.

[3] H. Ozen (2007), "Glycogen storage diseases: New perspectives", *World Journal of Gastroenterology*, **13**(18), pp.2541-2553, DOI: 10.3748/wjg.v13.i18.2541.

[4] J.Y. Chou, B.C. Mansfield (2008), "Mutations in the glucose-6-phosphatase- α (*G6PC*) gene that cause type Ia glycogen storage disease", *Human Mutation*, **29**(7), pp.921-930, DOI: 10.1002/humu.20772.

[5] A. Rossi, A. Venema, P. Haarsma, et al. (2022), "A prospective study on continuous glucose monitoring in glycogen storage disease type Ia: Toward glycaemic targets", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **107**(9), pp.e3612-e3623, DOI: 10.1210/clinem/dgac411.

[6] J. Hicks, E. Wartchow, G. Mierau (2011), "Glycogen storage diseases: A brief review and update on clinical features, genetic abnormalities, pathologic features, and treatment", *Ultrastructural Pathology*, **35**(5), pp.183-196, DOI: 10.3109/01913123.2011.601404.

[7] M. Eghbali, F.S. Fatemi, S. Salehpour, et al. (2021), "Whole-exome sequencing uncovers novel causative variants and additional findings in three patients affected by glycogen storage disease type VI and Fanconi-Bickel syndrome", *Frontiers in Genetics*, **11**, DOI: 10.3389/fgene.2020.601566.

[8] Z. Beyzaei, F. Ezgu, B. Geramizadeh, et al. (2021), "Clinical and genetic spectrum of glycogen storage disease in Iranian population using targeted gene sequencing", *Scientific Reports*, **11**(1), DOI: 10.1038/s41598-021-86338-4.

[9] H. Li, R. Durbin (2009), "Fast and accurate short read alignment with burrows-wheeler transform", *Bioinformatics*, **25**(14), pp.1754-1760, DOI: 10.1093/bioinformatics/btp324.

[10] A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, et al. (2010), "The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data", *Genome Research*, **20**(9), pp.1297-1303, DOI: 10.1101/gr.107524.110.

[11] P.C. Ng, S. Henikoff (2003), "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function", *Nucleic Acids Research*, **31**(13), pp.3812-3814, DOI: 10.1093/nar/gkg509.

[12] J.M. Schwarz, D.N. Cooper, M. Schuelke, et al. (2014), "MutationTaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age", *Nature Methods*, **11**(4), pp.361-362, DOI: 10.1038/nmeth.2890.

[13] Y. Lu, L. Wang, J. Li, et al. (2016), "Molecular genetic analysis and phenotypic characteristics of a consanguineous family with glycogen storage disease type Ia", *Molecular Medicine Reports*, **14**(4), pp.3251-3254, DOI: 10.3892/mmr.2016.5617.

[14] N.H.H. Thu, N.T.K. Ly, N.T. Duong (2022), "A homozygous variant in *G6PC* in a Vietnamese patient with glycogen storage disease type Ia", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **20**(1), pp.1-7, DOI: 10.15625/1811-4989/17090.

[15] Y.M. Kim, J.H. Choi, B.H. Lee, et al. (2020), "Predominance of the c.648G >T *G6PC* gene mutation and late complications in Korean patients with glycogen storage disease type Ia", *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **15**(1), DOI: 10.1186/s13023-020-1321-0.

[16] J. Akanuma, T. Nishigaki, K. Fujii, et al. (2000), "Glycogen storage disease type Ia: Molecular diagnosis of 51 Japanese patients and characterization of splicing mutations by analysis of ectopically transcribed mRNA from lymphoblastoid cells", *American Journal of Medical Genetics*, **91**(2), pp.107-112, DOI: 10.1002/(SICI)1096-8628(20000313)91:2<107::AID-AJMG5>3.0.CO;2-Y.

[17] S. Kajihara (1995), "Exon redefinition by a point mutation within exon 5 of the glucose-6-phosphatase gene is the major cause of glycogen storage disease type Ia in Japan", *Hepatology*, **22**(4), DOI: 10.1016/0270-9139(95)95224-1.

[18] K. Takahashi, J. Akanuma, Y. Matsubara, et al. (2000), "Heterogeneous mutations in the glucose-6-phosphatase gene in Japanese patients with glycogen storage disease type Ia", *American Journal of Medical Genetics*, **92**(2), pp.90-94, DOI: 10.1002/(SICI)1096-8628(20000515)92:2<90::AID-AJMG2>3.0.CO;2-H.

Đặc điểm các mảnh xương sọ bảo quản để ghép tự thân tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức

Dương Đức Hùng^{1,2,3*}, Dương Công Nguyên¹, Trần Thị Hằng¹

¹Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, 40 Tràng Thi, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Hà Nội, 1 Tôn Thất Tùng, phường Trung Tự, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, phường Dịch Vọng, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/4/2022; ngày chuyển phản biện 9/4/2022; ngày nhận phản biện 30/4/2022; ngày chấp nhận đăng 7/5/2022

Tóm tắt:

Chấn thương sọ não, u não hay tai biến mạch máu não có một tỷ lệ cao các trường hợp bệnh nhân (BN) được chỉ định mở hộp sọ để giải tỏa áp lực não. Mảnh xương sọ sau khi đưa ra ngoài cơ thể cần được bảo quản để ghép lại cho BN. Nghiên cứu này nhằm nhận xét đặc điểm BN được bảo quản mô xương sọ và đánh giá tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép lại mô xương sọ được bảo quản lạnh sâu tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020. Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả, hồi cứu, xử lý số liệu bằng các thuật toán thống kê y học. Kết quả: mô xương sọ của 2412 BN từ 14 bệnh viện được bảo quản, nhóm tuổi 18-60 chiếm tỷ lệ cao nhất (78,6%), nam giới chiếm đa số (78,8%), chấn thương sọ não chiếm 91,4%, BN có 01 mảnh xương chiếm đa số 89,18%, 100% số mẫu vô trùng sau chiếu xạ, trong đó đã ghép lại 51,2%, tử vong 25,4%, chưa ghép 23,4%. Kết luận: BN phần lớn trong độ tuổi lao động, chủ yếu là nam giới, chấn thương sọ não là nguyên nhân; quy cách đóng gói và vận chuyển mô đảm bảo yêu cầu, mô xương sạch, vô trùng, đảm bảo cho ghép tự thân.

Từ khóa: bảo quản lạnh sâu, mảnh mô xương sọ, mở hộp sọ giải áp, ngân hàng mô.

Chỉ số phân loại: 3.2, 3.5

Characteristics of the cryopreservation cranial bone flaps for autologous transplantation at the Tissue Bank, Viet Duc University Hospital

Duc Hung Duong^{1,2,3*}, Cong Nguyen Duong¹, Thi Hang Tran¹

¹Viet Duc University Hospital, 40 Trang Thi Street, Hang Bong Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

²Hanoi Medical University, 1 Ton That Tung Street, Trung Tu Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

³University of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University - Hanoi, 144 Xuan Thuy Street, Dich Vong Hau Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 6 April 2022; revised 30 April 2022; accepted 7 May 2022

Abstract:

Traumatic brain injury, brain tumour or stroke have a high proportion of patients who are assigned to open the skull to relieve brain pressure. Skull bone flap, after being taken out of the body, should be stored for re-transplantation to patients. This study aims to review the characteristics of patients with preserved skull bone tissue and evaluate the acquisition, processing, storage and transplantation of cryopreservation cranial bone flap at the Tissue Bank, Viet Duc Friendship Hospital from March 2018 to March 2020. Methods: Descriptive and retrospective studies, data were processed by using medical statistical algorithms. Results: There were 2412 patients from 14 hospitals preserved with skull bone, in which 78.6% of patients were at the age of 18-60, 78.8% were men, 91.4% of the cause was traumatic brain injury, 89.18% of patients had one flap, 100% flaps were sterile after irradiation, 51.2% patients were grafted, 25.4% died and 23.4% are waiting for transplantation. Conclusions: the majority of patients are of working age, men were more common, brain injury was the main cause; packing specifications and transportation of required tissue, clean, sterile bone tissue, ensuring autologous transplantation.

Keywords: cranial bone flap, cryopreservation, decompressive craniectomy, tissue bank.

Classification numbers: 3.2, 3.5

*Tác giả liên hệ: Email: duongdh38@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Chấn thương sọ não, u não hay tai biến mạch máu não có một tỷ lệ cao các trường hợp BN được chỉ định mở hộp sọ để giải tỏa áp lực não. Chỉ định này giải quyết ngay được tình trạng nguy cấp và cứu sống rất nhiều BN. Tuy nhiên, việc mở hộp sọ giải áp sẽ làm cho nhu mô não bên trong chỉ được bảo vệ bằng một lớp da và tổ chức phần mềm mỏng ở bên ngoài gây ra “hội chứng khuyết sọ”, trong các trường hợp các ô khuyết lớn, cấu trúc não bộ bên dưới hoàn toàn có thể bị biến đổi gây ảnh hưởng tới chức năng của não. Điều này đặt ra yêu cầu làm sao để có thể tạo hình được những lỗ hổng khuyết sọ. Các phương pháp tạo hình khuyết sọ có thể chia thành 3 nhóm chính: sử dụng chính mảnh xương sọ của BN đã lấy ra để ghép lại, sử dụng các xương tự thân, đồng loài hoặc khác loài để thay thế và sử dụng các vật liệu nhân tạo thay thế. Hiện nay, phương pháp phổ biến được áp dụng tại các ngân hàng mô trên thế giới và các phòng thí nghiệm nghiên cứu về bảo quản mô tại Việt Nam là kỹ thuật bảo quản mô xương sọ để ghép tự thân với phương pháp lạnh sâu có chiếu xạ, do có nhiều ưu điểm như: đạt hiệu quả cao và nhanh nhất trong việc tái tạo xương, bảo quản được dài ngày, BN không phải chịu 2 cuộc mổ và chi phí thấp [1-5].

Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức được thành lập tháng 3/2018, là đầu mối - lần đầu tiên tại Việt Nam có một ngân hàng đa mô, hoạt động trên các lĩnh vực liên quan đến mô ghép: mô ghép từ người, mô ghép dị loài, vật liệu thay thế, công nghệ mô - tế bào. Trong đó, loại mô được bảo quản và đưa vào hoạt động cấy ghép nhiều nhất là mô xương đặc biệt là mô xương sọ để ghép tự thân. Vì vậy chúng tôi tiến hành nghiên cứu “Đặc điểm các mảnh xương sọ bảo quản để ghép tự thân từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020 tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức” với mục tiêu: nhận xét đặc điểm BN được bảo quản mô xương sọ và đánh giá tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép lại mô xương sọ được bảo quản lạnh sâu tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Tất cả mô xương sọ được bảo quản tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả, hồi cứu.

Cỡ mẫu: Thuận tiện theo chủ đích

Chỉ tiêu nghiên cứu: Nhóm tuổi, giới; Nguyên nhân phẫu thuật; Bệnh viện thực hiện phẫu thuật mở hộp sọ giải áp; Thời gian từ khi thu nhận mô xương sọ đến khi bảo quản; Quy cách đóng gói, vận chuyển; Tình trạng mảnh xương sọ thu nhận; Số lượng mảnh xương sọ của BN gửi một lần; Kết quả cấy khuẩn vi sinh trước bảo quản và sau chiếu xạ; Số ca ghép lại, tử vong và chưa ghép lại.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Bằng các thuật toán thống kê y học.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Được đảm bảo theo quy định, các số liệu thu thập được từ kết quả nghiên cứu chỉ nhằm mục đích phục vụ nghiên cứu khoa học, không nhằm mục đích khác.

3. Kết quả

Tổng số BN được bảo quản mô xương sọ tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020 là 2412 BN.

3.1. Đặc điểm bệnh nhân được bảo quản mô xương sọ

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong 2412 BN bảo quản mô xương sọ, tuổi trung bình của BN là $42,1 \pm 17,0$, nhỏ nhất là 10 tháng tuổi và lớn nhất là 92 tuổi. Nhóm BN tuổi từ 18 đến 60 chiếm tỷ lệ cao nhất (78,6%), nhóm dưới 18 tuổi chiếm tỷ lệ thấp nhất (6,4%), nhóm BN >60 tuổi chỉ chiếm 15,0%.

Bảng 1. Phân bố nhóm tuổi của bệnh nhân nghiên cứu.

Nhóm tuổi	<18	18 đến 35	36 đến 60	>60	Tổng số
Số lượng	155	782	1114	361	2412
Tỷ lệ (%)	6,4	32,4	46,2	15,0	100

Kết quả bảng 2 cho thấy, tỷ lệ BN nam chiếm đa số với 1901 BN (78,8%), tỷ lệ BN nữ ít hơn, với 511 BN (21,2%).

Bảng 2. Giới tính của bệnh nhân nghiên cứu.

Giới tính	Nam	Nữ	Tổng số
Số lượng	1901	511	2412
Tỷ lệ (%)	78,8	21,2	100

Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ BN mở hộp sọ giải áp do nguyên nhân chấn thương sọ não chiếm 91,4% tổng số BN, số BN còn lại chiếm 8,6% do các nguyên nhân như: u não, tai biến mạch máu não và các nguyên nhân khác.

Bảng 3. Nguyên nhân mở hộp sọ giải áp.

Nguyên nhân	Chấn thương sọ não	Tai biến mạch não	U não	Khác	Tổng số
Số lượng	2204	79	101	28	2412
Tỷ lệ (%)	91,4	3,2	4,2	1,2	100

Kết quả bảng 4 cho thấy, mô xương sọ của BN bảo quản được phẫu thuật từ 14 bệnh viện, trong đó nhiều nhất là Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức với 2294 ca chiếm 95,1%, Bệnh viện Thanh Hóa là 62 ca chiếm 2,58%, Bệnh viện Bắc Ninh là 43 ca chiếm 1,80%.

Bảng 4. Bệnh viện thực hiện phẫu thuật mở hộp sọ giải áp.

Thứ tự	Bệnh viện	Số lượng bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
1	Việt Đức (Hà Nội)	2294	95,1
2	Thanh Hóa (Thanh Hóa)	62	2,58
3	Bắc Ninh (Bắc Ninh)	43	1,80
4	Lai Châu (Lai Châu)	2	0,08
5	Việt Trì (Hải Phòng)	2	0,08
6	Điện Biên (Điện Biên)	1	0,04
7	Hà Tĩnh (Hà Tĩnh)	1	0,04
8	Hùng Vương (Phú Thọ)	1	0,04
9	Lạng Sơn (Lạng Sơn)	1	0,04
10	Nghệ An (Nghệ An)	1	0,04
11	Quảng Bình (Quảng Bình)	1	0,04
12	Quảng Ninh (Quảng Ninh)	1	0,04
13	Thanh Nhân (Hà Nội)	1	0,04
14	Việt Xô (Hà Nội)	1	0,04
Tổng số		2412	100

3.2. Tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép lại

Kết quả bảng 5 cho thấy, thời gian từ khi thu nhận mô tại phòng mổ đến khi được bảo quản hầu hết trong vòng 24 giờ đầu tiên với 2323 ca (chiếm 96,31%), khoảng thời gian thu nhận từ 24-48 giờ có 50 ca (chiếm 2,07%), khoảng thời gian thu nhận trên 48 giờ có 39 BN chiếm tỷ lệ thấp nhất (1,62%).

Bảng 5. Thời gian từ khi lấy mô đến khi được bảo quản.

Thời gian	≤24 giờ	24-48 giờ	>48 giờ	Tổng số
Số bệnh nhân	2323	50	39	2412
Tỷ lệ (%)	96,31	2,07	1,62	100

Kết quả bảng 6 cho thấy, 100% số mẫu bảo quản được sử dụng túi vô khuẩn, vận chuyển bảo quản lạnh.

Bảng 6. Quy cách đóng gói, vận chuyển.

Quy cách đóng gói, vận chuyển	Sử dụng túi vô khuẩn, bảo quản lạnh	Không đúng	Tổng số
Số bệnh nhân	2412	0	2412
Tỷ lệ (%)	100	0	100

Kết quả bảng 7 cho thấy, 2151 BN có 1 mảnh xương chiếm tỷ lệ cao nhất 89,18%, số lượng BN có từ 2 mảnh xương là 261 BN chiếm 10,82%, số lượng mảnh xương nhiều nhất của một BN là 12 mảnh.

Bảng 7. Số lượng mảnh xương sọ/bệnh nhân.

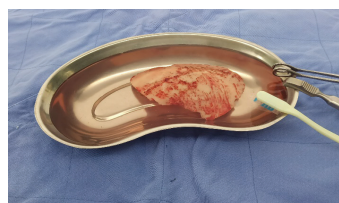
Số mảnh/bệnh nhân	1	2	3	4	5	Từ 6	Tổng số
Số bệnh nhân	2151	168	46	14	16	17	2412
Tỷ lệ (%)	89,18	6,97	1,91	0,58	0,66	0,7	100

Kết quả bảng 8 cho thấy, trước xử lý có 123/2412 (5,1%) BN có mảnh xương còn nhiều cân, cơ, máu tụ. Sau xử lý và bảo quản 100% số mẫu không có cân, cơ, máu tụ. Hình ảnh mô xương sọ trước khi xử lý và sau khi xử lý được thể hiện trong hình 1.

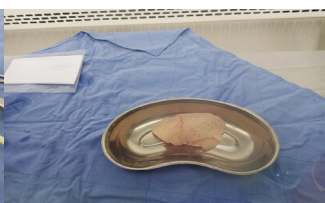
Bảng 8. Đặc điểm cân, cơ, máu tụ của mô xương sọ.

Đặc điểm cân, cơ, máu tụ	Trước bảo quản		Sau bảo quản	
	Có	Không	Có	Không
Số lượng	123	2289	0	2412
Tỷ lệ (%)	5,1	94,9	0	100

(A) Mô xương sọ trước xử lý



(B) Mô xương sọ sau xử lý



Hình 1. Hình ảnh mô xương sọ trước khi xử lý và sau khi xử lý.

Kết quả bảng 9 cho thấy, đã có 21 mẫu mô trước chiếu xạ có kết quả cấy khuẩn dương tính, chiếm tỷ lệ 3,59%. Sau chiếu xạ chỉ có 2 mẫu cấy khuẩn dương tính, tuy nhiên khi cấy khuẩn kiểm tra lại cả 2 mẫu này đều âm tính.

Bảng 9. Kết quả cấy khuẩn vi sinh.

Kiểm tra vô trùng	Tổng số mẫu	Âm tính	Dương tính	Tỷ lệ dương tính
Trước chiếu xạ	585	564	21	3,59
Sau chiếu xạ	710	708	2	0,28

Kết quả bảng 10 cho thấy, tỷ lệ BN đã ghép lại chiếm 51,2%, tỷ lệ BN đã tử vong chiếm 25,4%, tỷ lệ BN chưa ghép chiếm 23,4%.

Bảng 10. Số lượng bệnh nhân ghép lại, tử vong và chưa ghép.

Tình trạng bệnh nhân	Ghép lại	Tử vong	Chưa ghép	Tổng số
Số lượng	1236	612	564	2412
Tỷ lệ (%)	51,2	25,4	23,4	100

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm bệnh nhân được bảo quản mô xương sọ

Từ các kết quả của bảng 1-3 cho thấy, các BN phẫu thuật giải tỏa áp lực não gửi mô xương sọ bảo quản có thể gặp ở mọi lứa tuổi, nhỏ nhất là 10 tháng tuổi và nhiều nhất là 92 tuổi; nam gặp nhiều hơn nữ (78,8%), nhưng độ tuổi từ 18 đến 60 chiếm tỷ lệ chủ yếu 78,6%, nhóm dưới 18 tuổi chiếm tỷ lệ ít nhất 6,4%, nhóm BN trên 60 tuổi chiếm 15,0%. Điều này có thể giải thích do nhóm tuổi 18-60 là nhóm trong độ tuổi lao động, làm việc và tham gia chính vào mọi hoạt động của xã hội nên dễ bị chấn thương sọ não hơn do tai nạn giao thông, tai nạn sinh hoạt... Nhóm tuổi >60 cũng gặp khá cao, do đây là nhóm tuổi thường gặp của các BN tai biến mạch não và u não. Chấn thương sọ não là nhóm nguyên nhân chính của các BN bảo quản mô xương sọ chiếm 91,4%, các nguyên nhân như: u não, tai biến mạch máu não... chỉ chiếm 8,6%. Các kết quả trên của chúng tôi cũng cho tỷ lệ tương tự với một số nghiên cứu trước đây [5-7].

Các mẫu mô xương sọ của BN bảo quản được phẫu thuật từ 14 bệnh viện, trong đó thực hiện nhiều nhất là Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức với 2294 ca chiếm 95,1%, Bệnh viện Thanh Hóa là 62 ca chiếm 2,58%, Bệnh viện Bắc Ninh là 43 ca chiếm 1,80%. Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức với đặc thù là một bệnh viện chuyên khoa ngoại tuyến cuối của toàn miền Bắc, nên hầu hết các BN nặng cần phẫu thuật, đặc biệt là chấn thương sọ não đều sẽ được chuyển từ các bệnh viện tuyến dưới đến đây để điều trị tiếp. Vì vậy, phần lớn các BN được mở hộp sọ giải áp bảo quản mô xương sọ đến từ Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức. Với 14 bệnh viện khác nhau thực hiện phẫu thuật mở hộp sọ giải áp có BN gửi bảo quản mô xương sọ tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức điều này cho thấy, phẫu thuật mở hộp sọ giải áp đã được triển khai rộng rãi ở khắp các bệnh viện tuyến tỉnh, ví dụ những tỉnh có điều kiện khó khăn và ở xa thủ đô Hà Nội như Bệnh viện Đa khoa tỉnh Lai Châu, Bệnh viện Đa khoa tỉnh Điện Biên hay Bệnh viện Đa khoa tỉnh Quảng Bình.

Thêm nữa, quy trình phối hợp giữa Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức và các bệnh viện đã diễn ra khá tốt góp phần đảm bảo công tác chuyên môn phục vụ BN không chỉ tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức mà còn ở tất cả các bệnh viện trên cả nước.

4.2. Tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép lại

Thời gian từ khi thu nhận mô tại phòng mổ đến khi được bảo quản, tình trạng cân, cơ, máu tụ mô bảo quản và quy cách đóng gói, vận chuyển sẽ ảnh hưởng đến chất lượng mô bảo quản cũng như khả năng nhiễm trùng. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thời gian từ khi thu nhận mô tại phòng mổ đến khi được bảo quản hầu hết trong vòng 24 giờ đầu tiên với 2323 ca chiếm 96,31%, khoảng thời gian thu nhận từ 24 đến 48 giờ có 50 ca chiếm 2,07%, khoảng thời gian thu nhận trên 48 giờ có 39 BN chiếm tỷ lệ thấp nhất 1,62%, các kết quả này thấp hơn hẳn so với thời gian vận chuyển trên 5 ngày (tỷ lệ 47,27%) của T.T. Bui và cs (2018) [7], số mẫu đảm bảo quy cách đóng gói vô trùng và vận chuyển trong hộp bảo quản lạnh chuyên dụng là 100% cũng cao hơn so với nghiên cứu của T.T. Bui và cs (2018) [7]. Trước xử lý mô, 123/2412 (5,1%) BN có mảnh xương còn nhiều cân, cơ, máu tụ, tuy nhiên sau xử lý và bảo quản 100% số mẫu được làm sạch không có cân, cơ, máu tụ.

Số lượng BN có 1 mảnh xương chiếm tỷ lệ cao nhất 89,18% tương tự với kết quả nghiên cứu của T.T. Bui và cs (2018) [7] và T.Y. Quach và cs (2012) [8]. Số lượng BN có từ 2 mảnh xương là 261 BN chiếm 10,82%, số lượng mảnh xương nhiều nhất của một BN là 12 mảnh. Với các BN vỡ nhiều mảnh sẽ gây khó khăn cho việc xử lý, bảo quản và ghép lại sau phẫu thuật và trong rất nhiều trường hợp để tạo hình khuyết sọ cho BN, các phẫu thuật viên phải sử dụng đến phương án dùng các vật liệu thay thế như: titan, PEEK có giá thành cao.

Đã có 21 mẫu mô trước chiếu xạ trong 585 mẫu cấy có kết quả cấy khuẩn dương tính, chiếm tỷ lệ 3,59%, tỷ lệ này thấp hơn hẳn so với nghiên cứu của T.T. Bui và cs (2018) [7], khi tỷ lệ cấy khuẩn dương tính trước chiếu xạ là 16,36% (9/55 BN). Sau chiếu xạ chỉ có 2 mẫu cấy khuẩn dương tính trong 710 mẫu, tuy nhiên khi cấy khuẩn kiểm tra lại cả 2 mẫu này đều âm tính... Kết quả này của chúng tôi có sự khác biệt là do Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức chiếm phần lớn số mẫu bảo quản (95,1%). Tại bệnh viện, quy trình phối hợp giữa phẫu thuật viên, nhân viên phòng mổ và ngân hàng mô rất chặt chẽ, phẫu thuật viên có trình độ chuyên môn tốt, được trang bị kiến thức về bảo quản mô, vật tư, trang thiết bị được cung cấp đầy đủ nên việc làm sạch mẫu, đóng gói mẫu được đảm bảo, vận chuyển trong hộp chuyên dụng và được thực hiện bởi nhân viên y tế cùng người nhà BN. Thêm nữa, quy trình bảo quản mô xương sọ tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức trước đây đã được thực hiện từ nhiều năm kết hợp với phòng thí nghiệm công nghệ mô ghép, Trường Đại học Y Hà Nội. Kết quả cấy khuẩn mảnh mô sau chiếu xạ với tia gamma (liều 25 kGy) đều đạt 100% vô khuẩn đảm bảo yêu cầu cho việc ghép lại trên BN.

Số lượng mô xương sọ thu nhận, ghép lại, từ vong và chờ ghép là các thông số quan trọng phản ánh hoạt động của Ngân hàng Mô.

Ngoài ra, chúng còn giúp chúng ta dự báo khả năng lưu thông và từ đó có kế hoạch chuẩn bị trang thiết bị, vật tư hàng năm cũng như hàng tháng. Trong thời gian 2 năm từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020, Ngân hàng Mô đã tiếp nhận, xử lý và bảo quản mô xương sọ cho 2412 BN, số lượng BN đã thực hiện phẫu thuật ghép lại Mô xương sọ là 1236 BN chiếm 51,2%, số lượng BN đã từ vong chưa thực hiện ghép là 612 bệnh nhân, chiếm 25,4%, còn lại 564 BN đang chờ ghép, chiếm 23,4%. Tỷ lệ BN ghép lại của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của D.T. Ngo và cs (2012) là 61,8% [6]. Điều này có thể hiểu do, BN được mở hộp sọ giải áp sẽ được ghép lại sau một thời gian khi sức khỏe đã ổn định, thời gian này phụ thuộc tùy tình trạng BN. Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện khi Ngân hàng Mô mới hoạt động trong thời gian ngắn gần đây, khi đó trong khoảng thời gian đầu sẽ chưa có BN được ghép lại mô xương sọ.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu các BN được bảo quản mô xương sọ tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ tháng 3/2018 đến tháng 3/2020, chúng tôi có những kết luận sau: Trong 2 năm, đã có 2412 BN được bảo quản mô xương sọ từ 14 bệnh viện với độ tuổi phần lớn trong tuổi lao động, nam giới gặp nhiều hơn, chấn thương sọ não là nguyên nhân chủ yếu; quy cách đóng gói và vận chuyển mô đảm bảo yêu cầu; mô xương sạch, vô trùng, đảm bảo cho ghép tự thân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Engstrand (2012), "Biomaterials and biologics in craniofacial reconstruction", *J. Craniofac. Surg.*, **23**(1), pp.239-242, DOI: 10.1097/SCS.0b013e318241c0f4.
- [2] S. Aydin, B. Kucukyuruk, B. Abuzayed, et al. (2011), "Cranioplasty: Review of materials and techniques", *J. Neurosci. Rural. Pract.*, **2**(2), pp.162-167, DOI: 10.4103/0976-3147.83584.
- [3] G.F. Rogers, A.K. Greene (2012), "Autogenous bone graft: Basic science and clinical implications", *J. Craniofac. Surg.*, **23**(1), pp.323-327, DOI: 10.1097/SCS.0b013e318241dcba.
- [4] American Association of Tissue Banks (2016), *Standards for Tissue Banking*, United States of America, <https://www.aatb.org/standards>, accessed 20 January 2021.
- [5] C.T. Nguyen, D.H. Nguyen, V.K. Quach (2009), "Plastic surgery for large cranial defects after brain compression release surgery due to trauma using deep cryopreserved autologous skull bone", *Journal of Practical Medicine*, **686**(11), pp.43-47 (in Vietnamese).
- [6] D.T. Ngo, T.Y. Quach (2012), "Epidemiological characteristics of frozen skull fragments at the tissue preservation laboratory of Hanoi Medical University from 2002 to 2010", *Journal of Practical Medicine*, **840**(9), pp.57-59 (in Vietnamese).
- [7] T.T. Bui, C. Tran (2018), "Evaluation of the deep cryopreservation process of human skull fragments at Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy", *Vietnam Medical Journal*, **462**(1), pp.41-44 (in Vietnamese).
- [8] T.Y. Quach, D.T. Ngo (2012), "Morphological characteristics and status of skull fragments deep cold storage at tissue preservation laboratory Hanoi Medical University from 2002-2010 relationship between of bones status and possibility infection", *Journal of Medical Research*, **80**(3C), pp.228-233 (in Vietnamese).

Tối ưu hoá công thức viên nén dập thẳng chứa cao khô sấy phun Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack)

Nguyễn Võ Tuyết Như, Nguyễn Thị Ái Nhi, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Đức Hạnh*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, Quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 11/9/2023; ngày chuyển phản biện 13/9/2023; ngày nhận phản biện 5/10/2023; ngày chấp nhận đăng 9/10/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm xây dựng công thức viên nén dập thẳng chứa cao khô sấy phun Mật nhân. Lưu tính của cao khô Mật nhân và ảnh hưởng của tá dược độn lên lưu tính cao khô Mật nhân ở các tỷ lệ khác nhau đã được khảo sát và đánh giá. Mô hình thực nghiệm gồm mười công thức được thiết kế theo mô hình D-optimal. Các biến độc lập khảo sát gồm: tỷ lệ Starch 1500, A-tab và natri croscarmellose - Vivasol GF. Các biến phụ thuộc gồm độ biến thiên khối lượng viên, độ mài mòn, độ cứng, độ rã. Phần mềm BC PharSoft OPT được sử dụng để nghiên cứu liên quan nhân quả và tối ưu hoá công thức. Công thức tối ưu được kiểm chứng bằng thực nghiệm và kết quả thực nghiệm được so sánh với kết quả dự đoán sử dụng phần mềm SPSS. Kết quả cho thấy, cả ba tá dược độn Starch 1500, A-tab, Startab đều giúp cải thiện lưu tính của cao khô Mật nhân. Công thức viên nén Mật nhân được chọn bao gồm 150 mg cao khô Mật nhân (30% khối lượng viên), 20 mg Vivasol GF (4% khối lượng viên), 212,5 mg Startab (42,5% khối lượng viên), 15 mg A-tab (3% khối lượng viên), 100 mg Starch 1500 (20% khối lượng viên) và 2,5 mg magie stearat (0,5% khối lượng viên). Kết quả ba lần thực nghiệm so với kết quả dự đoán khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đề tài đã xây dựng thành công công thức viên nén Mật nhân. Kết quả nghiên cứu có thể làm tiền đề cho việc phát triển sản phẩm viên nén Mật nhân.

Từ khóa: A-tab, Mật nhân, Starch 1500, Startab, viên nén, Vivasol GF.

Chỉ số phân loại: 3.4

Optimisation of direct compression tablet formulation containing spray-dried extract of *Eurycoma longifolia* Jack

Vo Tuyen Nhu Nguyen, Thi Ai Nhi Nguyen, Quang Duong Do, Duc Hanh Nguyen*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 11 September 2023; revised 5 October 2023; accepted 9 October 2023

Abstract:

This study aimed to develop a formula for direct compression tablets containing spray-dried extract of *Eurycoma longifolia* Jack. The flowability of *E. longifolia* extract and the effect of filler excipients on the flowability of dry extract of *E. longifolia* at different ratios was investigated and evaluated. The experimental model consists of 10 formulas designed according to the D-optimal model. The independent variables surveyed included: Starch 1500, A-tab, and croscarmellose sodium (Vivasol GF) ratios. The dependent variables included tablet weight variation, friability, hardness, and disintegration. BC PharSoft OPT software was used to study cause-and-effect relationships and optimise formulas. The optimal formula was experimentally verified and the experimental results were compared with the predicted results using SPSS software. The results showed that all three fillers Starch 1500, A-tab, and Startab could improve the flowability of *E. longifolia* extract. The optimised *E. longifolia* tablet formulation included 150 mg of *E. longifolia* dry extract (30% of tablet weight), 20 mg of Vivasol GF (4% of tablet weight), 212.5 mg of Startab (42.5% of tablet weight), 15 mg of A-tab (3% of tablet weight), 100 mg of Starch 1500 (20% of tablet weight), and 2.5 mg of magnesium stearate (0.5% of tablet weight). The differences between the three experimental results and the predicted results were not statistically significant. This study has successfully developed the *E. longifolia* tablet formula and provided important data for the development of the *E. longifolia* tablet produced by the direct compression method.

Keywords: A-tab, *Eurycoma longifolia*, Starch 1500, Startab, tablets, Vivasol GF.

Classification number: 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: duchanh@ump.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack, họ Simaroubaceae) là một dược liệu quý, có tác dụng điều trị rối loạn chức năng sinh dục, sốt rét, ung thư, tiểu đường, loãng xương [1]. Năm 2020, D.H. Nguyen và cs (2020) đã nghiên cứu xây dựng quy trình điều chế [2] và tiêu chuẩn hóa cao khô sấy phun Mật nhân [3]. Vì vậy, đề tài tiếp tục nghiên cứu phát triển dạng bào chế chứa cao khô sấy phun Mật nhân.

Viên nén là dạng bào chế được sử dụng phổ biến trên thị trường nhờ vào những ưu điểm như có thể sản xuất quy mô lớn, giá thành thấp, bệnh nhân dễ dàng tự sử dụng, thuận lợi để che dấu mùi vị của thuốc, việc đóng gói và phân phối thuận lợi, độ ổn định cao [4]. Viên nén có thể được điều chế bằng phương pháp xát hạt hoặc phương pháp dập thẳng. Trong đó, phương pháp dập thẳng có nhiều ưu điểm như ít tốn thời gian, quy trình đơn giản và hạn chế gây phân huỷ hoạt chất. Tuy nhiên, việc điều chế viên nén chứa cao khô dược liệu bằng phương pháp dập thẳng có thể gặp một số khó khăn do cao khô có kích thước hạt nhỏ, lưu tính kém. Để cải thiện các nhược điểm nói trên, nhiều tá dược dập thẳng đã được nghiên cứu đưa vào công thức viên nén như tinh bột biến tính, dicalcium phosphat khan, lactose phun sấy... Vì vậy, đề tài được thực hiện nhằm nghiên cứu cải thiện lưu tính cao khô Mật nhân và tối ưu hóa công thức viên nén dập thẳng chứa cao khô sấy phun trên cơ sở khảo sát một số tá dược sử dụng trong công thức.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Cao khô sấy phun rễ Mật nhân (NC12020) đạt tiêu chuẩn cơ sở. Natri croscarmellose (Vivasol, Vivasol GF, JRS Pharma, Đức). Tinh bột biến tính (Starch 1500 và Startab, Colorcon, Mỹ), dicalcium phosphat khan (A-tab, Innophos, Mỹ), magnesi stearat (Brenntag, Đức).

2.2. Phương pháp xác định hình dạng hạt cao khô sấy phun Mật nhân

Hình dạng hạt được xác định bằng phương pháp chụp ảnh sử dụng kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscope - SEM, JSM - IT100, Jeol, Nhật). Mẫu bột được phân tán mỏng trên băng dính gắn trên đế mẫu, gạt bỏ các hạt dư và tiến hành phủ dẫn điện trong vòng 2 phút. Chụp hình mẫu bằng kính hiển vi điện tử quét ở độ phân giải X100 và X1000.

2.3. Phương pháp xác định tỷ số Hausner và chỉ số nén của khối bột

Cân m (g) bột và cho vào ống đong ($V=25$ ml), đọc thể tích khối bột trước khi gõ (V_0), tiếp tục gõ ống đong đến khi thể tích bột không đổi, đọc thể tích sau gõ (V). Mỗi công thức được khảo sát lặp lại 3 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Khối lượng riêng trước gõ (d_0), khối lượng riêng sau gõ (d), tỷ số Hausner và chỉ số nén được xác định bằng công thức:

$$d_0 = \frac{m}{V_0} \text{ (g/ml)} \quad d = \frac{m}{V} \text{ (g/ml)} \quad \text{Tỷ số Hausner} = \frac{V_0}{V}$$

$$\text{Chỉ số nén} = 100 \times \frac{V_0 - V}{V_0}$$

2.4. Phương pháp xác định tốc độ chảy và góc nghiêng

2.4.1. Tốc độ chảy

Cân m (g) bột, cho bột chảy qua phễu (đường kính 10 cm, chiều dài đuôi phễu là 8 cm). Xác định thời gian chảy t (s). Mỗi công thức được khảo sát lặp lại 3 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Tốc độ chảy V_c (g/s) được tính như sau: $V_c = \frac{m}{t}$

2.4.2. Góc nghiêng

Cân khoảng m (g) bột và cho bột chảy qua phễu. Đo chiều cao của hình chóp (h) và đường kính đáy (d) của khối bột. Mỗi công thức được khảo sát lặp lại 3 lần, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Tính góc nghiêng (α) theo công thức: $\tan \alpha = \frac{2h}{d}$

Lưu tính của khối bột được đánh giá dựa trên chỉ số nén, tỷ số Hausner và góc nghiêng theo bảng xếp loại của Dược điển Hoa kỳ USP [5].

2.5. Khảo sát ảnh hưởng của tá dược độn lên lưu tính của cao khô Mật nhân

Cao khô Mật nhân được cải thiện lưu tính bằng phương pháp phối hợp với tá dược độn riêng lẻ (Starch 1500, A-tab, Startab) với các tỷ lệ tá dược độn khảo sát từ 0 đến 100% (kl/kl, tính trên tổng khối lượng hỗn hợp bột và cao khô sấy phun). Các mẫu bột được khảo sát các thông số chỉ số nén, tỷ số Hausner, tốc độ chảy, góc nghiêng.

2.6. Phương pháp điều chế viên nén Mật nhân

Cao khô Mật nhân được cân và trộn đều với tá dược Starch 1500. Sau đó, thêm các tá dược A-tab, Vivasol, Startab (theo các tỷ lệ trong bảng 3) tạo thành hỗn hợp bột đồng nhất. Cuối cùng trộn Mg st (tỷ lệ cố định trong các công thức là 0,5%) đến đồng nhất. Tỷ lệ Startab là phần tá dược bổ sung đủ 100% (kl/kl). Khối lượng trung bình của mỗi viên nén trong khoảng 500 ± 20 mg. Hỗn hợp bột sau khi trộn đều được cho vào máy dập viên tam sai Riva Mini Press (Pharmatest apparatebau GmbH, Đức) tiến hành dập thẳng, sử dụng chày có đường kính là 1,1 cm, lực dập trong khoảng 4-6 (KN). Các thông số thiết bị như vị trí chày trên, vị trí chày dưới và tốc độ máy được duy trì không đổi trong suốt quá trình thực nghiệm các công thức.

2.7. Phương pháp đánh giá tính chất viên nén Mật nhân

2.7.1. Độ đồng đều khối lượng

Cân riêng biệt 20 đơn vị lấy ngẫu nhiên, tính khối lượng trung bình. Không được có quá 2 đơn vị có khối lượng nằm ngoài giới hạn chênh lệch so với khối lượng trung bình là 5% và không được có đơn vị nào vượt gấp đôi giới hạn đó [6].

2.7.2. Độ rã

Tiến hành thử với 6 đơn vị lấy ngẫu nhiên, cho vào mỗi ống thử 1 viên. Treo giá đỡ ống thử vào cốc nước cất có nhiệt độ duy trì ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$ và vận hành thiết bị có sử dụng đĩa nhựa, xác nhận thời gian rã của từng viên. Xác định thời gian rã trung bình của 6 viên [6].

2.7.3. Độ mài mòn

Lấy ngẫu nhiên 15 viên, thổi sạch bụi trước khi cân. Ghi nhận khối lượng ban đầu của 15 viên (M_0). Cho viên vào lồng quay,

chính máy quay 100 vòng (25 vòng/phút và trong 4 phút). Sau khi máy ngừng, lấy viên ra thổi sạch bụi. Cân chính xác và ghi nhận khối lượng (M_1) và tính kết quả [7].

Công thức xác định độ mài mòn: $M(\%) = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100$

2.7.4. Độ cứng

Mỗi thử nghiệm lấy 10 viên, tiến hành đo độ cứng của từng viên bằng máy thử độ cứng và ghi lại kết quả. Tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn.

2.8. Thiết kế thí nghiệm và tối ưu hóa công thức viên nén Mật nhân

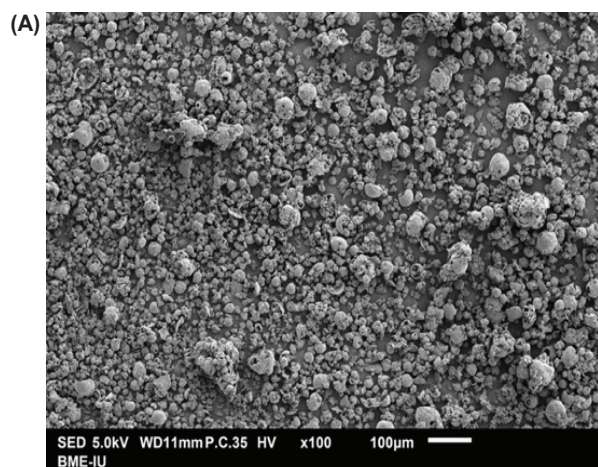
Mười thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm Design - Expert 6.0.6 (Stat-Ease Inc., Mỹ) theo mô hình D-optimal với 3 biến độc lập và 4 biến phụ thuộc với các mức thử nghiệm được trình bày bảng 1.

Bảng 1. Ý nghĩa và mức của các biến.

Biến độc lập	Mức 1	Mức 2	Mức 3
X_1 : % Starch 1500	20	30	-
X_2 : % A-tab	0	10	-
X_3 : % VS	1	3	5
Biến phụ thuộc	Điều kiện ràng buộc		
Y_1 : Độ biến thiên khối lượng viên (%)	Tối thiểu		
Y_2 : Độ mài mòn (%)	Tối thiểu		
Y_3 : Độ cứng (N)	Tối đa		
Y_4 : Độ rã (phút)	Tối thiểu		

Biến X_1 - X_3 là tỷ lệ % (kl/kl) của tá dược tương ứng, tính trên tổng khối lượng tá dược trong 1 viên.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình của 3 lần thử nghiệm. Sử dụng phần mềm BCPHARSOFT OPT để nghiên cứu mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa công thức viên nén Mật nhân. Kết quả dự đoán tối ưu được thực nghiệm kiểm chứng lặp lại 3 lần. Áp dụng trắc nghiệm t (One-sample t test) để so sánh kết quả thực nghiệm với kết quả dự đoán (khác nhau không có ý nghĩa thống kê khi $p > 0,05$).



3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hình dạng và kích thước hạt của cao khô Mật nhân

Các hạt cao Mật nhân có dạng hình gần cầu, bề mặt hạt tương đối nhẵn. Kích thước hạt trung bình khoảng 40 µm (hình 1). Do đó, tuy hạt cao khô Mật nhân có hình dạng gần cầu nhưng kích thước hạt cao nhỏ sẽ làm lực liên kết và lực tương tác giữa các hạt tăng.

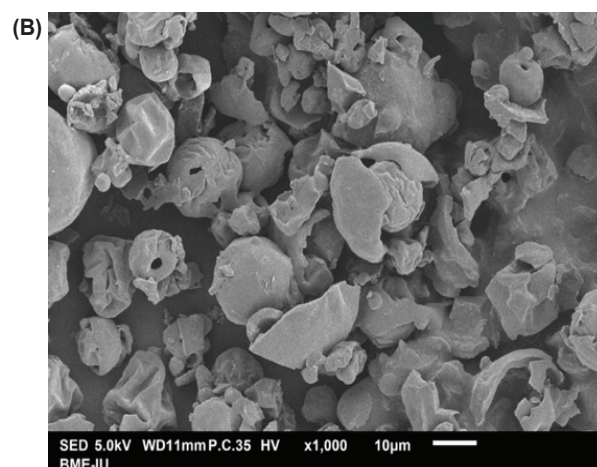
3.2. Lưu tính của cao khô Mật nhân và các tá dược độn

Cao khô Mật nhân có lưu tính rất kém với tỷ số Hausner và chỉ số nén lần lượt là $1,47 \pm 0,05$ và $32,03 \pm 2,26$. Khối lượng riêng trước gõ ($0,30 \pm 0,01$ g/ml) của cao khô Mật nhân thấp. Cao khô Mật nhân bị bám dính mạnh lên các bề mặt thiết bị và dụng cụ nên không thể chảy tự do và bị giữ lại trên phễu. Vì vậy, giá trị góc nghỉ và tốc độ chảy của cao khô Mật nhân không xác định được. Điều này có thể giải thích là do kích thước của cao khô sảy phun Mật nhân rất nhỏ (40 µm). Theo nghiên cứu của M.P. Mullarney và cs (2009) [8], các hạt nhỏ có tỷ lệ diện tích bề mặt trên thể tích tương đối cao, khiến lực hấp dẫn, lực Van der Waals giữa các hạt chiếm ưu thế dẫn đến sự kết dính của các hạt và khiến cho lưu tính của cao sảy phun kém.

Bảng 2. Kết quả xác định lưu tính của các tá dược độn (n=3, tỷ lệ tá dược độn là 100%).

	Starch 1500	A-tab	Startab
Khối lượng riêng trước gõ (g/ml)	$0,67 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,00$
Khối lượng riêng sau gõ (g/ml)	$0,83 \pm 0,00$	$0,88 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,01$
Tỷ số Hausner	$1,24 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,01$	$1,20 \pm 0,02$
Chỉ số nén	$19,46 \pm 0,94$	$15,02 \pm 0,63$	$16,67 \pm 1,70$
Tốc độ chảy (g/s)	$13,39 \pm 0,21$	$16,31 \pm 0,31$	$14,15 \pm 0,23$
Góc nghỉ (độ)	$33,37 \pm 0,59$	$21,20 \pm 0,19$	$16,01 \pm 0,19$

Starch 1500, A-tab, Startab là những tá dược độn cho phương pháp dập thẳng, có lưu tính và góc nghỉ tốt theo thang đánh giá lưu tính của bột [5]. Giá trị tỷ số Hausner và chỉ số nén của các tá dược đều từ mức khá đến tốt (bảng 2). Vì vậy, các tá dược này được sử dụng để cải thiện lưu tính cao khô Mật nhân. A-tab là tá dược độn



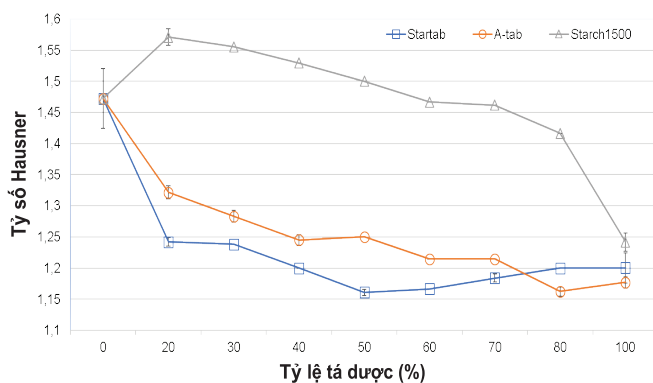
Hình 1. Hình chụp SEM của mẫu cao khô Mật nhân ở độ phóng đại X100 (A) và X1000 (B).

có khối lượng riêng trước gỗ cao nhất (0,75 g/ml) làm cho A-tab có lưu tính tốt. Tá dược Startab có góc nghỉ nhỏ nhất trong 3 tá dược. Starch 1500 có lưu tính khá. Tuy nhiên, lưu tính của Starch 1500 kém hơn so với tá dược A-tab và Startab.

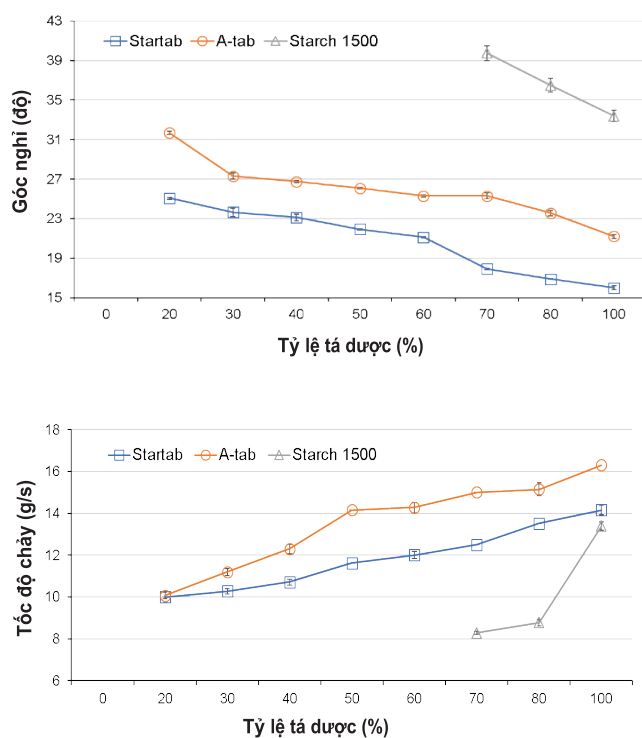
3.3. Ảnh hưởng của tá dược độn lên lưu tính cao khô Mật nhân

Hình 2 cho thấy, khi tăng tỷ lệ tá dược độn Starch 1500, A-tab hoặc Startab thì tỷ số Hausner của hỗn hợp cao khô sấy phun Mật nhân và tá dược độn giảm, lưu tính của cao khô Mật nhân thay đổi từ chảy rất kém sang chảy ở mức tốt.

Đối với tá dược Startab và A-tab, khi phối hợp tá dược ở tỷ lệ 20 đến 80% thì các hỗn hợp bột đều có góc nghỉ trong khoảng



Hình 2. Tương quan giữa tỷ số Hausner với tỷ lệ tá dược độn khảo sát.



Hình 3. Tương quan giữa góc nghỉ và tốc độ chảy với tỷ lệ tá dược độn khảo sát.

lưu tính từ tốt đến rất tốt (hình 3). Điều này là do kích thước của Startab (90 μ m) và A-tab (180 μ m) tương đối lớn nên khi hỗn hợp bột chảy qua phễu thì các hạt tá dược lớn đẩy các hạt cao khô Mật nhân nên cải thiện lưu tính.

Các hỗn hợp bột có tốc độ chảy tăng dần khi tăng tỷ lệ các tá dược. Trong ba loại tá dược độn thì tá dược A-tab cho hỗn hợp bột có tốc độ chảy nhanh nhất. Điều này là do A-tab có khối lượng riêng trước gỗ cao (0,75 g/ml), kích thước hạt trung bình tương đối lớn nên khi tá dược này chảy có thể kéo theo các hạt cao khô Mật nhân chảy cùng hoặc đẩy các hạt cao khô Mật nhân làm tăng tốc độ chảy qua phễu của hỗn hợp bột. Đối với Starch 1500, chỉ khi tỷ lệ tá dược là 70% hỗn hợp bột mới chảy được qua phễu. Các hạt tá dược Starch 1500 có kích thước hạt trung bình nhỏ (68,59 μ m) gần với hạt cao khô Mật nhân (khoảng 40 μ m) nên lực liên kết giữa các hạt lớn làm giảm tốc độ chảy của hỗn hợp bột.

Tá dược Starch 1500 có khả năng cải thiện lưu tính cao khô Mật nhân, nhưng mức cải thiện không tốt bằng 2 tá dược độn còn lại. Tuy nhiên, Starch 1500 có kích thước gần bằng hạt cao khô Mật nhân nên có thể giảm khả năng tách lớp hỗn hợp bột dập viên. Như vậy, nếu tỷ lệ Starch 1500 quá cao thì ảnh hưởng lưu tính bột dập viên, nếu quá thấp thì có thể hỗn hợp dập viên bị tách lớp. Vì vậy, Starch 1500 được chọn làm biến khảo sát cho nghiên cứu và cả 3 tá dược độn đều được sử dụng trong công thức viên nén Mật nhân.

3.4. Mô hình thực nghiệm, tương quan hồi quy của biến độc lập và biến phụ thuộc

Dữ liệu 10 thực nghiệm (bảng 3) được dùng làm dữ liệu đầu vào cho phần mềm BCPharsoft OPT để khảo sát mối liên quan nhân quả và tối ưu hóa công thức viên nén Mật nhân.

Bảng 3. Tổng hợp kết quả 10 thực nghiệm (n=3).

Công thức	Biến độc lập (%)			Biến phụ thuộc			
	X1	X2	X3	Y1 (%)	Y2 (%)	Y3 (N)	Y4 (phút)
F1	30	0	3	0,7469 $\pm$ 0,02	0,26 $\pm$ 0,01	67,6 $\pm$ 1,85	12,43 $\pm$ 0,37
F2	20	10	5	1,3026 $\pm$ 0,26	0,31 $\pm$ 0,05	74,5 $\pm$ 3,59	11,40 $\pm$ 0,03
F3	30	10	5	0,7444 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,02	68,3 $\pm$ 1,77	11,53 $\pm$ 0,16
F4	30	0	1	0,7890 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,04	67,2 $\pm$ 2,35	12,53 $\pm$ 0,35
F5	20	10	3	0,7277 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,00	75,1 $\pm$ 1,78	13,24 $\pm$ 0,23
F6	30	0	5	0,5094 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,01	74,6 $\pm$ 1,37	11,81 $\pm$ 0,01
F7	20	10	1	0,5424 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,01	77,2 $\pm$ 1,66	15,50 $\pm$ 0,38
F8	20	0	1	0,5124 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	75,0 $\pm$ 0,20	13,59 $\pm$ 0,41
F9	30	10	1	0,6476 $\pm$ 0,02	0,27 $\pm$ 0,03	71,2 $\pm$ 2,15	13,59 $\pm$ 0,09
F10	20	0	3	0,4204 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	73,1 $\pm$ 1,80	12,12 $\pm$ 0,44

3.5. Mô hình hóa

Điều kiện:

- Nhóm thử ($Y1^{(4,8)}$, $Y2^{(5,10)}$, $Y3^{(1,2)}$, $Y4^{(3,9)}$).

- Thuật toán: Back Propagation Learning.

Kết quả tương quan hồi quy của phương pháp tối ưu hóa thể hiện mức độ liên quan nhân quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Tương quan hồi quy phương pháp tối ưu.

Biến phụ thuộc	R ² luyện	R ² thử
Y1	0,99	0,98
Y2	0,99	0,98
Y3	0,99	0,98
Y4	1,00	0,98

Các giá trị R² luyện và R² thử trong khoảng 0,98-1,00 nên mô hình dự đoán được xây dựng từ phần mềm BCPharSoft OPT là rất tốt. Mô hình này có thể được sử dụng làm cơ sở để khảo sát liên quan nhân quả, tối ưu hóa và dự đoán các biến phụ thuộc.

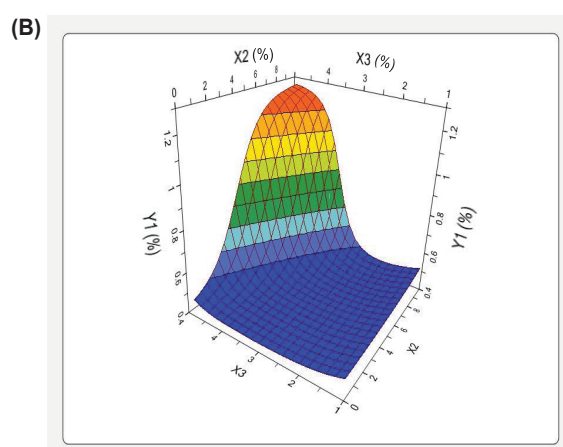
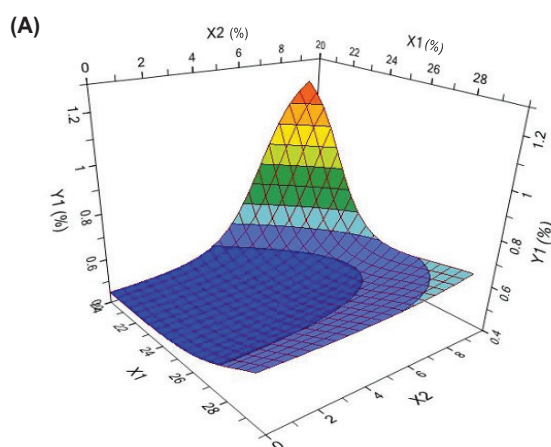
3.6. Quy luật nhân quả liên quan đến độ biến thiên khối lượng viên

Hình 4A cho thấy, khi tá dược Starch 1500 (X1) trong khoảng 20 đến 24%, tỷ lệ tá dược Starch 1500 càng tăng thì độ biến thiên khối lượng viên (Y1) càng giảm do Starch 1500 có kích thước hạt (68,59 μm) gần với kích thước hạt cao (40 μm), giúp cho hỗn hợp bột giảm sự tách lớp, bột chảy đều hơn nên độ biến thiên khối

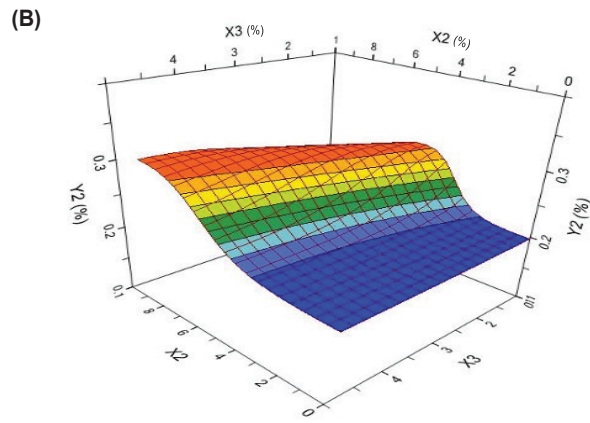
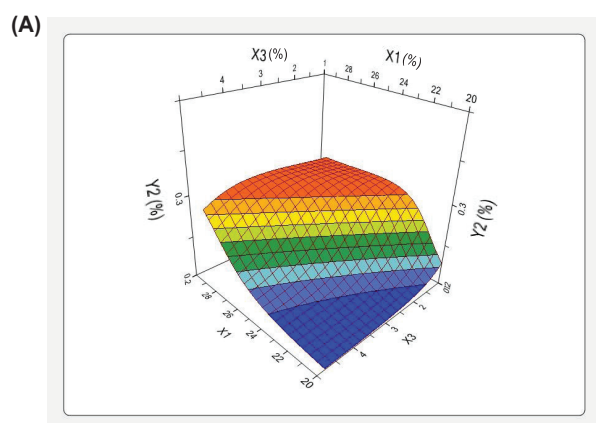
lượng viên giảm. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng tỷ lệ Starch 1500 lên khoảng 24 đến 30% thì độ biến thiên khối lượng viên (Y1) tăng dần. Do lúc này hỗn hợp bột có quá nhiều hạt có kích thước nhỏ, diện tích bề mặt lớn nên độ kết dính cao [9] dẫn đến lưu tính của bột giảm làm độ biến thiên khối lượng viên tăng.

Hình 4A cho thấy, tỷ lệ A-tab (X2) nằm trong khoảng từ 0 đến 4% thì độ biến thiên khối lượng viên (Y1) hầu như không đổi. Khi tỷ lệ A-tab tăng từ 4 đến 10% độ biến thiên khối lượng viên (Y1) tăng. Vì vậy, tỷ lệ A-tab (X2) càng lớn thì độ biến thiên khối lượng viên (Y1) càng lớn. Điều này có thể giải thích là do A-tab là tá dược có kích thước lớn (180 μm) và khối lượng riêng trước gõ cao (0,75g/ml). Khi tăng tỷ lệ A-tab quá cao làm hỗn hợp bột chảy không đều, dễ tách lớp làm tăng độ biến thiên khối lượng viên (Y1).

Theo hình 4B, khi tỷ lệ VS (X3) trong khoảng từ 1 đến 3% thì độ biến thiên khối lượng viên (Y1) không đổi đáng kể khi thay đổi tỷ lệ VS và A-tab. Ở tỷ lệ VS lớn hơn 3%, khi tỷ lệ VS tăng thì độ biến thiên khối lượng (Y1) tăng. Điều này có thể giải thích bởi lý do VS có kích thước hạt nhỏ (38,81 μm) nên lưu tính kém làm giảm lưu tính khối bột dập viên, dẫn đến làm tăng độ biến thiên khối lượng viên.



Hình 4. Ảnh hưởng của (A) % Starch 1500 (X1) và % A-tab (X2); (B) % A-tab (X2) và % VS (X3) lên độ biến thiên khối lượng viên (Y1).



Hình 5. Ảnh hưởng của (A) % Starch 1500 (X1) và % VS (X3); (B) % A-tab (X2) và % VS (X3) lên độ mài mòn (Y2).

3.7. Quy luật nhân quả liên quan đến độ mài mòn

Hình 5A cho thấy, khi tỷ lệ Starch 1500 (X1) giảm thì độ mài mòn (Y2) giảm dần. Điều này có thể giải thích là do trong quá trình dập viên, tá dược Starch 1500 xảy ra những biến dạng và hình thành liên kết chậm [10], mà quá trình dập thẳng xảy ra có thể quá nhanh làm cho viên nén chứa Starch 1500 có liên kết yếu. Do đó, viên nén chứa nhiều Starch 1500 sẽ có liên kết giữa các thành phần viên lỏng lẻo và không có độ bền cao. Vì vậy, tỷ lệ Starch 1500 tăng sẽ làm tăng sự mài mòn của viên nén.

Hình 5B cho thấy, khi A-tab (X2) ở tỷ lệ trong khoảng 0 đến 3% thì độ mài mòn không đổi theo tỷ lệ VS (X3). Tuy nhiên, tiếp tục tăng tỷ lệ tá dược A-tab từ 3 đến 10% thì độ mài mòn (Y2) tăng.

3.8. Quy luật nhân quả liên quan đến độ cứng

Hình 6A cho thấy, tỷ lệ Starch 1500 (X1) càng tăng thì độ cứng (Y3) càng giảm. Điều này có thể giải thích là do Starch 1500 trải qua những biến dạng trên bề mặt nhưng những biến dạng này xảy ra

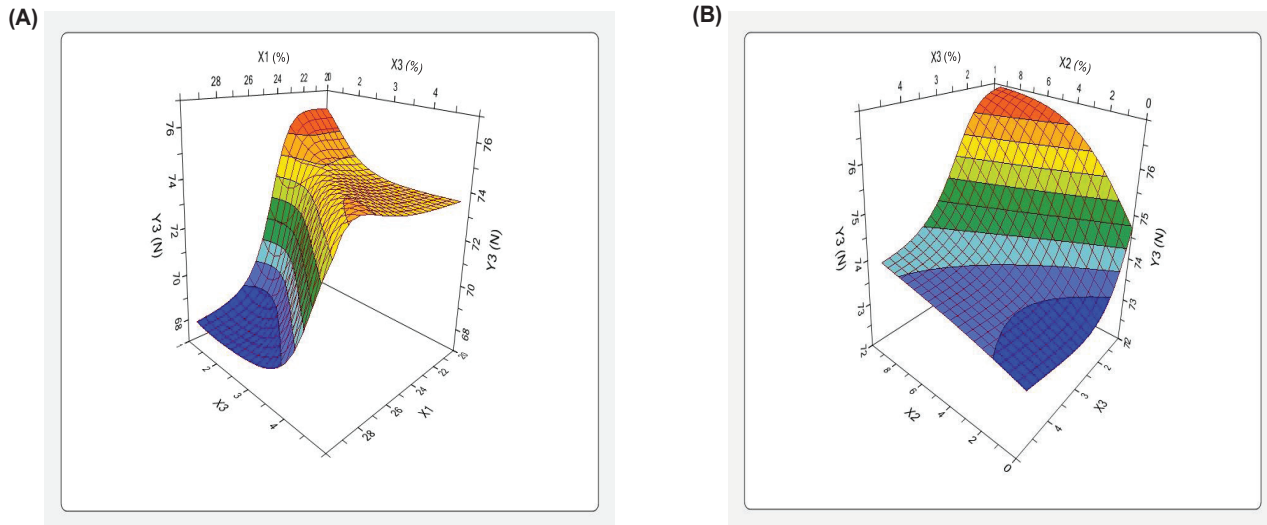
quá chậm để hình thành các liên kết trong quá trình nén nhanh [10]. Vì vậy, viên chứa tỷ lệ Starch 1500 lớn sẽ có liên kết giữa các thành phần yếu làm độ cứng viên giảm.

Hình 6B cho thấy, tỷ lệ A-tab (X2) tăng thì độ cứng (Y3) tăng do A-tab có tính chất giòn khi trải qua quá trình nén sẽ có sự phân mảnh đáng kể [11], giảm kích thước hạt trong quá trình nén và làm tăng sự sắp xếp lại của các hạt trong hỗn hợp bột. Vì vậy, viên nén chứa A-tab sẽ có độ cứng cao [12].

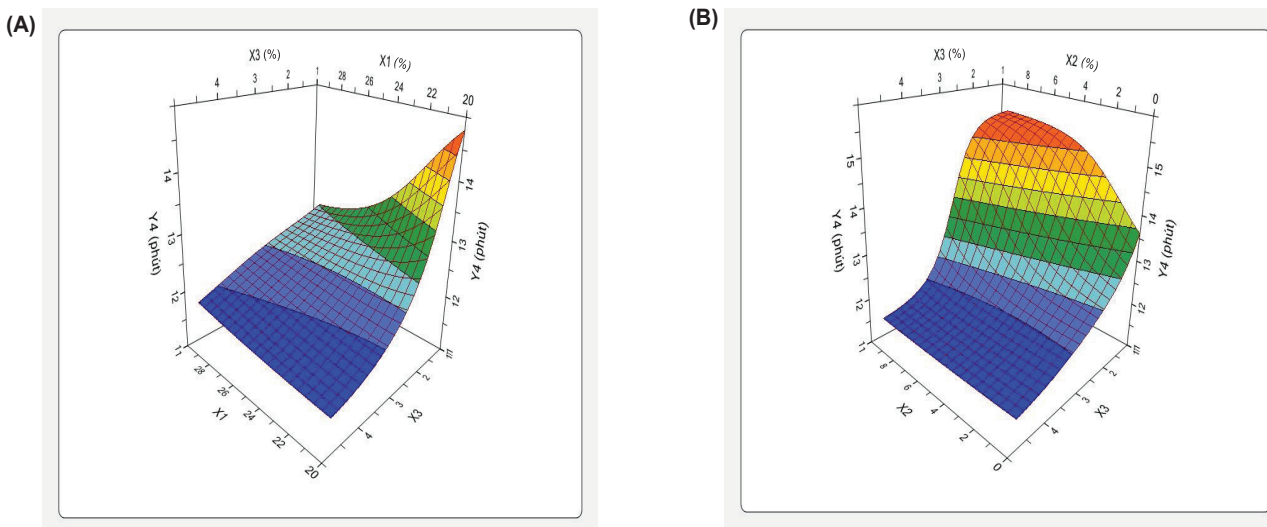
Theo hình 6B, khi tỷ lệ % VS (X3) càng cao thì độ cứng (Y3) càng giảm do VS có tính chịu nén không tốt (dễ giải nén) và các hạt VS liên kết kém [13]. Vì vậy, viên nén chứa càng nhiều VS thì độ cứng viên càng thấp [13,14].

3.9. Quy luật nhân quả liên quan đến độ rã

Hình 7A cho thấy, khi tỷ lệ VS (X3) càng tăng thì thời gian rã (Y4) càng giảm do VS là tá dược siêu rã với cơ chế hoạt động thông qua mao dẫn và độ xốp của viên nén (con đường xâm nhập



Hình 6. Ảnh hưởng của (A) % Starch 1500 (X1) và % VS (X3); (B) % A-tab (X2) và % VS (X3) lên độ cứng (Y3).



Hình 7. Ảnh hưởng của (A) % Starch 1500 (X1) và % VS (X3); (B) % A-tab (X2) và % VS (X3) lên độ rã (Y4).

của chất lỏng). VS giúp tăng cường độ xốp và thấm hút nước vào viên nên từ đó phá vỡ liên kết của các thành phần khác khiến viên bị vỡ ra, làm thúc đẩy quá trình rã của viên [14]. Độ xốp càng lớn thì nước càng dễ thấm vào viên nên thời gian rã nhanh hơn [9].

Hình 7A cho thấy, khi tỷ lệ tá dược VS (X3) trong khoảng từ 1 đến 2% và khi tá dược Starch 1500 (X1) tăng thì thời gian rã giảm mạnh. Điều này có thể giải thích là do VS là tá dược siêu rã kết hợp với Starch 1500 là tinh bột sẽ trương nở khi tiếp xúc với nước làm giảm khả năng kết dính của các thành phần khác trong viên, làm đẩy nhanh quá trình rã của viên [14].

Hình 7B cho thấy, khi tá dược VS (X3) giảm thì thời gian rã (Y4) giảm. A-tab không tan trong nước [12] và biến dạng phân mảnh tạo ra bề mặt mới làm các thành phần trong viên liên kết chặt hơn nên viên nén chứa tỷ lệ A-tab tăng làm tăng thời gian rã.

3.10. Tối ưu hóa công thức viên nén Mật nhân

Kết quả tối ưu và giá trị dự đoán các biến Y bởi phần mềm BCPharSoft OPT được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả tối ưu hoá dự đoán bằng phần mềm BCPharsoft OPT.

Biến số	Kết quả tối ưu			Giá trị dự đoán			
	X_1	X_2	X_3	$Y_1(\%)$	$Y_2(\%)$	$Y_3(N)$	$Y_4(phút)$
Giá trị	20	3	4	0,47	0,201	75,635	11,712

Thực hiện lặp lại 3 lần công thức và dùng phần mềm thống kê SPSS 20.0 so sánh kết quả thực nghiệm và kết quả dự đoán. Kết quả thống kê được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. So sánh kết quả dự đoán và thực nghiệm kiểm chứng (n=3).

	$Y_1(\%)$	$Y_2(\%)$	$Y_3(N)$	$Y_4(phút)$
Dự đoán	0,47	0,201	75,635	11,712
Thực nghiệm	0,4738±0,01	0,27±0,05	77,4±2,50	11,17±0,59
Giá trị p	0,661	0,152	0,346	0,248

Trắc nghiệm t cho thấy, kết quả dự đoán và kết quả kiểm chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$). Như vậy, kết quả thực nghiệm kiểm chứng công thức viên nén tối ưu phù hợp với kết quả dự đoán bởi phần mềm BCPharsoft OPT.

4. Kết luận

Đề tài đã nghiên cứu liên quan nhân quả giữa các biến độc lập (tỷ lệ Starch 1500, A-tab và natri croscarmellose - Vivasol GF) và các biến phụ thuộc (độ biến thiên khối lượng viên, độ mài mòn, độ cứng, độ rã). Từ đó, công thức viên nén Mật nhân đã được nghiên cứu tối ưu hóa và đã tiến hành thực nghiệm kiểm chứng thành công. Công thức tối ưu có thể được tiếp tục nghiên cứu nâng cỡ lô sản xuất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.U. Rehman, K. Choe, H.H. Yoo (2016), "Review on a traditional herbal medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology", *Molecules*, **21(3)**, DOI: 10.3390/molecules21030331.
- [2] D.H. Nguyen, D.P. Nguyen, N.T. Pham, et al. (2020a), "Research on cause-and-effect relationships and optimize the process of extracting the medicinal herb bile", *Journal of Pharmacy*, **60(529)**, pp.44-48 (in Vietnamese).
- [3] D.H. Nguyen, T.Q.D. Huynh, N.T. Pham, et al. (2020b), "Developing and validating a process for quantifying eurycoumanon in spray-dried honey extract using the HPLC-UV method", *Journal of Pharmacy*, **60(528)**, pp.85-88 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Health (2007), "Techniques for producing medicinal forms", *Pharmaceutical Production Techniques - Volume 3*, Medical Publishing House, pp.72-206 (in Vietnamese).
- [5] The United States Pharmacopoeia (2016a), https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/g05_pf_30_6_2004.pdf, accessed 10 June 2023.
- [6] Ministry of Health (2018), *Vietnam Pharmacopoeia V*, Medical Publishing House, 2200pp (in Vietnamese).
- [7] The United States Pharmacopoeia (2016b), https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-chapter/g06_pf_ira_32_2_2006.pdf, accessed 10 June 2023.
- [8] M.P. Mullarney, L. Natalie (2009), "Modeling pharmaceutical powder-flow performance using particle-size distribution data", *Pharmaceutical Technology*, **33(3)**, pp.126-134.
- [9] S.S.S. Muliyadi (2005), "The effect of repeated compaction on starch 1500 as a filler-binder of direct compression tablet", *Majalah Farmasi Indonesia*, **12(4)**, pp.166-171, DOI: 10.14499/INDONESIANJPHARMOISSOPP166-171.
- [10] J. Muzikova, I. Eimerova (2011), "A study of the compaction process and the properties of tablets made of a new co-processed starch excipient", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **37(5)**, pp.576-582, DOI: 10.3109/03639045.2010.530270.
- [11] Y. Zhang, Y. Law, S. Chakrabarti (2003), "Physical properties and compact analysis of commonly used direct compression binders", *AAPS PharmSciTech*, **4(4)**, pp.489-499, DOI: 10.1208/pt040462.
- [12] P.J. Sheskey, R.T. Robb, R.D. Moore, et al. (1995), "Effects of lubricant level, method of mixing, and duration of mixing on a controlled-release matrix tablet containing hydroxypropyl methylcellulose", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **21(19)**, pp.2151-2165, DOI: 10.3109/03639049509065898.
- [13] C. Ferrero, N. Munoz, M.V. Velasco, et al. (1997), "Disintegrating efficiency of croscarmellose sodium in a direct compression formulation", *International Journal of Pharmaceutics*, **147(1)**, pp.11-21, DOI: 10.1016/S0378-5173(96)04784-9.
- [14] P. Mohanachandran, P. Sindhumol, T. Kiran (2011), "Superdisintegrants: An overview", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **6(1)**, pp.105-109.

Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất liên quan aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester của dược chất aceclofenac

Triệu Quốc Vương, Nguyễn Trần Ngọc Vi, Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Trương Ngọc Tuyền*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, Quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/6/2023; ngày chuyển phản biện 23/6/2023; ngày nhận phản biện 17/7/2023; ngày chấp nhận đăng 19/7/2023

Tóm tắt:

Aceclofenac là thuốc kháng viêm, giảm đau không steroid (NSAID). Nghiên cứu tổng hợp aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F) của dược chất aceclofenac ở quy mô phòng thí nghiệm, xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu tạp E và tạp F. Quy trình tổng hợp tạp E và tạp F bằng phản ứng ester hóa aceclofenac và diclofenac sodium trong dimethyl formamide (DMF) được tối ưu hóa với hiệu suất tương ứng là 96 và 66%. Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về Hải hòa hóa các Thủ tục đăng ký Dược phẩm sử dụng cho người (ICH). Quy trình xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F đạt tính phù hợp hệ thống, với RSD % của các thông số sắc ký đều nhỏ hơn 2,0% và hệ số bất đối của pic tạp E và tạp F nằm trong khoảng 0,8-1,5. Về tính tuyến tính, giá trị R đối với cả hai tạp đều trong khoảng 0,9995-1,0000. Độ chính xác của tạp E và tạp F có RSD % tương ứng là 0,04 và 0,001%. Tỷ lệ phục hồi đạt quy định 98,0-102,0%. Nghiên cứu xây dựng các chỉ tiêu đánh giá tạp E và tạp F tổng hợp. Kết quả tạp E và F đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu với độ tinh khiết sắc ký được xác định lần lượt là 99,94 và 99,90% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Từ khóa: aceclofenac, aceclofenac benzyl ester, aceclofenac ethyl ester, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Chỉ số phân loại: 3.4

Synthesis and standardisation of aceclofenac ethyl ester and aceclofenac benzyl ester as related aceclofenac impurity

Quoc Vuong Trieu, Tran Ngoc Vi Nguyen, Huu Lac Thuy Nguyen, Ngoc Tuyen Truong*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 21 June 2023; revised 17 July 2023; accepted 19 July 2023

Abstract:

Aceclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). This study aimed to synthesise aceclofenac ethyl ester (E impurity) and aceclofenac benzyl ester (F impurity) of the drug aceclofenac at a laboratory scale and establish impurity criteria using high-performance liquid chromatography (HPLC) to create reference substances for E and F impurities. They were synthesised through the esterification of aceclofenac and diclofenac sodium in dimethyl formamide (DMF), optimised with yields of 96 and 66%, respectively. The HPLC method was validated in accordance with the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines. The process of determining the purity of impurities E and F was found to be system-suitable, with RSD % of all chromatographic parameters being less than 2.0% and the asymmetry factors of E and F impurities in the range of 0.8-1.5. In terms of linearity, the R values for both impurities were in the range of 0.9995-1.0000. The intermediate precision relative standard deviation (RSD) values for E and F impurities were 0.04 and 0.001%, respectively. The recovery rate met the requirements of 98.0-102.0%. The research has developed criteria for evaluating synthetic E and F impurities. The synthesised products met the requirements for established as reference substances, with chromatographic purity determined to be 99.94 and 99.90%, respectively, in their purity forms.

Keywords: aceclofenac, aceclofenac benzyl ester, aceclofenac ethyl ester, high-performance liquid chromatography.

Classification number: 3.4

*Tác giả liên hệ: Email: truongtuyen@ump.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Kiểm soát chất lượng cũng như độ an toàn của thuốc là vấn đề được quan tâm trong sử dụng thuốc. Aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F) là tạp chất liên quan của aceclofenac, có nguồn gốc từ quá trình tổng hợp aceclofenac. Theo Hệ thống Hải hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất (GHS), tạp E được ghi nhãn GHS06 và có những độc tính sau: độc nếu nuốt phải, gây kích ứng mắt nghiêm trọng và rất độc cho động vật thủy sinh với tác dụng lâu dài [1, 2], tạp F được ghi nhãn GHS07 và có những độc tính sau: độc nếu nuốt phải hay nghi ngờ ảnh hưởng khả năng sinh sản hoặc vô sinh và gây kích ứng mắt [1, 3]. Do đó, trong chuyên luận của aceclofenac của Dược điển châu Âu 9 (EP 9), cũng như Dược điển Anh 2019 (BP 2019) đều quy định về tạp chất liên quan bắt buộc phải được kiểm soát bao gồm tạp E và tạp F và quy định 2 tạp này trong nguyên liệu phải <0,2% [4, 5].

Hiện nay, tạp chuẩn E và F được thương mại hóa với giá khá cao, như ở Biosynth tạp E có giá 427,68 USD/100 mg và tạp F có giá 520 USD/100 mg với độ tinh khiết tối thiểu 95% [6], gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm những tạp chất này. Cho đến nay, ở Việt Nam, chỉ mới có 1 công trình nghiên cứu tổng hợp tạp A của diclofenac (cũng chính là tạp I của aceclofenac), còn các tạp khác (từ tạp A đến H) thì chưa nghiên cứu [7].

Với nhu cầu thực tế trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tổng hợp tạp chất liên quan E và F của aceclofenac ở quy mô phòng thí nghiệm, đồng thời tiến hành xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết của tạp E và tạp F bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu tạp E và tạp F góp phần bổ sung vào ngân hàng chất chuẩn quốc gia phục vụ cho công tác kiểm nghiệm.

2. Nguyên liệu và thiết bị

2.1. Nguyên liệu

Aceclofenac của Công ty Aarti Drugs, số lô: ACF/19020004, hàm lượng: 99,83%, hạn dùng 1/2024.

Diclofenac sodium của Công ty Henan Dongtai Pharm, số lô: 301190404-5, hàm lượng: 100,3%, hạn dùng 4/2023.

Hóa chất và dung môi: *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Fisher, Đức), diethyl sulfate (Acros, Bỉ), potassium carbonate (Merck, Đức), benzyl 2-bromoacetate (AKSci, Mỹ), diethyl ether, sodium sulfate và ethyl acetate (Xilong, Trung Quốc), acetone, dichloromethane, chloroform và methanol (Chemsol, Việt Nam) đạt tiêu chuẩn phân tích. Các hóa chất được sử dụng ngay mà không cần tinh chế thêm. Acetonitrile đạt tiêu chuẩn dùng sắc ký lỏng (Fisher, Đức). Bùn mỏng silica gel F₂₅₄ (Merck, Đức).

2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters Alliance e2695, đầu dò PDA. Máy quang phổ Shimadzu IR Affinity-1S. Máy LC-MS Agilent 1200 nguồn ESI. Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Advance II. Máy quét nhiệt vi sai DSC TA Instrument Q10 dùng phần mềm Universal V4.7A TA Instruments. Máy quang phổ UV-Vis Shimadzu UV-2550. Máy cô quay chân không Buchi R210S. Tủ sấy chân không Jeiotech OV-12 và một số thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm.

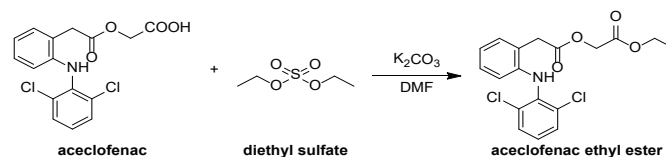
3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1. Đối tượng

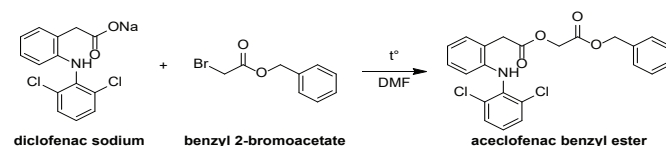
Aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F của aceclofenac).

3.2. Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp tạp E và tạp F: Tạp E và tạp F có thể được tổng hợp bằng phản ứng ester hóa aceclofenac và diclofenac sodium trong DMF [8] như sơ đồ 1 và 2.



Sơ đồ 1. Phản ứng ester hóa aceclofenac tạo aceclofenac ethyl ester.



Sơ đồ 2. Phản ứng ester hóa diclofenac sodium tạo aceclofenac benzyl ester.

Quy trình tổng hợp tạp E: cho aceclofenac (0,5 g; 1,41 mmol), 8 ml DMF, potassium carbonate (0,22 g; 1,58 mmol) và diethyl sulfate (0,28 ml; 2,12 mmol) vào bình cầu, khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển *n*-hexane-ethyl acetate (8:2), phát hiện bằng đèn UV 254 nm. Thời gian phản ứng 60 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được làm lạnh, lọc dưới áp suất giảm. Thêm nước từ từ và khuấy nhẹ cho đến khi hỗn hợp kết tinh. Để yên hỗn hợp đến khi kết tủa hoàn toàn, lọc dưới áp suất giảm. Rửa kết tủa bằng nước cất, thu được tạp E dự kiến. Sấy đến khối lượng không đổi.

Quy trình tổng hợp tạp F: Cho diclofenac sodium (0,50 g; 1,57 mmol), 6 ml DMF và benzyl 2-bromoacetate (0,28 ml; 1,70 mmol) vào bình cầu, khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C. Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển *n*-hexane-dichloromethane-acetone (8:1:1), phát hiện bằng đèn UV 254 nm. Thời gian phản ứng 180 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm vào hỗn hợp 40 ml diethyl ether, khuấy đều. Gạn lấy dịch ether, lắc dịch ether với nước (3 lần x 20 ml). Làm khan dịch ether bằng sodium sulfate. Cô quay loại ether, thêm 30 ml methanol, cô đến khi dịch còn một nửa. Làm lạnh dịch cô quay, để yên đến khi sản phẩm kết tinh hoàn toàn. Lọc dưới áp suất giảm, rửa sản phẩm bằng methanol lạnh. Thu được tạp F dự kiến. Sấy đến khối lượng không đổi.

Tinh chế sản phẩm tổng hợp: Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp thay đổi dung môi.

Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế: Sản phẩm tinh chế được thử tinh khiết bằng phương pháp nhiệt vi sai (DSC) và sắc ký lớp mỏng, sử dụng bản mỏng silica gel F₂₅₄ với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau.

Tạp E: *n*-hexane-dichloromethane-acetic acid (6:4:0,2), *n*-hexane-ethyl acetate (8:2), petroleum ether-ethyl acetate (4:1).

Tạp F: *n*-hexane-diethyl ether (9:1), *n*-hexane-dichloromethane-acetone (8:1:1), *n*-hexane-chloroform-acetic acid (4:6:0,15).

Xác định cấu trúc: Sản phẩm tinh chế được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm UV, IR, MS và NMR.

Xác định độ tinh khiết: Tạp E và tạp F được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp HPLC quy về 100% diện tích pic.

Điều kiện sắc ký: cột Eurospher II C18 (250x4,6 mm, 5 μ m), dung môi hòa tan và pha động là hỗn hợp acetonitrile-nước, nhiệt độ cột 40°C, tốc độ dòng 1,0 ml/phút và thể tích tiêm mẫu 10 μ l [4, 9, 10].

4. Kết quả và bàn luận

4.1. Tổng hợp và tinh chế aceclofenac ethyl ester

Phản ứng tổng hợp tạp E là phản ứng ester hóa aceclofenac với diethyl sulfate trong DMF. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng như tỷ lệ mol giữa aceclofenac và diethyl sulfate (từ tỷ lệ 1:1 đến 1:2); nhiệt độ (từ 30 đến 50°C) và thời gian phản ứng (từ 30-180 phút). Các yếu tố này đều ảnh hưởng đến hiệu suất sản phẩm phản ứng, sản phẩm phụ và độ tinh khiết sản phẩm. Với tỷ lệ 1:1 phản ứng xảy ra chậm và không hoàn toàn, khi tăng đến tỷ lệ 1:1,5 thì cho hiệu suất cao nhất (quan sát đậm độ của vết được cho là sản phẩm trên bản sắc ký lớp mỏng), tiếp tục tăng tỷ lệ thì bắt đầu xuất hiện các vết khác ngoài vết sản phẩm, càng tăng tỷ lệ thì các vết khác càng nhiều trong khi vết được cho là sản phẩm không đậm thêm và việc tinh chế khó khăn do không loại được hết các vết khác. Do vậy, chọn tỷ lệ mol là 1:1,5. Tiếp tục khảo sát yếu tố nhiệt độ, ở 30°C trên bản sắc ký lớp mỏng chỉ cho một vết là sản phẩm, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên đến 40, 50°C thì xuất hiện thêm các vết khác, nên chọn 30°C cho phản ứng. Tiếp tục khảo sát thời gian phản ứng, ở thời điểm 30 phút phản ứng đã xảy ra nhưng vết nguyên liệu vẫn còn, tiếp tục tăng đến 60 phút phản ứng không còn vết nguyên liệu trên sắc ký lớp mỏng, nếu tiếp tục thực hiện phản ứng thì các vết tạp bắt đầu xuất hiện, do đó chọn 60 phút làm điều kiện phản ứng. Các tạp thường xuất hiện có thể alkyl hóa nhóm amin (vết này có Rf cao hơn vết sản phẩm khi tăng tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng) và tạp thủy phân nguyên liệu đầu (vết có Rf thấp hơn vết sản phẩm và nguyên liệu khi tăng nhiệt độ và thời gian phản ứng kéo dài). Nghiên cứu chỉ tập trung vào cải thiện hiệu suất nên không xác định cấu trúc của các vết khác. Điều kiện tối ưu cho phản ứng tổng hợp tạp E là tỷ lệ mol aceclofenac: diethyl sulfate là 1:1,5; nhiệt độ phản ứng là 30°C và thời gian phản ứng là 60 phút với hiệu suất 96%.

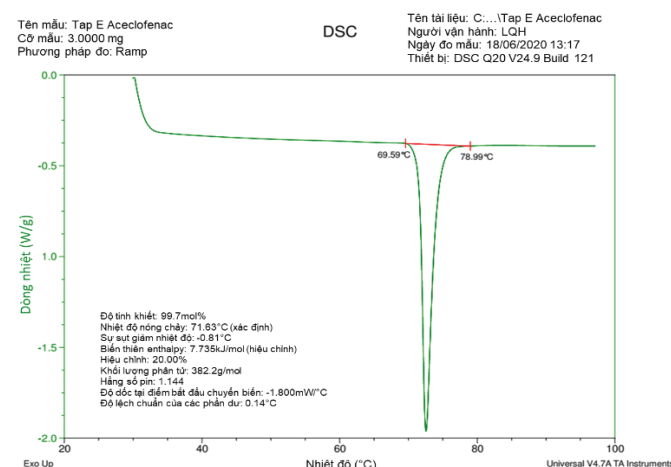
4.2. Tổng hợp và tinh chế aceclofenac benzyl ester

Tương tự như phản ứng tổng hợp tạp E, đây là phản ứng ester hóa nên tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng cũng ảnh hưởng đến hiệu suất và độ tinh khiết sản phẩm, do đó khảo sát các yếu tố ảnh hưởng như tỷ lệ mol giữa diclofenac sodium và benzyl 2-bromoacetate (tỷ lệ 1:1 đến 1:2,6); nhiệt độ phản ứng (30-70°C) và thời gian (từ 60-210 phút). Dựa vào đậm độ của vết được cho

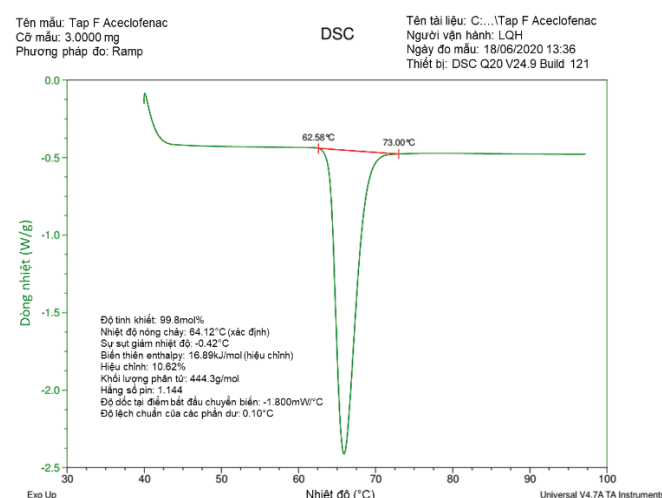
là sản phẩm cũng như sự xuất hiện các vết khác trên bản sắc ký lớp mỏng để xác định điều kiện tối ưu cho phản ứng và tinh chế. Điều kiện thích hợp cho phản ứng tổng hợp tạp F là tỷ lệ mol giữa diclofenac sodium và benzyl 2-bromoacetate là 1:2,2; ở nhiệt độ 50°C với thời gian 180 phút có hiệu suất là 66%.

4.3. Thử tinh khiết aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester tinh chế

Hòa tan tạp E và tạp F tinh chế trong methanol, triển khai sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Tạp E và tạp F tinh chế chỉ cho một vết duy nhất trên bản mỏng. Thử tinh khiết bằng phương pháp DSC, nhiệt độ nóng chảy của tạp E là 71,6°C, độ tinh khiết 99,7% và tạp F là 64,1°C với độ tinh khiết 99,8% (hình 1, 2).



Hình 1. Kết quả xác định nhiệt nóng chảy bằng DSC của aceclofenac ethyl ester.

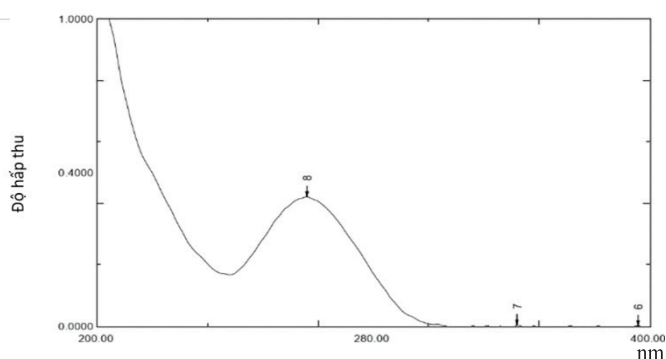


Hình 2. Kết quả xác định nhiệt nóng chảy bằng DSC của aceclofenac benzyl ester.

4.4. Xác định cấu trúc aceclofenac ethyl ester

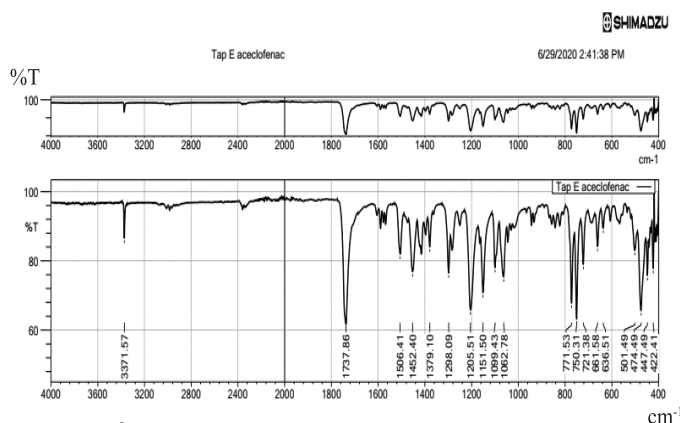
Phổ UV-Vis tạp E (pha trong acetonitrile, nồng độ 10 ppm) cho bước sóng hấp thụ cực đại tại 276 $\pm$ 2 nm (hình 3).

Dữ liệu: Tap E ACN 10 ppm_070452.spc – Dữ liệu thô



Hình 3. Phổ UV-Vis của aceclofenac ethyl ester.

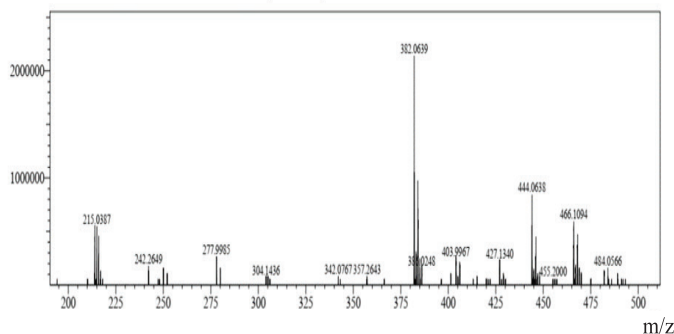
Phổ IR tap E có một số đỉnh đặc trưng: 3371,6 (N-H), 1737,9 (C=O ester), 1506,4; 1452,4 (C=C nhân thơm), 1298,1 (C-O acid), 1205,5; 1062,8 (C-O ester), 750,3 (C-Cl) (hình 4).



Hình 4. Phổ IR của aceclofenac ethyl ester.

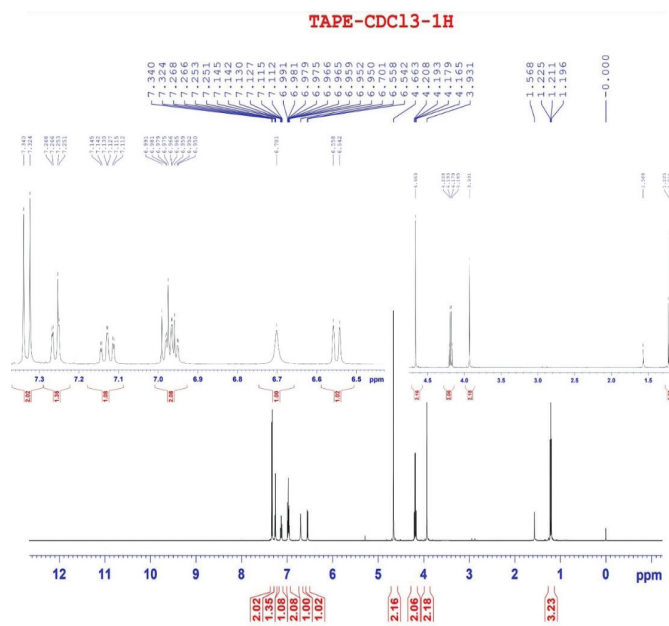
Phổ khối (ESI, m/z) $[M + H]^+$ tính toán 382,0613; $[M + H]^+$ tìm thấy 382,0639 (hình 5).

MSMS: Tiền chất m/z ----/+/Đỉnh chuẩn 382.06(2137844)



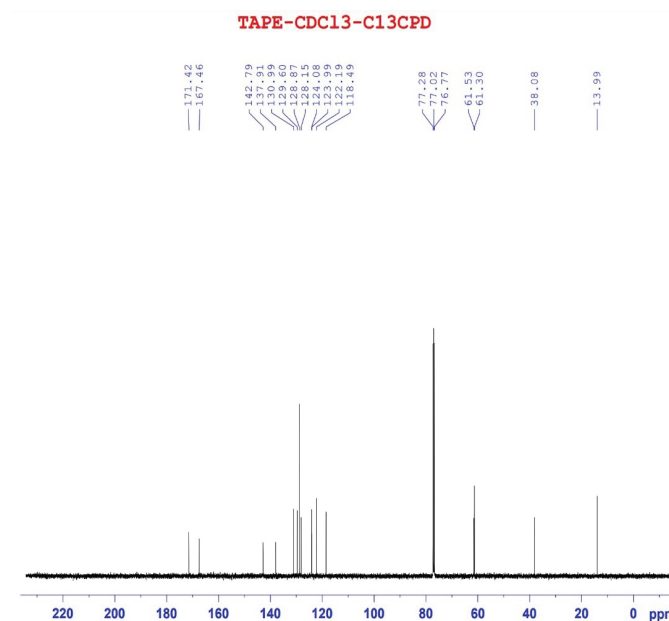
Hình 5. Phổ MS của aceclofenac ethyl ester.

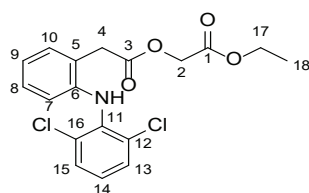
Phổ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,33 (d, 2H, $J=8,0$ Hz, H_{13} , H_{15}); 7,26 (dd, 1H, $J=1$ Hz; 7,5 Hz, H_{10}); 7,13 (td, 1H, $J=1,5$ Hz; 7,5 Hz, H_8); 6,98 (t, 1H, $J=8$ Hz, H_{14}); 6,97 (td, 1H, $J=1$ Hz; 7,25 Hz, H_9); 6,70 (s, 1H, -NH-); 6,55 (d, 1H, $J=8$ Hz, H_7); 4,66 (s, 2H, H_2); 4,19 (q, 2H, $J=7,5$ Hz, H_{17}); 3,93 (s, 2H, H_4); 1,21 (t, 3H, $J=7,0$ Hz, H_{18}) (hình 6).



Hình 6. Phổ ^1H NMR của aceclofenac ethyl ester.

Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 171,4; 167,5; 142,8; 137,9; 130,99; 129,6; 128,9; 128,2; 124,1; 124,0; 122,2; 118,5; 61,5; 61,3; 38,1; 13,99 (hình 7).



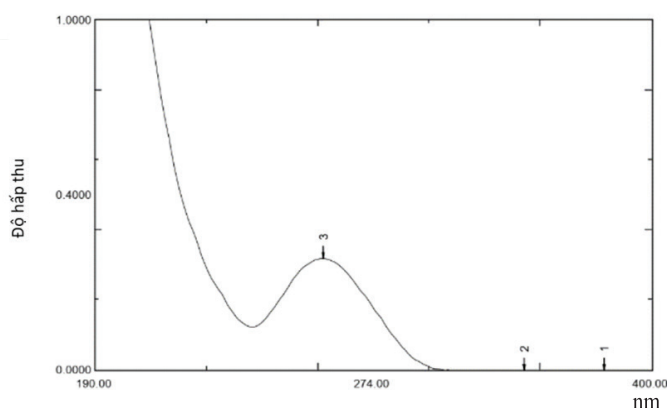


Hình 8. Công thức cấu tạo của aceclofenac ethyl ester.

4.5. Xác định cấu trúc aceclofenac benzyl ester

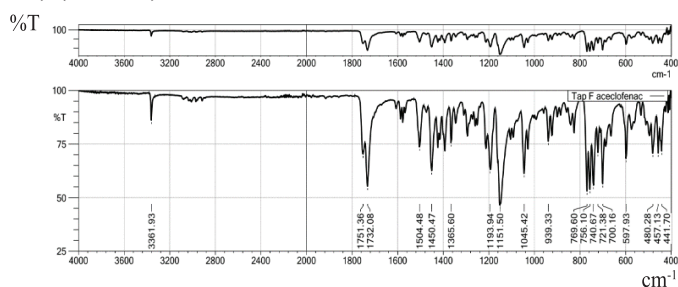
Phổ UV-Vis tập F (pha trong acetonitrile, nồng độ 10 ppm) cho bước sóng hấp thụ cực đại tại 276 ± 2 nm (hình 9).

Dữ liệu: Tap F ACN 10 ppm.spc – Dữ liệu thô



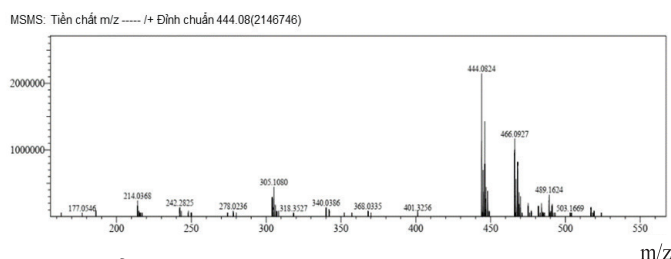
Hình 9. Phổ UV-Vis của aceclofenac benzyl ester.

Phổ IR tập F có một số đỉnh đặc trưng: 3361,9 (N-H), 1732,1 (C=O ester), 1504,5; 1450,5 (C=C nhân thơm), 1365,6 (C-O acid), 1193,9; 1151,5 (C-O ester), 756,1 (C-Cl) (hình 10).



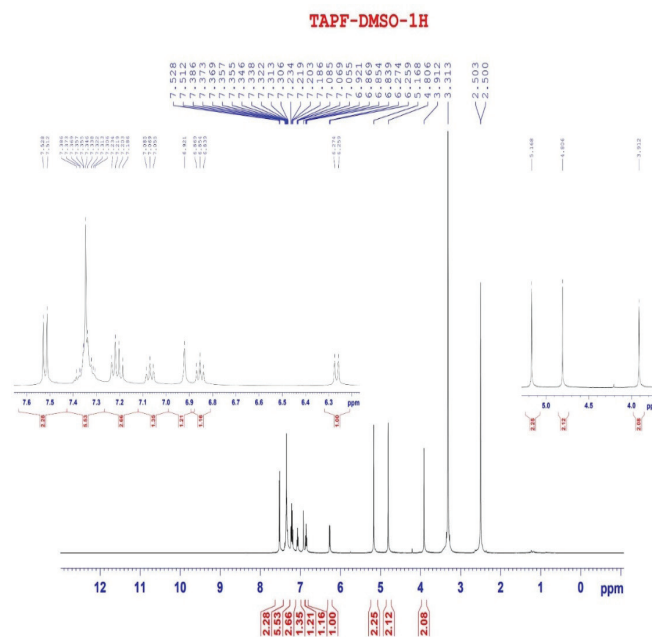
Hình 10. Phổ IR của aceclofenac benzyl ester.

Phổ khối (ESI, m/z) $[M + H]^+$ tính toán 444,0769; $[M + H]^+$ tìm thấy 444,0824 (hình 11).



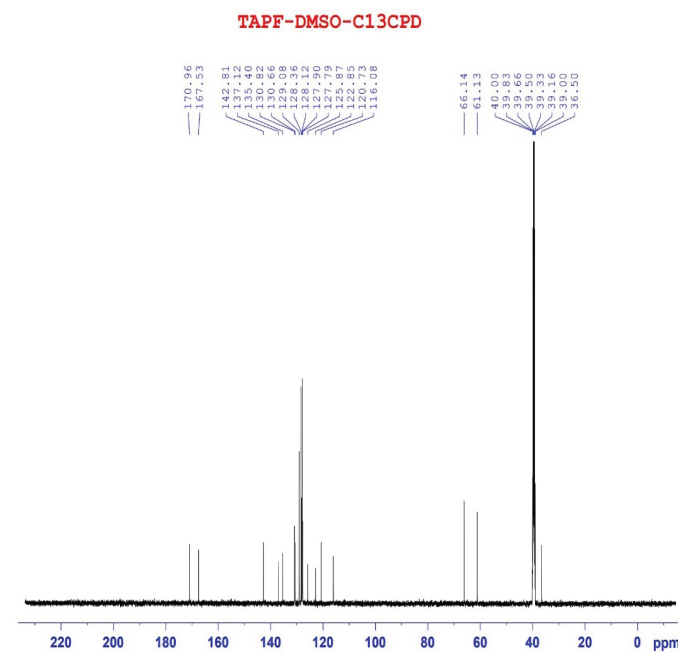
Hình 11. Phổ MS của aceclofenac benzyl ester.

Phổ ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7,52 (d, 2H, $J=8$ Hz, H_{13} , H_{15}); 7,30-7,39 (m, 5H; H_{19} , H_{20} , H_{21} , H_{22} , H_{23}); 7,23 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H_{10}); 7,22 (t, 1H, $J=8$ Hz, H_8); 7,09 (t, 1H, $J=8$ Hz, H_{14}); 6,92 (s, 1H, -NH-); 6,85 (t, 1H, $J=7,5$ Hz, H_9); 6,27 (d, 1H, $J=7,5$ Hz, H_7); 5,17 (s, 2H, H_{17}); 4,81 (s, 2H, H_2); 3,91 (s, 2H, H_4) (hình 12).



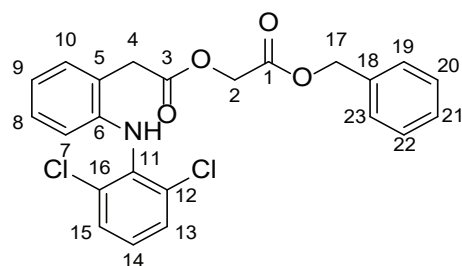
Hình 12. Phổ ^1H NMR của aceclofenac benzyl ester.

Phổ ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 171,0; 167,5; 142,8; 137,1; 135,4; 130,8; 130,7; 129,1; 128,3; 128,1; 127,9; 127,8; 125,9; 122,9; 120,7; 116,1; 66,1; 61,1; 36,5 (hình 13).



Hình 13. Phổ ^{13}C NMR của aceclofenac benzyl ester.

Các kết quả phổ nghiệm như MS tăng số khối phù hợp với phần thêm vào, ^1H NMR xuất hiện thêm 1 đỉnh đơn của nhóm methylen ($-\text{CH}_2$ (H_{17}) ở 5,17 ppm) và 5H ở vùng chuyển dịch của nhân thơm (7,30-7,39 ppm). ^{13}C NMR xuất hiện thêm 1 đỉnh của nhóm methylen ở 66,1 ppm so với aceclofenac, đồng thời đối chiếu với nghiên cứu tương tự trước đây cho thấy, sản phẩm phù hợp với cấu trúc của benzyl [[[2-[(2,6-diclorophenyl)amino]phenyl]acetyl]oxy]acetate (tạp F của aceclofenac) [7]. Chứng tỏ sản phẩm chính là tạp F của aceclofenac (hình 14).



Hình 14. Công thức cấu tạo của aceclofenac benzyl ester.

4.6. Xác định độ tinh khiết aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester bằng HPLC-PDA

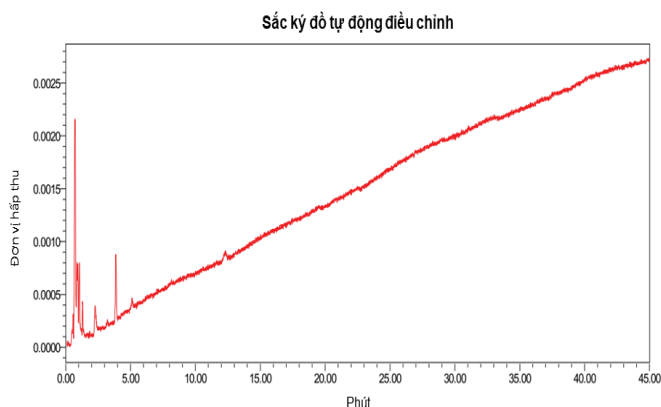
Xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F bằng HPLC-PDA, bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng.

Tính phù hợp hệ thống: RSD % của các thông số sắc ký đều nhỏ hơn 2,0% và hệ số bất đối của pic tạp E và tạp F nằm trong khoảng 0,8-1,5. Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F đạt tính phù hợp hệ thống (bảng 1).

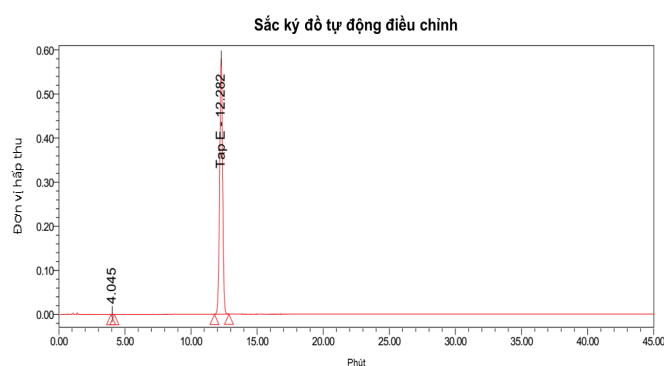
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của phương pháp (n=6).

	Giá trị thống kê	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ($\mu\text{V} \times \text{giây}$)	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết biểu kiến
Tạp E	Trung bình	12,295	8896554	1,0	15041
	RSD (%)	0,13	0,60	0,00	0,44
Tạp F	Trung bình	8,592	17338003	1,1	13640
	RSD (%)	0,05	1,18	0,00	0,30

Tính đặc hiệu: Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy sắc ký đồ (SKĐ) mẫu trắng và dung môi pha mẫu không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic tạp E và tạp F trong mẫu thử. Trên SKĐ mẫu thử, pic tạp E và tạp F tách hoàn toàn các pic tạp khác và các pic từ mẫu trắng và dung môi pha mẫu; pic tạp E và tạp F đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis. Như vậy, quy trình đạt yêu cầu về độ đặc hiệu (hình 15-22).

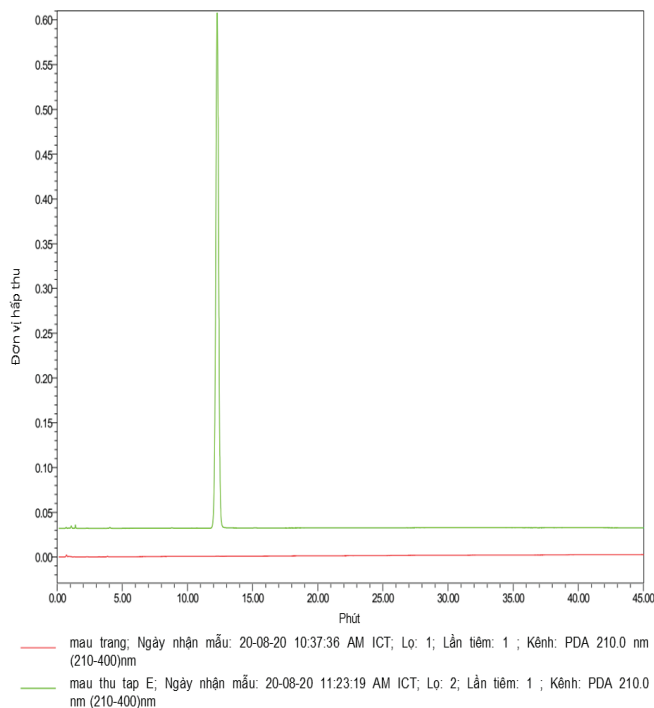


Hình 15. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu và pha động aceclofenac ethyl ester.

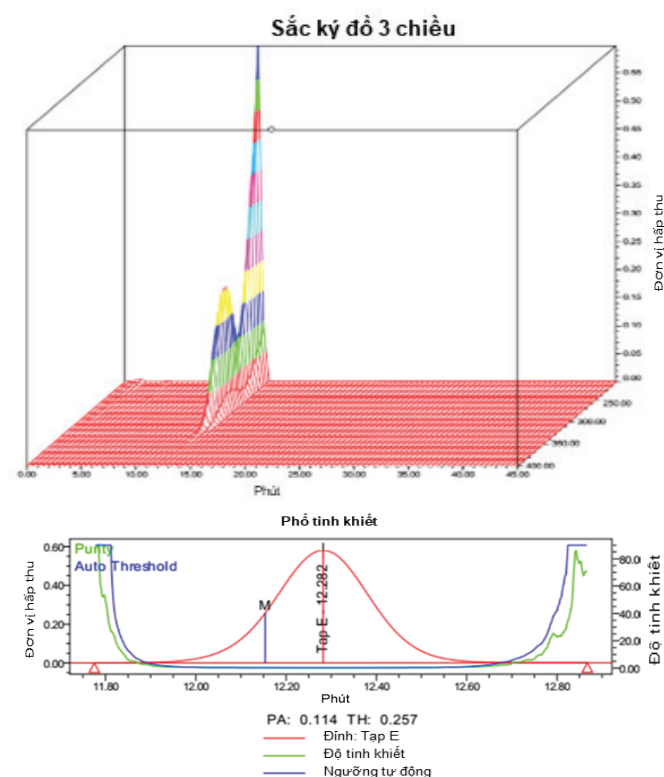


Kết quả									
Tên mẫu	Thời gian lưu	Góc tinh khiết	Ngưỡng tinh khiết	Diện tích	% Diện tích	Chiều cao	Yếu tố duy trì	Độ chọn lọc	Độ phân giải
1	4.045	13.912	20.027	5333	0.06	1089	1.5		
2 Tạp E	12.282	0.114	0.257	8901819	99.94	580260	6.7	4.4	31.4

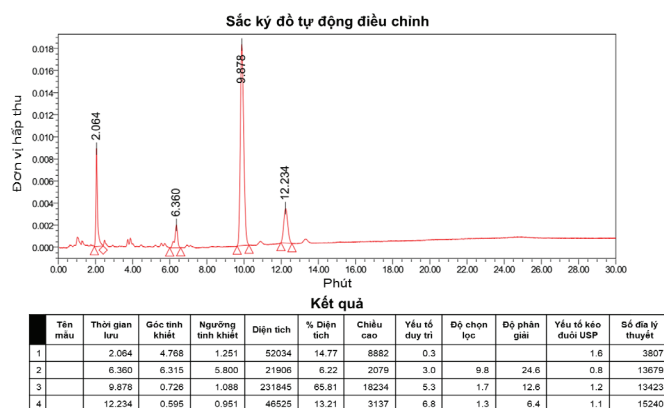
Hình 16. Sắc ký đồ mẫu thử aceclofenac ethyl ester.



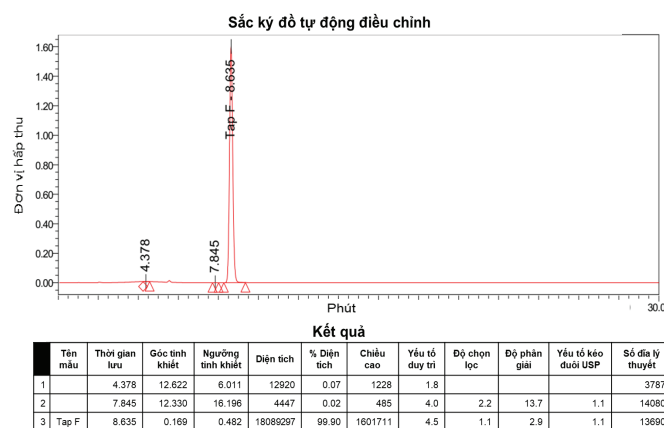
Hình 17. Sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu thử aceclofenac ethyl ester.



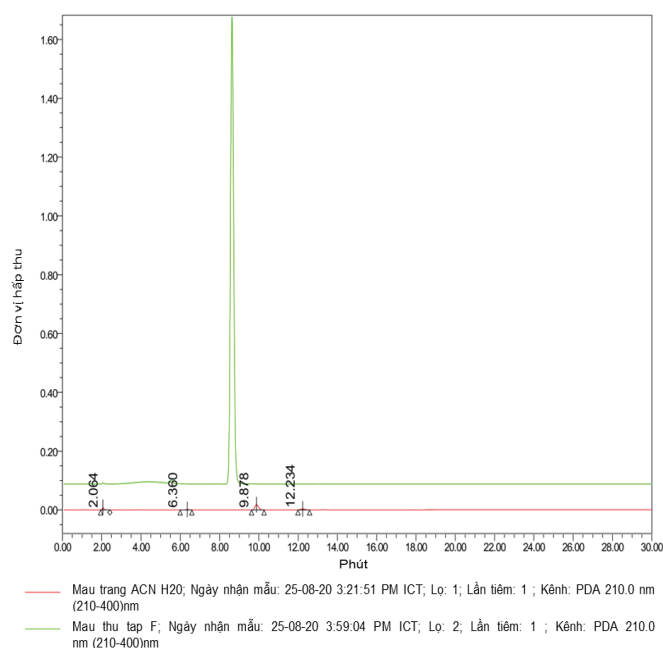
Hình 18. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic aceclofenac ethyl ester.



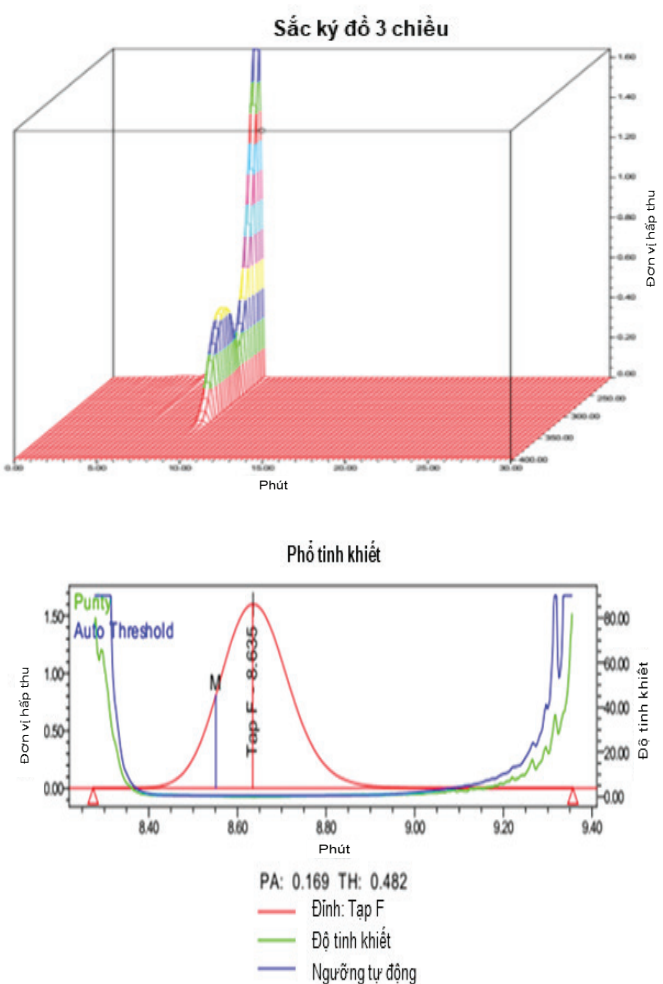
Hình 19. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu aceclofenac benzyl ester.



Hình 20. Sắc ký đồ mẫu thử aceclofenac benzyl ester.



Hình 21. Sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu thử aceclofenac benzyl ester.



Hình 22. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic aceclofenac benzyl ester.

Tính tuyến tính và khoảng giá trị: Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của tập E và tập F cho thấy giá trị R nằm trong khoảng 0,9995-1,0000. Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ tập E và tập F với diện tích pic.

Độ chính xác: Đạt độ chính xác RSD %=0,04% (tập E) và RSD=0,001% (tập F) với n=12.

Độ đúng: Đạt độ đúng với tỷ lệ phục hồi lần lượt là 100,37% (tập E) và 100,06% (tập F), đạt yêu cầu quy định 98,0-102,0%.

Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và độ chính xác.

	Tập E	Tập F
Phương trình hồi quy	$\hat{y}=42117,2x$	$\hat{y}=45696x$
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	50-300	50-500
Hệ số tương quan (R)	0,9999	0,9998
Độ chính xác (RSD, n=12, %)	0,04	0,001
Độ đúng (Tỷ lệ phục hồi, %)	100,37	100,06
Độ tinh khiết sắc ký	99,94%	99,90%

Kết quả bảng 2 cho thấy, quy trình xác định độ tinh khiết tập E, tập F bằng HPLC có tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác cao và khoảng tuyến tính rộng. Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký tập E và tập F theo phương pháp quy về 100% diện tích pic là trên 99,9% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

4.7. Xây dựng tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá chất lượng aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester

Tiêu chuẩn đánh giá và kết quả đánh giá tập E (bảng 3) và tập F (bảng 4) được tóm tắt như sau.

Bảng 3. Tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá aceclofenac ethyl ester.

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
	Cảm quan	Tinh thể hình kim màu trắng, không mùi	Đạt
Tính chất	Độ tan	Rất tan trong DMF, acetonitrile, chloroform; dễ tan trong dichloromethane, ethyl acetate, acetone; tan trong diethyl ether; hơi tan trong methanol; khó tan trong n-hexane, petroleum ether, ethanol; không tan trong nước	Đạt
Định tính	Phổ hồng ngoại	3371,6 (ν_{NH}); 1737,9 ($\nu_{\text{C=O}}$ ester); 1506,4; 1452,4 ($\nu_{\text{C=C}}$ nhân thơm); 1298,1 ($\nu_{\text{C-O}}$ acid); 1205,5; 1062,8 ($\nu_{\text{C-O}}$ ester); 750,3 ($\nu_{\text{C-Cl}}$)	Đúng
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ ^1H NMR; ^{13}C NMR	Đúng
Điểm chảy	DSC	70-72°C	Đạt 71,6°C
Hàm ẩm*	KF	$\geq 0,2\%$	Đạt (0,12%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 98,0\%$ tính trên chế phẩm nguyên trạng	Đạt (99,94%)

*: xác định theo Dược điển Anh; DSC: phân tích nhiệt quét vi sai; KF: Karl Fischer, HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Bảng 4. Tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá aceclofenac benzyl ester.

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
	Cảm quan	Tinh thể hình kim màu trắng, không mùi	Đạt
Tính chất	Độ tan	Rất tan trong DMF, acetonitrile, chloroform, dichloromethane; dễ tan trong ethyl acetate, acetone, diethyl ether; tan trong petroleum ether; hơi tan trong methanol; khó tan trong n-hexane, ethanol; không tan trong nước	Đạt
Định tính	Phổ hồng ngoại	3361,9 (ν_{NH}); 1732,1 ($\nu_{\text{C=O}}$ ester); 1504,5; 1450,5 ($\nu_{\text{C=C}}$ nhân thơm); 1365,6 ($\nu_{\text{C-O}}$ acid); 1193,9; 1151,5 ($\nu_{\text{C-O}}$ ester); 756,1 ($\nu_{\text{C-Cl}}$)	Đúng
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ ^1H NMR; ^{13}C NMR	Đúng
Điểm chảy	DSC	63-65°C	Đạt 64,1°C
Hàm ẩm*	KF	$\geq 0,2\%$	Đạt (0,16%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 98,0\%$ tính trên chế phẩm nguyên trạng	Đạt (99,90%)

*: xác định theo Dược điển Anh; DSC: phân tích nhiệt quét vi sai; KF: Karl Fischer, HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao.

5. Kết luận

Tập E và tập F đã được tổng hợp thành công bằng phản ứng ester hóa trong DMF từ nguyên liệu aceclofenac và diclofenac sodium với hiệu suất trung bình lần lượt khoảng 96 và 66%, đạt các tiêu chuẩn đánh giá chất lượng và có độ tinh khiết sắc ký trên 99,9% tính trên chế phẩm nguyên trạng, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của aceclofenac. Các chất đối chiếu này sẽ làm phong phú thêm ngân hàng tạp chuẩn quốc gia, giúp Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP Hồ Chí Minh dễ dàng cung cấp cho các công ty sản xuất dược phẩm trong nước có hoạt chất aceclofenac, chủ động trong việc kiểm tra thành phần tạp chất trong thành phẩm của mình với chi phí hợp lý thay vì phải mua tạp chuẩn từ các công ty cung cấp nước ngoài với chi phí cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] United Nations Economic Commission for Europe (2017), "Classification and labelling of chemicals - The new hazard labelling of chemicals", *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*, Seventh Revised Edition.
- [2] LGC Standards (2023a), *Safety Data Sheet-Aceclofenac Ethyl Ester*, pp.1-16.
- [3] LGC Standards (2023b), *Safety Data Sheet-Aceclofenac Benzyl Ester*, pp.1-15.
- [4] European Pharmacopoeia (2019), *Monographs: Aceclofenac*.
- [5] British Pharmacopoeia (2019), *Monographs: Aceclofenac*.
- [6] Biosynth (2023), <https://www.biosynth.com/category/iaceclofenac>, accessed 10 June 2023.
- [7] T.T. Le, T.Q.G. Nguyen, V.Q. Nguyen, et al. (2020), "Synthesize and purify impurity A of diclofenac to meet the quality standards used to establish impurities", *Journal of Drug Testing*, **18**(70), pp.18-26 (in Vietnamese).
- [8] P.L. Somashekar, S.Pai, G. Rao (2013), "Synthesis and characterization of specified impurities of aceclofenac", *Chemical Science Transactions*, **2**(3), pp.813-820.
- [9] M.D. White (2014), "An analytical profile of aceclofenac", *Microgram Journal*, **11**(1-4), pp.29-41.
- [10] International Conference on Harmonization (2005), *Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology*, pp.1-13.

Thực trạng và giải pháp thúc đẩy nông dân sản xuất cây ăn trái theo tiêu chuẩn VietGAP ở tỉnh Hậu Giang

Trần Quốc Nhân*

Trường Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 10/9/2022; ngày chuyển phản biện 12/9/2022; ngày nhận phản biện 26/9/2022; ngày chấp nhận đăng 7/10/2022

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân tích các nguyên nhân nông dân chưa chấp nhận áp dụng tiêu chuẩn thực hành sản xuất nông nghiệp tốt tại Việt Nam (VietGAP) vào sản xuất cây ăn trái ở tỉnh Hậu Giang. Số liệu thứ cấp được thu thập từ các báo cáo tổng kết của ngành nông nghiệp tỉnh Hậu Giang; trong khi đó số liệu sơ cấp được thực hiện thông qua phỏng vấn trực tiếp hộ nông dân. Nghiên cứu chủ yếu sử dụng phương pháp phân tích định tính và phương pháp thống kê mô tả. Những nguyên nhân chính làm cho các nhà vườn chưa áp dụng quy chuẩn VietGAP là do chi phí sản xuất VietGAP cao, giá bán sản phẩm VietGAP không chênh lệch so với sản phẩm thông thường và đầu ra sản phẩm VietGAP không ổn định. Quy trình kỹ thuật khó và phải thường xuyên ghi chép nhật ký sản xuất cũng là nguyên nhân chính làm người nông dân không áp dụng VietGAP. Các cơ quan quản lý nông nghiệp ở địa phương cần tăng cường tập huấn, nâng cao kiến thức, nhận thức của nông dân về VietGAP và tăng cường nối kết nhà vườn sản xuất VietGAP với thị trường.

Từ khóa: cây ăn trái, Hậu Giang, VietGAP.

Chỉ số phân loại: 4.1, 4.7

Current status and solutions to promote fruit-tree growers to adopt VietGAP standards in Hau Giang province

Quoc Nhan Tran*

Can Tho University, Campus 2, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 10 September 2022; revised 26 September 2022; accepted 7 October 2022

Abstract:

The aim of this study is to investigate why fruit-tree growers are not likely to adopt Vietnamese Good Agricultural Practices (VietGAP) standards in Hau Giang province. Secondary data were collected from the yearly report of the Hau Giang agricultural sector, while primary data were gathered by the household survey through face-to-face interviews. The qualitative approach and descriptive statistics were primarily used in the study. Results showed major causes, such as high production cost, the relatively low farm-gate price for VietGAP products, and an uncertain market for VietGAP products, which trigger fruit tree growers to be less motivated to adopt VietGAP standards in practice. Besides, complex components of techniques and writing farming diaries may also cause farmers to be unwilling to apply VietGAP standards. Accordingly, local authorities regarding the agricultural sector should place emphasis on training to raise farmers' awareness and knowledge of VietGAP and enhance the connection between VietGAP adopters and outlet markets.

Keywords: fruit tree, Hau Giang, VietGAP.

Classification numbers: 4.1, 4.7

*Email: tqnhan@ctu.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Kim ngạch xuất khẩu rau quả của Việt Nam đã đạt được giá trị lớn trong thời gian gần đây, năm 2021 đạt hơn 3,5 tỷ USD. Trung Quốc là thị trường xuất khẩu chính, mặc dù tỷ trọng năm 2021 chỉ còn chiếm 53,71%, trước đó, năm 2018 chiếm 73,07% tổng kim ngạch xuất khẩu ngành rau quả của cả nước [1]. Tuy nhiên, tỷ trọng xuất khẩu rau quả sang các nước EU, Hoa Kỳ, Nhật Bản và Hàn Quốc có xu hướng tăng. Đặc biệt là cơ hội xuất khẩu ngành hàng rau quả vào thị trường EU ngày càng lớn khi Hiệp định thương mại tự do giữa Việt Nam - EU (EVFTA) có hiệu lực vào ngày 1/8/2020, theo đó khoảng 94% dòng thuế nhóm hàng rau, quả tươi và chế biến được EU cắt giảm về 0%. Gần đây, Trung Quốc tăng cường kiểm soát việc nhập khẩu nông sản từ các nước. Từ ngày 01/01/2022, hàng hóa xuất khẩu sang Trung Quốc phải tuân thủ theo Lệnh 248 về “Quy định quản lý đăng ký doanh nghiệp sản xuất thực phẩm nước ngoài nhập khẩu” và Lệnh số 249 về “Biện pháp quản lý an toàn thực phẩm xuất nhập khẩu” của hải quan Trung Quốc.

Đây là cơ hội và cũng là thách thức đối với sản xuất của nông dân trong nước, đặc biệt nông dân ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), nơi cung cấp khoảng 70% sản lượng trái cây cho cả nước. Nông dân cần phải sản xuất theo quy chuẩn an toàn nhằm đáp ứng yêu cầu ngày càng khắt khe về chất lượng, độ an toàn và truy xuất nguồn gốc sản phẩm. Nhằm thúc đẩy nông dân sản xuất theo VietGAP, Bộ Khoa học và Công nghệ đã ban hành tiêu chuẩn VietGAP áp dụng trong lĩnh vực trồng trọt - TCVN 11892-1:2017 [2]. Tuy nhiên, việc triển khai áp dụng VietGAP vào sản xuất vẫn còn nhiều thách thức đối với nông dân. Nhiều mô hình thực nghiệm sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP thành công ở quy mô nhỏ nhưng khi nhân rộng thì thất bại vì đa số nông dân chưa chấp nhận áp dụng [3].

Cho đến thời điểm này chưa có nhiều công trình nghiên cứu làm sáng tỏ các vấn đề trên một cách khoa học. Mặc dù, trong thời gian qua đã có không ít nghiên cứu về các mô hình thực hành nông nghiệp tốt (GAP), tuy nhiên các nghiên cứu này thường tập trung phân tích khía cạnh lợi ích của mô hình mang lại. Nghiên cứu của V.T.N. Nhan (2014) [4] phân tích khía cạnh kinh tế và kỹ thuật của mô hình GAP mang lại cho nông dân trồng chôm chôm ở huyện Chợ Lách, tỉnh Bến Tre. Nghiên cứu của D.N. Thanh và cs (2014) [5] đánh giá hiệu quả tài chính của việc canh tác xoài theo quy trình GAP tại huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp. Nghiên cứu của T.V. Hau và cs (2008) [6] tập trung vào phân tích các yếu tố kỹ thuật có thể áp dụng vào quy trình GAP. Nghiên cứu của T.Q. Nhan và cs (2022) [7] sử dụng mô hình hồi quy nhị phân để xác định các yếu tố có ảnh hưởng đến việc áp dụng VietGAP của hộ trồng xoài.

Tóm lại, các nghiên cứu đã thực hiện chưa làm rõ được nguyên nhân nông dân chưa chấp nhận áp dụng quy trình VietGAP. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm làm rõ

vấn đề trên, thông qua trường hợp nghiên cứu tại tỉnh Hậu Giang. Hậu Giang nằm ở trung tâm vùng ĐBSCL, có điều kiện tự nhiên về đất đai và thổ nhưỡng phù hợp cho phát triển cây ăn trái. Diện tích cây ăn trái chiếm khoảng 30% diện tích đất nông nghiệp của tỉnh, sau diện tích đất lúa. Các loại cây ăn trái chủ lực của tỉnh như chanh không hạt, cam sành, bưởi, quýt, xoài và mít. Tuy nhiên, diện tích cây ăn trái sản xuất theo quy trình VietGAP chiếm chưa tới 1%.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp thu thập số liệu

Phương pháp chọn mẫu có chủ đích đã được áp dụng để chọn hộ trồng cây ăn trái không áp dụng tiêu chuẩn VietGAP. Những hộ này được lựa chọn thông qua sự giới thiệu của địa phương. Những hộ sẵn lòng hợp tác và trao đổi thông tin và có sự hiện diện của chủ hộ mới khảo sát. Trong thực tế, nhiều nông dân không muốn trả lời câu hỏi, hay có trường hợp chủ hộ đi vắng thì chúng tôi không tiến hành phỏng vấn. Hộ canh tác cây ăn trái chưa áp dụng tiêu chuẩn VietGAP được chọn để khảo sát phải cư ngụ trên cùng khu vực với nhà vườn đã và đang áp dụng tiêu chuẩn VietGAP, điều này nhằm đảm bảo tính tương đồng về điều kiện tự nhiên, kinh tế - xã hội với hộ áp dụng VietGAP. Mỗi khu vực có nhà vườn đã áp dụng VietGAP, chúng tôi chọn 15-20 hộ có canh tác cùng loại cây trồng nhưng không có áp dụng VietGAP để khảo sát. Chúng tôi khảo sát trên 5 nhóm hộ canh tác cây ăn trái khác nhau trên địa bàn tỉnh Hậu Giang.

Phương pháp thảo luận nhóm đã được áp dụng để xây dựng các tiêu chí về lý do nông dân chưa chấp nhận áp dụng VietGAP vào sản xuất. Thảo luận với 5 nhóm nông dân (5 người/nhóm) tương ứng với 5 nhóm cây ăn trái (bảng 1) được thực hiện để xác định các lý do nông dân không áp dụng VietGAP. Sau đó, các tiêu chí này được sử dụng vào bảng hỏi để mỗi nông dân đánh giá mức độ quan trọng của từng nguyên nhân thông qua thang đo Likert 5 mức độ (1: hoàn toàn không đồng ý và 5: hoàn toàn đồng ý). Bên cạnh đó, phỏng vấn KIP (Key informant panel) với 10 cán bộ phụ trách VietGAP ở địa phương (cán bộ khuyến nông cấp huyện và tỉnh, cán bộ chi cục trồng trọt và bảo vệ thực vật) nhằm phân tích nguyên nhân nông dân chưa chấp nhận áp dụng VietGAP.

Bảng 1. Cơ cấu mẫu khảo sát.

Thứ tự	Đối tượng	Số mẫu
1	Hộ canh tác chanh không hạt	60
2	Hộ canh tác bưởi	40
3	Hộ canh tác cam	15
4	Hộ canh tác quýt	15
5	Hộ canh tác xoài	20
Tổng		150

2.2. Phương pháp phân tích số liệu

Phương pháp phân tích định tính chủ yếu được sử dụng để phân tích những nguyên nhân nông hộ canh tác cây ăn trái chưa chấp nhận áp dụng tiêu chuẩn VietGAP vào sản xuất.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thực trạng sản xuất cây ăn trái theo quy trình VietGAP ở tỉnh Hậu Giang

Kết quả tổng hợp số liệu từ báo cáo của ngành nông nghiệp tỉnh Hậu Giang cho thấy, chỉ có 256 hộ canh tác cây ăn trái đạt chứng nhận VietGAP với diện tích khoảng 297 ha, chỉ chiếm khoảng 0,71% diện tích cây ăn trái của toàn tỉnh, với sản lượng khoảng 6.369 tấn/năm (bảng 2). Phần lớn diện tích cây ăn trái đạt chứng nhận VietGAP đều được thực hiện dưới dạng mô hình hay dự án của ngành nông nghiệp (khuyến nông) và các dự án khoa học và công nghệ, có sự hỗ trợ kinh phí cho nông dân từ nguồn ngân sách nhà nước. Các hộ được chứng nhận chủ yếu theo hình thức tập thể như thông qua hợp tác xã, tổ hợp tác hay câu lạc bộ khuyến nông. Tuy nhiên, cũng có 2 hộ dân sản xuất sầu riêng đạt chứng nhận VietGAP với diện tích 3 ha là không có sự hỗ trợ của nhà nước, tự thực hiện bằng nguồn kinh phí của nông hộ.

Một điều đáng quan tâm, hầu hết các diện tích được chứng nhận VietGAP sau khi hết thời gian hiệu lực đều không được chứng nhận lại (thời gian chứng nhận có giá trị trong 3 năm) và chỉ có một trường hợp (hợp tác xã) thực hiện tái chứng nhận được một lần. Nguyên nhân là do chi phí chứng nhận tốn kém, nông dân không muốn chi một số tiền lớn của cá nhân mình để thuê tái chứng nhận, sau khi đã kết thúc mô hình hay dự án và không còn sự hỗ trợ kinh phí của Nhà nước. Một nguyên nhân khác có thể do việc sản xuất theo quy chuẩn GAP chưa mang lại kết quả như kỳ vọng nên nông dân không muốn tiếp tục tái chứng nhận sau khi mô hình hay dự án kết thúc.

Qua đây cho thấy tính lan tỏa của các mô hình thực hiện VietGAP được sự hỗ trợ của Nhà nước rất thấp. Phần lớn nông dân không duy trì áp dụng và tái chứng nhận, điều này có thể tác động đến những nông dân xung quanh trong việc có áp dụng hay không. Kết quả này cũng ngụ ý rằng, cách tiếp cận Nhà nước hỗ trợ trong thời gian qua đem lại tính lan tỏa và thay đổi nhận thức của nông dân về sản xuất theo quy chuẩn an toàn và được công nhận. Các cơ quan nông nghiệp nên thay đổi cách tiếp cận theo hướng thị trường và cần kết nối nông dân với những người mua có nhu cầu đặt hàng VietGAP trong thời gian dài (có thể từ 3 năm trở lên).

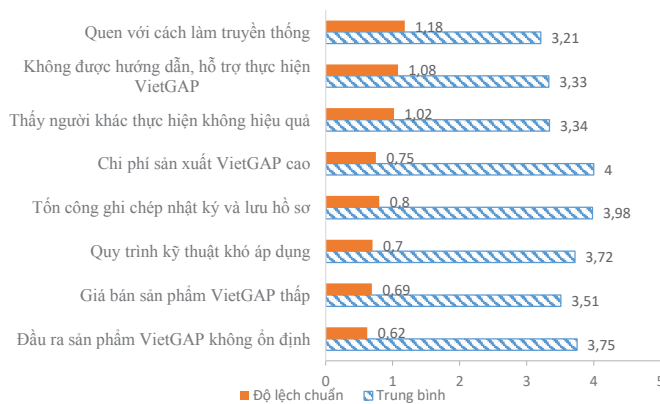
Bảng 2. Danh sách chứng nhận VietGAP cây ăn trái trên địa bàn tỉnh Hậu Giang.

Thứ tự	Địa điểm	Cây trồng	Số hộ	Diện tích (ha)	Sản lượng (tấn)	Thời điểm chứng nhận	Hiệu lực chứng nhận
1	Hợp tác xã Thanh Phước, xã Đông Thanh, huyện Châu Thành	Chanh không hạt	23	30	510	2010	Hết hạn
2	Ấp Bào Môn, xã Hòa An, huyện Phụng Hiệp	Chanh không hạt	2	6	180	6/2020	Còn hạn
3	Hợp tác xã trái cây sinh học OCOP, thị trấn Ngã Sáu, huyện Châu Thành	Chanh không hạt	10	29,4	1.700	11/2020	Còn hạn
4	Câu lạc bộ Khuyến nông Phú Trí A, xã Phú Tân, huyện Châu Thành	Bưởi Năm Roi	68	57	675	2012	Hết hạn
5	Câu lạc bộ Khuyến nông Phú Lễ, xã Phú Tân, huyện Châu Thành	Bưởi Năm Roi	21	20	300	2014	Hết hạn
6	Hợp tác xã Tiến Nông, xã Vĩnh Viễn, huyện Long Mỹ	Bưởi da xanh	21	21,65	433	10/2020	Còn hạn
7	Tổ hợp tác cam sành Tân Thành, xã Tân Thành, thị xã Ngã Bảy	Cam sành	14	15	375	12/2013	Hết hạn
8	Hợp tác xã Năm Nhi, xã Đông Phước, huyện Châu Thành	Cam sành	31	54,5	981	2019	Còn hạn
9	Hợp tác xã cam xoàn Phương Phú, xã Phương Phú, huyện Phụng Hiệp	Cam xoàn	23	20,4	510	6/2016	Hết hạn
10	Hợp tác xã quýt đường Long Trị, xã Long Trị, thị xã Long Mỹ	Quýt đường	20	18	500	4/2014 10/2017	Hết hạn
11	Hợp tác xã xoài Bảy Ngàn, thị trấn Bảy Ngàn, huyện Châu Thành A	Xoài cát Hoà Lộc	22	21,95	175	02/2015	Hết hạn
12	Hộ Nguyễn Hiền Mẫn và Nguyễn Văn Ánh, xã Long Bình, huyện Long Mỹ	Sầu riêng	2	3	30	4/2017	Hết hạn
Tổng			256	297	6.369		

Nguồn: Kết quả tổng hợp của tác giả năm 2021.

3.2. Nguyên nhân nông hộ chưa chấp nhận áp dụng VietGAP vào canh tác xoài

Theo quan điểm của người nông dân: Qua kết quả thảo luận nhóm nông dân, chúng tôi xác định được 4 nhóm nguyên nhân (thông qua 8 tiêu chí) làm cho nhà vườn chưa chấp nhận áp dụng VietGAP vào sản xuất. Sau khi xác định được các nguyên nhân chung, chúng tôi sử dụng 8 tiêu chí (lý do) này để nông dân đánh giá thông qua thang đo Likert 5 mức độ. Chi tiết kết quả đánh giá các nguyên nhân được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Nguyên nhân nông dân chưa chấp nhận áp dụng quy chuẩn VietGAP. Nguồn: Tác giả phân tích, n=150.

Nhóm nguyên nhân thứ nhất có liên quan đến các tiêu chuẩn về kỹ thuật sản xuất. Tiêu chuẩn VietGAP đặt ra những yêu cầu cụ thể về kỹ thuật cho từng khâu trong quá trình sản xuất, sơ chế sản phẩm trồng trọt, bao gồm: đánh giá và lựa chọn vùng sản xuất; giống; quản lý đất và giá thể; phân bón và chất phụ gia; nước tưới cho cây trồng; nông dược; thu hoạch và xử lý sau thu hoạch; quản lý và xử lý chất thải; an toàn lao động; ghi chép, lưu trữ hồ sơ, truy xuất nguồn gốc và thu hồi sản phẩm; kiểm tra nội bộ; khiếu nại và giải quyết khiếu nại (theo tiêu chuẩn TCVN11892-1:2017). Nông dân được khảo sát cho rằng quy trình VietGAP khó áp dụng và phức tạp, phải tuân thủ theo nhiều tiêu chí quy định bắt buộc (giá trị trung bình 3,72). Ngoài ghi chép nhật ký sản xuất hằng ngày, nông dân còn giữ quy tắc vệ sinh chung, vệ sinh kỹ dụng cụ sản xuất, thu gom chai lọ đựng thuốc bảo vệ thực vật, xây dựng nhà vệ sinh tự hoại. Qua khảo sát nông dân còn cho rằng, việc ghi chép nhật ký sản xuất hằng ngày và lưu hồ sơ sẽ khó thực hiện trong thực tế với nông dân (giá trị trung bình 3,98). Do đặc thù nghề nông, công việc mệt nhọc cùng với trình độ học vấn thấp, nông dân thường lớn tuổi, quen với sản xuất tự do không có ghi chép nên người dân cảm thấy không thực hiện được việc thường xuyên ghi chép lại các công việc hằng ngày trong quá trình canh tác xoài như loại phân bón, loại thuốc nông dược, ngày bón phân cũng như ngày phun thuốc... Qua

khảo sát cho thấy, người dân có ý thức về lợi ích của việc áp dụng tiêu chuẩn VietGAP, nhưng họ chưa quen công việc ghi chép “nhật ký nhà nông”, đây là một trong những tiêu chí quan trọng trong quy trình VietGAP, nhằm đảm bảo việc truy xuất nguồn gốc sản phẩm.

Nhóm nguyên nhân thứ hai có liên quan đến chi phí sản xuất. Nông dân được khảo sát tin rằng, việc sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP sẽ làm tăng chi phí so với sản xuất theo truyền thống. Đây là nguyên nhân quan trọng nhất trong số các nguyên nhân nông hộ không muốn sản xuất theo quy chuẩn VietGAP (giá trị trung bình 4). Như được đề cập, việc áp dụng tiêu chuẩn VietGAP phải tuân thủ theo quy trình kỹ thuật sản xuất nghiêm ngặt về an toàn như phải sử dụng thêm phân hữu cơ, thuốc sinh học, phải có nhà kho để phân bón và thuốc bảo vệ thực vật, dụng cụ bảo hộ lao động... do đó có thể làm tăng chi phí sản xuất cho nông dân. Các kết quả nghiên cứu của P.T. Dinh và cs (2020) [8], B.X. Nha và cs (2020) [9], D.N. Thanh và cs (2014) [5] cho thấy việc sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP làm tăng chi phí sản xuất của nông dân.

Nhóm nguyên nhân thứ ba là về đầu ra sản phẩm đạt chuẩn VietGAP. Nông dân đề cập đến 2 vấn đề chính liên quan đến thị trường là đầu ra sản phẩm VietGAP không ổn định và giá bán sản phẩm đạt chuẩn VietGAP không chênh lệch đáng kể so với giá sản phẩm sản xuất theo quy trình thông thường của nông dân. Các sản phẩm đạt chuẩn VietGAP có thể chưa được người mua tin tưởng về chất lượng nên chưa sẵn lòng để mua giá cao. Nông dân được khảo sát cho rằng, họ không muốn sản xuất theo quy chuẩn VietGAP là do đầu ra thị trường không ổn định (giá trị trung bình 3,75) và giá bán sản phẩm VietGAP thấp (giá trị trung bình 3,51). Kết quả khảo sát của T.Q. Nhan (2021) [10] cho thấy, giá bán xoài đạt chuẩn VietGAP không có sự khác biệt lớn so với xoài sản xuất theo quy trình bình thường của nông dân là nguyên nhân cốt lõi làm nông dân không tiếp tục duy trì áp dụng tiêu chuẩn VietGAP.

Nhóm nguyên nhân thứ tư có liên quan đến đặc điểm của nông dân như sự hiểu biết và nhận thức về VietGAP. Nông dân cho rằng, qua quan sát những hộ đang áp dụng quy trình VietGAP thấy hiệu quả sản xuất không cao so với sản xuất theo quy trình bình thường. Chẳng hạn, chi phí sản xuất theo VietGAP cao nhưng giá bán sản phẩm lại không cao, người sản xuất phải áp dụng quy trình kỹ thuật và ghi chép nhật ký sản xuất một cách nghiêm ngặt. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, nông dân chưa được tiếp cận hỗ trợ, trao đổi và hướng dẫn áp dụng tiêu chuẩn VietGAP nên chưa dám áp dụng. Nông dân không muốn áp dụng quy trình VietGAP vì đã quen với kỹ thuật và kinh nghiệm lâu nay trong canh tác nên chưa sẵn sàng để thay đổi, do không biết khi áp dụng VietGAP có đạt kết quả cao hơn hay không (hình 1).

Nhìn chung, có nhiều nguyên nhân làm nông dân chưa có động lực để áp dụng quy trình VietGAP vào canh tác cây ăn trái. Các nguyên nhân chủ yếu là chi phí sản xuất VietGAP cao do phải đầu tư một số hạng mục công trình như nhà kho, nhà vệ sinh tự hoại, thường xuyên ghi chép nhật ký sản xuất, quy trình kỹ thuật khó áp dụng, trong khi đó đầu ra cho sản phẩm VietGAP không ổn định và giá bán không chênh lệch nhiều so với sản xuất theo truyền thống.

Theo quan điểm của cán bộ ngành nông nghiệp: Qua kết quả phỏng vấn KIP với cán bộ khuyến nông, cán bộ ngành bảo vệ thực vật cấp huyện và tỉnh cho thấy có năm nguyên nhân cơ bản làm nông dân chưa có động lực để áp dụng VietGAP vào sản xuất cây ăn trái như sau:

Nông dân gặp khó khăn trong quá trình ghi chép nhật ký sản xuất (yêu cầu bắt buộc). Đánh giá này cũng phù hợp với quan điểm của nông dân là họ cảm thấy không quen với việc ghi chép nhật ký sản xuất cũng như việc lưu giữ hồ sơ, giấy tờ có liên quan trong quá trình sản xuất.

Nhiều nông dân chưa nhận thức được lợi ích lâu dài khi áp dụng quy trình VietGAP vào sản xuất. Không ít nông dân lớn tuổi, trình độ học vấn thấp nên đôi khi còn ngại áp dụng những kỹ thuật hay quy trình sản xuất mới.

Một lý do khác cũng khá quan trọng là giá bán sản phẩm đạt chuẩn VietGAP và sản phẩm thông thường chưa có sự khác biệt nhiều nên chưa tạo động lực cho nông dân áp dụng quy chuẩn VietGAP vào sản xuất. Qua phân tích ý kiến của cán bộ nông nghiệp cho thấy chưa có nhiều doanh nghiệp tham gia thực hiện việc liên kết bao tiêu sản phẩm VietGAP cho nông dân. Đây có thể là một trong những lý do làm cho giá bán giữa sản phẩm đạt chuẩn VietGAP và thông thường không chênh lệch nhiều, do nông dân vẫn bán sản phẩm VietGAP qua thương lái, trong khi thương lái ít có sự phân biệt giá mua giữa sản phẩm VietGAP và sản phẩm thông thường.

Chi phí chứng nhận đạt chuẩn VietGAP còn cao cũng được xem là một trong những nguyên nhân làm nông dân chưa có động lực để áp dụng tiêu chuẩn VietGAP. Hiện nay, để chứng nhận sản xuất đạt chuẩn VietGAP, nông dân phải thuê công ty để tư vấn, đánh giá, cấp giấy chứng nhận và tốn chi phí khá cao. Tuy nhiên, giấy chứng nhận VietGAP chỉ có giá trị trong thời gian 3 năm; sau khi hết hiệu lực, nông dân phải thuê công ty để tái chứng nhận lại. Kết quả khảo sát cũng cho thấy, các mô hình sản xuất đạt chuẩn VietGAP của nông dân ở tỉnh Hậu Giang được hỗ trợ từ các dự án của ngành nông nghiệp và từ các dự án khoa học công nghệ nên hầu hết người dân được hỗ trợ chi phí chứng nhận lần đầu.

Nguyên nhân cuối cùng nhưng cũng khá quan trọng là thiếu đội ngũ tư vấn, giám sát, hướng dẫn thường xuyên cho nông dân trong quá trình áp dụng quy trình VietGAP. Phần lớn nông dân thường ngại và chậm áp dụng quy trình kỹ thuật sản xuất mới do sợ rủi ro so với cách làm của mình. Do đó, đội ngũ cán bộ tư vấn, hướng dẫn khi nông dân áp dụng quy trình VietGAP sẽ là nhân tố quan trọng giúp nông dân tự tin hơn và mạnh dạn áp dụng.

Qua phân ý kiến của cán bộ nông nghiệp ở địa phương cho thấy hai nguyên nhân trùng với đánh giá của nông dân là khó khăn trong việc ghi chép nhật ký sản xuất và giá bán sản phẩm VietGAP chưa có sự khác biệt lớn với sản phẩm sản xuất theo quy trình truyền thống

3.3. Giải pháp thúc đẩy nhà vườn áp dụng tiêu chuẩn VietGAP

Nhà vườn cần mạnh dạn thay đổi tư duy sản xuất, chủ động áp dụng những tiến bộ khoa học kỹ thuật hay các quy trình sản xuất mới vào trong thực tế sản xuất của mình để tạo ra những sản phẩm an toàn hơn, cạnh tranh tốt hơn trong bối cảnh hội nhập kinh tế quốc tế ở nước ta hiện nay. Việt Nam đã ký nhiều hiệp định thương mại tự do với các nước, tạo cơ hội lớn cho việc xuất khẩu nông sản của nước nhà, tuy nhiên nông sản của ta cũng phải cạnh tranh với nông sản ngoại nhập có chất lượng cao và giá rẻ ở ngay thị trường nội địa.

Cán bộ nông nghiệp ở địa phương cần theo dõi và hỗ trợ nông dân trong quá trình sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP, đặc biệt về quy trình kỹ thuật và khâu ghi chép nhật ký sản xuất. Đây là một quá trình lâu dài để giúp nông dân thay đổi dần thói quen sản xuất tự do sang thói quen sản xuất theo quy chuẩn, có tính trách nhiệm và kỷ luật cao.

Ngành nông nghiệp cần tăng cường công tác tập huấn nâng cao năng lực áp dụng quy trình VietGAP cho người dân, từ đó giúp nông dân dễ dàng hơn trong việc tiếp cận và áp dụng vào thực tế, giảm chi phí sản xuất theo quy chuẩn VietGAP. Cần tăng cường công tác thông tin tuyên truyền về những lợi ích của việc áp dụng quy chuẩn VietGAP vào sản xuất, qua đó giúp nông dân thay đổi thói quen sản xuất và nâng cao nhận thức sản xuất an toàn nông sản, an toàn sức khỏe cho chính người nông dân và người tiêu dùng và góp phần bảo vệ môi trường.

Các cơ quan nông nghiệp ở địa phương cần tăng cường làm cầu nối giữa nông dân với các doanh nghiệp thu mua trái cây trong việc tiêu thụ sản phẩm đạt chuẩn VietGAP, thúc đẩy việc ký hợp đồng tiêu thụ sản phẩm VietGAP giữa đại diện nông dân (hợp tác xã, tổ hợp tác) với các đơn vị kinh doanh và xuất khẩu trái cây hay với các nhà bán lẻ hiện

đại. Qua đó, giúp nông dân sản xuất theo chuẩn VietGAP có thị trường đầu ra ổn định lâu dài. Nhà nước cần ban hành chính sách khuyến khích các doanh nghiệp, nhà bán buôn tham gia phân phối và tiêu thụ sản phẩm đạt chuẩn VietGAP. Thông qua kênh phân phối và bán buôn này sẽ giúp duy trì được chất lượng và uy tín của các sản phẩm đạt chuẩn VietGAP đối với người tiêu dùng.

Các cơ quan nông nghiệp ở địa phương cần thay đổi cách tiếp cận nông dân trong việc thúc đẩy áp dụng VietGAP. Cần chuyển từ cách tiếp cận cung (Nhà nước áp đặt nông dân áp dụng) sang cách tiếp cận cầu (theo nhu cầu của người tiêu dùng hay người mua) để sản xuất theo chuẩn VietGAP và cần thúc đẩy hợp tác lâu dài giữa nông dân sản xuất VietGAP và nhà thu mua thông qua sản xuất theo hợp đồng.

4. Kết luận và hàm ý chính sách

Những nguyên nhân chủ yếu làm các nhà vườn không có động lực để áp dụng tiêu chuẩn VietGAP vào sản xuất do chi phí sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP cao, giá bán sản phẩm VietGAP không chênh lệch đáng kể so với sản xuất theo phương thức của nông dân, đầu ra sản phẩm VietGAP không ổn định. Một số lý do khác làm nông dân chưa thật sự có động lực để áp dụng VietGAP như quy trình kỹ thuật khó áp dụng và phải ghi chép nhật ký sản xuất thường xuyên.

Kết quả nghiên cứu đã giúp các nhà quản lý, hoạch định chính sách về nông nghiệp hiểu rõ hơn về nguyên nhân cơ bản làm nông dân chưa muốn áp dụng quy trình VietGAP vào sản xuất, qua đó giúp xây dựng những chính sách phù hợp hơn. Kết quả nghiên cứu còn bổ sung thêm vào nguồn tài liệu tham khảo về chủ đề VietGAP cho các nhà nghiên cứu, đặc biệt chú trọng đến khả năng chấp nhận áp dụng của người nông dân.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chỉ phân tích ở khía cạnh của nông dân và cán bộ nông nghiệp ở địa phương mà chưa có phân tích đánh giá từ người thu mua như thương lái hay doanh nghiệp cũng như người tiêu dùng về nhu cầu tiêu thụ sản phẩm VietGAP. Những thuận lợi và khó khăn của người mua đối với sản phẩm trái cây VietGAP cũng chưa được đánh giá. Đây có thể xem là những hạn chế của nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Huyen (2022), "Decreased export to China, fruits and vegetables export increased to the United States", *Finance Journal*, <https://tapchitaichinh.vn/tai-chinh-kinh-doanh/giam-dan-o-trung-quoc-rau-qua-viet-nam-tang-sang-my-348566.html>, accessed 3 June 2022 (in Vietnamese).
- [2] Ministry of Science and Technology (2017), *TCVN 11892-1:2017 - Good Agricultural Practices for Vietnam (VietGAP) - Part I: Crop Production*, <https://vanbanphapluat.co/tcvn-11892-1-2017-thuc-hanh-nong-nghiep-tot-vietgap-phan-1-trong-trot>, accessed 4 April 2022 (in Vietnamese).
- [3] T. Nguyen (2015), "When farmers want to apply VietGAP standards", <https://bnews.vn/khi-nong-dan-chua-muon-san-xuat-theo-viet-gap/350.html>, accessed 10 May 2022 (in Vietnamese).
- [4] V.T.N. Nhan (2014), "Analysis on rambutan production under Global GAP standards in Ben Tre province", *Cantho University Journal of Science*, **32**, pp.69-75 (in Vietnamese).
- [5] D.N. Thanh, N.V. Phong (2014), "Assessment of financial efficiency of two models of Cat mango production in Dong Thap", *Cantho University Journal of Science*, **33**, pp.1-10 (in Vietnamese).
- [6] T.V. Hau, T.S. Hieu, L.T.T. Thuy (2008), "Mango production under VietGAP standards in Cao Lanh district, Dong Thap province", Presentation at GAP workshop in Binh Thuan (in Vietnamese).
- [7] T.Q. Nhan, L.H. Phuc, N.V. Nay, et al. (2022), "Factors affecting mango growers' adoption of VietGAP standards in the Mekong delta", *HCMCOUJS - Economics and Business Administration*, **17**, pp.152-163, DOI: 10.46223/HCMCOUJS (in Vietnamese).
- [8] P.T. Dinh, P.V. Hung, N.V. Huong (2020), "Development of lychee production under VietGAP standards in Bac Giang province", *Vietnam Journal of Agricultural Science*, **17**, pp.754-763 (in Vietnamese).
- [9] B.X. Nha, N.N. Thuy, L.T.M. Thu, et al. (2020), "Factors affecting VietGAP standards adoption in tea fresh bud in Lam Dong province", *Journal of Agriculture and Rural Development*, **387**, pp.125-131 (in Vietnamese).
- [10] T.Q. Nhan (2021), "VietGAP standards application: Obstacles and challenges to mango growers in the Mekong delta", *Review of Regional Sustainable Development*, **11**, pp.49-58 (in Vietnamese).

Chọn lọc cây trội Thanh mai (*Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don) với mục tiêu lấy quả tại huyện Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh

Lê Đức Thắng*

Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ, 70 Trần Hưng Đạo, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 24/10/2023; ngày chuyển phản biện 28/10/2023; ngày nhận phản biện 19/11/2023; ngày chấp nhận đăng 22/11/2023

Tóm tắt:

Chọn lọc cây trội là một trong những khâu quan trọng trong công tác chọn giống cây lâm nghiệp. Trong nghiên cứu này, đã lựa chọn ngẫu nhiên và đánh giá 18 mô hình trồng Thanh mai lấy quả ở các độ tuổi từ 5 đến 28 năm. Kết quả cho thấy, lượng tăng trưởng bình quân chung về đường kính, chiều cao, đường kính tán, chiều dài tán và năng suất quả có sự khác nhau rõ rệt giữa các mô hình trồng Thanh mai. Trên cơ sở đánh giá các tiêu chí về năng suất quả và các chỉ tiêu sinh trưởng, kết hợp phương pháp phân tích thứ bậc (AHP) xác định trọng số cho mỗi tiêu chí đã tuyển chọn được 21 cây trội từ 63 cây trội dự tuyển. Các cây trội được tuyển chọn có độ vượt so với trung bình lâm phần ở cùng độ tuổi từ 9,3 đến 83,5% về đường kính gốc, từ 6,0 đến 34,8% về chiều cao cây, từ 13,3 đến 66,7% về đường kính tán, từ 7,4 đến 50,7% về chiều dài tán, từ 18,2 đến 103,8% về năng suất quả, bình quân xếp hạng vượt từ 18 đến 68%, tùy theo mỗi độ tuổi. Các cây trội này có nguồn gốc, xuất xứ, chất lượng tốt phục vụ công tác khảo nghiệm giống và tuyển chọn giống làm vật liệu nhân giống cung cấp cho các địa phương.

Từ khóa: cây lâm sản ngoài gỗ, cây trội, phương pháp phân tích thứ bậc, Thanh mai.

Chỉ số phân loại: 4.4, 4.6

Plus tree selection of *Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don with the goal of fruit in Van Don district, Quang Ninh province

Duc Thang Le*

Institute of Regional Research and Development, Ministry of Science and Technology, 70 Tran Hung Dao Street, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 24 October 2023; revised 19 November 2023; accepted 22 November 2023

Abstract:

Plus tree selection is one of the important steps in forest tree breeding. In this study, 18 cultivation models of *Myrica esculenta* in Van Don district were randomly selected and assessed between the ages of 5 and 28 years old. The study results showed that the *Myrica esculenta* planting models had significantly different overall average growth in terms of diameter, height, canopy diameter, canopy length, and fruit yield. Based on the assessment of fruit yield criteria and growth indicators, as well as the analytic hierarchy process (AHP) to determine the weight for each criterion, 21 plus trees were selected from 63 candidate trees. The selected plus trees exceed the mean of the forest stand in terms of diameter (9.3-83.5%), tree height (6.0-34.8%), canopy diameter (13.3-66.7%), canopy length (7.4-50.7%), fruit yield (18.2-103.8%), and average rating (exceeds 18-68%), depending on each age. These plus trees have origins, provenance, and good quality to serve the work of field testing and forest tree breeding to supply localities.

Keywords: analytic hierarchy process (AHP), *Myrica esculenta*, plants of non-timber forest products, plus tree.

Classification numbers: 4.4, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: thangs.accr@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Cây trọi là cây tốt nhất được tuyển chọn từ rừng tự nhiên, rừng trồng, cây trồng phân tán, rừng giống hoặc vườn giống được sử dụng để lấy giống [1]. Cây lâm sản ngoài gỗ (LSNG) là cây lâm nghiệp cung cấp các sản phẩm lâm sản không phải là gỗ [2]. Thanh mai (*Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don) là cây thân gỗ bản địa cho sản phẩm ngoài gỗ (cho quả và thịt quả), có giá trị kinh tế, dinh dưỡng và dược liệu cao, nhưng là một đối tượng còn rất mới ở Việt Nam. Hiện nay, quả Thanh mai chủ yếu khai thác từ cây mọc tự nhiên trong rừng và một số hộ gia đình đã gây trồng, phát triển tại Vân Đồn, Quảng Ninh, nhưng với quy mô nhỏ lẻ; nguồn cây giống chủ yếu từ cây chiết được nhân giống từ cây mọc tự nhiên và cây đã trồng trong vườn hộ [3]. Phần lớn các hộ thiếu các thông tin và chưa chú trọng đến việc lựa chọn cây mẹ (cây trọi) để làm vật liệu nhân giống dẫn đến năng suất và chất lượng quả không ổn định, đồng đều qua các năm.

Nghiên cứu chọn lọc cây trọi để phục vụ công tác khảo nghiệm giống, qua đó tuyển chọn được giống Thanh mai có nguồn gốc, xuất xứ rõ ràng; có chất lượng tốt làm vật liệu nhân giống cung cấp cho các địa phương mở rộng và phát triển mô hình trồng thâm canh cây Thanh mai với mục tiêu lấy quả là cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các tiêu chí có liên quan đến tuyển chọn cây trọi và chọn được các cây trọi ở mỗi độ tuổi khác nhau trong các lâm phần trồng Thanh mai lấy quả tại xã Vạn Yên, huyện Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

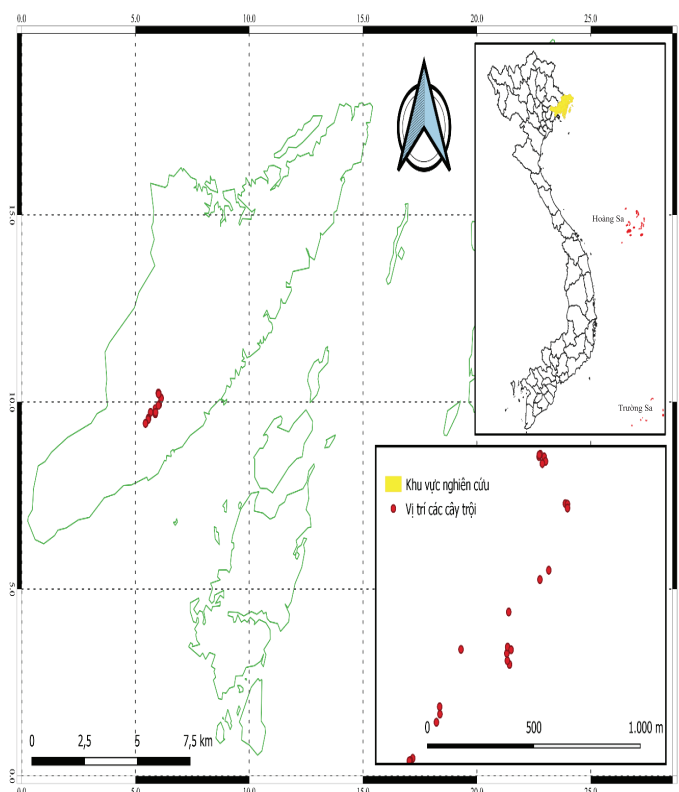
2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mô hình trồng Thanh mai lấy quả có độ tuổi từ 5 đến 28 năm, đã cho quả ổn định từ 3 năm trở lên; tập trung chủ yếu ở xã Vạn Yên (tại các thôn: Cái Bàu, Đài Mò, Đài Làng, 10/10), huyện Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh.

Cây trọi Thanh mai được chọn lọc từ giống Thanh mai trâu (tên gọi theo người dân địa phương) cho quả to đều, sai quả thay vì giống Thanh mai ruồi (cho quả nhỏ, sai quả không được lựa chọn trong nghiên cứu này).

2.2. Địa điểm và điều kiện tự nhiên

Vân Đồn có tọa độ địa lý từ 20°40' đến 21°16' vĩ độ Bắc, từ 107°15' đến 108° kinh độ Đông bao gồm phần đất đảo nổi và thềm lục địa, với diện tích tự nhiên (phần đất nổi) khoảng 551,83 km², chiếm 9,3% diện tích tỉnh Quảng Ninh; với 600 hòn đảo lớn nhỏ nằm trong vịnh Bái Tử Long, gồm đảo Cái Bàu lớn nhất (1 thị trấn Cái Rồng và 6 xã, có diện tích 294,34 km², chiếm 55% tổng diện tích tự nhiên) và quần đảo Vân Hải (có 5 xã, với diện tích 257,14 km²), nhưng chỉ có hơn 20 đảo đất có người ở. Địa hình thấp dần từ Đông Bắc xuống Tây Nam. Độ cao trung bình 40 m so với mặt biển, độ dốc trung bình 25°. Vân Đồn nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa, từ tháng 3-8 gió Đông Nam mát mẻ thổi từ biển thổi vào, từ tháng 10 đến tháng 2 năm sau, khí hậu khô lạnh do ảnh hưởng của gió mùa Đông Bắc. Nhiệt độ trung bình năm 23,4-24,3°C. Lượng mưa trung bình năm từ 1.815-2.753 mm, có từ 138-157 ngày có mưa (hình 1).



Hình 1. Khu vực nghiên cứu và vị trí các cây trọi Thanh mai được tuyển chọn.

2.3. Phương pháp lập ô tiêu chuẩn và thu thập số liệu

Thông qua phỏng vấn chủ hộ để xác định các mô hình (MH) trồng Thanh mai có số lượng cây từ 40 cây trở lên, ở các độ tuổi từ 5 đến 28 tuổi, và đã cho thu hoạch quả ổn định từ 3 năm trở lên. Mỗi MH ở cùng độ tuổi được lựa chọn theo phương pháp ngẫu nhiên phân tầng không theo tỷ lệ. Tổng số 18 MH đã được lựa chọn ở các độ tuổi, gồm: tuổi 5 (5 MH), tuổi 6 (3 MH), tuổi 7 (2 MH), tuổi 10 (1 MH), tuổi 12 (2 MH), tuổi 14 (1 MH), tuổi 15 (1 MH), tuổi 20 (2 MH), và tuổi 28 (1 MH).

Tại mỗi mô hình, lập 1 ô tiêu chuẩn tạm thời, diện tích 500 m² (25 x 20 m) đo đếm các chỉ tiêu:

- (i) Đường kính gốc (D_0 , cm): được xác định thông qua chu vi, dùng thước dây đo chu vi (vanh) tại vị trí cách mặt đất 5 cm, độ chính xác 1 mm;
- (ii) Chiều cao cây (H_{VN} , m): đo bằng sào khắc vạch, độ chính xác đến 0,1 m;
- (iii) Đường kính tán cây (D_T , cm): đo bằng sào khắc vạch, độ chính xác 0,1 m, đo 2 hướng Đông Tây - Nam Bắc vuông góc;
- (iv) Chiều dài tán (L_T , m): đo 4 điểm (Đông, Tây, Nam và Bắc) bằng sào khắc vạch, đo từ vị trí mép tán thấp nhất đến đỉnh tán, độ chính xác 0,1 m;
- (v) Số thân/cây, số cành cấp 1/cây: đếm trực tiếp số thân, số cành cấp 1/cây của toàn bộ cây điều tra;

(vi) Năng suất quả: lựa chọn 5 cây đại diện/mô hình - cây sinh trưởng và năng suất ở mức trung bình ở cùng độ tuổi, thu hoạch quả 3-5 lần, sau 2-3 ngày thu hoạch những quả chín một lần, cân khối lượng quả thu hoạch của mỗi lần của từng cây để tính năng suất quả bình quân/cây.

2.4. Tiêu chí tuyển chọn cây trội

Áp dụng phương pháp tham vấn 5 ý kiến chuyên gia nhiều vòng để xây dựng bộ tiêu chí tuyển chọn cây trội Thanh mai lấy quả trên cơ sở tiêu chuẩn ngành 04TCN 147:2006 [4], cây trội (cây mẹ) đã cho quả ổn định từ 3 năm trở lên và cho năng suất quả vượt từ 15% so với năng suất trung bình của đám rừng có cây giống (40-50 cây xung quanh), sinh trưởng từ mức trung bình trở lên và không bị sâu bệnh hại; kết hợp các chỉ tiêu sinh trưởng (D_0 , H_{VN} , D_T , L_T) đều vượt so với trị số bình quân của quần thể cây xung quanh theo TCVN 8755:2017 - Giống cây lâm nghiệp (cây trội lấy gỗ) [1]. Theo đó, cây trội Thanh mai được tuyển chọn trên cơ sở sáu (6) tiêu chí: (1) Năng suất quả (kg/cây) - ký hiệu TC1; (2) Chiều cao cây (H_{VN} , m) - TC2; (3) Đường kính gốc (D_0 , cm) - TC3; (4) Đường kính tán (D_T , m) - TC4; (5) Chiều dài tán (L_T , m) - TC5; và (6) Chất lượng sinh trưởng - TC6 (gồm: 1: cây đa thân [từ 1-3 thân/cây], phân cành thấp, cành nhánh nhiều; tán tròn đều, xum xuê, rất cân đối; sai quả; cây sinh trưởng và phát triển tốt; không có dấu hiệu bị sâu bệnh hại; 2: cây đa thân [trên 3 thân/cây, không quá 5 thân], phân cành thấp, cành nhánh nhiều; tán cân đối; cây sinh trưởng và phát triển tốt; không có dấu hiệu bị sâu bệnh hại). Thanh mai có đặc tính ra chồi rất tốt, khi trồng bằng cây chiết thường mọc nhiều chồi từ gốc, không được tia chồi (cành) mọc sát gốc để phát triển thân chính nên cây phát triển đa thân. Cây nhiều thân và phân cành thấp, cành nhánh nhiều, tán dày, rậm rạp sẽ hạn chế khả năng quang hợp, ra hoa đậu quả. Do đó sẽ ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng.

- Tuyển chọn cây trội dự tuyển: Thông qua phỏng vấn chủ hộ để xác định những cây trội dự tuyển có các đặc điểm vượt trội so với trị số bình quân của lâm phần ở cùng độ tuổi như cho quả ổn định từ 3 năm trở lên, năng suất quả vượt từ 15% trở lên, và các chỉ tiêu sinh trưởng từ mức trung bình trở lên, không bị sâu bệnh hại. Đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng và xác định năng suất quả cho từng cây trội dự tuyển (phương pháp đo đếm được áp dụng tương tự như đối với đánh giá tại mỗi mô hình); treo số hiệu vào các cây trội dự tuyển.

- Tuyển chọn cây trội: Căn cứ vào tiêu chí chọn cây trội dự tuyển trọng số của từng tiêu chí thông qua phương pháp phân tích thứ bậc (Analytic Hierarchy Process - AHP) [5], và độ vượt của từng tiêu chí. Nghiên cứu này có sử dụng mô hình AHP để phân tích, đánh giá, và xác định trọng số của từng tiêu chí theo mức độ quan trọng. Qua đó, xác định tổng phần trăm độ vượt bằng cách nhân giá trị phần trăm độ vượt của mỗi tiêu chí với trọng số tương ứng của mỗi cây trội dự tuyển, riêng đối tiêu chí chất lượng sinh trưởng (TC6) để đồng nhất với 5 tiêu chí còn lại về độ vượt (%), được quy đổi chất lượng 1 - tương ứng 100%, chất lượng 2 - tương ứng 50%). Cây trội được lựa chọn có tổng phần trăm độ vượt cao (>15%) và được xếp hạng theo thứ tự giảm dần.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Một số đặc trưng thống kê mô tả được xác định qua các công thức sau:

+ Trung bình mẫu (X_{tb}):

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (1)$$

+ Sd (độ lệch chuẩn):

$$Sd = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

+ Hệ số biến động (CV%):

$$CV\% = \frac{Sd}{\bar{X}} * 100 \quad (3)$$

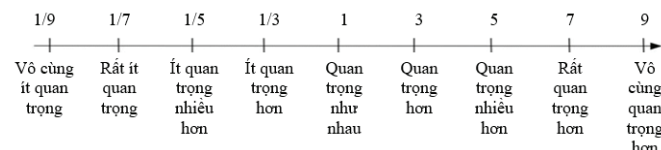
+ Độ vượt trội (%):

$$\text{vượt trội (\%)} = (X_{\text{cây dự tuyển}} - X_{tb}) * \frac{100}{X_{tb}} \quad (4)$$

trong đó, $X_{\text{cây dự tuyển}}$: giá trị tiêu chí của cây trội dự tuyển (D_0 , H_{VN} , D_T , L_T , năng suất); X_{tb} : giá trị trung bình của từng tiêu chí của lâm phần ở cùng độ tuổi có cây trội dự tuyển, n là tổng số cây.

Xác định trọng số cho các tiêu chí tuyển chọn cây trội:

Áp dụng phương pháp phân tích thứ bậc (AHP) [5] để đánh giá và xác định trọng số của từng tiêu chí trong 6 tiêu chí tuyển chọn cây trội Thanh mai lấy quả. Trên cơ sở đánh giá, đo lường mức độ ảnh hưởng khác nhau cho từng cặp đôi tiêu chí theo thang điểm từ 1 đến 9 thông qua tham vấn ý kiến 5 chuyên gia ở phần xác định bộ tiêu chí tuyển chọn cây trội Thanh mai lấy quả.



Hình 2. Đánh giá mức độ quan trọng của từng cặp đôi tiêu chí theo ý kiến chuyên gia [5].

+ Xác định mức độ ưu tiên cho các tiêu chí: tham vấn ý kiến chuyên gia để so sánh mức độ quan trọng của từng cặp đôi tiêu chí, mức độ ưu tiên của từng cặp đôi tiêu chí có các giá trị nguyên dương từ 1 đến 9 hoặc nghịch đảo của các số này, cụ thể tại hình 2.

+ Trọng số của mỗi tiêu chí:

$$w_{i,j} = \frac{a_{i,j}}{\sum_{i=1}^n a_{i,j}} \quad (5)$$

trong đó, W_{ij} : trọng số của tiêu chí i so với tiêu chí j; a_{ij} : mức độ quan trọng của tiêu chí i so với tiêu chí j, n: số tiêu chí.

Kiểm tra tính nhất quán trong đánh giá mức độ tin cậy của các giá trị trọng số cho từng tiêu chí thông qua tỷ số nhất quán CR (nếu $CR \leq 0,1$ thì kết quả phù hợp, đánh giá có độ tin cậy cao).

Các câu lệnh xác định trọng số cho mỗi tiêu chí trong R [6, 7]:

> AHP= ahp.mat(df=T, atts=atts, negconvert=TRUE)

```
> AHP %>% head(1) %>% kable()
> tc = ahp.indpref(AHP, atts, method = "arithmetic")
> round(tc, 3) %>% rownames_to_column('ID') %>% kable()
> ts = ahp.aggpref(AHP, atts, method = "arithmetic", aggmeth="arithmetic")
> round(ts, 3) %>% t() %>% kable()
```

Dữ liệu điều tra được tổng hợp, phân tích theo các mục đích nghiên cứu trên cơ sở các thuật toán của phần mềm R [6, 7]. Các gói sử dụng để xử lý số liệu và phân tích dữ liệu bằng biểu đồ trong bài báo: psych, gplot2, gridExtra, tidyverse, ahpurvey.

3. Kết quả

3.1. Một số chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất quả Thanh mai tại các lâm phần

Cây thanh mai được các hộ trồng chủ yếu từ cây chiết cành từ cây mẹ mọc tự nhiên và cây mẹ đã được trồng trong vườn hộ, nhưng phần lớn các hộ chưa chú trọng đến việc lựa chọn cây trội (cây mẹ) để làm vật liệu nhân giống. Từ năm 2007 trở lại đây, một số hộ được hướng dẫn kỹ thuật chiết cành và gây trồng thông qua “Dự án hỗ trợ chuyên ngành lâm sản ngoài gỗ tại Việt Nam - Pha II” [8]; sau đó các hộ tự chiết cành từ các cây đã trồng trong vườn hộ để mở rộng mô hình cũng như nhân rộng sang các hộ khác. Cây trội lấy các sản phẩm ngoài gỗ quy định cây chọn ở rừng trồng phải có năng suất các sản phẩm cuối cùng (theo mục tiêu kinh tế) vượt 15% so với năng suất trung bình của đám rừng có cây giống (40-50 cây xung quanh), sinh trưởng từ mức trung bình trở lên và không bị sâu bệnh hại [4]. Theo đó, năng suất quả là một trong những chỉ tiêu chính khi chọn cây trội Thanh mai. Tính chung, năng suất quả bình quân đạt từ 8,0-10,0 kg quả/cây (CV%: 30,5-45,6%) ở giai đoạn 5-7 tuổi, đạt 17,5 kg quả/cây (CV%: 17,1%) ở tuổi 10; chỉ đạt 12,3-16,0 kg quả/cây (CV%: 23,5-38,4%) ở tuổi

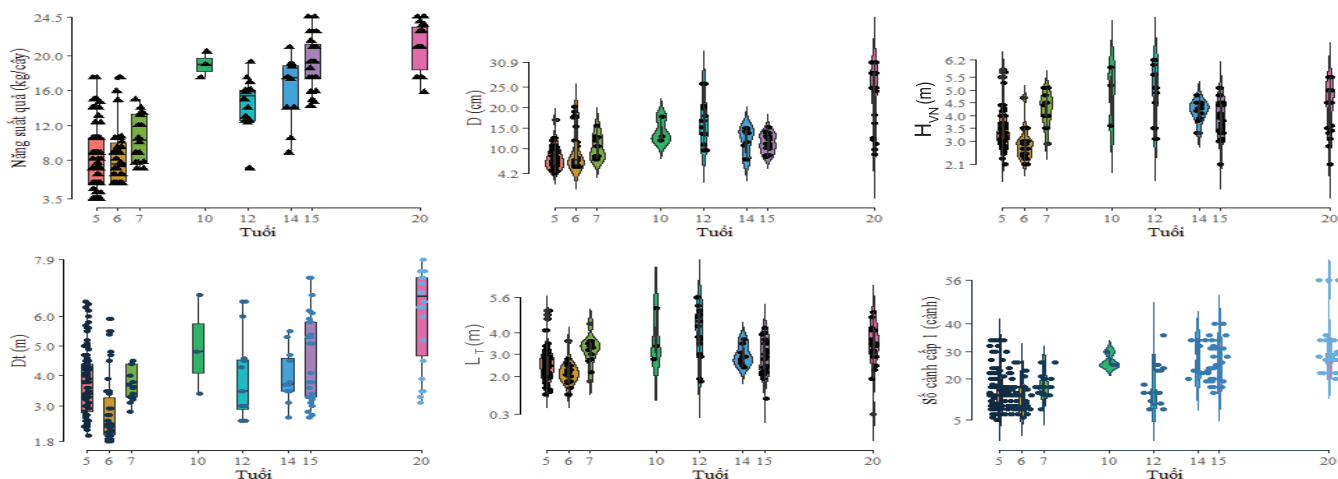
10 và 14; đạt 19,3 kg quả/cây (CV%: 16,1%) ở tuổi 15 và đạt 21,1 kg quả/cây (CV%: 13,6%) ở tuổi 20 (hình 3).

Bảng 1 cho thấy, các chỉ tiêu sinh trưởng đường kính, chiều cao, đường kính tán, chiều dài tán và năng suất quả bình quân có xu hướng tăng khi độ tuổi tăng. Tuy nhiên, mức tăng và lượng tăng trưởng bình quân chung tương ứng về các chỉ tiêu sinh trưởng, năng suất quả không đồng nhất ở mỗi độ tuổi. Thật vậy, lượng tăng trưởng bình quân chung về đường kính, chiều cao, đường kính tán và chiều dài tán được ghi nhận cao nhất ở tuổi 5 và 7; và cao hơn, có ý nghĩa so với các độ tuổi còn lại. Bình quân ΔD_0 cao nhất ở tuổi 5, 6

Bảng 1. Sinh trưởng và năng suất quả Thanh mai tại các lâm phần điều tra.

Tuổi (năm)	Mật độ (cây/ha)	Số thân/cây		D_0		H_{VN}		D_T		L_T		Số cành/cây		Năng suất quả/cây	
		TB	CV	TB	CV	TB	CV	TB	CV	TB	CV	TB	CV	TB	CV
		(thân)	(%)	(cm)	(%)	(m)	(%)	(m)	(%)	(m)	(%)	(cành)	(%)	(kg/cây)	(%)
5	781	1,4	39,3	7,3	23,7	3,2	24,2	2,7	19,9	2,2	15,7	7,2	22,8	7,4	12,8
5	781	4,6	51,8	7,8	34,9	3,4	17,7	3,9	26,5	2,5	24,5	15,9	41,9	7,4	47,0
5	781	5,3	28,5	10,5	14,5	5,7	20,1	5,1	10,4	4,8	11,4	30,0	15,8	13,7	13,5
5	781	3,0	42,0	8,5	24,9	3,4	13,2	2,5	10,4	2,6	23,6	15,3	29,4	10,1	37,5
5	781	3,6	24,7	7,3	23,7	3,2	14,9	2,6	26,2	2,2	12,7	12,0	50,7	9,5	20,4
6	893	1,6	44,5	7,7	44,1	2,6	12,7	2,2	21,3	2,0	18,1	11,7	42,1	7,8	22,7
6	893	1,5	50,7	8,3	45,7	2,7	10,0	2,4	20,4	2,1	18,4	11,9	31,1	7,0	27,4
6	893	3,1	34,1	16,9	17,9	3,8	18,1	5,0	13,7	2,8	22,6	20,4	21,3	14,5	27,6
7	833	2,0	35,0	13,7	11,0	4,5	18,4	4,3	11,2	3,4	28,7	21,0	19,5	13,7	10,0
7	833	2,9	52,4	8,6	13,7	4,1	16,8	3,5	10,4	3,2	14,9	16,5	27,5	7,9	15,0
10	833	3,3	69,4	14,3	21,1	4,9	24,1	5,0	33,4	3,8	31,4	26,7	10,8	17,5	11,4
12	952	2,0	45,5	14,6	25,4	4,8	24,6	3,3	22,8	3,7	30,0	15,1	38,4	13,3	22,7
12	1.000	1,7	68,9	25,6	11,7	5,6	17,9	6,3	25,1	5,2	14,7	27,3	27,5	12,3	38,4
14	1.020	5,3	50,3	12,0	26,2	4,2	33,7	4,0	22,6	3,0	15,2	27,0	23,9	16,0	23,5
15	1.042	3,9	36,6	11,4	19,0	3,9	18,6	4,6	31,9	2,9	27,1	26,3	28,7	19,3	16,1
20	1.100	1,9	56,7	27,2	13,4	4,9	12,0	7,0	22,0	4,0	14,4	33,5	37,6	21,2	13,6
20	1.100	3,2	78,2	11,8	21,9	3,3	14,9	3,9	20,4	2,6	17,3	33,0	34,3	20,7	13,6
28	1.111	2,5	28,4	11,3	12,0	3,1	17,4	3,7	30,5	1,9	18,7	22,5	28,3	13,2	28,5

D_0 - đường kính gốc; H_{VN} - chiều cao thân cây; D_T - đường kính tán cây; L_T - chiều dài tán cây; TB - giá trị trung bình; CV% - hệ số biến thiên.



Hình 3. Biểu đồ phân bố các giá trị sinh trưởng và năng suất quả bình quân các lâm phần Thanh mai theo độ tuổi.

và 7, dao động từ 1,5-1,6 cm/năm và thấp nhất ở tuổi 15 (đạt 0,8 cm/năm). ΔH_{VN} đạt cao nhất ở tuổi 5 (bình quân 0,7 m/năm), thấp nhất ở tuổi 20 (bình quân 0,2 m/năm); ΔD_T đạt cao nhất ở tuổi 5 (bình quân 0,8 m/năm), thấp nhất ở tuổi 14 (bình quân 0,28 m/năm); tuy nhiên, lượng tăng trưởng bình quân về năng suất quả lại ghi nhận cao nhất ở lâm phần tuổi 10 (trung bình 1,9 kg quả/cây/năm) và thấp nhất ở tuổi 20 (1,1 kg quả/cây/năm). Rất có thể những yếu tố như các lâm phần được trồng trước năm 2007 các hộ chủ yếu chiết cành từ cây mọc tự nhiên mà chưa chú trọng đến việc chọn những cây mẹ để vật liệu nhân giống, dẫn đến nguồn cây giống đem trồng có chất lượng không đồng đều và biện pháp kỹ thuật trồng, chăm sóc cũng không đồng nhất giữa các mô hình là lý do giải thích cho sự chênh lệch về lượng tăng trưởng bình quân về năng suất quả ở lâm phần tuổi 10 và tuổi 20.

Nhìn chung, các lâm phần trồng Thanh mai ở các độ tuổi khác nhau được ghi nhận có sự khác nhau rõ ở mức độ tin cậy 95% về lượng tăng trưởng bình quân chung về các chỉ tiêu sinh trưởng (D_0 , H_{VN} , D_T , L_T) và năng suất quả (các giá trị P đều nhỏ hơn 0,001). Lượng tăng trưởng bình quân chung đạt từ 0,8-1,6 cm/năm (CV%: 19,7-50,6%) về đường kính gốc, từ 0,2-0,7 m/năm (CV%: 10,0-24,5%) về chiều cao cây, từ 0,3-0,8 m/năm (CV%: 14,8-40,4%) về đường kính tán, từ 0,2-0,5 m/năm (CV%: 14,3-31,6%) về chiều dài tán, đạt từ 1,1-1,9 kg quả/cây/năm (CV%: 13,2-43,8%) về năng suất quả.

3.2. Chọn lọc cây trội Thanh mai tại các lâm phần điều tra

Xác định trọng số của các tiêu chí

Trên cơ sở đánh giá, đo lường mức độ ảnh hưởng khác nhau cho từng cặp đôi tiêu chí theo thang điểm từ 1 đến 9 thông qua tham vấn ý kiến 5 chuyên gia và sử dụng gói ahpurvey trong phần mềm R [6, 7] để xác định trọng số của từng tiêu chí tại bảng 2.

Bảng 2. Tổng hợp trọng số các tiêu chí tuyển chọn cây trội Thanh mai lấy quả.

Chuyên gia	Tiêu chí lựa chọn cây trội thanh mai với mục đích lấy quả					
	TC1	TC2	TC3	TC4	TC5	TC6
1	0,338	0,047	0,049	0,220	0,263	0,083
2	0,278	0,060	0,043	0,150	0,325	0,144
3	0,386	0,122	0,112	0,114	0,219	0,047
4	0,232	0,088	0,091	0,211	0,278	0,100
5	0,371	0,105	0,053	0,197	0,198	0,077
Trung bình	0,321	0,085	0,070	0,178	0,256	0,090

Kết quả xác định được trọng số từng tiêu chí theo thứ tự giảm dần: từ năng suất quả (0,321) > chiều dài tán (0,256) > đường kính tán (0,178) > chất lượng sinh trưởng (0,090) > chiều cao cây (0,085) > đường kính gốc (0,070).

Chọn lọc cây trội

Thanh mai là một loài cây thân gỗ cho lâm sản ngoài gỗ (cho quả và thịt quả) có giá trị kinh tế, giá trị dinh dưỡng cao. Do đó, một trong những tiêu chí chọn cây trội Thanh mai là những cây có năng suất quả cao nhất và chất lượng sản phẩm đáp ứng yêu cầu của thị trường. Độ vượt về năng suất quả của những cây trội được chọn cũng có xu hướng giảm theo độ tuổi, đạt cao nhất ở tuổi 6, bình quân vượt 103,5%, khoảng tin cậy (KTC) 95%: 51,5-155,5%, tiếp đến ở tuổi 5,

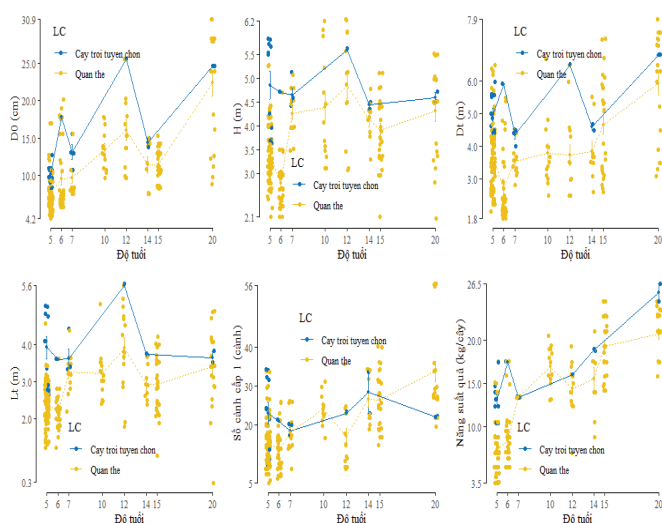
bình quân vượt 62,9%, KTC 95%: 47,3-78,6%; tiếp đến ở nhóm các tuổi 7 và 12, có độ vượt bình quân lần lượt là 34,0 và 22,1%; nhóm thấp nhất ở các tuổi 20 và 14, có độ vượt bình quân tương ứng là 20,8 và 18,2%.

Bảng 3. Sinh trưởng và năng suất quả các cây trội Thanh mai được tuyển chọn.

Cây trội	Tuổi	Số thân/ cây (thân)	D ₀ (cm)	H _{VN} (m)	D _T (m)	L _T (m)	Số cành cấp 1/cây (cành)	Chất lượng	Năng suất quả/cây (kg/cây)	Độ vượt so với trung bình lâm phần (%)					Xếp hạng (vượt, %)
										D ₀	H _{VN}	D _T	L _T	Năng suất quả/cây	
TM37	6	3	17,8	4,7	5,9	3,6	21	1	17,5	83,5	23,7	55,3	29,6	103,5	68
TM71	5	3	10,9	5,8	4,4	5,0	34	1	14,0	36,3	61,1	15,8	92,3	75,0	67
TM65	5	3	10,7	5,7	5,6	4,8	32	1	13,1	33,8	58,3	47,4	84,6	63,8	67
TM60	5	3	10,9	5,8	4,6	5,0	34	2	14,7	36,3	61,1	21,1	93,1	83,8	67
TM52	5	3	10,7	5,7	5,6	4,8	32	2	14,0	33,8	58,3	47,4	83,8	75,0	66
TM59	5	3	12,7	4,0	6,0	2,7	22	1	17,5	58,8	11,1	57,9	3,8	118,8	63
TM07	5	3	9,8	5,5	5,0	4,1	24	1	14,0	22,5	52,8	31,6	57,7	75,0	60
TM55	5	3	9,8	5,5	5,5	4,8	24	2	12,3	22,5	52,8	44,7	84,6	53,8	57
TM50	12	1	25,6	5,6	6,5	5,6	23	1	16,0	53,3	14,3	66,7	40,0	22,1	43
TM64	7	2	15,6	5,1	4,5	4,4	17	1	13,4	48,6	18,6	18,4	37,5	34,0	38
TM24	5	3	8,4	3,7	4,4	2,9	11	1	12,3	5,0	2,8	15,8	11,5	53,8	33
TM26	5	3	9,1	4,3	4,9	3,4	10	2	10,5	13,8	19,4	28,9	30,8	31,3	30
TM69	7	2	13,0	4,6	4,5	3,4	20	1	13,4	23,8	7,0	18,4	6,2	34,0	27
TM28	14	3	13,8	4,4	4,7	3,8	34	1	19,0	15,0	4,8	17,5	26,7	18,8	26
TM57	14	3	15,0	4,5	4,5	3,7	23	1	18,8	25,0	7,1	12,5	23,3	17,5	25
TM63	7	2	13,1	4,4	4,4	3,3	20	1	13,4	24,8	2,3	15,8	3,1	34,0	25
TM67	20	2	24,7	4,7	6,8	3,8	22	1	26,5	9,3	9,3	13,3	11,8	25,6	24
TM47	7	2	10,7	4,5	4,0	3,4	17	1	13,4	1,9	4,7	5,3	4,7	34,0	23
TM44	5	3	9,7	3,7	4,5	2,8	14	2	10,5	21,3	2,8	18,4	7,7	31,3	22
TM17	5	3	8,2	3,7	4,3	2,8	17	2	10,5	2,5	2,8	13,2	7,7	31,3	19
TM61	20	2	24,7	4,5	6,8	3,5	22	1	24,5	9,3	4,7	13,3	2,9	16,1	18

D_0 - đường kính gốc; H_{VN} - chiều cao thân cây; D_T - đường kính tán cây; L_T - chiều dài tán cây; TB - giá trị trung bình; CV% - hệ số biến thiên.

Trong phạm vi nghiên cứu này, cây trội Thanh mai lấy quả được tuyển chọn thông qua các tiêu chí về năng suất quả, các chỉ tiêu sinh trưởng, và kết quả xếp hạng thông qua phương pháp phân tích thứ bậc AHP [5] các tiêu chí D_0 , H_{VN} , D_T , L_T , chất lượng sinh trưởng, và năng suất quả của mỗi cây trội dự tuyển trong mỗi lâm phần. Kết quả đã tuyển chọn được 21 cây trội Thanh mai trong 63 cây dự tuyển có năng suất quả vượt 15% so với năng suất bình quân lâm phần. Bảng 3 cho thấy, ở tuổi 5, có 11 cây trội được tuyển chọn (nhiều nhất), với năng suất bình quân 13,0 kg quả/cây, khoảng tin cậy 95%: 11,8-14,3 kg quả/cây, vượt bình quân 62,9% so với trung bình quần thể ở cùng độ tuổi, tổng xếp hạng vượt bình quân 50,1%, khoảng tin cậy 95%: 31,8-104,2%; tiếp đến, tuổi 7 có 4 cây được tuyển chọn, năng suất bình quân 13,4 kg quả/cây, khoảng tin cậy 95%: 11,3-15,5 kg quả/cây, vượt bình quân 34,0%, tổng xếp hạng vượt 28,3%; ở tuổi 14 và tuổi 20, mỗi độ tuổi chọn được 2 cây trội, năng suất bình quân và độ vượt tương ứng là 18,9 kg quả/cây (vượt 18,2%, xếp hạng vượt 25,5%): 25,5 kg quả/cây (vượt 20,9%, xếp hạng vượt 21,0%); ở tuổi 6 và tuổi 12, mỗi độ tuổi chọn được 1 cây trội, năng suất bình quân và độ vượt tương ứng là 17,5 kg quả/cây (vượt 103,5%, xếp hạng vượt 68,0%): 16,0 kg quả/cây (vượt 22,1%, xếp hạng vượt 43,0%).



Hình 4. Giá trị các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất quả các cây trội Thanh mai được tuyển chọn so với quần thể theo độ tuổi.

Hình 4 cho thấy, nhìn chung, các cây trội Thanh mai được tuyển chọn đều đáp ứng được các chỉ tiêu sinh trưởng chung (D_0 , H_{VN} , D_T , L_T) đều vượt trội và đáp ứng yêu cầu về năng suất quả đối với cây trội cho sản phẩm ngoài gỗ (lấy quả) [5] và đáp ứng yêu cầu về các chỉ tiêu sinh trưởng đối với cây trội lấy gỗ [1]. Thật vậy, tùy theo độ tuổi các cây trội Thanh mai được tuyển chọn có độ vượt so với trung bình lâm phần từ 9,3-83,5% về đường kính gốc, từ 6,0-34,8% về chiều cao cây, từ 13,3-66,7% về đường kính tán, từ 7,4-50,7% về chiều dài tán, từ 18,2-103,5% về năng suất quả, bình quân xếp hạng vượt từ 18-68%.

4. Bàn luận

Công tác chọn cây trội và khảo nghiệm giống là những khâu quan trọng nhất trong các chương trình chọn giống cây rừng (cây lấy gỗ, LSNG, hoặc chọn cây trồng rừng phòng hộ) [9], nhưng có một giả định tồn tại khá lâu cho rằng, tiêu chí chính chọn cây trội LSNG là năng suất và chất lượng sản phẩm chính của từng loài cây, mà ít quan tâm đến các chỉ tiêu sinh trưởng (đường kính và chiều cao thân cây) như tiêu chí chọn cây trội lấy gỗ. Trên thực tế, đối với cây trội lấy các sản phẩm ngoài gỗ, cây chọn ở rừng trồng phải có năng suất các sản phẩm cuối cùng (theo mục tiêu kinh tế) vượt 15% so với năng suất trung bình của đám rừng có cây giống (từ 40-50 cây xung quanh), sinh trưởng từ mức trung bình trở lên và không bị sâu bệnh; cây chọn từ cây trồng phân tán phải có năng suất các sản phẩm cuối cùng (theo mục tiêu kinh tế) cao nhất ở khu vực (thôn, xã hoặc liên xã), ổn định trong ít nhất 3 năm, có sinh trưởng từ mức trung bình trở lên và không bị sâu bệnh [4]. Tuy nhiên, kết quả ở nghiên cứu này cho thấy, các chỉ tiêu sinh trưởng về đường kính gốc, chiều cao cây, đường kính tán cây, chiều dài tán và năng suất quả Thanh mai bình quân có xu hướng tăng khi lâm phần tăng mỗi tuổi. Thật vậy, kết quả phân tích phương trình đa biến từ các nhân tố điều tra cho thấy, các chỉ tiêu này đều có tương quan với nhau, với mức tương quan từ vừa phải ($0,3 \leq r < 0,5$) đến tương quan tương đối chặt ($0,5 \leq r < 0,7$), thậm chí chỉ tiêu chiều dài tán (L_T) có mức tương quan rất chặt với chỉ tiêu chiều cao cây ($r=0,94$). Trong một nghiên

cứu trước đây, thông qua phương trình đa biến chúng tôi cũng dự báo năng suất quả Thanh mai tăng thêm 1,9 kg khi tăng mỗi 1 tuổi và tăng thêm 0,5 kg khi tăng mỗi 1 cành cấp một [3]. Do vậy, để chọn cây trội LSNG ngoài các chỉ tiêu về năng suất và chất lượng sản phẩm chính của từng loài cây [4, 9], thì cũng cần quan tâm đến các chỉ tiêu sinh trưởng như đối với chọn cây trội lấy gỗ, với độ vượt so với bình quân của quần thể cây xung quanh ít nhất 25% về đường kính và 10% về chiều cao [1], thay vì chỉ yêu cầu các chỉ tiêu sinh trưởng chỉ từ mức trung bình trở lên và không bị sâu bệnh [4].

Ở một số nghiên cứu gần đây cũng đã áp dụng cả các tiêu chí tuyển chọn đối cây trội lấy gỗ và các tiêu chí tuyển chọn cây trội cho sản phẩm ngoài gỗ, như cây trội Quế lá nhỏ (*Cinnamomum cassia*) được tuyển chọn tại Văn Yên (Yên Bái) có độ vượt bình quân 52,1% về đường kính, 19,1% về chiều cao, 150,6% về năng suất vỏ khô, và hàm lượng tinh dầu trong mẫu vỏ khô trung bình 6,8% [10]; cây trội dự tuyển Dẻ tròng khánh (*Castranea mollissima*) tại Cao Bằng có độ vượt từ 15,0-258,2% về đường kính, từ 16,7-70,0% về chiều cao và từ 19,0-89,4% về sản lượng quả [11].

Bên cạnh đó, cũng có nhiều nghiên cứu chỉ tập trung vào các tiêu chí hoặc là cho cây trội lấy gỗ hoặc là cây trội cho sản phẩm ngoài gỗ, như cây trội Sờ chề (*Camellia sasanqua*) được tuyển chọn tại Nghệ An có lượng quả từ 10,6-23,1 kg/cây/năm, hàm lượng dầu đạt từ 50,0-57,0%, tương ứng 1,7-4,1 kg dầu/cây/năm, vượt từ 123,3-434,0% so với trung bình quần thể [12]; cây trội Dẻ yên thế (*Castanopsis boissii*) tại Bắc Giang có năng suất hạt vượt từ 43,7-91,3% so với trung bình quần thể [13]; cây trội Trám đen Hoàng Vân (*Canarium nigrum*) tại Bắc Giang được tuyển chọn ở 8 độ tuổi (5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 và 13 tuổi) có năng suất quả vượt từ 48,8-175,2% so với trung bình quần thể ở cùng độ tuổi [14]. Một nghiên cứu tuyển chọn được 108 cây trội Xoan đào (*Pygeum arboreum*) lấy gỗ ở 6 xuất xứ có đường kính từ 20,6-80,7 cm, chiều cao từ 14,3-28,6 m, chiều cao dưới cành lớn, chiếm từ 64,8-81,9% chiều cao cây; đều cho năng suất gỗ và phẩm chất thân cây tốt, với tổng điểm chất lượng (về độ thẳng thân, độ nhỏ cành, sức khỏe, v.v.) đều đạt 16-20 điểm [15].

Ở nghiên cứu này, ngoài áp dụng cả các tiêu chí lựa chọn về năng suất cho cây trội LSNG [4] và các chỉ tiêu sinh trưởng cho cây trội lấy gỗ [1]; nghiên cứu còn áp dụng phương pháp AHP [5] để xác định trọng số cho từng tiêu chí nhằm xếp hạng, đánh giá và lựa chọn các cây trội Thanh mai có thứ hạng cao. Theo đó, trọng số của từng tiêu chí theo thứ tự giảm dần: năng suất quả (0,321) > chiều dài tán (0,256) > đường kính tán (0,178) > chất lượng sinh trưởng (0,090) > chiều cao cây (0,085) > đường kính gốc (0,070). Kết quả cho thấy, các cây trội Thanh mai được tuyển chọn ở mỗi độ tuổi có độ vượt so với giá trị bình quân lâm phần từ 9,3-83,5% về đường kính gốc, từ 6,0-34,8% về chiều cao cây, từ 13,3-66,7% về đường kính tán, từ 7,4-50,7% về chiều dài tán, từ 18,2-103,5% về năng suất quả và bình quân xếp hạng vượt từ 18-68%.

Kết quả ở nghiên cứu này cần phải diễn giải và đặt trong bối cảnh các nghiên cứu vừa kể trên [10, 11], cũng nhất quán với quan điểm cho rằng tuyển chọn cây trội LSNG cần kết hợp cả các tiêu chí về năng suất, chất lượng sản phẩm chính và các chỉ tiêu sinh trưởng, chất lượng thân cây. Tuy nhiên, quan điểm này chưa nhất quán với

các kết quả nghiên cứu vừa kể trên, hoặc là chỉ quan tâm chính đến năng suất và chất lượng sản phẩm chính của từng loài cây đối với cây trội cung cấp các sản phẩm ngoài gỗ [12-14], hoặc là chỉ chú trọng đến các chỉ tiêu sinh trưởng, chất lượng thân cây, tính chất gỗ đối với cây trội lấy gỗ [15]. Rất có thể những yêu cầu kỹ thuật của cây trội lấy gỗ [1] hay yêu cầu về năng suất các sản phẩm cuối cùng (theo mục tiêu kinh tế) của cây trội cho các sản phẩm ngoài gỗ [4] là lý do giải thích cho sự chưa nhất quán này. Trong khi đó, sản phẩm của cây LSNG rất đa dạng, thay đổi theo yêu cầu sử dụng ở từng loài cây; tiêu chí chọn giống ở cây LSNG phụ thuộc yêu cầu sản phẩm của từng nhóm loài cây, như nhóm cây lấy quả và lấy hạt (quả lớn, tỷ lệ sử dụng cao...); nhóm cây lấy vỏ và lấy nhựa (nhóm lấy vỏ: nhiều vỏ, hàm lượng tinh dầu cao...; nhóm lấy nhựa và lấy mù; nhóm lấy lá), nhưng việc phân nhóm chỉ có tính tương đối [16]. Ở nghiên cứu này, cây trội được tuyển chọn là giống Thanh mai trâu (cho quả to) sai quả, quả to đều, tỷ lệ sử dụng (thịt quả/hạt cao)... và đáp ứng các tiêu chí đặt ra.

Bên cạnh đó, năng suất và chất lượng sản phẩm ở các loài cây LSNG phụ thuộc vào đặc điểm di truyền của loài, điều kiện lập địa, và tuổi cây khi thu hái sản phẩm [17, 18], mùa vụ thu hoạch trong năm [19]. Mục tiêu chọn giống ở bất cứ loài cây nào là năng suất và chất lượng sản phẩm tốt. Sản phẩm ở cây LSNG rất đa dạng, thay đổi theo mục tiêu chọn giống của từng loài cây. Đánh giá năng suất và chất lượng giống được thực hiện theo các tính trạng chủ yếu và trực tiếp ở từng loại sản phẩm chính của từng loài cây [16]. Do vậy, trong tuyển chọn cây trội Thanh mai lấy quả ngoài đáp ứng yêu cầu về năng suất quả và các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển, các yếu tố cấu thành năng suất; cần kết hợp phương pháp phân tích thứ bậc (AHP) để đánh giá mức độ ảnh hưởng của mỗi tiêu chí đến sinh trưởng và năng suất quả của cây trội Thanh mai. Trên cơ sở đó, nhằm xác định và lựa chọn đúng các cây cá thể đáp ứng tiêu chuẩn và mục tiêu đề ra là có ý nghĩa thực tiễn cao, là những luận cứ khoa học đáng tin cậy, góp phần công nhận giống và nguồn giống cây trội Thanh mai có nguồn gốc, xuất xứ. Tuy nhiên, một hạn chế ở nghiên cứu này cũng cần được ghi nhận đó là mặc dù chọn các mô hình điều tra ngẫu nhiên, nhưng các hộ gia đình áp dụng các biện pháp kỹ thuật từ chọn giống, trồng, chăm sóc, mật độ trồng... chưa đồng nhất có thể là lý do giải thích sự biến động về các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất quả giữa các mô hình, dẫn đến số lượng cây trội được tuyển chọn/cây dự tuyển ở mỗi độ tuổi không đồng nhất (ở tuổi 14 và tuổi 20, mỗi độ tuổi chỉ chọn được 2 cây trội; ở tuổi 6 và tuổi 12, mỗi độ tuổi chỉ chọn được 1 cây trội).

5. Kết luận

Trên cơ sở đáp ứng các tiêu chí về năng suất quả và các chỉ tiêu sinh trưởng, yếu tố cấu thành năng suất, kết hợp với phương pháp phân tích thứ bậc (AHP) đã tuyển chọn được 21 cây trội Thanh mai từ 63 cây dự tuyển. Tùy theo độ tuổi các cây trội được tuyển chọn có độ vượt so với trung bình lâm phần từ 9,3 đến 83,5% về đường kính gốc, từ 6,0 đến 34,8% về chiều cao cây, từ 13,3 đến 66,7% về đường kính tán, từ 7,4 đến 50,7% về chiều dài tán, từ 18,2 đến 103,5% về năng suất quả, và bình quân xếp hạng vượt từ 18 đến 68%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả nghiên cứu của Đề tài: “Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen cây Thanh mai (*Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don) tại một số tỉnh miền Bắc”,

mã số NVQG-2019.07. Tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng đã hỗ trợ kinh phí để nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu này. Tác giả xin chân thành cảm ơn Ths. Đinh Thị Ngọc đã hỗ trợ thu thập số liệu cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vietnam Ministry of Science and Technology (2017), *National Standard TCVN 8755:2017 Forest Tree Cultivars - Plus Tree* (in Vietnamese).
- [2] Vietnam Ministry of Science and Technology (2020), *National Standard TCVN 8761-2:2020 Forest Tree Cultivars - Testing for Value of Cultivation and Use. Part 2: Non-Timber Forest Tree For Fruit and Seed Products* (in Vietnamese).
- [3] D.T. Le, T.T. Phung, D.B.M. Nguyen, et al. (2023), “Evaluating growth, productivity and economic efficiency of models of growing *Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don for fruit in Van Don district, Quang Ninh province”, *Journal of Agriculture and Rural Development*, **14**, pp.34-44 (in Vietnamese).
- [4] Vietnam Ministry of Agriculture and Rural Development (2006), *Industry Standards 04 TCN 147-2006 Standards for Recognition of Forestry Plant Varieties* (in Vietnamese).
- [5] T.L. Saaty (1970), *Optimization in Integers and Related Extremal Problems*, RWS Publications, 295pp.
- [6] The R Foundation (2023), “The R project for statistical computing”, <https://www.r-project.org/>, accessed 10 August 2023.
- [7] N.V. Tuan (2014), *Data Analysis with R*, Ho Chi Minh City General Publishing House, 518pp (in Vietnamese).
- [8] V.H. Trieu (2007), *Non-Timber Forest Products Project in Vietnam Phase II*, Vietnam Publishing House of Natural Resources, Environment and Cartography, pp.899-904 (in Vietnamese).
- [9] L.D. Kha (2022), “Some problems of plus tree selection and field testing in forest tree breeding”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **2(3)**, pp.25-29 (in Vietnamese).
- [10] N.H. Tra, L.S. Trung, D.V. Thao (2019), “Identification and selection of plus trees of cinnamomum cassia with high bark volume and oil content for seedling production in Van Chan district, Yen Bai province”, *TNU Journal of Science and Technology*, **207(14)**, pp.153-160 (in Vietnamese).
- [11] L.T. Hai, T.H. Quy, D.H. Dang, et al. (2020), “Propagation of Trung Khanh chestnut (*Castranea mollissima* Blume) by grafting method”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **1(12)**, pp.54-60 (in Vietnamese).
- [12] H.V. Thang, N.T. Thang, P.D. Sam, et al. (2016), “Some plus trees of *Camellia sasanqua* Thunb. having high yield of seed and oil in Nghe An province”, *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **9(10)**, pp.40-42 (in Vietnamese).
- [13] L.S. Doanh, N.T.M. Duong, K.D. Anh, et al. (2019), “Initial results of selecting and breeding *Castanopsis boissii* by grafting method”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **1(4)**, pp.107-113 (in Vietnamese).
- [14] H.T. Loc, N.V. Du, N.T.T. Huong (2020), “Results of selecting dominant plants Hoang Van's *Canarium nigrum* Swingle”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **2(8)**, pp.68-74 (in Vietnamese).
- [15] H.V. Thang (2019), “Results of research on selecting *Prunus arborea* varieties to serve afforestation to provide large timber in the Northern provinces”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **1(6)**, pp.114-121 (in Vietnamese).
- [16] L.D. Kha (2018), “Some issues in selecting non-timber forest product varieties”, *Vietnam Journal of Agriculture Rural Development*, **11**, pp.66-72 (in Vietnamese).
- [17] L.D. Moi, L.D. Cu, T.M. Hoi, et al. (2001), *Essential Oil Plant Resources in Vietnam - Illicium Verum*, **1**, Vietnam Agriculture Publishing House, pp.109-116 (in Vietnamese).
- [18] L.D. Kha (2017), *Research on Selecting Varieties, Breeding and Growing Techniques for Melaleuca with High Yield and Quality of Essential Oil*, Vietnam Agriculture Publishing House, Hanoi, 147pp (in Vietnamese).
- [19] K.T.H. Ninh (2016), *Research on Selecting and Breeding Melaleuca with High Essential Oil Content and 1,8-Cineole Ratio*, Doctoral Thesis in Forestry, Vietnamese Academy of Forest Sciences, 97pp (in Vietnamese).

QUY ĐỊNH VỀ BÀI BÁO ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài báo gửi đăng trên Tạp chí phải là bài báo nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài báo trên các tạp chí khác cho đến khi có quyết định xét duyệt của Ban Biên tập.

Bài báo dài không quá 10 trang (bao gồm cả bảng biểu, ghi chú, tài liệu tham khảo và phụ lục); font chữ: Times New Roman; cỡ chữ 13; khổ giấy A4, lề trên 2 cm, lề dưới 2 cm, lề trái 3 cm, lề phải 2 cm.

Bài báo gửi qua Hệ thống gửi bài trực tuyến tại địa chỉ https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/about/submissions hoặc có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam) hoặc qua hòm thư điện tử: khoahocvacongnghevietnam@most.gov.vn.

Cấu trúc của các loại bài báo khác nhau có thể thay đổi tùy theo loại hình nghiên cứu và nội dung của bài báo. Sau đây là chi tiết các thành phần chính của bài báo.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, in đậm, không gạch chân hay viết nghiêng.
- Tên bài báo phải ngắn gọn, rõ ràng và phù hợp với nội dung bài báo.
- Phía dưới tên bài báo là tên tác giả không viết chức danh và học hàm, học vị. Nếu có nhiều tác giả làm việc ở các cơ quan khác nhau thì tên tác giả được đánh số ^(1,2,...) ở phía trên. Dấu hoa thị (*) chỉ tác giả liên hệ, được viết ở cuối trang đầu tiên của bài báo.
- Khí liệt kê cơ quan công tác của tác giả, cần nêu rõ tên cơ quan và địa chỉ cơ quan (số nhà, tên đường, phường, quận, thành phố, quốc gia) bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh (khoảng 160-250 từ). Nêu được mục đích, phương pháp nghiên cứu chính, kết quả nghiên cứu và kết luận chủ yếu. Từ khóa bằng cả tiếng Việt và tiếng Anh theo thứ tự alphabet (ít nhất 3 từ khóa). Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

1. Đặt vấn đề/Dẫn nhập/Mở đầu

Định nghĩa vấn đề; tóm lược vấn đề nghiên cứu đã được công bố trong và ngoài nước, nêu mục tiêu nghiên cứu và giải thích sự lựa chọn đề tài và mục tiêu nghiên cứu để thấy được tính thời sự, tính khoa học và sự cần thiết của vấn đề nghiên cứu.

2. Đối tượng/Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu cần trình bày tiêu chuẩn lựa chọn, đặc điểm đối tượng nghiên cứu. Phương pháp nghiên cứu cần nêu rõ cách tiếp cận nghiên cứu, loại hình nghiên cứu, phương pháp đo lường, công thức tính cỡ mẫu, phương pháp xử lý số liệu, mô tả kỹ các kỹ thuật tiến hành trong nghiên cứu; các quan điểm, lập luận, ý kiến tranh luận, các dẫn chứng...

3. Kết quả

Trình bày đầy đủ, khách quan các kết quả thu được sau nghiên cứu, các kết quả này phải phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu. Các số liệu phải chính xác và khớp với nhau.

Phần kết quả nghiên cứu chỉ trình bày các kết quả nghiên cứu của đề tài, không giải thích, so sánh và bàn luận.

4. Bàn luận (phần này có thể gộp với phần kết quả)

Chủ yếu bàn luận các vấn đề liên quan đến mục tiêu đề tài. Nhận xét, đánh giá một cách khách quan các kết quả nghiên cứu, có so sánh với các tác giả khác để khẳng định hoặc phủ định những hiểu biết đã có, qua đó nêu được những điểm mới và đóng góp của đề tài. Dự báo hướng nghiên cứu tiếp và khả năng ứng dụng các kết quả nghiên cứu vào thực tiễn.

5. Kết luận

Nêu kết quả nghiên cứu chủ yếu của đề tài có tính khái quát liên quan đến mục tiêu nghiên cứu, đề xuất các vấn đề tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN (nếu có)

Tác giả cảm ơn các tổ chức/cá nhân đã tài trợ kinh phí hoặc hỗ trợ cho nghiên cứu.

Phụ lục (nếu có)

Đăng tải bảng số liệu, thông tin để hỗ trợ thêm cho nội dung bài báo.

Chú thích và tài liệu tham khảo

Chú thích được đánh số theo thứ tự xuất hiện ^(1,2,3,...) và được trình bày ngay ở cuối trang viết (footnote). Các tài liệu tham khảo được đánh số theo thứ tự xuất hiện để chỉ dẫn chúng được trích dẫn ở đâu trong bài báo. Số thứ tự được đánh trong ngoặc vuông, ví dụ: [3] với một hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Lưu ý:

- Đối với trích dẫn trong bài báo: tài liệu tham khảo có nhiều hơn một tác giả chỉ để tên tác giả đầu tiên và cộng sự, viết tắt là cs, ví dụ: T.V. Nguyen và cs (năm xuất bản) [thứ tự trong danh mục tài liệu tham khảo].
- Đối với danh mục tài liệu tham khảo cuối bài: tài liệu tham khảo bằng tiếng Anh, các tài liệu không phải tiếng Anh cần được dịch sang tiếng Anh và chú thích ở cuối câu, ví dụ: (in Vietnamese), (in French)...
- Tài liệu tham khảo là các đường link cần bổ sung ngày truy cập.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập(số)**, trang/số trang/trang đầu-trang cuối (nếu có), số DOI (nếu có), URL (nếu có), ngày truy cập (ghi rõ ngôn ngữ nào nếu không phải tài liệu bằng tiếng Anh).

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn: liệt kê đầy đủ tên tác giả (chữ viết tắt đưa lên trước) với những tài liệu tham khảo có ≤3 tác giả; liệt kê 3 tác giả đầu tiên và theo sau là "et al." khi có từ 4 tác giả trở lên.

Năm xuất bản: năm xuất bản của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

Tên tài liệu được trích dẫn: là tên bài báo, chương/phần sách... (chỉ viết hoa chữ cái đầu, trừ tên riêng và sau dấu hai chấm), viết trong ngoặc kép.

Tên nguồn có thể là tên tạp chí, tên sách, hay tên tài liệu gốc của tài liệu được trích dẫn (phần này được *in nghiêng*), viết hoa chữ cái đầu tiên của mỗi từ chính.

Tập(số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này **in đậm**).

Trang/số trang/trang đầu cuối phần ảnh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Nếu có ≥2 tài liệu tham khảo do cùng tác giả đầu tiên và cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a, 1986b...).

Nếu có một số tài liệu tham khảo có cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: A. Amber (1982, p.39).

Chi tiết vui lòng xem thêm tại: https://b.vjst.vn/index.php/ban_b/quy-dinh-bai-viet.

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Toà soạn không trả lại bản thảo.
- Bài viết chỉ được đăng khi phản biện nhận xét về chất lượng bài báo đồng ý cho đăng.
- Bản quyền: tác giả đồng ý trao bản quyền bài viết (bao gồm cả phần tóm tắt) cho Ban Biên tập Tạp chí.

Quy định này áp dụng từ năm 2022 trở đi.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng; kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của khoa học y - dược

4. Khoa học nông nghiệp

- 4.1. Trồng trọt
- 4.2. Chăn nuôi
- 4.3. Thú y
- 4.4. Lâm nghiệp
- 4.5. Thủy sản
- 4.6. Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản
- 4.7. Các lĩnh vực khác của khoa học nông nghiệp

5. Khoa học xã hội và nhân văn

- 5.1. Tâm lý học
- 5.2. Kinh tế và kinh doanh
- 5.3. Khoa học giáo dục
- 5.4. Xã hội học
- 5.5. Pháp luật
- 5.6. Khoa học chính trị
- 5.7. Địa lý kinh tế và xã hội
- 5.8. Thông tin đại chúng và truyền thông
- 5.9. Lịch sử và khảo cổ học
- 5.10. Ngôn ngữ học và văn học
- 5.11. Triết học, đạo đức và tôn giáo
- 5.12. Nghiên cứu về khu vực và quốc tế
- 5.13. Các lĩnh vực khác của khoa học xã hội và nhân văn

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

Volume 66 - Number 9 - September 2024

Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất của vật liệu phân hủy sinh học chế tạo từ nhựa polyhydroxyalkanoates gia cường cellulose vi khuẩn.

Nguyễn Ngọc Diệp, Đoàn Hoàng Linh, Nguyễn Tiến Đạt, Đặng Thảo Yến Linh, Trương Thị Nguyệt Anh

Thiết kế cấu trúc nano bạc tuần hoàn 2D tạo hiệu ứng cộng hưởng plasmon bề mặt vùng hồng ngoại gần ứng dụng cho cảm biến.

Nguyễn Xuân Bách, Nguyễn Hữu Tư, Phạm Thanh Sơn, Ngô Quang Minh

Bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào chủng nấm sợi thực phẩm *Aspergillus luchuensis* AL1 sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Thái Hạnh Dung, Trịnh Thị Minh, Ngô Ánh Ngọc, Nguyễn Thị Ngân Giang, Trần Văn Tuấn

Tổng quan về phân loại nấm Thượng hoàng *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) và một số góc nhìn mới về nấm Thượng hoàng ở Việt Nam.

Lê Thị Hoàng Yến, Đồng Thị Hoàng Anh, Lê Thị Thanh Huyền, Nguyễn Duy Trinh, Trịnh Tam Kiệt

Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng phòng trừ sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker) gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

Đỗ Thị Mai Trinh, Lê Thanh Bình, Hồ Thị Nguyệt, Nguyễn Đào Thanh Hương, Nguyễn Thị Liên, Đặng Ngọc Tân, Trương Minh Ngọc

Nghiên cứu chọn giống nấm *Cordyceps militaris* mang gen giới tính đơn cho năng suất, chất lượng quả thể cao và ổn định.

Vũ Xuân Tào, Trần Bảo Trâm, Đào Ngọc Anh, Trương Thị Chiên, Bùi Lan Phương, Đỗ Thị Kim Trang

Nghiên cứu thiết kế hệ thống giám sát không dây, từ xa hàm lượng nước trong dầu máy biến áp truyền tải.

Hoàng Ngọc Nhân, Khổng Minh Đăng, Phạm Chí Công

Báo cáo ca bệnh rối loạn dự trữ glycogen do đột biến dị hợp tử phức trên gen *G6PC*.

Trần Thị Hải, Nguyễn Khánh Linh, Phạm Quang Anh, Nguyễn Thị Hòa, Nguyễn Hải Hà

Đặc điểm các mảnh xương sọ bảo quản để ghép tự thân tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

Dương Đức Hùng, Dương Công Nguyên, Trần Thị Hằng

Tối ưu hoá công thức viên nén dập thẳng chứa cao khô sậy phun Mật nhân (*Eurycoma longifolia* Jack).

Nguyễn Võ Tuyết Như, Nguyễn Thị Ái Nhi, Đỗ Quang Dương, Nguyễn Đức Hạnh

Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất liên quan aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester của dược chất aceclofenac.

Triệu Quốc Vương, Nguyễn Trần Ngọc Vi, Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Trương Ngọc Tuyền

Thực trạng và giải pháp thúc đẩy nông dân sản xuất cây ăn trái theo tiêu chuẩn VietGAP ở tỉnh Hậu Giang.

Trần Quốc Nhân

Chọn lọc cây trội Thanh mai (*Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don) với mục tiêu lấy quả tại huyện Vân Đồn, tỉnh Quảng Ninh.

Lê Đức Thắng

1 Factors affecting the properties of biodegradable material based on polyhydroxyalkanoates reinforced with bacterial cellulose.

Ngoc Diep Nguyen, Hoang Linh Doan, Tien Dat Nguyen, Thao Yen Linh Dang, Thi Nguyet Anh Tuong

7 Near-infrared plasmonic sensors based on surface plasmon resonances in two-dimensional metasurfaces of silver nanostructures.

Xuan Bach Nguyen, Huu Tu Nguyen, Thanh Son Pham, Quang Minh Ngo

12 A preliminary study on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the food filamentous fungus *Aspergillus luchuensis* AL1.

Hanh Dung Thai, Thi Minh Trinh, Anh Ngoc Ngo, Thi Ngan Giang Nguyen, Van Tuan Tran

18 A review: The classification system of the medicinal mushroom Shanghuang *Tropicoporus linteus* (*Phellinus linteus*) and some new perspective on Sanghuang in Vietnam.

Thi Hoang Yen Le, Thi Hoang Anh Dong, Thi Thanh Huyen Le, Duy Trinh Nguyen, Tam Kiet Trinh

26 Isolation and selection of active *Bacillus* strains that have the ability to control black-headed insect (*Opisina arenosella* Walker) causing damage to coconut trees in Ben Tre province.

Thi Mai Trinh Do, Thanh Binh Le, Thi Nguyet Ho, Dao Thanh Huong Nguyen, Thi Lien Nguyen, Ngoc Tan Dang, Minh Ngoc Trung

33 Research on selecting high and stable yield and fruiting body quality strains of *Cordyceps militaris* mushroom carrying a single mating-type gene.

Xuan Tao Vu, Bao Tram Tran, Ngoc Anh Dao, Thi Chien Trung, Lan Phuong Bui, Thi Kim Trang Do

39 Research to design a wireless and remote surveillance system for water content in transmission transformer oil.

Ngoc Nhan Hoang, Minh Dang Khong, Chi Cong Pham

44 A case report of glycogen storage disease caused by compound heterozygous variants in the *G6PC* gene.

Thi Hai Tran, Khanh Linh Nguyen, Quang Anh Pham, Thi Hoa Nguyen, Hai Ha Nguyen

49 Characteristics of the cryopreservation cranial bone flaps for autologous transplantation at the Tissue Bank, Viet Duc University Hospital.

Duc Hung Duong, Cong Nguyen Duong, Thi Hang Tran

53 Optimisation of direct compression tablet formulation containing spray-dried extract of *Eurycoma longifolia* Jack.

Vo Tuyet Nhu Nguyen, Thi Ai Nhi Nguyen, Quang Duong Do, Duc Hanh Nguyen

60 Synthesis and standardisation of aceclofenac ethyl ester and aceclofenac benzyl ester as related aceclofenac impurity.

Quoc Vuong Trieu, Tran Ngoc Vi Nguyen, Huu Lac Thuy Nguyen, Ngoc Tuyen Truong

68 Current status and solutions to promote fruit-tree growers to adopt VietGAP standards in Hau Giang province.

Quoc Nhan Tran

74 Plus tree selection of *Myrica esculenta* Buch.-Ham.ex D.Don with the goal of fruit in Van Don district, Quang Ninh province.

Duc Thang Le