

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

TẬP 66, SỐ 11, THÁNG 11 NĂM 2024
VOLUME 66, NUMBER 11, NOVEMBER 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

Khảo sát tính chất quang của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp ion Cr^{3+} chế tạo bằng phương pháp khuếch tán nhiệt

Nguyễn Mai Anh¹, Đàm Quang Học¹, Phạm Thị Lan Hương², Nguyễn Văn Quang^{1*}

¹Khoa Hóa học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2, phường Xuân Hoà, TP Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Hóa học và Kỹ thuật Môi trường, Trường Đại học Phenikaa, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/7/2023; ngày chuyển phản biện 11/7/2023; ngày nhận phản biện 10/8/2023; ngày chấp nhận đăng 15/8/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu này báo cáo quy trình đơn giản chế tạo bột huỳnh quang $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp Cr^{3+} ($\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$) với các nồng độ khác nhau (0,2-1,5%) bằng phương pháp khuếch tán nhiệt. Kết quả giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) cho thấy, vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ có cấu trúc monoclinic. Thêm vào đó, ion Cr^{3+} được tìm thấy đã thay thế cho ion Ga^{3+} trong mạng nền $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$. Phổ kích thích huỳnh quang (PLE) và phổ huỳnh quang (PL) chỉ ra rằng vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ nhận được có thể kích thích tốt ở bước sóng 442 nm và phát xạ trong dải rộng bước sóng từ 620 đến 850 nm. Dưới điều kiện thực nghiệm, nồng độ Cr^{3+} pha tạp tối ưu để vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ cho phát xạ mạnh nhất là 1,0% mol. Với đặc tính phát xạ trong dải rộng từ đỏ - đỏ xa và hấp thụ trong vùng xanh lam, vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ có tiềm năng lớn trong ứng dụng chế tạo đèn LED chiếu sáng chuyên dụng cho cây trồng. Thêm vào đó, quy trình chế tạo vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ được cho là đơn giản, rẻ tiền và độ lặp lại cao cho phép có thể chế tạo với quy mô số lượng lớn.

Từ khóa: $\text{Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$, khuếch tán nhiệt, phát xạ đỏ xa.

Chỉ số phân loại: 1.3, 1.4, 2.5

Luminescent properties of Cr^{3+} -doped $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ materials synthesised by thermal diffusion method

Mai Anh Nguyen¹, Quang Hoc Dam¹, Thi Lan Huong Pham², Van Quang Nguyen^{1*}

¹Faculty of Chemistry, Hanoi Pedagogical University 2, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen City, Vinh Phuc Province, Vietnam

²Faculty of Biotechnology, Chemistry and Environmental Engineering, Phenikaa University, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 8 July 2023; revised 10 August 2023; accepted 15 August 2023

Abstract:

This study reports a simple fabrication process for producing Cr^{3+} doped $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ ($\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$) phosphor powder with different concentrations (0.2-1.5%) by thermal diffusion method. The X-ray diffraction pattern (XRD) analysis revealed that the $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ phosphor has a monoclinic structure. Additionally, the Cr^{3+} ions were found to replace the Ga^{3+} ions in the $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ lattice. Photoluminescence excitation (PLE) and photoluminescence (PL) spectra showed that the obtained $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ phosphor, which could be well excited by a wavelength of 442 nm, strongly emits in a wide wavelength range from 620 to 850 nm. Under the experimental conditions, the $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ phosphor exhibited the highest photoluminescence (PL) intensity when doped at 1.0% mol. With characteristic emission in the far-red light region and absorption in the blue light region, the synthesised $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ phosphor has great potential for plant growth LED applications. In addition, the process of synthesising $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ phosphor has been found to be simple, low-cost, and highly repeatable so that it can be used for large-scale production.

Keywords: far-red emitting, $\text{Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$, thermal diffusion.

Classification numbers: 1.3, 1.4, 2.5

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenvanquang83@hpu2.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Cr^{3+} là ion kim loại chuyển tiếp, có cấu hình lớp ngoài cùng $3d^3$, với phân lớp $3d$ chưa được điền đầy số electron, nên dễ dàng nhận các electron kích thích và chuyển hóa thành phát xạ đặc trưng trong vùng đỏ đậm xung quanh bước sóng ~ 695 nm, vùng đỏ xa ~ 700 -750 nm và thậm chí là vùng hồng ngoại ~ 800 -900 nm, tùy thuộc vào tương tác của mạng tinh thể [1-7]. Gallium oxide (Ga_2O_3) được biết đến là chất bán dẫn vùng cấm rộng (cỡ 4,9 eV tại nhiệt độ phòng) [8]. Ga_2O_3 có nhiều tính chất ưu việt như độ bền nhiệt-hóa học cao và có khả năng dẫn điện tốt. Ga_2O_3 có nhiều dạng cấu trúc, trong đó cấu trúc $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ được hình thành ở nhiệt độ cao ($>900^\circ\text{C}$), do đó nó thường có tính ổn định [9-11]. Vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ và các dạng biến tính của nó đã được các nhà khoa học nghiên cứu cho nhiều lĩnh vực ứng dụng khác nhau như: chiếu sáng, năng lượng, xử lý môi trường, cảm biến, an ninh [10]. Trong lĩnh vực chiếu sáng, vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp các ion kim loại đất hiếm và kim loại chuyển tiếp cho phát xạ trong vùng ánh sáng khác nhau đã được quan tâm nghiên cứu sâu rộng [9, 11-14]. Ví dụ như vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp Eu^{3+} [15], $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp Ni^{2+} [7], $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp Cr^{3+} [9, 11-14], $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ đồng pha tạp Cr^{3+} , In^{3+} [8]. Như đã biết Chlorophyll (a, b), Phytochrome (P_r , P_{fr}) của cây trồng hấp thụ hai vùng bước sóng (400-500 nm) và (600-750 nm) [14], việc chế tạo các điốt phát quang (LED) có phổ phát xạ phù hợp với dải hấp thụ Chlorophyll và Phytochrome của cây trồng được các nhà khoa học trong nước và thế giới quan tâm mạnh mẽ. Hiện nay, các loại bột huỳnh quang thương mại phát xạ đỏ thường được sản xuất trong điều kiện khắc nghiệt và dựa trên ion pha tạp đất hiếm Eu^{2+} ($\text{M}_2\text{Si}_2\text{N}_8:\text{Eu}^{2+}$ và $\text{MAlSiN}_3:\text{Eu}^{2+}$) [13, 16]. Các sản phẩm thu được thường có giá thành đắt và không thân thiện với môi trường. Các nghiên cứu chế tạo bột huỳnh quang phát xạ đỏ xa vẫn còn hạn chế. Do đó, nghiên cứu chế tạo loại bột huỳnh quang thay thế, khắc phục được các nhược điểm trên và phù hợp với ứng dụng LED cây trồng sẽ là xu hướng tất yếu. Trong nghiên cứu mới nhất về vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp Cr^{3+} cho phát xạ trong dải rộng từ vùng ánh sáng đỏ đến hồng ngoại gần với cực đại xung quanh bước sóng ~ 730 -740 nm, được đánh giá là khá phù hợp với sắc tố Phytochrome đỏ xa của cây trồng [14]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu các điều kiện thực nghiệm ảnh hưởng đến cấu trúc tinh thể và tính chất quang của loại vật liệu này chưa thật sự chi tiết và hệ thống.

Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu đã tập trung nghiên cứu chế tạo vật liệu huỳnh quang $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ bằng phương pháp khuếch tán nhiệt. Đồng thời ảnh hưởng của nồng độ pha tạp đến cấu trúc và tính chất quang của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ sẽ được nghiên cứu và thảo luận chi tiết.

2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thực nghiệm

Vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ được chế tạo bằng phương pháp khuếch tán nhiệt từ các tiền chất ban đầu gồm Ga_2O_3 (Ga_2O_3 ,

độ sạch 99,8%) và muối chromi (III) nitrate ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, độ sạch 99,5%). Quy trình thực nghiệm chế tạo vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ gồm các bước sau: đầu tiên, cho hỗn hợp 1,8744 g Ga_2O_3 và lượng $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ với tỷ lệ xác định trong 50 ml nước cất hai lần, sau đó khuấy tan bằng máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, tiếp tục khuấy ở nhiệt độ 100°C cho đến khi tạo hỗn hợp chất rắn ướt. Trong bước tiếp theo, hỗn hợp chất rắn ướt được sấy ở 150°C trong 5 giờ để thu được hỗn hợp chất rắn khô. Cuối cùng, hỗn hợp chất rắn khô được thiêu kết tại nhiệt độ 1400°C , trong không khí 5 giờ để thu được bột huỳnh quang $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$.

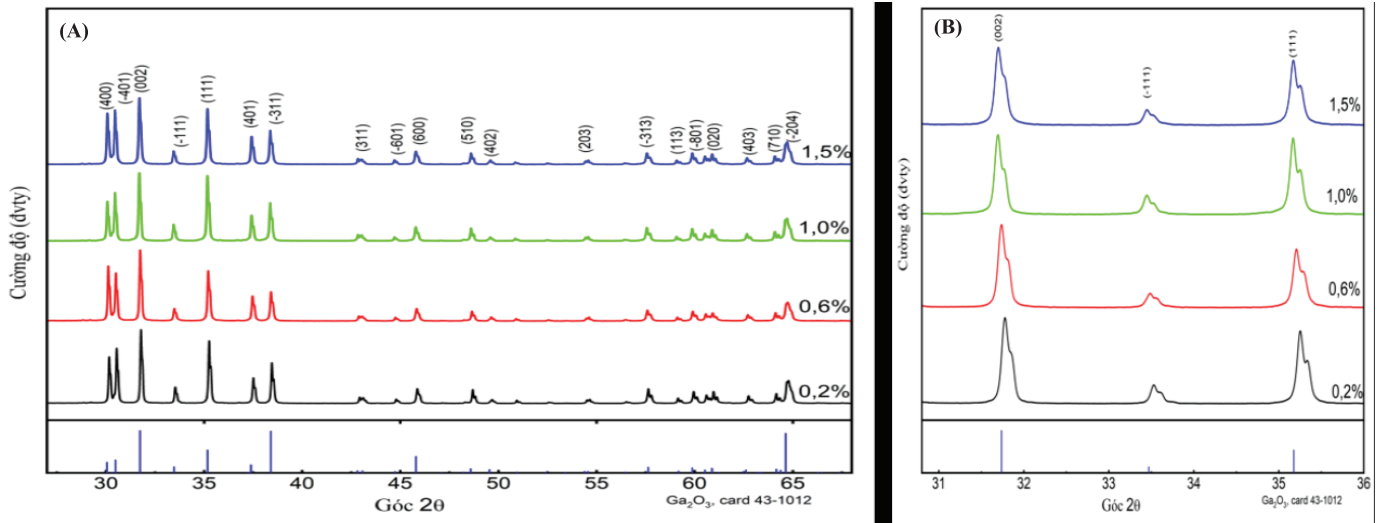
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Cấu trúc tinh thể của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:\text{Cr}^{3+}$ được phân tích bằng phép đo giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD) dựa trên thiết bị Siemens D6000 với bước sóng tới $\lambda_{\text{Cu}} = 1,5406$ Å và góc quét 25 - 70° . Hình thái bề mặt của vật liệu được nghiên cứu bằng hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) trên cơ sở thiết bị JEOL JSM-7600F. Tính chất quang của các mẫu được nghiên cứu thông qua phép đo phổ huỳnh quang (PL) và phổ kích thích huỳnh quang (PLE) sử dụng thiết bị quang phổ NanoLog (Horiba Jobin Yvon) nguồn kích thích là đèn Xenon với công suất 450 W. Các mẫu khảo sát được đo ở nhiệt độ phòng.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Cấu trúc tinh thể vật liệu

Cấu trúc tinh thể của vật liệu sẽ ảnh hưởng lớn đến tính chất quang của vật liệu. Do đó, trong nghiên cứu này đầu tiên các mẫu nghiên cứu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp với các nồng độ khác nhau sẽ được phân tích cấu trúc nhờ vào phép đo giản đồ nhiễu xạ tia X (XRD). Hình 1 trình bày giản đồ XRD của mẫu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3:x\%\text{Cr}^{3+}$ ($x=0,2-1,5$) chế tạo bằng phương pháp khuếch tán nhiệt tại 1400°C thời gian 5 giờ trong môi trường không khí. Kết quả XRD nhận được trên hình 1A cho thấy tất cả các mẫu đều xuất hiện các đỉnh nhiễu xạ tại góc $2\theta = 30,06^\circ; 30,46^\circ; 31,68^\circ; 33,46^\circ; 35,18^\circ; 37,41^\circ; 38,42^\circ; 42,85^\circ; 44,72^\circ; 45,80^\circ; 48,58^\circ; 49,62^\circ; 54,56^\circ; 57,55^\circ; 59,88^\circ; 60,5^\circ; 60,9^\circ; 62,6^\circ; 64,11^\circ; 64,7^\circ; 69,4^\circ$ và $70,3^\circ$ tương ứng với các mặt phẳng (400), (-401), (002), (-111), (111), (401), (-311), (311), (-601), (600), (510), (402), (203), (-313), (113), (-801), (020), (710), (-204), (403), (420) và (022) của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ với cấu trúc monoclinic (theo thẻ chuẩn JCPDS 43-1012) [14]. Khi tăng nồng độ pha tạp từ 0,2-1,5%, cường độ các đỉnh nhiễu xạ trên giản đồ XRD của các mẫu không thay đổi nhiều và không xuất hiện bất kỳ đỉnh nhiễu xạ mới nào chứng tỏ nồng độ pha tạp Cr^{3+} không ảnh hưởng đến cấu trúc tinh thể của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$. Tuy nhiên, giản đồ XRD của các mẫu ở độ phóng đại cao hơn (hình 1B) cho thấy có sự dịch vị trí đỉnh nhiễu xạ về góc 2θ nhỏ hơn khi nồng độ pha tạp tăng lên từ 0,2-1,5%. Các nghiên cứu chỉ ra rằng nếu ion có bán kính lớn thay thế cho ion có bán kính bé hơn sẽ làm vị trí đỉnh nhiễu xạ dịch về góc 2θ nhỏ [1-7]. Ngược lại ion có bán kính bé thay thế cho ion có bán kính lớn hơn sẽ làm vị trí đỉnh nhiễu xạ dịch về góc 2θ lớn. Nếu bán kính ion pha tạp và ion thay thế tương



Hình 1. (A) Giản đồ nhiễu xạ tia X của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:x\%Cr}^{3+}$ ($x=0,2-1,5$) thiêu kết tại 1400°C thời gian 5 giờ trong môi trường không khí, (B) XRD ở góc $2\theta=31-36^\circ$. x là nồng độ pha tạp (%).

tự nhau, vị trí đỉnh XRD thường không bị xô dịch nhưng sẽ gây ra giảm tính đối xứng trong mạng nền [1, 7, 14]. Trong trường hợp của chúng tôi, Cr^{3+} ($r=0,615 \text{ \AA}$) có bán kính gần tương tự với bán kính ion Ga^{3+} ($0,620 \text{ \AA}$), do đó sự thay thế của ion Cr^{3+} cho Ga^{3+} chỉ làm thay đổi tính đối xứng trong mạng nền mà không gây ra sự dịch đỉnh nhiễu xạ như công bố trong tài liệu tham khảo [14].

Thiêu kết tại 1400°C thời gian 5 giờ trong môi trường không khí.

Để xác định kích thước tinh thể của các mẫu nghiên cứu, nhóm nghiên cứu sử dụng công thức Scherrer (1) [9, 14, 16]:

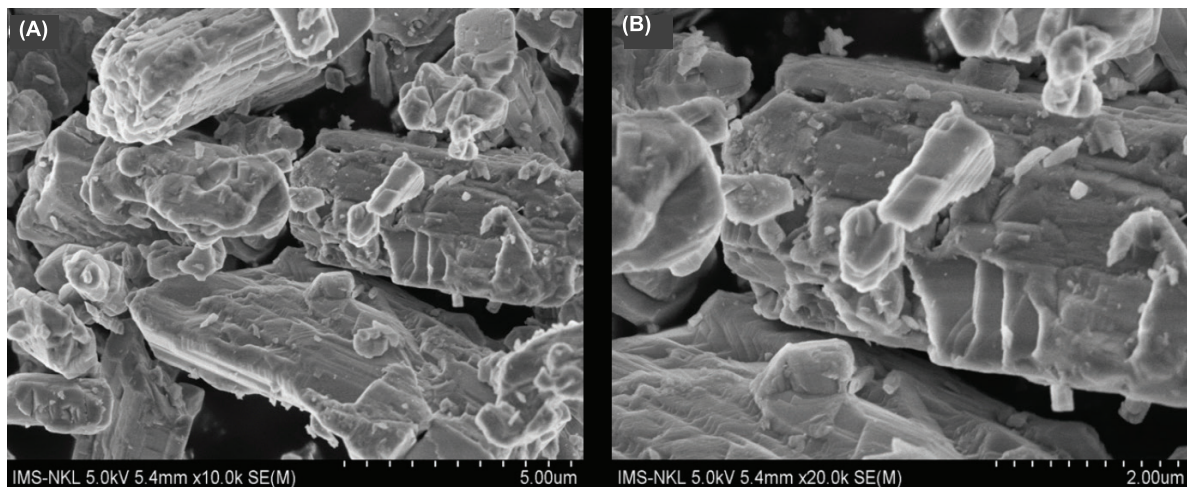
$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (1)$$

trong đó: D (nm) là kích thước tinh thể; $K=0,9$ và λ ($1,54 \text{ \AA}$) lần lượt là hằng số Scherrer và bước sóng tới của tia X; θ (rad) và β (rad) là góc nhiễu xạ và bán độ rộng vạch phổ.

Tính trên mặt tinh thể (002) tại góc $2\theta=31,68^\circ$, kích thước tinh thể thu được của các mẫu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp 0,2; 0,6; 1,0 và 1,5% Cr^{3+} lần lượt là 43,45; 43,50; 44,21 và 44,72 nm. Có thể thấy rằng, kích thước tinh thể của các mẫu pha tạp với các nồng độ khác nhau thay đổi không nhiều chỉ dao động từ 43-44 nm, là bằng chứng quan trọng cho thấy sự thay thế của ion Cr^{3+} vào vị trí bán kính tương tự của Ga^{3+} .

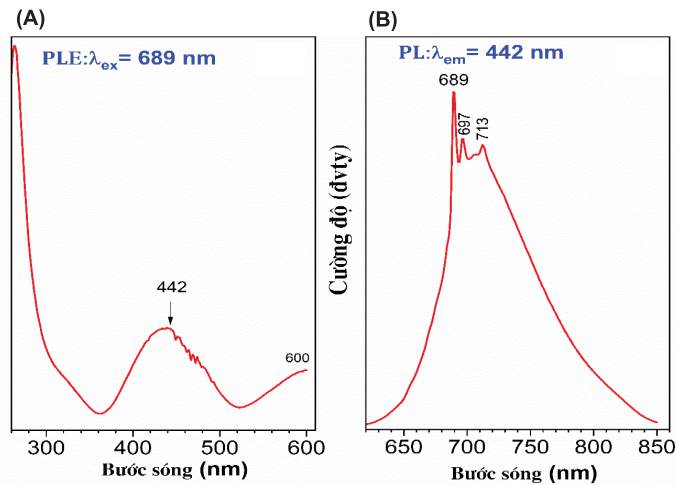
3.2. Hình thái bề mặt vật liệu

Ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) của mẫu vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:1\%Cr}^{3+}$ thiêu kết ở 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí với hai độ phóng đại khác nhau 10.000 và 20.000 lần được trình bày trên hình 2. Kết quả trên hình 2A cho thấy, vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:1\%Cr}^{3+}$ có dạng hạt với kích thước phân bố không đồng nhất. Hạt nhỏ nhất và hạt to nhất có kích thước khoảng 150 và $5 \mu\text{m}$. Như chỉ ra trên hình 2B, nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng các hạt với kích thước bé có xu hướng kết tụ thành các hạt có kích thước lớn hơn.

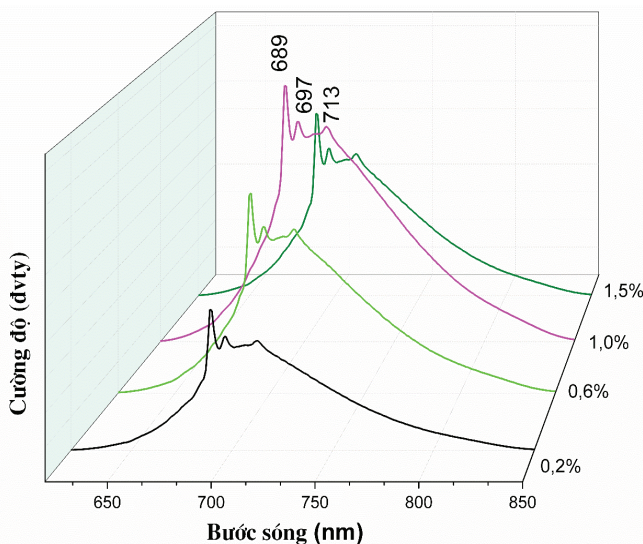


Hình 2. Ảnh hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FESEM) nhận được của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:1,0\%Cr}^{3+}$ thiêu kết ở 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí. (A) Phóng đại 10.000 lần; (B) Phóng đại 20.000 lần.

3.3. Tính chất quang của vật liệu



Hình 3. Phổ kích thích huỳnh quang đo tại bước sóng phát xạ 689 nm (A) và phổ kích thích huỳnh quang tại bước sóng 442 nm (B) của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}1,0\%\text{Cr}^{3+}$ thiêu kết ở 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí.



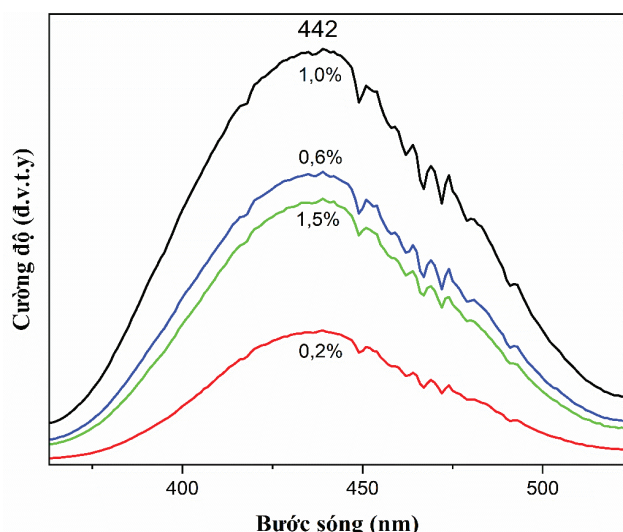
Hình 4. Phổ huỳnh quang tại bước sóng 442 nm của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}x\%\text{Cr}^{3+}$ ($x=0,2-1,5$) thiêu kết tại 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí.

Để nghiên cứu tính chất quang của vật liệu, nhóm nghiên cứu sử dụng phép đo phổ PL và phổ PLE của các mẫu. Hình 3 trình bày phổ PLE và PL của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}1\%\text{Cr}^{3+}$ thiêu kết ở 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí. Kết quả phổ PLE nhận được trên hình 3A cho thấy, vật liệu hấp thụ mạnh ở ba vùng xung quanh bước sóng: 260-360 nm với cực đại tại 270 nm; 380-510 nm với cực đại tại 442 nm và từ 520 đến lớn hơn 600 nm với cực đại tại khoảng 600 nm. Đỉnh hấp thụ xung quanh 270 nm được lý giải là dịch chuyển

điện tử từ $\text{Cr}^{3+} \rightarrow \text{O}^{2-}$ của mạng nền. Trong khi đó hai đỉnh hấp thụ tại 442 nm và 600 nm được cho là do dịch chuyển điện tử từ mức ${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_1$ và ${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_2$ của ion Cr^{3+} [9, 14, 16]. Phổ PL trên hình 3B cho thấy, vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}1\%\text{Cr}^{3+}$ phát xạ trong dải bước sóng rộng từ 620-850 nm với các đỉnh tại 689, 697 và 713 nm. Đỉnh 697 nm có nguồn gốc từ sự chuyển mức năng lượng tích hợp gồm ${}^2\text{E} \rightarrow {}^4\text{A}_2$, trong khi hai đỉnh 689 và 713 nm liên quan đến chuyển mức vạch R_1 và R_2 [9, 14]. Kết quả phổ phát xạ thu được của nghiên cứu này cũng khá phù hợp với công bố gần đây [14].

Để khảo sát tìm ra nồng độ pha tạp tối ưu cho phát xạ mạnh nhất, chúng tôi tiến hành đo phổ huỳnh quang của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}x\%\text{Cr}^{3+}$ ($x = 0,2; 0,6; 1,0$ và $1,5$) thiêu kết ở 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí và kết quả thu được chỉ ra trên hình 4. Quan sát kết quả hình 4 cho thấy các mẫu hình dạng phổ huỳnh quang của các mẫu có nồng độ pha tạp khác nhau là không thay đổi, tuy nhiên cường độ của chúng phụ thuộc rất mạnh vào nồng độ pha tạp. Trong khoảng nồng độ pha tạp từ 0,2-1,5%, cường độ PL tăng dần và sau đó nó bị giảm xuống ở nồng độ 1,5%. Hiện tượng cường độ PL giảm xuống ở nồng độ cao (lớn hơn 1%) gọi là hiện tượng dập tắt huỳnh quang theo nồng độ. Có thể giải thích hiện tượng dập tắt huỳnh quang như sau, khi nồng độ tăng từ 0,2-1,0%, mật độ tâm tái hợp tăng dẫn đến cường độ PL tăng theo. Tuy nhiên, khi pha tạp ở nồng độ cao (1,5%), mật độ tâm tái hợp lớn dẫn đến khoảng cách giữa các ion pha tạp $\text{Cr}^{3+}\text{-Cr}^{3+}$ gần nhau hơn, khi đó xảy ra quá trình truyền năng lượng từ ion Cr^{3+} này ion Cr^{3+} khác và kết quả là làm cho cường độ PL giảm xuống [2-4]. Do đó, nhóm nghiên cứu có thể kết luận rằng nồng độ pha tạp tối ưu cho phát xạ PL tốt nhất trong nghiên cứu này là 1,0%. Sự hấp thụ trong vùng xanh lam (442 nm) và phát xạ trong dải rộng 620-850 nm của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:}\text{Cr}^{3+}$ cho thấy nó có tiềm năng rất lớn trong định hướng ứng dụng chế tạo đèn LED chuyên dụng cho cây trồng [9, 14, 17].

Để khẳng định nhận định trên, nhóm nghiên cứu đo phổ PLE của các mẫu và kết quả chỉ ra trên hình 5. Có thể thấy rằng, hình dạng phổ PLE của các mẫu cũng không thay đổi khi tăng nồng độ pha tạp từ 0,2-1,5%. Tuy nhiên, cường độ PLE phụ thuộc rất mạnh vào nồng độ. Quy luật thay đổi cường độ PLE gần giống với sự thay đổi cường độ PL trên hình 4. Có nghĩa là cường độ PLE tăng dần ở nồng độ từ 0,2-1,0% và sau đó giảm xuống ở nồng độ 1,5%. Kết quả này chứng minh rằng, mẫu 1,0% hấp thụ mạnh nhất, gián tiếp cho thấy khả năng phát xạ cao nhất như đã được chỉ ra trên hình 4 [2, 3].



Hình 5. Phổ kích thích huỳnh quang đo tại bước sóng phát xạ 689 nm của vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:x}\%\text{Cr}^{3+}$ ($x=0,2-1,5$) thiêu kết tại 1400°C thời gian 5 giờ trong không khí.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chế tạo thành công vật liệu phát quang $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ bằng phương pháp khuếch tán nhiệt. Quy trình chế tạo có tính đơn giản, rẻ tiền, độ lặp lại cao cho phép có thể chế tạo với số lượng lớn. Kết quả chỉ ra rằng ion Cr^{3+} đã thay thế vào vị trí của ion Ga^{3+} trong mạng nền $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$. Bột huỳnh quang thu được có kích thước phân bố rộng từ 150-5 μm , cho phát xạ trong dải rộng từ 620-850 nm và có thể được kích thích tốt bằng hai bước sóng 442-600 nm. Dưới điều kiện thực nghiệm, chúng tôi đã tìm thấy mẫu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ pha tạp 1% Cr^{3+} ủ tại 1.400°C thời gian 5 giờ trong môi trường không khí cho phát xạ tốt nhất.

Với đặc tính phát xạ trong dải rộng vùng đỏ - đỏ xa và hấp thụ trong vùng xanh lam (442 nm), vật liệu $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ có tiềm năng lớn trong chế tạo đèn LED chiếu sáng chuyên dụng cho cây trồng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 qua đề tài có mã số SV.2022.HPU2.01. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Adachi (2021), "Review-photoluminescence properties of Cr^{3+} -activated oxide phosphors", *ECS Journal of Solid State Science and Technology*, **10**(2), DOI: 10.1149/2162-8777/abdc01.

[2] N.V. Quang, N.T. Huyen, N. Tu, et al. (2021), "A high quantum efficiency plant growth LED by using a deep-red-emitting $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ phosphor", *Dalt. Trans.*, **50**(36), pp.12570-12582.

[3] M.T. Tran, D.Q. Trung, N. Tu, et al. (2021), "Single-phase far-red-emitting $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{:Cr}^{3+}$ phosphor for application in plant growth LEDs", *Journal of Alloys and Compounds*, **884**(5), pp.1-13, DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.161077.

[4] L.Q. Duong, N.T. Tuan, N.V. Quang, et al. (2020), "Synthesis and photoluminescence properties of deep-red-emitting $\text{CaYAlO}_4\text{:Cr}^{3+}$ phosphors", *J. Electron. Mater.*, **49**, pp.7464-7471, DOI: 10.1007/s11664-020-08457-4.

[5] X.S. Wang, J.Q. Situ, X.Y. Ying, et al. (2015), " $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ nanoparticle: A new platform with near infrared photoluminescence for drug targeting delivery and bio-imaging simultaneously", *Acta Biomaterialia*, **22**, pp.164-172, DOI: 10.1016/j.actbio.2015.04.010.

[6] Q. Shao, H. Ding, L. Yao, et al. (2018), "Photoluminescence properties of a $\text{ScBO}_3\text{:Cr}^{3+}$ phosphor and its applications for broadband near-infrared LEDs", *RSC Adv.*, **8**, pp.12035-12042, DOI: 10.1039/C8RA01084F.

[7] S. Zhou, G. Feng, B. Wu, et al. (2007), "Intense infrared luminescence in transparent glass-ceramics containing $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:Ni}^{2+}$ nanocrystals", *J. Phys. Chem. C.*, **111**(20), pp.7335-7338, DOI: 10.1021/jp068370i.

[8] L. Li, K. Xu, Y. Wang, et al. (2016), "Enhanced persistent luminescence and photocatalytic properties of $\text{Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ by In^{3+} doping", *Opt. Mater. Express.*, **6**, pp.164-172, DOI: 10.1364/OME.6.001122.

[9] J. Zhong, Y. Zhuo, F. Du, et al. (2022), "Efficient broadband near-infrared emission in the $\text{GaTaO}_4\text{:Cr}^{3+}$ phosphor", *Adv. Opt. Mater.*, **10**, pp.1-8, DOI: 10.1002/adom.202101800.

[10] S.I. Stepanov, V.I. Nikolaev, V.E. Bougrov, et al. (2016), "Gallium oxide: Properties and applications - A review", *Rev. Adv. Mater. Sci.*, **44**, pp.63-86.

[11] A. Luchechko, V. Vasylytsiv, Y. Zhydashkevskyy, et al. (2020), "Luminescence spectroscopy of Cr^{3+} ions in bulk single crystalline $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ ", *Journal of Physics D: Applied Physics*, **53**(35), DOI: 10.1088/1361-6463/ab8c7d.

[12] E. Nogales, J.A. García, B. Mndez, et al. (2007), "Red luminescence of Cr in $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3$ nanowires", *J. Appl. Phys.*, **101**(3), pp.2-6, DOI: 10.1063/1.2434834.

[13] Y.Y. Lu, F. Liu, Z. Gu, et al. (2011), "Long-lasting near-infrared persistent luminescence from $\beta\text{-Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ nanowire assemblies", *Journal of Luminescence*, **131**(12), pp.2784-2787, DOI: 10.1016/j.jlumin.2011.07.007.

[14] S.F. Hu, M.H. Fang, R.S. Liu (2020), "Ultra-high-efficiency near-infrared $\text{Ga}_2\text{O}_3\text{:Cr}^{3+}$ phosphor and controlling of phytochrome", *Journal of Materials Chemistry C*, **32**, DOI: 10.1039/D0TC02705G.

[15] G. Liu, X. Duan, H. Li, et al. (2008), "Preparation and photoluminescence properties of Eu-doped Ga_2O_3 nanorods", *Materials Chemistry and Physics*, **110**(2-3), pp.206-211, DOI: 10.1016/j.matchemphys.2008.02.012.

[16] T.Y. Shen, Y. Wu, Y.F. Shen, et al. (2014), "Photophysical properties and electronic structure of $\text{Sr}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu}^{2+}$ ", *Journal Synth. Cryst.*, **43**, pp.1212-1216.

[17] S.M. Hwang, J.B. Lee, S.H. Kim, et al. (2012), "A review on inorganic phosphor materials for white LEDs", *J. Korean Cryst. Growth Cryst. Technol.*, **22**, pp.233-240, DOI: 10.6111/JKCGCT.2012.22.5.233.

Tổng hợp chấm lượng tử carbon từ nút bấc nhằm thử nghiệm khả năng chỉ thị ion Fe^{3+} và nhuộm huỳnh quang tế bào biểu bì hành tây

Ngô Khoa Quang^{1*}, Lê Vũ Trường Sơn²

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, phường Phú Nhuận, TP Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế, Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng, 459 Tôn Đức Thắng, phường Hòa Khánh Nam, quận Liên Chiểu, TP Đà Nẵng, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/3/2022; ngày chuyển phản biện 12/3/2022; ngày nhận phản biện 4/4/2022; ngày chấp nhận đăng 7/4/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chế tạo chấm lượng tử carbon (CDs) từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt. CDs chế tạo được có đường kính trung bình $6,2 \pm 2,7$ nm. Phổ hấp thụ cho thấy, hai đỉnh ở vị trí 217 và 280 nm tương ứng với chuyển dời $\pi-\pi^*$ và $n-\pi^*$ của liên kết C=C và C=O. Khi thay đổi bước sóng kích thích từ 340 đến 500 nm, đỉnh phổ phát quang của CDs cũng dịch chuyển đồng thời từ 445 đến 605 nm. Kết quả cho thấy, phổ phát quang phụ thuộc bước sóng kích thích của vật liệu. Dựa vào các tính chất lý hóa được nghiên cứu, chúng tôi đã sử dụng CDs để thăm dò khả năng phát hiện ion Fe^{3+} dựa trên hiện tượng dập tắt huỳnh quang. Kết quả tính toán cho thấy, giới hạn phát hiện đạt giá trị $\sim 0,012$ mg/ml. Bên cạnh đó, CDs cũng đã được sử dụng để nhuộm huỳnh quang tế bào biểu bì hành tây. Mẫu tế bào hành tây lần lượt phát huỳnh quang màu xanh lá cây và màu đỏ dưới sự kích thích của ánh sáng tím (bước sóng 405 nm) và xanh lá cây (bước sóng 532 nm) chiếu từ laser diode. Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy tiềm năng ứng dụng của CDs trong các lĩnh vực liên quan đến cảm biến và chụp ảnh tế bào.

Từ khóa: chấm lượng tử carbon, huỳnh quang, nút bấc, thủy nhiệt.

Chỉ số phân loại: 1.3, 1.4, 2.5

Synthesis of carbon nanodots from wine cork for the detection of ferrum (III) ions and bioimaging of onion epidermal cells

Khoa Quang Ngo^{1*}, Vu Truong Son Le²

¹University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue Street, Phu Nhuan Ward, Hue City, Thua Thien Hue Province, Vietnam

²The University of Danang, University of Education, 459 Ton Duc Thang Street, Hoa Khanh Nam Ward, Lien Chieu District, Da Nang City, Vietnam

Received 9 March 2022; revised 4 April 2022; accepted 7 April 2022

Abstract:

In this study, we synthesised the carbon nanodots (CDs) from the waste wine cork using a hydrothermal method. The analysis results indicated the average diameter of CDs was 6.2 ± 2.7 nm. The UV-vis absorption spectrum shows two peaks around 217 and 280 nm, which are attributed to $\pi-\pi^*$ transition and $n-\pi^*$ transition of the C=C and the C=O bonds, respectively. When changing the excitation wavelength from 340 to 500 nm, the luminescence peak of CDs also shifts simultaneously from 445 to 605 nm. This result indicated excitation-dependent photoluminescence of the obtained CDs. Based on the studied physicochemical properties, we used CDs to probe the ability of Fe^{3+} ions detection using fluorescence quenching. The estimated results revealed that the detection limit reached ~ 0.012 mg/ml. Besides, CDs have also been used to stain the onion epidermal cells. The onion cells exhibit fluorescence in green and red under violet (405 nm) and green (532 nm) laser diode excitation, respectively. The initial result shows the potential applications of CDs in the fields related to cell imaging and sensing.

Keywords: carbon nanodots, fluorescence, hydrothermal synthesis, wine cork.

Classification numbers: 1.3, 1.4, 2.5

*Tác giả liên hệ: Email: nkquang@hueuni.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Trong những thập kỷ qua, các chấm lượng tử bán dẫn (SQDs) được xem như một trong các vật liệu nano phát huỳnh quang ưu việt, với các tính chất quang học nổi bật. SQDs đã được sử dụng rộng rãi để làm đầu dò nano (nanoprobe) trong các ứng dụng liên quan đến cảm biến và chụp ảnh sinh học, do tính ổn định quang học cao, phổ phát xạ hẹp, phổ kích thích dải rộng, cường độ phát quang mạnh và bước sóng phát quang có thể điều chỉnh dựa vào kích thước hạt [1-3]. Nhược điểm chính đối với nhóm vật liệu này chính là sự xuất hiện của các ion kim loại nặng (Cd^{2+} , Te^{2-} , Pb^{2+} , Hg^{2+}) trong thành phần cấu trúc [4-6]. Những mối lưu tâm lớn về độ an toàn khi sử dụng chấm lượng tử trong nghiên cứu y sinh đã được đề cập trong một số công trình trước đây [4-6].

Là một loại vật liệu thuộc họ carbon nano, các hạt nano carbon phát quang với kích thước nhỏ hơn 10 nm (thường được gọi là chấm lượng tử carbon hoặc CDs) đang thu hút sự quan tâm đặc biệt từ nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới, nhờ vào những tính chất hóa lý độc đáo và thú vị [7-9]. CDs có đầy đủ các tính chất ưu việt của vật liệu SQDs truyền thống, như phát quang cường độ mạnh và tương thích sinh học tốt (biocompatible) [5]. Bên cạnh đó, vật liệu này còn có những đặc tính vượt trội khác, chẳng hạn như khả năng chống tẩy màu huỳnh quang (photobleaching) khi tiếp xúc với ánh sáng cường độ cao, phổ phát xạ phụ thuộc vào bước sóng kích thích và tính độc với tế bào (cytotoxicity) thấp. Do vậy, trong hơn một thập kỷ qua, CDs đã được nghiên cứu chuyên sâu và rộng rãi cho các ứng dụng trong lĩnh vực cảm biến và chụp ảnh huỳnh quang, nhờ khai thác các đặc tính quang học đặc biệt này [9].

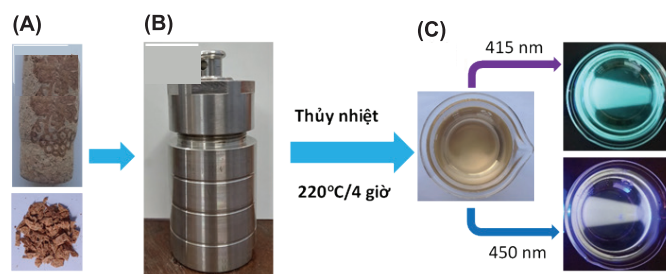
Đến nay, đã có nhiều phương pháp được áp dụng để chế tạo CDs, sử dụng cả hóa chất và nguyên liệu tự nhiên. Trong các phương pháp đó, thủy nhiệt được coi là một lựa chọn ưu tiên nhờ vào quy trình chế tạo đơn giản, thiết bị không phức tạp và chi phí thấp [10]. Thêm vào đó, nhằm cải thiện phương pháp chế tạo theo hướng thân thiện với môi trường, giảm thiểu việc sử dụng hóa chất trong quá trình tổng hợp vật liệu nano, các nguồn nguyên liệu có nguồn gốc từ tự nhiên được xem như nguồn tiền chất lý tưởng để sản xuất CDs với các đặc tính mong muốn. Nhiều công trình nghiên cứu đã ứng dụng phương pháp thủy nhiệt để chế tạo vật liệu CDs có nguồn gốc tự nhiên như nước ép cam, nước ép chuối, sữa đậu nành, củ khoai tây, vỏ bưởi, nước dừa... [11-14].

Trong giải pháp được nêu ra ở đây, chúng tôi trình bày kỹ thuật chế tạo có chi phí thấp và thân thiện với môi trường được ứng dụng để tổng hợp CDs từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt [15]. Các nghiên cứu chi tiết liên quan đến độc tính đối với tế bào cũng được khảo sát. Trong đó, các tế bào gốc trung mô (MSCs) vẫn phát triển khá tốt khi hàm lượng carbon trong môi trường nuôi lên đến $0,25 \times$ (với $1 \times = 0,51 \text{ mg/ml}$). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung trình bày các kết quả nghiên cứu liên quan đến khả năng ứng dụng CDs làm đầu dò chỉ thị huỳnh quang, trong việc phát hiện ion Fe^{3+} và nhuộm huỳnh quang tế bào biểu bì hành tây.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Quy trình chế tạo CDs

Quy trình chế tạo dung dịch CDs từ nút bấc bằng phương pháp thủy nhiệt được mô tả trong hình 1 [15]. Đầu tiên, nút bấc từ chai rượu Vang Đalat® (5,0 g) được làm sạch, sấy khô và cắt thành từng miếng nhỏ, sau đó được cho vào 80 ml nước cất hai lần. Hỗn hợp này được xử lý bằng phương pháp thủy nhiệt ở nhiệt độ 220°C trong 4 giờ, sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng. Sản phẩm thu được là dung dịch có màu nâu đen, được lọc qua giấy lọc và ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút, trong 15 phút, nhằm loại bỏ các hạt kích thước lớn. Dung dịch cuối cùng có màu nâu nhạt, được bảo quản ở 4°C trong điều kiện tránh ánh sáng để chuẩn bị cho các phép đo tiếp theo.



Hình 1. Quy trình chế tạo vật liệu chấm lượng tử carbon từ nút bấc. Nút bấc từ chai rượu vang Đalat® được cắt nhỏ (A) và cho vào bình thủy nhiệt (B). Sản phẩm CDs dưới ánh sáng mặt trời và dưới ánh sáng đèn LED có bước sóng định lần lượt là 415 và 450 nm (C). Quan sát ảnh chụp bằng mắt thường có thể thấy cường độ ánh sáng phát quang khá mạnh.

2.2. Phát hiện ion Fe^{3+}

Các muối kim loại MgSO_4 ($\geq 99,0\%$), KCl ($\geq 99,5\%$), $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,5\%$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98,0\%$), $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0\%$), HgCl_2 ($\geq 99,5\%$), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ($\geq 99,0\%$), $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0\%$), $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0\%$), Na_2CO_3 ($\geq 99,8\%$) và $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99,0\%$) được mua từ Công ty hóa chất Xilong Scientific, Trung Quốc. Nước sử dụng trong các thí nghiệm

là nước cất hai lần. Dung dịch của các muối kim loại khác nhau được pha ở nồng độ 0,5 mg/ml. Nồng độ dung dịch chứa CDs được giữ không đổi ở mức 0,51 mg/ml trong tất cả các bước. Đối với phép thử chỉ thị huỳnh quang ion Fe^{3+} , hệ mẫu được pha ở các nồng độ lần lượt là 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 và 0,5 mg/ml. Sau đó, 1 ml dung dịch muối được cho vào cuvette đựng 1 ml dung dịch CDs và hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng trong 3 phút. Cuối cùng, phép đo phổ quang phát quang của mẫu trước và sau khi bổ sung ion kim loại được ghi lại.

2.3. Nhuộm màu tế bào biểu bì hành tây

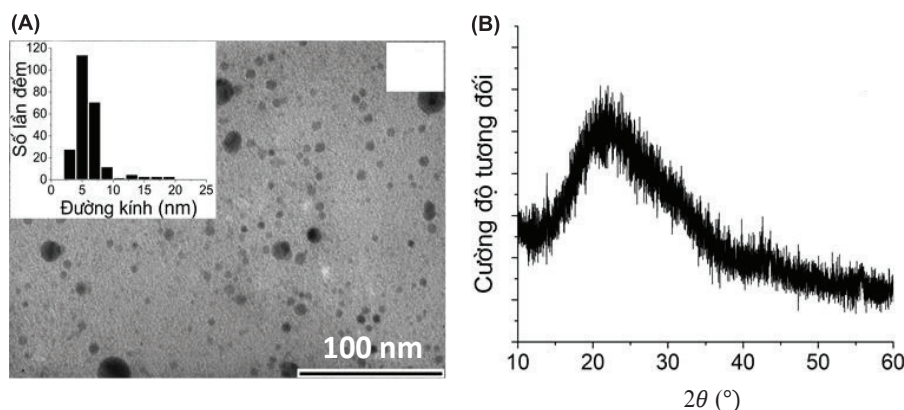
Quy trình nhuộm tế bào biểu bì hành tây được chúng tôi thực hiện dựa trên công bố trước đây [16]. Cụ thể, dao mổ số 11 được sử dụng để rạch một ô vuông có cạnh khoảng 1 cm ở mặt trong vảy củ hành tây còn tươi. Sau đó, chúng tôi dùng panh lột nhẹ lớp biểu bì và cho vào cốc đựng cồn trong khoảng 30 giây để làm mất nước. Tiếp theo, lớp biểu bì được cho vào cốc đựng dung dịch CDs ở nồng độ 0,51 mg/ml trong khoảng 60 giây và được rửa lại trong nước cất. Cuối cùng, mẫu được trải cẩn thận trên lam kính và đặt lại bằng lamén để quan sát dưới kính hiển vi.

2.4. Thiết bị ứng dụng để phân tích

Để phân tích cấu trúc của CDs chế tạo được, chúng tôi tiến hành đo nhiễu xạ tia X (XRD) trên hệ đo D8 Advance (Bruker, Đức) với góc 2θ được quét từ 10 đến 60° . Hình dạng và kích thước của CDs trong dung dịch được khảo sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) JEOL JEM-1010 (Nhật Bản), hoạt động ở điện áp gia tốc 80 kV. Chúng tôi tiến hành đo phổ huỳnh quang (PL) và phổ kích thích huỳnh quang (PLE) trên máy đo FS5 spectrofluorometer của Edinburgh Instruments (Anh), đồng thời phép đo phổ hấp thụ từ ngoại - khả kiến (UV-Vis) được thực hiện bằng thiết bị GENESYS 10S UV-Vis của Thermo Scientific (Mỹ). Ảnh huỳnh quang từ tế bào được chụp trên kính hiển vi huỳnh quang do nhóm nghiên cứu phát triển và mẫu được kích thích sử dụng laser diode bước sóng 405 và 532 nm.

3. Kết quả và bàn luận

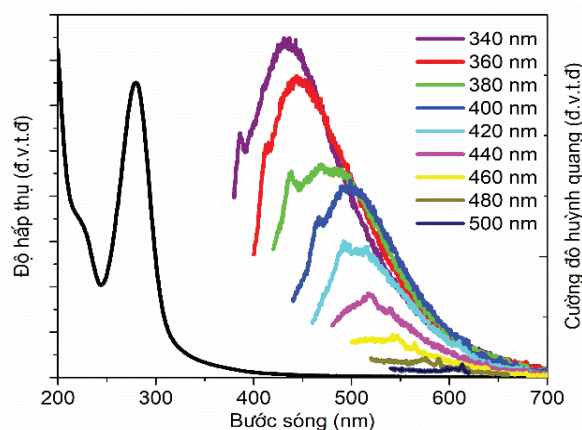
Hình 2A là ảnh kích thước hạt của dung dịch chứa CDs được chụp bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Ảnh TEM chỉ ra các hạt phân bố rời rạc và không kết đám. Để



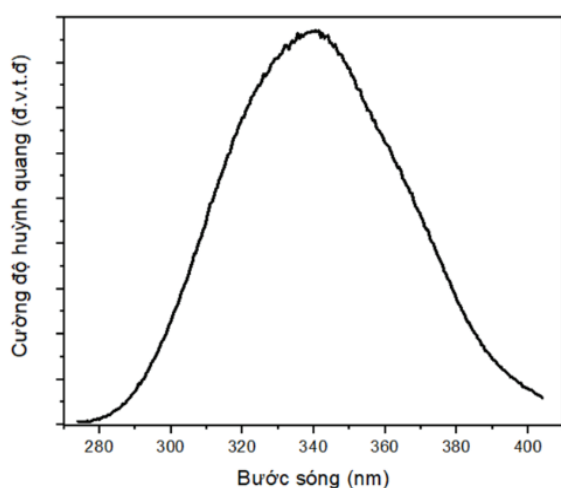
Hình 2. (A) Ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua của dung dịch chấm lượng tử carbon với thanh định cỡ là 100 nm; (B) Giản đồ nhiễu xạ tia X của vật liệu.

xác định được sự phân bố đường kính hạt CDs, các vị trí khác nhau trên ảnh TEM được chọn ngẫu nhiên và đo kích thước bằng phần mềm ImageJ. Biểu đồ phân bố đường kính kích thước hạt CDs được thể hiện trong hình vẽ phía góc trên bên trái hình 2A. Kết quả cho thấy, các hạt carbon có kích thước nằm trong khoảng từ 2,8 đến 19,6 nm, với giá trị đường kính trung bình $6,2 \pm 2,7$ nm. Giản đồ nhiễu xạ tia X mô tả trên hình 2B, ứng với thẻ chuẩn PDF 00-050-0926 được trích xuất từ thư viện Trung tâm Dữ liệu nhiễu xạ quốc tế - ICDD. Kết quả cho thấy, một đỉnh rộng ở vị trí góc $20-21^\circ$, đây là đỉnh nhiễu xạ đặc trưng của họ mặt (002) của vật liệu carbon có cấu trúc vô định hình [8].

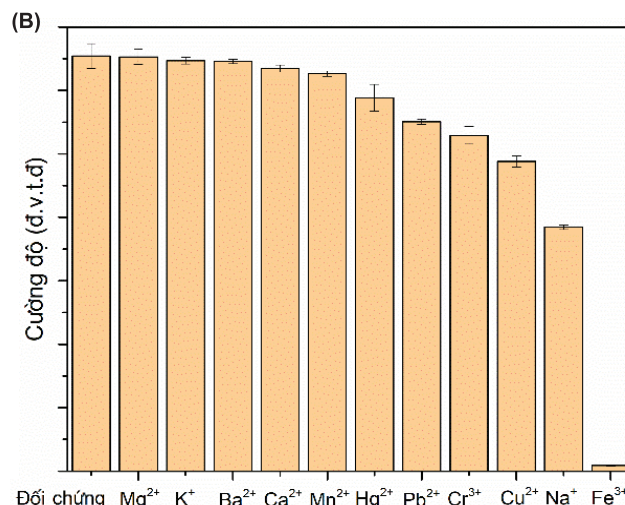
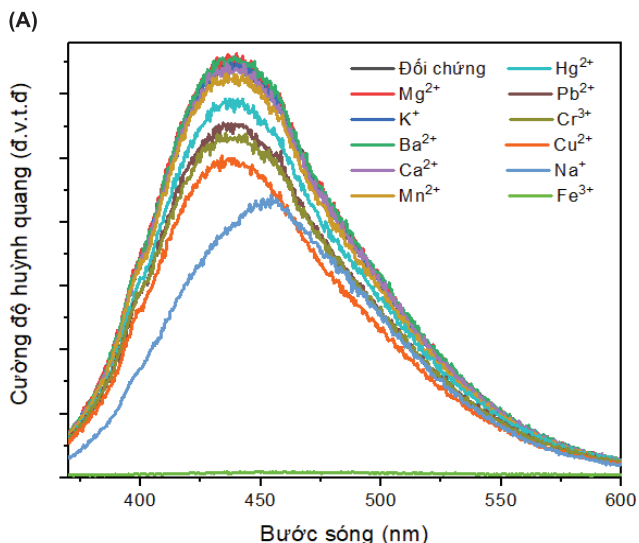
Để làm rõ tính chất quang học của vật liệu CDs, phổ hấp thụ và phổ phát quang phụ thuộc vào bước sóng kích thích đã được ghi lại. Như được mô tả trên hình 3 (bên trái), phổ hấp thụ của vật liệu sau khi thủy nhiệt ở 220°C có hai vị trí: 217 và 280 nm. Đây là đỉnh đặc trưng của chuyển dời $\pi-\pi^*$



Hình 3. Phổ hấp thụ và phổ phát quang của dung dịch chấm lượng tử carbon khi được kích thích ở các bước sóng từ 340 đến 500 nm (bước dịch chuyển là 20 nm).



Hình 4. Phổ kích thích phát quang của dung dịch chấm lượng tử carbon với bước sóng phát quang là 440 nm.



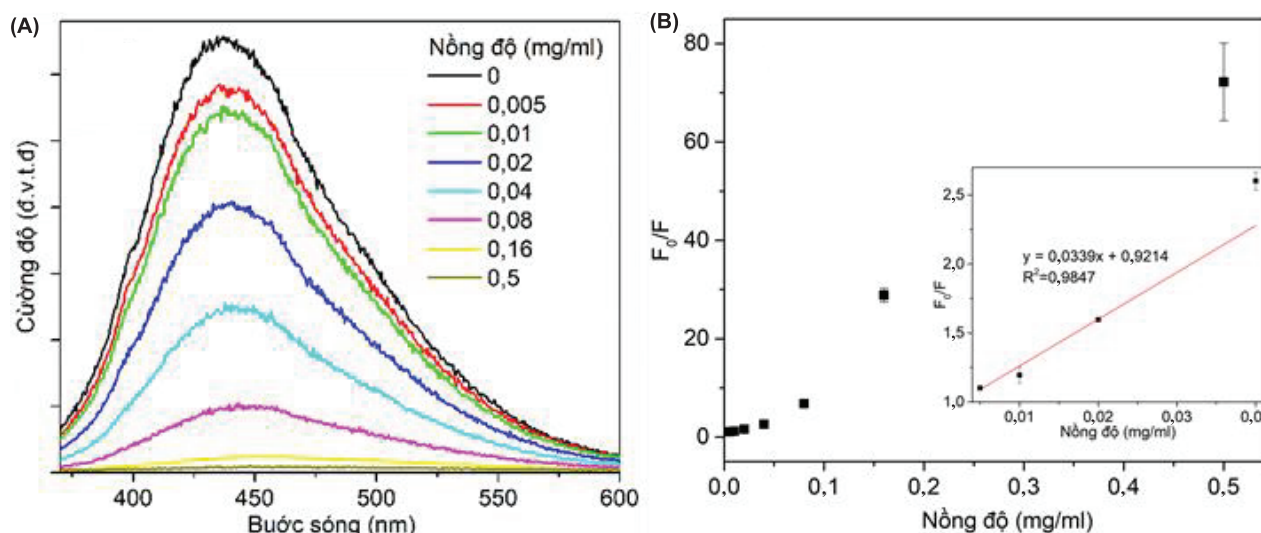
Hình 5. Tính chọn lọc của dung dịch chứa chấm lượng tử carbon trong khả năng chỉ thị huỳnh quang ion Fe³⁺. Dung dịch của các muối kim loại khác nhau được pha ở nồng độ 0,5 mg/ml. Nồng độ dung dịch chứa chấm lượng tử carbon được giữ không đổi ở mức 0,51 mg/ml. Phổ huỳnh quang trên hình A (tương ứng hình B mô tả dưới dạng biểu đồ hình cột) cho thấy, sự xuất hiện của ion Fe³⁺ gây ra sự dập tắt cường độ huỳnh quang của dung dịch chấm lượng tử carbon mạnh hơn so với một số ion kim loại khác.

và n- π^* tương ứng với liên kết C=C và C=O [13]. Phổ kích thích cũng được mô tả trong hình 4 với vùng bước sóng kích thích đạt hiệu suất cao nằm trong vùng từ 330 đến 350 nm. Nhằm làm rõ hơn tính chất quang học của vật liệu CDs, chúng tôi tiến hành đánh giá phổ huỳnh quang phụ thuộc bước sóng kích thích (hình 3, bên phải). Quan sát kết quả chúng ta có thể thấy, khi thay đổi bước sóng kích thích từ 340 đến 500 nm, đỉnh phổ phát quang của dung dịch cũng đồng thời thay đổi theo. Phổ phát quang có dạng dải rộng, trong đó, vị trí đỉnh phổ phát quang phụ thuộc vào bước sóng kích thích và có xu hướng dịch về phía bước sóng dài khi tăng bước sóng kích thích. Đối với vật

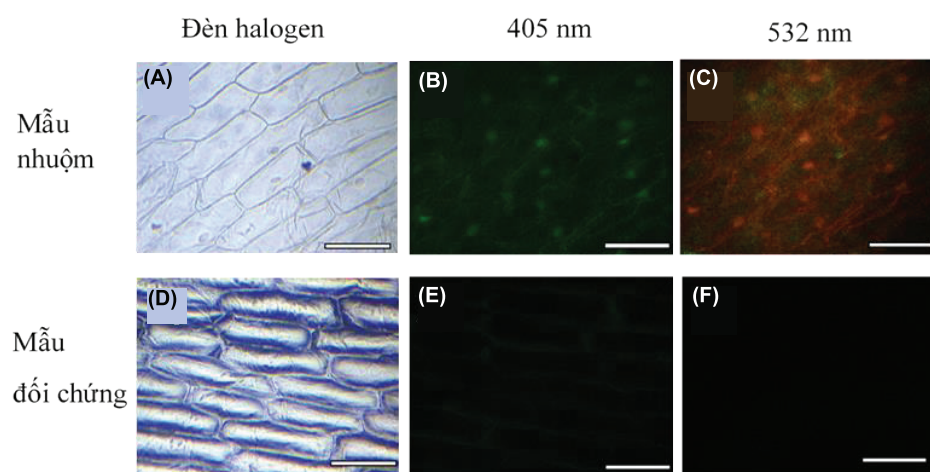
liệu CDs, cơ chế vật lý dẫn đến hiệu ứng phát quang nói trên vẫn đang là chủ đề nghiên cứu còn nhiều tranh luận [17]. Mặc dù nguyên nhân vẫn chưa được giải quyết một cách triệt để, phần lớn các kết quả nghiên cứu trước đây đều cho rằng sự phân bố kích thước hạt trong một vùng rộng và các chuyển dời quang học xảy ra do sự lai hóa trạng thái bề mặt (hybridization of surface state) giữa lõi carbon và các nhóm chức đã dẫn đến hiện tượng huỳnh quang đặc trưng trên của CDs [12, 14, 17]. Chi tiết kết quả phân tích các nhóm chức trên bề mặt CDs đã được trình bày trong công bố trước đây [15].

Sự thay đổi cường độ ánh sáng phát quang khi có mặt các ion kim loại Mg²⁺, K⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Na⁺ và Fe³⁺ được mô tả như trong hình 5. Chúng ta

thấy rằng, cường độ phát quang của dung dịch CDs đạt giá trị rất nhỏ khi có sự xuất hiện của ion Fe³⁺. Ngược lại, không có sự thay đổi lớn về cường độ ánh sáng huỳnh quang được quan sát sau khi cho các ion kim loại khác vào dung dịch chứa CDs. Các nghiên cứu trước đây nhận định rằng, ion Fe³⁺ có thể đã tạo ái lực lớn với CDs, điều này đã dẫn đến sự dập tắt mạnh hiện tượng huỳnh quang [18]. Kết quả bước đầu cho thấy, CDs có thể được sử dụng làm chất chỉ thị huỳnh quang trong việc phát hiện chọn lọc ion Fe³⁺. Đây cũng là cơ sở để chúng tôi tiến hành phép đo huỳnh quang với các nồng độ khác nhau của ion Fe³⁺.



Hình 6. (A) Phổ huỳnh quang của dung dịch chứa chấm lượng tử carbon ứng với các giá trị nồng độ khác nhau của ion Fe^{3+} ; (B) Các giá trị nồng độ của ion Fe^{3+} trong khoảng 0,005-0,5 mg/ml (được biểu diễn theo phương trình Stern-Volmer dựa vào tỷ số F_0/F và F_0 là giá trị tín hiệu cường độ huỳnh quang thu được tại bước sóng 435 nm ứng với trường hợp có và không có sự xuất hiện của ion Fe^{3+} (bước sóng kích thích là 340 nm)).



Hình 7. Ảnh chụp tế bào biểu bì hành tây dưới kính hiển vi huỳnh quang. Tế bào biểu bì hành tây được nhuộm trong môi trường có chứa chấm lượng tử carbon (A) và mẫu đối chứng - không được nhuộm (D) khi được chiếu bằng đèn halogen và laser diode có bước sóng 405 nm (B, E) và 532 nm (C, F). Thanh định cỡ có giá trị là 200 μm .

Hình 6 cho thấy, cường độ ánh sáng phát quang giảm dần ở bước sóng 435 nm khi nồng độ ion Fe^{3+} tăng dần. Điều này chỉ ra rằng, dung dịch chứa CDs khá nhạy với sự xuất hiện của ion Fe^{3+} . Các giá trị nồng độ của ion Fe^{3+} trong khoảng 0,005-0,5 mg/l được biểu diễn theo phương trình Stern-Volmer dựa vào tỷ số F_0/F [19]. Một điểm đáng lưu ý là đỉnh phổ huỳnh quang (hình 6A) hầu như không dịch chuyển giữa mẫu có và không có sự xuất hiện của ion Fe^{3+} . Hệ số tương quan (R^2) có giá trị 0,9847 trong khoảng nồng độ 0,005-0,04 mg/ml cho thấy mối quan hệ tuyến tính tốt. Giới hạn phát hiện được tính theo tiêu chí $3,3 \delta/m_{\text{slope}}$ có giá trị 0,012 mg/ml [20]. Trong đó, δ là độ lệch chuẩn (standard

deviation) của mẫu đối chứng và m_{slope} là hệ số góc của đường chuẩn. So sánh với các công bố trước đây liên quan đến việc phát hiện ion Fe^{3+} , kết quả có giá trị khá lớn [18-20]. Nhận định nguyên nhân ban đầu có thể do vật liệu CDs được chế tạo có nguồn gốc khác nhau cũng như hệ thống các mẫu ion Fe^{3+} được chúng tôi pha vẫn còn ở nồng độ khá lớn. Vì vậy, cần có nghiên cứu chi tiết hơn để đánh giá cụ thể vùng tuyến tính cũng như giới hạn phát hiện ion Fe^{3+} đối với vật liệu CDs được chế tạo từ nút bấc.

Tiếp theo, chúng tôi đã tiến hành thăm dò khả năng sử dụng dung dịch CDs làm thuốc nhuộm huỳnh quang đa sắc đối với tế bào biểu bì hành tây.

Ảnh chụp các tế bào biểu bì hành tây sau khi nhuộm được mô tả như trong hình 7. Quan sát hình 7B và 7C ta nhận thấy rằng, mẫu tế bào lần lượt phát huỳnh quang màu xanh lá cây và màu đỏ dưới sự kích thích của ánh sáng tím (bước sóng 405 nm) và xanh lá cây (bước sóng 532 nm) chiếu từ laser diode. Cụ thể, chúng ta có thể quan sát rõ thành và nhân của tế bào biểu bì hành tây, điều này cho thấy dung dịch chứa CDs đã đi vào bên trong. Trong khi đó, mẫu đối chứng (không được nhuộm trong dung dịch có CDs) không cho thấy sự xuất hiện của ánh sáng huỳnh quang trong cùng điều kiện chiếu sáng (hình 7E và 7F).

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tổng hợp thành công vật liệu CDs phát huỳnh quang đa sắc từ nguồn nguyên liệu tái chế có nguồn gốc tự nhiên. Sau khi thủy nhiệt nút bắc, dung dịch CDs chế tạo được cho thấy hiện tượng phổ phát quang phụ thuộc vào bước sóng kích thích và có khuynh hướng dịch về phía bước sóng dài khi tăng bước sóng kích thích. Dung dịch CDs chế tạo được cho thấy khả năng chỉ thị huỳnh quang ion Fe^{3+} khi có sự sụt giảm đáng kể về cường độ so với các ion kim loại khác. Hơn nữa, vật liệu CDs cũng đã được thử nghiệm thành công trong chụp ảnh huỳnh quang tế bào biểu bì hành tây. Kết quả bước đầu cho thấy, cần có thêm các nghiên cứu chi tiết trên vật liệu CDs chế tạo được để xem xét những ứng dụng cụ thể trong từng lĩnh vực, như chụp ảnh huỳnh quang hay vật liệu phát quang.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài khoa học và công nghệ cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2021-DHH-05. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Ren, B. Wang, C. Hu, et al. (2017), "Quantum dot probes for cellular analysis", *Anal. Methods*, **9**(18), pp.2621-2632, DOI: 10.1039/C7AY00018A.
- [2] C.B. Murray, D.J. Noms, M.G. Bawendi (1993), "Synthesis and characterisation of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites", *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, pp.8706-8715, DOI: 10.1021/ja00072a025.
- [3] Y. He, H.T. Lu, L.M. Sai, et al. (2008), "Microwave synthesis of water-dispersed CdTe/CdS/ZnS core-shell-shell quantum dots with excellent photostability and biocompatibility", *Adv. Mater.*, **20**(18), pp.3416-3421, DOI: 10.1002/adma.200701166.
- [4] Y. Su, Y. He, H. Lu, et al. (2009), "The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase-synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating", *Biomaterials*, **30**, pp.19-25, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.029.
- [5] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, S.N. Bhatia (2004), "Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots", *Nano Lett.*, **4**, pp.11-18, DOI: 10.1021/nl0347334.
- [6] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, et al. (2005), "Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles", *Nano Lett.*, **5**, pp.331-338, DOI: 10.1021/nl047996m.
- [7] S.N. Baker, G.A. Baker (2010), "Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights", *Angew. Chem. Int.*, **49**(38), pp.6726-6744, DOI: 10.1002/anie.200906623.
- [8] Y. Yang, J. Cui, M. Zheng, et al. (2012), "One-step synthesis of amino-functionalised fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonisation of chitosan", *Chem. Commun.*, **48**(3), pp.380-382, DOI: 10.1039/C1CC15678K.
- [9] M.L. Liu, B.B. Chen, C.M. Li, et al. (2019), "Carbon dots: Synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications", *Green Chem.*, **21**(3), pp.449-471, DOI: 10.1039/C8GC02736F.
- [10] X. Xu, L. Cai, G. Hu, et al. (2020), "Red-emissive carbon dots from spinach: Characterisation and application in visual detection of time", *Journal of Luminescence*, **227**, DOI: 10.1016/j.jlumin.2020.117534.
- [11] C. Zhu, J. Zhaia, S. Dong (2012), "Bifunctional fluorescent carbon nanodots: Green synthesis via soy milk and application as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction", *Chem. Commun.*, **48**(75), pp.9367-9369, DOI: 10.1039/C2CC33844K.
- [12] H. Li, Z. Kang, Y. Liu, et al. (2012), "Carbon nanodots: Synthesis, properties and applications", *J. Mater. Chem.*, **22**(46), pp.24230-24253, DOI: 10.1039/C2JM34690G.
- [13] Z. Yang, Z. Li, M. Xu, et al. (2013), "Controllable synthesis of fluorescent carbon dots and their detection application as nanoprobe", *Nano-Micro Lett.*, **5**(4), pp.247-259, DOI: 10.1002/chem.201300332.
- [14] P. Namdaria, B. Negahdarib, A. Eatemadi (2017), "Synthesis, properties and biomedical applications of carbon-based quantum dots: An updated review", *Biomed. Pharmacother.*, **87**, pp.209-222, DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.108.
- [15] Q.N. Khoa, H.N. Ngoc, B.V.V. Quoc, et al. (2022), "Hydrothermal synthesis of carbon nanodots from waste wine cork and their use in biocompatible fluorescence imaging", *New Carbon Materials*, **37**(3), pp.595-602, DOI: 10.1016/S1872-5805(22)60608-5.
- [16] N.K. Quang (2021), "A simple way to demonstrate fluorescent image by employing a conventional microscope and transparent coloured acrylic pieces", *Phys. Teach.*, **59**(1), pp.57-59, DOI: 10.1119/10.0003020.
- [17] H. Ding, X. Li, X. Chen, et al. (2020), "Surface states of carbon dots influences on luminescence", *J. Appl. Phys.*, **127**, pp.231101-231121, DOI: 10.1063/1.5143819.
- [18] M. Zulfajri, G. Gedda, C. Chang, et al. (2019), "Cranberry beans derived carbon dots as a potential fluorescence sensor for selective detection of Fe^{3+} ions in aqueous solution", *ACS Omega*, **4**(13), pp.15382-15392, DOI: 10.1021/acsomega.9b01333.
- [19] J. Xu, Y. Zhou, S. Liu, et al. (2014), "Low-cost synthesis of carbon nanodots from natural products used as a fluorescent probe for the detection of ferrum(III) ions in lake water", *Anal. Methods*, **6**, pp.2086-2090, DOI: 10.1039/c3ay41715h.
- [20] R. Vikneswaran, S. Ramesh, R. Yahya (2014), "Green synthesised carbon nanodots as a fluorescent probe for selective and sensitive detection of iron(III) ions", *Mater. Lett.*, **136**, pp.179-182, DOI: 10.1016/j.matlet.2014.08.063.

Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới tính chất của keo dán nền cao su thiên nhiên dùng để liên kết vải canvas và cao su viền giày

Đoàn Anh Vũ^{1*}, Nguyễn Thị Trang¹, Bạch Trọng Phúc¹, Trần Hữu Quang², Trần Hữu Huy², Đỗ Quốc Việt³, Nguyễn Thanh Liêm¹

¹Viện Kỹ thuật Hóa học, Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, phường Bách Khoa, quận Hai Bà Trưng, Hà Nội, Việt Nam

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

³Viện Tiên tiến về Khoa học và Công nghệ Nhật Bản, JAIST, 1-1 Asahidai, TP Nomi, tỉnh Ishikawa, Nhật Bản

Ngày nhận bài 4/11/2022; ngày chuyển phản biện 8/11/2022; ngày nhận phản biện 23/11/2022; ngày chấp nhận đăng 28/11/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số loại tác nhân tăng dính như nhựa hydro carbon C₉ (PR), nhựa gốc phenon (P803L và P2402) và nhựa cumaron tới các tính chất cơ bản của keo dán nền cao su thiên nhiên (CSTN) đã được nghiên cứu. Vật liệu ứng dụng thử nghiệm để đánh giá hiệu suất và đặc tính của keo dán là vải canvas và cao su viền giày được sử dụng để sản xuất các loại giày vải xuất khẩu cao cấp tại doanh nghiệp ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ bền bắt dính và độ bền kéo bóc tăng dần khi tăng hàm lượng tác nhân tăng dính, sau đó giảm đến khi hàm lượng này vượt quá giá trị tối ưu. Khả năng chịu lão hóa nhiệt bị ảnh hưởng chủ yếu bởi bản chất của tác nhân tăng dính. Keo dán sử dụng PR ở hàm lượng 7 phần khối lượng so với cao su cho giá trị độ bền kéo bóc là 4,158 N/mm và hệ số già hóa tốt nhất đạt 0,81. Ngoài ra, cơ chế phá hủy mối liên kết dán cũng được xác định là cơ chế phá hủy hỗn hợp. Kết quả này có ý nghĩa trong việc xây dựng đơn phối liệu và chế tạo keo dán nền CSTN ứng dụng trong sản xuất giày cao cấp.

Từ khóa: giày vải, keo dán nền cao su thiên nhiên, tác nhân tăng dính.

Chỉ số phân loại: 1.4, 2.4

Effect of tackifiers on the properties of natural rubber-based adhesive used to bind canvas fabric and rubber shoe sole

Anh Vu Doan^{1*}, Thi Trang Nguyen¹, Trong Phuc Bach¹, Huu Quang Tran², Huu Huy Tran², Quoc Viet Do³, Thanh Liem Nguyen¹

¹School of Chemical Engineering, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Street, Bach Khoa Ward, Hai Ba Trung District, Hanoi, Vietnam

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

³Japan Advanced Institutes of Science and Technology, JAIST, 1-1 Asahidai, Nomi City, Ishikawa Province, Japan

Received 4 November 2022; revised 23 November 2022; accepted 28 November 2022

Abstract:

In this study, the influence of various tackifiers, including C₉ hydrocarbon resin (PR), phenolic resins (P803L and P2402), and cumaron, on the basic properties of natural rubber-based adhesives was thoroughly investigated. The test application materials used to evaluate the performance and properties of the adhesive are canvas and shoelace rubber, which are used to produce high-end export canvas shoes at enterprises in Vietnam. The study results reveal that tack and peel strength progressively increase with a rise in tackifier content until reaching an optimal threshold, beyond which these properties begin to decline when this content exceeds the optimal value. Thermal-ageing resistance was mainly affected by the chemical nature of the tackifiers. An adhesive formulation containing 7 phr of PR exhibited the highest peel tensile strength at 4.158 N/mm and the best ageing coefficient of 0.81. Furthermore, the bonding failure mechanism was identified as a mixed-mode failure mechanism. This result is significant for the development of the material combination and the manufacturing of natural rubber-based adhesive used in the production of high-end footwear.

Keywords: canvas shoes, natural rubber adhesives, tackifiers.

Classification numbers: 1.4, 2.4

*Tác giả liên hệ: Email: vu.doananh@hust.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Một trong những ứng dụng quan trọng nhất của keo dán có nguồn gốc từ cao su là sử dụng để liên kết các chi tiết của sản phẩm giày, đặc biệt là giày lưu hóa (nổi bật là giày canvas) [1]. Trong ngành công nghiệp giày dép, việc lựa chọn chất kết dính thích hợp là rất quan trọng để đảm bảo được độ bền liên kết theo tiêu chuẩn. Hai đặc tính quan trọng được quan tâm là độ bền kéo bóc và độ rão [2]. Các đặc tính này được xác định theo các tiêu chuẩn châu Âu (EN) như EN 1392:2006 và EN 17708:2018, và các yêu cầu kỹ thuật đối với các loại giày dép khác nhau liên quan đến độ dính của đế - mũi giày được định nghĩa trong EN 15307:2005.

Một trong những thành phần quan trọng nhất được sử dụng trong công thức của chất kết dính làm từ cao su là tác nhân tăng dính [3]. Tác nhân tăng dính được đưa vào keo để cải thiện các đặc tính về độ bắt dính, độ bám dính, tính chất cơ học và độ nhớt. Sự cân bằng giữa các đặc tính đàn hồi và độ nhớt là một trong những đặc điểm quan trọng nhất của keo dán và chất kết dính [4, 5].

Việc nghiên cứu làm rõ ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới đặc tính của keo dán, đặc biệt là keo dán từ cao su là rất cần thiết và đã thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của rất nhiều các nhà khoa học và các tổ chức nghiên cứu trên thế giới như:

D.W. Aubrey (1987) [6] - Hiệp hội Hóa học Mỹ, là một trong những nhà khoa học đầu tiên chỉ ra bản chất và vai trò của tác nhân tăng dính trong keo dán nền cao su.

A.R. Azura và cs (2014) [7] đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các tác nhân tăng dính tự nhiên và tổng hợp tới độ nhớt và đặc tính dính của keo từ nền CSTN đã loại protein và cao su tự nhiên lai ghép styren.

L. Musa và cs (2015) [8] đã chỉ ra rằng, độ nhớt, độ bền kéo trượt và độ bền kéo bóc của keo nhạy áp nền cao su tự nhiên và cao su tự nhiên epoxy hóa sẽ thay đổi phụ thuộc vào hàm lượng và loại tác nhân tăng dính được sử dụng.

Tại Việt Nam hiện nay, nhu cầu sử dụng keo dán nền cao su trong sản xuất giày xuất khẩu là rất lớn, đặc biệt là với các loại giày vải có đế và viền đế giày làm từ cao su lưu hóa. Mặc dù Việt Nam là một nước có sản lượng CSTN hàng đầu trên thế giới, tuy nhiên keo dán phục vụ cho sản xuất trong nước hầu hết đều phải nhập khẩu. Việc nghiên cứu làm rõ ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới keo dán CSTN dùng cho sản xuất giày vải sẽ góp phần từng bước làm chủ công nghệ chế tạo keo dán phục vụ nhu cầu sản xuất. Các loại tác nhân tăng dính được sử dụng trong nghiên cứu này là PR, nhựa cumaron và hai loại nhựa phenolic (803L và 2402). Ảnh hưởng của loại và hàm lượng tác nhân tăng dính tới đặc trưng lưu hóa, độ bền bắt dính, độ bền kéo bóc và hình thái học bề mặt phá hủy của liên kết cũng được làm rõ.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Cao su tự nhiên được dùng là loại cao su SVR-3L cung cấp bởi Công ty Cao su Đồng Nai. Các hóa chất trong hệ lưu hóa là các chất thông dụng thường dùng trong ngành công nghiệp cao su như: zinc oxide (ZnO), stearic acid, sunfur (S), benzothiazyl disulfide (MBTS), zinc dibutyl dithiocarbamate (BZ), butylated hydroxytoluene (BHT). Các loại tác nhân tăng dính petro resin C₉ (PR); coumarone (CMR), phenolic (P803L và P2402) được nhập khẩu từ Đài Loan (Trung Quốc). Dung môi pha chế keo được cung cấp bởi Công ty TNHH Công nghiệp YESTAR (TP Hồ Chí Minh).

Vật liệu dùng làm nền liên kết để thử nghiệm keo dán là vải canvas và cao su viền đế giày vải dùng trong sản xuất giày xuất khẩu được cung cấp bởi Công ty THNN Hóa dệt Hà Tây (Hà Nội).

2.2. Phương pháp tạo mẫu

Hỗn hợp chất kết dính nền CSTN được phối trộn theo tỷ lệ hóa chất trình bày trong bảng 1. Hàm lượng của tác nhân tăng dính trong các mẫu thay đổi lần lượt là 5, 7, 10, 15 phần khối lượng so với 100 phần khối lượng cao su nguyên chất.

Bảng 1. Đơn phối liệu hỗn hợp kết dính.

Hóa chất	Hàm lượng (phần khối lượng)
SVR-3L	100
ZnO	5
Axit stearic	1
BHT	0,5
MBTS	0,5
BZ	1,5
S	1
Tác nhân tăng dính	5, 7, 10, 15

Hỗn hợp gồm các hóa chất trong đơn phối liệu trừ hệ xúc tiến, lưu hóa và tác nhân tăng dính được sơ luyện ở 80°C bằng máy trộn kín trong khoảng 15 phút với tốc độ 50 vòng/phút. Tiếp theo, lưu huỳnh, các chất xúc tiến và tác nhân tăng dính được bổ sung và hỗn hợp được sơ luyện ở 50°C trong thời gian 10 phút. Trước khi sử dụng để pha chế keo thì hỗn hợp được cán trên máy cán xuất tấm hai trục.

Hỗn hợp chất kết dính thu được sẽ được khuấy trộn cùng xăng công nghiệp với tỷ lệ 12:88 trong máy khuấy kín, ở tốc độ 800 vòng/phút, trong khoảng thời gian 2,5 giờ. Dung dịch keo thu được sẽ được lưu ổn định ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ trước khi sử dụng để dán mẫu.

Mẫu vải canvas và cao su viền đế giày sau khi được dán sẽ được ép lưu hóa ở các nhiệt độ nghiên cứu trong 90 phút dưới áp lực 4 kgf/cm².

2.3. Các phương pháp phân tích và đánh giá

Nhiệt vi sai (DTA) và nhiệt trọng lượng (TGA) của các tác nhân tăng dính được đo bằng thiết bị TG 8121, Thermo plus EVO2 của hãng Rigaku, Nhật Bản. Đặc trưng lưu hóa của vật liệu được khảo sát trên thiết bị Rheometer MDR 2020 (Hàn Quốc).

Độ bền kéo bóc và độ bền bắt dính xác định theo phương pháp Peel 180° theo tiêu chuẩn EN 1392:2006 và EN 17708:2018 trên thiết bị kéo đứt Lloyd LRX 500N (Mỹ), với tốc độ kéo cố định là 100 mm/phút. Độ bền kéo bóc được xác định theo công thức:

$$\delta = \frac{P}{b} \text{ [N/mm]}$$

trong đó; δ : độ bền kéo bóc (N/mm); P: lực tác dụng (N); b: chiều rộng mẫu (mm).

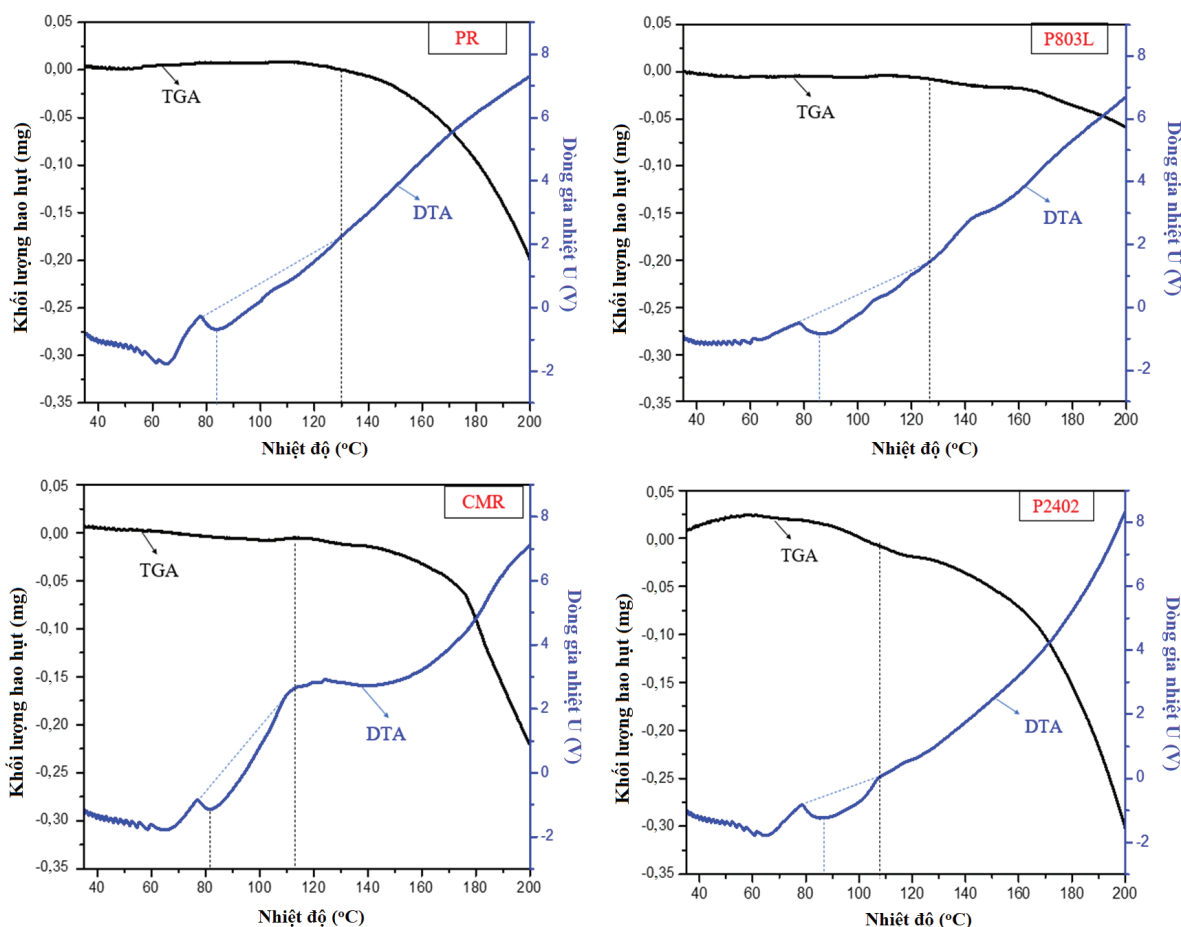
Sự suy giảm của các liên kết dính do lão hóa nhiệt được tiến hành thực nghiệm đánh giá theo tiêu chuẩn EN 15062:2006. Bề mặt phá hủy mỗi lần được chụp bằng hệ kính hiển vi điện tử quang học với độ phóng đại x35 thông qua phần mềm NeptuneViewer.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân tích một số đặc trưng tính chất nhiệt của các tác nhân tăng dính

Hình 1 thể hiện biểu đồ phân tích DTA và TGA của các tác nhân tăng dính sử dụng trong nghiên cứu. Từ đồ thị có thể thấy, đối với PR, ban đầu dòng nhiệt tăng, sau đó giảm một cách đột ngột ở khoảng 83°C, tại nhiệt độ này nhựa chuyển từ trạng thái cứng giòn sang trạng thái mềm dẻo, đây là nhiệt độ chuyển trạng thái của tác nhân tăng dính PR. Còn ở khoảng 130°C thì đường TGA bắt đầu giảm, có thể là do PR đã bắt đầu có sự phân hủy nhiệt.

Tương tự như vậy, từ biểu đồ nhiệt cũng xác định được nhiệt độ chuyển trạng thái của các tác nhân tăng dính P803L, CMR, P2402 lần lượt là 86, 81 và 87°C. Kết quả cho thấy, nhiệt độ chuyển pha của các chất bắt dính chênh lệch không nhiều, hay nói cách khác nhiệt độ chảy mềm của các hợp chất hữu cơ thấp phân tử sử dụng làm tác nhân tăng dính trong nghiên cứu này là gần tương tự nhau.

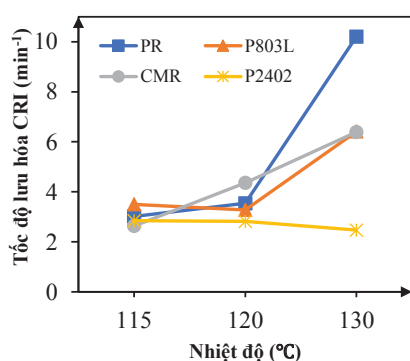


Hình 1. Biểu đồ phân tích nhiệt vi sai (DTA) và nhiệt trọng lượng (TGA) của các tác nhân tăng dính.

Nhiệt độ phân hủy của P803L, CMR và PR không có sự khác biệt quá lớn, đều nằm trong khoảng 150-160°C. Đặc biệt, đối với P2402 trong khoảng nhiệt độ từ 30-90°C nhận thấy có sự gia tăng về khối lượng, điều này có thể giải thích là do P2402 có khả năng đã phản ứng với oxy trong không khí.

3.2. Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới đặc trưng lưu hóa của hỗn hợp chất kết dính nền cao su tự nhiên

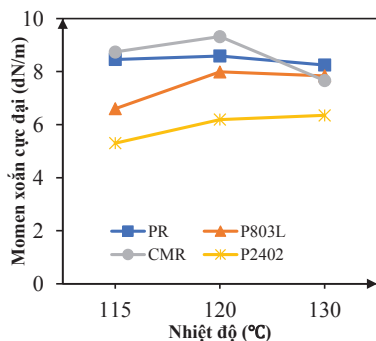
Để đánh giá ảnh hưởng của loại tác nhân tăng dính tới khả năng lưu hóa của hỗn hợp chất kết dính nền CSTN thì các mẫu có chứa 10 phần khối lượng từng tác nhân tăng dính được tiến hành lưu hóa ở các nhiệt độ 115, 120 và 130°C.



PR: nhựa hydro carbon C_{90} ; CMR: coumarone.

Hình 2. Ảnh hưởng của các tác nhân tăng dính tới khả năng lưu hóa của hỗn hợp chất kết dính từ cao su tự nhiên ở các nhiệt độ khác nhau.

Từ kết quả ở hình 2, có thể nhận thấy tốc độ lưu hóa của các mẫu ở 115 và 120°C là không khác nhau nhiều, nhưng ở 130°C thì đã có sự phân hóa. Tại 130°C, tốc độ lưu hóa của mẫu chứa PR cao hơn hẳn so với mẫu chứa P803L và CMR. Đặc biệt, với mẫu chứa P2402 tốc độ lưu hóa còn có xu hướng hơi giảm xuống. Kết hợp với kết quả TGA có thể đưa ra nhận xét là do P2402 kém bền nhiệt, ngay ở khoảng 30-90°C đã bắt đầu xảy ra phản ứng với oxy trong không khí gây ảnh hưởng tới hệ lưu hóa.



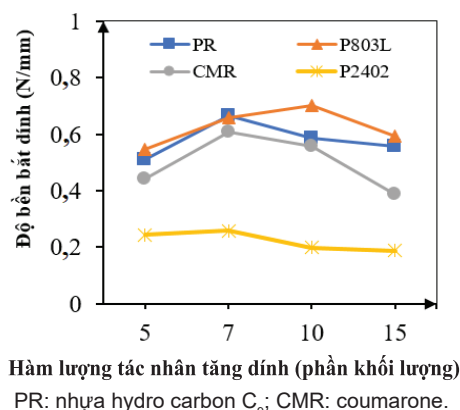
PR: nhựa hydro carbon C_{90} ; CMR: coumarone.

Hình 3. Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới momen xoắn cực đại của hỗn hợp chất kết dính từ cao su tự nhiên khi lưu hóa ở các nhiệt độ khác nhau.

Hình 3 thể hiện ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới momen xoắn cực đại khi lưu hóa ở các nhiệt độ khác nhau của hỗn hợp chất kết dính. Có thể thấy, với tất cả các mẫu, khi nhiệt độ lưu hóa tăng từ 115 đến 120°C, momen xoắn cực đại tăng lên đáng kể, tuy nhiên khi tiếp tục tăng nhiệt độ lưu hóa từ 120 lên 130°C thì momen xoắn cực đại thay đổi không đáng kể và có xu hướng đi ngang. Kết quả này cho thấy, nhiệt độ 120°C là phù hợp để vừa đạt được mật độ lưu hóa tốt, vừa tiết kiệm được năng lượng gia nhiệt cho mẫu khi lưu hóa.

3.3. Ảnh hưởng của loại và hàm lượng tác nhân tăng dính tới khả năng bắt dính của keo dán

Độ bắt dính là khả năng hai bề mặt vật liệu được kết dính lại với nhau, ngay tại thời điểm tiếp xúc, khi chất kết dính chưa tạo các liên kết ngang hình thành các đặc tính liên kết cuối cùng khi đông rắn hoàn toàn. Nói cách khác, độ bền bắt dính là khả năng nội tại của chất kết dính để bám vào bề mặt ngay sau khi tiếp xúc. Độ bền bắt dính của các mẫu keo có chứa các tác nhân tăng dính với hàm lượng thay đổi được tổng hợp và trình bày tại đồ thị ở hình 4.



PR: nhựa hydro carbon C_{90} ; CMR: coumarone.

Hình 4. Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới độ bền bắt dính.

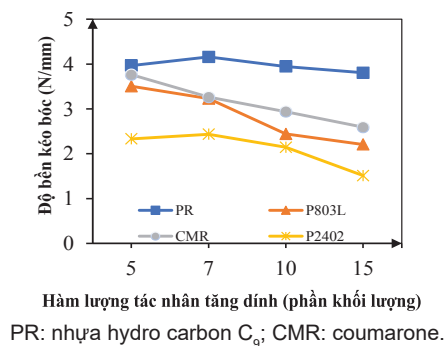
Kết quả cho thấy, độ bắt dính của các mẫu PR nằm trong khoảng từ 0,509 đến 0,664 N/mm. Độ bắt dính tăng sau đó đạt giá trị cực đại ở hàm lượng 7 phần khối lượng PR rồi giảm dần ở các hàm lượng 10 và 15 phần khối lượng. Đối với các mẫu sử dụng P803L, độ bắt dính của mẫu chứa 7 phần khối lượng tăng 20,47% so với mẫu 5 phần khối lượng. Khi tăng hàm lượng P803L từ 7 lên 10 phần khối lượng thì độ bền bắt dính tăng 6,67%, sau đó khi tiếp tục tăng hàm lượng P803L lên 15 phần khối lượng thì độ bắt dính lại giảm 15,51% so với mẫu 10 phần khối lượng.

Kết quả trên cho thấy, khi tăng hàm lượng tác nhân tăng dính thì độ bắt dính của keo cũng tăng dần đến một giá trị cực đại, sau đó giảm dần. Điều này là hợp lý vì tác nhân tăng dính là những hợp chất hữu cơ thấp phân tử, khi được đưa vào hệ cao su chúng sẽ xen kẽ vào phần thể tích tự do, khiến các phân tử cao su duỗi ra, làm tăng diện tích tiếp xúc và khả năng thấm ướt của phân tử cao su với bề mặt nền. Do đó, khả năng chống lại sự phân tách của keo sau thời gian tiếp xúc ngắn là cao hơn khi hàm lượng tác nhân tăng dính tăng lên. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng hàm lượng

chất tăng dính thì độ bắt dính lại giảm dần, có thể là do khi hàm lượng tác nhân tăng dính càng nhiều thì độ nhớt của keo càng tăng lên, dẫn đến làm giảm khả năng thấm ướt của keo vào bề mặt nền nên độ bền bắt dính cũng theo đó giảm dần.

3.4. Ảnh hưởng của loại và hàm lượng tác nhân tăng dính tới độ bền kéo bóc của keo dán

Độ bền kéo bóc của liên kết dán là một trong những tính chất quan trọng nhất đối với chất kết dính nói chung và chất kết dính dùng cho sản phẩm giày nói riêng. Ảnh hưởng của các loại và hàm lượng tác nhân tăng dính tới độ bền kéo bóc của mỗi liên kết dán giữa cao su viên đế và vải canvas dùng làm mũi giày được mô tả trong đồ thị ở hình 5.

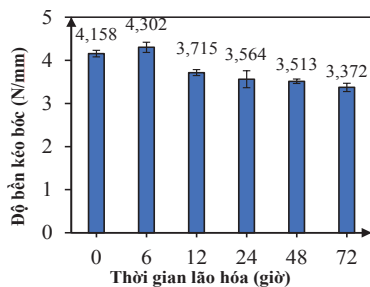


Hình 5. Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới độ bền kéo bóc của mỗi liên kết dán.

Có thể thấy, độ bền kéo bóc của mẫu keo chứa tác nhân tăng dính PR tăng khi hàm lượng tác nhân tăng dính tăng từ 5 đến 7 phần khối lượng, sau đó giảm dần ở các hàm lượng 10 và 15 phần khối lượng. Xu hướng tương tự cũng được xác nhận đối với các mẫu có chứa chất tăng dính P2402.

Đối với các mẫu keo chứa chất tăng dính CMR, độ bền kéo bóc lại giảm dần khi tăng hàm lượng từ 5 đến 15 phần khối lượng. Độ bền kéo bóc giảm 13,26% ở 7 phần khối lượng, giảm 21,96% ở 10 phần khối lượng và giảm đến 31,1% ở 15 phần khối lượng so với độ bền kéo bóc ban đầu ở 5 phần khối lượng. Điều này cũng được nhận thấy với các mẫu keo dán có chứa P803L.

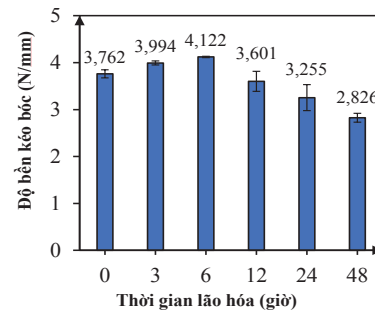
Trong các loại tác nhân tăng dính đã được sử dụng, có thể thấy PR ở 7 phần khối lượng và CMR ở 5 phần khối lượng cho giá trị độ bền kéo bóc cao nhất.



Hình 6. Độ bền kéo bóc của mẫu chứa 7 phần khối lượng PR ở 70°C theo thời gian.

3.5. Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới độ chịu lão hóa nhiệt của mẫu liên kết dán

Một trong những tiêu chí để đánh giá chất lượng của keo dán là độ chịu nhiệt trong khoảng thời gian dài. Nhằm làm rõ sự ảnh hưởng của tác nhân tăng dính đến độ chịu lão hóa nhiệt của mẫu liên kết dán, mẫu chứa 7 phần khối lượng PR và mẫu chứa 5 phần khối lượng CMR sẽ được xử lý nhiệt ở các khoảng thời gian khác nhau. Mẫu dán sau khi hoàn thành quá trình ép định hình liên kết sẽ được xử lý nhiệt ở 70°C. Sự biến đổi về độ bền kéo bóc theo thời gian được thể hiện ở hình 6 và hình 7.



Hình 7. Độ bền kéo bóc của mẫu chứa 5 phần khối lượng CMR ở 70°C theo thời gian.

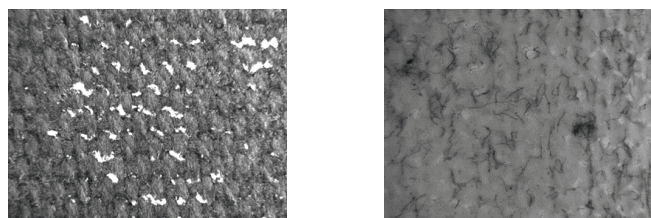
Với cả 2 mẫu, quá trình xử lý nhiệt ban đầu làm tăng độ bền kéo bóc sau đó mới bắt đầu có hiện tượng giảm độ bền. Mẫu chứa 7 phần khối lượng PR có độ bền kéo bóc trước khi xử lý nhiệt là 4,158 N/mm, sau khi xử lý nhiệt 6 giờ thì độ bền của mẫu tăng lên 4,302 N/mm, sau đó giảm dần. Khi tiếp tục xử lý nhiệt ở 12, 24, 48 và 72 giờ thì độ bền kéo bóc giảm xuống còn 81,1% so với trước khi lão hóa (hình 6). Với mẫu chứa 5 phần khối lượng CMR, độ bền tăng dần theo thời gian xử lý nhiệt từ 3,762 N/mm đến giá trị cực đại là 4,122 N/mm sau 6 giờ, sau đó giảm dần khi tiếp tục tăng thời gian xử lý nhiệt lên 12, 24 và 48 giờ, độ bền kéo bóc còn lại 75,12% so với ban đầu. Đối với mẫu keo dán bị lão hóa nhiệt thì có một giới hạn giảm bền quan trọng là độ bền sau lão hóa không được nhỏ hơn 80% giá trị độ bền ban đầu. Vì vậy, đối với mẫu chứa 5 phần khối lượng CMR lão hóa nhiệt trong 48 giờ là không thỏa mãn điều kiện (hình 7).

Hiện tượng tăng độ bền ở giai đoạn đầu của quá trình xử lý nhiệt có thể giải thích là do khi lưu hóa hình thành liên kết dán, lớp keo chưa được lưu hóa hoàn toàn, vì vậy khi ở trong môi trường lão hóa nhiệt, dưới sự tác động của nhiệt độ thì lớp keo chưa lưu hóa hoàn toàn này ưu tiên hình thành các liên kết ngang bổ sung thay vì phá hủy các liên kết ngang đã được hình thành trước đó. Còn thành phần kết dính ngoại là liên kết giữa keo và vải không phải là liên kết hóa học, nên chúng không ảnh hưởng đến việc độ bền kéo bóc tăng trong giai đoạn đầu xử lý nhiệt. Sau khi các liên kết ngang bổ sung được hình thành hết, mẫu bắt đầu bị lão hóa và các liên kết bị phá hủy, dần dần đến độ bền kéo bóc cũng giảm dần. Hiện tượng tương tự cũng đã được H. Zhang và cs (2015) [9] chỉ ra trong một nghiên cứu về lão hóa nhiệt của NR.

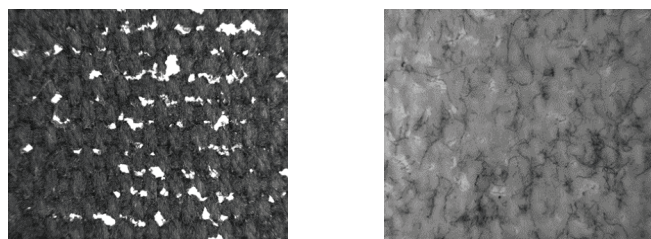
Độ bền ban đầu của mẫu chứa 7 phần khối lượng PR là 4,158 N/mm, sau khi lão hóa nhiệt 48 giờ độ bền là 3,512 N/mm, độ bền đã giảm 15,54%. Mẫu chứa 5 phần khối lượng CMR có độ bền ban đầu là 3,762 N/mm, độ bền là 2,826 N/mm sau 48 giờ lão hóa nhiệt, giảm 24,88%. Như vậy, ở cùng một thời gian xử lý nhiệt, mức độ giảm bền của mỗi liên kết dán có chứa tác nhân tăng dính PR sẽ nhỏ hơn tác nhân tăng dính CMR. Mặc dù cả hai loại tác nhân tăng dính có nhiệt độ phân hủy nhiệt không quá khác biệt và đều cao hơn nhiều so với nhiệt độ lão hóa, tuy nhiên do CMR có chứa các nhóm ($=C=O$) và ($C-O-C$) phân cực nên khả năng tương hợp với NR thấp hơn PR [7]. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến khả năng chịu lão hóa nhiệt của keo chứa CMR không bằng keo có chứa PR. Điều này cho thấy, ảnh hưởng của loại tác nhân tăng dính khác nhau trong việc ổn định mỗi liên kết dán trong quá trình sử dụng lâu dài.

3.6. Đặc điểm phá hủy liên kết dán

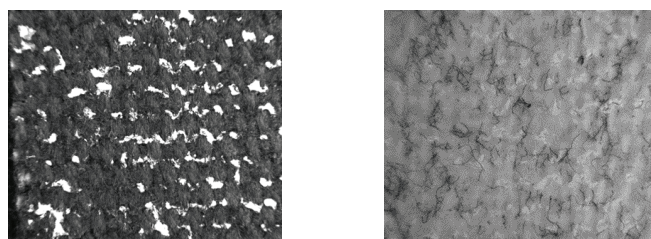
Ảnh chụp bề mặt vải và bề mặt viên đế cao su của mẫu chứa 7 phần khối lượng PR sau khi phá hủy liên kết dán trên được thể hiện ở hình 8.



Mẫu trước lão hóa



Mẫu sau lão hóa 6 giờ



Mẫu sau lão hóa 48 giờ

Hình 8. Ảnh chụp bề mặt vải (trái) và cao su viên đế (phải) sau khi phá hủy mỗi dán.

Nhận xét chung về đặc điểm phá hủy mỗi dán là dạng phá hủy hỗn hợp. Trên bề mặt vải (hình phía trái) xuất hiện các vụn viên đế cao su đã bị phá hủy và hầu như lớp keo ban đầu

đã không còn trên vải, còn trên bề mặt viên cao su có lớp keo bên trên dính theo các xơ vải bị phá hủy (hình phía phải). Đây là cơ chế phá hủy hỗn hợp, một cơ chế mong muốn nếu có sự phá hủy liên kết dán xảy ra. Khi lão hóa nhiệt, sự phá hủy bề mặt cũng của các mẫu cũng thay đổi. Từ các hình ảnh bề mặt phá hủy liên kết dán trước và sau khi lão hóa cho thấy, cao su bị phá hủy nhiều hơn do độ bền kéo bóc tăng khi xử lý nhiệt trong 6 giờ và do sự lão hóa của viên đế cao su sau thời gian dài xử lý nhiệt đối với mẫu lão hóa 48 giờ.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng và loại tác nhân tăng dính có ảnh hưởng trực tiếp tới các tính chất lưu hóa của keo, đặc trưng bắt dính, độ bền kéo bóc và mức độ chịu lão hóa nhiệt. Trong số các loại tác nhân tăng dính đã sử dụng thì PR ở hàm lượng 7 phần khối lượng cho chất lượng keo tốt nhất khi dùng để liên kết vải canvas và cao su viên giày. Kết quả này là một cơ sở để xây dựng đơn phối liệu và chế tạo keo dán nền CSTN dùng cho sản xuất giày.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn đề tài ĐT.BO.016/21 đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này. Các tác giả cũng xin cảm ơn Trung tâm Công nghệ Vật liệu, Đại học Quốc gia Hà Nội đã hỗ trợ việc đo đạc các tính chất nhiệt trọng lượng và nhiệt vi sai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Pizzi, K.L. Mittal (2018), *Handbook of Adhesive Technology Third Edition*, CRC Press, 658pp.
- [2] J.M.M. Martínez (2011), "Shoe industry", *Handbook of Adhesion Technology*, Springer, DOI: 10.1007/978-3-319-55411-2_51.
- [3] G. Wypych (2018), *Handbook of Surface Improvement and Modification*, ChemTec Publishing, 226pp.
- [4] J.M.M. Martínez (2002), "Chapter 13 - Rubber base adhesives", *Adhesion Science and Engineering*, Elsevier, 2, pp.573-675.
- [5] D. Zheleva (2013), "Mechanisms of interaction between the components in adhesive compositions based on chloroprene rubber", *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, **48(5)**, pp.535-542.
- [6] D.W. Aubrey (1987), "The nature and action of tackifier resin", *Rubber Chemistry and Technology*, **61(3)**, pp.448-469, DOI: 10.5254/1.3536196.
- [7] A.R. Azura, X.M. Lee, M.A. Misman (2014), "Effect of natural and synthetic tackifiers on viscosities, adhesion properties and thermal stability of SNR and DPNR solution adhesives", *Journal of Adhesion Science and Technology*, **28(7)**, pp.637-652, DOI: 10.1080/01694243.2013.858590.
- [8] L. Musa, S.Z. Firdaus, H. Kamarudin, et al. (2015), "Effect of hybrid tackifiers on viscosity, peel strength and shear resistance of natural rubber and epoxidized natural rubber-based pressure sensitive adhesives", *Applied Mechanics and Materials*, **754-755**, pp.49-53, DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMM.754-755.49.
- [9] H. Zhang, Y. Li, J.Q. Shou, et al. (2015), "Effect of curing temperature on properties of semi-efficient vulcanized natural rubber", *Journal of Elastomers and Plastics*, **48(4)**, DOI: 10.1177/0095244315576243.

Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường của cây African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro*

Huỳnh Gia Bảo^{1,2}, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đức Khải¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Hoàng Thanh Tùng^{1,2}, Dương Tấn Nhựt^{1,2*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Học 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 3/8/2022; ngày chuyển phân biện 6/8/2022; ngày nhận phân biện 26/8/2022; ngày chấp nhận đăng 29/8/2022

Tóm tắt:

Bài báo nghiên cứu tác động của nano bạc (AgNPs) lên sự tái sinh chồi, khắc phục hiện tượng bất thường, sự biến động khí ethylene (ET) và hoạt tính enzyme chống oxy hóa trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet. Kết quả cho thấy, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên với tỷ lệ tái sinh chồi 66,00%, 5,33 chồi/mẫu và chiều cao chồi 0,73 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Ở giai đoạn tái sinh, chồi của cây African violet trên cả mẫu cấy gân lá chính và mẫu lá nguyên đều xuất hiện một số hiện tượng thủy tinh thể lần lượt là 20,00 và 19,67%; mô sẹo ở mép lá lần lượt là 21,67 và 22,33%; hoại tử mẫu cấy lần lượt là 14,67 và 12,33%; hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy lần lượt là 20,33 và 15,67%. Ngoài ra, khi bổ sung 2 mg/l AgNPs vào môi trường tái sinh chồi làm gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi, khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy, giảm sự tích lũy khí ET và gia tăng hoạt tính của APX (ascorbate peroxidase), CAT (catalase) trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet.

Từ khóa: ethylene, hóa nâu, hoại tử mẫu cấy, nano bạc, thủy tinh thể.

Chỉ số phân loại: 1.6, 1.7, 4.6

Silver nanoparticles enhanced shoot regeneration efficiency and limited some abnormal phenomena of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*

Gia Bao Huynh^{1,2}, Thi Nhu Mai Nguyen¹, Duc Khai Hoang¹, Manh Cuong Do¹, Thanh Tung Hoang^{1,2}, Tan Nhut Duong^{1,2*}

¹Tay Nguyen Institute of Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Graduate 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 3 August 2022; revised 26 August 2022; accepted 29 August 2022

Abstract:

This article investigated the effects of silver nanoparticles (AgNPs) on shoot regeneration, abnormal growth, ethylene (ET) gas fluctuations, and antioxidant enzyme activity during the shoot regeneration of African violet. The results showed that using the main leaf vein explant significantly improved shoot regeneration efficiency compared to the whole leaf explant, with a shoot regeneration rate of 66.00%, an average of 5.33 shoots per explant, and shoot height reaching 0.73 cm after eight weeks of cultivation. At shoot regeneration time, both the main leaf vein and whole leaf explants exhibited vitrification (20.00 and 19.67%, respectively), callus formation at the leaf edges (21.67 and 22.33%, respectively), necrosis (14.67 and 12.33%, respectively), and browning of explants and the culture medium (20.33 and 15.67%, respectively). Furthermore, adding 2 mg/l AgNPs into the regeneration environment enhanced shoot regeneration efficiency and growth, mitigated vitrification, callus formation, necrosis, browning of explants and the culture medium, reduced ethylene gas accumulation and increased the activities of ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT) during African violet shoot regeneration.

Keywords: browning, ethylene, necrosis, silver nanoparticles, vitrification.

Classification numbers: 1.6, 1.7, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Công nghệ nano đã được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác nhau và có ảnh hưởng đáng kể trên thế giới. Bên cạnh đó, công nghệ nano cũng đã được ứng dụng cho nghiên cứu các hệ thống sinh học. Trong nông nghiệp, nano kim loại đã được chứng minh có tác động tích cực đối với thực vật nuôi cấy *in vitro*, bao gồm việc tăng tỷ lệ nảy mầm [1], kích thích sự phát triển [2] và tăng cường tổng hợp các hợp chất thứ cấp có giá trị như dược phẩm, chất dinh dưỡng và hóa chất nông nghiệp, bao gồm các hợp chất phenol và flavonoid [3]. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã đạt được những kết quả đáng khích lệ trong việc sử dụng AgNPs như một tác nhân khử trùng môi trường nuôi cấy *in vitro* [4], khử trùng mẫu cây thực vật như African violet [5], rong Bắp sú [6], Cúc trắng [4] và bổ sung vào môi trường nuôi cấy để thúc đẩy sự phát triển của Đậu tây [7], Hồng môn [8] và sâm Ngọc Linh [9], cũng như hạn chế vi sinh vật trong hệ thống vi thủy canh [10]. Ngoài ra, các loại nano khác cũng đã được nghiên cứu trên các đối tượng thực vật khác nhau, chẳng hạn như nano coban giúp khắc phục hiện tượng vàng và rụng lá ở cây hoa Hồng [11] và nano sắt cải thiện khả năng ra rễ ở cây hoa Cẩm chướng trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* [12]. Tuy nhiên, tác động của các loại nano kim loại (bổ sung hoặc thay thế) đối với sự phát triển và sinh trưởng, khắc phục hiện tượng bất thường, cải thiện khả năng ra rễ *in vitro*, gia tăng tỷ lệ sống sót, cùng với các chỉ tiêu sinh lý-sinh hóa như sự biến động ET và hoạt tính enzyme chống oxy hóa (APX, CAT) vẫn cần được nghiên cứu thêm, đặc biệt là đối cây hoa African violet.

African violet (thuộc chi Saintpaulia) có nguồn gốc từ các khu rừng mưa ở châu Phi với màu sắc hoa đa dạng. Loài hoa này có lá dày, đẹp và phủ lông nhung, có khả năng nở hoa liên tục khi điều kiện thuận lợi, do đó rất được ưa chuộng trong việc trồng trang trí nội thất và văn phòng [13]. Đã có một số kết quả tích cực trong việc nhân giống *in vitro* cây African violet, bao gồm phát sinh phôi soma [13], tái sinh chồi [14] và cảm ứng mô sẹo [15]. D.T. Nhut và cs (2007) [16] đã tái sinh chồi thành công cây African violet; tuy nhiên sau 30 ngày nuôi cấy, số lượng chồi thu được dao động 5,8-8,0 chồi/mẫu, kích thước chồi nhỏ hơn 1 cm và không đồng đều. Hiện tại, ứng dụng nano kim loại trong việc vi nhân giống cây African violet vẫn còn rất hạn chế. D.T. Nhut và cs (2018) [5] chỉ mới dừng lại ở việc sử dụng AgNPs như một chất khử trùng thay thế cho các chất khử trùng truyền thống. Do đó, nghiên cứu về ảnh hưởng của AgNPs đối với quá trình tái sinh chồi, hiện tượng bất thường, sự biến động khí ET và hoạt động của enzyme chống oxy hóa trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet là điều cần thiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu thực vật

Nguồn mẫu ban đầu của nghiên cứu này là các mẫu lá của cây African violet *in vitro* 12 tuần tuổi.

2.2. Dung dịch nano bạc

Dung dịch AgNPs có kích thước nhỏ hơn 20 nm với nồng độ 1000 mg/l [17]. AgNPs với các nồng độ khác nhau được chuẩn bị cho thí nghiệm tái sinh chồi. AgNPs được sử dụng trong các thí nghiệm do Viện Công nghệ Môi trường, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.3. Ghi nhận hiện tượng bất thường ở giai đoạn tái sinh chồi cây African violet

Các mẫu lá nguyên *in vitro* với đường kính 10 mm và mẫu gân lá chính với kích thước 1×10 mm của cây African violet được thu nhận và cấy trên đĩa petri nhựa có chứa môi trường tái sinh chồi. Môi trường MS [14] có chứa 0,2 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 8 g/l agar, 30 g/l sucrose và 1 g/l than hoạt tính [16] (MSS), được bọc kín bằng màng parafilm M nhằm đánh giá khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá nguyên và mẫu gân lá chính, đồng thời ghi nhận một số hiện tượng bất thường trong quá trình tái sinh. Tỷ lệ tái sinh chồi (%), số lượng chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), hiện tượng thủy tinh thể (%), tỷ lệ mô sẹo ở mép lá (%), tỷ lệ hoại tử mẫu cây (%), tỷ lệ hóa nâu của mẫu cây và môi trường nuôi cấy (%) được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy. Hình thái mẫu cây được quan sát và ghi nhận bằng kính hiển vi soi nổi (x10).

2.4. Ảnh hưởng của nano bạc lên hiệu quả tái sinh chồi

Trong thí nghiệm, nguồn mẫu tối ưu cho quá trình tái sinh chồi được cấy trên môi trường MSS có chứa AgNPs ở các nồng độ khác nhau. Mẫu đối chứng được nuôi cấy trên môi trường MSS không bổ sung AgNPs. Tỷ lệ tái sinh chồi (%), số lượng chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) sau 4 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, số lượng chồi/mẫu (tổng số chồi và chồi có kích thước lớn hơn 1 cm), chiều cao chồi (cm), SPAD (chỉ số đánh giá hàm lượng diệp lục trong lá), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (mg) được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy.

2.5. Xác định hàm lượng khí ethylene trong đĩa petri bằng phương pháp sắc ký khí

Khí ET được thu thập trực tiếp trong đĩa petri được bọc bằng màng parafilm M bằng ống tiêm không rò rỉ khí (dung tích 1 ml) và sau đó bơm thủ công vào hệ thống GC (sử dụng cột thép không gỉ có kích thước 3 m × 1,5 mm chứa chất hấp phụ Porapak Q với kích thước hạt 80-100 Mesh) để phân tích. Nhiệt độ của cột, kim phun và ngọn lửa ion hóa được duy trì lần lượt ở 60 và 90°C. Khí nitơ (với tốc độ 55 ml/phút) được sử dụng làm khí mang, giúp vận chuyển khí cần phân tích đến cột sắc ký [18]. Đĩa petri chứa mẫu

cây được nuôi cấy trên môi trường bổ sung AgNPs tối ưu và môi trường đối chứng (không có AgNPs) được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy để đánh giá sự biến động của khí ET.

2.6. Xác định hoạt độ của enzyme chống oxy hóa bằng phương pháp UV-Vis

Các cụm chồi tươi (300 mg) từ các thí nghiệm được nghiền thành bột mịn trong nitor lỏng. Sau đó, mẫu được hòa tan trong 2 ml dung dịch đệm phosphate 0,1 M, pH 7,4 chứa 0,1 mM EDTA. Hỗn hợp mẫu được ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Phần nổi phía trên sau ly tâm được giữ lại (bảo quản ở 4°C) để phân tích CAT và APX.

Hoạt tính CAT được xác định bằng cách phản ứng mẫu với 100 μ l H₂O₂ 65 mM trong 2 phút. Phức hợp màu vàng tạo thành giữa H₂O₂ và ammonium molybdate (NH₄Mo₇O₂₄) được đo ở bước sóng 405 nm, với 1 đơn vị hoạt tính (U/g) tương đương với việc phân hủy 1 μ mol H₂O₂ trong 1 phút [19].

Hoạt tính APX được đo bằng cách theo dõi sự giảm hấp thụ của ascorbate ở bước sóng 290 nm khi enzyme APX oxy hóa ascorbate, với sự hiện diện của 0,5 mM H₂O₂ trong 3 phút. Một đơn vị hoạt tính enzyme (U/g) tương đương với lượng APX cần thiết để oxy hóa 1 μ mol ascorbate trong 1 phút [20].

2.7. Xử lý số liệu

Số liệu ghi nhận trong thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft excel 2016 và SPSS 20.0, phép thử Duncan và LSD với mức ý nghĩa p<0,05 [21]. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ngẫu nhiên 3 lần với 100 mẫu/nghiệm thức.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hiện tượng bất thường ở giai đoạn tái sinh chồi cây African violet

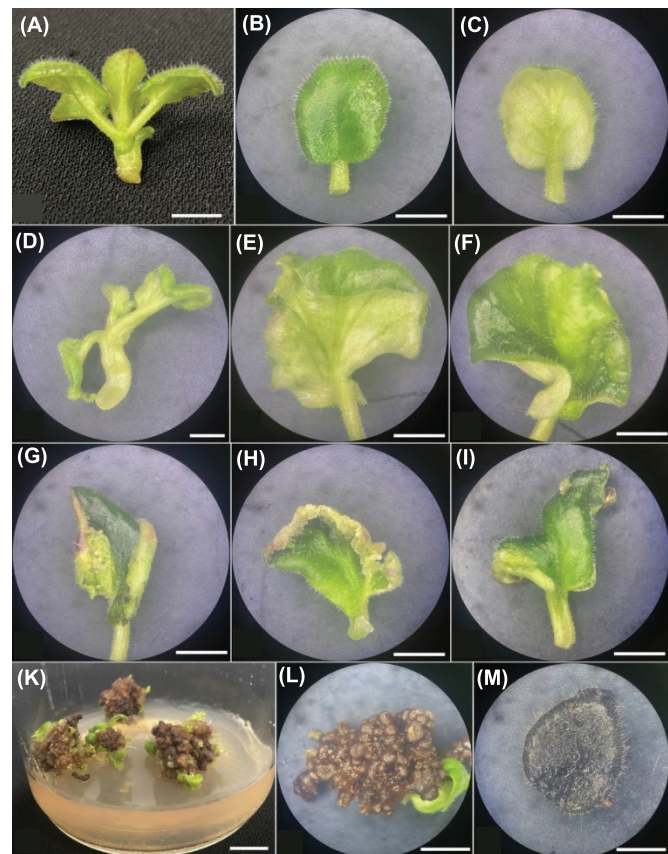
Sau 8 tuần nuôi cấy, hiện tượng thủy tinh thể, sự hình thành mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hiện tượng hóa nâu của mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. Những hiện tượng này được quan sát ở các mẫu chứa gân lá chính và lá nguyên của cây African violet (bảng 1).

Bảng 1. Một số hiện tượng bất thường của mẫu cấy cây African violet sau 8 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu lá nguyên	Mẫu gân lá chính
Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	40,00±1,15*	66,00±2,08
Số chồi/mẫu	2,67±0,33	5,33±0,33
Chiều cao chồi (cm)	0,50±0,60	0,73±0,06
Thủy tinh thể (%)	20,00±1,15	19,67±1,20
Mô sẹo ở mép lá (%)	21,67±1,67	22,33±1,45
Hoại tử mẫu cấy (%)	14,67±0,88	12,33±1,45
Hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (%)	20,33±0,88	10,67±0,67

*: các giá trị thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn trong phép thử LSD với p<0,05.

Kết quả ghi nhận được, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên với các chỉ tiêu như tỷ lệ tái sinh chồi (66,00%), số chồi/mẫu (5,33 chồi) và chiều cao chồi (0,73 cm) (bảng 1). Kết quả nghiên cứu này trên cây kiwi cũng cho kết quả tương đồng, mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh tối ưu hơn so với mẫu lá nguyên [22]. Vì vậy, việc sử dụng mẫu gân lá chính cho hiệu quả tái sinh chồi tối ưu so với mẫu lá nguyên. Ngoài ra, ở giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet trên cả 2 mẫu cây gân lá chính và mẫu lá nguyên đều xuất hiện hiện tượng thủy tinh thể (lần lượt là 20,00 và 19,67%), mô sẹo ở mép lá (lần lượt là 21,67 và 22,33%), hoại tử mẫu cấy (lần lượt là 14,67 và 12,33%), hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (lần lượt là 20,33 và 15,67%) (bảng 1 và hình 1).



Hình 1. Một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet sau 4 tuần nuôi cấy. (A, B, C) Mẫu cấy sinh trưởng bình thường; (D, E, F) Hiện tượng thủy tinh thể; (G, H, I) Hiện tượng hình thành mô sẹo ở mép lá; (K, L, M) Hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. Thước đo: 1 cm, ngoại trừ A: 0,5 cm.

Hiện tượng thủy tinh thể chủ yếu được ghi nhận trong nuôi cấy *in vitro* và đã được ghi nhận khi nuôi cấy cây Cẩm chương [23] và cây Xương rồng [24]. Nguyên nhân dẫn đến hiện tượng thủy tinh thể trong nhân giống *in vitro* là do môi trường nuôi cấy, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật [25], độ ẩm tương đối và sự tích lũy khí ET [26], hệ thống nuôi cấy và các chất làm đông như agar hay gelrite trong môi trường nuôi cấy [27]. Đối với cây African violet, hiện tượng bất thường ghi nhận ở giai đoạn tái

sinh chồi là khoảng 20% trên cả 2 loại mẫu cây (gân lá chính và lá nguyên) với các đặc điểm của chồi như chồi và lá có hiện tượng mọng nước và biến dạng (hình 1D-1F). Trong nghiên cứu này, hiện tượng mô sẹo xuất hiện ở mép lá lần đầu tiên ghi nhận trong nuôi cấy *in vitro*, điều này có thể là do trong giai đoạn tái sinh chồi, các chồi được tạo thành có kích thước nhỏ và các lá nằm gần và tiếp xúc với môi trường nuôi cấy; do đó, các mẫu lá có hiện tượng hình thành mô sẹo (hình 1G-1I).

Bên cạnh đó, hiện tượng hoại tử mẫu cây, hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy cũng được ghi nhận trong giai đoạn tái sinh chồi (hình 1K-1M); trong đó, mẫu gân lá nuôi cấy trên môi trường MSS ghi nhận các hiện tượng này thấp hơn so với mẫu lá nguyên. Điều này có thể là do mẫu gân lá chính có vết thương sau khi cắt mẫu nên khả năng tiếp xúc, hấp thu dinh dưỡng tốt hơn so với mẫu lá nguyên. Ở điều kiện nuôi cấy trong bình kín, độ ẩm cao trong bình nuôi cấy, thành phần môi trường nuôi cấy và sự tích lũy các khí (đặc biệt là khí ET) đã làm xuất hiện một số hiện tượng không mong muốn trong quá trình nuôi cấy *in vitro* [4, 12]. Do đó, việc cải tiến sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cây cũng như khắc phục một số hiện tượng bất thường là việc làm cần thiết trong nhân giống thực vật trong điều kiện *in vitro*.

3.2. Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và khắc phục một số hiện tượng bất thường

Sau 4 và 8 tuần nuôi cấy, AgNPs có hiệu quả lên khả năng tái sinh chồi, khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo mép lá, hoại tử mẫu cây, hóa nâu mẫu cây và môi trường nuôi cấy, sự biến động khí ET, enzyme chống oxy hóa (bảng 2, 3 và hình 2, 3).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nano bạc lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

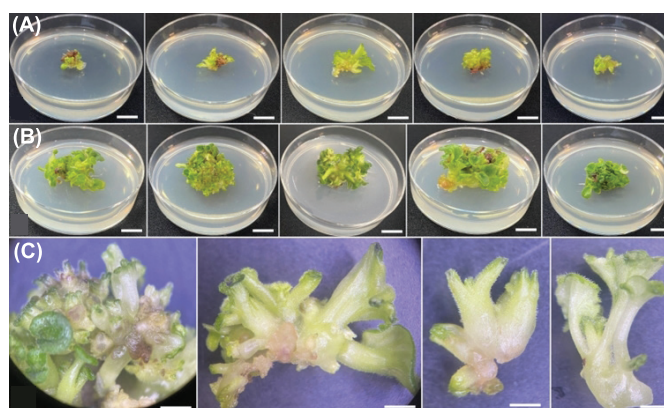
AgNPs (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
0	67,67 ^a	5,67 ^b	0,47 ^{bc}	282,67 ^c	36,00 ^d
1,0	79,00 ^{bc}	6,00 ^b	0,53 ^{ab}	467,67 ^b	60,67 ^b
2,0	89,33 ^a	6,00 ^b	0,67 ^a	581,33 ^a	72,67 ^a
3,0	82,33 ^b	7,67 ^a	0,43 ^{bc}	409,00 ^b	50,33 ^c
4,0	76,33 ^c	5,00 ^b	0,30 ^c	409,33 ^b	42,33 ^{cd}

*: trong cùng một cột, các ký tự (^{a, b, c, d}) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

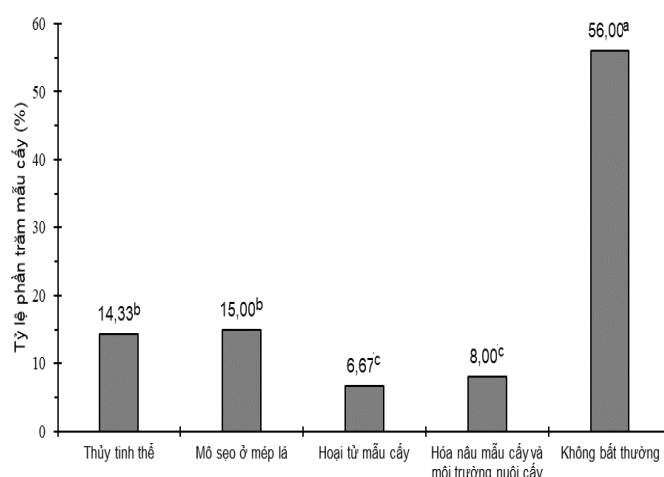
Bảng 3. Ảnh hưởng của nano bạc lên sự tái sinh chồi và sinh trưởng của cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/l)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi (cm)	SPAD	Khối lượng tươi cụm chồi (mg)	Khối lượng khô cụm chồi (mg)
	Tổng số chồi	Chồi > 1 cm				
0	7,33 ^{bc*}	1,67 ^{bc}	0,73 ^c	27,33 ^a	1020,33 ^d	120,00 ^e
1,0	10,67 ^a	2,33 ^b	0,80 ^{bc}	27,67 ^a	1198,33 ^c	134,33 ^b
2,0	10,00 ^a	5,67 ^a	1,30 ^a	30,00 ^a	1476,00 ^a	160,67 ^a
3,0	8,00 ^b	1,33 ^d	0,93 ^b	28,00 ^a	1358,00 ^b	147,00 ^{ab}
4,0	6,00 ^c	1,00 ^e	0,73 ^c	25,33 ^a	977,67 ^d	110,67 ^c

*: trong cùng một cột, các ký tự (^{a, b, c, d, e}) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). SPAD: chỉ số đánh giá hàm lượng diệp lục trong lá.



Hình 2. Ảnh hưởng của nano bạc lên khả năng tái sinh chồi cây African violet sau 4 và 8 tuần nuôi cấy. (A) Cụm chồi sau 4 tuần nuôi cấy; (B) Cụm chồi sau 8 tuần nuôi cấy; (C) Hình thái chồi. Thước đo: 2 cm.



Hình 3. Ảnh hưởng của nano bạc ở nồng độ 2 mg/l lên khả năng khắc phục một số hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cây African violet sau 8 tuần nuôi cấy. Các ký tự (a, b, c) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

Kết quả ghi nhận nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs sau 4 tuần nuôi cấy cho tỷ lệ tái sinh chồi (89,33%), khối lượng tươi và khô của cụm chồi (tương ứng là 581,33 và 72,67 mg) cao hơn các nghiệm thức bổ sung AgNPs khác và đối chứng (bảng 2). Ngoài ra, nghiệm thức bổ sung 3 mg/l AgNPs ghi nhận số chồi/mẫu (7,67 chồi) cao hơn các nghiệm thức còn lại (bảng 1 và hình 2A).

Sau 8 tuần nuôi cấy, nghiệm thức bổ sung 1 và 2 mg/l AgNPs cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất với tổng số chồi ghi nhận lần lượt là 10,67 chồi/mẫu và 10 chồi/mẫu. Tuy nhiên, số chồi có kích thước > 1 cm ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs lại cao hơn với 5,67 chồi (bảng 3 và hình 2B và 2C). Ngoài ra, các chỉ số như chiều cao chồi (1,30 cm), khối lượng tươi của cụm chồi (1476 mg) và khối lượng khô của cụm chồi (160,67 mg) đạt tối ưu khi bổ sung 2 mg/l AgNPs (bảng 3). Chỉ số SPAD không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức.

Ngoài ra, hàm lượng khí ET và hoạt tính enzyme chống oxy hóa của cụm chồi được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung AgNPs sau 8 tuần nuôi cấy cũng ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa (bảng 4). Nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs ghi nhận hàm lượng khí ET thấp hơn so với đối chứng (1,15 so với 1,36 ppm); trong khi đó, hoạt tính enzyme của CAT và APX lại gia tăng hơn so với đối chứng (bảng 4). Hơn nữa, ghi nhận hiện tượng bất thường trong giai đoạn tái sinh chồi cho thấy hiện tượng thủy tinh thể (14,33%), mô sẹo ở mép lá (15%), hoại tử mẫu cấy (6,67%) và hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy (8,00%) giảm ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/l AgNPs so với nghiệm thức đối chứng (bảng 1 và hình 3).

Bảng 4. Sự tích lũy khí ethylene trong đĩa nuôi cấy và hoạt tính catalase và ascorbate peroxidase của cụm chồi trên môi trường có bổ sung nano bạc sau 8 tuần nuôi cấy.

AgNPs (mg/l)	Khí ET (ppm)	Hoạt tính CAT (U/g)	Hoạt tính APX (U/g)
0	1,36 ^{ab}	77,31 ^c	0,29 ^e
1,0	1,45 ^a	82,32 ^d	1,11 ^b
2,0	1,15 ^c	101,51 ^a	2,37 ^a
3,0	1,32 ^{bc}	88,09 ^b	0,94 ^c
4,0	1,44 ^a	86,90 ^c	0,40 ^d

*: trong cùng một cột, các ký tự (a, b, c, d, e) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test). ET: ethylene, APX: ascorbate peroxidase, CAT: catalase.

Khí ET là hormone thực vật duy nhất tồn tại ở dạng khí và có hoạt tính sinh học ở nồng độ rất thấp (0,01-1,0 ppm). Độ nhạy cảm của cây với khí ET có thể thay đổi tùy thuộc vào loài và kiểu đáp ứng. Thực vật từ lâu đã được biết đến có khả năng sản xuất ET, một hormone dạng khí có tác động mạnh đến quá trình phát triển và tăng trưởng, có thể hỗ trợ hoặc đối kháng với các hormone khác [28]. Đã có nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng, sự hình thành và hoạt động của ET bị ức chế bởi AgNPs; AgNPs ngăn chặn sự liên kết của khí ET với các thụ thể trong tế bào thực vật, từ đó ngăn chặn quá trình nhận diện và hoạt động của khí ET [29]. Bên cạnh đó, AgNPs có thể hạn chế sự tích lũy khí ET trong bình nuôi cấy chồi dâu tây [4]. Ngoài ra, nồng độ AgNPs ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của thực vật có sự khác biệt tùy theo loại cây trồng [4, 28, 29].

Kết quả của nghiên cứu cho thấy, ở nồng độ tối ưu, AgNPs giúp gia tăng hoạt tính CAT và APX. Hoạt tính của APX và CAT ghi nhận trên cây Cải bẹ xanh trong môi trường có bổ sung AgNPs (25-50 ppm) gia tăng và giúp cây cũng sinh trưởng và phát triển mạnh nhất [30]. Ngoài ra, bổ sung AgNPs vào môi trường nuôi cấy cây Lúa và Cải bẹ xanh ở mức độ phân tử ghi nhận được sự tăng mạnh biểu hiện gen FSD1 của SOD, CATa và APXa; do đó, làm giảm đáng kể sự tích lũy gốc H_2O_2 giúp gia tăng sự sinh trưởng của cây [30, 31]. Trong nghiên cứu này, bổ sung AgNPs có hiệu quả lên khả năng tái sinh chồi, khắc phục một số hiện tượng bất thường, sự biến động khí ethylen, enzyme kháng oxy hóa (bảng 2, 3 và hình 2, 3). Từ những kết quả trên cho

thấy, bổ sung 2 mg/l AgNPs vào môi trường nuôi cấy đã giúp gia tăng hiệu quả tái sinh chồi cũng như hạn chế tỷ lệ mẫu có hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử mẫu cấy, hóa nâu mẫu cấy và môi trường nuôi cấy của cây African violet.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, việc bổ sung AgNPs (2 mg/l) có hiệu quả tích cực trong việc tái sinh chồi và sự sinh trưởng của cụm chồi, đồng thời giúp khắc phục hiện tượng thủy tinh thể, mô sẹo ở mép lá, hoại tử và hóa nâu của mẫu cấy và môi trường nuôi cấy. AgNPs còn giúp giảm sự tích lũy ET trong hệ thống nuôi cấy và gia tăng hoạt động của APX và CAT trong giai đoạn tái sinh chồi của cây African violet.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Chương trình phát triển nhóm nghiên cứu xuất sắc hạng I về “Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hạt nano kim loại lên sự phát sinh hình thái, sinh trưởng - phát triển, sinh lý - sinh hóa và tích lũy hợp chất thứ cấp của một số cây trồng có giá trị kinh tế nuôi cấy *in vitro*” (mã số đề tài NCXS01.03/22-24) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. Gopinath, S. Gowri, V. Karthika, et al. (2014), “Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*”, *Journal of Nanostructures*, **4**(3), pp.1-11, DOI: 10.1007/s40097-014-0115-0.
- [2] H.M.H. Salama (2012), “Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.)”, *International Journal of Biotechnology Research*, **3**(10), pp.190-197.
- [3] J.P. Giraldo, M.P. Landry, S.M. Faltermeier, et al. (2014), “Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing”, *Nature Materials*, **13**(4), pp.400-408, DOI: 10.1038/nmat3890.
- [4] H.T. Tung, H.G. Bao, D.M. Cuong, et al. (2021a), “Silver nanoparticles as the sterilant in large-scale micropropagation of chrysanthemum”, *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **57**, pp.897-906, DOI: 10.1007/s11627-021-10163-7.
- [5] D.T. Nhut, D.B. Trinh, D.M. Cuong, et al. (2018), “Study on silver nanoparticles as a novel explant disinfectant for micropropagation of African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.)”, *Vietnam Journal of Biotechnology*, **16**(1), pp.87-97, DOI: 10.15625/1811-4989/16/1/9807.
- [6] V.T. Mo, L.K. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020), “Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from the seaweed *Kappaphycus striatus*”, *Acta Physiologiae Plantarum*, **42**, DOI: 10.1007/s11738-020-03102-3.

- [7] H.T. Tung, T.T. Thuong, D.M. Cuong, et al. (2021b), "Silver nanoparticles improved explant disinfection, *in vitro* growth, runner formation and limited ethylene accumulation during micropropagation of strawberry (*Fragaria × ananassa*)", *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **145**(2), pp.393-403, DOI: 10.1007/s11240-021-02015-4.
- [8] H.T. Tung, P.T. Suong, H.D. Khai, et al. (2021c), "Protocorm-like body formation, stem elongation and enhanced growth of *Anthurium andraeanum* 'Tropical' plantlet on medium containing silver nanoparticles", *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, **58**, pp.70-79, DOI: 10.1007/s11627-021-10217-w.
- [9] D.M. Cuong, P.C. Du, H.T. Tung, et al. (2021), "Silver nanoparticles as an effective stimulant in micropropagation of *Panax vietnamensis* - A valuable medicinal plant", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **146**(3), pp.577-588, DOI: 10.1007/s11240-021-02095-2.
- [10] H.T. Tung, N.B. Nam, N.P. Huy, et al. (2018), "A system for large scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes", *Scientia Horticulturae*, **232**, pp.153-161, DOI: 10.1016/j.scientia.2017.12.063.
- [11] H.T.M. Ngan, D.M. Cuong, H.T. Tung, et al. (2020a), "The effect of coban and silver nanoparticles on overcoming leaf abscission and enhanced growth of rose (*Rosa hybrida* L. 'Baby Love') plantlets cultured *in vitro*", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **141**(2), pp.393-405, DOI: 10.1007/s11240-020-01796-4.
- [12] H.T.M. Ngan, H.T. Tung, B.V. Le, et al. (2020b), "Evaluation of root growth, antioxidant enzyme activity and mineral absorbability of carnation (*Dianthus caryophyllus* "Express golem") plantlets cultured in two culture systems supplemented with iron nanoparticles", *Scientia Horticulturae*, **272**, DOI: 10.1016/j.scientia.2020.109612.
- [13] M. Ioannou (1987), "Micropropagation of African violet from petiole and leaf blade tissue", *Technical Bulletin (Cyprus)*, **92**, pp.114-117.
- [14] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Plant Physiology*, **15**, pp.473-497.
- [15] P.D. Paiva, S.C.B.R. Jose, M. Pasqual, et al. (1997), "Effects of naphthalene acetic acid and GA₃ on the violet micropropagation", *Ceres*, **44**, pp.392-398, DOI: 10.20546/ijcmas.2018.703.036.
- [16] D.T. Nhut, P.N. Uyen, T.T.L. Anh, et al. (2007), "Temporary immersion system for rapid *in vitro* African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl)", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **5**(3), pp.371-381.
- [17] N.H. Chau, B.A. Le, Q.B. Ngo, et al. (2008), "Some results in manufacturing of nanosilver and investigation of its application for disinfection", *Advances in Natural and Applied Sciences*, **9**(2), pp.241-248.
- [18] S.M. Cristescu, J. Mandon, D. Arslanov, et al. (2012), "Current methods for detecting ethylene in plants", *Annals of Botany*, **111**(3), pp.347-360, DOI: 10.1093/aob/mcs259.
- [19] L. Goth (1991), "A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range", *Clinica Chimica Acta*, **196**(2-3), pp.143-151, DOI: 10.1016/0009-8981(91)90067-m.
- [20] Y. Nakano, K. Asada (1981), "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts", *Plant and Cell Physiology*, **22**(5), pp.867-880, DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232.
- [21] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, **11**(1), pp.1-42.
- [22] N.T.M. Hanh, H.T. Tung, H.D. Khai, et al. (2022), "Efficient somatic embryogenesis and regeneration from leaf main vein and petiole of *Actinidia chinensis* planch. via thin cell layer culture technology", *Scientia Horticulturae*, **298**, DOI: 10.1016/j.scientia.2022.110986.
- [23] M. Kharrazi, A. Tehranifar, S. Nemati, et al. (2011), "In vitro culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification", *Journal of Biological and Environmental Sciences*, **5**(13), pp.1-6.
- [24] O.H.G. Osuna, A.B. Mendoza, L.E. Bocardo (2011), "Hyperhydricity control of *in vitro* shoot of *Turbinicarpus valdeianus* (Möller) GL&F", *Phyton*, **80**(5), pp.175-179, DOI: 10.32604/phyton.2011.80.175.
- [25] C. Kevers (2004), "Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state", *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **77**(5), pp.181-191, DOI: 10.1023/B:TICU.0000016825.18930.e4.
- [26] C.C. Lai, H.M. Lin, S.M. Nalawade (2005), "Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels", *Journal of Plant Physiology*, **162**(2), pp.355-361, DOI: 10.1016/j.jplph.2004.07.015.
- [27] B. Winarto, M.A. Aziz, A.A. Rashid, et al. (2016), "Effect of permeable vessel closure and gelling agent on reduction of hyperhydricity in *in vitro* culture of carnation", *Indonesian Journal of Agricultural Science*, **5**(1), pp.11-17, DOI: 10.21082/ijas.v5n1.2004.p11-19.
- [28] G.K. Muday, A. Rahman, B.M. Binder (2012), "Auxin and ethylene: Collaborators or competitors?", *Trends in Plant Science*, **17**(4), pp.181-195, DOI: 10.1016/j.tplants.2012.02.001.
- [29] R. Razavizadeh, F. Rostami (2015), "Risks and benefits assessments of silver nanoparticles in tomato plants under *in vitro* culture", *Journal of Engineering Research*, **3**(7), pp.51-55.
- [30] P. Sharma, D. Bhatt, M.G.H. Zaidi, et al. (2012), "Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **167**(8), pp.2225-2233, DOI: 10.1007/s12010-012-9759-8.
- [31] P.M.G. Nair, I.M. Chung (2014) "Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings", *Chemosphere*, **112**, pp.105-113, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2014.03.056.

Sàng lọc môi trường nuôi cấy và điều kiện lên men tối ưu cho sinh tổng hợp transglutaminase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1

Võ Nguyễn Thanh Thảo^{1,2}, Nguyễn Thành Vũ¹, Nguyễn Thị Dung¹, Bùi Lê Khả Tú¹, Nguyễn Đăng Phước Ngọc³, Trần Quốc Tuấn^{2*}

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh,

227 Nguyễn Văn Cừ, phường 4, quận 5, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/6/2023; ngày chuyển phản biện 2/6/2023; ngày nhận phản biện 19/6/2023; ngày chấp nhận đăng 9/7/2023

Tóm tắt:

Transglutaminase từ vi sinh vật (MTGase) xúc tác tạo ra liên kết isopeptide giữa nhóm γ -carboxamide của gốc glutamine là chất cho acyl và nhóm ε -amine của các hợp chất khác nhau như là chất nhận làm thay đổi cấu trúc protein. Mục tiêu của nghiên cứu là lựa chọn môi trường nuôi cấy phù hợp và tối ưu hóa điều kiện lên men nhằm tăng hoạt tính transglutaminase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1. Nghiên cứu tiến hành theo các công thức môi trường khác nhau, sau đó các giá trị tối ưu điều kiện lên men bao gồm pH, nhiệt độ và thời gian cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy, hoạt tính MTGase cao nhất được ghi nhận ở môi trường chứa peptone (1%), cao nấm men (0,2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2%), KH_2PO_4 (0,4%), Na_2HPO_4 (0,5%), bột đậu nành (1,5%), tinh bột khoai tây (1,5%), glucose (0,5%). Hoạt tính MTGase đạt mức cao nhất (43,6 mU/ml) với điều kiện nuôi ở pH 7,5, nhiệt độ 30°C trong 4 ngày. Hoạt tính MTGase tăng lên khi môi trường nuôi cấy chứa hỗn hợp ba nguồn carbon gồm bột đậu nành, tinh bột khoai tây và glucose. Trong nghiên cứu đã đưa ra điều kiện nuôi cấy và yếu tố môi trường phù hợp cho chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 sinh tổng hợp transglutaminase.

Từ khóa: môi trường lên men, phương pháp đáp ứng bề mặt, *Streptomyces*, tối ưu hóa điều kiện, transglutaminase từ vi sinh vật.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8

Screening the culture medium and optimal fermentation conditions for the production of transglutaminase by the *Streptomyces* sp. strain TG1G1

Nguyen Thanh Thao Vo^{1,2}, Thanh Vu Nguyen¹, Thi Dung Nguyen¹, Le Kha Tu Bui¹, Dang Phuoc Ngoc Nguyen³, Quoc Tuan Tran^{2*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, 2374 Highway 1A, Quarter 2, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Biology - Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

277 Nguyen Van Cu Street, Ward 4, District 5, Ho Chi Minh City, Vietnam

³International University, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 1 June 2023; revised 19 June 2023, accepted 9 July 2023

Abstract:

Microbial transglutaminase (MTGase) catalyses the creation of isopeptide bonds between the γ -carboxamide group of the glutamine residues as acyl donors and the ε -amine group of different compounds as a receptor that modifies protein structure. This research objective was to improve the transglutaminase activity produced by a strain of *Streptomyces* sp. TG1G1 by choosing an appropriate medium and optimising fermentation conditions. The study started with screening different media formulations and then various fermentation conditions, including pH, temperature, and time for optimal MTGase production. The findings of these studies revealed that the maximum MTGase activity was shown in the medium composed of peptone (1%), yeast extract (0.2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2%), KH_2PO_4 (0.4%), Na_2HPO_4 (0.5%), soybean powder (1.5%), potato starch (1.5%), and glucose (0.5%). MTGase activity reached the highest level (43.6 mU/ml) under the following culture conditions: pH 7.5, temperature of 30°C, for 4 days of culture. In addition, MTGase activity increased when the culture medium contained three carbon sources, including soybean meal, potato starch, and glucose. These results propose appropriate culture conditions and medium factors for transglutaminase biosynthesis of *Streptomyces* sp. strain TG1G1.

Keywords: conditions optimisation, fermentation environment, microbial transglutaminase, response surface methodology, *Streptomyces*.

Classification numbers: 1.6, 2.8

*Tác giả liên hệ: Email: trqtuan@hcmus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Transglutaminase (EC 2.3.2.13; protein-glutamine γ -glutaminyltransferase) là một nhóm enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển acyl, hình thành liên kết cộng hoá trị giữa nhóm ε -amino của lysine gắn với protein hoặc peptide và nhóm γ -carboxamide của glutamine gắn với protein hoặc peptide [1]. Từ đó, cấu trúc của protein được cải thiện thông qua các liên kết ngang được hình thành trong hoặc giữa các phân tử, giúp thay đổi các đặc tính của protein [1, 2]. Do đó, transglutaminase được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp chế biến thực phẩm, với mục đích phát triển và cải thiện đặc tính chức năng protein có trong các sản phẩm như tăng thời hạn sử dụng, tăng giá trị dinh dưỡng cũng như cải thiện độ nhớt, độ đàn hồi và khả năng giữ nước [1, 2].

Transglutaminase có trong các mô tế bào động vật, thực vật và vi sinh vật. Do quy trình thu nhận và tinh sạch enzyme từ tế bào động vật, thực vật khá phức tạp và chỉ thu được lượng nhỏ sản phẩm nên nguồn transglutaminase từ vi sinh vật (microbial transglutaminase, MTGase) được nghiên cứu như một nguồn thay thế tiềm năng [1, 2]. Quá trình nuôi cấy vi sinh vật giúp sản xuất MTGase với số lượng lớn từ các thành phần môi trường có chi phí thấp [3]. Theo đó, tối ưu hóa quá trình lên men là cần thiết bởi vì các thành phần môi trường nuôi cấy hay các điều kiện lên men đều ảnh hưởng đến quy trình sản xuất công nghiệp [4].

Kỹ thuật được sử dụng để tối ưu hóa môi trường dựa trên việc tối ưu từng nhân tố (one-at-a-time) có ưu điểm là đơn giản và dễ thực hiện, trong đó mức độ của một yếu tố được thay đổi trong khi giữ nguyên các yếu tố khác được trình bày trên đồ thị mà không cần phải phân tích thống kê [2, 5]. Đồng thời, phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) và mô hình thực nghiệm được thiết kế theo phương pháp Box-Behnken, mô tả bằng thuật toán các mối quan hệ tồn tại giữa các điều kiện nuôi (pH, nhiệt độ và thời gian) một cách độc lập và thu nhận hàm mục tiêu là hoạt tính MTGase. Từ đó đánh giá tác động của các biến khác nhau, đồng thời thiết lập các điều kiện tối ưu của một hệ thống đa biến để đạt được các phản ứng có ý nghĩa [5]. Trong nghiên cứu này với mục tiêu thực hiện là tối ưu hóa quá trình lên men của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 có khả năng sinh transglutaminase để thu nhận tối đa hoạt tính enzyme.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng *Streptomyces* sp. được sử dụng trong nghiên cứu có ký hiệu là TG1G1, được cung cấp từ bộ chủng *Streptomyces* sp. của Phòng Công nghệ Sinh học Thực phẩm, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sàng lọc môi trường tối ưu sinh MTGase

Chủng khảo sát được cấy vào môi trường tăng sinh cấp 1 (peptone 2%, cao nấm men 0,2%, KH_2PO_4 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%, tinh bột tan 2%, glucose 0,5%), được

nuôi lắc ở 30°C 250 vòng/phút trong 3 ngày. Sau đó, sinh khối cấp 1 được chuyển vào môi trường khảo sát (tỷ lệ cấy 10%) và lên men trong 4 ngày với cùng điều kiện. Sau đó tiến hành ly tâm (7.500 vòng/phút) trong 15 phút ở 4°C thu dịch nổi chứa enzyme thô. Xác định hoạt tính enzyme cùng điều kiện để lựa chọn môi trường thích hợp để thu được MTGase có hoạt tính cao. Năm môi trường khác nhau được khảo sát, thay đổi nguồn carbon và nitơ với mục đích tìm ra công thức phù hợp để tổng hợp transglutaminase với năng suất cao. Các thành phần của môi trường lên men được tham khảo từ các nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần của các môi trường khảo sát.

Môi trường	Nguồn carbon	Nguồn nitơ	Nguồn khoáng	Tài liệu tham khảo
Môi trường A	Tinh bột khoai tây 2%, glucose 1,5%	Peptone 1,5%, bột đậu nành 2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1% KH_2PO_4 0,5% Na_2HPO_4 0,5%	[6]
Môi trường B	Glycerol 3,12%, tinh bột tan 2%	Peptone 1,05%, cao nấm men 0,25% casein 3,84%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% KH_2PO_4 0,2% Na_2HPO_4 0,5%	[7]
Môi trường C	Tinh bột khoai tây 2% glucose 0,2%	Bột đậu nành 1,5%, peptone 1%, cao nấm men 0,2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,4% Na_2HPO_4 0,5%	[2]
Môi trường D	Tinh bột tan 2%	Peptone 2%, cao nấm men 0,5%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,2% K_2HPO_4 0,2% CaCl_2 0,1%	[8]
Môi trường E	Tinh bột tan 2%	Peptone 2%, cao nấm men 0,2%	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2% KH_2PO_4 0,2% K_2HPO_4 0,2%	[9]

2.2.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy sinh MTGase

Phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) và thiết kế thử nghiệm Box-Behnken được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của các thông số điều kiện nuôi cấy lên quá trình sinh tổng hợp MTGase từ chủng TG1G1. 3 yếu tố được chọn làm biến độc lập là pH (A), nhiệt độ (B), thời gian (C), mỗi yếu tố được khảo sát ở 3 mức (-1, 0, 1) với 15 nghiệm thức, trong đó có 3 thí nghiệm ở tâm, 3 lần lặp lại, hàm mục tiêu là hoạt tính enzyme MTGase (Y).

Giá trị mã hóa của các biến độc lập cho thiết kế Box-Behnken được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Giới hạn và các mức độ mã hóa của 3 yếu tố khảo sát thực nghiệm.

Các biến số	Các yếu tố khảo sát	Mức độ			Tài liệu tham khảo
		-1	0	1	
A	pH	6,5	7,5	8,5	[10]
B	Nhiệt độ (°C)	26	30	34	[2]
C	Thời gian (ngày)	2	4	6	[10]

Chỉ tiêu theo dõi: hoạt tính MTGase (Y).

2.2.3. Phương pháp đo hoạt tính MTGase

Hoạt tính MTGase được xác định bằng phương pháp so màu sử dụng N-carbobenzoxy-L-glutaminyglycine (Z-Gln-Gly) làm cơ chất theo mô tả của J. Folk và cs (1996) [11]. Hỗn hợp phản ứng chứa 0,2 ml cơ chất (Z-Gln-Gly, tris buffer 1M, hydroxylamine 200 mM, CaCl₂ 1 M) ủ ở 37°C, bổ sung 0,03 ml MTGase thu được, trộn đều và ủ ở 37°C trong 10 phút. Sau đó, ngừng phản ứng bằng cách thêm 0,5 ml dung dịch TCA 12% trộn đều, tiếp tục bổ sung 0,5 ml dung dịch FeCl₃ 5%, trộn đều và ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút, đo độ hấp thụ ở bước sóng 525 nm, sử dụng L-glutamic acid γ -monohydroxamate làm chất chuẩn. Hoạt tính chung của MTGase được định nghĩa là một đơn vị MTGase tương ứng lượng enzyme gây ra sự hình thành 1 μ M L-glutamic acid γ -monohydroxamate trong một phút ở 37°C, pH 6,0. Hàm lượng protein của MTGase thu nhận được xác định bằng phương pháp Bradford [12] và hoạt tính riêng của enzyme là số đơn vị hoạt tính của enzyme trong 1 mg protein.

2.2.4. Phương pháp phân tích và xử lý

Thí nghiệm được thiết kế và phân tích thống kê bằng phần mềm Design Expert® 12.0.3 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, Mỹ). Mô hình được kiểm định thông qua kiểm định ANOVA.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Sàng lọc môi trường tối ưu sinh MTGase

Chủng TG1G1 có khả năng sinh MTGase với các nồng độ protein, hoạt tính chung và riêng khác nhau tùy thuộc vào điều kiện môi trường nuôi cấy (bảng 3). Cụ thể, môi trường C cho hoạt tính cao hơn so với các môi trường còn lại. Qua bảng 3, môi trường A và C có sự phối hợp giữa hai nguồn carbon là tinh bột khoai tây và glucose cho hoạt tính MTGase tốt hơn những môi trường chỉ sử dụng một loại carbon (tinh bột tan) như D và E. Đồng thời, nguồn carbon là glycerol phối hợp với tinh bột tan không mang lại hiệu quả tương tự như khi phối hợp giữa tinh bột khoai tây và glucose. Từ sự khác biệt này, có thể thấy, nguồn carbon từ tinh bột và nguồn nitơ là peptone giữ vai trò quan trọng trong quá trình lên men và thu nhận MTGase, để nâng cao hiệu quả thu nhận enzyme việc phối hợp giữa các nguồn carbon khác nhau vô cùng quan trọng. Kết quả tương tự như nghiên cứu của G. Bahrim và cs (2010) [13], môi trường có sử dụng bột khoai tây và glucose kích thích sinh MTGase tốt hơn các nguồn carbon đơn lẻ khác, và peptone là yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh enzyme. Ngoài ra, môi trường C phù hợp cho quá trình thu nhận MTGase với hoạt tính và độ tinh sạch của enzyme cao hơn ở các môi trường khảo sát khác, được thể hiện qua hàm lượng protein tương đối ít, giúp cho sản phẩm MTGase thu nhận có hoạt tính riêng cao hơn.

Bảng 3. Hoạt tính MTGase của chủng TG1G1 trên các môi trường khảo sát.

Môi trường	Hoạt tính chung (mU/ml)	Nồng độ protein (μ g/ml)	Hoạt tính riêng (mU/mg)
Môi trường A	38,683 $\pm$ 0,286	483,23 $\pm$ 4,01	80,054 $\pm$ 0,556
Môi trường B	36,754 $\pm$ 0,078	485,50 $\pm$ 3,88	75,709 $\pm$ 0,385
Môi trường C	40,779 $\pm$ 0,058	396,37 $\pm$ 2,88	102,94 $\pm$ 0,120
Môi trường D	38,374 $\pm$ 0,073	557,72 $\pm$ 5,59	68,809 $\pm$ 0,614
Môi trường E	32,888 $\pm$ 0,656	492,36 $\pm$ 3,01	66,797 $\pm$ 0,594

Các chữ cái trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

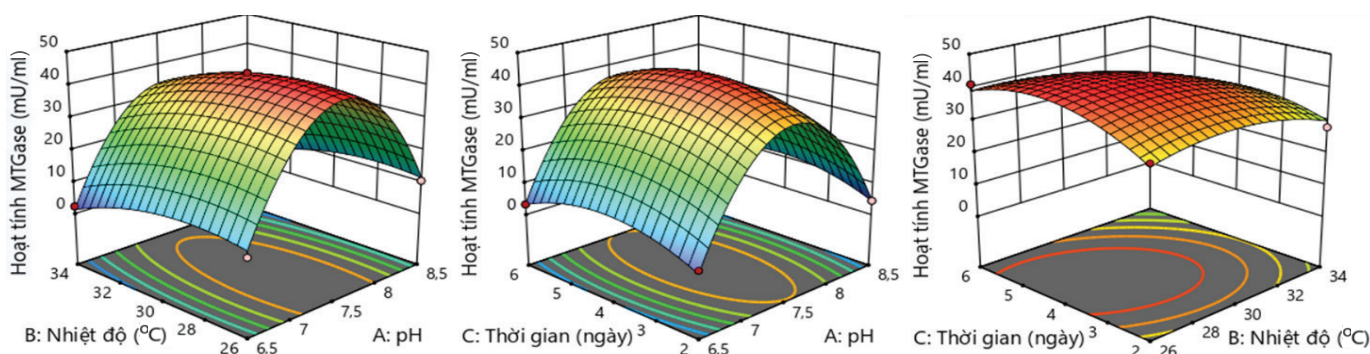
3.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy sinh MTGase

Theo phương pháp đáp ứng bề mặt, điều kiện nuôi cấy sinh tổng hợp MTGase từ chủng TG1G1 được thực hiện tối ưu hóa bằng cách quy hoạch thực nghiệm với ba yếu tố ảnh hưởng là pH (A), nhiệt độ (B), thời gian (C) để xác định giá trị tối ưu. Các thí nghiệm khảo sát được bố trí theo phương pháp Box-Behnken gồm 15 nghiệm thức, trong đó có 3 nghiệm thức ở tâm, mỗi thí nghiệm được tiến hành 3 lần lặp lại và lấy kết quả trung bình, hàm mục tiêu là hoạt tính MTGase (Y). Trong nghiên cứu, khoảng tối ưu được chọn sau khi tham khảo tài liệu là pH 6,5-8,5, nhiệt độ nuôi 26-34°C và thời gian nuôi cấy 2-6 ngày, kết quả khảo sát của các nghiệm thức được trình bày chi tiết trong bảng 4.

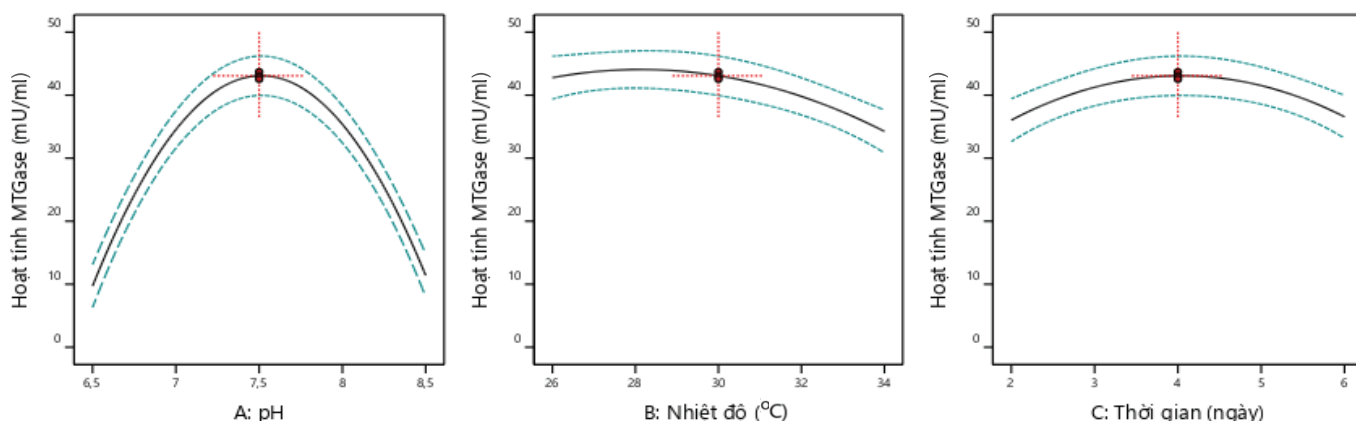
Bảng 4. Hoạt tính MTGase của TG1G1 thu nhận từ các nghiệm thức bố trí.

Số TT	Nghiệm thức	A: pH	B: nhiệt độ (°C)	C: thời gian (ngày)	Hoạt tính MTGase (mU/ml)	Giá trị dự đoán (mU/ml)
5	11	-1	0	-1	3,57918	2,61
9	7	0	-1	-1	34	32,99
10	9	0	+1	-1	28	29,97
6	13	+1	0	-1	4,41574	4,42
1	14	-1	-1	0	7,02716	9,0
3	5	-1	+1	0	2,29194	1,29
13	6	0	0	0	43,6782	43,08
14	1	0	0	0	42,9982	43,08
15	4	0	0	0	42,559	43,08
2	8	+1	-1	0	10,5	11,5
4	3	+1	+1	0	4,14702	2,17
7	2	-1	0	+1	3,2655	3,26
11	10	0	-1	+1	41	39,03
12	15	0	+1	+1	24	25,01
8	12	+1	0	+1	3,8783	4,84

Biểu đồ 3D của hàm mục tiêu hoạt tính MTGase thực nghiệm theo phương pháp đáp ứng bề mặt được thể hiện ở hình 1. Mô hình 3D thể hiện ảnh hưởng và tương tác của các biến độc lập đến quá trình sinh tổng hợp MTGase, giúp thu nhận hoạt tính MTGase cao hơn. Hình 1 và 2 cho thấy, cả 3 yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian đều có ảnh hưởng đến quá



Hình 1. Biểu đồ 3D về ảnh hưởng của hai yếu tố đến hoạt tính MTGase. Mỗi vòng tròn mở cho biết các giá trị dự đoán được ước tính từ phương trình thu được. Khi tác động của hai yếu tố được vẽ, yếu tố còn lại được đặt ở các giá trị trung bình như sau: 4 ngày, 30°C và pH 7,5).



Hình 2. Dự đoán sự thay đổi hoạt tính MTGase khi thay đổi các yếu tố nuôi cấy.

trình sinh tổng hợp MTGase. Hình 1 biểu đồ A-B và A-C có dạng mặt cong lồi, dốc và có đỉnh cực đại rõ ràng ở điều kiện khảo sát pH cho thấy mức độ ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt tính MTGase thu nhận. Hai yếu tố nhiệt độ và thời gian cho thấy sự ít tương tác và ảnh hưởng lẫn nhau (biểu đồ B-C).

Kết quả thực nghiệm trên cho giá trị $R^2=0,9947$, R^2 dự đoán là 0,9177 phù hợp với R^2 hiệu chỉnh là 0,9852; với chênh lệch nhỏ hơn 0,2. Độ chính xác phù hợp đo tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu với giá trị 24,3416, lớn hơn 4 là mong muốn, cho thấy một tín hiệu thích hợp. Mô hình này có thể được sử dụng để điều hướng không gian thiết kế (bảng 5).

Bảng 5. Thống kê mức độ phù hợp của thí nghiệm.

Độ lệch chuẩn	Giá trị trung bình	Hệ số biến thiên (%)	R^2	R^2 hiệu chỉnh	R^2 dự đoán	Độ chính xác phù hợp (Adeq precision)
2,10	19,69	10,68	0,9947	0,9852	0,9177	24,3416

Kết quả phân tích ANOVA mô hình bậc hai của hàm mục tiêu đã được đánh giá bằng các chỉ số F-value và R^2 tương ứng (bảng 6). Chỉ số F-value và p-value của mô hình lần lượt là 104,74 và $p<0,05$ ($<0,0001$) cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy là 99,99%. Mức độ không tương thích (F) của mô hình là 22,51 ($p>0,05$) thể hiện sự không tương thích không đáng kể về mặt thống kê.

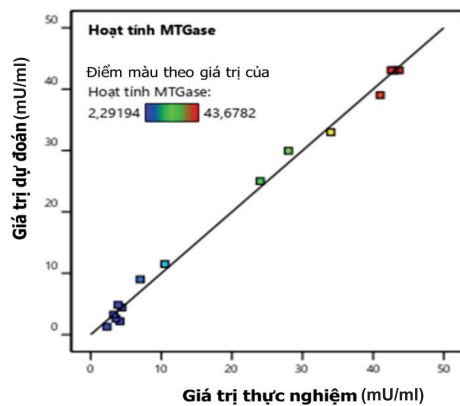
Bảng 6. Kết quả phân tích hồi quy hoạt tính MTGase thu nhận.

Các yếu tố	F-value	p-value
Mô hình	104,74	$<0,0001$
A-pH	1,3	0,3061
B-Nhiệt độ	32,85	0,0023
C-Thời gian	0,1306	0,7326
AB	0,148	0,7163
AC	0,0028	0,9596
BC	6,84	0,0473
A ²	883,51	$<0,0001$
B ²	17,37	0,0088
C ²	38,25	0,0016
Không tương thích	22,51	0,0628

Đồ thị biểu diễn các giá trị thực nghiệm so với phần dư của hoạt tính MTGase thu nhận, chứng minh tầm quan trọng của mô hình khi toàn bộ các điểm khảo sát hầu như tập trung xung quanh các đường chéo (hình 3). Phương trình hồi quy bậc hai được tính toán cho hoạt tính MTGase tối đa, sau khi loại bỏ các hệ số không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$) là:

$$Y \text{ (mU/ml)} = 43,0785 - 4,26*B - 2,75*B*C - 32,53*A^2 - 4,56*B^2 - 6,77*C^2$$

trong đó: Y là hoạt tính MTGase (mU/ml), A: pH, B: nhiệt độ (°C), C: thời gian (ngày).



Hình 3. Biểu đồ giữa các giá trị thực nghiệm và dự đoán.

Phân tích phương sai được trình bày ở bảng 5, cho thấy, mô hình này có ý nghĩa. Kiểm định R^2 thực tế gần tương đương với R^2 dự đoán, chứng tỏ rằng hồi quy này có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Ngoài ra, hệ số tương quan R^2 thu được là $<0,99$ cho thấy mức độ phù hợp của mô hình.

Bảng 7. Điểm đỉnh và giá trị dự đoán của mô hình.

Các yếu tố	Ký hiệu và giá trị tối ưu	Giá trị dự đoán của mô hình	Giá trị thực tế
pH	A=7,5		
Nhiệt độ (°C)	B=30	43,079 (mU/ml)	43,078±1,035 (mU/ml)
Thời gian (ngày)	C=4		

*Giá trị trung bình của 5 lần thực nghiệm (n=5).

Kết quả bảng 7 thu được từ mô hình cho thấy, nồng độ tối ưu của 3 yếu tố khảo sát giống với giá trị tại điểm trung tâm là: pH 7,5; nhiệt độ 30°C, thời gian nuôi là 4 ngày. Hoạt tính MTGase tối đa mà mô hình dự đoán được tính toán là 43,079 mU/ml. Để xác nhận kết quả dự đoán và xác thực phương trình hồi quy thu được, các thí nghiệm sử dụng điều kiện tối ưu đã được thực hiện và thu được giá trị hoạt tính MTGase 43,078±1,035 mU/ml (n=5), kết quả chứng minh tính phù hợp của mô hình được tạo ra. Kết quả tương tự như nghiên cứu của D.H. Eshra và cs (2016) [10] trong 4 ngày nuôi đối với cả 3 môi trường khảo sát đều cho hoạt tính MTGase tốt nhất với điều kiện nuôi tối ưu là nhiệt độ 30°C và pH 7,5.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tìm ra thành phần môi trường và các điều kiện phù hợp cho quá trình lên men chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 để thu được hoạt lực MTGase cao nhất. Cụ thể là môi trường C cho hoạt tính và độ tinh sạch của MTGase cao hơn so với các môi trường khảo sát khác (bao gồm: peptone 1%, cao nấm men 0,2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2%, KH_2PO_4 0,4%, Na_2HPO_4 0,5%, bột đậu nành 1,5%, tinh bột khoai tây 1,5%, glucose 0,5%). Đồng thời, nghiên cứu đã tìm ra được các thông số tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp MTGase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1 trong quá trình lên men áp dụng phương pháp đáp ứng bề mặt Box-Behnken. Hoạt tính MTGase tối đa đạt được là 43,078±1,035 mU/ml khi lên men ở pH 7,5, 30°C và thời gian lên men 4 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. Zhu, Q. Wu, L. Hua (2019), "Industrial enzymes", *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, Academic Press, pp.1-13, DOI: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00148-8.
- [2] J. Macedo, L. Sette, H. Sato (2007), "Optimisation studies for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp.", *Journal of Biotechnology*, **2(131)**, pp.213-214, DOI: 10.1016%2Fj.jbiotec.2007.07.384.
- [3] H.M. Moreno, M.M. Pedrosa, C.A. Tovar, et al. (2022), "Effect of microbial transglutaminase on the production of fish myofibrillar and vegetable protein-based products", *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology*, Academic Press, pp.427-436, DOI: 10.1016/B978-0-323-89929-1.00020-2.
- [4] C. Souza, F. Simone, M. Ayub (2006), "Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods", *Process Biochem*, **41(5)**, pp.1186-1192, DOI: 10.1016/j.procbio.2005.12.019.
- [5] J. Chen, X.Lan, R. Jia, et al. (2022), "Response surface methodology (RSM) mediated optimisation of medium components for mycelial growth and metabolites production of *Streptomyces alfae* XN-04", *Microorganisms*, **10(9)**, DOI: 10.3390/microorganisms10091854.
- [6] Y.N. Fawzya, D.S. Zilda, S. Chaniago (2016), "Screening of Indonesian *Streptomyces* sp. capable of secreting transglutaminase (MTGase) and optimisation of MTGase production using different growth media", *Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology*, **11(1)**, pp.13-21, DOI: 10.15578/squalen.195.
- [7] S.T. Luis, J.A. Ramirez, M. Vázquez (2004), "Production of transglutaminase by *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 using glycerol as carbon source", *Food Technology and Biotechnology*, **42(2)**, pp.75-81.
- [8] H. Aidaroos, G. Du, J. Chen (2011), "Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*", *Biotechnol. Bioinf. Bioeng.*, **1(2)**, pp.173-178.
- [9] C. Bourneow, S. Benjakul, P. Sumpavapol, et al. (2012), "Isolation and cultivation of transglutaminase-producing bacteria from seafood processing factories", *Innovative Romanian Food Biotechnology*, **10**, pp.28-39.
- [10] D.H. Eshra, T.M.A. Bakr, E. Iraki (2016), "Optimization conditions for the production of microbial transglutaminase from a newly isolated strain of *Streptomyces* sp.", *International Journal of Advanced Research*, **4(5)**, pp.1722-1729, DOI: 10.21474/IJAR01/362.
- [11] J. Folk, P. Cole (1996), "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation*, **122(2)**, pp.244-264, DOI: 10.1016/0926-6593(66)90066-X.
- [12] J.M. Walker (2009), "The Bradford method for protein quantitation (Chapter 4)", *The Protein Protocols Handbook*, Humana Press, pp.17-24, DOI: 10.1385/0-89603-268-X:9.
- [13] G. Bahrim, C. Iancu, B. Nicolae, et al. (2010), "Production of a novel microbial transglutaminase using *Streptomyces* sp. polar strains", *Biotechnology*, **15(2)**, pp.5197-5203.

Nghiên cứu điều chế vi cầu chứa bovine serum albumin từ alginat và chitosan

Lê Minh Quân*, Trần Thanh Hải, Đỗ Hoàng Hân, Trần Lê Tuyết Châu

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 3/4/2024; ngày chuyển phản biện 6/4/2024; ngày nhận phản biện 24/5/2024; ngày chấp nhận đăng 27/5/2024

Tóm tắt:

Vi cầu là hệ thống phân phối có khả năng kiểm soát giải phóng dược chất kích thước micron, có polymer trong cấu trúc. Trong đó, alginat và chitosan là hai polymer tương thích sinh học có ứng dụng điều chế vi cầu đa dạng trong dược phẩm. Tuy nhiên, ở Việt Nam hiện vẫn chưa có nhiều công bố về vi cầu từ alginat và chitosan. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành để xây dựng và tối ưu hóa quy trình điều chế vi cầu lõi alginat chứa protein mô hình bovine serum albumin (BSA), sau đó xây dựng phương pháp bao phủ chitosan. Quy trình điều chế vi cầu lõi được xây dựng gồm alginat, BSA, isooctan, span 80, tween 80 và calci clorid. Các yếu tố công thức và thông số quy trình được khảo sát bằng phần mềm Design Expert v12.0. Vi cầu lõi alginat chứa BSA được bao phủ bằng 1% chitosan trong acid acetic 1% và có khả năng giải phóng kiểm soát BSA trong 24 giờ. Vi cầu alginat bao phủ chitosan có kích thước trung bình 178 μm , tỷ lệ tải BSA đạt 12,7%. Nghiên cứu đã điều chế thành công vi cầu chứa BSA từ hai polymer alginat và chitosan có khả năng giải phóng dược chất có kiểm soát.

Từ khóa: alginat, bovine serum albumin, chitosan, giải phóng kiểm soát, vi cầu.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.9, 3.4

Research on the preparation of microspheres containing bovine serum albumin microspheres from alginate and chitosan

Minh Quan Le*, Thanh Hai Tran, Hoang Han Do, Le Tuyet Chau Tran

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 3 April 2024; revised 24 May 2024; accepted 27 May 2024

Abstract:

Microspheres are controlled-release drug delivery systems with a micron diameter with a polymeric structure. Alginate and chitosan are two pharmaceutical biodegradable polymers applied for various microsphere preparation techniques. However, there is very limited research on microspheres from alginate and chitosan in Vietnam. Thus, the goal of this research was to prepare and optimise the alginate microspheres containing the model protein bovine serum albumin (BSA) preparation process and then develop a chitosan coating method. The developed method of alginate microspheres containing BSA includes alginate, BSA, isooctane, span 80, tween 80, and calcium chloride. Formulations and process parameters influencing the alginate microsphere properties were optimised using Design Expert v12.0 software. Alginate microspheres containing BSA were coated with 1% chitosan in 1% acetic acid and achieved the controlled release of BSA from microspheres in 24 hours. Chitosan-coated alginate microspheres containing BSA had an average particle diameter of 178 μm , in which the drug loading rate was 12.7%. This study successfully prepared the controlled-release microspheres containing BSA from alginate and chitosan polymers.

Keywords: alginate, bovine serum albumin, chitosan, controlled release, microspheres.

Classification numbers: 1.6, 2.9, 3.4

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

1. Đặt vấn đề

Hiện nay, các hệ trị liệu giải phóng có kiểm soát chứa được chất phân tử lượng lớn (ví dụ như các peptid, protein) ngày càng được quan tâm do xu thế sử dụng các dược chất sinh học trong điều trị. Tuy nhiên, các dược chất này có cấu trúc phức tạp, độ ổn định thấp, hấp thu kém và dễ bị enzyme phân giải nên việc bào chế dạng giải phóng có kiểm soát còn gặp nhiều thử thách [1]. Hệ thống phân phối thuốc cấu trúc vi cầu có nhiều tiềm năng để giải quyết các khó khăn này, kết hợp sử dụng loại polymer thích hợp để kiểm soát khả năng giải phóng dược chất [2, 3].

Alginate và chitosan là hai polymer phân hủy sinh học, an toàn, đang được sử dụng phổ biến để điều chế vi cầu có khả năng tải và kiểm soát giải phóng nhiều loại dược chất khác nhau [4-6]. Khi alginate và chitosan kết hợp sẽ hình thành một cấu trúc màng tổ hợp nhờ vào tương tác lưỡng cực và liên kết hydro. Quá trình hình thành màng tổ hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố như nồng độ polymer, pH, nhiệt độ, trình tự phối hợp, độ linh hoạt của polymer, thành phần hóa học của polymer [7]. Vi cầu từ alginate được bao phủ chitosan đã báo cáo có sự giảm độ xốp và rò rỉ dược chất so với vi cầu alginate riêng lẻ. Bên cạnh đó, lớp bao chitosan có độ bền cơ học cao hơn khi có mặt alginate, do vậy có khả năng cải thiện đặc tính giải phóng hoạt chất có kiểm soát theo pH [8]. Mặc dù có nhiều ưu điểm nhưng vi cầu từ alginate và chitosan vẫn chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều ở Việt Nam.

Nghiên cứu này được tiến hành để điều chế vi cầu từ alginate và chitosan chứa dược chất phân tử lượng lớn và kiểm soát sự giải phóng dược chất trong khoảng 24 giờ. BSA được lựa chọn làm dược chất mô hình trong nghiên cứu này vì có tính tương đồng với albumin huyết thanh người, đồng thời có giá rẻ hơn, dễ bảo quản và tinh chế mẫu trong quá trình sử dụng [9]. Nghiên cứu sử dụng thiết kế thực nghiệm để xác định các yếu tố công thức và quy trình ảnh hưởng đến tính chất của vi cầu tạo thành.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện (CA-MS-BSA).

2.2. Nguyên vật liệu

BSA có nguồn gốc từ Ấn Độ. Natri alginate (Nhật Bản) có phân tử lượng trung bình, độ nhớt dung dịch 1% khoảng 300-400 cps. Chitosan (Canada) có phân tử lượng 10-20 KDa, tỷ lệ deacetyl hóa >90% đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất. Các tá dược, dung môi dùng trong quá trình điều chế bao gồm isooctan, span 80, tween 80, calci clorid, aceton và acid acetic (Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn dược dụng.

2.3. Phương pháp điều chế

Sử dụng phương pháp điều chế vi cầu hai giai đoạn. Vi cầu lõi alginate chứa BSA (A-MS-BSA) được tổng hợp

từ polymer alginate bằng phương pháp tách loại dung môi thông qua tạo nhũ tương nước (N) trong dầu (D). Sau đó tiến hành bao phủ một lớp chitosan lên A-MS-BSA hình thành CA-MS-BSA [10, 11].

Xây dựng và tối ưu hóa phương pháp điều chế A-MS-BSA: Hòa tan một lượng xác định BSA trong dung dịch alginate có nồng độ xác định tạo nên N. Đồng nhất hóa pha N vào D gồm 30 g isooctan và 3,8 g chất nhũ hóa span 80 để tạo nhũ tương N/D. Hỗn hợp gồm tween 80 30% và CaCl₂ với nồng độ xác định được bổ sung vào nhũ tương, tiếp tục khuấy để gel hóa alginate. Thêm aceton để hóa rắn A-MS-BSA. Lọc và rửa, để ổn định A-MS-BSA thu được.

Để xác định các thành phần công thức và quy trình có khả năng ảnh hưởng đến tính chất của A-MS-BSA, thiết kế thực nghiệm được tiến hành bằng phần mềm Design Expert v12.0 (Mỹ). Không gian thực nghiệm được thiết kế gồm 22 thí nghiệm thông qua mô hình yếu tố từng phần, độ phân giải IV.

Mười biến đầu vào được xác lập với hai mức cao - thấp bao gồm: (X₁) nồng độ BSA (giá trị khảo sát 0,5%; 1,5%), (X₂) nồng độ alginate (2%; 4%), (X₃) tỷ lệ pha nước của nhũ tương (30%; 50%), (X₄) tốc độ nhũ hóa (6000 vòng/phút; 9000 vòng/phút), (X₅) thời gian khuấy tạo liên kết chéo (5 phút; 15 phút), (X₆) tốc độ khuấy tạo liên kết chéo (4000 vòng/phút; 6000 vòng/phút), (X₇) nồng độ dung dịch CaCl₂ (5%; 10%), (X₈) thể tích dung dịch CaCl₂ (1:1; 3:1), (X₉) thể tích tween 80 (5%; 10%), (X₁₀) tỷ lệ span 80 (5%; 15%). Tiến hành tuần tự thí nghiệm, phân tích và ghi nhận kết quả dựa trên 5 biến đầu ra lần lượt: (Y₁) tỷ lệ tải dược chất (%), (Y₂) kích thước A-MS-BSA trung bình (μm), (Y₃, Y₄, Y₅) tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2, 4 giờ (%).

Xây dựng phương pháp bao phủ A-MS-BSA bằng chitosan: Ở giai đoạn tiếp theo, lượng xác định A-MS-BSA được phân tán trong dung dịch chitosan bằng phương pháp khuấy trong thời gian phù hợp. Ly tâm, lọc, rửa và sấy CA-MS-BSA ở 37°C trong 24 giờ. Bảo quản CA-MS-BSA trong bình kín trong tủ mát cho các thử nghiệm tiếp theo.

Các A-MS-BSA đã tối ưu hóa được sử dụng để khảo sát quá trình bao phủ chitosan, nhằm mục tiêu kéo dài khả năng tỷ lệ giải phóng dược chất ở môi trường đệm phosphate (PBS) pH 7,4 trong 24 giờ. Đồng thời, xác định sơ bộ ảnh hưởng của nồng độ chitosan và một số thông số khác như tỷ lệ A-MS-BSA và thể tích dung dịch chitosan, nồng độ acid hữu cơ, thời gian khuấy đến khả năng giải phóng BSA của CA-MS-BSA.

2.4. Phân tích đặc tính vi cầu

Xác định tỷ lệ tải dược chất: Cân chính xác khoảng 250 mg A-MS-BSA (hoặc CA-MS-BSA) vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 20 ml dung dịch đệm PBS pH 7,4, siêu âm trong 15 phút, định mức với cùng dung môi. Ly tâm với tốc độ 10000 vòng/phút, trong 5 phút. Lọc hỗn hợp qua màng

lọc millipore 0,45 µm dưới áp suất giảm. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 278 nm, mẫu trắng được tiến hành tương tự nhưng với vi cầu lõi alginat không chứa hoạt chất hoặc vi cầu alginat-chitosan không chứa hoạt chất. Hàm lượng BSA trong mẫu thử được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ tải (\%)} = \frac{\text{Lượng chất trong vi cầu}}{\text{Lượng vi cầu}} \times 100$$

Đánh giá kích thước vi cầu: Bằng thực nghiệm trên thiết bị phân tích cỡ hạt Malvern Mastersizer MS 3000. Hình thái bề mặt, hình dạng tiểu phân, độ xốp của vi cầu được quan sát và đánh giá thông qua phân tích hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Đánh giá khả năng giải phóng protein: Cân chính xác khoảng 250 mg A-MS-BSA (hoặc CA-MS-BSA), phân tán trong 40 ml đệm PBS pH 7,4 ở 37,0±0,5°C trên máy khuấy từ với tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Tại các thời điểm xác định 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 giờ, lấy 5 ml dịch thử và bổ sung 5 ml đệm. Lọc mẫu thử qua màng lọc millipore 0,45 µm, xác định lượng BSA phóng thích bằng phương pháp đo quang phổ UV ở bước sóng 278 nm.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng thành phần công thức và thông số điều chế vi cầu lõi alginat chứa bovine serum albumin

Bảng 1 trình bày không gian thực nghiệm và kết quả phân tích đặc tính A-MS-BSA.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ tải dược chất (Y_1) nằm trong khoảng 4,5-23,3% và phù hợp với hàm nghịch đảo Inverse ($R^2=0,9919$, $F=75,4$, có ý nghĩa thống kê với $p<0,0001$).

Kích thước trung bình của A-MS-BSA (Y_2) thu được dao động khá lớn, trong khoảng 14,6-308,5 µm, ảnh hưởng theo hàm căn bậc hai (Square Root) với $R^2=0,9468$, có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.

Tỷ lệ giải phóng dược chất của A-MS-BSA (Y_3 , Y_4 , Y_5) được phân tích các ảnh hưởng và phù hợp với hàm lũy thừa (Power) với tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2 và 4 giờ có R^2 lần lượt là 0,9849, 0,9776, 0,9878 có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$. Bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của biến độc lập đến các tính chất của A-MS-BSA.

Bảng 1. Không gian thực nghiệm và kết quả đánh giá vi cầu tạo thành.

Thứ tự	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	0,5	4	50	6000	5	6000	5	3	10	15	8,30	55,0	14,46	21,17	48,0
2	1,5	4	50	6000	15	6000	10	3	10	5	6,50	46,4	10,40	29,50	75,8
3	0,5	4	30	6000	15	4000	5	3	5	5	9,54	43,3	24,00	32,70	41,0
4	1,5	2	50	6000	5	4000	5	1	5	5	15,9	308,5	37,20	39,00	39,4
5	1,5	2	50	9000	15	6000	5	3	5	15	7,00	44,5	40,50	49,70	48,8
6	0,5	2	50	9000	5	4000	5	3	10	5	12,3	86,0	93,60	94,50	94,4
7	0,5	2	30	6000	5	6000	10	3	5	5	6,20	14,8	28,30	30,50	32,8
8	1,5	2	30	9000	15	4000	10	1	5	5	6,50	145,0	61,60	78,30	87,5
9	0,5	4	30	9000	15	6000	10	3	10	15	4,53	27,3	21,70	20,60	24,4
10	0,5	2	50	6000	15	4000	10	3	10	15	7,20	55,7	27,50	25,20	39,9
11	1,5	4	50	9000	15	4000	5	1	10	15	20,4	29,6	27,50	33,80	67,7
12	1,5	2	30	6000	5	4000	5	3	10	15	8,75	161,0	37,80	38,50	43,1
13	0,5	2	50	6000	5	6000	10	1	5	15	6,20	19,1	23,60	24,80	22,0
14	0,5	2	30	9000	5	4000	5	1	5	15	14,97	244,0	26,20	26,10	87,0
15	0,5	4	50	9000	15	6000	10	1	5	5	9,35	25,8	56,30	53,30	53,2
16	1,5	2	50	9000	5	6000	10	1	10	15	8,30	22,7	19,60	68,10	93,3
17	0,5	2	30	6000	15	6000	5	1	10	5	17,65	14,6	45,70	60,20	65,5
18	1,5	4	50	9000	5	4000	10	3	5	15	8,30	28,6	12,70	15,30	24,5
19	1,5	4	30	9000	5	6000	5	1	5	5	23,34	63,0	31,80	34,30	34,1
20	1,5	4	30	9000	15	4000	5	3	10	5	18,25	26,8	35,80	53,10	56,9
21	1,5	4	30	6000	15	6000	10	1	5	15	8,60	32,3	33,70	35,20	62,9
22	0,5	4	30	6000	5	4000	10	1	10	5	6,73	26,8	74,90	78,60	82,2

X_1 : nồng độ bovine serum albumin; X_2 : nồng độ alginat; X_3 : tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X_4 : tốc độ nhũ hóa; X_5 : thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X_6 : tốc độ khuấy tạo liên kết chéo; X_7 : nồng độ dung dịch $CaCl_2$; X_8 : thể tích dung dịch $CaCl_2$; X_9 : thể tích tween 80; X_{10} : tỷ lệ span 80; Y_1 : tỷ lệ tải dược chất (%); Y_2 : kích thước A-MS-BSA trung bình (µm); Y_3 , Y_4 , Y_5 : tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1, 2 và 4 giờ (%).

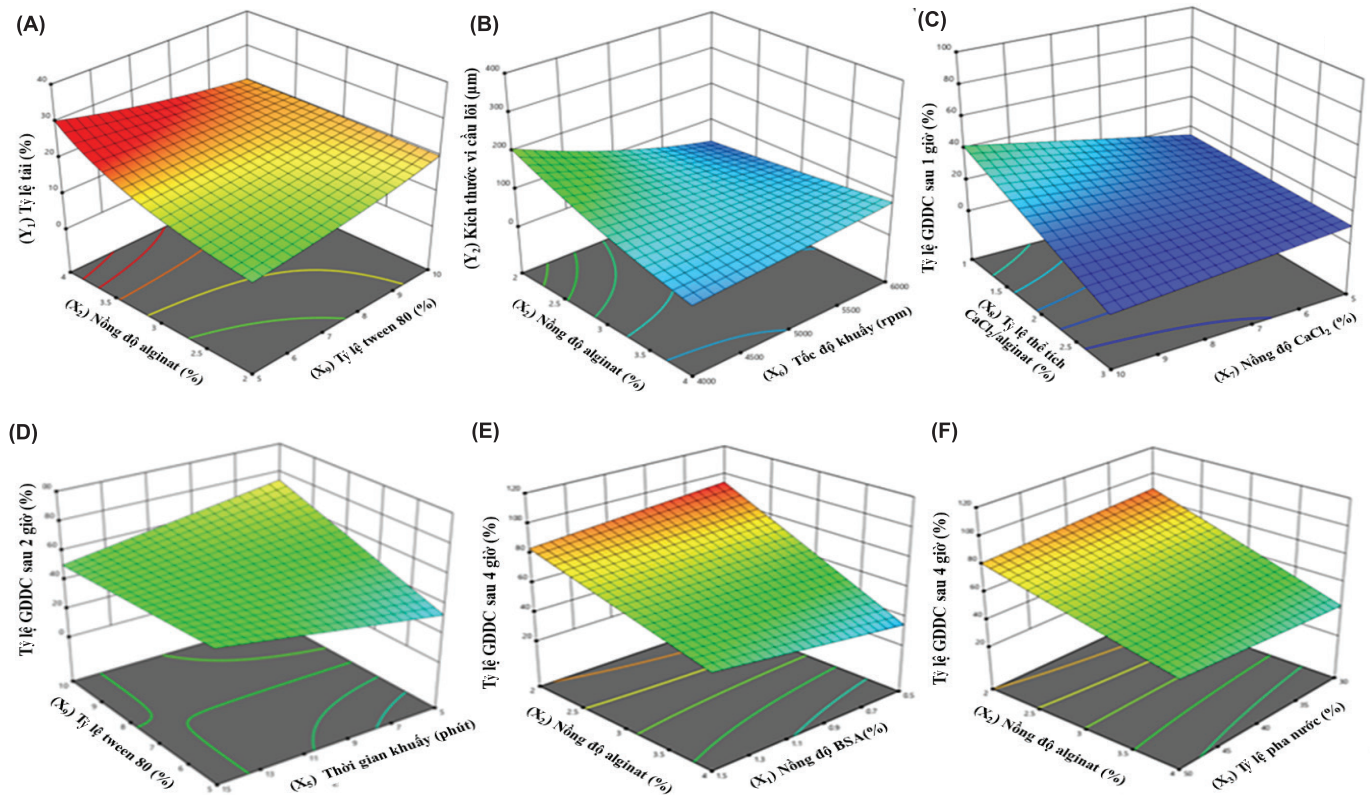
Bảng 2. Phân tích các biến độc lập ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đến các đặc tính chất lượng của vi cầu.

Biến độc lập	Biến phụ thuộc (Hàm)	Tỷ lệ tải được chất (Nghịch đảo)	Kích thước trung bình A-MS-BSA (Căn bậc hai)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 1 giờ (Lũy thừa)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 2 giờ (Lũy thừa)	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 4 giờ (Lũy thừa)
X_1		0,0326		0,0145		
X_2		0,0017	0,0049	0,0060	<0,0001	0,0082
X_3				0,0253		
X_6		<0,0001	0,0004	0,0163		0,0183
X_7		<0,0001	0,0061			
X_8		<0,0001		0,0128	0,0010	0,0009
X_9			0,0246	0,0427	<0,0001	0,0002
X_{10}		0,0023		0,0004	<0,0001	0,0068
X_1, X_9				0,0062		
X_2, X_6			<0,0001			
X_2, X_9		<0,0001				
X_5, X_9					<0,0001	
X_7, X_8				0,0009		
X_1, X_2, X_3		<0,0001				

X_1 : nồng độ bovine serum albumin; X_2 : nồng độ alginat; X_3 : tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X_5 : thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X_6 : tốc độ khuấy; X_7 : nồng độ dung dịch CaCl_2 ; X_8 : thể tích dung dịch CaCl_2 ; X_9 : thể tích tween 80; X_{10} : tỷ lệ span 80.

Từ phân tích này đã xác định được liên quan nhân quả giữa các biến số và đặc tính của vi cầu lõi tạo thành (hình 1). Tỷ lệ tải được chất (Y_1) có xu hướng tăng khi X_2 tăng và X_9 giảm (hình 1A). Kích thước trung bình của A-MS-BSA (Y_2) khi X_2 và X_6 đồng thời giảm (hình 1B).

Tỷ lệ giải phóng được chất sau 1 giờ (Y_3) tăng khi X_7 tăng và X_8 giảm (hình 1C). Tỷ lệ giải phóng được chất sau 2 giờ (Y_4) tăng khi X_5 giảm và X_9 tăng (hình 1D). Tỷ lệ giải phóng được chất sau 4 giờ (Y_5) tăng khi các biến X_1 , X_2 , X_3 đồng thời giảm (hình 1E và 1F).



Hình 1. Biến thiên các đặc tính vi cầu lõi alginat chứa bovine serum albumin (Y) theo tương tác giữa các biến số (X).

3.2. Tối ưu hóa công thức và quy trình điều chế vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin

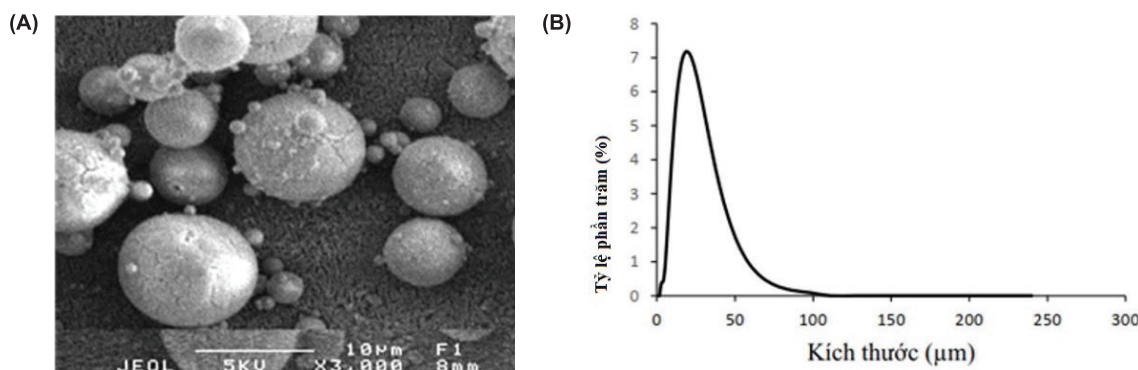
Từ các kết quả và mô hình liên quan nhân quả đã xây dựng, tiến hành tối ưu hóa thực nghiệm để xác định quy trình điều chế phù hợp cho vi cầu lõi có các đặc tính mong đợi như tỷ lệ tải >15%, kích thước trong khoảng 20-60 μm , tỷ lệ giải phóng được chất đạt khoảng 90% sau 4 giờ. Đề xuất các thông số quy trình điều chế A-MS-BSA tối ưu trong bảng 3.

Bảng 3. Dữ liệu mô hình tối ưu hóa vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin.

Ký hiệu biến	Tên biến	Đề xuất bởi phần mềm	Dự đoán bởi phần mềm	Kết quả thực nghiệm
X_1	Nồng độ BSA	1,5%		
X_2	Nồng độ polymer	4%		
X_3	Tỷ lệ pha nước của nhũ tương	32,5%		
X_4	Tốc độ nhũ hóa	6000 vòng/phút		
X_5	Thời gian khuấy tạo liên kết chéo	15 phút		
X_6	Tốc độ khuấy tạo liên kết chéo	4000 vòng/phút		
X_7	Nồng độ CaCl_2	7,6%		
X_8	Tỷ lệ thể tích CaCl_2	1:1		
X_9	Tỷ lệ tween 80	9,8%		
X_{10}	Tỷ lệ span 80	11,3%		
Y_1	Tỷ lệ tải		15,7%	17,0 $\pm$ 0,2%
Y_2	Kích thước vi cầu lõi		20,3 μm	21,7 $\pm$ 2,0 μm
Y_3	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 1 giờ		29,6%	19,8 $\pm$ 0,7%
Y_4	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 2 giờ		34,4%	38,7 $\pm$ 1,5%
Y_5	Tỷ lệ giải phóng được chất sau 4 giờ		94,6%	92,3 $\pm$ 0,8%

X_1 : nồng độ bovine serum albumin; X_2 : nồng độ alginate; X_3 : tỷ lệ pha nước của nhũ tương; X_4 : tốc độ nhũ hóa; X_5 : thời gian khuấy tạo liên kết chéo; X_6 : tốc độ khuấy tạo liên kết chéo; X_7 : nồng độ dung dịch CaCl_2 ; X_8 : thể tích dung dịch CaCl_2 ; X_9 : thể tích tween 80; X_{10} : tỷ lệ span 80; Y_1 : tỷ lệ tải được chất (%); Y_2 : kích thước A-MS-BSA trung bình (μm); Y_3 , Y_4 , Y_5 : tỷ lệ giải phóng được chất sau 1, 2 và 4 giờ (%).

Kết quả xử lý thống kê cho thấy, A-MS-BSA được điều chế theo các thông số tối ưu đề xuất có đặc tính giống như được dự đoán bởi phần mềm (t-Test, $p=0,69>0,05$). Bên cạnh đó, phân tích bề mặt mẫu tối ưu cho thấy A-MS-BSA có dạng hình cầu, khá đồng nhất, phân bố kích thước hạt hẹp (hình 2).



Hình 2. (A) Hình kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 3000x, (B) Dải phân bố kích thước của vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin tối ưu.

3.3. Kết quả bao phủ vi cầu lõi alginate chứa bovine serum albumin bằng chitosan

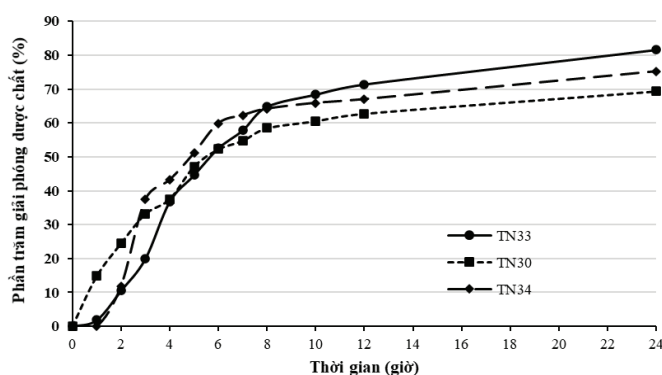
Kết quả khảo sát các thông số trong quá trình bao phủ chitosan lên A-MS-BSA được ghi nhận dựa trên đặc tính của sản phẩm CA-MS-BSA về kích thước trung bình, tỷ lệ tải được chất được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát các đặc tính của vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện.

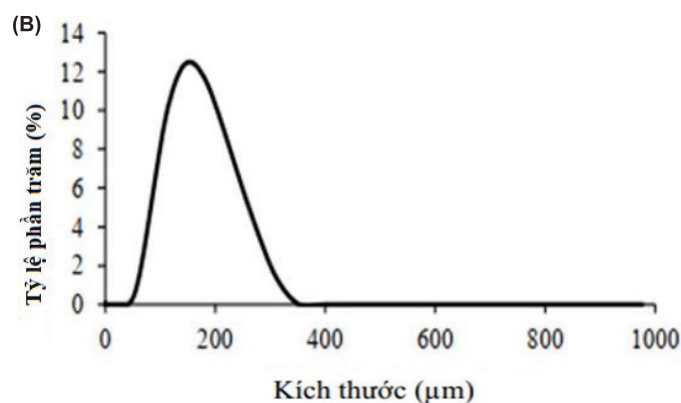
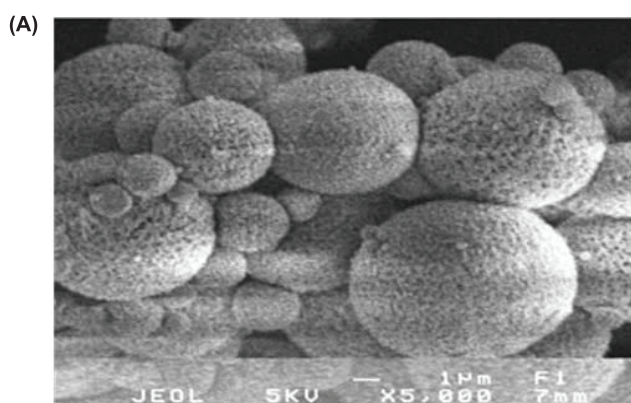
Thứ tự	Tỷ lệ vi cầu alginate/chitosan (g/ml)	Nồng độ acid acetic (%)	Thời gian khuấy (phút)	Nồng độ chitosan (%)	Kích thước (μm)	Tỷ lệ tải được chất (%)
TN29	1,5/50	1	10	0,5		
TN30	1,5/100	1	10	0,5	156	12,7
TN31	1,5/100	5	10	0,5	272	9,8
TN32	1,5/100	1	30	0,5	242	11,9
TN33	1,5/100	1	10	1,0	178	12,5
TN34	1,5/100	1	10	2,0	388	11,3

TN29-TN34: các thí nghiệm của giai đoạn 2 (tạo vi cầu alginate-chitosan hoàn thiện).

Kết quả cho thấy, tỷ lệ A-MS-BSA và thể tích dung dịch chitosan cần đủ lớn để không ảnh hưởng đến khả năng phân tán của A-MS-BSA trong dung dịch, tránh hiện tượng bị vón trong quá trình bao phủ. Khi nồng độ acid acetic tăng, CA-MS-BSA tăng kích thước trung bình nhưng tỷ lệ tải được chất bị giảm. Thời gian khuấy tỷ lệ thuận với kích thước CA-MS-BSA và ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê đến tỷ lệ tải được chất. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy nồng độ chitosan trong dung dịch là thông số quan trọng trong giai đoạn bao phủ A-MS-BSA. Ba mức nồng độ chitosan được khảo sát là 0,5%, 1,0% và 2,0% (TN30, TN33, TN34). Khi nồng độ chitosan tăng làm kích thước CA-MS-BSA tăng mạnh và tỷ lệ tải được chất giảm nhẹ. Thêm nữa, khi thử nghiệm tỷ lệ giải phóng được chất của CA-MS-BSA (hình 3), TN30 đã phóng thích đáng kể được chất ngay từ những thời điểm đầu tiên, trong khi TN33, TN34 có tiềm thời trong khoảng 2 giờ (tỷ lệ giải phóng được chất xấp xỉ 10%). Khi kết thúc thử nghiệm ở thời điểm 24 giờ, TN33 có tỷ lệ giải phóng được chất cao nhất, đạt 81,6%.



Hình 3. Tỷ lệ giải phóng dược chất vi cầu alginat-chitosan hoàn thiện với nồng độ chitosan khác nhau. Điều kiện thực nghiệm: tỷ lệ vi cầu alginat/chitosan (1,5 g/100 ml), nồng độ acid acetic (1%), thời gian khuấy (10 phút), nồng độ chitosan thay đổi của thí nghiệm 30, 33, 34 lần lượt là 0,5, 1 và 2%.



Hình 4. (A) Hình kính hiển vi điện tử quét ở độ phóng đại 5000x, (B) Phân bố kích thước hạt của vi cầu alginat-chitosan hoàn thiện.

Như vậy, quy trình điều chế CA-MS-BSA đã được xây dựng hoàn chỉnh theo điều kiện thử nghiệm TN33, tạo thành CA-MS-BSA có kích thước trung bình 178 μm và tỷ lệ tải BSA là 12,7%. Về mặt hình thái, hình ảnh SEM cho thấy CA-MS-BSA có dạng hình cầu, bề mặt khá xốp, dải phân bố kích thước tiểu phân tương đối hẹp (hình 4).

Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (phổ FTIR) (hình 5) của A-MS-BSA cho thấy có sự liên kết chéo giữa natri alginat với Ca^{2+} , thể hiện qua các dải quang phổ ở số sóng 1613 cm^{-1} và 1417 cm^{-1} có liên quan đến sự kéo dài nhóm $-\text{COO}-$ được liên kết với Ca^{2+} để tạo thành mạng lưới hydrogel liên kết chéo ba chiều. Các số sóng 3376 cm^{-1} của nhóm N-H, 1659 cm^{-1} của nhóm amin bậc I của BSA vẫn tồn tại trong phổ FTIR của A-MS-BSA, điều này chứng tỏ sự hiện diện của BSA trong cấu trúc vi cầu. Phổ FTIR của CA-MS-BSA cho thấy sự dịch chuyển và thay đổi đỉnh sóng của nhóm carboxyl (1613 cm^{-1}) trong natri alginat chứng tỏ có sự liên kết chéo giữa NH_3^+ trong chitosan và nhóm carboxyl trong natri alginat thông qua tương tác tĩnh điện.

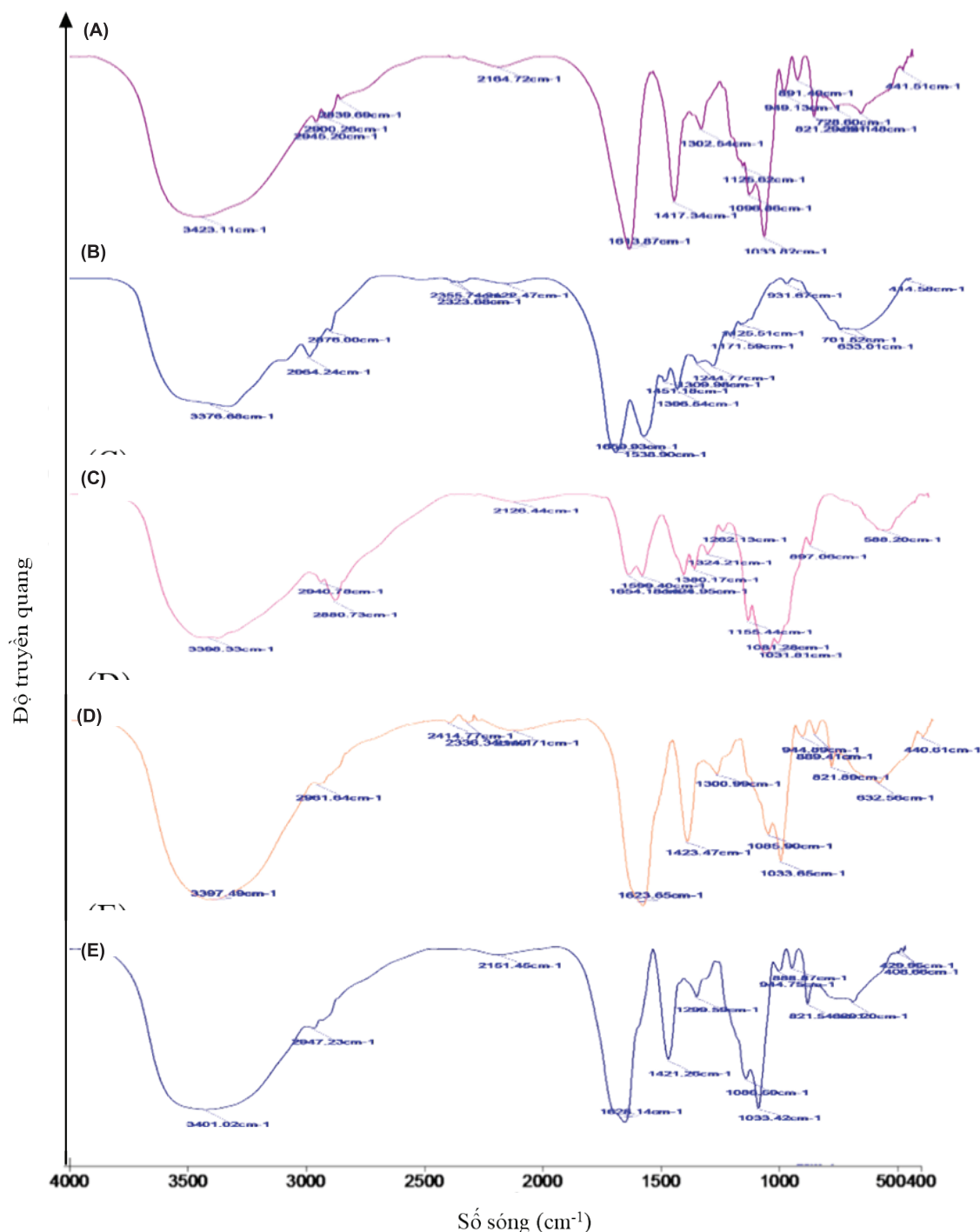
Đồng thời, có sự biến mất hoặc dịch chuyển của một số đỉnh sóng tương ứng với nhóm chức N-H, -OH, acetylamino bậc II, $-\text{C}=\text{O}$ trong cấu trúc BSA. Điều này chứng tỏ lớp vỏ chitosan đã bao phủ toàn bộ bề mặt CA-MS-BSA.

Quá trình điều chế AC-MS-BSA đã được xây dựng hoàn thiện. Ở giai đoạn điều chế A-MS-BSA, xác định được 6 biến độc lập có ảnh hưởng nhiều đến các đặc tính của A-MS-BSA gồm nồng độ BSA, nồng độ polymer, tốc độ khuấy tạo liên kết chéo, thể tích dung dịch CaCl_2 , tỷ lệ tween 80, tỷ lệ span 80, giúp giảm bớt các thí nghiệm khảo sát về sau khi tiến hành nâng cấp cỡ lô.

Nồng độ polymer alginat là thông số ảnh hưởng mạnh nhất, có tương tác với nhiều yếu tố công thức và thông số

quy trình khác cùng tác động lên đặc tính A-MS-BSA. Điều này phù hợp với nghiên cứu của S.F. Lin và cs (2016) [12] đã báo cáo ảnh hưởng của nồng độ natri alginat đến kích thước hạt và hiệu suất bắt giữ dược chất, do sự gia tăng nồng độ polymer làm tăng độ nhớt của dung dịch nên sức căng bề mặt giữa các giọt alginat và pha dầu tăng làm vi cầu có kích thước trung bình lớn hơn.

Nồng độ BSA có ảnh hưởng đến tỷ lệ tải dược chất, tỷ lệ giải phóng dược chất sau 1 giờ và có tương tác với nhiều yếu tố khác làm thay đổi đặc tính của A-MS-BSA. Tốc độ khuấy tạo liên kết chéo ảnh hưởng có ý nghĩa đến kích thước trung bình, tỷ lệ tải và tỷ lệ giải phóng dược chất của A-MS-BSA. Khi tốc độ khuấy tạo liên kết chéo thay đổi mức độ tiếp xúc và tương tác giữa các ion Ca^{2+} và polymer, dẫn đến thay đổi tính chất của A-MS-BSA. Thể tích dung dịch CaCl_2 cũng làm tăng tỷ lệ liên kết giữa Ca^{2+} và natri alginat, sự hóa rắn của A-MS-BSA cũng diễn ra nhanh hơn. Điều này đã được R. Rastogi và cs (2007) [13] nhấn mạnh trong nghiên cứu điều chế vi cầu tải isoniazid, tăng nồng độ Ca^{2+} thì hiệu suất



Hình 5. Quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier của natri alginat (A), bovine serum albumin (B), chitosan (C), vi cầu lõi alginat chứa bovine serum albumin (D), vi cầu alginat-chitosan hoàn thiện (E).

bắt giữ thuốc có thể giảm do quá trình gel hóa xảy ra nhanh và đột ngột làm thất thoát được chất ra khỏi mạng gel. Thể tích tween 80, tỷ lệ span 80 cũng có ảnh hưởng rất rõ đến các đặc tính của vi cầu bao gồm kích thước và tỷ lệ giải phóng được chất, tương tự như công bố của A.L. Márquez và cs (2010) [14], trong đó kích thước hạt nhỏ hơn được tạo ra với nồng độ chất hoạt động bề mặt cao hơn.

Đối với mục tiêu bao phủ vi cầu alginat bằng chitosan, nghiên cứu đã chọn phương pháp khuấy vi cầu alginat trong dung dịch chitosan vì quy trình thực hiện đơn giản [15, 16]. Với phương pháp này, các yếu tố cần phải khảo sát là: (i) nồng độ acid acetic, (ii) nồng độ chitosan; (iii) thời gian bao phủ chitosan. Trong đó, yếu tố nồng độ chitosan có vai trò quan trọng. Khi nồng độ chitosan tăng thì kích thước trung

binh CA-MS-BSA tăng tương ứng, điều này phù hợp với nghiên cứu của Y. Misirli và cs (2005) [17]. Hiện tượng này có thể là do sự tương tác của các nhóm amin của chitosan và các nhóm cacboxyl của natri alginate trong quá trình hình thành màng phức hợp.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được các yếu tố ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến đặc tính của A-MS-BSA; xác định mức độ và xu hướng ảnh hưởng của các yếu tố đến tỷ lệ tải được chất, kích thước trung bình, tỷ lệ giải phóng được chất của A-MS-BSA điều chế bằng phương pháp tách loại dung môi. CA-MS-BSA được điều chế theo quy trình tối ưu có kích thước trung bình 178 μm và tỷ lệ tải BSA là 12,7%. Được chất được giải phóng hoàn toàn với tốc độ giải phóng được kiểm soát trong 24 giờ. Như vậy, vi cầu alginate bao phủ chitosan chứa protein mô hình là BSA cung cấp thêm dữ liệu và tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trên hệ thuốc trị liệu giải phóng kiểm soát chứa được chất phân tử lượng lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] V.R. Sinha, A. Trehan (2003), "Biodegradable microspheres for protein delivery", *Control Release*, **90(3)**, pp.261-280, DOI: 10.1016/s0168-3659(03)00194-9.
- [2] D.S. Kshirsagar, R.B. Saudagar (2016), "Microsphere: A review", *RJTCS*, **7(1)**, pp.27-37, DOI: 10.5958/2321-5844.2016.00006.6.
- [3] S. Saini, S. Kumar, M. Choudhary, et al. (2018), "Microspheres as controlled drug delivery system: An updated review", *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **9**, pp.1760-1768, DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(5).1760-68.
- [4] N.K. Sachan, S. Pushkar, A. Jha, et al. (2009), "Sodium alginate: The wonder polymer for controlled drug delivery", *J. Pharm. Res.*, **2(8)**, pp.1191-1199.
- [5] L. Xing, J. Sun, H. Tan, et al. (2019), "Covalently polysaccharide-based alginate/chitosan hydrogel embedded alginate microspheres for BSA encapsulation and soft tissue engineering", *Int. J. Biol. Macromol.*, **127**, pp.340-348, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.065.
- [6] J.L. Mendoza, W.M.A Monal, F.M.G Valencia (2016), "Chapter 1 - Chemical characteristics and functional properties of chitosan", *Chitosan in The Preservation of Agricultural Commodities*, pp.3-31, DOI: 10.1016/B978-0-12-802735-6.00001-X.
- [7] D. Kulig, A.Z. Korzycka, A. Jarmoluk, et al. (2016), "Study on alginate-chitosan complex formed with different polymers ratio", *Polymers (Basel)*, **8(5)**, DOI: 10.3390/polym8050167.
- [8] L.A. Nnamonu, R.S. Ato, I. Onyido (2012), "Alginate reinforced chitosan and starch beads in slow release formulation of imazaquin herbicide - preparation and characterization", *Materials Sciences and Applications*, **3(8)**, pp.566-574, DOI: 10.4236/msa.2012.38081.
- [9] S. Ketrat, D. Japrun, P. Pongprayoon (2020), "Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin", *J. Mol. Graph. Model.*, **98**, DOI: 10.1016/j.jmgm.2020.107601.
- [10] Y. Luo, Q. Wang (2014), "Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery", *Int. J. Biol. Macromol.*, **64**, pp.353-367, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017.
- [11] H.V. Sæther, H.K. Holme, G. Maurstad, et al. (2008), "Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan", *Carbohydr. Polym.*, **74(4)**, pp.813-821, DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.04.048.
- [12] S.F. Lin, Y.C. Chen, R.N. Chen, et al. (2016), "Improving the stability of astaxanthin by microencapsulation in calcium alginate beads", *PLOS ONE*, **11(4)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0153685.
- [13] R. Rastogi, Y. Sultana, M. Aqil, et al. (2007), "Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery", *Int. J. Pharm.*, **334(1-2)**, pp.71-77, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2006.10.024.
- [14] A.L. Márquez, A. Medrano, L.A. Panizzolo, et al. (2010), "Effect of calcium salts and surfactant concentration on the stability of water-in-oil (w/o) emulsions prepared with polyglycerol polyricinoleate", *J. Colloid. Interface. Sci.*, **341(1)**, pp.101-108, DOI: 10.1016/j.jcis.2009.09.020.
- [15] F. Maestrelli, M. Jug, M. Cirri, et al. (2018), "Characterisation and microbiological evaluation of chitosan-alginate microspheres for cefixime vaginal administration", *Carbohydr. Polym.*, **192**, pp.176-183, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.03.054.
- [16] C.H. Zheng, W.Q. Liang, F. Li, et al. (2005), "Optimisation and characterisation of chitosan-coated alginate microcapsules containing albumin", *Pharmazie*, **60(6)**, pp.434-438.
- [17] Y. Misirli, E. Oztürk, H. Kuşaklıoğlu, et al. (2005), "Preparation and characterization of mitomycin-C loaded chitosan-coated alginate microspheres for chemoembolization", *J. Microencapsul.*, **22(2)**, pp.167-178, DOI: 10.1080/02652040400026368.

Chọn lọc cây trội Vũ hương (*Cinnamomum balansae* H.Lec) phục vụ trồng rừng thâm canh cung cấp gỗ lớn tại tỉnh Lào Cai

Hoàng Văn Thành¹, Hoàng Văn Thắng^{1*}, Trần Hồng Vân¹, Cao Văn Lạng²

¹Viện Nghiên cứu Lâm sinh, 46 Đức Thắng, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, 46 Đức Thắng, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/10/2024; ngày chuyển phản biện 4/10/2024; ngày nhận phản biện 2/11/2024; ngày chấp nhận đăng 5/11/2024

Tóm tắt:

Theo các tiêu chí trong TCVN 8755:2017 (Giống cây Lâm nghiệp - Cây trội) và các chỉ tiêu phẩm chất thân cây, đề tài đã chọn lọc được 12 cây trội Vũ hương trong các trạng thái rừng tự nhiên ở hai huyện Bảo Thắng và Si Ma Cai, tỉnh Lào Cai. Tại huyện Bảo Thắng đã chọn được 10 cây trội tại 3 xã Phong Niên, Thái Niên, Bản Phiệt; tại huyện Si Ma Cai chọn được 2 cây trội tại xã Sán Chải. Các cây trội Vũ hương được chọn lọc có sinh trưởng phát triển tốt, với đường kính ngang ngực 20,4-55,7 cm, chiều cao vút ngọn 14,6-28,0 m, chiều cao dưới cành 7,5-15,7 m (chiếm 51,4-66,0% so với chiều cao vút ngọn) và đều có phẩm chất cây tốt với tổng điểm chất lượng theo các chỉ tiêu: độ thẳng thân, độ nhỏ cành, phát triển tán và sức khỏe đạt 17-20 điểm. Các cây trội đã được Chi cục Kiểm lâm tỉnh Lào Cai công nhận nguồn giống cây Lâm nghiệp. Đây là nguồn giống tốt để nhân, tạo giống Vũ hương chất lượng cao phục vụ công tác trồng rừng cung cấp gỗ lớn kết hợp lấy tinh dầu tại tỉnh Lào Cai.

Từ khóa: chọn lọc cây trội, Lào Cai, Vũ hương.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.4, 4.6

Plus-trees selection of *Cinnamomum balansae* H.Lec for intense planting to supply timber in Lao Cai province

Van Thanh Hoang¹, Van Thang Hoang^{1*}, Hong Van Tran¹, Van Lang Cao²

¹Silviculture Research Institute, 46 Duc Thang Street, Duc Thang Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²Vietnamese Academy of Forest Science, 46 Duc Thang Street, Duc Thang Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

Received 2 October 2024; revised 2 November 2024; accepted 5 November 2024

Abstract:

According to the criteria in TCVN 8755:2017 (Forestry tree varieties - plus trees) and tree trunk quality indicators, 12 plus trees of *Cinnamomum balansae* H.Lec (*C. Balansae* H.Lec) were selected in natural forest in Bao Thang and Si Ma Cai districts, Lao Cai province. 10 plus trees were selected in Phong Nien, Thai Nien, Ban Phiet communes, Bao Thang district and 2 plus trees were selected in San Chai commune, Si Ma Cai district. Selected *C. Balansae* H.Lec plus trees have good growth with a diameter at breast height from 20.4-55.7 cm, a total height from 14.6-28.0 m, under branches height from 7.5-15.7 m (accounting for 51.4-66.0% of the total height) and all have good quality with a total quality score according to the criteria of trunk straightness, branch smallness, canopy development and health, scored 17-20 points. The Forest Protection Department has approved the addition of trees in Lao Cai province. This is a good source of breed to propagate and produce seedlings to multiply and create high-quality *C. Balansae* H.Lec varieties for afforestation to provide large timber combined with essential oil extraction in Lao Cai province.

Keywords: *Cinnamomum balansae* H.Lec, Lao Cai province, plus-trees selection.

Classification numbers: 1.6, 4.4, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: hoangthang75@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Vù hương (còn có tên gọi khác là Gù hương) có tên khoa học là *Cinnamomum balansae* H.Lec, là loài cây bản địa đa tác dụng, vừa cung cấp gỗ lớn làm đồ mộc cao cấp, vừa cho tinh dầu, kết hợp tạo cảnh quan đẹp và bảo vệ môi trường sinh thái tốt. Vù hương có phân bố rộng, từ các tỉnh Tây Nguyên đến các tỉnh phía Bắc như: Lạng Sơn, Vĩnh Phúc, Phú Thọ, Hà Nam, Ninh Bình, Nghệ An, Hà Tĩnh... [1]. Cây Vù hương có kích thước lớn, có thể cao tới 27 m và đường kính có thể đạt tới hơn 100 cm. Gỗ Vù hương cứng, không bị mối mọt, màu sắc đẹp, có mùi thơm nên được dùng làm đồ mộc có giá trị cao và được thị trường ưa chuộng (hiện không có đủ gỗ đáp ứng nhu cầu của thị trường). Ngoài ra có thể chiết xuất tinh dầu từ các bộ phận của cây (thân, cành, lá, rễ), đây là loại tinh dầu chất lượng cao có thể sử dụng làm mỹ phẩm, hương liệu và dược liệu với giá bán hiện nay khoảng 3-5 triệu đồng/lít [2]. Vù hương là loài cây sinh trưởng tương đối nhanh, nếu được trồng thâm canh thì sau 10-12 năm có thể cho khai thác làm gỗ xẻ. Vù hương trồng thuần loài ở tuổi 15-17 tại Hoà Bình với mật độ hiện tại 410-550 cây/ha có thể cho năng suất gỗ đạt 230,0-262,9 m³/ha, tương đương lượng tăng trưởng đạt 15,3-16,4 m³/ha/năm [3].

Mặc dù Vù hương là loài cây gỗ bản địa đa tác dụng và có giá trị cao, có phân bố tự nhiên ở Lào Cai, là loài nhanh cho khai thác và phù hợp với điều kiện gây trồng ở Lào Cai nhưng đến nay chưa được phát triển rộng trên địa bàn tỉnh Lào Cai. Nguyên nhân chính là do chưa có các nguồn giống tốt được chọn lọc để phục vụ công tác nhân giống và trồng rừng trên diện rộng. Do đó, để có cơ sở cho việc nhân giống và cải thiện giống phục vụ trồng rừng Vù hương chất lượng cao thì việc nghiên cứu chọn lọc cây trội Vù hương tại Lào Cai là cần thiết.

Bài báo này là một phần kết quả của đề tài khoa học và công nghệ cấp tỉnh “Nghiên cứu hoàn thiện kỹ thuật nhân giống và xây dựng mô hình trồng thâm canh Vù hương (*Cinnamomum balansae* H.Lec) cung cấp gỗ lớn kết hợp lấy tinh dầu tại tỉnh Lào Cai” do Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam thực hiện trong giai đoạn từ tháng 7/2022 đến tháng 12/2024.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và địa điểm nghiên cứu

Cây Vù hương (*Cinnamomum balansae* H.Lec) có phân bố trong các trạng thái rừng tự nhiên ở các xã Thái Niên, Bản Phiệt, Phong Niên của huyện Bảo Thắng và xã Sán Chải của huyện Si Ma Cai.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Cây trội Vù hương được chọn theo Tiêu chuẩn quốc gia của cây lấy gỗ (TCVN 8755:2017). Chọn cây trội được xác định theo 2 bước: Bước 1 là điều tra khảo sát chọn cây trội

dự tuyển theo các chỉ tiêu sinh trưởng. Tức là chọn những cây có đường kính từ 20 cm trở lên, có chiều cao dưới cành bằng 1/2 chiều cao vút ngọn, đã ra hoa và quả; Bước 2 là chọn theo các chỉ tiêu chất lượng trên cơ sở các cây dự tuyển đã xác định được đánh giá bằng phương pháp chuyên gia. Mỗi cây trội dự tuyển được đánh dấu ở vị trí ngang ngực và ghi tên cây trội bằng 2 chữ viết tắt của tên huyện kèm số thứ tự từ 1 đến hết (ví dụ Bảo Thắng là BT1, BT2, Si Ma Cai là SMC1...). Mỗi cây trội dự tuyển được định vị và xác định độ cao nơi phân bố bằng máy định vị cầm tay (GPS) và lập hồ sơ theo dõi theo quy định trong TCVN 8755:2017 [4].

Chất lượng cây trội dự tuyển được đánh giá bằng phương pháp chuyên gia thông qua các chỉ tiêu: độ thẳng thân cây, độ nhỏ cành, sự phát triển của ngọn và chỉ tiêu sức khỏe. Xác định các chỉ tiêu này theo phương pháp mục trắc và cho điểm [5], cụ thể như sau:

* Độ thẳng thân và tròn thân cho điểm như sau:

- Cây rất cong: 1 điểm
- Cây cong: 2 điểm
- Cây hơi hơi cong và thân không tròn đều: 3 điểm
- Cây hơi thẳng, thân tròn đều, không xoắn vặn: 4 điểm
- Cây thẳng, thân tròn đều không xoắn vặn: 5 điểm

* Độ nhỏ cành cho điểm như sau:

- Cành rất lớn (>1/3 đường kính thân cây tại vị trí phân cành): 1 điểm
- Cành lớn (1/4-1/3 đường kính thân cây tại vị trí phân cành): 2 điểm
- Cành trung bình (1/6-1/5 đường kính thân cây tại vị trí phân cành): 3 điểm
- Cành nhỏ (1/9-1/7 đường kính thân cây tại vị trí phân cành): 4 điểm
- Cành rất nhỏ (<1/10 đường kính thân cây tại vị trí phân cành): 5 điểm

* Phát triển ngọn cho điểm như sau:

- Cây mất ngọn, cụt ngọn: 1 điểm
- Cây có nhiều ngọn cùng phát triển, tán phát triển theo chiều rộng: 2 điểm
- Cây có ngọn chính phát triển, ngọn phát triển lệch, tán lệch: 3 điểm
- Cây có ngọn chính phát triển, tán tương đối đều: 4 điểm
- Cây có một ngọn chính phát triển mạnh, tán có dạng cân đối: 5 điểm

* Chỉ tiêu sức khỏe (phản ánh toàn bộ hình thái cây, sức sống của cây và tình hình sâu bệnh hại) cho điểm như sau:

- Cây rất kém phát triển: 1 điểm
- Cây kém phát triển: 2 điểm
- Cây phát triển trung bình: 3 điểm
- Cây phát triển khá: 4 điểm
- Cây phát triển tốt: 5 điểm

Theo kế hoạch đã được phê duyệt, đề tài cần chọn được 12 cây trội, dựa vào các tiêu chí nêu trên các cây trội được chọn có tổng số điểm từ cao xuống thấp.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Chọn cây trội dự tuyển theo các chỉ tiêu sinh trưởng

Kết quả bước đầu đã chọn được 23 cây trội dự tuyển theo các chỉ tiêu sinh trưởng, đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$) đều đạt từ 20,4 đến 55,7 cm; chiều cao vút ngọn (H_{vn}) đều đạt từ 7,5 đến 28,0 m; chiều cao dưới cành (H_{dc}) đều đạt từ 3,7 đến 15,7 m. Đặc biệt, phần lớn các cây trội dự tuyển có chiều cao dưới cành (H_{dc}) đều lớn hơn 50% chiều cao vút ngọn (H_{vn}). Trong tổng số 23 cây dự tuyển có 21 cây ở huyện Bảo Thắng (BT) và 2 cây ở huyện Si Ma Cai. Ngoài ra, số liệu ở bảng 1 còn cho thấy các cây trội có phân bố ở độ cao từ 70 đến 1.015 m so với mực nước biển, nhưng tập trung nhiều nhất ở độ cao dưới 200 m, riêng 2 cây ở Si Ma Cai phân bố ở độ cao 937-1015 m.

Bảng 1. Một số chỉ tiêu sinh trưởng của các cây trội dự tuyển.

Thứ tự	Ký hiệu cây trội dự tuyển	Vĩ độ Bắc (N)	Kinh độ đông (E)	Độ cao (m)	Các chỉ tiêu sinh trưởng			Tỷ lệ H_{dc}/H_{vn} (%)
					$D_{1,3}$ (cm)	H_m (m)	H_{dc} (m)	
1	BT2	438249	2478280	166	41,3	25,4	13,6	53,5
2	BT5	437840	2480390	148	55,7	27,5	15,7	57,1
3	BT18	438254	2478282	166	39,5	28,0	14,5	51,8
4	BT19	438248	2478281	165	40,4	18,3	10,4	56,8
5	BT20	437686	2478154	148	47,1	25,3	13,6	53,8
6	BT21	413580	2476464	70	34,4	18,9	10,7	56,6
7	BT6	425643	2489550	139	41,1	17,5	9,8	56,0
8	BT10	425474	2489550	129	20,4	15,1	8,5	56,3
9	BT11	425384	2489630	164	22,1	15,6	10,3	66,0
10	BT17	425769	2489840	140	44,9	26,5	15,5	58,5
11	SMC1	426754	2508396	937	48,1	15,8	8,3	52,5
12	SMC2	426633	2509322	1015	26,3	14,6	7,5	51,4
13	BT1	439814	2478850	162	51,0	25,7	3,7	14,4
14	BT3	437687	2478150	148	19,7	14,5	4,0	27,6
15	BT4	437867	2478900	161	22,9	15,5	9,5	61,3
16	BT7	425219	2489280	167	12,5	7,5	4,0	53,3
17	BT8	425527	2489510	128	14,0	13,8	5,2	37,7
18	BT9	425505	2489510	125	17,7	13,5	8,5	63,0
19	BT12	424976	2489420	195	17,0	16,2	9,5	58,6
20	BT13	433214	2485730	147	38,0	25,2	12,4	49,2
21	BT14	433263	2485760	153	35,5	21,4	10,5	49,1
22	BT15	433270	2485780	161	41,6	25,7	8,9	34,6
23	BT16	438659	2488730	464	32,6	14,5	6,7	46,2

$D_{1,3}$: đường kính ngang ngực; H_{vn} : chiều cao vút ngọn; H_{dc} : chiều cao dưới cành.

3.2. Đánh giá chất lượng các cây trội dự tuyển

Chất lượng các cây trội được đánh giá thông qua 4 chỉ tiêu, gồm: độ thẳng thân cây (Đtt), độ nhỏ cành (Đnc), đặc điểm phát triển của ngọn (Pn) và sức khỏe của cây (Sk), số liệu chi tiết như trong bảng 2.

Bảng 2. Một số chỉ tiêu chất lượng cơ bản của các cây trội dự tuyển.

Thứ tự	Ký hiệu cây trội dự tuyển	Các chỉ tiêu sinh trưởng		Các chỉ tiêu chất lượng				Tổng (điểm)
		$D_{1,3}$ (cm)	H_m (m)	Đtt (điểm)	Đnc (điểm)	Pn (điểm)	Sk (điểm)	
1	BT2	41,3	25,4	5	5	5	4	19
2	BT5	55,7	27,5	5	4	4	4	17
3	BT18	39,5	28	5	5	5	5	20
4	BT19	40,4	18,3	5	4	5	5	19
5	BT20	47,1	25,3	5	4	4	5	18
6	BT21	34,4	18,9	5	5	5	5	20
7	BT6	41,1	17,5	5	4	4	4	17
8	BT10	20,4	15,1	5	5	5	5	20
9	BT11	22,1	15,6	5	4	4	4	17
10	BT17	44,9	26,5	5	4	4	4	17
11	SMC1	48,1	15,8	5	4	5	5	19
12	SMC2	26,3	14,6	5	5	5	5	20
13	BT1	51,0	25,7	5	4	3	4	16
14	BT3	19,7	14,5	3	3	4	4	14
15	BT4	22,9	15,5	4	4	4	4	16
16	BT7	12,5	7,5	4	4	4	4	16
17	BT8	14,0	13,8	4	3	4	5	16
18	BT9	17,7	13,5	3	4	4	4	15
19	BT12	17,0	16,2	4	4	4	3	15
20	BT13	38,0	25,2	4	4	4	4	16
21	BT14	35,5	21,4	4	3	4	4	15
22	BT15	41,6	25,7	4	3	4	4	15
23	BT16	32,6	14,5	4	4	3	4	15

$D_{1,3}$: đường kính ngang ngực; H_{vn} : chiều cao vút ngọn; Đtt: độ thẳng thân cây; Đnc: độ nhỏ cành; Pn: đặc điểm phát triển của ngọn; Sk: sức khỏe của cây.

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, có 13 cây trội dự tuyển đều có độ thẳng thân cây đạt điểm tối đa là 5 điểm; 8 cây có độ thẳng thân cây kém hơn và đạt 4 điểm; 2 cây có điểm độ thẳng thân cây chỉ đạt 3 điểm. Về độ nhỏ cành chỉ có 5 cây đạt điểm tối đa là 5 điểm, 14 cây có độ nhỏ cành đạt 4 điểm, còn lại 4 cây có độ nhỏ cành chỉ đạt 3 điểm. Điều này cho thấy một số cây Vù hương phát triển cành nhánh tương đối mạnh. Về sự phát triển của ngọn phần lớn các cây trội dự tuyển đều chỉ đạt 4 điểm (14 cây), chỉ có 7 cây có ngọn phát triển tốt và đạt 5 điểm, có 2 cây 3 điểm. Về sức khỏe, hầu hết các cây trội dự tuyển đều đạt 4-5 điểm, chỉ có 1 cây 3 điểm (BT12).

Tổng hợp cả 4 chỉ tiêu chất lượng nêu trên, các cây trội dự tuyển đều đạt 15-20 điểm. Ngoài ra, theo kết quả phỏng vấn cán bộ kiểm lâm địa bàn và người dân địa phương đều cho rằng các cây trội dự tuyển này hàng năm đều ra hoa kết quả và có khả năng cung cấp hạt giống.

3.3. Xác định các cây trội chính thức để phục vụ phát triển sản xuất

Căn cứ vào các tiêu chí sinh trưởng và chất lượng của các cây trội dự tuyển đã xác định được 12 cây trội đảm bảo yêu cầu của Tiêu chuẩn quốc gia về cây lấy gỗ (TCVN 8755-2017), trong đó ở huyện Bảo Thắng có 10 cây, huyện Si Ma Cai có 2 cây. Các cây trội này đều sinh trưởng tốt. Tất cả các cây trội được chọn lọc đều có kích thước thân cây lớn, sinh trưởng đường kính ngang ngực dao động 20,4-55,7 cm, chiều cao dao động 14,6-28,0 m. Các cây trội được chọn lọc đều có chiều cao dưới cành lớn, đạt 7,5-15,7 m, chiếm 51,4-66,0% so với chiều cao vút ngọn (bảng 3).

Bảng 3. Đặc điểm các cây trội chính thức được chọn.

Thứ tự	Ký hiệu cây trội	Độ cao (m)	Các chỉ tiêu sinh trưởng			Tỷ lệ H_d/H_v (%)	Các chỉ tiêu chất lượng				Tổng (điểm)
			$D_{1,3}$ (cm)	H_m (m)	H_d (m)		Đtt (điểm)	Đnc (điểm)	Pn (điểm)	Sk (điểm)	
1	BT2	166	41,3	25,4	13,6	53,5	5	5	5	4	19
2	BT5	148	55,7	27,5	15,7	57,1	5	4	4	4	17
3	BT18	166	39,5	28	14,5	51,8	5	5	5	5	20
4	BT19	165	40,4	18,3	10,4	56,8	5	4	5	5	19
5	BT20	148	47,1	25,3	13,6	53,8	5	4	4	5	18
6	BT21	70	34,4	18,9	10,7	56,6	5	5	5	5	20
7	BT6	139	41,1	17,5	9,8	56,0	5	4	4	4	17
8	BT10	129	20,4	15,1	8,5	56,3	5	5	5	5	20
9	BT11	164	22,1	15,6	10,3	66,0	5	4	4	4	17
10	BT17	140	44,9	26,5	15,5	58,5	5	4	4	4	17
11	SMC1	937	48,1	15,8	8,3	52,5	5	4	5	5	19
12	SMC2	1015	26,3	14,6	7,5	51,4	5	5	5	5	20

$D_{1,3}$: đường kính ngang ngực; H_v : chiều cao vút ngọn; H_d : chiều cao dưới cành; Đtt: độ thẳng thân cây; Đnc: độ nhỏ cành; Pn: đặc điểm phát triển của ngọn; Sk: sức khỏe của cây.

Về chất lượng cây trội đều đảm bảo yêu cầu, đặc biệt độ thẳng thân cây (Đtt) của tất cả cây trội được chọn đều đạt điểm tối đa là 5 điểm; độ nhỏ cành (Đnc), sự phát triển ngọn (Pn) và sức khỏe (Sk) đều đạt 4-5 điểm. Tổng điểm chất lượng của các cây trội đều đạt 17-20 điểm. Các cây trội Vũ hương tại 3 xã có phân bố trong các trạng thái rừng tự nhiên ở độ cao từ 70 đến 1.015 m so với mực nước biển, trong đó tại Bảo Thắng có 10 cây trội ở độ cao 70-166 m và 2 cây ở Si Mai Cai có độ cao so với mực nước biển 937-1.015 m.

3.4. Đặc điểm các cây trội phân bố ở các địa điểm cụ thể

+ **Tại xã Phong Niên, huyện Bảo Thắng:** Đã chọn được một cây trội Vũ hương (ký hiệu là BT2) tại thôn Làng Có 1, trong rừng tự nhiên là rừng sản xuất đã bị tác động nên cây rừng nói chung và cây Vũ hương nói riêng còn lại trong rừng với kích thước không lớn và do bị khai thác chọn diễn ra trong thời gian dài nên số lượng cây Vũ hương còn lại

trong rừng rất ít, chủ yếu là cây nhỏ, kích thước 10-15 cm. Do đó tại xã Phong Niên chỉ chọn được một cây trội Vũ hương đạt theo TCVN 8755:2017, với đường kính ngang ngực 41,3 cm, chiều cao vút ngọn 25,4 m, chiều cao dưới cành 13,6 m và đường kính tán lá 10,1 m (hình 1). Cây trội không chỉ có kích thước lớn mà còn có chất lượng thân cây tương đối tốt với tổng điểm chất lượng đạt điểm tuyệt đối là 20 điểm.



Hình 1. Ảnh cây trội Vũ hương BT2 tại xã Phong Niên, huyện Bảo Thắng.

+ **Tại xã Thái Niên, huyện Bảo Thắng:** Theo các tiêu chí chọn lọc, đã chọn được 5 cây trội Vũ hương có chất lượng tốt từ khu rừng tự nhiên phục hồi ở các thôn Hải Niên và Mom Đào (ký hiệu là BT5, BT18, BT19, BT20, BT21). Rừng tại khu vực này đã bị khai thác kiệt. Do có giá trị nên chủ rừng đã để lại các cây Vũ hương này trong rừng để chăm sóc, bảo vệ. Các cây trội này đều có hình thái đẹp, điểm cây lượng các cây trội đạt từ 17-20 điểm (trung bình là 18,8 điểm). Năm cây trội Vũ hương được chọn lọc tại các thôn Hải Niên và Mom Đào có các chỉ tiêu sinh trưởng đạt đường kính ngang ngực từ 34,4-55,7 cm; chiều cao vút ngọn từ 18,3-28 cm; chiều cao dưới cành chiếm từ 51,8-57,1% so với chiều cao vút ngọn và có đường kính tán lá từ 5,5-14 m (hình 2).



Ảnh cây trội BT5 Ảnh cây trội BT18 Ảnh cây trội BT21

Hình 2. Ảnh cây trội Vũ hương tại xã Thái Niên, huyện Bảo Thắng.

+ Tại xã Bản Phiệt, huyện Bảo Thắng: Đã chọn lọc được 4 cây trội Vũ hương từ các trạng thái rừng tự nhiên sau khai thác chọn ở thôn Cốc Lầy (ký hiệu là BT6, BT10, BT11 và BT17). Các cây trội Vũ hương được chọn lọc tại xã Bản Phiệt có đường kính ngang ngực dao động từ 20,4-44,6 cm, chiều cao vút ngọn từ 15,1-26,5 m, chiều cao dưới cành từ 8,5-15,5 m, đường kính tán lá từ 6,4-8,6 m và có tổng điểm chất lượng cây của các cây trội đạt từ 17-20 điểm (hình 3).



Ảnh cây trội BT6

Ảnh cây trội BT10

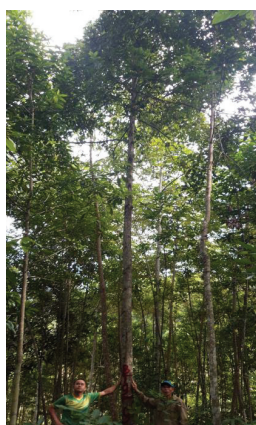
Ảnh cây trội BT17

Hình 3. Ảnh cây trội Vũ hương BT2 tại xã Bản Phiệt, huyện Bảo Thắng.

+ Tại xã Sán Chải, huyện Si Ma Cai: Đã chọn lọc được 2 cây trội Vũ hương từ trạng thái rừng tự nhiên sau khai thác chọn ở thôn Sín Hồ Sán (ký hiệu là SMC1 và SMC2). Hai cây trội này có đường kính ngang ngực dao động từ 26,3-48,1 cm, chiều cao vút ngọn từ 14,6-18,5 m, chiều cao dưới cành từ 7,5-8,3 m (51,4-52,5% so với Hvn), đường kính tán lá từ 5,6-8,8 m và có tổng điểm chất lượng đạt từ 19-20 điểm (hình 4).



Cây trội SMC1



Cây trội SMC2

Hình 4. Ảnh cây trội Vũ hương BT2 tại xã Sán Chải, huyện Si Ma Cai.

Nhìn chung 12 cây trội được chọn lọc tại hai huyện Bảo Thắng và Si Ma Cai đều sinh trưởng phát triển tốt, có hình thái thân cây đẹp, cây có thân thẳng, tròn, tán phát triển đều

và các cây trội đều đã ra hoa, kết quả nhiều năm, trong đó có nhiều cây sai quả. Các cây trội Vũ hương này đã được Chi cục kiểm lâm tỉnh Lào Cai công nhận nguồn giống cây trồng Lâm nghiệp theo Quyết định số 245/QĐ-CCKL ngày 29/12/2023. Đây là nguồn giống Vũ hương tốt, làm nguồn vật liệu để nhân giống, tạo cây giống chất lượng cao phục vụ trồng thâm canh cung cấp gỗ lớn kết hợp lấy tinh dầu tại Lào Cai.

4. Kết luận

Theo các tiêu chí quy định trong TCVN 8755:2017 (Giống cây Lâm nghiệp - Cây trội) và tiêu chí về phẩm chất thân cây đã chọn lọc được 12 cây trội Vũ hương ở 2 huyện Bảo Thắng và Si Ma Cai tỉnh Lào Cai, trong đó tại huyện Bảo Thắng chọn được 10 cây trội tại 3 xã Phong Niên, Thái Niên, Bản Phiệt và tại Si Ma Cai chọn được 2 cây trội tại xã Sán Chải.

Các cây trội Vũ hương được chọn lọc có sinh trưởng phát triển tốt, với đường kính ngang ngực từ 20,4 đến 55,7 cm, chiều cao vút ngọn dao động từ 14,6 đến 28,0 m, chiều cao dưới cành đạt từ 7,5 đến 15,7 m (chiếm từ 51,4 đến 66,0% so với chiều cao vút ngọn), đường kính tán lá dao động từ 5,5 đến 14 m.

Cây trội Vũ hương đều có phẩm chất cây tốt với tổng điểm chất lượng theo các chỉ tiêu độ thẳng thân, độ nhỏ cành, phát triển tán và sức khỏe cây đều đạt từ 17 đến 20 điểm. Các cây trội đã được Chi cục kiểm lâm tỉnh Lào Cai công nhận nguồn gốc giống cây Lâm nghiệp. Đây là nguồn giống tốt để nhân, tạo giống Vũ hương chất lượng cao phục vụ công tác trồng rừng cung cấp gỗ lớn kết hợp lấy tinh dầu tại tỉnh Lào Cai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Hop (1997), *Vietnam's Timber Resources*, Agricultural Publishing House, Hanoi, 762pp (in Vietnamese).
- [2] N. Vien, N.T.A. Nguyet, P.H. Hai, et al. (2015), *Research on Conservation and Development of Cinnamomum Balansae H.Lec in Phu Tho Province*, Final report of provincial-level science and technology project, Department of Science and Technology of Phu Tho province (in Vietnamese).
- [3] L.V. Quang, H.V. Thang (2023), "Current status of *Cinnamomum balansae* H.Lec forestation in some northern provinces", *Vietnam Journal of Forest Science*, 4, pp.88-89 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Science and Technology (2017), *TCVN 8755:2017: Forestry Tree Varieties - Superior Trees* (in Vietnamese).
- [5] L.D. Kha, D.M. Hung (2003), *Textbook on Forest Tree Varieties*, Agricultural Publishing House, Hanoi, 291pp (in Vietnamese).

Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng hào sữa (*Crassostrea angulata*) phục vụ chọn giống

Nguyễn Thành Luân^{1,2*}, Nguyễn Thị Mai Anh¹, Nguyễn Thảo Suong²,
Nguyễn Thị Nga³, Nguyễn Như Trí², Nguyễn Văn Sáng¹

¹Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II, 116 Nguyễn Đình Chiểu, phường Đa Kao, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, khu phố 6, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng, 215 Điện Biên Phủ, phường 15, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/10/2023; ngày chuyển phản biện 15/10/2023; ngày nhận phản biện 30/10/2023; ngày chấp nhận đăng 6/11/2023

Tóm tắt:

Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của các chế độ dinh dưỡng khác nhau đến tăng trưởng (tốc độ tăng trưởng, chiều cao, chiều dài vỏ), tỷ lệ ấu trùng điểm mắt (eyed spat) và tỷ lệ sống của ấu trùng hào sữa (*Crassostrea angulata*) có nguồn gốc tự nhiên từ Đài Loan (Trung Quốc). Ba loài tảo *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* và *Chaetoceros calcitrans* sử dụng làm thức ăn cho ấu trùng được bố trí ở các tỷ lệ và thời gian cho ăn khác nhau từ giai đoạn ấu trùng chữ D (ngày 1) tới ấu trùng điểm mắt (ngày ương thứ 16). Thí nghiệm được bố trí trong bể ương 200 lít, gồm 5 nghiệm thức (NT): NT1, NT2, NT3, NT4 và NT5, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống cao nhất (83,28±9,14%) thu được ở NT4 kết hợp cả ba loài tảo theo tỷ lệ 1:1:1 trong suốt 16 ngày nuôi (p<0,05). Kích thước vỏ và tốc độ tăng trưởng theo ngày cao nhất ở các NT3 và NT2 khi sử dụng kết hợp tảo *I. galbana* và *C. calcitrans* từ ngày nuôi số 4-16, khác biệt có ý nghĩa thống kê với các NT còn lại (p<0,05). Tỷ lệ ấu trùng điểm mắt cũng thu được cao nhất ở nhóm NT2, NT3 và NT4 (p<0,05). Tùy theo mục tiêu sản xuất cụ thể, chế độ dinh dưỡng ở NT3, NT2 và NT4 là phù hợp nhất cho lai tạo gia đình chọn giống hoặc sản xuất giống hào sữa phục vụ nghề nuôi thương phẩm.

Từ khóa: *Crassostrea angulata*, dinh dưỡng, hào sữa, tăng trưởng, tỷ lệ sống, vi tảo.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.5, 4.6

A study on effects of nutrition on growth and survival of oyster larvae *Crassostrea angulata* for selective breeding program

Thanh Luan Nguyen^{1,2*}, Mai Anh Thi Nguyen¹, Thao Suong Nguyen²,
Thi Nga Nguyen³, Nhu Tri Nguyen², Van Sang Nguyen¹

¹Research Institute for Aquaculture No.2, 116 Nguyen Dinh Chieu Street, Da Kao Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Nong Lam University, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Hong Bang International University, 215 Dien Bien Phu Street, Ward 15, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 12 October 2023, revised 30 October 2023; accepted 6 November 2023

Abstract:

This study evaluated the effect of different nutrition on growth (growth rate, shell height, shell length), eyed spat larvae rate and survival rate of *Crassostrea angulata* derived from the wild Taiwanese coastline (China). Three microalgae species of *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* were fed to oyster larvae at different ratios and time points from D-larvae (day 1) to eyed spat larvae (day 16). The experiment was designed with five treatments NT1, NT2, NT3, NT4 and NT5, three replicates per treatment in the 200 l tanks. The results showed that the highest survival rate (83.28±9.14%) was obtained in the NT4 treatment, in which the diet combined all three algae species at a ratio of 1:1:1 throughout 16 days of culture (p<0.05). Shell size and daily growth rate were highest in treatments NT2 and NT3, which used algae *I. galbana* and *C. calcitrans* from culture days no.4-16, showing a statistically significant difference compared to the other treatments (p<0.05). The rate of eye spot larvae was also highest in groups NT2, NT3 and NT4 (p<0.05). Depending on specific production goals, the nutritional regimes in NT3, NT2 and NT4 are most suitable for family breeding or producing oyster seeds for commercial farming.

Keywords: *Crassostrea angulata*, growth, microalgae, nutrition, oysters, survival rate.

Classification numbers: 1.6, 4.5, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: nguyentuan0309@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Hàu *Crassostrea angulata* (tên tiếng Anh: Portuguese oyster) tên thường gọi ở Việt Nam: hàu sữa hay hàu Bò Đào Nha) là một trong những loài thương mại quan trọng. Ở châu Âu, trước năm 1970, hàu sữa là đối tượng nuôi chính trong gần một thế kỷ với sản lượng hàng năm lên đến 100.000 tấn, nhưng hiện nay chỉ còn một vài vùng ở châu Âu nuôi trồng loài hàu này do bùng phát dịch bệnh *Ostreid herpesvirus 1* (OsHV-1) [1]. Ở châu Á, hàu sữa được nuôi trồng chính tại Đài Loan (Trung Quốc) [2], gần đây được nuôi phổ biến ở Việt Nam với sản lượng khoảng 50.000 tấn vào năm 2018 [3]. Nuôi hàu sữa tại Việt Nam hiện đối mặt với nhiều thách thức do đối tượng này được du nhập vào Việt Nam từ những năm 2008 và con giống hoàn toàn phụ thuộc vào sản xuất nhân tạo. Hàu bố mẹ cận huyết, tuyển chọn thiếu cơ sở khoa học từ hàu thương phẩm trong thời gian dài dẫn tới chất lượng con giống ngày càng suy thoái và ảnh hưởng tới năng suất nuôi [3].

Chọn giống là tương lai của ngành nuôi trồng thủy sản nhằm nâng cao hiệu quả kinh tế, cải thiện năng suất, chất lượng sản phẩm [4]. Thách thức lớn nhất trong chọn giống dựa trên gia đình là phải đồng thời sản xuất số lượng lớn gia đình mỗi thế hệ trong thời gian ngắn [4]. Vì vậy, hàu bố mẹ không những phải được tuyển chọn khoa học mà còn phải cung cấp chế độ dinh dưỡng tối ưu nhằm đạt hiệu quả cao nhất trong ương nuôi ấu trùng.

Vì tảo là thức ăn thích hợp để nuôi động vật thân mềm hai mảnh vỏ, có chứa các thành phần sinh hóa lipid (axit béo không bão hòa), carbohydrate và protein [5], trong đó sự phối trộn giữa các loài tảo là chế độ ăn uống được sử dụng phổ biến nhất, cung cấp sự cân bằng tốt hơn các chất dinh dưỡng [6]. Tuy nhiên, kích thước, hình thái và thành phần dinh dưỡng của tảo phải được đánh giá để xây dựng chế độ dinh dưỡng phù hợp và đảm bảo rằng các yếu tố này không cản trở ấu trùng ăn lọc và tiêu hóa cả ở giai đoạn phát triển sớm và muộn [5]. Một số loài hai mảnh vỏ có thể phân biệt thức ăn từ nhiều loại hạt khác nhau, ưu tiên ăn những hạt thích hợp và loại bỏ những hạt không mong muốn [7, 8]. Vì vậy, chế độ dinh dưỡng cao, giàu chất béo kết hợp từ hai hoặc nhiều vi tảo để đáp ứng đầy đủ nhu cầu phát triển và thiết lập quy trình sản xuất giống tối ưu cho ấu trùng hai mảnh vỏ [9].

Các axit béo không bão hòa trong vi tảo như DHA (Docosahexaenoic acid), EPA (Eicosapentaenoic acid) và ARA (Arachidonic acid) có liên quan trực tiếp đến tốc độ tăng trưởng nhanh, tỷ lệ sống cao và giảm căng thẳng ở hai

mảnh vỏ như hàu Thái Bình Dương, vẹm, điệp [10]. Ba vi tảo đơn bào *N. oculata*, *I. galbana* và *C. calcitrans* trong nghiên cứu này có chứa đầy đủ các thành phần axit béo kể trên và được sử dụng phổ biến làm thức ăn trong sản xuất giống hai mảnh vỏ do kích thước phù hợp với khả năng ăn lọc và dinh dưỡng đầy đủ cho các giai đoạn phát triển ấu trùng [6]. Dù vậy, cho đến nay có rất ít nghiên cứu đánh giá sử dụng thích hợp các loài tảo khác nhau từ giai đoạn ấu trùng chữ D tới con giống tám nhằm nâng cao tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng hàu sữa.

Với ý nghĩa khoa học và thực tiễn, nghiên cứu này nhằm:

1) xác định chế độ dinh dưỡng tối ưu nâng cao hiệu quả sản xuất giống quần đàn hàu sữa tự nhiên được nhập khẩu từ Đài Loan (Trung Quốc); 2) ứng dụng kết quả nghiên cứu phục vụ ương nuôi ấu trùng các gia đình hàu sữa các thể hệ chọn giống theo tính trạng tăng trưởng; 3) đề xuất chế độ dinh dưỡng tối ưu phục vụ sản xuất giống thương mại hàu sữa.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Ấu trùng (AT) chữ D hàu sữa khỏe mạnh có bố mẹ thu thập từ tự nhiên tại đảo Bành Hồ, Đài Loan (Trung Quốc). Các giai đoạn phát triển của ấu trùng hàu sữa [9] được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Các giai đoạn phát triển của ấu trùng hàu sữa.

Giai đoạn ấu trùng	Chữ D	Đỉnh vỏ	Điểm mắt	Bám (spat)
Thời gian (ngày)	1-7	5-12	14-21	21

Thức ăn cho ấu trùng hàu gồm 3 loài vi tảo đơn bào gồm: 1) *N. oculata*, 2) *I. galbana*, 3) *C. calcitrans* được lưu giữ giống và nuôi sinh khối tại Trung tâm Quốc gia giống hải sản Nam Bộ. Thành phần axit béo và kích thước của các loài vi tảo sử dụng trong thí nghiệm được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng (%) tổng các axit béo và kích thước của vi tảo trong thí nghiệm.

Chỉ tiêu	<i>N. oculata</i> [8]	<i>I. galbana</i> [7]	<i>C. calcitrans</i> [7]
Kích thước (µm)	1,5-2,0	3,0-4,0	4,0-6,0
Axit béo (%) tổng axit béo)	20:4n-6 (ARA)	8,47-10,55	11,3
	20:5n-3 (EPA)	29,34-35,51	26,3
	22:6n-3 (DHA)	26,8	2,3

ARA: Arachidonic acid; EPA: Eicosapentaenoic acid; DHA: Docosahexaenoic acid.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí trong 15 bể với 5 NT, mỗi NT 3 lần lặp lại trong các bể ương bể nhựa 200 lít (thể tích nước 150 lít). Các NT sử dụng các loài tảo đơn hoặc kết hợp đồng thời và thời gian cho ăn khác nhau (bảng 3).

Bảng 3. Các nghiệm thức thí nghiệm.

Nghiệm thức	Loài tảo	Thời gian cho ăn (ngày)
NT1	<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i> + <i>C. calcitrans</i>	(1-3) + (4-7) + (8-16)
NT2	<i>N. oculata</i> và <i>I. galbana</i> + <i>I. galbana</i> và <i>C. calcitrans</i>	(1-3) + (4-16)
NT3	<i>I. galbana</i> + <i>I. galbana</i> và <i>C. calcitrans</i>	(1-3) + (4-16)
NT4	1/3 <i>N. oculata</i> + 1/3 <i>I. galbana</i> + 1/3 <i>C. calcitrans</i>	(1-16)
NT5	<i>N. oculata</i> + <i>I. galbana</i>	(1-3) + (4-16)

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Ấu trùng chữ D khỏe mạnh sau khi ấp nở 24 giờ được bố trí vào các bể thí nghiệm. Mật độ ương ban đầu là 3 ấu trùng/ml/bể. Môi trường ương nuôi được duy trì trong điều kiện thích hợp nhiệt độ 28-29°C, độ mặn 30‰, pH 8,0, NO₂<1, NH₃<0,5 ppm.

Chế độ cho ăn 2 lần/ngày vào lúc 8:00 và 16:00. Mật độ tảo trong bể ương được duy trì khoảng 30.000 tế bào/ml ở 3 ngày đầu tiên, sau tăng lên 50.000 tế bào/ml ở các ngày tiếp theo và tăng lên 80.000 tế bào/ml từ ngày ương thứ 10 [9]. Mật độ tảo trong các bể nuôi ương và nuôi sinh khối tảo định lượng bằng buồng đếm Sedgewick dưới kính hiển vi vật kính 40× trước khi cho ăn [10]. Định kỳ thay nước 3 ngày/lần, lượng nước thay 30-50%. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ sống, chiều dài và chiều cao vỏ ấu trùng, tỷ lệ ấu trùng điểm mắt (eyed spat) ở các nghiệm thức sau 16 ngày ương.

2.3. Phương pháp nuôi sinh khối tảo

Tảo giống trong phòng thí nghiệm khi đạt mật độ khoảng 8×10⁵ tế bào/ml sẽ được nhân sinh khối ra hệ thống bể nuôi ngoài trời, sử dụng môi trường F2 đối với tảo *N. oculata* và môi trường Walne đối với tảo *I. galbana* và *C. calcitrans* theo tỷ lệ 1 ml môi trường cho 1 lít nước nuôi [11].

Tảo sinh khối được nuôi trong bể 500 và 1000 lít ngoài trời che lưới lan để ổn định nhiệt độ và hạn chế ánh sáng quá mức vào buổi trưa được thiết kế riêng cho việc nuôi tảo. Các chỉ tiêu nhiệt độ 26-28°C, pH nước 7,5-8,0; sục khí liên tục 24/24 giờ. Sau thời gian nuôi khoảng 3-4 ngày, mật độ tảo đạt 6-8×10⁶ tế bào/ml thì tiến hành thu hoạch làm thức ăn cho ấu trùng.

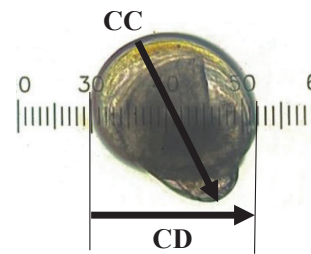
2.4. Phương pháp thu thập số liệu

Phương pháp xác định chỉ tiêu tăng trưởng: Tốc độ tăng trưởng theo ngày (%/ngày) được xác định bằng phương pháp đo kích thước vỏ của ấu trùng theo công thức:

$$SGR = 100 \times (\ln[L_2] - \ln[L_1]) / (T_2 - T_1)$$

trong đó: SGR: tốc độ tăng trưởng theo ngày (%/ngày); L₁ và L₂: chiều cao hoặc chiều dài vỏ trung bình thời điểm đầu và kết thúc (μm); T₁ và T₂: thời gian giữa 2 lần lấy mẫu.

Kích thước ấu trùng được đo bằng thước vi thị kính có 100 vạch, tương ứng là 10 μm/vạch, dưới vật kính 10×, định kỳ 2 ngày/lần, số lượng 25 ấu trùng/lần/bể. Chiều cao (CC) được đo từ mép vỏ phía mặt bụng đến đỉnh vỏ phía mặt lưng. Chiều dài (CD) được đo từ mép vỏ của mặt sau đến mép vỏ của mặt trước (hình 1).



Hình 1. Đo kích thước ấu trùng hàu sữa bằng thước vi thị kính.

Phương pháp xác định tỷ lệ sống ấu trùng: được xác định ở thời điểm kết thúc thí nghiệm và tính toán theo công thức:

$$TLS (\%) = N_2 / N_1 \times 100$$

trong đó: TLS: tỷ lệ sống ấu trùng (%); N₁: số lượng ấu trùng chữ D ban đầu bố trí thí nghiệm (con); N₂: số lượng ấu trùng thu được khi kết thúc thí nghiệm (con).

Phương pháp xác định tỷ lệ ấu trùng điểm mắt được tính theo công thức:

$$R (\%) = N_3 / N_2 \times 100$$

trong đó: R: tỷ lệ ấu trùng điểm mắt (%); N₃: số lượng ấu trùng điểm mắt thời điểm kết thúc thí nghiệm (con); N₂: số lượng ấu trùng thời điểm kết thúc thí nghiệm (con).

Phương pháp xác định các chỉ tiêu môi trường ương nuôi: nhiệt độ, độ mặn, oxy hòa tan (DO), pH được đo 2 lần/ngày vào lúc 6:00 và 14:00 bằng các dụng cụ đo môi trường như: nhiệt kế, máy đo oxy, pH và khúc xạ kế; NH₄⁺, NO₂⁻ được đo bằng bộ dụng cụ kiểm tra Sera 3 ngày/lần.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và quản lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2019. Kết quả được trình bày là trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn để so sánh các giá trị trung bình ở các nghiệm thức thí nghiệm. Phân tích số liệu bằng phương pháp phân tích phương sai một nhân tố (One-way ANOVA, kiểm định Duncan) với mức ý nghĩa 5% ($p=0,05$), sử dụng phần mềm SPSS phiên bản 22.0.

3. Kết quả

3.1. Điều kiện môi trường ương nuôi ấu trùng

Các yếu tố môi trường nước ương nuôi đều trong khoảng thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của ấu trùng hàu sữa, cho thấy việc bố trí thí nghiệm trong nhà an toàn sinh học hoàn toàn phù hợp với mục tiêu của nghiên cứu (bảng 4).

Bảng 4. Môi trường ương nuôi ấu trùng hàu sữa trong các nghiệm thức.

Chỉ tiêu	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5
Nhiệt độ (°C)	27-30	27-30	26-30	27-30	26-30
pH	7,6-8,0	7,8-8,0	7,7-8,0	7,6-8,0	7,5-8,0
Độ mặn (‰)	30	30	30	30	30
DO (mg/l)	5,0-5,5	5,0-5,5	5,2-5,5	5,3-5,5	5,1-5,5
NH ₄ ⁺ /NH ₃ (mg/l)	0	0	0	0	0
NO ₂ ⁻ (mg/l)	0	0	0	0	0

NT: nghiệm thức.

3.2. Tốc độ tăng trưởng của ấu trùng

Kích thước ấu trùng chữ D khi bố trí thí nghiệm là tương đồng với chiều dài vỏ 68,56 $\pm$ 0,32 μ m và 55,36 $\pm$ 0,17 μ m chiều cao vỏ ở tất cả các nghiệm thức. Từ kết quả bảng 5 cho thấy, kích thước vỏ trung bình đạt được khi kết thúc thí nghiệm cao nhất ở NT2 và NT3, với chiều cao vỏ lớn nhất là 273,71 $\pm$ 5,51 μ m ở NT2, trong khi chiều dài vỏ lớn nhất ở NT3 đạt 252,16 $\pm$ 2,15 μ m (khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) với các nghiệm thức còn lại). Kích thước vỏ nhỏ nhất ở NT1 với chiều cao và chiều dài vỏ lần lượt là 228,85 $\pm$ 1,73 μ m và 209,22 $\pm$ 1,56 μ m.

Tương tự kích thước vỏ, tốc độ tăng trưởng theo ngày cũng được ghi nhận cao nhất ở NT2 và NT3, khác biệt ý nghĩa thống kê với NT1, NT4 và NT5 ($p<0,05$). NT3 có tốc độ tăng trưởng nhanh nhất với chiều cao vỏ đạt 10,16 $\pm$ 0,07%/ngày và chiều dài vỏ (8,13 $\pm$ 0,1%/ngày) cao hơn khác biệt ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với NT2 (7,85 $\pm$ 0,09 %/ngày). NT4 và

NT5 có tốc độ tăng trưởng tương đương. Tốc độ tăng trưởng theo ngày ở NT1 là thấp nhất và khác biệt ý nghĩa ($p<0,05$) với cả 4 NT còn lại (bảng 5).

Bảng 5. Kích thước vỏ và tốc độ tăng trưởng của ấu trùng hàu sữa sau 16 ngày ương.

Nghiệm thức	Kích thước vỏ AT (μ m)		Tốc độ tăng trưởng (%/ngày)	
	CC	CD	SGR _{CC}	SGR _{CD}
NT1	228,85 $\pm$ 1,73 ^c	209,22 $\pm$ 1,56 ^d	8,99 $\pm$ 0,06 ^c	6,99 $\pm$ 0,07 ^d
NT2	273,71 $\pm$ 5,51 ^a	240,94 $\pm$ 2,86 ^b	10,15 $\pm$ 0,12 ^a	7,85 $\pm$ 0,09 ^b
NT3	272,71 $\pm$ 2,18 ^a	252,16 $\pm$ 2,15 ^a	10,16 $\pm$ 0,07 ^a	8,13 $\pm$ 0,1 ^a
NT4	244,75 $\pm$ 2,66 ^b	226,77 $\pm$ 1,84 ^c	9,49 $\pm$ 0,07 ^b	7,48 $\pm$ 0,06 ^c
NT5	249,78 $\pm$ 1,88 ^b	222,79 $\pm$ 3,81 ^c	9,62 $\pm$ 0,02 ^b	7,37 $\pm$ 0,08 ^c

a, b, c, d: Các giá trị trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$). Giá trị trong bảng là trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; CC: chiều cao vỏ; CD: chiều dài vỏ; SGR_{CC}: tốc độ tăng trưởng theo ngày chiều cao vỏ; SGR_{CD}: tốc độ tăng trưởng theo ngày chiều dài vỏ. AT: ấu trùng, NT: nghiệm thức.

3.3. Tỷ lệ ấu trùng điểm mắt và tỷ lệ sống của ấu trùng

Kết quả ở bảng 6 cho thấy, tỷ lệ xuất hiện ấu trùng điểm mắt và tỷ lệ sống của ấu trùng có sự phân nhóm ở các NT sau 16 ngày ương. Tỷ lệ ấu trùng điểm mắt là tương đồng ở nhóm NT2 (69,33 $\pm$ 2,03%), NT3 (67,33 $\pm$ 3,18%) và NT4 (69,11 $\pm$ 2,14%) là cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) so với nhóm NT1 (36,78 $\pm$ 10,52%) và NT5 (29,67 $\pm$ 3,28%). Tỷ lệ sống cao nhất là ở NT4 (83,28 $\pm$ 9,14%), cao hơn không khác biệt thống kê ($p>0,05$) so với NT1 (67,50 $\pm$ 12,82%) nhưng khác biệt thống kê ($p<0,05$) với NT3, NT2 và NT5. Tỷ lệ sống thấp nhất là ở NT5 (52,19 $\pm$ 20,05%).

Bảng 6. Tỷ lệ ấu trùng điểm mắt và tỷ lệ sống hàu sữa sau 16 ngày ương.

Nghiệm thức	Tỷ lệ AT điểm mắt (%)	Tỷ lệ sống (%)
NT1	36,78 $\pm$ 10,52 ^b	67,50 $\pm$ 12,82 ^{ab}
NT2	69,33 $\pm$ 2,03 ^a	56,06 $\pm$ 17,21 ^b
NT3	67,33 $\pm$ 3,18 ^a	57,56 $\pm$ 4,46 ^b
NT4	69,11 $\pm$ 2,14 ^a	83,28 $\pm$ 9,14 ^a
NT5	29,67 $\pm$ 3,28 ^b	52,19 $\pm$ 20,05 ^b

a, b: Các giá trị trong cùng một cột mang chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$). Giá trị trong bảng là trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. AT: ấu trùng, NT: nghiệm thức.

4. Bàn luận

Các nghiên cứu trên hàu sữa (*C. angulata*) nói chung còn rất hạn chế so với hàu Thái Bình Dương (*C. gigas*), đặc biệt các nghiên cứu liên quan tới chế độ dinh dưỡng trong ương nuôi ấu trùng. Quy trình sản xuất giống hàu hầu hết dựa trên quy trình sản xuất giống hàu Thái Bình Dương do 2 loài hàu này có quan hệ gần gũi với nhau, có khả năng tạo con lai, được phân tách thành 2 loài cùng một nguồn gốc [12] và hàu sữa không được nuôi phổ biến [13] như hàu Thái Bình Dương. Hạn chế của nghiên cứu này là không có NT đối chứng, các NT thí nghiệm được bố trí và dựa trên kết quả nghiên cứu trước trên hàu Thái Bình Dương và đặc điểm sinh học các giai đoạn phát triển ấu trùng của hàu *Crassostrea* sp. [14-16].

Nghiên cứu này cho kết quả tốc độ tăng trưởng của ấu trùng nhanh (7-10%/ngày) và tỷ lệ xuất hiện ấu trùng điểm mắt (30-70%) và tỷ lệ sống từ trung bình tới cao (52-83%) qua 16 ngày ương nuôi từ giai đoạn chữ D tới giai đoạn ấu trùng điểm mắt ở các NT thí nghiệm (bảng 5 và bảng 6). Kết quả này khẳng định hàu sữa bố mẹ có nguồn gốc tự nhiên nhập khẩu từ Đài Loan (Trung Quốc) đã thích nghi tốt và sản xuất giống hiệu quả trong điều kiện Việt Nam. Tốc độ tăng trưởng nhanh và tỷ lệ sống cao chỉ sau 16 ngày ương nuôi tới giai đoạn con giống bám so với 18-21 ngày được báo cáo trên hàu Thái Bình Dương [10] cho thấy chất lượng ấu trùng và kỹ thuật ương nuôi ấu trùng hàu đáp ứng yêu cầu thí nghiệm và quan trọng hơn, các loài vi tảo sử dụng làm thức ăn trong thí nghiệm phù hợp cho các giai đoạn phát triển của ấu trùng hàu sữa nguồn gốc Đài Loan (Trung Quốc).

Hàm lượng dinh dưỡng của vi tảo là yếu tố chính ảnh hưởng đến sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng 2 mảnh vỏ [5]. Hàm lượng axit béo của thức ăn rất quan trọng để đáp ứng yêu cầu về dinh dưỡng của động vật 2 mảnh vỏ [5]. PUFA (Polyunsaturated fatty acids), đặc biệt là axit béo omega-3 (DHA và EPA) hết sức cần thiết trong dinh dưỡng ương nuôi ấu trùng do ấu trùng 2 mảnh vỏ hầu hết thiếu khả năng tổng hợp DHA, EPA và sterol [11]. DHA là thiết yếu duy trì cấu trúc màng và tính toàn vẹn chức năng của

ấu trùng và EPA không thể thiếu cho quá trình hình thành phôi và sự phát triển của ấu trùng [12]. Nghiên cứu trên hàu *C. corteziensis* cho thấy, thức ăn thiếu ARA hạn chế sự phát triển của ấu trùng và có thể ảnh hưởng tới chức năng miễn dịch và sản xuất hormone sinh sản của ấu trùng động vật 2 mảnh vỏ [13]. Với nhu cầu đa dạng thành phần, hàm lượng chất béo và axit béo không bão hòa cao cho các giai đoạn phát triển khác nhau của ấu trùng 2 mảnh vỏ, không có loài vi tảo nào cung cấp đầy đủ các chất dinh dưỡng cần thiết [14]. Vì vậy, chế độ dinh dưỡng gồm nhiều loại tảo với tỷ lệ thích hợp có thể mang lại sự cân bằng dinh dưỡng, tăng trưởng tốt hơn và tỷ lệ sống cao hơn [15]. Các kết quả tăng trưởng và tỷ lệ sống ấu trùng hàu trong nghiên cứu này cho thấy, 3 loài tảo *N. oculata*, *I. galbana* và *C. calcitrans* đơn bào có kích thước và hàm lượng dinh dưỡng (DHA, EPA, ARA) khác nhau (bảng 2) phù hợp với khả năng ăn lọc của ấu trùng hàu và khẳng định thêm kết quả nghiên cứu của P. Cheng và cs (2020) [6] cho rằng, sự kết hợp từ 2 hoặc 3 loài tảo này đảm bảo chế độ dinh dưỡng tốt và hiệu quả sản xuất giống cao hơn so với sử dụng một loài tảo cho từng giai đoạn hoặc xuyên suốt các giai đoạn phát triển của ấu trùng hàu sữa.

Ở NT1, tảo *I. galbana* không được sử dụng ở những ngày sau của giai đoạn phát triển ấu trùng dẫn đến sự thiếu hụt DHA, có thể kết quả kích thước ấu trùng nhỏ nhất. Trong khi ở NT5, chỉ sử dụng tảo *I. galbana* (DHA cao) cho thấy sự thiếu hụt ARA và EPA từ tảo *N. oculata* và *C. calcitrans* từ ngày 4-16 có thể gây ra tỷ lệ sống thấp nhất (52,19±20,05%). Ngược lại, NT2 và NT3 duy trì sử dụng *I. galbana* và *C. calcitrans* (đầy đủ DHA, ARA và EPA) trong suốt quá trình ương nuôi ấu trùng cho thấy tốc độ tăng trưởng và kích thước ấu trùng nhanh nhất. Kết quả này cũng tương đồng với kết luận của B.R. Villa và cs (2006) [16] cho rằng, khẩu phần 25% *I. galbana* + 75% *C. calcitrans* là tối ưu cho sinh trưởng của ấu trùng hàu Thái Bình Dương. Có thể nói, chế độ dinh dưỡng kết hợp *I. galbana* và *C. calcitrans* hoàn toàn phù hợp với ương nuôi ấu trùng hàu sữa. Ở NT4, chế độ dinh dưỡng với hỗn hợp cả 3 loài tảo *N. oculata*, *I. galbana* và *C. calcitrans* (tỷ lệ 1:1:1) từ đầu tới kết thúc thí nghiệm cho tỷ lệ sống (83,28±9,14%) và

tỷ lệ xuất hiện ấu trùng điểm mắt ($69,1 \pm 2,14\%$) cao nhất ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức khác, tốc độ tăng trưởng kích thước vỏ cũng khá nhanh (bảng 5).

Một yếu tố quan trọng khác là kích thước phù hợp của tế bào tảo cũng ảnh hưởng trực tiếp tới tăng trưởng, tỷ lệ sống của ấu trùng hai mảnh vỏ [7]. Tỷ lệ lọc ở ấu trùng 2 mảnh vỏ thường cao nhất với kích thước hạt từ 4,7 đến 6,3 μm [17], nghĩa là bên cạnh thành phần dinh dưỡng thiết yếu thì kích thước thức ăn phải phù hợp với kích thước ấu trùng ở các giai đoạn phát triển đảm bảo ấu trùng có thể sử dụng tối đa và tiêu hóa thức ăn tốt nhất. Theo R. Robert và cs (2001) [18], ấu trùng hàu *C. gigas* phát triển kém ($1,2-1,7 \mu\text{m/ngày}$) với chế độ ăn đơn loài *Tetraselmis suecica* cho đến khi đạt 140 μm , sau đó tăng trưởng được cải thiện ($6,4-8,0 \mu\text{m/ngày}$). Hơn nữa, M.M. Helm và cs (2004) [9] cho rằng, kích thước tảo ảnh hưởng đến khả năng bắt mồi, tiêu hóa của ấu trùng. Tảo *C. calcitrans* hay *T. pseudonana* thích hợp cho ấu trùng lớn hơn 55 μm trong khi *C. muelleri* thích hợp cho ấu trùng lớn hơn 90 μm . Trong nghiên cứu này, ương nuôi ấu trùng từ giai đoạn chữ D ($>68 \mu\text{m}$) sử dụng *N. oculata* ($1,5-2,0 \mu\text{m}$) và *I. galbana* ($3-4 \mu\text{m}$) đảm bảo cho ấu trùng có thể lọc và tiêu hóa tốt. Đặc biệt ở NT4, tảo *N. oculata* kích thước nhỏ được duy trì xuyên suốt thí nghiệm, những ấu trùng hàu chậm lớn hơn trong đàn có thể vẫn được cung cấp đầy đủ thức ăn có kích thước phù hợp để duy trì phát triển nên đạt tỷ lệ sống cao nhất. Tỷ lệ sống cao nhất nên mật độ ương nuôi ấu trùng ở NT4 cao hơn ($p < 0,05$) các NT khác trong suốt thời gian thí nghiệm có thể ảnh hưởng tới tốc độ tăng trưởng chậm hơn ở NT4 so với các NT2 và NT3. Mặt khác, NT5 không sử dụng *C. calcitrans*, tỷ lệ sống của ấu trùng đạt thấp nhất ($52,19 \pm 20,05\%$). Ngoài ra, R. Marshall và cs (2010) [5] thống kê tất cả các nghiệm cứu đạt tỷ lệ sống cao hơn 88% thì chế độ dinh dưỡng đều chứa *C. calcitrans* đơn đặc hiệu hoặc kết hợp với các loài tảo khác và tỷ lệ sống thấp dưới 50% thì chế độ dinh dưỡng hầu hết có chứa các loài Pavlova.

Trong sản xuất giống nhân tạo, tỷ lệ ấu trùng điểm mắt cũng là chỉ tiêu quan trọng đánh giá sự thành công sản xuất giống. Ấu trùng điểm mắt là ấu trùng ra chân bò, biến đổi hình thái và chuẩn bị kết thúc giai đoạn ấu trùng trôi nổi để

chuyển sang giai đoạn sống bám vào giá thể tới hết vòng đời. Tỷ lệ ấu trùng điểm mắt cao cho thấy ấu trùng phát triển đồng đều và con giống đạt chất lượng tốt. Ở nghiên cứu này, để đánh giá chính xác hơn, chúng tôi tiếp tục theo dõi ấu trùng bám giá thể sau khi kết thúc thí nghiệm. NT2, NT3 và NT4 vượt trội hơn so với NT1 và NT5 với tỷ lệ ấu trùng điểm mắt cao, tăng trưởng nhanh hơn, ấu trùng bắt đầu và kết thúc bám giá thể sớm hơn 2 ngày so với NT1 và NT5 (bảng 5 và bảng 6). NT3 có tốc độ tăng trưởng kích thước vỏ nhanh nhất, khác biệt ý nghĩa thống kê với NT4 và tỷ lệ ấu trùng điểm mắt cao, tỷ lệ sống cao tương đồng với NT2 và NT4. Vì vậy, nếu các nghiệm cứu không đặt mục tiêu cao ở khía cạnh tỷ lệ sống như trong lai tạo gia đình chọn giống tăng trưởng nhanh thì NT3 là chế độ dinh dưỡng tối ưu nhất, theo sau là NT2. Mặt khác, NT4 có tỷ lệ sống cao nhất ($83,28 \pm 9,14\%$), tỷ lệ ấu trùng điểm mắt tương đương và tốc độ tăng trưởng thấp hơn, khác biệt ý nghĩa thống kê với NT2 và NT3 cho thấy, NT4 nên được xem xét như là chế độ dinh dưỡng tối ưu trong các nghiệm cứu nâng cao tỷ lệ sống hoặc trong thực tiễn sản xuất giống thương mại nhằm nâng cao năng suất thu hoạch.

5. Kết luận

Điều kiện môi trường ương nuôi ấu trùng là trong khoảng thích hợp để bố trí thí nghiệm và sự phát triển của ấu trùng. Chế độ dinh dưỡng kết hợp các loài vi tảo *N. oculata*, *I. galbana* và *C. calcitrans* là phù hợp cho sản xuất giống hàu sữa. NT3 (*I. galbana* từ ngày 1-3 + *I. galbana* và *C. calcitrans* từ ngày 4-16) và NT2 (*N. oculata* và *I. galbana* từ ngày 1-3 + *I. galbana* và *C. calcitrans* từ ngày 4-16) là chế độ dinh dưỡng tối ưu nhất cho mục tiêu ương nuôi gia đình phục vụ chọn giống tăng trưởng nhanh. NT4 ($1/3 N. oculata + 1/3 I. galbana + 1/3 C. calcitrans$ từ ngày 1-16) có thể là chế độ dinh dưỡng thích hợp nhất cho thực tiễn sản xuất giống thương mại. Hàu sữa (*C. angulata*) tự nhiên Đài Loan (Trung Quốc) đáp ứng yêu cầu làm vật liệu ban đầu cho chương trình chọn giống. Từ kết quả trên, chúng tôi đề nghị tiếp tục mở rộng nghiên cứu ở quy mô sản xuất để đề xuất chế độ dinh dưỡng tối ưu nhất cho thực tiễn sản xuất giống hàu sữa trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.M. Batista, M.L. Sanmartin, A. Grade, et al. (2015), “Sequence variation in *Ostreid herpesvirus 1* microvar isolates detected in dying and asymptomatic *Crassostrea angulata* adults in the Iberian Peninsula: Insights into viral origin and spread”, *Aquaculture*, **435**, pp.43-51, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.016.
- [2] S. Lapègue, S. Heurtebise, F. Cornette, et al. (2020), “Genetic characterisation of cupped oyster resources in Europe using informative single nucleotide polymorphism (SNP) panels”, *Genes*, **11**(4), DOI: 10.3390/genes11040451.
- [3] W. O'Connor, M. Dove, S. O'Connor, et al. (2019), *Enhancing Bivalve Production in Northern Vietnam and Australia, Final Report*, Australian Centre for International Agricultural Research FIS/2010/100.
- [4] B. Gjerde (2005), *Selection and Breeding Programs in Aquaculture*, Springer, DOI: 10.1007/1-4020-3342-7.
- [5] R. Marshall, S. McKinley, C.M. Pearce (2010), “Effects of nutrition on larval growth and survival in bivalves”, *Reviews in Aquaculture*, **2**(1), pp.33-55, DOI: 10.1111/j.1753-5131.2010.01022.x.
- [6] P. Cheng, C. Zhou, R. Chu, et al. (2020), “Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements”, *Algal Research*, **51**, DOI: 10.1016/j.algal.2020.102076.
- [7] Z.S. Pinarbaş, M. Sayar, S.S. Türk, et al. (2023), “Effect of microalgae diets on growth, proximate and fatty acid composition of black mussel (*Mytilus galloprovincialis*)”, *Research Square*, **1**, pp.1-23, DOI: 10.21203/rs.3.rs-2911662/v1.
- [8] X. Huang, Z. Huang, W. Wen, et al. (2013), “Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*)”, *Journal of Applied Phycology*, **25**, pp.129-137, DOI: 10.1007/s10811-012-9846-9.
- [9] M.M. Helm, N. Bourne, A. Lovatelli (2004), “Hatchery operation: Culture of larvae basic methodology, feeding and nutrition, factors influencing growth and survival, and settlement and metamorphosis”, *Hatchery Culture of Bivalves. A Practical Manual. FAO Fish Technical Paper*, **471**, pp.59-83.
- [10] I. Laing (1991), *Cultivation of Marine Unicellular Algae*, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Conwy, **67**, 31pp.
- [11] D.R. Pesantes, C. Lodeiros, A. Márquez, et al. (2020), “Microalgal diet evaluation in the larval development and substrate selection for settlement in the rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825)”, *Aquaculture Research*, **51**(12), pp.4938-4947, DOI: 10.1111/are.14831.
- [12] R. Gagné, R. Tremblay, F. Pernet, et al. (2010), “Lipid requirements of the scallop *Pecten maximus* (L.) during larval and post-larval development in relation to addition of *Rhodomonas salina* in diet”, *Aquaculture*, **309**(1-4), pp.212-221, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.040.
- [13] M.A. Hurtado, M. Reza, A.M. Ibarra, et al. (2009), “Arachidonic acid (20:4n-6) effect on reproduction, immunology, and prostaglandin E2 levels in *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951)”, *Aquaculture*, **294**(3-4), pp.300-305, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.06.009.
- [14] S. Hemaiswarya, R. Raja, R.R. Kumar, et al. (2011), “Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**, pp.1737-1746, DOI: 10.1007/s11274-010-0632-z.
- [15] R.G. Araya, C. Mingant, B. Petton, et al. (2012), “Influence of diet assemblage on *Ostrea edulis* broodstock conditioning and subsequent larval development”, *Aquaculture*, **364**, pp.272-280, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.08.036.
- [16] B.R. Villa, J.R.L. Coz, C. Mingant, et al. (2006), “Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg)”, *Aquaculture*, **256**, pp.377-388, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.02.015.
- [17] F. Sommer, H. Stibor, U. Sommer, et al. (2000), “Grazing by mesozooplankton from Kiel Bight, Baltic Sea, on different sized algae and natural seston size fractions”, *Marine Ecology Progress Series*, **199**, pp.43-53, DOI: 10.3354/meps199043.
- [18] R. Robert, G. Parisi, L. Rodolfi, et al. (2001), “Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae”, *Aquaculture*, **192**(2-4), pp.333-346, DOI: 10.1016/S0044-8486(00)00456-7.

Tuyển chọn các chủng vi nấm có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao ứng dụng trong lên men quả bồ kết (*Gleditsia australis* Hemsl.)

Trương Thị Chiên, Mai Vũ Hoàng Giang, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thành Đức, Phan Xuân Bình Minh, Vũ Xuân Tạo*

Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 29/7/2024; ngày chuyển phản biện 1/8/2024; ngày nhận phản biện 13/8/2024; ngày chấp nhận đăng 16/8/2024

Tóm tắt:

Bồ kết là nguồn thực vật giàu saponin có giá trị, được ứng dụng để sản xuất chất hoạt động bề mặt tự nhiên thân thiện với môi trường. Quả bồ kết có nhiều đặc tính sinh học phù hợp với ngành công nghiệp dược mỹ phẩm. Hiện nay, quả bồ kết là nguồn nguyên liệu chính để sản xuất nhiều sản phẩm như dầu gội, nước rửa chén... Nghiên cứu này đánh giá khả năng sinh amylase, protease và cellulase của 4 chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* (NE1, NE2, NE10 và NE13) và 2 chủng nấm mốc *Aspergillus oryzae* (NOS1 và NO42), trong đó 2 chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryzae* NOS1 được lựa chọn để lên men quả bồ kết. Kết quả đánh giá chất lượng sản phẩm sau lên men cho thấy, các chủng nấm đều có khả năng ứng dụng trong lên men quả bồ kết. Đặc biệt, việc sử dụng chủng *S. cerevisiae* NE2 đã giúp nâng cao chất lượng sản phẩm sau lên men rõ rệt với hàm lượng saponin/chất rắn hòa tan đạt 71,7%. Sản phẩm sau lên men là nguồn nguyên liệu chứa saponin có độ sạch cao, được ứng dụng như một chất hoạt động bề mặt trong phát triển các sản phẩm hóa mỹ phẩm.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, bồ kết, *Gleditsia australis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Selection of microfungal strains with high exoenzyme production for the fermentation of *Gleditsia australis* Hemsl. fruits

Thi Chien Truong, Vu Hoang Giang Mai, Thi Hien Nguyen, Thanh Duc Pham, Xuan Binh Minh Phan, Xuan Tao Vu*

Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6 Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 29 July 2024; revised 13 August 2024; accepted 16 August 2024

Abstract:

Gleditsia australis Hemsl. is a valuable plant source rich in saponins, used for producing environmentally friendly natural surfactants. *Gleditsia australis* Hemsl. fruits have various biological properties suitable for the pharmaceutical and cosmetic industries. Currently, *Gleditsia australis* Hemsl. fruit is the main raw material used to produce various products such as shampoo, dishwashing liquid... This study evaluated the amylase, protease, and cellulase production capabilities of four yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* (NE1, NE2, NE10, and NE13) and two mould strains of *Aspergillus oryzae* (NOS1 and NO42). Among these, the *S. cerevisiae* NE2 and *A. oryzae* NOS1 were selected for fermenting *Gleditsia australis* Hemsl. fruits. The quality assessment of the fermented product shows that both fungal strains are applicable in the fermentation of *Gleditsia australis* Hemsl. Notably, the use of the *S. cerevisiae* NE2 significantly improved the quality of the fermented product, with the saponin/soluble solids content reaching 71.7%. The post-fermentation product is a highly pure saponin source, used as a surfactant in the development of chemical and cosmetic products.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, enzyme, *Gleditsia australis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Ngày nay việc sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc từ thiên nhiên đang trở thành xu hướng tiêu dùng mới. Đặc biệt, các hóa chất trong hóa mỹ phẩm, sản phẩm tẩy rửa... đang dần được thay thế bởi các thành phần chiết xuất từ thực vật. Ở Việt Nam, quả bồ kết (*Gleditsia australis* Hemsl.) được sử dụng phổ biến trong nhiều sản phẩm dầu gội, nước rửa chén... do trong thành phần có chứa nhiều saponin - một chất hoạt động bề mặt quan trọng trong các sản phẩm làm sạch [1]. Nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy, có 67 hợp chất được phân lập từ các loài thuộc chi *Gleditsia* bao gồm triterpenes, sterol, flavonoid, alkaloid, phenolics và các dẫn xuất của chúng, trong đó 32 hợp chất được xác định là saponin [2]. Cao chiết từ quả bồ kết được xác định có hoạt tính chống ung thư, chống viêm, chống dị ứng, giảm đau, kháng khuẩn và kháng nấm [3, 4]. Vì vậy, saponin từ quả bồ kết có tiềm năng lớn trong phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe, mỹ phẩm và các sản phẩm làm sạch.

Việc chiết xuất saponin từ thực vật làm nguyên liệu cho phát triển các sản phẩm tẩy rửa luôn được quan tâm. Trong đó, phương pháp lên men truyền thống sử dụng các loài thực vật giàu saponin như quả bồ kết, bồ hòn với hệ vi sinh vật có sẵn trên nguyên liệu đã được nhiều đơn vị sản xuất áp dụng. Phương pháp này đơn giản, không tốn kém nhưng chất lượng thành phẩm sau lên men không cao, khó kiểm soát, không đồng đều giữa các mẻ lên men [5]. Một số nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng vi sinh vật trong lên men chiết xuất saponin như sử dụng nấm men *S. cerevisiae* và nấm mốc *A. oryzae* trong lên men quả bồ hòn để tăng độ tinh sạch của saponin, nâng cao tính cảm quan từ đó tăng chất lượng sản phẩm sau lên men [6-8]. Các chủng vi nấm *S. cerevisiae* và *A. oryzae* được xác định có khả năng sinh các loại enzyme ngoại bào cao, phù hợp sử dụng trong quá trình lên men. Tuy nhiên, việc nghiên cứu lên men quả bồ kết sử dụng các chủng vi nấm giúp tăng chất lượng sản phẩm sau lên men hiện chưa có nhiều công bố. Kết quả nghiên cứu của bài báo này sẽ là cơ sở khoa học quan trọng trong việc thiết lập quy trình lên men quả bồ kết cho hiệu quả cao, ổn định sử dụng vì nấm có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Ba mẫu quả bồ kết tươi được thu thập tại các tỉnh Thái Nguyên, Thanh Hóa và Gia Lai được xác định là loài *Gleditsia australis* Hemsl. bởi TS Đỗ Thị Xuyên - Bộ môn Khoa học Thực vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các mẫu được ký hiệu lần lượt là BKTN, BKTH và BKGL.

Bốn chủng nấm men *S. cerevisiae* (ký hiệu tương ứng NE1, NE2, NE10 và NE13) và 2 chủng nấm mốc *A. oryzae* (ký hiệu tương ứng là NOS1 và NO42) thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định một số chỉ tiêu chất lượng của các mẫu quả bồ kết thu thập

Các mẫu quả bồ kết được sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi, tách lấy phần vỏ quả, nghiền nhỏ, rây qua lưới kích thước 1 mm và phân tích các chỉ tiêu:

- Hàm lượng đường: Xác định theo tiêu chuẩn ngành 10 TCN 514:2002.

- Hàm lượng tinh bột: Xác định theo TCVN 12382:2018.

- Hàm lượng saponin tổng số: Xác định theo phương pháp đo quang [9].

Axit oleanolic được pha trong cồn tuyệt đối ở các nồng độ 5, 10, 15, 20, 25 và 30 µg/ml để dựng đường chuẩn định lượng saponin. Cân chính xác 1,0 g bột quả bồ kết vào ống falcon, thêm chính xác 25 ml ethanol 96%, siêu âm trong 1 giờ, để lắng. Hút 40 µl dịch chiết vào bình định mức 10 ml, bốc hơi đến cạn trên bếp cách thủy ở 80°C. Thêm vào bình 0,6 ml dung dịch vanilin/axit acetic băng nồng độ 50 mg/ml và 1,0 ml axit perchloric. Bọc kín bình, lắc đều và ủ ở 70°C trong 20 phút. Sau đó, làm lạnh nhanh và thêm axit acetic băng đến vạch định mức 10 ml. Lắc đều và đo quang ở 550 nm.

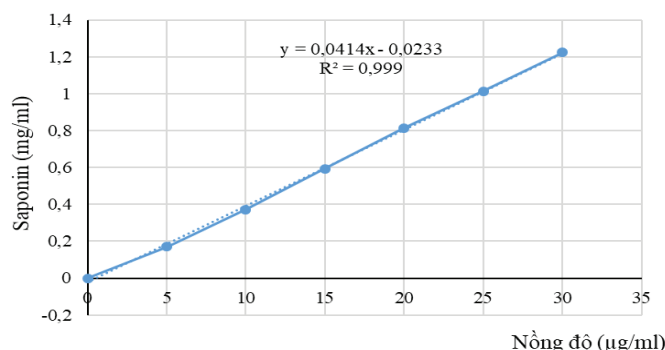
Xác định hàm lượng saponin tổng số dựa trên đường chuẩn axit oleanolic:

$$\text{Saponin (\%)} = \frac{W_{TSS}}{W_{mẫu}} \times 100$$

$$W_{TSS} = C_{TSS} \times V_{dịch\ chiết}$$

trong đó: W_{TSS} (mg): khối lượng saponin tổng số trong mẫu dịch chiết; $W_{mẫu}$ (g): khối lượng mẫu phân tích; C_{TSS} (mg/ml): nồng độ saponin tổng số trong dịch chiết tính theo axit oleanolic; $V_{dịch\ chiết}$ (ml): thể tích dịch chiết tương ứng.

Đường chuẩn định lượng saponin dựa theo nồng độ axit oleanolic được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. Đường chuẩn định lượng saponin dựa theo nồng độ axit oleanolic.

2.2.2. Phương pháp đánh giá khả năng sinh cellulase, amylase và protease của các chủng vi nấm

Chủng *S. cerevisiae* và *A. oryzae* (1 ml dịch nấm men/ dịch bào tử nấm mốc (10^6 tế bào (bào tử)/ml)) được tiến hành lên men trong 50 ml môi trường tương ứng là YPD lỏng (g/l, yeast extract 10; peptone 20; D-glucose 20) và CD (Czapek-Dox) lỏng (g/l, NaNO_3 2; K_2HPO_4 1; MgSO_4 0,5; KCl 0,5; FeSO_4 0,1; saccharose 30) với nguồn cacbon được thay thế bằng 0,2% cơ chất cảm ứng (CMC, tinh bột, sữa gầy) ở điều kiện lắc 150 vòng/phút, 30°C trong 3 ngày để thu dịch enzyme thô. 50 μ l dịch enzyme thô được nhỏ vào giếng đã đục sẵn trên môi trường thạch chứa 1% cơ chất tương ứng. Đĩa được ủ ở 4°C trong 4 giờ để dịch enzyme khuếch tán và ủ tiếp 48 giờ ở 30°C. Sử dụng dung dịch Lugol 0,1% để hiện vòng phân giải đối với dịch cellulase và amylase thô [10].

2.2.3. Phương pháp đánh giá khả năng lên men quả bồ kết của chủng vi nấm tuyển chọn

Bột quả bồ kết và dung dịch đường saccharose 2% (w/v) được khử trùng riêng rẽ và để nguội. Quá trình lên men được thực hiện trong bình tam giác 250 ml chứa tổng thể tích lên men là 100 ml bao gồm 10 g bột quả bồ kết, 10 ml dịch nấm men/dịch bào tử nấm mốc (10^6 tế bào (bào tử)/ml) và dung dịch đường saccharose 2% ở điều kiện lắc 150 vòng/phút, 30°C trong 4 ngày. Dịch sau lên men được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi [6]. Phần dịch sau ly tâm được tiến hành xác định hàm lượng saponin/hàm lượng chất rắn hòa tan (chất rắn hòa tan), pH, °Brix, ethanol.

Hàm lượng chất rắn hòa tan được xác định bằng cân 10 g dịch chiết, sấy ở nhiệt độ 80°C đến khối lượng không đổi. Cân khối lượng mẫu trước và sau khi sấy để ghi lại kết quả.

Hàm lượng ethanol được xác định theo TCVN 5562:2009, pH trong dịch được xác định theo TCVN 7806:2007, °Brix trong dịch được xác định theo khúc xạ kế.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm Excel 2016.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng mẫu quả bồ kết thu thập

Cây bồ kết thường được trồng nhiều tại các tỉnh miền Bắc và vùng cao nguyên Nam Trung Bộ. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành thu thập một số mẫu quả bồ kết được trồng

hiều tại các tỉnh Thái Nguyên, Thanh Hóa và Gia Lai. Kết quả đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng nguyên liệu thu thập được thể hiện tại bảng 1.

Bảng 1. Chất lượng mẫu quả bồ kết thu tại một số tỉnh của Việt Nam.

Thứ tự	Chỉ tiêu	Các mẫu quả bồ kết		
		BKTN	BKTH	BKGL
1	Đường tổng số (%)	8,71 $\pm$ 0,66	9,15 $\pm$ 0,73	9,32 $\pm$ 0,70
2	Tinh bột (%)	6,08 $\pm$ 0,81	6,68 $\pm$ 0,78	6,54 $\pm$ 0,88
3	Saponin (%)	10,17 $\pm$ 0,92	8,31 $\pm$ 0,89	11,11 $\pm$ 0,94

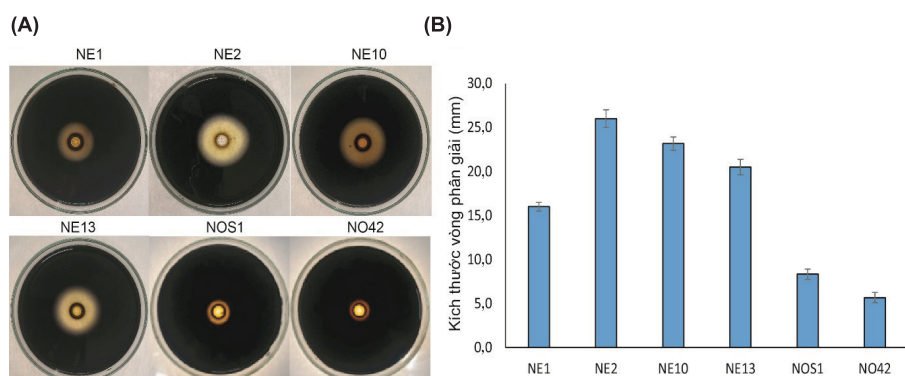
BKTN: bồ kết tươi thu tại tỉnh Thái Nguyên; BKTH: bồ kết tươi thu tại tỉnh Thanh Hóa; BKGL: bồ kết tươi thu tại tỉnh Gia Lai.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, quả bồ kết thu được tại 3 tỉnh có hàm lượng đường tổng số từ 8,71 đến 9,32% và hàm lượng tinh bột từ 6,08 đến 6,68%. Đây là nguồn cacbon cần thiết cho quá trình lên men. Hàm lượng saponin của các mẫu quả bồ kết dao động từ 8,31 đến 11,11%, trong đó đạt cao nhất ở là mẫu quả bồ kết thu tại Gia Lai và thấp nhất ở mẫu quả bồ kết thu tại Thanh Hóa (sự khác biệt về hàm lượng saponin giữa các mẫu quả bồ kết có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đó về hàm lượng saponin tổng số của các mẫu quả bồ kết đạt khoảng 10% [11]. Vì vậy, trong khuôn khổ nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn mẫu quả bồ kết thu thập tại Gia Lai sử dụng cho các thử nghiệm tiếp theo.

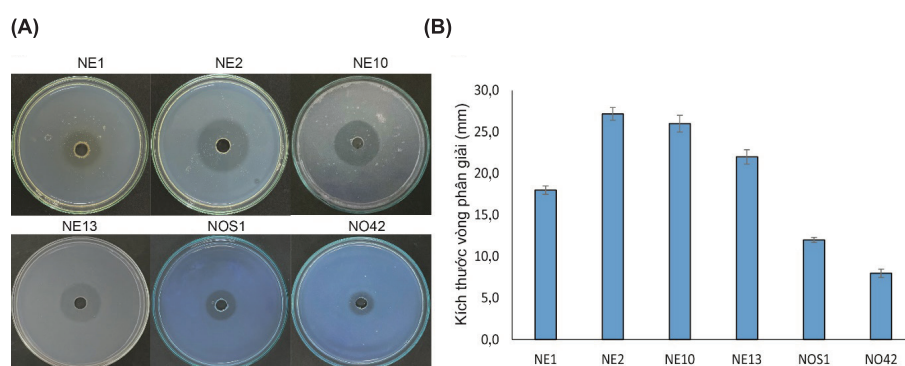
3.2. Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm nghiên cứu

3.2.1. Khả năng sinh amylase

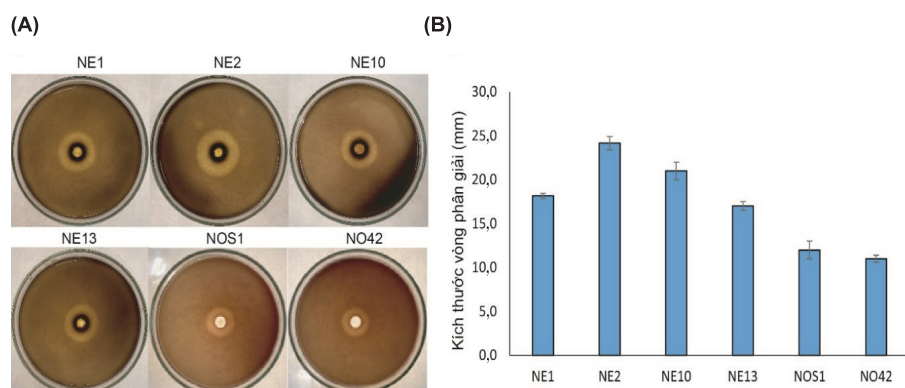
Cả 6 chủng vi nấm nghiên cứu được tiến hành xác định khả năng sinh amylase dựa trên kích thước vòng phân giải cơ chất tinh bột. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong 4 chủng nấm men *S. cerevisiae*, chủng NE2 cho đường kính vòng phân giải lớn nhất, trung bình đạt 26 mm (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Trong 2 chủng nấm mốc nghiên cứu, chủng *A. oryzae* NOS1 cho kích thước vòng phân giải lớn hơn, đạt trung bình 12 mm (hình 2). Nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng *S. cerevisiae* có khả năng sinh nhiều loại enzyme như pectinase, chitinase, invertase, catalase, tannase, amylase, protease, cellulase, lipase... được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, đồ uống, dược phẩm và mỹ phẩm [12]. *A. oryzae* được sử dụng phổ biến trong các sản phẩm lên men truyền thống của Nhật Bản. *A. oryzae* có khả năng sản xuất nhiều loại enzyme hữu ích như α -amylase, glucoamylase và α -glucosidase phân giải tinh bột [13].



Hình 2. Khả năng sinh amylase của các chủng vi nấm. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% tinh bột; (B) Kích thước vòng phân giải.



Hình 3. Khả năng sinh protease của các chủng vi nấm. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% sữa gầy; (B) Kích thước vòng phân giải.



Hình 4. Khả năng sinh cellulase của các chủng nấm. (A) Vòng phân giải trên môi trường chứa 1% CMC; (B) Kích thước vòng phân giải.

3.2.2. Khả năng sinh protease

Protease từ vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất chất tẩy rửa, thực phẩm và y tế [14, 15]. Khả năng sinh protease của các chủng vi nấm được xác định dựa trên khả năng phân giải cơ chất sữa gầy. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryza* NOS1 là 2 chủng nấm men và nấm mốc cho khả năng sinh protease cao với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 27,2 và 12 mm (hình 3). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của C. Li và cs (2014) [16], protease từ chủng nấm *A. oryzae* HG76

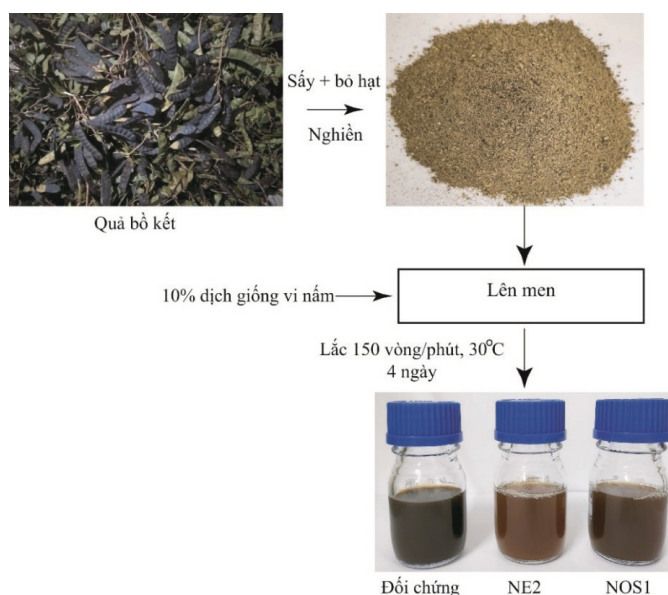
có tính axit được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, đồ uống và dược phẩm.

3.2.3. Khả năng sinh cellulase

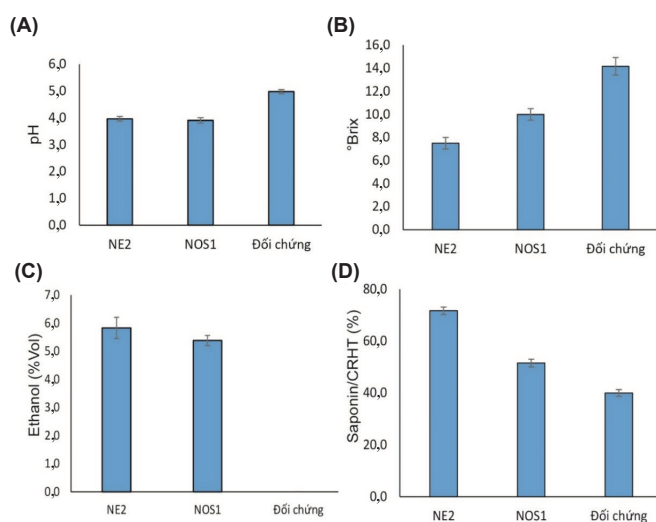
Với mục đích tuyển chọn các chủng vi nấm có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao ứng dụng trong lên men quả bỏ kết nên chúng tôi đánh giá khả năng sinh cellulase của các chủng dựa trên việc xác định đường kính vòng phân giải cơ chất CMC. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *S. cerevisiae* NE2 có khả năng sinh cellulase mạnh nhất trong 4 chủng nấm men nghiên cứu, đường kính vòng phân giải cơ chất CMC đạt trung bình 24,2 mm (có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Trong khi đó, chủng *A. oryzae* NOS1 có khả năng sinh enzyme cellulase mạnh hơn chủng NO42 (hình 4). Chủng *A. oryzae* được xác định là loài nấm an toàn và được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất nhiều loại enzyme [17]. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi nấm chủ yếu được sử dụng để hỗ trợ quá trình lên men các sản phẩm truyền thống như lên men rượu, đồ uống [12, 16, 18]. Tuy nhiên, việc sử dụng enzyme ngoại bào để lên men quả bỏ kết hiện chưa có nghiên cứu. Với kết quả nghiên cứu đạt được về khả năng sinh amylase, protease và cellulase của các chủng vi nấm, nghiên cứu này đã lựa chọn được chủng *S. cerevisiae* NE2 và chủng *A. oryzae* NOS1 đại diện cho nhóm nấm men và nấm mốc để tiến hành nghiên cứu lên men quả bỏ kết.

3.3. Đánh giá khả năng lên men quả bỏ kết của chủng vi nấm tuyển chọn

Quả bỏ kết được tiến hành lên men trong 4 ngày ở 30°C với sự tham gia của chủng vi nấm *S. cerevisiae* NE2 và chủng *A. oryzae* NOS1. Dịch sau lên men được ly tâm 8.000 vòng/phút. Kết quả bước đầu đánh giá cảm quan dịch lên men cho thấy, dịch lên men sử dụng chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryzae* NOS1 đều trong hơn và có màu nâu sáng hơn so với dịch lên men ở thí nghiệm đối chứng. Dịch lên men sử dụng chủng *S. cerevisiae* NE2 cho màu nâu sáng hơn dịch lên men sử dụng chủng *A. oryzae* NOS1 (hình 5).



Hình 5. Quy trình lên men chiết xuất saponin từ quả bồ kết.



Hình 6. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu pH, °Brix, ethanol và saponin/chất rắn hòa tan của dịch lên men quả bồ kết. (A) pH; (B) °Brix; (C) Ethanol; (D) Saponin/chất rắn hòa tan.

Trong nghiên cứu này, dịch lên men sau ly tâm cũng được xác định các chỉ tiêu pH, °Brix, ethanol và saponin/chất rắn hòa tan. Kết quả nghiên cứu được trình bày tại hình 6.

Sau 4 ngày lên men sử dụng các chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryzae* NOS1, pH dịch lên men đã giảm so với đối chứng, cụ thể pH đạt 3,9-4,0 (hình 6A). Nghiên cứu của A.F. Belhaj và cs (2020) [19] cho thấy, pH ảnh hưởng lớn đến sự hấp phụ của chất hoạt động bề mặt. Ở pH thấp, chất hoạt động bề mặt thúc đẩy nhóm hydroxyl thu được điện tích dương làm tăng khả năng hấp phụ, đây là yếu tố quan trọng trong sản xuất các sản phẩm làm sạch [19]. Vì vậy, việc sử dụng các chủng vi nấm giúp làm giảm pH trong dịch

lên men, tạo điều kiện thuận lợi cho các chất hoạt động bề mặt, giúp tăng khả năng làm sạch của dịch quả bồ kết sau lên men.

Kết quả phân tích hàm lượng đường (thể hiện qua °Brix) trong dịch sau lên men với chủng *S. cerevisiae* NE2 và chủng *A. oryzae* NOS1 giảm mạnh sau 4 ngày nuôi cấy so với đối chứng (tương ứng đạt 7,5°Brix, 10°Brix và 14,2°Brix) (hình 6B). Kết quả này có thể được giải thích là do chủng *S. cerevisiae* NE2 và chủng *A. oryzae* NOS1 đã sử dụng các nguồn đường trong quá trình sinh trưởng và giúp cho sản phẩm lên men trong hơn. Đồng thời, sản phẩm phụ của quá trình lên men là ethanol dao động 5,4-5,8%Vol, còn ở mẫu đối chứng không phát hiện có sự thay đổi (hình 6C), đây là mức nồng độ chấp nhận được với các sản phẩm tẩy rửa [6].

Chỉ tiêu saponin/chất rắn hòa tan (hình 6D) của dịch lên men sử dụng chủng vi nấm NE2 và NOS1 tương ứng đạt 71,7 và 51,5%, trong khi ở mẫu đối chứng là 40,0% (sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$). Như vậy, việc sử dụng 2 chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryzae* NOS1 giúp tăng lượng saponin/chất rắn hòa tan trong dịch lên men. Đặc biệt, việc sử dụng chủng *S. cerevisiae* NE2 giúp nâng cao rõ rệt chất lượng sản phẩm sau lên men. Kết quả này có thể là do *Saccharomyces* có khả năng sử dụng nguồn tinh bột và protein trong quá trình lên men từ đó làm tăng chất lượng sản phẩm sau lên men [8].

Một số các nghiên cứu tương tự đã được công bố như W. Heng và cs (2015) [6] đã sử dụng chủng *S. cerevisiae* AnQi BV818 trong lên men quả bồ hòn giúp tăng lượng saponin/chất rắn hòa tan từ 45,7 lên 75,5% và nồng độ ethanol tạo thành là 5,33%, hay như nghiên cứu của X.T. Le và cs (2023) [8] đã sử dụng *S. cerevisiae* lên men dịch chiết quả bồ hòn để loại bỏ tạp chất và nâng cao tính cảm quan của dịch lên men, độ đục giảm 75,6%, cải thiện rõ rệt màu sắc từ nâu sẫm thành nâu vàng. M.P. Wei và cs (2021) [7] cũng đã sử dụng nấm mốc *A. oryzae* trong lên men quả bồ hòn giúp tăng chất lượng sản phẩm sau lên men. Tuy nhiên, hiện hầu như chưa thấy có công bố nào về sử dụng các chủng vi nấm trong lên men quả bồ kết.

Những kết quả đạt được trong nghiên cứu này cho thấy, các chủng *S. cerevisiae* và *A. oryzae* trong nghiên cứu hoàn toàn có khả năng ứng dụng trong lên men quả bồ kết. Trong đó, chủng *S. cerevisiae* NE2 cho hiệu quả tốt nhất trong việc nâng cao chất lượng sản phẩm sau lên men quả bồ kết với chỉ tiêu saponin/chất rắn hòa tan đạt 71,7%, tạo nguồn nguyên liệu chất lượng cao cho việc tiếp tục phát triển các sản phẩm mỹ phẩm và gia dụng làm sạch khác.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã đánh giá được khả năng sinh amylase, protease và cellulase của 4 chủng nấm men *S. cerevisiae* (NE1, NE2, NE10 và NE13) và 2 chủng nấm mốc *A. oryzae* (NOS1 và NOS2), trong đó 2 chủng *S. cerevisiae* NE2 và *A. oryzae* NOS1 có khả năng sinh enzyme ngoại bào tốt nhất được xác định có khả năng lên men quả bồ kết. Đặc biệt, việc sử dụng chủng *S. cerevisiae* NE2 đã giúp nâng cao chất lượng sản phẩm sau lên men rõ rệt. Sản phẩm sau lên men có chỉ tiêu saponin/chất rắn hòa tan đạt 71,7% và là nguồn nguyên liệu cung cấp saponin - chất hoạt động bề mặt cho phát triển các sản phẩm mỹ phẩm và sản phẩm làm sạch.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp Bộ năm 2024-2025: “Nghiên cứu công nghệ lên men thảo dược giàu saponin ứng dụng trong sản xuất chất tẩy rửa sinh học” của Viện Ứng dụng Công nghệ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D.N. Do, T.T. Dang, Q.T. Le, et al. (2019), “Extraction of saponin from gleditsia peel and applications on natural dishwashing liquid detergent”, *Materials Today: Proceedings*, **18(7)**, pp.5219-5230, DOI: 10.1016/j.matpr.2019.07.522.

[2] J.P. Zhang, X.H. Tian, Y.X. Yang, et al. (2016), “*Gleditsia* species: An ethnomedical, phytochemical and pharmacological review”, *Journal of Ethnopharmacology*, **178**, pp.155-171, DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.044.

[3] D.O. Saleh, I. Kassem, F.R. Melek (2016), “Analgesic activity of *Gleditsia triacanthos* methanolic fruit extract and its saponin-containing fraction”, *Pharmaceutical Biology*, **54(4)**, pp.576-580, DOI: 10.3109/13880209.2015.1064450.

[4] F.R. Melek, F.A. Aly, I.A.A. Kassem, et al. (2015), “Three further triterpenoid saponins from *Gleditsia caspica* fruits and protective effect of the total saponin fraction on cyclophosphamide-induced genotoxicity in mice”, *Zeitschrift Für Naturforschung C*, **70(1-2)**, pp.31-37, DOI: 10.1515/znc-2014-4132.

[5] V. Capozzi, M. Fragasso, R. Romaniello, et al. (2017), “Spontaneous food fermentations and potential risks for human health”, *Fermentation*, **3(4)**, DOI: 10.3390/fermentation3040049.

[6] W. Heng, Z. Ling, W. Na, et al. (2015), “Extraction and fermentation-based purification of saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn”, *Journal of Surfactants and Detergents*, **18(3)**, pp.429-438, DOI: 10.1007/s11743-015-1668-8.

[7] M.P. Wei, J.D. Qiu, L. Li, et al. (2021), “Saponin fraction from *Sapindus mukorossi* Gaertn as a novel cosmetic additive: Extraction, biological evaluation, analysis of anti-acne mechanism and toxicity prediction”, *Journal of Ethnopharmacology*, **268**, DOI: 10.1016/j.jep.2020.113552.

[8] X.T. Le, T.A.T. Tran, K.T. Phuong, et al. (2023), “Improvement in extraction and sensory properties of soapnut extract by fermentation”, *Polish Journal of Chemical Technology*, **25(2)**, pp.1-7, DOI: 10.2478/pjct-2023-0010.

[9] S. Hiai, H. Oura, T. Nakajima (1976), “Color reaction of some saponins and saponins with vanillin and sulfuric acid”, *Planta Medica*, **29(2)**, pp.116-122, DOI: 10.1055/s-0028-1097639.

[10] P. Yang, H. Zhang, L. Cao, et al. (2016), “Construction of *Aspergillus niger* integrated with cellulase gene from *Ampullaria gigas* Spix for improved enzyme production and saccharification of alkaline-pretreated rice straw”, *3 Biotech*, **6**, pp.1-10, DOI: 10.1007/s13205-016-0545-0.

[11] D.T. Loi (2004), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Medical Publishing House, 1268pp (in Vietnamese).

[12] E.F. Vieira, C.M. Delerue (2020), “Exploitation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes in food processing and preparation of nutraceuticals and pharmaceuticals”, *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries*, **11**, pp.41-62, DOI: 10.1007/978-981-15-1710-5_2.

[13] T. Matsuzawa (2024), “Plant polysaccharide degradation-related enzymes in *Aspergillus oryzae*”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **88(3)**, pp.276-282, DOI: 10.1093/bbb/zbad177.

[14] A. Razzaq, S. Shamsi, A. Ali, et al. (2019), “Microbial proteases applications”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **7**, DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110.

[15] A.D. Varia, V.Y. Shukla, D.R. Tipre, et al. (2019), “Alkaline protease - A versatile enzyme”, *International Journal of Research and Analytical Reviews*, **6(2)**, pp.208-217.

[16] C. Li, D. Xu, M. Zhao, et al. (2014), “Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae*, and *Aspergillus niger*”, *European Food Research and Technology*, **238**, pp.905-917, DOI: 10.1007/s00217-014-2172-5.

[17] Z. Sun, Y. Wu, S. Long, et al. (2024), “*Aspergillus oryzae* as a cell factory: Research and applications in industrial production”, *Journal of Fungi*, **10(4)**, DOI: 10.3390/jof10040248.

[18] Y.L. Yamane, J. Fujita, S. Izuwa, et al. (2002), “Properties of cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus oryzae* and their contribution to material utilization and alcohol yield in sake mash fermentation”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **93(5)**, pp.479-484, DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80095-0.

[19] A.F. Belhaj, K.A. Elraies, S.M. Mahmood, et al. (2020), “The effect of surfactant concentration, salinity, temperature, and pH on surfactant adsorption for chemical enhanced oil recovery: A review”, *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, **10**, pp.125-137, DOI: 10.1007/s13202-019-0685-y.

Đánh giá khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên

Chu Thanh Bình^{1*}, Nguyễn Việt Hà^{2,3}, Nguyễn Hữu Thắng^{2,3}, Đào Ngọc Ánh², Trần Bảo Trâm²

¹Viện Y học Dự phòng Quân đội, 21 Trung Liệt, phường Trung Liệt, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa 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 30/7/2024; ngày chuyển phân biện 2/8/2024; ngày nhận phân biện 16/8/2024; ngày chấp nhận đăng 19/8/2024

Tóm tắt:

Xạ khuẩn *Streptomyces* được đánh giá có hoạt tính kháng nhiều loài vi nấm gây bệnh cây trồng. Các loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* thường được ứng dụng tạo chế phẩm sinh học dùng kiểm soát bệnh hại trong nông nghiệp. Trong bài báo này, từ 6 chủng xạ khuẩn phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên đã lựa chọn được chủng xạ khuẩn XKH6 có hoạt tính kháng đồng thời 5 loài nấm bệnh thực vật gồm *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* và *Aspergillus flavus*. Đặc biệt, dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 kiểm soát 100% khả năng gây bệnh của 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger* khi lây nhiễm nhân tạo trên quả cam và táo. Chủng XKH6 được định danh thuộc loài *Streptomyces murinus* dựa vào đặc điểm về hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA. XKH6 có độ tương đồng là 100% khi so sánh trên GenBank. Chủng *S. murinus* XKH6 có triển vọng trong phát triển chế phẩm vi sinh kiểm soát *P. digitatum*, *A. niger*, *C. gloeosporioides* gây bệnh cây trồng.

Từ khóa: *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, đối kháng, *P. digitatum*, *Streptomyces murinus*, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Assessment of the antifungal activity against plant pathogens of the *Streptomyces murinus* XKH6 strain isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province

Thanh Binh Chu^{1*}, Viet Ha Nguyen^{2,3}, Huu Thang Nguyen^{2,3}, Ngoc Anh Dao², Bao Tram Tran²

¹Military Institute of Preventive Medicine, 21 Trung Liet Street, Trung Liet Ward, Dong Da District, Hanoi, Vietnam

²Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trãi Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 30 July 2024; revised 16 August 2024; accepted 19 August 2024

Abstract:

Streptomyces are evaluated to have strong antagonistic abilities against many species of plant pathogenic fungi. Species of the *Streptomyces* genus are commonly applied in the creation of biological products used in the control of agricultural diseases. In this article, from 6 actinomycete strains isolated from turmeric-growing soil in Hung Yen province, the XKH6 strain was selected for its simultaneous antifungal activity against five plant pathogenic fungi: *Penicillium digitatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, and *Aspergillus flavus*. Notably, the broth cultures of the XKH6 strain 100% effectively controlled the *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, and *A. niger* on artificial infection of orange and apple. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the XKH6 strain was identified as belonging to the species *Streptomyces murinus*. XKH6 has 100% similarity with *S. murinus* on GenBank. The *S. murinus* XKH6 strain has the potential for application in the development of biological products for the control of the *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, and *A. niger* that cause crop diseases.

Keywords: actinomycete, antagonistic, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *P. digitatum*, *Streptomyces murinus*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

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

1. Đặt vấn đề

Nấm là một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng ở thực vật. Bào tử các loài nấm bệnh thường được phát tán nhờ gió, nước hoặc côn trùng, sau đó bám vào bề mặt của cây. Khi điều kiện thuận lợi, chu kỳ lây nhiễm của nấm gây bệnh thực vật bắt đầu bằng sự nảy mầm của bào tử và hình thành hệ sợi nấm. Hệ sợi nấm phát triển dọc theo bề mặt cây chủ, chúng tiết enzyme phá hủy cấu trúc tế bào thực vật và xâm nhiễm gây ra các triệu chứng bệnh khác nhau [1]. Nhiều loài nấm đã được ghi nhận là tác nhân gây bệnh nghiêm trọng trên các loại cây trồng khác nhau. Trên cây có múi, *Penicillium digitatum* và *Colletotrichum gloeosporioides* là hai loài nấm gây bệnh phổ biến. *P. digitatum* là loài nấm gây bệnh mốc xanh và thối rụng quả trên cây có múi. Nấm *Colletotrichum* cũng được ghi nhận là tác nhân gây khô cành, khô cuống quả, thối cuống quả gây rụng quả trên cây có múi [2, 3]. *Aspergillus niger* là một trong số các nguyên nhân phổ biến gây thối hồng táo ở cả hai giai đoạn trước và sau thu hoạch, gây tổn thất lớn về kinh tế [4, 5]. *Aspergillus flavus* là loài nấm gây mốc hồng nông sản phổ biến, chúng có khả năng sinh độc tố aflatoxin gây ung thư [6]. *Fusarium oxysporum* là tác nhân gây bệnh héo rũ trên nhiều loài thực vật, loài nấm này thường xâm nhiễm vào rễ cây trồng [7]...

Nhằm kiểm soát các nấm bệnh gây hại thực vật, nông dân thường sử dụng các loại thuốc hóa học. Tuy nhiên, việc lạm dụng các loại thuốc bảo vệ thực vật hóa học có thể gây ra một số hệ quả trong nông nghiệp, tác động xấu tới môi trường và đặc biệt tạo ra nhiều nguy cơ tiềm ẩn về sức khỏe cho con người. Do vậy, việc phát triển các chế phẩm sinh học dùng trong kiểm soát bệnh hại trên cây trồng nhằm hướng tới nền nông nghiệp xanh đang được quan tâm nghiên cứu. Nhiều loài xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* được sử dụng trong kiểm soát sinh học đối với các loại nấm bệnh trong nông nghiệp. Các loài xạ khuẩn này có khả năng tiết các chất chuyển hóa thứ cấp như kháng sinh hay một số độc tố có hoạt tính ức chế sinh trưởng, ngăn chặn hoặc tiêu diệt các loài vi sinh vật khác [8]. Đây là cơ chế chính trong việc kiểm soát các loài vi nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn *Streptomyces*. Việc tìm kiếm các chủng xạ khuẩn có khả năng kiểm soát các loài vi nấm gây bệnh thực vật phục vụ nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học là cần thiết. Các kết quả bước đầu của nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ trong kiểm soát nhiều loài vi nấm gây bệnh trên thực vật, đặc biệt với một số vi nấm gây hỏng quả sau thu hoạch.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng (*Curcuma longa*) sinh trưởng tốt, trồng tại huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên được thu thập sử dụng để phân lập các chủng xạ khuẩn.

Chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201, *A. niger* N402, *F. oxysporum* SH01, *A. flavus* NRRL3357 gây bệnh trên thực vật, được cung cấp bởi Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

Quả cam V2 (Việt Nam) và táo Gala (Canada) được mua tại một siêu thị ở Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập xạ khuẩn từ mẫu đất thu thập

Mẫu đất được thu cách mặt đất 10-15 cm và lấy khoảng 100 g đất xung quanh vùng rễ của các cây nghệ khỏe mạnh, phát triển tốt. Mẫu đất được bảo quản trong túi nilon vô trùng, ghi đầy đủ các thông tin về mẫu. 10 g đất được đưa vào bình tam giác đựng 90 ml nước cất vô trùng, lắc 250 vòng/phút trong 1-2 giờ thu được dịch 10⁻¹, dịch tiếp tục được pha loãng đến nồng độ 10⁻⁵. Các mẫu dịch pha loãng được cấy trên môi trường ISP4 có bổ sung cyclohexamide và nystatin (60 µg/ml) để ức chế vi khuẩn gram âm và nấm. Các đĩa được nuôi ở 26-28°C trong thời gian 5-7 ngày [9]. Các khuẩn lạc xạ khuẩn xuất hiện được thuần khiết để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp thu bào tử nấm gây bệnh thực vật

Các chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201, *A. niger* N402, *F. oxysporum* SH01, *A. flavus* NRRL3357 được nuôi cấy trên môi trường Potato dextrose agar (PDA) trong 5 ngày ở 25-28°C để tiến hành thu dịch bào tử theo quy trình của K.T. Nguyen và cs (2016) [10]. Mật độ bào tử được xác định trên buồng đếm Thoma và sau đó được pha loãng về 10⁶ bào tử/ml để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.3. Xác định hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn phân lập bằng phương pháp đặt thời thạch và khuếch tán trên đĩa thạch

Để sàng lọc nhanh các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm bệnh, các thời thạch xạ khuẩn (đường kính 9 mm, xạ khuẩn được nuôi trên môi trường ISP4 trong 3 ngày) được đặt trên bề mặt đĩa môi trường PDA đã cấy trái 50 µl dịch bào tử nấm (10⁶ bào tử/ml). Các đĩa thử được ủ ở nhiệt độ 25-28°C (nhiệt độ mà chủng nấm bệnh sinh trưởng tốt) trong 3-5 ngày. Đường kính vòng kháng nấm = D - d; trong đó: D là đường kính vòng kháng (vòng không có nấm sinh trưởng); d là đường kính thời thạch [11].

Để xác định khả năng kháng nấm bệnh của dịch nuôi xạ khuẩn, chủng xạ khuẩn đã lựa chọn được nuôi lắc trong môi trường MT2, lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Dịch nuôi sau 7 ngày được tiến hành ly tâm 12000 vòng/phút (10 phút), loại bỏ sinh khối và thu phần dịch trong (dịch thu được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm bệnh trên mô hình lây nhiễm nấm bệnh nhân tạo cho quả và khuếch tán trên thạch). 50 µl dịch sau ly tâm được bổ sung vào mỗi giếng trên đĩa môi trường PDA đã cấy 50 µl dịch bào tử nấm (10⁶ bào tử/ml).

Khả năng kháng nấm được xác định sau 5 ngày ủ ở 25-28°C. Đường kính vòng kháng nấm = D - d trong đó: D là đường kính vòng kháng (vòng không có nấm sinh trưởng); d là đường kính giếng thạch [11].

2.2.4. *Xác định khả năng kiểm soát P. digitatum, C. gloeosporioides gây bệnh trên quả cam và A. niger gây bệnh trên quả táo của dịch nuôi chủng xạ khuẩn tuyển chọn*

Quá trình đánh giá khả năng kiểm soát nấm bệnh trên mô hình quả được tiến hành theo T.X. Vu và cs (2023) [2]. Quả cam và táo được làm sạch bằng nước cất vô trùng và ethanol 70%, sau đó để khô tự nhiên trong vòng 2-3 giờ ở nhiệt độ phòng. Cam và táo được tạo vết thương xâm nhiễm bằng tăm nhọn vô trùng (vết thương xâm nhiễm có kích thước dài 10 mm và sâu 2 mm). Chủng nấm *P. digitatum* PdVN1, *C. gloeosporioides* HGC201 được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm trên cam, *A. niger* N402 được sử dụng cho thí nghiệm lây nhiễm trên táo. Thí nghiệm được chia làm 2 nhóm: nhóm lây nhiễm nấm và nhóm không lây nhiễm nấm. Trong mỗi nhóm có 3 lô thí nghiệm: ở lô thí nghiệm 1, quả được ngâm trong nước cất vô trùng; lô thí nghiệm 2, quả được ngâm trong dịch nuôi xạ khuẩn và lô thí nghiệm 3, quả được ngâm trong mancozeb 0,25% trong 30 phút và để khô tự nhiên. Nhóm lây nhiễm nấm: các vết thương đã tạo trên vỏ quả được nhiễm 10 µl dịch bào tử nấm bệnh (nồng độ 10⁶ bào tử/ml). Thí nghiệm được bố trí trong hộp kín vô trùng ở 25°C. Quan sát, chụp ảnh và xác định tỷ lệ quả bị thối hỏng hoặc không thối hỏng ở các lô thí nghiệm để đánh giá khả năng kháng nấm của dịch nuôi xạ khuẩn sau 5-7 ngày. Mỗi lô thí nghiệm gồm 10 quả và lặp lại 3 lần.

2.2.5. Phương pháp định danh chủng XKH6

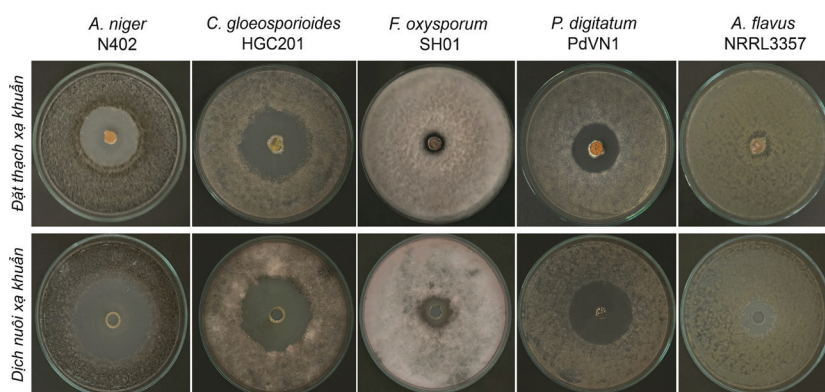
Chủng XKH6 được xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên đĩa môi trường ISP4. Đặc điểm hệ sợi được xác định bằng cách đặt lamên nghiêng một góc 45° với bề mặt môi trường và vuông góc với đường cấy, sau 5 ngày ở nhiệt độ 26-28°C, lamên được quan sát dưới kính hiển vi. Ngoài các đặc điểm hình thái, chủng xạ khuẩn XKH6 được định danh dựa trên trình tự 16S rRNA. Chủng XKH6 được tách chiết DNA theo quy trình của V.T. Tran và cs (2017) [12]. Mẫu DNA được sử dụng để khuếch đại trình tự 16S rRNA của chủng XKH6 bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho trình tự 16S rRNA là fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/rP1 (5'-ACGGTTACCTTGTTACG ACTT-3') [13]. Sản phẩm sau xét nghiệm sinh học phân tử (PCR) được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose (0,7%) và tiến hành tinh sạch bằng bộ kit của hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE. Phân tích và so sánh trình tự gen thu được với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank và xây dựng cây phát sinh loài sử dụng chương trình MEGA6 [14].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật

Nghiên cứu đã tiến hành thu thập các mẫu đất vùng rễ cây nghệ vàng sinh trưởng tốt trồng tại Khoái Châu, Hưng Yên và từ đó đã phân lập được 6 chủng xạ khuẩn. Khảo sát hoạt tính kháng nấm *A. niger*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* và *A. flavus* bằng phương pháp đặt thoi thạch cho thấy, chủng XKH6 có khả năng kháng cả 5 loài nấm bệnh nghiên cứu với kích thước vòng kháng trung bình đạt tương ứng là 30, 33, 4, 20, 5 mm. Hơn nữa, dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6 trên môi trường MT2 sau 7 ngày cũng thể hiện hoạt tính kháng cả 5 loài nấm bệnh, trong đó thể hiện hoạt tính kháng mạnh nhất đối với nấm bệnh *A. niger*, *C. gloeosporioides* và *P. digitatum* với kích thước vòng kháng trung bình đạt tương ứng là 40, 35, 30 mm (hình 1).

Việc tìm kiếm, đánh giá khả năng kháng nấm bệnh trên cây trồng của các chủng xạ khuẩn nhằm phát triển các biện pháp hiệu quả trong kiểm soát bệnh hại nông nghiệp luôn được các nhóm nghiên cứu trên thế giới cũng như ở Việt Nam quan tâm. Nhóm nghiên cứu của X.F. Li và cs (2020) [15] đã xác định được khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của các chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ cây mướp đắng *Momordica charantia* trồng tại Trung Quốc. Việc ứng dụng chủng xạ khuẩn này đã thúc đẩy sự tăng trưởng và phát triển của rễ và thân, đồng thời cải thiện năng suất mướp đắng ngoài đồng ruộng [15]. W. Shen và cs (2024) [16] đã tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. graminearum* STR-1 từ đất vùng rễ cây lúa có khả năng kháng đồng thời các vi nấm gây bệnh thực vật *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *F. graminearum*, *Ustilaginoidea virens* và *Bipolaris maydis*. B.T. Tran và cs (2021) [11] đã phân lập, tuyển chọn được chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 từ đất vùng rễ cây cam có hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* và *C. gloeosporioides* gây bệnh thối rụng quả trên cây cam. Chủng xạ khuẩn *S. albulus* XK1 được đánh giá tiềm năng cho phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát vi nấm gây bệnh thối rụng quả trên cây có múi [11]. Như vậy, kết quả đánh giá sơ bộ cho thấy, chủng XKH6 kháng mạnh 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger*, đây là căn cứ khoa học quan trọng để định hướng ứng dụng



Hình 1. Khả năng kháng một số vi nấm gây bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn XKH6.

chủng xạ khuẩn XKH6 trong nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ nấm bệnh hại cây trồng.

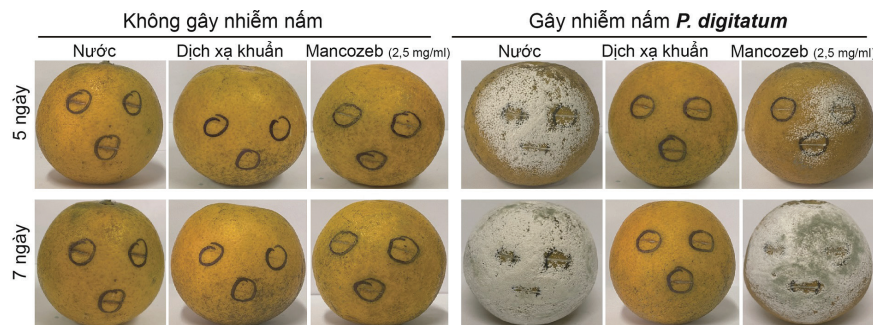
3.2. Khả năng kiểm soát nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* gây bệnh trên cam và nấm *A. niger* gây bệnh trên táo của dịch nuôi chủng xạ khuẩn XKH6

Nấm *P. digitatum* đã được nhiều nghiên cứu ghi nhận là nguyên nhân gây bệnh thối mốc xanh, nấm *C. gloeosporioides* là tác nhân gây thối cuống quả gây rụng quả trên cây có múi [2]; *A. niger* là một trong số các loài nấm gây thối hồng táo ở cả hai giai đoạn trước và sau thu hoạch [4, 5]. Dịch nuôi sau ly tâm của chủng XKH6 có hoạt tính kháng với *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* khi thử nghiệm trên môi trường thạch PDA. Việc đánh giá hoạt tính kháng các loài nấm này trên quả là rất cần thiết để định hướng sử dụng chủng XKH6 để tạo chế phẩm phòng trừ bệnh do 3 loài vi nấm trên gây ra trên nông sản.

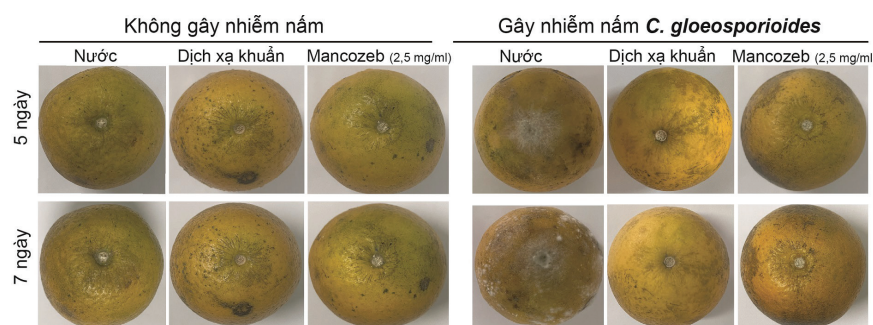
Nghiên cứu tiến hành đánh giá khả năng kiểm soát *P. digitatum* gây thối mốc xanh trên quả cam của dịch nuôi cấy chủng XKH6. Sau 5-7 ngày, ở nhóm thí nghiệm không lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum* cho thấy, cam được ngâm với nước cất, dịch nuôi cấy chủng XKH6 và dung dịch Mancozeb (2,5 mg/ml) không xuất hiện hiện tượng mốc (100% số cam thử nghiệm không xuất hiện nấm mốc gây hỏng thối quả). Như vậy, nước cất, dịch nuôi cấy chủng XKH6 và dung dịch Mancozeb không làm ảnh hưởng tới cam. Ở nhóm thí nghiệm có lây nhiễm bào tử nấm *P. digitatum*, 100% số cam được ngâm với nước cất đã xuất hiện thối mốc sau 5 ngày và sau 7 ngày toàn bộ bề mặt cam đã bị thối mốc. Ở mẫu cam ngâm với dung dịch Mancozeb (2,5 mg/ml) và có lây nhiễm nấm *P. digitatum*, cam cũng đã xuất hiện hiện tượng thối mốc, tuy nhiên quá trình thối mốc chậm hơn so với mẫu cam xử lý với nước cất. Mancozeb là thuốc hóa học diệt nấm hại trong nông nghiệp, loại thuốc này đã có những nghiên cứu ghi nhận những ảnh hưởng nhất định tới sức khỏe con người [17]. Trong khi đó, cam được ngâm với dịch nuôi cấy chủng XKH6 không bị thối mốc (100% số cam thử nghiệm đều không bị thối mốc) (hình 2). Từ đó cho thấy, dịch nuôi cấy chủng XKH6 có khả năng kiểm soát hiệu quả sự gây bệnh của nấm *P. digitatum* trên cam sau thu hoạch.

Tương tự, khi đánh giá khả năng kiểm soát nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thối cuống quả cam cho thấy, dịch nuôi cấy chủng XKH6 có khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *C. gloeosporioides*. Sau 5-7 ngày gây nhiễm nấm *C. gloeosporioides* trên lô quả cam được xử lý với dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 và dung dịch Mancozeb không thấy xuất hiện triệu chứng bệnh cũng như sự sinh trưởng của nấm *C. gloeosporioides*. Trong khi đó sau 5-7 ngày, 100% số quả cam tại lô xử lý với nước cất, nấm *C. gloeosporioides* đã sinh trưởng gây thối từ phần cuống quả và lan rộng vị trí thối trên quả (hình 3). Dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 hoàn toàn có thể thay thế thuốc diệt nấm hóa học Mancozeb trong kiểm soát nấm *C. gloeosporioides*.

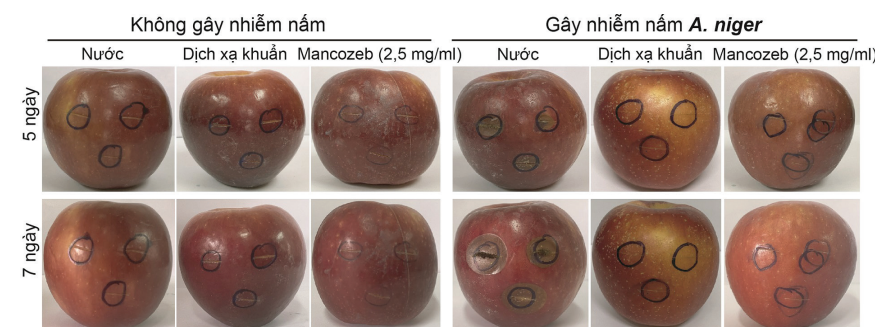
Dịch nuôi cấy chủng XKH6 cũng thể hiện khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *A. niger* gây bệnh thối hồng táo. Ở lô thí nghiệm lây nhiễm nấm *A. niger*, táo được ngâm với dịch nuôi cấy chủng XKH6 không bị thối hồng do nấm *A. niger* gây ra (100% số quả táo thử nghiệm không xuất hiện vết thối) (hình 4). Khả năng kiểm soát hiệu quả các loài nấm



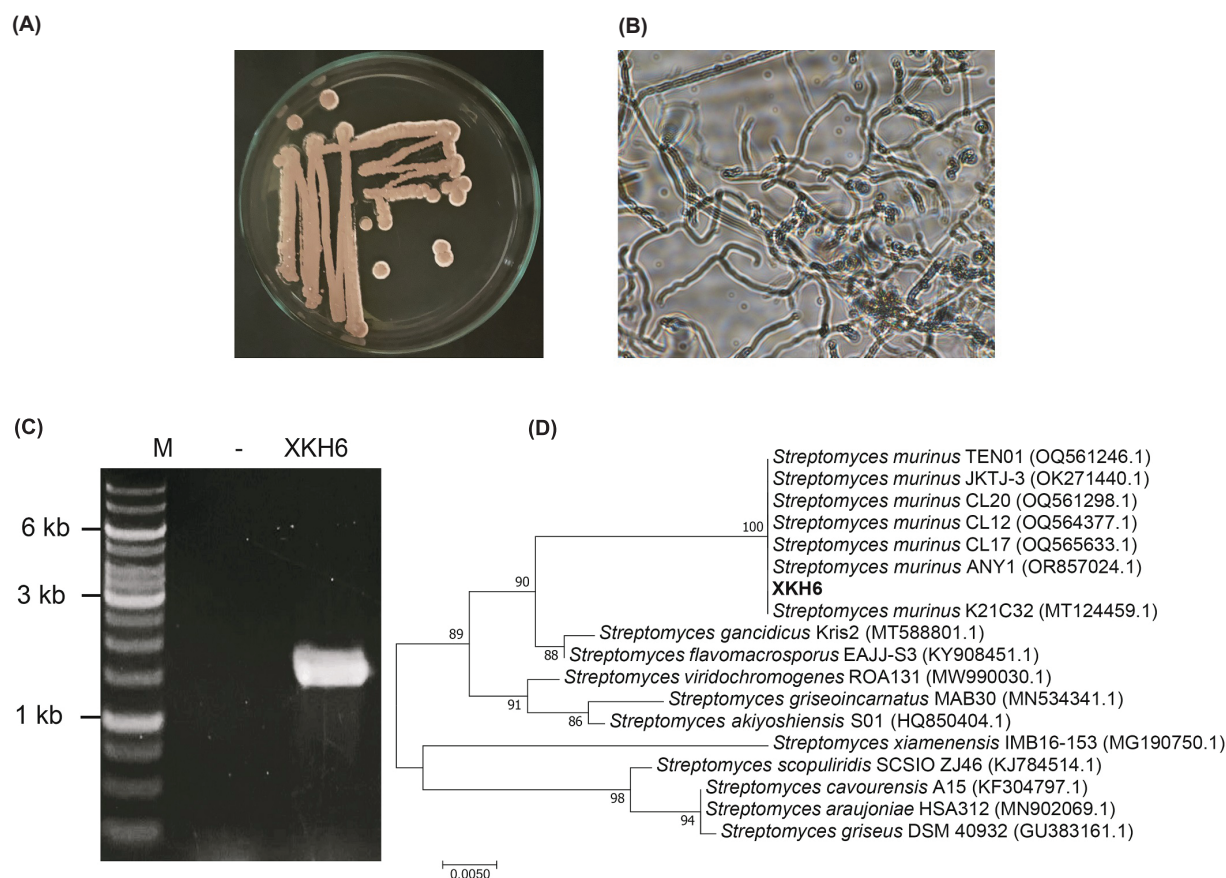
Hình 2. Hoạt tính kháng nấm *P. digitatum* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả cam.



Hình 3. Hoạt tính kháng nấm *C. gloeosporioides* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả cam.



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm *A. niger* của dịch nuôi chủng XKH6 trên quả táo.



Hình 5. Định danh chủng XKH6. (A) Hình thái khuẩn lạc trên môi trường ISP4; (B) Khuẩn ty và cấu trúc sinh bào tử; (C) Kết quả điện di sản phẩm PCR; (D) Cây phát sinh chủng loại; M: marker (1 kb).

bệnh *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* có thể do chủng xạ khuẩn XKH6 đã sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp như kháng sinh, một số độc tố... có khả năng diệt nấm [8]. Việc sử dụng xạ khuẩn để phòng trừ vi nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* gây bệnh trên cây trồng tại Việt Nam chưa có nhiều. Trong khi đó, các loài nấm này là tác nhân gây bệnh cây trồng rất phổ biến. Với các kết quả thu được về khả năng kiểm soát hiệu quả nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides* và *A. niger* trên môi trường thạch và trên mô hình quả của dịch nuôi XKH6 cho thấy, chủng XKH6 có tiềm năng để tạo chế phẩm phòng trừ nấm bệnh thực vật.

3.3. Định danh chủng XKH6

Để có thể sử dụng chủng xạ khuẩn XKH6 trong sản xuất chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp thì việc định danh chính xác chủng XKH6 là cần thiết. Trên môi trường ISP4, chủng XKH6 hình thành khuẩn lạc lồi, đường kính khuẩn lạc từ 3-3,5 mm (sau 3-5 ngày), khuẩn lạc có các nếp nhăn, từ màu trắng chuyển sang màu nâu... Khi quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi, chủng XKH6 hình thành khuẩn ty cơ chất phân nhánh. Khuẩn ty khí sinh hình thành cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử dạng lượn sóng (hình 5A). Đây là những đặc điểm điển hình của chi xạ khuẩn *Streptomyces* [18].

Kết quả PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA của chủng XKH6 sử dụng cặp môi fD1/rP1 cho một băng DNA duy nhất (khoảng 1500 bp) (hình 5C). Sản phẩm sau PCR được tinh sạch, giải trình tự, so sánh với dữ liệu trên GenBank và sử dụng phần mềm MEGA6 để xây dựng cây phát sinh loài cho thấy, chủng XKH6 được định danh là *Streptomyces murinus* XKH6 (trình tự 16S rRNA có độ tương đồng là 99,9%) (hình 5D).

Xạ khuẩn *S. murinus* đã được ghi nhận có khả năng kháng nhiều loài nấm bệnh thực vật. B. Dhillon và cs (2023) [19] đã giải và phân tích trình tự toàn bộ hệ gen của loài xạ khuẩn *S. murinus*. Bộ gen được xác định có kích thước 8,3 Mb, với hàm lượng GC 71,96% và chứa 37 cụm chất chuyển hóa thứ cấp (SMC). Trong các chất chuyển hóa thứ cấp, nghiên cứu đã xác định chủng *S. murinus* sinh chất kháng nấm pentamycin (fungichromin) và do sự quy định của gen SPC1 [19]. M. Ge và cs (2023) [20] đã cho thấy tiềm năng của loài xạ khuẩn *S. murinus* trong phát triển chế phẩm kiểm soát nấm *Pythium aphanidermatum* gây bệnh hại dưa hấu. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về loài xạ khuẩn *S. murinus* không có nhiều. T.T.T. Nguyen và cs (2022) [21] đã phân lập và tuyển chọn được chủng *S. murinus* kháng nấm *C. acutatum* gây bệnh thán thư trên thanh long. Chưa ghi nhận nghiên cứu nào đề cập tới khả năng kháng nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger*, *F. oxysporum* và *A. flavus* của xạ khuẩn *S. murinus*, đặc biệt là khả năng kiểm soát nấm

P. digitatum, *C. gloeosporioides* và *A. niger* trên mô hình quả. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở quan trọng để sử dụng chủng xạ khuẩn *S. murinus* XKH6 trong sản xuất chế phẩm phòng trừ vi nấm hại cây trồng.

4. Kết luận

Chủng xạ khuẩn XKH6 được phân lập và tuyển chọn từ đất vùng rễ cây nghệ trồng ở Hưng Yên có khả năng kháng các loài nấm bệnh thực vật gồm *A. niger*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *P. digitatum* và *A. flavus* với kích thước vòng kháng nấm xác định theo phương pháp đặt thạch đạt trung bình tương ứng là 30, 33, 4, 20, 5 mm. Đặc biệt, dịch nuôi cấy chủng xạ khuẩn XKH6 có khả năng kiểm soát hoàn toàn sự gây bệnh của 3 loài nấm *P. digitatum*, *C. gloeosporioides*, *A. niger* trên mô hình lây nhiễm nấm bệnh nhân tạo ở quả cam và táo. Chủng XKH6 được định danh thuộc loài *Streptomyces murinus* dựa trên một số đặc điểm về hình thái và phân tích trình tự gen 16S rRNA. Chủng *S. murinus* XKH6 có triển vọng trong phát triển chế phẩm vi sinh dùng trong kiểm soát nấm bệnh *P. digitatum*, *A. niger*, *C. gloeosporioides* trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] G. Doehlemann, B. Ökmen, W. Zhu, et al. (2017), "Plant pathogenic fungi", *Microbiology Spectrum*, **5**(1), pp.1-23, DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016.

[2] 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), pp.1-11, DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e13663.

[3] R. Kaur, H. Rewal, A. Sethi (2007), "Pre-harvest stem-end rot in citrus cultivars due to *Colletotrichum gloeosporioides*", *European Journal of Horticultural Science*, **72**(1), pp.20-25.

[4] Y. Zheng, X. Jia, Y. Ran, et al. (2022), "Inhibition effect of *Aspergillus niger* and quality preservation of apple by in-package sterilization medium flow of circulating", *Scientia Horticulturae*, **293**, DOI: 10.1016/j.scienta.2021.110708.

[5] J.R.A. Obaidi, N. Rahmad, N.M. Hanafi (2023), "*Aspergillus niger* causing fruit rot disease on rose apple in Malaysia", *New Disease Reports*, **48**(1), pp.1-2, DOI: 10.1002/ndr2.12216.

[6] L. Antiga, S.R.L. Starza, C. Miccoli, et al. (2020), "*Aspergillus flavus* Exploits maize kernels using an "orphan" secondary metabolite cluster", *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(21), pp.1-17, DOI: 10.3390/ijms21218213.

[7] Y.C. Chen, C.L. Wong, F. Muzzi, et al. (2014), "Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance", *Scientific Reports*, **4**(1), pp.1-10, DOI: 10.1038/srep05584.

[8] M.E. Hibbing, C. Fuqua, M.R. Parsek, et al. (2010), "Bacterial competition: Surviving and thriving in the microbial jungle", *Nature Reviews Microbiology*, **8**(1), pp.15-25, DOI: 10.1038/nrmicro2259.

[9] A.K. Passari, V.K. Mishra, R. Saikia, et al. (2015), "Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential", *Frontiers in Microbiology*, **6**, pp.1-13, DOI: 10.3389/fmicb.2015.00273.

[10] K.T. 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**, pp.1-9, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.

[11] B.T. Tran, T.H. Nguyen, B.M. Tran, et al. (2021), "Studying on the antifungal activity of the actinomycete XK1 isolated from growing orange's soil against pathogenic fungi causing disease in citrus", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(5), pp.41-45, DOI: 10.31276/VJST.63(5).41-45 (in Vietnamese).

[12] 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, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66-74.

[13] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, et al. (1991), "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of Bacteriology*, **173**(2), pp.697-703, DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

[14] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, et al. (2013), "MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), pp.2725-2729, DOI: 10.1093/molbev/mst197.

[15] X.F. Li, Y.H. Tian, H.Y. Peng, et al. (2020), "Isolation, screening and identification of antagonistic actinomycetes to control *Fusarium* wilt of *Momordica charantia*", *The Journal of Applied Ecology*, **31**(11), pp.3869-3879, DOI: 10.13287/j.1001-9332.202011.036.

[16] W. Shen, R. Liu, J. Wang, et al. (2024), "Characterization of a broad-spectrum antifungal strain, *Streptomyces gramineus* STR-1, against *Magnaporthe oryzae*", *Frontiers in Microbiology*, **15**, pp.1-12, DOI: 10.3389/fmicb.2024.1298781.

[17] A.V.A. Pirozzi, A. Stellavato, A.L. Gatta, et al. (2016), "Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model", *Toxicology Letters*, **249**, pp.1-4, DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.03.004.

[18] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, et al. (2016), "Morphological identification of actinobacteria", *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, BoD - Books on Demand, pp.59-86, DOI: 10.5772/61461.

[19] B. Dhillon, S. Chakrabarti (2023), "Draft genome sequence of *Streptomyces murinus* strain SPC1 with antimicrobial potential against fungal pathogens of palms", *Microbiology Resource Announcements*, **12**(12), pp.1-3, DOI: 10.1128/MRA.00826-23.

[20] M. Ge, X. Cai, D. Wang, et al. (2023), "Efficacy of *Streptomyces murinus* JKTJ-3 in suppression of *Pythium* damping-off of watermelon", *Microorganisms*, **11**(6), pp.1-20, DOI: 10.3390/microorganisms11061360.

[21] T.T.T. Nguyen, H.T. Nguyen, T.D.H. Nguyen, et al. (2022), "Evaluation antifungal ability of *Streptomyces* sp. against *Collectotrichum* causing anthracnose on dragon fruit", *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, **20**(12), pp.1591-1598 (in Vietnamese).

Mô hình phi tuyến nước nông mô phỏng dòng chảy sau vỡ đập trên nền đáy hạ lưu phức tạp dùng hệ tọa độ (b, s)

Nguyễn Hữu Văn, Phạm Trung Cảnh, Lại Văn Quyền, Phạm Thị Nga, Phạm Văn Khôi*

Trường Đại học Hàng hải Việt Nam, 484 Lạch Tray, phường Kênh Dương, quận Lê Chân, TP Hải Phòng, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/1/2023; ngày chuyển phản biện 25/1/2023; ngày nhận phản biện 21/2/2023; ngày chấp nhận đăng 25/2/2023

Tóm tắt:

Trong điều kiện khí tượng bất thường hiện nay, mô phỏng dòng chảy ngập lụt đô thị đang là bài toán ứng dụng thực tiễn rất cao trong tính toán dự báo thiên tai của mỗi quốc gia, đặc biệt là những quốc gia chịu ảnh hưởng lớn từ biến đổi khí hậu như Việt Nam. Bài báo nghiên cứu xây dựng một mô hình số mô phỏng dòng chảy sau vỡ đập trên nền đáy hạ lưu phức tạp, có khả năng ứng dụng cao trong mô phỏng dự báo ngập lụt đô thị. Mô hình số sử dụng hệ phương trình phi tuyến nước nông dùng hệ tọa độ (b, s) có ưu điểm đơn giản nhưng hiệu quả trong mô phỏng các hiện tượng dòng chảy không nén được. Phương pháp hỗn hợp thể tích - sai phân hữu hạn và phương pháp tường minh Runge - Kutta 3 bước bậc 3 được sử dụng để rời rạc hóa hệ phương trình chủ đạo tương ứng theo không gian và thời gian. Mô hình số được kiểm chuẩn với kết quả từ mô hình giải tích và mô hình vật lý cho bài toán đáy hạ lưu đơn giản. Với trường hợp đáy hạ lưu phức tạp, mô hình tiếp tục mô phỏng chính xác tốc độ và chiều sâu dòng chảy cho trường hợp đáy gồ ghề và đáy nghiêng nhám.

Từ khóa: đáy phức tạp, hệ phương trình phi tuyến nước nông, mô hình số, mô hình vật lý, mô phỏng vỡ đập.

Chỉ số phân loại: 1.8, 2.1

A nonlinear shallow water model simulating dam-break flow over complex downstream beds using (b, s) coordinate

Huu Van Nguyen, Trung Canh Pham, Van Quyen Lai, Thi Nga Pham, Van Khoi Pham*

Vietnam Maritime University, 484 Lach Tray Street, Kênh Dương Ward, Lê Chân District, Hai Phong City, Vietnam

Received 23 January 2023; revised 21 February 2023; accepted 25 February 2023

Abstract:

Under the current abnormal meteorological conditions, urban flood flow simulation is an efficient problem in disaster prediction calculations for every country, especially those significantly impacted by climate change, such as Vietnam. This article presents the development of a numerical model simulating flow after a dam break on complex downstream beds, with high applicability in urban flood forecasting. The numerical model uses the shallow water nonlinear equations employing the (b, s) coordinates and has the advantage of being simple but effective in simulating incompressible flow phenomena. The hybrid finite volume-the finite difference method and the explicit three-stage, third-order Runge-Kutta method are used to discretise the governing equations in space and time, respectively. The numerical model is validated with results from analytical models and physical models for the problem with a simple downstream bed. For complex downstream bed cases, the model accurately simulates flow velocity and flow depth for both hump and rough inclined beds.

Keywords: complex bed, dam-break simulation, numerical model, physical model, shallow water equations.

Classification numbers: 1.8, 2.1

*Tác giả liên hệ: Email: khoipv.ctt@vimaru.edu.vn

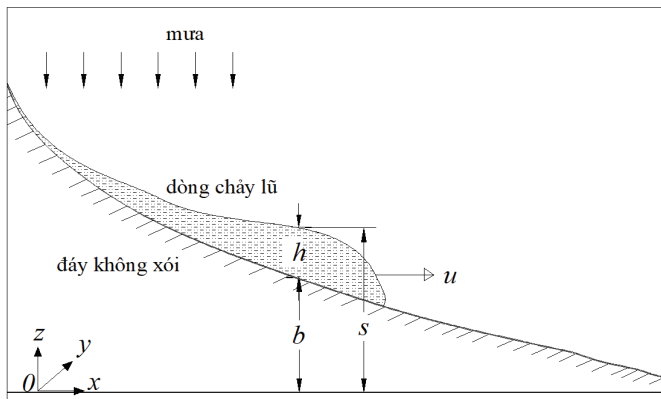
1. Đặt vấn đề

Bài toán mô phỏng vỡ đập (dam-break simulation) được ứng dụng phổ biến trong thực tế cho vấn đề dự báo thiên tai, ứng phó với biến đổi khí hậu ngày càng gia tăng ở các quốc gia trên thế giới [1-4]. Đặc biệt, dòng chảy sau vỡ đập hình thành dòng chảy lũ ở đáy hạ lưu tác động lên cơ sở hạ tầng và đô thị, đe dọa tính mạng, nhà cửa và tài sản của người dân. Để mô phỏng vỡ đập, ngoài mô hình giải tích [5, 6] và mô hình vật lý [7, 8] thì mô hình số [9, 10] được xem là có ưu thế hơn vì dễ dàng sử dụng và ít tốn kém. Trong mô hình số, tùy theo kích thước của miền tính toán để chia và lựa chọn các mô hình, như một chiều [1, 11], hai chiều [12], ba chiều [13, 14]. Mô hình nhiều chiều thì cho kết quả tính toán có độ chính xác cao hơn nhưng thời gian mô phỏng và tài nguyên máy tính thường yêu cầu cao. Do đó, trong một số bài toán cụ thể, mô hình một chiều thường được sử dụng vì độ chính xác khá phù hợp và không yêu cầu cao về tài nguyên. Hầu hết các mô hình mô phỏng dòng chảy lũ sử dụng biến chiều sâu dòng chảy theo hệ tọa độ địa phương [15-18], các nghiên cứu sử dụng hệ tọa độ (b, s) còn khá hạn chế.

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu là một mô hình số sử dụng hệ phương trình phi tuyến nước nông [15, 19, 20] dùng hệ tọa độ (b, s) , trong đó b là cao độ đáy không xói, s là cao độ mặt nước tính từ mặt phẳng chuẩn. Đây là một dạng của hệ tọa độ tổng thể, dễ dàng xác định được mặt đáy và mặt nước trong tính toán mô phỏng mà không phải chuyển đổi như sử dụng hệ tọa độ địa phương [21]. Mô hình số đề xuất được kiểm chuẩn với mô hình giải tích và mô hình vật lý cho trường hợp đáy phẳng để thấy được độ chính xác cao. Với trường hợp đáy phức tạp, mô hình tiếp tục mô phỏng và đối sánh với thí nghiệm vật lý cho trường hợp đáy gồ ghề và đáy nghiêng nhám.

2. Mô hình phi tuyến nước nông

2.1. Hệ phương trình chủ đạo



Hình 1. Sơ đồ và các biến tính toán mô hình phi tuyến nước nông trong hệ tọa độ (b, s) .

Hệ phương trình chủ đạo của mô hình số mô phỏng sóng nước sau vỡ đập là hệ phương trình phi tuyến nước nông một chiều dưới dạng bảo toàn dùng hệ tọa độ (b, s) (hình 1) [10] như sau:

$$\frac{\partial s}{\partial t} + \frac{\partial [(s-b)u]}{\partial x} = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} [(s-b)u] + \frac{\partial}{\partial x} \left[(s-b)u^2 + \frac{1}{2}g(s-b)^2 \right] = g(s-b) \left(-\frac{\partial b}{\partial x} - \frac{n^2 u^2}{(s-b)^{4/3}} \right) \quad (2)$$

trong đó: s (m) và b (m) tương ứng là cao độ mặt nước và cao độ đáy; u (m/s) là vận tốc trung bình theo chiều đứng của phần tử nước theo phương ngang; ∂ : vi phân từng phần; g : gia tốc trọng trường; $-\partial b/\partial x$ là thành phần nguồn thể hiện độ dốc đáy; n là hệ số nhám Manning thể hiện thành phần lực cản do ma sát bề mặt. Hệ phương trình chủ đạo trên là dạng không thuần nhất (inhomogenous), dạng thuần nhất (homogenous) được thiết lập bằng cách bỏ đi thành phần nguồn ở vế phải của phương trình động lượng (2).

2.2. Phương pháp giải

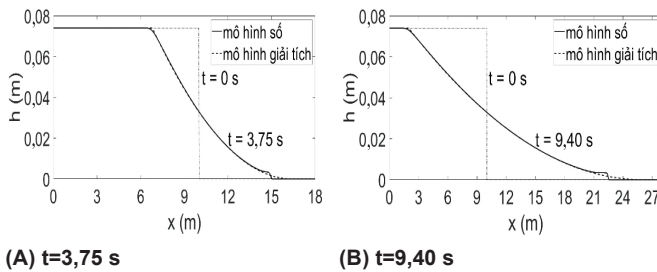
Để giải tích phân hệ phương trình (1), (2) của mô hình vỡ đập theo thời gian, phương pháp tường minh Runge-Kutta 3 bước bậc 3 được sử dụng [22]. Phương pháp này cho độ chính xác với bước thời gian đủ nhỏ và được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực mô phỏng dòng chảy. Để giải tích phân hệ phương trình chủ đạo theo không gian, phương pháp hỗn hợp thể tích hữu hạn - sai phân hữu hạn được sử dụng. Phương pháp này gần đây được sử dụng phổ biến như sự kết hợp giữa bài toán có điều kiện ban đầu không liên tục và liên tục [23]. Trong đó, phương pháp thể tích hữu hạn áp dụng giải thành phần thông lượng cho điều kiện bề mặt không liên tục, còn phương pháp sai phân hữu hạn áp dụng giải thành phần nguồn có độ dốc đáy liên tục.

3. Kiểm chuẩn mô hình

Lời giải số là lời giải gần đúng khi rời rạc hóa hệ phương trình vi phân (1) và (2) theo không gian và thời gian [23]. Độ chính xác của lời giải phụ thuộc vào phương pháp giải gần đúng. Trong khi lời giải giải tích là lời giải chính xác khi sử dụng các hàm toán học, còn kết quả thí nghiệm vật lý thể hiện dòng chảy thực tế trong điều kiện biên quá phức tạp hoặc tính chất dòng chảy phi tuyến bậc cao, còn mô hình vật lý thường khá tốn kém khi xây dựng. Vì vậy, mô hình số vẫn là mô hình đã và đang được sử dụng rộng rãi khi có thí nghiệm kiểm chuẩn với lời giải giải tích hoặc mô hình vật lý. Trong nghiên cứu này, kết quả của mô hình số ở dạng thuần nhất được kiểm chuẩn với lời giải giải tích và mô hình số ở dạng không thuần nhất được kiểm chuẩn với kết quả của mô hình vật lý.

3.1. Kiểm chuẩn với mô hình giải tích

Hệ phương trình chủ đạo (1), (2) dưới dạng thuần nhất (bỏ qua thành phần nguồn ở vế phải) và mô hình giải tích trong tài liệu [5] được giải với cùng điều kiện biên và điều kiện ban đầu để có thể kiểm chuẩn một cách chính xác. Miền tính toán là dài 28 m trong đó cửa đập được đặt ở khoảng cách 10 m so với biên trái. Chiều cao cột nước ban đầu là 7,4 cm, điều kiện biên trái là tường cứng còn điều kiện biên phải là cửa chảy tự do. Các kết quả được kiểm chuẩn ở hai thời điểm khác nhau là $t=3,75$ s và 9,4 s như thể hiện trên hình 2.



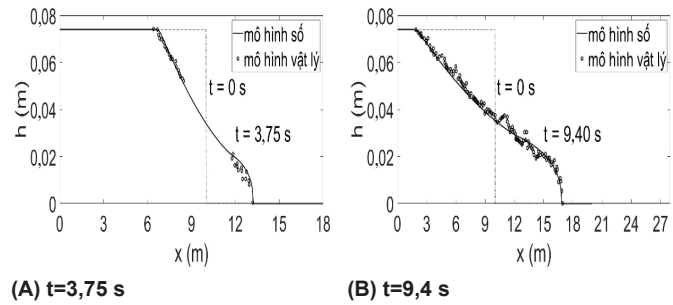
Hình 2. Kiểm chuẩn mô hình số với mô hình giải tích.

Trên hình 2, kết quả của mô hình số và mô hình giải tích tại hai thời điểm khác nhau là hoàn toàn trùng khớp, ngoại trừ mép phải của lời giải số không được cong tròn như lời giải giải tích. Điều này có thể lý giải do lời giải số phải giả sử chiều cao cột nước dung sai ở đáy khô là 10^{-6} m để cho nghiệm của bài toán được liên tục. Chiều cao dung sai này sẽ phát sinh sai số dẫn đến kết quả không cong tròn trên. Tuy nhiên, sai số này là tương đối nhỏ và có thể chấp nhận được. Từ đó có thể thấy mô hình số ở dạng thuần nhất mô phỏng khá phù hợp so với mô hình giải tích.

3.2. Kiểm chuẩn với mô hình vật lý

Mô hình vật lý được sử dụng trong nghiên cứu này là mô hình một chiều (kích thước chiều dài lớn hơn nhiều so với chiều rộng và chiều cao) trong tài liệu [7]. Trong thí nghiệm này, một máng nước đặt phẳng có chiều dài 18 m được thiết lập, trong đó 10 m dài biên trái được đổ nước với chiều cao 7,4 cm và ngăn cách với ngăn khô bên phải bằng một cửa kín nước. Cửa sẽ được mở trong một khoảng thời gian đủ ngắn để đảm bảo điều kiện cả khối nước sẽ đổ xuống cùng một thời điểm như điều kiện ban đầu cho bài toán vỡ đập. Đường mặt nước sau khi vỡ đập sẽ được mô phỏng tại các bước thời gian khác nhau.

Để kiểm chuẩn với mô hình vật lý, hệ phương trình chủ đạo đầy đủ của mô hình số được giải xấp xỉ và kiểm chuẩn ở cùng một bước thời gian với kết quả từ mô hình vật lý như thể hiện trên hình 3. Miền tính toán, điều kiện biên và điều kiện ban đầu được xác định giống như bài toán kiểm chuẩn với mô hình giải tích. Hệ số nhám Manning được chọn là $0,01 \text{ m}^{-1/3}$ s theo đặc điểm của bề mặt đáy thí nghiệm.



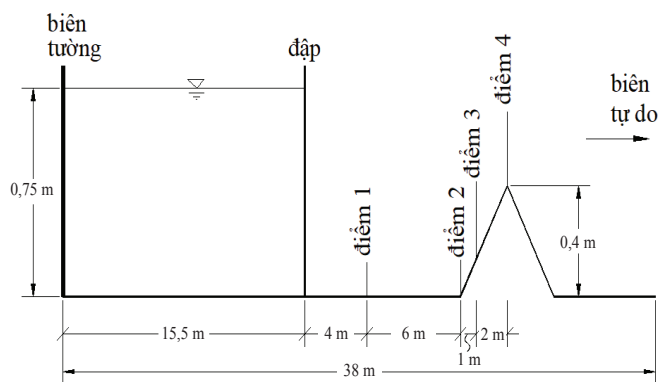
Hình 3. Kiểm chuẩn mô hình số với mô hình vật lý.

Trên hình 3, tại các thời điểm rất ngắn ngay sau vỡ đập $t=3,75$ s hay một khoảng thời gian dài sau vỡ đập $t=9,4$ s, kết quả đường mặt nước từ mô hình số đều có sự phù hợp với kết quả từ thí nghiệm mô hình vật lý. Điều này chứng tỏ mô hình số mô phỏng đường mặt nước sau vỡ đập là chính xác về bản chất chuyển động vật lý của dòng nước. Mô hình số được đề cập đến trong nghiên cứu này chính xác về mặt toán học và vật lý, có thể ứng dụng để mô phỏng những bài toán vỡ đập trong thực tế. Có thể dễ dàng nhận thấy, so với lời giải của mô hình giải tích, vận tốc dòng chảy chậm hơn và đường mặt nước bên phải không cong tròn do ảnh hưởng của ma sát đáy. Điều này cũng hoàn toàn logic về mặt cơ học.

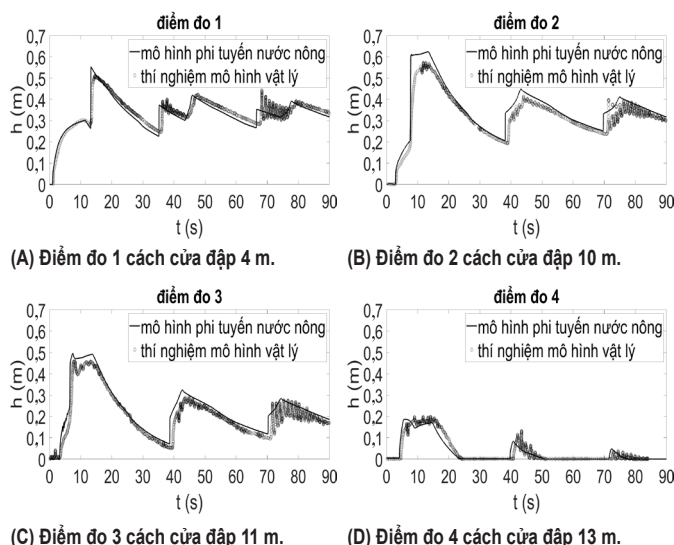
4. Kết quả mô phỏng cho đáy phức tạp

4.1. Đáy gồ ghề

Mô hình số được ứng dụng để mô phỏng dòng chảy sau vỡ đập qua đáy gồ ghề. Đây là thí nghiệm mô hình vật lý tỷ lệ lớn [1], miền tính toán dài 38 m, cửa đập cách đáy thượng lưu 15,5 m. Chiều cao nước phía đập là 0,75 m, sau đập là đáy khô. Phía đáy hạ lưu xuất hiện một đáy tam giác cân nhô cao 0,4 m, rộng 6 m và đỉnh tam giác cách cửa đập 13 m. Các thông số mô hình được thiết lập: biên trái là tường, biên phải là tự do, hệ số nhám Manning là $0,0125 \text{ m}^{-1/3}$ s, kích thước lưới là 5 cm và thời gian mô phỏng là 90 s. Kết quả mô phỏng chiều cao dòng chảy theo thời gian của mô hình số được so sánh với kết quả từ mô hình vật lý [1] tại 4 điểm đo cách cửa lần lượt 4, 10, 11 và 13 m như thể hiện trên hình 4. Điểm đo 1 và 2 nằm trên đáy bằng, điểm đo 3 nằm trên mái dốc trái của tam giác và điểm đo 4 nằm trên đỉnh tam giác.



Hình 4. Miền tính toán mô phỏng dòng chảy trên nền đáy hạ lưu gồ ghề [1].



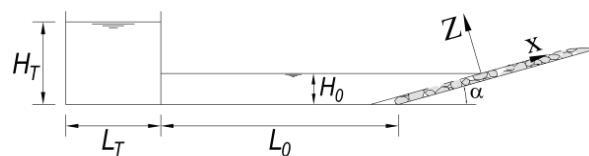
Hình 5. Kết quả mô phỏng dòng chảy trên nền đáy hạ lưu gồ ghề với kết quả từ thí nghiệm vật lý [8].

Hình 5 thể hiện kết quả mô phỏng số và số liệu thí nghiệm vật lý của chiều sâu dòng chảy theo thời gian. Nhìn chung, kết quả từ mô hình số khá phù hợp với số liệu thí nghiệm, cho thấy mô hình phi tuyến nước nông mô phỏng được khá tốt hiện tượng dòng chảy phức tạp này. Ở những bước thời gian đầu, ngay sau khi vỡ đập, nước sẽ chảy từ bề thượng lưu về hạ lưu như dòng chảy lũ. Khi dòng chảy gặp mái dốc trái của đáy tam giác, nước sẽ leo lên mái dốc trái và vượt qua đỉnh tam giác chảy tràn sang mái dốc phải và thoát ra ngoài biên tự do một phần. Dưới tác dụng của đáy tam giác, dòng chảy sẽ hình thành sóng phản xạ truyền về phía biên thượng lưu. Sóng gặp biên thượng lưu sẽ phản xạ lại nguyên vẹn và tạo sóng tới truyền về phía đáy hạ lưu, quá trình lặp lại đến khi mực nước không vượt qua được đỉnh đáy tam giác hạ lưu. Theo kết quả mô phỏng ở điểm đo 2, 3 và 4, trong khoảng 90 s mô phỏng, hình thành 3 con sóng phản xạ tại các thời điểm tương ứng $t = 10$ s, 40 s và 70 s. Từ kết quả mô phỏng cho trường hợp đơn giản này, mô hình số có thể mô phỏng chính xác cho các trường hợp ngập lụt phức tạp hơn phía hạ lưu như khu đô thị hay công trình cơ sở hạ tầng.

4.2. Đáy mái nghiêng nhám

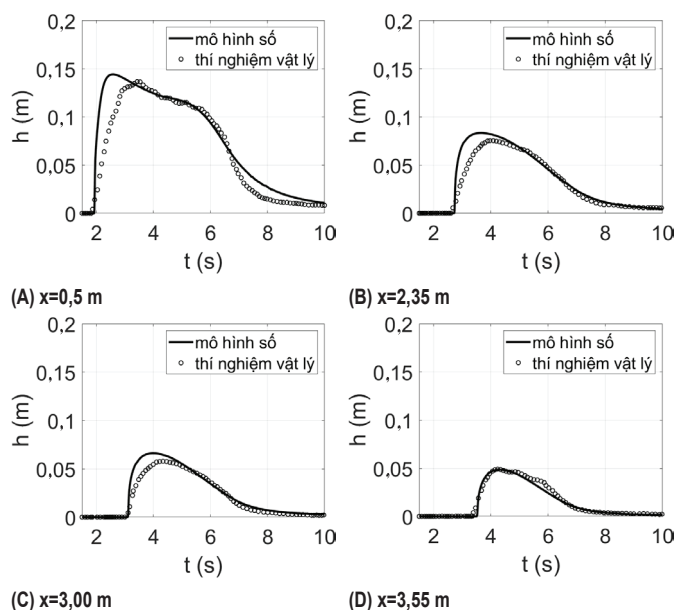
Để tiếp tục kiểm chứng mô hình đã phát triển, nhóm nghiên cứu tiến hành mô phỏng sóng leo và sóng rút trên bãi nghiêng nhám và so sánh với kết quả thí nghiệm từ mô hình vật lý [16] được thể hiện trên hình 6. Chiều cao cột nước ban đầu $H_T = 0,65$ m với chiều rộng $L_T = 1$ m, độ sâu nước phía bãi $H_0 = 0,06$ m, với chiều rộng $L_0 = 3,8$ m. Độ nhám của bãi được tạo ra bằng cách sử dụng 1 lớp đá cuội nhỏ có đường kính $d = 5 \div 6$ mm xếp phía trên mái dốc cứng có độ dốc tan $\alpha = 0,1$. Hệ số nhám Manning được sử dụng trong tính toán là $n = 0,028 \text{ m}^{-1/3} \text{ s}$. Cột nước ban đầu sau khi đổ xuống sẽ tạo

dòng chảy lan truyền ở phần nước hạ lưu, sau đó dòng chảy sẽ tạo sóng leo lên mái dốc khô theo trục x như hình 6. Kết quả mô hình được so sánh với số liệu thí nghiệm tại 4 vị trí $x = 0,5$ m, 2,35 m, 3,0 m, 3,55 m.



Hình 6. Thí nghiệm sóng leo lên đáy nghiêng nhám [16].

Hình 7 thể hiện mô hình số đã mô phỏng thành công hiện tượng dòng chảy phía hạ lưu hình thành sóng leo trên bãi nhám tại 4 vị trí khác nhau. Trong đó, sự phù hợp được thể hiện cả về vận tốc sóng leo và chiều cao sóng leo. Đặc biệt, tại vị trí cao nhất, vị trí $x = 3,55$ m, hầu như không có sự sai lệch giữa kết quả mô hình số hiện tại và số liệu thí nghiệm. Kết quả cũng cho thấy hiệu quả của mô hình khi mô phỏng thực tế hiện tượng lũ lụt phía hạ lưu là những dạng địa hình mái nghiêng như bãi biển, sườn núi... trong thực tế. Từ đó, có thể cho thấy khả năng ứng dụng của mô hình phi tuyến nước nông trong việc mô phỏng các địa hình khác nhau phía hạ lưu.



Hình 7. Kết quả mô phỏng chiều cao sóng leo và sóng rút trên mái dốc nhám với kết quả thí nghiệm vật lý [16].

5. Kết luận

Bài báo đã nghiên cứu xây dựng được một mô hình phi tuyến nước nông mô phỏng dòng chảy sau vỡ đập trên nền đáy hạ lưu phức tạp. Mô hình phi tuyến nước nông dùng hệ tọa độ (b, s) có thể mô phỏng các địa hình thực tế nhờ thêm vào thành phần độ dốc và độ nhám đáy trong hệ phương

trình chủ đạo. Lời giải số áp dụng phương pháp hỗn hợp thể tích - sai phân hữu hạn nhằm phát huy tối đa ưu điểm của từng phương pháp. Mô hình số thiết lập được kiểm chuẩn với mô hình giải tích cho dạng thuần nhất và với mô hình vật lý cho dạng đầy đủ. Mô hình sau kiểm chuẩn được tiếp tục mô phỏng cho hai trường hợp đáy hạ lưu phức tạp. Với trường hợp đáy hạ lưu gồ ghề, mô hình mô phỏng chính xác về vận tốc và chiều cao dòng chảy khi gặp vật cản có kích thước hình tam giác. Với trường hợp đáy nghiêng nhám, hiện tượng sóng leo và sóng rút được mô phỏng phù hợp với bản chất vật lý của dòng chảy. Mô hình hai chiều có thể được phát triển trong tương lai để có thể mô phỏng cho một lưu vực bị ngập lụt trong thực tế.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Hàng hải Việt Nam trong đề tài mã số SV22-23.33. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] F. Belkhandoun, L. Monthe, I. Elmahi (1999), "A splitting finite volume Roe scheme for shallow water equations with source terms", *Concerted Action on Dam-Break Modelling*, Wallingford, United Kingdom, pp.63-88.

[2] D. Liang (2010), "Evaluating shallow water assumptions in dam-break flows", *Proc. Inst. Civ. Eng. - Water Manag.*, **163**(5), pp.227-237, DOI: 10.1680/wama.2010.163.5.227.

[3] P.V. Khoi, V.N. Vu, C. Lee (2020), "Numerical simulation of tsunami due to submarine landslide using extended Boussinesq equations", *Proc. 10th Int. Conf. Asian Pac. Coasts APAC 2019 Hanoi Vietnam* (in Vietnamese).

[4] P.V. Khoi (2022a), "Integrated numerical model of submarine landslide-induced tsunami: Verification to one-dimensional domain", *Journal of Marine Science and Technology*, **69**, pp.62-66 (in Vietnamese).

[5] A. Mangeney, P. Heinrich, R. Roche (2000), "Analytical solution for testing debris avalanche numerical models", *Pure Appl. Geophys.*, **157**(6-8), pp.1081-1096, DOI: 10.1007/s000240050018.

[6] C. Ancey, R.M. Iverson, M. Rentschler, et al. (2008), "An exact solution for ideal dam-break floods on steep slopes: Dam-break problem on sloping bed", *Water Resour. Res.*, **44**(1), pp.1-10, DOI: 10.1029/2007WR006353.

[7] A. Schoklitsch (1917), "Dam break waves", *Proceedings of The Royal Academy of Sciences*, **126**, pp.1489-1514 (in German).

[8] A.F. Khankandi, A. Tahershamsi, S.S. Frazão (2012), "Experimental investigation of reservoir geometry effect on dam-break flow", *J. Hydraul. Res.*, **50**(4), pp.376-387, DOI: 10.1080/00221686.2012.690974.

[9] Q. Liang, F. Marche (2009), "Numerical resolution of well-balanced shallow water equations with complex source terms", *Adv. Water Resour.*, **32**(6), pp.873-884, DOI: 10.1016/j.advwatres.2009.02.010.

[10] P.V. Khoi, C. Lee, V.N. Vu (2019), "Numerical simulation of subaerial and submarine landslides using the finite volume method in the shallow water equations with (b, s) coordinate", *J. Korean Soc. Coast. Ocean Eng.*, **31**(4), pp.229-239, DOI: 10.9765/KSCOE.2019.31.4.229.

[11] J. Paik (2015), "A high resolution finite volume model for 1D debris flow", *J. Hydro-Environ. Res.*, **9**(1), pp.145-155, DOI: 10.1016/j.jher.2014.03.001.

[12] X. Xia, Q. Liang (2018), "A new depth-averaged model for flow-like landslides over complex terrains with curvatures and steep slopes", *Eng. Geol.*, **234**, pp.174-191, DOI: 10.1016/j.enggeo.2018.01.011.

[13] P.V. Khoi, V.V. Nghi (2021), "Flow-3D model: Theory, verification and application to simulate siphon spillways", *Journal of Marine Science and Technology*, **67**, pp.73-77 (in Vietnamese).

[14] P.V. Khoi, P.T. Nga, D.T.H. Ngoc (2022b), "Flow-3D model: Air vent tool and application to control the outflow discharge of siphon spillways", *Journal of Marine Science and Technology*, **69**, pp.57-61 (in Vietnamese).

[15] S. Nickovic, G. Pejanovic, V. Djurdjevic, et al. (2010), "HYPROM hydrology surface-runoff prognostic model: Hydrology prognostic model", *Water Resour. Res.*, **46**(11), pp.1-18, DOI: 10.1029/2010WR009195.

[16] T. O'Donoghue, D. Pokrajac, L.J. Hondebrink (2010), "Laboratory and numerical study of dam-break-generated swash on impermeable slopes", *Coast. Eng.*, **57**(5), pp.513-530, DOI: 10.1016/j.coastaleng.2009.12.007.

[17] V.M. Dansac, C. Berthon, S. Clain, et al. (2017), "A well-balanced scheme for the shallow-water equations with topography or Manning friction", *J. Comput. Phys.*, **335**, pp.115-154, DOI: 10.1016/j.jcp.2017.01.009.

[18] J. Hou, T. Wang, P. Li, et al. (2018), "An implicit friction source term treatment for overland flow simulation using shallow water flow model", *J. Hydrol.*, **564**, pp.357-366, DOI: 10.1016/j.jhydrol.2018.07.027.

[19] J.S. O'Brien, P.Y. Julien, W.T. Fullerton (1993), "Two-dimensional water flood and mudflow simulation", *J. Hydraul. Eng.*, **119**(2), pp.244-261, DOI: 10.1061/(ASCE)0733-9429(1993)119:2(244).

[20] J. Xia, R.A. Falconer, B. Lin, et al. (2010), "Modelling flood routing on initially dry beds with the refined treatment of wetting and drying", *Int. J. River Basin Manag.*, **8**(3-4), pp.225-243, DOI: 10.1080/15715124.2010.502121.

[21] E.D.F. Nieto, F. Bouchut, D. Bresch, et al. (2008), "A new savage-hutter type model for submarine avalanches and generated tsunami", *J. Comput. Phys.*, **227**(16), pp.7720-7754, DOI: 10.1016/j.jcp.2008.04.039.

[22] D. Dutykh, T. Katsounis, D. Mitsotakis (2011), "Finite volume schemes for dispersive wave propagation and runup", *J. Comput. Phys.*, **230**(8), pp.3035-3061, DOI: 10.1016/j.jcp.2011.01.003.

[23] E.F. Toro (2001), *Shock-Capturing Methods for Free-Surface Shallow Flows*, John Wiley & Sons, 328pp.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến đặc tính hóa lý của chế phẩm tạo màng và khả năng bảo quản quả chanh leo tím

Nguyễn Sáng*, Phạm Anh Tuấn, Lê Hà Hải, Trần Thị Thu Hoài

Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch, 60 Trung Kinh, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 6/8/2024; ngày chuyển phản biện 9/8/2024; ngày nhận phản biện 30/8/2024; ngày chấp nhận đăng 4/9/2024

Tóm tắt:

Quả chanh leo sau thu hoạch là loại quả hô hấp mạnh, dễ bị mất nước làm biến đổi trạng thái dẫn đến vỏ quả nhăn nheo, giảm chất lượng cảm quan và hư hỏng nhanh trong thời gian 5-7 ngày ở điều kiện môi trường. Mục đích của nghiên cứu nhằm khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ các thành phần chính tạo chế phẩm phủ màng (MW-CMC) từ 3 nguyên liệu: sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5, 3%), sáp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5%) và nano carboxymethyl (0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2%) đến đặc tính hóa lý của chế phẩm và khả năng bảo quản quả chanh leo tím trồng tại tỉnh Sơn La ở nhiệt độ $5\pm 1^\circ\text{C}$, độ ẩm RH $90\pm 2\%$ trong 48 ngày. Kết quả xác định tỷ lệ thành phần phù hợp của sáp ong trong khoảng 1,5-2,5%, sáp cọ 0,6-1,2% và carboxymethyl 0,4-0,8%. Đặc tính hóa lý của chế phẩm MW-CMC ổn định với pH 7,8-8,2, độ nhớt 10,31-61,59 cp, điện thế zeta tối thiểu $|\zeta| > 54,1$ mV, kích thước hạt khoảng 9,2-11,8 μm và mật độ hạt 2,9-3,2 triệu hạt/ml. Kết quả khảo sát và thử nghiệm bảo quản quả chanh leo tím cho thấy: Cường độ hô hấp đạt đỉnh 14,12-23,08 ml $\text{CO}_2/\text{kg.h}$ vào ngày 15 đến ngày 18, tương ứng cường độ sản sinh khí ethylene 191,25-205,67 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$; tỷ lệ hao hụt khối lượng 1,92-3,42%; chất lượng cảm quan được duy trì đến ngày thứ 48 đạt 17,42 điểm.

Từ khóa: bảo quản, carboxymethyl cellulose, chế phẩm tạo màng, quả chanh leo, sáp cọ, sáp ong.

Chỉ số phân loại: 2.10, 4.7

Research on the effect of the ratio of beeswax, carnauba wax, and carboxymethyl cellulose on the physicochemical properties of film-forming preparation and the ability to preserve purple passion fruits

Sang Nguyen*, Anh Tuan Pham, Ha Hai Le, Thi Thu Hoai Tran

Vietnam Institute of Agricultural Engineering and Post-Harvest Technology, 60 Trung Kinh Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 6 August 2024; revised 30 August 2024; accepted 4 September 2024

Abstract:

The post-harvest passion fruit is a climacteric fruit prone to water loss, which leads to changes in its state, results in wrinkled skin, decreased sensory quality, and rapid spoilage within 5 to 7 days under environmental conditions. This research aims to investigate the effect of the ratios of the main components in the coating formulation (MW - CMC) from three materials: beeswax (1, 1.5, 2, 2.5, and 3%), carnauba wax (0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5%), and nano carboxymethyl (0.4, 0.6, 0.8, 1.0, and 1.2%) on the physicochemical properties of the film coating composition and ability to preserve purple passion fruit grown in Son La province, at a temperature of $5\pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity (RH) $90\pm 2\%$ for 48 days. The experimental results determined the appropriate component ratios of beeswax within 1.5 to 2.5%, carnauba wax from 0.6 to 1.2%, and carboxymethyl from 0.4 to 0.8%. The physicochemical properties of the film coating MW-CMC were stable with a pH from 7.8 to 8.2, viscosity from 10.31-61.59 cp, minimum zeta potential $|\zeta| > 54.1$ mV, particle size about 9.2 to 11.8 μm , and particle density of 2.9 to 3.2 million particles/ml. The experimental preservation on purple passion fruit results showed that respiration intensity peaked from 14.12-23.08 ml $\text{CO}_2/\text{kg.h}$ on the 15th to 18th day with a corresponding ethylene production rate from 191.25-205.67 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$; weight loss ratio from 1.92-3.42%; the sensory quality was maintained until the 48th day, achieving a score of 17.42 points.

Keywords: beeswax, carboxymethyl cellulose, carnauba wax, film-forming preparation, preserve, purple passion fruit.

Classification numbers: 2.10, 4.7

*Tác giả liên hệ: Email: nguyensang78vn@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Chanh leo là loại quả chín sau thu hoạch, cường độ hô hấp và mức sản sinh khí ethylene phụ thuộc vào độ chín và nhiệt độ bảo quản. Một số nghiên cứu cho thấy, cường độ hô hấp trong khoảng nhiệt độ 5-25°C khoảng 29-349 mg CO₂/kg.h [1]. Khi giảm nhiệt độ từ 20 xuống 10°C, cường độ hô hấp giảm gần 50% [2]. Mức sản sinh khí ethylene cũng tăng theo nhiệt độ bảo quản và phụ thuộc vào độ chín sau thu hoạch 221,26-505,35 µl C₂H₄/kg.h (20°C). Hao hụt khối lượng theo nhiệt độ và thời gian bảo quản tương ứng 26,84% (20°C, 30 ngày) và 8,8% (8°C, 21 ngày) [3, 4].

Chế phẩm phủ màng là một kỹ thuật tiên tiến để kéo dài thời gian bảo quản rau quả, nhờ tạo ra môi trường vi khí hậu (O₂, CO₂, độ ẩm) nhằm ức chế cường độ hô hấp, sản sinh khí ethylene, ngăn cản sự mất nước và những tác động gây hại khác như ánh sáng, vi sinh vật [5]. Đặc tính rào cản của lớp phủ màng được xác định bằng khả năng thẩm hơi nước, thẩm khí O₂ và CO₂. Tính năng của lớp màng phủ phụ thuộc vào đặc tính vật lý và hóa lý của nó và các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm rau quả như: ngăn chặn sự hư hỏng do quá trình oxy hóa, mức độ oxy cần phải được kiểm soát nhằm giảm tốc độ hô hấp và sự sản sinh ethylene trong rau quả [6, 7]. Chế phẩm dạng nhũ tương thường được điều chế từ 3 thành phần chính, gồm pha dầu, pha nước và chất ổn định nhũ tương. Pha dầu trong quá trình tạo nhũ tương thường có nguồn gốc từ các chất béo trung tính như triacylglycerol, diacylglycerol, monoacylglycerol, tinh dầu, dầu khoáng, axit béo và các loại khác được phẩm dinh dưỡng [8, 9].

Một số nghiên cứu đã công bố về bảo quản quả chanh leo tím, cụ thể bằng màng PLA/PBAT (acid lacticopoly với butylene màng blend adipate-co-terephthalate) ở nhiệt độ 20°C và 70-75% RH trong 21 ngày. Kết quả tỷ lệ hao hụt khối lượng 15%, độ cứng 15N, đường tổng 6,3%, axit tổng số 28 g/kg, Vitamin C 12,5 mg/100 g (mức tồn thất 33,5%) [10]. Nghiên cứu bảo quản quả chanh leo tím bằng màng phủ chitosan trong thời gian bảo quản 12 ngày ở nhiệt độ 28°C, độ ẩm 85% cho thấy, tỷ lệ hao hụt khối lượng thấp nhất là 20% và có hiệu quả duy trì hàm lượng vitamin C tốt nhất (6,1 mg/100 g), cao gấp 1,12 lần so với đối chứng (5,4 mg/100 g) [11]. Nghiên cứu bảo quản quả chanh leo tím bằng xử lý 1 µl/l 1-MCP kết hợp với chitosan 1% (w/v) trong thời gian bảo quản 25 ngày ở 4°C cho thấy, hạn chế cường độ hô hấp và hao hụt khối lượng (13,11%) [12]. Nghiên cứu bảo quản chanh leo tím bằng phủ màng chitosan (2%) ở nhiệt độ 8±1°C trong 25 ngày cho thấy, hao hụt khối lượng ít nhất 19,53%, vitamin C 19,81 mg/100 g (mức tồn thất 30%) [13].

Đề khai thác và sử dụng có hiệu quả một số vật liệu tiềm năng nhằm tạo ra chế phẩm bảo quản rau quả có nguồn gốc tự nhiên và thân thiện môi trường như sáp ong có đặc tính tương đối kỵ nước và có khả năng ngăn việc mất nước, giữ được các hợp chất dễ bay hơi [14, 15]. Sáp ong có khả năng làm giảm cường độ hô hấp của trái cây, nên có khả năng giảm hao hụt

khối lượng và tăng thời hạn bảo quản trái cây [16, 17]. Trong khi CMC là dẫn xuất cellulose với các nhóm carboxymethyl (-CH₂-COOH) dạng natri monochloroacetate ClCH₂COONa tạo nên khung cellulose là chất điều chỉnh độ nhớt, tạo đặc và ổn định nhũ tương [18, 19]. Tuy vậy, độ ổn định và tính năng của chế phẩm tạo màng dạng nhũ tương phụ thuộc vào đặc tính hóa lý với các thông số kỹ thuật chính (độ nhớt, pH, điện thế zeta, kích thước và mật độ hạt). Trong đó, thành phần và tỷ lệ các thành phần tạo nên chế phẩm có tính quyết định đến đặc tính hóa lý.

Trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và CMC đến đặc tính hóa lý của chế phẩm, khả năng tạo rào cản khí và ẩm có ảnh hưởng đến quá trình bảo quản quả chanh leo tím.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Quả chanh leo tím (*Passiflora edulis Sims*) trồng tại Mộc Châu, Sơn La (vĩ độ 20°51' B, kinh độ 104°37' Đ, độ cao 1050 m so với mực nước biển). Cây chanh leo 2 năm tuổi, được thu hoạch ở độ chín 3, tương ứng màu tím của vỏ chiếm 75% bề mặt quả. Quy cách quả có kích thước đồng đều, không sâu bệnh, không bị tổn thương cơ học. Chanh leo được thu hái tại thời điểm tháng 5/2023, vào buổi sáng (7:00-8:00 giờ), mỗi quả được gói bằng lớp giấy báo và đóng trong thùng xốp, vận chuyển về Bộ môn Công nghệ Bảo quản nông sản - Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ Sau thu hoạch trong thời gian không quá 10 giờ, mẫu được bảo quản mát 10±1°C, độ ẩm 90±2°C để tiến hành thí nghiệm và phân tích.

Sáp ong (bee wax): Màu trắng sáng tự nhiên, nhiệt độ nóng chảy từ 61 đến 65°C, chỉ số ester là 77,08 mg/g, axit 18,83 mg/g và xà phòng hóa 95,91 mg/g (Science Union Thái Lan).

Sáp cọ (carnauba wax): Màu vàng sáng tự nhiên, nhiệt độ nóng chảy từ 81 đến 86°C, chỉ số axit 2,6 mg/KOH/g, xà phòng hóa 78-88 mg KOH/g, tinh khiết 99% (Science Union Thái Lan).

Carboxymethyl cellulose sodium salt (CMC): Trọng lượng 500 g/hộp, C₈H₁₆NaO₈, thể dạng bột trắng kem, độ pH (1% dung dịch) từ 6,5 đến 8, độ nhớt (1% dung dịch; 20°C ở dạng khô) 250-350 cps (Oxford, Ấn Độ).

2.1.2. Hóa chất sử dụng

Sử dụng sơ chế xử lý nguyên liệu: Acid propionic (C₃H₆O₂) 99,5% của Đức.

Hóa chất phụ gia sử dụng điều chế chế phẩm tạo màng gồm: axit palmitic - CH₃(CH₂)₁₄COOH 98% và axit oleic - C₁₈H₃₄O₂ (MWt 282,47 g/mol) của Merck (Đức); ammonium hydroxide (NH₄OH) 30,3% của Baker (Mỹ); silicon antifoaming (w/w 30% Silicon), 500 ml của Oxford (Ấn Độ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tạo chế phẩm

Định lượng tỷ lệ sáp ong và sáp cọ theo kế hoạch thực nghiệm phối trộn với 100 ml nước cất → Gia nhiệt đến $90 \pm 1^\circ\text{C}$, khuấy đều 10 phút (duy trì nhiệt độ trong suốt quá trình tạo chế phẩm) → Bổ sung CMC theo tỷ lệ thực nghiệm, khuấy đều 5 phút → Bổ sung chất phụ gia gồm acid Palmitic 1%, acid oleic 6%, ammonium hydroxide 0,64%, chất chống bọt 0,4% và khuấy đều 5 phút → Đồng hóa với tốc độ 21500 v/ph trong thời gian 20 phút → Chế phẩm CMC.

2.2.2. Phương pháp xử lý nguyên liệu chanh leo

Lựa chọn các quả có kích thước và ngoại hình đồng đều, làm sạch sơ bộ bằng nước, tiếp theo được xử lý nấm bệnh bằng dung dịch axit propionic 0,45% trong thời gian 3 phút [20], để ráo nước trước khi tiến hành phủ màng theo kế hoạch thực nghiệm. Các thí nghiệm được chuẩn bị mẫu với cùng khối lượng 1500 ± 10 g/mẫu, tương ứng mỗi thí nghiệm. Tiến hành phủ màng bằng sử dụng chổi sợi lông để nhúng chế phẩm và quét đều trên bề mặt quả, sau đó quả được làm ráo 30 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, xếp quả vào hộp nhựa chuyên dụng (9 lít/hộp/mẫu) và bảo quản ở điều kiện lạnh để tiến hành theo dõi đo đạc theo chu kỳ các thông số công nghệ theo kế hoạch thực nghiệm.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm

Tiến hành thực nghiệm tạo chế phẩm MW-CMC và khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần (sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose) đến đặc tính hóa lý, khả năng bảo quản quả chanh leo tím:

Thực nghiệm 1: Gồm 5 thí nghiệm (TN₁₁, TN₁₂, TN₁₃, TN₁₄, TN₁₅) tương ứng 5 mức tỷ lệ sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%) tính theo tỷ lệ khối lượng/100 ml nước cất phối trộn tạo chế phẩm theo quy trình tạo chế phẩm (mục 2.2.1), các thí nghiệm ở cùng điều kiện tỷ lệ sáp cọ 0,9% và CMC 0,8%.

Thực nghiệm 2: Gồm 5 thí nghiệm (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅) tương ứng 5 mức tỷ lệ sáp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) ở cùng điều kiện như thực nghiệm 1, với cùng tỷ lệ sáp ong được lựa chọn tỷ lệ phù hợp (thực nghiệm 1) và CMC 0,8%.

Thực nghiệm 3: Gồm 5 thí nghiệm (TN₃₁, TN₃₂, TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) tương ứng 5 mức tỷ lệ CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 và 1,2%) ở cùng điều kiện như thực nghiệm 1, với cùng tỷ lệ sáp ong và sáp cọ đã được lựa chọn tỷ lệ phù hợp (thực nghiệm 1 và thực nghiệm 2).

Mục tiêu của 3 nhóm thực nghiệm được đánh giá đặc tính hóa lý của chế phẩm tạo màng MW-CMC với các chỉ tiêu: độ nhớt (cp), pH, điện thế zeta (mV), kích thước thức hạt (μm),

mật độ hạt (triệu/ml). Khả năng bảo quản quả chanh leo gồm các chỉ tiêu: cường độ hô hấp ($\text{ml CO}_2/\text{kg.h}$), mức sản sinh khí ethylen ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$), tỷ lệ hao hụt khối lượng (%) và chất lượng cảm quan (điểm) ở cùng điều kiện nhiệt độ bảo quản $5 \pm 1^\circ\text{C}$ và độ ẩm RH $90 \pm 2\%$.

2.2.4. Xác định đo điện thế zeta, kích thước và mật độ hạt

Phương pháp đo: Sử dụng thiết bị Litesizer 500.

Phương pháp chuẩn bị mẫu: Mẫu được phân tán bằng siêu âm trong 8 giờ ở điều kiện 25°C sau đó dùng micropipet bơm vào cuvet 1 ml rồi tiến hành đo tự động trên thiết bị Litesizer 500.

2.2.5. Chụp ảnh SEM (Scanning Electronic Microscopy)

Bằng kính hiển vi điện tử quét phân giải cao Hitachi S-4800 (Nhật Bản) độ phóng đại có thể thay đổi từ 10 đến 100.000 lần. Mẫu chế phẩm được phân tán bằng siêu âm trong 8 giờ ở điều kiện 25°C , tiếp sau dùng micropipet bơm lên tấm lưới Pt và làm khô mẫu rồi tiến hành chụp FE-SEM ở các điều kiện phóng đại, thang đo khác nhau thu lại ảnh và lưu kết quả ở dạng ảnh.

2.2.6. Xác định cường độ hô hấp và sản sinh khí ethylene

Phương pháp đo và tính toán theo [21]: Sử dụng hộp nhựa kín đựng mẫu hiệu Lock & Lock, dung tích 9 lít có gắn các đầu siptm để rút mẫu khí. Máy đo nồng độ khí O_2 và CO_2 tương ứng dải đo O_2 (0,001-100%) và CO_2 (0,1-100%) hiệu analyzer 6600, ILLINOIS (Mỹ); máy đo khí ethylene hiệu FELIX-F-960 (Mỹ) phạm vi dải đo 0-1000 ppm.

$$R_{\text{CO}_2} = \frac{(Y_{\text{CO}_2}^c - Y_{\text{CO}_2}^d) V}{100 \cdot W (t_c - t_d)} \quad (1)$$

$$R_{\text{C}_2\text{H}_4} = \frac{(Y_{\text{C}_2\text{H}_4}^c - Y_{\text{C}_2\text{H}_4}^d) V}{100 \cdot W (t_c - t_d)} \quad (2)$$

trong đó: R_{CO_2} là cường độ hô hấp tính theo CO_2 ($\text{ml CO}_2/\text{kg.h}$); $R_{\text{C}_2\text{H}_4}$ là cường độ sản sinh khí C_2H_4 ($\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$); $Y_{\text{CO}_2}^c$, $Y_{\text{CO}_2}^d$ là nồng độ khí CO_2 thời điểm đầu và cuối (%); $Y_{\text{C}_2\text{H}_4}^c$, $Y_{\text{C}_2\text{H}_4}^d$ là nồng độ khí C_2H_4 thời điểm đầu và cuối (ppm); W là khối lượng quả (kg); V là thể tích không khí chiếm chỗ trong bình đo mẫu (ml); t_c : thời gian cuối; t_d : thời gian đầu.

2.2.7. Phương pháp xác định tỷ lệ hao hụt khối lượng

Tính theo công thức: Tỷ lệ hao hụt = $\frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100\%$

trong đó: m_1 là khối lượng mẫu quả chanh leo ban đầu (g); m_2 là khối lượng mẫu chanh leo trong quá trình bảo quản (g).

2.2.8. Đánh giá chất lượng cảm quan quả chanh leo

Dựa trên cơ sở các TCVN 3215:1979 và TCVN 3216:1979 bằng lập hội đồng chấm điểm: Hội đồng gồm 5 người là nghiên cứu viên và kỹ thuật viên cùng nghiên cứu sinh của Bộ môn Bảo quản nông sản thực phẩm, Viện Cơ điện Nông nghiệp và Công nghệ Sau thu hoạch. Tiến hành các bước thống nhất thuật ngữ mô tả, huấn luyện hội đồng với 4 chỉ tiêu đánh giá gồm màu sắc và trạng thái vỏ quả, mùi và vị thịt của quả chanh leo. Các chỉ tiêu được đánh giá riêng rẽ bằng mô tả đối với màu sắc, trạng thái và thử nếm với mùi và vị theo thang 5 điểm, điểm cao nhất là 5, điểm thấp nhất là 1. Với đặc tính của quả chanh leo dễ bị mất nước dẫn đến biến đổi trạng thái do nhăn vỏ, mất khác cường độ hô hấp lớn dẫn đến tốc độ già hóa nhanh làm biến đổi màu sắc vỏ quả, trong khi ức chế cường độ hô hấp thấp quá còn gây nên hiện tượng yếm khí dẫn đến biến đổi mùi vị thịt quả làm giảm chất lượng cảm quan. Nguyên tắc chấm điểm dựa trên hệ số quan trọng theo mức độ ưu tiên (HSQT): Trạng thái (1,2), màu sắc (1,0), mùi (0,9) và vị (0,9). Mức xếp loại theo tổng điểm: tốt (18,2-20), khá (15,2-18,1), trung bình (11,2-15,1), kém (7,2-11,1), hỏng <7,2.

2.2.9. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý theo phương pháp thống kê bằng chương trình thống kê trong Excel 2016 và phương pháp phân tích phương sai ANOVA, sự khác biệt giữa các giá trị dùng kiểm định Duncan ($p < 0,05$) bằng chương trình SPSS 18.

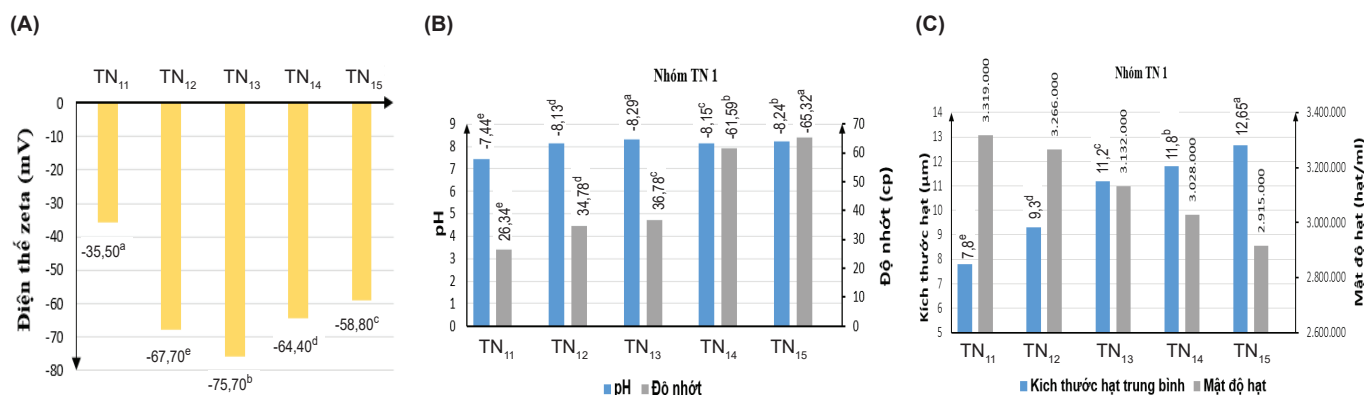
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến đặc tính hóa lý và cấu trúc của chế phẩm phủ màng sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose

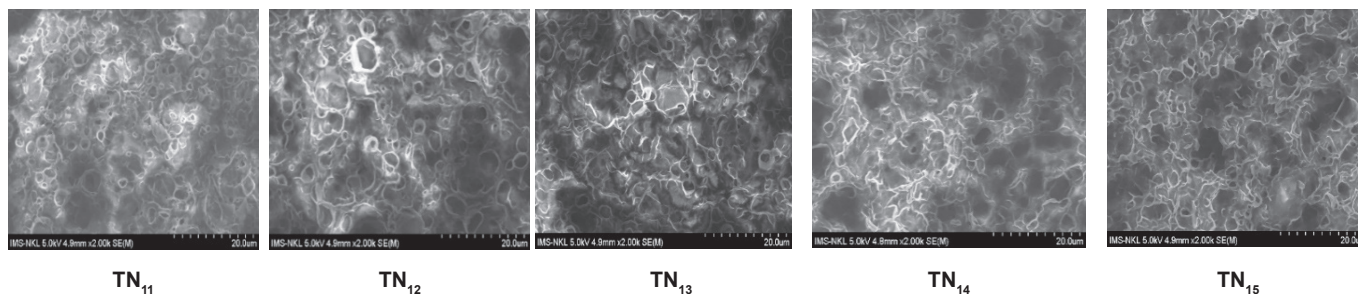
3.1.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sáp ong đến đặc tính hóa lý và cấu trúc của chế phẩm

Tổng hợp số liệu phân tích mẫu (TN_{11} , TN_{12} , TN_{13} , TN_{14} , TN_{15}) tương ứng tỷ lệ sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%) với các tỷ lệ sáp cọ (0,9%) và CMC (0,8%) thể hiện tại hình 1.

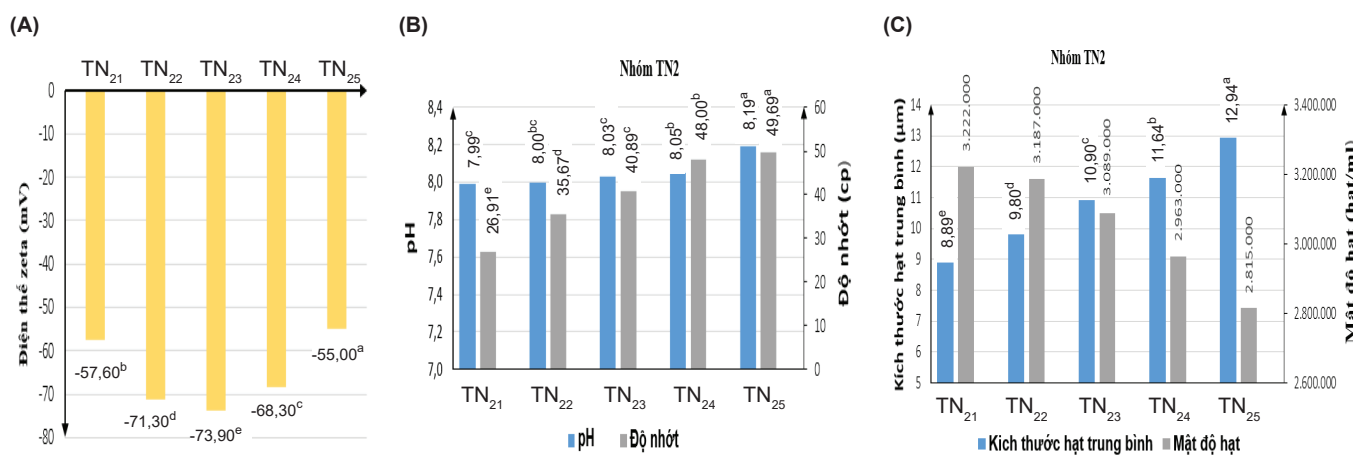
Quan sát hình 1A tất cả 5 mẫu thí nghiệm đều có độ ổn định khá tốt do có giá trị điện thế zeta $|\zeta| \geq 35,5$ mV (so với mức tối thiểu $|\zeta| \geq 20$ mV để đảm bảo độ ổn định). Trong đó, mẫu TN_{13} (2%) có độ ổn định cao nhất với điện thế zeta -75,7 mV và mẫu TN_{11} (1%) có độ ổn định thấp nhất (-35,5 mV). Khi tỷ lệ sáp ong tăng từ 1 đến 2% thì giá trị điện thế zeta tăng -5,5 đến -75,7 mV, ngược lại khi tỷ lệ sáp ong tăng từ 2 đến 3% thì điện thế Zeta có xu hướng giảm từ -75,7 xuống -58,8 mV. Điều này có thể lý giải với tỷ lệ sáp ong khoảng 2% là lượng vừa đủ để ổn định hệ gel đồng nhất và bền vững, trong khi với các mẫu có tỷ lệ sáp ong >2% hoặc <2% dẫn đến lượng sáp ong dư thừa hoặc thiếu làm giảm khả năng liên kết với các cấu tử tạo gel màng. Mặt khác quan sát hình 1B cho thấy, độ nhớt tỷ lệ thuận với tỷ lệ sáp ong và ổn định trong khoảng pH 7,4-8,2. Khi tỷ lệ sáp ong tăng từ 1 đến 2% thì độ nhớt duy trì mức tương đối thấp từ 26,34 đến 36,78 cp; trong khi tiếp tục tăng tỷ lệ sáp ong lên 2,5-3% thì độ nhớt tăng nhanh lên 61,59 đến 65,32 cp, điều này chứng tỏ lượng sáp ong trong hỗn hợp dư có thể tạo đặc làm tăng độ nhớt.



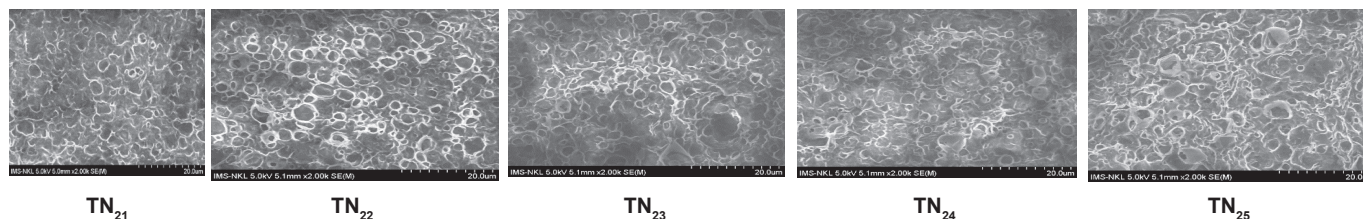
Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong đến đặc tính hóa lý của chế phẩm sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose. (A) Điện thế zeta (mV); (B) pH và độ nhớt; (C) Kích thước và mật độ hạt. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN1: thực nghiệm 1.



Hình 2. Ảnh kính hiển vi điện tử quét của các mẫu chế phẩm MW-CMC với tỷ lệ sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%).



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ saponin đến đặc tính hóa lý của chế phẩm saponin, saponin và carboxymethyl cellulose. (A) Điện thế zeta (mV); **(B)** pH và độ nhớt; **(C)** Kích thước và mật độ hạt. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN2: thực nghiệm 2.



Hình 4. Ảnh kính hiển vi điện tử quét của mẫu chế phẩm saponin, saponin và carboxymethyl cellulose với tỷ lệ saponin (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%).

Quan sát hình ảnh SEM (hình 2) tương ứng mẫu 5 thí nghiệm cho thấy cấu trúc vật liệu dạng hạt tựa cầu với kích thước đồng đều và có khoang rỗng. Mặt khác, quan sát hình 1C theo số liệu xác định bằng máy phân tích hạt thì kích thước hạt trung bình trong khoảng 7,8-12,65 μm , tương ứng mật độ hạt 2,9-3,3 triệu hạt/ml.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ saponin đến đặc tính hóa lý và cấu trúc của chế phẩm

Tổng hợp số liệu phân tích mẫu (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅) tương ứng tỷ lệ saponin (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) với tỷ lệ saponin (2%) và CMC (0,8%) thể hiện tại hình 3.

Quan sát hình 3A cho thấy, cả 5 mẫu thí nghiệm đều có độ ổn định cao với giá trị điện thế zeta $|\zeta| \geq 55$ mV. Trong đó, mẫu TN₂₃ (0,9%) có độ ổn định cao nhất (-73,9 mV) và mẫu TN₂₅ (1,5%) có độ ổn định thấp nhất (-55 mV). Trong khoảng tỷ lệ saponin 0,6-1,2% tương ứng điện thế Zeta từ -71,3 đến -68,3 mV là miền có tính ổn định cao hơn so với các mức tỷ lệ saponin $< 0,6\%$ và $> 1,2\%$. Điều này có thể lý giải tương tự như đối với tỷ lệ saponin. Mặt khác quan sát hình 3B cho thấy, tỷ lệ saponin có ảnh hưởng tỷ lệ thuận với độ nhớt, khi tăng tỷ lệ saponin 0,3-1,5% thì độ nhớt tăng từ 26,91 đến 49,69 cp và ổn định trong khoảng pH 7,9-8,19.

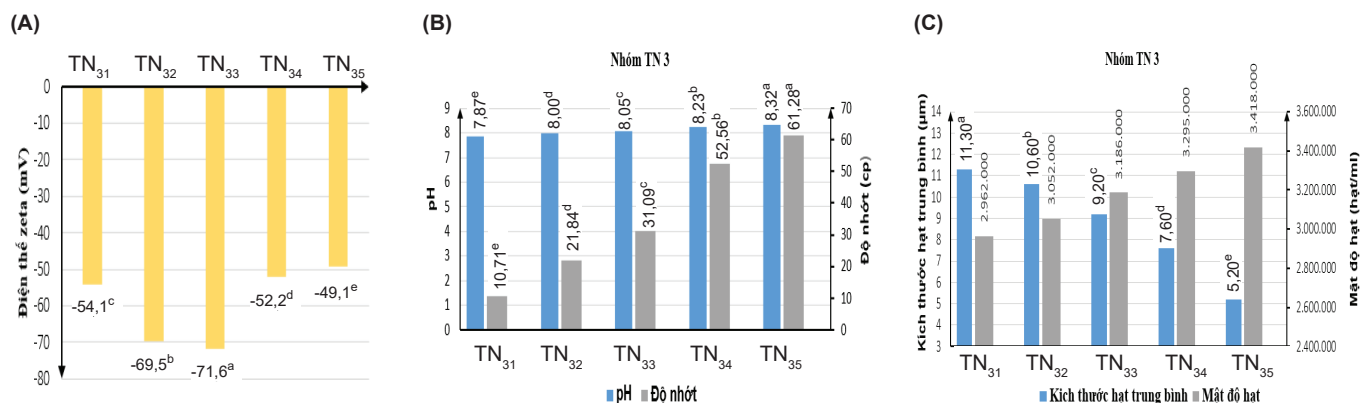
Quan sát ảnh SEM (hình 4) cho thấy, cấu trúc thể vật liệu dạng hạt tựa cầu với kích thước đồng đều và có khoang rỗng. Kích thước và phân bố mật độ hạt theo xác định bằng máy phân

tích hạt được thể hiện tại hình 3C trong khoảng 8,8-12,9 μm , tương ứng mật độ hạt 2,8-3,2 triệu hạt/ml so với quan sát trên hình ảnh SEM là có sự tương đồng và tương đối đồng đều.

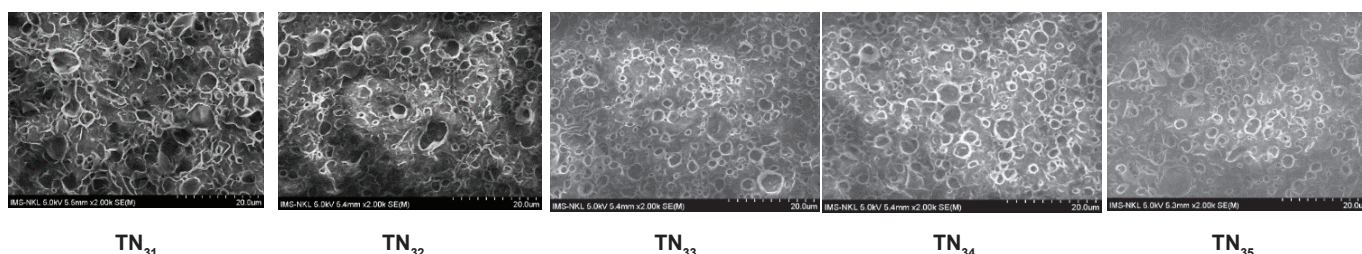
3.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ carboxymethyl cellulose đến đặc tính hóa lý và cấu trúc của chế phẩm

Tổng hợp số liệu phân tích mẫu (TN₃₁, TN₃₂, TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) tương ứng tỷ lệ CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1,0 và 1,2%) với các tỷ lệ saponin (2%) và saponin (0,9%) thể hiện tại hình 5.

Quan sát hình 5A tương tự như đối với saponin và saponin cho thấy, cả 5 mẫu thí nghiệm đều có độ ổn định cao với giá trị điện thế zeta $|\zeta| \geq 49,1$ mV. Trong đó, các mẫu TN₃₂ và TN₃₃ có độ ổn định cao hơn cả (-69,5 và -71,6 mV), trong khi các mẫu còn lại có độ ổn định thấp hơn nhiều (-54,1, -52,2 và -49,1 mV) tương ứng các mẫu thí nghiệm TN₃₁, TN₃₄, TN₃₅. Qua đo cho thấy, tỷ lệ CMC $\leq 0,8\%$ thì chế phẩm có tính ổn định cao hơn đáng kể so với các mẫu có tỷ lệ CMC $> 0,8\%$. Mặt khác, quan sát hình 5B cho thấy tỷ lệ CMC có ảnh hưởng mạnh đến độ nhớt, với tỷ lệ CMC 0,4-0,8% thì độ nhớt tăng từ 10,71 đến 31,09 cp, trong khi tăng tỷ lệ CMC (1,0-1,2%) thì độ nhớt tăng mạnh từ 52,56 đến 61,28 cp và ổn định trong khoảng pH 7,8-8,3. Điều này là phù hợp với sự phân tán của các hạt nano CMC lên bề mặt và các khoang rỗng được tạo ra từ các hạt saponin và saponin (kích thước μm) tạo khung cellulose liên kết với các hạt saponin và saponin có tác dụng như chất điều chỉnh độ nhớt, tạo đặc và ổn định nhũ tương [18, 19].



Hình 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ carboxymethyl cellulose đến đặc tính hóa lý của chế phẩm sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose. (A) Điện thế zeta (mV); **(B)** pH và độ nhớt; **(C)** Kích thước và mật độ hạt. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN3: thực nghiệm 3.



Hình 6. Ảnh kính hiển vi điện từ quét của chế phẩm tạo màng chế phẩm sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose với carboxymethyl cellulose (0,4, 0,6, 0,8, 1 và 1,2%).

Quan sát ảnh SEM (hình 6) cho thấy, cấu trúc thể vật liệu dạng hạt tựa cầu với kích thước đồng đều và có khoang rỗng. Kích thước và phân bố mật độ hạt theo xác định bằng máy phân tích hạt được thể hiện tại hình 5C trong khoảng 5,2-11,3 μm, tương ứng mật độ hạt 2,9-3,4 triệu hạt/ml so với quan sát trên hình ảnh SEM là có sự tương đồng và tương đối đồng đều.

Từ kết quả khảo sát sơ bộ trên cho thấy, đặc tính hóa lý của chế phẩm tạo màng MW-CMC có tính ổn định khá cao tương ứng tỷ lệ sáp ong (1,5-2,5%), sáp cọ (0,6-1,2%) và CMC (0,4-0,8%). Trong đó, các mẫu thí nghiệm có tỷ lệ sáp ong (2%), sáp cọ (0,9%) và CMC (0,6%) thể hiện tính ổn định cao nhất: điện thế Zeta từ -69,5 đến -75,7 mV, pH 8-8,2, độ nhớt 21,84-40,89 cp, kích thước hạt trung bình 10,6-11,2 μm và mật độ hạt 3,0-3,1 triệu hạt/ml.

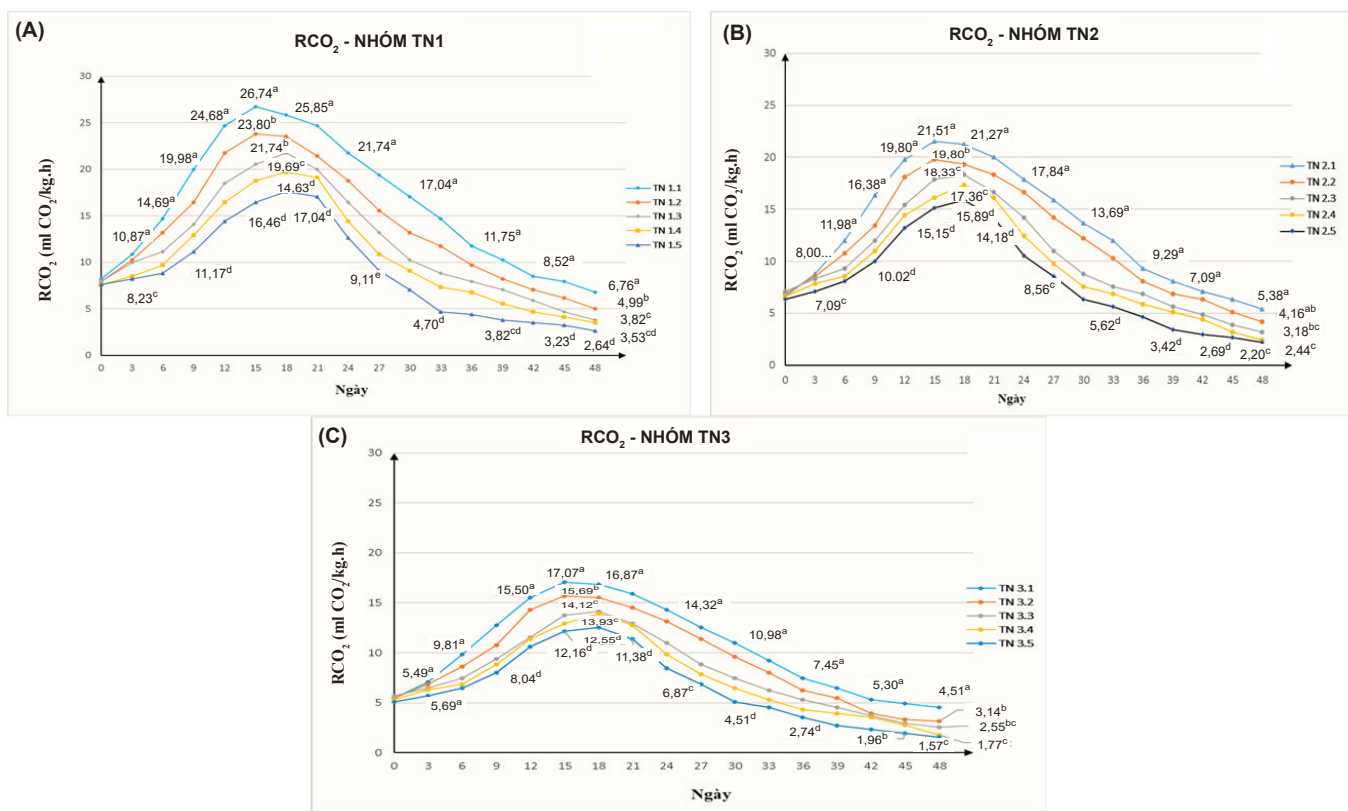
3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến sự biến đổi sinh lý và chất lượng cảm quan của quả chanh leo trong quá trình bảo quản

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến cường độ hô hấp

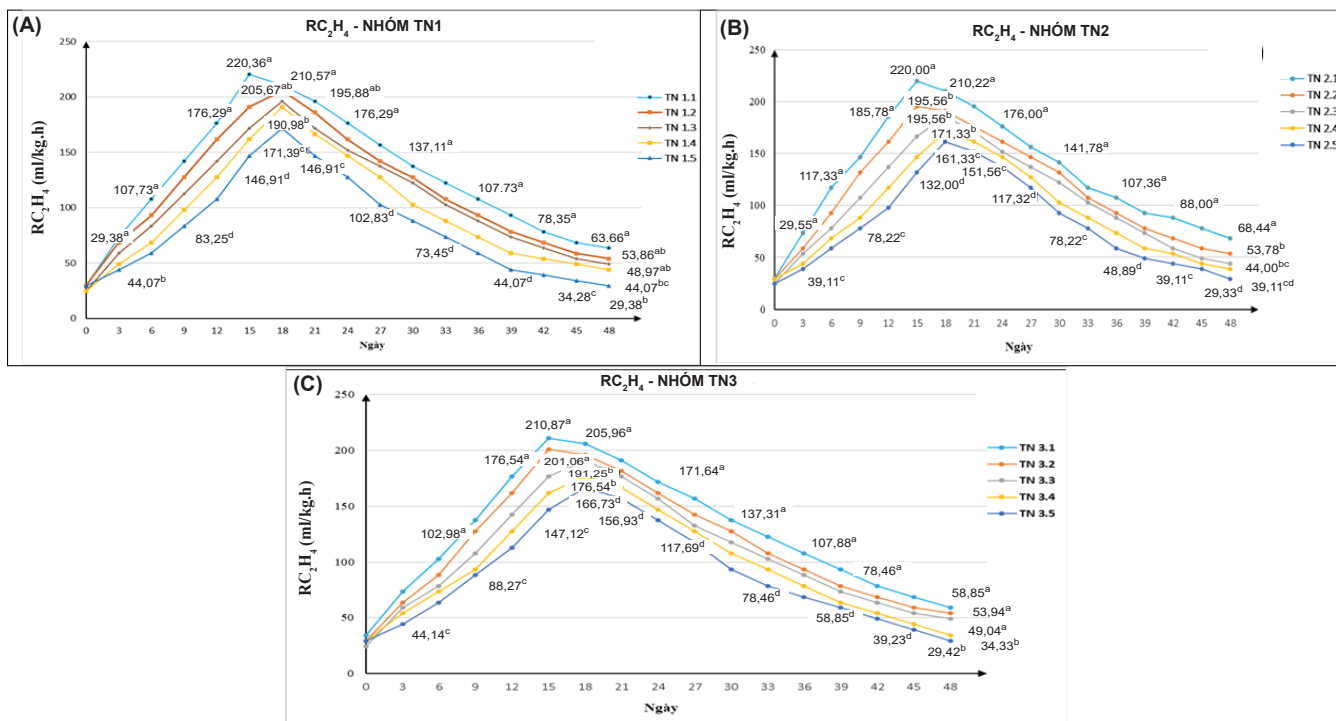
Quan sát hình 7 biểu diễn quan hệ giữa cường độ hô hấp với các biến độc lập gồm tỷ lệ thành phần sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%), sáp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) và CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1 và 1,2%) ở cùng điều kiện chung cố định 2 yếu tố còn lại tại tâm cho thấy:

Cường độ hô hấp của quả chanh leo sau phủ màng tỷ lệ nghịch với tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và CMC, khi tăng tỷ lệ của 1 trong 3 thành phần thì cường độ hô hấp đều giảm và ngược lại, mật khác thời điểm đạt đỉnh cường độ hô hấp của mỗi thí nghiệm là khác nhau, đối với các thí nghiệm có khả năng ức chế hô hấp mạnh hơn tức cường độ hô hấp thấp hơn, thì thời điểm đạt đỉnh kéo dài ngày hơn và ngược lại. Cụ thể, khi tăng tỷ lệ sáp ong từ 1 đến 3% tương ứng 5 thí nghiệm (TN₁₁, TN₁₂, TN₁₃, TN₁₄, TN₁₅) thì đỉnh cường độ hô hấp đạt (26,74, 23,8, 21,74, 19,69 và 17,63 ml CO₂/kg.h). Tương tự khi tăng sáp cọ (0,3-1,5%) và CMC (0,4-1,2%) tương ứng (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅) đạt đỉnh (21,51, 19,8, 18,53, 17,36 và 15,89 ml CO₂/kg.h) và (TN₃₁, TN₃₂, TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) đạt đỉnh (17,07, 15,69, 14,12, 13,92 và 12,55 ml CO₂/kg.h) với thời điểm đạt đỉnh cường độ hô hấp của 3 nhóm thí nghiệm từ ngày 15 đến ngày 18. Từ kết quả thực nghiệm này cho thấy, sáp ong, sáp cọ và CMC đều có tác động tương hỗ lẫn nhau để tạo nên rào cản khí, ức chế quá trình hô hấp của quả chanh leo.

Từ kết quả khảo sát thể hiện trong khoảng miền biến thiên tỷ lệ sáp ong (1,5-2,5%), sáp cọ (0,6-1,2%) và CMC (0,4-0,8%) thì đỉnh cường độ hô hấp lớn nhất là 23,08 ml CO₂/kg.h (TN₁₂) và thấp nhất 14,12 ml CO₂/kg.h (TN₃₃) so với công bố của R.E. Paull và cs (2004) [1], mức cường độ hô hấp của quả chanh leo 29-349 mg CO₂/kg.h ở nhiệt độ từ 5-25°C đã có xu hướng giảm đáng kể.



Hình 7. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sáp ong (A), sáp cọ (B) và carboxymethyl cellulose (C) đến cường độ hô hấp. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN1: thực nghiệm 1; TN2: thực nghiệm 2; TN3: thực nghiệm 3.



Hình 8. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sáp ong (A), sáp cọ (B) và carboxymethyl cellulose (C) đến cường độ sản sinh khí ethylene. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN1: thực nghiệm 1; TN2: thực nghiệm 2; TN3: thực nghiệm 3.

3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ sấp ong, sấp cọ và carboxymethyl cellulose đến sản sinh khí ethylene

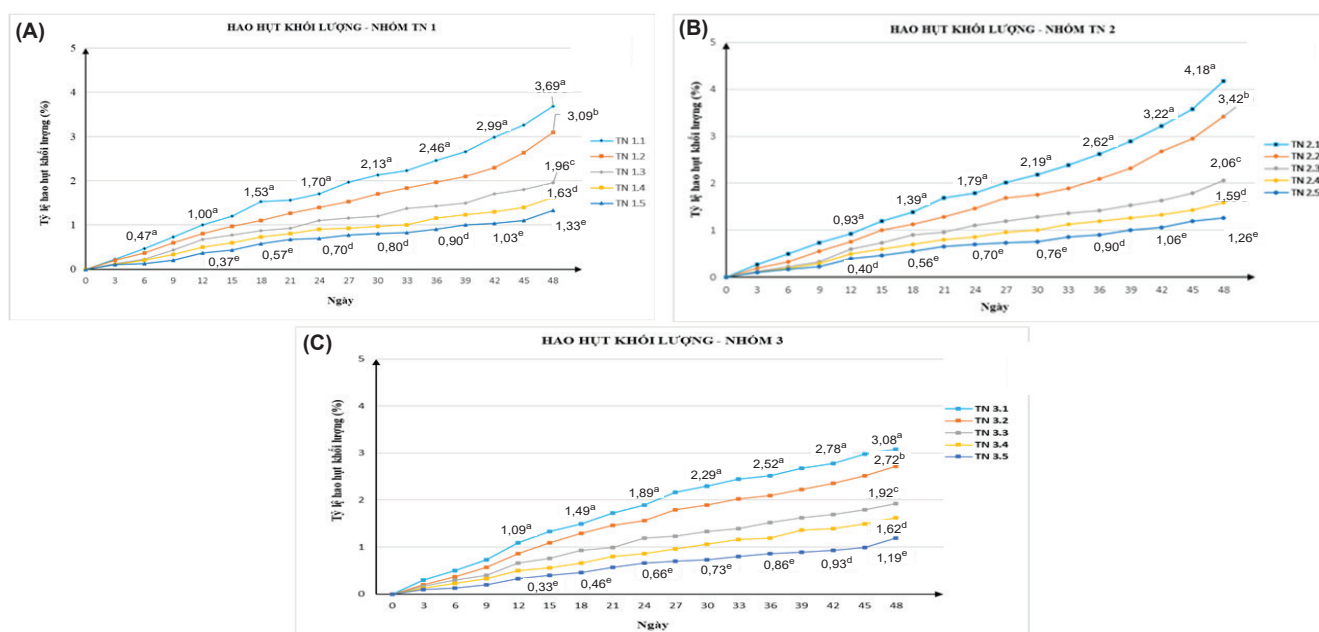
Tương tự quan sát hình 8 biểu diễn quan hệ giữa cường độ sản sinh khí ethylene với các biến độc lập gồm tỷ lệ thành phần sấp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%), sấp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) và CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1 và 1,2%) ở cùng điều kiện chung cố định 2 yếu tố còn lại tại tâm cho thấy:

Quy luật biến thiên cường độ sản sinh khí ethylene cũng như cường độ hô hấp là tỷ lệ nghịch với tỷ lệ thành phần sấp ong, sấp cọ và CMC và thời điểm đạt đỉnh cường độ sản sinh khí ethylene sớm hơn với các thí nghiệm có tỷ lệ thành phần thấp hơn và ngược lại. Cụ thể khi tăng tỷ lệ sấp ong từ 1 đến 3% tương ứng 5 thí nghiệm (TN₁₁, TN₁₂, TN₁₃, TN₁₄, TN₁₅) thì đỉnh cường độ sản sinh khí ethylene đạt (220,36, 205,67, 195,88, 190,98 và 171,39 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$). Tương tự, khi tăng tỷ lệ sấp cọ (0,3-1,5%) và CMC (0,4-1,2%) tương ứng (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅) đạt đỉnh (220,0, 195,56, 185,78, 171,11 và 161,33 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$) và (TN₃₁, TN₃₂, TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) đạt đỉnh (210,87, 201,06, 191,25, 176,54 và 166,73 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$) với thời điểm đạt đỉnh của cả 3 nhóm thí nghiệm từ khoảng ngày 15 đến ngày 18. Từ kết quả thực nghiệm này cho thấy, sấp ong, sấp cọ và CMC là có tác động tương hỗ lẫn nhau để tạo nên rào cản khí và ức chế quá trình sản sinh khí ethylene. Tương ứng miền phù hợp của tỷ lệ thành phần sấp ong (1,5-2,5%), sấp cọ (0,6-1,2%) và CMC (0,4-0,8%) cho thấy đỉnh cường độ khí ethylene lớn nhất là 205,67 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$ (TN₁₂) và thấp nhất 191,25 $\mu\text{l C}_2\text{H}_4/\text{kg.h}$ (TN₃₃).

3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ sấp ong, sấp cọ và carboxymethyl cellulose đến hao hụt khối lượng

Quan sát hình 9 biểu diễn quan hệ của tỷ lệ hao hụt khối lượng với sự biến thiên của các biến độc lập gồm tỷ lệ sấp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%), sấp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) và CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1 và 1,2%) ở cùng điều kiện chung cố định 2 yếu tố còn lại tại tâm cho thấy:

Tỷ lệ hao hụt khối lượng của quả chanh leo trong quá trình bảo quản tỷ lệ nghịch với tỷ lệ thành phần của sấp ong, sấp cọ và CMC, khi tăng tỷ lệ của 1 trong 3 thành phần thì tỷ lệ hao hụt khối lượng đều có xu hướng giảm trong suốt quá trình bảo quản và ngược lại. Cụ thể, khi tăng tỷ lệ sấp ong từ 1 đến 3% tương ứng 5 thí nghiệm (TN₁₁, TN₁₂, TN₁₃, TN₁₄, TN₁₅) thì tỷ lệ hao hụt khối lượng tính đến ngày thứ 48 là (3,69, 3,09, 1,96, 1,63 và 1,33%). Tương tự, khi tăng tỷ lệ sấp cọ (0,3-1,5%) và CMC (0,4-1,2%) tương ứng (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅) tỷ lệ hao hụt khối lượng (4,18, 3,42, 2,06, 1,59 và 1,26%) và (TN₃₁, TN₃₂, TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) là (3,08, 2,72, 1,92, 1,62 và 1,19%). Từ kết quả thực nghiệm cho thấy, sấp ong và sấp cọ đều có khả năng tại rào cản nước, trong đó khả năng ngăn nước của sấp cọ cao hơn sấp ong, trong khi CMC dạng nano lại có tác động tương hỗ và có ảnh hưởng đáng kể về khả năng ngăn cản sự thâm nước nhờ đặc tính hóa lý và cấu trúc khi liên kết với các hạt sấp ong và sấp cọ. Trong đó, với miền phù hợp của sấp ong (1,5-2,5%), sấp cọ (0,6-1,2%) và CMC (0,4-0,8%) cho thấy mức hao hụt khối lượng thấp nhất là 1,92% (TN₃₃) và cao nhất 3,42% (TN₂₂).



Hình 9. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sấp ong (A), sấp cọ (B) và CMC (C) đến hao hụt khối lượng. Các công thức khác nhau trong cùng một đại lượng xác định có các chữ cái khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$. TN1: thực nghiệm 1; TN2: thực nghiệm 2; TN3: thực nghiệm 3.

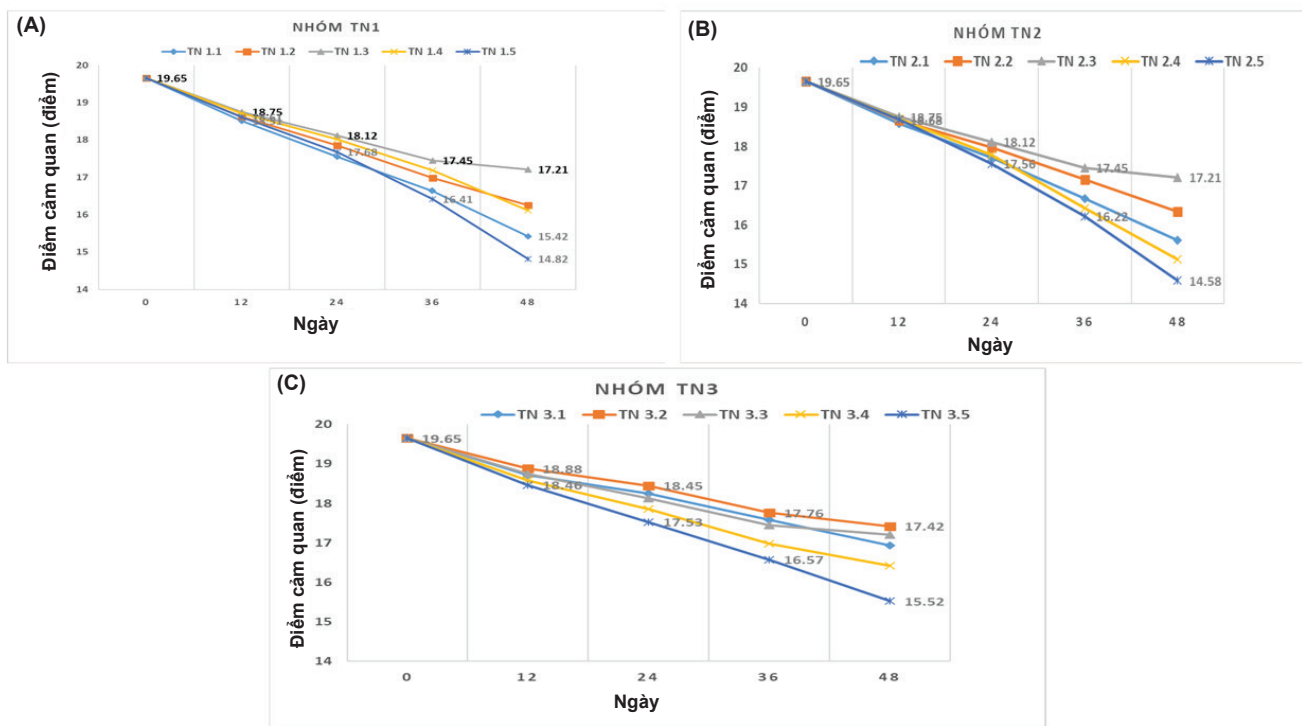
3.2.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến chất lượng cảm quan

Quan sát hình 10 biểu diễn quan hệ của chất lượng cảm quan với sự biến thiên của các biến độc lập gồm tỷ lệ sáp ong (1, 1,5, 2, 2,5 và 3%), sáp cọ (0,3, 0,6, 0,9, 1,2 và 1,5%) và CMC (0,4, 0,6, 0,8, 1 và 1,2%) ở cùng điều kiện chung cố định 2 yếu tố còn lại tại tâm cho thấy:

Chất lượng cảm quan của quả chanh leo trong quá trình bảo quản có ảnh hưởng đáng kể của tỷ lệ thành phần sáp ong, sáp cọ và CMC. Tại hình 10A và 10B cho thấy, sáp ong và sáp cọ có quy luật khá tương đồng, khi tăng tỷ lệ sáp ong từ 1 đến 2% và tỷ lệ sáp cọ từ 0,3 đến 0,9%, tương ứng 2 nhóm thí nghiệm (TN₁₁, TN₁₂, TN₁₃) và (TN₂₁, TN₂₂, TN₂₃) thì chất lượng cảm quan đều có xu hướng duy trì ở mức cao hơn so với các thí nghiệm tăng nồng độ sáp ong từ 2 đến 3% (TN₁₃, TN₁₄, TN₁₅) và nồng độ sáp cọ tăng từ 0,9 đến 1,5% (TN₂₃, TN₂₄, TN₂₅). Cụ thể, chất lượng cảm quan duy trì ở mức cao nhất tại các thí nghiệm trung tâm (TN₁₃, TN₂₃) đến ngày 48 đạt 17,21 điểm. Điều này có thể lý giải rằng, sáp ong và sáp cọ là 2 thành phần chính đóng vai trò vật liệu nền là lớp rào cản khí và hơi nước, ở các mức tỷ lệ thành phần thấp quá chưa đủ mật độ để tạo lớp ngăn cản khí và ẩm dẫn đến bề mặt quả bị co ngót do mất nước tự nhiên và sự mất nước do quá trình hô hấp với cường độ mạnh hơn. Ngược lại, khi tăng tỷ lệ sáp ong và sáp cọ cao hơn có thể tạo ra lớp rào cản khí và ẩm cao bền vững hơn dẫn đến quá trình hô hấp yếm khí dưới mức giới hạn để các phản ứng sinh hóa xảy ra để duy trì quá trình trao đổi chất và nuôi sống tế bào, từ đó

gây ra sự biến đổi về màu sắc và mùi vị làm giảm chất lượng cảm quan. Trong khi quan sát hình 10C cho thấy, khi tăng tỷ lệ CMC từ 0,4 (TN₃₁) đến 0,6% (TN₃₂) thì chất lượng cảm quan duy trì ở mức cao nhất là 17,42 điểm (ngày 48), mặt khác khi tiếp tục tăng tỷ lệ CMC từ 0,6 đến 1,2% (TN₃₃, TN₃₄, TN₃₅) thì chất lượng cảm quan giảm mạnh. Điều này là phù hợp với cấu trúc và tính năng của vật liệu nano CMC, với tỷ lệ CMC thấp trong khoảng (0,4-0,6%) là mật độ vừa đủ để liên kết với các hạt sáp ong và sáp cọ tạo nên lớp màng mỏng dạng khung cellulose vững chắc mà vẫn duy trì được khả năng trao đổi khí và ẩm, ngược lại khi tăng tỷ lệ CMC có thể làm thay đổi trạng thái đồng đặc và độ nhớt của chế phẩm dẫn đến làm tăng độ dày lớp màng phủ, đồng nghĩa với khả năng tạo rào cản khí và ẩm cao hơn, tuy rằng có thể hạn chế hao hụt khối lượng nhưng chất lượng cảm quan suy giảm do hô hấp yếm khí.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần tạo chế phẩm MW-CMC và thử nghiệm bảo quản quả chanh leo ở điều kiện (5±1°C và độ ẩm RH 90±2%) cho thấy, tỷ lệ thành phần sáp ong (1,5-2,5%), sáp cọ (0,6-1,2%) và CMC (0,4-0,8%) là phù hợp với: Cường độ hô hấp đạt đỉnh 14,12-23,08 ml CO₂/kg.h trong thời điểm từ ngày 15 đến ngày 18, tương ứng cường độ khí ethylene 191,25-205,67 µl C₂H₄/kg.h; tỷ lệ hao hụt khối lượng 1,92-3,42%. Khả năng duy trì chất lượng cảm quan tốt nhất đến ngày 48 đạt 17,42 điểm. Đánh giá so sánh với một số kết quả nghiệm cứu đã công bố cường độ hô hấp và sản sinh khí ethylene giảm khi nhiệt độ bảo quản thấp hơn, mặt khác tỷ lệ hao hụt khối lượng tăng theo thời gian bảo quản và phụ thuộc



Hình 10. Ảnh hưởng của tỷ lệ thành phần sáp ong (A), sáp cọ (B) và carboxymethyl cellulose (C) đến chất lượng cảm quan. TN1: thực nghiệm 1; TN2: thực nghiệm 2; TN3: thực nghiệm 3.

vào nhiệt độ bảo quản và phương pháp ức chế quá trình hô hấp. Cụ thể, ở nhiệt độ 5-25°C, cường độ hô hấp khoảng 29-349 mg CO₂/kg.h [1]. Trong khi nghiên cứu xác định cường độ sản sinh khí ethylene và hao hụt khối lượng theo nhiệt độ và thời gian bảo quản quả chanh leo tím 221,26-505,35 µl C₂H₄/kg.h (20°C), hao hụt khối lượng 8,8% (8°C, 21 ngày) và 26,84% (20°C, 30 ngày) [3, 4]. Mặt khác, nghiên cứu khác bảo quản quả chanh leo tím bằng xử lý 1 µl/l 1-MCP kết hợp với chitosan 1% (w/v) trong thời gian 25 ngày ở 4°C thì hao hụt khối lượng là 13,11% [12]. Tiếp theo nghiên cứu bảo quản quả chanh leo tím bằng phủ màng chitosan ở nhiệt độ 8±1°C trong 25 ngày, hao hụt khối lượng ít nhất là 19,53% [13]. Kết quả bước đầu cho thấy, chế phẩm MW-CMC là có khả năng ứng dụng hiệu quả trong bảo quản quả chanh leo tím với thời gian kéo dài hơn và tỷ lệ hao hụt thấp hơn, cần tiếp tục nghiên cứu và tối ưu hóa tỷ lệ thành phần của chế phẩm để cải thiện chức năng nhằm nâng cao hiệu quả bảo quản.

4. Kết luận

Tỷ lệ thành phần chế phẩm MW-CMC ổn định trong khoảng sấp ong 1,5-2,5%, sấp cò 0,6-1,2% và CMC 0,4-0,8%. Đặc tính hóa lý của chế phẩm ổn định với pH 7,8-8,2, độ nhớt 10,31-61,59 cp, điện thế zeta tối thiểu $|\zeta| > 54,1$ mV, kích thước hạt 9,2-11,8 µm tương ứng mật độ hạt 2,9-3,2 triệu hạt/ml. Kết quả thử nghiệm bảo quản quả chanh leo tím ở điều kiện lạnh (5±1°C và độ ẩm RH 90±2%) cho thấy: Cường độ hô hấp đạt đỉnh 14,12-23,08 ml CO₂/kg.h vào ngày 15 đến ngày 18, tương ứng cường độ sản sinh khí ethylene 191,25-205,67 µl C₂H₄/kg.h; tỷ lệ hao hụt khối lượng 1,92-3,42%; khả năng duy trì chất lượng cảm quan tốt nhất đến ngày 48 đạt 17,42 điểm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] R.E. Paull, C.C. Chen (2004), *The Commercial Storage of Fruits Vegetables and Florist and Nursery Stocks*, United States Department of Agriculture, 792pp.

[2] W.C. Schotsmans, S.E. Nicholson, S. Pinnamaneni, et al. (2008), "Quality changes of purple passion fruit (*Passiflora edulis*) during storage", *Acta Horticulturae*, **773**, pp.239-244, DOI: 10.17660/actahortic.2008.773.

[3] A. Pongener, V. Sagar, R. Pal, et al. (2014), "Physiological and quality changes during postharvest ripening of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)", *Fruits*, **69**(1), pp.19-30, DOI: 10.1051/fruits/2013097.

[4] K. Kishore, K.A. Pathak, R. Shukla, et al. (2011), "Effect of storage temperature on physico-chemical and sensory attributes of purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)", *J. Food Sci. Technol.*, **48**, pp.484-488, DOI: 10.1007/s13197-010-0189-8.

[5] S.M.K. Hasan, G. Ferrentino, M. Scampicchio (2019), "Nanoemulsion as advanced edible coatings to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables: A review", *Int. J. Food Sci. Technol.*, pp.1-10, DOI: 10.1111/ijfs.14273.

[6] S.A.V. Chamorro, L. Palou, M.A.D. Rio, et al. (2011), "Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **51**(9), pp.872-900, DOI: 10.1080/10408398.2010.485705.

[7] M.L.Z. Zaragoza, R.G. Reza, N.M. Munoz, et al. (2018), "Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation", *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(705), pp.1-24, DOI: 10.3390/ijms19030705.

[8] A. Gonçalves, N. Nikmaram, S. Roohinejad, et al. (2018), "Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries", *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **538**, pp.108-126, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.10.076.

[9] M. Kumar, R.S. Bishnoi, A.K. Shukla, et al. (2019), "Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: A review", *Prev. Nutr. Food Sci.*, **24**(3), pp.225-234, DOI: 10.3746/pnf.2019.24.3.225.

[10] R. Zhang, W. Lan, J. Ding, et al. (2019), "Effect of PLA/PBAT antibacterial film on storage quality of passion fruit during the shelf-life", *Molecules*, **24**(18), DOI: 10.3390/molecules24183378.

[11] L.I. Xingyan, H. Lijin, L. Hanmei, et al. (2023), "Effect of chitosan coating with different molecular weights on the storage quality of postharvest passion fruit (*Passiflora edulis* Sims)", *Shipin Gongye Ke-ji*, **44**(22), pp.319-326, DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023020261.

[12] M. You, X. Duan, X. Li, et al. (2022), "Effect of 1-methylcyclopropene combined with chitosan-coated film on storage quality of passion fruit", *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **27**, DOI: 10.1016/j.scp.2022.100679.

[13] J.J. Mohamed, J.J. Prem, S. Saraswathy, et al. (2022), "Influence of edible coatings to enhance the postharvest quality of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) under cold storage conditions", *Biological Forum - An International Journal*, **14**(3), pp.118-122.

[14] E.A. Baldwin, R. Hagenmaier, J. Bai (2011), *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, CRC Press, 392pp.

[15] B. Bugariski, J. Milanovic, S. Levic, et al. (2008), "Carnauba wax as a carrier for aroma encapsulation", *XVI The International Conference on Bioencapsulation*, Dublin, Ireland.

[16] M.L.N. Tarazaga, A. Massa, M.B.P. Gago (2011), "Effect of beeswax content on hydroxypropyl methylcellulose-based edible film properties and postharvest quality of coated plums (Cv. Angeleno)", *LWT-Food Science and Technology*, **44**(10), pp.2328-2334, DOI: 10.1016/j.lwt.2011.03.011.

[17] M.N. Shahid, N.A. Abbasi (2011), "Effect of bee wax coatings on physiological changes in fruits of sweet orange CV. 'blood red'", *Sarhad Journal of Agriculture*, **27**(3), pp.385-394.

[18] Codex Alimentarius Commission (2016), "Sodium carboxymethyl cellulose (Cellulose gum)", *FAO*, <https://www.cspinet.org/article/carboxymethyl-cellulose-cmc-cellulose-gum-sodium-carboxymethyl-cellulose-cmc>, accessed 31 December 2021.

[19] R. Ergun, J. Guo, B.H. Keese (2016), "Cellulose", *Encyclopedia of Food and Health*, pp.694-702, DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00127-6.

[20] N. Sang, L.H. Hai (2020), "Effect of propionic acid on fruit decay and postharvest quality of Vietnamese purple passion fruit during low temperature storage", *III Asian Horticultural Congress-AHC2020*, pp.463-470, DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1312.66.

[21] P.A. Tuan, V.T. Nga, N.T.M. Nguyet, et al. (2019), "Preservative technology for some Vietnamese fruits and vegetables by using controlled atmosphere (CA) and modified atmosphere packaging (MAP)", *Gases in Agro-Food Processes*, Academic Press, 368pp.

Bảo quản lạnh sâu mô van tim người để ghép tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ năm 2018 đến năm 2023

Dương Đức Hùng*, Dương Công Nguyên, Trần Thị Hằng

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

Ngày nhận bài 24/9/2024; ngày chuyển phân biên 27/9/2024; ngày nhận phân biên 4/10/2024; ngày chấp nhận đăng 8/10/2024

Tóm tắt:

Việc bảo quản được mô van tim còn tế bào sống trong các ngân hàng mô đã giúp cho phẫu thuật viên luôn có nguồn van tim dự trữ, có thể sử dụng một cách chủ động và phù hợp với kích cỡ, chủng loại của từng bệnh nhân cần thay thế. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm nhận xét tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép mô van tim đồng loại tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ 10/2018 đến 10/2023. Kết quả cho thấy, Ngân hàng Mô đã thực hiện thu nhận 78 van tim từ 39 người hiến. Tuổi trung bình bệnh nhân hiến là $36,2 \pm 17,3$ (7-69); nam giới chiếm 76,9%. 100% người hiến có kết quả sàng lọc âm tính với HIV; 97,4% âm tính với HBV và HCV; 9% số van bị loại bỏ do các nguyên nhân: hình thái, nhiễm viêm gan B và viêm gan C. 100% số mẫu có kết quả vi sinh âm tính giai đoạn thu nhận mô, ngâm kháng sinh và trước khi ghép. Đã thực hiện ghép van tim bảo quản cho 51 bệnh nhân từ nhiều bệnh lý; tuổi của bệnh nhân ghép trung bình là $29,7 \pm 16,70$ tuổi (2-68); thời gian bảo quản đến khi ghép trung bình là $9,4 \pm 10,2$ tháng (6 ngày đến 41,7 tháng); 36 bệnh nhân sống/ổn định sau ghép, 3 bệnh nhân đã tử vong.

Từ khóa: bảo quản lạnh sâu, mô van tim đồng loại, ngân hàng mô.

Chỉ số phân loại: 3.2, 3.5

Preservation of human heart valves for replacement at the Tissue Bank, Viet Duc University Hospital from 2018 to 2023

Duc Hung Duong*, Cong Nguyen Duong, Thi Hang Tran

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

Received 24 September 2024; revised 4 October 2024; accepted 8 October 2024

Abstract:

The preservation of heart valve tissue with viable cells in tissue banks has ensured that surgeons always have a reserve of heart valves available, which can be actively and appropriately used according to the size and type needed for each patient requiring a replacement. This study was conducted to evaluate the collection, preparation, preservation, and transplant of heart valve homograft at the Tissue Bank, Viet Duc University Hospital, from October 2018 to October 2023. The results show that the Tissue Bank collected 78 heart valves from 39 donors. In which, the average age of donor patients was 36.2 ± 17.3 (7-69); men account for 76.9%. 100% of patients tested negative for HIV; 97.4% were negative for HBV and HCV; 9% of valves were removed due to morphology, hepatitis B infection, and hepatitis C infection. 100% of valves had negative microbiological results during tissue recovery, antibiotic soaking and post-thawing. 51 homografts had been implanted into recipients with congenital or acquired heart valve conditions; the average age of transplant patients is 29.7 ± 16.70 years (2-68); the average storage time until transplantation is 9.4 ± 10.2 months (6 days - 41.7 months); 36 patients have been alive/stable after transplantation, 3 patients have died.

Keywords: cryopreservation, heart valve homografts, tissue bank.

Classification numbers: 3.2, 3.5

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

1. Đặt vấn đề

Phẫu thuật thay van tim là phương pháp điều trị đầu tay cho bệnh nhân mắc bệnh van tim. Mỗi năm có hơn 290.000 bệnh nhân cần thay van và dự báo lên tới 850.000 bệnh nhân trước năm 2050. Các loại van tim được sử dụng để thay thế bao gồm van cơ học, van nhân tạo sinh học và van tim đồng loại từ người hiến (homograft). Van cơ học được làm bằng các hợp kim titan, cacbon và các chất hóa học... thời gian sử dụng dài trên 15 năm, nhưng phải dùng kèm thuốc chống đông, theo dõi chặt chẽ và thường có nhiều biến chứng liên quan đến đông máu. Thực tế, van sinh học được ưu tiên sử dụng chính ở các trung tâm phẫu thuật tim mạch trên thế giới, ví dụ tại Đức, năm 2008, trong tổng số 12.000 bệnh nhân ghép van tim có tới 78% bệnh nhân ghép van sinh học, 21% là ghép van cơ học và chỉ 1% van được sửa [1]. Van nhân tạo sinh học có nguồn gốc từ động vật như lợn, bò... đã qua các khâu xử lý, có ưu điểm là ít phải sử dụng thuốc chống đông, nhưng lại có thời gian sử dụng rất ngắn, chỉ khoảng 6-8 năm ở người trẻ tuổi. Van tim đồng loại (homograft) vừa không cần dùng thuốc chống đông, lại có thể sử dụng được tới trên 20 năm mới thoái hóa; ưu thế vượt trội các chất liệu nhân tạo trong bệnh lý van tim do viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn, thay van trong bệnh tim bẩm sinh và phụ nữ [2]. Việc bảo quản được mô van tim còn tế bào sống trong ngân hàng mô đã giúp cho các phẫu thuật viên luôn có được nguồn van tim dự trữ và có thể sử dụng một cách chủ động và phù hợp với kích cỡ, chủng loại của từng bệnh nhân cần thay thế [2-3].

Năm 2010, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức đã tiến hành 2 ca ghép van tim từ người cho đầu tiên thành công, là động lực lớn thúc đẩy các nghiên cứu về bảo quản lạnh sâu mô van tim được thực hiện [4-6]. Năm 2018, Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức được thành lập, là ngân hàng đa mô đầu tiên của Việt Nam được cấp phép, trong đó quy trình sàng lọc, thu nhận, xử lý và bảo quản mô van tim bằng phương pháp lạnh sâu đã được áp dụng thực hiện. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục tiêu nhận xét tình hình thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép van tim đồng loại trên người tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ 2018 đến 2023.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Mô van tim đồng loại thu nhận từ người hiến được bảo quản và ghép thay thế tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

Tiêu chuẩn lựa chọn: Tất cả các mẫu mô van tim có đủ hồ sơ bảo quản, hồ sơ người hiến, hồ sơ người ghép theo quy định.

Tiêu chuẩn loại trừ: Các mẫu không đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn lựa chọn.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Từ tháng 10/2018 đến tháng 10/2023.

Địa điểm: Ngân hàng Mô, Trung tâm Phẫu thuật tim mạch và lồng ngực, Khoa Vi sinh, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức.

2.3. Phương pháp và chỉ tiêu nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả.

Cách chọn mẫu: Thuận tiện theo chủ đích.

Quy trình sàng lọc, thu nhận và bảo quản lạnh sâu mô van tim: Quy trình chuẩn đã ban hành nội bộ của Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức trên cơ sở quy trình của Hiệp hội Ngân hàng Mô châu Á - Thái Bình Dương và Hiệp hội ngân hàng mô Hoa Kỳ:

+ Sàng lọc người hiến và mô ghép: có đơn tình nguyện hiến mô của người hiến hoặc người thân theo yêu cầu của pháp luật; mô lấy từ bệnh nhân khỏe mạnh, bệnh sử rõ ràng; xét nghiệm sàng lọc HIV, HBsAg, HCV âm tính.

+ Thu nhận, xử lý và bảo quản mô ghép: van tim được thu hồi trong phòng mổ, đảm bảo vô trùng; vận chuyển nhanh về Ngân hàng Mô bằng thùng vận chuyển chuyên dụng; xử lý mô van tim trước bảo quản: làm sạch mỡ, mô liên kết... và ngâm mô trong hỗn hợp kháng sinh tại 4°C trong 24 giờ; đưa mẫu vào môi trường chứa chất bảo quản lạnh dimethylsulfoxide - DMSO; hạ nhiệt theo chương trình; bảo quản lạnh sâu mô van tim; rã đông mô và loại bỏ dung dịch bảo quản trước khi ghép cho người bệnh.

Chỉ tiêu nghiên cứu:

Đặc điểm người hiến mô van tim: nhóm tuổi, giới; loại hiến: hiến sống, chẩn đoán bệnh; hiến chết não, nguyên nhân tử vong; kết quả xét nghiệm: HIV, HBsAg, HCV.

Đặc điểm van tim được thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép thay thế: đặc điểm đại thể van tim được thu nhận; kết quả cấy khuẩn vi sinh giai đoạn: thu nhận van tim, sau khi ngâm kháng sinh và rã đông (trước khi ghép cho bệnh nhân); số lượng van đã thu nhận, bảo quản, loại bỏ và ghép lại; thời gian từ khi thu nhận bảo quản van tim đến khi ghép cho bệnh nhân.

Đặc điểm bệnh nhân được ghép mô van tim: tuổi, giới; Chẩn đoán bệnh; Tình hình bệnh nhân sau ghép: sống, tử vong.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Bằng các thuật toán thống kê y học.

2.5. Đạo đức 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

3.1. Đặc điểm người hiến mô van tim

Bảng 1. Phân bố nhóm tuổi và giới của người hiến van tim (n=39).

Thông số nghiên cứu	Chết não		Thay tim		Tổng số	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>Nhóm tuổi</i>						
<18	1	9	5	17,9	6	15,4
18-35	6	55	7	25,0	13	33,3
36-60	2	18	15	53,6	17	43,6
>60	2	18	1	3,6	3	7,7
±SD	36±18,9		36,4±16,6		36,2±17,3	
Min	12		7		7	
Max	69		60		69	
<i>Giới tính</i>						
Nam	7	63,6	23	82,1	30	76,9
Nữ	4	36,4	5	17,9	9	23,1
Tổng số	11	100	28	100	39	100

Kết quả bảng 1 cho thấy, nhóm tuổi từ 36-60 chiếm tỷ lệ cao nhất (43,6%), nhóm tuổi từ 18-35 chiếm 33,3%, nhóm tuổi dưới 18 chiếm 15,4% và trên 60 tuổi chỉ chiếm 7,7%. Tuổi trung bình của người hiến là 36,2±17,3, nhỏ tuổi nhất là 7 và lớn tuổi nhất là 69. Tỷ lệ nam giới chiếm 76,9%, cao hơn nữ giới (23,1%).

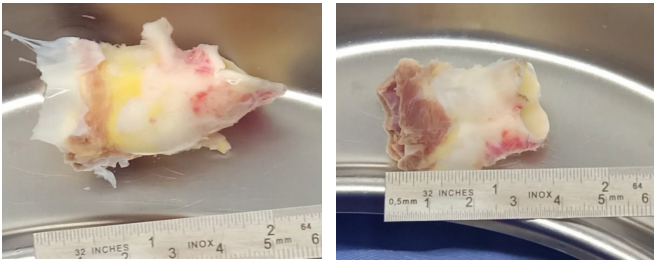
Trong số 39 người hiến, có 71,8% người cho sống với bệnh lý là giãn cơ tim và suy tim tỷ lệ tương đương nhau, 28,2% người hiến chết não chủ yếu do chấn thương sọ não (10/11). 100% người hiến có kết quả sàng lọc HIV (-); 97,4% người hiến có kết quả HBV (-), 2,6% có HBV (+); 97,4% người hiến có HCV (-) và 2,6% có HCV (+).

3.2. Đặc điểm mô van tim được thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép thay thế

Bảng 2. Đặc điểm đại thể van tim được thu nhận (n=78).

Tiêu chí	Phân loại	Số lượng (n)	Tỷ lệ (%)
Màu sắc	Trắng hồng	78	100
	Màu khác	0	0
Tính chất	Sạch	73	93,6
	Máu tụ	1	1,3
	Xơ vữa/vôi hóa	4	5,1
Độ nguyên vẹn (đại thể)	Van kín	70	89,8
	Van hở	2	2,6
	Van rách	3	3,8
	Rách ống mạch	3	3,8

Bảng 2 cho thấy, tất cả các van tim sau khi thu nhận đều có màu sắc trắng hồng. Hầu hết van sau thu nhận sạch (93,6%); 1,3% van tim còn máu tụ; 5,1% van xơ vữa/vôi hóa. Đa số van tim được thu nhận còn nguyên vẹn chiếm 89,8%; có 10,2% van không nguyên vẹn: rách/hở/rách ống mạch. Hình ảnh đại thể mô van tim được xử lý thể hiện trong hình 1.



Van động mạch chủ

Van động mạch phổi

Hình 1. Hình ảnh đại thể mô van tim được xử lý.

Bảng 3. Kết quả vi sinh các mẫu mô van tim giai đoạn thu nhận mô, sau ngâm kháng sinh và trước khi ghép.

Giai đoạn	Vi khuẩn hiếu khí		Vi khuẩn kỵ khí		Vi nấm	
	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính	Âm tính	Dương tính
Giai đoạn thu nhận mô	n 39	0	39	0	39	0
	% 100	0	100	0	100	0
Sau ngâm kháng sinh	n 39	0	39	0	39	0
	% 100	0	100	0	100	0
Trước khi ghép	n 35	0	35	0	35	0
	% 100	0	100	0	100	0

Kết quả bảng 3 cho thấy, tại giai đoạn thu nhận mô và sau khi ngâm kháng sinh: 100% các mẫu đều âm tính với vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn kỵ khí và vi nấm. Trong số 51 van tim được rửa đông để ghép, chỉ 35 van có chỉ định xét nghiệm vi sinh với kết quả 100% âm tính với cả vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí và vi nấm.

Bảng 4. Số lượng van tim được thu nhận, bảo quản, loại bỏ và ghép lại.

Thông số nghiên cứu	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Tổng số van thu nhận	78	100
Tổng số bảo quản	75	96,2
Van có thể sử dụng được	71	91,0
Van loại bỏ	7	9,0
Xơ vữa/vôi hóa nhiều	1	14,3
Rách nhiều (lỗi kỹ thuật)	2	28,6
HBV (+)	3	42,8
HCV (+)	1	14,3
Tổng số van đã sử dụng	51	65,4
Van động mạch chủ	21	
Van động mạch phổi	30	
Số lượng van chưa sử dụng	20	25,6

Kết quả bảng 4 cho thấy, trong tổng số 78 van tim được thu nhận: đã bảo quản 75 van tim; 91,0% van tim có thể sử dụng được và 9% van bị loại bỏ vì các nguyên nhân: xơ vữa/vôi hóa, rách nhiều, xét nghiệm HBV (+), HCV (+). Thời gian bảo quản mô van tim đến khi được sử dụng trung bình là 9,4±10,2 tháng; ngắn nhất là 6 ngày và dài nhất là 41,7 tháng.

3.3. Đặc điểm bệnh nhân được phẫu thuật ghép van tim

Tuổi của bệnh nhân ghép trung bình là $29,7 \pm 16,70$, nhỏ nhất 2 tuổi, lớn nhất 68 tuổi; nam chiếm 65%, nữ chiếm 35%.

Kết quả bảng 5 cho thấy, bệnh lý của các bệnh nhân ghép van gặp nhiều nhất là hẹp/hở van động mạch phổi (35,3%); tiếp theo là tứ chứng Fallot (17,6%), viêm nội tâm mạch nhiễm khuẩn (13,7%); các bệnh lý còn lại chiếm 33,4%.

Bảng 5. Bệnh lý của bệnh nhân ghép van tim (n=51).

Thứ tự	Bệnh lý cần ghép	n	Tỷ lệ (%)
1	Hẹp/hở van ĐMP	18	35,3
2	Tứ chứng Fallot	9	17,6
3	Viêm nội tâm mạch nhiễm khuẩn	7	13,7
4	Sùi van ĐMC cơ học/ sinh học	4	7,8
5	Hẹp/hở van ĐMC	4	7,8
6	Hẹp conduit ĐMP sau mổ	2	3,9
7	Thoái hóa van ĐMC/ĐMP sinh học	2	3,9
8	Bệnh tim bẩm sinh phức tạp	2	3,9
9	Bệnh lý van tim khác	2	3,9
10	Thông liên thất - hẹp khí quản đường ra thất phải	1	2,0
Tổng số bệnh nhân ghép		51	100

ĐMC: động mạch chủ, ĐMP: động mạch phổi.

Tỷ lệ bệnh nhân sau ghép ổn định là 36/51, chiếm 70,6% cao hơn đáng kể so với nhóm tử vong sau ghép (5,9%); 23,5% trường hợp không thu thập được dữ liệu. Trong 36 bệnh nhân sống, thời gian từ khi ghép đến khi đánh giá tình trạng sống trung bình là $23,0 \pm 14,8$ tháng, gần nhất là cách 1 tháng và dài nhất 51 tháng.

4. Bàn luận

4.1. Đặc điểm người hiến mô van tim

Trong vòng 5 năm từ 10/2018 đến 10/2023, Ngân hàng Mô đã thu nhận 78 mô van tim và bảo quản được 75 van từ 39 người hiến (28 người hiến sống và 11 người hiến chết não). Các trường hợp người hiến sống thực chất là các bệnh nhân được ghép tim, mặc dù trái tim của họ đã bị yếu phải thay thế nhưng phần van tim còn sử dụng tốt nên được Ngân hàng Mô bảo quản để ghép cho các bệnh nhân khác sau này; với các trường hợp người hiến chết não xảy ra khi không tìm được người nhận tim ghép phù hợp tại thời điểm hiến chết não, vì vậy van tim được thu nhận và bảo quản. Như vậy, có thể thấy tất cả người hiến van tim đều liên quan đến các trường hợp chết não, nếu tính trung bình 1 năm thì chưa tới 10 người hiến, con số này quá khiêm tốn so với quy mô gần 100 triệu dân của Việt Nam. Tỷ lệ hiến tạng trên 1 triệu dân (PMP) của một số nước như Tây Ban Nha, Đức, Anh, Hà Lan, Hàn Quốc, Nhật Bản và Ấn Độ lần lượt là 43,4, 10,4, 21,14, 14,71, 10,6, 0,7 và 0,34. Điều này có thể do tâm lý và truyền thống người Việt Nam hay rộng hơn

là người châu Á coi trọng sự toàn vẹn về thể xác sau khi chết. Do vậy cách tổ chức mô hình và đào tạo nhân lực phục vụ cho hiến mô - tạng, sự giáo dục và cung cấp thông tin liên quan đến ghép mô - tạng, người chết não là cần thiết để tăng số lượng người hiến. Đã có 11 bệnh nhân chết não hiến tạng từ vong do nguyên nhân chấn thương sọ não, chiếm 92%. Điều này có khác biệt lớn với nguyên nhân người hiến chết não ở các nước tiên tiến: tại Tây Ban Nha, tai biến mạch não chiếm tới 40,6%, chấn thương sọ não chỉ chiếm 20,3%; tại Pháp, tai biến mạch não chiếm 62,2%, chấn thương sọ não chiếm có 20,3% [7, 8]. Điều này cũng giải thích cho việc tuổi trung bình người hiến trong nghiên cứu của chúng tôi khá trẻ so với một số ngân hàng mô tại châu Âu [9, 10].

Để đảm bảo an toàn và hiệu quả cho người nhận mô ghép, một trong những tiêu chuẩn mang tính bắt buộc đó là không bị nhiễm khuẩn và vi nấm. Kết quả cấy khuẩn tại mỗi giai đoạn sẽ góp phần quản lý tốt quy trình thu nhận, xử lý và bảo quản mô. Do các mô van tim của cùng một bệnh nhân hiến đều chung dụng cụ và phẫu thuật thu nhận nên chúng tôi chỉ tiến hành cấy khuẩn đại diện tất cả các mô theo lô xử lý, bảo quản. Trong quá trình thu nhận và vận chuyển tim từ nơi thu nhận về Ngân hàng Mô để xử lý và bảo quản có thể xảy ra nhiễm khuẩn từ các nguồn khác nhau. Các biện pháp nhằm giảm thiểu sự nhiễm khuẩn như giảm thiểu thời gian thu nhận mô (<24 giờ sau khi chết) và đào tạo nhóm thu nhận mô có ý nghĩa lớn [11]. Tỷ lệ nhiễm khuẩn mô trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nhiều so với các nghiên cứu trên thế giới, một phần do lượng người hiến của chúng tôi còn ít, nhưng chủ yếu ở việc tất cả tim thu nhận (từ người hiến chết não và người hiến thay tim) đều được thực hiện trong phòng mổ vô trùng tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức và vận chuyển nội viện đến Ngân hàng Mô để thực hiện quy trình xử lý, bảo quản trong thời gian rất nhanh chóng.

4.2. Đặc điểm mô van tim được thu nhận, xử lý, bảo quản và ghép thay thế

Tỷ lệ loại bỏ van tim của chúng tôi khá thấp khi so sánh với các kết quả nghiên cứu tại các Ngân hàng mô khác. Tại ngân hàng mô EHB, Bỉ trong 30 năm, 50-60% van tim bị loại bỏ do hình thái, nhiễm bẩn, vết cắt do phẫu thuật hoặc các lý do khác; khi giới hạn tuổi hiến mô van động mạch phổi tăng lên 70 tuổi, số lượng van bị loại bỏ vì lý do hình thái học đã tăng lên đáng kể [10]. Nghiên cứu trong 10 năm tại Croatia, tỷ lệ loại bỏ mô là 37%, phổ biến nhất do hình thái (12%) và nhiễm khuẩn (19%) [12]. Nghiên cứu tại Nam Phi từ 1984-2008, cho thấy tỷ lệ loại bỏ mô là 39,2% (995/1545 van tim), trong đó nguyên nhân chính là HIV (32,4%), viêm gan B (9,6%), các bệnh hoa liễu (8,9%) [13]. Tiêu chuẩn chấp nhận và loại bỏ van tim đồng loại đang áp dụng tại các ngân hàng mô này khá nghiêm ngặt theo các tiêu chí lựa chọn mô tiêu chuẩn châu Âu [10]. Bên cạnh đó, việc thu nhận mô tại các ngân hàng mô trên thế giới được thực hiện theo hình thức đa trung tâm, dẫn đến có sự không đồng đều về đội ngũ nhân viên thu nhận mô, bị ảnh hưởng nhiều bởi kỹ thuật của bác sĩ thực hiện đã dẫn đến những

lỗi phát sinh trong quá trình thu nhận mô tại phòng phẫu thuật; điều này đã được chứng minh trong giai đoạn đầu tại Ngân hàng Mô Croatia, sau đó giảm dần [12].

Tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức, việc thu nhận mô được thực hiện bởi các kíp bác sĩ phẫu thuật tim mạch tại phòng mổ. Do đó hầu hết các van tim đều đáp ứng tiêu chuẩn về hình thái đại thể mà không bị thải loại khi thu nhận, chỉ một số lượng nhỏ van tim có phần mạch xuất hiện những vết rách nhỏ có thể chỉnh sửa được và vẫn tiếp tục được bảo quản để sử dụng khi cần. Trong tương lai, nếu mở rộng phạm vi mạng lưới thu nhận mô ra các trung tâm hoặc bệnh viện khác, Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức cần lưu ý đến việc chuẩn hóa quy trình và chuyển giao kỹ trước khi thực hiện, tránh phải loại bỏ mô bị lỗi phát sinh trong quá trình thu nhận mô.

4.3. Đặc điểm bệnh nhân được phẫu thuật ghép van tim

Trong nghiên cứu này: tuổi, giới và bệnh lý của bệnh nhân ghép rất đa dạng, tương đồng với các ngân hàng mô khác; tập trung chính ở các nhóm bệnh tim bẩm sinh, bệnh lý van tim nhiễm trùng, phẫu thuật ROSS. Nghiên cứu tại Ngân hàng Mô EHB, Bỉ (1989-2020), 7.290 van tim đã được ghép với 2 nhóm chính: phẫu thuật ROSS (2.410 ca ghép), nhóm bệnh lý viêm nội tâm mạc nhiễm trùng (1011 ca ghép) [10]. Nghiên cứu tại Ngân hàng Mô New Dehli, Ấn Độ (1993-2007) đã ghi nhận 967 van đồng loại được sử dụng: nhóm bệnh lý tim chiếm 49,3%, nhiều nhất là phẫu thuật ROSS (189 ca); nhóm bệnh tim bẩm sinh chiếm 50,7% [14]. Nghiên cứu tại Ngân hàng Mô Iranian Tissue Bank tại Tehran, Iran (2006-2015), đã có 400 ca ghép van đồng loại: bệnh tim bẩm sinh chiếm chủ yếu (81,8%); bệnh van tim mắc phải (thấp khớp, thoái hóa, lão hóa) chiếm 15,2% [15].

Bệnh lý của bệnh nhân ghép van đồng loại tương đối phong phú, thể hiện trình độ, chuyên môn của các phẫu thuật viên tại Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức đã làm chủ được hầu hết các kỹ thuật khó trên thế giới. Với vai trò là bệnh viện ngoại khoa hạng đặc biệt, trung tâm phẫu thuật ngoại khoa hàng đầu của Việt Nam và trung tâm ghép mô tạng lớn nhất của cả nước, việc sẵn có những van tim đồng loại từ Ngân hàng Mô của bệnh viện đã đáp ứng được nhu cầu trong quá trình điều trị cho người bệnh.

Theo dõi tình trạng sống/chết là một yếu tố rất quan trọng trong đánh giá hiệu quả điều trị trên bệnh nhân ghép van tim. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ bệnh nhân sống sau ghép và thời gian sống khá tốt. Nghiên cứu của Ngân hàng Mô Iranian, Tehran, Iran (2016) cho kết quả: tỷ lệ tử vong trong 10 năm là 21% (84/400 ca): 66,7% tử vong sớm (trong 30 ngày) và 33,3% tử vong muộn; tỷ lệ biến chứng muộn là 2% [15].

5. Kết luận

Qua nghiên cứu các mô van tim được bảo quản và ghép tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ tháng 10/2018 đến tháng 10/2023, chúng tôi có những kết luận sau: đã thu nhận được 78 van tim từ 39 người hiến chủ yếu trong nhóm tuổi trưởng thành, nam giới chiếm phần lớn; tỷ lệ nhỏ số van bị loại bỏ vì các nguyên nhân: hình thái, viêm gan B, viêm gan C;

tất cả số mẫu có kết quả vi sinh âm tính giai đoạn thu nhận mô, ngâm kháng sinh và trước khi ghép. 51 van tim đã được ghép cho bệnh nhân từ nhiều bệnh lý: bất thường tim bẩm sinh hoặc bệnh tim mắc phải; phần lớn các ca sống ổn định sau ghép. Trên cơ sở nghiên cứu này, chúng tôi đề nghị: đẩy mạnh công tác vận động hiến mô, tạng để cứu giúp thêm nhiều bệnh nhân và triển khai thêm các nghiên cứu đánh giá lâm sàng bệnh nhân sau ghép.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E.M. D. Walter, T.M.M.H. By, R. Meyer, et al. (2012), "The future of heart valve banking and of homografts: Perspective from the Deutsches Herzzentrum Berlin", *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth.*, **4**(2), pp.97-108.
- [2] J.Y. Kim, J.B. Kim, S.H. Jung, et al. (2016), "Long-term outcomes of homografts in the aortic valve and root position: A 20-year experience", *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **49**(4), pp.258-263, DOI: 10.5090/kjcs.2016.49.4.258.
- [3] R. Parker (2010), "Banking of heart valves", *Essentials of Tissue Banking*, Springer Netherlands, pp.69-80.
- [4] Communist Party of Vietnam Online Newspaper (2010), "Successfully performed the first two heart valve transplants in Vietnam", <https://dangcongson.vn/y-te/thuc-hien-thanh-cong-2-ca-ghiep-van-tim-dau-tien-o-viet-nam-23404.html>, accessed 10 October 2023 (in Vietnamese).
- [5] C.N. Duong, D.T. Ngo, T.H.N. Le (2017), "The structure of cold-preserved pig heart valve tissue in a serum-free environment", *Military Pharmacy Journal*, Special Issue on Morphology, pp.166-172 (in Vietnamese).
- [6] T.B.T. Cu, D.T. Ngo, C.N. Duong (2020), "Assessment of the microstructure and durability of cold-stored pig heart valve tissue", *Vietnam Medical Journal*, **496**(2), pp.164-168 (in Vietnamese).
- [7] H.S. Trinh, T.K. Nguyen (2016), "Clinical characteristics of brain-dead organ donors in 2014 at the Hepato-Pancreato-Biliary Surgery Department of Hautpierre Hospital, Strasbourg, France", *Journal of Practical Medicine*, **5**, pp.102-106 (in Vietnamese).
- [8] M.A. Bodí, T. Pont, A. Sandiumenge, et al. (2015), "Brain death organ donation potential and life support therapy limitation in neurocritical patients", *Med. Intensiva.*, **39**(6), pp.337-344, DOI: 10.1016/j.medine.2014.07.001.
- [9] C.C. Sala, M.L. Pérez, E. Agustí, et al. (2023), "Last twenty-years activity of cardiovascular tissue banking in Barcelona", *Cell Tissue Bank*, **25**(1), pp.1-16, DOI: 10.1007/s10561-022-10059-9.
- [10] R. Jashari (2021), "Transplantation of cryopreserved human heart valves in Europe: 30 years of banking in Brussels and future perspectives", *Cell Tissue Bank*, **22**(4), pp.519-537, DOI: 10.1007/s10561-021-09902-2.
- [11] B. Sawa, V.S.T. Ribeiro, L. Kraft, et al. (2019), "Risk factors associated with contamination of allograft valves in a tissue bank", *Cell Tissue Bank*, **20**(1), pp.87-94, DOI: 10.1007/s10561-019-09754-x.
- [12] M. Skific, M. Golemovic, I. Safradin, et al. (2022), "Cryopreserved human heart valve allografts: A ten-year single centre experience", *Cell Tissue Bank*, **24**(2), pp.1-16, DOI: 10.1007/s10561-022-10043-3.
- [13] L. Botes, J.J. Heever, F.E. Smit, et al. (2012), "Cardiac allografts: A 24-year South African experience", *Cell Tissue Bank*, **13**(1), pp.139-146, DOI: 10.1007/s10561-010-9237-x.
- [14] S.K. Choudhary, N. Bansal, I. Kumar, et al. (2020), "Audit of homograft valve bank", *Indian J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **36**(1), pp.14-20, DOI: 10.1007/s12055-019-00829-8.
- [15] A.H. Rouchi, H. Radmehr, S.A. Tavakoli, et al. (2016), "Iranian homograft heart valves: Assessment of durability and late outcome", *Cell Tissue Bank*, **17**(4), pp.603-610, DOI: 10.1007/s10561-016-9573-6.

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 11 - November 2024

Khảo sát tính chất quang của vật liệu β -Ga₂O₃ pha tạp ion Cr³⁺ chế tạo bằng phương pháp khuếch tán nhiệt.

Nguyễn Mai Anh, Đàm Quang Học, Phạm Thị Lan Hương, Nguyễn Văn Quang

Tổng hợp chấm lượng tử carbon từ nút bấc nhằm thử nghiệm khả năng chỉ thị ion Fe³⁺ và nhuộm huỳnh quang tế bào biểu bì hành tây.

Ngô Khoa Quang, Lê Vũ Trường Sơn

Ảnh hưởng của tác nhân tăng dính tới tính chất của keo dán nền cao su thiên nhiên dùng để liên kết vải canvas và cao su viền giày.

Đoàn Anh Vũ, Nguyễn Thị Trang, Bạch Trọng Phúc, Trần Hữu Quang, Trần Hữu Huy, Đỗ Quốc Việt, Nguyễn Thanh Liêm

Nano bạc gia tăng hiệu quả tái sinh chồi và hạn chế một số hiện tượng bất thường của cây African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) nuôi cấy *in vitro*.

Huỳnh Gia Bảo, Nguyễn Thị Như Mai, Hoàng Đức Khải, Đỗ Mạnh Cường, Hoàng Thanh Tùng, Dương Tấn Nhựt

Sàng lọc môi trường nuôi cấy và điều kiện lên men tối ưu cho sinh tổng hợp transglutaminase của chủng *Streptomyces* sp. TG1G1.

Võ Nguyễn Thanh Thảo, Nguyễn Thành Vũ, Nguyễn Thị Dung, Bùi Lê Khả Tú, Nguyễn Đặng Phước Ngọc, Trần Quốc Tuấn

Nghiên cứu điều chế vi cầu chứa bovine serum albumin từ alginate và chitosan.

Lê Minh Quân, Trần Thanh Hải, Đỗ Hoàng Hân, Trần Lê Tuyết Châu

Chọn lọc cây trội Vù hương (*Cinnamomum balansae* H.Lec) phục vụ trồng rừng thâm canh cung cấp gỗ lớn tại tỉnh Lào Cai.

Hoàng Văn Thành, Hoàng Văn Thắng, Trần Hồng Vân, Cao Văn Lạng

Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ dinh dưỡng lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng hàu sữa (*Crassostrea angulata*) phục vụ chọn giống.

Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Thị Mai Anh, Nguyễn Thảo Suong, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Như Trí, Nguyễn Văn Sáng

Tuyển chọn các chủng vi nấm có khả năng sinh enzyme ngoại bào cao ứng dụng trong lên men quả bồ kết (*Gleditsia australis* Hemsl.).

Trương Thị Chiên, Mai Vũ Hoàng Giang, Nguyễn Thị Hiền, Phạm Thành Đức, Phan Xuân Bình Minh, Vũ Xuân Tạo

Đánh giá khả năng kháng một số nấm bệnh thực vật của chủng xạ khuẩn *Streptomyces murinus* XKH6 phân lập từ đất trồng nghệ tại Hưng Yên.

Chu Thanh Bình, Nguyễn Việt Hà, Nguyễn Hữu Thắng, Đào Ngọc Ánh, Trần Bảo Trâm

Mô hình phi tuyến nước nông mô phỏng dòng chảy sau vỡ đập trên nền đáy hạ lưu phức tạp dùng hệ tọa độ (*b, s*).

Nguyễn Hữu Văn, Phạm Trung Cảnh, Lại Văn Quyền, Phạm Thị Nga, Phạm Văn Khôi

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ sáp ong, sáp cọ và carboxymethyl cellulose đến đặc tính hóa lý của chế phẩm tạo màng và khả năng bảo quản quả chanh leo tím.

Nguyễn Sáng, Phạm Anh Tuấn, Lê Hà Hải, Trần Thị Thu Hoài

Bảo quản lạnh sâu mô van tim người để ghép tại Ngân hàng Mô, Bệnh viện Hữu nghị Việt Đức từ năm 2018 đến năm 2023.

Dương Đức Hùng, Dương Công Nguyễn, Trần Thị Hằng

1 Luminescent properties of Cr³⁺-doped β -Ga₂O₃ materials synthesised by thermal diffusion method.

Mai Anh Nguyen, Quang Hoc Dam, Thi Lan Huong Pham, Van Quang Nguyen

6 Synthesis of carbon nanodots from wine cork for the detection of ferrum (III) ions and bioimaging of onion epidermal cells.

Khoa Quang Ngo, Vu Truong Son Le

12 Effect of tackifiers on the properties of natural rubber-based adhesive used to bind canvas fabric and rubber shoe sole.

Anh Vu Doan, Thi Trang Nguyen, Trong Phuc Bach, Huu Quang Tran, Huu Huy Tran, Quoc Viet Do, Thanh Liem Nguyen

18 Silver nanoparticles enhanced shoot regeneration efficiency and limited some abnormal phenomena of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cultured *in vitro*.

Gia Bao Huynh, Thi Nhu Mai Nguyen, Dac Khai Hoang, Manh Cuong Do, Thanh Tung Hoang, Tan Nhut Duong

24 Screening the culture medium and optimal fermentation conditions for the production of transglutaminase by the *Streptomyces* sp. strain TG1G1

Nguyen Thanh Thao Vo, Thanh Vu Nguyen, Thi Dung Nguyen, Le Kha Tu Bui, Dang Phuoc Ngoc Nguyen, Quoc Tuan Tran

29 Research on the preparation of microspheres containing bovine serum albumin microspheres from alginate and chitosan.

Minh Quan Le, Thanh Hai Tran, Hoang Han Do, Le Tuyet Chau Tran

37 Plus-trees selection of *Cinnamomum balansae* H.Lec for intense planting to supply timber in Lao Cai province.

Van Thanh Hoang, Van Thang Hoang, Hong Van Tran, Van Lang Cao

42 A study on effects of nutrition on growth and survival of oyster larvae *Crassostrea angulata* for selective breeding program.

Thanh Luan Nguyen, Thi Mai Anh Nguyen, Thao Suong Nguyen, Thi Nga Nguyen, Nhu Tri Nguyen, Van Sang Nguyen

49 Selection of microfungial strains with high exoenzyme production for the fermentation of *Gleditsia australis* Hemsl. fruits.

Thi Chien Truong, Vu Hoang Giang Mai, Thi Hien Nguyen, Thanh Duc Pham, Xuan Binh Minh Phan, Xuan Tao Vu

55 Assessment of the antifungal activity against plant pathogens of the *Streptomyces murinus* XKH6 strain isolated from soil growing *Curcuma longa* in Hung Yen province.

Thanh Binh Chu, Viet Ha Nguyen, Huu Thang Nguyen, Ngoc Anh Dao, Bao Tram Tran

61 A nonlinear shallow water model simulating dam-break flow over complex downstream beds using (*b, s*) coordinate.

Huu Van Nguyen, Trung Canh Pham, Van Quyen Lai, Thi Nga Pham, Van Khoi Pham

66 Research on the effect of the ratio of beeswax, carnauba wax, and carboxymethyl cellulose on the physicochemical properties of film-forming preparation and the ability to preserve purple passion fruits.

Sang Nguyen, Anh Tuan Pham, Ha Hai Le, Thi Thu Hoai Tran

76 Preservation of human heart valves for replacement at the Tissue Bank, Viet Duc University Hospital from 2018 to 2023.

Duc Hung Duong, Cong Nguyen Duong, Thi Hang Tran