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

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

Vietnam Journal of Science and Technology - MOST

B

Tập 64 - Số 11 - Tháng 11 năm 2022

TẠP CHÍ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

Tập 64 - Số 11 - Tháng 11 năm 2022

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Châu Văn Minh - *Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam*
Nguyễn Việt Anh - *Trường Đại học Xây dựng*
Bùi Chí Bửu - *Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam*
Vũ Dũng - *Hội Tâm lý học Việt Nam*
Trần Thọ Đạt - *Trường Đại học Kinh tế Quốc dân*
Nguyễn Đình Đức - *Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*
Vũ Minh Giang - *Đại học Quốc gia Hà Nội*
Trương Nam Hải - *Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*
Trần Thanh Hải - *Trường Đại học Mỏ - Địa chất*
Phạm Huy Khang - *Trường Đại học Giao thông Vận tải*
Phạm Gia Khánh - *Chủ tịch Hội Ghép tạng Việt Nam*
Hồ Đắc Lộc - *Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh*
Nguyễn Thị Mỹ Lộc - *Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội*
Bành Tiến Long - *Trường Đại học Bách khoa Hà Nội*
Lê Quan Nghiệm - *Trường Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh*
Mai Trọng Nhuận - *Đại học Quốc gia Hà Nội*
Trần Hữu Phúc - *Hội đồng GS Nhà nước*
Nguyễn Thanh Phương - *Trường Đại học Cần Thơ*
Nguyễn Thanh Thủy - *Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*
Phạm Hùng Việt - *Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

EDITORIAL COUNCIL

Chau Van Minh - *Vietnam Academy of Science and Technology*
Nguyen Viet Anh - *National University of Civil Engineering*
Bui Chi Buu - *Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam*
Vu Dung - *Vietnam Association of Social Psychology*
Tran Tho Dat - *National Economics University*
Nguyen Dinh Duc - *University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi*
Vu Minh Giang - *VNU, Hanoi*
Truong Nam Hai - *Vietnam Academy of Science and Technology*
Tran Thanh Hai - *Hanoi University of Mining and Geology*
Pham Huy Khang - *University of Transport and Communications*
Pham Gia Khanh - *President of Vietnam Society of Organ Transplantation*
Ho Dac Loc - *Ho Chi Minh City University of Technology*
Nguyen Thi My Loc - *University of Education, VNU, Hanoi*
Banh Tien Long - *Hanoi University of Science and Technology*
Le Quan Nghiem - *University of Medicine and Pharmacy of Ho Chi Minh City*
Mai Trong Nhuan - *VNU, Hanoi*
Tran Huu Phuc - *The State Council for Professorship*
Nguyen Thanh Phuong - *Can Tho University*
Nguyen Thanh Thuy - *University of Engineering and Technology, VNU, Hanoi*
Pham Hung Viet - *University of Science, VNU, Hanoi*

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP PHỤ TRÁCH
Nguyễn Thị Hương Giang

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP
Nguyễn Thị Hải Hằng

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP
Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TẠP CHÍ ĐIỆN TỬ
Vũ Văn Hưng

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ
Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY
Đinh Thị Luận

EXECUTIVE DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF
Nguyen Thi Huong Giang

DEPUTY EDITOR
Nguyen Thi Hai Hang

HEAD OF EDITORIAL BOARD
Pham Thi Minh Nguyet

HEAD OF E-JOURNAL BOARD
Vu Van Hung

HEAD OF ADMINISTRATION
Luong Ngoc Quang Hung

ART DIRECTOR
Dinh Thi Luan

TÒA SOẠN
113 Trần Duy Hưng - Cầu Giấy - Hà Nội
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

Giá: 18000đ

EDITORIAL OFFICE
113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
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

Cải thiện hệ số công suất nhiệt điện trong hợp chất Mg_3Sb_2 pha tạp Si cho ứng dụng chuyển đổi nhiệt điện của vật liệu

Mạc Trung Kiên[1, 2], Phạm Kim Ngọc[1, 2], Raja Das[1, 2], Nguyễn Hữu Tuân[1, 2], Trần Đăng Thành[3, 4], Phan Bách Thắng[5], Dương Anh Tuấn[1, 2*]

[1]Khoa Khoa học và Kỹ thuật vật liệu, Trường Đại học Phenikaa, đường Tố Hữu, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam
[2]Viện Nghiên cứu và Công nghệ Phenikaa, 167 Hoàng Ngân, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
[3]Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam
[4]Học 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
[5]Trung tâm INOMAR, 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 4/4/2022; ngày chuyển phản biện 8/4/2022; ngày nhận phản biện 9/5/2022; ngày chấp nhận đăng 13/5/2022

Tóm tắt:

Mg_3Sb_2 được biết đến là vật liệu bán dẫn vùng cấm hẹp có độ dẫn điện và đặc tính nhiệt điện phụ thuộc nhiều vào cấu trúc và hàm lượng tạp chất. Trong nghiên cứu này, để cải thiện tính chất chuyển đổi nhiệt điện của Mg_3Sb_2, các tác giả tiến hành pha tạp Si theo tỷ lệ khác nhau (x=0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3) vào vị trí của Sb trong hợp chất $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ nhằm nâng cao độ dẫn điện mà không làm giảm hệ số Seebeck của vật liệu nền. Kết quả cho thấy, các hợp chất nền Mg_3Sb_2 và hợp chất lai hóa $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ chế tạo bằng phương pháp phản ứng pha rắn (nghiền năng lượng cao kết hợp với ép nóng và nung thiêu kết) đều thu được cấu trúc tinh thể lục giác (hexagonal). Độ dẫn điện của các mẫu pha tạp Si tăng lên đáng kể so với mẫu Mg_3Sb_2 không pha tạp, trong khi hệ số Seebeck giảm nhẹ ở các mẫu có nồng độ Si thấp và tăng cao nhất ở mẫu $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$. Kết quả hệ số công suất của các mẫu pha tạp Si đều tăng so với mẫu không pha tạp. Giá trị hệ số công suất tại 673K của các mẫu $Mg_3Sb_{1,9}Si_{0,1}$, $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$ và $Mg_3Sb_{1,7}Si_{0,3}$ tăng khoảng 1,7 lần so với Mg_3Sb_2.

Từ khóa: **hiệu ứng Seebeck, Mg_3Sb_2, nhiệt điện, vật liệu bán dẫn.**

Chỉ số phân loại: **1.3**

1. Mở đầu

Nghiên cứu phát triển các nguồn năng lượng mới, năng lượng tái tạo để thay thế các nguồn năng lượng hóa thạch trong tự nhiên là một trong những vấn đề cấp thiết đang được thế giới quan tâm [1]. Một trong những giải pháp để giải quyết vấn đề trên là việc nghiên cứu và ứng dụng vật liệu nhiệt điện - loại vật liệu có thể chuyển đổi trực tiếp nhiệt năng dư thừa từ các nguồn nhiệt như lò nhiệt, động cơ nhiệt… thành điện năng nhờ các hiệu ứng nhiệt điện [2]. Đặc tính hay hiệu suất chuyển đổi nhiệt điện của vật liệu được đánh giá thông qua giá trị của độ phẩm chất nhiệt điện (Thermoelectric figure of merit ZT) và được xác định thông qua mối quan hệ giữa hệ số Seebeck *(S)*, dẫn điện (σ), dẫn nhiệt (κ) và nhiệt độ tuyệt đối T.

$$ZT=S^2\sigma T/\kappa$$

trong đó: $S^2\sigma$ đặc trưng cho hiệu suất chuyển năng lượng của một thiết bị nhiệt điện được gọi là hệ số công suất (power factor) của vật liệu [3]. Để đạt được giá trị ZT cao thì cần tạo ra các vật liệu có hệ số công suất cao và độ dẫn nhiệt thấp [4].

Nhiều loại vật liệu có hệ số công suất cũng như giá trị ZT cao đã được nghiên cứu chế tạo thành công và đưa vào ứng dụng trong các thiết bị, linh kiện chuyển đổi nhiệt điện như Bi_2Te_3, Sb_2Te_3 và các hợp chất cấu trúc nano của chúng cho giá trị ZT trong khoảng 1-1,6 ở vùng nhiệt độ 300-600K [5-10]. SnSe cấu trúc lớp ở trạng thái đơn tinh thể cho giá trị ZT=2,6 đối với vật liệu loại p và 2,2 đối với vật liệu loại n [11]. Các hợp chất trên nền vật liệu Cu_2Se, half-Heusler hay vật liệu oxit cũng cho giá trị ZT trong khoảng 1,5-2,5 ở vùng nhiệt độ cao [12-20]. Các đặc điểm chung ở các vật liệu cho ZT cao hầu hết là các bán dẫn có vùng cấm năng lượng hẹp, có cấu trúc nano hoặc được lai hóa giữa các vật liệu khác nhau để tối ưu hóa đặc tính nhiệt điện.

Một loại vật liệu bán dẫn vùng cấm hẹp cấu trúc lớp, dễ chế tạo, cho hệ số công suất và ZT trong vùng có thể ứng dụng gần đây được nghiên cứu nhiều là Mg_3Sb_2 [21]. Để cải thiện giá trị ZT của loại vật liệu này việc pha tạp các nguyên tố khác vào vật liệu nền Mg_3Sb_2 đang là phương pháp sử dụng chủ yếu để tạo những khuyết tật trong cấu trúc tinh thể, điều khiển nồng độ hạt tải, tăng độ dẫn điện và giảm độ dẫn nhiệt [22]. Những báo cáo gần đây của một số nhóm nghiên cứu đã bước đầu đạt được những thành công trong việc tăng giá trị ZT, như J. Zhang và cs (2017) [23], H. Tamaki và cs (2016) [24] pha tạp Bi với ZT=1,51-1,65, Y. Wang và cs (2019) [25] thành công pha tạp Te với ZT=0,78. Ngoài ra, còn nhiều kết quả công bố khác cũng đạt được những thành công với giá trị ZT trong khoảng 1-1,6 [26-30].

*Tác giả liên hệ: Email: tuan.duonganh@phenikaa-uni.edu.vn

Enhancement of thermoelectric power factor in Si-doped Mg_3Sb_2 compound for thermoelectric converting applications

Trung Kien Mac[1, 2], Kim Ngoc Pham[1, 2], Raja Das[1, 2], Huu Tuan Nguyen[1, 2], Dang Thanh Tran[3, 4], Bach Thang Phan[5], Anh Tuan Duong[1, 2*]

[1]Faculty of Materials Science and Engineering, Phenikaa University, To Huu Street, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam
[2]Phenikaa Research and Technology Institute (PRATI), 167 Hoang Ngan Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam
[3]Institute of Materials Science, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam
[4]Graduate University of Science and Technology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam
[5]Center for Innovative Materials and Architectures, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, Quarter 6, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 4 April 2022; revised 9 May 2022; accepted 13 May 2022

Abstract:

Mg_3Sb_2 is a narrow band gap semiconductor with electrical conductivity and thermoelectric properties dependent on structure and doping elements. In this study, to improve the thermoelectric properties of Mg_3Sb_2, the authors doped Si at different ratios (x=0.05, 0.1, 0.15, 0.25, and 0.3) into Sb sites as the formula $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ to improve the electrical conductivity of doping samples while maintaining a high value of the Seebeck coefficient. The results exhibited that Mg_3Sb_2 and $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ compounds prepared by solid phase reaction method (high energy grinding combined with hot pressing and sintering) showed hexagonal structure. The electrical conductivity of the Si-doped samples increased significantly compared to the undoped Mg_3Sb_2 sample, while the Seebeck coefficient slightly decreased in the low doping contents samples and highest increase in the $Mg_3Sb_{1.75}Si_{0.25}$ sample. The power factor of all doping samples increased compared to undoped samples. The power factor values at 673K of $Mg_3Sb_{1.9}Si_{0.1}$, $Mg_3Sb_{1.75}Si_{0.25}$, and $Mg_3Sb_{1.7}Si_{0.3}$ increased around 1.7 times compared to the Mg_3Sb_2.

Keywords: **Mg_3Sb_2, Seebeck effect, semiconductor, thermoelectric.**

Classification number: **1.3**

Việc khảo sát và tìm ra một nguyên tố phù hợp để pha tạp vào Mg_3Sb_2 và tối ưu hóa hàm lượng pha tạp là điều cần thiết để cải thiện tính chất nhiệt điện của vật liệu nền.

Ở nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn Si làm nguyên tố pha tạp vì đây là vật liệu phổ biến, thân thiện với môi trường và có giá thành thấp. Với việc pha tạp Si vào vật liệu nền Mg_3Sb_2, chúng tôi mong muốn làm giảm khối lượng hiệu dụng của vật liệu (làm tăng hệ số Seebeck) và lai hoá hai hợp chất cùng cấu trúc là vật liệu nền Mg_3Sb_2 với pha $SiSb_3$ hình thành bên trong vật liệu. Hơn nữa, pha cấu trúc $SiSb_3$ có đặc tính dẫn điện tốt khi được hình thành trong hợp chất có thể cải thiện tính chất dẫn điện của hỗn hợp. Hiện nay, chưa ghi nhận các kết quả nghiên cứu về tính chất nhiệt điện của pha tạp Si vào vật liệu nền Mg_3Sb_2. Với việc tạo ra pha $SiSb_3$ trong và giảm thiểu lượng Sb dư thừa đã làm tăng giá trị hệ số công suất lên khoảng 1,7 lần so với mẫu không pha tạp (PF=1,35 $\mu Wcm^{-1}K^{-2}$ trong khoảng 600-673K ở mẫu $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$, trong khi giá trị PF ở mẫu không pha tạp là 0,81 $\mu Wcm^{-1}K^{-2}$ trong cùng khoảng nhiệt độ khảo sát). Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các khảo sát về thay đổi điều kiện chế tạo để tăng hiệu ứng nhiệt điện trong vật liệu Mg_3Sb_2.

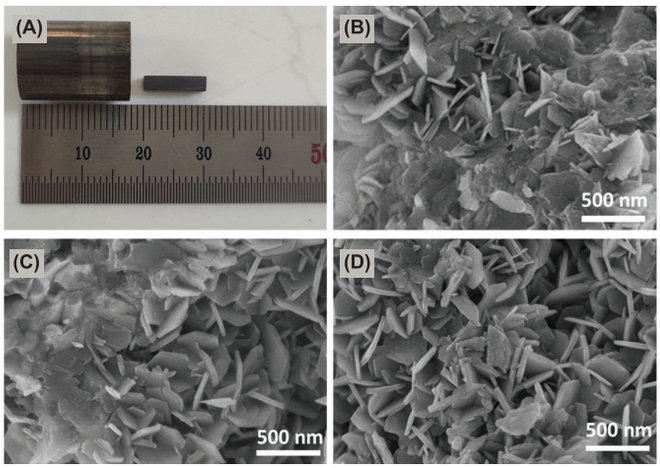
2. Thực nghiệm

Vật liệu có độ tinh khiết cao (bột Mg 99%, Sb 99% và Si 99%) được cân theo tỷ lệ $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3) lần lượt với tổng khối lượng 10 g. Sau đó, mẫu được nghiền trong máy nghiền bi năng lượng cao (FRITSCH pulverisette 7, Germany) với cối và bi Tungsten carbide trong 2 giờ, tốc độ 700 vòng/phút. Hỗn hợp sau khi nghiền được cho vào khuôn ép đường kính 12 mm và ép nóng ở áp suất 50 MPa, nhiệt độ 250°C trong 1 giờ. Hợp kim dạng khối trụ sau khi ép nóng được nung ở nhiệt độ 600°C trong môi trường Ar trong 60 phút. Hình thái và cấu trúc của vật liệu được khảo sát bằng phổ nhiễu xạ tia X (XRD) và kính hiển vi điện tử quét độ phân giải cao (FE-SEM). Tính chất nhiệt điện của vật liệu được khảo sát thông qua hệ đo đặc trưng Seebeck (s) và độ dẫn nhiệt (σ) theo nhiệt độ.

3. Kết quả và bàn luận

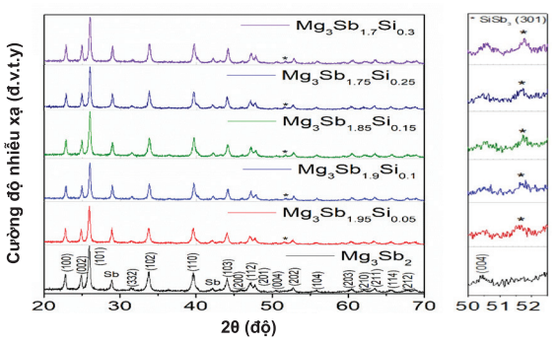
Hình 1A là ảnh chụp thực tế mẫu Mg_3Sb_2 sau khi ép viên ở áp suất nén 50 MPa ở 250°C và nung thiêu kết ở 600°C. Các mẫu đều thể hiện đặc tính liên kết cơ học tốt, không có các biểu hiện nứt gãy sau khi nung. Các thanh vật liệu được cắt thành hình hộp chữ nhật có chiều dài 10 mm, tiết diện vuông 2x2 mm để khảo sát độ dẫn điện và hệ số Seebeck trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 673K. Hình ảnh chụp bề mặt sau khi đập vỡ của các mẫu Mg_3Sb_2 (B), $Mg_3Sb_{1,95}Si_{0,05}$ (C) và $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$ (D) bằng FE-SEM cho thấy, các tấm mỏng có độ dày khoảng vài chục nanomet hình lục giác được mọc xen kẽ nhau giúp xác định được các mẫu đều có cấu trúc tinh thể hexagonal. Bên cạnh các phiến dạng đĩa, cũng quan sát thấy một lượng bột dư thừa còn tồn tại được cho là của Sb không phản ứng hết. Bằng chứng cho thấy, khi giảm nồng độ Sb và thay thế bằng Si thì ở ảnh FE-SEM của các mẫu Mg_3Sb_2, $Mg_3Sb_{1,95}Si_{0,05}$ và $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$, lượng bột dư thừa đã giảm đi đáng kể. Tuy nhiên, khi phân tích XRD vẫn ghi nhận sự xuất hiện của Sb chưa phản ứng hết trong tất cả các mẫu. Nguyên nhân lượng Sb còn dư trong vật liệu đến từ bản chất của hệ vật liệu Mg_3Sb_2 với đặc tính khi hình thành cấu trúc pha Mg_3Sb_2, cấu trúc tinh thể bị khuyết thiếu các vị trí Mg^{2+}, điều này tạo nên bản chất bán dẫn loại p của họ vật liệu Mg_3Sb_2 [31]. Để triệt tiêu hết lượng Sb dư thừa, các nghiên cứu trước đó đã công bố tăng tỷ lệ tiền chất ban đầu Mg:Sb từ 3:2 lên 3,2:2 hoặc cao hơn. Khi đó, khuyết thiếu Mg^{2+} được lấp đầy và vật liệu chuyển sang thành bán dẫn loại n [24]. Ở đây với mong muốn khảo sát sự thay đổi tính chất nhiệt điện của

bán dẫn loại p-Mg_3Sb_2 khi đưa thêm Si vào trong hợp chất nên chúng tôi vẫn giữ tỷ lệ tiền chất Mg:Sb là 3:2 cho tất cả các mẫu pha tạp và không pha tạp.



Hình 1. Ảnh mẫu Mg_3Sb_2 sau khi được nung ở 600°C. (A) Thanh trụ chữ nhật được cắt để đo tính chất nhiệt điện; **(B-D)** Ảnh FE-SEM chụp bề mặt của các mẫu Mg_3Sb_2, $Mg_3Sb_{1,95}Si_{0,05}$ và $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$ sau khi được đập vỡ.

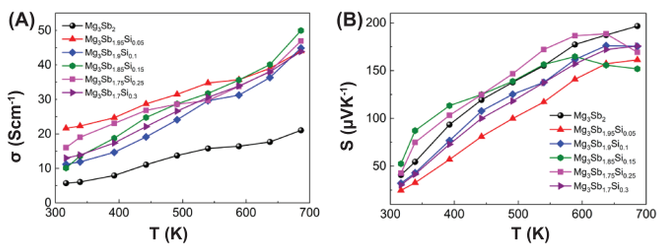
XRD của mẫu $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3) được thể hiện ở hình 2. Kết quả phân tích XRD cho thấy, tất cả các mẫu Mg_3Sb_2 và Mg_3Sb_2 pha tạp Si có các đỉnh nhiễu xạ phù hợp với cấu trúc lục giác (Mg_3Sb_2 #mp-2646). Tuy nhiên, ở mẫu Mg_3Sb_2 không pha tạp xuất hiện thêm đỉnh Sb ở vị trí 2θ=28,9°. Khi đưa Si vào trong hợp chất lượng Sb còn dư sẽ phản ứng với Si tạo ra pha $SiSb_3$ cùng cấu trúc hexagonal xen kẽ vào Mg_3Sb_2. Đỉnh $SiSb_3$ (301) được quan sát thấy ở vị trí góc 2θ=51,7° (dấu * trên hình 2) và được phóng to để thấy rõ hơn xu hướng tăng dần của cường độ theo hàm lượng Si tăng. Pha $SiSb_3$ xuất hiện trong mẫu pha tạp Si được cho là một trong những yếu tố làm thay đổi đặc tính dẫn điện và hiệu ứng nhiệt điện trong vật liệu sẽ được thảo luận chi tiết ở phần sau.



Hình 2. XRD của các mẫu $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3).

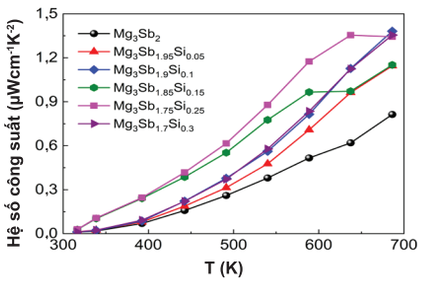
Sự phụ thuộc của độ dẫn điện và hệ số Seebeck theo nhiệt độ trong khoảng 300-673K được thể hiện ở hình 3(A, B). Các mẫu đều thể hiện đặc tính bán dẫn với độ dẫn điện tăng dần khi tăng nhiệt độ của phép đo. Điểm đáng lưu ý là giá trị của độ dẫn điện trong toàn dải đo ở các mẫu pha tạp Si đều tăng đáng kể so với mẫu không pha tạp. Tuy nhiên, quy luật tăng độ dẫn điện không tỷ lệ với nồng độ pha tạp Si. Cụ thể, ở mẫu pha tạp với tỷ lệ Si thấp nhất (x=0,05) cho độ dẫn điện cao nhất trong vùng nhiệt độ dưới 550K. Các mẫu pha tạp với tỷ lệ Si cao hơn (x=0,1; 0,15 và 0,25) độ dẫn điện trong vùng nhiệt độ dưới 550K tỷ lệ với độ tăng của nồng độ Si. Mẫu pha tạp với nồng độ Si cao nhất (x=0,3), độ dẫn lại có xu hướng giảm đi. Để lý giải cho sự thay đổi không theo quy luật của đặc tính dẫn điện trên các mẫu, chúng ta cần có các phép phân tích về nồng độ, độ linh động của hạt tải cũng như xác định chính xác tỷ lệ thành phần của các pha cấu trúc trong hợp chất, từ đó đánh giá được ảnh hưởng của các pha tạp chất lên đặc tính dẫn điện của vật liệu. Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, chúng tôi chỉ bước đầu kết luận rằng, sự thay thế một phần Si vào vị trí Sb trong hợp chất Mg_3Sb_2 và sự xuất hiện của pha $SiSb_3$ góp phần làm tăng độ dẫn điện của vật liệu nền Mg_3Sb_2.

Hình 3B biểu diễn giá trị hệ số Seebeck của các mẫu $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3) khảo sát trong dải nhiệt độ 323-673K. Chúng tôi quan sát thấy rằng, các mẫu pha tạp Si ở nồng độ x=0,05, 0,1 và 0,3 có giá trị Seebeck thấp hơn mẫu không pha tạp trong toàn dải nhiệt độ khảo sát, trong khi các mẫu pha tạp Si với nồng độ x=0,15 và 0,25 cho giá trị Seebeck cao hơn mẫu không pha tạp ở vùng nhiệt độ dưới 550K. Sự giảm giá trị Seebeck của bán dẫn khi độ dẫn điện tăng là hoàn toàn dễ hiểu. Tuy nhiên, sự thăng giáng của Seebeck ở các mẫu có nồng độ pha tạp x=0,15 và 0,25 được cho là do sự cạnh tranh giữa nồng độ và độ linh động của hạt tải và sự tối ưu hóa khối lượng hiệu dụng của vật liệu ở các mẫu này. Kết quả khi pha tạp Si vào vật liệu nền Mg_3Sb_2 đã cải thiện đáng kể độ dẫn điện nhưng không làm giảm quá nhiều giá trị hệ số Seebeck. Đây là điểm quan trọng của nghiên cứu này và thực sự có ý nghĩa trong việc cải thiện hệ số công suất của vật liệu loại p-Mg_3Sb_2.



Hình 3. Sự phụ thuộc của độ dẫn điện (A), hệ số Seebeck theo nhiệt độ của $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3) (B).

Hệ số công suất của vật liệu nhiệt điện được xác định thông qua độ dẫn điện và hệ số Seebeck theo công thức: $PF=S^2\sigma$, với S là hệ số Seebeck, σ là độ dẫn điện đặc trưng cho khả năng chuyển đổi nhiệt điện trong vật liệu. Hình 4 biểu diễn kết quả tính toán hệ số công suất chuyển đổi nhiệt điện theo nhiệt độ. Mặc dù hệ số Seebeck giảm nhẹ ở một số mẫu nhưng do độ dẫn điện tăng mạnh nên hệ số công suất thu được ở các mẫu pha tạp đều tăng lên đáng kể so với mẫu không pha tạp. Điển hình là các mẫu $Mg_3Sb_{1,9}Si_{0,1}$, $Mg_3Sb_{1,75}Si_{0,25}$ và $Mg_3Sb_{1,7}Si_{0,3}$ có hệ số công suất tăng khoảng 1,7 lần so với mẫu Mg_3Sb_2 không pha tạp.



Hình 4. Sự phụ thuộc của hệ số công suất theo nhiệt độ của $Mg_3Sb_{2-x}Si_x$ (x=0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 và 0,3).

4. Kết luận

Bằng phương pháp phản ứng pha rắn (kết hợp giữa nghiền năng lượng cao, ép nóng và nung thiêu kết), chúng tôi đã chế tạo thành công hợp chất Mg_3Sb_2 và hợp chất lai hóa giữa Mg_3Sb_2 và $SiSb_3$ khi pha tạp Si nồng độ từ 0,05 đến 0,3. Kết quả thu được tất cả các mẫu đều cho cấu trúc lục giác, đồng thời các mẫu pha tạp đều xuất hiện pha cấu trúc $SiSb_3$. Độ dẫn điện tăng lên đáng kể ở các mẫu pha tạp trong khi hệ số Seebeck vẫn duy trì ở mức cao đã đẩy hệ số công suất tăng khoảng 1,7 lần so với mẫu không pha tạp. Kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tính chất nhiệt điện của Mg_3Sb_2 thông qua việc tối ưu hóa nồng độ pha tạp và quy trình chế tạo để nâng cao đặc tính nhiệt điện của vật liệu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 103.02-2019.354. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M.T. Jeena, T. Bok, S.H. Kim, et al. (2016), "A siloxane-incorporated copolymer as an *in situ* cross-linkable binder for high performance silicon anodes in Li-ion batteries", *Nanoscale*, **8(17)**, pp.9245-9253, DOI: 10.1039/C6NR01559J.

[2] D.M. Rowe (1995), *CRC Handbook of Thermoelectrics*, CRC Press, 701pp.

[3] A.T. Duong, V.Q. Nguyen, G. Duvjir, et al. (2016), "Achieving ZT=2.2 with Bi-doped n-type SnSe single crystals", *Nat. Commun.*, **7**, DOI: 10.1038/ncomms13713.

[4] L. Yang, Z.G. Chen, G. Han, et al. (2015), "High-performance thermoelectric Cu_2Se nanoplates through nanostructure engineering", *Nano Energy*, **16**, pp.367-374, DOI: 10.1016/j.nanoen.2015.07.012.

[5] H.Y. Lv, H.J. Liu, J. Shi, et al. (2013), "Optimized thermoelectric performance of Bi_2Te_3 nanowires", *Journal of Materials Chemistry A*, **1(23)**, pp.6831-6838, DOI: 10.1039/C3TA10804J.

[6] S. Chen, N. Logothetis, L. Ye, et al. (2015), "A high performance Ag alloyed nano-scale n-type Bi_2Te_3 based thermoelectric material", *Mater. Today Proc.*, **2(2)**, pp.610-619, DOI: 10.1016/j.matpr.2015.05.083.

[7] W.H. Shin, J.W. Roh, B. Ryu, et al. (2018), "Enhancing thermoelectric performances of bismuth antimony telluride via synergistic combination of multiscale structuring and band alignment by $FeTe_2$ incorporation", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **10(4)**, pp.3689-3698, DOI: 10.1021/acsami.7b18451.

[8] O. Yamashita, S. Tomiyoshi, K. Makita (2003), "Bismuth telluride compounds with high thermoelectric figures of merit", *J. Appl. Phys.*, **93(1)**, pp.368-374, DOI: 10.1063/1.1525400.

[9] M.K. Han, K. Ahn, H. Kim, et al. (2011), "Formation of Cu nanoparticles in layered Bi_2Te_3 and their effect on *ZT* enhancement", *J. Mater. Chem.*, **21(30)**, pp.11365-11370, DOI: 10.1039/C1JM10163C.

[10] S. Wang, H. Li, R. Lu, et al. (2013) "Metal nanoparticle decorated n-type Bi_2Te_3-based materials with enhanced thermoelectric performances", *Nanotechnology*, **24(28)**, DOI: 10.1088/0957-4484/24/28/285702.

[11] L.D. Zhao, S.H. Lo, Y. Zhang, et al. (2014), "Ultralow thermal conductivity and high thermoelectric figure of merit in SnSe crystals", *Nature*, **508(7496)**, pp.373-377, DOI: 10.1038/nature13184.

[12] B. Zhong, Y. Zhang, W. Li, et al. (2014), "High superionic conduction arising from aligned large lamellae and large figure of merit in bulk $Cu_{1.94}A_{10.02}Se$", *Appl. Phys. Lett.*, **105(12)**, DOI: 10.1063/1.4896520.

[13] M. Li, D.L. Cortie, J. Liu, et al. (2018), "Ultra-high thermoelectric performance in graphene incorporated Cu_2Se: Role of mismatching phonon modes", *Nano Energy*, **53**, pp.993-1002, DOI: 10.1016/j.nanoen.2018.09.041.

[14] L. Zhao, S.M.K.N. Islam, J. Wang, et al. (2017), "Significant enhancement of figure-of-merit in carbon-reinforced Cu_2Se nanocrystalline solids", *Nano Energy*, **41**, pp.164-171, DOI: 10.1016/j.nanoen.2017.09.020.

[15] S. Butt, W. Xu, M.U. Farooq, et al. (2016), "Enhanced thermoelectricity in high-temperature β-phase copper(I) selenides embedded with Cu_2Te nanoclusters", *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **8(24)**, pp.15196-15204, DOI: 10.1021/acsami.6b02086.

[16] C. Zhou, Y. Yu, Y.K. Lee, et al. (2018), "High-performance n-type PbSe-Cu_2Se thermoelectrics through conduction band engineering and phonon softening", *J. Am. Chem. Soc.*, **140(45)**, pp.1535-1554, DOI: 10.1021/jacs.8b10448.

[17] J. Yu, C. Fu, Y. Liu, et al. (2018), "Unique role of refractory Ta alloying in enhancing the figure of merit of NbFeSb thermoelectric materials", *Adv. Energy Mater.*, **8(1)**, DOI: 10.1002/aenm.201701313.

[18] H. Zhu, J. Mao, Y. Li, et al. (2019), "Discovery of TaFeSb-based half-heuslers with high thermoelectric performance", *Nat. Commun.*, **10(1)**, pp.1-8, DOI: 10.1038/s41467-018-08223-5.

[19] R. Funahashi, I. Matsubara, H. Ikuta, et al. (2000), "Oxide single crystal with high thermoelectric performance in air", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39(11B)**, DOI: 10.1143/JJAP.39.L1127.

[20] J. Wei, L. Yang, Z. Ma, et al. (2020), "Review of current high-ZT thermoelectric materials", *J. Mater. Sci.*, **55(27)**, pp.12642-12704, DOI: 10.1007/s10853-020-04949-0.

[21] C.L. Condron, S.M. Kauzlarich, F. Gascoin, et al. (2006), "Thermoelectric properties and microstructure of Mg_3Sb_2", *J. Solid State Chem.*, **179(8)**, pp.2252-2257, DOI: 10.1016/j.jssc.2006.01.034.

[22] X. Shi, T. Zhao, X. Zhang, et al. (2019), "Extraordinary n-type Mg_3SbBi thermoelectrics enabled by yttrium doping", *Adv. Mater.*, **31(36)**, pp.1-8, DOI: 10.1002/adma.201903387.

[23] J. Zhang, L. Song, S.H. Pedersen, et al. (2017), "Discovery of high-performance low-cost n-type Mg_3Sb_2-based thermoelectric materials with multi-valley conduction bands", *Nat. Commun.*, **8**, DOI: 10.1038/ncomms13901.

[24] H. Tamaki, H.K. Sato, T. Kanno (2016), "Isotropic conduction network and defect chemistry in $Mg_{3+\delta}Sb_2$-based layered zintl compounds with high thermoelectric performance", *Adv. Mater.*, **28(46)**, pp.10182-10187, DOI: 10.1002/adma.201603955.

[25] Y. Wang, X. Zhang, Y. Wang, et al. (2019), "Enhanced thermoelectric properties of n-type Mg_3Sb_2 by excess magnesium and tellurium doping", *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, **216(6)**, DOI: 10.1002/pssa.201800811.

[26] X. Chen, H. Wu, J. Cui, et al. (2018), "Extraordinary thermoelectric performance in n-type manganese doped Mg_3Sb_2 zintl: High band degeneracy, tuned carrier scattering mechanism and hierarchical microstructure", *Nano Energy*, **52**, pp.246-255, DOI: 10.1016/j.nanoen.2018.07.059.

[27] J.I. Tani, H. Ishikawa (2020), "Thermoelectric properties of Te-doped Mg_3Sb_2 synthesized by spark plasma sintering", *Phys. B Condens. Matter*, **588**, DOI: 10.1016/j.physb.2020.412173.

[28] Z. Ren, J. Shuai, J. Mao, et al. (2018), "Significantly enhanced thermoelectric properties of p-type Mg_3Sb_2 via co-doping of Na and Zn", *Acta Mater.*, **143**, pp.265-271, DOI: 10.1016/j.actamat.2017.10.015.

[29] W. Zhu, W. Fang, J. Zou, et al. (2022), "Enhanced thermoelectric performance of indium-doped n-type Mg_3Sb_2-based materials synthesized by rapid induction melting", *J. Electron. Mater.*, **51(4)**, pp.1591-1596, DOI: 10.1007/s11664-021-09400-x.

[30] Y. Wang, X. Zhang, Y. Wang, et al. (2022), "High thermoelectric performance of nanostructured Mg_3Sb_2 on synergistic Te-doping and Mg/Y interstitial", *J. Mater. Sci.*, **57(5)**, pp.3183-3192, DOI: 10.1007/s10853-021-06797-y.

[31] S. Ohno, K. Imasato, S. Anand, et al. (2018), "Phase boundary mapping to obtain n-type Mg_3Sb_2-based thermoelectrics phase boundary mapping to obtain n-type Mg_3Sb_2 - based thermoelectrics", *Joule*, **2(1)**, pp.141-154, DOI: 10.1016/j.joule.2017.11.005.

Nghiên cứu một số đặc tính vật liệu màng lọc chế tạo từ cellulose acetate và polyguanidine

Nguyễn Thị Minh Châu, Lưu Thị Huệ, Ngô Hồng Ánh Thu*, Trần Thị Dung*

Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 19 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/2/2022; ngày chuyển phản biện 18/2/2022; ngày nhận phản biện 25/2/2022; ngày chấp nhận đăng 2/3/2022

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, màng lọc được chế tạo từ các vật liệu cellulose acetate (CA) ưa nước và polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) kháng khuẩn bằng phương pháp đảo pha nhằm tăng cường tính năng tách lọc và khả năng kháng tắc. Ảnh hưởng của các điều kiện chế tạo đến đặc tính cấu trúc và tính năng tách lọc của màng đã được khảo sát và đánh giá. Kết quả thực nghiệm cho thấy, màng lọc CA chế tạo bằng phương pháp đảo pha có cấu trúc bất đối xứng với lớp bề mặt chặt sít ở trên lớp đỡ xốp. Nồng độ CA trong dung dịch tạo màng có ảnh hưởng mạnh đến cấu trúc và tính năng lọc tách của màng. Khi nồng độ CA tăng từ 12,2 đến 18,2%, ở áp suất lọc 5 bar, năng suất lọc trung bình của màng giảm dần từ 46,47 xuống 38,72 l/m²h do lớp bề mặt của màng hình thành dày hơn. So với màng CA thuần, màng CA/PHMG có năng suất lọc trung bình cao hơn đến 1,6 lần, mức độ tắc màng thấp hơn và khả năng kháng tắc tốt hơn rõ rệt.

Từ khóa: **cellulose acetate, màng lọc, polyguanidine.**

Chỉ số phân loại: **1.4**

1. Mở đầu

Màng lọc là vật liệu được sử dụng trong quá trình tách một hỗn hợp đồng thể hoặc dị thể. Ưu điểm của phương pháp lọc màng là có thể phân tách được các cấu tử có kích thước từ cỡ hạt tới ion mà không cần sử dụng thêm hóa chất, các cấu tử cần tách không phải chuyển pha, là phương pháp tách hiện đại, tiết kiệm năng lượng và thân thiện với môi trường [1]. Hiệu quả của một quá trình lọc màng được đánh giá thông qua khả năng lưu giữ các cấu tử cần tách và năng suất lọc trung bình của màng, trong đó độ lưu giữ phụ thuộc chủ yếu vào cấu trúc màng, trong khi năng suất lọc chịu ảnh hưởng mạnh bởi bản chất của vật liệu tạo màng.

Trong lĩnh vực xử lý nước, phương pháp lọc màng có nhiều ưu điểm về mặt kỹ thuật, quy mô sản xuất cũng như giá thành [2, 3]. Quá trình tách qua màng có thể loại bỏ được hầu hết các tạp chất trong nước như kim loại nặng, chất hữu cơ hòa tan, các ion có kích thước nhỏ, vi sinh vật… Tuy nhiên, một trong những thách thức đã và đang đặt ra là hiện tượng tắc màng (fouling), gây ra bởi sự tích lũy các tiểu phân bị lưu giữ trên bề mặt và bên trong các lỗ xốp của màng trong quá trình lọc tách [4, 5]. Tùy thuộc vào bản chất của các tiểu phân gây tắc màng, có thể phân biệt một vài kiểu tắc màng như: vô cơ, keo, hữu cơ hay sinh học (biofouling) [6-8], trong đó biofouling thường gây ra sự tắc màng khá nghiêm trọng và rất khó xử lý. Biofouling được khơi mào bởi sự có mặt của một số vi khuẩn trên bề mặt màng, sau đó phát triển và được nhân lên nhanh chóng với sự có mặt của các chất dinh dưỡng có trong nước [9]. Các vi khuẩn bài tiết ra hợp chất polyme ngoại bào (EPS) có khả năng liên kết các tế bào lại với nhau, tạo thành lớp chất nhờn. Tập hợp các tế bào, EPS và vật chất bị tích lũy trên bề mặt màng hình thành lớp màng sinh học, gọi là "biofilm".

Hầu hết các nỗ lực để giảm thiểu hiện tượng tắc màng do biofouling đều không mang lại hiệu quả, do lớp biofilm bám chặt rất khó tách rửa ra khỏi bề mặt. Việc sử dụng chất khử trùng (nước Javen) có thể xử lý được biofilm nhưng mặt khác lại gây tổn hại hoặc phá vỡ cấu trúc bề mặt màng polyme. Với màng lọc nano (NF), các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, hơn 50% (w/w) lớp cặn bẩn bám trên màng có nguồn gốc là các vi sinh vật có trong nước. Các màng NF thương mại dùng cho xử lý nước hiện nay được làm chủ yếu từ các vật liệu CA và polyamide (PA). Khả năng kháng khuẩn kém của vật liệu CA cũng như sự hạn chế của vật liệu PA trong môi trường khử trùng [10] đã đặt ra yêu cầu hết sức cần thiết trong việc nghiên cứu phát triển vật liệu màng lọc có tính kháng khuẩn, nhằm nâng cao khả năng kháng tắc sinh học cho màng.

Một số công trình nghiên cứu chế tạo màng lọc có tính kháng khuẩn đã được công bố, sử dụng các hạt nano vô cơ như nano đồng, nano bạc ráp lên bề mặt màng [11-14]. Gần đây, việc sử dụng các PHMG bắt đầu được quan tâm do khả năng kháng khuẩn tốt và tính chất không độc hại của vật liệu này. Hiện nay, đã có một số nghiên cứu đưa PHMG lên bề mặt màng polyamide nhằm nâng cao khả năng ứng dụng màng này trong thực tế [15-17]. Tính kháng khuẩn của polyguanidine được cho là do tương tác giữa lớp lipid

*Tác giả liên hệ: Email: anhthu@hus.edu.vn; tranthidung@hus.edu.vn

Characterisation of membrane prepared from cellulose acetate and polyguanidine

Thi Minh Chau Nguyen, Thi Hue Luu, Hong Anh Thu Ngo*, Thi Dung Tran*

Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 19 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 15 February 2022, revised 25 February 2022; accepted 2 March 2022

Abstract:

In this study, membranes were prepared from hydrophilic cellulose acetate (CA) and antibacterial polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) by phase inversion method to improve membrane separation and antifouling capacities. The influence of preparation conditions on membrane structure and separation performance has been investigated and evaluated. The experimental results indicated that the CA membranes prepared by the phase inversion method have an asymmetric structure with a dense top layer located onto a porous supporting layer. The concentration of CA in casting solution highly influences membrane structure and its separation capacity. When the CA concentration increased from 12.2 to 18.2%, at a filter pressure of 5 bar, the prepared membrane flux gradually decreased from 46.47 to 38.72 l/m².h due to the increase in membrane surface thickness. In comparison with the pure CA membrane, the CA/PHMG membranes have higher average filtration yield (1.6 times), lower degree of membrane fouling, and much better antifouling properties.

Keywords: **cellulose acetate, membrane, polyguanidine.**

Classification number: **1.4**

kép của màng tế bào vi khuẩn và các nhóm guanidine, làm cho lớp lipid kép mất tính linh động hoặc bị hòa tan, ức chế sự phát triển của tế bào và cuối cùng dẫn đến sự chết của vi khuẩn [18-20]. Tuy nhiên, cho đến nay, hầu như chưa có nghiên cứu nào đưa PHMG biến tính màng CA - loại màng rất dễ bị vi khuẩn tấn công để tăng cường khả năng kháng tắc sinh học. Bài báo trình bày một số kết quả nghiên cứu chế tạo màng lọc từ các vật liệu CA ưa nước và PHMG nhằm tăng cường tính năng tách lọc và khả năng kháng tắc trong quá trình tách lọc. Ảnh hưởng của một số điều kiện chế tạo đến đặc trưng cấu trúc và tính năng lọc tách của màng được khảo sát và đánh giá.

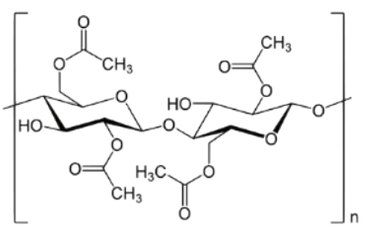
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất, vật liệu

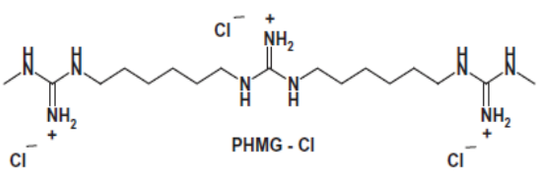
CA (Sigma-Aldrich, 99%), acetone (Xilong, 99%), PHMG (Sigma-Aldrich, 98%), formamide (Xilong, 98%), ethanol (Công ty Cổ phần tập đoàn hóa chất Đức Giang, 96%), môi trường TSB, TSA (Xilong), nước khử ion.

2.2. Chế tạo màng

Hòa tan bột CA trong hỗn hợp dung môi acetone và formamide với các nồng độ khác nhau (12,2-18,2%) thu được dung dịch đồng nhất. Dung dịch PHMG được chuẩn bị (với nồng độ 3%) trong etanol được thêm vào dung dịch tạo màng với lượng xác định. Trải dung dịch thành lớp mỏng có chiều dày 300 µm, cho bay hơi dung môi và đưa vào môi trường đông tụ. Hình 1 và 2 là công thức cấu tạo của CA và PHMG. Khi cho thêm PHMG vào dung dịch CA xảy ra phản ứng hóa học giữa nhóm guanidine $NHC(NH_2)$ của PHMG và nhóm hydroxyl của CA tạo liên kết cầu hydro. Màng sau khi hình thành được ngâm rửa kỹ bằng nước khử ion để loại bỏ hoàn toàn dung môi và PHMG chưa tham gia phản ứng ra khỏi màng.



Hình 1. CA.



Hình 2. PHMG.

2.3. Đánh giá đặc trưng cấu trúc màng

Cấu trúc hình thái vật liệu màng (mặt cắt, bề mặt) được quan sát qua ảnh chụp kính hiển vi điện tử quét (SEM, Hitachi 4800S, điện thế 5 kV), đo tại Viện Khoa học Vật liệu, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các mẫu vật liệu màng đều được phủ Pt với chiều dày khoảng 3 nm trước khi tiến hành chụp. Đặc trưng hóa học bề mặt màng được đánh giá qua phổ hồng ngoại phản xạ (FTIR-ATR, Affinity 1S), đo tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Các phép đo được thực hiện ở góc tới 45°, 100 vòng quét ở số sóng 400-4.000 cm^{-1}.

2.4. Đánh giá tính kháng khuẩn của màng

Cấy vi khuẩn *E. Coli* vào môi trường TSB và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 24 giờ. Pha loãng dung dịch này bằng nước muối sinh lý đã tiệt trùng. Nhúng mẫu màng vào dung dịch *E. Coli* trong thời gian 20 giây, lấy màng ra và để khô tự nhiên trên đĩa petri trong 3 giờ. Ngâm màng trở lại vào dung dịch nước muối sinh lý, lấy 100 µl dung dịch này cấy vào đĩa thạch TSA và đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Đếm số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch, màng có khả năng kháng khuẩn càng cao thì số lượng khuẩn lạc xuất hiện sẽ càng ít và ngược lại.

2.5. Đánh giá tính năng lọc tách của màng

Khả năng lưu giữ của màng được đánh giá thông qua hiệu suất xử lý COD (H_{COD}, %) của nước sông.

$H_{COD}=[(1-COD_{dịch\ lọc}/COD_{nước\ sông})x100]$

Năng suất lọc trung bình (J, l/m^2h) tại áp suất xác định được tính theo biểu thức:

$J=V/(Axt)$

với V là thể tích dịch lọc (l); A là diện tích màng lọc (m^2); t là thời gian lọc (giờ).

Mức độ duy trì năng suất lọc theo thời gian được biểu diễn qua công thức sau:

$FM\ (\%)=(J_t/J_o)x100$

với J_o là năng suất lọc trung bình của màng sau 10 phút lọc đầu tiên; J_t năng suất lọc trung bình của màng tại thời điểm t trong quá trình lọc tách.

Mức độ fouling (DF, %) được biểu diễn qua độ giảm lưu lượng nước tinh khiết thấm qua màng.

$DF=(J_{w1}-J_{w2})x100$

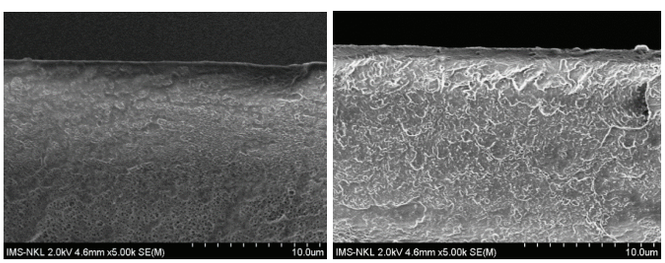
trong đó: J_{w1} và J_{w2} là lưu lượng nước tinh khiết thấm qua màng ban đầu và màng sau khi đã sử dụng để lọc dung dịch.

Khả năng kháng tắc sinh học của màng được đánh giá bằng cách ngâm màng trong nước bị ô nhiễm bởi các chất hữu cơ và vi sinh vật trong khoảng thời gian xác định (72 giờ), sau đó tiến hành quá trình lọc tách và xác định độ suy giảm năng suất lọc theo thời gian. Các thí nghiệm lọc tách được thực hiện trên thiết bị thử màng phòng thí nghiệm (Osmonic, Mỹ).

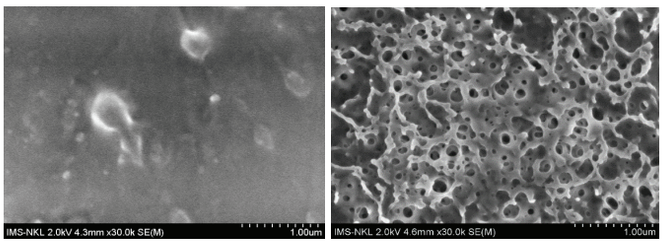
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh chụp SEM

Hình 3 và 4 là ảnh chụp SEM cấu trúc hình thái màng chế tạo từ các dung dịch tạo màng có nồng độ CA khác nhau.



Hình 3. Ảnh SEM mặt cắt màng chế tạo từ dung dịch CA nồng độ 12,2% (trái) và 18,2% (phải).

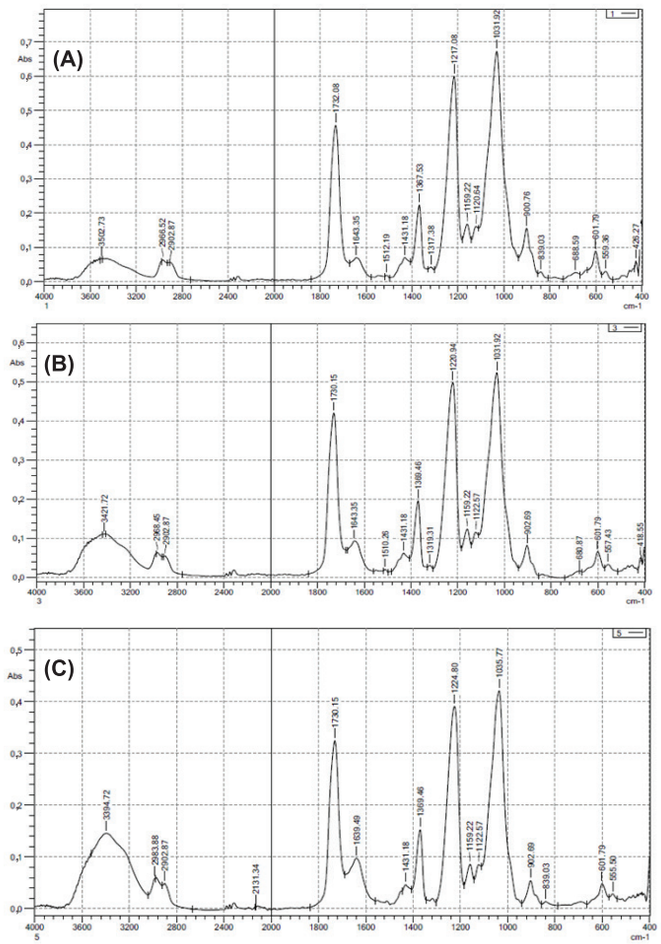


Hình 4. Ảnh SEM mặt trên (trái) và mặt dưới (phải) màng chế tạo từ dung dịch CA nồng độ 18,2%.

Kết quả cho thấy, màng hình thành có cấu trúc bất đối xứng với lớp bề mặt chặt sít ở trên lớp đỡ. Khi tăng nồng độ CA trong dung dịch tạo màng, màng hình thành sẽ có lớp bề mặt dày hơn. Bề mặt trên (toplayer) của màng khá nhẵn với kích thước lỗ rất nhỏ không quan sát rõ, bề mặt dưới của lớp đỡ thô nhám hơn và có thể quan sát thấy các lỗ xốp.

3.2. Phổ hồng ngoại phản xạ

Hình 5 là phổ hồng ngoại phản xạ bề mặt các màng CA và CA/PHMG. Kết quả cho thấy sự xuất hiện các pic hấp thụ đặc trưng cho các liên kết trong vật liệu CA tại các số sóng

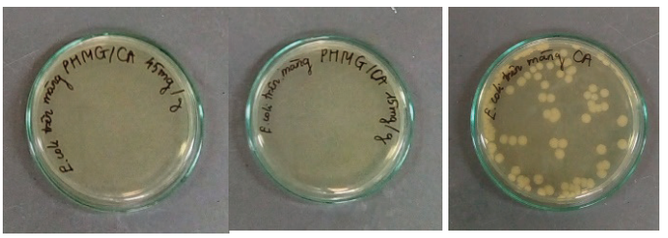


Hình 5. Phổ hồng ngoại phản xạ bề mặt màng CA (A), màng CA/PHMG với tỷ lệ PHMG/CA là 15 mg/g (B) và 75 mg/g (C).

3502 cm^{-1} (nhóm O-H); 2983 và 2902 cm^{-1} (liên kết C-H); 1730 cm^{-1} (liên kết C=O của nhóm acetyl ($CH_3C(O)O$-); 1431 và 1367 cm^{-1} (liên kết C-H của nhóm CH_3); 1217 và 1031 cm^{-1} (liên kết C-O-C). Các pic hấp thụ đặc trưng này cũng xuất hiện tương ứng với nghiên cứu của nhóm tác giả T. Sudiarti và cs (2017) [21]. So với phổ hồng ngoại của màng CA, phổ hồng ngoại của màng CA/PHMG có sự chuyển dịch và tăng cường độ pic hấp thụ trong khoảng số sóng 3400-3500 cm^{-1}. Điều này có thể do sự hình thành liên kết cầu hydro giữa nhóm NHC(NH_2)-Cl của PHMG và nhóm OH của CA làm tăng cường độ pic hấp thụ, đồng thời chuyển dịch pic về số sóng ngắn hơn (3421 và 3394 cm^{-1}), tương ứng với khi tăng tỷ lệ PHMG/CA (từ 15 đến 75 mg/g).

3.3. Khả năng kháng khuẩn của màng

Trong thí nghiệm này, màng được chế tạo với các tỷ lệ khối lượng thành phần PHMG/CA khác nhau là 0, 15 và 45 (mg/g).



Hình 6. So sánh khuẩn lạc xuất hiện trên các đĩa thạch cấy dịch ngâm các màng CA (trái) và CA/PHMG với tỷ lệ thành phần PHMG/CA là 15 mg/g (giữa) và 45 mg/g (phải).

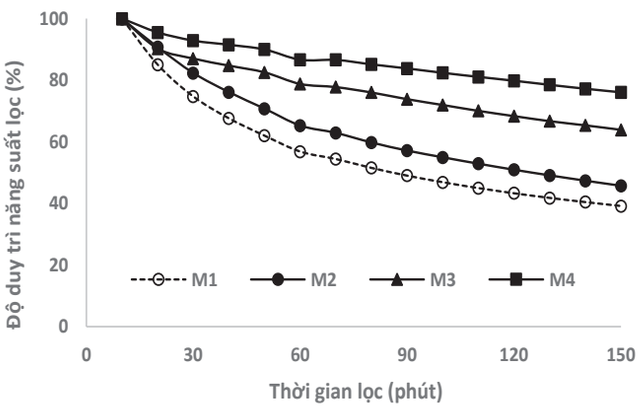
Kết quả thí nghiệm (hình 6) cho thấy, số lượng khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch được cấy dịch ngâm các mẫu màng CA/PHMG giảm mạnh so với số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch được cấy dịch ngâm mẫu màng CA thuần. Điều đó chứng tỏ màng CA/PHMG có khả năng kháng khuẩn tốt. Tính kháng khuẩn của màng CA/PHMG có tác dụng ngăn chặn hoặc giảm bớt sự hình thành lớp biofilm tạo bởi vi sinh vật trên bề mặt màng và do đó làm tăng khả năng kháng tắc cho màng trong quá trình lọc tách.

3.4. Tính năng lọc tách của màng

Trong nghiên cứu này, nước sông chưa qua xử lý được sử dụng làm đối tượng lọc. Kết quả đánh giá tính năng lọc tách của màng chế tạo từ các dung dịch có nồng độ CA khác nhau được đưa ra ở bảng 1.

Bảng 1. Năng suất lọc trung bình, mức độ tắc màng và hiệu suất xử lý COD (mẫu nước sông có COD=136 mgO_2/l, áp suất lọc 5 bar).

Mẫu màng	Nồng độ CA (%)	J (l/m^2h)	H_{COD} (%)	DF (%)
M1	12,2	46,47	80,65	76,9
M2	14,3	45,94	83,87	60,8
M3	16,3	43,27	87,09	36,8
M4	18,2	38,72	83,87	20,6



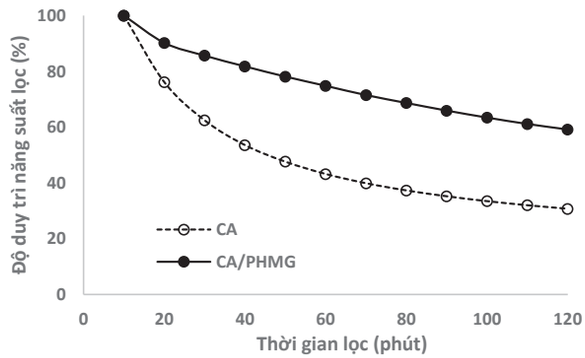
Hình 7. So sánh độ duy trì năng suất lọc theo thời gian của màng chế tạo từ các dung dịch có nồng độ CA khác nhau.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, năng suất lọc trung bình của màng giảm dần từ M1 đến M4. Điều này có thể do độ chặt sít của màng tăng dần (kích thước lỗ bề mặt và độ xốp giảm) khi nồng độ CA trong dung dịch tạo màng tăng dần từ M1 (12,2%) đến M4 (18,2%). Với cùng áp suất động lực, màng càng chặt sít thì lưu lượng lọc qua màng càng thấp do sự tăng trở lực chuyển khối. Kết quả thực nghiệm cũng cho thấy, hiệu suất xử lý COD trong nước sông của cả 4 mẫu màng đều đạt trên 80%. Kết quả đánh giá mức độ duy trì năng suất lọc của màng theo thời gian được đưa ra ở hình 7 cho thấy, năng suất lọc trung bình của tất cả các màng đều giảm dần theo thời gian, tuy nhiên độ giảm năng suất lọc của các màng là khác nhau. Khi nồng độ CA trong dung dịch tạo màng tăng từ 12,2 (M1) đến 18,2% (M4), độ giảm năng suất lọc theo thời gian của màng chậm dần. Điều này có thể do độ chặt sít và chiều dày lớp bề mặt màng tăng lên khi tăng nồng độ CA trong dung dịch tạo màng, làm cho bề mặt màng có thể trở nên trơn nhẵn hơn, các tiểu phân lưu giữ bị lọt vào bên trong lớp đỡ xốp và/hoặc bám trên bề mặt màng ít hơn, trở lực tắc màng giảm, năng suất lọc theo thời gian của màng do đó được duy trì ở mức cao hơn. Từ các kết quả thực nghiệm thu được có thể nhận thấy, mẫu màng M3 (chế tạo từ dung dịch CA nồng độ 16,3%) có tính năng lọc tách tốt với năng suất lọc trung bình cao hơn M4, trong khi mức độ tắc màng thấp hơn đáng kể so với M1 và M2.

Trong thí nghiệm tiếp theo, màng được chế tạo từ dung dịch có nồng độ CA 16,3% và có thêm thành phần PHMG với tỷ lệ PHMG/CA là 30 mg/3,5 g. Kết quả đánh giá năng suất lọc trung bình, mức độ tắc màng và độ duy trì năng suất lọc của các màng theo thời gian được đưa ra ở bảng 2 và hình 8.

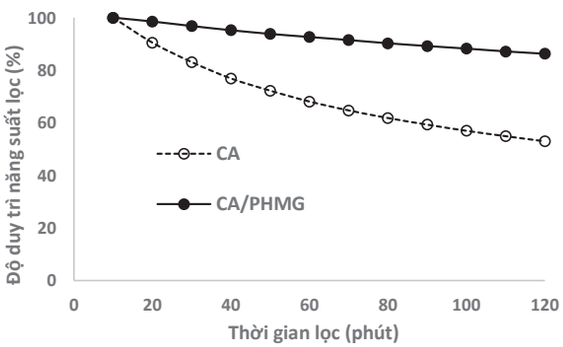
Bảng 2. Năng suất lọc trung bình và mức độ tắc màng (mẫu nước sông có COD=160 mgO_2/l, áp suất lọc 10 bar).

Thông số	Màng CA	Màng CA/PHMG
J (l/m^2.h)	36,32	60,49
DF (%)	69,58	53,94



Hình 8. So sánh độ duy trì năng suất lọc theo thời gian của các màng CA và CA/PHMG.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, màng CA/PHMG có tính năng lọc tách tốt hơn rõ rệt so với màng CA. Năng suất lọc trung bình của màng CA/PHMG là 60,49 l/m^{2}h, cao hơn nhiều so với năng suất lọc của màng CA là 36,32 l/m^{2}h. Mức độ tắc của màng CA/PHMG thấp hơn (53,94%) so với màng CA (69,58%). Đặc biệt, độ duy trì năng suất lọc của màng CA/PHMG cao hơn rõ rệt. Sau 120 phút lọc, năng suất lọc của màng CA/PHMG giảm còn 59,31%, trong khi màng CA năng suất lọc giảm còn 30,73% so với ban đầu. Để đánh giá khả năng kháng tắc sinh học của màng, thí nghiệm được tiến hành như sau: ngâm màng vào nước sông chưa qua xử lý trong 72 giờ, sau đó tiến hành quá trình lọc và so sánh mức độ duy trì năng suất lọc của màng theo thời gian.



Hình 9. So sánh độ duy trì năng suất lọc theo thời gian của màng sau khi ngâm trong nước sông 72 giờ.

Kết quả hình 9 cho thấy, độ duy trì năng suất lọc của màng CA/PHMG cao hơn nhiều so với màng CA. Sau 120 phút lọc, năng suất lọc của màng CA/PHMG duy trì ở mức 86,3%, trong khi năng suất lọc của màng CA chỉ còn khoảng 50,0% so với ban đầu. Kết quả so sánh mức độ tắc giữa các màng trong thí nghiệm này được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Mức độ tắc của các màng đã ngâm 72 giờ trong nước sông.

Màng	CA	CA/PHMG
DF (%)	58,05	16,70

Có thể nhận thấy, màng CA/PHMG có mức độ tắc màng thấp hơn (16,70%) so với màng CA (58,05%). Sở dĩ như vậy là do sự có mặt của thành phần PHMG đã hạn chế sự hình thành lớp biofilm trên bề mặt màng, khả năng kháng tắc của màng CA/PHMG do đó tốt hơn.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã chế tạo được các màng bất đối xứng từ CA và CA/PHMG bằng phương pháp đảo pha. Nồng độ CA trong dung dịch tạo màng có ảnh hưởng mạnh đến cấu trúc và tính năng lọc tách của màng. Khi nồng độ CA tăng từ 12,2 đến 18,2%, ở áp suất lọc 5 bar, năng suất lọc trung bình của màng giảm dần từ 46,47 xuống 38,72 l/m^{2}h, hiệu suất xử lý COD trong nước sông của các màng đều đạt trên 80%. So với màng CA thuần, màng composit CA/PHMG có tính năng lọc tách tốt hơn với năng suất lọc trung bình cao hơn, mức độ tắc màng thấp hơn và khả năng kháng tắc sinh học tốt hơn.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của Đại học Quốc gia Hà Nội thông qua đề tài có mã số QG.21.12. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H.K. Shon, S. Phuntsho, D.S. Chaudhary, et al. (2013), "Nanofiltration for water and wastewater treatment - a mini review", *Drinking Water Engineering and Sciene*, **6(1)**, pp.47-53, DOI: 10.5194/dwes-6-47-2013.

[2] J.P. van't Hul, I.G. Rácz, T. Reith (1997), "The application of membrane technology for reuse of process water and minimisation of wastewater in a textile washing range", *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **113(10)**, pp.287-294, DOI: 10.1111/j.1478-4408.1997.tb01850.x.

[3] L. Braeken, B. Van der Bruggen, C. Vandecasteele (2004), "Regeneration of brewery wastewater using nanofiltration", *Water Research*, **38(13)**, pp.3075-3082, DOI: 10.1016/j.watres.2004.03.028.

[4] M. Liu, Q. Chen, L. Wang, et al. (2015), "Improving fouling resistance and chlorine stability of aromatic polyamide thin film composite reverse osmosis membrane by surface grafting of polyvinyl alcohol (PVA)", *Desalination*, **367**, pp.11-20, DOI: 10.1016/j.desal.2015.03.028.

[5] V. Kochkodan, D.J. Johnson, N. Hilal, et al. (2014), "Polymeric membranes: Surface modification for minimizing (bio) colloidal fouling", *Advanced in Colloid and Interface Science*, **206**, pp.116-140, DOI: 10.1016/j.cis.2013.05.005.

[6] W.J. Lau, A.F. Ismail (2009), "Polymeric nanofiltration membanes for textile dye wastewater treatment: Preparation, performance evaluation, transport modelling, and fouling control - a review", *Desalination*, **245(1-3)**, pp.321-348, DOI: 10.1016/j.desal.2007.12.058.

[7] X.Q. Cheng, Y. Liu, Z. Guo, et al. (2015), "Nanofiltration membrane achieving dual resistance to fouling and chlorine for 'green' separation of antibiotics", *Journal of Membrane Science*, **493**, pp.156-166, DOI: 10.1016/j.memsci.2015.06.048.

[8] X.F. Shi, G. Tal, N.P. Hankins, et al. (2014), "Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review", *Journal of Water Process Engineering*, **1**, pp.121-138, DOI: 10.1016/j.jwpe.2014.04.003.

[9] S. Jiang, Y. Li, B.P. Ladewig, et al. (2017), "A review of reverse osmosis membrane fouling and control strategies", *Science of the Total Environment*, **595**, pp.567-583, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.235.

[10] M.B. El-Arnaouty, A.M. Abdel Ghaffar, M. Eid, et al. (2018), "Nano-modification of polyamide thin film composite reverse osmosis membranes by radiation grating", *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, **11(3)**, pp.204-216, DOI: 10.1016/j.jrras.2018.01.005.

[11] X. Liu, S. Qi, Y. Li, et al. (2013), "Synthesis and characterization of novel antibacterial silver nanocomposite nanofiltration and forward osmosis membranes based on layer-by-layer assembly", *Water Research*, **47(9)**, pp.3081-3092, DOI: 10.1016/j.watres.2013.03.018.

[12] A. García, B. Rodríguez, D. Oztürk, et al. (2018), "Incorporation of CuO nanoparticles into thin-film composite reverse osmosis membranes (TFC-RO) for antibiofouling properties", *Polymer Bulletin*, **75**, pp.2053-2069, DOI: 10.1007/s00289-017-2146-4.

[13] R. Quezada, Y. Quintero, J.C. Salgado, et al. (2020), "Understanding the phenomenon of copper ions release from copper - modified TFC membranes: A mathematical and experimental methodology using shrinking core model", *Nanomaterials*, **10(6)**, pp.1130-1148, DOI: 10.3390/nano10061130.

[14] M.A. Ontiveros, Y. Quintero, A. Llanquilef, et al. (2019), "Anti-biofouling and desalination properties of thin film composite reverse osmosis membranes modified with copper and iron nanoparticles", *Materials*, **12(13)**, pp.2081-2094, DOI: 10.3390/ma12132081.

[15] E.M.V. Wagner, A.C. Sagle, M.M. Sharma, et al. (2011), "Surface modification of commercial polyamide desalination membranes using poly(ethylene glycol) diglycidyl ether to enhance membrane fouling resistance", *Journal of Membrane Science*, **367(1-2)**, pp.273-287, DOI: 10.1016/j.memsci.2010.11.001.

[16] Q. Cheng, Y. Zheng, S. Yu, et al. (2013), "Surface modification of a commercial thin-film composite polyamide reverse osmosis membrane through graft polymerization of N-isopropylacrylamide followed by acrylic acid", *Journal of Membrane Science*, **447**, pp.236-245, DOI: 10.1016/j.memsci.2013.07.025.

[17] D.T.M. Anh, T.H. Nghia, D.X. Quan, et al. (2020), "Evaluation of thin film composite polyamide grafted by polyguanidine", *Vietnam Journal of Chemistry*, **58(5E12)**, pp.188-193.

[18] Y. Wang, W. Yu, A. Shu, et al. (2020), "Polypropylene-grafted poly(hexamethylene guanidine)/modified polyethylene monofilament and its antimicrobial performance", *International Journal of Polymer Science*, DOI: 10.1155/2020/6416230.

[19] H. Yuan, C. Xue, J. Zhu, et al. (2021), "Preparation and antifouling property of polyurethane film modified by PHMG and HA using layer-by-layer assembly", *Polymers*, **13(6)**, pp.934-947, DOI: 10.3390/polym13060934.

[20] D. Wei, Q. Ma, Y. Guan, et al. (2009), "Structural characterization and antibacterial activity of oligo guanidine (polyhexamethylene guanidine hydrochloride)", *Materials Science and Engineering C*, **29(6)**, pp.1776-1780, DOI: 10.1016/j.msec.2009.02.005.

[21] T. Sudiarti, D. Wahyuningrum, B. Bundjali, et al. (2017), "Mechanical strength and ionic conductivity of polymer electrolyte membranes prepared from cellulose acetate-lithium perchlorate", *Innovation in Polymer Science and Technology: Materials Science and Engineering*, **223**, pp.2052-2060, DOI: 10.1088/1757-899X/223/1/012052.

Tổng hợp trong một bước các ligand bisphosphin monoxid bằng phương pháp ôxy hóa với xúc tác PdI_2

Nguyễn Quí Hiển*

Bộ môn Hóa Hữu cơ, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 4/4/2022; ngày chuyển phản biện 8/4/2022; ngày nhận phản biện 25/4/2022; ngày chấp nhận đăng 29/4/2022

Tóm tắt:

Bisphosphin monoxid là một phân họ ligand monophosphin mới đang được ứng dụng trong nhiều quy trình tổng hợp chọn lọc đồng phân quang học, đặc biệt là lĩnh vực chức hóa liên kết C-H bất đối xứng, nhưng quy trình tổng hợp ra chúng thường gồm nhiều bước và gây lãng phí. Nghiên cứu này trình bày một quy trình cải tiến từ quá trình mono-ôxy hóa của Grushin, biến các ligand bisphosphin đối quang thành bisphosphin monoxid đối quang, chứa các khung biphenyl và 1,1'-binaphthyl, nhờ thay đổi điều kiện phản ứng và theo dõi chặt chẽ tiến trình phản ứng bằng phổ NMR. Quy trình này cung cấp một hướng tổng hợp ngắn hơn để tạo ra phân họ ligand bisphosphin monoxid bất đối xứng trục, dùng để sàng lọc ligand trong các nghiên cứu phản ứng bất đối xứng mới.

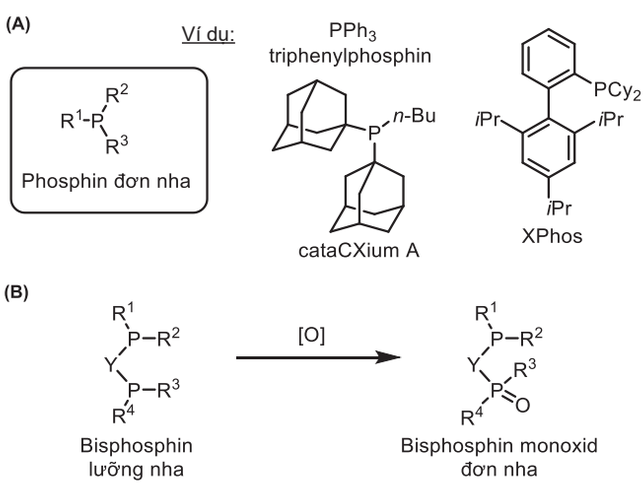
Từ khóa: **ligand bisphosphin monoxid, ligand đơn nha, xúc tác.**

Chỉ số phân loại: **1.4**

1. Đặt vấn đề

Hóa học hữu cơ hiện đại đã có một bước tiến rất dài trong 3 thập niên gần đây sau khi các nhà khoa học thành thục hơn trong việc áp dụng các xúc tác kim loại chuyển tiếp vào phản ứng hóa học hữu cơ nhằm thực hiện các phản ứng cặp đôi chéo (cross-coupling) và phản ứng chức hóa nối C-H để tạo các nối carbon-carbon và carbon-dị tố có độ khó cao [1, 2]. Từ đó, phân ngành nghiên cứu các phản ứng bất đối xứng đã được phát triển để tạo nên những cấu trúc 3 chiều phức tạp từ những nguyên liệu đầu vào đơn giản hơn [3, 4]. Bên cạnh tìm kiếm và lựa chọn xúc tác kim loại chuyển tiếp, việc thiết kế và tổng hợp nên ligand (phối tử) bất đối xứng tối ưu cũng là một vấn đề quyết định sự thành công của những phản ứng loại này [5].

Họ ligand chứa phosphor là một trong những họ được nghiên cứu kỹ lưỡng và có tính ứng dụng cao nhất trong tổng hợp bất đối xứng, vì chúng có thể được dễ dàng tinh chỉnh về các tính chất không gian và điện tử bằng cách thay thế các nhóm thế quanh nguyên tử phosphor [6]. Trong họ này, các phosphin đơn nha (monodentate phosphines - $R_1R_2R_3P$) (hình 1A) đã và đang cho thấy tính hiệu quả cao trong việc dùng làm xúc tác kết hợp với Pd(0) trong các phản ứng chức hóa nối C-H. Cụ thể, trong những phản ứng xảy ra theo cơ chế kim loại hóa-deproton hóa đồng thời (Concerted metalation-deprotonation - CMD), các phosphin đơn nha chỉ tạo một liên kết phối trí với tâm Pd, do đó để ngỏ một vị trí phối trí trống, tạo điều kiện thuận lợi cho bước hoạt hóa nối C-H được diễn ra dễ dàng [7]. Một chiến lược mới, đang được áp dụng gần đây là biến các bisphosphin lưỡng nha (R_1R_2P-Y-PR_3R_4) thành các bisphosphin đơn nha bằng cách mono-ôxy hóa chọn lọc một nhóm chức phosphine trở thành phosphin oxid, giảm ái lực lên tâm kim loại của nhóm chức này [6]. Những phosphin dạng này có thể được tập hợp vào một nhóm gọi là phân họ ligand bisphosphin monoxid, với cấu trúc chung là R_1R_2P-Y-$P(O)R_3R_4$ (hình 1B) [8]. Các bisphosphin monoxid đơn nha này đã được nhiều nhóm nghiên cứu áp dụng thành công vào một số phản ứng chức hóa nối C-H [9-13].



Hình 1. Phosphin đơn nha và các ví dụ (A) và ôxy hóa ligand bisphosphin lưỡng nha trở thành bisphosphin monoxid đơn nha (B).

Năm 1999, V.V. Grushin [14] đưa ra quy trình mono-ôxy hóa một bước một số bisphosphin thành bisphosphin monoxid bằng xúc tác PdI_2, trong điều kiện lưỡng pha, kiềm hóa. Theo quy trình của V.V. Grushin, BINAPO (**2a**) có thể được tổng hợp thành công từ nguyên liệu đầu vào là

*Email: nguyenquihien@ump.edu.vn

One-step synthesis of bisphosphine monoxide ligands via PdI_2-catalysed oxidation

Qui Hien Nguyen*

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

Received 4 April 2022; revised 25 April 2022; accepted 29 April 2022

Abstract:

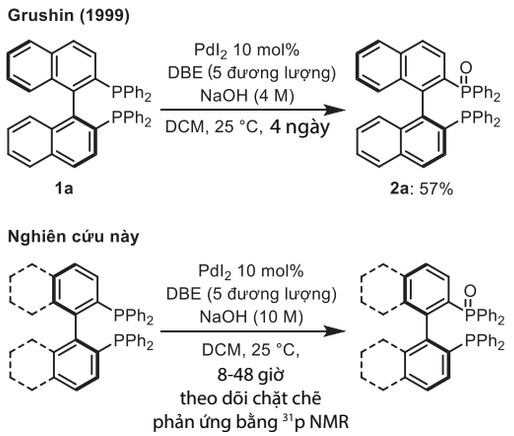
Bisphosphine monoxides are an emerging class of monophosphine ligands that have found their use in many enantioselective protocols, especially in the field of asymmetric C-H functionalization, yet their synthesis is usually multistep and chemically-wasteful. This report shows a one-step modified protocol based on Grushin's mono-oxidation of axially chiral bisphosphine ligands to form axially chiral bisphosphine monoxide ligands with biphenyl and 1,1'-binaphthyl scaffolds, by changing the reaction conditions as well as careful monitoring of the reaction progress by NMR spectroscopy. The modified protocol provides a quick way to prepare a series of chiral bisphosphine monoxide ligands for ligand screening in asymmetric methodological researches.

Keywords: **bisphosphine monoxide ligands, catalysis, monodentate ligands.**

Classification number: **1.4**

ligand BINAP (**1a**) - một ligand đã được thương mại hóa (hình 2). BINAP (**1a**) là một ligand có trục bất đối xứng và có nhiều ứng dụng trong tổng hợp bất đối xứng [15], do đó BINAPO (**2a**) cũng là một ligand bất đối xứng tiềm năng. Tuy nhiên, phản ứng này đòi hỏi thời gian phản ứng quá lâu (4 ngày). Các bisphosphin có khung dẫn xuất từ biphenyl, hay 1,1'-bisnapthyl tương tự BINAP phản ứng rất chậm trong điều kiện V.V. Grushin đưa ra. Nhiều nghiên cứu khác cũng đề ra các quy trình nhằm tổng hợp các ligand bisphosphin monoxid, nhưng đây đều là các quy trình nhiều bước và phức tạp, gây tốn kém rất nhiều về thời gian, hóa chất và dung môi [10-12].

Trong quá trình nghiên cứu các hệ phản ứng bất đối xứng nhằm chức hóa nhóm C-H, chọn lọc đồng phân quang học (enantioselectively functionalization of C-H bonds) dùng xúc tác Pd(0), chúng tôi cần phát triển một phân họ ligand bisphosphin monoxid mang bộ khung biphenyl và 1,1'-binaphthyl [13]. Với mục đích muốn rút ngắn thời gian tổng hợp ra các ligand, giảm thiểu hóa chất, dung môi sử dụng, chúng tôi đã thực hiện cải tiến quy trình của Grushin, bằng cách thay đổi điều kiện phản ứng, đồng thời theo dõi chặt chẽ tiến trình phản ứng bằng phương pháp phổ ^{1}H và ^{31}P NMR, tận dụng được ưu điểm phản ứng một bước của quy trình Grushin, nhanh chóng tạo ra nguồn ligand bất đối xứng có cấu trúc phức tạp đưa vào quy trình sàng lọc ligand cho các phản ứng bất đối xứng.



Hình 2. Tổng hợp ligand bisphosphin monoxid có khung biphenol và 1,1'-naphthyl (2) từ bisphosphin (1) theo quy trình Grushin và quy trình cải tiến của nghiên cứu này.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

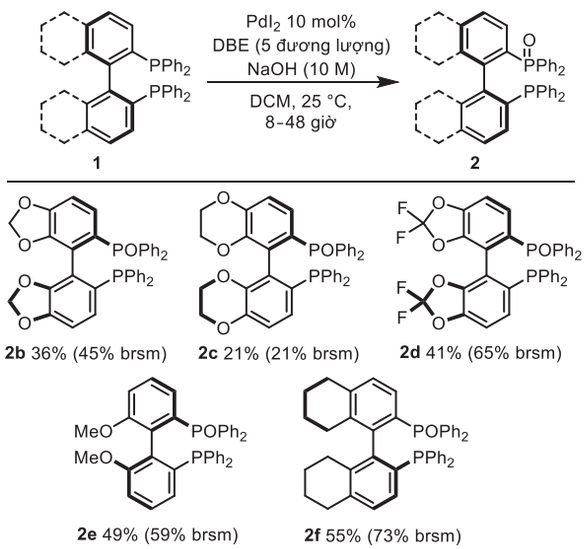
Đối tượng nghiên cứu là phản ứng tổng hợp các ligand bisphosphin monoxid thông qua con đường ôxy hóa các ligand bisphosphin bằng xúc tác PdI_2. Các ligand, hóa chất và dung môi được mua từ Hãng Takasago, Sigma-Aldrich, Merck, Acros và TCI. Các dung môi diclorometan (DCM) và nước được loại ôxy bằng cách cho sục mạnh khí N_2 khô trong ít nhất 30 phút. Sắc ký bản mỏng được thực hiện trên bản thủy tinh phủ 0,25 mm silica gel (E. Merck, Kieselgel 60 F254). Sắc ký cột được thực hiện với silica gel Silicycle 60 (0,040-0,063 µm). Phổ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, ^{19}F NMR và ^{31}P NMR được đo bằng máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AVANCEIII-400 tại Viện Công nghệ Liên bang Thụy Sỹ tại Lausanne. Phổ IR được đo bằng máy Alpha-P Bruker FT-IR.

2.2. Quy trình ôxy hóa bằng xúc tác PdI_2 ligand bisphosphin đối với (R)-SEGPHOS

Trong một bình cầu đáy tròn, dưới môi trường N_2, hòa tan hỗn hợp gồm (R)-SEGPHOS (0,33 g, 0,54 mmol, 1,0 đương lượng) và PdI_2 (0,019 g, 0,054 mmol, 0,1 đương lượng) trong 1,2-dibromoethan (0,23 ml, 2,69 mmol, 5,0 đương lượng) và DCM (3 ml) đã được loại ôxy. Sau đó, dung dịch NaOH 10 M (5 ml) (đã được loại ôxy) được thêm vào và hỗn hợp phản ứng được khuấy mạnh trong môi trường N_2. Phản ứng được theo dõi bằng ^{1}H, ^{31}P NMR và

được cho ngừng lại khi sự hình thành monoxid được đánh giá là diễn ra chậm hơn so với các biến đổi hóa học khác. Đối với sản phẩm (R)-SEGPHOSO, phản ứng được ngừng sau 48 giờ. Hỗn hợp sau đó được chiết bằng DCM (3×15 ml). Pha hữu cơ được làm khô bằng $MgSO_4$ khan và cô đặc ở áp suất thấp. Dung dịch sản phẩm thô được khuấy với 0,2 đương lượng 1,2-bis(diphenylphosphino)ethan trong 15 phút để tạo phức với Pd(II). Hỗn hợp thô được tinh chế bằng sắc ký cột để thu lại nguyên liệu đầu chưa phản ứng (pentan/Et_2O 10/1) và sản phẩm tinh khiết (pentan/EtOAc 6/4).

3. Kết quả



Hình 3. Kết quả tổng hợp các ligand bisphosphin monoxid bằng xúc tác PdI_2.

(R)-SEGPHOSO (2b): resin không màu. Thời gian phản ứng: 48 giờ. Hiệu suất: 36%, 45% brsm (0,12 g, 0,19 mmol). R_f 0,35 (pentan/EtOAc 5/5). ^{1}H NMR (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,69 (ddt, *J*=11,7, 6,9, 1,4 Hz, 2H), 7,61 (ddt, *J*=12,0, 6,9, 1,4 Hz, 2H), 7,47-7,43 (m, 2H), 7,39-7,32 (m, 4H), 7,29-7,19 (m, 10H), 6,98 (dd, *J*=14,1, 8,1 Hz, 1H), 6,76 (dd, *J*=8,0, 2,0 Hz, 1H), 6,62 (d, *J*=8,0 Hz, 1H), 6,55 (dd, *J*=8,0, 3,5 Hz, 1H), 5,71 (d, *J*=1,7 Hz, 1H), 5,66 (d, *J*=1,5 Hz, 1H), 5,23 (d, *J*=1,7 Hz, 1H), 4,83 (d, *J*=1,5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, Cloroform-*d*) δ 150,0-107,5 (36 C, carbon thơm, quan sát thấy có sự chẻ tín hiệu phức tạp do tương tác C-P), 101,5 (s), 101,1 (s). ^{31}P{^{1}H} NMR (162 MHz, Cloroform-*d*) δ 26,91-14,87. HRMS (ESI/QTOF): tính cho $[C_{38}H_{28}O_5P_2+H]^+$, $[M+H]^+$: 627,1485; tìm thấy: 627,1496. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3053, 3007, 2962, 2896, 1437, 1244, 1176, 1114, 1056, 745, 715, 695, 529 cm^{-1}. $[\alpha]_D^{20}$: +51,5 (c=1,0, $CHCl_3$).

Các ligand khác tổng hợp tương tự quy trình đối với (R)-SEGPHOS.

(R)-SYNPHOSO (2c): bột trắng. Thời gian phản ứng: 8 giờ. Hiệu suất: 21%, 21% brsm (15 mg, 0,023 mmol). R_f 0,25 (pentan/EtOAc 5/1). ^{1}H NMR (500 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,62 (ddd, *J*=11,9, 8,3, 1,4 Hz, 2H), 7,54-7,25 (m, 13H), 7,24-7,12 (m, 5H), 6,78 (ddd, *J*=26,3, 8,4, 5,1 Hz, 3H), 6,59 (dd, *J*=8,4, 3,5 Hz, 1H), 4,04 (dtd, *J*=11,3, 6,6, 2,4 Hz, 2H), 3,83 (ddd, *J*=11,3, 5,2, 2,3 Hz, 1H), 3,78-3,65 (m, 3H), 3,44 (ddd, *J*=11,4, 6,7, 2,3 Hz, 1H), 3,12 (ddd, *J*=11,7, 7,1, 2,2 Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, Cloroform-*d*) δ 146,2-115,8 (36 C, carbon thơm, quan sát thấy có sự chẻ tín hiệu phức tạp do tương tác C-P), 64,0 (s), 63,9 (s), 63,5 (s), 60,4 (s). ^{31}P{^{1}H} NMR (162 MHz, Cloroform-*d*) δ 28,32 (s), -15,98 (s). HRMS (ESI): tính cho $[C_{40}H_{32}O_5P_2]^+$, $[M+H]^+$: 655,1798; tìm thấy: 655,1807. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3052, 2926, 2357, 1588, 1470, 1435, 1290, 1194, 1154, 1090, 876, 783, 748, 712 cm^{-1}. $[\alpha]_D^{20}$: -53,2 (c=1,0, $CHCl_3$).

(R)-DIFLUORPHOSO (2d): bột trắng. Thời gian phản ứng: 19 giờ. Hiệu suất: 41%, 65% brsm (0,08 g, 0,11 mmol). R_f 0,35 (pentan/EtOAc 4/1). ^{1}H NMR (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,59-7,53 (m, 2H), 7,53-7,26 (m, 12H), 7,25-7,02 (m, 8H), 6,96 (d, *J*=8,2 Hz, 1H), 6,87 (dd, *J*=8,2; 3,1 Hz; 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, Cloroform-*d*) δ 145,6-109,1 (38 C, quan sát thấy có sự chẻ tín hiệu phức tạp do tương tác C-P và C-F). ^{31}P{^{1}H} NMR (162 MHz, Cloroform-*d*) δ 27,83 (s), -15,03 (s). ^{19}F{^{1}H} NMR (377 MHz, Cloroform-*d*) δ -48,2 (d, J_{F-F}=94,1 Hz, 1F), -49,2 (d, J_{F-F}=90,0 Hz, 1F), -49,6 (d, J_{F-F}=90,4 Hz, 1F), -50,1 (d, J_{F-F}=94,1 Hz, 1F). HRMS (ESI/QTOF): tính cho $[C_{38}H_{24}F_4O_5P_2+H]^+$, $[M+H]^+$: 699,1108; tìm thấy: 699,1118. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3055, 2974, 2926, 1453, 1436, 1237, 1197, 1169, 1119, 1035, 746, 722, 695, 536 cm^{-1}. $[\alpha]_D^{20}$: -1.2 (c=1,0, $CHCl_3$). Mp: 219,5-220,5°C.

(R)-MeO-BIPHEPO (2e): bột trắng. Thời gian phản ứng: 42 giờ. Hiệu suất: 49%, 59% brsm (0,08 g, 0,13 mmol). R_f 0,35 (pentan/EtOAc 1/1). ^{1}H NMR (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,56 (tdt, *J*=10,2, 6,9, 1,4 Hz, 4H), 7,42 (tdd, *J*=7,0, 5,1, 1,5 Hz, 2H), 7,38-7,27 (m, 7H), 7,26-7,19 (m, 8H) 7,16 (t, *J*=7,9 Hz, 1H), 6,95 (ddd, *J*=13,3, 7,7, 1,0 Hz; 1H), 6,88 (dt, *J*=8,3, 1,0 Hz, 1H), 6,73 (ddd, *J*=7,7, 3,4, 0,9 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J*=8,3, 1,0 Hz, 1H), 3,16 (s, 3H), 3,04 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, Cloroform-*d*) δ 158,2-110,3 (36 C, carbon thơm, quan sát thấy có sự chẻ tín hiệu phức tạp do tương tác C-P), 54,8 (s), 54,6 (s). ^{31}P{^{1}H} NMR (162 MHz, Cloroform-*d*) δ 27,63 (s), -15,31 (s). HRMS (ESI): calculated for $[C_{38}H_{32}O_3P_2]^+$, $[M+H]^+$: 599,1899; tìm thấy:

599,1910. IR (ATR): $\tilde{\nu}$ =3052, 2933, 2364, 1566, 1434, 1258, 1191, 1114, 1049, 998, 860, 697 cm^{-1}. $[\alpha]_D^{20}$: -87,0 (c=1,0, $CHCl_3$).

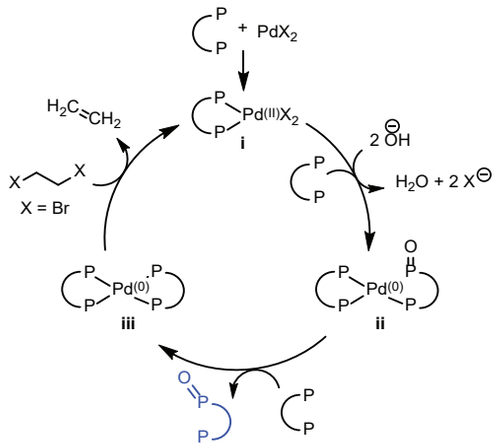
(R)-H_8-BINAPO (2f): bột trắng. Thời gian phản ứng: 14 giờ. Hiệu suất: 55%, 73% brsm (0,11g, 0,17 mmol). ^{1}H NMR (400 MHz, Cloroform-*d*) δ 7,71-7,54 (m, 4H), 7,49-7,20 (m, 13H), 7,20-7,08 (m, 4H), 7,06-6,93 (m, 3H), 2,76-2,61 (m, 4H), 1,90-1,66 (m, 3H), 1,54-1,06 (m, 8H), 0,80-0,67 (m, 1H). ^{31}P{^{1}H} NMR (162 MHz, Cloroform-*d*) δ 26,70 (s), -16,15 (s). Hợp chất đã được biết đến từ trước, các dữ liệu trùng với tài liệu khoa học đã công bố [12].

4. Bàn luận

Bằng cách cẩn thận loại O_2 trong dung môi, sử dụng môi trường phản ứng là khí N_2 và dung dịch kiềm đậm đặc 10 M, đồng thời với đó là theo dõi chặt chẽ tiến trình phản ứng bằng phương pháp phổ ^{1}H và ^{31}P NMR, chúng tôi đã có thể đẩy nhanh tốc độ của phản ứng mono-ôxy hóa. Các phản ứng đều diễn ra trong thời gian ngắn hơn nhiều (8-48 giờ) nếu so với quy trình Grushin (4 ngày cho BINAPO **2a**), và hầu hết đều có hiệu suất tính theo khối lượng thu hồi của nguyên liệu ban đầu (brsm) tương đối tốt.

Sở dĩ các thí nghiệm không được cho phản ứng đến khi hoàn thành là vì có phản ứng dioxy hóa diễn ra cạnh tranh (quan sát được bằng phổ NRM); thí nghiệm cần được ngừng tại thời điểm thích hợp (ví dụ: sự tạo thành phosphin dioxid bắt đầu xảy ra nhanh hơn sự tạo thành monoxid) để có thể thu hồi nguyên liệu bisphosphin ban đầu, tránh việc ôxy hóa quá mức các nguyên liệu đắt tiền này. Trong số các ligand được tổng hợp, (R)-SYNPHOSO (**2c**) là sản phẩm duy nhất được tạo ra với hiệu suất thấp (21%), vì quá trình mono-ôxy hóa của ligand đầu vào (R)-SYNPHOS không chọn lọc. Đỉnh tín hiệu của phosphin (PR_3) trên phổ đồ ^{31}P NMR thường nằm trong khoảng dịch chuyển hóa học từ +50 đến -50 ppm. Khi phosphin bị ôxy hóa trở thành phosphin oxid (POR_3), tín hiệu NMR của nguyên tử P bị giải che chắn bởi nguyên tử O có độ âm điện cao, dẫn đến độ dịch chuyển hóa học của nó tăng lên [16]. Vì thế, sử dụng phổ ^{31}P NMR, có thể dễ dàng theo dõi tiến trình phản ứng ôxy hóa này, phổ ^{1}H được sử dụng song song để bổ trợ cho việc xác định thêm thông tin cấu trúc.

Để hiểu rõ hơn sự tác động của điều kiện phản ứng lên từng tác chất và trung gian phản ứng, chu trình cơ chế xúc tác của phản ứng ôxy hóa này đã được đề xuất như ở hình 4 [8, 14]. Xúc tác PdX_2 đầu tiên được phối trí bởi bisphosphin lưỡng nha tạo phức chelate dạng $[(\eta^2\text{-P-P})_2Pd]X_2$ **(i)**. Phức Pd(II)/P(III) này thực hiện một phản ứng ôxy hóa-khử nội phân tử, xúc tiến bởi base, xảy ra ở mặt phân cách của 2 pha vô cơ/hữu cơ (nước/DCM) để tạo thành phức Pd(0)/P(V) **(ii)**, chứa một ligand bisphosphin monoxid. Sau đó, nhiều khả năng ligand bisphosphin monoxid đơn nha này được tráo đổi bằng một ligand bisphosphin lưỡng nha khác trong hệ, do ái lực của ligand lưỡng nha với tâm kim loại mạnh hơn, tạo một phức Pd(0) mới **(iii)** phối trí với 4 nhóm chức phosphin. Phức **(iii)** này được dễ dàng ôxy hóa trở lại thành Pd(II) bởi dibromoethan đóng lại chu trình xúc tác. Tác chất ôxy hóa dibromoethan được lựa chọn vì có khả năng dễ dàng thực hiện bước cộng ôxy hóa vào các phức chất dạng $[(\eta^2\text{-P-P})_2Pd]$.

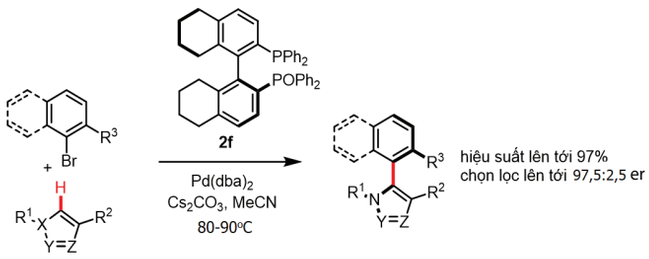


Hình 4. Cơ chế đề xuất cho phản ứng tạo bisphosphin monoxid, xúc tác PdI_2.

Bước quan trọng nhất của chu trình trên là sự ôxy hóa-khử nội phân tử của phức **(i)** để tạo ra sản phẩm chính (bisphosphin monoxid). Bước này được cho là xảy ra ở mặt phân cách 2 pha vô cơ/hữu cơ và được xúc tiến bởi môi trường kiềm. Để bước ôxy hóa-khử này xảy ra dễ dàng, cần đảm bảo nồng độ OH^- cao để dễ dàng khuếch tán vào pha hữu cơ, đồng thời sự khuấy trộn hỗn hợp phải nhanh và mạnh vì dung dịch NaOH 10 M có độ nhớt lớn. Bên cạnh đó, phản ứng được tiến hành trong môi trường N_2, để hạn chế tối đa việc sản phẩm bisphosphin monoxid bị ôxy hóa quá mức, trở thành phosphin dioxid.

5 ligand bisphosphin monoxid bất đối xứng **2b-f** mới nêu trên được tổng hợp theo quy trình cải tiến, cùng với ligand BINAPO **(2a)** tổng hợp bằng quy trình Grushin cũ đã được ứng dụng vào phản ứng aryl hóa liên kết C-H của các dị vòng thơm, chọn lọc atropisomer, với hệ xúc tác $Pd(dba)_2$. Trong đó, ligand H_8-BINAPO **(2f)** là ligand cho tỷ lệ chọn lọc 2 đồng phân đối quang atropisomer tối ưu (lên tới 97,5:2,5% er) (hình 5) [13]. Quy trình tổng hợp ligand bisphosphin monoxid này vẫn đang được cải tiến thêm nữa để có thể áp dụng cho nhiều khung cấu trúc bisphosphin, hay thậm chí phosphin đa nha, nhằm tạo ra một ngân hàng ligand phosphin lớn, nhanh chóng, góp phần rút ngắn thời

gian cho bước sàng lọc ligand trong việc phát triển các hệ phản ứng bất đối xứng sử dụng xúc tác Pd nói riêng và các xúc tác kim loại chuyển tiếp khác, kinh tế hơn và thân thiện với môi trường hơn nói chung.



Hình 5. Ứng dụng của ligand 2f trong một phản ứng aryl hóa nối C-H của dị vòng thơm đã được công bố [13].

5. Kết luận

Nghiên cứu đã thành công trong việc cải tiến quy trình mono-ôxy hóa ligand bisphosphin của Grushin, thiết lập được một quy trình nhanh chóng và tiết hiệm hơn để tổng hợp được một phân họ ligand bisphosphin monoxid chứa khung biphenyl và 1,1'-binaphthyl bất đối xứng, với hiệu suất từ khá đến cao. Đây là những ligand bất đối xứng mới có cấu trúc phức tạp, nếu đi theo con đường tổng hợp khác thì cần trải qua nhiều bước, gây tốn kém về thời gian và hóa chất. Các ligand này có tiềm năng ứng dụng trong các hệ phản ứng xúc tác Pd bất đối xứng để chọn lọc đồng phân đối quang. Song song với đó, quy trình phản ứng này vẫn đang tiếp tục được cải tiến nhằm tạo ra một thư viện ligand bisphosphin monoxid bất đối xứng lớn hơn nữa, có nhiều ứng dụng hơn nữa trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện ở Phòng Thí nghiệm tổng hợp và xúc tác bất đối xứng, với sự hướng dẫn và hỗ trợ của GS.TS Nicolai Cramer - Viện Công nghệ Liên bang Thụy Sỹ ở Lausanne (EPFL), cùng với sự cộng tác vô cùng quý giá của GS.TS Olivier Baudoin và TS Shu-Min Guo (Đại học Basel, Thụy Sỹ). Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Khoa học Quốc gia Thụy Sỹ (SNF). Tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A.D. Meijere, S. Bräse, M. Oestreich (2014), *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions and More*, **1-3**, John Wiley & Sons, 1576pp.

[2] S.K. Sinha, S. Guin, S. Maiti, et al. (2022), "Toolbox for distal C-H bond functionalizations in organic molecules", *Chem. Rev.*, **122(6)**, pp.5682-5841, DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00220.

[3] C.G. Newton, S.G. Wang, C.C. Oliveira, et al. (2017), "Catalytic enantioselective transformations involving C-H bond cleavage by transition-metal complexes", *Chem. Rev.*, **117(13)**, pp.8908-8976, DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00692.

[4] M. Li, J. Wang (2021), "Recent advances on transition-metal-catalyzed asymmetric C-H arylation reactions", *Synthesis*, **54(21)**, pp.4734- 4752, DOI: 10.1055/a-1677-5870; Art ID: ss-2021-g0577-st.

[5] K.M. Engle, J.Q. Yu (2013), "Developing ligands for palladium(II)-catalyzed C-H functionalization: Intimate dialogue between ligand and substrate", *J. Org. Chem.*, **78(18)**, pp.8927-8955, DOI: 10.1021/jo400159y.

[6] O. Vyhivskyi, A. Kudashev, T. Miyakoshi, et al. (2021), "Chiral catalysts for Pd^0-catalyzed enantioselective C-H activation", *Chem. Eur. J.*, **27(4)**, pp.1231-1257, DOI: 10.1002/chem.202003225.

[7] D. Lapointe, K. Fagnou (2010), "Overview of the mechanistic work on the concerted metallation-deprotonation pathway", *Chem. Lett.*, **39(11)**, pp.1118-1126, DOI: 10.1246/cl.2010.1118.

[8] V.V. Grushin (2004), "Mixed phosphine-phosphine oxide ligands", *Chem. Rev.*, **104(3)**, pp.1629-1662, DOI: 10.1021/cr030026j.

[9] Y. Ji, et al. (2015), "Mono-oxidation of bidentate bis-phosphines in catalyst activation: Kinetic and mechanistic studies of a Pd/xantphos-catalyzed C-H functionalization", *J. Am. Chem. Soc.*, **137(41)**, pp.13272-13281, DOI: 10.1021/jacs.5b01913.

[10] C.L. Ladd, A.B. Charette (2016), "Access to cyclopropyl-fused azacycles via a palladium-catalyzed direct alkenylation strategy", *Org. Lett.*, **18(23)**, pp.6046-6049, DOI: 10.1021/acs.orglett.6b02982.

[11] C. Mayer, C.L. Ladd, A.B. Charette (2019), "Utilization of BozPhos as an effective ligand in enantioselective C-H functionalization of cyclopropanes: Synthesis of dihydroisoquinolones and dihydroquinolones", *Org. Lett.*, **21(8)**, pp.2639-2644, DOI: 10.1021/acs.orglett.9b00627.

[12] M. Batuecas, J. Luo, I. Gergelitsová, et al. (2019), "Catalytic asymmetric C-H arylation of (η^6-arene) chromium complexes: Facile access to planarchiral phosphines", *ACS Catal.*, **9(6)**, pp.5268-5278, DOI: 10.1021/acscatal.9b00918.

[13] Q.H. Nguyen, S.M. Guo, T. Royal, et al. (2020), "Intermolecular palladium(0)-catalyzed atropo-enantioselective C-H arylation of heteroarenes", *J. Am. Chem. Soc.*, **142(5)**, pp.2161-2167, DOI: 10.1021/jacs.9b12299.

[14] V.V. Grushin (1999), "Catalysis for catalysis: Synthesis of mixed phosphine-phosphine oxide ligands via highly selective, Pd-catalyzed monooxidation of bidentate phosphines", *J. Am. Chem. Soc.*, **121(24)**, pp.5831-5832, DOI: 10.1021/ja990841+.

[15] P. Kočovský, Š. Vyskočil, M. Smrčina (2003), "Non-symmetrically substituted 1,1'-binaphthyls in enantioselective catalysis", *Chem. Rev.*, **103(8)**, pp.3213-3246, DOI: 10.1021/cr9900230.

[16] D.G. Gorenstein (1983), "Nonbiological aspects of phosphorus-31 NMR spectroscopy", *Progress in NMR Spectroscopy*, **16**, pp.1-98, DOI: 10.1016/0079-6565(84)80002-3.

DOI: 10.31276/VJST.64(11).16-21

Đặc điểm sinh học và hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương của *Microbacterium* sp. C21 phân lập từ đất

Nguyễn Mạnh Tuấn[1*], Trương Phúc Hưng[2], Trần Minh Hằng[2], Trần Văn Tiến[3]

[1]Viện Khoa học Sự sống, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam
[2]Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, phường Tân Thịnh, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam
[3]Học viện Hành chính Quốc gia, 77 Nguyễn Chí Thanh, phường Láng Hạ, quận Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 2/3/2022; ngày chuyển phản biện 7/3/2022; ngày nhận phản biện 31/3/2022; ngày chấp nhận đăng 6/4/2022

Tóm tắt:

Phần lớn kháng sinh thương mại có nguồn gốc từ *Streptomyces*. Việc tìm kiếm các nguồn gen tiềm năng mới (không thuộc *Streptomyces*) sản sinh hoạt chất kháng khuẩn được đặt ra nhằm ngăn chặn sự kháng thuốc bởi các vi khuẩn gây bệnh hiện nay. Chủng C21 được phân lập từ đất, khuẩn lạc nhỏ (kích thước 0,8-1,2 mm) trên môi trường Intensive soil extract medium (ISEM). Phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, chủng C21 thuộc vi khuẩn khó nuôi cấy và được coi là ứng viên loài mới thuộc chi *Microbacterium*. Ngoại trừ môi trường R2A, chủng C21 chỉ có khả năng sinh trưởng trong môi trường nghèo dinh dưỡng như NB/3, TSB/10 và R4/10. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric là những nguồn cacbon phù hợp cho chủng C21 sinh trưởng. Hoạt chất kháng khuẩn tách chiết từ dịch lên men của chủng C21 có khả năng ức chế ở nồng độ 16 µg/ml đối với *Enterococcus faecalis* CCARM 5168, 8 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5171, 32 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5024, 64 µg/ml đối với *E. faecium* CCARM 5025, 32 µg/ml đối với *Streptococcus agalactiae* CCARM 4504 và 8 µg/ml đối với *S. pyogenes* CCARM 4520. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về tìm kiếm các hoạt chất kháng khuẩn tiềm năng từ vi khuẩn khó nuôi cấy.

Từ khóa: **hoạt tính kháng khuẩn, *Microbacterium*, nồng độ ức chế tối thiểu.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

1. Đặt vấn đề

Penicillin là kháng sinh đầu tiên được phát hiện từ nấm mốc *Penicillium rubrum* bởi Fleming năm 1929 [1] và mở ra thời kỳ vàng cho phát hiện kháng sinh mới từ tự nhiên vào giữa những năm 1950 [2], trong đó có hơn 80% các loại kháng sinh có nguồn gốc từ *Streptomyces* [2, 3]. Tuy nhiên, sau những năm 1965 số lượng kháng sinh mới được phát hiện có xu hướng giảm mạnh [2, 4]. Trong khi các loài vi khuẩn gây bệnh đa kháng kháng sinh xuất hiện ngày càng nhiều, trong đó có *Enterococci* kháng thuốc vancomycin (VRE - Vancomycin resistant *Enterococcus*) và *Streptococci* được biết đến là một trong những nguồn bệnh truyền nhiễm nguy hiểm cho người [5, 6].

Theo báo cáo của M.E. De Kraker và cs (2016) [7] hậu quả của vi khuẩn gây bệnh đa kháng kháng thuốc thường rất nghiêm trọng, gây tử vong khoảng 8,6 triệu người hàng năm trên toàn thế giới và dự đoán đến năm 2050 có khoảng hơn 10 triệu người chết mỗi năm nếu không có giải pháp kịp thời nhằm ngăn chặn tình trạng đa kháng thuốc như hiện nay.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy, vấn đề đa kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh ở nước ta xuất hiện ở tất cả các bệnh viện lớn trên cả nước [8-10]. Có tới 48% các loài *E. faecalis* được phân lập từ bệnh nhân tại các bệnh viên kháng lại gentamicin [8]; 22-57% các loài *E. faecium* kháng lại vancomycin và gentamicin; 25-85% các loài *S. pneumoniae* kháng ceftriaxone và erythromycin [9].

Cho đến nay, có khoảng 1% cộng đồng vi khuẩn đất có thể được phân lập và xác định đặc điểm kiểu hình trong điều kiện phòng thí nghiệm [11, 12]. Trong khi hơn 99% vi khuẩn đất là chưa được nuôi cấy (hay còn gọi là vi khuẩn khó nuôi cấy) và đây được coi là nguồn gen tiềm năng cho phát hiện các hoạt chất kháng khuẩn mới nhằm ngăn chặn vấn đề kháng thuốc [13, 14]. Nghiên cứu về các vi khuẩn khó nuôi cấy sản sinh hoạt chất kháng khuẩn gần như chưa được triển khai ở nước ta. Do vậy, nghiên cứu sẽ bổ sung thêm phương pháp tiếp cận vi khuẩn khó nuôi cấy trong phòng thí nghiệm nhằm tuyển chọn nguồn gen vi khuẩn mới phục vụ cho phát hiện các hoạt chất kháng khuẩn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Đất bề mặt (3 mẫu) thu thập tại Mỏ sắt Trại Cau, Đồng Hỷ, Thái Nguyên. Đất được loại bỏ đất đá, sinh khối thực vật bằng rây với đường kính lỗ 0,2 mm và làm khô ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ.

Các chủng vi khuẩn kiểm định gồm *E. faecalis* CCARM 5168 (kháng tetracycline và gentamicin), *E. faecalis* CCARM 5171, *E. faecalis* CCARM 5025 (kháng oxacillin

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenmanhtuan@tuaf.edu.vn

Biological characteristics and antibacterial activity against gram-positive bacteria of *Microbacterium* sp. C21 isolated from soil

Manh Tuan Nguyen[1*], Phuc Hung Truong[2], Minh HangTran[2], Van Tien Tran[3]

[1]Institute of Life Science, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam
[2]Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University, Tan Thinh Ward, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam
[3]National Academy of Public Administration, 77 Nguyen Chi Thanh Street, Lang Ha Ward. Dong Da District, Hanoi, Vietnam

Received 2 March 2022; revised 31 March 2022; accepted 6 April 2022

Abstract:

Most commercial antibiotics are derived from *Streptomyces*. The search for new potential microbial sources (non-*Streptomyces*) for antibacterial activity is proposed to prevent drug resistance by current pathogenic microbes. Strain C21 was isolated from soil, with small colonies (0.8-1.2 mm in size) on an intensive soil extract medium (ISEM). Sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed strain C21 belongs to the group of bacteria that are difficult to cultivate, and is considered a candidate for novel species of genus *Microbacterium*. Except for R2A medium, strain C21 was only able to grow in nutrient-poor media such as NB/3, TSB/10, and R4/10. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate and 3-hydroxybutyric acid were suitable carbon sources for the growth of strain C21. Crude extract from fermentation liquid of strain C21 can inhibit *Enterococcus faecalis* CCARM 5168 at a concentration of 16 µg/ml, 8 µg/ml for *E. faecalis* CCARM 5171, 32 µg/ml for *E. faecalis* CCARM 5024, 64 µg/ml for *E. faecium* CCARM 5025, 32 µg/ml for *Streptococcus agalactiae* CCARM 4504, and 8 µg/ml for *S. pyogenes* CCARM 4520. Results of this study established a basis for future studies on finding potential antibacterial compounds from difficult-to-culture bacteria.

Keywords: **antibacterial activity, *Microbacterium*, minimum inhibitory concentration.**

Classification number: **1.6**

và quinupristin/dalfopristin), *E. faecium* CCARM 5024 (kháng ampicillin, oxacillin, teicoplanin và tetracycline), *S. agalactiae* CCARM 4504 (kháng clindamycin, clarithromycin và tetracycline) và *S. pyogenes* CCARM 4520. Các chủng vi khuẩn kiểm định được cung cấp bởi CCARM (Culture collection of antimirobial resistant microorganisms), Hàn Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và phân lập vi khuẩn khó nuôi cấy: Môi trường ISEM gồm dịch chiết đất (200 ml), muối khoáng (thành phần cơ sở), axít amin (2 ml), vitamin B (1 ml), muối vi lượng (2 ml), agar (15 g), pH 6,8±0,2. Thành phần cơ sở (g/795 ml nước cất) gồm: KH_2PO_4 (0,23), K_2HPO_4 (0,23), $MgSO_4.7H_2O$ (0,23), NH_4NO_3 (0,33) và $NaHCO_3$ (0,25). Phương pháp chuẩn bị môi trường ISEM được thực hiện theo mô tả của T.M. Nguyen và cs (2018) [15]. Hòa 25 g đất trong 250 ml nước muối sinh lý, pha loãng đến nồng độ 10^{-7} và cấy trải 100 µl mỗi nồng độ pha loãng đất lên môi trường ISEM và Nutrient (HiMedia, Ấn Độ, đối chứng) nuôi ở 25°C trong 2 tuần. Chỉ thu nhận, tinh sạch các khuẩn lạc xuất hiện sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường ISEM và lưu giữ ở -86°C trong 10% glycerol [16].

Tuyển chọn vi khuẩn khó nuôi cấy sản sinh hoạt chất kháng khuẩn: Các chủng phân lập được nuôi lắc trong bình tam giác chứa đựng 30 ml môi trường dịch thể ISEM có bổ sung 0,1% (w/v) cao nấm men ở 28°C trong 10 ngày. Hoạt chất sinh học tổng số trong dịch nuôi cấy được tách chiết với ethyl acetate theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Hòa cặn sau khi bay hơi ethyl acetate trong 300 µl dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO). 10 µl hoạt chất tách chiết được nhỏ vào khoanh giấy đường kính 6 mm (Whatman, Merck) và đặt lên môi trường Mueller Hinton Agar (BD DIFCO) chứa *E. faecium* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504. Kiểm tra vòng kháng khuẩn sau 24 giờ ở 37°C [17].

Định danh phân tử và xây dựng sơ đồ phả hệ: DNA tổng số của chủng phân lập được tách chiết theo mô tả bởi J. Sambrook và D.W. Russell (2001) [18]. Cặp mồi 27F-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R-TACGGYTACCTTGTTACGACTT [19] được sử dụng cho khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng PCR. Phản ứng PCR được tiến hành trong 25 chu kỳ, biến tính DNA mẫu ở 95°C trong 5 phút, 25 chu kỳ ở 95°C trong 40 giây, gắn mồi 55°C và kéo dài 72°C trong 1 phút; chu kỳ cuối được kéo dài ở 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được đọc trình tự thông qua hệ thống Applied Biosystems 3730 xl DNA analyzer sử dụng Big Dye terminator cycle sequencing kit v.3.1 (Macrogen, Hàn Quốc). Nhận diện trình tự gen 16S rRNA thông qua dữ liệu NCBI Blast và Eztaxon Server. Quan hệ di truyền của chủng phân lập được thiết lập bằng phần mềm MEGA 7 sử dụng phương pháp Neighbor-Joining [20].

Xác định đặc điểm nuôi cấy: Chủng phân lập được hoạt hóa trong môi trường ISEM lỏng, 3% (v/v) dịch huyền phù được cấy chuyển đến các môi trường gồm R2A (HiMedia, Ấn Độ), Nutrient Broth - NB (HiMedia, Ấn Độ), TSB (ATCC medium 18: Trypticase Soy) và R4 (g/l): glucose (10), cao nấm men (1), axít casamino (0,1), proline (3), $MgCl_2.6H_2O$ (10), K_2SO_4 (0,2), $CaCl_2.2H_2O$ (4) và axit N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic (5,6). Đồng thời, các chủng phân lập cũng được cấy chuyển đến môi trường nghèo dinh dưỡng hơn, tương ứng R2A/3 (hàm lượng dinh dưỡng giảm đi 3 lần so với môi trường đầy đủ), NB/3, TSB/10 và R4/10. Khả năng sinh trưởng của chủng phân lập trên các loại môi trường được xác định ở 5 ngày, 28°C, 130 vòng/phút thông qua xác định mật độ vi khuẩn ở OD_{600}. Ảnh hưởng của các nguồn cacbon đến sinh trưởng của chủng phân lập được xác định bởi API ID 32 GN Kit (BioMerieux, Pháp). Sử dụng kính hiển vi điện tử quét SEM (Scanning Electron Microscope, Hitachi S-4800, Nhật Bản) để xác định hình thái tế bào của chủng phân lập.

Lên men và tách chiết hoạt chất kháng khuẩn tổng số: Chủng phân lập được hoạt hóa trong môi trường R2A/3 nuôi lắc ở 28°C, 150 vòng/phút trong 3 ngày. Cấy chuyển 3% dịch nuôi cấy đến môi trường R4/10, nuôi lắc 10 ngày. Hoạt chất kháng khuẩn tổng số có trong dịch lên men được tách chiết 2 lần với ethyl acetate (1:1, v/v). Bay hơi dung môi ở 40°C, cặn hoạt chất tổng số được hòa trong 10 ml nước cất và lọc qua màng lọc 0,22 µm (Millipore, Mỹ) trước khi đông khô ở -54°C [21].

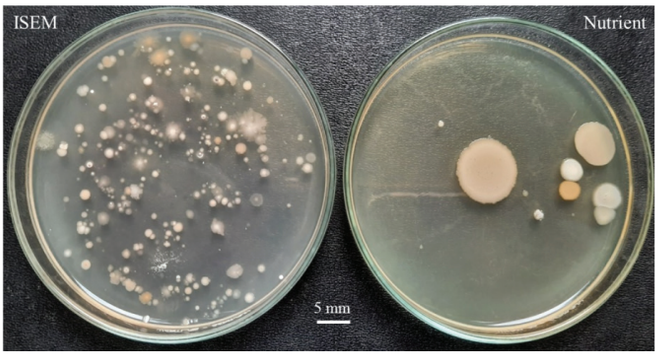
Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của hoạt chất sinh học tổng số tách chiết từ dịch lên men: Quy trình xác định MIC được tiến hành theo phương pháp pha loãng của CLSI (2012) [17]. Các chủng vi khuẩn kiểm định được chuẩn bị ở mật độ 10^5 CFU/ml. Kháng sinh cephalothin và norfloxacin được sử dụng là đối chứng dương. Bột hoạt chất tách chiết tổng số của chủng phân lập và kháng sinh thương mại được chuẩn bị ở nồng độ 128, 64, 32, 16, 8 và 4 µg/ml.

Xử lý số liệu: Kết quả của các thí nghiệm được xử lý bằng Student's t-test để xác định ý nghĩa thống kê. Giá trị $p \leq 0,05$ là giới hạn sai khác có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn khó nuôi cấy tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn

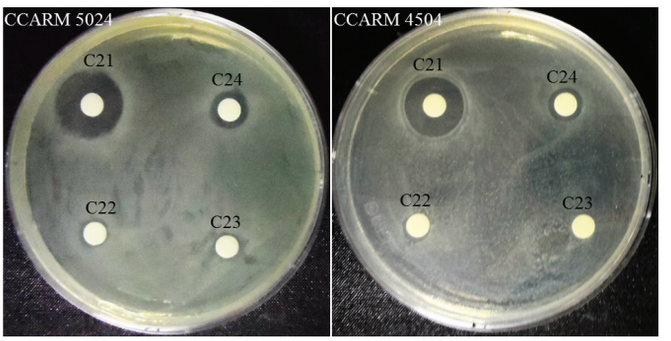
Thành phần dinh dưỡng có trong môi trường phân lập có ảnh lớn đến sự sinh trưởng (khuẩn lạc) của vi sinh vật. Sau 2 tuần nuôi cấy số lượng khuẩn lạc xuất hiện ở nồng độ pha loãng mẫu đất 10^{-5} trên môi trường ISEM và Nutrient lần lượt là 132±18 và 10±3 (hình 1). Ở cùng nồng độ pha loãng mẫu đất, khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường ISEM nhiều hơn gần 14 lần so với Nutrient (p=0,009).



Hình 1. Khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường thạch đĩa sau 2 tuần.

Sự thiếu các yếu tố từ môi trường sống tự nhiên (nơi mà các vi sinh vật sinh sống) trong các môi trường thương mại (như Nutrient) là một trong những nguyên nhân dẫn tới phần lớn các loài vi sinh vật không thể sinh trưởng trong phòng thí nghiệm [11, 15, 22]. Bên cạch đó, nồng độ dinh dưỡng cao trong môi trường nuôi cấy cũng là nguyên nhân gây ức chế sinh trưởng của các loài [11, 23]. Việc bổ sung thành phần tách chiết từ đất và vitamin vào môi trường ISEM sau khi khử trùng ở 121°C có tác động hỗ trợ cho các loài sinh trưởng tốt hơn trong điều kiện phòng thí nghiệm.

Nghiên cứu này tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn sản sinh hoạt chất kháng khuẩn từ 145 chủng phân lập, trong đó chủng C21 có khả năng ức chế cả 2 vi khuẩn kiểm định *E. faecium* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504 với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 12,5 và 12 mm (hình 2).

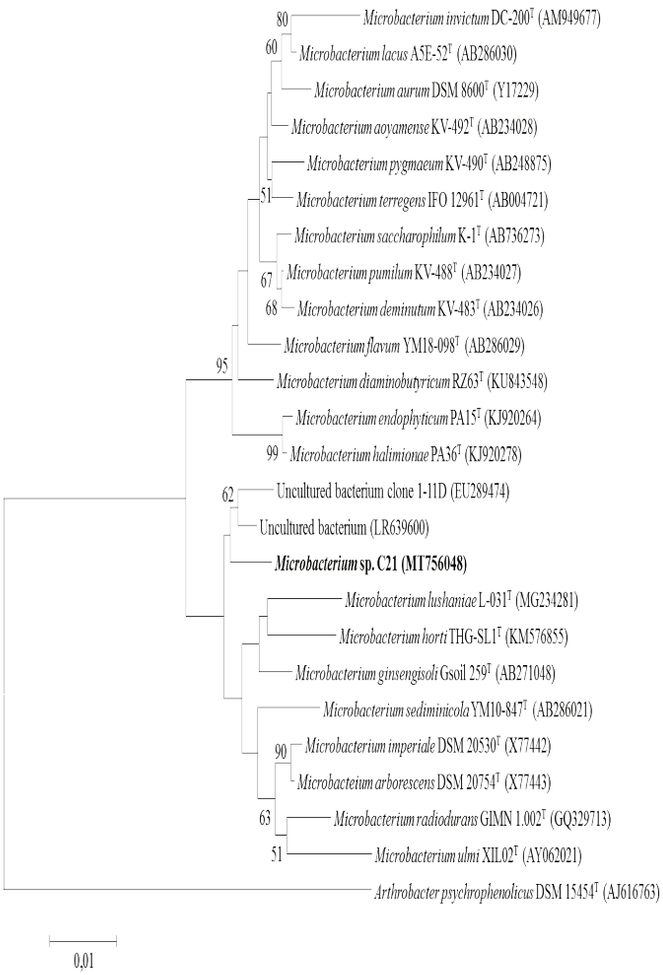


Hình 2. Hoạt tính kháng khuẩn của chủng vi khuẩn khó nuôi cấy.

3.2. Định danh và sơ đồ phả hệ của chủng C21

Kích thước chiều dài gen 16S rRNA của chủng C21 là 1454 bp, với mã số truy nhập MT756048. Kết quả so sánh trình tự gen của chủng C21 cho thấy gần nhất với hai trình tự gen được xác định trực tiếp từ DNA tách chiết trong môi trường mà không thông qua con đường nuôi cấy thuần khiết, bao gồm uncultured bacterium (LR639600) và uncultured bacterium clone 1-11D (EU289474) với độ tương đồng lần lượt là 98,96 và 98,90%. Trong khi so sánh với dữ liệu chủng chuẩn công bố trên dữ liệu Eztaxon Server, trình tự gen 16S rRNA của chủng C21 thể hiện mức tương đồng

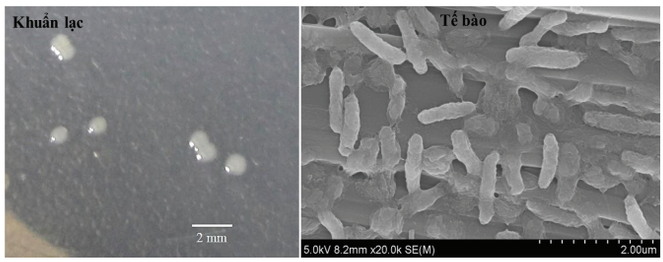
cao nhất (98,54%) với chủng chuẩn *Microbacterium ginsengisoli* DSM 18659^T (JYIY01000074). Bên cạnh đó, sơ đồ phả hệ cũng cho thấy chủng C21 được sắp xếp thuộc chi *Microbacterium*, nhưng ở một vị trí độc lập với các thành viên khác của chi *Microbacterium* đã công bố (hình 3). Nghiên cứu của H.P. Browne và cs (2016) [23] chỉ ra rằng, dựa vào kết quả so sánh trình gen 16S rRNA giữa các loài có giá trị tương đồng dưới 98,7% thì có thể được coi là loài mới. Do vậy, chủng C21 có thể là loài mới thuộc chi *Microbacterium*.



Hình 3. Cây phả hệ chỉ ra mối quan hệ di truyền của chủng C21 với các loài gần nhất của *Microbacterium* dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Các giá trị ở các vị trí phân nhánh với tần số xuất hiện (bootstrap) 1000 phép so sánh (chỉ giữ lại giá trị ≥50%); *Arthrobacter psychrophenolicus* DSM 15454^T (AJ616763) là ngoài chi *Microbacterium*.

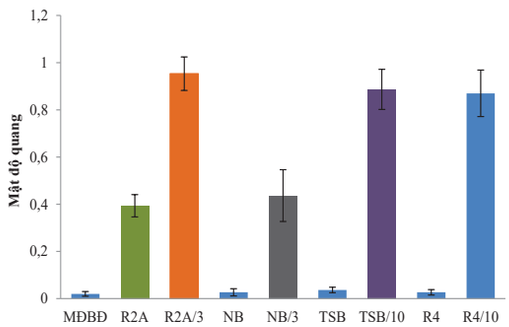
3.3. Đặc điểm nuôi cấy của chủng C21

Khuẩn lạc của chủng C21 trên môi trường ISEM ở 28^{o}C, 6 ngày có màu trắng sữa, tròn lồi, bóng, đường kính khoảng 0,8-1,2 mm. Tế bào có dạng que dài, kích thước 0,20-0,22×1,0-1,2 µm (hình 4).



Hình 4. Hình thái khuẩn lạc và tế bào của chủng C21.

Ngoại trừ môi trường R2A, chủng C21 không sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng hoàn chỉnh như NB, TSB và R4 (p>0,05). Ngược lại, khi sử dụng môi trường nghèo dinh dưỡng hơn thông thường cho thấy chủng C21 sinh trưởng tốt trong tất cả các môi trường sử dụng (hình 5). Mật độ vi khuẩn của chủng C21 trong môi trường hoàn chỉnh (R2A) và nghèo dinh dưỡng (R2A/3) lần lượt là 0,39 và 0,95 (p=0,008). Khi giảm hàm lượng dinh dưỡng đi 3 lần (NB/3), mật độ tế bào chủng C21 đạt 0,44 so với 0,03 đối với môi trường hoàn chỉnh NB (p=0,02). Chủng C21 sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng (TSB/10 và R4/10), nhưng không sinh trưởng trong môi trường TSB và R4 hoàn chỉnh (p>0,05). Như vậy, vi khuẩn khó nuôi cấy C21 sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng. Báo cáo của V.H.T. Pham và J. Kim (2012) [11], A.A. Pulschen và cs (2017) [24] cho thấy, sử dụng môi trường có hàm lượng dinh dưỡng thấp hơn so với thông thường được coi là giải pháp hiệu quả cho tuyển chọn các vi sinh sinh vật khó nuôi cấy.



Hình 5. Ảnh hưởng của môi trường đến sinh trưởng chủng C21. MĐBĐ: mật độ tế bào của chủng C21 ban đầu; môi trường hoàn chỉnh: R2A, NB, TSB và R4; môi trường nghèo dinh dưỡng: R2A/3, NB/3, TSB/10 và R4/10.

Kết quả nghiên cứu khả năng sử dụng các nguồn cacbon cho thấy, chủng C21 sinh trưởng tốt ở các nguồn cacbon gồm N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric; không phát hiện sinh trưởng của chủng C21 đối với các nguồn D-ribose, sucrose, axit itaconic, axit suberic, sodium malonate, axit lactic, L-alanine, potassium 2-ketogluconate, potassium 5-ketogluconate glycogen, L-serine, D-mannitol, salicin, D-melibiose, L-fucose, D-sorbitol, L-arabinose, axit propionic, axit capric, axit

valeric, trisodium citrate, L-histidine, axit 3-hydroxybenzoic và axit 4-hydroxybenzoic. Như vậy, chủng C21 có khả năng sử dụng 8/32 (25%) nguồn cacbon của API ID 32 GN Kit.

3.4. MIC của chủng C21

Kết quả xác định MIC của hoạt chất sinh học tổng số tách chiết từ dịch lên men của chủng C21 được thể hiện ở bảng 1. Hoạt chất sinh học tổng số của chủng C21 có khả năng ức chế sinh trưởng của các vi khuẩn kiểm định từ 8 đến 64 µg/ml, cụ thể *E. faecalis* CCARM 5171 và *S. Pyogenes* CCARM4520 ở nồng độ 8 µg/ml; *E. faecalis* CCARM 5168 ở 16 µg/ml; 32 µg/ml đối với *E. faecalis* CCARM 5024 và *S. agalactiae* CCARM 4504; *E. faecium* CCARM 5025 ở 64 µg/ml. Hoạt tính của kháng sinh có thể được tăng cường dựa trên phương pháp chỉnh sửa bán tổng hợp, kháng sinh mới iboxamycin được tạo ra theo phương pháp trên từ clindamycin là một trong số bằng chứng tiêu biểu (clindamycin là một trong những kháng sinh bị các vi khuẩn gây bệnh gram âm và dương kháng lại). Trong khi kháng sinh iboxamycin nhạy cảm ức chế phổ rộng cả vi khuẩn gây bệnh gram âm và dương [25].

Bảng 1. Giá trị MIC của hoạt chất kháng khuẩn tách chiết từ chủng C21.

Chủng vi khuẩn	MIC (µg/ml)		
	C21	*Cep*	*Nor*
E. faecalis CCARM 5168	16	16	4
E. faecalis CCARM 5171	8	8	8
E. faecalis CCARM 5024	32	32	4
E. faecium CCARM 5025	64	8	8
S. agalactiae CCARM 4504	32	0,25	4
S. pyogenes CCARM 4520	8	0,25	1

Ghi chú: Cep: cephalothin; Nor: norfloxacin.

Những năm gần đây, tìm kiếm các nguồn gen mới (không thuộc *Streptomyces*) tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn được các nhà khoa học quan tâm. Chi *Microbacterium* được coi là nguồn gen tiềm năng cho phát hiện hoạt chất kháng khuẩn [26-30]. Báo cáo của D.W. Kim và cs (2011) [26] phát hiện 4 loại kháng sinh thuộc nhóm norfloxacin do *M.* sp. strain 4N2-2 tổng hợp, bao gồm 8-hydroxynorfloxacin, 6-defluoro-6-hydroxynorfloxacin, desethylene norfloxacin và N-acetylnorfloxacin. P. Ghulster và cs (2018) [28] công bố dịch chiết tổng số từ loài mới *M. arborescens* CIP 55.81^T ức chế *S. aureus* ATCC 13709 và S. *aureus* MRSA ATCC 1683 ở hàm lượng 12,5 và 22,5 µg/ml theo thứ tự. Chủng *M. arborescens* 5913 tổng hợp microvionin (kháng sinh thuộc nhóm lipopeptide), nhạy cảm ức chế vi khuẩn gram dương gồm *S. aureus* ATCC 13709, *S. aureus* ATCC 1683 và *S. pneumoniae* ATCC 33400 ở hàm lượng lần lượt là 0,1, 0,46 và 0,15 µg/ml [27]. Gần đây, N.E. Suzina và cs (2022) [30] công bố *M. lacticum* Str. F2E có khả năng ứng chế sinh trưởng phổ rộng các chủng gram dương gồm *B. megaterium* VKM B-512, *B. cereus* GA5, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. thuringiensis* ATCC 35646, *B. wehnestephanensis* KBAB4, *L. sphaericus* VKM B-509, *M. liquefaciens* Ash10-2, *M. luteus* VKM Ac-2230, *M. roseus* VKM B-1236, *R. erythropolis* Sh5, *S. aureus* 209-P và *S. salivarius* M15.

4. Kết luận

Chủng C21 thuộc chủng vi khuẩn khó nuôi cấy, có thể là một loài mới thuộc chi *Microbacterium*. Khuẩn lạc có màu trắng sữa, tròn lồi, kích thước 0,8-1,2 mm trên môi trường ISEM, tế bào hình que dài (0,20-0,22×1,0-1,2 µm). Chủng C21 không sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng đầy đủ (ngoại trừ R2A), nhưng sinh trưởng tốt trong môi trường nghèo dinh dưỡng. N-acetylglucosamine, maltose, D-glucose, L-proline, L-rhamnose, inositol, sodium acetate và axit 3-hydroxybutyric là các nguồn cacbon cho chủng C21 sinh trưởng. Hoạt chất kháng khuẩn tổng số tách chiết từ dịch lên men chủng C21 có khả năng ức chế *E. faecalis* CCARM 5168, *E. faecalis* CCARM 5171, *E. faecalis* CCARM 5024, *E. faecium* CCARM 5025, *S. agalactiae* CCARM 4504 và *S. pyogenes* CCARM 4520 ở nồng độ tương ứng là 16, 8, 32, 64, 32 và 8 µg/ml. Đây là nguồn gen mới cho tìm kiếm hoạt chất kháng khuẩn tự nhiên. Chính vì vậy, cần có những nghiên cứu tiếp theo về xác định cấu trúc và tăng hoạt tính kháng khuẩn bằng cách biến đổi cấu trúc hóa học của hoạt chất kháng khuẩn sinh ra bởi chủng C21.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2019.03. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Fleming (1929), "On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*", *Br. J. Exp. Pathol.*, **10(3)**, pp.226-236.

[2] L.J. Stephens, M.V. Werrett, A.C. Sedgwick, et al. (2020), "Antimicrobial innovation: A current update and perspective on the antibiotic drug development pipeline", *Future Med. Chem.*, **12(22)**, pp.2035-2065, DOI: 10.4155/fmc-2020-0225.

[3] J. Bérdy (2005), "Bioactive microbial metabolites", *J. Antibiot.*, **58**, pp.1-26, DOI: 10.1038/ja.2005.1.

[4] K. Lewis (2020), "The science of antibiotic discovery", *Cell*, **181(1)**, pp.29-45, DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.056.

[5] J.H. Ch'ng, K.K.L. Chong, L.N. Lam, et al. (2019), "Biofilm-associated infection by enterococci", *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, pp.82-94, DOI: 10.1038/s41579-018-0107-z.

[6] Y. Liu, Z. Tong, J. Shi, et al. (2021), "Reversion of antibiotic resistance in multidrug-resistant pathogens using non-antibiotic pharmaceutical benzydamine", *Commun. Biol.*, **4**, DOI: 10.1038/s42003-021-02854-z.

[7] M.E.A. de Kraker, A.J. Stewardson, S. Harbarth (2016), "Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?", *PLOS Med.*, **13(11)**, DOI: 10.1371/journal.pmed.1002184.

[8] L.L. Poulsen, M. Bisgaard, N.T. Son, et al. (2012), "*Enterococcus* and *Streptococcus* spp. associated with chronic and self-medicated urinary tract infections in Vietnam", *BMC Infect. Dis.*, **12**, DOI: 10.1186/1471-2334- 12-320.

[9] V.T.V. Dung, D.T.T. Nga, U. Rydell, et al. (2019), "Antimicrobial susceptibility testing and antibiotic consumption results from 16 hospitals in Viet Nam: The VINARES project 2012-2013", *J. Glob.*, **18**, pp.269-278, DOI: 10.1016/j.jgar.2019.06.002.

[10] T.V.D. Vu, M. Choisy, T.T.N. Do, et al. (2021), "Antimicrobial susceptibility testingresults from 13 hospitals in Viet Nam: VINARES 2016-2017", *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, **10(1)**, DOI: 10.1186/s13756-021-00937-4.

[11] V.H.T. Pham, J. Kim (2012), "Cultivation of unculturable soil bacteria", *Trends. Biotechnol.*, **30(9)**, pp.475-484, DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.05.007.

[12] L.A. Hug, B.J. Baker, K. Anantharaman, et al. (2016), "A new view of the tree of life", *Nat. Microbiol.*, **1**, DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.48.

[13] L.L. Ling, T. Schneider, A.J. Peoples, et al. (2015), "A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance", *Nature*, **517**, pp.455-459, DOI: 10.1038/nature14098.

[14] K. Lewis (2017), "New approaches to antimicrobial discovery", *Biochem. Pharmacol.*, **134**, pp.87-98, DOI: 10.1016/j.bcp.2016.11.002.

[15] T.M. Nguyen, C. Seo, M. Ji, et al. (2018), "Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **84(24)**, DOI: 10.1128/AEM.01145-18.

[16] B.C. Ferrari, S.J. Binnerup, M. Gillings (2005), "Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **71(12)**, pp.8714-8720, DOI: 10.1128/AEM.71.12.8714-8720.2005.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2012), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, pp.1-68.

[18] J. Sambrook, D.W. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed., 2344pp.

[19] D.J. Lane (1991), "16S/23S rRNA sequencing", *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, pp.115-175.

[20] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33(7)**, pp.1870-1874, DOI: 10.1093/molbev/msw054.

[21] S. Ahmadi, S. Soleimanian-Zad, D. Zaeim (2020), "Antibacterial and antifungal activity of the aqueous and methanolic extracts and essential oils of Red Beets *Beta vulgaris* leaves", *Zahedan J. Res. Med. Sci.*, **22(3),** DOI: 10.5812/zjrms.83725.

[22] D. Nichols, N. Cahoon, E.M. Trakhtenberg, et al. (2010), "Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species", *Appl. Environ. Microbiol.*, **76(8)**, pp.2445-2450, DOI: 10.1128/aem.01754-09.

[23] H.P. Browne, S.C. Forster, B.O. Anonye, et al. (2016), "Culturing of "unculturable" human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation", *Nature*, **533**, pp.543-546, DOI: 10.1038/nature17645.

[24] A.A. Pulschen, A.G. Bendia, A.D. Fricker, et al. (2017), "Isolation of uncultured bacteria from antarctica using long incubation periods and low nutritional media", *Front. Microbiol.*, **8**, DOI: 10.3389/fmicb.2017.01346.

[25] M.J. Mitcheltree, A. Pisipati, E.A. Syroegin, et al. (2021), "A synthetic antibiotic class overcoming bacterial multidrug resistance", *Nature*, **599**, pp.507-512, DOI: 10.1038/s41586-021-04045-6.

[26] D.W. Kim, T.M. Heinze, B.S. Kim, et al. (2011), "Modification of norfloxacin by a *Microbacterium* sp. strain isolated from a wastewater treatment plant", *Appl. Environ. Microbiol.*, **77(17)**, pp.6100-6108, DOI: 10.1128/AEM.00545-11.

[27] V. Wiebach, A. Mainz, M.A.J. Siegert, et al. (2018), "The anti-staphylococcal lipolanthines are ribosomally synthesized lipopeptides", *Nat. Chem. Biol.*, **14(7)**, pp.652-654, DOI: 10.1038/s41589-018-0068-6.

[28] P. Ghulster, D.L. Beller, J.P. Leonetti, et al. (2018), *Use of Microbacterium Strains for the Production of Antibacterial Agents*, US Patent Application Publication (US 2018/0187216 A1).

[29] T. Wang, F. Li, Q. Lu, et al. (2021), "Diversity, novelty, antimicrobial activity, and new antibiotics of cultivable endophytic actinobacteria isolated from psammophytes collected from Taklamakan desert", *J. Pharm. Anal.*, **11(2)**, pp.241-250, DOI: 10.1016/j.jpha.2020.06.004.

[30] N.E. Suzina, A.V. Machulin, V.V. Sorokin, et al. (2022), "Capture of essential trace elements and phosphate accumulation as a basis for the antimicrobial activity of a new ultramicrobacterium-*Microbacterium* lacticum Str. F2E", *Microorganisms*, **10(1)**, DOI: 10.3390/microorganisms10010128.

DOI: 10.31276/VJST.64(11).22-26

Nghiên cứu tạo cấu trúc mang promoter *rpb1* nhằm tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp ở nấm dược liệu *Cordyceps militaris*

Trần Văn Tuấn[1, 2*], Nguyễn Minh Thư[1], Bùi Thị Khánh Linh[1], Phạm Thị Thu Hường[1, 2], Phạm Thanh Hiền[2], Lê Thị Hồng Nhung[1, 2], Hoàng Thị Mỹ Nhung[1, 2]

[1]Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam
[2]Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 7/10/2022; ngày nhận phản biện 31/10/2022; ngày chấp nhận đăng 4/11/2022

Tóm tắt:

***Cordyceps militaris* là loài nấm dược liệu chứa nhiều hoạt chất có lợi cho sức khỏe như cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharide, carotenoid. Tuy nhiên, hàm lượng của các hợp chất này ở các chủng nấm tự nhiên tương đối thấp. Gần đây, hệ gen của *C. militaris* đã được giải trình tự hoàn toàn và các gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất có lợi đã được xác định. Do đó, việc nghiên cứu tăng cường sinh tổng hợp các hoạt chất quý ở *C. militaris* nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp có nhiều thuận lợi. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tạo thành công vector nhị thể với vùng T-DNA mang cấu trúc tăng cường biểu hiện gen dưới sự điều hòa bởi promoter *rpb1* từ chính loài *C. militaris*. Cấu trúc T-DNA từ vector nhị thể được chuyển vào hệ gen nấm nhờ phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phân tích ngẫu nhiên một số thể chuyển gen bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu chứng minh cấu trúc T-DNA đã được tích hợp thành công vào hệ gen *C. militaris*. Quan sát các thể chuyển gen dưới kính hiển vi huỳnh quang xác nhận sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa protein huỳnh quang đỏ DsRed dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. Vector nhị thể mang promoter *rpb1* tạo được trong nghiên cứu này có thể được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của các gen mong muốn ở nấm dược liệu *C. militaris*.**

Từ khóa: **chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Cordyceps militaris*, protein huỳnh quang DsRed, vector nhị thể mang promoter *rpb1*.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

1. Đặt vấn đề

Ước tính, có hơn 500 loài thuộc chi *Cordyceps* đã được thu thập và phân loại. Trong đó, *C. militaris* là loài được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền ở các nước châu Á. Hiện nay, loài nấm này đang được nuôi trồng dạng quả thể ở quy mô công nghiệp. Nấm *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất có khả năng chống lại tế bào ung thư, kháng viêm và điều hòa tăng cường miễn dịch [1-3]. Tuy nhiên, hàm lượng thành phần có hoạt tính sinh học như cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharide và carotenoid ở các chủng tự nhiên thường tương đối thấp. Vì vậy, nghiên cứu tăng cường sự biểu hiện của các gen liên quan nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể giúp tăng hàm lượng hoạt chất có lợi ở nấm *C. militaris* [4].

Hệ gen của loài *C. militaris* đã được giải trình tự hoàn toàn và các gen/nhóm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các chất có lợi đã cơ bản được xác định. Cơ sở dữ liệu hệ gen nấm *C. militaris* (https://mycocosm.jgi.doe.gov/Cormi1/Cormi1.home.html) có thể được khai thác cho các nghiên cứu biểu hiện gen tái tổ hợp nhằm tăng cường sự biểu hiện của các gen mong muốn [4, 5]. Nhiều loại promoter mạnh đã được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu biểu hiện tái tổ hợp ở nấm sợi. Tuy nhiên, việc sử dụng các promoter để điều hòa biểu hiện gen ở *C. militaris* vẫn còn tương đối hạn chế [4-6]. Năm 2014, T. Lian và cs [7] sử dụng kỹ thuật real-time PCR đã chỉ ra một số gen biểu hiện mạnh ở các giai đoạn phát triển khác nhau của *C. militaris*. Trong số đó, gen *rpb1* liên quan đến sinh tổng hợp enzyme RNA polymerase II được đặc biệt chú ý, vì gen này biểu hiện mạnh và ổn định qua các giai đoạn phát triển của *C. militaris*. Vùng trình tự 5' của gen *rpb1* có thể được khai thác làm promoter cho nghiên cứu điều hòa biểu hiện gen tái tổ hợp ở nấm *C. militaris*.

Để chuyển gen vào nấm, nhiều phương pháp chuyển gen đã được phát triển. Tuy nhiên, phương pháp chuyển thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được chứng minh là có hiệu quả đối với nhiều loài nấm sợi khác nhau, trong đó có cả *C. militaris* [8-10]. Đến nay, việc chuyển gen vào *C. militaris* vẫn chủ yếu sử dụng gen kháng kháng sinh hoặc gen kháng chất diệt cỏ [4]. Việc sử dụng các vector mang gen kháng thuốc để tạo chủng chuyển gen thường không đáp ứng được các tiêu chuẩn về an toàn trong lĩnh vực sản xuất thực phẩm. Do đó, chủng tái tổ hợp được tạo ra nhờ sử dụng vector mang marker trợ dưỡng *pyrG* sẽ có tiềm năng cao để ứng dụng vào thực tiễn, đồng thời giúp loại bỏ việc sử dụng các gen kháng thuốc.

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

Generating a construct harboring the *rpb1* promoter for enhancing recombinant protein expression in the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*

Van Tuan Tran[1, 2*], Minh Thu Nguyen[1], Thi Khanh Linh Bui[1], Thi Thu Huong Pham[1, 2], Thanh Hien Pham[2], Thi Hong Nhung Le[1, 2], Thi My Nhung Hoang[1, 2]

[1]Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam
[2]National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 31 October 2022; accepted 4 November 2022

Abstract:

***Cordyceps militaris* is a valuable medicinal mushroom that contains numerous bioactive ingredients such as cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharides, and carotenoids. However, the contents of these substances in wild-type strains of *C. militaris* are relatively low. Recently, the genome of *C. militaris* has been fully sequenced, and genes involved in the biosynthesis of beneficial constituents have been identified. Therefore, research on enhancing the biosynthesis of the bioactive compounds in this fungus by recombinant DNA technology has advantages. In the present study, the authors have successfully generated a binary vector with a T-DNA region carrying a construct regulated by the native *rpb1* promoter that can enhance gene expression in *C. militaris*. The T-DNA structure from the binary vector was then transferred into the *C. militaris* genome by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Analysis of some fungal transformants by PCR using the specific primer pairs indicated that the T-DNA structure was successfully integrated into the fungal genome. Observation of the transformants under fluorescence microscopy confirmed the overexpression of the DsRed fluorescent protein under the regulation of the *rpb1* promoter. The binary vector carrying the *rpb1* promoter constructed in this study can be employed to promote the expression of target genes in the medicinal mushroom *C. militaris*.**

Keywords: ***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, binary vector carrying promoter *rpb1*, *Cordyceps militaris*, DsRed fluorescent protein.**

Classification number: **1.6**

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật, gồm *C. militaris G12*, *C. militaris* Δ*pyrG*, *A. tumefaciens* AGL1 và *Escherichia coli* DH5α do Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp. Vector nhị thể nguyên bản pEX2 dùng trong nghiên cứu được tạo ra bởi K.T. Nguyen và cs (2016) [9]. Môi trường dịch chiết khoai tây (PDA hoặc PDB) và Czapek-Dox (CD) được sử dụng cho nuôi nấm *C. militaris*. Môi trường Luria Bertani (LB) được sử dụng để nuôi các chủng vi khuẩn. Chủng nấm *C. militaris* Δ*pyrG* được nuôi trên môi trường đĩa thạch PDA có bổ sung 0,1% uridine và 0,1% uracil trong 8-10 ngày, ở 25°C dưới điều kiện chiếu sáng nhằm kích thích sự hình thành của bào tử. Bào tử nấm được thu hồi theo mô tả của K.T. Nguyen và cs (2016) [9]. Dịch bào tử được điều chỉnh về nồng độ 10^6 bào tử/ml và được giữ ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1. Cặp mồi CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 đặc hiệu cho vùng promoter của gen *rpb1* (mã số GenBank: KC242729) được thiết kế bằng phần mềm Primer3 (https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0). Trình tự vùng promoter của *rpb1* được trích xuất từ dữ liệu hệ gen nấm *C. militaris* tại https://mycocosm.jgi.doe.gov/Cormi1/Cormi1.home.html. Hai cặp mồi còn lại do Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Bảng 1. Các cặp mồi dùng cho PCR.

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	CMrpb1-F2	GGG**ACTAGT**GTCGAGGCTGTACC ACCAA (*Spe*I)	958
2	CMrpb1-R2	GGG**CTCGAG**GATATGGCGATGAC GGATT (*Xho*I)	
3	DsRed-F	AACTCGAGCACGTGCTTAAGGAT ATC ATGGCCTCCTCCGAGG	730
4	DsRed-R	AAGGATCCCCGCGGGAGCTCGAT AT CCTACAGGAACAGGTGGTGGC	
5	pyrG-orf-F	ATGTCTTCCAAGTCGCAATT	899
6	pyrG-orf-R	TATTGCGCACCAACACG	

2.2. Tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm C. militaris

Các chủng *C. militaris* được nuôi trong môi trường dịch chiết khoai tây PDB (Potato dextrose broth). Riêng đối với chủng *C. militaris* khuyết dưỡng uridine/uracil (Δ*pyrG*) thì môi trường PDB cần bổ sung thêm 0,1% uridine và 0,1% uracil. Nấm được nuôi trên máy lắc ổn nhiệt ở 25°C, tốc độ 200 vòng/phút trong 3 ngày. Hệ sợi nấm được thu lại bằng cách lọc dịch nuôi qua màng Miracloth để phục vụ tách chiết DNA tổng số. Việc tách chiết DNA tổng số được thực hiện theo quy trình đã công bố trước đây với một số điều chỉnh phù hợp [9]. Một lượng 0,15 g hệ sợi nấm được chia

vào ống eppendorf vô trùng và được giã nát bằng đũa thủy tinh vô trùng trong khoảng 1 phút. Bổ sung 600 µl đệm chiết (2,5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,2% β-mercaptoethanol) và 3 µl proteinase K vào ống chứa mẫu. Mẫu được trộn đều bằng máy vortex. Ủ mẫu ở 60°C trong 30 phút. Bổ sung 300 µl 3 M sodium acetate (pH 5,2) và đảo đều ống. Mẫu được ly tâm ở 4°C, tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút. Hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf mới và bổ sung thêm 1 thể tích isopropanol lạnh để kết tủa DNA. Đảo nhẹ ống và tiến hành ly tâm lạnh ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Bỏ phần dịch nổi và thu kết tủa. Bổ sung 700 µl ethanol 70% vào ống để rửa kết tủa. Ly tâm ống ở 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Kết tủa được làm khô bằng máy SpeedVac của Hãng Thermo Scientific (Mỹ). Bổ sung 50 µl TE (Tris- EDTA, pH 8) và 3 µl RNase A (10 mg/ml) để hòa tan mẫu và mẫu được ủ ở 60°C trong 30 phút để loại bỏ RNA. Mẫu DNA tổng số được kiểm tra trên gel agarose 0,7% bằng phương pháp điện di. Mẫu được bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Tạo vector nhị thể pEX2-rpb1

Vùng trình tự promoter (940 bp) của gen *rpb1* được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn là DNA tổng số tách chiết từ *C. militaris* và cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 (bảng 1). Để đảm bảo tính chính xác của quá trình sao chép DNA, enzyme Phusion™ high-fidelity DNA polymerase của Hãng Thermo Scientific (Mỹ) đã được sử dụng. Quy trình PCR gồm 94°C (6 phút); 35 chu kỳ lặp của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (1 phút) và 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gen agarose 0,7% và được cắt với enzyme giới hạn *Spe*I và *Xho*I. Sản phẩm được tinh sạch bằng MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit của Hãng iNtRON Biotechnology (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm tinh sạch được nối vào vector nhị thể pEX2 cũng đã được cắt bằng cùng 2 enzyme *Spe*I và *Xho*I. Việc ghép nối được thực hiện với enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Mỹ). Hỗn hợp lai được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa môi trường chọn lọc (môi trường LB chứa 100 mg/l kháng sinh kanamycin) được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc (colony PCR) sử dụng cặp mồi đặc hiệu (bảng 1). GoTaq® Green Master Mix của Hãng Promega (Mỹ) được sử dụng cho colony PCR. Những khuẩn lạc với kết quả PCR xác nhận sự có mặt của đoạn chèn được nuôi để tách plasmid. Plasmid tái tổ hợp được xác nhận bằng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và giải trình tự một phần plasmid.

2.4. Chuyển gen vào nấm C. militaris thông qua vi khuẩn A. tumefaciens

Quy trình chuyển gen vào nấm *C. militaris* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành dựa theo quy trình của K.T. Nguyen và cs (2016) [9] và Z. Zheng và cs (2011) [10]. Vector nhị thể được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 nhờ hệ thống chuyển gen bằng xung điện Gene Pulse Xcell™ Electroporation System của Hãng Bio-Rad (Mỹ). Các khuẩn lạc vi khuẩn mang vector nhị thể được xác nhận bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin (100 mg/l) ở 28°C, 200 vòng/phút, khoảng 18 đến 20 giờ. Hút 0,5 ml dịch nuôi cho vào ống falcon chứa 4,5 ml môi trường cảm ứng IM có bổ sung acetosyringone (AS) [9]. Nuôi lắc trong tối ở 28°C, 200 vòng/phút, cho tới khi dịch nuôi có OD_{600} đạt 0,6 đến 0,8 (khoảng 5-6 giờ). Trộn 100 µl dịch nuôi đã cảm ứng với 100 µl bào tử nấm (nồng độ 10^6 bào tử/ml). Hỗn hợp được trải đều lên màng cellulose đã đặt sẵn trên môi trường IM (có bổ sung 0,01% uridine, 0,01% uracil, 200 µM AS). Đĩa được ủ trong hộp tối ở 22°C trong 2,5 ngày. Để chọn lọc thể chuyển gen, màng cellulose được chuyển sang đĩa môi trường thạch Czapek Dox (CD) có bổ sung kháng sinh cefotaxime (600 mg/l) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. Ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong 5 ngày.

2.5. Xác nhận các thể chuyển gen

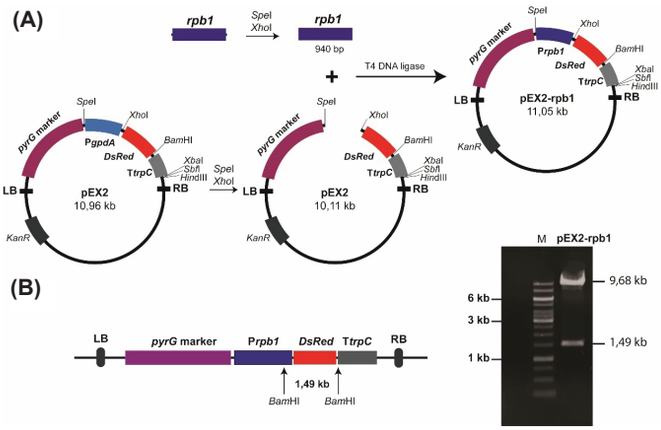
Các khuẩn lạc nấm xuất hiện trên đĩa chuyển gen được cấy chuyển sang đĩa môi trường CD mới và được tinh sạch bằng phương pháp phân lập bào tử đơn. Các thể chuyển được nuôi cấy trong môi trường PDB để thu sinh khối hệ sợi cho tách chiết DNA tổng số. Cấu trúc biểu hiện gen *DsRed* trong hệ gen các thể chuyển gen được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu DsRed-F/DsRed-R (bảng 1). Khả năng biểu hiện của protein DsRed ở các thể chuyển gen được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan fluorescence microscope (Carl Zeiss, Đức). Các thể chuyển gen đã được xác nhận bằng PCR được nuôi trên môi trường thạch CD ở nhiệt độ 25°C, trong 3 ngày. Dùng kẹp vô trùng lấy một phần hệ sợi nấm từ đĩa nuôi cấy và chuyển lên lam kính. Nhỏ một giọt nước cất vô trùng lên giữa phần hệ sợi nấm. Đặt lamen lên phía trên mẫu cần quan sát và ép nhẹ để dàn mỏng mẫu. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở vật kính 20X.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo vector nhị thể pEX2-rpb1 mang promoter rpb1 của C. militaris

Promoter *rpb1* có kích thước 940 bp được khuếch đại từ hệ gen nấm *C. militaris* bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 (bảng 1). Sản phẩm được nối thành công vào vector nhị thể pEX2 [9] tại vị trí *Xho*I và *Spe*I để thay thế promoter *gpdA* có nguồn gốc từ nấm sợi *Aspergillus nidulans*. Vector nhị thể thu được đặt tên là pEX2-rpb1 (hình 1A). Vector pEX2-rpb1 được xác nhận bằng cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *Bam*HI. Enzyme *Bam*HI có 2 vị trí cắt trong vector pEX2-rpb1, gồm 1 vị trí cắt trong trình tự promoter *rpb1* (P*rbp1*) và 1 vị trí trong khung vector. Phân tích sản phẩm cắt enzyme giới hạn trên gel agarose 0,7% cho thấy 1 băng DNA có kích thước tương ứng với 1,49 kb, tương đương với kích thước tính toán dựa trên trình tự (hình 1B). Kết quả thu được khẳng định

promoter *rpb1* đã được tích hợp đúng vị trí trong vector tái tổ hợp pEX2-rpb1.

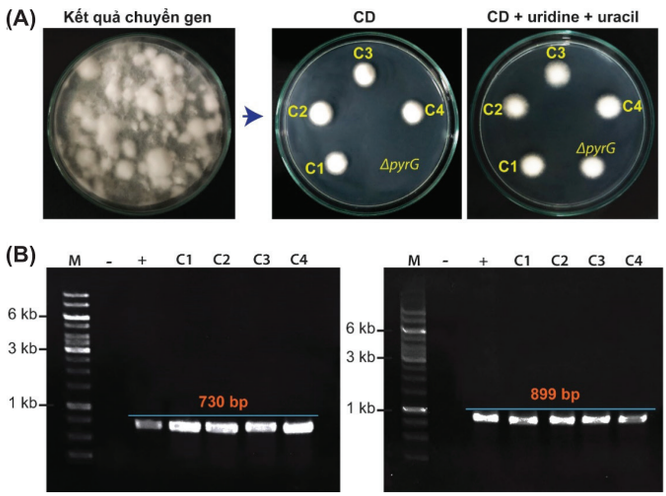


Hình 1. Vector nhị thể pEX2-rpb1 mang cấu trúc biểu hiện protein DsRed dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. (A) Sơ đồ tạo vector pEX2-rpb1, trong đó promoter *rpb1* từ *C. militaris* được sử dụng để thay thế promoter *gpdA* từ *A. nidulans*; **(B)** Sơ đồ cắt vector pEX2-rpb1 với enzyme giới hạn *Bam*HI và kết quả phân tích sản phẩm tương ứng trên gel agrose; M là thang DNA chuẩn 1 kb.

3.2. Tích hợp cấu trúc biểu hiện protein huỳnh quang DsRed vào hệ gen của C. militaris

Để đánh giá hiệu quả điều hòa biểu hiện gen của promoter *rpb1*, cấu trúc T-DNA của vector pEX2-rpb1 được chuyển vào chủng *C. militaris* Δ*pyrG* khuyết dưỡng uridine/uracil sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Phương pháp chuyển gen này đã được chứng minh là hiệu quả cao ở nhiều loài nấm khác nhau [8, 9], bao gồm cả *C. militaris* [10]. Hiệu quả chuyển gen ở *C. militaris* với marker trợ dưỡng *pyrG* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* đạt 150-210 thể chuyển gen cho 10^5 bào tử nấm. Chọn ngẫu nhiên 4 thể chuyển gen độc lập (ký hiệu C1-C4) và cấy đồng thời lên môi trường tối thiểu CD và môi trường CD có bổ sung uridine và uracil (CD+uridine+uracil). Kết quả thu được cho thấy, cả 4 thể chuyển gen đều sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu CD, trong khi chủng đối chứng *ΔpyrG* chỉ sinh trưởng được khi môi trường CD có bổ sung uridine và uracil (hình 2A). Điều này chứng tỏ, cả 4 thể chuyển gen đều đã nhận được gen *pyrG* và có khả năng tự tổng hợp uridine và uracil để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng của tế bào.

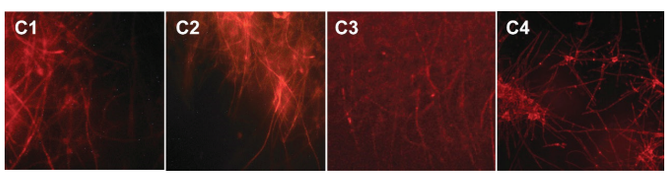
Để khẳng định chính xác khả năng phục hồi sinh trưởng của các thể chuyển gen trên môi trường khuyết uridine và uracil, DNA tổng số từ các chủng này được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi pyrG-orf-F/pyrG-orf-R và DsRed-F/DsRed-R (bảng 1). Phân tích sản phẩm PCR trên gel agrose cho thấy, cả 4 thể chuyển gen đều xuất hiện 2 băng DNA đặc trưng với kích thước 730 và 899 bp, tương ứng với kích thước của gen *DsRed* và gen *pyrG* (hình 2B). Kết quả này chứng minh cấu trúc T-DNA của vector nhị thể pEX2-rpb1 đã được chuyển gen thành công vào hệ gen nấm *C. militaris*.



Hình 2. Xác nhận các thể chuyển gen ở *C. militaris*. (A) Các thể chuyển gen được nuôi trên môi trường chọn lọc CD và CD + uridine + uracil. Chủng *C. militaris* khuyết dưỡng uridine/uracil được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của các thể chuyển gen; **(B)** Cặp mồi pyrG-orf-F/pyrG-orf-R đặc hiệu cho marker chọn lọc *pyrG* và DsRed-F/DsRed-F đặc hiệu cho gen huỳnh quang đỏ *DsRed* được sử dụng để xác nhận sự tích hợp của cấu trúc T-DNA vào hệ gen của các thể chuyển gen; M: thang DNA chuẩn 1 kb; (-): đối chứng âm sử dụng nước cất vô trùng; (+): đối chứng dương sử dụng vector pEX2-rpb1.

3.3. Xác nhận sự biểu hiện của gen DsRed dưới sự điều hòa của promoter rpb1

Gen chỉ thị huỳnh quang đỏ *DsRed* được sử dụng rất phổ biến trong chuyển gen vào nấm sợi để chứng minh vai trò của các promoter, cũng như tạo ra chủng nấm biểu hiện protein DsRed cho các mục đích nghiên cứu cụ thể [9, 11]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện gen *DsRed* được chuyển thành công vào nấm dược liệu *C. militaris*. Kết quả phân tích định tính dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy hệ sợi của các thể chuyển gen đều có tín hiệu huỳnh quang đỏ rất rõ nét (hình 3). Kết quả thu được cũng khẳng định gen *DsRed* có thể sử dụng làm gen mô hình để đánh giá khả năng điều hòa biểu hiện gen của các promoter ở nấm *C. militaris*.



Hình 3. Quan sát sự biểu hiện của protein DsRed trong hệ sợi nấm *C. militaris* chuyển gen. Hệ sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan fluorescence microscope. Tín hiệu huỳnh quang đỏ *DsRed* ở 4 thể chuyển gen độc lập (C1-C4) dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. Chủng C1, C2 và C4 cho mức độ tín hiệu mạnh hơn chủng C3.

Một nghiên cứu gần đây của T. Lian và cs (2014) [7] chỉ ra rằng, gen *rpb1* biểu mạnh và ổn định ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển của nấm *C. militaris*. Điều này gợi ý rằng, promoter của gen *rpb1* có thể giữ vai trò

quan trọng trong điều hòa biểu hiện gen ở *C. militaris*. Gen *rpb1* mã hóa tiểu phần lớn (large subunit) của enzyme RNA polymerase II và có mức độ bảo thủ cao ở động vật, thực vật và nấm. Do đó trình tự gen này được sử dụng phổ biến trong phân loại sinh vật [12]. Tuy nhiên, vai trò của promoter *rpb1* trong điều hòa biểu hiện gen ở nấm vẫn chưa được điều tra. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này chỉ ra rằng, sự biểu hiện của gen huỳnh quang *DsRed* được kích hoạt mạnh ở *C. militaris* nhờ promoter *rpb1* (hình 3). Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh promoter *rpb1* có thể được sử dụng để điều hòa biểu hiện gen tái tổ hợp ở nấm dược liệu *C. militaris*. Nghiên cứu cũng bước đầu cho thấy, việc chuyển gen vào *C. militaris* sử dụng marker trợ dưỡng *pyrG* và vi khuẩn *A. tumefaciens* là hoàn toàn khả thi và bổ trợ cho phương pháp chuyển gen sử dụng gen kháng hygromycin B làm marker chọn lọc [11].

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã tạo thành công vector nhị thể pEX2-rpb1 mang promoter *rpb1* nhằm tăng cường sự biểu hiện của gen mong muốn ở *C. militaris*. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng promoter *rpb1* có khả năng kích hoạt sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa protein *DsRed* từ san hô đỏ *Discosoma* sp. ở nấm dược liệu *C. militaris*. Vector pEX2-rpb1 tạo được từ nghiên cứu này có thể được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất có lợi ở *C. militaris*.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Đại học Quốc gia Hà Nội đã cấp kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài "Nghiên cứu phát triển hệ thống biểu hiện gen mới ở nấm dược liệu *C. militaris* phục vụ sản xuất enzym tái tổ hợp và các chất có hoạt tính sinh học" (mã số KLEPT.20.03).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] B. Shrestha, W. Zhang, Y. Zhang, et al. (2012), "The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development", *Mycological Progress*, **11(3)**, pp.599-614, DOI: 10.1007/s11557-012-0825-y.

[2] K.J. Jędrejko, J. Lazur, B. Muszyńska (2021), "*Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity", *Foods*, **10(11)**, DOI: 10.3390/foods10112634.

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

[4] L. Wang, H. Yan, B. Zeng, et al. (2022), "Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in *Cordyceps militaris*", *Bioengineering*, **9(2)**, DOI: 10.3390/bioengineering9020069.

[5] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, et al. (2017), "Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin", *Cell Chemical Biology*, **24(12)**, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.001.

[6] J. Kluge, D. Terfehr, U. Kück (2018), "Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102(15)**, pp.6357-6372, DOI: 10.1007/s00253-018-9115-1.

[7] T. Lian, T. Yang, G. Liu, et al. (2014), "Reliable reference gene selection for *Cordyceps militaris* gene expression studies under different developmental stages and media", *FEMS Microbiology Letters*, **356(1)**, pp.97-104, DOI: 10.1111/1574-6968.12492.

[8] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J. van den Hondel, et al. (2005), "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi", *Current Genetics*, **48(1)**, pp.1-17, DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0.

[9] 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(12)**, pp.204-212, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.

[10] Z. Zheng, C. Huang, L. Cao, et al. (2011), "*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*", *Fungal Biology*, **115(3)**, pp.265-274, DOI: 10.1016/j.funbio.2010.12.011.

[11] L. Mikkelsen, S. Sarrocco, M. Lübeck, et al. (2003), "Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi", *FEMS Microbiology Letters*, **223(1)**, pp.135-139, DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00355-0.

[12] J. Luo, N. Yoshikawa, M.C. Hodson, et al. (2007), "Duplication and paralog sorting of *RPB2* and *RPB1* genes in core eudicots", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44(2)**, pp.850-862, DOI: 10.1016/j.ympev.2006.11.020.

Nghiên cứu phân lập chủng vi khuẩn biển có khả năng phân hủy polyvinyl chloride

Kiều Thị Quỳnh Hoa[1], Trần Hữu Trung[2], Mai Đức Huynh[2], Nguyễn Hữu Đạt[2], Nguyễn Vũ Giang[2*]

[1]Viện Công nghệ Sinh 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

[2]Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, 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 12/1/2022; ngày gửi phản biện 18/1/2022; ngày nhận phản biện 16/2/2022; ngày chấp nhận đăng 22/2/2022

Tóm tắt:

Do có tính bền nhiệt và cơ học, nhựa polyvinyl chloride (PVC) được ứng dụng rộng rãi trong đời sống của con người. Tuy nhiên, bên cạnh lợi ích mang lại, nhựa PVC phế thải cũng gây ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và môi trường sống. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, vi sinh vật biển như vi nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn có tiềm năng phân hủy rác thải nhựa và sử dụng chúng như nguồn carbon duy nhất. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn phân hủy nhựa PVC được làm giàu và phân lập từ các vùng ô nhiễm rác thải nhựa ven biển Việt Nam. Từ 18 chủng vi khuẩn phân lập, các tác giả đã lựa chọn được chủng vi khuẩn VK3 có khả năng phân hủy nhựa PVC và sử dụng vật liệu này như nguồn carbon duy nhất sau 8 tuần thử nghiệm. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, chủng vi khuẩn này có độ tương đồng 99% với *Alcanivorax* sp. Sự biến đổi cấu trúc bề mặt và nhóm chức của nhựa PVC bởi chủng vi khuẩn VK3 cũng được minh chứng bằng phương pháp phân tích hình ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) và phổ hồng ngoại (FTIR). Nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng xử lý nhựa PVC phế thải của vi khuẩn biển.

Từ khóa: **làm giàu, phân hủy PVC, phân lập, PVC, vi khuẩn biển.**

Chỉ số phân loại: **1.6**

1. Đặt vấn đề

Theo số liệu thống kê, 4 loại nhựa là polyethylene (PE), polypropylene (PP), PVC và polystyrene (PS) chiếm tới 68% lượng nhựa sản xuất trên thế giới hàng năm. Với đặc tính bền, dễ chế tạo, các loại nhựa này được ứng dụng rộng rãi để sản xuất các mặt hàng tiêu dùng như đóng gói, đồ chơi, đồ nội thất, ống nước, ván sàn và vật liệu xây dựng… Trong các loại nhựa nêu trên, PVC được sản xuất với số lượng tương đối lớn (đứng thứ 3). Do nhu cầu sử dụng các sản phẩm làm từ nhựa ngày càng gia tăng nên rác thải nhựa nói chung, rác thải PVC nói riêng đang là mối lo ngại, gây ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường sống và sức khỏe con người [1, 2].

Mặc dù, các nhà quản lý và sản xuất đã cố gắng tăng khả năng tái chế rác thải nhựa, tuy nhiên phương pháp xử lý phổ biến hiện nay vẫn là thiêu đốt và chôn lấp. Nhược điểm của 2 phương pháp này là tốn kém do tiêu tốn năng lượng và gây ô nhiễm thứ cấp tới môi trường. Các khí độc thải ra trong quá trình thiêu đốt rác thải nhựa phải kể đến là CO_2, CFC (chlorofuorocarbon), vinyl monome và dioxin làm ô nhiễm khí quyển và môi trường. Dioxin không chỉ ảnh hưởng đến hệ thống miễn dịch và nội tiết mà còn gây ra các bệnh ung thư ở người. Phương pháp chôn lấp cũng ảnh hưởng không nhỏ tới môi trường, đặc biệt là môi trường nước. Nhựa sau thời gian dài chôn lấp có thể bị phân hủy một phần, tạo thành các mảnh nhựa có kích thước vừa và nhỏ (vi nhựa). Vi nhựa có thể ngấm từ bãi chôn lấp xuống nước ngầm gây ô nhiễm nguồn nước và môi trường biển. Ngoài ra, chôn lấp lâu ngày cũng tạo ra khí độc làm ô nhiễm môi trường [3, 4].

Do đó, việc lựa chọn các phương pháp xử lý rác thải nhựa phù hợp, an toàn và thân thiện với môi trường là cần thiết. Theo các nhà khoa học, giải pháp tốt nhất để xử lý rác thải nhựa hiện nay là việc kết hợp tái chế nhựa và xử lý rác thải nhựa bằng phương pháp phân hủy sinh học (bioremediation). Phân hủy sinh học là phương pháp bổ sung vi sinh vật phân hủy rác thải nhựa và dinh dưỡng vào môi trường ô nhiễm nhằm thúc đẩy quá trình phân hủy sinh học rác thải nhựa. Trong quá trình này, các vi sinh vật sẽ đồng hóa rác thải nhựa độc hại thành sinh khối tế bào, giải phóng ra các sản phẩm không độc hại như CO_2 và H_2O [1, 3]. Với ưu điểm an toàn và thân thiện với môi trường, phương pháp này hiện đang thu hút được sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới. Tuy nhiên, việc lựa chọn các vi sinh vật có khả năng phân hủy rác thải nhựa, từ đó nhân giống trên quy mô lớn và ứng dụng xử lý trên quy công nghiệp là điều kiện tiên quyết.

Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập và lựa chọn được chủng vi khuẩn phân hủy nhựa PVC tiềm năng từ các mẫu bùn và nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển Việt Nam.

*Tác giả liên hệ: Emai: vugiang.lit@gmail.com

Study on the isolation of marine bacterial strains capable of degrading polyvinyl chloride

Thi Quynh Hoa Kieu[1], Huu Trung Tran[2], Duc Huynh Mai[2], Huu Dat Nguyen[2], Vu Giang Nguyen[2*]

[1]Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam
[2]Institute of Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 12 January 2022; revised 16 February 2022; accepted 22 February 2022

Abstract:

Polyvinyl chloride (PVC) is a widely used plastic due to its good mechanical properties and thermal resistance. However, despite of its advantages, the persistent nature of PVC makes it challenging to dispose when released into the environment, thereby causing harm to human health and the environment. Recent research has revealed that specialised marine microbes (such as bacteria, fungi, and actinomycetes) have the potential to biodegrade plastics and utilise many of them as the sole source of carbon. In this study, PVC degrading bacteria were enriched and isolated from plastic waste contaminated coastal areas in Vietnam. From 18 isolates of bacteria, the authors selected the VK3 strain capable of degrading PVC and used this material as the sole carbon source after 8 weeks of testing. The results of 16S rRNA gene sequence analysis showed that this bacterial strain has 99% similarity with *Alcanivorax* sp. The changes in surface structure and functional groups of PVC was also demonstrated by Scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). These results revealed promising evidences of PVC degradation by marine bacteria.

Keywords: **enrichment, isolation, marine bacteria, PVC, PVC degradation.**

Classification number: **1.6**

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi khuẩn biển phân hủy nhựa PVC

Chủng vi khuẩn phân hủy nhựa PVC được làm giàu và phân lập từ các mẫu bùn, nước ô nhiễm rác thải nhựa ở các vùng ven biển Việt Nam. Các mẫu nước và bùn ô nhiễm được lấy bằng dụng cụ chuyên dụng được vô trùng. Mẫu được giữ lạnh và được phân tích trong vòng 24 giờ.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường khoáng (MSM) có bổ sung nhựa PVC (g/l): NH_4NO_3 1, KH_2PO_4 0,5, K_2HPO_4 0,5, $MgSO_4.7H_2O$ 0,5, NaCl 20, $ZnSO_4.7H_2O$ 0,002, $FeSO_4.H_2O$ 0,002, pH 7.

Môi trường dinh dưỡng hiếu khí (HKTS) (g/l): NH_4NO_3 2, KH_2PO_4 1, NaCl 20, KCl 0,25, $MgCl_2$ 1,2, glucose 1, pepton 5, cao men 0,2, cao thịt 3, thạch 20, pH 7.

2.3. Vật liệu PVC

Bột nhựa PVC PM-66R là sản phẩm thương mại của Công ty TNHH hóa chất AGC Việt Nam, khối lượng riêng 1,35 g/cm^3, hàm lượng PVC tối thiểu 99,7%, hàm lượng chất bay hơi tối đa là 0,3%.

2.4. Phương pháp làm giàu vi khuẩn phân hủy PVC

Mẫu nước và bùn thu được từ khu vực ô nhiễm rác thải nhựa ven biển được sử dụng để làm giàu vi khuẩn phân hủy PVC trên môi trường MSM bổ sung 0,2% (w/v) bột nhựa PVC (môi trường PVC-MSM). 1 ml mẫu nước hoặc 1 g mẫu bùn được pha loãng vào 9 ml muối sinh lý. Sau đó 3 ml dịch mẫu pha loãng được bổ sung vào 100 ml môi trường PVC-MSM, pH 7 và được nuôi lắc 180 vòng/phút ở nhiệt độ 30^{o}C. Sau 3 tuần nuôi lắc, tiếp tục cấy chuyển vào môi trường PVC-MSM mới thêm 2 lần [5].

2.5. Phương pháp phân lập vi khuẩn phân hủy PVC

Dịch nuôi cấy sau 9 tuần làm giàu được pha loãng tới nồng độ phù hợp và gạt trên môi trường thạch HKTS và được nuôi cấy ở 30^{o}C trong thời gian từ 1-2 ngày. Các chủng vi khuẩn thuần khiết có khuẩn lạc riêng với các hình thái khác nhau trên môi trường thạch HKTS được giữ ở nhiệt độ -80^{o}C trong dịch glycerol cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.6. Phương pháp sàng lọc chủng vi khuẩn phân hủy PVC

Các chủng vi khuẩn thuần khiết thu được trên môi trường thạch HKTS sau khi làm giàu tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường thạch khoáng MSM bổ sung 0,2% (w/v) bột nhựa PVC. Các chủng có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường thạch PVC-MSM được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Để đánh giá khả năng sinh trưởng và phân hủy PVC của các chủng vi khuẩn sau khi sàng lọc trên môi trường thạch PVC-MSM, tiến hành nuôi lắc các chủng vi khuẩn thu được trong bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường PVC-MSM bổ sung 2% (v/v) dịch nuôi cấy (18-24 giờ) với mật độ 10^5 CFU/ml sau khi ly tâm thu hồi sinh khối và rửa 2 lần bằng môi trường MSM không bổ sung nhựa PVC. Mẫu đối chứng không nuôi cấy vi khuẩn cũng được chuẩn bị ở cùng điều kiện. Thí nghiệm sàng lọc được tiến hành ở 30^{o}C, 180 vòng/phút trong 8 tuần. Khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được xác định hàng tuần trên môi trường thạch HKTS. Chủng vi khuẩn nào có khả năng sinh

trưởng và phát triển tốt nhất sẽ được lựa chọn để xác định đặc điểm phân loại và đánh giá khả năng phân hủy PVC [5].

2.7. Phân loại chủng vi khuẩn phân hủy PVC lựa chọn bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

Gen mã hóa 16S-rRNA của chủng vi khuẩn nghiên cứu được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số sử dụng cặp mồi 27F (5' AGA GTT TAG TCC TGG CTC AG 3') và 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3') theo chu trình nhiệt: 94^{o}C trong 5 phút, 30 chu trình (94^{o}C trong 60 giây, 55^{o}C trong 60 giây, 72^{o}C trong 90 giây), 72^{o}C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4^{o}C [6]. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR. Mức độ tương đồng gen 16S rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các trình tự gen 16S rRNA trong Genbank bằng công cụ BLAST trên NCBI.

2.8. Xác định sự biến đổi hình thái cấu trúc của vật liệu PVC bằng kính hiển vi SEM

Hình thái cấu trúc vật liệu PVC được phân tích trên thiết bị kính hiển vi SEM, JEOL JMS63660LV của Nhật Bản tại Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.9. Đánh giá khả năng phân hủy của vật liệu PVC bằng phân tích quang phổ hồng ngoại (FTIR)

FTIR được phân tích bằng máy hồng ngoại biến đổi Fourier NEXUS 670 (Mỹ) tại Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với các điều kiện sau: độ phân giải 4 cm^{-1}, mỗi mẫu được quét 32 lần trong giải bước sóng từ 4000 đến 400 cm^{-1}, các mẫu được đo bằng phương pháp truyền qua mẫu ép viên KBr.

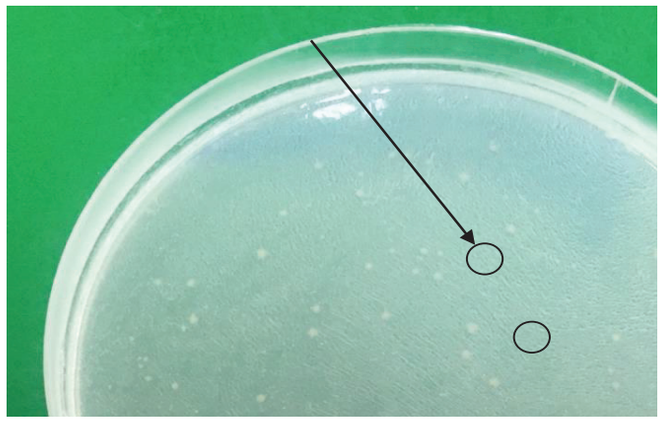
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Làm giàu và phân lập vi khuẩn phân hủy PVC

Vi khuẩn phân hủy nhựa PVC được làm giàu và phân lập từ các mẫu bùn và nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển Việt Nam. Các mẫu bùn và mẫu nước được bổ sung vào MSM chứa 0,2% (w/v) bột nhựa PVC. Sau 3 tuần, 3 ml dịch làm giàu tiếp tục được cấy chuyển 2 lần vào 100 ml môi trường PVC-MSM mới. Sau 9 tuần làm giàu trên môi trường PVC-MSM, dịch nuôi cấy được pha loãng tới nồng độ phù hợp rồi gạt trên môi trường thạch dinh dưỡng. Từ các mẫu làm giàu trong môi trường PVC-MSM, thu được 18 khuẩn lạc riêng rẽ có hình thái khác nhau (có thể tương ứng với 18 chủng vi khuẩn khác nhau). Các chủng vi khuẩn này được bảo quản trong dịch glycerol ở nhiệt độ -80^{o}C.

3.2. Lựa chọn chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy PVC

Các chủng vi khuẩn đã phân lập tiếp tục được sàng lọc trên môi trường thạch PVC-MSM. Trong 18 chủng phân lập được, chỉ có 5 chủng có thể sinh trưởng và phát triển được trên môi trường thạch PVC-MSM được ký hiệu lần lượt là VK1, VK2, VK3, VK4 và VK5. Hình thái khuẩn lạc của cả 5 chủng trên môi trường thạch PVC-MSM đều nhỏ, tròn và có màu trắng (hình 1).



Hình 1. Hình thái của chủng vi khuẩn VK3 trên môi trường thạch PVC-MSM sau 14 ngày nuôi cấy.

Các chủng vi khuẩn VK1, VK2, VK3, VK4 và VK5 lại tiếp tục được sàng lọc dựa vào khả năng sinh trưởng và phát triển của từng chủng trong môi trường dịch MSM bổ sung 0,2% (w/v) bột nhựa PVC như nguồn carbon duy nhất sau 8 tuần nuôi cấy. Khả năng sinh trưởng của 5 chủng vi khuẩn lựa chọn sau 8 tuần nuôi cấy được xác định bằng số lượng vi khuẩn trong môi trường HKTS, kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng và phát triển của 5 chủng vi khuẩn lựa chọn trên môi trường PVC-MSM sau 8 tuần nuôi cấy.

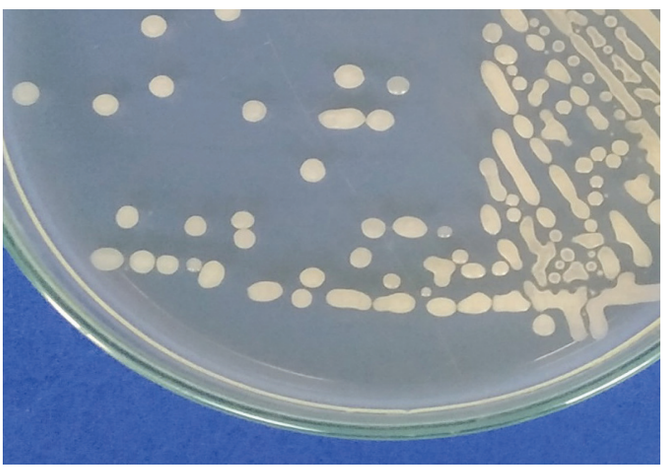
Ký hiệu chủng vi khuẩn	Số lượng vi khuẩn trong môi trường PVC-MSM (CFU/ml)							
	Tuần 1	*Tuần 2*	*Tuần 3*	*Tuần 4*	*Tuần 5*	*Tuần 6*	*Tuần 7*	*Tuần 8*
VK1	$1,5x10^3$	$9,0x10^3$	$4,3x10^4$	$3,0x10^5$	$4,0x10^5$	$5,2x10^5$	$1,6x10^5$	$7,5x10^4$
VK2	$1,2x10^3$	$8,0x10^2$	$1,6x10^2$	$1,1x10^1$	0	0	0	0
VK3	$1,1x10^3$	$1,5x10^3$	$1,6x10^3$	$2,1x10^4$	$4,6x10^4$	$8,2x10^5$	$8,3x10^5$	$9,0x10^5$
VK4	$1,3x10^3$	$1,4x10^3$	$1,6x10^3$	$2,3x10^3$	$1,0x10^4$	$9,6x10^4$	$8,3x10^4$	$9,0x10^3$
VK5	$1,5x10^3$	$2,0x10^3$	$2,7x10^3$	$4,1x10^3$	$9,4x10^3$	$1,18x10^4$	$9,6x10^4$	$5,2x10^4$

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, chủng VK1 và VK3 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong môi trường MSM bổ sung bột nhựa PVC như nguồn carbon duy nhất. Trong đó, chủng VK1 đạt số lượng cao nhất từ tuần thứ 4 tới tuần thứ 6 là $3,0x10^5$ đến $5,2x10^5$ CFU/ml và chủng VK3 đạt số lượng cao nhất từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 8 là $8,2x10^5$ đến $9,0x10^5$ CFU/ml. Khả năng sinh trưởng trên môi trường PVC-MSM của các chủng VK2 ($1,1x10^1$-$1,2x10^3$ CFU/ml), VK4 ($1,3x10^3$-$9,6x10^4$ CFU/ml) và VK5 ($1,5x10^3$-$9,6x10^4$ CFU/ml) đều yếu hơn so với chủng VK1 và VK3.

Số lượng của chủng VK2 giảm từ $1,2x10^3$ CFU/ml tại thời điểm ban đầu xuống $1,1x10^1$ CFU/ml sau 4 tuần nuôi cấy và không được phát hiện trên môi trường HKTS từ tuần thứ 5 trở đi, chứng tỏ chủng này không có khả năng sinh trưởng và phát triển trên môi trường PVC-MSM (không có khả năng sử dụng PVC như nguồn carbon duy nhất). Sau 8 tuần nuôi cấy, số lượng khuẩn lạc của các chủng VK1, VK2, VK3, VK4 và VK5 lần lượt là $7,5x10^4$, 0, $9,0x10^5$, $9,0x10^3$ và $5,2x10^4$ CFU/ml, trong đó chủng VK3 có số lượng cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy. Do đó, chủng VK3 được lựa chọn để xác định đặc điểm phân loại và đánh giá khả năng phân hủy PVC bằng phương pháp SEM và FITR.

3.3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn VK3

Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng vi khuẩn VK3 trên môi trường dinh dưỡng HKTS sau 24 giờ nuôi cấy được thể hiện ở hình 2. Chủng VK3 là vi khuẩn hiếu khí, gram âm, không sinh bào tử, trên môi trường HKTS, chủng VK3 có mép gọn, oval lồi, bóng, nhầy, trắng đục hơi ngả vàng, kích thước 3-4 mm.



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc chủng VK3 trên môi trường dinh dưỡng HKTS sau 2 ngày nuôi cấy.

3.4. Phân loại chủng vi khuẩn VK3 bằng phân tích trình tự gen 16S rRNA

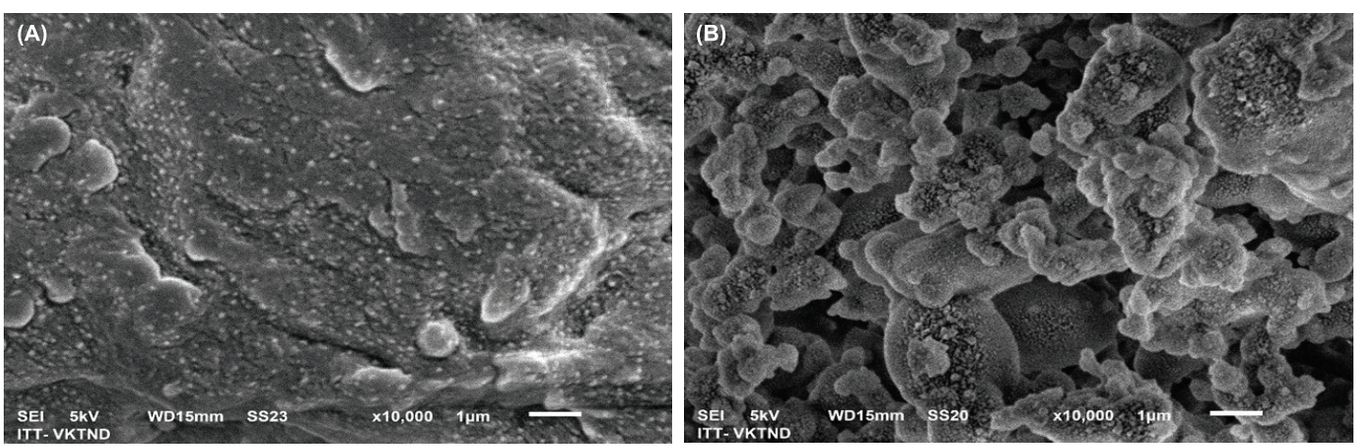
Trong số 18 chủng vi khuẩn phân lập được ban đầu, chủng VK3 được lựa chọn để phân loại và đánh giá khả năng phân hủy nhựa PVC do có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt nhất trong môi trường PVC-MSM. Kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, chủng VK3 tương đồng 99% với loài *Alcanivorax* sp. Vì vậy trong nghiên cứu này, chủng VK3 được ký hiệu là *Alcanivorax* sp. VK3.

3.5. Đánh giá khả năng phân hủy nhựa PVC của chủng Alcanivorax sp. VK3

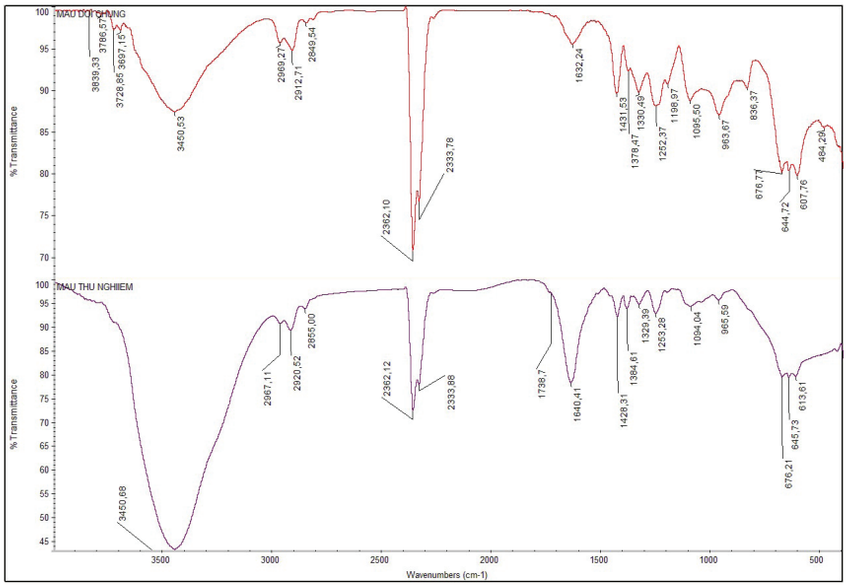
Hình thái cấu trúc của nhựa PVC dưới kính hiển vi SEM: khả năng phân hủy PVC của chủng *Alcanivorax* sp. VK3 đã được nghiên cứu sau 8 tuần nuôi lắc trên môi trường PVC-MSM được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, ở độ phóng đại 10.000 lần, bề mặt vật liệu PVC của mẫu đối chứng (không xử lý với chủng VK3) gần như còn nguyên vẹn, hình thái học bề mặt của mẫu khá phẳng (hình 3A). Trong khi đó, mẫu thử nghiệm xử lý bởi chủng VK3 có sự biến đổi rõ rệt, trên bề mặt mẫu xuất hiện rất nhiều các hốc rỗ và xốp vật liệu như thể hiện ở hình 3B sau 8 tuần thử nghiệm. Kết quả này chứng tỏ chủng vi khuẩn *Alcanivorax* sp. VK3 có khả năng phân hủy nhựa PVC.

3.6. Đánh giá khả năng phân hủy nhựa PVC bằng phân tích FTIR

Hình 4 trình bày kết quả nghiên cứu phổ FTIR của mẫu nhựa PVC đối chứng và mẫu thử nghiệm được xử lý bởi chủng vi khuẩn *Alcanivorax* sp. VK3 sau 8 tuần. Trên phổ của mẫu đối chứng xuất hiện các píc đặc trưng của nhựa PVC như: các đỉnh ở vùng 2362-2333 cm^{-1} (tương ứng với dao động của nhóm HC-Cl) [5], các píc đặc trưng của nhóm CH_2 ở 2972 cm^{-1} và 2910 cm^{-1}, nhóm CH_2-Cl biến dạng ở 1431 cm^{-1}, CH-Cl biến dạng góc ở 1252 cm^{-1}, C-H ở 960 cm^{-1} và liên kết C-Cl đặc trưng bởi các đỉnh 831, 691 và 615 cm^{-1} [7-9].



Hình 3. Ảnh SEM mẫu nhựa PVC đối chứng (A) và mẫu xử lý với chủng *Alcanivorax* sp. VK3 (B) sau 8 tuần.



Hình 4. Phân tích phổ FTIR mẫu nhựa PVC đối chứng (bên trên) và mẫu xử lý với chủng vi khuẩn *Alcanivorax* sp. VK3 (bên dưới).

So sánh với phổ FTIR của mẫu thử nghiệm được xử lý bởi chủng VK3, có sự xuất hiện píc mới ở các bước sóng 1738 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm cacbonyl (C=O), đồng thời, về cường độ của píc đặc trưng, xuất hiện sự suy giảm cường độ tại các píc trong vùng 2362-2333 cm^{-1} (tương ứng với HC-Cl), vùng 1300-1000 cm^{-1} của nhóm CH_2-Cl đầu mạch [10-12]. Sự xuất hiện của các ngóm cacbonyl có thể làm tăng khả năng hấp thụ nước trên bề mặt mẫu. Do đó, trên phổ hồng ngoại của mẫu sau thử nghiệm vùng 3450 cm^{-1} có đỉnh rộng và cường độ mạnh hơn so với mẫu đối chứng. Các kết quả này cho thấy đã có sự biến đổi về cấu trúc của mạch PVC, đã xuất hiện quá trình khử clo từ PVC của bởi chủng vi khuẩn *Alcanivorax* sp. VK3.

Hiện chưa có công bố nào về khả năng phân hủy PVC cũng như khả năng sử dụng vật liệu này như nguồn carbon duy nhất và năng lượng của vi khuẩn *Alcanivorax*. Tuy nhiên, những công bố về khả năng phân hủy hydrocarbon dầu mỏ và nhựa LDPE (low-density polyethylene) của chủng này đã được biết đến [6, 13, 14].

4. Kết luận

Trong số 18 chủng vi khuẩn phân lập được bằng phương pháp làm giàu từ các mẫu bùn và nước ô nhiễm rác thải nhựa ở ven biển Việt Nam đã lựa chọn được chủng *Alcanivorax* sp. VK3 có khả năng phân hủy và sử dụng nhựa PVC như nguồn carbon và năng lượng. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng *Alcanivorax* sp. VK3 sinh trưởng và phát triển tốt trong MSM bổ sung PVC như nguồn carbon duy nhất sau 8 tuần thử nghiệm. Khả năng phân hủy nhựa PVC của chủng này được minh chứng thông qua sự biến đổi rõ rệt bề mặt vật liệu nhựa PVC và cấu trúc của mạch PVC giữa mẫu đối chứng và mẫu thử nghiệm sau 8 tuần.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Chương trình hỗ trợ nghiên cứu viên cao cấp của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (mã số: NCVCC. 13.09/21-21). Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Singh, et al. (2020), "Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes", *Science of The Total Environment*, **759**, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.143536.

[2] B.Y. Peng, Z. Chen, J. Chen, et al. (2020), "Biodegradation of polyvinyl chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae", *Environment International*, **145**, DOI: 10.1016/j. envint.2020.106106.

[3] L. Giacomucci, N. Raddadi, M. Soccio, et al. (2019), "Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*", *New Biotechnology*, **52**, pp.35-41, DOI: 10.1016/j. nbt.2019.04.005.

[4] M.M. Aji, S. Narendren, M.K. Purkait, et al. (2020), "Biopolymer (gum arabic) incorporation in waste polyvinylchloride membrane for the enhancement of hydrophilicity and natural organic matter removal in water", *Journal of Water Process Engineering*, **38**, DOI: 10.1016/j.jwpe.2020.101569.

[5] M.I. Ali, S. Ahmed, G. Robson, et al. (2012), "Isolation and molecular characterization of polyvinyl chloride (PVC) plastic degrading fungal isolates", *Journal of Basic Microbiology*, **54(1)**, pp.18-27, DOI: 10.1002/jobm.201200496.

[6] T.N. Chernikova, R. Bargiela, S.V. Toshchakov, et al. (2020), "Hydrocarbon-degrading bacteria *alcanivorax* and *marinobacter* associated with microalgae *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*", *Font. Microbiol.*, **11**, pp.1-14, DOI: 10.3389/fmicb.2020.572931.

[7] J. Chen, X.A. Nie, J.C. Jiang, et al. (2018), "Thermal degradation and plasticizing mechanism of poly(vinyl chloride) plasticized with a novel cardanol derived plasticizer", *IOP Conference Series - Materials Science and Engineering*, **292**, DOI: 10.1088/1757-899X/292/1/012008/meta.

[8] M. Pandey, G.M. Joshi, A. Mukherjee, et al. (2016), "Electrical properties and thermal degradation of poly (vinyl chloride)/polyvinylidene fluoride/ZnO polymer nanocomposites", *Polymer International*, **15(9)**, pp.1098-1106, DOI: 10.1002/pi.5161.

[9] V.K. Plakunov, A.V. Gannesen, S.V. Mart'yanov, et al. (2020), "Biocorrosion of synthetic plastics: Degradation mechanisms and methods of protection", *Microbiology*, **89**, pp.647-659, DOI: 10.1134/S0026261720060144.

[10] J. Almond, P. Sugumaar, M.N. Wenzel, et al. (2020), "Determination of the carbonyl index of polyethylene and polypropylene using specified area under band methodology with ATR-FTIR spectroscopy", *E-Polymers*, **20(1)**, pp.369-381, DOI: 10.1515/epoly-2020-0041.

[11] Organic Chemistry at CU Boulder (2021), "IR spectroscopy tutorial: Alkyl halides", https://orgchemboulder.com/Spectroscopy/irtutor/tutorial.shtml, accessed 20 December 2021.

[12] S.D. Khandare, D.R. Chaudhary, B. Jha (2021), "Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria", *Marine Pollution Bulletin*, **169**, DOI: 10.1016/j. marpolbul.2021.112566.

[13] A. Delacuvellerie, V. Cyriaque, S. Gobert, et al. (2019), "The plastisphere in marine ecosystem hosts potential specific microbial degraders including *Alcanivorax borkumensis* as a key player for the low-density polyethylene degradation", *Journal of Hazardous Materials*, **380**, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.120899.

[14] D.J. Lane (2021), "16S/23S rRNA sequencing", *CiNii Research*, https://cir.nii.ac.jp/crid/1573950399022125056, accessed 20 December 2021 (in Japanese).

 DOI: 10.31276/VJST.64(11).32-37

Ảnh hưởng của kỹ thuật trích ly đến hoạt tính sinh học cao nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) giàu polysaccharide

Nguyễn Thị Kim Ngân[1], Ngô Thị Thùy Linh[1], Trần Đỗ Đạt[1], Nguyễn Đức Việt[2], Hoàng Minh Nam[2, 3], Mai Thanh Phong[2, 3], Nguyễn Hữu Hiếu[1, 2, 3*]

[1]Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Hóa học và Dầu khí, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

[2]Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

[3]Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, phường Linh Trung, TP Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 9/8/2021; ngày chuyển phản biện 13/8/2021; ngày nhận phản biện 13/9/2021; ngày chấp nhận đăng 16/9/2021

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, cao nấm Linh chi giàu polysaccharide (PS) được thu nhận bằng nhiều kỹ thuật trích ly khác nhau như: nước nóng (hot water extraction - HWE), nước nóng có hỗ trợ siêu âm (ultrasonic-assisted hot water extraction - UHWE), enzyme (enzyme-assisted extraction - EAE) và enzyme có hỗ trợ siêu âm (ultrasonic-assisted enzyme extraction - UAEE). Tổng hàm lượng PS cao nhất là 3,721±0,134% đối với UAEE, cao hơn so với HWE (1,783±0,156%), UHWE (1,886±0,148%) và EAE (2,133±0,139%). Cao nấm Linh chi được thử nghiệm hoạt tính kháng ôxy hóa với gốc tự do 2,2-diphenyl-1-1picrylhydrazyl (DPPH) và năng lực khử sắt. Hoạt tính kháng khuẩn của cao trích được đánh giá qua thông số nồng độ ức chế 50% (IC_{50}). Khả năng bắt gốc tự do DPPH của cao nấm trích bằng kỹ thuật UAEE đạt 42,334%, đồng thời kết quả khảo sát năng lực khử sắt cho thấy, khả năng khử của cao trích bằng UAEE tốt hơn so với 3 kỹ thuật trích ly HWE, UHWE và EAE. Ngoài ra, cao nấm Linh chi trích ly bằng UAEE thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis và Staphylococcus aureus* với IC_{50} trong khoảng 0,069-0,096 g/ml.

Từ khoá: **kháng khuẩn, kháng ôxy hóa, nấm Linh chi, polysaccharide.**

Chỉ số phân loại: **2.4**

1. Đặt vấn đề

Nấm Linh chi có tên khoa học là *Ganoderma lucidum* thuộc họ Ganodermataceae, là một trong những loại nấm dược liệu được biết đến rộng rãi, ứng dụng nhiều trong các loại thuốc thảo dược và thực phẩm chức năng ở các nước châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam. Nấm Linh chi là một loại nấm lớn, sẫm màu, có bề ngoài bóng và kết cấu dạng gỗ [1, 2]. Loài nấm này chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như PS, triterpenoid, alkaloid, flavonoid, streroid, protein, acid amin, enzyme, vitamin và khoáng chất [3]. Trong đó, PS và triterpenoid trong nấm Linh chi đang được nghiên cứu rộng rãi vì các hoạt tính sinh học như điều hòa miễn dịch, hạ đường huyết, kháng khuẩn, kháng ôxy hóa, các hoạt động chống lão hóa, ngăn ngừa hình thành khối u, ức chế enzyme α-glucosidase, kháng viêm và bảo vệ gan [2, 4]. Chính vì vậy, việc thu nhận cao nấm Linh chi giàu hoạt tính sinh học là cần thiết.

Các kỹ thuật trích ly thu nhận các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật đã và đang thu hút nhiều sự quan tâm trong suốt các thập kỷ qua. Hầu hết, quá trình trích ly đều tốn thời gian, công sức, sử dụng lượng lớn dung môi và sự phân hủy của các hợp chất mong muốn do quá trình trích ly cần nhiệt độ cao liên tục [5]. Vì vậy, việc tìm ra kỹ thuật trích ly phù hợp nhằm giúp nâng cao hiệu suất trích ly là cần thiết. Kỹ thuật trích ly có thể được phân thành loại thông thường và hiện đại. Các kỹ thuật thông thường như HWE, chưng cất thủy phân và Soxhlet có thể thu nhận cao trích với nồng độ và hoạt tính thấp do dịch chiết dễ bị lôi kéo và bay hơi cùng với dung môi [6]. Các kỹ thuật này yêu cầu nhiệt độ cao hơn, thời gian xử lý lâu, thể tích dung môi lớn, có thể dẫn đến việc chiết xuất nhiều thành phần không mong muốn gây ảnh hưởng xấu đến hợp chất. Mặc dù HWE được sử dụng khá phổ biến, nhưng HWE chỉ có thể chiết xuất PS từ thành tế bào do đặc tính thành tế bào của nấm Linh chi, dẫn đến việc trích ly PS với hàm lượng thấp [7]. Bên cạnh đó, trích ly bằng Soxhlet được sử dụng với một số dung môi, kỹ thuật này mất vài giờ thậm chí hơn 24 giờ để trích ly và sử dụng lượng lớn dung môi [8]. Ngược lại, các kỹ thuật trích ly hiện đại như kỹ thuật lưu chất siêu tới hạn (Supercritical fluid extraction - SFE), EAE, vi sóng (Microwave-assisted extraction - MAE), có hỗ trợ của siêu âm (Ultrasonic-assisted extraction - UAE) và UAEE có hiệu suất trích ly cao và khắc phục được những nhược điểm của các kỹ thuật thông thường. Ưu điểm của các kỹ thuật hiện đại so với các kỹ thuật thông thường là hạn chế sử dụng dung môi hữu cơ và giảm thiểu sự phân hủy của các hợp chất [9]. Kỹ thuật EAE dựa trên nguyên tắc enzyme

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

Effects of extraction technology on bioactivities from polysaccharide-rich *Ganoderma lucidum*

Thi Kim Ngan Nguyen[1], Thi Thuy Linh Ngo[1], Do Dat Tran[1], Duc Viet Nguyen[2], Minh Nam Hoang[2, 3], Thanh Phong Mai[2, 3], Huu Hieu Nguyen[1, 2, 3*]

[1]Key Laboratory of Chemical Engineering and Petroleum Processing (Key CEPP Lab), Ho Chi Minh City University of Technology, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

[2]Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

[3]Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Linh Trung Ward, Thu Duc City, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 9 August 2021; revised 13 September 2021; accepted 16 September 2021

Abstract:

In this study, the polysaccharide-riched extract from *Ganoderma lucidum* was obtained by different extraction methods including hot water extraction (HWE), ultrasonic-assisted hot water extraction (UHWE), enzyme-assisted extraction (EAE), and ultrasonic-assisted enzyme extraction (UAEE). The total polysaccharide content in UAEE (3.721±0.134%) was higher than HWE (1.783±0.156%), UHWE (1.886±0.148%), and EAE (2.133±0.139%). The *G. lucidum* extract was then evaluated for antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-1picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods. The antibacterial activity was assessed via half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). The DPPH radical scavenging activity of extract from UAEE was 42.334%, while the result obtained from FRAP shows much better than HWE, UHWE, and EAE methods. Furthermore, *G. lucidum* extracted by UAEE showed antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* with IC_{50} in the range of 0.069-0.096 g/ml.

Keywords: **antibacteria, anti-oxidation, *Ganoderma lucidum*, polysaccharide.**

Classification number: **2.4**

liên kết với cơ chất, cấu trúc và hình thái của enzyme thay đổi để phù hợp với sự tương tác giữa enzyme và cơ chất, làm phá vỡ thành tế bào thực vật, giải phóng thành phần nội bào [10]. Đối với kỹ thuật UAEE được phát triển thêm nhằm rút ngắn thời gian và tăng năng suất trích ly các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, nâng cao chất lượng của các hợp chất [11]. Theo các nghiên cứu trước đây, hàm lượng PS khi trích ly bằng UAE với công suất 210 W, nhiệt độ 80°C sau 100 phút cho hiệu suất đạt 0,63% [12], UAEE thu nhận hàm lượng PS đạt 3,21% với điều kiện nhiệt độ trích ly 45°C, trong 30 phút, nồng độ enzyme 3% [13]. Kỹ thuật trích ly kết hợp sóng siêu âm và enzyme Pectinex (Pectinex ultra SP-L là hệ enzyme gồm pectinase, cellulase, hemicellulase, β-glucanase, xylanase và α-amylase) [14] giúp đẩy nhanh quá trình trích ly, vì enzyme có tính chọn lọc cơ chất và đặc hiệu cao, tùy vào loại cơ chất, thì vị trí phân cắt tương ứng với từng loại enzyme sẽ khác nhau [15].

Mục đích của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của các kỹ thuật trích ly HWE, UHWE, EAE, UAEE lên hàm lượng PS, đồng thời thử nghiệm các hoạt tính sinh học như kháng ôxy hóa và kháng khuẩn.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

Nấm Linh chi được nuôi trồng ở huyện Củ Chi, TP Hồ Chí Minh. Nguyên liệu được sấy và nghiền thành dạng bột. Ethanol (C_2H_5OH) 95%, axit sunfuric (H_2SO_4) 98%, axit ascorbic, axit acetic (CH_3COOH), phenol (C_6H_6O), kali ferricyanid ($C_6N_6FeK_3$), axit cloacetic ($ClCH_2CO_2H$) được thu mua từ Công ty TNHH khoa học Xilong (Trung Quốc). Enzyme Pectinex Ultra SP-L được cung cấp bởi Công ty TNHH Brentag Việt Nam. D-glucose, DPPH được mua từ Sigma-Aldrich Chemcal Co., Ltd (Mỹ).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

HWE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi nghiền được bổ sung vào erlen 250 ml chứa 100 ml nước cất, đun sôi trong nồi cách thủy ở 90°C trong khoảng thời gian xác định. Hỗn hợp huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc được cô quay bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khi thu nhận cao nấm Linh chi với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C để tiến hành phân tích mẫu tiếp theo [16].

UHWE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi nghiền được bổ sung vào erlen 250 ml chứa 100 ml nước cất, trích ly với điều kiện nhiệt độ siêu âm ở 90°C, công suất 240 W trong các khoảng thời gian xác định. Sau đó, hỗn hợp huyền phù được lọc bằng thiết bị lọc chân không. Dịch lọc được cô quay bằng thiết bị cô quay chân không ở nhiệt độ 50°C cho đến khi thu nhận cao nấm với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C để tiến hành phân tích mẫu.

EAE: Nấm Linh chi (2 g) được bổ sung vào bình tam giác 250 ml chứa 100 ml nước cất, dung dịch đệm acetate (pH 7,9). Hỗn hợp huyền phù được bổ sung hệ enzyme Pectinex Ultra SP-L (3% khối lượng), khuấy từ từ ở 50°C trong các khoảng thời gian xác định. Kết thúc quá trình phản ứng, hỗn hợp được đun sôi tới 80°C trong 30 phút nhằm bất hoạt enzyme. Sau đó, hỗn hợp được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không đến khi thu được cao nấm Linh chi với khối lượng không đổi. Trữ mẫu ở nhiệt độ 4°C [16].

UAEE: Nấm Linh chi (2 g) sau khi sấy khô, được bổ sung thêm 100 ml nước cất, dung dịch đệm, chỉnh đến pH 7,9, enzyme Pectinex Ultra SP-L (3% khối lượng) và trích ly với điều kiện nhiệt độ siêu âm ở 50°C, công suất 240 W trong khoảng thời gian xác định. Tiến hành lọc loại bã bằng thiết bị lọc chân không, dịch lọc được gia nhiệt đến 80°C trong 30 phút để bất hoạt enzyme. Sau đó, dịch lọc được cô quay chân không để loại bỏ dung môi. Đem sấy khô đến khối lượng không đổi, thu được mẫu cao nấm. Trữ lạnh mẫu ở nhiệt độ 4°C.

Xác định hàm lượng PS: Hàm lượng PS được xác định bằng phương pháp phenol - axit sunfuric [17]. Pha dung dịch D-glucose 1000 được chuẩn bị bằng cách cân 100 mg D-glucose cho vào 100 ml nước cất, sau đó pha loãng 10 lần thu được dung dịch D-glucose ở các nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 µg/ml. Hút 2 ml dung dịch chuẩn D-glucose ở các nồng độ khác nhau vào ống nghiệm, sau đó thêm vào mỗi ống nghiệm 1 ml phenol 5%, 5 ml H_2SO_4 (98%), lắc đều để phản ứng xảy ra nhanh và đồng nhất. Thực hiện tương tự với mẫu cao trích thu được từ nấm Linh chi. Hàm lượng PS xác định bằng phương pháp đo mật độ quang tại bước sóng 488 nm và dựa trên đường chuẩn D-glucose theo công thức sau:

$$H = \frac{C_{PS} \times V \times n}{m} \quad (1)$$

trong đó: C_{ps} (mg/l) là nồng độ PS trong cao trích; V (ml) là thể tích cao trích đem phân tích; n là hệ số pha loãng; m (g) là khối lượng nguyên liệu thô ban đầu.

2.3. Hoạt tính kháng ôxy hóa

Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Đánh giá khả năng kháng ôxy hóa được thực hiện bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH. DPPH là một gốc tự do nhân tạo, ổn định, có màu tím, độ hấp thu cực đại ở bước sóng 517 nm và không thể tham gia phản ứng với các chất có khả năng cho nguyên tử hydro, sau phản ứng sẽ làm giảm cường độ màu tím của dung dịch và chuyển sang màu vàng. Từ đó, có thể đánh giá khả năng kháng ôxy hóa của hợp chất. Cao nấm Linh chi được hòa tan trong methanol để thu được các nồng độ khác nhau, axit ascorbic là đối chứng dương. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 2 ml dịch chiết tương ứng với nồng độ đã chuẩn bị trước đó và 4 ml dung dịch DPPH. Lắc đều hỗn hợp và để yên 30 phút trong tối ở nhiệt độ phòng. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được tính bằng công thức sau:

$$\%I = \frac{A_B - (A_S - A_C)}{A_B} \times 100\% \quad (2)$$

trong đó: I là phần trăm bắt gốc DPPH; A_B là độ hấp thu của mẫu trắng; A_S là độ hấp thu của mẫu; và A_C là độ hấp thu của mẫu màu.

Khả năng khử sắt: Các hợp chất có khả năng kháng ôxy hóa phản ứng với kali ferricyanide tạo thành kali ferrocyanide. Sau đó, hợp chất này phản ứng với ferric trichloride tạo ra ferrocyanide ferric là một phức màu xanh lam với độ hấp thu tối đa ở 700 nm. Chuẩn bị 1 ml mẫu cao nấm Linh chi ở các nồng độ khảo sát khác nhau được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch đệm phosphate 0,2 M (pH 6,6) và 2,5 ml kali ferricyanid, lắc và ủ ở nhiệt độ 50°C trong 20 phút. Sau đó, mỗi ống nghiệm được bổ sung thêm 2,5 ml dung dịch axit tricloacetic 10%. Hỗn hợp được ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút. Dùng pitpet hút 2,5 ml dung dịch mẫu vào 2,5 ml nước cất và 0,5 ml dung dịch $FeCl_3$ 0,1%. Đo độ hấp thu ở bước sóng 700 nm, giá trị độ hấp thu phản ánh khả năng khử của mẫu. Giá trị mật độ quang càng cao chứng tỏ năng lực khử sắt của mẫu càng cao. Mỗi nồng độ lặp lại 3 lần, axit ascorbic được sử dụng làm đối chứng. Năng lực khử sắt được tính theo công thức sau:

$$Q = A_S - A_B \quad (3)$$

trong đó: Q là năng lực khử sắt; A_S và A_B lần lượt là độ hấp thu của mẫu và mẫu trắng.

Hoạt tính kháng khuẩn: Khả năng kháng khuẩn của cao nấm Linh chi được đánh giá qua thông số IC_{50} trên các chủng vi khuẩn kiểm định: *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus*. Mẫu vi khuẩn được hoạt hóa trên môi trường nuôi cấy dinh dưỡng, sau đó mẫu cao trích được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, ủ ở 37°C trong 24 giờ. Tế bào vi khuẩn có thể tạo hệ huyền phù trong nước tạo độ đục cho môi trường. Tiến hành xác định mật độ tế bào vi sinh thông qua đo độ hấp thu của dung dịch ở bước sóng 550-610 nm. Gentamicin được sử dụng làm mẫu đối chứng. Phần trăm ức chế vi khuẩn được tính theo công thức sau:

$$I_{UC} = \frac{A_m - A_{(+)}}{A_{(-)} - A_{(+)}} \times 100\% \quad (4)$$

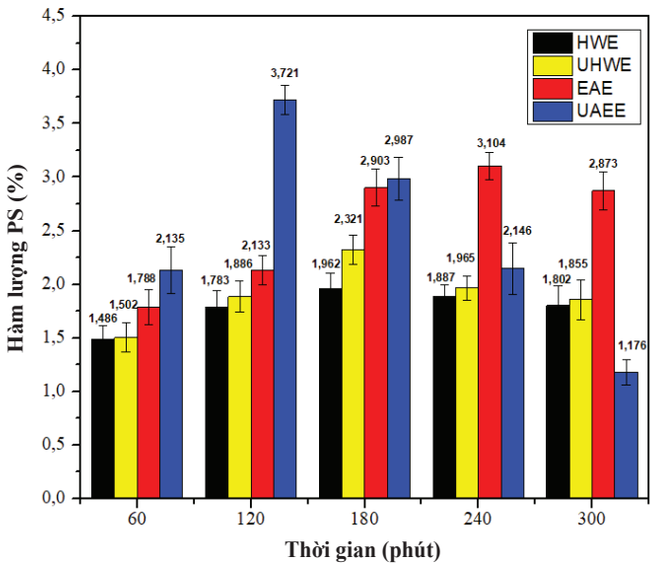
trong đó: I_{UC} là phần trăm ức chế vi khuẩn; A_m là độ hấp thu của mẫu chứa vật liệu cần thử nghiệm; $A_{(+)}$ là độ hấp thu

của mẫu chứa chất kháng khuẩn biết trước nồng độ ức chế tối thiểu; $A_{(-)}$ là độ hấp thu của mẫu không chứa chất kháng khuẩn.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật trích ly đến hàm lượng PS

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các kỹ thuật trích ly đến hàm lượng PS được thể hiện ở hình 1. Kết quả cho thấy, PS được trích bằng 3 kỹ thuật HWE, UHWE và EAE tăng khi kéo dài thời gian trích ly. Đối với EAE, hàm lượng PS cao nhất đạt 3,104±0,126%, với thời gian phản ứng 240 phút, sau đó giảm xuống khi kéo dài thời gian phản ứng tới 360 phút. Bên cạnh đó, UHWE cho hàm lượng PS (2,321±0,135%) cao hơn so với HWE (1,962±0,142%) trong 180 phút [16]. Tuy nhiên, hàm lượng PS thu được từ 2 kỹ thuật này vẫn thấp hơn khi so với EAE ở cùng thời gian phản ứng. Mặt khác, hàm lượng PS được trích ly bằng UAEE (3,721±0,142%) cao hơn so với 3 kỹ thuật HWE, UHWE và EAE lần lượt là 1,783±0,142, 1,886±0,148 và 2,133±0,126% trong cùng điều kiện trích ly 2 g nấm Linh chi với thời gian 120 phút. Do đó, kỹ thuật UAEE giúp nâng cao hàm lượng PS, rút ngắn thời gian trích ly.

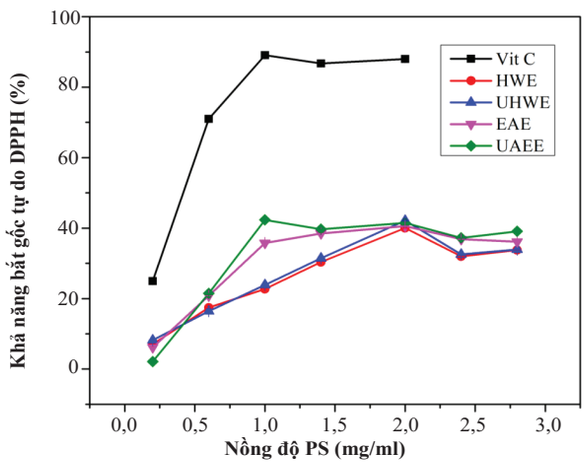


Hình 1. Ảnh hưởng của phương pháp trích ly lên hàm lượng PS.

Kết quả có thể giải thích là do cấu trúc đặc biệt của thành tế bào nấm Linh chi chủ yếu được cấu tạo bởi các PS trọng lượng phân tử khác nhau như chitin, cellulose và β-glucan. Trong đó, chitin và cellulose hầu như không tan trong nước [18]. Điều này dẫn đến, HWE không trích ly được nhiều PS khi so sánh với EAE cùng thời gian trích ly. Vì kỹ thuật EAE dựa trên khả năng enzyme thủy phân và phá vỡ cấu trúc thành tế bào thành những phân tử có khối lượng thấp giúp các phân tử dễ dàng hòa tan trong dung môi. Ngoài ra, sự hỗ trợ của sóng siêu âm từ kỹ thuật UAEE có thể cải thiện hoạt tính của enzyme và khuếch tán vào trong dung môi làm tăng hiệu quả trích ly [11]. Bên cạnh đó, yếu tố thời gian cũng ảnh hưởng đến hàm lượng PS, khi kéo dài thời gian sẽ làm giảm hàm lượng cao trích ly. Với quá trình siêu âm ở nhiệt độ cao thì việc kéo dài thời gian có thể làm biến đổi các phân tử trong cao trích ly, do đó sẽ ảnh hưởng đến chất lượng và làm giảm hàm lượng PS trong cao trích [19, 20].

3.2. Hoạt tính kháng ôxy hóa

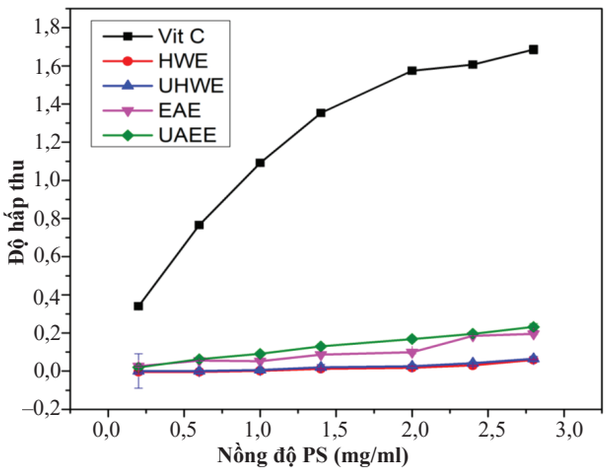
Khả năng bắt gốc tự do DPPH: Khả năng các bắt tự do DPPH của axit ascorbic và cao nấm Linh chi được trích ly bằng HWE, UHWE, EAE và UAEE được thể hiện ở hình 2. Đối với axit ascorbic cho thấy, khả năng bắt gốc tự do DPPH tăng từ 24,929 lên 89,091% khi tăng nồng độ từ 0,2 đến 1 mg/ml. Tuy nhiên, khi nồng độ của axit ascorbic tiếp tục tăng trên 1 mg/ml, khả năng bắt gốc tự do tương đối ổn định. Cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE cho khả năng bắt gốc tự do thấp hơn so với axit ascorbic. Đối với kỹ thuật UAEE và EAE, khả năng bắt gốc tự do tăng khi nồng độ tương ứng tăng từ 0,2 đến 1 mg/ml, UAEE cho thấy khả năng bắt gốc tự do (42,338%) cao hơn EAE (35,756%) ở cùng nồng độ 1 mg/ml. Khi tiếp tục tăng nồng độ PS, khả năng bắt gốc tự do của cao nấm Linh chi được trích bằng UAEE bắt đầu giảm nhẹ, tuy nhiên vẫn cao hơn so với kỹ thuật EAE. Tương tự, với kỹ thuật HWE và UHWE, cao nấm Linh chi cho khả năng bắt gốc tự do cao nhất, lần lượt là 40,015 và 42,123% ở nồng độ 2 mg/ml.



Hình 2. Khả năng bắt gốc tự do DPPH của axit ascorbic và cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE.

Kết quả có thể giải thích là do khả năng bắt gốc tự do DPPH tương quan với liên kết glucose- (1-6) glycosyl [21]. Liên kết glucose-(1-6) và arabinose-(1-4) được cho là 2 liên kết chủ yếu có khả năng bắt gốc tự do DPPH [22]. Ngoài ra, PS thu được từ UAEE cho nhiều liên kết β-glycoside hơn HWE nên có khả năng bắt gốc tự do tốt hơn [16]. Kết quả nghiên cứu này chứng minh nấm Linh chi được trích ly bằng UAEE có khả năng bắt gốc tự do cao hơn cao nấm giàu PS từ các loài nấm *Auricularia cornea*, *Auricularia auricula* và *Mulberry fungus* thể hiện hoạt tính ôxy hóa tối đa khi nồng độ PS là 1,2 mg/ml có thể bắt 37,8, 40,3 và 31,1% DPPH [23]; *Porphyra haitanensis* với nồng độ PS 2 mg/ml bắt 34,63% DPPH [24].

Khả năng khử Fe^{3+}(PFRAP): Khả năng tạo phức với kim loại là một tính chất quan trọng của chất kháng ôxy hóa vì làm giảm nồng độ của các kim loại chuyển tiếp, đồng thời là xúc tác cho phản ứng tạo gốc tự do trong hệ thống sinh học. Hình 3 thể hiện sự tương quan giữa độ hấp thu của phức sắt (III) ferrocyanide và chất kháng ôxy hóa.

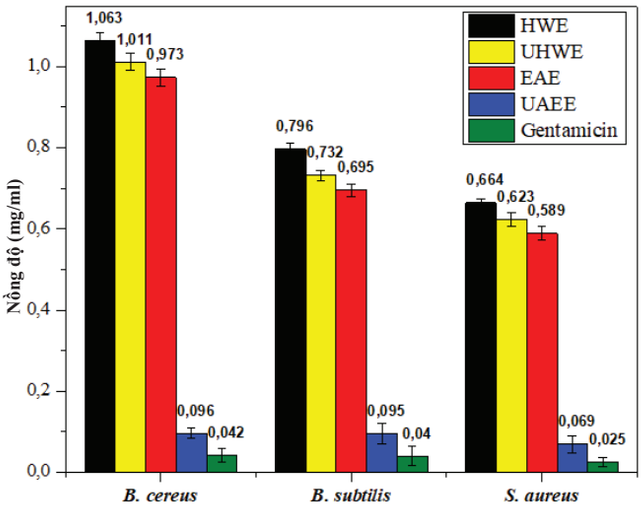


Hình 3. Khả năng khử sắt của axit ascorbic và cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE, UAEE.

Khi so với axit ascorbic, cao nấm Linh chi được trích ly bằng kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE đều cho khả năng khử sắt thấp hơn. Đối với UAEE, khi nồng độ tăng từ 0,2 đến 2,8 mg/ml thì năng lực khử sắt tăng (độ hấp thu tăng từ 0,020 đến 0,232), cao hơn so với EAE (độ hấp thu tăng từ 0,026 đến 0,195). Tương tự, cao nấm Linh chi thu được từ kỹ thuật HWE (độ hấp thu từ 0 đến 0,059) và UHWE (độ hấp thu từ 0 đến 0,065) cho thấy năng lực khử sắt thấp hơn so với UAEE. Kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, cao nấm Linh chi thu được bằng HWE có năng lực khử lần lượt là 0,118, 0,138, 0,101 và 0,007 [25]. Các kết quả này đều thấp hơn so với cao nấm Linh chi được thu bằng kỹ thuật UAEE.

3.3. Hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi từ các kỹ thuật UAEE và HWE thông qua giá trị IC_{50} được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Kết quả thử nghiệm kháng khuẩn của cao nấm Linh chi thu được bằng các kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE.

Cao nấm giàu PS được trích bằng kỹ thuật HWE, UHWE, EAE và UAEE được khảo sát hoạt tính với 3 chủng vi khuẩn kiểm định *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus* được thể hiện ở hình 4. Kết quả cho thấy, cao nấm Linh chi thu được bằng UAEE (IC_{50} trong khoảng 0,069-0,096 mg/ml) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt hơn so với EAE (0,589-0,973 mg/ml), UHWE (0,623-1,011 mg/ml) và HWE (0,664-1,063 mg/ml). Kết quả này có thể giải thích là do cao nấm thu được từ UAEE có các đơn vị glucose và galactose là những yếu tố tương tác với lớp vỏ vi khuẩn, thậm chí kỹ thuật UAEE còn cho thấy sự xuất hiện của PS sunfat, là một chất có khả năng kháng khuẩn cao [26]. Ngoài ra, một trong những cơ chế diệt khuẩn của PS là phá vỡ thành tế bào và màng tế bào chất, dẫn đến giải phóng protein và các phân tử thiết yếu trong tế bào, đồng thời DNA có thể bị phân hủy sau khi PS xâm nhập vào tế bào dẫn đến vi khuẩn không thể phát triển và bị tiêu diệt [27]. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của cao nấm Linh chi trong nghiên cứu này cho thấy hoạt tính tốt hơn đối với hàm lượng PS thu nhận từ *Malva sylvestris* bằng kỹ thuật EAE với enzyme cellulase, trong khoảng nồng độ 3-15 mg/ml đối với chủng vi khuẩn *B. cereus* và *S. aureus* [28].

4. Kết luận

Hàm lượng PS trong nấm Linh chi chịu ảnh hưởng bởi các kỹ thuật trích ly khác nhau. Kết quả của nghiên cứu cho thấy, hàm lượng PS cao nhất (3,721±0,134%) thu được bằng phương pháp UAEE. Bên cạnh đó, kỹ thuật UAEE cũng thể

hiện khả năng kháng ôxy hóa cao hơn so với các kỹ thuật khác thông qua phương pháp thử nghiệm khả năng bắt gốc tự do DPPH và năng lực khử sắt. Ngoài ra, cao nấm Linh chi còn thể hiện khả năng kháng khuẩn cao với 3 chủng vi khuẩn *B. cereus*, *B. subtilis* và *S. aureus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số B2019-20-02. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J. Li, F. Gu, C. Cai, et al. (2020), "Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *International Journal of Biological Macromolecules*, **143**, pp.806-813, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.141.

[2] J. Lu, R. He, P. Sun, et al. (2020), "Molecular mechanisms of bioactive polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a review", *International Journal of Biological Macromolecules*, **150**, pp.765-774, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.035.

[3] M.F. Ahmad (2020), "*Ganoderma lucidum*: A rational pharmacological approach to surmount the cancer", *Journal of Ethnopharmacology*, **260**, DOI: 10.1016/j.jep.2020.113047.

[4] K.S. Gill, Navgeet, S. Kumar (2017), "*Ganoderma lucidum* targeting lung cancer signaling: A review", *Tumor Biology*, **39(6)**, DOI: 10.1177/1010428317707437.

[5] D.P. Fulzele, R.K. Satdive (2005), "Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*", *Journal of Chromatography A*, **1063(1-2)**, pp.9-13, DOI: 10.1016/j.chroma.2004.11.020.

[6] G. Zengin, A. Cvetanović, U. Gašić, et al. (2020), "Modern and traditional extraction techniques affect chemical composition and bioactivity of *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip", *Industrial Crops and Products*, **146**, DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112202.

[7] C. Cai, Y. Wang, W. Yu, et al. (2020), "Temperature-responsive deep eutectic solvents as green and recyclable media for the efficient extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*", *Journal of Cleaner Production*, **274**, DOI: 10.1016/j.jclepro.2020.123047.

[8] M. Barriada-Pereira, E. Concha-Graña, M.J. González-Castro, et al. (2003), "Microwave-assisted extraction versus Soxhlet extraction in the analysis of 21 organochlorine pesticides in plants", *Journal of Chromatography A*, **1008(1)**, pp.115-122, DOI: 10.1016/S0021-9673(03)01061-6.

[9] Z. Liang, P. Zhang, Z. Fang (2022), "Modern technologies for extraction of aroma compounds from fruit peels: A review", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **62**, pp.1284-1307, DOI: 10.1080/10408398.2020.1840333.

[10] S.S. Nadar, P. Rao, V.K. Rathod (2018), "Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review", *Food Research International*, **108**, pp.309-330, DOI: 10.1016/j.foodres.2018.03.006.

[11] W. Tchabo, Y. Ma, F.N. Engmann, et al. (2015), "Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology", *Industrial Crops and Products*, **63**, pp.214-225, DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.09.053.

[12] S. Zheng, W. Zhang, S. Liu (2020) "Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides and triterpenoids from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* and evaluation of their *in vitro* antioxidant capacities", *PLOS ONE*, **15(12)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0244749.

[13] D.T. Do, D.H. Lam, T. Nguyen, et al. (2021), "Utilization of response surface methodology in optimization of polysaccharides extraction from Vietnamese red *Ganoderma lucidum* by ultrasound-assisted enzymatic method and examination of bioactivities of the extract", *The Scientific World Journal*, **2021**, DOI: 10.1155/2021/7594092.

[14] A. Tanriseven, Y. Aslan (2005) "Immobilization of pectinex ultra SP-L to produce fructooligosaccharides", *Enzyme and Microbial Technology*, **36(4)**, pp.550-554, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.12.001.

[15] H. Zhang, L. Han, H. Dong (2021), "An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies", *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **140**, DOI: 10.1016/j.rser.2021.110758.

[16] T.Q. Hoa, T.T.P. Mai, H.M. Nam, et al. (2018), "Extraction of polysaccharides from lingzhi by ultrasonic-assisted enzymatic method", *Vietnam Journal of Science and Technology*, **56(4A)**, pp.171-181.

[17] S.S. Nielsen (2017), "Total carbohydrate by phenol-sulfuric acid method", *Food Analysis Laboratory Manual*, Springer, 3rd ed., pp.137-141.

[18] D.D. Chen, L. Shi, S.N. Yue, et al. (2019), "The Slt2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*", *Fungal Genetics and Biology*, **123**, pp.70-77, DOI: 10.1016/j.fgb.2018.12.005.

[19] Q.V. Nguyen, J.B. Eun (2011), "Antioxidant activity of solvent extracts from Vietnamese medicinal plants", *Journal of Medicinal Plants Research*, **5(13)**, pp.2798-2811.

[20] C. Cai, J. Ma, C. Han, et al. (2019) "Extraction and antioxidant activity of total triterpenoids in the mycelium of medicinal fungus, *Sanghuangporus sanghuang*", *Scientific Reports*, **9(1)**, pp.1-10, DOI: 10.1038/s41598-019-43886-0.

[21] T. Lo, C.A. Chang, K.H. Chiu, et al. (2011), "Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods", *Carbohydrate Polymers*, **86(1)**, pp.320-327, DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.04.056

[22] Y. Nie, H. Jiang, Y. Su, et al. (2012), "Purification, composition analysis and antioxidant activity of different polysaccharides from the fruiting bodies of *Pholiota adiposa*", *African Journal of Biotechnology*, **11(65)**, pp.12885-12894, DOI: 10.5897/AJB11.3117.

[23] Y. Su, L. Li (2020), "Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from four auriculariales", *Carbohydrate Polymers*, **229**, DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115407.

[24] B.M. Khan, H.M. Qiu, S.Y. Xu, et al. (2020), "Physicochemical characterization and antioxidant activity of sulphated polysaccharides derived from *Porphyra haitanensis*", *International Journal of Biological Macromolecules*, **145**, pp.1155-1161, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.040.

[25] Y. Kan, T. Chen, Y. Wu, et al. (2015), "Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology", *International Journal of Biological Macromolecules*, **72**, pp.151-157, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.056.

[26] P. Vijayabaskar, N. Vaseela, G. Thirumaran (2012), "Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*", *Chinese Journal of Natural Medicines*, **10(6)**, pp.421-428, DOI: 10.1016/S1875-5364(12)60082-X.

[27] F. He, Y. Yang, G. Yang, et al. (2010), "Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03", *Food Control*, **21(9)**, pp.1257-1262, DOI: 10.1016/j.foodcont.2010.02.013.

[28] H. Rostami, S. Gharibzahedi (2017), "Cellulase-assisted extraction of polysaccharides from *Malva sylvestris*: Process optimization and potential functionalities", *International Journal of Biological Macromolecules*, **101**, pp.196-206, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.078.

DOI: 10.31276/VJST.64(11).38-43

Tổng hợp và thử hoạt tính *in vitro* kháng nấm, kháng khuẩn của hợp chất đồng (II) xitrat, định hướng làm chế phẩm phòng bệnh trên cây trồng

Lê Thế Tâm[1], Nguyễn Hoa Du[1], Bùi Thu Trang[2], Hoàng Đức Nghĩa[2, 3], Hồ Đình Quang[1], Trần Quang Đệ[4], Lê Đăng Quang[3, 5*]

[1]*Trường Đại học Vinh, 182 Lê Duẩn, phường Bến Thủy, TP Vinh, tỉnh Nghệ An, Việt Nam*

[2]*Khoa Công nghệ Hóa, Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội, 298 Cầu Diễn, phường Cầu Diễn, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam*

[3]*Viện Kỹ thuật Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

[4]*Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ, khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam*

[5]*Học 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 25/11/2021; ngày chuyển phản biện 1/12/2021; ngày nhận phản biện 27/12/2021; ngày chấp nhận đăng 30/12/2021

Tóm tắt:

Trong bài báo này, đồng (II) xitrat $Cu_3(C_6H_5O_7)_2$ đã được tổng hợp thành công trong dung môi nước. Các yếu tố cho quá trình tổng hợp là nhiệt độ và tỷ lệ mol của các chất phản ứng đã được nghiên cứu. Đặc điểm cấu trúc, tính chất, thành phần của các nguyên tố được khảo sát và đánh giá bằng mẫu nhiễu xạ tia X (XRD), quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), kính hiển vi điện tử quét (SEM), kết hợp đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX) và phổ hấp thụ phân tử UV-Vis. Hiệu suất của đồng (II) xitrat trong phản ứng là 82,46% với tỷ lệ số mol của $CuSO_4/C_6H_5Na_3O_7$ là 1,5/1 tại 70°C. Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy, hợp chất đồng (II) xitrat tại nồng độ 1000 ppm ức chế sự phát triển của sợi nấm *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* với hiệu lực 19-53% sau 2 ngày nuôi cấy. Bên cạnh đó, hợp chất này còn ức chế mạnh các mầm bệnh vi khuẩn thực vật như *Xanthomonas axonopodis* (gây bệnh thối nhũn trên cây có múi), *Ralstonia solanacearum* (gây bệnh héo cà chua) và *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (gây bệnh héo xanh và thối nhũn trên cà chua). Những kết quả này cho thấy, đồng (II) xitrat có thể được sử dụng như một loại thuốc diệt nấm/diệt khuẩn có triển vọng để kiểm soát các bệnh do nấm và vi khuẩn trên cây có múi và cà chua.

Từ khóa: **cây có múi, đồng cacboxylat, đồng (II) xitrat, thuốc diệt khuẩn, thuốc diệt nấm.**

Chỉ số phân loại: **2.4**

1. Mở đầu

Thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) đóng vai trò quan trọng trong việc ngăn chặn, khống chế sự phát sinh, phát triển của các đối tượng gây hại, góp phần tăng năng suất và chất lượng nông sản. Tuy nhiên, lượng thuốc BVTV hóa học dư thừa trong quá trình canh tác chính là nguyên nhân gây ra nhiều tác hại nghiêm trọng khác như: ô nhiễm môi trường đất, đặc biệt là môi trường nước do sự rửa trôi. Dư lượng của thuốc BVTV còn gây độc cho người và gia súc, ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe người tiêu dùng. Tác động tiêu cực của thuốc BVTV càng trở nên nghiêm trọng khi con người sử dụng không đúng cách và quá lạm dụng. Điều này không chỉ làm suy giảm tính đa dạng sinh học, gây tổn hại đến quần thể thiên địch mà còn làm phát sinh tính kháng thuốc của sinh vật hại, tăng chi phí phòng trừ, gây ảnh hưởng lớn đến con người và môi trường. Chính vì thế, tìm kiếm một loại thuốc BVTV hiệu quả và an toàn hơn cho người và môi trường sinh thái là vấn đề hết sức cấp thiết nhằm xây dựng nền nông nghiệp bền vững.

Ở nước ta cũng như trên thế giới, thuốc trừ bệnh gốc đồng đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp, với phổ tác dụng rộng, có thể phòng trừ được nhiều loại cây trồng khác nhau [1-5]. Cơ chế tác động của thuốc gốc đồng là khả năng xâm nhập vào tế bào vi sinh vật, ức chế các phản ứng sinh học trong tế bào, làm chết vi sinh vật [6, 7]. Hiện nay, thuốc BVTV hoạt chất gốc đồng chủ yếu là các hợp chất vô cơ, đã được đăng ký sử dụng trên nhiều loại cây trồng [1, 2, 6], chủ yếu gồm 4 nhóm chính: (i) Copper Oxychloride (một số sản phẩm: COC 85WP, đồng cloruloxi 30WP, Epolists 85WP, Vidoc 30WP, 50SC, 80WP…); (ii) Copper hydroxide (Map - Jaho 77WP, Champion 37.5FL, 57.6DP, 77WP, Ajily 77WP, Funguran - OH 50WP…); (iii) Copper sulfate (Tribasic) (đồng Hocmon 24,5% crystal, BordoCop Super 12,5WP, 25WP, Cuproxat 345SC...); và (iv) Copper sulfate nguyên chất hay Sulfat đồng (thuốc Boóc-đô là $Ca(OH)_2$ và $CuSO_4$). Tuy nhiên, các thuốc BVTV chứa hoạt chất gốc đồng hiện nay hầu hết là các loại hợp chất vô cơ, thuộc nhóm độc II, một số thuốc nhóm này chậm phân huỷ trong môi trường; tương đối độc, đặc biệt dễ bị rửa trôi sau khi phun nên liều lượng dùng lớn [1, 7]. Trong xu thế hướng tới nền nông nghiệp hữu cơ, nông nghiệp bền vững, một số nước phát triển ở châu Âu sẽ cấm các thuốc vô cơ gốc đồng và thay thế bằng các thuốc gốc đồng dạng hữu cơ [8, 9]. Ở Việt Nam các chế phẩm BVTV dạng đồng hữu cơ phòng trừ một số bệnh trên cây trồng hầu như là chưa có và chưa được đề cập tới.

*Tác giả liên hệ: Email: ledangquang2011@gmail.com

Synthesis of copper (II) citrate and evaluation of its *in vitro* antifungal and antibacterial activities, and the suitability of using this chemical as a plant protection agent

The Tam Le[1], Hoa Du Nguyen[1], Thu Trang Bui[2], Duc Nghia Hoang[2, 3], Dinh Quang Ho[1], Quang De Tran[4], Dang Quang Le[3, 5*]

[1]Vinh University, 182 Le Duan Street, Ben Thuy Ward, Vinh City, Nghe An Province, Vietnam
[2]Faculty of Chemical Technology, Hanoi University of Industry, 298 Cau Dien Street, Cau Dien Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam
[3]Institute for Tropical Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam
[4]College of Natural Sciences, Can Tho University, Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam
[5]Graduate 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 25 November 2021; revised 27 December 2021; accepted 30 December 2021

Abstract:

In this paper, copper (II) citrate $Cu_3(C_6H_5O_7)_2$ was successfully synthesised in an aqueous solution. The factors for the synthesis process such as temperature and molar ratio of the reactants were investigated. The structural, properties and composition characteristics of the elements were investigated and evaluated by X-ray diffraction pattern (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), and UV-Vis spectroscopy. The yield of the copper (II) citrate in the reaction was 82.46% at the molar ratio of the $CuSO_4/C_6H_5Na_3O_7$ of 1.5/1 at 70°C. The *in vitro* results showed that copper (II) citrate at a concentration of 1,000 ppm inhibits the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium oxysporum* with control values ranging from 19 to 53% after 2 days of incubation. Besides, it strongly suppressed the plant bacterial pathogens *Xanthomonas axonopodis* (bacterial strain causing citrus canker), *Ralstonia solanacearum* (bacterial wilt of tomato), and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cause of bacterial wilt and canker of tomato). These results suggested that copper (II) citrate can be used as a promising fungicide/bactericide to control fungal and bacterial diseases on citrus and tomato plants.

Keywords: **bactericide, citrus, copper carboxylate, copper (II) citrate, fungicide.**

Classification number: **2.4**

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phản ứng trao đổi ion để tổng hợp muối đồng (II) xitrat. Bằng cách thay đổi nhiệt độ và tỷ lệ phản ứng của các chất tham gia phản ứng đã tìm ra điều kiện tối ưu để đạt hiệu quả tổng hợp cao nhất. Hoạt tính kháng nấm và kháng khuẩn trên một số nấm và vi khuẩn đã được nghiên cứu để đánh giá hoạt lực của nó.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

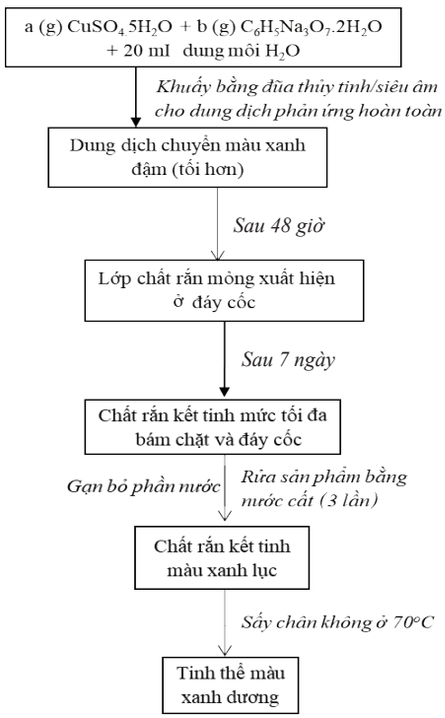
2.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong thí nghiệm để tổng hợp muối đồng (II) xitrat của Hãng Sigma-Aldrich bao gồm: đồng sunfat pentahydrat ($CuSO_4.5H_2O$, 99%, trinatri xitrat dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$, 95%). Nước khử ion đã được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm.

2.2. Tổng hợp đồng (II) xitrat $Cu_3(C_6H_5O_7)_2$

$Cu_3(C_6H_5O_7)_2$ được tổng hợp bằng phương pháp trao đổi ion giữa đồng (II) sunfat pentahydrat và natri xitrat (hình 1).

$$3CuSO_4(aq) + 2Na_3(C_6H_5O_7)(aq) \rightarrow Cu_3(C_6H_5O_7)_2(s) + 3Na_2SO_4(aq)$$



Hình 1. Quy trình tổng hợp và tinh chế đồng (II) xitrat.

Trong nghiên cứu này, yếu tố nhiệt độ và tỷ lệ mol của các tiền chất đã được nghiên cứu. Cụ thể, nhiệt độ phản ứng được khảo sát ở 50, 70 và 90°C với ký hiệu mẫu tương ứng là TN1, TN2 và TN3, trong khi đó các tiền chất được dùng với các tỷ lệ mol tương ứng ở bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ mol các tiền chất tham gia phản ứng.

Ký hiệu mẫu	$CuSO_4$ (mmol)	$C_6H_5Na_3O_7$ (mmol)	$CuSO_4/C_6H_5Na_3O_7$
TN-1/1	9	9	1/1
TN-1,5/1	9	6	1,5/1
TN-1,25/1	13,5	6	2,25/1

2.3. Phương pháp phân tích đặc trưng cấu trúc và thành phần

Hợp chất đồng (II) xitrat sau khi tổng hợp được phân tích đặc trưng cấu trúc bằng phép đo phổ hồng ngoại FT-IR trên thiết bị Nicolet iS10 (Thermo Scientific - Mỹ), phổ UV-Vis của các mẫu được ghi trên máy quang phổ Libra S80 Libra (Biochrom - Anh). Hình thái và thành phần nguyên tố trong sản phẩm được xác định bằng phương pháp hiển vi điện tử quét (SEM) và đầu dò tán xạ năng lượng tia X (EDX, Oxford Instruments - Anh) trên thiết bị JSM-6510LV (Jeol - Nhật Bản).

2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

Hoạt tính kháng nấm: Phương pháp kiểm tra khả năng ức chế mycelia được sử dụng trong nghiên cứu với các chủng nấm *Sclerotium rolfsii* (SR-BV) gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng và *Fusarium oxysporum* (FOAH) gây bệnh héo vàng, héo rũ, chết vàng, thối khô củ. Hoạt tính kháng nấm được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA tại pH 6,8-7,0.

Nấm được phân lập và làm thuần, dùng dụng cụ đục lỗ có đường kính 4 mm tiến hành đục vành ngoài đường kính tán nấm sau đó đặt lên môi trường PDA đã trộn với mẫu thử. Mẫu thử hợp chất đồng (II) xitrat hòa tan bằng Tween 80 với nồng độ 0,05% và dimethyl sulfoxide (DMSO) 2% ở các nồng khác nhau (1000 và 500 ppm), sau đó trộn vào môi trường PDA nóng chảy ở 50°C đã khử trùng và để nguội. Mỗi nồng độ khác nhau được thử lặp lại 3 lần. Theo dõi sự phát triển của nấm và xác định tính hiệu lực của từng loại dựa vào việc đo đường kính tản nấm sau các thời gian khác nhau tùy theo từng loại nấm. Hiệu quả ức chế được tính theo công thức sau [10]:

$$\text{Hiệu quả ức chế} = \frac{ĐK_{\text{đối chứng}} - ĐK_{\text{mẫu}}}{(ĐK_{\text{đối chứng}} - 4)} \times 100\%$$

trong đó: ĐK là đường kính.

Hoạt tính kháng khuẩn: Vi khuẩn *X. axopopdis* sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ quả cam bị bệnh loét trên giống cam Vinh trồng ở Nghệ An. Ngoài ra, còn có các vi khuẩn *R. solanacearum* và *C. michiganensis* gây bệnh cây trồng khác.

Hoạt tính kháng vi khuẩn được thử trong môi trường Tryptic soy agar (TSA), Tryptic soy broth (TSB) pH 6,8-7,0. Vi khuẩn được hoạt hóa lại trên môi trường TSA trong 24 giờ để quan sát khuẩn lạc nhằm phát hiện tạp nhiễm trong quá trình giữ giống và nuôi cấy. Lấy một khuẩn lạc cấy chuyển sang các bình TSB nuôi lắc ở nhiệt độ 37°C cho đến khi đạt giá trị OD=0,5. Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn bằng vòng vô khuẩn được sử dụng như sau:

- Sử dụng đĩa petri đã chứa 15 ml môi trường TSA vô trùng đã khô ổn định. Lấy 1 ml dịch vi khuẩn có giá trị OD=0,5 tráng đều lên bề mặt môi trường, để yên khoảng 1-2 giờ cho dịch vi khuẩn được ổn định trên bề mặt. Mỗi đĩa petri được đục 5 lỗ thạch, trong đó gồm: 4 lỗ thạch chứa 35 µl dịch chứa chất pha ở nồng độ 1.000 ppm trong dung môi DMSO. Đối với mỗi một lỗ thạch đối chứng chứa 35 µl dung dịch DMSO vô trùng.

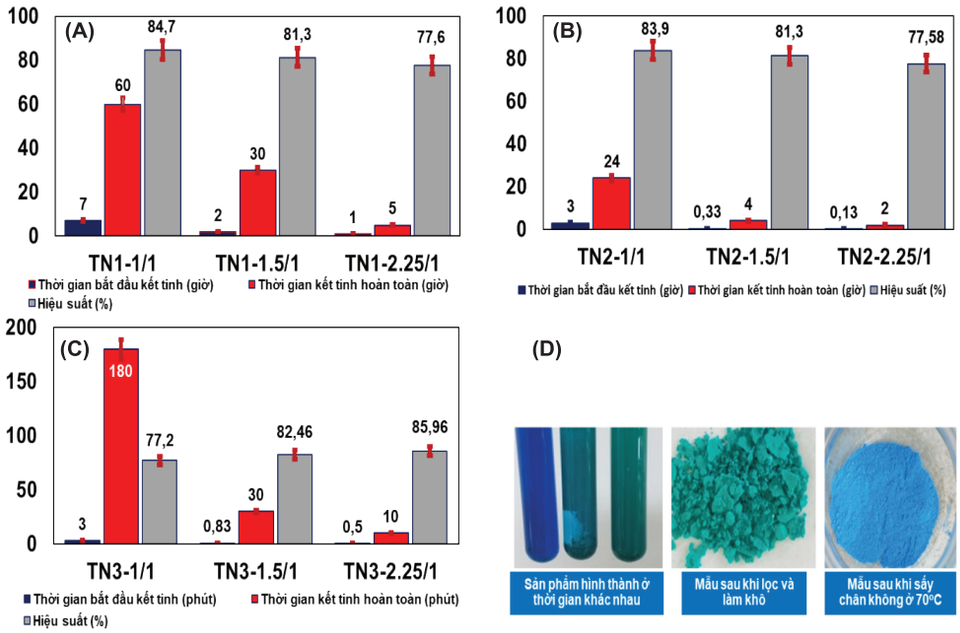
- Các đĩa được ủ ở 37°C trong vòng 24-36 giờ. Đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo đơn vị mm.

3. Kết quả và bàn luận

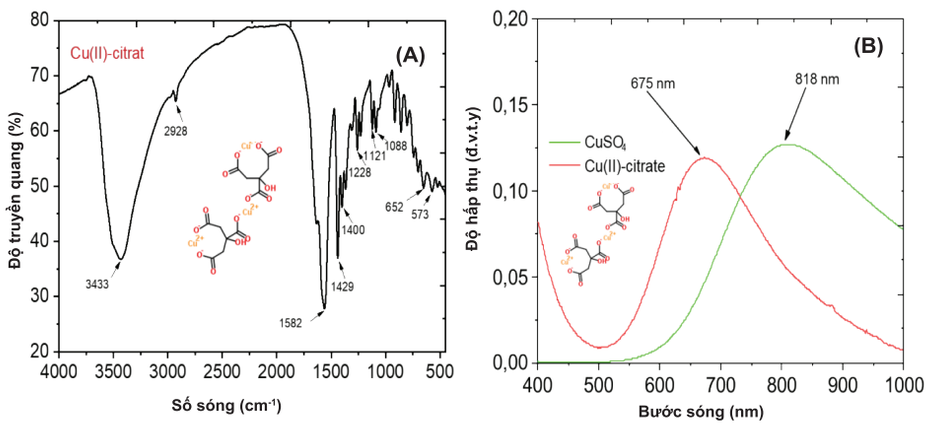
3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiền chất và nhiệt độ đến tốc độ và hiệu suất phản ứng

Khảo sát sơ bộ cho thấy phản ứng xảy ra chậm, sự tạo thành tinh thể sản phẩm diễn ra trong thời gian dài. Trong các thí nghiệm tiếp theo, phản ứng sẽ được tiến hành ở khoảng nhiệt độ 50, 70 và 90°C, tỷ lệ mol các tiền chất Cu(II)/xitrat là 1/1, 1,5/1 và 2,25/1. Trong phản ứng tương tác với kim loại, phối tử xitrat có khả năng thể hiện các dung lượng phối trí khác nhau, có thể tạo cầu nối để tạo thành phức đa nhân. Mặt khác, dư đồng là điều không mong muốn, ngoài ảnh hưởng xấu đến môi trường và cây trồng thì có thể tạo ra sản phẩm kết tủa đồng dạng bazơ cacbonat, xitrat không mong muốn. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng chọn các điểm thực nghiệm với tỷ lệ tiền chất khác nhau, xung quanh tỷ lệ ứng với hệ số của phản ứng thế phối tử (1) ở trên, trong đó tỷ lệ tiền chất Cu(II)/xitrat (9:4) là lớn nhất. Ở nhiệt độ 50°C với tỷ lệ mol các tiền chất 1/1 thì sau khi phối trộn hai dung dịch, hỗn hợp dung dịch chuyển màu sang xanh tối nhanh hơn so với ở nhiệt độ phòng, tuy nhiên kết tủa chỉ bắt đầu hình thành sau 7 giờ. Sau 60 giờ lượng chất rắn kết tinh đạt mức tối đa, dung dịch nhạt màu. Tiến hành rửa mẫu thu được sản phẩm tinh thể màu xanh lục, ít tan trong nước. Sản phẩm tiếp tục được lọc chân không và sấy khô ở 40°C thu được tinh thể muối đồng (II) xitrat ở dạng ngậm nước có màu xanh lá. Tiếp tục sấy khô trong điều kiện chân không ở 70°C tinh thể đồng (II) xitrat mất nước thành những tinh thể đồng (II) xitrat khan có màu xanh nước biển (hình 2D). Khi tăng tỷ lệ mol phản ứng lên 1,5/1 và 2,25/1 thì thời gian bắt đầu kết tinh và thời gian kết tinh hoàn toàn được rút ngắn hơn đáng kể (hình 2A).

Tổng hợp mẫu tại nhiệt độ 70°C và giữ nguyên tỷ lệ mol chất tham gia của các tiền chất phản ứng cho thấy, khi tăng nhiệt độ và tỷ lệ Cu^{2+} thì sản phẩm càng nhanh chóng kết tinh (hình 2B). Tương tự, khi tiến hành ở nhiệt độ 90°C, ngay sau khi phối trộn xuất hiện chất rắn kết tinh ngay lập tức ở đáy cốc, đồng thời dung dịch bắt đầu nhạt màu. Sau 30 phút lượng chất rắn kết tinh đạt mức tối đa dung dịch nhạt màu gần như trong suốt. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình tạo sản phẩm có thể được giải thích là do phản ứng giữa đồng (II) và phối tử tạo muối đồng (II) xitrat $Cu_3(C_6H_5O_7)_2$ về bản chất là phản ứng thế phối tử, trong đó có sự khép vòng chelat tạo ra sản phẩm kết tinh với kiểu phối trí cầu nối bidentat [11, 12], phù hợp với kết quả thu được từ phổ hồng ngoại FTIR. Qúa trình khép vòng tạo sản phẩm kết tinh chậm về mặt động học phản ứng. Do đó, nhiệt độ đóng vai trò quan trọng để tăng tốc độ phản ứng cho sự khép vòng chelat.



Hình 2. Đồ thị ảnh hưởng nhiệt độ và tỷ lệ mol tiền chất đến tốc độ và hiệu suất phản ứng tổng hợp muối đồng (II) xitrat (A-C) và hình ảnh sản phẩm thu được ở các giai đoạn (D).



Hình 3. Phổ FTIR đồng (II) xitrat (A) và phổ UV-Vis của dung dịch của muối CuSO4 và đồng (II) xitrat (B).

Xác định hiệu suất của phản ứng ở các điều kiện cho thấy hiệu suất của các phản ứng đạt 77,58-85,96% (hình 2A-C). Việc thay đổi tỷ lệ các chất tham gia phản ứng cũng như nhiệt độ của phản ứng không ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất. Tỷ lệ Cu^{2+} và nhiệt độ càng cao thì thời gian kết tinh của sản phẩm càng ngắn hay muối đồng (II) xitrat nhanh kết tinh hơn. Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đưa ra điều kiện tối ưu để tổng hợp muối đồng (II) xitrat là ở 70°C và tỷ lệ mol phản ứng là 1,5/1, sản phẩm thu được sẽ được phân tích đặc trưng cấu trúc, thành phần và tính chất của vật liệu.

3.2. Đặc trưng cấu trúc và thành phần hợp chất

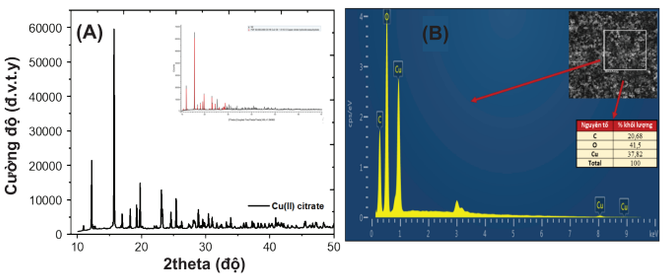
Sản phẩm tinh thể thu được sau khi kết tinh hoàn toàn có màu xanh lục, ít tan trong nước, sấy chân không ở 40°C thu được tinh thể ở dạng ngậm nước có màu xanh lá. Tiếp tục sấy chân không ở 70°C tinh thể đồng (II) xitrat mất nước thành những tinh thể đồng (II) xitrat khan có màu xanh nước biển (hình 2D).

Hình 3A chỉ ra phổ hồng ngoại của mẫu muối đồng (II) xitrat tổng hợp tại điều kiện tỷ lệ mol 1,5/1. Kết quả cho thấy, phổ hồng ngoại có các dải hấp thụ đặc trưng của các dao động hóa trị của các nhóm: -OH ở 3433,76 cm^{-1}, nhóm ete -O- ở 1088,04 cm^{-1}, C=O ở 1582,09 cm^{-1}. Một đỉnh ở 1690,08 cm^{-1} đã được quan sát trên phổ IR của chất tạo thành được gán cho dao động hóa trị của carboxylate (COO^-) trong natri xitrat. Các dao động hóa trị không đối xứng và đối xứng của các nhóm carboxylate ($v_{COO,\ as}$ và $v_{COO,\ s}$) lần lượt xuất hiện ở 1582 và 1429 cm^{-1}.

Một số nghiên cứu cho thấy, các vị trí của dao động hóa trị không đối xứng (v_{as}) và đối xứng (v_s) của các nhóm carboxylat ($\Delta v_{COO} = v_{COO,\ as} - v_{COO,\ s}$) có thể được sử

dụng để phân biệt kiểu cấu trúc phức carboxylat-kim loại đồng (II) [12, 13]. Giá trị của Δv_{COO} trong phạm vi 150-180 cm^{-1} tương ứng với một cầu phối trí bidentat Cu(II), trong khi Δv_{COO}>200 cm^{-1} được cho là các phức chất với nhóm carboxylic monodentat. Trong phổ IR ở hình 3A, $v_{COO, as}$=1582 cm^{-1} trong khi $v_{COO, s}$=1429 cm^{-1}, cho giá trị của Δv_{COO}=153 cm^{-1}. Giá trị này tương ứng với kiểu phối trí cầu nối bidentat trong muối đồng (II) xitrat.

Những số liệu phổ IR nêu trên chứng tỏ sản phẩm đồng (II) xitrat đã được tạo thành, phù hợp với xác nhận từ phổ hấp thụ UV-Vis. Từ hình 3B cho thấy, đỉnh hấp thụ cực đại đã có sự dịch chuyển từ bước sóng 818 nm đối với dung dịch muối đồng vô cơ về 675 nm đối với dung dịch đồng xitrat, ứng với bước chuyển d-d từ $^2E_g \rightarrow {}^2T_{2g}$, tương ứng với sự dịch chuyển màu xanh lam về dung dịch màu xanh lục do sự tương tác của nhóm xitrat với ion Cu^{2+} [14-16].



Hình 4. Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu đại diện TN2-1,5/1 (A) và phổ EDX tại vùng lựa chọn (B).

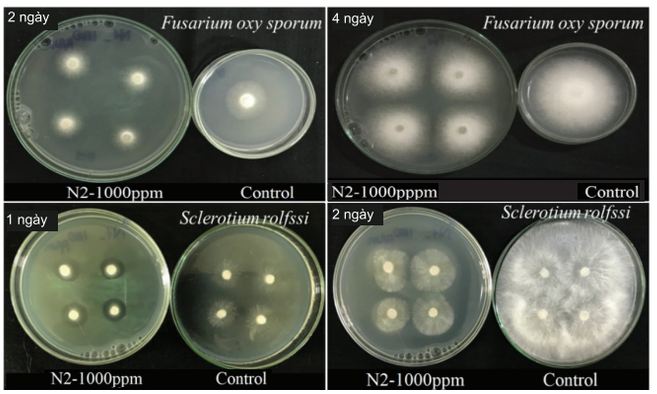
Nhiễu xạ tia X được thực hiện với mẫu đồng (II) xitrat sau khi tổng hợp được để so sánh với cơ sở dữ liệu cấu trúc chuẩn của hợp chất. Hình 4A là giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu nghiên cứu và dữ liệu cấu trúc chuẩn (hình nhỏ). Kết quả cho thấy, có sự tương đồng về cấu trúc của hợp chất khảo sát với phổ chuẩn của copper (II) xitrat hydroxide sesquihydrate. Dạng tinh thể của hợp chất tổng hợp được là tinh thể đơn tà (monoclinic) [17]. Như vậy, có thể khẳng định rằng hợp chất đồng (II) xitrat đã được tổng hợp thành công. Phân tích phổ EDX đã được thực hiện để xác định sự phân bố của các nguyên tố trên bề mặt của mẫu phức. Hình 4B là phổ EDX của mẫu đại diện TN2-1,5/1, cho thấy cacbon, ôxy và đồng chiếm thành phần chủ yếu trong vật liệu, trong đó 2 nguyên tử cacbon và ôxy là thành phần chính của gốc muối hữu cơ xitrat. Sự có mặt của nguyên tử đồng với hàm lượng cao cho thấy phản ứng trao đổi đã xảy ra, hợp chất đồng đã được tạo thành. Kết quả này phù hợp với phần trăm khối lượng các nguyên tố trong công thức muối thu được.

3.3. Thử hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn

Hoạt tính kháng nấm: Đồng (II) xitrat thể hiện khả năng ức chế đối với cả 2 chủng nấm *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* tại nồng độ 1.000 ppm. Đây là 2 loại nấm khó bị ức chế, vì vậy khả năng phòng trừ trên thực tế tốn nhiều công sức và các loại thuốc mạnh để kiểm soát bệnh trên cây. Sau thời gian nuôi cấy 1-2 ngày đối với nấm *Sclerotium rolfsii* đồng (II) xitrat ức chế lần lượt 58 và 53% ở ngày 1 và 2, đây cũng là hiệu lực mạnh nhất được quan sát khi so sánh giữa 2 nấm (bảng 2 và hình 5). Qua thí nghiệm *in vitro*, nấm *Fusarium oxysporum* có đề kháng tốt hơn với đồng (II) xitrat, hiệu lực kháng nấm giảm mạnh còn 9% sau 4 ngày nuôi cấy. Hiện tượng giảm hiệu lực theo thời gian cho thấy khả năng kháng lại hoạt chất thử nghiệm của nấm này.

Bảng 2. Hoạt tính kháng nấm *Sclerotium rolfsii* và *Fusarium oxysporum* của đồng (II) xitrat: nuôi cấy 1, 2 và 4 ngày.

Tên chất	Hiệu quả ức chế ở nồng độ 1000 ppm (%)			
	S. rolfsii		*F. oxysporum*	
	1 ngày	*2 ngày*	*2 ngày*	*4 ngày*
Đồng (II) xitrat (%)	58	53	19	9

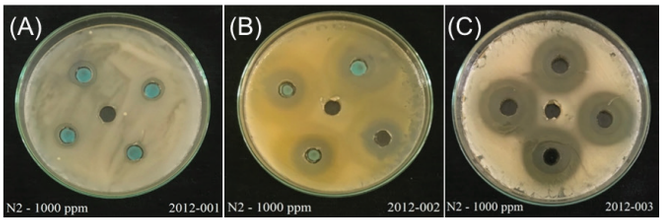


Hình 5. Khả năng ức chế của đồng (II) xitrat đối với *Sclerotium rolfsii và Fusarium oxysporum* tại thời điểm 1, 2 và 4 ngày nuôi cấy.

Hoạt tính kháng khuẩn gây bệnh hại cây trồng: Các hợp chất chứa đồng (II) được biết tới có khả năng ức chế và gây độc với tế bào vi khuẩn do tương tác tĩnh điện của ion Cu^{2+} trên bề mặt tế bào tích điện tích (-) từ nhóm carboxylic của các lớp lipoprotein trên bề mặt vi khuẩn và của lớp peptidoglycans trong thành tế bào. Trong tế bào, Cu^{2+} bị khử thành Cu^{+} gây độc với tế bào bằng cách liên kết với các enzyme chứa các nhóm sulhydryl, hydroxyl, amino và carboxyl thành các phức và làm bất hoạt các enzyme này trong quá trình trao đổi chất trong tế bào dẫn đến gây chết tế bào vi sinh vật. Ngoài ra, Cu^{+} cũng làm tế bào vi khuẩn sinh ra các gốc tự do bên trong tế bào dẫn tới gây chết tế bào. Trong nghiên cứu này, các quan sát từ kết quả thử nghiệm với vi khuẩn trên đĩa thạch cho thấy, đồng (II) xitrat có hoạt tính kháng lại cả 3 loại vi khuẩn *X. axonopodis*, *Ralstonia solanacearum* và *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* với hoạt lực khá mạnh tại 1000 ppm. *X. axonopodis* và *Clavibacter. michiganensis* subsp. *michiganensis* là các vi khuẩn gram dương, do vậy khả năng kháng vi khuẩn mạnh nhất là với vi khuẩn *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, với đường kính kháng khuẩn lên tới 20 mm (bảng 3 và hình 6).

Bảng 3. Khả năng ức chế của đồng (II) xitrat đối với các vi khuẩn *X. axopopdis*, *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (quan sát vòng vô khuẩn sau 1 ngày nuôi cấy).

Loại vi khuẩn	Nồng độ mg/ml	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)
X. axonopodis	1	7
R. solanacearum	1	15
C. michiganensis subsp. *michiganensis*	1	20



Hình 6. Vòng kháng khuẩn với vi khuẩn *X. axonopodis* (A), *R. solanacearum* (B) và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (C).

Hoạt tính kháng nấm và vi khuẩn của đồng (II) xitrat quan sát được khá ấn tượng do phổ tác dụng rộng của chất. Đặc biệt, mẫu chất có tác động mạnh lên các vi khuẩn gây bệnh cây như *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; đây là những loại vi khuẩn gây bệnh héo xanh và thối loét quả rất khó chữa trên cây cà chua.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, phản ứng tổng hợp đồng (II) xitrat từ các chất đầu đồng (II) sulfate và natri xitrat ở điều kiện tối ưu với nhiệt độ 70°C và tỷ lệ mol 1,5/1 thu được sản phẩm $Cu_3(C_6H_5O_7)_2$ với hiệu suất phản ứng đạt 81,3%. Sử dụng các phương pháp phân tích xác định được hợp chất tạo thành là hợp chất đồng (II) xitrat. Kết quả thử hoạt tính sinh học cho thấy, đồng (II) xitrat có hoạt tính ức chế đối với cả 2 chủng nấm *Sclerotium rolfsii* (SR-BV) gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng và *Fusarium oxysporum* (FOAH) gây bệnh héo vàng, héo rũ, chết vàng, thối khô củ và 3 chủng vi khuẩn: *X. axonopodis*, *R. solanacearum* và *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Với hoạt tính này, có thể nghiên cứu sử dụng đồng (II) xitrat để làm hoạt chất BVTV chống một số bệnh khó chữa trên cây cà chua gây ra do các chủng nấm và vi khuẩn đã khảo sát ở trên.

Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài mã số 01/2020/HĐ-NCKHNA. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Rusjan (2012), "Copper in horticulture", *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, **13**, pp.257-277, DOI: 10.5772/26964.

[2] J.R. Lamichhane, E. Osdaghi, F. Behlau, et al. (2018), "Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture: A review", *Agronomy for Sustainable Development*, **38**, DOI: 10.1007/s13593-018-0503-9.

[3] F. Behlau, A.M. Gochez, J.B. Jones (2020), "Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus", *Tropical Plant Pathology*, **45**, pp.200-212, DOI: 10.1007/s40858-020-00340-1.

[4] F. Behlau, B.I. Canteros, J.B. Jones, et al. (2012), "Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*", *European Journal of Plant* Pathology, **133**, pp.949-963, DOI: 10.1007/s10658-012-9966-8.

[5] P.A. Abbasi, S.E. Khabbaz, B. Weselowski, et al. (2015), "Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario", *Canadian Journal of Microbiology*, **61(10)**, pp.753-761, DOI: 10.1139/cjm-2015-0228.

[6] F.M. Fishel (2017), "Pesticide toxicity profile: Copper-based pesticides: PI-66/PI103, 9/2005", *University of Florida/IFAS Extension*, **2005(11),** DOI: 10.32473/edis-pi103-2005.

[7] V. Husak (2015), "Copper and copper-containing pesticides: Metabolism, toxicity and oxidative stress", *Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University*, **2(1)**, pp.38-50, DOI: 10.15330/jpnu.2.1.38-50.

[8] V. Sinisi, P. Pelagatti, M. Carcelli, et al. (2019), "A green approach to copper-containing pesticides: Antimicrobial and antifungal activity of brochantite supported on lignin for the development of biobased plant protection products", *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **7(3)**, pp.3213-3221, DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b05135.

[9] N. Kaewchangwat, S. Dueansawang, G. Tumcharern, et al. (2017), "Synthesis of copper-chelates derived from amino acids and evaluation of their efficacy as copper source and growth stimulator for *Lactuca sativa* in nutrient solution culture", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **65(45)**, pp.9828-9837, DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03809.

[10] P.T. Hieu, L.D. Quang, T.D. Lam, et al. (2021), "Chemical composition and in vitro antifungal activity against *Colletotrichum* spp. Causes anthracnose disease on turmeric (*Curcuma longa* L.) plants.", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63(6)**, pp.6-10 (in Vietnamese).

[11] RSC Advancing the Chemical Sciences (2021), *Preparation of Copper(II) Citrate*, https://edu.rsc.org/download?ac=12720, accessed 16 August 2021.

[12] A. Doyle, J. Felcman, M.T.D.P. Gambardella, et al. (2000), "Anhydrous copper(II) hexanoate from cuprous and cupric oxides - The crystal and molecular structure of $Cu_2(O_2CC_5H_{11})_4$", *Polyhedron*, **19(26-27)**, pp.2621-2627, DOI: 10.1016/S0277-5387(00)00568-4.

[13] K. Wojciechowski, A. Bitner, G. Bernardinelli, et al. (2009), "Azacrown ether-copper(II)- hexanoate complexes - From monomer to 1-D metal organic polymer", *Dalton Transactions*, **7**, pp.1114-1122, DOI: 10.1039/B811374B.

[14] S.B. Rahardjo, T.E. Saraswati1, A. Masykur, et al. (2018), "Synthesis and characterization of tetrakis(2-amino-3-methylpyridine)copper(II) sulfate tetrahydrate", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **349**, DOI: 10.1088/1757-899X/349/1/012056.

[15] S. Sobel, A. Haigney, M. Kim, et al. (2010), "The complexation of aqueous metal ions relevant to biological applications - 2. Reactions of copper(II) citrate and copper(II) succinate with selected amino acids", *Chemical Speciation & Bioavailability*, **22(2)**, pp.109-114, DOI: 10.3184/095422910X12692705325385.

[16] Y. Hamada, R. Cox, H. Hamada (2015), "Cu^{2+}-citrate dimer complexes in aqueous solutions", *Journal of Basic & Applied Sciences*, **11**, pp.583-589, DOI: 10.6000/1927-5129.2015.11.78.

[17] A. Palčić, I. Halasz, J. Bronić (2014), "Crystal structure of copper(II) citrate monohydrate solved from a mixture powder X-ray diffraction pattern", *Powder Diffraction*, **29(1)**, pp.28-32, DOI: 10.1017/S0885715613001267.

 DOI: 10.31276/VJST.64(11).44-47

Nghiên cứu chế tạo hệ vật liệu đơn lớp phân tử diazonium trên nền graphite bằng phương pháp cấy ghép điện hóa

Phan Thanh Hải*, Lê Cảnh Định, Hoàng Nhật Hiếu, Nguyễn Thị Xuân Huynh, Huỳnh Thị Miền Trung, Lê Thị Ngọc Loan, Trần Năm Trung

Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Quy Nhơn, 170 An Dương Vương, phường Nguyễn Văn Cừ, TP Quy Nhơn, tỉnh Bình Định, Việt Nam

Ngày nhận bài 22/12/2021; ngày chuyển phản biện 27/12/2021; ngày nhận phản biện 17/1/2022; ngày chấp nhận đăng 21/1/2022

Tóm tắt:

Biến tính bề mặt bằng màng đơn lớp phân tử hữu cơ được xem là một trong những phương pháp hiệu quả để mở rộng khả năng ứng dụng của vật liệu carbon trong lĩnh vực cảm biến điện hóa. Các phân tử diazonium thường được sử dụng để biến tính bề mặt vật liệu như graphite và graphene thông qua sự hình thành liên kết hóa học C-C giữa chúng. Tuy nhiên, khó khăn trong việc kiểm soát sự hình thành màng đơn lớp được xem là một trong những hạn chế của phương pháp này vì khả năng hoạt động hóa học rất mạnh của diazonium. Trong bài báo này, các tác giả trình bày phương pháp biến tính bề mặt vật liệu graphite nhiệt phân định hướng (HOPG) - một loại vật liệu đa lớp của graphene bằng phân tử 3,5-bis-tert-butylbenzenediazonium (3,5-TBD). Các nhóm chức tert-butyl gắn trên các vị trí 3,5 của vòng benzen làm cho các gốc aryl tự do sau khi hình thành không tương tác với những phân tử đã cấy ghép mà ưu tiên tạo liên kết với bề mặt điện cực HOPG để tạo thành màng đơn lớp phân tử. Tính chất điện hóa và hình thái học bề mặt của hệ màng đơn lớp 3,5-TBD được khảo sát bằng phương pháp quét thế vòng tuần hoàn (CV), hiển vi lực nguyên tử (AFM) và hiển vi xuyên hầm lượng tử (STM).

Từ khóa: **biến tính bề mặt, cấy ghép điện hóa, đơn lớp phân tử, graphene, HOPG, phân tử diazonium.**

Chỉ số phân loại: **2.5**

1. Đặt vấn đề

Vật liệu carbon, đặc biệt là dẫn xuất dạng lớp của chúng - graphene đã và đang được ứng dụng một cách hiệu quả trong việc chế tạo vật liệu điện cực của các thiết bị cảm biến điện hóa [1, 2]. Biến tính bề mặt điện cực carbon là công đoạn rất quan trọng trong quá trình chế tạo các lớp cảm biến [3]. Tuy nhiên, các cảm biến điện hóa luôn làm việc trong môi trường dung dịch, vì vậy đòi hỏi các lớp màng kết dính trung gian không bị hòa tan trong khi cảm biến hoạt động. Để thỏa mãn điều kiện này, các phương pháp biến tính hóa học được áp dụng đảm bảo hình thành được các liên kết bền vững, nghĩa là tạo thành các liên kết hóa học giữa vật liệu biến tính với bề mặt graphene. Các phân tử diazonium thường được sử dụng để biến tính hóa học bề mặt graphite và graphene vì quy trình biến tính đơn giản và hiệu quả cao [4, 5]. Bản chất của phương pháp này là các gốc tự do được hình thành nhờ quá trình khử điện hóa có thể tạo liên kết hóa học C-C với C lai hóa sp^2 để tạo thành C lai hóa sp^3 trên bề mặt graphite và graphene [6-8]. Tuy nhiên, các gốc diazonium có đặc tính hoạt hóa rất cao, vì vậy chúng không chỉ phản ứng với bề mặt graphene mà còn tạo liên kết cộng hóa trị với các phân tử diazonium trên bề mặt, từ đó hình thành màng đa lớp. Điều này làm giảm chất lượng và độ dẫn điện của màng diazonium. Để khắc phục những hạn chế này, việc kiểm soát được sự hình thành màng đơn lớp của các phân tử diazonium trên bề mặt điện cực graphene nhằm tăng cường quá trình trao đổi điện tích trên bề mặt cảm biến được xem là một giải pháp tối ưu. Đã có nhiều giải pháp được đề xuất nhằm hạn chế quá trình hình thành màng đa lớp của các phân tử diazonium như: (i) Sử dụng các chất ức chế để ngăn cản các gốc diazonium tự do phản ứng với các phân tử đã cấy ghép trên bề mặt [9, 10]; (ii) Kiểm soát quá trình trao đổi điện tích tại giao diện rắn - lỏng trong quá trình cấy ghép [11]; (iii) Sử dụng các phân tử diazonium có gắn các nhóm chức tại vị trí 3 và 5 của vòng aryl. Đây là phương pháp sẽ được nhóm nghiên cứu áp dụng để chế tạo màng diazonium đơn lớp trên bề mặt vật liệu graphite nhiệt phân định hướng (HOPG), một loại graphene đa lớp.

Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về biến tính hóa học bề mặt HOPG bằng phương pháp điện hóa sử dụng các phân tử 3,5-TBD. Tính chất điện hóa và hình thái học bề mặt vật liệu HOPG sau khi biến tính được khảo sát bằng phương pháp CV, AFM và STM. Kết quả thu được cho thấy, bằng cách gắn các nhóm chức tại vị trí 3,5 của vòng aryl các cấu tử 3,5-TBD chỉ tạo màng hữu cơ đơn lớp trên bề mặt điện cực HOPG. Hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG chế tạo được bằng phương pháp cấy ghép điện hóa hoàn toàn có thể sử dụng làm điện cực để chế tạo các cảm biến điện hóa.

2. Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

Các hóa chất gồm: $K_4Fe(CN)_6$, $NaNO_2$ (Sigma Aldrich), HCl (Merck); 3,5-TBD (97%, Sigma-Aldrich); nước siêu sạch (nước Milli-Q, điện trở suất >18 MΩ.cm, TOC<4 ppb) được sử dụng để pha các dung dịch điện ly; khí N_2 (độ tinh khiết 99%)

*Tác giả liên hệ: Email: phanthanhhai@qnu.edu.vn

Study on the fabrication of diazonium molecular monolayer material on graphite substrate via electrochemical grafting approach

Thanh Hai Phan*, Canh Dinh Le, Nhat Hieu Hoang, Thi Xuan Huynh Nguyen, Thi Mien Trung Huynh, Thi Ngoc Loan Le, Nam Trung Tran

Faculty of Natural Sciences, Quy Nhon University,
170 An Duong Vuong Street, Nguyen Van Cu Ward, Quy Nhon City, Binh Dinh Province, Vietnam

Received 22 December 2021; revised 17 January 2022; accepted 21 January 2022

Abstract:

Surface denaturation of carbon surfaces with molecular monolayer is appointed as one of the most effective bottom-up techniques to enlarge the applicability of the carbon-based electrodes in the electrochemical sensor field. Diazonium molecules have been often employed to denature the surface of materials such as graphite and graphene through the formation of C-C chemical bonds between them. However, the layered formation of these molecules is not well controlled yet due to their intrinsic high reactivity. This report demonstrated a practical approach for covalent functionalisation of the highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) surface, a model system of multilayered graphene, by using 3,5-bis-tert-butylbenzenediazonium molecules. Due to the substituents at the 3,5 positions the aryl radicals prefer bonding directly to the HOPG surface than attacking the grafted aryls towards the monolayered formation. The efficiency of this approach was determined by the combined cyclic voltammetry, atomic force microscopy and scanning tunnelling microscopy.

Keywords: **diazonium molecules, electrochemical grafting, graphene, HOPG, monolayer, surface functionalisation.**

Classification number: **2.5**

dùng để loại bỏ khí ôxy trong dung dịch điện ly và làm khô bề mặt vật liệu sau khi chế tạo.

Đơn tinh thể HOPG (loại ZYB) do Công ty Advanced Ceramics Inc. (Cleveland, Hoa Kỳ) sản xuất. Trước mỗi thí nghiệm, điện cực HOPG được làm sạch bằng cách bóc tách các lớp bề mặt ngoài cùng bằng băng keo.

Phương pháp CV được sử dụng để biến tính bề mặt HOPG với hệ điện hóa 3 điện cực tự chế, diện tích bề mặt điện cực hiệu dụng là 38,5 mm^2. Hệ vật liệu sau khi chế tạo được rửa bằng dung dịch toluene nóng (90^0C) và nước Milli-Q để loại bỏ các phân tử 3,5-TBD và sản phẩm phụ hấp phụ vật lý trên bề mặt rắn, cuối cùng vật liệu được sấy khô bằng khí N_2.

Các phép đo CV được thực hiện trên thiết bị Potentiostat DY2300 với hệ bình đo điện hóa gồm 3 điện cực: điện cực làm việc HOPG, điện cực so sánh Ag/AgCl (C_{KCl}=3 M) (Metrohm) và điện cực đối Pt.

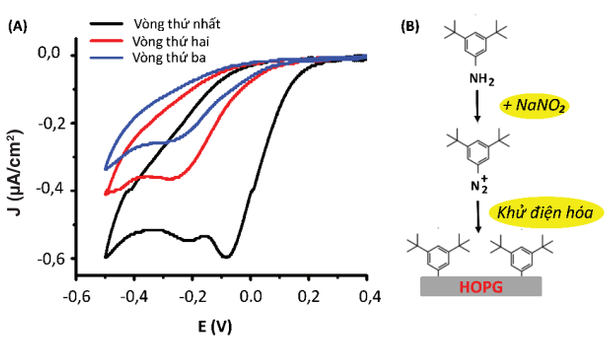
Các phép đo STM và AFM được thực hiện trên hệ STM-AFM đa năng ở điều kiện thường (T=20-30^{o}C, độ ẩm khoảng 50%) trên thiết bị PicoLE sử dụng hệ điều khiển Nanoscope IV (Veeco/Digital Instruments); STM hoạt động ở chế độ dòng không đổi. Đầu dò STM được cắt cơ học từ dây hợp kim Pt/Ir (80-20%, Φ=0,25 mm). Phần mềm WSxM 5.0 được sử dụng để phân tích hình ảnh AFM [12].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Biến tính bề mặt HOPG

Trong khuôn khổ bài báo này, phương pháp CV đã được sử dụng để cấy ghép điện hóa các phân tử 3,5-TBD lên bề mặt điện cực HOPG. Vì phân tử 3,5-TBD không bền nên chúng được tổng hợp ngay trước khi thực hiện phép đo CV bằng cách cho tiền chất 3,5-TBA (3,5-bis-tert-butylbenzen aniline) tác dụng với HCl và $NaNO_2$ bão hòa.

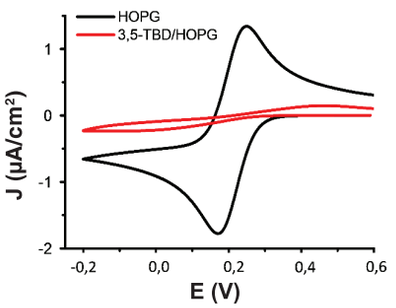
Hình 1A mô tả thế quét vòng tuần hoàn của điện cực HOPG trong dung dịch 1 mM 3,5-TBD + 10 mM KCl + 5 mM H_2SO_4 + $NaNO_2$ (bão hòa). Kết quả cho thấy, ở vòng quét thứ nhất ghi nhận một đỉnh khử chính tại vùng thế E_1=-0,08 V so với Ag/AgCl kèm theo một đỉnh khử phụ tại E_2=-0.21 V so với Ag/AgCl (đường màu đen). Các đỉnh này được quy cho là kết quả của quá trình khử các cation 3,5-TBD thành các gốc aryl tương ứng [13]. Tuy nhiên, đỉnh khử thứ nhất không còn xuất hiện ở vòng quét thứ hai và ba (đường màu đỏ và xanh). Trong khi đó, đỉnh khử thứ hai giảm dần theo từng vòng quét. Điều này cho thấy, trong vòng quét thứ hai, quá trình trao đổi electron giữa bề mặt điện cực HOPG và các phân tử 3,5-TBD đã xảy ra chậm lại và gần như kết thúc trong vòng quét thứ 3, nghĩa là toàn bộ bề mặt điện cực HOPG gần như đã được cấy ghép bởi các gốc tự do sau 3 vòng quét đầu tiên. Hệ vật liệu được tính bởi gốc 3,5-TBD được đặt tên là 3,5-TBD/HOPG. Cơ chế khử và hình thành màng đơn lớp 3,5-TBD được mô tả chi tiết ở hình 1B.



Hình 1. Các đường CV thể hiện quá trình khử điện hóa của các phân tử 3,5-TBD trên bề mặt HOPG (A) và cơ chế khử điện hóa và hình thành màng đơn lớp 3,5-TBD trên nền HOPG (B).

3.2. Tính chất điện hóa của màng 3,5-TBD

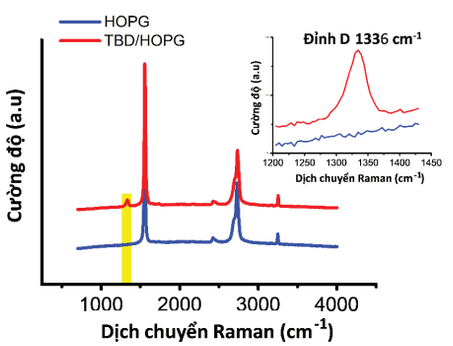
Đặc trưng điện hóa của hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG được khảo sát bằng phép đo CV sử dụng dung dịch điện ly 1 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ + 0,2 M Na_2SO_4 (hình 2). Đối với điện cực HOPG chưa biến tính, cặp đỉnh ôxy hóa khử thuận nghịch ghi nhận tại E_R=+0,16 V và E_O=+0,24 V so với Ag/AgCl (đường màu đen) tương ứng với quá trình ôxy hóa khử thuận nghịch của ion $[Fe(CN)_6]^{2+}$. Ngược lại, các đỉnh ôxy hóa khử của ion $[Fe(CN)_6]^{2+}$ hầu như không xuất hiện trong CV của điện cực sử dụng vật liệu 3,5-TBD/HOPG (đường màu đỏ). Điều này chứng tỏ, màng phân tử 3,5-TBD đã được cấy ghép thành công trên toàn bộ bề mặt gây cản trở sự trao đổi electron giữa ion $[Fe(CN)_6]^{2+}$ và điện cực HOPG.



Hình 2. So sánh khả năng trao đổi electron giữa điện cực HOPG và 3,5-TBD/HOPG.

3.3. Tính chất liên kết của màng 3,5-TBD

Bản chất của liên kết hình thành giữa các phân tử 3,5-TBD và bề mặt HOPG được khảo sát bằng phương pháp phổ Raman. Đỉnh D trong phổ Raman của HOPG chỉ xuất hiện khi hệ vật liệu này có các sai hỏng mạng tinh thể do sự hình thành của carbon lai hóa sp^3 sau khi tạo thành liên kết C-C với phân tử hữu cơ [14]. Điều này cho phép xác định bản chất liên kết giữa các phân tử 3,5-TBD và HOPG thông qua sự xuất hiện của đỉnh D trong phổ Raman. Ngoài ra, tỷ lệ giữa cường độ đỉnh D và G (I_D/I_G) cho phép xác định mật độ của các sai hỏng và là cơ sở để khảo sát mức độ biến tính bề mặt hệ vật liệu [15]. Hình 3 mô tả phổ Raman của hệ vật liệu HOPG (đường màu đen) và 3,5-TBD/HOPG (đường màu đỏ).



Hình 3. Phổ Raman của các hệ vật liệu HOPG và 3,5-TBD/HOPG.

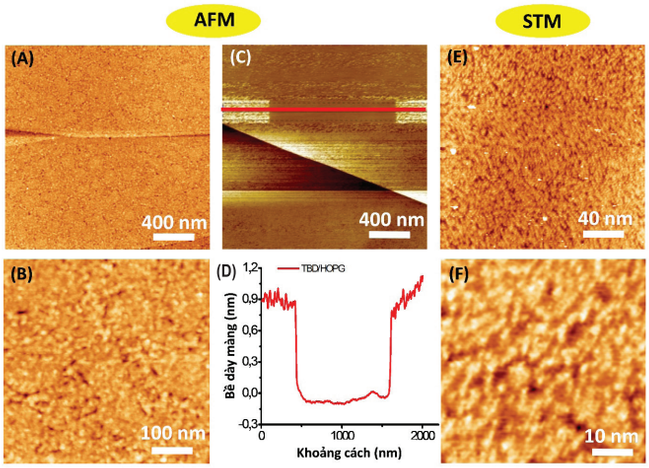
Hai đỉnh phổ tại 1576 và 2679 cm^{-1} được ghi nhận trên cả 2 hệ vật liệu là các đỉnh G (G band) và 2D (2D band) đặc trưng của vật liệu carbon. So sánh với phổ của HOPG, trên phổ Raman của hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG còn có thêm một đỉnh phổ tại 1336 cm^{-1} (khung màu vàng). Đỉnh phổ này được gọi là đỉnh D (D band) và chỉ xuất hiện khi cấu trúc mạng carbon sp^2 bị biến dạng (so sánh chi tiết được thể hiện ở hình chèn). Kết quả thu được cho thấy, cường độ đỉnh D của hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG tương đối lớn. Cụ thể, tỷ lệ I_D/I_G của 3,5-TBD/HOPG là 0,07. Như vậy, mức độ sai hỏng sp^3 trên bề mặt HOPG do sự cấy ghép trực tiếp của các gốc tự do 3,5-TBD lên trên bề mặt HOPG là rất cao nếu so sánh với các dẫn xuất diazonium có xu hướng hình thành màng đa lớp trên bề mặt như 4-NBD [11]. Điều này chứng tỏ, các phản ứng phụ nhằm hình thành cấu trúc đa lớp đã không xảy ra với phân tử 3,5-TBD. Kết quả là, bề mặt vật liệu HOPG được cấy ghép bởi màng đơn lớp 3,5-TBD thông qua liên kết cộng hóa trị C-C. Chú ý rằng, đỉnh D không xuất hiện trên đế HOPG chưa biến tính (đường màu đen), nghĩa là bề mặt hệ vật liệu HOPG được sử dụng khá hoàn hảo và không bị hư hại khi sử dụng tia laser trong quá trình đo Raman.

3.4. Hình thái học bề mặt của các hệ vật liệu

Thông qua kết quả đặc trưng điện hóa và Raman, có thể thấy rằng, các phân tử 3,5-TBD đã liên kết hóa học để hình thành màng đơn lớp với bề mặt HOPG. Tiếp theo, chúng tôi sử dụng kết hợp hai phương pháp AFM và STM để khảo sát hình thái học bề mặt của chúng ở cấp độ phân tử (hình 4). Kết quả đo phương pháp AFM cho thấy, bề mặt điện cực HOPG sau cấy ghép được phủ một lớp màng của phân tử hữu cơ (hình 4A và B). Để xác định chính xác độ dày của các màng 3,5-TBD, chúng tôi đã loại bỏ cục bộ các phân tử hữu cơ trên HOPG bằng đầu dò AFM nhằm xác định sự chênh lệch về độ cao giữa vùng bề mặt HOPG không biến tính và biến tính. Kết quả cho thấy, màng 3,5-TBD có độ dày khoảng 0,7±0,2 nm (hình 4C và D), giá trị này tương đương với chiều dày của màng đơn lớp [16]. Kết quả này được cho là do hiệu ứng không gian gây ra bởi 2 nhóm chức $-C(CH_3)_3$ gắn kết trên các vị trí meta của vòng benzen. Do đó, các gốc aryl tự do sau khi hình thành từ quá trình khử điện hóa không thể tương tác với các phân tử đã được cấy ghép trên bề mặt HOPG.

Tuy nhiên, phương pháp AFM không thể cung cấp thông tin về mật độ các gốc tự do liên kết trực tiếp với bề mặt HOPG vì chúng chỉ cho thông tin về cấu hình của lớp bề mặt. STM là phương pháp có thể đo được mật độ trạng thái cục bộ (LDOS) với độ phân giải đến cấp độ phân tử [17]. Khi bề mặt xuất hiện các sai hỏng thì LDOS cũng thay đổi theo. Vì vậy, phương pháp này rất hữu ích để xác định mật độ sai hỏng trên bề mặt gây ra bởi các gốc aryl tự do. Hình 4E và F mô tả mật độ trạng thái cục bộ của hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG. Kết quả cho thấy, mật độ các gốc 3,5-TBD liên kết với bề mặt HOPG là rất cao. Điều này hoàn toàn

phù hợp với kết quả trên phổ Raman cho thấy cường độ đỉnh D của HOPG tăng đột biến sau khi cấy ghép. Vì vậy, chúng ta có thể kết luận rằng, màng 3,5-TBD cấy ghép điện hóa trên bề mặt HOPG là màng đơn lớp với độ gồ ghề trung bình của bề mặt hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG tính theo phần mềm WSxM có giá trị khoảng 0,38 nm.



Hình 4. Phương pháp khảo sát hình thái học bề mặt AFM và STM. (A, B) Hình ảnh AFM mô tả hình thái học bề mặt của hệ vật liệu HOPG sau khi được cấy ghép điện hóa bởi phân tử 3,5-TBD; **(C, D)** Độ dày của màng phân tử 3,5-TBD cấy ghép điện hóa trên bề mặt HOPG đo bằng phương pháp AFM có giá trị khoảng 0,7±0,2 nm, tương ứng với chiều dày của màng đơn lớp; **(E, F)** Hình ảnh STM mô tả mật độ liên kết cộng hóa trị trên bề mặt HOPG sau biến tính. Thông số đo: I_t=0,12 nA; V_b=-0,5 V.

4. Kết luận

Bề mặt HOPG đã được cấy ghép thành công bởi các phân tử 3,5-TBD thông qua liên kết cộng hóa trị C-C tạo thành hệ vật liệu màng đơn lớp phân tử 3,5-TBD/HOPG. Tính chất điện hóa, bản chất liên kết và hình thái học bề mặt của hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG được khảo sát 3,5-TBD/HOPG bằng các phép đo CV, Raman, AFM và STM. Hệ vật liệu 3,5-TBD/HOPG có độ bền cao trong các môi trường do liên kết cộng hóa trị C-C giữa các phân tử 3,5-TBD và bề mặt HOPG, vì vậy có khả năng ứng dụng làm điện cực trong các thiết bị cảm biến điện hóa. Kết quả thu được này cho phép nhóm tác giả tiếp tục áp dụng quy trình biến tính cho các hệ vật liệu khác như kim loại và các loại vật liệu 2 chiều tiên tiến như MoS_2, WS_2… nhằm mở rộng khả năng ứng dụng của chúng trong lĩnh vực cảm biến.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đề tài cấp Bộ mã số B2020-DQN-04. Nhóm nghiên cứu cảm ơn GS. Steven De Feyter đã hỗ trợ các phép đo khảo sát bề mặt vật liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] J.K. Shashikumara, B.E.K. Swamy (2020), "Electrochemical investigation of dopamine in presence of uric acid and ascorbic acid at poly (reactive blue) modified carbon paste electrode: A voltammetric study", *Sensors International*, **1**, pp.100008-100013, DOI: 10.1016/j.sintl.2020.100008.

[2] S. Nasraoui, A. Al-Hamry, P.R. Teixeira, et al. (2021), "Electrochemical sensor for nitrite detection in water samples using flexible laser-induced graphene electrodes functionalized by CNT decorated by Au nanoparticles", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **880**, DOI: 10.1016/j.jelechem.2020.114893.

[3] J. Xing, F. Chunfang, D. Ponnamma, et al. (2020), "Review on exploration of graphene in the design and engineering of smart sensors, actuators and soft robotics", *Chemical Engineering Journal Advances*, **4**, DOI: 10.1016/j.ceja.2020.100034.

[4] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, et al. (1997), "Covalent modification of carbon surfaces by aryl radicals generated from the electrochemical reduction of diazonium salts", *J. Am. Chem. Soc.*, **119(1)**, pp.201-207, DOI: 10.1021/ja963354s.

[5] M. Delamar, G. Désarmot, O. Fagebaume, et al. (1997), "Modification of carbon fiber surfaces by electrochemical reduction of aryl diazonium salts: Application to carbon epoxy composites", *Carbon*, **35(6)**, pp.801-807, DOI: 10.1016/S0008-6223(97)00010-9.

[6] G. Ambrosio, A. Brown, L. Daukiya, et al. (2020), "Impact of covalent functionalization by diazonium chemistry on the electronic properties of graphene on SiC", *Nanoscale*, **12(16)**, pp.9032-9037, DOI: 10.1039/D0NR01186J.

[7] R. Steeno, M.C.R. González, S. Eyley, et al. (2020), "Covalent functionalization of carbon surfaces: Diaryliodonium versus aryldiazonium chemistry", *Chemistry of Materials*, **32(12)**, pp.5246-5255, DOI: 10.1021/acs.chemmater.0c01393.

[8] K. Sampathkumar, V. Diez-Cabanes, P. Kovaricek, et al. (2019), "On the suitability of raman spectroscopy to monitor the degree of graphene functionalization by diazonium salts", *The Journal of Physical Chemistry C*, **123**, pp.22397-22402, DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b06516.

[9] A. Fischer, N. Heidary, J. Kozuch, et al. (2018), "*In situ* spectroelectrochemical studies into the formation and stability of robust diazonium-derived interfaces on gold electrodes for the immobilization of an oxygentolerant hydrogenase", *ACS Applied Materials & Interfaces*, **10(27)**, pp.23380-23391, DOI: 10.1021/acsami.8b02273.

[10] T. Menanteau, M. Dias, E. Levillain, et al. (2016), "Electrografting via diazonium chemistry: The key role of the aryl substituent in the layer growth mechanism", *The Journal of Physical Chemistry C*, **120(8)**, pp.4423-4429, DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b12565.

[11] H. Uetsuka, D. Shin, N. Tokuda, et al. (2007), "Electrochemical grafting of boron-doped single-crystalline chemical vapor deposition diamond with nitrophenyl molecules", *Langmuir*, **23(6)**, pp.3466-3472, DOI: 10.1021/la063241e.

[12] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gómez-Rodríguez, et al. (2007), "WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology", *Review of Scientific Instruments*, **78(1)**, pp.13705-13713, DOI: 10.1063/1.2432410.

[13] V.T.T. Hang, T.T. Thi, H.T.M. Trung, et al. (2020), "Diazonium based surface functionalization of graphite by electrochemical grafting", *Vietnam Journal of Catalysis and Adsorption*, **9(2)**, pp.125-129 (in Vietnamese).

[14] A.C. Ferrari, J. Robertson (2000), "Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon", *Physical Review B*, **61(20)**, pp.14095-14107, DOI: 10.1103/PhysRevB.61.14095.

[15] P. Avouris (2010), "Graphene: Electronic and photonic properties and devices", *Nano Letters*, **10(11)**, pp.4285-4294, DOI: 10.1021/nl102824h.

[16] A.M. Bragança, J. Greenwood, O. Ivasenko, et al. (2016), "The impact of grafted surface defects and their controlled removal on supramolecular selfassembly", *Chemical Science*, **7(12)**, pp.7028-7033, DOI: 10.1039/C6SC02400A.

[17] C. Hellenthal, R. Heimbuch, K. Sotthewes, et al. (2013), "Determining the local density of states in the constant current STM mode", *Physical Review B*, **88(3)**, pp.35425-35430, DOI: 10.1103/PhysRevB.88.035425.

DOI: 10.31276/VJST.64(11).48-53

Rủi ro sinh thái một số kim loại nặng trong trầm tích tại khu vực hạ lưu sông Hồng

Trịnh Thị Thắm*, Lê Thị Trinh, Trịnh Thị Thủy

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

Ngày nhận bài 14/2/2022; ngày chuyển phản biện 17/2/2022; ngày nhận phản biện 15/3/2022; ngày chấp nhận đăng 21/3/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này đánh giá sự tích lũy một số kim loại gồm Cu, Pb, Cd, Cr trong trầm tích tại khu vực hạ lưu sông Hồng đoạn chảy từ phía nam Hà Nội đến huyện Nam Trực, tỉnh Nam Định. Đồng thời, chỉ số tích lũy địa chất (I_{geo}) và chỉ số rủi ro sinh thái tiềm ẩn (E_r^i) được tính toán để đánh giá mức độ ảnh hưởng của hàm lượng kim loại nặng (KLN) trong trầm tích đến hệ sinh thái. Kết quả xác định hàm lượng kim loại trong 20 mẫu trầm tích cho thấy, tại khu vực nghiên cứu chưa có dấu hiệu ô nhiễm Cu, Pb, Cd, Cr căn cứ theo quy định chất lượng trầm tích (QCVN 43:2017/BTNMT). Tuy nhiên, 50% số điểm có hàm lượng kim loại ở mức gây ảnh hưởng thấp theo hướng dẫn của Canada. Giá trị chỉ số rủi ro toàn diện (RI) của Cu, Pb, Cd và Cr nằm trong khoảng 1,8-11,6 cho thấy mức độ rủi ro sinh thái thấp đối với trầm tích tại khu vực nghiên cứu. Kết quả đánh giá mức độ rủi ro là những căn cứ khoa học ban đầu để đề xuất các biện pháp kiểm soát nguồn thải cũng như hạn chế sự lan truyền của các kim loại vào môi trường nước.

Từ khóa: **kim loại nặng, rủi ro sinh thái, sông Hồng, trầm tích.**

Chỉ số phân loại: **2.7**

1. Mở đầu

Sông Hồng là con sông lớn nhất khu vực phía Bắc và lớn thứ 2 của Việt Nam sau sông Mekong. Sông Hồng bắt nguồn từ tỉnh Vân Nam của Trung Quốc và chảy vào địa phận Việt Nam tại tỉnh Lào Cai. Tại địa phận Việt Nam, sông Hồng chảy qua 7 tỉnh, thành phố gồm Lào Cai, Yên Bái, Phú Thọ, Vĩnh Phúc, Hà Nội, Hà Nam và Nam Định. Sông Hồng đổ ra biển Đông tại cửa Ba Lạt với tổng chiều dài trên đất Việt Nam là 328 km. Sông Hồng có lưu lượng nước lớn nhưng phân bổ không đều giữa các mùa trong năm. Vào mùa mưa, lưu lượng nước sông lớn nhất có thể lên đến 30.000 m^3/s nhưng vào mùa khô, lưu lượng thấp nhất là 700 m^3/s. Do chảy qua nhiều địa phận miền núi và đặc điểm địa chất - thủy văn khác nhau ở các khu vực, đặc điểm dòng chảy của sông Hồng cũng khá khác nhau giữa các khu vực. Lượng phù sa của sông Hồng lớn đã góp phần quan trọng trong phát triển kinh tế nông nghiệp tại các tỉnh đồng bằng sông Hồng. Tuy nhiên, hoạt động phát triển nông nghiệp cũng như những khai thác nguồn lợi từ sông cũng đã và đang gây nên những hệ lụy về môi trường, ảnh hưởng đến hệ sinh thái quanh khu vực sông Hồng chảy qua. Bên cạnh đó, hoạt động khai thác cát và khoáng sản phát triển tại nhiều khu vực cũng là một trong những nguyên nhân gây suy giảm chất lượng môi trường nước mặt sông Hồng. Theo Báo cáo hiện trạng môi trường Quốc gia năm 2018, chất lượng nước sông Hồng có xu hướng giảm trong những năm gần đây [1]. Ngoài ra, một số nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, một số khu vực sông Hồng có dấu hiệu ô nhiễm KLN trong nước, bùn cát lơ lửng, trầm tích [2, 3].

Sự cân bằng phân bố của kim loại trong nước, các hạt lơ lửng và trầm tích có thể phản ánh chất lượng môi trường tại khu vực [4]. Các đặc tính bền vững của KLN như độ độc cao, không phân hủy sinh học và có khả năng tích tụ đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học cũng như các nhà quản lý môi trường trong việc đánh giá hàm lượng KLN trong môi trường [5]. Các tác động của kim loại đến hệ sinh thái dưới nước được đánh giá không chỉ dựa trên hàm lượng của chúng trong nước mà còn căn cứ vào hàm lượng của nó trong trầm tích vì các chất ô nhiễm từ trầm tích cũng là một nguồn phơi nhiễm quan trọng. Quá trình cân bằng vật chất của các chất ô nhiễm trong đó có KLN giữa môi trường nước, các hạt lơ lửng và trầm tích đáy diễn ra liên tục. Chính vì vậy, đánh giá ô nhiễm trầm tích cũng phản ánh được mức độ ô nhiễm của các chất trong môi trường nước.

Để xem xét mức độ ô nhiễm của kim loại trong trầm tích ở cả hai phương diện là nồng độ và tính độc hại, các nhà khoa học thường sử dụng I_{geo} và E_r^i. Ví dụ, đánh giá rủi ro sinh thái của kim loại trong trầm tích sông Châu Giang, trầm tích từ hồ và trầm tích biển ở Chennai đã được các nhà khoa học từ Trung Quốc, Ấn Độ và Nigeria công bố [6-9]. I_{geo} của một số kim loại cũng được tính toán đối với trầm tích tại khu vực cửa biển Linggi, Malaysia [10]. Kết quả chỉ ra khu vực nghiên cứu bị ô nhiễm bởi các kim loại như As, Pb và Sb.

*Tác giả liên hệ: Email: ttham@hunre.edu.vn

Ecological risks of some heavy metals in sediment samples collected from downstream of the Red river

Thi Tham Trinh*, Thi Trinh Le, Thi Thuy Trinh

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

Received 14 February 2022; revised 15 March 2022; accepted 21 March 2022

Abstract:

This study aimed to assess the accumulation of some heavy metals such as Cu, Pb, Cd, and Cr in the sediments collected from downstream of the Red river from the south of Hanoi city to Nam Truc district, Nam Dinh province. Besides, the geological accumulation index (I_{geo}) and the potential ecological risk index were calculated to understand the impact of heavy metal content in the sediments on the ecosystem. The results showed that the concentration of several metals (Cu, Pb, Cd, Cr) in 20 sediment samples was lower than the permitted values specified in Technical Regulations on sediment quality (QCVN 43:2017/BTNMT). However, according to the Canadian guidelines, the concentrations of metals in 50% of samples had a low level of effect. The potential ecological risk index of metals ranges from 1.8 to 11.6, revealing that the study area has a low-level metal risk. This data can clarify the area's potential risk level and provide the scientific basis for recommending measures to control and reduce sources of metal pollution into the aquatic environment.

Keywords: **ecological risks, heavy metals, Red river, sediment.**

Classification number: **2.7**

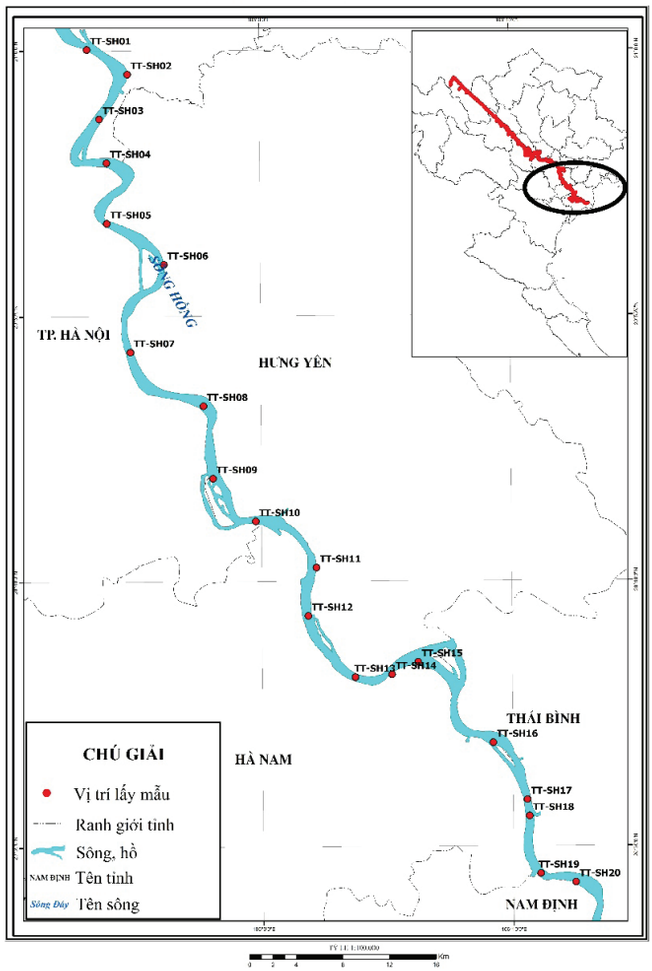
Tại Việt Nam, hầu hết các nghiên cứu tập trung vào đánh giá nguy cơ tiềm ẩn một số KLN tại Đồng bằng sông Cửu Long [11], sông Hồng [12], rừng ngập mặn nhiệt đới ở Cần Giờ [13], và vùng ven biển ở miền Nam [14]. Hệ số làm giàu (enrichment factors - EF) của một số kim loại gồm Cu, Cd, Pb, Ni và Zn đã chỉ ra sự ô nhiễm đáng kể của các kim loại Cd, Cu và Pb ở khu vực thượng nguồn sông Hồng [12]. Bên cạnh đó, tình trạng ô nhiễm của một số kim loại trong các mẫu trầm tích lấy tại Cửa Ông, Vịnh Hạ Long (Việt Nam) được khẳng định khi giá trị I_{geo} dương cao của As [15].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định mức độ ô nhiễm của một số kim loại gồm Cu, Pb, Cd và Cr trong trầm tích sông Hồng đoạn chảy từ địa phận phía Nam của Hà Nội đến huyện Nam Trực, tỉnh Nam Định. Đồng thời, việc tính toán E_r^i của các kim loại nghiên cứu sẽ cung cấp các dữ liệu khoa học giúp cho việc hoạch định các chính sách và xây dựng các biện pháp kỹ thuật nhằm giảm thiểu ô nhiễm kim loại trên các lưu vực sông.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Lấy mẫu và xử lý sơ bộ

Trước khi tiến hành lấy mẫu, nhóm nghiên cứu đã thực hiện khảo sát thực địa để xây dựng chương trình quan trắc, lựa chọn điểm lấy mẫu và phương án lấy mẫu. 20 điểm lấy mẫu trầm tích được lấy dọc theo sông Hồng từ địa phận Thanh Trì, Hà Nội đến hết địa phận huyện Nam Trực, tỉnh Nam Định vào tháng 10/2019. Trong quá trình lấy mẫu, các vị trí lấy mẫu được đánh dấu tọa độ và mô tả chi tiết các đặc điểm xung quanh (hình 1).



Hình 1. Bản đồ vị trí các điểm lấy mẫu.

Mẫu trầm tích mặt ở độ sâu khoảng 5-10 cm được lấy bằng gầu lấy mẫu trầm tích Peterson (Wildco 1750-G30). Mẫu trầm tích được trộn đều trên khay nhựa, sau đó lấy khoảng 500 g mẫu đựng vào bình thủy tinh tối màu. Toàn bộ mẫu được đựng trong hộp bảo quản mẫu chuyên dụng. Các

mẫu trầm tích được bảo quản lạnh bằng đá gel theo TCVN 6663-15:2008 (ISO 5667-15:1999) và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

Các mẫu trầm tích được xử lý sơ bộ tại phòng thí nghiệm bằng phương pháp hong khô tự nhiên. Trong quá trình hong khô, nhặt bỏ các thành phần tạp. Mẫu trầm tích khô được xử lý sơ bộ và nghiền nhỏ theo TCVN 6647:2007. Các mẫu có kích thước hạt nhỏ hơn 63 µm được sử dụng để phân tích các chỉ tiêu kim loại và xác định hệ số khô kiệt theo TCVN 4080:2011.

2.2. Phân tích hàm lượng các KLN

Một số kim loại được lựa chọn trong nghiên cứu này gồm Cr, Cu, Cd, Pb. Mẫu trầm tích được xử lý heo hướng dẫn của EPA 3050B (1996) để xác định hàm lượng kim loại. Mẫu trầm tích được xử lý bằng phương pháp vô cơ hóa mẫu ướt với axit mạnh HNO_3 tỷ lệ 1:1 trong khoảng 15 phút ở 95°C. Tiếp theo, sử dụng axit HNO_3 đặc để phân hủy mẫu cho đến khi hết khí màu nâu thoát ra, mỗi lần sử dụng 5 ml HNO_3 đặc. Để nguội mẫu đến nhiệt độ phòng rồi tiếp tục tiến hành xử lý mẫu với 2,0 ml nước cất hai lần và 3,0 ml dung dịch H_2O_2 30%. Bình mẫu tiếp tục được đun sôi đến khi giảm bọt khí. Thêm chính xác 5,0 ml dung dịch H_2O_2 30% và đun tiếp ở 95°C cho đến khi dung dịch trong và hết khói trắng thoát ra. Hỗn hợp sau khi nguội được hòa tan bằng dung dịch HNO_3 2%, lọc để loại bỏ cặn. Sau đó, dịch lọc mẫu được chuyển vào bình định mức 50 ml, định mức đến vạch bằng dung dịch HNO_3 2%. Tiến hành đo hàm lượng các kim loại trong dịch mẫu bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa (F-AAS) sử dụng thiết bị Thermo Fisher M6 với các điều kiện được tối ưu trước khi đo.

2.3. Đánh giá rủi ro sinh thái

Đánh giá rủi ro sinh thái của một số KLN trong trầm tích thông qua I_{geo} và chỉ số rủi ro sinh thái tiềm ẩn E_r^i. I_{geo} là chỉ số được tính toán dựa trên sự so sánh hàm lượng tổng kim loại trong trầm tích với giá trị nền của kim loại đó. Chỉ số này được đưa ra bởi E. Suess và cs (1979) [16] và có công thức tính như sau:

$$I_{geo} = \log_2 \frac{C_n}{1{,}5 * B_n} \quad (1)$$

trong đó: C_n: hàm lượng kim loại trong mẫu; B_n: giá trị nền của kim loại trong vỏ trái đất [16]; 1,5: hệ số được đưa ra để giảm thiểu tác động của những thay đổi có thể xảy ra đối với giá trị nền do những biến đổi về thạch học trong trầm tích.

Giá trị B_n được coi là giá trị trung bình của hàm lượng mỗi kim loại trong vỏ trái đất. Giá trị B_n được cho là rất khác nhau ở các địa điểm khác nhau do đặc điểm địa chất của từng khu vực. Do vậy, việc đánh giá mức độ ô nhiễm dựa trên giá trị I_{geo} cũng chỉ mang tính chất tham khảo để đề xuất những giải pháp bảo vệ môi trường phù hợp. Mức độ ô nhiễm trầm tích dựa theo I_{geo} được phân loại trong bảng 1.

Bảng 1. Đánh giá mức độ ô nhiễm KLN giá trị I_{geo} [17].

Phân loại	Giá trị I_{geo}	Mức độ ô nhiễm
0	$I_{geo} \leq 0$	Không ô nhiễm
1	$0 \leq I_{geo} \leq 1$	Từ không ô nhiễm đến ô nhiễm trung bình
2	$1 \leq I_{geo} \leq 2$	Trung bình
3	$2 \leq I_{geo} \leq 3$	Từ ô nhiễm trung bình đến ô nhiễm nặng
4	$3 \leq I_{geo} \leq 4$	Nặng
5	$4 \leq I_{geo} \leq 5$	Từ ô nhiễm nặng đến ô nhiễm rất nghiêm trọng
6	$5 \leq I_{geo}$	Rất nghiêm trọng

Chỉ số rủi ro sinh thái tiềm năng RI được đề xuất bởi L. Hakanson (1980) [18] để đánh giá nguy cơ sinh thái tiềm năng của KLN. Hệ số RI được xác định dựa trên 3 yếu tố cơ bản để đánh giá mức độ rủi ro: mức độ ô nhiễm (C_d), mức độ độc tính của KLN (T_r^i) và E_r^i.

Theo phương pháp này, các hệ số rủi ro sinh thái tiềm ẩn đơn của các kim loại và RI được tính như sau:

$$RI = \sum_{i=1}^{n} E_r^i \quad (2)$$

$$E_r^i = C_f^i \times T_r^i \quad (3)$$

$$C_f^i = \frac{C_i}{C_n^i} \quad (4)$$

trong đó: C_i: hàm lượng KLN trung bình trong mẫu trầm tích (mg/kg); C_f^i: yếu tố ô nhiễm của từng kim loại; c_n^i: hàm lượng tham chiếu của KLN thời kỳ tiền công nghiệp; E_r^i: yếu tố rủi ro sinh thái của từng KLN; T_r^i: hệ số độc tính của KLN.

Mức độ rủi ro sinh thái của một số kim loại được đánh giá theo L. Hakanson (1980) [19], với các mức rủi ro thấp (E_r^i<40, RI<110); rủi ro vừa phải (40≤E_r^i<80, 110≤RI<220), rủi ro đáng quan tâm (80≤E_r^i<160, 220≤RI<440); rủi ro cao (160≤E_r^i<320, RI≥440) và rủi ro rất cao (E_r^i≥320).

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Hàm lượng KLN trong trầm tích

Hàm lượng một số KLN gồm Cr, Cu, Cd và Pb trong trầm tích khu vực hạ lưu sông Hồng được thể hiện tại bảng 2 cho thấy trầm tích tại đây chưa có dấu hiệu ô nhiễm KLN.

Hàm lượng các kim loại Cr, Cu, Cd và Pb trong trầm tích đều nhỏ hơn giá trị giới hạn theo QCVN 43:2012/BTNMT. Tuy nhiên, hàm lượng trung bình của Cr, Cu và Pb đều cao hơn giá trị thấp nhất có ảnh hưởng theo hướng dẫn chất lượng trầm tích tỉnh Ontario, Canada (1993) - các giá trị quy định để bảo vệ hệ thủy sinh nhằm đánh giá mức độ ô nhiễm cũng như tích lũy KLN tại khu vực nghiên cứu. Số mẫu trầm tích có hàm lượng Cr, Cu và Pb lớn hơn giá trị mức độ thấp nhất có ảnh hưởng (LEL) tương ứng là 13, 15 và 7 mẫu. Như vậy, có trên 50% số lượng mẫu trầm tích được lấy từ hạ lưu sông Hồng có thể có những ảnh hưởng nhất định đến hệ sinh thái dưới nước. Khoảng nồng độ của các kim loại Cr, Cu, Cd và Pb là 21,0-55,4; 7,97-104; 0,005-0,429 và 13,2-73,5 mg/kg, đều nhỏ hơn mức độ gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ sinh thái theo hướng dẫn chất lượng trầm tích của Canada. Điều này cho thấy, vấn đề ô nhiễm KLN trong trầm tích khu vực chưa ở mức độ cảnh báo nghiêm trọng.

Bảng 2. Hàm lượng KLN trong mẫu trầm tích.

Đơn vị: mg/kg trọng lượng khô

Sông Hồng (n=20)	Cr	Cu	Cd	Pb
Trung bình	34,6	36,8	0,243	31,2
Nhỏ nhất	21,0	7,97	0,005	13,2
Lớn nhất	55,4	104,0	0,429	73,5
SD	10,5	26,2	0,111	15,2
Giới hạn ảnh hưởng[a]	90	197	3,5	91,3
Mức độ thấp nhất có ảnh hưởng[b]	26	16	0,6	31
Mức độ gây ảnh hưởng nghiêm trọng[b]	110	110	10	250

Ghi chú: [a]: QCVN 43:2012/BTNMT - Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về chất lượng trầm tích (giá trị giới hạn các thông số chất lượng trầm tích nước ngọt, nước mặn và nước lợ); [b]: hướng dẫn về chất lượng trầm tích tỉnh Ontario, Canada - các giá trị quy định để bảo vệ hệ thủy sinh.

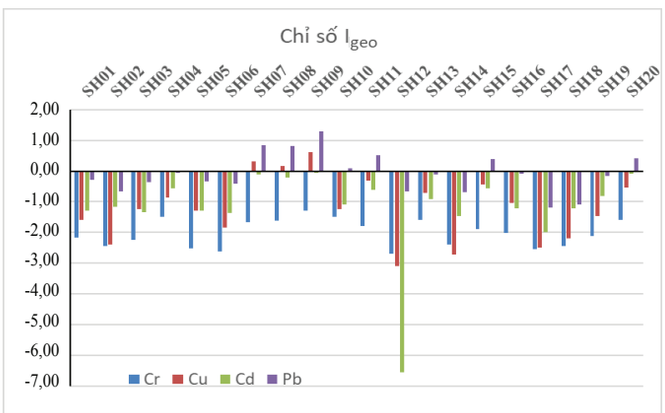
Bên cạnh đó, mức độ tích lũy kim loại trong trầm tích sông Hồng ở nghiên cứu này thấp hơn so với hàm lượng kim loại trong trầm tích tại sông Hàn, Đà Nẵng (hàm lượng Cu 23-65,01; Pb 31,1-76,1; Cd 0,038-0,156; Cr 43,1-58 mg/kg trọng lượng khô) [20] và trầm tích tại khu vực hạ lưu sông Đáy [21] (bảng 3). Trong khi đó, hàm lượng KLN trong trầm tích sông Hồng có khoảng nồng độ tương đương với sông Cầu và sông Sài Gòn, đặc biệt là Pb [22, 23]. Tất cả các hàm lượng đều đạt yêu cầu quy định tại QCVN 43:2017/BTNMT. Sự khác biệt về hàm lượng KLN ở mỗi sông có thể phụ thuộc vào điều kiện phát triển kinh tế, đặc điểm nguồn thải cũng như các biện pháp xử lý, quản lý của các cơ quan chức năng ở mỗi khu vực khác nhau.

Bảng 3. So sánh nồng độ các kim loại trong trầm tích với một số khu vực tại Việt Nam.

Nghiên cứu	Giá trị (mg/kg)	Kim loại				Nguồn
		Cd	*Cu*	*Pb*	*Cr*	
Sông Hồng	Cao nhất	0,426	44,0	55,0	48,1	Nghiên cứu này
	Thấp nhất	0,005	10,4	7,97	20,9	
	Trung bình	0,218	28,7	32,2	34,0	
Sông Đáy	Cao nhất	2,43	72,1	82,6	97,3	[21]
	Thấp nhất	0,189	13,1	15,8	16,1	
	Trung bình	1,0	39,7	39,4	52,4	
Sông Hàn	Cao nhất	0,156	65,01	76,1	58,0	[20]
	Thấp nhất	0,038	23,0	31,1	43,1	
	Trung bình	0,830	28,0	45,4	52,5	
Sông Cầu	Cao nhất	5,62	571	430	-	[22]
	Thấp nhất	1,97	176	116	-	
Sông Sài Gòn	Cao nhất	0,240	58,8	63,1	41,5	[22]
	Thấp nhất	0,030	14,3	3,31	19,5	
	Trung bình	0,100	31,6	23,8	28,0	

3.2. Đánh giá rủi ro sinh thái

I_{geo} của các mẫu trầm tích khu vực hạ lưu sông Hồng tương đối thấp, hầu hết các I_{geo} nhỏ hơn 0, với khoảng dao động của Cr, Cu, Cd và Pb lần lượt là: -2,7÷-1,3; -3,1÷0,62; -6,6÷-0,07 và -1,2÷1,3.



Hình 1. Chỉ số I_{geo} trong trầm tích của các kim loại.

Căn cứ vào kết quả I_{geo} và tiêu chuẩn đánh giá mức độ tích lũy địa chất, mức độ ô nhiễm của Cr và Cd ở các địa điểm đều ở mức thấp. Đối với Pb và Cu, hầu hết các địa điểm cũng cho thấy khu vực nghiên cứu không bị ô nhiễm bởi kim loại này. Một số vị trí như SH07, SH08 và SH09, I_{geo} cho thấy mức độ ô nhiễm nhẹ của Cu và Pb. Riêng điểm SH09 có mức độ ô nhiễm trung bình đối với kim loại Pb. Theo kết quả khảo sát, các vị trí lấy mẫu này đều có hoạt động khai thác cát, nuôi trồng thủy sản và canh tác nông nghiệp phát triển.

Bảng 4. Chỉ số rủi ro sinh thái KLN trong trầm tích.

TT	Ký hiệu	E_r^i				RI
		Cr	*Cu*	*Cd*	*Pb*	
1	SH01	0,667	0,572	1,59	1,35	4,17
2	SH02	0,553	0,326	1,71	1,04	3,63
3	SH03	0,638	0,724	1,54	1,29	4,19
4	SH04	1,07	0,935	2,61	1,56	6,18
5	SH05	0,528	0,696	1,58	1,29	4,10
6	SH06	0,491	0,481	1,50	1,23	3,70
7	SH07	0,953	2,14	3,57	2,96	9,62
8	SH08	0,988	1,94	3,35	2,87	9,14
9	SH09	1,23	2,64	3,67	4,03	11,6
10	SH10	1,07	0,731	1,82	1,75	5,37
11	SH11	0,867	1,381	2,53	2,34	7,12
12	SH12	0,466	0,202	0,04	1,05	1,75
13	SH13	0,995	1,04	2,04	1,51	5,59
14	SH14	0,569	0,259	1,40	1,02	3,25
15	SH15	0,815	1,28	2,60	2,16	6,85
16	SH16	0,744	0,840	1,66	1,54	4,78
17	SH17	0,516	0,306	0,98	0,72	2,52
18	SH18	0,551	0,376	1,65	0,77	3,35
19	SH19	0,695	0,624	2,20	1,47	4,99
20	SH20	0,991	1,18	3,65	2,20	8,03
Trung bình		0,769	0,933	2,08	1,71	5,50

Các kết quả tính toán yếu tố rủi ro sinh thái (E_r^i) trong bảng 4 cho thấy mức độ rủi ro thấp của các KLN trong trầm tích hạ lưu sông Hồng. Bên cạnh đó, mức độ rủi ro sinh thái của từng kim loại nghiên cứu giảm dần từ Cd đến Pb, đến Cu và Cr với giá trị E_r^i như sau: E_r^i(Cd)=2,08>E_r^i(Pb)=1,71>E_r^i(Cu)=0,933>E_r^i(Cr)=0,769. Như vậy, cũng giống như một số khu vực đã nghiên cứu trước đó, Cd là yếu tố rủi ro sinh thái chính. Tuy nhiên, kết quả đánh giá rủi ro sinh thái theo L. Hakanson (1980) [18] cho thấy, trầm tích tại sông Hồng có mức độ rủi ro thấp đối với các kim loại Pb, Cu, Cd, Cr.

Ngoài ra, nhóm nghiên cứu cũng đã tiến hành đánh giá rủi ro của một số kim loại trong trầm tích sông Hàn, sông Đáy [20, 21]. Mức độ rủi ro của các kim loại trong trầm tích các sông này cao hơn so với nghiên cứu này nhưng cũng đều ở mức thấp. Điều này một lần nữa khẳng định các khu vực nghiên cứu chưa bị ô nhiễm KLN và các biện pháp quản lý môi trường cũng đang được triển khai để kiểm soát ô nhiễm nguồn nước.

4. Kết luận

Theo QCVN 43:2012/BTNMT về chất lượng trầm tích, trầm tích sông Hồng đoạn chảy từ phía Nam của Hà Nội đến huyện Nam Trực, tỉnh Nam Định chưa bị ô nhiễm một số kim loại gồm Cu, Pb, Cd, Cr. Tuy nhiên, theo hướng dẫn chất lượng trầm tích tỉnh Ontario, Canada (1993), hơn 50% số mẫu ô nhiễm Cr và Cu và 30% số mẫu ô nhiễm Pb do hàm lượng cao hơn mức độ thấp nhất có ảnh hưởng. Kết quả này chỉ ra nguy cơ ô nhiễm KLN trong trầm tích tại sông Hồng bởi đặc tính bền vững và tích lũy lâu dài của các kim loại. Bên cạnh đó, chỉ số rủi ro sinh thái của các KLN thấp nhất là 1,80 và cao nhất là 11,6 cũng cho thấy mức độ rủi ro sinh thái thấp của tất cả các kim loại tại khu vực nghiên cứu. Đặc biệt, tại một số điểm lấy mẫu, kim loại Cd có chỉ số rủi ro ở mức độ vừa phải.

Trong nghiên cứu này, tuy các kim loại đều chưa bị ô nhiễm và mức độ rủi ro không cao, nhưng do đặc tính khó phân hủy và khả năng tích lũy cao nên vẫn luôn tồn tại các nguy cơ rủi ro tiềm ẩn tác động tiêu cực đến hệ sinh thái. Khu vực hạ lưu sông Hồng chảy qua các tỉnh nằm trong vùng kinh tế trọng điểm của khu vực phía bắc Việt Nam nên đang chịu sức ép nặng nề từ hoạt động kinh tế, xã hội. Các nguồn thải từ hoạt động sản xuất công nghiệp, nông nghiệp sẽ mang theo các chất ô nhiễm vào nguồn nước và tích lũy trong trầm tích gây ảnh hưởng đến hệ sinh thái. Do vậy, kết quả này là cơ sở khoa học để các nhà quản lý đưa ra những chính sách và giải pháp phù hợp giảm thiểu các nguồn thải nội địa, quản lý tốt các nguồn nước thải từ hoạt động công nghiệp, khai khoáng và làng nghề tại lưu vực Đồng bằng sông Hồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ministry of Natural Resources and Environment (2018), *National Environmental Status Report 2018: Water environment in River Basins* (in Vietnamese).

[2] L.N. Da, L.T.P. Quynh, H.T.T. Ha, et al. (2020), "Heavy metals in suspended solids in the Red river system at Chuong Duong bridge (Hanoi)", *Journal of Science and Technology - Hanoi University of Industry*, **56(6)**, pp.114-118 (in Vietnamese).

[3] D.T. Ha, A. Coynel (2014), "Initial results on metal content in Red River water at Son Tay hydrological station", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **36(3)**, pp.281-288 (in Vietnamese).

[4] J.M. Wood (1974), "Biological cycle for toxic elements in the environment", *Science*, **183(4129)**, pp.1049-1052, DOI: 10.1126/science.183.4129.1049.

[5] R. Yu, X. Yuan, Y. Zhao, et al. (2008), "Heavy metal pollution in intertidal sediments from Quanzhou Bay, China", *Journal of Environmental Sciences*, **20(6)**, pp.664-669, DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62110-5.

[6] H. Niu, W. Deng, Q. Wu, et al. (2009), "Potential toxic risk of heavy metals from sediment of the Pearl river in South China", *Journal of Environmental Sciences*, **21(8)**, pp.1053-1058, DOI: 10.1016/S1001-0742(08)62381-5.

[7] S. Veerasingam, R. Venkatachalapathy, T. Ramkumar (2012), "Heavy metals and ecological risk assessment in marine sediments of Chennai, India", *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, **7(2)**, pp.111-124.

[8] T. Ntakirutimana, G. Du, J.S. Guo, et al. (2013), "Pollution and potential ecological risk assessment of heavy metals in a lake", *Polish Journal of Environmental Studies*, **22(4)**, pp.1129-1134.

[9] T.O. Kolawole, A.S. Olatunji, M.T. Jimoh, et al. (2018), "Heavy metal contamination and ecological risk assessment in soils and sediments of an industrial area in southwestern Nigeria", *Journal of Health Pollution*, **8(19)**, DOI: 10.5696/2156-9614-8.19.180906.

[10] M.S. Elias, S. Ibrahim, K. Samuding, et al. (2018), "The sources and ecological risk assessment of elemental pollution in sediment of Linggi estuary, Malaysia", *Marine Pollution Bulletin*, **137**, pp.646-655, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2018.11.006.

[11] G.J. Wilbers, M. Becker, L.T. Nga, et al. (2014), "Spatial and temporal variability of surface water pollution in the Mekong Delta, Vietnam", *Science Total Environment*, **485-486**, pp.653-665, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.03.049.

[12] N.T.T. Hien, W. Zhang, Z. Li, et al. (2016), "Assessment of heavy metal pollution in Red river surface sediments, Vietnam", *Marine Pollution Bulletin*, **113(1-2)**, pp.513-519, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.08.030.

[13] T.N. Nguyen, C. Marchand, E. Strady, et al. (2019), "Metals geochemistry and ecological risk assessment in a tropical mangrove (Can Gio, Vietnam)", *Chemosphere*, **219**, pp.365-382, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.11.163.

[14] S.C. Böddeker, P. Hoelzmann, L.X. Thuyen, et al. (2017), "Ecological risk assessment of a coastal zone in southern Vietnam: Spatial distribution and content of heavy metals in water and surface sediments of the Thi Vai estuary and Can Gio mangrove forest", *Marine Pollution Bulletin*, **114(2)**, pp.1141-1151, DOI: 10.1016/j.marpolbul.2016.10.046.

[15] H.H. Ho, R. Swennen, A.V. Damme (2010), "Distribution and contamination status of heavy metals in estuarine sediments near Cua Ong harbor, Ha Long bay, Vietnam", *Geologica Belgica*, **13(1-2)**, pp.37-47.

[16] E. Suess, P.J. Müller (1979), "Productivity, sedimentation rate, and sedimentary organic matter in the oceans -I. Organic carbon presentation", *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers*, **26(12)**, pp.1347-1362, DOI: 10.1016/0198-0149(79)90003-7.

[17] G. Müller (1979), "Heavy metals in the sediment of the rhine-changes seity", *Umschau in Wissenschaft und Technik*, **79**, pp.778-783.

[18] L. Hakanson (1980), "An ecological risk index for aquatic pollution control - A sedimentological approach", *Water Research*, **14(8)**, pp.975-1001, DOI: 10.1016/0043-1354(80)90143-8.

[19] E.L. Hamliton (2000), "Environmental variables in a holistic evaluation of land contaminated by historic mine wastes: A study of multi-element mine wastes in West Devon, England using arsenic as an element of potential concern to human health", *The Science of the Total*, **249(1-3)**, pp.171-221, DOI: 10.1016/s0048-9697(99)00519-7.

[20] L.T. Trinh (2017), "Accumulation and potential ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments of Han river estuary, Da Nang City", *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **33(3)**, pp.112-119, DOI: 10.25073/2588-1140/vnunst.4667 (in Vietnamese).

[21] L.T. Trinh, K.T.T. Trang, N.T. Trung, et al. (2018), "Heavy metal accumulation and potential ecological risk assessment of surface sediments from Day river downstream", *Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, **34(4)**, pp.140-147, DOI: 10.25073/2588-1094/vnuees.4351 (in Vietnamese).

[22] D.T.T. Anh, C.V. Hoang (2015), "Research on the distribution of some heavy metals in sediments of the Cau river basin", *Journal of Analytical Science*, **20(4)**, pp.36-43 (in Vietnamese).

[23] H.T.T. Thuy, T.T.C. Loan, N.N.H. Vy (2007), "Environmental geochemical research on some heavy metals in river and canal sediments in Ho Chi Minh City", *Science & Technology Development Journal*, **10(1)**, pp.1-10 (in Vietnamese).

 DOI: 10.31276/VJST.64(11).54-58

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành bởi vi khuẩn *Bacillus subtilis*

Nguyễn Thị Hồng Thắm[1, 2*], Nguyễn Thị Lệ Ngọc[1], Nguyễn Công Hà[1]

[1]Khoa Nông nghiệp Thuỷ sản, Trường Đại học Trà Vinh, 126 Nguyễn Thiện Thành, phường 5, TP Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh, Việt Nam
[2]Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ, khu II, đường 3/2, phường Xuân Khánh, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 1/10/2021; ngày chuyển phản biện 5/10/2021; ngày nhận phản biện 27/10/2021; ngày chấp nhận đăng 2/11/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của các yếu tố (pH, nhiệt độ và thời gian lên men) trong quá trình lên men đậu nành bởi vi khuẩn *Bacillus subtilis* tới sự ôxy hoá lipid. Đậu nành được lên men ở các điều kiện khác nhau: pH (6,0, 6,3 - pH tự nhiên của nguyên liệu, 7,0 và 8,0), nhiệt độ (28, 33, 35 - nhiệt độ phòng và 38^{o}C) và thời gian lên men (24, 36, 48 và 60 giờ). Để xác định mức độ ôxy hoá lipid, các thông số liên quan đến sự ôxy hoá như DPPH, IC50, hàm lượng lipid tổng, peroxyt, TBARs, hàm lượng acid béo tự do đã được xác định. Sự ôxy hoá lipid xảy ra mạnh nhất ở pH 6,0, nhiệt độ 35^{o}C và thời gian lên men 60 giờ; sự ôxy hoá xảy ra thấp nhất ở pH 7,0, nhiệt độ 28^{o}C và thời gian lên men 24 giờ.

Từ khóa: ***Bacillus subtilis*, đậu nành, lên men, lipid, ôxy hoá.**

Chỉ số phân loại: **2.10**

1. Mở đầu

Đậu nành (*Glycine max*) được trồng đầu tiên ở Đông Á cách đây hàng nghìn năm, từ lâu đã trở thành nguồn protein quan trọng, bổ sung cho protein ngũ cốc ở các nước châu Á [1]. Lipid đại diện cho một trong những lớp thành phần quan trọng nhất trong đậu nành. Về mặt kinh tế, dầu đậu nành chiếm khoảng 29% sản lượng dầu và mỡ trên thế giới. Lipid đậu nành chủ yếu nằm trong lá mầm đậu nành và chiếm khoảng 20% trọng lượng của nó. Về mặt sinh lý học, lipid đậu nành có nhiều chức năng, bao gồm vai trò là một phần của màng, hoạt động như một nguồn dự trữ năng lượng và làm môi trường dung môi cho nhiều chất hòa tan trong lipid [2]. Đậu nành không chỉ rất giàu protein mà còn chứa các axit béo không bão hòa, đặc biệt là axit linoleic - một axit béo không bão hòa đa ω6 được cho là có lợi cho sức khỏe con người [3]. Trong số các loại đậu, đậu nành là cây họ đậu duy nhất cung cấp một lượng đáng kể axit α-linolenic - một axit béo ω3 thiết yếu [4]. Việc thay thế thực phẩm giàu axit béo bão hòa bằng thực phẩm đậu nành cho thấy sự cải thiện nồng độ cholesterol và giảm nguy cơ bệnh tim mạch vành [5, 6]. Nguy cơ mắc bệnh tim mạch có thể được giảm bớt nhờ một chế độ ăn uống cung cấp nhiều nguồn protein thực vật hơn so với chế độ ăn uống điển hình của người Mỹ gồm các loại thực phẩm protein từ động vật chưa qua chế biến và ít chất béo bão hòa [7]. Thành phần đậu nành đã kích thích sự quan tâm nghiên cứu của các nhà khoa học, nhất là isoflavone - một polyphenol có đặc tính estrogen chứa nhiều trong đậu nành [8]. Ngoài isoflavone và protein, đậu nành là một nguồn cung cấp axit béo không bão hòa, vitamin B, chất xơ, sắt, canxi, kẽm và các hợp chất hoạt tính sinh học khác giúp chúng trở thành một ứng cử viên sáng giá cho một loại thực phẩm chức năng. Hàm lượng chất xơ trong đậu nành chủ yếu là polysaccharides pectic, một loại chất xơ thực vật có thể lên men tốt nhờ hệ vi sinh vật đường ruột [9].

Đậu nành có thể được pha trộn và đun nóng để chiết xuất sữa đậu nành, cũng có thể được xử lý bằng magie clorua hoặc canxi sunphat sữa đông để lấy đậu phụ. Ngoài ra, các phương pháp xử lý lên men khác nhau rất hữu ích để có được natto, tempeh, nước tương và sufu [10]. Quá trình lên men của thực phẩm đậu nành không chỉ ảnh hưởng đến tính chất cảm quan và thời hạn sử dụng mà còn có thể xảy ra những thay đổi về giá trị dinh dưỡng và khả năng tiêu hóa [11]. Ngoài ra, vi sinh vật được sử dụng để lên men có thể cung cấp thêm các đặc tính có lợi cho sức khỏe con người như các chức năng của probiotic [12]. Mặc dù đậu nành được biết là có chứa các yếu tố chống dinh dưỡng, chẳng hạn như phytates, chất ức chế trypsin và lectin [13], hầu hết các sản phẩm đậu nành lên men đã được phân tích chứa một lượng rất nhỏ các yếu tố này, khi so sánh với đậu nành thô [14].

Quá trình ôxy hóa lipid là nguyên nhân chính làm giảm chất lượng của thực phẩm và sản phẩm. Quá trình ôxy hóa có thể xảy ra ở cả triglycerid và phospholipid của thực phẩm vì lipid được chia thành hai lớp chính: lipid phân cực (phospholipid) và lipid trung tính (triglycerid). Quá trình ôxy hóa lipid từ lâu đã được công nhận là một vấn đề lớn trong việc lưu trữ các axit béo trong thực phẩm. Quá trình ôxy hóa xảy ra bởi một số cơ chế phân tử như tạo ra các

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

Factors affecting lipid oxidation in the soybean fermentation by *Bacillus subtilis*

Thi Hong Tham Nguyen[1, 2*], Thi Le Ngoc Nguyen[1], Cong Ha Nguyen[1]

[1]Agriculture and Aquaculture Faculty, Tra Vinh University, 126 Nguyen Thien Thanh Street, Ward 5, Tra Vinh City, Tra Vinh Province, Vietnam
[2]Department of Food Technology, College of Agriculture, Can Tho University, Area II, 3/2 Street, Xuan Khanh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 1 October 2021; revised 27 October 2021; accepted 2 November 2021

Abstract:

The study aimed to determine lipid oxidation affected by factors (pH, fermentation temperature, fermentation time) during soybean fermentation by *Bacillus subtilis*. Soybean is fermented at different fermentation conditions: pH (6.0, 6.3 - natural pH of raw materials, 7.0, 8.0), temperature (28, 33, 35 - room temperature, and 38°C), and fermentation time (24, 36, 48, and 60 hours). To determine the degree of lipid oxidation, the parameters related to oxidation such as DPPH, IC50, total lipid content, peroxide, TBARs, and free fatty acid content were determined. The most intense lipid oxidation occur at pH 6.0, 35°C, and 60 hours of fermentation time. The lowest lipid oxidation occurred at pH 7.0, temperature 28°C, and fermentation time of 24 hours.

Keywords: ***Bacillus subtilis*, fermentation, lipid, oxidation, soybean.**

Classification number: **2.10**

tiền chất ôxy phản ứng và các gốc tự do. Quá trình ôxy hóa ảnh hưởng đến nhiều tương tác giữa các thành phần thực phẩm, dẫn đến tạo các sản phẩm mong muốn và không mong muốn. Lipid thực phẩm là thành phần dễ bị ôxy hóa nhất, do đó phản ứng ôxy hóa là một trong những nguồn gây hư hỏng chính xảy ra trong quá trình sản xuất, bảo quản, phân phối thực phẩm. Các sản phẩm ôxy hóa lipid có mặt khắp nơi trong thực phẩm, mặc dù có nhiều sự khác biệt về chủng loại và mức độ hiện tại của chúng. Mặc dù mức độ của các hợp chất này nói chung là thấp, vấn đề ôxy hóa lipid làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng của một số sản phẩm thực phẩm và hạn chế thời hạn sử dụng của một số sản phẩm khác. Sự thay đổi mức độ ôxy hóa có thể gây ôi thiu như mất mùi vị, mất màu, thay đổi giá trị dinh dưỡng và có thể tạo ra các hợp chất độc hại, có thể gây hại cho sức khỏe của người tiêu dùng. Chất chống ôxy hóa và chất chelat là những chất ức chế hữu ích nhất của quá trình ôxy hóa lipid. Tốc độ ôxy hóa phụ thuộc vào mức độ không bão hòa và tăng khi tăng liên kết đôi của axit béo. Khi ôxy phản ứng với lipid không bão hòa, nhiều loại sản phẩm ôxy hóa được tạo ra bởi quá trình peroxy hóa lipid [15].

Hiện nay, các peroxit lipid khác nhau được tạo ra bởi quá trình peroxy hóa lipid như vậy. Tuy nhiên, trong số các loại thực phẩm truyền thống lâu đời, có những loại thực phẩm có hương vị tốt được tạo ra bằng quá trình peroxy hóa lipid. Vì vậy, các peroxit lipid được tạo ra bởi quá trình peroxy hóa lipid cũng có thể có lợi. Các đặc tính của thực phẩm có thể được cải thiện bằng cách sử dụng tốt hơn các đặc tính của peroxit lipid. Nghiên cứu hiện tại đã cung cấp một phát hiện thú vị: khi lipoxygenase được thêm vào trong quá trình lên men bột bánh mì, quá trình lên men của bột nhào đã được thúc đẩy [16].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* được phân lập từ Phòng thí nghiệm sinh học của Khoa Nông nghiệp Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh); đậu nành mua từ Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất: mua của Công ty TNHH thiết bị - hóa chất khoa học kỹ thuật An Khánh (Cần Thơ) và Công ty TNHH công nghệ đồng hành phát (TP Hồ Chí Minh).

Quá trình lên men đậu nành: Đậu nành được ngâm qua đêm cho lớp vỏ trương nở tạo điều kiện cho việc tách vỏ dễ dàng hơn đồng thời tạo điều kiện cho quá trình hấp chín đậu nhanh, đồng đều. Sau khi tách vỏ, đậu nành được rửa lại nhiều lần cho đến khi không còn mùi của nước ngâm và cho vào nồi hấp 45 phút đến khi hạt đậu nành chín mềm, làm nguội và cho vào bình tam giác (50 g đậu nành/bình). Các chủng *Bacillus* spp. được nuôi trên hạt đậu nành đã hấp chín với tỷ lệ giống 1% (mật số vi khuẩn là 10^4 CFU/g), chiều dày môi trường 2 cm, nuôi ủ ở nhiệt độ 37°C, thời gian lên men 24 giờ để thu enzyme protease và nattokinase [17]. Sản phẩm enzyme thô thu được cho vào túi ép chân không và bảo quản lạnh.

Có 3 thí nghiệm gồm: xác định pH, nhiệt độ và thời gian lên men. Ở từng thí nghiệm sẽ thay đổi các thông số tương ứng, các thông số còn lại được cố định.

2.2. Phương pháp

TBARs (Thiobarbituric acid reactive substances) được phân tích theo phương pháp của P.J. Ke và A.D. Woyewoda (1979) [18]: chuẩn bị dung dịch mẫu bằng cách cân 2 g đậu nành lên men (được nghiền mịn) và trích ly 2 lần với 10 ml dung dịch TCA 5%, mỗi lần vortex 1 phút, thu dịch chiết. Phân tích mẫu được thực hiện bằng cách lấy 1 ml mẫu và 5 ml dung dịch TBA (180 ml TBA chuẩn, 120 ml chloroform, 15 ml Na_2SO_3 0,3 M) cho vào ống nghiệm, đem đi vortex khoảng 15 giây rồi đun cách thủy trong 45 phút; làm lạnh nhanh ống nghiệm bằng nước đá, cho vào mỗi ống nghiệm 2,5 ml dung dịch TCA 0,28 M và vortex 15 giây. Sau đó, dung dịch được ly tâm với tốc độ 2500 vòng/phút ở 25°C

trong 5 phút; sau khi ly tâm hút lớp dung dịch phía trên đem so màu trên máy so màu quang phổ ở bước sóng 538 nm. Mặt khác, chuẩn bị thêm các ống chứa mẫu đậu nành lên men tương ứng như trên rồi cho vào 1 ml TEP 200 µM và tiến hành chiết tách tương tự để tính hiệu suất thu hồi. Hàm lượng TBARs được tính thông qua đường chuẩn TEP.

Khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết được xác định theo H.Y. Fu và D.E. Shieh (2001) [19] với một vài hiệu chỉnh nhỏ. 3 g mẫu được trích ly qua đêm ở -18°C với 27 ml methanol. Các hỗn hợp được ly tâm bằng máy Hermle Labotechnik Z323K ở 6.000 g trong 10 phút. Hút 3 ml chất nổi phía trên vào ống nghiệm. Sau đó thêm vào 1 ml dung dịch DPPH 0,1 mM (pha trong methanol 99,5%), lắc đều và để yên trong bóng tối 30 phút. Mẫu luôn được giữ tránh ánh sáng trực tiếp trong suốt quá trình phân tích. Độ hấp thu quang học được đo ở bước sóng 517 nm. Khả năng khử gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau:

$$DPPH\ (\%) = 100 \times (ACT - ASP)/ACT$$

trong đó: ACT là độ hấp thu quang học của mẫu trắng không chứa dịch chiết; ASP là độ hấp thu quang học của mẫu có chứa dịch chiết.

Kết quả báo cáo bởi giá trị IC50 là nồng độ dịch chiết cho khả năng khử gốc tự do DPPH là 50%. Từ tỷ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, phương trình tương quan tuyến tính được xây dựng, từ đó xác định giá trị IC50 để làm cơ sở so sánh khả năng kháng ôxy hóa giữa các mẫu. Mẫu có giá trị IC50 càng thấp thì hoạt tính kháng ôxy hóa càng cao.

Phân tích peroxit theo TCVN 6121:2010. Phần mẫu thử được hòa tan trong isooctan và axit axetic rồi bổ sung kali iodua. Iôt được giải phóng bởi các peroxit được xác định bằng chuẩn độ iôt (quan sát bằng mắt thường) với chất chỉ thị là hồ tinh bột và dung dịch chuẩn natri thiosulfat. Điểm kết thúc chuẩn độ được xác định bằng phương pháp chuẩn độ iôt (quan sát bằng mắt thường).

Phân tích lipid tổng: cân khoảng 3 g mẫu đậu nành lên men (đã được nghiền mịn) đã sấy ẩm đến khối lượng không đổi, gói lại bằng giấy lọc (đã sấy và cân khối lượng), cho gói mẫu vào ống chiết (Soxhlet). Sau đó cho dung môi (ether 60-90) vào khoảng 2/3 bình cầu và bật hệ thống Soxhlet, thời gian chiết béo khoảng 24 giờ. Kiểm tra xem đã trích ly hết chất béo chưa bằng cách dùng đũa thủy tinh lấy 1 giọt dầu từ hệ thống Soxhlet thử trên mặt kính đồng hồ, nếu không thấy vết loang xem như quá trình trích ly đã hoàn toàn. Sau khi quá trình cất béo kết thúc, các gói mẫu được sấy ở nhiệt độ 105°C đến khối lượng không đổi và đem cân khối lượng.

Hàm lượng lipid tổng được tính theo công thức:

$$\%\ lipid = (m_1 - m_2) \times 100/m_1$$

trong đó: m_1: khối lượng mẫu cân phân tích (g); m_2: khối lượng mẫu sau khi trích béo được sấy ở 105°C.

Phân tích acid béo tự do FFA theo TCVN 6127:2010: mẫu thử được hòa tan trong hỗn hợp dung môi thích hợp và các axit có mặt được chuẩn độ bằng dung dịch kali hoặc natri hydroxit trong etanol hoặc trong metanol.

2.3. Xử lý thống kê

Sử dụng phương pháp phân tích phương sai ANOVA nhằm kiểm định độ tin cậy với mức ý nghĩa 5% để đánh giá sự khác biệt của các kết quả trong các thí nghiệm, sử dụng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XVI.

3. Kết quả và bàn luận

Trong quá trình lên men, môi trường lên men có ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng sản phẩm, đặc biệt là các sản phẩm chứa nhiều chất béo dễ bị ôxy hoá nên cần kiểm soát quá trình lên men để hạn chế thấp nhất sự ôxy hoá lipid. Trong phạm vi bài báo này, chúng tôi tập trung vào các yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian lên men ảnh hưởng đến sự ôxy hoá lipid. Để xác định mức độ ôxy hoá lipid như thế nào thì các thông số liên quan đến sự ôxy hoá như DPPH, IC50, hàm lượng lipid tổng, peroxyt, TBARs, hàm lượng acid béo tự do đã được xác định.

Theo P. Kulkarni và cs (2020) [20], các thông số khác nhau như giá trị Peroxide (PV), Anisidine (AV), Thiobarbituric acid (TBARs) và Iodine (IV) là những chỉ số có thể đánh giá chất lượng của dầu.

3.1. Ảnh hưởng của pH đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành

pH có ý nghĩa quan trọng trong quá trình lên men, độ pH ảnh hưởng nhiều đến năng suất cũng như sự hình thành sản phẩm, quá trình lên men tốt khi các điều kiện lên men thích hợp, trong đó có pH, khi đó các sản phẩm chính là chủ yếu, các sản phẩm phụ và quá trình ôxy hoá bị hạn chế.

Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành.

pH	DPPH (%)	IC_{50} (mg/g CKNL)	Hàm lượng lipid tổng (%)	Peroxyt (mEq/kg lipid), CBK	TBARs (µmol TBARs/g) hoặc MDA (mg/kg), CBK	Hàm lượng acid béo tự do (%, acid oleic), CBK
6,0	$44,0^{c}$±0,49	$0,52^{a}$±0,52	$24,52^{b}$±0,4	$1,8^{a}$±0,14	$30,59^{c}$±0,06	$1,88^{c}$±0,33
6,3	$52,0^{a}$±0,68	$0,43^{c}$±0,43	$26,2^{ab}$±2,33	$1,21^{b}$±0,23	$49,15^{a}$±0,22	$3,01^{b}$±0,33
7,0	$51,6^{a}$±0,41	$0,38^{d}$±0,38	$27,11^{ab}$±1,1	$0,81^{c}$±0,09	$35,29^{b}$±0,53	$3,38^{ab}$±0,56
8,0	$47,7^{b}$±3,32	$0,49^{b}$±0,49	$28,74^{a}$±1,8	$1,78^{a}$±0,09	$35,85^{b}$±0,2	$3,76^{a}$±0,33

Ghi chú: CKNL: chất khô nguyên liệu; CBK: căn bản khô; các chữ cái khác nhau trong cùng một cột (hoặc một hàng) thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử LSD.

Kết quả bảng 1 cho thấy, ở pH 6,0 sự ôxy hoá lipid xảy ra rất mạnh, ở điều kiện này DPPH thấp nhất (44%), hàm lượng lipid tổng, acid béo tự do, TBARs thấp nhưng IC_{50} và hàm lượng peroxyt cao nhất (lần lượt là 0,52 mg/g CKNL và 1,8 mEq/kg lipid). Ở pH 6,3, DPPH cao nhất 52% nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với ở pH 7,0 (DPPH 51,6%), trong khi đó các thông số IC_{50}, peroxyt, TBARs thấp hơn ở pH 6,0 và hàm lượng lipid tổng, acid béo tự do cao hơn, điều đó cho thấy tại pH 6,3 sự ôxy hoá lipid xảy ra mạnh hơn ở pH 7,0. Kết qua bảng 1 còn cho thấy sự ôxy hoá lipid giảm từ pH 6,0 đến 7,0, nhưng đến pH 8,0 thì sự ôxy hoá lipid tăng trở lại. Để hạn chế sự ôxy hoá lipid nên điều chỉnh pH môi trường lên men về 7,0. Điều này tương tự khi khảo sát sự ôxy hoá lipid trong thịt cá lóc nuôi, kết quả sự ôxy hóa lipid và protein của cơ thịt cá lóc được hạn chế khi pH của dung dịch muối ở khoảng trung tính [21].

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến sự ôxy hoá lipid

Nhiệt độ lên men tối thích sẽ cho sản phẩm có chất lượng tốt, *Bacillus subtilis* là vi khuẩn chịu nhiệt, theo các tài liệu nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam, trong điều kiện nhiệt độ 30-37°C, loài vi khuẩn này sinh trưởng và phát triển tốt nhất [22]. Do đó, mỗi quá trình lên men có nhiệt độ lên men tối ưu, khi nhiệt độ vượt qua một giới hạn nhất định thì quá trình lên men sẽ giảm, các sản phẩm phụ sinh ra nhiều và đặc biệt là sự ôxy hoá xảy ra mạnh mẽ.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành.

Nhiệt độ lên men (°C)	DPPH (%)	IC_{50} (mg/g CKNL)	Hàm lượng lipid tổng (%)	Peroxyt (mEq/ kg lipid), CBK	TBARs (µmol TBARs/g) hoặc MDA (mg/kg), CBK	Hàm lượng acid béo tự do (%, acid oleic), CBK
28	$46,1^{ab}$±0,31	$0,62^{b}$±0,62	$24,56^{d}$±0,67	$1,34^{b}$±0,05	$13,83^{d}$±0,02	$3,76^{a}$±0,86
33	$47,2^{a}$±1,66	$0,96^{ab}$±0,96	$29,2^{c}$±0,54	$3,28^{a}$±0,47	$19,18^{c}$±0,13	$4,14^{a}$±0,33
35	$43,4^{b}$±1,95	$1,0^{a}$±1,0	$30,86^{b}$±0,82	$3,17^{a}$±0,31	$31,55^{a}$±0,21	$3,2^{a}$±0,33
38	$44,5^{ab}$±1,81	$0,47^{c}$±0,47	$33,17^{a}$±0,47	$3,11^{a}$±0,34	$22,19^{b}$±0,12	$4,14^{a}$±0,86

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột (hoặc một hàng) thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử LSD.

Kết quả bảng 2 cho thấy, sự ôxy hoá xảy ra mạnh nhất ở nhiệt độ 35°C và yếu nhất ở 28°C. Tuy nhiên, sự ôxy hoá lipid lại xảy ra mạnh nhất ở cả 2 nhiệt độ này (chỉ số peroxyt ở 2 nhiệt độ 33 và 35°C lần lượt là 3,28 và 3,17 mEq/kg lipid, không có sự khác biệt ý nghĩa ở mức p=0,05), nhưng nếu xét thêm chỉ số TBARs thì rõ ràng sự ôxy hoá lipid xảy ra mạnh nhất ở 35°C (TBARs cao nhất 31,55 µmol TBARs/g) và thấp nhất ở 28°C (peroxyt 1,34 mEq/kg lipid và TBARs 13,83 µmol TBARs/g, cả 2 chỉ số này có giá trị thấp nhất ở nhiệt độ này). Hàm lượng acid béo tự do không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các nhiệt độ lên men khác nhau. Ở nhiệt độ 38°C, sự ôxy hoá lipid giảm nhưng không đáng kể. Qua đó cho thấy, sự ôxy hoá lipid tăng khi nhiệt độ lên men tăng từ 28 đến 35°C và giảm khi nhiệt độ lên men vượt quá 35°C, điều này tương tự các nghiên cứu của K. Liu và cs (2019) [23] là nhiệt độ cao dẫn đến mức độ ôxy hóa lipid cao và mất chất dinh dưỡng; M. Sajib và cs (2020) [24] là khi tăng nhiệt độ và thời gian ủ cá trích từ 17 đến 37°C sự ôxy hoá lipid cũng tăng.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sự ôxy hoá lipid

Mỗi một quá trình lên men có thời gian lên men thích hợp, khi đó lượng sản phẩm hình thành cao nhất và nếu kéo dài thời gian lên men thì sản phẩm cũng không được tạo ra thêm, khi đó các cơ chất gần như cạn kiệt và quá trình lên men kết thúc.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành.

Thời gian lên men (giờ)	DPPH (%)	IC50 (mg/g CKNL)	Hàm lượng lipid tổng (%)	Peroxyt (mEq/kg lipid), CBK	TBARs (µmol TBARs/g) hoặc MDA (mg/kg), CBK	Hàm lượng acid béo tự do (%, acid oleic), CBK
24	$52,5^{a}$ ±1,46	$0,78^{a}$±0,78	$25,59^{b}$±1,09	$2,15^{d}$±0,09	$61,7^{c}$±0,12	$3,95^{a}$±0,56
36	$45,9^{b}$±0,81	$0,39^{b}$±0,39	$32,7^{a}$±2,5	$2,36^{c}$±0,09	$59,59^{c}$±0,33	$2,26^{b}$±0,56
48	$42,4^{c}$±1,3	$0,77^{a}$±0,77	$33,19^{a}$±0,96	$2,51^{b}$±0,09	$75,95^{a}$±0,36	$1,5^{bc}$±0,33
60	$42,0^{c}$±1,38	$0,34^{c}$±0,34	$30,43^{a}$±0,55	$3,41^{a}$±0,05	$69,14^{b}$±0,32	$1,32^{c}$±0,33

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trong cùng một cột (hoặc một hàng) thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử LSD.

Kết quả bảng 3 cho thấy, quá trình ôxy hoá tăng dần khi thời gian lên men kéo dài từ 24 đến 60 giờ, 48 giờ lên men sự ôxy hoá đã bắt đầu xảy ra mạnh, IC50 0,77 mg/g CKNL và chỉ số TBARs 75,95 µmol TBARs/g đạt giá trị cao nhất so với các thời gian lên men khác. Tuy nhiên, sự ôxy hoá lipid thì xảy ra mạnh nhất ở 60 giờ, chỉ số peroxyt cao nhất ở thời gian này (3,41 mEq/kg lipid), trong khi chỉ số TBARs bắt đầu giảm.

4. Kết luận

Qua khảo sát các điều kiện lên men đậu nành bởi vi khuẩn *Bacillus subtilis*, sự oxy hoá lipid xảy ra mạnh mẽ ở pH 6,0, nhiệt độ càng cao và thời gian lên men càng dài sự ôxy hoá lipid càng tăng và sự ôxy hoá lipid xảy ra mạnh nhất ở nhiệt độ 35°C và thời gian lên men 60 giờ. Sự ôxy hoá lipid xảy ra thấp nhất ở pH 7,0, nhiệt độ 28°C và thời gian lên men 24 giờ. Cần có các nghiên cứu ức chế sự ôxy hoá trong quá trình lên men để hạn chế sự thất thoát các chất dinh dưỡng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án phát triển Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 từ nguồn vốn vay ODA của Nhật Bản. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H. El-Shemy (2011), *Soybean and Health*, Intechopen, 514pp.

[2] J.A. Gerde, P.J. White (2008), "7 - lipids", *AOCS Press*, pp.193-227, DOI: 10.1016/B978-1-893997-64-6.50010-X.

[3] M. Friedman, D.L. Brandon (2001), "Nutritional and health benefits of soy proteins", *J. Agric. Food Chem.*, **49(3)**, pp.1069-1086, DOI: 10.1021/jf0009246.

[4] J. Kang, T.M. Badger, M.J.J. Ronis, et al. (2010), "Non-isoflavone phytochemicals in soy and their health effects", *J. Agric. Food Chem.*, **58(14)**, pp.8119-8133, DOI: 10.1021/jf100901b.

[5] M.U. Jakobsen, E.J. O'Reilly, B.L. Heitmann, et al. (2009), "Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A pooled analysis of 11 cohort studies", *Am. J. Clin. Nutr.*, **89(5)**, pp.1425-1432, DOI: 10.3945/ajcn.2008.27124.

[6] D. Mozaffarian, R. Micha, S. Wallace (2010), "Effects on coronary heart disease of increasing polyunsaturated fat in place of saturated fat: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials", *PLOS Med.*, **7(3)**, DOI: 10.1371/journal.pmed.1000252.

[7] C.K. Richter, A.C. Skulas-Ray, C.M. Champagne, et al. (2015), "Plant protein and animal proteins: Do they differentially affect cardiovascular disease risk?", *Adv. Nutr.*, **6(6)**, pp.712-728, DOI: 10.3945/an.115.009654.

[8] G. Rizzo, L. Baroni (2018), "Soy, soy foods and their role in vegetarian diets", *Nutrients.*, **10(1)**, DOI: 10.3390/nu10010043.

[9] F. Yamaguchi, Y. Ota, C. Hatanaka (1996), "Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean *okara* and enzymatic analysis of their structures", *Carbohydr. Polym.*, **30(4)**, pp.265-273, DOI: 10.1016/S0144-8617(96)00046-X.

[10] K. Zaheer, M.H. Akhtar (2017), "An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health", *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **57(6)**, pp.1280-1293, DOI: 10.1080/10408398.2014.989958.

[11] W.P. Hammes (1991), "Fermentation of non-dairy foods", *Food Biotechnol.*, **5(3)**, pp.293-303, DOI: 10.1080/08905439109549811.

[12] K.J. Heller (2001), "Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms", *Am. J. Clin. Nutr.*, **73(2)**, pp.374s-379s, DOI: 10.1093/ajcn/73.2.374s.

[13] H. Licandro, P.H. Ho, T.K.C. Nguyen, et al. (2019), "How fermentation by lactic acid bacteria can address safety issues in legumes food products?", *Food Control*, **110**, DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106957.

[14] R.L. Anderson, W.J. Wolf (1995), "Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing", *J. Nutr.*, **125(3)**, pp.581S-588S, DOI: 10.1093/jn/125.suppl_3.581S.

[15] M. Ahmed, J. Pickova, T. Ahmad, et al. (2016), "Oxidation of lipids in foods", *Sarhad J. Agric.*, **32(3)**, pp.230-238, DOI: 10.17582/journal.sja/2016.32.3.230.238.

[16] P.V. Hung, T. Maeda, S. Yamamoto, et al. (2012), "Effects of germination on nutritional composition of waxy wheat", *J. Sci. Food Agric.*, **92(3)**, pp.667-672, DOI: 10.1002/jsfa.4628.

[17] L.T.B. Phuong, V.T. Hanh, T.T. Phong, et al. (2012), "Isolation and selection of some *Bacillus subtilis* strains that produce nattokinase", *Vietnam Journal of Biology*, **34(3SE)**, pp.99-104 (in Vietnamese).

[18] P.J. Ke, A.D. Woyewoda (1979), "Microdetermination of thiobarbituric acid values in marine lipids by a direct spectrophotometric method with a monophasic reaction system", *Anal. Chim. Acta*, **106(2)**, pp.279-284, DOI: 10.1016/S0003-2670(01)85011-X.

[19] H.Y. Fu, D.E. Shieh (2001), *Antioxidant and Free Radical Scavenging*, Rutgers Universiry, **9**, pp.35-46.

[20] P. Kulkarni (2020), "Oxidation of oil and its associated losses in poultry nutrition - engormix", *Engormix*, https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/oxidation-oil-its-associated-t45429.htm, accessed 25 August 2021.

[21] T.B. Long, N.V. Muoi, T.T. Truc (2019), "Effect of salting on lipid oxidation and protein oxidation of snakehead fish (*Channa striata*) meat", *CTU Journal of Science*, **55**, pp.301-310, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2019.074 (in Vietnamese).

[22] H.T.T. Thy, N.N.T. Thuy, V.M. Son (2011), "Investigate some characteristics of *Bacillus subtilis* B20.1 for probiotic product to prevent disease caused by edwardseilla ictaluri on stripe catfish (*Pangasius hypophthalmus*) cultured in intensive farms", *Proceedings of the National Aquatic Science Conference*, pp.225-233 (in Vietnamese).

[23] K. Liu, Y. Liu, F. Chen (2019), "Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts", *Food Sci. Nutr.*, **7(7)**, pp.2280-2290, DOI: 10.1002/fsn3.1069.

[24] M. Sajib, E. Albers, M. Langeland, et al. (2020), "Understanding the effect of temperature and time on protein degree of hydrolysis and lipid oxidation during ensilaging of herring (*Clupea harengus*) filleting coproducts", *Sci. Rep.*, **10(1)**, DOI: 10.1038/s41598-020-66152-0.

Cải thiện khả năng sống sót của *Lactobacillus plantarum* VAL6 bằng đáp ứng thích nghi với sốc môi trường

Nguyễn Hữu Thanh[1*], Nguyễn Thành Dũng[2], Nguyễn Phú Thọ[1] Nguyễn Thị Tố Uyên[3], Bùi Nhi Bình[3], Phạm Thúy Vy[3], Nguyễn Hoàng Tính[3], Đặng Chí Thiện[3], Nguyễn Thị Bích Như[3]

[1]Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 18 Ung Văn Khiêm, phường Đông Xuyên, TP Long Xuyên, tỉnh An Giang, Việt Nam
[2]Trường THPT Nguyễn Trung Trực - Kiên Giang, 393 Nguyễn Bỉnh Khiêm, phường Vĩnh Thanh, TP Rạch Giá, tỉnh Kiên Giang, Việt Nam
[3]Trung tâm Ứng dụng tiến bộ Khoa học và Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ Cần Thơ, 166 Nguyễn Văn Cừ, phường An Bình, quận Ninh Kiều, TP Cần Thơ, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/9/2021; ngày chuyển phản biện 13/9/2021; ngày nhận phản biện 1/10/2021; ngày chấp nhận đăng 14/10/2021

Tóm tắt:

Để chứng minh sự thích nghi của vi khuẩn lactic (LAB) với sốc môi trường có thể cải thiện khả năng sống sót của tế bào trong quá trình sấy đông khô, chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* VAL6 được nuôi cấy dưới các điều kiện gây sốc khác nhau như nhiệt độ, pH và sự tăng nồng độ CO_2. Kết quả phân tích mật số cho thấy, vi khuẩn này có khả năng sống sót ở các điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH 2,5, nhiệt độ 47°C và điều kiện yếm khí do CO_2 tạo ra. Đặc biệt, việc nuôi cấy tăng cường CO_2 có thể kích thích làm tăng mật số của *L. plantarum* VAL6 (đạt 9,4 so với 9 LogCFU/ml ở điều kiện nuôi cấy bình thường). Sau khi tế bào được thích nghi với sốc môi trường ở pH 3,5, tỷ lệ sống sót sau sấy đông của *L. plantarum* VAL6 đạt cao nhất là 28% (cao hơn khoảng 2.500 lần so với đối chứng không gây sốc). Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng sốc môi trường để cải thiện tỷ lệ sống sót của chủng giống LAB khởi động cho các ứng dụng thực phẩm.

Từ khóa: ***Lactobacillus plantarum*, sốc môi trường, vi khuẩn lactic.**

Chỉ số phân loại: **2.10**

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, probiotic đã được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghệ thực phẩm và dược phẩm nhờ những lợi ích sức khỏe mà nó mang lại. Nhiều chế phẩm probiotic thương mại hiện nay là thành viên của LAB [1, 2]. Nhiều LAB quen thuộc và được công nhận an toàn thuộc chi *Lactobacillus*, thường được sử dụng trong quá trình lên men rau, trái cây và sữa [3]. *Lactobacillus* cũng có mặt như một hệ vi sinh vật niêm mạc bình thường của người và động vật. Chúng chủ yếu là ưa hoặc kỵ khí, không gây bệnh và thích điều kiện có tính axit của đường tiêu hóa. Các nghiên cứu cho thấy tiêu thụ lợi khuẩn *Lactobacillus* giúp duy trì sức khỏe và ngăn ngừa nhiễm trùng đường ruột [4]. Do đó, các loài *Lactobacillus* được sử dụng phổ biến nhất trong các chế phẩm probiotic bao gồm: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri* và *Lactobacillus rhamnosus* [5, 6].

Trong các ứng dụng thực phẩm và dược phẩm, chế phẩm probiotic dạng bột vi khuẩn sẽ thuận tiện hơn trong vận chuyển và kết hợp vào các hoạt động chế biến khác như phối trộn và đóng viên [7, 8]. So với sản phẩm dạng lỏng, chế phẩm dạng bột có lợi thế trong việc duy trì hoạt động của các thành phần có hoạt tính sinh học, giúp kéo dài thời hạn sử dụng của sản phẩm [9]. Tuy nhiên, hiệu suất sản xuất và mật số sống sót của LAB trong quá trình sấy khô bảo quản thường không cao nên giá thành sản xuất cao và thời gian bảo quản ngắn. Một nghiên cứu đã chứng minh khả năng sống sót của *L. plantarum* sau khi sấy phun chỉ khoảng 0,85% [10]. Tỷ lệ sống sót sau sấy thấp, thời gian bảo quản ngắn nên sẽ đẩy giá thành lên rất cao, làm hạn chế khả năng sử dụng của chế phẩm probiotic.

Sự sống sót của vi khuẩn probiotic trong quá trình sản xuất và sử dụng phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau, chẳng hạn như lựa việc chọn chủng, điều kiện nuôi cấy, môi trường lên men, điều kiện sấy khô và lựa chọn chất nền thực phẩm để đảm bảo vi khuẩn sống sót đi đến đường ruột. Trạng thái sinh lý thích nghi với môi trường nuôi cấy cũng có thể là một yếu tố chính ảnh hưởng đến khả năng tồn tại của vi khuẩn probiotic. Chẳng hạn như cảm ứng thích nghi với các sốc môi trường có thể cải thiện khả năng chống lại quá trình lạnh đông và làm khô ở vi khuẩn. Để tạo ra phản ứng thích nghi của tế bào, người ta đã cố gắng nuôi cấy *Lactobacillus* trong các điều kiện dưới ngưỡng gây chết, bao gồm sử dụng nhiệt độ cao và thấp, thay đổi pH, ôxy và áp suất thẩm thấu, cũng như bổ sung các chất ức chế như muối mật [11-13].

Trong nghiên cứu này, để chứng minh sự thích nghi của LAB với sốc môi trường có thể cải thiện khả năng sống sót của tế bào trong quá trình sấy đông khô, chủng vi khuẩn

[*]Tác giả liên hệ: Email: nhuuthanh@agu.edu.vn

Improving the viability of *Lactobacillus plantarum* VAL6 using environmental-stress adaptation

Huu Thanh Nguyen[1*], Thanh Dung Nguyen[2], Phu Tho Nguyen[1], Thi To Uyen Nguyen[3], Nhi Binh Bui[3], Thuy Vy Pham[3], Hoang Tinh Nguyen[3], Chi Thien Dang[3], Thi Bich Nhu Nguyen[3]

[1]An Giang University, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 18 Ung Van Khiem Street, Dong Xuyen Ward, Long Xuyen City, An Giang Province, Vietnam
[2]Nguyen Trung Truc High School - Kien Giang, 393 Nguyen Binh Khiem Street, Vinh Thanh Ward, Rach Gia City, Kien Giang Province, Vietnam
[3]Science and Technology Application Center, Can Tho City Department of Science and Technology, 166 Nguyen Van Cu Street, An Binh Ward, Ninh Kieu District, Can Tho City, Vietnam

Received 8 September 2021; revised 1 October 2021; accepted 14 October 2021

Abstract:

To demonstrate the adaptation of lactic acid bacteria to environmental stresses can improve cell viability during freeze-drying, the *Lactobacillus plantarum* VAL6 strain was cultured under different stress conditions, including temperature, pH, and increase in CO_2 concentration. The results of densitometry analysis showed that the strain was able to survive in harsh environmental conditions such as at pH 2.5, the temperature at 47°C, and in anaerobic conditions created by CO_2. In particular, the CO_2 intensification culture could stimulate an increase in the density of *L. plantarum* VAL6, reaching 9.4 compared to 9 LogCFU/ml under normal culture conditions. After cells were adapted to environmental stress at pH 3.5, the highest survival rate after freeze-drying of *L. plantarum* VAL6 was 28% (2,500 times higher than that of the control). The results showed the potential to use environmental stresses to increase the survival rate of starter lactic acid bacteria strains for food applications.

Keywords: **environmental stress, lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum.***

Classification number: **2.10**

L. plantarum VAL6 đã được nuôi cấy trong các điều kiện gây sốc môi trường khác nhau bao gồm nhiệt độ, pH và sự tăng nồng độ CO_2. Sự cải thiện khả năng sống sót được đánh giá thông qua sự thay đổi mật số của vi khuẩn trong suốt quá trình gây sốc và tỷ lệ sống sót sau khi sấy đông khô.

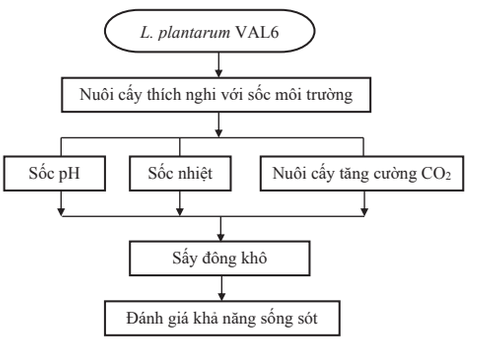
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *L. plantarum* VAL6 được cung cấp từ Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Nông nghiệp và Tài nguyên thiên nhiên, Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh. Thành phần môi trường Man Rogosa Sharpe (MRS) nuôi cấy vi khuẩn [14]: Yeast extract 2%; Peptone 1%; Glucose 2%; NaCl 0,5%; K_2HPO_4 0,2%; $MgSO_4$ 0,02%; $MnSO_4$ 0,004%; Tween 80 0,1%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm gây sốc môi trường: Các thí nghiệm gây sốc môi trường được thực hiện độc lập trong Bioreactor 5 l (BIOSTAT, Sartorius Stedim, Germany). Cụ thể, 5 l môi trường MRS được cấy với 100 ml dịch giống vi khuẩn (OD_{595}=1,5). Thực hiện nuôi cấy ở điều kiện bình thường (pH=6,8, nhiệt độ 37°C và tốc độ khuấy được đặt ở 250 vòng/phút) khoảng 24 giờ. Việc nuôi cấy thích nghi với sốc môi trường được thực hiện như mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm gây sốc môi trường.

Để đánh giá ảnh hưởng của sốc pH lên khả năng sống sót của vi khuẩn, sau 24 giờ nuôi cấy ở điều kiện bình thường, các nuôi cấy được xử lý ở các pH bằng 2,5; 3; 3,5; 8; 8,5 và 9. Các mốc thời gian xử lý là 1, 3, 5 và 7 giờ.

Để đánh giá ảnh hưởng của sốc nhiệt lên khả năng sống sót của vi khuẩn, sau 24 giờ nuôi cấy ở điều kiện bình thường, các nuôi cấy được xử lý ở các nhiệt độ 15, 25, 42 và 47°C. Các mốc thời gian xử lý là 1, 3, 5 và 7 giờ.

Thí nghiệm tăng nồng độ CO_2 được thực hiện ở giai đoạn đầu của nuôi cấy. Ngay sau khi chủng giống đầu tiên đưa vào nuôi cấy, CO_2 được cung cấp liên tục với tốc độ 50 cm^3/lít môi trường/phút. Các nghiệm thức về thời gian tăng cường CO_2 được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm nuôi cấy tăng cường CO_2.

Nghiệm thức	Thời gian sục CO_2 (giờ)	Thời gian không sục CO_2 (giờ)	Tổng thời gian nuôi cấy (giờ)
Đối chứng	0	24	24
Xử lý 1 giờ	1	23	24
Xử lý 2 giờ	2	22	24
Xử lý 4 giờ	4	20	24
Xử lý 24 giờ	24	0	24

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn để sấy đông khô: Quá trình đông khô được thực hiện bằng cách ly tâm 10 ml dung dịch huyền phù tế bào ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để thu sinh khối tế bào. Tế bào được rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý đã khử trùng để loại các thành phần môi trường. Tất cả các tế bào tiếp tục được làm đông lạnh đến -20°C trước khi đông khô. Khả năng sống sót sau đông khô (%) được tính bằng cách lấy mật số vi khuẩn còn sống sau sấy đông khô chia cho mật số vi khuẩn trước khi sấy đông khô (tức sau khi gây sốc môi trường) rồi nhân với 100.

Đếm mật số vi khuẩn: Vi khuẩn được đếm mật số trên môi trường MRS agar sau 48 giờ nuôi cấy ở 37°C từ 3 nồng độ pha loãng liên tiếp. Sau khi ủ, chọn đĩa có số lượng khuẩn lạc 25-300 khuẩn lạc và đếm số khuẩn lạc có trên đĩa. Số khuẩn lạc có trong mẫu được tính dựa theo công thức:

$$A\ (CFU/ml) = \frac{N}{n1Vf1+niVfi}$$

trong đó: A là số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1 ml mẫu; N là tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn; ni là số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i; V là thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa; fi là độ pha loãng tương ứng.

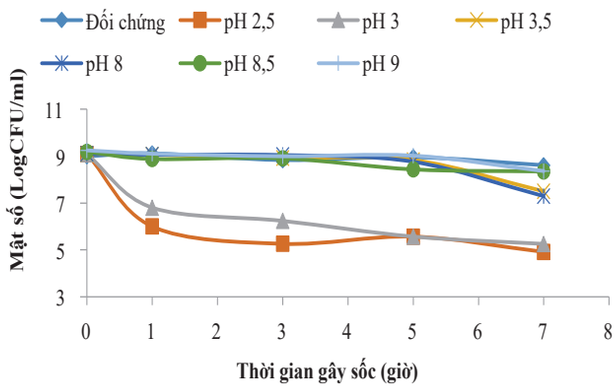
Xử lý thống kê: Các thí nghiệm xử lý gây sốc môi trường và sấy đông khô được thực hiện độc lập ba lần lặp lại. Các phân tích thống kê được thực hiện bằng phép thử Student's t với khoảng tin cậy 95%.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thay đổi mật số vi khuẩn dưới tác động của sốc môi trường

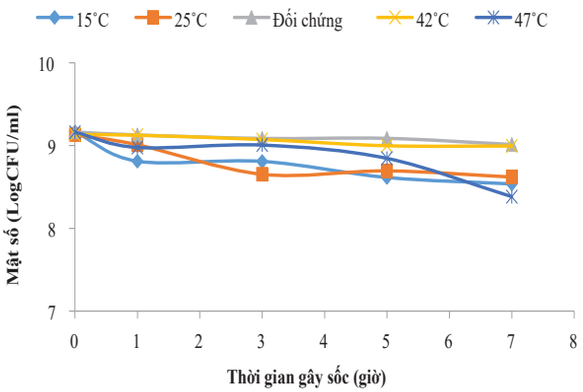
Các điều kiện sốc môi trường được chứng minh ảnh hưởng đáng kể đến sự sống sót, sự tăng trưởng, khả năng lên men và khả năng tồn tại của vi khuẩn [15]. Do đó, nghiên cứu đã đánh giá sự thay đổi mật số *L. plantarum* VAL6 trong suốt thời gian gây sốc. Nhìn chung, các sốc môi trường được kiểm tra có thể ảnh hưởng đến sự phát triển nhưng không gây chết hoàn toàn đối với vi khuẩn.

Mật số *L. plantarum* VAL6 tương đối ổn định dưới tác động của sốc ở pH 3,5 và ở pH kiềm. Tuy nhiên, dưới tác động của pH thấp 2,5-3, mật số vi khuẩn giảm mạnh. Ở pH 2,5 và 3, mật số giảm nhanh sau 1 giờ gây sốc còn 6 và 6,8 LogCFU/ml và sau đó giảm nhẹ trong suốt thời gian xử lý. Ngược lại, sốc ở pH cao (pH 8-9) và ở pH 3,5, mật số *L. plantarum* VAL6 ít thay đổi trong suốt thời gian gây sốc (hình 2).



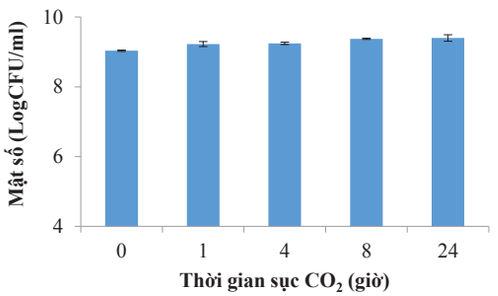
Hình 2. Ảnh hưởng của sốc pH lên mật số *L. plantarum* VAL6.

Để xác định khả năng chịu đựng sốc nhiệt của vi khuẩn, nghiên cứu đã đánh giá sự thay đổi mật số dưới tác động của các nhiệt độ khác nhau. Kết quả cho thấy mật số *L. plantarum* VAL6 ít thay đổi dưới điều kiện sốc nhiệt (hình 3). Ở điều kiện sốc 42°C, mật số *L. plantarum* VAL6 dao động khoảng 9,2 LogCFU/ml, khác biệt không có ý nghĩa ($p>0.05$) khi so sánh với đối chứng không gây sốc. Tuy nhiên, ở 47°C, mật số *L. plantarum* VAL6 giảm nhẹ và còn khoảng 8,38 LogCFU/ml sau 7 giờ gây sốc. Ở các điều kiện xử lý nhiệt độ thấp (15 và 25°C), mật số *L. plantarum* VAL6 bắt đầu giảm sau 1 giờ xử lý và dao động trong khoảng 8,5-8,7 LogCFU/ml trong suốt quá trình xử lý.



Hình 3. Ảnh hưởng của sốc nhiệt lên mật số *L. plantarum* VAL6.

Không giống với những yếu tố gây sốc, sự tăng nồng độ CO_2 lại kích thích làm tăng mật số *L. plantarum* VAL6 (hình 4). Dưới điều kiện nuôi cấy tăng cường CO_2, mật số vi khuẩn dao động trong khoảng 9,2-9,4 LogCFU/ml, so với điều kiện không gây sốc chỉ đạt khoảng 9 LogCFU/ml. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu không tìm thấy sự khác biệt ($p>0,05$) về mật số ở hai điều kiện xử lý CO_2 trong 4 và 24 giờ.



Hình 4. Mật số *L. plantarum* VAL6 dưới điều kiện nuôi cấy tăng cường CO_2.

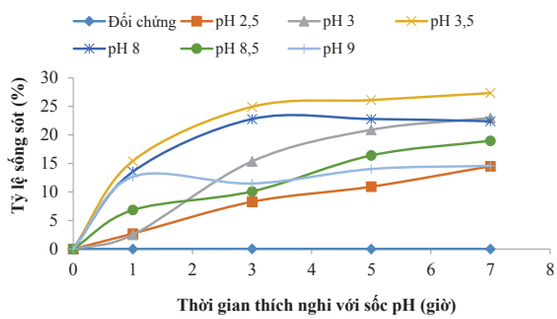
Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng các chủng probiotic *Lactobacillus* có khả năng đi qua dạ dày đến khu trú vào hệ đường ruột người và động vật, giúp tăng cường sức khỏe cho vật chủ [16]. Để có hiệu quả trong sử dụng, vi khuẩn probiotic phải sống sót qua đường tiêu hóa và đến ruột non [17]. Các vi khuẩn probiotic phải đối phó với môi trường thù địch trong suốt quá trình chúng đi qua đường tiêu hóa [18]. Do đó, việc xác định khả năng chịu đựng của chủng probiotic đối với các sốc môi trường là hết sức cần thiết. Trong nghiên cứu hiện tại, kết quả đã chứng minh *L. plantarum* VAL6 có khả năng sống sót ở các điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH axit rất thấp (pH 2,5), nhiệt độ cao 47°C và điều kiện yếm khí do CO_2 tạo ra. Điều này cho thấy tiềm năng sử dụng *L. plantarum* VAL6 như một vi khuẩn probiotic.

Một điều khá thú vị được phát hiện trong nghiên cứu này là việc nuôi cấy tăng cường CO_2 lại kích thích làm tăng mật số của *L. plantarum* VAL6. CO_2 thường được sử dụng để khử ôxy môi trường trước khi nuôi cấy vi khuẩn probiotic [19]. Một số bằng chứng đã chứng minh rằng CO_2 có thể điều hòa sinh lý và quá trình chuyển hóa năng lượng của tế bào bằng cách điều tiết hoạt động của các enzyme liên quan đến quá trình glycolysis. Ngoài ra, các enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase và carbamoyl-phosphate synthase trên vi khuẩn probiotic có vai trò xúc tác sự cố định CO_2 để sinh tổng hợp aspartate, arginine và uracil [20]. Đây là những yếu tố giúp kích thích sự phát triển của vi khuẩn làm tăng mật số. Một số kết quả nghiên cứu trước đây cũng đã chứng minh vai trò của CO_2 đối với sự phát triển của vi khuẩn probiotics. Các nguồn cacbon vô cơ như HCO_3^- hoặc CO_2 có liên quan đến các đặc điểm sinh lý và kích thích sự phát triển của *L. plantarum* [21]. Tương tự, chủng *L. plantarum* VAL6, tốc độ phát triển của *L. plantarum* WCFS1 theo thời gian có thể được kích thích bằng cách tăng mức độ cung cấp CO_2 [22].

3.2. Khả năng sống sót sau sấy đông khô của L. plantarum VAL6

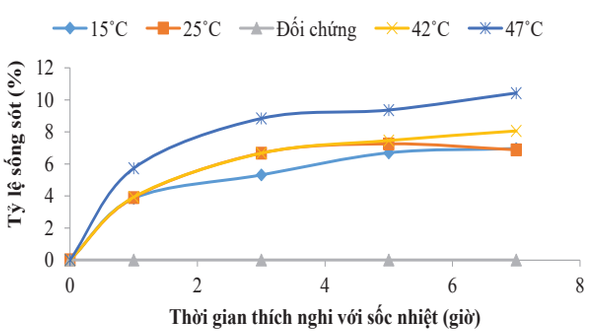
Để chứng minh vi khuẩn sau khi thích nghi với sốc môi trường có khả năng sống sót tốt hơn trong quá trình sấy đông khô, nghiên cứu đã so sánh tỷ lệ % sống sót sau sấy đông khô của vi khuẩn được gây sốc và không gây sốc.

Kết quả cho thấy sốc pH cải thiện đáng kể tỷ lệ sống sót của *L. plantarum* VAL6 trong quá trình sấy đông khô (hình 5). Tỷ lệ sống sót sau đông khô của tế bào vi khuẩn được gây sốc tăng dần theo thời gian xử lý thích nghi và đạt cao nhất gần 28% đối với tế bào được thích nghi khoảng 7 giờ ở pH 3,5. Trong khi đó, tỷ lệ này chỉ đạt khoảng 0,01% ở tế bào vi khuẩn không được gây sốc.



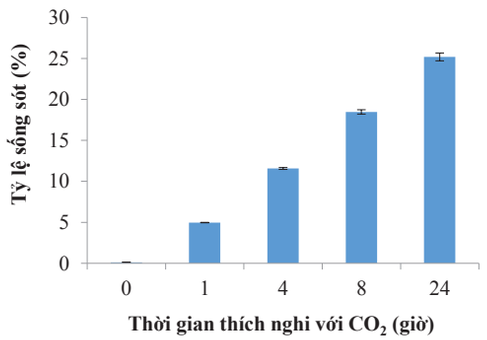
Hình 5. Tỷ lệ sống sót sau đông khô của *L. plantarum* VAL6 sau khi thích nghi với sốc pH.

Tương tự như sốc pH, sự thích nghi với sốc nhiệt cũng giúp tăng cường đáng kể khả năng sống sót sau sấy đông khô của *L. plantarum* VAL6 (hình 6). Nhìn chung, thời gian thích nghi với sốc nhiệt độ càng lâu thì khả năng sống sót càng tăng. Tỷ lệ sống sót cao hơn khi tế bào được xử lý thích nghi với sốc nhiệt ở 47°C, dao động khoảng 8-10% sau 3-7 giờ xử lý.



Hình 6. Tỷ lệ sống sót sau đông khô của *L. plantarum* VAL6 sau khi thích nghi với sốc nhiệt.

Cùng với sự gia tăng mật số, sự sống sót sau sấy đông khô của *L. plantarum* VAL6 được xử lý CO_2 tăng dần theo thời gian sục khí (hình 7). Ở điều kiện 1 giờ sục CO_2, tỷ lệ sống sót của vi khuẩn là 4,97%. Tỷ lệ này tiếp tục tăng và đạt hơn 25% ở điều kiện xử lý CO_2 24 giờ (sục CO_2 liên tục).



Hình 7. Tỷ lệ sống sót sau đông khô của *L. plantarum* VAL6 sau khi thích nghi với CO_2.

Sự sống sót và phát triển của vi sinh vật phụ thuộc vào khả năng cảm nhận và phản ứng của chúng với các điều kiện môi trường như nhiệt độ, pH, khả năng cung cấp chất dinh dưỡng và mật số tế bào [23]. Các điều kiện sốc môi trường có thể kích thích vi khuẩn tổng hợp nên những yếu tố kháng lại điều kiện môi trường bất lợi. Nghiên cứu về phản ứng của vi khuẩn với nhiệt độ cao đã dẫn đến việc phát hiện ra một tập hợp các protein cảm ứng nhiệt được gọi là protein sốc nhiệt. Tương tự, sốc lạnh dẫn đến sự cảm ứng của một tập hợp các protein được gọi là protein sốc lạnh. Các protein này giúp vi khuẩn chống lại các tác động đa hướng của sốc nhiệt. Các phản ứng của vi khuẩn với sốc môi trường cũng liên quan đến việc thay đổi bên ngoài vách tế bào chẳng hạn như nồng độ CO_2 cao có thể làm thay đổi hình thái và tính chất của màng tế bào [20]. Ngoài ra, dưới tác động của sốc môi trường có thể kích thích tạo ra exopolysacchride (EPS) [24, 25] như một rào cản bảo vệ làm tăng khả năng chịu đựng và cải thiện khả năng sống sót của vi khuẩn. Như vậy, việc tăng cường sản xuất các yếu tố kháng bên trong và sự kích thích sản xuất EPS bên ngoài dưới tác động của sốc môi trường có thể là nguyên nhân chính giúp *L. plantarum* kháng tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi, mà trong trường hợp này là sự mất nước do quá trình sấy đông khô. Thực tế nghiên cứu hiện tại đã chứng minh tỷ lệ sống sót sau sấy đông khô của *L. plantarum* VAL6 được thích nghi với sốc môi trường cao hơn 2500 lần so với vi khuẩn không được thích nghi. Một nghiên cứu trước đây trên *Bifidobacterium bifidum* cũng đã chứng minh mối tương quan giữa sản xuất EPS, sốc môi trường và cải thiện khả năng sống sót trong quá trình sấy đông khô [26]. Trong suốt quá trình đông khô, các EPS được tổng hợp hoạt động như một chất bảo vệ lạnh bảo vệ tế bào khỏi bị đóng băng và các ảnh hưởng sốc do khi bị mất nước. Ngoài ra, quá trình ôxy hóa lipid màng trong quá trình sấy cũng làm hư hỏng cấu trúc màng tế bào của LAB [27]. Dưới các điều kiện sốc môi trường, các EPS được tổng hợp với hoạt tính chống ôxy hóa cao có thể ức chế hiệu quả quá trình ôxy hóa màng dẫn đến tăng khả năng sống sót của vi khuẩn.

4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng sốc môi trường để kích thích tạo phản ứng thích nghi của tế bào trước khi sấy đông khô có thể giúp cải thiện khả năng sống sót của vi khuẩn. Điều này cho thấy tiềm năng sử dụng sốc môi trường để làm tăng tỷ lệ sống sót của các chủng giống LAB khởi động cho các ứng dụng thực phẩm.

Tiềm năng probiotic của *L. plantarum* VAL6 được thể hiện qua khả năng sống sót ở các điều kiện môi trường khắc nghiệt như pH axit rất thấp (pH 2,5), nhiệt độ cao (47°C) và điều kiện yếm khí do CO_2 tạo ra. Đặt biệt, nuôi cấy tăng cường CO_2 kích thích làm tăng mật số của *L. plantarum* VAL6. Sự thích nghi với các sốc môi trường như nhiệt độ, pH và sự tăng nồng độ CO_2 có thể cải thiện khả năng sống của *L. plantarum* VAL6. Tỷ lệ sống đạt cao nhất (28%) đối với các tế bào được thích nghi ở điều kiện sốc pH 3,5 khoảng 7 giờ (cao hơn khoảng 2.500 lần so với đối chứng).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Forster, T. Lawley (2015), "Systematic discovery of probiotics", *Nature Biotechnology*, **33**, pp.47-48, DOI: 10.1038/nbt.3111.

[2] T. Vasiljevic, N.P. Shah (2008), "Probiotics-from metchnikoff to bioactives", *International Dairy Journal*, **18(7)**, pp.714-728, DOI: 10.1016/j.idairyj.2008.03.004.

[3] K. Saito, S. Tomita, T. Nakamura (2019), "Aggregation of *Lactobacillus brevis* associated with decrease in pH by glucose fermentation", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83(8)**, pp.1347-6947, DOI: 10.1080/09168451.2019.1584522.

[4] Y. Yue, X. Xu, B. Yang, et al. (2020), "Stable colonization of orally administered *Lactobacillus casei* SY13 alters the gut microbiota", *BioMed Research International*, **2020**, DOI: 10.1155/2020/5281639.

[5] W.M. De Vos (2011), "Systems solutions by lactic acid bacteria: From paradigms to practice", *Microbial Cell Factories*, **10(1)**, DOI: 10.1186/1475-2859-10-S1-S2.

[6] Z. Ahmed, M.S. Vohra, M.N. Khan, et al. (2019), "Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens", *The Journal of Infection in Developing Countries*, **13(2)**, pp.130-136, DOI: 10.3855/jidc.10542.

[7] S.H. Peighambardoust, A.G. Tafti, J. Hesari (2011), "Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review", *Trends in Food Science & Technology*, **22(5)**, pp.215-224, DOI: 10.1016/j.tifs.2011.01.009.

[8] N. Fu, S. Huang, J. Xiao, et al. (2018), "Producing powders containing active dry probiotics with the aid of spray drying", *Advances in Food and Nutrition Research*, **85**, pp.211-262, DOI: 10.1016/bs.afnr.2018.02.003.

[9] G.R. Rama, D. Kuhn, S. Beux, et al. (2020), "Cheese whey and ricotta whey for the growth and encapsulation of endogenous lactic acid bacteria", *Food and Bioprocess Technology*, **13**, pp.308-322, DOI: 10.1007/s11947-019-02395-8.

[10] W. Lapsiri, B. Bhandari, P. Wanchaitanawong (2012), "Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage", *Drying Technology*, **30(13)**, pp.1407-1412, DOI: 10.1080/07373937.2012.684226.

[11] A.R. Dijkstra, W. Alkema, M.J.C. Starrenburg, et al. (2014), "Fermentation-induced variation in heat and oxidative stress phenotypes of *Lactococcus lactis* MG1363 reveals transcriptome signatures for robustness", *Microbial Cell Factories*, **13(1)**, DOI: 10.1186/s12934-014-0148-6.

[12] F. Gaucher, H. Rabah, K. Kponouglo, et al. (2020), "Intracellular osmoprotectant concentrations determine *Propionibacterium freudenreichii* survival during drying", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104(7)**, pp.3145-3156, DOI: 10.1007/s00253-020-10425-1.

[13] S. Settachaimongkon, H.J.F. Valenberg, V. Winata, et al. (2015), "Effect of sublethal preculturing on the survival of probiotics and metabolite formation in set-yoghurt", *Food Microbiology*, **49**, pp.104-115, DOI: 10.1016/j.fm.2015.01.011.

[14] J.C. De Man, M. Rogosa, M.E. Sharpe (1960), "A medium for the cultivation of Lactobacilli", *Journal of Applied Bacteriology*, **23(1)**, pp.130-135, DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.

[15] T. Zotta, A. Ricciardi, F. Ciocia, et al. (2008), "Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci", *International Journal of Food Microbiology*, **124(1)**, pp.34-42, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.024.

[16] C.M. Slover, L. Danziger (2008), "*Lactobacillus*: A review", *Clinical Microbiology Newsletter*, **30(4)**, pp.23-27, DOI: 10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006.

[17] A. Curto, I. Pitino, G. Mandalari, et al. (2011), "Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an *in vitro* gastric model of digestion", *Food Microbiology*, **28(7)**, pp.1359-1366, DOI: 10.1016/j.fm.2011.06.007.

[18] N. Beales (2004), "Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3(1)**, pp.1-20, DOI: 10.1111/j.1541-4337.2004.tb00057.x.

[19] B. Ebel, F. Martin, L.D.T. Le, et al. (2011), "Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk", *Journal of Dairy Science*, **94(5)**, pp.2185-2191, DOI: 10.3168/jds.2010-3850.

[20] S. Arioli, P. Roncada, A.M. Salzano, et al. (2009), "The relevance of carbon dioxide metabolism in *Streptococcus thermophilus*", *Microbiology*, **155(6)**, pp.1953-1965, DOI: 10.1099/mic.0.024737-0.

[21] F. Arsène-Ploetze, F. Bringel (2004), "Role of inorganic carbon in lactic acid bacteria metabolism", *Dairy Science and Technology*, **84**, pp.49-59, DOI: 10.1051/lait:2003040.

[22] M.J.A. Stevens, A. Wiersma, W.M. de Vos, et al. (2008), "Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis", *Applied and Environmental Microbiology*, **74(15)**, pp.4776-4778, DOI: 10.1128/aem.00136-08.

[23] B. Buck, M. Azcárate-Peril, T. Klaenhammer (2009), "Role of autoinducer-2 on the adhesion ability of *Lactobacillus acidophilus*", *Journal of Applied Microbiology*, **107(1)**, pp.269-279, DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04204.x.

[24] P.T. Nguyen, T.T. Nguyen, D.C. Bui, et al. (2020), "Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: The manipulation of environmental stresses for industrial applications", *AIMS Microbiology*, **6(4)**, pp.451-469, DOI: 10.3934/microbiol.2020027.

[25] P.T. Nguyen, T.T. Nguyen, T.N.T. Vo, et al. (2021), "Response of *Lactobacillus plantarum* VAL6 to challenges of pH and sodium chloride stresses", *Scientific Reports*, **11**, DOI: 10.1038/s41598-020-80634-1.

[26] H.T. Nguyen, H. Razafindralambo, C. Blecker, et al. (2014), "Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying", *Biochemical Engineering Journal*, **88**, pp.85-94, DOI: 10.1016/j.bej.2014.04.005.

[27] P. Teixeira, H. Castro, R. Kirby (1996), "Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage", *Letters in Applied Microbiology*, **22(1)**, pp.34-38, DOI: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb01103.x.

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 thuỷ (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.

Khi 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 khoá 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-trang cuối phản ánh 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 thuỷ 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 64 - Number 11 - November 2022

Cải thiện hệ số công suất nhiệt điện trong hợp chất Mg_3Sb_2 pha tạp Si cho ứng dụng chuyển đổi nhiệt điện của vật liệu.
Mạc Trung Kiên, Phạm Kim Ngọc, Raja Das, Nguyễn Hữu Tuân, Trần Đăng Thành, Phan Bách Thắng, Dương Anh Tuấn

1 **Enhancement of thermoelectric power factor in Si-doped Mg_3Sb_2 compound for thermoelectric converting applications.**
Trung Kien Mac, Kim Ngoc Pham, Raja Das, Huu Tuan Nguyen, Dang Thanh Tran, Bach Thang Phan, Anh Tuan Duong

Nghiên cứu một số đặc tính vật liệu màng lọc chế tạo từ cellulose acetate và polyguanidine.
Nguyễn Thị Minh Châu, Lưu Thị Huệ, Ngô Hồng Ánh Thu, Trần Thị Dung

5 **Characterisation of membrane prepared from cellulose acetate and polyguanidine.**
Thi Minh Chau Nguyen, Thi Hue Luu, Hong Anh Thu Ngo, Thi Dung Tran

Tổng hợp trong một bước các ligand bisphosphin monoxid bằng phương pháp ôxy hóa với xúc tác PdI_2.
Nguyễn Quí Hiển

11 **One-step synthesis of bisphosphine monoxide ligands via PdI_2-catalysed oxidation.**
Qui Hien Nguyen

Đặc điểm sinh học và hoạt tính kháng vi khuẩn gram dương của *Microbacterium* sp. C21 phân lập từ đất.
Nguyễn Mạnh Tuấn, Trương Phúc Hưng, Trần Minh Hằng, Trần Văn Tiến

16 **Biological characteristics and antibacterial activity against gram-positive bacteria of *Microbacterium* sp. C21 isolated from soil.**
Manh Tuan Nguyen, Phuc Hung Truong, Minh HangTran, Van Tien Tran

Nghiên cứu tạo cấu trúc mang promoter *rpb1* nhằm tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp ở nấm dược liệu *Cordyceps militaris*.
Trần Văn Tuấn, Nguyễn Minh Thư, Bùi Thị Khánh Linh, Phạm Thị Thu Hường, Phạm Thanh Hiền, Lê Thị Hồng Nhung, Hoàng Thị Mỹ Nhung

22 **Generating a construct harboring the *rpb1* promoter for enhancing recombinant protein expression in the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*.**
Van Tuan Tran, Minh Thu Nguyen, Thi Khanh Linh Bui, Thi Thu Huong Pham, Thanh Hien Pham, Thi Hong Nhung Le, Thi My Nhung Hoang

Nghiên cứu phân lập chủng vi khuẩn biển có khả năng phân hủy polyvinyl chloride.
Kiều Thị Quỳnh Hoa, Trần Hữu Trung, Mai Đức Huynh, Nguyễn Hữu Đạt, Nguyễn Vũ Giang

27 **Study on the isolation of marine bacterial strains capable of degrading polyvinyl chloride.**
Thi Quynh Hoa Kieu, Huu Trung Tran, Duc Huynh Mai, Huu Dat Nguyen, Vu Giang Nguyen

Ảnh hưởng của kỹ thuật trích ly đến hoạt tính sinh học cao nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) giàu polysaccharide.
Nguyễn Thị Kim Ngân, Ngô Thị Thùy Linh, Trần Đỗ Đạt, Nguyễn Đức Việt, Hoàng Minh Nam, Mai Thanh Phong, Nguyễn Hữu Hiếu

32 **Effects of extraction technology on bioactivities from polysaccharide-rich *Ganoderma lucidum*.**
Thi Kim Ngan Nguyen, Thi Thuy Linh Ngo, Do Dat Tran, Duc Viet Nguyen, Minh Nam Hoang, Thanh Phong Mai, Huu Hieu Nguyen

Tổng hợp và thử hoạt tính *in vitro* kháng nấm, kháng khuẩn của hợp chất đồng (II) xitrat, định hướng làm chế phẩm phòng bệnh trên cây trồng.
Lê Thế Tâm, Nguyễn Hoa Du, Bùi Thu Trang, Hoàng Đức Nghĩa, Hồ Đình Quang, Trần Quang Đệ, Lê Đăng Quang

38 **Synthesis of copper (II) citrate and evaluation of its *in vitro* antifungal and antibacterial activities, and the suitability of using this chemical as a plant protection agent.**
The Tam Le, Hoa Du Nguyen, Thu Trang Bui, Duc Nghia Hoang, Dinh Quang Ho, Quang De Tran, Dang Quang Le

Nghiên cứu chế tạo hệ vật liệu đơn lớp phân tử diazonium trên nền graphite bằng phương pháp cấy ghép điện hóa.
Phan Thanh Hải, Lê Cảnh Định, Hoàng Nhật Hiếu, Nguyễn Thị Xuân Huynh, Huỳnh Thị Miền Trung, Lê Thị Ngọc Loan, Trần Năm Trung

44 **Study on the fabrication of diazonium molecular monolayer material on graphite substrate via electrochemical grafting approach.**
Thanh Hai Phan, Canh Dinh Le, Nhat Hieu Hoang, Thi Xuan Huynh Nguyen, Thi Mien Trung Huynh, Thi Ngoc Loan Le, Nam Trung Tran

Rủi ro sinh thái một số kim loại nặng trong trầm tích tại khu vực hạ lưu sông Hồng.
Trịnh Thị Thắm, Lê Thị Trinh, Trịnh Thị Thủy

48 **Ecological risks of some heavy metals in sediment samples collected from downstream of the Red river.**
Thi Tham Trinh, Thi Trinh Le, Thi Thuy Trinh

Các yếu tố ảnh hưởng đến sự ôxy hoá lipid trong quá trình lên men đậu nành bởi vi khuẩn *Bacillus subtilis*.
Nguyễn Thị Hồng Thắm, Nguyễn Thị Lệ Ngọc, Nguyễn Công Hà

54 **Factors affecting lipid oxidation in the soybean fermentation by *Bacillus subtilis*.**
Thi Hong Tham Nguyen, Thi Le Ngoc Nguyen, Cong Ha Nguyen

Cải thiện khả năng sống sót của *Lactobacillus plantarum* VAL6 bằng đáp ứng thích nghi với sốc môi trường.
Nguyễn Hữu Thanh, Nguyễn Thành Dũng, Nguyễn Phú Thọ, Nguyễn Thị Tố Uyên, Bùi Nhi Bình, Phạm Thúy Vy, Nguyễn Hoàng Tính, Đặng Chí Thiện, Nguyễn Thị Bích Như

59 **Improving the viability of *Lactobacillus plantarum* VAL6 using environmental-stress adaptation.**
Huu Thanh Nguyen, Thanh Dung Nguyen, Phu Tho Nguyen, Thi To Uyen Nguyen, Nhi Binh Bui, Thuy Vy Pham, Hoang Tinh Nguyen, Chi Thien Dang, Thi Bich Nhu Nguyen