



ISSN 1859-4794

TẠP CHÍ

KHOA HỌC & CÔNG NGHỆ Việt Nam

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

B

Tập 60 - Số 12 - Tháng 12 năm 2018

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP

Nguyễn Văn Hiệu - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ 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
Từ Quang Hiến - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
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 Kỹ thuật 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 - Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh
Mai Trọng Nhuận - Đại học Quốc gia Hà Nội
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

TỔNG BIÊN TẬP

Đặng Ngọc Bảo

PHÓ TỔNG BIÊN TẬP

Nguyễn Thị Hải Hằng
Nguyễn Thị Hương Giang

TRƯỞNG BAN BIÊN TẬP

Phạm Thị Minh Nguyệt

TRƯỞNG BAN TRỊ SỰ

Lương Ngọc Quang Hưng

TRÌNH BÀY

Đinh Thị Luận

EDITORIAL COUNCIL

Nguyen Van Hieu - Vietnam Academy of Science and Technology
Nguyen Viet Anh - National University of Civil Engineering
Bui Chi Bui - 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 - Vietnam National University, Hanoi
Vu Minh Giang - Vietnam National University, Hanoi
Truong Nam Hai - Vietnam Academy of Science and Technology
Tu Quang Hien - Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry
Pham Huy Khang - University of Transport and Communications
Pham Gia Khanh - President of Vietnam Society of Organ Transplantation
Ho Duc Loc - Ho Chi Minh City University of Technology
Nguyen Thi My Loc - University of Education, Vietnam National University, 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 - Vietnam National University, Hanoi
Nguyen Thanh Phuong - Can Tho University
Nguyen Thanh Thuy - University of Engineering and Technology - Vietnam National University, Hanoi
Pham Hung Viet - VNU University of Science

EDITOR-IN-CHIEF

Dang Ngoc Bao

DEPUTY EDITORS

Nguyen Thi Hai Hang
Nguyen Thi Huong Giang

HEAD OF EDITORIAL BOARD

Pham Thi Minh Nguyet

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: khcnvn@most.gov.vn
Tạp chí điện tử: b.vjst.vn

EDITORIAL OFFICE

113 Tran Duy Hung Str. - Cau Giay Dist. - Hanoi
Tel: (84.24) 39436793; Fax: (84.24) 39436794
Email: khcnvn@most.gov.vn
E-journal: b.vjst.vn

GIẤY PHÉP XUẤT BẢN

Số 1153/GP-BTTTT ngày 26/7/2011
Số 2528/GP-BTTTT ngày 26/12/2012
Số 592/GP-BTTTT ngày 28/12/2016
Giá: 18000^d

PUBLICATION LICENCE

No.1153/GP-BTTTT 26th July 2011
No.2528/GP-BTTTT 26th December 2012
No.592/GP-BTTTT 28th December 2016

Thẩm định độ chính xác của bộ xét nghiệm tự pha để định lượng fructose trong tinh dịch phục vụ chẩn đoán vô sinh nam

Nguyễn Thị Trang*, Trần Thị Hồng Nhung, Bùi Bích Mai, Trần Lê Giang

Trường Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận 13/8/2018; ngày chuyển phản biện 15/8/2018; ngày nhận phản biện 19/10/2018; ngày chấp nhận đăng 25/10/2018

Tóm tắt:

Fructose được hình thành trong túi tinh dưới tác động của testosterone và được tiết ra cùng với tinh trùng qua ống dẫn tinh trong mỗi lần xuất tinh nên fructose được coi là chất sinh hóa phản ánh trung thực chức năng của các thành phần này. Nồng độ fructose trong tinh dịch bình thường khẳng định vai trò của các testosterone và chức năng của túi tinh, ống dẫn tinh bình thường, không gặp hiện tượng tắc nghẽn. Nghiên cứu này được thực hiện trên 30 nam giới đến khám và làm xét nghiệm tinh dịch đồ tại Trung tâm Tư vấn di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Bộ kit tự pha theo phương pháp ROE cải tiến đã được sử dụng để định lượng nồng độ fructose trong tinh dịch. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ dung dịch TCA (Trichloroacetic acid - CCl_3COOH) tối ưu là 10%; thành phần phức hợp màu gồm 2,5 ml HCl 30% và 0,25 ml resorcinol 0,1%; độ lặp lại: $\text{CV}\% = 1,407\%$ ($< 5\%$); độ chụm trung gian: $\text{CV}\% = 2,032\%$ ($< 5\%$); độ đúng: $t_m = 0,906 < t_c = 2,262$. Kết quả, đã thẩm định thành công quy trình định lượng fructose trong tinh dịch bằng bộ xét nghiệm tự pha chế.

Từ khóa: fructose tinh dịch, phương pháp ROE cải tiến, phương pháp so màu, vô sinh nam.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Từ năm 1946, Mann đã phát hiện fructose trong tinh dịch dưới dạng Methyl-Phenyl-Fructosazone [1]. Fructose được hình thành trong túi tinh dưới tác động của testosterone và được tiết ra cùng với tinh trùng qua ống dẫn tinh trong mỗi lần xuất tinh.

Theo M. Rajalakshmi và cs (1989), G.F. Gonzales (2001), sự gia tăng mật độ tinh trùng thường đi kèm với sự giảm nồng độ fructose trong tinh dịch do tinh trùng sử dụng fructose là nguồn năng lượng chủ yếu [2, 3]. Tuy nhiên, cũng có nghiên cứu chỉ ra nồng độ fructose trong tinh dịch của những bệnh nhân ít tinh trùng (oligozoospermia) và không có tinh trùng (azoospermia) giảm hơn khi so sánh với người nam bình thường [4]. Năng lượng từ fructose là cơ sở dinh dưỡng chủ yếu cho tinh trùng, đảm bảo sự sản sinh, phát triển, từ đó ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và khả năng di động của tinh trùng. Hoạt lực của tinh trùng liên quan chặt chẽ đến nồng độ fructose trong tinh dịch [5]. Độ di động của tinh trùng đã được chứng minh có mối tương quan tỷ lệ nghịch với nồng độ fructose [6]. Fructose được hình thành

trong túi tinh và bài tiết qua các ống dẫn tinh nên nó được coi là chất sinh hóa phản ánh trung thực chức năng của các thành phần này [7]. Nồng độ fructose trong tinh dịch bình thường khẳng định vai trò của testosterone và chức năng của túi tinh, ống dẫn tinh bình thường, không gặp hiện tượng tắc nghẽn [8]. Theo WHO (2010) và M. Gavella (1981), nồng độ fructose trong tinh dịch thấp là đặc trưng của tình trạng tắc nghẽn hệ thống ống dẫn tinh gặp trong bất sản ống dẫn tinh, bất sản túi tinh, thiếu hụt androgen hay xuất tinh ngược dòng [9, 10].

Ngoài ra, tương quan giữa nồng độ fructose trong tinh dịch với hình thái tinh trùng cũng được nhiều nghiên cứu quan tâm. Schoenfeld và cộng sự (1979) nghiên cứu về mối tương quan nghịch giữa nồng độ fructose và bất thường ở đuôi tinh trùng tiếp tục chứng minh sự cần thiết của fructose như một nguồn năng lượng cho sự vận động có hiệu quả của tinh trùng [11]. Fructose cũng có mối tương quan nghịch với bất thường đầu tinh trùng, điều này cho thấy rằng fructose trong tinh dịch còn có chức năng duy trì hoạt động của acrosome và chromatin nhân [12]. Chính vì vậy, nhiều nơi trên thế giới đã coi xét nghiệm nồng độ fructose là xét

*Tác giả liên hệ: Email: trangnguyen@hmu.edu.vn

Verifying the accuracy of self-manufactured test kit for determination of fructose concentration in semen for male infertility diagnosis

Thi Trang Nguyen*, Thi Hong Nhung Tran,
Bich Mai Bui, Le Giang Tran

Hanoi Medical University

Received 13 August 2018; accepted 25 October 2018

Abstract:

Fructose is formed in the seminal vesicle under the action of testosterone and is secreted along with the vas deferens during each ejaculation, so fructose is considered a biochemical agent that faithfully reflects the function of these components. Fructose concentrations in normal semen confirm the role of testosterone and the function of normal seminal vesicles, without the phenomenon of obstruction. Materials and methods: the semen samples were obtained from 30 male partners of infertile couples who had consultation at Genetic Counseling Centre of Hanoi Medical University Hospital, and the semen samples were analysed for the seminogram parameters. Fructose concentration was assessed using self-manufactured test kit (according to the improved ROE method). Results showed that the optimal solution concentration of TCA was 10%; composite color composition included 2.5 ml of HCl 30% and 0.25 ml of resorcinol 0.1%; repeatability was CV%=1.407% (<5%); intermediate precision was CV%=2.032% (<5%); correctness was $t_{ex}=0.906 < t_t=2.262$. In conclusion, the manufacturing procedure of the test kit for determination of fructose concentration in seminal fluid was successfully verified.

Keywords: improved ROE method, male infertility, seminal fructose, Spectrophotometric method.

Classification number: 3.2

nghiệm cơ bản trong chẩn đoán vô sinh nam.

Ở Việt Nam, xét nghiệm này được đưa vào ứng dụng lần đầu tiên tại Bệnh viện Việt Đức năm 2011 và tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ năm 2013. Từ đó đến nay, xét nghiệm này ngày càng được phổ biến ở các cơ sở y tế, góp phần chẩn đoán nguyên nhân vô sinh nam hay xác định các bất thường hệ sinh sản nam. Nhu cầu sử dụng bộ xét nghiệm để định lượng fructose trong tinh dịch ngày càng nhiều. Tuy nhiên, tại Việt Nam hiện nay chưa có đơn vị hay cơ sở nào sản xuất bộ xét nghiệm này. Do đó, tất cả bộ xét nghiệm đều phải nhập từ nước ngoài với nhiều chi phí trung gian làm tăng giá thành của xét nghiệm lên nhiều lần. Xuất phát từ tình hình thực tế này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu với mục tiêu: “Thẩm định độ chính xác của bộ xét nghiệm tự pha để định lượng fructose trong tinh dịch”.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là mẫu tinh dịch của những bệnh nhân nam đến khám, tư vấn, làm xét nghiệm tinh dịch đồ tại Trung tâm Tư vấn di truyền và Phòng khám Nam khoa - Tiết niệu, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 6/2017 đến tháng 3/2018.

Công thức tính cỡ mẫu cho một nghiên cứu mô tả tính theo công thức của S.K. Luanga và Lemeshow [13]:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{\epsilon^2 p}$$

trong đó: $1-\alpha/2=0,95$; $\epsilon=0,10$; $p=95\%$ (độ chính xác của quy trình tham chiếu); n =số lần thực nghiệm cần thực hiện, tính được bằng 21, chúng tôi lấy số tròn là 30.

Tiêu chuẩn lựa chọn đối tượng nghiên cứu: mẫu tinh dịch của các bệnh nhân nam trong độ tuổi sinh sản từ 18 đến 50 tuổi, không mắc các bệnh cấp tính và đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ: nam giới bị các bệnh ung thư bộ phận sinh dục; nam giới bị nhiễm HIV, giang mai, lậu...; nam giới đang mắc các bệnh cấp tính, bệnh tâm thần; người không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Quy trình tiến hành xét nghiệm định lượng fructose trong tinh dịch

Bao gồm 5 bước sau:

+ Bước 1: tinh dịch được ly tâm ở 1.500 vòng/phút trong 10 phút. Bước này thực hiện nhằm lắng tể bào tinh trùng xuống dưới đáy và chỉ lấy lớp tinh dịch chứa fructose ở trên để làm xét nghiệm, vì lớp tinh trùng không sử dụng trong

xét nghiệm.

+ Bước 2: cho 100 µl dịch nổi vào 400 µl TCA 10%, trộn đều, ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 10 phút. Bước này được sử dụng để loại bỏ được các protein (sau ly tâm protein sẽ được kết tủa, chỉ thu lại dịch nổi chứa fructose).

+ Bước 3: lấy 100 µl dịch nổi đã loại bỏ phần protein kết tủa bằng TCA, cho vào ống nghiệm khác có chứa 2,5 ml dung dịch HCl 30% và 250 µl dung dịch resorcinol 0,1%. Ủ ở nhiệt độ 80-85°C trong 5 phút.

+ Bước 4: để nguội và đo mật độ quang (OD) với bước sóng 530 nm, kích thước cuvet 1 cm. Với đối chứng, thay cho tinh dịch là 100 µl TCA. Màu sắc dung dịch thu được không thay đổi trong vòng 2-3 tiếng.

+ Bước 5: xác định hàm lượng fructose với hệ số đã được xây dựng bởi hàm hiệu chuẩn.

$$C_{\text{fructose}} = E(OD) \times C(h) / E(h)$$

trong đó: E(OD) là mật độ quang học của fructose mẫu tinh dịch của bệnh nhân ở bước sóng 530 nm; C(h) là nồng độ fructose chuẩn trong hàm hiệu chuẩn; E(h) là mật độ quang học của fructose chuẩn ở hàm hiệu chuẩn; C(h)/E(h) là hệ số a xây dựng được từ hàm hiệu chuẩn.

Đây là nghiên cứu tiếp nối của nhóm nghiên cứu sau khi đã xác định được các thành phần hóa chất để pha chế bộ xét nghiệm gồm: TCA 10%; dung dịch HCl 15%; dung dịch resorcinol 0,1% trong ethanol 95^o pha bởi 0,1 g resorcinol trong 100 ml ethanol 95^o; fructose chuẩn.

Để hoàn thiện quy trình pha chế bộ xét nghiệm, chúng tôi tiến hành tối ưu nồng độ dung dịch TCA, thời gian tạo phức hợp màu và sau đó để xác định độ chính xác của bộ xét nghiệm tự pha, chúng tôi tiến hành đánh giá độ chụm, độ chính xác và độ đúng.

Các số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm SPSS 16.0.

Nghiên cứu tuân thủ các yêu cầu và đã được thông qua Hội đồng đạo đức nghiên cứu trong y học của Trường Đại học Y Hà Nội.

Kết quả

Lựa chọn thể tích TCA biến tính protein

Chúng tôi sử dụng TCA 10% để làm biến tính protein trong tinh dịch, tiến hành thử nghiệm 9 mẫu nồng độ fructose chuẩn với các thể tích TCA lần lượt là 0, 100, 200, 300, 400, 500 µl thu được kết quả như bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ fructose theo thể tích TCA.

Nồng độ fructose chuẩn (g/l)	Thể tích TCA (µl)					
	0	100	200	300	400	500
0,0	0,45	0,40	0,32	0,12	0	0,09
0,5	0,86	0,72	0,68	0,54	0,5	0,46
1,0	1,34	1,23	1,18	1,14	1,03	0,93
1,5	1,70	1,64	1,61	1,56	1,52	1,55
2,0	2,67	2,65	2,50	2,42	1,98	2,13
2,5	2,66	2,59	2,52	2,51	2,5	2,45
3,0	3,21	2,89	3,19	3,1	3,05	2,90
3,5	3,71	3,62	3,59	3,44	3,5	3,45
4,0	4,25	4,14	4,1	4,05	3,99	3,94

Nhận xét: nồng độ fructose với thể tích TCA 400 µl cho kết quả đúng nhất, vì vậy chúng tôi lựa chọn thể tích này để làm biến tính protein trong tinh dịch.

Tạo phức hợp màu

Chúng tôi sử dụng chất chỉ thị màu là 250 µl resorcinol 0,1% phản ứng với fructose trong tinh dịch ở môi trường acid mạnh (2,5 ml HCl 30%) và ủ trong 5 phút ở nhiệt độ 85°C để tạo phức hợp màu đỏ tươi. Độ đậm độ phức hợp màu tỷ lệ thuận với nồng độ fructose trong tinh dịch. Tiến hành thử nghiệm với 9 mẫu nồng độ fructose chuẩn, đo mật độ OD ở bước sóng 530 nm của phức hợp màu thu được ở các thời điểm sau 0, 1, 2, 3, 4, 5h chúng tôi thu được kết quả thể hiện trong bảng 2.

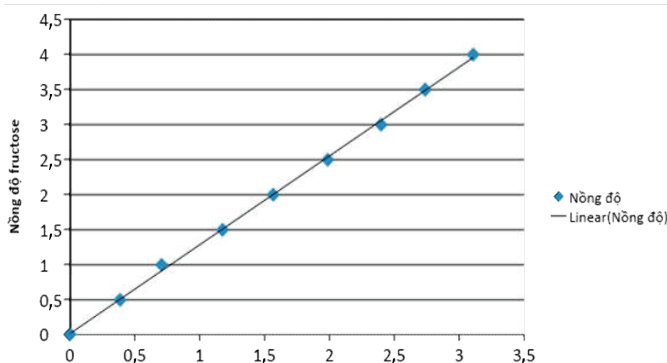
Bảng 2. Mật độ OD của phức hợp màu đo ở 530 nm theo thời gian.

Nồng độ fructose chuẩn (g/l)	Thời gian					
	0h	1h	2h	3h	4h	5h
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,38	0,37	0,38	0,37	0,33	0,31
1,0	0,70	0,70	0,71	0,70	0,65	0,61
1,5	1,17	1,17	1,18	1,16	1,11	1,00
2,0	1,56	1,56	1,55	1,56	1,52	1,49
2,5	1,98	1,98	1,98	1,97	1,93	1,90
3,0	2,39	2,39	2,39	2,39	2,31	2,29
3,5	2,73	2,73	2,73	2,72	2,65	2,61
4,0	3,10	3,10	3,10	3,09	3,05	3,01

Nhận xét: phức hợp màu có mật độ OD ổn định khi đo trong khoảng từ 0-3h, đo sau 3h mật độ OD có xu hướng giảm sẽ dẫn đến làm sai lệch nồng độ fructose.

Xây dựng hàm hiệu chuẩn

Hàm hiệu chuẩn được xây dựng với ngưỡng nồng độ fructose chuẩn lần lượt là 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 g/l, chúng tôi đo mật độ OD tương ứng với mỗi ngưỡng nồng độ fructose chuẩn theo quy trình xét nghiệm được hoàn thiện và dựng được đường chuẩn như biểu đồ 1.



Biểu đồ 1. Đường chuẩn nồng độ fructose theo OD ở bước sóng 530 nm.

Nhận xét: hàm hiệu chuẩn xây dựng được trong nghiên cứu này là $y=1,2797x$ với $r=0,99$. Trong đó, y là nồng độ fructose trong tinh dịch, x là mật độ OD đo được, r là hệ số hiệu chuẩn (sai số sau mỗi lần đo).

Xác định độ chính xác của bộ xét nghiệm

Độ lặp lại (bảng 3):

Bảng 3. Kết quả thực nghiệm độ lặp lại.

Lần đo	Nồng độ fructose chuẩn (mg/ml)	Độ hấp thụ	Nồng độ fructose đo được (mmol/l)
1	2,5	1,665	2,46
2	2,5	1,682	2,49
3	2,5	1,670	2,47
4	2,5	1,683	2,49
5	2,5	1,637	2,42
6	2,5	1,632	2,42
7	2,5	1,607	2,38
8	2,5	1,642	2,43
9	2,5	1,651	2,44
10	2,5	1,654	2,45
SD	0,034		
CV%	1,407		

Nhận xét: từ kết quả ở bảng 3, chúng tôi tính được độ lệch chuẩn $SD=0,034$ và hệ số biến thiên $CV\%=1,407$. Hệ số biến thiên của bộ kit tự pha chế nằm trong giới hạn cho phép ($CV\%<5\%$).

Độ chụm trung gian (bảng 4):

Bảng 4. Kết quả thử nghiệm độ chụm trung gian.

Lần thử	Nồng độ fructose chuẩn (mg/ml)	Nồng độ fructose đo được do các kiểm nghiệm viên (KNV) khác nhau (mg/ml)		
		KNV 1	KNV 2	KNV 3
1	2,5	2,55	2,45	2,39
2	2,5	2,55	2,48	2,43
3	2,5	2,51	2,58	2,52
4	2,5	2,57	2,65	2,60
5	2,5	2,50	2,56	2,54
6	2,5	2,50	2,56	2,52
7	2,5	2,52	2,59	2,52
8	2,5	2,52	2,59	2,52
9	2,5	2,52	2,50	2,54
10	2,5	2,55	2,52	2,51
SD	0,051			
CV%	2,032			

Nhận xét: với kết quả thu được từ bảng 4, sử dụng công thức tính độ chụm, chúng tôi thu được độ lệch chuẩn là $SD=0,051$, từ đó tính được hệ số biến thiên là $CV\%=2,032\%$. Hệ số biến thiên này nằm trong giới hạn cho phép $CV\%<5\%$.

Độ đúng (bảng 5):

Bảng 5. Kết quả thử nghiệm độ đúng.

Lần đo	Nồng độ fructose chuẩn (mg/ml)	OD	Nồng độ fructose đo được (mg/ml)
1	2,5	1,622	2,55
2	2,5	1,625	2,55
3	2,5	1,699	2,51
4	2,5	1,735	2,47
5	2,5	1,689	2,50
6	2,5	1,686	2,50
7	2,5	1,701	2,52
8	2,5	1,705	2,52
9	2,5	1,704	2,52
10	2,5	1,721	2,45

Nhận xét: với kết quả như trên, chúng tôi tính được sai số thử nghiệm $t_{tn}=0,906$. Bên cạnh đó, thông qua tra bảng có sai số lý thuyết $t_c=2,262$. Như vậy, $t_{tn}<t_c \rightarrow$ đạt được tiêu chuẩn kiểm nghiệm.

Bàn luận

Quy trình định lượng fructose trong tinh dịch bằng bộ xét nghiệm tự pha có nhiều điểm cải tiến với các quy trình hiện nay trên thế giới.

Về hóa chất cần chuẩn bị

Hóa chất cần cho pha chế bộ xét nghiệm định lượng fructose trong tinh dịch theo phương pháp so màu bao gồm: TCA 10%; dung dịch HCl 30%; dung dịch resorcinol 0,1% trong ethanol 95°; fructose chuẩn (Merck, Đức đạt chuẩn PE).

Việc chọn hóa chất như trên là điểm khác biệt giữa quy trình kỹ thuật này tại Việt Nam so với thế giới. Trên thế giới, chỉ thị màu sử dụng để tiến hành xét nghiệm định lượng fructose bằng phương pháp so màu thường được sử dụng là indol, đây là loại chỉ thị màu đắt và khó tìm mua tại Việt Nam. Ở đây, chúng tôi tiến hành pha dung dịch resorcinol 0,1% bằng resorcinol 0,1 g trong 100 ml ethanol 95°. Mặt khác, trong quá trình pha hoá chất không thể tránh khỏi các sai số. Tuy nhiên, với phương pháp định lượng fructose này, hàm hiệu chuẩn được xây dựng đối với các hóa chất sau mỗi lần pha. Khi sử dụng hết một trong các hóa chất thì cần xây dựng lại hàm hiệu chuẩn. Vì vậy, việc thiết kế bộ xét nghiệm cho nhiều mẫu, chia thành hai phần riêng gồm phức hợp chất tạo màu và chỉ thị màu để bảo quản lâu dài vừa giúp chúng ta hạn chế các sai số, vừa giúp sử dụng hoá chất một cách hiệu quả, tiết kiệm.

Về bước tạo phức hợp màu

Đây là điểm cải tiến nhiều nhất của quy trình này vì chỉ sử dụng HCl và resorcinol, so với phương pháp phiên bản gốc ROE sử dụng HCl, resorcinol và acid benzoic. Lượng HCl trong phiên bản gốc sử dụng 6 ml, resorcinol 2 ml, trong khi bộ xét nghiệm này chỉ sử dụng 2,5 ml HCl và 0,25 ml resorcinol cho 1 lần định lượng/1 bệnh nhân. Trong khi bộ xét nghiệm fructose test của hãng Fertipro sử dụng chỉ thị màu là indol độc, đắt, khó tìm ở Việt Nam và có thêm thành phần NaOH.

Về xây dựng hàm hiệu chuẩn

Ở bước xây dựng hàm hiệu chuẩn, chúng tôi cũng cải tiến so với phương pháp ROE. Khi ROE xây dựng quy trình pha chế bộ xét nghiệm sử dụng hàm hiệu chuẩn với các ngưỡng 0,1; 0,5 và 0,025 g/l. Theo WHO (2010), fructose ở người bình thường >1,3 g/l. Tuy nhiên theo các nghiên cứu sử dụng phương pháp ROE sau này thì fructose ở người bình thường 1,3-4 g/l. Trong khi việc xây dựng hàm hiệu chuẩn với khoảng cách càng nhỏ thì cho độ chính xác càng cao.

Giữa các lần pha hóa chất khác nhau, do yếu tố chủ quan hoặc khách quan, có thể có những yếu tố sai số khiến cho kết quả giữa 2 lô có sự khác biệt. Trong bộ kit này, để hạn chế các yếu tố gây nhiễu đó, đảm bảo tính ổn định kết quả giữa các lô hóa chất khác nhau, với mỗi lần pha hóa chất chúng tôi thực hiện xây dựng lại hàm hiệu chuẩn. Phương trình hàm hiệu chuẩn là $y=1,2797x$, hệ số tương

quan $r=0,99$. Như vậy khi tính toán, kết quả định lượng khi sử dụng lô hóa chất sau cần nhân với hệ số 1, đồng nghĩa với việc không cần thêm hệ số. Có thể thấy, giữa các lô hóa chất thử khác nhau không có sự khác biệt đáng kể về kết quả kiểm nghiệm.

Độ chính xác

Trong các thử nghiệm, đặc biệt là thử nghiệm định lượng, có rất nhiều yếu tố sai số ảnh hưởng tới thử nghiệm, dẫn tới không chính xác trong kết quả. Do đó, để kiểm soát các yếu tố gây nhiễu này, cần thiết sử dụng khái niệm độ chụm. Độ chụm mô tả kết quả chỉ phụ thuộc vào yếu tố sai số ngẫu nhiên mà không liên quan đến kết quả thực của mẫu. Độ chụm càng thấp thì độ lệch chuẩn hay hệ số biến thiên càng lớn, và ngược lại, độ chụm càng lớn thì hệ số biến thiên càng nhỏ. Độ chụm được tính toán dựa trên 3 thông số: độ lặp lại, độ chụm trung gian và độ tái lập. Mỗi thông số được thiết kế thực hiện trong các điều kiện khác nhau. Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi chỉ tiến hành thực nghiệm tính được độ lặp lại và độ chụm trung gian. Do không có phòng thí nghiệm tương đương nên không thể tiến hành tính toán độ tái lập.

Trong nghiên cứu này, bộ kit tự pha chế của chúng tôi có độ lặp lại với hệ số biến thiên $CV\%=1,407\%$. Như vậy, hệ số biến thiên có giá trị không vượt quá 5%, nói lên quy trình có độ lặp lại đạt yêu cầu của phép phân tích.

Khi tính toán độ chụm trung gian, chúng tôi thu được hệ số biến thiên là $CV\%=2,032\%$. Hệ số biến thiên này cũng có giá trị không vượt quá 5%, chứng tỏ quy trình đã đạt được yêu cầu của phép phân tích.

Như vậy, khi có tác động của các yếu tố sai số ngẫu nhiên, với cùng một mẫu, nồng độ đo được trong các điều kiện khác nhau có sai số trong khoảng chấp nhận được.

Khảo sát độ đúng

Độ đúng của phương pháp cho thấy mức độ gần nhau giữa kết quả thu được và giá trị thực hoặc giá trị được chấp nhận là đúng (μ). Với thực nghiệm kiểm định độ đúng, kết quả chúng tôi thu được là $t_{\text{m}}=0,906$. Đồng thời khi tra bảng, giá trị t_c thu được là 2,262. Như vậy $t_{\text{m}} < t_c$, và điều đó đồng nghĩa với việc nồng độ fructose đo được từ phương pháp này có kết quả giống với nồng độ thực của mẫu. Quy trình đạt được độ đúng theo yêu cầu của phép phân tích.

Kết luận

Quy trình định lượng fructose trong tinh dịch bằng bộ xét nghiệm do chúng tôi nghiên cứu có nhiều điểm cải tiến so với các quy trình hiện nay trên thế giới. Hóa chất cần cho pha chế bộ xét nghiệm này gồm:

Thành phần dung dịch biến tính TCA tối ưu là 10%.

Thành phần phức hợp màu 2,5 ml HCl 30% và 0,25 ml resorcinol 0,1% cho 1 lần định lượng/1 bệnh nhân và tối ưu trong khoảng từ 0-3h.

Độ lặp lại: CV%=1,407% (<5%).

Độ chụm trung gian: CV%=2,032% (<5%).

Độ đúng: $t_{\text{m}}=0,906 < t_c=2,262$.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Mann (1946), "Fructose content and fructolysis in semen. Practical application in the evaluation of semen quality", *The Journal of Agricultural Science*, **38(3)**, pp.323-333.
- [2] M. Rajalakshmi, R.S. Sherma, G.F.X. David (1989), "Seminal fructose in normal and infertile men", *Contraception*, **39**, pp.299-306.
- [3] G.F. Gonzales (2001), "Function of seminal vesicles and their role on male fertility", *Asian J. Androl.*, **3(4)**, pp.251-258.
- [4] A. Carpino, V. De Sanctis, L. Siciliano, et al. (1997), "Epididymal and sex accessory gland secretions in transfusion-dependent beta-thalassemic patients: evidence of an impaired prostatic function", *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **105(3)**, pp.169-174.
- [5] B. Manivannan, S.S. Bhande, S. Panneerdoss, et al. (2005), "Safety evaluation of long-term vas occlusion with styrene maleic anhydride and its non-invasive reversal on accessory reproductive organs in langurs", *Asian J. Androl.*, **7(2)**, pp.195-204.
- [6] W.M. Buckett, D.I. Lewis Jones (2002), "Fructose concentrations in seminal plasma from men with non - obstructive azoospermia", *Arch. Andrology*, **48**, pp.23-27.
- [7] R. Kumar, S. Thulkar, V. Kumar, et al. (2005), "Contribution of investigations to the diagnosis of bilateral vas aplasia", *ANZ J. Surg.*, **75(9)**, pp.807-809.
- [8] E. Vicari, S. La Vignera, R. Castiglione, et al. (2006), "Sperm parameter abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostatitis-epididymitis", *J. Endocrinol. Invest.*, **29(1)**, pp.18-25.
- [9] WHO (2010), *WHO Laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, 5th edn., WHO Press: Geneva, Switzerland.
- [10] M. Gavella (1981), "Automated enzymatic fructose determination in Semen", *Andrologia*, **13(6)**, pp.541-546.
- [11] C. Schoenfeld, R.D. Amelar, L. Dubin, M. Numeroff (1979), "Prolactin, fructose, and zinc levels found in human seminal plasma", *Fertil. Steril.*, **32(2)**, pp.206-208.
- [12] F.T. Andrade-Rocha (2001), "Sperm parameters in men with suspected infertility. Sperm characteristics, strict criteria sperm morphology analysis and hypoosmotic swelling test", *J. Reprod. Med.*, **46(6)**, pp.577-582.
- [13] S.K. Luanga, S. Lemeshow, WHO (1991), *Sample size determination in health studies: a practical manual*, 80pp.

Xây dựng quy trình phát hiện đồng thời *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* dựa trên kỹ thuật recombinase polymerase amplification

Nguyễn Ngọc Bảo Huy^{1,2}, Quan Quốc Đăng³, Nguyễn Hoàng Chương^{2*}

¹Công ty TBR

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

³Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ, Thành Đoàn TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/10/2018; ngày chuyển phản biện 29/10/2018; ngày nhận phản biện 23/11/2018; ngày chấp nhận đăng 30/11/2018

Tóm tắt:

Sốt rét là bệnh nhiễm trùng gây ra bởi các loài ký sinh thuộc chi *Plasmodium*. Ở Việt Nam, bệnh sốt rét chủ yếu do *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* gây ra thông qua trung gian truyền bệnh là muỗi *Anopheles*. Bệnh sốt rét chủ yếu lưu hành tại vùng rừng, đồi núi, ven biển nước lợ ở Việt Nam, nơi mà các phương pháp chẩn đoán bệnh sốt rét khó được tiếp cận. Trong lúc vaccine cho sốt rét chưa được ứng dụng rộng rãi trong thực tế lâm sàng thì việc điều trị bệnh sốt rét phụ thuộc chủ yếu vào các thuốc chống sốt rét, đặc biệt khi bệnh được chẩn đoán ở giai đoạn sớm. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật recombinase polymerase amplification (RPA) được áp dụng nhằm phát triển quy trình xét nghiệm phát hiện đồng thời hai tác nhân chính gây bệnh sốt rét là *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả nghiên cứu cho thấy: đã thiết kế thành công các cặp mồi đặc hiệu để nhân bản ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* trong phản ứng duplex RPA. Tiếp đến, các thông số của phản ứng duplex RPA như nhiệt độ phản ứng và thể tích phản ứng được tối ưu hoá nhằm giảm chi phí, đạt được hiệu quả tốt. Nghiên cứu cũng xây dựng phản ứng lai dựa trên kỹ thuật lateral flow strip với các mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* nhằm giảm thao tác và thời gian tiến hành cũng như nâng cao độ chính xác trong việc phát hiện sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax*. Quy trình duplex RPA được ứng dụng để thử nghiệm trên 33 mẫu ADN được tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm ký sinh trùng sốt rét và so sánh với quy trình monoplex real-time PCR. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* của 2 quy trình này là tương đồng. Quy trình phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* được xây dựng trong nghiên cứu này có khả năng được phát triển thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* ứng dụng trong thực tế lâm sàng.

Từ khóa: chẩn đoán phân tử, nhân bản đẳng nhiệt, *Plasmodium*, recombinase polymerase amplification, sốt rét.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Sốt rét là bệnh truyền nhiễm do ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* gây ra [1]. Có hơn 100 loài khác nhau của chi *Plasmodium* nhưng chỉ có 5 loài (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. Knowlesi*) được biết là gây bệnh ở người. *P. falciparum* được tìm thấy phổ biến ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và đặc biệt là châu Phi. *P. vivax* tập trung nhiều và gây bệnh chủ yếu ở châu Á, châu Mỹ La tinh và vài khu vực của châu Phi [2]. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đến năm 2013, trên toàn thế giới vẫn còn hơn 198 triệu ca mắc bệnh sốt rét và nửa triệu ca tử vong [3]. Bệnh sốt rét ở Việt Nam chủ yếu do 2 loài ký sinh trùng *P. falciparum* (khoảng 55%) và *P. vivax* (khoảng 45%) gây ra. Đây là bệnh lưu hành địa phương, chủ yếu ở vùng rừng, đồi núi, ven biển nước lợ; bệnh xảy ra quanh năm, nhưng chủ yếu vào mùa mưa. Ở Việt Nam, cho đến năm 2015 vẫn còn hơn 14.000

ca mắc bệnh sốt rét và có hơn 6,3 triệu người sống trong vùng có nguy cơ mắc sốt rét cao. Ngoài ra, trong những năm gần đây, hiện tượng ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc ở các vùng sốt rét lưu hành tại Việt Nam ngày càng phổ biến với mức độ kháng ngày càng tăng [4]. Do đó, mỗi người cần phải thực hiện các biện pháp phòng tránh bệnh sốt rét nhằm bảo vệ sức khỏe của bản thân, gia đình, góp phần làm giảm gánh nặng cho xã hội.

Có nhiều phương pháp để chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét như: chẩn đoán lâm sàng, soi kính hiển vi, thử nghiệm miễn dịch (test nhanh), chẩn đoán huyết thanh, kính hiển vi huỳnh quang và các kỹ thuật nhân bản acid nucleic như PCR và nhân bản đẳng nhiệt. Các phương pháp như chẩn đoán lâm sàng, soi kính hiển vi, test nhanh không đòi hỏi nhiều về trang thiết bị nhưng độ nhạy và độ đặc hiệu không cao. Các kỹ thuật nhân bản acid nucleic như PCR có độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn nhưng đòi hỏi về trang thiết

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

Constructing a molecular assay based on the recombinase polymerase amplification technique for simultaneous detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*

Ngoc Bao Huy Nguyen^{1,2}, Quoc Dang Quan³,
Hoang Chuong Nguyen^{2*}

¹TBR Company

²University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

³Center of Science and Technology Development,
Ho Chi Minh Communist Youth Union

Received 26 October 2018; accepted 30 November 2018

Abstract:

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium* species. In Vietnam, this disease is mainly caused by *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* through the malaria vector, the *Anopheles* mosquito. Malaria mainly circulates throughout the year in forest, mountainous, and coastal areas in Vietnam where diagnostic methods for this disease are often not easily accessible. Vaccines for malaria have been not available, but malaria medications are effective against the disease especially when malaria is diagnosed at the early stage. In this study, we developed a molecular assay based on the recombinase polymerase amplification (RPA) technique to detect *P. falciparum* and *P. vivax* in clinical samples. We successfully designed the specific primers to amplify the DNA of these two *Plasmodium* species in the duplex RPA reaction. Reaction temperature and reaction volume of the duplex RPA reaction were studied to reduce the operating cost. We also set up the hybridisation reaction with the specific *P. falciparum* and *P. vivax* probes based on the lateral flow strip technique to detect the RPA products. This hybridisation technique reduced manipulation and timing as well as improved the accuracy in the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* by RPA. Finally, we evaluated the built molecular assay to detect *P. falciparum* and *P. vivax* on 33 DNA samples collected from malaria patients in comparison with the monoplex real-time PCR assay. The results of the two assays were identical. The duplex RPA assay could be developed into a quick test kit for the rapid and accuracy detection of *P. falciparum* and *P. vivax* in the treatment of malaria in Vietnam.

Keywords: isothermal duplication, malaria, molecular diagnosis, *Plasmodium*, recombinase polymerase amplification.

Classification number: 3.3

bị cũng như kỹ thuật viên có kinh nghiệm. Do đó, việc phát triển một phương pháp đơn giản hơn nhưng lại cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao để chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét là hết sức cần thiết. PRA là phương pháp nhân bản ADN đẳng nhiệt ở nhiệt độ từ 37-42°C và trong thời gian khoảng 5-20 phút. Recombinase, SSB và polymerase là 3 protein đóng vai trò quan trọng trong phản ứng RPA. Recombinase và SSB sẽ giúp gắn mỗi và trình tự ADN mục tiêu. Sau đó, mỗi sẽ được kéo dài nhờ polymerase. Đây là một kỹ thuật khuếch đại acid nucleic nên cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao như PCR. RPA có thể sử dụng cho xác định bệnh và phát hiện đa hình nucleotide đơn ở ung thư của người và sinh vật biến đổi gen [5]. Ngoài ra, RPA cũng có thể được ứng dụng trong kiểm tra vi sinh trong mẫu nước, thực phẩm và trong lĩnh vực trồng trọt, chăn nuôi. Do chỉ cần hoạt động ở nhiệt độ thấp nên RPA có khả năng ứng dụng cao trong chẩn đoán tại hiện trường hoặc các điểm chăm sóc sức khỏe. Ở Việt Nam, *P. falciparum* và *P. vivax* là hai ký sinh trùng sốt rét gây bệnh phổ biến và với đặc điểm chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét càng sớm và chính xác thì việc điều trị bệnh sốt rét càng hiệu quả, chúng tôi thực hiện nghiên cứu xây dựng một quy trình phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật duplex RPA với mong muốn đóng góp một công cụ vào việc kiểm soát hiệu quả bệnh sốt rét ở Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp

Vật liệu

Các mẫu ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* được nuôi cấy nhân tạo và các mẫu ADN tách chiết từ các mẫu bệnh phẩm nghi nhiễm ký sinh trùng sốt rét được cung cấp bởi Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh. Các môi và mẫu dò được tổng hợp và cung cấp bởi Công ty Integrated ADN Technologies. Các hóa chất thực hiện phản ứng RPA được cung cấp bởi Công ty TwistDX. Các hóa chất cho phản ứng lateral flow strip được cung cấp bởi Công ty Milenia Biotec. Các hóa chất thực hiện phản ứng real-time PCR được cung cấp bởi Công ty Bioline. Các hóa chất điện di trên gel agarose được cung cấp bởi Công ty Bioline và Công ty TBR.

Thiết kế môi và mẫu dò phát hiện đặc hiệu *P. falciparum* và *P. vivax*

Vùng gen 18S rRNA của *Plasmodium* được lựa chọn để thiết kế các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax*. Tất cả các trình tự gen 18S rRNA của *P. falciparum* và *P. vivax* (JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1, JQ627149.1) được tải về từ GenBank. Sau đó, các vùng gen này được so sánh bằng phần mềm Clustal X để tìm ra các đoạn bảo tồn. Trên các đoạn bảo tồn này, một môi ngược chung và hai môi xuôi đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* được thiết kế sử dụng phần mềm Annhyb. Ngoài ra, mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* cũng được thiết kế theo cách tương tự. Đặc tính kỹ thuật của các môi và mẫu dò được kiểm tra bằng phần mềm OligoAnalyzer. Tính đặc hiệu lý thuyết của các môi và mẫu dò được khảo sát với phần mềm Blast. Trình tự các môi và mẫu dò được gửi tổng hợp tại Công ty Integrated ADN Technologies.

Thiết lập phản ứng RPA và phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật điện di

Phản ứng RPA được thiết lập trong tube thể tích 0,2 ml bao gồm các thành phần: 29,5 µl rehydration buffer; 2,5 µl magnesium acetate, 2 µl mỗi môi (RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF) có nồng độ 10 mM/môi; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ 50 µl. Phản ứng RPA được ủ ở 37°C trong 40 phút. Sau khi kết thúc phản ứng, cho 100 µl phenol pH 8 vào trong tube 0,2 ml. Vortex và ly tâm 11.000 vòng/phút trong 2 phút. Thu dịch nổi để điện di trên gel agarose.

Khảo sát nhiệt độ và thể tích phản ứng duplex RPA

Nhiệt độ phản ứng: phản ứng RPA được thiết lập như trên và được ủ ở các nhiệt độ 25, 30, 35, 40°C để khảo sát khoảng nhiệt độ mà phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra.

Thể tích phản ứng: phản ứng RPA được thiết lập với đầy đủ các thành phần như trên nhưng với các thể tích phản ứng khác nhau, bao gồm 10, 20, 30, 40, 50 µl để khảo sát thể tích phản ứng nhỏ nhất vẫn cho kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*.

Thiết lập phản ứng RPA và phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip

Phản ứng RPA được thiết lập trong tube thể tích 0,2 ml bao gồm các thành phần: 29,5 µl rehydration buffer; 2,5 µl magnesium acetate, 2 µl mỗi môi (RPA.PlasR, RPA.Falci-BIO, RPA.Vivax-DIG) có nồng độ 10 µM/môi; 0,6 µl mẫu dò RPA.Plas-FAM có nồng độ 10 µM; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ 50 µl. Phản ứng RPA được ủ ở 37°C trong 40 phút. Sau khi kết thúc phản ứng, sử dụng 2 µl sản phẩm RPA phát hiện bằng lateral flow strip. 2 µl sản phẩm RPA của *P. falciparum* và *P. vivax* được trộn với dung dịch PBST running buffer (bộ kit Milenia Genline Hybridetect-2 kit), sau đó rút 10 µl của dung dịch này cho lên vị trí nạp mẫu của que giấy. Trên que giấy chứa 3 vị trí tương ứng với vạch tín hiệu chứng nội, vạch tín hiệu cho *P. falciparum* và vạch tín hiệu cho *P. vivax*. Cuối cùng, cho que giấy này vào tube chứa 200 µl dung dịch PBST running buffer mới và quan sát kết quả hiện màu của hạt nano vàng sau 2-5 phút ở ba vị trí của chứng nội, *P. falciparum* và *P. vivax*.

Thiết lập phản ứng real-time PCR

Phản ứng monoplex real-time PCR được thiết lập trong tube 0,2 ml bao gồm các thành phần: 10 µl SensiFastTM Probe Lo-ROX Mix 2X; 1 µl mỗi môi (Plas-R, Faci-F, Vivax-F) với nồng độ 10 µM/môi; 0,25 µl mỗi mẫu dò (Falci-P, Vivax-P) với nồng độ 10 µM/mẫu dò; 2,5 µl ADN bản mẫu; nước cất vừa đủ thể tích 20 µl. Chương trình real-time PCR: 1 chu kỳ 3 phút ở 95°C; 40 chu kỳ 95°C trong 10 giây và 60°C trong 50 giây. Kết quả real-time PCR được phân tích sử dụng phần mềm của máy ABI 7500.

Phương pháp giải trình tự nucleotide Sanger

Các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax* được tinh sạch bằng bộ kit Expin PCR SV (GenAll). Sau đó, các sản phẩm này được đánh dấu huỳnh quang bằng phản ứng PCR với bộ kit BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing (ThermoFisher). Tiếp đến, các sản phẩm đánh dấu huỳnh quang được phân tích trên máy giải trình tự tự động ABI 3500. Các trình tự giải mã được xử lý bằng phần mềm Sequencing Analysis Software v5.4 with KB™

Basecaller v1.4.1, sau đó được phân tích và so sánh với trình tự chuẩn trên GenBank bằng phần mềm BioEdit.

Kết quả

Thiết kế các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax*

Trình tự các môi và mẫu dò sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày trong bảng 1.

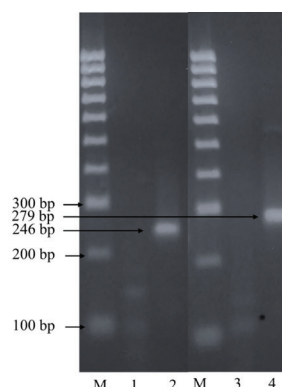
Bảng 1. Trình tự các môi và mẫu dò được thiết kế trong nghiên cứu.

STT	Tên	Trình tự nucleotide	Ghi chú
1	RPA.PlasR	CCC AAG CTA CTC CTA TTA ATC GTA ACT AAG CCA	Tự thiết kế. Môi ngược chung
2	RPA.FalciF	CGC TTT AAT ACG CTT CCT CTA TTA TTA TGT TC	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 246 bp
3	RPA.VivaxF	GCA ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CTG AT	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 279 bp
4	RPA.Plas-FAM	FAM-TGC TWT AWC TGT TTG CTT TGA ACA CTC TAA (THF) TTA CTC AAA GTA ACA A-Block	Tự thiết kế. Phát hiện các sản phẩm RPA bằng phản ứng lai
5	RPA.Falci-BIO	Biotin-CGC TTT AAT ACG CTT CCT CTA TTA TTA TGT TC	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 246 bp
6	RPA.Vivax-DIG	Digoxigenin-GCA ACG CTT CTA GCT TAA TCC ACA TAA CTG ATA C	Tự thiết kế. Kết hợp với RPA.PlasR tạo sản phẩm 279 bp
7	Plas-R	AACCCAAAGACTTTGATTCTCATAA	Các môi và mẫu dò sử dụng cho real-time PCR được tham khảo công trình của Rougemont và cộng sự (2004)
8	Falci-F	CCGACTAGGTGTTGGATGAAAGTGTAA	
9	Vivax-F	CCGACTAGGCTTTGGATGAAAGATTITA	
10	Falci-P	FAM-AGC AAT CTA AAA GTC ACC TC G AAA GAT GAC T-TAMRA	
11	Vivax-P	VIC-AGC AAT CTA AGA ATA AAC TC C GAA GAG AAA ATT CT-TAMRA	

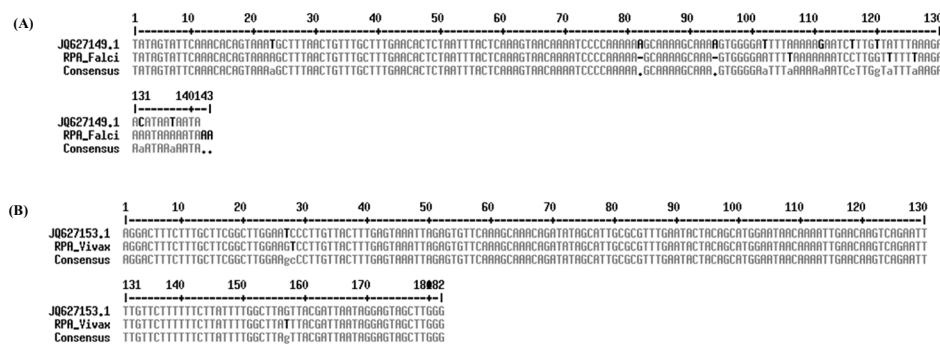
Tất cả các môi và mẫu dò đã thiết kế được kiểm tra các đặc tính kỹ thuật bằng các phần mềm thích hợp nhằm đảm bảo có khả năng hoạt động tốt trong phản ứng RPA và phản ứng lai. Kết quả kiểm tra cho thấy, các môi và mẫu dò đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* đã thiết kế đạt yêu cầu về mặt lý thuyết. Các môi và mẫu dò này sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xây dựng phản ứng RPA nhằm phát hiện *P. falciparum*, *P. vivax*

Phản ứng monoplex RPA được thiết lập cho *P. falciparum*, *P. vivax* với các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF để khảo sát hoạt động thực tế của các môi đã thiết kế. Kết quả điện di trên gel agarose của các phản ứng monoplex RPA được trình bày trong hình 1.



Hình 1. Kết quả monoplex RPA trên ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1, 2: monoplex RPA với cặp môi PlasR-FalciF trên mẫu chứng âm và ADN của *P. falciparum*. 3, 4: monoplex RPA với cặp môi PlasR-VivaxF trên mẫu chứng âm và ADN của *P. vivax*.

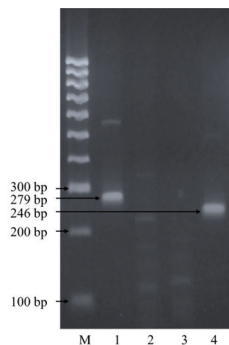


Hình 2. Kết quả so sánh trình tự nucleotide giữa các sản phẩm RPA lần lượt của *P. falciparum* (A), *P. vivax* (B) với các trình tự chuẩn trên GenBank.

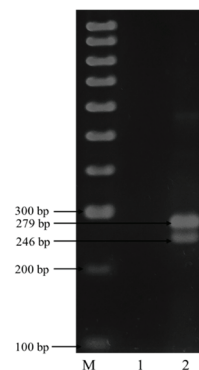
Kết quả ở hình 1 cho thấy, các phản ứng monoplex RPA với các cặp mồi đặc hiệu cho *P. falciparum*, *P. vivax* đã nhân bản hiệu quả ADN của *P. falciparum*, *P. vivax*. Các sản phẩm RPA của *P. falciparum*, *P. vivax* có kích thước như dự kiến lần lượt là 246 và 279 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp. Để chứng minh các sản phẩm RPA từ các cặp mồi là đặc hiệu cho *P. falciparum*, *P. vivax*, các sản phẩm này được giải trình tự nucleotide bằng kỹ thuật Sanger và so sánh với các trình tự của *P. falciparum*, *P. vivax* trên ngân hàng dữ liệu GenBank. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của sản phẩm RPA được trình bày trong hình 2.

Kết quả so sánh cho thấy, trình tự nucleotide của các sản phẩm RPA từ *P. falciparum*, *P. vivax* hoàn toàn trùng khớp với các trình tự chuẩn trên GenBank là JQ627149.1 cho *P. falciparum* và JQ627153.1 cho *P. vivax*. Để chứng minh các môi đã thiết kế không nhân bản chéo ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*, phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF được thiết lập trên ADN lần lượt của *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả kiểm tra khả năng nhân bản chéo của môi được trình bày trong hình 3.

Kết quả ở hình 3 cho thấy, phản ứng RPA với 3 môi RPA. PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* chỉ cho một băng sản phẩm với kích thước 246 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp. Tương tự, phản ứng RPA với 3 môi RPA. PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. vivax* chỉ cho một băng sản phẩm với kích thước 279 bp. Như vậy, mỗi RPA.FalciF kết hợp với mỗi RPA.PlasR chỉ nhận bản ADN *P. falciparum* và mỗi RPA.VivaxF kết hợp với mỗi RPA.PlasR chỉ nhận bản ADN của *P.*



Hình 3. Kết quả kiểm tra chéo của các môi cho *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1, 2: phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalcIF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* và mẫu chứng âm; 3, 4: phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalcIF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. vivax* và mẫu chứng âm.

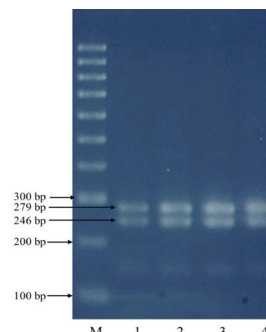


Hình 4. Kết quả duplex RPA nhằm phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*. M: thang ADN 100 bp; 1: mẫu chứng âm phản ứng duplex RPA với các môi RPA. PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên bản mẫu là nước; 2: phản ứng duplex RPA với các môi RPA. PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF trên ADN của *P. falciparum* và *P. Vivax*.

Kết quả ở hình 4 cho thấy, phản ứng duplex RPA trên ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* cho các băng sản phẩm mục tiêu là 246 và 279 bp khi so sánh với thang ADN 100 bp trong khi mẫu chứng âm không cho các băng mục tiêu này. Các điều kiện của phản ứng duplex RPA này sẽ được khảo sát trong các thí nghiệm tiếp theo nhằm tìm ra thông số tốt nhất.

Khảo sát các điều kiện của phản ứng duplex RPA phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*

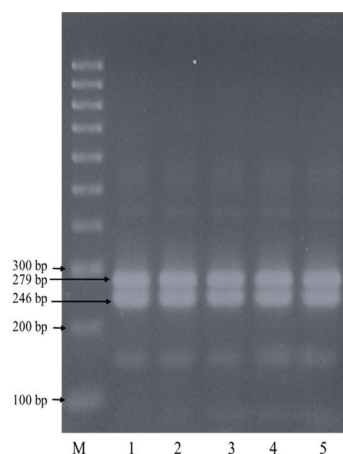
Khảo sát nhiệt độ phản ứng: mục tiêu của nghiên cứu này là hướng đến ứng dụng phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* tại các điểm chăm sóc sức khỏe ban đầu, nơi thiếu thốn các trang thiết bị so với phòng thí nghiệm. Do đó, bên cạnh nhiệt độ phản ứng RPA theo khuyến cáo là 37°C, chúng tôi khảo sát hiệu quả của phản ứng duplex RPA tại các nhiệt độ khác nhau, bao gồm 25, 30, 35, 40°C. Kết quả khảo sát nhiệt độ của phản ứng RPA được trình bày ở hình 5.



Hình 5. Kết quả khảo sát nhiệt độ của phản ứng duplex RPA. M: thang ADN 100 bp; 1-4: phản ứng duplex RPA tại các nhiệt độ lần lượt là 25, 30, 35, 40°C.

Kết quả ở hình 5 cho thấy, phản ứng duplex RPA diễn ra trong khoảng nhiệt độ rộng từ 25-40°C, tuy nhiên tín hiệu RPA tốt nhất nằm trong khoảng từ 35-40°C. Vì thế, chúng tôi chọn nhiệt độ 37°C là nhiệt độ cho phản ứng duplex RPA phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*. Nhiệt độ này cũng thích hợp để tiến hành quy trình duplex RPA tại các nơi thiếu thôn trang thiết bị.

Khảo sát thể tích phản ứng: với mục tiêu tiết kiệm chi phí phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng RPA khi phương pháp này được ứng dụng trong thực tế lâm sàng, chúng tôi khảo sát các thể tích phản ứng khác nhau đi từ 50 µl (theo khuyến cáo của bộ kit RPA) xuống đến 10 µl, cụ thể bao gồm các thể tích như sau: 10, 20, 30, 40, 50 µl. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA được trình bày ở hình 6. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA cho thấy, không có sự chênh lệch trong khả năng phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng phản ứng RPA với các thể tích phản ứng khác nhau. Vì vậy, thể tích phản ứng RPA có thể giảm xuống đến 10 µl để tiết kiệm chi phí phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax*.

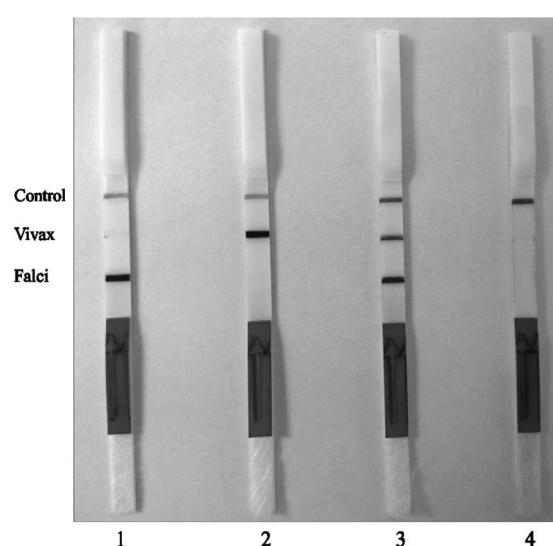


Hình 6. Kết quả khảo sát thể tích phản ứng RPA. M: thang ADN 100 bp; 1-5: thể tích phản ứng RPA lần lượt là 10, 20, 30, 40, 50 µl.

Phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip

Khi điện di trên gel agarose các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax*, các băng ký sinh khác ngoài hai băng sản phẩm mục tiêu của *P. falciparum* và *P. vivax* vẫn xuất hiện. Chúng tôi đã khảo sát các điều kiện của phản ứng như nồng độ môi, thời gian phản ứng, nồng độ magnesium acetate (kết quả không trình bày) nhưng vẫn không loại bỏ hoàn toàn các băng ký sinh này. Đây là lý do chúng tôi xây dựng phản ứng lai với mẫu dò đặc hiệu là RPA.Plas-FAM cho *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật lateral flow strip nhằm phát hiện chính xác *P. falciparum* và *P. vivax*. Trong phản ứng duplex RPA cho lateral flow strip, chúng tôi thay thế môi RPA.FalciF bằng RPA.Falci-BIO và môi RPA.VivaxF bằng RPA.Vivax-DIG. Cả hai môi thay thế có các gốc chức năng là Biotin và Digoxigenin. Trên que giấy (strip) của bộ kit Milenia Genline Hybridetect-2 có sẵn kháng thể bắt giữ Biotin và Digoxigenin tại hai vị trí khác nhau tương ứng cho sản phẩm RPA của *P. falciparum*

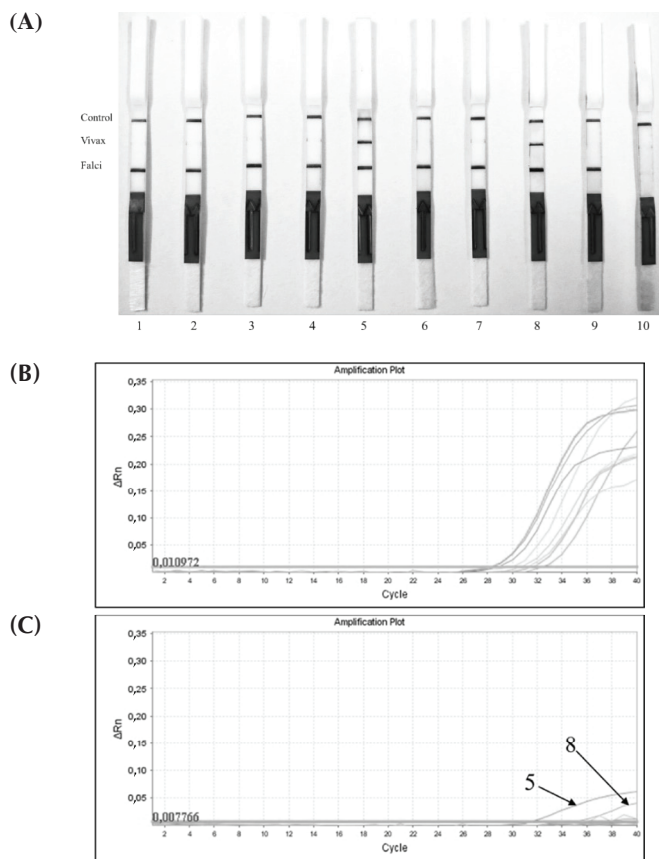
và *P. vivax*. Ngoài ra, trên que giấy còn có một vị trí tín hiệu chứng nội cho quá trình lai. Sản phẩm RPA được phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu có gắn hạt nano vàng cho gốc chức năng FAM trên mẫu dò RPA.Plas-FAM. Kết quả lateral flow strip được trình bày ở hình 7. Kết quả hình 7 cho thấy, phản ứng duplex RPA kết hợp lateral flow strip cho tín hiệu dương tính với sản phẩm RPA từ ADN *P. falciparum*, từ ADN *P. vivax* và từ cả hai loại ADN của *P. falciparum* và *P. vivax* tại các vị trí đã xác định trước. Mẫu chứng âm chỉ có tín hiệu chứng nội của phản ứng lai. Các tín hiệu lai trên các que giấy là rõ ràng và không có các tín hiệu ký sinh khác. Vì vậy, chúng tôi sẽ sử dụng phương pháp lai lateral flow strip thay cho điện di trên gel agarose cho quy trình phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng kỹ thuật RPA.



Hình 7. Kết quả lai bằng kỹ thuật lateral flow strip trên các sản phẩm RPA. 1: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. falciparum*; 2: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. vivax*; 3: phản ứng lai với sản phẩm RPA của *P. falciparum* và *P. vivax*; 4: phản ứng lai với sản phẩm RPA từ mẫu chứng âm.

Đánh giá quy trình duplex RPA trên các mẫu ADN nghi nhiễm *P. falciparum* và *P. vivax*

Chúng tôi thu nhận 33 mẫu ADN tách chiết từ các bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium* từ Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh và thực hiện quy trình duplex RPA nhằm phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* trong các mẫu ADN này. Chúng tôi cũng thực hiện quy trình monoplex real-time PCR với các mẫu dò Taqman đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* nhằm so sánh với kết quả phát hiện bằng quy trình duplex RPA. Các mẫu dò Taqman probe cho các phản ứng monoplex real-time PCR được tham khảo từ công trình của Rougemont và cộng sự năm 2004. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng cả hai quy trình được trình bày đại diện trong hình 8 và trình bày đầy đủ trong bảng 2.



Hình 8. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng quy trình duplex RPA và real-time PCR. (A) duplex RPA; (B) real-time PCR với môi và mẫu dò đặc hiệu *P. falciparum*; (C) real-time PCR với môi và mẫu dò đặc hiệu *P. vivax*.

Hình 8 cho thấy kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* trên 9 mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium* bằng quy trình duplex RPA và real-time PCR. Quy trình duplex RPA phát hiện *P. falciparum* ở cả 9 mẫu ADN và phát hiện *P. vivax* ở 2 mẫu ADN (số 5 và số 8 trong hình 8). Kết quả phát hiện bằng real-time PCR khẳng định kết quả duplex RPA khi phát hiện cả 9 mẫu ADN có nhiễm *P. falciparum* và 2 mẫu ADN (số 5 và số 8) nhiễm *P. vivax*.

Bảng 2. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* bằng duplex RPA và real-time PCR.

Mẫu ADN	Mẫu phát hiện bằng duplex RPA	Mẫu phát hiện bằng real-time PCR
Nhiễm <i>P. falciparum</i>	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22	1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 20, 21, 22
Nhiễm <i>P. vivax</i>	13	13
Nhiễm <i>P. falciparum</i> và <i>P. vivax</i>	5, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33	5, 8, 11, 12, 14, 17, 18, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
Mẫu âm tính		

Bảng 2 cho thấy, kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* là trùng hợp giữa hai quy trình duplex RPA và real-time PCR.

Bàn luận

P. falciparum và *P. vivax* là hai ký sinh trùng gây bệnh sốt rét chủ yếu ở Việt Nam. Do đặc thù bệnh xuất hiện chủ yếu ở vùng rừng, đồi núi nên công tác chẩn đoán còn gặp nhiều khó khăn. Việc tìm kiếm một kỹ thuật sinh học phân tử không đòi hỏi nhiều về trang thiết bị là cần thiết cho chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét. Trong các kỹ thuật sinh học phân tử được phát triển gần đây, RPA là một kỹ thuật có khả năng ứng dụng cao trong chẩn đoán, có thể khuếch đại ở nhiệt độ phòng, chỉ trong 10 phút và đọc kết quả chỉ trong 5 phút bằng lateral flow strip. Đây là một trong những phương pháp có khả năng ứng dụng rất tốt cho chẩn đoán, đặc biệt là chẩn đoán tại hiện trường. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật RPA trong việc phát hiện *P. falciparum* và *P. Vivax*, phục vụ cho việc điều trị hiệu quả bệnh sốt rét ở Việt Nam. Đây cũng là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam ứng dụng kỹ thuật RPA trong chẩn đoán.

RPA là một kỹ thuật cho phép nhân bản ADN ở nhiệt độ thấp và đẳng nhiệt bằng cách sử dụng các enzyme trong hệ thống sửa sai và sao chép của tế bào sinh vật. Ở giai đoạn khởi động nhân bản ADN mục tiêu, các môi sẽ được enzyme recombinase (RecA) gắn vào tạo thành sợi nucleoprotein. Sợi nucleoprotein này sẽ dò trên trình tự ADN mục tiêu để tìm kiếm cấu trúc tương đồng. Khi cấu trúc tương đồng được tìm thấy, sợi nucleoprotein này sẽ xâm lấn ADN mục tiêu mạch đôi và hình thành một cấu trúc D-loop. Đây là vị trí phân tách sợi ADN mạch đôi. Mạch bổ sung được tách ra sẽ được ổn định bởi protein SSB để giúp hạn chế việc mạch bổ sung tự bắt cặp lại với mạch mục tiêu. Trong khi đó, sau khi bắt cặp với mạch mục tiêu, các SSB protein rời khỏi trình tự môi, điều này giúp cho enzyme polymerase gắn vào được phức hợp môi - mạch mục tiêu và tiến hành tổng hợp mạch bổ sung. Kết quả là có hai phân tử ADN giống hệt phân tử ADN ban đầu được hình thành sau một chu kỳ hoạt động của RecA, protein SSB và enzyme polymerase. Hai phân tử ADN này tiếp tục làm cơ chất để hệ protein RecA, protein SSB và enzyme polymerase tổng hợp các phân tử ADN mới ở các chu kỳ kế tiếp [5, 6].

Các môi cho phản ứng RPA như RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF được thiết kế dựa vào nguyên tắc của kỹ thuật RPA như có độ dài từ 20-35 nucleotide, %GC nằm trong khoảng 30-70%, các cấu trúc thứ cấp có năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol, trình tự môi đặc hiệu cho sinh vật mục tiêu [7, 8]. Lưu ý, môi RPA.Falci-BIO có trình tự nucleotide trùng hợp với môi RPA.FalciF và tương tự cho môi RPA.Vivax-DIG với môi RPA.VivaxF. Điểm khác biệt giữa hai môi RPA.FalciF và RPA.VivaxF với hai môi RPA.Falci-BIO và RPA.Vivax-DIG là các gốc chức năng Biotin và Digoxigenin, hai gốc chức năng này sẽ được sử dụng trong phản ứng lai lateral flow strip. Tương tự, mẫu dò RPA.Plas-FAM cũng được thiết kế đặc hiệu với *P. falciparum* và *P. vivax* và có các cấu trúc thứ cấp với năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol. Các cấu trúc thứ cấp của một môi hay mẫu dò có năng lượng tự do nhỏ hơn -9 kcal/mol sẽ không bền ở nhiệt độ phản ứng và vì thế không cản trở môi hay mẫu dò bắt cặp vào ADN mục tiêu trong phản

ứng nhân bản và phản ứng lai [9]. Khi khảo sát hoạt động thực tế trong phản ứng RPA với ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* nuôi cấy, các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF đã cho các sản phẩm nhân bản với kích thước dự kiến là 246 và 279 bp. Kết quả giải trình tự nucleotide Sanger đã xác nhận các sản phẩm nhân bản từ các môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF có nguồn gốc từ *P. falciparum* và *P. vivax*. Ngoài ra, kết quả kiểm tra khả năng nhân bản chéo cũng cho thấy các môi đã thiết kế là RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF chỉ nhân bản chọn lọc *P. falciparum* và *P. vivax*. Vì vậy, các môi đã thiết kế cho phản ứng RPA là hoàn toàn đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* và hoạt động tốt trong phản ứng RPA trên thực tế.

Để tiết kiệm chi phí hóa chất cũng như giảm thao tác, chúng tôi đã xây dựng và khảo sát một số điều kiện của quy trình duplex RPA phát hiện đồng thời *P. falciparum* và *P. vivax*. Kết quả cho thấy có khả năng phát hiện cùng lúc hai ký sinh thuộc chi *Plasmodium* bằng phản ứng RPA với 3 môi RPA.PlasR, RPA.FalciF, RPA.VivaxF. Phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra ở nhiệt độ từ 25 đến 40°C và thể tích phản ứng RPA có thể giảm xuống còn 10 µl. Các thông số này cho phép tiến hành phản ứng RPA ở những nơi thiết thôn trang thiết bị thí nghiệm. Ngoài ra, chúng tôi cũng khảo sát phản ứng lai với mẫu dò đặc hiệu dựa trên kỹ thuật lateral flow strip. Đây là bước quan trọng nhất của quy trình duplex RPA để được ứng dụng trong thực tế lâm sàng vì nó giảm được thao tác và thời gian phát hiện sản phẩm RPA mục tiêu so với kỹ thuật điện di trên gel agarose. Thời gian tiến hành phản ứng lai chỉ diễn ra trong khoảng 5 phút với thao tác nhúng que giấy vào dung dịch lai và xem kết quả trực tiếp bằng mắt thường. Để so sánh, kỹ thuật điện di trên gel agarose phát hiện các sản phẩm RPA cần hơn 120 phút với các thao tác chuẩn bị bản gel, điện di sản phẩm trên bản gel, nhuộm và giải nhuộm bản gel, quan sát kết quả trên bản đèn từ ngoại. Hơn nữa, phát hiện sản phẩm RPA bằng kỹ thuật lateral flow strip còn tăng tính chính xác vì sử dụng thêm một mẫu dò đặc hiệu trong phản ứng lai. Mẫu dò này chỉ bắt cặp với sản phẩm RPA mục tiêu và không bắt cặp với các sản phẩm RPA ký sinh có trong phản ứng RPA. Trên thực tế, thường có sự xuất hiện của các sản phẩm RPA ký sinh bên cạnh sản phẩm RPA mục tiêu khi điện di sản phẩm từ phản ứng RPA trên gel agarose mặc dù các điều kiện của phản ứng RPA như nồng độ môi, thời gian phản ứng đã được khảo sát để tối ưu. Tuy nhiên, các sản phẩm ký sinh này đã được loại bỏ hoàn toàn trong phản ứng lai lateral flow strip với các mẫu dò đặc hiệu. Như vậy, với quá trình xây dựng và khảo sát đã đề cập ở trên thì quy trình duplex RPA trong nghiên cứu này có khả năng được sử dụng để phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* ở những điểm y tế thiếu thôn các trang bị.

Cuối cùng, quy trình duplex RPA vừa xây dựng được đánh giá trên các mẫu ADN được tách chiết từ máu của những bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* ở Việt Nam và được thực hiện song song quy trình monoplex real-time PCR với cùng các môi PlasR, FalciF, VivaxF và các Taqman probe đặc hiệu cho *P. falciparum* và *P. vivax* được trích từ công trình nghiên cứu của Rougemont và cộng sự năm 2004 [10]. Kết quả phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* ở các mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh trùng thuộc chi *Plasmodium* là trùng khớp giữa hai quy trình duplex RPA và monoplex real-time PCR. Với những kết quả thu nhận

được thì nghiên cứu này là tiền đề tốt để tiếp tục phát triển quy trình duplex RPA thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* phục vụ cho việc điều trị bệnh sốt rét trong thực tế lâm sàng.

Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình nhằm phát hiện *P. falciparum* và *P. vivax* dựa trên kỹ thuật duplex RPA và lateral flow strip. Các môi và mẫu dò đã thiết kế trong phản ứng duplex RPA hoàn toàn đặc hiệu và nhân bản hiệu quả ADN của *P. falciparum* và *P. vivax*. Phản ứng duplex RPA có khả năng diễn ra ở đây nhiệt độ từ 25-40°C và thể tích phản ứng có thể giảm xuống đến 10 µl. Các sản phẩm RPA từ *P. falciparum* và *P. vivax* được phát hiện bằng kỹ thuật lateral flow strip với mẫu dò đặc hiệu, điều này làm giảm thao tác và thời gian tiến hành cũng như nâng cao độ chính xác. Khi đánh giá quy trình duplex RPA trên 33 mẫu ADN nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium*, quy trình duplex RPA đã cho kết quả tương đồng với quy trình monoplex real-time PCR. kết quả nghiên cứu này là tiền đề tốt để phát triển thành bộ kit phát hiện nhanh *P. falciparum* và *P. vivax* phục vụ cho việc điều trị bệnh sốt rét ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh đã cung cấp các mẫu ADN tách chiết từ *P. falciparum* và *P. vivax* nuôi cấy và từ các mẫu máu bệnh nhân nghi nhiễm ký sinh thuộc chi *Plasmodium*. Chúng tôi cũng cảm ơn Công ty TBR đã tài trợ các hóa chất, vật liệu sử dụng trong nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N. Tangpukdee, C. Duangdee, P. Wilairatana, S. Krudsood (2009), "Malaria diagnosis: a brief review", *The Korean Journal of Parasitology*, **47**(2), pp.93-102.
- [2] J.H. Kattenberg, A. Erhart, M.H. Truong, E. Rovira-Vallbona, K.A.D. Vu, T.H.N. Nguyen, V.H. Nguyen, V.V. Nguyen, M. Bannister-Tyrrell, M. Theisen, A. Bennet, A.A. Lover, T.D. Tran, X.X. Nguyen, A. Rosanas-Urgell (2018), "Characterization of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* recent exposure in an area of significantly decreased transmission intensity in Central Vietnam", *Malaria Journal*, **17**(1), DOI: 10.1186/s12936-018-2326-1.
- [3] World Health Organization (2015), *World Malaria Report 2014*.
- [4] <http://vnecdc.gov.vn/vi/danh-muc-benh-truyen-nhiem/1093/benh-sot-ret>.
- [5] R.K. Daher, G. Stewart, M. Boissinot, M.G. Bergeron (2016), "PRA for diagnostic applications", *Clinical Chemistry*, **62**(7), pp.947-958.
- [6] O. Piepenburg, C.H. Williams, D.L. Stemple, N.A. Armes (2006), "ADN detection using recombination proteins", *PLOS Biology*, **4**(7), p.e204, DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- [7] <https://www.twistdx.co.uk/docs/default-source/twistamp-manuals/twistamp-assay-design-manual-v2-4.pdf?sfvrsn=10>.
- [8] <https://www.twistdx.co.uk/en/tpa/using-pcr-primers>.
- [9] <https://www.idtADN.com/pages/support/faqs/how-do-i-use-the-oligoanalyzer-tool-to-analyze-possible-hairpins-and-dimers-formed-by-my-oligo>.
- [10] M. Rougemont, M. Van Saanen, R. Sahli, H.P. Hinrikson, J. Bille, K. Jatton (2004), "Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays", *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(12), pp.5636-5643.

Đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của các chủng *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức

Vũ Thị Thu Hiền¹, Phạm Duy Thái², Trần Thị Vân Phương²,

Ngô Thị Hồng Hạnh², Bùi Thị Việt Hà¹, Trần Huy Hoàng^{2*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

Ngày nhận bài 24/10/2018; ngày chuyển phản biện 26/10/2018; ngày nhận phản biện 23/11/2018; ngày chấp nhận đăng 29/11/2018

Tóm tắt:

Pseudomonas aeruginosa là một trong những tác nhân hàng đầu gây nhiễm trùng bệnh viện. Với cơ chế kháng đa dạng như sự biểu hiện quá mức của hệ thống bơm đẩy, giảm tính thấm thấu màng ngoài (OM), hoặc sản sinh β -lactamase phân hủy kháng sinh nhóm β -lactama, *P. aeruginosa* có xu hướng kháng lại nhiều dòng kháng sinh, gây nhiều khó khăn trong quá trình điều trị. Nghiên cứu nhằm tìm hiểu về đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của các chủng *P. aeruginosa* phân lập từ các mẫu bệnh phẩm (như dịch phế quản, đờm, nước tiểu...) thu thập tại Bệnh viện Việt Đức từ năm 2012 đến năm 2014. 70 chủng *P. aeruginosa* được tiến hành thử nghiệm MIC để kiểm tra tính nhạy cảm với kháng sinh. Kết quả cho thấy, hầu hết các chủng đã kháng lại các kháng sinh với mức độ và tỷ lệ cao: ceftazidime (85,7%), aztreonam (81,4%), imipenem (97,1%), amikacin (27,1%), gentamicin (87,1%) và ciprofloxacin (87,2%). Đồng thời, kỹ thuật điện di xung trường PFGE được thực hiện để đánh giá mối liên hệ kiểu gen của các chủng vi khuẩn. Kết quả chỉ ra các chủng *P. aeruginosa* trong nghiên cứu có sự đa dạng về kiểu gen, được chia thành 11 nhóm với độ tương đồng >80%. Các chủng trong cùng một nhóm kiểu gen phần lớn được phân lập từ mẫu dịch phế quản và ở Khoa Hồi sức.

Từ khóa: kiểu gen, MIC, *P. aeruginosa*, PFGE.

Chỉ số phân loại: 3.3

Đặt vấn đề

Kháng sinh có vai trò quan trọng trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn nặng do vi khuẩn gây ra, tuy nhiên, việc sử dụng quá mức và không đúng cách làm giảm hiệu quả của kháng sinh bởi sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng thuốc có khả năng lây lan dễ dàng qua lục địa [1, 2]. Vi khuẩn kháng kháng sinh là một trong những vấn đề nghiêm trọng nhất mà nhân loại đang phải đối mặt trong thế kỷ XXI và được xác định có vai trò trọng tâm trong công tác chăm sóc sức khỏe toàn cầu với chiến lược đánh giá tác động của vi khuẩn kháng kháng sinh lên cộng đồng giai đoạn 2020-2025. Trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng đã xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn kháng lại kháng sinh ở mức độ nguy hiểm và là căn nguyên gây ra nhiễm trùng bệnh viện như *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumonia* và *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* có cơ chế đề kháng đa dạng như sự biểu hiện quá mức của hệ thống bơm đẩy, giảm tính thấm thấu màng ngoài (OM), hoặc sản sinh β -lactamase phân hủy

kháng sinh nhóm β -lactam, nhờ vậy vi khuẩn này đã kháng lại nhiều dòng kháng sinh khác nhau và trở thành một trong những mầm bệnh cơ hội gây nhiễm trùng bệnh viện [3, 4]. Tính đa kháng của *P. aeruginosa* đã gây ra nhiều khó khăn trong quá trình điều trị, làm tăng tỷ lệ bệnh tật, tăng tỷ lệ tử vong và tăng chi phí điều trị. Đã có nhiều báo cáo trên thế giới cho thấy mức độ kháng đa kháng sinh và gây ra hậu quả nặng nề do *P. aeruginosa* [5, 6]. Tại Việt Nam, đã có nhiều nghiên cứu về *P. aeruginosa*, tuy nhiên những nghiên cứu này chỉ dừng lại ở mức độ đánh giá khả năng kháng kháng sinh [7, 8]. Có thể kể đến nghiên cứu của Tada và cộng sự trên 40 chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Bạch Mai cho thấy các chủng *P. aeruginosa* ST235 mang gen IMP-26 có khả năng ly giải mạnh kháng sinh nhóm carbapenem [9]. Tuy nhiên, nghiên cứu này không được tiến hành ở Việt Nam mà được thực hiện tại phòng thí nghiệm ở Nhật Bản. Do vậy, cần có thêm các nghiên cứu chuyên sâu về kỹ thuật sinh học phân tử để có thể phân loại và đánh giá nguồn gốc cũng như khả năng lây lan giữa các

*Tác giả liên hệ: Email: thh@nihe.org.vn

Antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at Viet Duc Hospital

Thi Thu Hien Vu¹, Duy Thai Pham²,
Thi Van Phuong Tran², Thi Hong Hanh Ngo²,
Thi Viet Ha Bui¹, Huy Hoang Tran^{2*}

¹University of Science, Vietnam National University, Hanoi

²National Institute of Hygiene and Epidemiology

Received 24 October 2018; accepted 29 November 2018

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa is one of the leading causes of nosocomial infections. *P. aeruginosa* widely resists to antibiotic classes by many mechanisms, such as overexpression of efflux pump systems, low outer membrane permeability (OM), or producing β -lactamase to degrade β -lactam antibiotics. Multi-drug resistant *P. aeruginosa* strains cause many difficulties in the treatment of diseases. This study aimed to investigate antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of *P. aeruginosa* isolated from clinical specimens (such as bronchial fluids, sputum, urine, etc.) at Viet Duc Hospital from 2012 to 2014. Seventy strains were tested for antibiotic susceptibility. PFGE was used to analyse the genotype correlation. Results showed that *P. aeruginosa* highly resisted to antibiotics: ceftazidime (85.7%), aztreonam (81.4%), imipenem (97.1%), amikacin (27.1%), gentamicin (87.1%) and ciprofloxacin (87.2%). The results also showed *P. aeruginosa* had a variety of genotypes, divided into 11 groups with the homology >80%. Most strains in a same genotype group were isolated from bronchial fluid specimens and at intensive care unit.

Keywords: genotype, MIC, *P. aeruginosa*, PFGE.

Classification number: 3.3

chủng vi khuẩn. Hiện nay, điện di xung trường (PFGE) là kỹ thuật sinh học phân tử được nhiều nhà khoa học sử dụng để nghiên cứu và đánh giá sự lây truyền của các vi khuẩn gây bệnh trong bệnh viện và cộng đồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PFGE nhằm đánh giá mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Chủng vi khuẩn

Nghiên cứu sử dụng 70 chủng *P. aeruginosa* phân lập được tại Bệnh viện Việt Đức trong giai đoạn từ 2012-2014 được lưu trữ trong ngân hàng chủng tại Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Trước khi tiến hành kiểm tra tính nhạy cảm kháng sinh bằng phương pháp xác định nồng độ kháng sinh tối thiểu ức chế vi khuẩn (MIC) và đánh giá mối liên hệ kiểu gen giữa các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật PFGE, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller - Hinton và sau đó được định danh lại bằng MALDI-TOF. Việc định danh lại các chủng vi khuẩn được thực hiện tại đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Hà Nội.

Địa điểm tiến hành nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kháng sinh, Khoa Vi khuẩn, Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

Kỹ thuật MIC

6 loại kháng sinh khác nhau bao gồm ceftazidime (CAZ), aztreonam (AZT), imipenem (IMP), amikacin (AK), gentamicin (GEN) và ciprofloxacin (CIP) được sử dụng để xác định nồng độ kháng sinh tối thiểu có khả năng ức chế vi khuẩn bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong thạch Mueller-Hinton. Kết quả diễn giải sẽ dựa theo tiêu chuẩn CLSI 2018 (Clinical Laboratory Standards Institute).

Kỹ thuật điện di xung trường (PFGE) [10]

Các chủng vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trên thạch Mueller-Hinton, ủ ở 37°C qua đêm, sau đó hòa tan các khuẩn lạc riêng rẽ vào dung dịch đệm (EDTA)-saline buffer (75 mmol/l NaCl và 25 mmol/l EDTA, pH 7,5). Trộn đều huyền phù vi khuẩn với thạch SeaKem Gold Agarose (Lonza) nóng chảy theo tỷ lệ 1:1 và hút cho vào khuôn tạo plug. Các plug sẽ được chuyển sang ống fancel chứa 5 ml dung dịch đệm ly giải (6 mmol/l Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 mol/l EDTA, 1 mol/l NaCl, 0,5% Brij®58 (polyoxyethylene (20) cetyl ether, Sigma), 0,4% sodium deoxycholate, 0,5% sodium lauryl sarcosine và 1 mg/ml lysozyme) và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, dung dịch đệm ly giải sẽ được thay thế bởi 5 ml dung dịch đệm proteinase K (1% sodium lauryl sarcosine, 0,5 mol/l EDTA (pH 9) và 50 µg/ml proteinase K, Sigma),

ủ và lắc nhẹ ở 50°C trong khoảng 20 giờ. Loại bỏ dung dịch đệm proteinase K, các plug sau đó sẽ được rửa 2 lần trong ống fancel chứa 10 ml nước khử ion vô trùng, mỗi lần 10-15 phút, ở 50-55°C. Lặp lại bước rửa này 4 lần với dung dịch đệm Tris-EDTA buffer (10 mmol/l Tris-HCl (pH 8) và 1 mmol/l EDTA). ADN toàn phần của các chủng *P. aeruginosa* chứa trong plug sẽ được cắt bằng enzyme giới hạn *SpeI* (Bio-Rad Laboratories) với nồng độ 30U/miếng thạch và ủ ở 37°C trong vòng 18-20 giờ. Các phân đoạn ADN được phân tách bằng hệ thống điện di xung trường trên gel agarose Seakem-Gold 1%, CHEF-DR III (Biorad, Hercules, CA, Mỹ) với hiệu điện thế 6 V/cm trong 20 giờ ở nhiệt độ 14°C, thời gian một xung từ 2 đến 40 giây và góc điện trường là 120°. Sau điện di, gel được nhuộm dung dịch ethidium bromide trong 45 phút, rửa bằng nước cất 2 lần x 30 phút và chụp ảnh bằng máy chụp ảnh gel-doc. ADN toàn phần của chủng vi khuẩn *S. branderup* H9812 được cắt bằng enzym *XbaI* và sẽ được sử dụng làm thang chuẩn để phân tích.

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được quản lý bằng phần mềm excel. Phần mềm Bio-Numeric version 6.6. được sử dụng để phân tích mối liên hệ về kiểu gen của các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức.

Kết quả

Kết quả thử nghiệm mức độ nhạy cảm kháng sinh của *P. aeruginosa* bằng phương pháp MIC

Bảng 1. Mức độ nhạy cảm kháng sinh của *P. aeruginosa* đối với các loại kháng sinh.

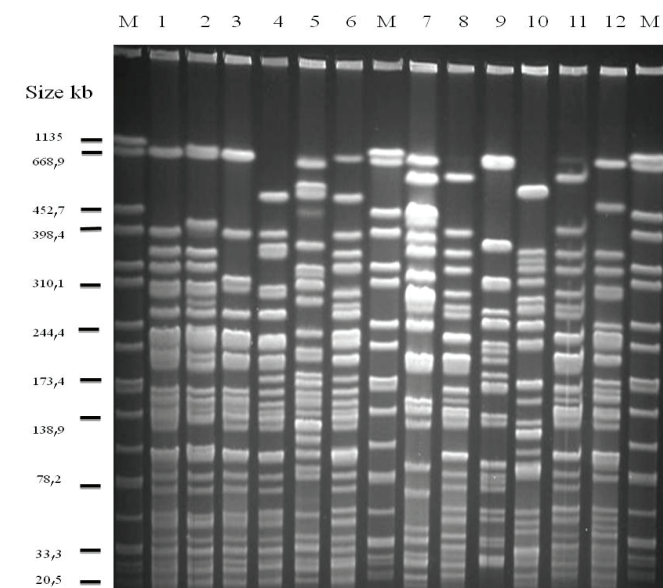
Kháng sinh	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC µg/ml) (n=70)		
	Kháng hoàn toàn	Kháng trung gian	Nhạy
Ceftazidime	57 (81,4%) (32 - >256 µg/ml)	3 (4,3%) (16 µg/ml)	10 (14,3%) (4-8 µg/ml)
Aztreonam	31 (44,3%) (32- >128 µg/ml)	26 (37,1%) (16 µg/ml)	13 (18,6%) (1-8 µg/ml)
Imipenem	68 (97,1%) (8->128 µg/ml)	0%	2 (2,9%) (1-2 µg/ml)
Amikacin	18 (25,7%) (64->256 µg/ml)	1 (1,4%) (32 µg/ml)	51 (72,9%) (2-16 µg/ml)
Gentamycin	61 (87,1%) (16->128 µg/ml)	0%	9 (12,9%) (1-4 µg/ml)
Ciprofloxacin	59 (84,3%) (4->128 µg/ml)	2 (2,9%) (2 µg/ml)	9 (12,8%) (0,125-1 µg/ml)

Kết quả MIC cho thấy, tỷ lệ vi khuẩn kháng lại từng kháng sinh là khá cao: ceftazidime (85,7%) với 57 chủng kháng hoàn toàn, chiếm 81,4% và 3 chủng kháng trung gian, chiếm 4,3%; aztreonam (81,4%) với 31 chủng kháng hoàn toàn, chiếm 44,3% và 26 chủng kháng trung gian, chiếm 37,1%; imipenem (97,1%) với 69 chủng kháng hoàn toàn và không có chủng nào kháng trung gian; amikacin (27,1%) với 18 chủng kháng hoàn toàn, chiếm 25,7% và 1 chủng kháng trung gian, chiếm 1,4%; gentamicin (87,1%) với 61 chủng kháng hoàn toàn và không có chủng nào kháng trung gian; ciprofloxacin (87,2%) với 59 chủng kháng hoàn toàn, chiếm 84,3% và 2 chủng kháng trung gian, chiếm 2,9% (bảng 1).

Chỉ có một lượng nhỏ các chủng còn nhạy cảm với từng loại kháng sinh, riêng amikacin có tỷ lệ chủng còn nhạy cảm khá cao (72,9%).

Kết quả phân tích kiểu gen của các chủng *P. aeruginosa* bằng kỹ thuật PFGE

ADN của 70 chủng *P. aeruginosa* được cắt bằng enzyme *SpeI*, sau đó chạy điện di xung trường trong 20 giờ. Kết quả được đọc bằng máy Biodoc và được phân tích bằng phần mềm BioNumerics version 6.6.11 (hình 1).

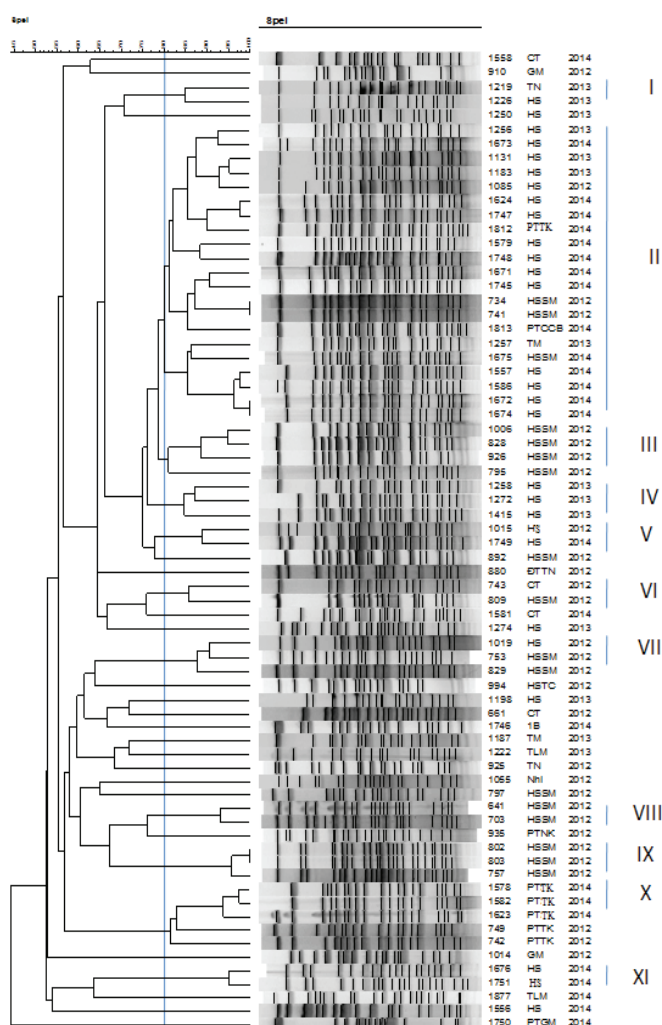


Hình 1. Hình ảnh đại diện cho kiểu gen PFGE của một số chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức.

Kết quả PFGE của 70 chủng *P. aeruginosa* có thể xác định được 11 nhóm kiểu gen với độ tương đồng $\geq 80\%$, được ký hiệu từ I đến XI (hình 2).

Nhóm I: gồm 2 chủng phân lập ở 2 khoa: Tiết niệu và Hồi sức vào năm 2013; nhóm II là nhóm có sự phân bố các chủng lớn nhất với 21 chủng chủ yếu phân lập từ dịch phế

quản ở Khoa Hồi sức trong cả 3 năm từ 2012 đến 2014; nhóm III có 4 chủng được phân lập ở Khoa Hồi sức vào năm 2012; nhóm IV có 3 chủng được phân lập cùng ở Khoa Hồi sức trong năm 2013; nhóm V có 2 chủng phân lập từ Khoa Hồi sức trong 2 năm 2012 và 2014; nhóm VI có 2 chủng được phân lập ở 2 khoa: Chấn thương và Hồi sức trong năm 2012; nhóm VII có 3 chủng được phân lập ở Khoa Hồi sức vào năm 2012; nhóm VIII có 2 chủng được phân lập ở Khoa Hồi sức trong năm 2012; nhóm IX gồm 3 chủng được phân lập từ dịch phế quản và đờm ở Khoa Hồi sức vào năm 2012; nhóm X gồm 5 chủng được phân lập ở Khoa Phẫu thuật thần kinh; nhóm XI có 2 chủng được phân lập từ hai loại mẫu là dịch phế quản và dịch vết mổ trong năm 2014 ở Khoa Hồi sức. Ngoài các chủng có mối liên hệ chặt chẽ về kiểu gen, các chủng còn lại có kiểu gen PFGE hoàn toàn khác biệt với các chủng trong 11 nhóm nêu trên.



Hình 2. Cây phân loại kiểu gen PFGE của các chủng *P. aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức trong nghiên cứu.

HS: hồi sức; HSSM: hồi sức sau mổ; PTTK: phẫu thuật thần kinh; TLM: thận lọc máu; GM: gan mật; PTGM: phẫu thuật gan mật; PTCCB: phẫu thuật cấp cứu bụng; TN: tiết niệu; TM: tim mạch; CT: chấn thương; ĐTTN: điều trị tự nguyện.

Bàn luận

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi đánh giá mức độ nhạy cảm của *P. aeruginosa* trên một số kháng sinh đại diện cho các dòng kháng sinh khác nhau hiện vẫn đang được sử dụng trong việc điều trị tại bệnh viện cho thấy: tính đa kháng thuốc của *P. aeruginosa* và mức độ kháng là khá cao. Khả năng kháng mạnh mẽ này chính là hệ quả của áp lực chọn lọc do việc sử dụng kháng sinh trong điều trị. Đặc biệt, tỷ lệ kháng kháng sinh imipenem thuộc nhóm cacbarpenem đạt đến 97,1%, chỉ có 2 chủng là còn nhạy. Điều này có thể lý giải là do một số chủng *P. aeruginosa* mang các gen *imp* kháng imipenem. Một phần nữa là do vi khuẩn này có thể sở hữu cơ chế gây mất protein porinD ở màng ngoài liên quan tới việc giảm tính nhạy cảm với kháng sinh imipenem. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cho thấy còn một tỷ lệ lớn các chủng *P. aeruginosa* vẫn nhạy cảm với kháng sinh amikacin (72,9%), chứng tỏ kháng sinh này còn tác dụng trong việc điều trị. Do vậy, có thể khuyến cáo khi điều trị cho bệnh nhân bị nhiễm trùng không nhất thiết phải sử dụng các kháng sinh có phổ tác dụng mạnh, giá đắt để tránh tạo áp lực cho vi khuẩn kháng lại kháng sinh mà có thể lựa chọn các kháng sinh còn nhạy cảm với mức chi phí thấp hơn và phù hợp hơn.

Dựa trên kết quả nhạy cảm kháng sinh, một câu hỏi được đặt ra: các chủng biểu hiện tính nhạy cảm giống nhau liệu có khả năng có cùng một nguồn gốc hay không? Để làm sáng tỏ điều này, chúng tôi tiến hành kỹ thuật điện di xung trường PFGE để phân tích sâu hơn về kiểu gen của các chủng vi khuẩn. Kết quả cho thấy: phần lớn các chủng vi khuẩn không thuộc một kiểu gen duy nhất (single clone) mà có sự đa dạng về kiểu gen. Kết quả PFGE trong nghiên cứu đã xác định được 11 nhóm kiểu gen độ tương đồng >80%. Chúng tôi cho rằng, các chủng có sự tương đồng về kiểu gen trong PFGE nhiều khả năng có chung một nguồn gốc. Đi sâu vào phân tích nhóm kiểu gen cho thấy, các chủng *P. aeruginosa* được phân lập chủ yếu ở Khoa Hồi sức. Ví dụ, ở nhóm II có 21 chủng thì có 18 chủng được phân lập ở Khoa Hồi sức; các chủng thuộc các nhóm III, IV, V, VII, VIII, IX đều phân bố ở Khoa Hồi sức. Đặc biệt, trong các chủng phân bố ở Khoa Hồi sức, có 3 cặp tương đồng 100% về kiểu gen là 734 và 741 (2012); 1672 và 1674 (2014) ở nhóm II; 802 và 803 (2012) ở nhóm IX. Qua đó thể hiện rằng, Khoa Hồi sức là nơi có tỷ lệ lây lan các chủng cao, không những có khả năng lây lan giữa các chủng trên các bệnh nhân tại cùng một thời điểm điều trị (cùng năm) mà các chủng giữa các năm khác nhau cũng có mối quan hệ mật thiết, dẫn đến giả thiết sự tồn tại và lưu hành các chủng *P. aeruginosa* gây bệnh ở khoa này qua các năm. Bên cạnh đó, kết quả cũng cho thấy có sự liên hệ về chủng giữa các khoa khác nhau (ở nhóm I, hai chủng thuộc 2 khoa Tiết niệu và Hồi sức; nhóm II có chủng 1257 ở Khoa Tim mạch và 1675 ở Khoa Hồi sức; nhóm VI

có hai chủng phân bố ở 2 khoa Chấn thương và Hồi sức). Giải thích cho vấn đề này, chúng tôi cho rằng, rất có thể các bệnh nhân từng có tiền sử điều trị tại Khoa Hồi sức sau đó được đưa về điều trị tại các khoa khác, vì vậy mới có sự liên hệ về chủng giữa các bệnh nhân ở các khoa khác nhau. Tuy nhiên, để có thể đưa ra kết quả chính xác cần phải tiến hành điều tra sâu hơn vào các đặc điểm dịch tễ học. Do vậy, việc phân lập được cùng một loại vi khuẩn ở những bệnh nhân khác nhau, kết hợp với thông tin lâm sàng cũng như lịch sử điều trị có thể giúp phát hiện sự lưu hành của một vụ dịch, từ đó đề ra các biện pháp phòng chống hiệu quả.

Nhiều kết quả phân tích kiểu gen của *P. aeruginosa* bằng phương pháp PFGE trên thế giới đã chỉ ra rằng, *P. aeruginosa* có sự đa dạng lớn về kiểu gen [10, 11]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đưa ra kết luận tương tự. Sự tương đồng về kiểu gen giữa các chủng trong cùng một khoa và ở các khoa khác nhau đã cung cấp thêm những bằng chứng cho giả thuyết các chủng này có cùng nguồn gốc và lây lan giữa các bệnh nhân điều trị tại cùng 1 khoa và giữa các khoa với nhau thông qua các yếu tố con người (cán bộ y tế, người thân) và yếu tố môi trường (dụng cụ y tế, môi trường trong bệnh viện). Trên cơ sở này, các nhà quản lý y tế, đặc biệt là những người làm công tác kiểm soát nhiễm khuẩn cũng như bệnh nhân cần nghiêm túc nhìn nhận vấn đề này, để từ đó nâng cao ý thức và đưa ra các biện pháp can thiệp phù hợp nhằm kiểm soát các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh. Tuy nhiên, để làm rõ hơn về cơ chế kháng kháng sinh và sự lan truyền của các chủng vi khuẩn kháng thuốc cần có nghiên cứu sâu hơn về gen bằng kỹ thuật MLST (Multi Locus Sequence Typing) và WGS (Whole Genome Sequence), chúng tôi sẽ tiếp tục đề cập trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Các chủng *P. aeruginosa* có mức độ kháng cao với các kháng sinh: ceftazidime (85,7%), aztreonam (81,4%), imipenem (97,1%), gentamicin (87,1%) và ciprofloxacin (87,2%). Tuy nhiên, vẫn còn một tỷ lệ lớn các chủng nhạy với kháng sinh amikacin (72,9%).

Các chủng *P. aeruginosa* có sự đa dạng về mặt kiểu gen và được chia thành 11 nhóm với độ tương đồng >80% cho thấy mối liên quan giữa các chủng trong cùng một nhóm, từ đó thể hiện nguy cơ về khả năng lây lan của các chủng này trong cùng một khoa và giữa các khoa khác nhau tại cùng

thời điểm điều trị (cùng năm) và qua các năm khác nhau tại Bệnh viện Việt Đức.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này sử dụng kinh phí của đề tài cấp nhà nước mã số NHQT/SPĐP/02.16. Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] E. Toprak, et al. (2012), "Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection", *Nature Genetics*, **44**(1), p.101.
- [2] C.L. Ventola (2015), "The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats", *Pharmacy and Therapeutics*, **40**(4), p.277.
- [3] P. Lambert (2002), "Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of the Royal Society of Medicine*, **95**, Suppl.41, p.22.
- [4] A.Y. Peleg and D.C. Hooper (2010), "Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria", *New England Journal of Medicine*, **362**(19), pp.1804-1813.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (2013), *Antibiotic resistance threats in the United States*, Washington, DC.
- [6] S. Sharma and P. Srivastava (2016), "Resistance of antimicrobial in *Pseudomonas aeruginosa*", *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, **5**, pp.121-128.
- [7] Hoàn Doãn Cảnh (2014), "Tình hình kháng kháng sinh của *Pseudomonas aeruginosa* phân lập được trên bệnh phẩm tại Viện Pasteur, Tp Hồ Chí Minh", *Tạp chí Khoa học, Đại học Sư phạm Tp Hồ Chí Minh*, **61**, tr.156-162.
- [8] Trần Văn Ngọc và cộng sự (2017), "Khảo sát đặc điểm kháng thuốc của *Pseudomonas aeruginosa* và *Acinetobacter baumannii* gây viêm phổi bệnh viện". *Thời sự Y học*, **3**, tr.64-69.
- [9] T. Tada, et al. (2016), "Multidrug-resistant ST235 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates producing IMP-26 with increased carbapenem hydrolyzing activities in Vietnam", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**(11), pp.6853-6858.
- [10] S. Selim, et al. (2015), "Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **29**(1), pp.152-156.
- [11] A. Freitas and A.L. Barth (2004), "Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **37**(1), pp.77-82.

Bào chế và đánh giá động học phóng thích viên nén metformin hydroclorid 750 mg phóng thích kéo dài với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước

Nguyễn Hữu Vĩnh Trung, Nguyễn Thiện Hải, Phạm Đình Duy*

Bộ môn Bào chế, Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 27/8/2018; ngày chuyển phản biện 30/8/2018; ngày nhận phản biện 25/9/2018; ngày chấp nhận đăng 8/10/2018

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm bào chế viên nén metformin hydroclorid 750 mg phóng thích kéo dài (PTKD) với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước có độ giải phóng hoạt chất (GPHC) tương đương với viên đối chiếu Glucophage XR 750 theo tiêu chuẩn USP 40 và xác định cơ chế GPHC. Viên đối chiếu Glucophage XR 750 được khảo sát các tính chất lý hóa như hình thức viên, khối lượng trung bình, độ cứng, độ mài mòn, độ ẩm, định tính, định lượng và độ GPHC để làm cơ sở cho việc so sánh với viên nghiên cứu có cùng hàm lượng. Viên nghiên cứu được bào chế bằng phương pháp xát hạt ướt với sự thay đổi tỷ lệ và thành phần tá dược, sau đó so sánh với viên đối chiếu. Phần mềm DDSolver được sử dụng để khảo sát động học phóng thích và cơ chế GPHC của viên.

Kết quả cho thấy, viên nghiên cứu có công thức gồm 7,5% gôm xanthan, 7,5% Acrypol 971p và 15% magiê nhôm silicate làm tá dược tạo khung, quá trình GPHC tương đương với viên đối chiếu trong môi trường pH 6,8 ($f_2=71,16$, tiến hành tương tự Test 1 USP 40) khi dùng giỏ quay với tốc độ 100 vòng/phút. Viên nghiên cứu đồng thời cũng đạt các Test 1, 3, 8, 10, 11 của USP 40 về độ hòa tan, có động học phóng thích hoạt chất tuân theo mô hình động học Korsmeyer-Peppas ($R^2=0,98$; $AIC=39,59$), phương trình % GPHC tích lũy, do đó cơ chế GPHC chủ đạo là khuếch tán và ăn mòn. Viên nghiên cứu metformin hydroclorid 750 mg đã được bào chế đạt yêu cầu phóng thích hoạt chất kéo dài tương đương với viên đối chiếu.

Từ khóa: metformin hydroclorid, phóng thích kéo dài, tá dược tạo khung matrix thân nước.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh mạn tính do sự thiếu hụt insulin, dẫn đến rối loạn chuyển hóa đường. Hiện nay thế giới có 425 triệu người mắc ĐTĐ và dự báo đến năm 2045 sẽ có 629 triệu người mắc ĐTĐ, bao gồm cả người được chẩn đoán và không được chẩn đoán; khoảng 50% người mắc không được phát hiện sớm, cứ 10 giây có một người chết do ĐTĐ, cứ 30 giây có một người phải cắt cụt chi do biến chứng của ĐTĐ [1-3]. Ở Việt Nam, bệnh ĐTĐ đang có xu hướng tăng nhanh ở người trẻ tuổi, tỷ lệ bệnh ĐTĐ là 5,4% và suy giảm dung nạp glucose 13,7% [4].

Metformin được khuyến cáo là lựa chọn đầu tiên trong điều trị ĐTĐ type 2 với trên 40 năm điều trị lâm sàng; có khả năng hạ đường huyết mạnh nhưng ít tác dụng không mong muốn và chi phí tương đối thấp. Tuy nhiên 25% bệnh nhân điều trị với viên metformin quy ước nhận thấy tác dụng

phụ trên đường tiêu hóa và khoảng 5-10% trong số đó quyết định ngưng điều trị. Vì vậy, viên nén metformin hydroclorid (MH) phóng thích kéo dài (PTKD) được nghiên cứu phát triển nhằm mang lại kết quả tốt hơn, giúp giảm tác dụng phụ và tăng hiệu quả điều trị so với dạng quy ước. Tuy nhiên, MH dễ tan trong nước và liều dùng lớn nên việc nghiên cứu các dạng PTKD gặp nhiều khó khăn, do đó trước đây chưa được chú trọng [5-9].

Xuất phát từ nhu cầu nâng cao hiệu quả điều trị và góp phần tăng thêm lựa chọn trong trị liệu ĐTĐ, nghiên cứu này thực hiện bào chế viên nén MH PTKD với liều dùng 750 mg có độ giải phóng hoạt chất (GPHC) tương đương với viên đối chiếu Glucophage XR 750 do hãng Merck Sante (Pháp) sản xuất theo tiêu chuẩn USP 40. Viên sau đó được đánh giá động học phóng thích (ĐHPT) hoạt chất, từ đó xác định cơ chế GPHC của viên.

* Tác giả liên hệ: Email: duyphamding1981@gmail.com

Formulating and evaluating the release kinetics of metformin hydrochloride 750 mg extended release tablet prepared by hydrophilic matrix

Huu Vinh Trung Nguyen, Thien Hai Nguyen,
Dinh Duy Pham*

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy,
University of Medicine and Pharmacy in Ho Chi Minh City

Received 27 August 2018; accepted 8 October 2018

Abstract:

The present study aims to formulate metformin hydrochloride 750 mg extended release tablets based on the hydrophilic matrix which have the amount of drug release equivalent to reference tablets Glucophage XR 750 according to the USP 40 standard and to determine the mechanism of active ingredient release of the tablets. The reference tablets Glucophage XR 750 were surveyed on form of tablet, average weight, hardness, abrasion, moisture content, identification, assay and dissolution to set up a database for the standards of tablets having the same amount of metformin hydrochloride. The test tablets having various rate and various inactive ingredient were prepared by wet granulation method, and then compared with the reference tablets. DDSolver (an add-in program) was used for surveying and comparing the release kinetics and the mechanism of active ingredient release. The results showed that the test tablets containing 7.5% xanthan gum, 7.5% Acrypol 971p, and 15% magnesium aluminium silicate had the active ingredient release process equivalent to the reference tablets in pH 6.8 buffer medium when using apparatus 1 at 100 rpm ($f_2=71.16$, process similar to Test 1 USP 40). The test tablets also satisfied the USP 40 dissolution Test 1, 3, 8, 10, and 11, had the active ingredient release kinetics in accordance with the Korsmeyer-Peppas model ($R^2=0.98$; $AIC=39.59$). The release kinetics equation was the cumulative percentage of drug release, so the main mechanism of active ingredient release included diffusion and erosion. Metformin hydrochloride 750 mg extended release tablets that were prepared in this study had the dissolution equivalent to the reference tablet Glucophage XR 750 according to the USP 40 standard.

Keywords: extended release, hydrophilic matrix inactive ingredient, metformin hydrochloride.

Classification number: 3.4

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

MH đạt tiêu chuẩn USP 37, Na Uy. Acrypol 940, 971p, gồm xanthan, magiê nhôm silicat, natri alginat, natri carboxymethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose đạt tiêu chuẩn USP 38, Ấn Độ. PVP K30 đạt tiêu chuẩn USP 32, Trung Quốc. Magiê stearat có nguồn gốc từ Singapore. Cồn tuyệt đối và nước cất đạt tiêu chuẩn ĐVN IV, Việt Nam.

Phần mềm ứng dụng trong nghiên cứu là DDSolver version 1.0 [10].

Phương pháp

Trên nhãn của viên đối chiếu Glucophage XR 750 thử độ hòa tan theo Test 1.

Bào chế viên nén MH 750 mg PTKD với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước: các công thức được khảo sát với sự thay đổi tá dược tạo khung cùng các tỷ lệ phần trăm tương ứng được trình bày trong bảng 1, thành phần gồm hoạt chất, tá dược tạo khung dạng đơn lẻ hoặc phối hợp, tá dược trơn bóng, tá dược dính và dung môi.

Bảng 1. Thành phần các công thức của viên nghiên cứu

CT	Thành phần	Tỷ lệ % khối lượng									
		CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6	CT7	CT8	CT9	CT10
1	MH	63,5	63,5	63,5	63,5	63,5	58,7	64,1	63,5	63,5	63,5
2	GX	30			15		3,6	5,1	7,5		
3	A940		30			15	9,1	8,2			
4	A971			30					7,5		
5	MAS				15	15	18,8	20,5	15		
6	PVP K30	5	5	5	5	5			5	5	5
7	Mg stearat	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	0,8	0,9	1,5	1,5	1,5
8	HPC						9	1,2			
9	NA									30	
10	NaCMC										30
11	EtOH 70%	Vừa đủ									
Tổng		100									

MH: metformin hydroclorid; GX: gồm xanthan; A940: Acrypol 940; A971: Acrypol 971P; NA: natri alginate; MAS: magiê nhôm silicat; HPC: hydroxy propyl cellulose; NaCMC: natri carboxymethyl cellulose.

Quy trình bào chế 1.000 viên nén như sau: cân đồng nguyên liệu theo công thức; rây hoạt chất và tá dược tạo khung matrix qua rây 0,2 mm, trộn đều được hỗn hợp bột (1); pha tá dược dính bằng cách dùng cồn 70% hòa tan PVP K30 hoặc HPC tạo dung dịch tá dược dính, sau đó cho tá dược dính vào hỗn hợp bột (1), xát hạt qua rây 2 mm; sấy ở nhiệt độ 40 có thông gió đến độ ẩm <3%; sàng hạt qua rây 1 mm; trộn hoàn tất với tá dược trơn bóng; dập viên bằng máy tam sai sử dụng chày caplet kích thước 2,10x1,00 cm,

độ cứng viên khoảng 150-200 N.

Phương pháp đánh giá tính chất lý hóa của hạt trước khi dập viên:

- Xác định độ ẩm của hạt: mất khối lượng do làm khô khoảng 1 g cốm khi sử dụng cân đo độ ẩm bằng hồng ngoại MB 45 - OHAUS.

- Xác định chỉ số Carr (C): cho một lượng cốm vào ống đong 50 ml, nâng lên cách mặt phẳng 2 cm rồi thả theo chiều thẳng đứng, thực hiện 50 lần, ghi nhận thể tích trước (V_t) và sau khi gõ (V_s), tính $C = 100 \cdot \frac{V_t - V_s}{V_t}$; tiến hành 3 lần và lấy kết quả trung bình; C càng lớn khả năng chảy của hạt càng kém: $C \leq 15$: trơn chảy tốt, C trong khoảng 16-20: trơn chảy tương đối tốt, C trong khoảng 21-25: có thể chảy được, $C \geq 26$: trơn chảy kém.

Phương pháp đánh giá tính chất lý hóa của viên nén:

- Độ cứng của viên: xác định lực gây vỡ từng viên trên máy thử độ cứng Erweka, lấy giá trị trung bình 10 viên.

- Độ mài mòn của viên: thổi bụi và cân 10 viên cho vào máy thử độ mài mòn Erweka với tốc độ 25 vòng/phút trong 4 phút, thổi bụi và cân lại khối lượng 10 viên, tính phần trăm hao hụt khối lượng do mài mòn.

- Độ đồng đều khối lượng: cân và so sánh khối lượng từng viên trong 20 viên với giá trị trung bình. Chênh lệch khối lượng không được quá 5% so với khối lượng trung bình $\bar{m}$.

- Định lượng: cân 10 viên, nghiền thành bột mịn. Phân tán một lượng bột mt tương ứng với 1/10 viên trong 70 ml đệm phosphat 6,8, siêu âm trong 10 phút. Bổ sung dung dịch đệm vừa đủ 100 ml, sau đó để trong ngăn mát tủ lạnh 24h rồi lọc, loại bỏ 20 ml dịch lọc đầu. Lấy chính xác 1 ml dịch lọc ở nhiệt độ phòng, bổ sung dung dịch đệm vừa đủ 100 ml (dung dịch thử). Độ hấp thụ A_t của dung dịch được đo ở bước sóng 232 nm. Tiến hành song song pha lượng mc MH chuẩn chính xác khoảng 75 mg; độ hấp thụ A_c của dung dịch được đo ở bước sóng 232 nm. Tính toán hàm lượng chế phẩm theo công thức:

$$\% \text{ hàm lượng} = \frac{100 \cdot A_t \cdot mc \cdot \bar{m}}{750 \cdot A_c \cdot mt} \%$$

- Thử độ hòa tan theo Test 1, 3, 8, 10, 11 USP 40; trước hết ưu tiên khảo sát theo Test 1: sử dụng 1.000 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8; khuấy 100 vòng/phút, rút 10 ml mẫu tại các thời điểm 1, 3, 10h, pha loãng bằng dung dịch đệm và định lượng bằng phương pháp UV tại bước sóng 232 nm với tiêu chuẩn tương ứng là 22-42%, 49-69%, $\geq 85\%$.

- Đánh giá độ GPHC: tiến hành như thử độ hòa tan nhưng thời điểm lấy mẫu là 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12h, định

lượng và tính phần trăm tích lũy GPHC. Số liệu được xử lý bằng phần mềm DDSolver version 1.0. Các mô hình động học được sử dụng khảo sát là bậc không, bậc một, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas; việc đánh giá mức độ phù hợp dựa trên giá trị R^2 càng lớn ($R^2 > 0,9$) và giá trị AIC càng nhỏ là đạt.

- Đánh giá tương đương hòa tan của viên nghiên cứu và viên đối chiếu dựa trên công thức sau:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} * \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \right\} * 100$$

với n: số điểm lấy mẫu; R_t : trung bình phần trăm hoạt chất hòa tan từ thuốc đối chiếu tại thời điểm t; T_t : trung bình phần trăm hoạt chất hòa tan từ thuốc thử tại thời điểm t; khi giá trị $f_2 \geq 50$, hai thuốc tương tự về độ hòa tan hay tương đương *in vitro*.

Kết quả và bàn luận

Tính chất lý hóa và độ GPHC của viên đối chiếu

Kết quả khảo sát viên đối chiếu được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Tính chất lý hóa của viên đối chiếu.

Tính chất khảo sát	Kết quả
Tên biệt dược - Công ty	Glucophage XR 750 - Merck Sante
Ngày sản xuất - số lô	27.10.15 - Y00969
Hạn dùng	25.10.18
Cảm quan	Viên nén màu trắng, hình caplet, một mặt có chữ Merck, một mặt có số 750, ép vi PVC
KLTB (mg)	(n=20) 1.095,94 $\pm$ 13,65 ^(*)
Độ cứng (N)	(n=10) 173,80 $\pm$ 15,85
Độ mài mòn (%)	(n=3) 0,10 $\pm$ 0,002
Độ ẩm (%)	(n=3) 2,82 $\pm$ 0,0005
Định tính	Đúng
Định lượng (90-110%)	(n=3) Đạt (100,070 $\pm$ 0,942)
Độ hòa tan (Test 1)	(n=6) Đạt

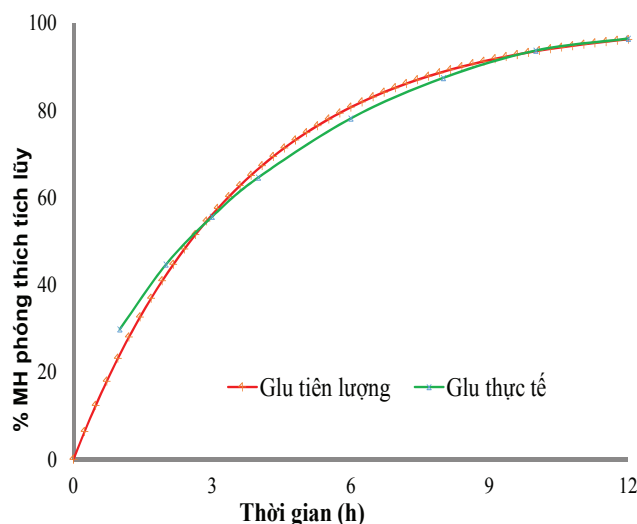
KLTB: khối lượng trung bình; ^(*): $\pm$ SD.

Kết quả đánh giá ĐHPT của viên đối chiếu được trình bày trong bảng 3 và hình 1.

Bảng 3. ĐHPT của viên đối chiếu.

Động học	AIC	R ²	Phương trình động học
Bậc không	39,60	0,93	$F(\%) = 41,33 + 5,14 \times t$
Bậc một	33,71	0,99	$F(\%) = 100 \times (1 - e^{-0,27 \times t})$
Higuchi	39,64	0,98	$F(\%) = 6,46 + 27,64 \times t^{0,5}$
Hixson-Crowell	45,22	0,95	$F(\%) = 100 \times [1 - (1 - 0,07 \times t)^3]$
Korsmeyer-Peppas	37,62	0,98	$F(\%) = 34,00 \times t^{0,44}$

Khi dữ liệu GPHC được khảo sát với phương trình động học bậc không từ thời điểm 1h thu được giá trị R^2 là 0,92, AIC là 50,79 và phương trình hồi quy $y = 5,86 \times t + 35,09\%$. Dựa vào giá trị F_0 của phương trình hồi quy (nhỏ hơn phần trăm GPHC tích lũy đến thời điểm 2h, lớn hơn phần trăm GPHC tích lũy đến thời điểm 1h) có thể đưa ra nhận định quá trình phóng thích gồm 2 pha là pha phóng thích nhanh và phóng thích có kiểm soát, trong đó pha phóng thích nhanh diễn ra trước 2h đầu. Vì vậy, dữ liệu GPHC tiếp tục được khảo sát với mô hình động học bậc không với phần dữ liệu tính từ lúc 2h trở đi để có phương trình phù hợp với pha phóng thích có kiểm soát. Kết quả thu được giá trị R^2 là 0,93, AIC là 39,60 và phương trình hồi quy thu được $y = 5,14 \times t + 41,33\%$. Như vậy, khi tính toán trên phần dữ liệu thu được từ pha phóng thích có kiểm soát đã thu được phương trình có mức tương thích cao hơn, đem lại khả năng dự đoán tốt hơn với giá trị R^2 lớn hơn và giá trị AIC nhỏ hơn đáng kể. Tuy nhiên, dữ liệu này cần tiếp tục khảo sát với các mô hình động học khác để có nhận định đầy đủ và chính xác hơn về sự giải phóng hoạt chất.



Hình 1. Đồ thị GPHC của viên đối chiếu.

Khi dữ liệu GPHC được khảo sát với phương trình động học bậc một thu được giá trị R^2 là 0,99 và AIC là 33,71. Như vậy khi tính toán trên phần dữ liệu thu được từ pha phóng thích có kiểm soát đã thu được phương trình động học bậc một có mức tương thích cao hơn phương trình động học bậc không ở trên do giá trị R^2 lớn hơn và giá trị AIC nhỏ hơn. Tương tự, dữ liệu GPHC tiếp tục được khảo sát với phương trình động học Higuchi thu được giá trị R^2 là 0,98 và AIC là 39,64, với động học Hixson-Crowell thu được giá trị R^2 là 0,95 và AIC là 45,22, với động học Korsmeyer-Peppas thu

được giá trị R^2 là 0,98 và AIC là 37,62. Từ kết quả phân tích động học pha phóng thích có kiểm soát cho thấy, phương trình động học bậc một có mức tương thích cao hơn các mô hình động học khác. Như vậy, kết quả thử với 5 mô hình động học cho thấy mô hình động học bậc một là phù hợp nhất ($R^2=0,99$), động học Korsmeyer-Peppas cũng có mức phù hợp khá cao ($R^2=0,98$), và phương trình động học bậc một thu được là: phần trăm phóng thích tích lũy theo thời gian $F = 100 \times (1 - e^{-0,27 \times t})\%$. Từ đó có thể suy đoán cơ chế GPHC là trương nở và khuếch tán, không bị bào mòn.

Viên nén MH 750 mg PTKD được bào chế với hệ tá được tạo khung matrix thân nước

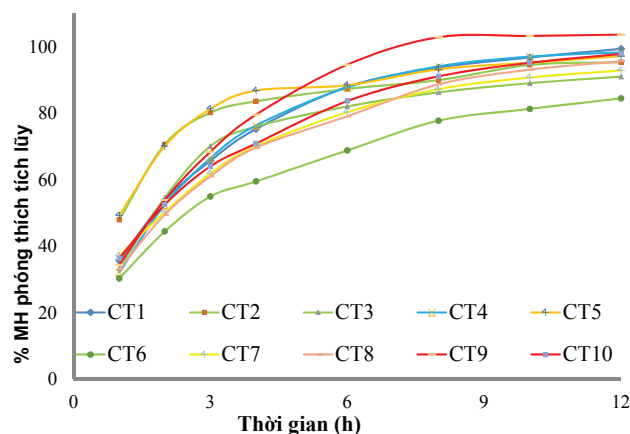
Kết quả khảo sát các công thức điều chế viên nén MH 750 mg PTKD được trình bày trong bảng 4 và hình 2 cho thấy CT2, CT3, CT5 có độ GPHC không đạt tiêu chuẩn USP 40; CT2, CT5 có tỷ lệ hoạt chất phóng thích trong 1h đầu lớn hơn 45%, CT3 có tỷ lệ hoạt chất phóng thích trong 3h đầu lớn hơn 69%. CT1 và CT4 xát hạt dễ dàng, cốm xốp to đều, trong khi CT6 và CT7 khó xát hạt, cốm dính cứng. Cả 4 CT này đều có tính chịu nén tốt, tính trơn chảy tốt, độ ẩm hơi cao, sấy khó hạ thấp độ ẩm; khi dập viên, viên đạt độ đồng đều về khối lượng và độ mài mòn cao. Hệ tá được sử dụng không kiểm soát sự phóng thích hoạt chất như viên đối chiếu. CT4 và CT1 hoạt chất phóng thích nhanh lần lượt sau 4h là 80% và 7h >90%, trong khi CT6 giải phóng chậm hơn sau 12h có khoảng 84% hoạt chất phóng thích. CT7 kiểm soát khả năng phóng thích hoạt chất tốt hơn ở những giờ đầu (1-5h) và có hệ số tương đồng f_2 là 64,52, tuy nhiên công thức khó xát hạt cốm, dính cứng và hao hụt nhiều nên được cải thiện thêm bằng cách điều chỉnh tỷ lệ và thay tá được dính với PVP K30 (CT8).

CT8 xát hạt dễ dàng, cốm hình cầu đều, có tính chịu nén tương đối tốt, tính trơn chảy khá tốt, độ ẩm thấp, sấy nhanh, dập viên đẹp đều, độ mài mòn khá thấp. Tuy giá trị $f_2=71,16$ cao hơn nhưng sự GPHC vẫn có khác biệt so với viên đối chiếu. Giai đoạn đầu vẫn có sự phóng thích cao hơn so với viên đối chiếu, sau đó là giai đoạn phóng thích có kiểm soát và lượng hoạt chất giải phóng trong 12h xấp xỉ viên đối chiếu. CT9 cho thấy xát hạt dễ dàng, đã cải thiện rõ rệt, cốm hình cầu to đều, có tính chịu nén tốt, tính trơn chảy tốt, độ ẩm cao, dập viên bề mặt bị đốm màu xấu của natri alginat, độ mài mòn cao, giá trị f_2 nhỏ hơn 50, trong khi CT10 cũng xát hạt dễ dàng, cốm rất xốp, có tính chịu nén tốt, tính trơn chảy tương đối tốt, độ ẩm cao, dập viên màu trắng đẹp, độ mài mòn thấp. Hệ tá được sử dụng trong công thức có thể kiểm soát sự phóng thích như viên đối chiếu.

Bảng 4. Kết quả khảo sát công thức viên nén MH 750 mg PTKD.

CT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Tính chất viên khảo sát	Cồm xộp	Khó xát hạt	Khó xát hạt	Chảy kém	Tốt	Khó xát hạt	Khá tốt	Tốt	Đỏ nâu	Cồm xộp	
Chỉ số Carr	13	11	7	21	17	12	15	13	13	21	
KLTB (mg) (n=20)	1210,9	1209,6	1216,7	1218,1	1216,5	1306,3	1192,6	1219,5	1206,0	1207,9	
Độ cứng (N) (n=10)	164	181	182	179	188	189	186	186	164	163	
Mài mòn (%) (n=3)	1,82	0,31	0,32	0,62	0,34	0,13	0,55	0,62	1,84	1,66	
Độ ẩm (%) (n=3)	4,38	1,39	3,39	2,15	1,49	2,02	2,09	1,69	3,4	3,08	
HLTB (%) (n=3)	100,45	100,38	100,13	100,28	100,97	101,15	100,15	101,06	101,29	101,98	
f ₂	54,91	39,36	53,92	55,25	38,13	54,42	64,52	71,16	46,87	61,09	
Bậc không	AIC	31,84	14,48	22,89	32,00	18,45	35,05	39,91	39,00	35,24	39,39
	R ²	0,88	0,97	0,93	0,87	0,94	0,94	0,89	0,92	0,84	0,91
Bậc một	AIC	30,28	47,08	46,74	14,80	43,32	50,12	44,71	38,95	38,77	38,71
	R ²	0,99	0,84	0,90	0,99	0,90	0,84	0,93	0,97	0,98	0,97
Higuchi	AIC	47,55	50,02	51,93	50,54	50,36	38,70	42,88	42,96	50,95	43,11
	R ²	0,94	0,82	0,86	0,92	0,82	0,97	0,96	0,96	0,92	0,96
Hixson-Crowell	AIC	43,68	56,78	53,33	40,26	55,95	56,17	52,27	49,02	35,42	48,25
	R ²	0,95	0,45	0,78	0,97	0,53	0,66	0,81	0,90	0,97	0,90
Korsmeyer-Peppas	AIC	44,54	46,56	49,30	48,22	46,81	34,61	38,82	39,59	48,88	39,19
	R ²	0,96	0,88	0,90	0,94	0,88	0,98	0,97	0,98	0,94	0,98
Bậc động học	n	0,36	0,21	0,31	0,37	0,22	0,37	0,35	0,38	0,38	0,36

KLTB: khối lượng trung bình; HLTB: hàm lượng trung bình.



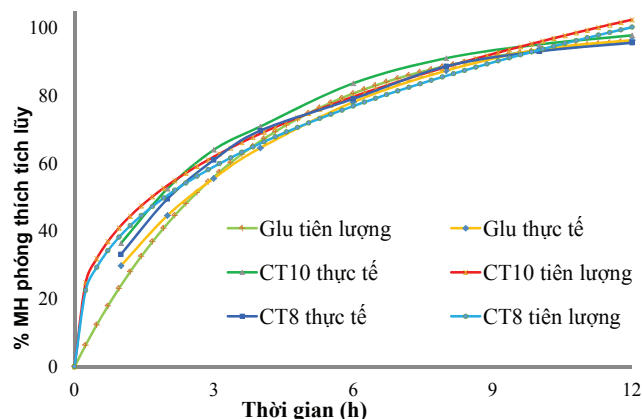
Hình 2. Đồ thị GPHC của CT1-CT10.

Kết quả độ GPHC của CT8 và CT10, hình 3, cho thấy giá trị phần trăm phóng thích tích lũy tại các thời điểm đều lớn hơn so với viên đối chiếu nhưng không quá nhiều; để cải thiện công thức trên có thể tăng lượng tá dược tạo khung nhằm kiểm soát sự phóng thích tốt hơn ngay từ đầu, tuy nhiên khối lượng viên tăng gây tăng kích thước viên, tăng giá thành sản phẩm.

Tương tự viên đối chiếu, độ hòa tan của các viên khảo sát được đánh giá theo các phương trình động học, kết quả cho thấy CT1 và CT4 tuân theo động học bậc một với giá trị R² rất cao lần lượt là 0,99 và 0,99 có thể suy đoán cơ chế phóng thích hoạt chất là khuếch tán và trương nở không bào mòn. CT 2, 3 và 5 tuân theo động học bậc không với giá trị R² lần lượt là 0,97, 0,93 và 0,94 có thể suy đoán cơ chế phóng thích hoạt chất là khuếch tán là chính. CT 6, 8 và 10 tuân theo động học Korsmeyer-Peppas với giá trị R² là 0,98 và CT 7 cho giá trị R² là 0,97, có thể suy đoán cơ chế phóng thích hoạt chất là khuếch tán qua khung xốp không trương nở kết hợp bào mòn. CT9 tuân theo động học Hixson-Crowell với giá trị R² là 0,99 có thể suy đoán cơ chế phóng thích hoạt chất là bào mòn kết hợp khuếch tán.

Kết quả thử với 5 mô hình động học cho thấy mô hình động học Korsmeyer-Peppas là phù hợp nhất với CT8 có phương trình là: phần trăm phóng thích tích lũy theo thời gian $F = 38,84 \times t^{0,380\%}$, động học bậc một cũng có mức phù hợp đáng quan tâm với phương trình động học là: phần trăm phóng thích tích lũy theo thời gian $F = 100 \times (1 - e^{-0,31 \times t})\%$.

Đánh giá các công thức dựa trên giá trị f_2 thì CT8 là tốt nhất (71,16), kế tiếp là CT7 (64,52) rồi đến CT10 (61,09); đánh giá theo tương đồng mô hình động học đối với 3 CT này thì CT7 (tương thích nhất mô hình động học Korsmeyer-Peppas, kế đến là động học bậc một với giá trị R² là 0,93) khác nhiều với viên đối chiếu phù hợp nhất với mô hình động học bậc một (R² là 0,99), CT8 và CT10 tương tự nhau phù hợp nhất với mô hình động học Korsmeyer-Peppas với giá trị R² xấp xỉ nhau lần lượt là 0,98, 0,98; bên cạnh đó mô hình động học bậc một cũng khá phù hợp với CT8, CT10, giá trị R² xấp xỉ nhau lần lượt là 0,97, 0,97. Tiếp tục so sánh CT8 và CT10 với viên đối chiếu dựa trên đồ thị hòa tan theo thực nghiệm và tiên lượng dựa trên mô hình động học thu được ở đồ thị trong hình 3 cho thấy về mặt thực nghiệm và tiên lượng thì CT8 và viên đối chiếu có đồ thị hòa tan giống nhau hơn. Từ các so sánh cho thấy CT8 có đầy đủ căn cứ được lựa chọn.



Hình 3. So sánh đồ thị GPHC giữa các CT tiềm năng.

Tiếp tục khảo sát độ hòa tan của CT8 theo Test 1, 3, 8, 10, 11 của USP 40 được tóm tắt trong bảng 5 cho kết quả độ hòa tan theo các thời điểm 1, 2, 3, 6, 10h lần lượt là 33,17, 49,54, 61,07, 79,11, 93,12% đạt yêu cầu của các Test này.

Bảng 5. Một số phương pháp thử độ hòa tan theo USP 40.

Test	Môi trường	Thiết bị	Thời điểm (h)	(% Hoạt chất phóng thích (n = 6))	
				CT8	Tiêu chuẩn USP 40
1 và 3	1.000 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8	Giò quay 100 vòng/phút	1	33,17	22-42
			3	61,07	49-69
			10	93,12	≥85
8	1.000 ml dung dịch đệm phosphat 0,05M pH 6,8	Giò quay 100 vòng/phút	1	33,17	20-40
			2	49,54	35-55
			6	79,11	75-95
			10	93,12	≥85
10	1.000 ml dung dịch đệm phosphat 0,05M pH 6,8	Giò quay 100 vòng/phút	1	33,17	25-45
			3	61,07	50-70
			10	93,12	≥85
11	1.000 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8	Giò quay 100 vòng/phút	1	33,17	25-45
			3	61,07	50-70
			10	93,12	≥80

Kết luận

CT8 của viên nén MH 750 mg PTKD được bào chế với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước có độ GPHC đạt tiêu chuẩn USP 40 - Test 1, 3, 8, 10, 11, tương đương với viên đối chiếu Glucophage XR. Trong đó hệ tá dược sử dụng 7,5% gôm xanthan, 7,5% Acrypol 971p và 15% magiê nhôm silicate tạo khung cho giá trị f_2 cao nhất, tuân theo mô hình động học Korsmeyer-Peppas ($R^2=0,98$; $AIC=39,59$), phương trình %GPHC tích lũy $F = 38,84 \times t^{0,380}$, cơ chế chủ đạo là khuếch tán và ăn mòn, trong khi viên đối chiếu tuân theo động học bậc một có cơ chế GPHC là trương nở và khuếch tán qua màng gel tạo thành. Một số công thức chỉ khác nhau nhỏ về tỷ lệ cũng dẫn đến ĐHPT khác nhau do ảnh hưởng của từng thành phần tạo nên sự khác biệt về cơ chế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Chandan Garg and Vikrant Saluja (2013), "Once-daily sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride based on an enteric polymer and chitosan", *J. Pharm. Educ. Res.*, **4**(1), pp.92-97.
- [2] International Diabetes Federation (2017), *IDF diabetes atlas*.
- [3] World Health Organization (2016), *Global report on diabetes*.
- [4] Nguyen Thy Khue (2015), "Review Diabetes in Vietnam", *Annals of Global Health*, **81**(6), pp.870-873.
- [5] Cao Thị Thanh Ngọc (2007), *Nghiên cứu kỹ thuật và quy trình bào chế viên nén PTKD chứa metformin 500 mg*, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh.
- [6] F. Palmer, et al. (2005), "Investigation of a directly compressible metformin HCl 500 mg extended release formulation based on hypromellose", *Controlled release society annual meeting*, pp.1-3.
- [7] K. Lila Nath, R. Nihar Pani (2014), "Development of controlled release tablet by optimizing HPMC: Consideration of theoretical release and RSM", *Carbohydrate Polymers*, **104**, pp.238-245.
- [8] Nguyễn Xuân Đình (2012), "Nghiên cứu bào chế viên metformin hydroclorid giải phóng kéo dài", *Tạp chí Dược học*, **52**(8), pp.10-13.
- [9] Saptarshi Dutta, et al. (2010), "Formulation and evaluation of metformin hydrochloride sustained release matrix tablets", *Journal of Pharmacy Research*, **3**(4), pp.781-784.
- [10] Yong Zhang, Meirong Huo, Jianping Zhou, Aifeng Zou, Weize Li, Chengli Yao, Shaofei Xie (2010), "DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles", *The AAPS Journal*, **12**(3), pp.263-271.

Điều chế SMEDDS chứa cao diếp cá toàn phần và khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ

Ngô Tiến Thịnh, Vũ Anh, Trần Lê Tuyết Châu*

Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 3/8/2018; ngày chuyển phản biện 6/8/2018; ngày nhận phản biện 11/9/2018; ngày chấp nhận đăng 14/9/2018

Tóm tắt:

Hệ thống chuyển giao thuốc dạng vi tự nhũ (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) thường gọi là hệ vi tự nhũ chứa cao diếp cá (DC) toàn phần (SMEDDS-DC) được điều chế nhằm cải thiện độ ổn định của quercitrin - một thành phần có hoạt tính trong cao DC, đồng thời hoạt tính kháng viêm cấp của hệ SMEDDS-DC đã được đánh giá trên mô hình gây viêm bằng carrageenan. Thành phần của SMEDDS-DC gồm cao DC toàn phần (20%, kl/kl), dầu mè (20%, kl/kl), tween 80 (52%, kl/kl), glycerol (8%, kl/kl). Hệ có kích thước tiểu phân trung bình khoảng $184,9 \pm 1,72$ nm (PDI $0,343 \pm 0,004$) và thế zêta trung bình khoảng $-32,77 \pm 1,21$ mV. Tác động kháng viêm cấp của hệ trên mô hình gây viêm bằng carrageenan cho thấy hệ SMEDDS-DC thể hiện tác động điều trị viêm cấp tính ở liều 430 mg/kg và 860 mg/kg từ 1 giờ sau khi cho chuột uống thuốc.

Từ khóa: diếp cá, quercitrin, SMEDDS, tác động kháng viêm cấp tính.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Từ lâu, DC đã được sử dụng rộng rãi như một loại rau gia vị giúp kích thích tiêu hóa, tăng thêm mùi vị món ăn, tạo cảm giác ngon miệng. Theo Đông y, DC có vị cay, tính hơi lạnh, giúp thanh nhiệt giải độc cho cơ thể, lợi tiểu, sát trùng. Chính vì vậy, trong các tài liệu y học cổ truyền cũng đã lưu lại nhiều tác dụng quý từ DC. Tuy nhiên, không phải ai cũng có thể ăn được loại rau này vì bản thân DC có vị hơi tanh và đắng, đồng thời việc sử dụng dài ngày trong điều trị các bệnh mạn tính theo các đơn thuốc bằng kinh nghiệm dân gian với khoảng 20,0 g cao khô mỗi ngày quả thật khó khăn [1]. Hơn nữa, flavonoid có tính thân nước sẽ khó qua được màng phospholipid kép, nên hấp thu kém khi dùng qua đường uống. Quercitrin trong cao DC kém ổn định, dễ bị phân hủy bởi pH và các tác nhân tại đường tiêu hóa nên làm giảm khả năng điều trị của thuốc dạng quy ước chứa cao DC [2].

Với sự phát triển của công nghệ dược phẩm, một số hệ thống phân phối thuốc mới đã ra đời, trong đó có hệ SMEDDS. Thành phần chính của hệ SMEDDS là các tá dược lipid, các chất diện hoạt và đồng diện hoạt. Khi phân tán vào nước, dưới tác động của nhu động dạ dày có thể tạo ra hệ vi nhũ tương D/N có kích thước tiểu phân nhỏ dưới 250 nm, diện tích bề mặt lớn nên tăng khả năng hòa tan và thấm qua màng của hoạt chất [3, 4]. Từ đó, hệ SMEDDS-DC đã được điều chế nhằm mục đích giúp cải thiện tính kém

bền của quercitrin - một flavonoid chính trong dược liệu DC và khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu gồm: cao DC của Công ty Cổ phần sản xuất và thương mại Hồng Bàng đạt tiêu chuẩn cơ sở; quercitrin của Viện Công nghệ hóa học TP Hồ Chí Minh; Plurol® Oleique CC 497, Peceol™, Labrafil® 1944 CS, Capryol 90, Labrasol®, Gelucire® 50/13, Gelucire® 44/14 của Gattefossé (Pháp); tween 80 của Merck (Đức); dầu mè của Meizan (Việt Nam); PEG 400 của HIMEDIA (Ấn Độ) và glycerol của Sigma-Aldrich (Mỹ). Các dung môi acid hydrocloric, acid formic, methanol, acetonitril được cung cấp bởi Merck (Đức).

Carrageenan 1% (Sigma-Aldrich, Mỹ) pha trong dung dịch nước muối sinh lý, dung dịch chống thấm Ornano imbidente (Ugo Basile, Ý) pha 1 ml với 250 mg NaCl trong 500 ml nước cất, thuốc đối chứng diclofenac hàm lượng 50 mg (viên nén bao phim Voltaren, Novartis, số lô KA833, hạn sử dụng 01/08/2019).

Chuột nhắt trắng đực, chủng *Swiss albino*, 6-7 tuần tuổi, khoảng 25,0 g, cung cấp bởi Viện Vaccin và sinh phẩm Nha Trang. Sử dụng chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, được nuôi ổn định trong môi trường thí nghiệm 5 ngày. Chuột được nuôi trong lồng kích thước 25x35x15 cm,

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

Preparation of SMEDDS containing *Houttuynia cordata* (Thunb.) extract and examination of the acute anti-inflammatory effects

Tien Thinh Ngo, Anh Vu, Le Tuyen Chau Tran*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy,
Ho Chi Minh City

Received 3 August 2018; accepted 14 September 2018

Abstract:

SMEDDS containing *Houttuynia cordata* (Thunb.) extract (SMEDDS-HCE) was prepared to improve the stability of quercitrin and examine the acute anti-inflammatory effects by the carrageenan model on mice. The chosen SMEDDS-HCE formulation contained *Houttuynia cordata* (Thunb.) extract (20%, w/w), tween 80 (52%, w/w), glycerol (8%, w/w), and sesame oil (20%, w/w). The SMEDDS-HCE was dark brown and homogenous. The average particle size was 184.9 ± 1.72 nm, PDI was 0.343 ± 0.004 , and the average zeta potential value was -32.77 ± 1.21 mV. The results on the examination of the acute anti-inflammatory properties of SMEDDS-HCE using the carrageenan model showed that SMEDDS-DC exhibited acute anti-inflammatory effects at doses of 430 mg/kg or 860 mg/kg after 1 hour of the administration of SMEDDS-HCE.

Keywords: acute anti-inflammatory properties, *Houttuynia cordata* (Thunb.), quercitrin, SMEDDS.

Classification number: 3.4

cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp định lượng quercitrin trong cao DC bằng HPLC: độ tan của quercitrin trong các tá dược được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Hệ thống HPLC Hewlett Packard 1050, cột Lichrosorb RP18 (150x4,60 mm; 5 μ m), detector PDA, bước sóng phát hiện ở 254 nm, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μ l, pha động gồm acetonitril : acid formic 0,1% theo chương trình (bảng 1).

Bảng 1. Chương trình dung môi pha động theo gradient nồng độ.

Thời gian (phút)	Acid formic 0,1% (%)	Acetonitrile (%)
0	85,3	14,7
5	85,3	14,7
15	70	30
22	70	30
25	0	100
30	0	100

Khảo sát khả năng phân tán của cao DC trong các tá dược bằng phương pháp cảm quan và độ tan của quercitrin/DC trong các tá dược bằng phương pháp HPLC: khả năng phân tán của cao DC toàn phần được khảo sát trong các tá dược Plurol® Oleique CC 497, Peceol™, Labrafil® 1944 CS, Capryol 90, Labrasol®, PEG400, glycerol, tween 80.

Tiến hành khảo sát khả năng phân tán: cân chính xác khoảng một lượng tá dược lỏng nêu trên. Thêm vào tá dược từng lượng xác định cao DC, khuấy đều bằng máy khuấy từ với tốc độ 500 vòng/phút ở nhiệt độ phòng đến quá bão hòa. Quan sát và đánh giá cảm quan mẫu thu được để sơ bộ lựa chọn tá dược cho phương pháp định lượng. Yêu cầu: cao DC toàn phần phân tán đều trong các tá dược khảo sát để tạo hệ có thể chất mịn.

Dựa trên kết quả khảo sát bằng phương pháp cảm quan, lựa chọn các tá dược có khả năng phân tán tốt cao DC, tiến hành xác định độ tan của quercitrin trong các tá dược được lựa chọn bằng phương pháp HPLC.

Tiến hành khảo sát độ tan: cân chính xác khoảng một lượng tá dược lỏng. Thêm vào tá dược từng lượng xác định cao DC, khuấy đều bằng máy khuấy từ với tốc độ 500 vòng/phút ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ đến quá bão hòa. Tiếp tục khuấy đều trong 4 giờ, ly tâm dịch với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 15 phút, tiến hành định lượng quercitrin trong lớp dịch phía trên bằng phương pháp HPLC.

Điều chế hệ SMEDDS-DC: dựa vào kết quả khảo sát độ tan của quercitrin bằng phương pháp HPLC, lựa chọn các tá dược thích hợp để xây dựng công thức giả mang SMEDDS thông qua giản đồ ba pha. Sau đó, tiến hành tải 20% cao DC toàn phần vào các công thức giả mang được lựa chọn (SMEDDS-DC). Các công thức SMEDDS-DC sẽ được đánh giá các chỉ tiêu: cảm quan, kích thước tiểu phân và thế zeta.

Yêu cầu: SMEDDS-DC tạo thành phải đồng nhất, không tách lớp và không lắng cặn. Kích thước trung bình tiểu phân phải nằm trong khoảng 50-200 nm, PDI < 0,4.

Quy trình điều chế SMEDDS-DC (quy mô phòng thí nghiệm 100 g/mẫu): cân 52,0 g tween 80 và 8 g glycerol

khuyến trộn tạo hỗn hợp đồng nhất bằng máy khuấy từ với tốc độ 300 vòng/phút ở $40 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 5 phút. Sau đó, phân tán từ từ 20,0 g cao DC vào hỗn hợp trên bằng máy khuấy từ với tốc độ 300 vòng/phút ở $40 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 10 phút. Phối hợp từ từ pha dầu vào pha thân nước bằng máy khuấy từ với tốc độ 500 vòng/phút ở $40 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 10 phút để tạo hệ SMEDDS-DC. Để nguội đến nhiệt độ phòng, đóng chai, dán nhãn.

Khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ SMEDDS-DC: gây phù chân chuột bằng carrageenan theo Winter và cộng sự (1962). Carrageenan là polysaccharid cấu tạo từ các polymer của β -(1,3)-D-galactose và β -(1,4)-3,6-hydro-D-galactose. Do là hợp chất cao phân tử nên khi vào trong cơ thể, carrageenan trở thành kháng nguyên thông qua cơ chế miễn dịch kháng nguyên - kháng thể. Mức độ viêm tối đa ở trong thời gian 3-5 giờ. Mẫu có tác dụng kháng viêm sẽ làm giảm mức độ phù chân chuột. Carrageenan gây viêm cấp theo 2 pha: pha 1 giải phóng histamin và serotonin; pha 2 giải phóng bradykinin, protease, prostaglandin và lysosom.

Thực hiện: tính toán liều thử nghiệm trên chuột đối với hệ phân tán, dự kiến dùng trên người là 2 g/ngày và 4 g/ngày, tương đương 2.000 và 4.000 mg/57,5 kg/ngày (vì người lớn có trọng lượng khoảng 55-60 kg, tính trung bình khoảng 57,5 kg) = 34,8 và 69,6 mg/kg/ngày. Quy đổi sang liều trên chuột nhất = liều ở người x 12,3, tương đương khoảng 430 và 860 mg/kg.

Chuẩn bị dung dịch chống thấm: sử dụng nước cất, cho muối KCl và dung dịch chống thấm vào nước cất (theo tỷ lệ 0,3-0,4 g KCl cho 0,7 lít nước cất).

Đo thể tích chân chuột bình thường (V_{-3h}) trên máy Plethysmometer: nhúng chân phải của chuột vào dung dịch chống thấm đến khuỷu chân, nhấn giữ bàn đạp để cố định, ghi nhận thể tích.

Chuẩn bị dung dịch gây viêm: ngâm carrageenan 1% trong nước muối sinh lý NaCl 0,9% trước 2 giờ cho trương nở hoàn toàn.

Chuột được gây viêm bằng cách tiêm dưới da vào gan bàn chân phải sau 0,025 ml dung dịch carrageenan 1%. Tiến hành đo thể tích chân chuột sau khi tiêm 3 giờ (V_{0h}). Độ chênh lệch giữa 2 lần đo trước và sau khi gây viêm được xem là độ phù và tính theo công thức:

$$DV_t (\%) = [(V_t - V_{-3h}) / V_{-3h}] \times 100 \quad (1)$$

Trong đó, DV_t là độ phù bàn chân chuột, tính theo %; V_t là thể tích chân chuột tại thời điểm sau khi gây viêm, bắt đầu điều trị (ml); V_{-3h} là thể tích chân chuột tại thời điểm trước khi gây viêm (ml).

Những chuột độ phù sau khi gây viêm 3 giờ (DV_{0h}) từ

50% trở lên được chia thành 4 lô theo độ phù, mỗi lô 10 chuột đực, đảm bảo không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các lô:

Lô chứng bệnh: uống nước cất.

Lô đối chứng: uống diclofenac (viên nén bao phim Voltaren 50 mg) liều 10 mg/kg.

Lô thử 1: uống hệ SMEDDS-DC liều 430 mg/kg.

Lô thử 2: uống hệ SMEDDS-DC liều 860 mg/kg.

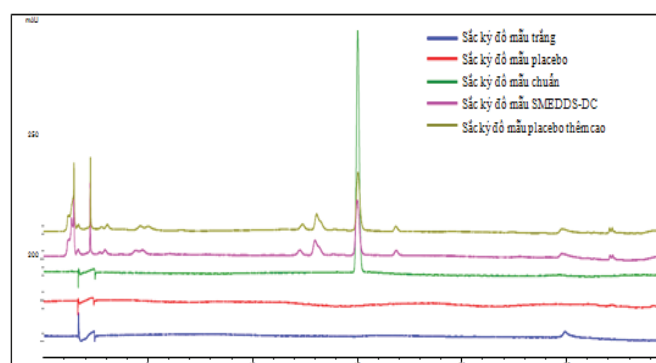
Chuột được cho uống nước cất, diclofenac hoặc mẫu thử 1 lần ngay sau khi phân lô với thể tích 10 ml/kg. Đo thể tích chân chuột sau khi cho uống 1, 3, 5, 18 và 24 giờ, tính mức độ phù bàn chân chuột ở các thời điểm theo công thức (1).

Xử lý kết quả và phân tích thống kê: kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (standard error of mean - sai số chuẩn của số trung bình). Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm Kruskal-Wallis và Mann-Whitney với phần mềm SPSS 22.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

Kết quả và bàn luận

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng quercitrin trong cao DC toàn phần bằng phương pháp HPLC

Quy trình định lượng quercitrin trong cao DC toàn phần bằng phương pháp HPLC đạt yêu cầu về thẩm định tính tương thích hệ thống ($RSD < 2\%$), độ đặc hiệu (t_R của đỉnh quercitrin trong mẫu cao DC là 14,979 phút, tương đương với t_R của đỉnh quercitrin trong mẫu chuẩn là 15,008 phút ở bước sóng 254 nm). Phương pháp cũng đạt yêu cầu về tính tuyến tính ($r^2 = 0,9999$) trong khoảng nồng độ trung bình từ 20 đến 200 $\mu\text{g/ml}$, độ lặp lại ($RSD = 1,28\%$) và độ đúng (tỷ lệ hồi phục trung bình là 99,83%, $RSD = 0,380\%$). Sắc ký đồ định lượng quercitrin bằng phương pháp HPLC được thể hiện trên hình 1.



Hình 1. Sắc ký đồ định lượng quercitrin bằng phương pháp HPLC.

Khảo sát khả năng phân tán của cao DC và độ tan của quercitrin trong các tá dược

Thí nghiệm được tiến hành ở hai điều kiện nhiệt độ là $30 \pm 2^\circ\text{C}$ và $40 \pm 2^\circ\text{C}$. Độ tan của quercitrin trong các tá dược ở nhiệt độ $30 \pm 2^\circ\text{C}$ và $40 \pm 2^\circ\text{C}$ khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Theo phương pháp cảm quan, cao DC phân tán tốt trong dầu mè nhưng lại không tìm được quercitrin bằng phương pháp HPLC. Vì quercitrin là một glycosid của quercetin có cấu trúc khung cơ bản là favonol (=favon 3-ol), trong phân tử có nhiều nhóm -OH tự do làm cho quercitrin có tính phân cực cao. Tuy nhiên, trong nguyên liệu ta sử dụng là cao DC toàn phần nên thành phần gồm nhiều nhóm chất trong đó có những chất thân dầu, những chất này sẽ hòa tan/phân tán tốt vào các lipid. Bằng phương pháp định lượng, quercitrin/cao DC tan tốt trong tween 80 và glycerol. Vì vậy, lựa chọn hệ dầu mè - tween 80 - glycerol để tiến hành xây dựng giản đồ ba pha cho công thức giả mang SMEDDS.

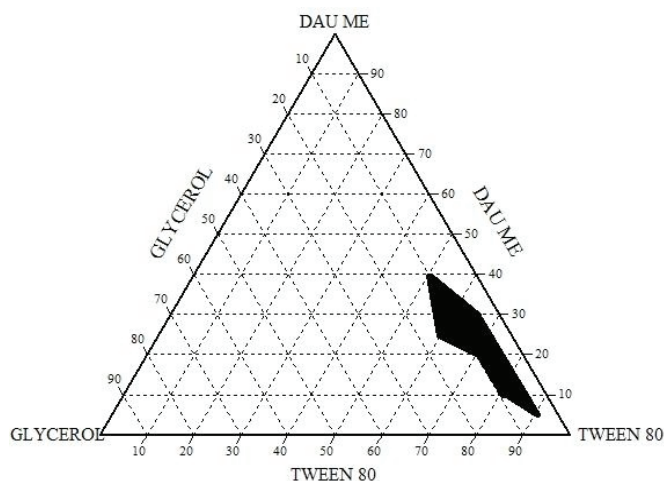
Xây dựng giản đồ pha

Giản đồ pha: dầu mè là pha dầu, tween 80 là chất diện hoạt và glycerol là chất đồng diện hoạt. Đánh giá các điểm của giản đồ ba pha dựa theo các tiêu chuẩn:

Cảm quan: giả mang phải đồng nhất, không tách lớp, trong hay trong mờ.

Khả năng nhũ hóa: tại các điểm của giản đồ pha, tiến hành pha loãng 100 lần trong nước ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$ với tốc độ khuấy 70-100 vòng/phút. Nhũ tương hình thành nhanh, trong suốt hoặc trong mờ ánh xanh (< 2 phút).

Các công thức được theo dõi trong vòng 24 giờ về cảm quan và khả năng tự nhũ hóa. Kết quả xây dựng giản đồ pha được trình bày ở hình 2 với phần được tô màu đen hình thành từ tỷ lệ thành phần của các công thức đạt yêu cầu về cảm quan và khả năng nhũ hóa.



Hình 2. Giản đồ pha của hệ dầu mè - tween 80 - glycerol.

Từ giản đồ ba pha đã xây dựng, thiết lập được các công thức giả mang SMEDDS nằm trong vùng tạo vi nhũ tương (vùng màu đen trong hình 2), sau đó tiến hành đo kích thước và phân bố kích cỡ tiểu phân, thể zêta của các công thức giả mang. Các công thức đạt yêu cầu khi có kích thước tiểu phân trung bình nhỏ hơn 200 nm, kiểu phân bố kích thước tiểu phân 1 đỉnh và $PdI < 0,4$. Với các yêu cầu đề ra, chúng tôi đã lựa chọn được 4 công thức giả mang phù hợp để tiến hành điều chế SMEDDS-DC.

Điều chế SMEDDS-DC

Cao DC toàn phần được tải vào 1 g hệ vi tự nhũ với tỷ lệ 20% hình thành hệ SMEDDS-DC, đánh giá khả năng tải của các hệ giả mang. Tiếp theo, SMEDDS-DC được đánh giá các chỉ tiêu: cảm quan, kích thước và phân bố kích cỡ tiểu phân, thể zêta và khả năng nhũ hóa sau khi bảo chế và sau 24 giờ bảo quản ở điều kiện $30 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $75 \pm 5\%$.

Kết quả cho thấy, trong 4 công thức SMEDDS-DC có 3 công thức gồm **MTG4** (30% dầu mè - 60% tween 80 - 10% glycerol), **MTG5** (25% dầu mè - 65% tween 80 - 10% glycerol), **MTG6** (25% dầu mè - 60% tween 80 - 15% glycerol) đạt yêu cầu về cảm quan là hệ đồng nhất, phân tán đều, thể chất mịn, không lắng cặn. Các công thức SMEDDS-DC được lựa chọn sẽ pha loãng 100 lần với nước cất ở $37 \pm 2^\circ\text{C}$ với tốc độ khuấy 70-100 vòng/phút. Đánh giá khả năng nhũ hóa dựa vào thời gian nhũ hóa và cảm quan của hệ vi nhũ tương tạo thành, kết quả được trình bày trong bảng 2.

Hệ vi nhũ tương tạo thành sau khi nhũ hóa thì công thức **MTG6** bị đục mờ, các tiểu phân bị kết tụ làm hệ không ổn định. Công thức **MTG4**, **MTG5** sau khi nhũ hóa tạo các vi nhũ tương trong mờ, màu vàng nhạt và có hiện tượng tán xạ ánh sáng xảy ra. Vì vậy, lựa chọn 2 công thức **MTG4** (30% dầu mè - 60% tween 80 - 10% glycerol) và **MTG5** (25% dầu mè - 65% tween 80 - 10% glycerol) để đo kích thước tiểu phân và thể zêta. Kết quả được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả khảo sát thời gian tự nhũ hóa, kích thước tiểu phân trung bình và thể zêta một số công thức ($n = 3$).

Công thức	Thời gian tự nhũ hóa (giây)	Vi nhũ tương hình thành	Nhận xét	Kích thước trung bình tiểu phân (nm)	PdI	Thể zêta (mV)
MTG4	84,7 $\pm$ 2,1	Trong mờ	Đạt	211,33 $\pm$ 5,34	0,220 $\pm$ 0,036	-28,70 $\pm$ 1,07
MTG5	53,3 $\pm$ 2,1	Trong mờ	Đạt	184,92 $\pm$ 1,72	0,343 $\pm$ 0,004	-32,57 $\pm$ 0,45
MTG6	77,7 $\pm$ 2,5	Đục mờ	Không đạt			

Kích thước trung bình tiểu phân của công thức **MTG4** nằm ngoài khoảng 20-200 nm. Công thức **MTG5** đạt yêu cầu về kích thước tiểu phân, PdI và thể zêta. Do đó, công thức **MTG5** (25% dầu mè - 65% tween 80 - 10% glycerol) được lựa chọn.

Khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ SMEDDS-DC

Sự thay đổi độ phù bàn chân chuột theo thời gian giữa các lô chuột được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Sự thay đổi độ phù bàn chân chuột theo thời gian giữa các lô.

Lô thử nghiệm (n=10)	Độ phù trung bình $\pm$ SEM (%)					
	ΔV_{0h}	ΔV_{1h}	ΔV_{3h}	ΔV_{5h}	ΔV_{18h}	ΔV_{24h}
Chứng bệnh	91,32 $\pm 4,53$	95,60 $\pm 6,51$	67,43 $\pm 5,59$	57,05 $\pm 6,78$	60,85 $\pm 9,05$	44,89 $\pm 3,49$
Diclofenac 10 mg/kg	90,46 $\pm 6,09$	48,62 $\pm 4,90^{***}$	32,03 $\pm 3,31^{***}$	24,12 $\pm 3,37^{***}$	25,33 $\pm 4,14^{**}$	22,76 $\pm 2,01^{**}$
SMEDDS-DC 430 mg/kg	89,69 $\pm 6,53$	49,48 $\pm 6,38^{**}$	41,03 $\pm 5,72^{**}$	42,03 $\pm 6,08^{\#}$	49,69 $\pm 6,34^{\#}$	37,33 $\pm 5,05^{\#}$
SMEDDS-DC 860 mg/kg	90,47 $\pm 6,84$	45,07 $\pm 5,24^{***}$	36,51 $\pm 3,50^{***}$	25,92 $\pm 4,67^{**}$	30,51 $\pm 5,93^{**@}$	34,28 $\pm 3,64^{\#}$

** $p < 0,01$ và *** $p < 0,001$: so với lô chứng bệnh ở cùng thời điểm; * $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$: so với lô diclofenac ở cùng thời điểm; @ $p < 0,05$: so với lô SMEDDS-DC 430 mg/kg ở cùng thời điểm.

Lô đối chứng diclofenac liều 10 mg/kg làm giảm độ phù bàn chân chuột so với lô chứng bệnh. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê bắt đầu từ 1 giờ sau khi cho uống thuốc điều trị ($p < 0,01$).

So với lô chứng bệnh, SMEDDS-DC liều 430 mg/kg thể hiện tác dụng kháng viêm làm giảm độ phù bàn chân chuột ở tất cả thời điểm khảo sát; sự khác biệt có ý nghĩa thống kê sau khi cho uống mẫu thử 1 và 3 giờ ($p < 0,01$). Ở lô cho uống SMEDDS-DC liều 860 mg/kg, độ phù thấp hơn lô chứng bệnh từ 10 đến 50%; sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các thời điểm khảo sát ($p < 0,01$), trừ 24 giờ sau khi uống mẫu thử.

Tác động kháng viêm cấp của liều 860 mg/kg thể hiện tốt hơn và kéo dài hơn so với liều 430 mg/kg; không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với thuốc đối chứng diclofenac 10 mg/kg từ trong khoảng thời gian 1 giờ đến 18 giờ sau khi cho chuột uống.

Bàn luận

Nhóm hoạt chất chính trong DC là flavonoid - một nhóm hoạt chất kém bền nên tuy có tác dụng trong thử nghiệm *in*

vitro nhưng tác động kém trong *in vivo*. Đa phần dược liệu được sử dụng dưới dạng thuốc thang hoặc các dạng thuốc quy ước nên không phát huy được hiệu quả điều trị trong lâm sàng.

Từ đó, việc nghiên cứu ứng dụng hệ SMEDDS đã được tiến hành giúp tăng tính ổn định của quercitrin trong cao DC nói riêng và có thể được áp dụng cho các cao chiết dược liệu khác. Hệ SMEDDS-DC dự kiến được phát triển thành dạng bào chế viên nang mềm với liều sử dụng là 2-4 viên/ngày. Điều này giúp cho việc sử dụng thuốc có nguồn gốc tự nhiên dễ dàng hơn so với việc sử dụng dạng bào chế quy ước. Bên cạnh đó, hệ SMEDDS-DC được tạo ra từ các tá dược phổ biến trên thị trường nên việc phát triển sản phẩm có tính kinh tế cao cũng như việc sử dụng sản phẩm sẽ không là gánh nặng cho người bệnh.

Ngoài ra, SMEDDS-DC thể hiện tác động điều trị viêm ở liều 430 và 860 mg/kg từ 1 giờ sau khi cho chuột uống. Tác động này của liều 860 mg/kg thể hiện tốt hơn và kéo dài hơn so với liều 430 mg/kg; khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với thuốc đối chứng diclofenac 10 mg/kg từ trong khoảng thời gian 1 giờ đến 18 giờ sau khi cho chuột uống.

Kết luận

Hệ SMEDDS-DC đã được điều chế thành công bằng cách sử dụng các tá dược phổ thông bằng kỹ thuật cơ học. Kết quả khảo sát tác động kháng viêm cấp cho thấy, hoạt tính dược lý rất khả quan trong điều trị. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của hệ nhằm nâng cao giá trị của các loại thuốc có nguồn gốc tự nhiên trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi (2007), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
- [2] B.F. De Simon, et al. (1995), "Flavonoid separation by capillary electrophoresis. Effect of temperature and pH", *Chromatographia*, **41(7-8)**, pp.389-392.
- [3] B. Singh, et al. (2009), "Self-emulsifying drug delivery systems (SMEDDS): formulation development, characterization, and applications", *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **26(5)**, pp.427-521.
- [4] S.G. Talele, et al. (2016), "Novel approaches for solidification of SMEDDS", *Int. J. Pharm. Biosci.*, **15**, pp.90-101.

Phân loại 2 chủng vi nấm phân lập tại Viện 69 và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của chúng

Phùng Công Thường*, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn Cao Vũ

Viện 69

Ngày nhận bài 11/10/2018; ngày chuyển phản biện 16/10/2018; ngày nhận phản biện 23/11/2018; ngày chấp nhận đăng 27/11/2018

Tóm tắt:

Mục tiêu của đề tài là nghiên cứu định danh 2 chủng vi nấm bằng phương pháp hình thái và giải trình tự gen đoạn ITS rDNA, đồng thời xác định khả năng phân giải các cơ chất collagen, gelatin, cellulose của chúng. Các phương pháp thực hiện bao gồm: nghiên cứu thực nghiệm, mô tả, so sánh các dữ liệu thu thập được với dữ liệu khóa phân loại và dữ liệu genbank. Nghiên cứu được tiến hành trên 2 chủng vi nấm phân lập được ở Viện 69. Kết quả cho thấy, chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Aspergillus versicolor* và chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Aspergillus sydowi*. Đây là 2 loài vi nấm cùng nhóm (*Aspergillus versicolor* group), chúng có các đặc điểm hình thái khá giống nhau và gần gũi nhau về mặt di truyền. Chủng vi nấm ĐTĐL-032 có khả năng phân hủy cơ chất collagen và gelatin, chủng ĐTĐL-207 có khả năng phân hủy 3 cơ chất collagen, gelatin, cellulose.

Từ khóa: cellulose, collagen, gelatin, hình thái, ITS, vi nấm.

Chỉ số phân loại: 3.5

Đặt vấn đề

Nghiên cứu về vi nấm, trước hết cần phân loại (định danh) các chủng thu thập được. Định danh vi nấm hiện nay có nhiều phương pháp, trong đó hình thái là phương pháp truyền thống, cơ bản và tới nay vẫn là phương pháp chính để phân loại vi nấm ở các labo trong và ngoài nước. Phương pháp này dựa vào các đặc điểm hình thái đại thể, vi thể, siêu vi thể và căn cứ vào các khóa phân loại để định danh tên chi, loài vi nấm. Phương pháp sinh học phân tử dựa vào các kỹ thuật PCR, giải trình tự gen... để định danh vi nấm. Trong giải trình tự gen rDNA, một số cặp mồi (ITS1, ITS2, NL1, NL4...) thường được sử dụng để có được trình tự gen đích cho phân tích, định danh loài. Hiện nay, việc kết hợp nhiều phương pháp trong định danh xác định loài vi nấm đang là hướng phát triển mạnh mẽ nhằm có được kết quả chẩn đoán chính xác và nhanh chóng [1, 2].

Vi nấm là các vi sinh vật có thành phần loài phong phú và đa dạng, có khả năng sản sinh hệ các enzyme protease, lipase, cellulase... giúp chúng tồn tại, phát triển trên nhiều loại cơ chất, sống được ở nhiều điều kiện môi trường khắc nghiệt [3]. Viện 69 có một số phòng thí nghiệm có điều kiện khô lạnh (nhiệt độ 16°C, độ ẩm 70%) để bảo quản tiêu bản

sinh học. Các thành phần trong các tiêu bản sinh học bảo quản ở Viện chính là các cơ chất sinh học giúp cho các vi nấm phát triển, có thể gây hư hỏng các tiêu bản. Khảo sát hệ vi nấm ở các phòng thí nghiệm này đã thu được nhiều chủng vi nấm, trong đó các loài thuộc chi *Aspergillus* chiếm tỷ lệ cao.

Từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nội dung nghiên cứu với mục tiêu định danh 2 chủng vi nấm ĐTĐL-207 và ĐTĐL-032 thuộc chi *Aspergillus* thu thập được bằng phương pháp hình thái kết hợp với giải trình tự gen và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của các loài vi nấm này.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Hai chủng vi nấm ĐTĐL-207 và ĐTĐL-032 phân lập được tại Viện 69.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân loại vi nấm dựa vào hình thái:

Tiến hành nuôi cấy chủng vi nấm thuần khiết, xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường Czapek Dox

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

Classification of two fungal strains isolated at the Institute 69 and determining their ability to dissolve some biological substrates

Cong Thuong Phung*, Van Bac Nguyen,
Cao Vu Nguyen

Institute 69

Received 11 October 2018; accepted 27 November 2018

Abstract:

The study aims at the identification of two fungal strains by the morphological method and the sequencing of the ITS rDNA region, and the determination of their ability to dissolve collagen, gelatin, and cellulose. **Methods:** Experimental study, description, and comparison of the collected data with the key classification data and database of GenBank. The study was conducted with two strains of fungi at the Institute 69. Results showed that the strain DTDL-032 belonged to *Aspergillus versicolor* and DTDL-207 belonged to *Aspergillus sydowi*. These are two species of the *Aspergillus versicolor* group, which are quite homogenous in morphological and genetic characteristics. DTDL-032 is capable of decomposing collagen and gelatin substrates; the strain DTDL-207 is capable of decomposing collagen, gelatin, and cellulose.

Keywords: cellulose, collagen, fungi, gelatin, IST, morphology.

Classification number: 3.5

Agar (CZA) [4]. Làm tiêu bản, soi trên kính hiển vi quang học. Xác định các đặc điểm vi thể của sợi nấm và cơ quan sinh sản theo các tiêu chí trong hệ thống phân loại [4, 5]. Làm tiêu bản, quan sát đặc điểm vi nấm trên kính hiển vi điện tử quét (SEM): chuẩn bị mẫu, vi nấm, cố định mẫu bằng Osmic, mạ phủ mẫu bằng vàng. Soi mẫu trên kính hiển vi điện tử quét JSM-5410LV của hãng JEOL. Quan sát, chụp ảnh các đặc điểm siêu vi thể, nhất là đặc điểm của bào tử và cơ quan sinh sản [6]. Xác định vị trí chủng nấm trong hệ thống phân loại: căn cứ vào các khóa phân loại Chi *Aspergillus* của Raper, Fennell (1965) [7]; khóa phân loại của Katsuhiko Ando "Identification of fungi Imperfecti", 2002, NITE [5]. Từ các đặc điểm hình thái khuẩn lạc, vi thể, siêu vi thể, xác định và phân loại, viết tên các chủng nấm theo

đúng danh pháp quốc tế.

Phương pháp phân loại vi nấm dựa vào các trình tự gen:

Nuôi cấy chủng nấm thuần khiết trong môi trường Malt Broth: đặt trong tủ nuôi cấy lắc, tốc độ 180 vòng/phút/25°C trong 3-5 ngày. Thu sinh khối bằng giấy lọc. Tách chiết DNA tổng số bằng kit tách chiết của hãng GeneAll, Hàn Quốc. Kiểm tra nồng độ, độ sạch của DNA tổng số bằng máy đo quang (Nano photometer, IMPLN). Điều chỉnh nồng độ DNA tổng số để đạt khoảng 50 đến 150 ng/μl.

Thực hiện phản ứng PCR nhân gen vi nấm với cặp mồi ITS1 và ITS4. Trình tự của mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGGG-3' (mồi xuôi), ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3 (mồi ngược). Chu trình nhiệt: 94°C/1'; (94°C/30''- 56°C/30''- 68°C/45'') x 35 chu kỳ; 68°C/7'.

Tinh sạch sản phẩm DNA vi nấm sau PCR bằng kit tinh sạch của hãng GeneAll, Hàn Quốc. Kiểm tra nồng độ, độ tinh sạch DNA bằng máy đo quang. Điều chỉnh nồng độ DNA tổng số, đạt khoảng 20 ng/μl đến 30 ng/μl.

Giải trình tự gen trực tiếp sử dụng mồi ITS1 trên hệ thống ABI 3130. Phân tích trình tự gen, xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm Bioedit, DNASTAR, công cụ Blast và các dữ liệu trên genbank [1, 2, 8].

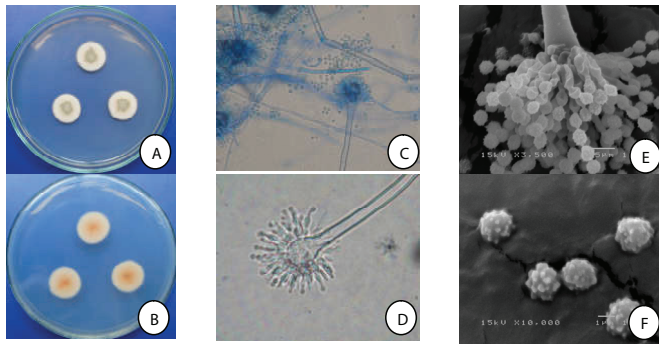
Phương pháp xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính các enzyme vi nấm:

Xác định hoạt tính các enzyme collagenase, gelatinase, cellulase theo phương pháp thạch đĩa: môi trường cơ chất collagen 0,1% (nutrient agar 20 g, collagen 1 g), cơ chất gelatin 0,4% (nutrient agar 20 g, gelatin 4 g), cơ chất cellulose 1% (CZA 48 g, carboxymethyl cellulose-CMC 10 g). Môi trường cơ chất pha trong 1000 ml nước cất, hấp vô trùng ở 121°C/15 phút, để nguội khoảng 45°C, phân phối vào các đĩa petri. Cấy các chủng vi nấm lên đĩa môi trường thành 3 điểm, đặt trong tủ ẩm ở 25°C trong 5 ngày. Dùng thuốc thử HgCl₂ đổ lóng trên bề mặt đĩa thạch có cơ chất collagen hoặc gelatin, thuốc thử KI với đĩa thạch có CMC. Đo bán kính khuẩn lạc và bán kính vòng phân giải (vòng trong suốt xung quanh khuẩn lạc), xác định hệ số phân giải cơ chất (I) theo công thức: $I = R_2^2/R_1^2$. Trong đó: R_2 là bán kính vòng phân giải, R_1 là bán kính khuẩn lạc. Hệ số phân giải I càng lớn thì hoạt tính enzyme càng cao [4].

Kết quả nghiên cứu

Kết quả phân loại chủng vi nấm DTDL-032

Phân loại chủng DTDL-032 bằng phương pháp hình thái: hình ảnh khuẩn lạc và các hình ảnh vi thể, siêu vi thể của chủng được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Chủng ĐTDL-032. (A-B) Khuẩn lạc và mặt trái khuẩn lạc (CZA), nuôi cấy 10 ngày, 25°C; (C-D) Cơ quan sinh bào tử và bào tử trần X 1000; (E) Cơ quan sinh bào tử trần (SEM) X 3500; (F) Bào tử trần (SEM) X 10000.

Mô tả chủng:

Đặc điểm khuẩn lạc: khuẩn lạc trên môi trường CZA phát triển khá chậm, đạt 2,5-3 cm trong 10 ngày ở nhiệt độ phòng, phân vùng, có khía đồng tâm tỏa ra xung quanh. Mặt khuẩn lạc dạng nhung, mịn, lúc đầu có màu trắng nhạt, sau chuyển sang màu vàng, vàng cam tới lục vàng; giọt tiết ít, không màu đến vàng nhạt; mặt trái màu vàng đến vàng da cam hoặc đỏ tía.

Đặc điểm vi thể, siêu vi thể: cuống sinh bào tử đa số ngắn (200-300 mm), nhưng có thể dài tới 500-700 mm, đường kính 5-10 mm, nhẵn, không màu đến nâu nhạt. Bọng hình clavate đến gần cầu, kích thước (KT) 13-18 mm. Thê bình 2 tầng; cuống thê bình KT 5,5-8,0 mm x 3,0 mm; thê bình KT 5,0-7,5 mm x 2,0-2,5 mm. Bào tử hình cầu, hầu hết KT 2,5-3,0 mm, có thể đến 3,5 mm, gai ráp.

Kết luận tên loài: *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi [7].

Phân loại chủng ĐTDL-032 dựa vào trình tự gen ITS rDNA:

Giải trình tự gen với mỗi ITS1, có trình tự sau sửa lỗi bằng phần mềm Bioedit như sau:

>032 ITS ITS1:

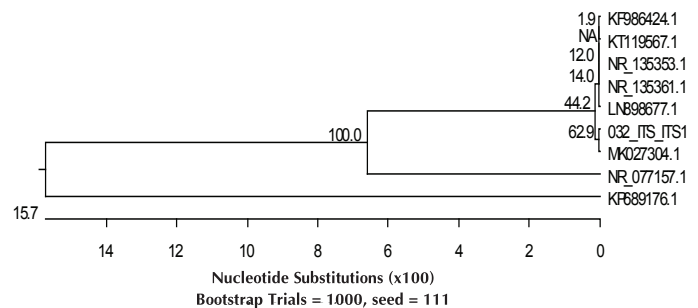
CCACCTCCACCCGCTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGGCGC
GCCGCCGGGACTACTGAACCTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAA
ATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
ACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACAT
TGCGCCCTCGGCATTCCGGGGGCGATGCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCC
GGCTTGTGTGTTGGGTGCTGCTCCCCCGGGGACGGGCGGAAAGGCAGCGCGGCGAC
CGTGTCCGCTCTCGAGCGTATGGGCTTTGTCACCGCTCGATTAGGGCCGCGCGGCG
CCAGCCGACGTCAACCACTTTTCTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGATACCGGCTG
AACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

Sau khi Blast (Blast/NCBI) thu được kết quả tương đồng với các trình tự dữ liệu trên genbank thể hiện tóm tắt ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen 032 ITS ITS1.

TT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	MK027304.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
2	LC105689.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
3	NR_135443.1	<i>Aspergillus austroafricanus</i>	99
4	KF986424.1	<i>Aspergillus carneus</i>	99
5	LN898677.1	<i>Aspergillus amoenus</i>	99
6	NR_135361.1	<i>Aspergillus tabacinus</i>	99
7	NR_135353.1	<i>Aspergillus protuberus</i>	99
8	KP689176.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	69
9	NR_077157.1	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	72

Từ trình tự nghiên cứu và các trình tự tham khảo thu được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại và tính độ tương đồng di truyền bằng phần mềm DNASTAR, kết quả thu được ở hình 2 và hình 3.



Hình 2. Cây phân loại trình tự gen 032 ITS ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank.

Pair Distances of Untitled ClustalW (Slow/Accurate, IUB)									
Percent Identity									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	87.8	74.9	1
2	0.0	100.0	99.8	99.8	99.8	99.8	88.0	75.0	2
3	0.2	0.2	100.0	100.0	100.0	100.0	87.8	75.1	3
4	0.2	0.2	0.0	100.0	100.0	100.0	88.0	75.2	4
5	0.2	0.2	0.0	0.0	100.0	100.0	88.0	75.2	5
6	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	100.0	88.0	75.2	6
7	0.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	75.2	7
8	13.3	13.1	13.3	13.1	13.1	13.1	13.1	100.0	8
9	30.6	30.5	30.4	30.3	30.3	30.3	30.3	32.6	9
	1	2	3	4	5	6	7	8	9

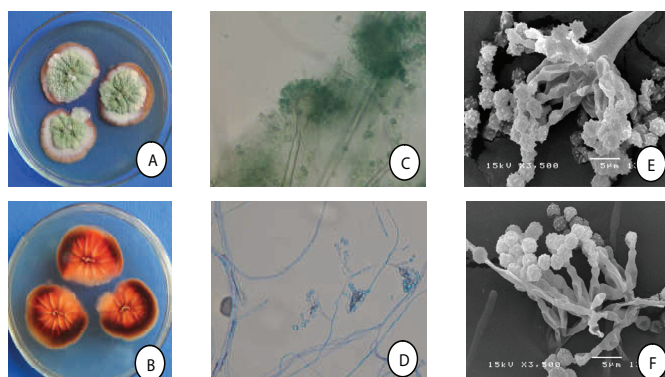
Hình 3. Tương đồng di truyền trình tự gen 032 ITS ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank.

Qua bảng 1 và phân tích cây phân loại ở hình 2 cho thấy, chủng nghiên cứu có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. versicolor*. Hình 3 cho thấy trình tự gen 032 ITS ITS1 tương đồng trình tự 100% với 5 loài thuộc chi *Aspergillus*, khác biệt rõ ràng với hai chủng thuộc chi *Penicillium* và *Cladosporium*. Như vậy,

qua phân tích trình tự gen với mỗi ITS1, chủng ĐTĐL-032 có quan hệ gần gũi nhất với loài *Asp. versicolor*. Kết quả này là phù hợp và bổ sung cho phân loại dựa vào các đặc điểm hình thái.

Kết quả phân loại chủng vi nấm ĐTĐL-207

Phân loại chủng ĐTĐL-207 bằng phương pháp hình thái: hình ảnh khuẩn lạc và các hình ảnh vi thể, siêu vi thể của chủng được trình bày ở hình 4.



Hình 4. Chủng ĐTĐL-207. (A-B) Khuẩn lạc và mặt trái khuẩn lạc (CZA), nuôi cấy 10 ngày, 25°C; (C) Cơ quan sinh bào tử và bào tử trần X1000; (D) Đầu sinh bào tử nhỏ X1000, (E) Cơ quan sinh bào tử trần (SEM) X3500; (F) Đầu sinh bào tử nhỏ (SEM) X3500.

Mô tả chủng:

Đặc điểm khuẩn lạc: khuẩn lạc trên môi trường CZA đạt 3-3,5 cm trong 14 ngày ở nhiệt độ phòng, có khía phân vùng đồng tâm. Mặt khuẩn lạc dạng len, xốp nhẹ, tạo thành các đám bào tử vùng trung tâm, có màu lục nhạt, sau chuyển sang màu lục xám; giọt tiết thường nhiều, màu vàng rom đến đỏ cam; mặt trái màu đỏ san hô đến đỏ sẫm.

Đặc điểm vi thể, siêu vi thể: cuống sinh bào tử dài khoảng 500 mm, đường kính 5-8 mm, thành dày, nhẵn, không màu; bong hình gần cầu, KT 15-20 mm. Thể bình 2 tầng, bao phủ hầu khắp bề mặt bong; cuống thể bình thường KT 6,0-7,0 mm x 2,0-3,0 mm; thể bình KT 7,0-9,5 mm x 2,0-2,5 mm. Bào tử hình gần cầu đến cầu, hầu hết KT 2,5-3,0 mm, có thể đến 3,5 mm, gai ráp. Có các đầu sinh bào tử nhỏ được sinh ra từ các sợi nấm khí sinh, có KT nhỏ (dạng *Penicillium* - hình 4D, F), có thể có bong hoặc không.

Kết luận tên loài: *Aspergillus sydowi* (Bain. and Sart.) Thom and Church [7].

Phân loại chủng ĐTĐL-207 dựa vào trình tự gen ITS rDNA:

Giải trình tự gen với mỗi ITS1, có trình tự sau sửa lỗi bằng

phần mềm Bioedit như sau:

>207 ITS ITS1:

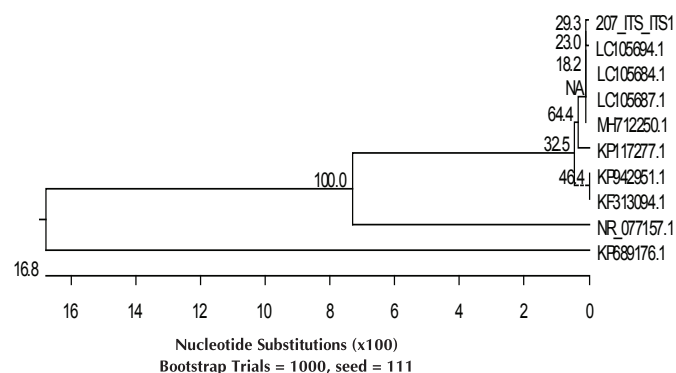
```
CCAACCTCCACCCGTAATACCTAACACTGTTGCTTCGG
CGGGGAACCCCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGA
ACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAA
ATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCAT
CGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC
CCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCTGTCCTCCCCCGGG
GGACGGGGCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGCCGGTCCTCG
AGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGACTAGGGCCGGCCGGG
CGCCAGCCGACGTCTCAACCATTTTCTTCAGGTTGACCTCGGA
TCAGGTAGGGATAACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGA
```

Kết quả Blast thu được tỷ lệ tương đồng với các trình tự dữ liệu trên genbank được thể hiện tóm tắt ở bảng 2.

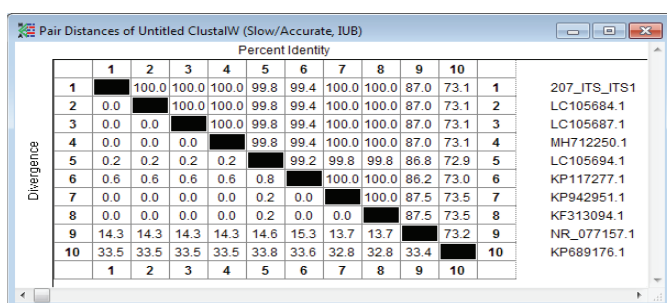
Bảng 2. Kết quả tóm tắt Blast search trình tự gen 207 ITS ITS1.

TT	Ký hiệu chủng	Tên loài trên genbank	Tỷ lệ tương đồng (%)
1	LC105687.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
2	LC105684.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
3	MH712250.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	99
4	LC105694.1	<i>Aspergillus versicolor</i>	99
5	KP942951.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	100
6	KF313094.1	<i>Aspergillus sydowi</i>	100
7	KP117277.1	<i>Aspergillus nidulan</i>	99
8	KP689176.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	87
9	NR_077157.1	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	73

Từ trình tự nghiên cứu và các trình tự tham khảo thu được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại và tính độ tương đồng di truyền bằng phần mềm DNASTAR, kết quả thu được ở hình 5 và hình 6.



Hình 5. Cây phân loại trình tự gen 032 ITS ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank phân tích bằng phần mềm DNASTAR V7.0.



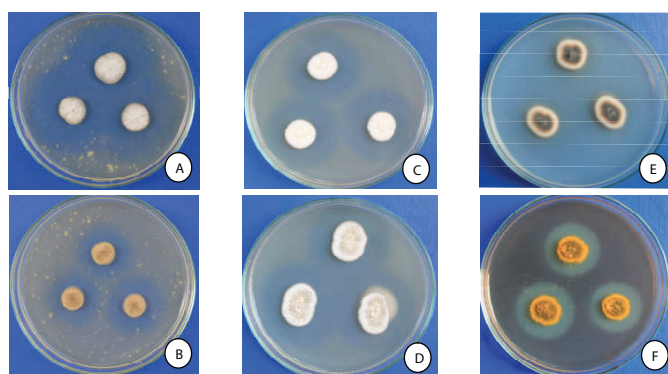
Hình 6. Tương đồng di truyền trình tự gen 207_ITS_ITS1 với các trình tự tham khảo trên genbank phân tích bằng phần mềm DNASTAR V7.0.

Kết quả xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme

Xác định khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme của 2 chủng vi nấm thông qua xác định hệ số phân giải cơ chất (I). Kết quả giá trị hệ số I thể hiện ở bảng 3; minh họa khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính collagenase ở hình 7.

Bảng 3. Khả năng sinh tổng hợp và hoạt tính một số enzyme của 2 chủng nấm.

TT	Tên chủng	Hệ số phân giải cơ chất (I) trung bình (n=6)		
		Gelatin	Collagen	Cellulo
1	ĐTĐL-032	6,7 ± 0,5	11,4 ± 0,9	0,0
2	ĐTĐL-207	5,0 ± 0,9	4,6 ± 0,3	3,6 ± 0,2



Hình 7. Các chủng vi nấm phân hủy cơ chất. (A) Chủng ĐTĐL-032 phân giải collagen; (B) Chủng ĐTĐL-207 phân giải collagen; (C) Chủng ĐTĐL-032 phân giải gelatin; (D) Chủng ĐTĐL-207 phân giải gelatin; (E) Chủng ĐTĐL-032 không phân giải cellulose; (F) Chủng ĐTĐL-207 phân giải cellulose.

Bàn luận

Hai chủng vi nấm ĐTĐL-032 và ĐTĐL-207 khi nuôi cấy trên môi trường CZA ở nhiệt độ 25°C trong 10 ngày, thấy tốc độ phát triển khuẩn lạc của chủng ĐTĐL-032 (3 cm) kém hơn ĐTĐL-207 (3,5 cm) không đáng kể. Hình

thái khuẩn lạc giữa hai chủng trong vòng 3 ngày đầu khá giống nhau; sau 10 ngày có sự khác nhau nhiều hơn, chủng ĐTĐL-207 có màu lục sẫm hơn, mặt trái có màu đỏ tía rõ hơn, giọt tiết to và thẫm màu hơn. Quan sát đặc điểm vi thể, siêu vi thể thấy cơ quan sinh bào tử và bào tử trần của hai chủng có KT và hình dạng giống nhau. Điểm khác biệt là chủng ĐTĐL-207 có xuất hiện thêm cơ quan sinh bào tử dạng nhỏ từ các sợi nấm khí sinh (hình 4D, F). Các đầu sinh bào tử này có đặc điểm là KT nhỏ hơn cơ quan sinh bào tử bình thường, có thể có bông hoặc không; chúng được sinh ra từ các sợi nấm khí sinh và tồn tại song song cùng các cơ quan sinh bào tử bình thường (có đủ cuống, bông, cuống thể bình và thể bình). Các đặc điểm này có thể quan sát thấy trên cả kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử quét. Đây là những đặc điểm khác nhau giúp phân biệt giữa *Asp. sydowi* (chủng ĐTĐL-207) và *Asp. vesicolor* (chủng ĐTĐL-032). Hai loài này đều thuộc *Aspergillus vesicolor* group trong chi *Aspergillus* [5, 7, 8].

Chủng ĐTĐL-032 trong phân loại bằng giải trình tự gen cho thấy có độ tương đồng 100% với các chủng thuộc loài *Asp. vesicolor* khi blast. Khi phân tích cây phân loại thấy chủng này có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. vesicolor*; có độ tương đồng di truyền 100% với 5 trình tự tham khảo trong đó có *Asp. vesicolor*. Chủng ĐTĐL-207 trong phân loại bằng giải trình tự gen cho thấy có độ tương đồng 100% với các chủng thuộc loài *Asp. vesicolor* và cả *Asp. sydowi* khi blast. Khi phân tích cây phân loại thấy chủng này có quan hệ gần gũi nhất với *Asp. vesicolor*; có độ tương đồng di truyền 100% với 5 trình tự tham khảo, trong đó có cả *Asp. vesicolor* và *Asp. sydowi*. Như vậy, phân loại bằng trình tự gen đoạn ITS với cặp mồi ITS1-ITS4 chưa thể phân loại xác định chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài nào. Z. Jurjevic và cộng sự (2012) khi phân biệt 9 loài thuộc nhóm *Asp. vesicolor* ngoài trình tự gen vùng ITS, phải dùng tới nhiều vùng khác thuộc rDNA hoặc các gen chức năng như camodulin, β -tubulin... [8]. Trong phân loại vi nấm hiện nay, phương pháp hình thái vẫn là phương pháp chính để phân loại. Các phương pháp khác như sinh hóa, sinh học phân tử... giúp định loại bổ sung, làm rõ thêm cho phương pháp hình thái, bổ sung, làm rõ các mối quan hệ tiến hóa của các loài vi nấm [1, 8]. Như vậy, kết hợp 2 phương pháp phân loại, Viện 69 xác định chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Asp. vesicolor*; chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Asp. sydowi*.

Hai chủng vi nấm phân lập được tại Viện 69 thuộc các loài vi nấm ưa khô, không bắt buộc phải sống trong điều kiện độ ẩm khô (<85%), có thể thích nghi phát triển ở điều kiện độ ẩm không khí cao hơn [7]. Khi nghiên cứu đặc điểm sinh tổng hợp và hoạt tính 3 enzyme, thấy cả 2 chủng đều có khả năng phân giải collagen và gelatin, chủng ĐTĐL-032 không có khả năng phân giải cellulose. Đây là hai loài vi nấm có thể gây hư hỏng các tiêu bản đang bảo quản ở Viện 69.

Việc nghiên cứu khả năng phân hủy các cơ chất sinh học của vi nấm được nhiều tác giả quan tâm do có ý nghĩa trong nhiều ngành, nhiều lĩnh vực đời sống, công nghiệp, thương mại, khoa học như da giày, chế biến, bảo quản lương thực thực phẩm, bảo tồn bảo tàng... [3].

Kết luận

Nghiên cứu về hai chủng vi nấm phân lập được ở Viện 69, chúng tôi rút ra những kết luận sau:

1. Hai chủng vi nấm thuộc về chi *Aspergillus*, chủng ĐTĐL-032 thuộc về loài *Asp. vesicolor*, chủng ĐTĐL-207 thuộc về loài *Asp. sydowi*.

Kết quả phân loại loài vi nấm dựa vào hình thái vi nấm có ý nghĩa quyết định, phân loại bằng giải trình tự đoạn gen ITS rDNA chỉ giúp bổ sung, làm rõ phân loại cho 1 trong 2 chủng nghiên cứu.

2. Chủng vi nấm ĐTĐL-032 có khả năng phân hủy 2 cơ chất (collagen và gelatin), chủng ĐTĐL-207 có khả năng phân hủy 3 cơ chất (collagen, gelatin, cellulose).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm thực hiện đề tài xin trân trọng cảm ơn các Thủ trưởng, đồng nghiệp ở Viện 69, Bộ Tư lệnh Bảo vệ Lăng Chủ tịch Hồ Chí Minh đã tạo điều kiện và cùng phối hợp thực hiện nghiên cứu. Nội dung nghiên cứu này thuộc

đề tài nghiên cứu khoa học độc lập cấp quốc gia mã số ĐTĐLCN.31/15, thực hiện trong giai đoạn 2015-2018.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.J. Chen, V. Hubka, et al. (2017), "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food", *Studies in Mycolgy*, **88**, pp.37-135.
- [2] A.R. Huzefa, et al. (2017), "Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community", *Journal of Natural Products*, **80**, pp.756-770.
- [3] A.W. Maria Carolina, et al. (2017), "Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review", *Brazilian Journal of Microbiology*, **48**, pp.13-24.
- [4] Nguyễn Lâm Dũng (1978), *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*, **3**, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, tr.25-45.
- [5] K. Ando (2002), "Identification of Fungi imperfecti", *NITE*, Japan, pp.38-55.
- [6] Nguyễn Kim Giao (2004), *Hiện vi điện tử trong khoa học sự sống*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, tr.43-58.
- [7] B. Raper & D. Fennell (1965), *The genus Aspergillus*, Baltimore & Wilkin, USA, pp.442-490.
- [8] Z. Jurjevic, et al. (2012), "Aspergillus section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny", *International Mycological Association Fungus*, **3(1)**, pp.59-79.

Nghiên cứu nuôi trồng lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) ở giai đoạn vườn ươm

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Vũ Mạnh Hải², Phạm Hương Sơn¹,
Phạm Minh Duy³, Bùi Thị Thanh Phương¹

¹Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

²Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

³Trường THPT chuyên Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 1/10/2018; ngày chuyển phản biện 3/10/2018; ngày nhận phản biện 31/10/2018; ngày chấp nhận đăng 5/11/2018

Tóm tắt:

Lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) là loài lan rừng đẹp, có giá trị y học và kinh tế cao. Kết quả nghiên cứu nuôi trồng lan Nghệ tâm ở giai đoạn vườn ươm cho thấy, thời vụ thích hợp đưa cây con *in vitro* ra vườn ươm là vụ Thu, hỗn hợp rêu + đá bọt (tỷ lệ 50:50) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm, sau 12 tuần nuôi trồng, tỷ lệ sống đạt 94%, chiều cao cây đạt 7,8 cm, 7,2 lá/cây và 3,9 rễ mới/cây. Phun chế phẩm dinh dưỡng B1 Thái Lan định kỳ 1 tuần/lần với liều lượng 2 ml/l có tác dụng làm cho cây mập, cao, ra nhiều lá, nhiều rễ (chiều cao cây đạt 9,1 cm, 7,93 lá/cây và 4,6 rễ mới/cây) sau 12 tuần nuôi trồng.

Từ khóa: cây thuốc, dinh dưỡng, Hoàng thảo Nghệ tâm, vườn ươm.

Chỉ số phân loại: 4.1

Dặt vấn đề

Lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) thuộc chi Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài lan rừng đẹp và có hương thơm, được thị trường trong nước cũng như quốc tế ưa chuộng nên có giá trị kinh tế cao. Ngoài giá trị làm cảnh, loài lan Nghệ tâm còn có giá trị dược liệu rất lớn; toàn bộ cây được sử dụng để làm thuốc chữa bệnh ung thư dạ dày và ung thư phổi, chống đông máu [1]; ngăn ngừa tế bào ung thư tuyến giáp, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư thực quản, ung thư tuyến tụy, điều trị bệnh tiểu đường [2]; có tác dụng làm trắng da [3].

Do có giá trị lớn nên loài lan rừng Nghệ tâm ở Việt Nam đang bị khai thác một cách quá mức, có nguy cơ cạn kiệt trong tự nhiên [4].

Hiện nay, trên thế giới đã có một số công trình nghiên cứu về nhân giống *in vitro* lan Nghệ tâm được công bố như Lu Wenyun, et al. (2004) [5], Bai, et al. (2004) [6], Lu Zhou, et al. (2015) [7] nhưng chưa đề cập đến việc nuôi trồng ở giai đoạn vườn ươm. Đây chính là lý do chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm bảo tồn và phát triển nguồn gen quý, góp phần thúc đẩy phát triển kinh tế - xã hội và bảo vệ rừng.

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

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: các cây lan Nghệ tâm *in vitro* có chiều cao 5-6 cm, có 4-6 lá và 3-5 rễ, được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Sinh học Thực nghiệm - Viện Ứng dụng Công nghệ - Bộ Khoa học và Công nghệ.

Điều kiện nuôi trồng

Nhà lưới có mái che mưa và che lưới đen, độ che sáng >70%, có nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm không khí 70-80%, tưới phun sương đều 2 lần/ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Các cây *in vitro* sau khi nuôi cấy trong phòng thí nghiệm đạt chiều cao 5-6 cm, có 4-6 lá và 3-5 rễ, để bình cây ra ngoài vườn ươm 7 ngày. Cây con được rửa hết thạch, rải đều trên khay sạch để trong 4 giờ, khử trùng cây trong dung dịch 3 g/l carbendazim trong 5 phút rồi trồng vào khay hay chậu đất nung với kích thước chậu 8x12 cm.

Bố trí thí nghiệm:

a) Ảnh hưởng của thời vụ ra ngôi đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm:

A study on cultivation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe at the nursery stage

Thi Lai Nguyen^{1*}, Manh Hai Vu²,
Huong Son Pham¹, Minh Duy Pham³,
Thi Thanh Phuong Bui¹

¹National Center for Technological Progress,
Ministry of Science and Technology

²Vietnam Academy Agricultural Science

³HUS High School for Gifted Students,
Vietnam National University, Hanoi

Received 1 October 2018; accepted 5 November 2018

Abstract:

Dendrobium loddigesii Rolfe is one of beautiful wild orchids of Vietnam with highly economical and medicinal values. In the recent years, the studies on the cultivation technologies of *Dendrobium loddigesii* Rolfe at the nursery stage have been implemented. Results conducted from these studies showed that, the suitable planting time was in the Autumn, and the mixture of *Sphagnum moss* and pumice stone (50:50 ratio) was regarded as the best cultivation media proven by high planlet survival (94%) and healthy planlets (7.8 cm high with 7.2 leaves/plantlet and 3.9 new roots/plantlet) at 12 weeks after planting. And also, the nutrient substance coded B1-Thailand at the concentration of 2 ml/l sprayed weekly made plantlets much healthier, which is indicated by the plantlet's high and thick stems with more newly formed leaves and roots (9.1 cm high, 7.93 leaves and 4.6 new roots per a plantlet at 12 weeks after planting).

Keywords: *Dendrobium loddigesii* Rolfe, medicinal plant, nursery, nutrient.

Classification number: 4.1

Thí nghiệm gồm 4 công thức (CT): CT1: vụ Xuân (trồng 18/02/2017); CT2: vụ Hè (trồng 18/05/2017); CT3: vụ Thu (trồng 18/08/2016); CT4: vụ Đông (trồng 18/11/2016).

Giá thể trồng là rêu và phun Growmore (30:10:10), liều lượng phun 1 g/l, phun 7 ngày/lần, phun sau trồng 1 tháng, lượng 0,5 lít dung dịch cho 1 m²/5 chậu.

b) Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây in vitro ở giai đoạn vườn ươm:

Thí nghiệm gồm 4 CT: CT1: rêu; CT2: xơ dừa; CT3: rêu + đá bọt (50:50); CT4: rêu + xơ dừa (70:30).

Phun Growmore (30:10:10), liều lượng phun 1 g/l, phun 7 ngày/lần, phun sau trồng 1 tháng, lượng 0,5 lít dung dịch cho 1 m²/5 chậu.

c) Ảnh hưởng của một số loại chế phẩm dinh dưỡng đến khả năng sinh trưởng của cây in vitro ở giai đoạn vườn ươm:

Thí nghiệm gồm 4 CT: CT1: đối chứng (phun nước lã); CT2: phun Đầu trâu 502 (30:12:10); CT3: phun B1 Thái Lan; CT4: phun Growmore (30:10:10).

Chế phẩm dinh dưỡng được phun định kỳ 7 ngày/lần, Đầu trâu 502 và Growmore (30:10:10) phun liều lượng 1 g/l, B1 Thái Lan phun 2 ml/l, lượng 0,5 lít dung dịch cho 1 m²/5 chậu.

Theo dõi, đánh giá theo các chỉ tiêu: đo đếm các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của 30 cây/CT thí nghiệm. Đánh giá thí nghiệm sau 3 tháng và số liệu được theo dõi 30 ngày/lần. Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá) và số rễ mới (rễ).

Phương pháp xử lý số liệu: phương pháp thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và phần mềm Excel 2007.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Ảnh hưởng của thời vụ ra cây đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây in vitro ở giai đoạn vườn ươm

Việc xác định được thời vụ phù hợp để đưa cây in vitro ra vườn ươm có ý nghĩa quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến tỷ lệ sống cũng như khả năng sinh trưởng của cây ở giai đoạn vườn ươm. Trong thí nghiệm này, đề tài đã sử dụng các cây in vitro có chiều cao 5-6 cm, 4-6 lá và 3-5 rễ, được trồng trên giá thể rêu ở các thời vụ khác nhau. Kết quả ở bảng 1 cho thấy: trong 4 thời vụ trồng, cây con trồng vụ Thu có tỷ lệ sống cao nhất đạt 78%, cây sinh trưởng mạnh nhất (chiều cao 7,15 cm với 6,3 lá, 3,5 rễ).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời vụ ra cây đến tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* giai đoạn vườn ươm (sau 12 tuần trồng).

Thời vụ	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới (rễ)
Vụ Thu (18/8/2016)	78,00	7,15	6,30	3,50
Vụ Đông (18/11/2016)	62,00	5,60	5,60	2,20
Vụ Xuân (18/02/2017)	72,0	6,42	5,80	2,73
Vụ Hè (18/5/2017)	76,00	6,86	6,03	3,3
CV%		4,8	3,7	4,4
LSD ₀₅		0,15	0,24	0,24

Cây con ra ngôi vào vụ Hè có tỷ lệ sống và các chỉ tiêu sinh trưởng cũng tương đối cao, tỷ lệ sống 76%, chiều cao 6,86 cm, số lá 6,03, số rễ 3,3. Ra ngôi vào vụ Đông, tỷ lệ sống của cây con thấp nhất (62%). Bên cạnh đó, các chỉ tiêu sinh trưởng khác như chiều cao cây, số lá của cây con ở vụ Đông cũng kém hơn so với vụ Thu và vụ Hè. Nguyên nhân có thể do vụ Đông độ ẩm cao, cây có hiện tượng thối lá và rễ. Như vậy, thời vụ ra cây thích hợp cho lan Nghệ tâm là vụ Thu.

Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm

Trong giai đoạn vườn ươm, các loại cây trồng khác nhau đòi hỏi các loại giá thể với các tính chất vật lý và hóa học cũng khác nhau. Nhìn chung, giá thể tốt là giá thể có khả năng giữ ẩm và thoát nước tốt, có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây con trong giai đoạn đầu để thích ứng dần với môi trường sống tự nhiên. Cây lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) sau nuôi cấy mô yêu cầu độ ẩm cao nhưng không bị úng, nhiệt độ môi trường không quá cao, giá thể sạch và có khả năng cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho cây con trong vườn ươm. Để xác định giá thể phù hợp, đề tài tiến hành thí nghiệm ra cây vào vụ Thu và trồng trên 4 loại giá thể khác nhau, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm (sau 12 tuần trồng).

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới (rễ)
Rêu (<i>sphagnum moss</i>)	78	7,16	6,31	3,43
Xơ dừa	70	5,80	5,48	2,30
Rêu (<i>sphagnum moss</i>) + đá bọt (50:50)	94	7,80	7,20	3,90
Rêu (<i>sphagnum moss</i>) + xơ dừa (70:30)	86	7,50	6,55	3,60
CV%		4,7	4,0	4,1
LSD ₀₅		0,4	0,48	0,37

Có thể nhận thấy: giá thể khác nhau cho tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con *in vitro* khác nhau. Trên giá thể rêu, xơ dừa, các chỉ tiêu tỷ lệ sống, chiều cao cây, số lá, số rễ của cây con đều nằm ở mức thấp. Điều này là do rêu có khả năng giữ nước cao, làm giảm độ thông thoáng của giá thể và gia tăng mức độ nhiễm nấm bệnh, gây ra hiện tượng thối rễ. Còn giá thể xơ dừa lại thoát nước nhanh nên cây dễ bị mất nước, cây yếu lá nhỏ màu xanh nhạt.

Giá thể hỗn hợp khắc phục được nhược điểm của giá thể đơn lẻ, tạo điều kiện thích hợp cho việc thoát nước, giữ độ ẩm và hô hấp, những yếu tố cần thiết cho sinh trưởng của cây lan con (Xiao và Zhang, 2013) [8]. Trong thí nghiệm này, hỗn hợp rêu + xơ dừa (70:30) đem lại kết quả tương đối tốt, tỷ lệ sống của cây con cao (86%), cây sinh trưởng khỏe (cao 7,5 cm; 6,55 lá/cây, 3,6 rễ mới). Hỗn hợp rêu + đá bọt (50:50) được coi là giá thể phù hợp nhất, thể hiện ở tỷ lệ sống của cây con cao nhất (94%), khả năng sinh trưởng cũng tốt nhất (chiều cao cây 7,8 cm với 3,9 rễ mới và 7,2 lá/cây). Với giá thể này, sự phối hợp của hai giá thể rêu + đá bọt (50:50) đã bổ sung ưu điểm cho nhau, tạo điều kiện cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho cây con, có khả năng giữ và thoát nước tốt, cây cứng cáp, lá xanh bóng, rễ khỏe.

Như vậy, giá thể rêu + đá bọt (50:50) là giá thể thích hợp nhất để chuyển cây *in vitro* của loài lan Nghệ tâm ra vườn ươm.

Ảnh hưởng của một số loại chế phẩm dinh dưỡng đến khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại chế phẩm dinh dưỡng khác nhau đến khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* giai đoạn vườn ươm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số loại chế phẩm dinh dưỡng khác nhau đến khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm (sau 12 tuần trồng).

Loại phân bón	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới (rễ)	Đặc điểm hình thái cây
Nước lã (Đ/C)	6,00	5,79	1,93	Cây nhỏ, thấp và lá màu xanh nhạt
B1 Thái Lan	9,10	7,93	4,60	Cây mập, khỏe và lá màu xanh bóng
Growmore Mỹ (30:10:10)	8,30	7,48	4,10	Cây khỏe và lá xanh đậm
Đầu trâu 502 (30:12:10)	7,30	6,62	3,40	Cây bình thường và lá xanh
CV%	4,6	4,5	4,4	
LSD ₀₅	0,23	0,33	0,29	

Kết quả thu được sau 12 tuần theo dõi cho thấy, cây con ở CT đối chứng có các chỉ tiêu sinh trưởng thấp hơn so với các CT được phun dinh dưỡng, chiều cao cây chỉ đạt 6 cm với 5,79 lá, 1,93 rễ mới và cây có lá nhỏ, màu xanh nhạt.

CT phun dinh dưỡng Đầu trâu 502 cho cây sinh trưởng và phát triển ở mức trung bình, chiều cao cây chỉ đạt 7,3 cm, 6,62 lá, 3,4 rễ mới.

Ở CT phun dinh dưỡng Growmore (30:10:10), cây sinh trưởng và phát triển khá tốt, thể hiện ở các chỉ tiêu như: chiều cao cây 8,3 cm; số lá 7,48 lá; số rễ mới 4,1 rễ, cây con tương đối khỏe và lá xanh đậm.

Trong số các chế phẩm dinh dưỡng phun bổ sung, B1 Thái Lan có tác động tốt nhất đến sinh trưởng và phát triển của cây con, cây có chiều cao vượt hơn hẳn (9,1 cm), trong lúc các chỉ tiêu số lá, số rễ mới tương đương hoặc cao hơn chút ít so với CT phun Growmore (7,93 lá và 4,6 rễ mới), cây mập, bộ lá và rễ phát triển rất tốt. Như vậy, ở giai đoạn vườn ươm phun chế phẩm dinh dưỡng B1 Thái Lan, phun định kỳ 1 tuần/lần với liều lượng 2 ml/l cho cây sinh trưởng tốt nhất, lá xanh khỏe và bộ rễ mập và dài.

Kết luận

Từ các kết quả nhận được, chúng tôi rút ra kết luận: thời vụ thích hợp đưa cây con *in vitro* ra vườn ươm là vụ Thu; giá thể hỗn hợp rêu + đá bọt (50:50) cho tỷ lệ cây sống cao nhất (94%). Đồng thời, bổ sung chế phẩm B1 Thái Lan định kỳ 1 tuần/lần với liều lượng 2 ml/l có tác dụng làm cho cây mập, cao, ra nhiều rễ, nhiều lá (4,60 rễ, 7,93 lá, cây cao 9,10 cm).



Hình 1. Cây lan Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) ở giai đoạn vườn ươm. (A) Cây lan Nghệ tâm trồng trên giá thể rêu + đá bọt (50:50); (B) Cây lan Nghệ tâm phun B1 Thái Lan với liều lượng 2 ml/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A.C. Tsai, S.L. Pan, C.H. Liao, J.H. Guh, S.W. Wang, H.L. Sun, Y.N. Liu, C.C. Chen, C.C. Shen, Y.L. Chang, C.M. Teng (2010), "Moscatalin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth *in vitro* and *in vivo*", *Cancer Lett.*, **292**(2), pp.163-170.
- [2] Veronika Cakova, Frederic Bonte, Annelise Lobstein (2017), "Dendrobium: sources of active ingredients to treat age related pathologies", *Aging and Disease*, **8**(6), pp.827-849.
- [3] Ho Kyung Jung, Ji Hun Jang, Mi Ok Sim, Ki Ho Lee, Jun Hwan Yeo, Byoung Man Kang, Jung Hee Cho, Chul Gu Bean, Seong Cheol Kim and Won Seok Jung (2015), "Effect of *Dendrobium loddigesii* Rolfe Methanol Extract on Melanogenesis in α -MSH Stimulated B16F10 Cells", *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **23**(4), pp.298-304.
- [4] Nguyễn Tiến Hiệp, Nguyễn Sinh Khang, Phạm Văn Thế, Tô Văn Thảo, Nguyễn Quang Hiếu, Phan Kế Lộc (2009), *Những loài thực vật bị đe dọa tuyệt chủng và hiện trạng bảo tồn chúng ở cao nguyên đá vôi Đồng Văn (tỉnh Hà Giang)*, Tuyển tập báo cáo Hội nghị Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 3, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [5] Lu Wenyun, Zhang Yubin, Tang Jingang, Yi Yin, Yan Zhijian (2004), "Tissue culture and rapid propagation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe", *Journal of Guizhou Normal University* (Natural Science Edition), **22**(4), pp.15-18.
- [6] M.F. Bai, T.L. Wu, M. Huang, T.G. Zhang (2004), "Rapid propagation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe by tissue culture", *Seed*, **23**, pp.44-46.
- [7] Lu Zhou, Guoqing Luo, Feng Yang, Jianhua Wang, Zibu Wang (2015), "Effect of different culture medium formulas on *Dendrobium loddigesii* Rolfe root culture", *Advances in Microbiology*, **4**, pp.6-10.
- [8] Y. Xiao, Y.Z. Zhang (2013), "The effect of media and plant training and season on the pre-planting of the tissue culture shoots of *Dendrobium candidum* Wall. ex Lindl", *J. Xinyang Agric. College*, **23**, pp.93-94.

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lạnh bằng công nghệ Hyokan đến chất lượng quả cam

Đoàn Thị Bắc¹, Lê Tất Khương¹, Kouichi Omura², Lê Thị Minh Hằng²,
Đào Văn Minh¹, Tạ Thu Hằng^{1*}

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng, Bộ Khoa học và Công nghệ, Việt Nam

²Công ty O's & Tec Co., Ltd, Nhật Bản

Ngày nhận bài 24/8/2018; ngày chuyển phản biện 28/8/2018; ngày nhận phản biện 26/9/2018; ngày chấp nhận đăng 2/10/2018

Tóm tắt:

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lạnh bằng công nghệ Hyokan đến chất lượng và giảm tổn thất sau thu hoạch của quả cam được tiến hành trên thực nghiệm bảo quản cam Valencia 2 tại phòng thí nghiệm thuộc Viện Nghiên cứu và Phát triển Vùng. Quả cam được thu hoạch với độ chín vỏ quả 80%. Sau khi sơ chế được bảo quản bằng hai công thức (CT): (1) Đối chứng (ĐC) được bảo quản bằng tủ lạnh Sanky nhiệt độ 2-4°C; (2) Bảo quản lạnh bằng công nghệ Hyokan ở nhiệt độ 2°C, điện thế 3.500 V. Qua 4 tháng, quả cam được bảo quản bằng tủ lạnh thường có sự suy giảm chất lượng nhanh, đặc biệt là sự suy giảm khối lượng và chất lượng cảm quan. Quả cam được bảo quản bằng công nghệ Hyokan hạn chế hao hụt khối lượng, giữ được độ tươi, hương vị, màu sắc vỏ quả và chất lượng dinh dưỡng tốt. Vì vậy, công nghệ Hyokan được coi là công nghệ mới đầy triển vọng trong việc bảo quản lâu dài quả cam.

Từ khóa: bảo quản lạnh, công nghệ Hyokan, quả cam, Valencia 2.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Cam, quýt, chanh, bưởi là cây ăn quả có múi chủ lực của nước ta, có lịch sử phát triển lâu đời và được trồng trên khắp các vùng sinh thái của cả nước. Trong nhiều thập kỷ qua, quả có múi luôn là một trong những mặt hàng xuất khẩu chủ lực và nhu cầu tiêu thụ trong nước cũng rất lớn. Cây có múi là loại cây có giá trị dinh dưỡng cao, thịt quả có chứa hàm lượng carbohydrat, protein và chất béo thay đổi từ 4,60-8,50; 5,80-7,90 và 2,50-9,50 g, các acid hữu cơ từ 0,4-1,2% và trong đó có nhiều acid có hoạt tính sinh học cao cùng với các chất khoáng và dầu thơm [1].

Quả cam có thời gian thu hoạch rất ngắn (35-40 ngày), dễ bị hư hỏng bởi thời tiết nóng trong vụ thu hoạch, đã tạo ra áp lực tiêu thụ rất lớn, đặc biệt vào đỉnh vụ. Vì vậy, việc bảo quản là rất cần thiết nhằm giảm thiểu những thiệt hại do suy giảm chất lượng cho người nông dân. Có nhiều phương pháp bảo quản cam được áp dụng, như bảo quản ở nhiệt độ thấp, xử lý hóa chất, phương pháp điều chỉnh khí quyển tồn trữ. Trong các phương pháp trên, phương pháp điều chỉnh khí quyển kết hợp nhiệt độ thấp cho thấy nhiều ưu điểm, như giảm sự tổn thất khối lượng, trì hoãn quá trình chín và giảm được tổn thương lạnh [2]. Tuy nhiên, các phương pháp này chưa đủ điều kiện để đảm bảo an toàn về chất lượng của

quả trong suốt thời gian bảo quản.

Nghiên cứu của Marcilla và cộng sự [3] cho thấy, điều kiện nhiệt độ bảo quản có ảnh hưởng lớn đến hương vị của cam Valencia, nhiệt độ càng thấp thì thời gian bảo quản càng dài (2 tháng đối với bảo quản 5°C, 1 tháng đối với bảo quản ở 15, 20, 25°C), đồng thời cam được bảo quản ở nhiệt độ càng cao thì sự thay đổi hương vị càng nhiều. Theo nghiên cứu của Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền [4], sau 30 ngày tồn trữ thì cam mật bảo quản ở nhiệt độ phòng (28-30°C) bị hỏng nhiều, trong khi bảo quản ở nhiệt độ thấp (10°C) thì sau 50 ngày chất lượng cảm quan vẫn còn duy trì tốt.

Công nghệ Hyokan là một công nghệ bảo quản mới của Nhật Bản, cài đặt điện áp cao với cường độ dòng điện thấp để làm chậm quá trình oxy hóa, ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật. Công nghệ này vừa duy trì được độ tươi của sản phẩm, vừa ngăn ngừa nước đóng băng ngay cả khi ở nhiệt độ đông lạnh và bảo quản trong thời gian dài. Công nghệ Hyokan có thể được sử dụng như một container cải tiến, thuận tiện cho quá trình vận chuyển sản phẩm trong thời gian dài mà vẫn duy trì được độ tươi, ngon của sản phẩm [5].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành đánh giá ảnh

*Tác giả liên hệ: Email: tthang311@yahoo.com

Effects of cold storage conditions applying the Hyokan technology on the quality of oranges

Thi Bac Doan¹, Tat Khuong Le¹, Kouichi Omura²,
Thi Minh Hang Le², Van Minh Dao¹, Thu Hang Ta^{1*}

¹Institute of Regional Research and Development,
Ministry of Science and Technology, Vietnam
²O's & Tec Co., Ltd, Japan

Received 24 August 2018; accepted 2 October 2018

Abstract:

A study on the effects of cold storage conditions applying the Hyokan technology on the quality and postharvest losses of oranges was conducted for the preservation of Valencia 2 oranges at the laboratory of Institute of Regional Research and Development. Oranges were harvested with 80% fruit ripening. After preliminary processing, they were preserved by two formulations: (1) the control preserved by Sanky refrigerator at temperature 2-4°C; (2) the studied ones preserved cold by the Hyokan technology at 2°C and 3,500 V. After 4 months of the storage, oranges preserved by the refrigerator often had a deterioration in quality, especially in terms of weight loss and sensory quality. Oranges preserved with the Hyokan technology reduced the weight loss, kept freshness, flavour, peel colour and good nutritional quality. Therefore, the Hyokan technology has been considered a promising new technology in the long-term preservation of oranges.

Keywords: cold storage, Hyokan technology, orange, Valencia 2.

Classification number: 4.1

hưởng của công nghệ Hyokan đến chất lượng của quả cam trong quá trình bảo quản ở điều kiện nhiệt độ thấp kết hợp với điện trường.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là giống cam V2 (Valencia 2), được thu hoạch ở độ chín 80% diện tích vỏ quả chuyển sang màu vàng. Quả cam thí nghiệm được lựa chọn đảm bảo tính đồng đều về độ chín, hình dạng, kích thước và loại bỏ những quả sâu bệnh.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm được bố trí với 2 CT như sau:

+ CT ĐC: quả cam được bọc trong màng HDPE và bảo quản bằng tủ lạnh thường, nhiệt độ 2-4°C.

+ CT bảo quản bằng công nghệ Hyokan: quả cam được bọc trong màng HDPE và bảo quản bằng tủ lạnh Hyokan có nhiệt độ 2°C, điện áp 3.500 V.

Thời gian phân tích chất lượng quả cam được tiến hành định kỳ 1 tháng/lần, thực hiện bảo quản sau 4 tháng, phân tích các chỉ tiêu như sự thay đổi màu sắc, hao hụt khối lượng, độ cứng, hàm lượng chất khô hòa tan, hàm lượng acid tổng số, hàm lượng vitamin C và đánh giá chất lượng cảm quan.

Tủ lạnh: làm lạnh
bằng khí lạnh

Khái quát cấu tạo



Loại tủ lạnh thường

Hyokan: thêm vào
trường tĩnh điện

Hình 1. Hình ảnh tủ lạnh Hyokan.

Phương pháp phân tích các chỉ tiêu:

- Xác định chỉ số màu sắc (L, a) bằng máy đo màu sắc cầm tay NR3000. Đo tại 3 vị trí khác nhau trên quả cam, giá trị màu sắc được đánh giá theo hệ thống CIE (L, a).

- Xác định tỷ lệ hao hụt khối lượng bằng phương pháp cân, sử dụng cân phân tích có độ chính xác cao. Tỷ lệ hao

hút khối lượng được tính theo CT:

$$X = \frac{M_1 - M_2}{M_1} 100 (\%)$$

trong đó: X (%): hao hụt khối lượng tự nhiên ở mỗi lần phân tích; M_1 (g): khối lượng quả trước khi bảo quản; M_2 (g): khối lượng quả ở các lần phân tích.

- Hàm lượng chất khô tổng số được xác định bằng chiết quang kế điện tử.

- Hàm lượng acid tổng số chuẩn độ với NaOH 0,1N.

- Xác định hàm lượng vitamin C bằng phương pháp chuẩn độ với thuốc thử 2,6-dichlorophenol indophenol.

- Đánh giá chất lượng cảm quan dựa vào phương pháp cho điểm theo TCVN 575-2004.

Phương pháp xử lý số liệu:

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Irristat 5.0 và phần mềm Microsoft Excel 2007.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan đến màu sắc quả cam

Màu sắc là một trong những chỉ tiêu quan trọng liên quan chất lượng cũng như giá trị của sản phẩm. Kết quả đánh giá màu sắc của quả cam từ hai CT Hyokan và ĐC sau 4 tháng bảo quản về các chỉ số L, a được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Màu sắc của quả cam trong điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan.

Chỉ tiêu	CT	Tháng 0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4
Chỉ số L	ĐC	48,40	47,43 ^a	46,70 ^b	45,98 ^a	45,07 ^b
	HYOKAN	48,40	48,20 ^a	47,53 ^a	47,17 ^a	46,70 ^a
	LSD (0,05)		1,23	1,09	1,14	0,93
Chỉ số a	ĐC	25,43	26,22 ^a	26,53 ^b	26,66 ^b	26,92 ^b
	HYOKAN	25,43	25,45 ^a	25,56 ^a	25,67 ^a	25,95 ^a
	LSD (0,05)		0,72	0,89	0,87	0,91

Trong cùng một cột, các CT có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Số liệu trong bảng 1 cho thấy, sau 4 tháng bảo quản, giá trị L và a của quả cam bảo quản bằng công nghệ Hyokan và điều kiện tủ lạnh thường có sự khác biệt rõ rệt ở mức ý

nghĩa $\alpha=0,05$. CT ĐC bảo quản bằng tủ lạnh thường có chỉ số L giảm nhanh từ 48,40 xuống 45,07; chỉ số a tăng lên từ 25,43 đến 26,92.

Quả cam bảo quản bằng công nghệ Hyokan sau 4 tháng bảo quản duy trì màu sắc tốt, các chỉ số màu sắc vẫn giữ nguyên như quả cam tươi (chỉ số L có giảm nhưng rất chậm từ 48,40 xuống 46,70; chỉ số a thay đổi chậm từ 25,43 lên 25,95).

Sự tăng lên về chỉ số a, giảm chỉ số L là do trong quá trình bảo quản, màu quả có xu hướng chuyển từ vàng xanh sang vàng đậm. CT Hyokan thay đổi chậm hơn do có sự tác động của điện trường làm các phân tử bên trong quả dao động liên tục và không liên kết với nhau, làm hạn chế các quá trình hô hấp cũng như các trao đổi chất bên trong quả. Điều này đã chứng minh công nghệ Hyokan có tác dụng duy trì màu sắc quả tốt hơn bảo quản trong tủ lạnh thường.

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan đến độ cứng quả cam

Sau thu hoạch, sự phá vỡ cấu trúc bên trong dẫn đến giảm độ cứng của quả cam sẽ làm giảm đi giá trị thương mại của quả cam. Vì vậy, cùng với việc theo dõi màu sắc quả, chúng tôi đã tiến hành xác định độ cứng quả cam, kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Độ cứng của quả cam (kg/cm²) trong điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan và CT ĐC.

CT	Tháng 0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4
ĐC	7,23	7,10 ^a	6,99 ^b	6,88 ^b	6,77 ^b
HYOKAN	7,23	7,18 ^a	7,13 ^a	7,08 ^a	7,03 ^a
LSD (0,05)		0,09	0,11	0,14	0,13

Trong cùng một cột, các CT có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Số liệu từ bảng 2 cho thấy, ở hai CT, độ cứng đều giảm xuống sau 4 tháng bảo quản. Độ cứng quả cam ở CT Hyokan giảm ít hơn ở CT ĐC, chỉ giảm từ 7,23 kg/cm² xuống 7,03 kg/cm². Ở CT ĐC, độ cứng của quả cam giảm nhanh hơn từ 7,23 kg/cm² giảm còn 6,77 kg/cm². Sự khác nhau giữa hai CT bảo quản là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Nguyên nhân là do trong quá trình bảo quản, các hợp chất cao phân tử tham gia cấu trúc thành tế bào bị phân giải như sự thủy phân protopectin thành pectin hòa tan, đã làm cho ruột quả trở nên mềm hơn, bên cạnh yếu tố thủy phân nội tại của protopectin thì vi sinh vật gây thối hỏng quả cũng góp phần phá vỡ cấu trúc quả. Việc kết hợp xử lý bằng nhiệt độ và

điện trường trong công nghệ Hyokan có tác dụng ức chế sự phát triển của vi sinh vật tốt hơn, hạn chế quá trình hô hấp và trao đổi chất, do đó cấu trúc quả được duy trì. Thêm vào đó, quá trình này còn có tác dụng phân phối lại tuyến tinh dầu trên vỏ quả và làm những vết rạn trên biểu bì khép lại, đồng thời ức chế hoạt động của enzyme liên quan đến quá trình làm mềm quả, giúp quả cam giữ được trạng thái tươi sau 4 tháng bảo quản.

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan đến sự hao hụt khối lượng của quả cam

Trong quá trình bảo quản thường có sự tổn thất khối lượng tự nhiên, giảm giá trị dinh dưỡng và giá trị thương phẩm của quả. Kết quả đánh giá sự hao hụt khối lượng quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Sự hao hụt khối lượng của quả cam (%) trong điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan và CT ĐC.

CT	Tháng 0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4
ĐC	0	1,31 ^a	3,42 ^b	5,49 ^b	8,2 ^b
HYOKAN	0	0,56 ^a	1,48 ^a	2,21 ^a	2,8 ^a
LSD (0,05)		0,19	0,23	0,32	0,35

Trong cùng một cột, các CT có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Từ số liệu bảng 3 cho thấy, ở mỗi CT, sự hao hụt khối lượng tăng dần theo thời gian bảo quản và có sự biến đổi khác nhau. Ở CT ĐC, hao hụt khối lượng xảy ra nhanh hơn sau 4 tháng bảo quản (8,2%), ở CT Hyokan có sự thay đổi ít hơn (2,8%).

Trong quá trình bảo quản, sự tổn thất khối lượng quả thường tăng do quả bị suy thoái, chất nền bị tiêu hao nhiều hơn. Đồng thời ở giai đoạn này, hệ keo của tế bào bị lão hóa cũng làm giảm tính háo nước nên tốc độ bay hơi nước tăng lên đáng kể ở CT ĐC so với CT bảo quản bằng công nghệ Hyokan. Kết quả này cũng tương tự trong nghiên cứu của Hamedani và cộng sự [6].

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan đến hàm lượng TSS, acid tổng số, vitamin C của quả cam

Chất lượng của quả là một yếu tố hàng đầu để đánh giá giá trị của sản phẩm được người tiêu dùng chấp nhận. Kết quả đánh giá hàm lượng chất khô hòa tan (TSS), hàm lượng acid tổng số, hàm lượng vitamin C của 2 CT bảo quản được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Hàm lượng TSS, acid tổng số, vitamin C của quả cam trong điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan và CT ĐC.

Chỉ tiêu	CT	Tháng 0	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4
Hàm lượng TSS	ĐC	12,52	12,91 ^a	13,33 ^b	13,57 ^b	13,92 ^b
	HYOKAN	12,52	12,87 ^a	13,00 ^a	13,12 ^a	13,29 ^a
	LSD (0,05)		0,08	0,09	0,12	0,14
Hàm lượng acid tổng số (TA)	ĐC	1,21	1,12 ^a	1,04 ^b	0,98 ^b	0,89 ^b
	HYOKAN	1,21	1,17 ^a	1,13 ^a	1,09 ^a	1,05 ^a
	LSD (0,05)		0,05	0,06	0,07	0,07
Hàm lượng vitamin C	ĐC	32,84	29,08 ^b	25,58 ^b	18,77 ^b	10,75 ^b
	HYOKAN	32,84	31,16 ^a	29,06 ^a	28,19 ^a	24,37 ^a
	LSD (0,05)		1,37	1,18	1,43	0,66

Trong cùng một cột, các CT có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Hàm lượng TSS của các CT thí nghiệm có xu hướng tăng lên, tỷ lệ thuận với sự hao hụt khối lượng trong quả. CT ĐC tăng 11% so với ban đầu; CT bảo quản bằng công nghệ Hyokan tăng chậm hơn, tăng 6% so với ban đầu. Hai CT có sự khác nhau đáng kể ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$ ở thời điểm 2, 3, 4 tháng bảo quản.

Sau 4 tháng bảo quản, hàm lượng TA của hai CT có xu hướng giảm dần, CT ĐC hàm lượng acid giảm nhanh hơn, giảm 26%. CT Hyokan có sự giảm nhẹ, chỉ giảm 13%. Sự khác nhau của hai CT là có ý nghĩa tại các thời điểm 2, 3, 4 tháng bảo quản.

Sự gia tăng TSS và giảm TA đồng thời ở cả CT dẫn đến tăng chỉ số (TSS/TA) tăng từ 10,35 lên 15,64 đối với CT ĐC và 10,35 đến 12,66 đối với CT Hyokan. Tăng tỷ lệ TSS/TA trong thời gian lưu trữ đã được quan sát thấy tương tự trong cam đỏ Tarocco [7], cam Hamlin và Valencia [3, 8] và trong bưởi [9]. Tỷ lệ TSS/TA cao thường được coi là chỉ số chất lượng đối với quả cam, nhưng sự gia tăng tỷ lệ này trong quá trình bảo quản cũng có thể kèm theo sự thay đổi của mùi vị do sự hình thành ethanol trong quả [10].

Tương tự, số liệu ở bảng 4 cho thấy hàm lượng vitamin C của hai CT đều giảm, CT ĐC giảm khá nhanh, từ 32,84 mg% xuống 10,75 mg% (giảm 67% so với ban đầu), CT bảo quản bằng công nghệ Hyokan có hàm lượng vitamin C giảm chậm hơn, từ 32,84 mg% xuống 24,37 mg% (giảm 26% so với ban đầu). Các báo cáo khác nhau đã chỉ ra rằng, hàm lượng vitamin C trong quả thuộc họ cam quýt bị mất đi trong quá trình bảo quản ở các nhiệt độ khác nhau. Trong trường hợp này, sự phân hủy của vitamin C trong quả có thể được giải thích do sự tương tác với anthocyanin ở nồng độ

cao trong quả đã làm giảm đi hàm lượng này [11].

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan đến chất lượng cảm quan quả cam

Kết quả đánh giá cảm quan quả cam được bảo quản theo CT ĐC và bảo quản bằng công nghệ Hyokan sau 4 tháng được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Chất lượng cảm quan quả cam sau 4 tháng trong điều kiện bảo quản bằng công nghệ Hyokan và CT ĐC.

CT	Hình thức bên ngoài	Trạng thái bên trong	Mùi	Vị	Điểm trung bình có trọng lượng	Xếp loại
Cam tươi	4,8±0,1	4,8±0,1	4,9±0,1	4,8±0,1	19,295	Tốt
ĐC	3,6±0,1	3,9±0,1	4,0±0,1	4,0±0,1	15,515	Khá
HYOKAN	4,6±0,1	4,6±0,1	4,8±0,1	4,7±0,1	18,71	Tốt
Hệ số trọng lượng	1	0,85	0,95	1,2		

Số liệu từ bảng 5 cho thấy, ở CT bảo quản bằng công nghệ Hyokan, trạng thái, hương vị, màu sắc quả cam tốt hơn, đạt điểm đánh giá tốt, biểu hiện ở vỏ vẫn có màu vàng tươi, bên trong mọng nước, mùi thơm, vị ngọt mát. Ở CT ĐC bảo quản bằng tủ lạnh thường có chất lượng cảm quan giảm đáng kể, và chỉ đạt điểm số ở mức khá. Do đó, việc bảo quản cam bằng công nghệ Hyokan cho thấy hiệu quả tốt sau thời gian 4 tháng bảo quản.

Kết luận

Bảo quản quả cam Valencia 2 bằng công nghệ Hyokan, một công nghệ bảo quản bằng điện trường của Nhật Bản ở nhiệt độ 2°C, điện áp 3.500 V cho chất lượng quả cam tốt hơn so với bảo quản trong tủ lạnh thường ở nhiệt độ 2-4°C. Quả cam được bảo quản bằng công nghệ Hyokan sau 4 tháng vẫn giữ được màu sắc vỏ quả, độ cứng quả giảm chậm, hạn chế được các biến đổi hóa lý như hao hụt khối lượng ít hơn (chỉ 2,8%), hàm lượng TSS tăng chậm (6%), hàm lượng acid giảm nhẹ (13%), hàm lượng vitamin C giảm chậm (26%), đặc biệt chất lượng cảm quan vẫn duy trì ở mức độ tốt.

Công nghệ Hyokan là một công nghệ mới có thể dùng để kéo dài thời gian bảo quản, duy trì chất lượng quả nhằm làm tăng giá trị và khả năng tiêu thụ trong nước cũng như xuất khẩu ra thị trường thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.K. Paul and R.X. Shaha (2004), "Nutrients, vitamins and minerals content in common citrus fruits in the Northern region of Bangladesh", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **7**, pp.238-242.
- [2] D. Ke and A.A. Kader (1990), "Tolerance of 'Valencia' oranges to controlled atmosphere as determined by physiological responses and quality attributes", *Journal of American Society for Horticultural Science*, **115**, pp.779-783.
- [3] A. Marcilla, M. Zarzo and M.A. del Río (2006), "Effect of storage temperature on the flavour of citrus fruit", *Spanish Journal of Agricultural Research*, **4(4)**, pp.336-344.
- [4] Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền (2011), "Bảo quản cam mật bằng phương pháp MAP (modified atmosphere packaging)", *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, **17a**, tr.229-238.
- [5] <http://www.ostec.co.jp/vn/hyokan/>.
- [6] M. Hamedani, V. Rabiei, H. Moradi, A. Ghanbari, and M.Z. Azimi (2012), "Determination of storage duration and temperature effects on fruit quality parameters of blood orange (*Citrus sinensis* cv. tarocco)", *Biharean Biologist*, **6(1)**, pp.10-13.
- [7] P. Rapisarda, S.E. Bellomo, and S. Intelisano (2001), "Storage temperature effects on blood orange fruit quality", *J. Agric. Food Chem.*, **49(7)**, pp.3230-3235.
- [8] E. Echeverria, M. Ismail (1987), "Changes in sugars and acids of citrus fruits during storage", *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **100**, pp.50-52.
- [9] H.J. Bruemmer, B. Roe (1969), "Post-harvest treatment of citrus fruit to increase Brix/Acid ratio", *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, **82**, pp.212-215.
- [10] P. Davis, R.C. Hoffman, T.T. Hatton (1974), "Temperature and duration of storage on ethanol content of citrus fruits", *HortScience*, **9**, pp.376-377.
- [11] E. Maccarone, A. Passerini (1990), "Stabilità di antocianine in sistemi modello", *Chim. Ind.*, **72**, pp.890-898.

Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nhân giống *Spirulina platensis* nước lợ phục vụ sản xuất sinh khối tại tỉnh Thanh Hóa

Trần Bảo Trâm^{1*}, Nguyễn Thị Hiền¹, Phan Xuân Bình Minh¹, Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Trương Thị Chiên¹, Phạm Hương Sơn²

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

²Phòng thí nghiệm y sinh công nghệ cao, Viện Ứng dụng Công nghệ

Ngày nhận bài 16/10/2018; ngày chuyển phản biện 19/10/2018; ngày nhận phản biện 18/11/2018; ngày chấp nhận đăng 22/11/2018

Tóm tắt:

Kết quả khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân giống ở hệ thống nuôi kín có sục khí phục vụ sản xuất của hai chủng *Spirulina platensis* thu thập tại Thanh Hóa (TH) và Bình Thuận (BT2) đã cho thấy, cả hai chủng đều sinh trưởng tốt trong môi trường nước lợ với pH cao (10 với chủng TH và 9,5 với chủng BT2). Nhiệt độ thích hợp trong điều kiện phòng nhân giống khoảng 30°C cho cả 2 chủng thí nghiệm. Với chu kỳ chiếu sáng: tối là 12:12 giờ thì cường độ ánh sáng thích hợp cho chủng TH và BT2 là 4.000 và 3.000 lux, sinh khối cực đại ở ngày nuôi thứ 8 với mật độ quần thể (OD_{560}) tương ứng đạt 1,42 và 1,33.

Từ khóa: nhân giống, nước lợ, sinh khối, *Spirulina*, Thanh Hóa.

Chỉ số phân loại: 4.5

Đặt vấn đề

Spirulina (*Arthrospira*) là vi khuẩn lam dạng sợi đa bào, có thể sống ở những môi trường khắc nghiệt mà không thích hợp cho các loài vi tảo khác, tạo thành quần thể trong các hồ nước ngọt, nước lợ và một số môi trường nước mặn, chủ yếu là ở các hồ nước muối kiềm [1]. Mặc dù đã được sử dụng từ rất lâu nhưng chỉ đến những năm 70 của thế kỷ trước người ta mới tập trung đầu tư nuôi trồng *Spirulina* trên quy mô lớn cũng như nghiên cứu về thành phần dinh dưỡng và ứng dụng của nó. Nghiên cứu thành phần hóa học cho thấy, tảo *Spirulina* có chứa tới 55-70% protein, giàu axit béo (trong đó chủ yếu là axit γ -linolenic), vitamin và khoáng vi lượng [2, 3]. Chính vì vậy, từ lâu *Spirulina* đã được sử dụng để bổ sung cho cơ thể nhiều chất dinh dưỡng cần thiết, giúp cải thiện tình trạng suy dinh dưỡng và điều trị bệnh béo phì, tăng cường sức khỏe, tăng sức đề kháng cho cơ thể, chống stress và chống lão hóa. Hiện nay, các sản phẩm từ *Spirulina* đã được sử dụng ở nhiều nước trên thế giới, và được các tổ chức quốc tế như FAO, WHO công nhận là thực phẩm bổ dưỡng và khuyến dùng.

Trong sản xuất sinh khối *Spirulina*, giống là yếu tố đầu tiên được các nhà sản xuất lựa chọn khi tiến hành nuôi trồng. Bên cạnh đó, việc xác định các điều kiện thích hợp để nuôi *Spirulina* luôn được các nhà sản xuất ưu tiên quan tâm, trong đó quan trọng nhất là các yếu tố về dinh dưỡng, nhiệt độ và

ánh sáng [4]. Ở Việt Nam, việc nuôi *Spirulina* bằng nước lợ hay nước biển đã được triển khai tại Công ty CP Long Phú, bước đầu mang lại nguồn thu cho doanh nghiệp và tạo sinh kế cho người dân trên địa bàn xã Quảng Thái, huyện Quảng Xương (Thanh Hóa). Chính vì vậy, việc nghiên cứu lựa chọn giống cũng như các điều kiện nhân nuôi giống sơ cấp ban đầu phục vụ cho sản xuất sinh khối *Spirulina* nước lợ sẽ mở ra một hướng phát triển nông nghiệp bền vững cho các vùng ven biển Việt Nam.

Đối tượng và phương pháp



Hình 1. Khu thực nghiệm nhân giống *Spirulina* tại Công ty CP Long Phú.

*Tác giả liên hệ: Email: trantram_74@yahoo.com

Effect of some factors on the cultivation of *Spirulina platensis* in brackish water for biomass production in Thanh Hoa province

Bao Tram Tran^{1*}, Thi Hien Nguyen¹,
Xuan Binh Minh Phan¹, Thi Thanh Mai Nguyen¹,
Thi Chien Truong¹, Huong Son Pham²

¹Center for Experimental Biology, NACENTECH

²High-Tech Biomedical Application Development Lab, NACENTECH

Received 16 October 2018; accepted 22 November 2018

Abstract:

The result of investigating some factors affecting the cultivation of two *Spirulina platensis* strains collected in Thanh Hoa (TH) and Binh Thuan (BT2) provinces in the close system form with aeration showed that both the strains could grow well in brackish water with high pH values (10 for TH and 9.5 for BT2). The suitable temperature in the laboratory condition was about 30°C for both the strains. With the light:dark cycle of 12:12 h, the appropriate light intensity was 4,000 lux for those in TH and 3,000 lux for those in BT2, and the maximum biomass expressed by the optical density at wavelength of 560 nm reached 1.42 and 1.33 for the two strains in the 8th day, respectively.

Keywords: biomass, brackish water, cultivation, *Spirulina*, Thanh Hoa.

Classification number: 4.5

Đối tượng nghiên cứu

Giống *Spirulina platensis* được thu thập tại Thanh Hóa và Bình Thuận (ký hiệu lần lượt là TH và BT2). Nghiên cứu được thực hiện tại Công ty CP Long Phú - xã Quảng Thái, huyện Quảng Xương (Thanh Hóa).

Hiện tại, Công ty CP Long Phú đang tiến hành nuôi thương mại *Spirulina* với nguồn nước biển pha loãng 5‰, để thuận lợi cho việc triển khai ứng dụng các nguồn giống mới thu thập trong sản xuất tại Công ty, nhóm nghiên cứu cũng đã sử dụng nước biển pha loãng tới độ mặn 5‰, môi trường dinh dưỡng bổ sung là Zarrouk cải tiến.

Bố trí thí nghiệm

Tảo *S. platensis* được nhân nuôi trong hệ thống chai nhựa 1,5 l (dạng kín) có sục khí với mật độ giống ban đầu có mật độ quang (Optical Density - OD) được đo ở bước sóng 560 nm (OD₅₆₀) là 0,2. Với mỗi yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sinh trưởng và phát triển của tảo, chúng tôi bố trí các công thức thí nghiệm khác nhau, bao gồm:

+ Ảnh hưởng của nhiệt độ: được bố trí 5 công thức với dải nhiệt độ là 15, 20, 25, 30, 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

+ Ảnh hưởng của pH: được bố trí 5 công thức với dải pH là 8, 8,5, 9, 9,5, 10.

+ Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng: sử dụng đèn huỳnh quang ánh sáng trắng chiếu sáng 4 công thức với cường độ ánh sáng là 2.000, 3.000, 4.000 và 5.000 lux.

+ Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng: được bố trí với 3 công thức có chu kỳ chiếu sáng trong ngày: 8, 10, 12h.

Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

+ Đánh giá sinh trưởng của tảo *S. platensis* được xác định dựa vào mật độ quang hấp thụ ở bước sóng 560 nm. Theo dõi tốc độ sinh trưởng của dịch nuôi cấy 1 ngày/lần liên tục trong 10 ngày. Mỗi thí nghiệm được thực hiện với 3 lần lặp lại.

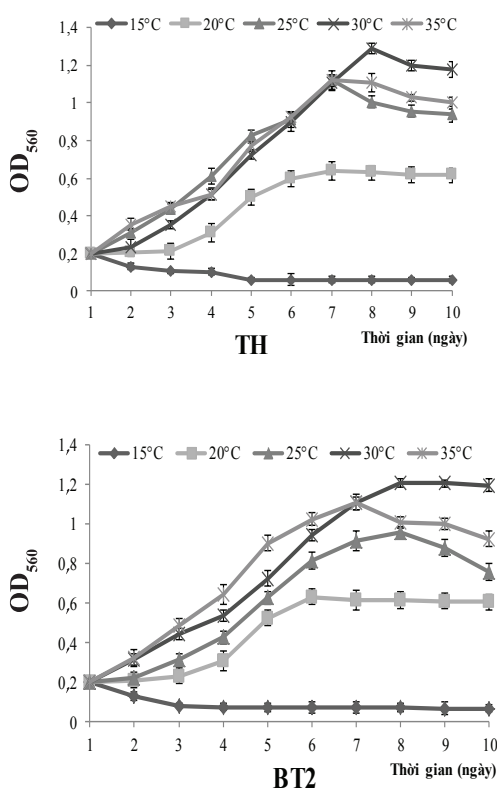
+ Xử lý số liệu: mẫu thí nghiệm được phân tích lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình (trung bình $\pm$ SD). Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên phần mềm Excel 2007.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của tảo thông qua tác động đến quá trình trao đổi chất diễn ra trong tế bào và nó là một trong những yếu tố chính điều khiển sự phát triển của *Spirulina*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ có ảnh hưởng rõ nét đến sinh trưởng của cả 2 chủng TH và BT2: ở khoảng nhiệt độ 15-20°C, tảo sinh trưởng và phát triển chậm hoặc chết (ở ngưỡng 15°C).

Trong khoảng 25-35°C tảo sinh trưởng tốt và sinh khối cực đại đều đạt ở ngày nuôi thứ 7-8 (hình 2).



Hình 2. Ảnh hưởng nhiệt độ nuôi cấy đến sinh trưởng *S. platensis*.

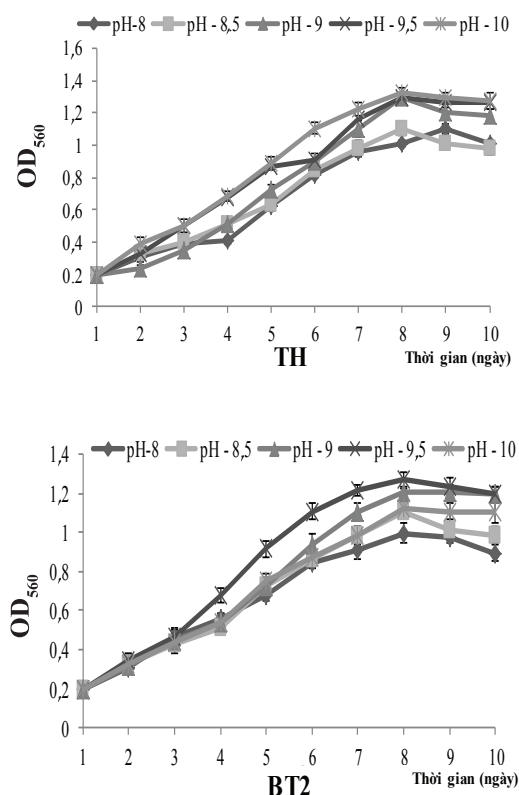
Tuy nhiên, ở ngưỡng 30°C đường cong sinh trưởng của cả 2 chủng TH và BT2 đều vượt trội hơn so với ở mức 25 và 35°C, đạt cực đại ở ngày nuôi thứ 8 (OD₅₆₀ lần lượt đạt 1,29 và 1,20). Kết quả thu được trong nghiên cứu cũng tương đồng với kết quả công bố của Hu (2004) cho thấy tảo có thể sống ở dải nhiệt độ từ 20-40°C [5], hay Danesi và cộng sự (2001) cũng xác định được nhiệt độ tối ưu cho tăng trưởng của *Spirulina* là 30°C [6].

Kết quả thu được cho thấy, ở nhiệt độ thấp, hoạt tính quang hợp của tảo thấp, dẫn đến sinh trưởng và phát triển chậm, khi nhiệt độ tăng, cường độ quang hợp tăng dẫn đến sinh trưởng của tảo tăng. Tuy nhiên, khi nhiệt độ tăng lên quá nhiệt độ tối thích của tảo sẽ làm giảm hoạt tính quang hợp và dẫn đến ngừng hẳn quang hợp [7]. Một nghiên cứu khác của Vonshak và cộng sự (1982) cho thấy, khi nhiệt độ cao tảo sử dụng nhiều năng lượng dự trữ như cacbohydrate để tăng hoạt động hô hấp trong chu kỳ tối dẫn đến làm giảm trọng lượng của tế bào [8].

Ảnh hưởng của pH

Với chi *Spirulina* khi pH quá cao hay quá thấp sẽ làm ức chế quá trình điều hòa áp suất thẩm thấu, quang hợp và trao đổi chất của tảo [9]. Tuy nhiên, giá trị pH tối ưu cho tăng

trưởng của tảo phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống, điều kiện nhân nuôi. Chính vì vậy, trong nghiên cứu chúng tôi tiến hành xác định pH thích hợp cho từng chủng tảo trong điều kiện nhân nuôi tại Công ty CP Long Phú, tỉnh Thanh Hóa (hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng *S. platensis*.

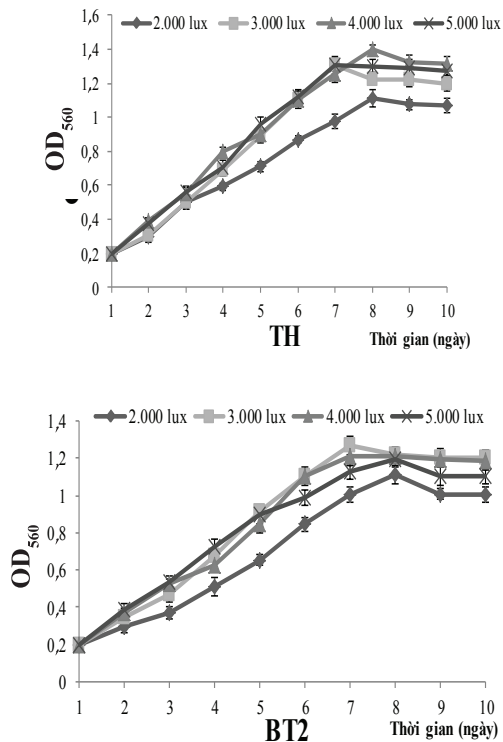
Kết quả trên hình 3 cho thấy, cũng giống với các loài thuộc chi *Spirulina* nói chung, cả 2 chủng tảo thực nghiệm đều có thể sinh trưởng và phát triển ở pH 8-10. Tuy nhiên, với chủng TH, ở ngưỡng pH 10 tảo phát triển tốt hơn so với khoảng pH 8-9,5, và mật độ quần thể đạt cực đại (OD₅₆₀=1,33 ở ngày nuôi thứ 8). Với chủng BT2, tảo phát triển tốt nhất ở pH 9,5, tiếp đó là pH 9 và thời gian đạt sinh khối cực đại ở pH 9,5 (OD₅₆₀=1,27 ở ngày nuôi thứ 8).

Kết quả này cũng phù hợp với các công bố trước đây, như nghiên cứu của Belkin và cộng sự (1971) đã xác định pH tối ưu cho sinh trưởng của *S. platensis* nuôi trong môi trường Zarrouk (với nguồn N bổ sung là NaNO₃ 29,4 mM) từ 9-9,5 [10], hay với chủng *S. platensis* (Ấn Độ) nuôi trong môi trường Zarrouk có hàm lượng NaHCO₃ 18 g/l, độ mặn 1‰ cho sinh trưởng tốt nhất ở pH 9 [10]. Trong khi ở độ mặn cao 15-25‰, chủng *S. platensis* của Trường Đại học Nha Trang cho kết quả sinh trưởng tốt hơn ở pH 9-9,5, hay như chủng *Spirulina* sp. (Trường Đại học Cần Thơ) thì pH

9 là điều kiện tốt nhất cho sự phát triển sinh khối cũng như tích lũy chlorophyll và carotenoid của loài tảo này... [11, 12].

Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng

Cũng như các cơ thể có khả năng quang hợp nói chung, ánh sáng là nguồn năng lượng chính cho quá trình sản xuất sinh khối vi tảo. Trong đó, cường độ ánh sáng là yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến cường độ quang hợp, nhất là trong điều kiện mật độ tảo đạt cao [13].



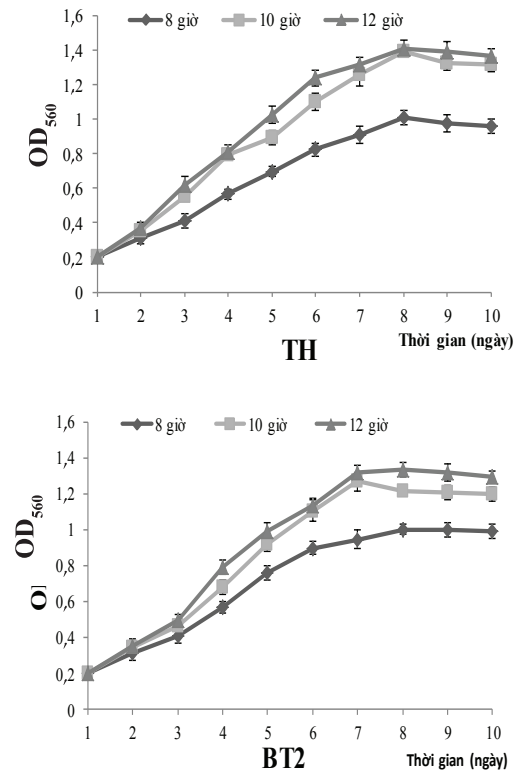
Hình 4. Ảnh hưởng của cường độ chiếu sáng đến sinh trưởng *S. platensis*.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, với chủng TH, ở cường độ ánh sáng 4.000 lux, tảo sinh trưởng và phát triển tốt nhất, mật độ quần thể đạt cao nhất ở ngày nuôi thứ 8 ($OD_{560}=1,40$), còn ở ngưỡng cường độ ánh sáng 2.000 lux tảo sinh trưởng và phát triển kém hơn. Với chủng BT2, tảo sinh trưởng tốt nhất ở cường độ sáng 3.000 lux (đạt cao nhất ở ngày nuôi thứ 8 với $OD_{560}=1,29$), tiếp đó là ở cường độ chiếu sáng 4.000 lux, 5.000 lux, còn ở cường độ 2.000 lux sinh trưởng của tảo phát triển chậm nhất (hình 4). Điều này có thể giải thích là do, với cường độ ánh sáng thấp (2.000 lux) ức chế sinh trưởng của tảo và trở thành yếu tố giới hạn, trong khi cường độ ánh sáng cao (5.000 lux) và ở giai đoạn ban đầu mật độ tảo còn thấp, thì ánh sáng quá mạnh sẽ gây tổn thương tảo, ảnh hưởng đến các sắc tố

quang hợp như chlorophyll, phycocyanin, và bắt đầu xuất hiện hiện tượng ức chế quang hợp có thể làm tảo chết hoặc làm giảm năng suất [14].

Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng

Bên cạnh cường độ chiếu sáng, thời gian chiếu sáng cũng ảnh hưởng rất lớn đến quá trình quang hợp. Chính vì vậy, việc nghiên cứu chu kỳ chiếu sáng thích hợp cho nuôi *Spirulina* cũng là dữ liệu quan trọng khi ứng dụng trong sản xuất ở điều kiện ngoài trời phải phụ thuộc hoàn toàn vào thời gian chiếu sáng tự nhiên.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng đến sinh trưởng *S. platensis*.

Hình 5 biểu diễn tốc độ sinh trưởng của 2 chủng TH và BT2 ở các chu kỳ chiếu sáng khác nhau. Đối với cả 2 chủng TH và BT2, thời gian chiếu sáng 8h/ngày tảo phát triển chậm hơn hẳn so với chu kỳ chiếu sáng: tối là 10:14 đến 12:12 giờ, mật độ quần thể đạt cực đại ở ngày nuôi thứ 8 với chu kỳ chiếu sáng: tối là 10:14 và 12:12 giờ, OD_{560} tương ứng đạt 1,40 và 1,42 (chủng TH) và 1,33 (chủng BT2). Như vậy, có thể thấy, khi rút ngắn thời gian chiếu sáng đã ảnh hưởng đến quá trình quang hợp của tảo, dẫn đến sinh trưởng của tảo bị giảm sút. Thời gian chiếu sáng càng dài thì năng suất tảo *Spirulina* càng cao, năng suất tảo đạt cao nhất khi chiếu sáng liên tục [15].

Kết luận

Trong điều kiện phòng nuôi tại Công ty CP Long Phú (Quảng Xương, tỉnh Thanh Hóa), kết quả thử nghiệm cho thấy cả 2 chủng *S. platensis* TH và BT2 đều có thể sử dụng cho nhân giống tảo nước lợ phục vụ sản xuất sinh khối. Điều kiện nhân giống thích hợp với chủng TH là: nhiệt độ nuôi cấy 30°C, pH môi trường 10, cường độ ánh sáng 4.000 lux, chu kỳ chiếu sáng: tối là 12:12 giờ cho sinh khối đạt cực đại ở ngày nuôi thứ 8 ($OD_{560}=1,42$). Với chủng BT2 nhiệt độ nuôi cấy thích hợp 30°C, pH môi trường 9,5, cường độ ánh sáng 3.000 lux và thời gian chiếu sáng: tối là 12:12 giờ cho sinh khối cao nhất ở ngày nuôi thứ 8 ($OD_{560}=1,33$).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vonshak (1997), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, Taylor and Francis, London, 233pp.
- [2] R. Henrikson (1994), *Microalga Spirulina, superalimento del futuro*, Ronore Enterprises, Ediciones Urano, Barcelona, España, 222pp.
- [3] A. Belay (1997), "Mass culture of *Spirulina* outdoors: the earthrise farms experience", *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, Cell Biology and Biotechnology*, London: Taylor & Francis, pp.131-158.
- [4] J.F. Cornet, C.G. Dussap, G. Dubertret (1992), "A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors. I. Coupling between light transfer and growth kinetics", *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, pp.817-825.
- [5] Q. Hu (2004), "Industrial production of microalgal cell mass and secondary products-major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*", *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied phycolgy*, Oxford: Blackwell Science Ltd, pp.264-272.
- [6] E.D.G. Danesi, C.O. Rangel, L.H. Pelizer, J.C.M. Carvalho, S. Sato, I.O. Moraes (2001), "Production of *Spirulina platensis* under different temperatures and urea feeding regimes for chlorophyll attainment", *Proceed. 8th Intl. Congress Engin. Food*, **2**, pp.1978-1982.
- [7] Muhammad Qasim, Imran Najeeb, Majeeda Rasheed, Khawar Ali Shahzad, Abdul Ahad, Zahida Fatima and Zubair Anwar (2012), "Physico-chemical growth requirements and molecular characterization of indigenous *Spirulina*", *Afr. J. Microbiol. Res.*, **6(11)**, pp.2788-2792.
- [8] A. Vonshak, A. Abeliovich, S. Boussiba, S. Arad, A. Richmond (1982), "Production of *Spirulina* biomass: affects of environmental factors and population density", *Biomass*, **2(3)**, pp.175-185.
- [9] J.P. Pandey, N. Pathak, and A. Tiwan (2010), "Standardization of pH and light intensity for the biomass production of *Spirulina platensis*", *J. Algal Biomass Utln.*, **1(2)**, pp.93-102.
- [10] S. Belkin and S. Boussiba (1971), "Resistance of *Spirulina platensis* (Cyanophyta) to high pH values", *Plant Cell Physiol.*, **32**, pp.953-958.
- [11] Gaurav Sharma, Manoj Kumar, Mohammad Irfan Ali1, and Nakuleshwar Dut Jasuja (2014), "Effect of Carbon Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation", *J. Microb. Biochem. Technol.*, **6(4)**, pp.202-206.
- [12] Trần Thị Lê Trang, Hoàng Thị Bích Mai, Nguyễn Tấn Sỹ, Nguyễn Thị Thúy, Trần Văn Dũng, Trần Thị Tuyết, Nguyễn Thị Hà Giang, Lê Thị Hoài Nhon (2012), "Nghiên cứu ảnh hưởng của pH và độ mặn đến sinh trưởng của quần thể tảo *Spirulina platensis*", *Tạp chí Hoạt động Khoa học*, **10**, tr.73-76.
- [13] J. Falquet, and J. Hurni (1997), *The nutritional aspects of Spirulina*, Antenna Foundation, https://www.antenna.ch/wp-content/uploads/2017/03/AspectNut_UK.pdf (Accessed July 25, 2017).
- [14] Đặng Đình Kim, Đặng Hoàng Phước Hiền (1999), *Công nghệ sinh học vi tảo*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.5-125.
- [15] M.G.J. Janssen (2002), *Cultivation of microalgae: effect of light/dark cycles on biomass yield*, doctoral dissertation.

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Phạm Hương Sơn¹, Bùi Thị Thanh Phương¹,
Phạm Minh Duy², Đỗ Thị Thơm¹, Nguyễn Thị Bình¹, Nguyễn Ích Tân³

¹Viện Ứng dụng Công nghệ

²Trường THPT chuyên Khoa học Tự nhiên

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 22/10/2018; ngày chuyển phản biện 26/10/2018; ngày nhận phản biện 26/11/2018; ngày chấp nhận đăng 29/11/2018

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành nhân giống *in vitro* cây Sâm cau thông qua phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, kết quả cho thấy trên môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l tảo *Spirulina* là thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *in vitro*, với số chồi 20,8 chồi/mẫu và 5,2 lá/cây, sau 6 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất trong môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 0,5 mg/l IBA. Hỗn hợp đất mùn + vụn xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm, sau 10 tuần nuôi trồng, tỷ lệ sống đạt 98%, chiều cao cây đạt 16,6 cm, 6,9 lá/cây và 6,3 rễ mới/cây.

Từ khóa: cây thuốc, đỉnh sinh trưởng, giá thể, Sâm cau, số chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) thuộc họ Sâm cau (Hypoxidaceae) là cây thuốc quý được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền Ấn Độ, Pakistan, Trung Quốc và Việt Nam. Sâm cau có tác dụng chữa bệnh vàng da, hen suyễn, làm thuốc bổ, ngăn ngừa loãng xương, trị đái tháo đường [1], chống ung thư [2]..., chữa bệnh huyết trắng [3]; chữa vô sinh, nam giới tinh lạnh, liệt dương, tê thấp, đau lưng, viêm thận mạn tính, viêm khớp, suy nhược cơ thể, loét dạ dày tá tràng, tiêu chảy, huyết áp cao... [4]. Do nhu cầu sử dụng dược liệu tăng mạnh trong thời gian gần đây nên cây Sâm cau bị khai thác ồ ạt, dẫn đến nguồn nguyên liệu đang trở nên cạn kiệt. Mặt khác, vùng phân bố của Sâm cau bị khai thác triệt để khiến loài cây này rơi vào tình trạng gần như mất dần trong tự nhiên, được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam [5] và Danh lục đỏ của IUCN [6]. Vì vậy, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống Sâm cau, sản xuất cây giống để tạo ra nguồn dược liệu phục vụ cho lĩnh vực y học và mỹ phẩm là vấn đề rất cần thiết.

Cho đến nay, các nghiên cứu về nuôi cấy Sâm cau chủ yếu từ mô lá, nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng vẫn còn rất hạn chế. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu nhân nhanh Sâm cau bằng phương pháp nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng, nhằm góp phần bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý của Việt Nam.

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

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: nguyên liệu dùng trong nhân giống là cây Sâm cau được thu thập ở Sơn La, mẫu được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong 15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được cắt lấy đỉnh sinh trưởng và cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 1,5 mg/l TDZ, pH 5,5. Những chồi non tái sinh từ các đỉnh sinh trưởng được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Phòng nuôi cấy mô của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN. Thời gian nghiên cứu: 01/2017-8/2018.

Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.500 lux, nhiệt độ 25±2°C và độ ẩm không khí 70-80%. Trồng cây trong nhà lưới có mái che mưa và che lưới đen, độ che sáng >70%, tưới phun sương đều 2 lần/ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nhân nhanh chồi: để khảo sát khả năng nhân nhanh chồi, các chồi non tái sinh từ các đỉnh sinh trưởng được cấy trên môi trường cơ bản MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar

Study on *in vitro* propagation of *Curculigo orchoides* Gaertn. through apical meristem culture

Thi Lai Nguyen^{1*}, Huong Son Pham¹,
Thi Thanh Phuong Bui¹, Minh Duy Pham²,
Thi Thom Do¹, Thi Binh Nguyen¹, Ich Tan Nguyen³

¹National Center for Technological Progress

²HUS High School for Gifted Students

³Vietnam National University of Agriculture

Received 22 October 2018; accepted 29 November 2018

Abstract:

In this study, authors propagated *Curculigo orchoides* Gaertn plants using the apical meristem culture method. The results indicated that: the most appropriate medium for multiplication of shoots was the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose + 5.5 g/l agar + 200 ml/l coconut water + 1 g/l activated charcoal + 1.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA + 1.0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l *Spirulina* algae, with the results of 20.8 shoots/explant and 5.2 leaves/plantlet after 6 weeks of culture. Root formation of shoots carried out on the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose + 5.5 g/l agar + 200 ml/l coconut water + 1 g/l activated charcoal + 0.5 mg/l IBA gave the best result. In nursery, a mixture of humus + coconut fiber powder (70:30 ratio) was regarded as the best substrate due to the high survival rate of plantlets (98%) and healthy plantlets (16.60 cm high with 6.9 leaves and 6.3 new roots/a plantlet) at 10 weeks after planting.

Keywords: apical meristem, *Curculigo orchoides* Gaertn., medicinal plant, shoot number, substrate.

Classification number: 4.6

+ 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ, bổ sung IBA (0-2,0 mg/l); 0,5 mg/l IBA + phloroglucinol (PG) (0-2 mg/l); 0,5 mg/l IBA + AgNO₃ (0-2 mg/l); 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + tảo *Spirulina* (0-100 mg/l).

Phương pháp nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: các chồi Sâm cau *in vitro* có 2-3 lá, chồi chưa có rễ, chồi khỏe mạnh được tách ra và cấy sang môi trường ra rễ có bổ sung IBA ở các nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/l, 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,5 để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Phương pháp đưa cây *in vitro* ra vườn ươm: các cây *in vitro* sau khi nuôi cấy trong phòng thí nghiệm đạt chiều cao 6-7 cm, có 3-4 lá và 5-7 rễ để bình cây ra ngoài vườn ươm 5 ngày. Cây con được rửa hết thạch, rải đều trên khay sạch để trong 1 giờ, rồi trồng vào chậu nhựa kích thước 12x18 cm trên các giá thể: vụn xơ dừa, đất mùn, bã được liệu (cây Atiso), đất mùn + vụn xơ dừa (70:30), để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại.

Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu: mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thu thập số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm). Tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá) và số rễ mới (rễ) được đánh giá sau 10 tuần nuôi trồng.

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và phần mềm Excel 2007.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Nghiên cứu nhân nhanh chồi

Ảnh hưởng của tổ hợp (TDZ + IBA) đến khả năng nhân nhanh chồi cây Sâm cau:

Bảng 1. Ảnh hưởng của tổ hợp (TDZ + IBA) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
TDZ	IBA			
1,5	0,0	4,9 ^d	2,6 ^b	Chồi nhỏ, lá bé
1,5	0,25	6,1 ^b	2,9 ^b	Chồi nhỏ, lá xanh
1,5	0,50	8,0 ^a	3,9 ^a	Chồi bình thường, lá xanh
1,5	0,75	6,3 ^b	3,5 ^a	Chồi nhỏ, lá xanh
1,5	1,0	5,6 ^c	2,7 ^b	Chồi nhỏ, lá màu vàng nhạt
LSD _{0,05}		0,41	0,43	
CV%		3,6	4,6	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Trong nhân giống *in vitro*, nhiều loại cây trồng chỉ phù hợp với các chất thuộc nhóm cytokinin, nhưng có nhiều loại khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng giữa nhóm cytokinin và auxin thì nâng cao hiệu quả trong nhân giống. Để tìm hiểu ảnh hưởng của Auxin đến quá trình nhân nhanh chồi có sự tương tác với TDZ, đề tài tiến hành bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính. Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, sự kết hợp giữa TDZ và IBA có ảnh hưởng tích cực lên quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. IBA ở nồng độ 0,5 mg/l kết hợp với 1,5 mg/l TDZ là tốt nhất, với số chồi là 8 chồi/mẫu và 3,9 lá/cây, chồi cây xanh và sinh trưởng tốt. Điều này cho thấy, khi tăng nồng độ IBA kết hợp với 1,5 mg/l TDZ đã kích thích sự hình thành chồi cây và sinh trưởng của chồi cây, qua đây cũng cho thấy, sự kết hợp của TDZ và IBA có sự tương tác nâng cao hiệu quả trong nhân giống *in vitro* cây Sâm cau. Khi tăng nồng độ IBA lên 1 mg/l số chồi và số lá giảm dần, thậm chí những chồi tạo ra nhỏ, thấp và không đồng đều, có thể do IBA ở nồng độ cao sẽ gây ức chế sự tái sinh của mẫu.

Ảnh hưởng của phloroglucinol (PG) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau: theo Kim, et al. (2007) [7] khi bổ sung PG vào môi trường nuôi cấy đã giảm tỷ lệ mẫu hóa nâu và tăng số lượng chồi. Để ngăn ngừa hoặc giảm tỷ lệ mẫu tiết phenol và tăng số lượng chồi, chúng tôi tiến hành bổ sung PG vào môi trường nuôi cấy MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA và bổ sung PG ở nồng độ (0-2 mg/l), kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của phloroglucinol (PG) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ PG (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	7,9 ^d	3,93 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
0,5	10,8 ^b	4,2 ^{ab}	Chồi bình thường, lá xanh
1,0	13,1^a	4,5^a	Chồi to, lá xanh
1,5	10,1 ^c	3,9 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
2,0	8,2 ^d	3,4 ^c	Chồi nhỏ, lá màu xanh nhạt
LSD _{0,05}	0,48	0,34	
CV%	2,6	4,7	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, PG có tác dụng tốt đối với quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. Bổ sung PG ở nồng độ 1 mg/l cho số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đạt cao hơn cả với 13,1 chồi và 4,5 lá, trong khi đối chứng môi trường không bổ sung PG chỉ đạt 7,9 chồi và 3,93 lá. Khi tăng nồng độ lên quá 1 mg/l PG nhận thấy số chồi, chiều cao của chồi giảm xuống theo chiều tăng của PG. Điều này có thể do nồng độ PG cao quá đã gây ức chế đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau. Cụ thể, ở nồng độ 2,0 mg/l tỷ lệ hình thành chồi giảm xuống chỉ đạt 8,2 chồi và 3,4 lá, chất lượng chồi kém, chồi mảnh.

Ảnh hưởng của AgNO₃ đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau: các ion bạc dưới dạng nitrate (AgNO₃) có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình phát sinh cơ quan sinh phôi, ra rễ *in vitro*, cảm ứng ra hoa, ra hoa sớm, kiểm soát hiện tượng rụng lá thông qua việc ức chế hoạt động của ethylene và hạn chế mẫu tiết phenol [8]. Trong nghiên cứu này, đề tài đã bổ sung AgNO₃ ở các nồng độ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Số liệu ở bảng 3 cho thấy, bổ sung AgNO₃ đã khắc phục vấn đề tiết phenol và tăng số lượng chồi, ngăn ngừa hoặc giảm tỷ lệ mẫu hóa nâu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của AgNO₃ đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ AgNO ₃ (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	7,8 ^c	3,90 ^b	Chồi bình thường, lá màu xanh
0,5	15,1 ^b	4,6 ^{ab}	Chồi to, lá màu xanh
1,0	17,8^a	4,9^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
1,5	12,0 ^d	4,1 ^b	Chồi to, lá màu xanh
2,0	7,7 ^e	3,6 ^{bc}	Chồi yếu và có hiện tượng mọng nước
LSD _{0,05}	0,51	0,41	
CV%	2,1	5,0	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Môi trường không bổ sung AgNO₃ thì mẫu chỉ tái sinh 7,8 chồi/mẫu và 3,9 lá/chồi, khi môi trường bổ sung 0,5 mg/l AgNO₃ thì mẫu tái sinh chồi tăng lên 15,1 chồi/mẫu và 4,6 lá/chồi. Khi tăng nồng độ AgNO₃ lên 1 mg/l thì mẫu tái sinh đạt cao nhất với 17,8 chồi/mẫu và 4,9 lá/chồi. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng cao nồng độ AgNO₃ lên 1,5 mg/l thì số chồi/mẫu và số lá/chồi có xu hướng giảm dần, chồi cây yếu và có hiện tượng mọng nước. Điều này cho thấy, AgNO₃ ở nồng độ cao

thì ức chế sự tái sinh chồi của mẫu. Như vậy, ở nồng độ 1 mg/l AgNO_3 thích hợp cho việc tái sinh chồi cũng như sinh trưởng phát triển của chồi.

Ảnh hưởng của tảo Spirulina đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau:

Bảng 4. Ảnh hưởng của tảo *Spirulina* đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Hàm lượng tảo <i>Spirulina</i> (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0	17,6 ^c	4,8 ^{bc}	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
50	20,8 ^a	5,2 ^a	Chồi mập, cứng cáp và lá xanh bóng
100	18,9 ^b	4,9 ^{ab}	Chồi xanh đậm, khỏe
150	14,0 ^d	4,5 ^c	Chồi xanh nhạt, lá nhỏ
200	10,7 ^e	4,1 ^d	Chồi có hiện tượng hóa vàng, lá nhỏ
LSD _{0,05}	0,6	0,39	
CV%	2,1	4,6	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO_3 . Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, tảo *Spirulina* có tác dụng tốt đối với quá trình hình thành và sinh trưởng của chồi. Các nồng độ tảo *Spirulina* khác nhau, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây cũng khác nhau, bột tảo *Spirulina* ở nồng độ 50 mg/l bổ sung vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO_3 cho kết quả tốt nhất, với số chồi/mẫu là 20,8, số lá/chồi là 5,2. Điều này có thể do trong bột tảo *Spirulina* có chứa các nhóm chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây như các vitamin, các amino acid, các chất khoáng đa lượng, vi lượng [9]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Cúc và cs (2014) [10] khi bổ sung bột tảo *Spirulina* ở nồng độ 50 mg/l có tác động hiệu quả đến tỷ lệ sống của chồi và sự hình thành số chồi của lan Hải (*Paphiopedilum delenatii*). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ tảo *Spirulina* từ 100-200 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây có xu hướng giảm dần, thậm chí còn thấp hơn so với đối chứng. Như vậy, nồng độ tảo *Spirulina* 50 mg/l là thích hợp nhất cho giai đoạn nhân nhanh chồi *in vitro* Sâm cau.

Nghiên cứu tạo cây in vitro hoàn chỉnh (nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi Sâm cau in vitro)

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi Sâm cau in vitro (6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ IBA (mg/l)	Chiều cao của cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0 (Đ/C)	7,5 ^c	6,3 ^c	4,1 ^e	2,7 ^d	Rễ ngắn
0,5	11,8 ^a	7,2 ^a	10,3 ^a	5,1 ^a	Rễ khỏe, trắng, mập và đều, nhiều lông hút
1	9,6 ^b	7,0 ^{ab}	8,2 ^b	4,3 ^b	Rễ khỏe, rễ trắng và nhiều lông hút
1,5	7,8 ^c	6,5 ^{bc}	7,1 ^c	3,4 ^c	Đầu rễ trắng và đều, nhiều lông hút
2	6,2 ^d	5,0 ^d	5,6 ^d	2,8 ^d	Rễ ngắn, mảnh
LSD _{0,05}	0,33	0,61	0,65	0,25	
CV%	2,1	5,3	5,0	3,7	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, trên môi trường không bổ sung IBA rễ vẫn hình thành. Điều này chứng tỏ auxin nội sinh được hình thành ở chồi và di chuyển xuống dưới gốc để cảm ứng tạo rễ. Tại nồng độ 0,5 mg/l IBA bổ sung vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính, sau 6 tuần nuôi cấy cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây đạt 11,8 cm, số lá đạt 7,2 lá/cây, số rễ đạt 10,3 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5,1 cm; chất lượng rễ rất tốt, rễ khỏe, trắng, mập đều và nhiều lông hút, thuận lợi cho sự phát triển của chồi và rễ ở giai đoạn vườn ươm. Tiếp tục tăng nồng độ IBA từ 1-2 mg/l, có sự ức chế kéo dài rễ và giảm số lượng rễ tạo thành. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Zuraida, et al. 2014) [11] khi sử dụng IBA ở nồng độ 0,5 mg/l cho quá trình ra rễ *in vitro* loài *Melicope lunuankenda*.

Nghiên cứu kỹ thuật đưa cây in vitro ra vườn ươm (nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể trồng đối với sinh trưởng và phát triển của cây Sâm cau in vitro ở giai đoạn vườn ươm)

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây Sâm cau cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm sau 10 tuần nuôi trồng trên giá thể vụn xơ dừa, đất mùn, bã được liệu, đất mùn + vụn xơ dừa (70:30) được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể trồng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của cây Sâm cau *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm (sau 10 tuần).

Công thức giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới xuất hiện (rễ)	Chất lượng cây
Vụn xơ dừa	86	10,8 ^d	5,5 ^c	4,5 ^c	Cây còi cọc, lá nhỏ
Đất mùn	95	13,5 ^b	6,2 ^b	5,9 ^b	Cây khỏe, lá to màu xanh
Bã dược liệu	90	11,68 ^c	5,9 ^{bc}	4,2 ^c	Cây khỏe, lá xanh
Mùn + vụn xơ dừa (70:30)	98	16,6 ^a	6,9 ^a	6,3 ^a	Cây khỏe, mập, lá to xanh đậm
<i>LSD</i> _{0,05}		0,42	0,51	0,36	
CV%		1,7	4,4	3,7	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cây trồng ở các loại giá thể đều đạt cao từ 86-98%, trên giá thể đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) cây sống và sinh trưởng tốt nhất, với tỷ lệ sống đạt (98%), chiều cao cây 16,6 cm, số lá 6,9, số rễ mới xuất hiện 6,3 rễ, là do đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) có độ thông thoáng và giữ ẩm thích hợp cho sinh trưởng của cây con trong giai đoạn đầu ở vườn ươm. Trên giá thể đất mùn, chiều cao cây, số lá và số rễ mới xuất hiện khá cao, tương ứng (13,5 cm, 6,2 lá; 5,9 rễ), điều này cho thấy đất mùn giàu chất khoáng và xốp thoáng phù hợp cho cây cấy mô sinh trưởng. Còn giá thể vụn xơ dừa và bã dược liệu, tuy tỷ lệ sống đạt khá cao nhưng chiều cao cây, số lá, số rễ của cây con đều thấp, có thể do bã dược liệu có khả năng giữ nước cao, dễ gây thối rễ. Còn vụn xơ dừa lại thoát nước nhanh, nên cây dễ héo.

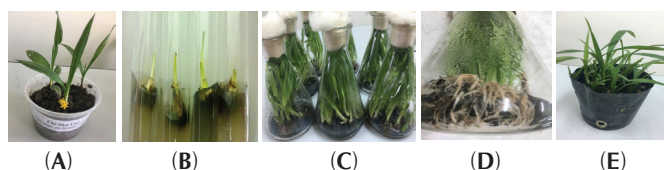
Như vậy, giá thể đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) thích hợp chuyển cây con Sâm cau ra giai đoạn vườn ươm.

Kết luận

- Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l tảo *Spirulina* là thích hợp nhất cho khả năng nhân nhanh *in vitro* cây Sâm cau, với số chồi/mẫu là 20,8, số lá/chồi là 5,2 sau 6 tuần nuôi cấy.

- Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 0,5 mg/l IBA thích hợp nhất cho sự hình thành rễ *in vitro* của cây Sâm cau, chiều cao cây đạt 11,8 cm, số lá đạt 7,2 lá/cây, số rễ đạt 10,3 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5,1 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Hỗn hợp đất mùn + vụn xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm với tỷ lệ sống đạt (98%), chiều cao cây 16,6 cm, số lá 6,9, số rễ mới xuất hiện 6,3 rễ sau 10 tuần nuôi trồng.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*C. orchoides* Gaertn.). (A) Cây Sâm cau (*C. orchoides* Gaertn.); (B) Chồi nảy mầm từ đỉnh sinh trưởng; (C) Nhân nhanh chồi; (D) Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh; (E) Cây Sâm cau ở vườn ươm.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí để chúng tôi thực hiện và hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.S. Nagesh and C. Shanthamma (2016), "An overview on tissue culture studies of *Curculigo orchoides* Gaertn: an endangered multi-potential medicinal herb", *Journal of Medicinal Plants Studies*, **4**(4), pp.119-123.
- [2] K. Rajagopalan, V.V. Sivarajan, P.R. Varier (1994), "*Curculigo orchoides* Gaertn", *Indian Medicinal Plants*, Orient Longman, Madras, pp.245-248.
- [3] H.A. Prajapathi, S.R. Mehta, R.B. Subramanian (2004), "*In vitro* regeneration in *Curculigo orchoides* Gaertn. - an endangered medicinal herb", *Phytomorphology*, **54**, pp.85-95.
- [4] Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, **tập II**, tr.693.
- [5] Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam, phần II- Thực vật*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.396-397.
- [6] IUCN (2012), *Red List of IUCN*.
- [7] K.M. Kim, M.Y. Kim, P.Y. Yun, T. Chandrasekhar, H.Y. Lee, P.S. Song (2007), "Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.)", *Journal of Plant Biology*, **50**, pp.440-446.
- [8] A. Sharma, V. Kumar, G. Parvatam, G.A. Ravishankar (2008), "Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation", *Electronic Journal of Biotechnology*, **11**(2), pp.1-6.
- [9] B. Dal, Zs. Gerencsér, Zs. Szendrő, C. Mugnai, M. Cullere, S. Ruggeri, S. Mattioli, C. Castellini, A. Dalle Zotte (2014), "Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Thyme* (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display", *Meat Sci.*, **96**(1), pp.114-119.
- [10] Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thị Kim Lý (2014), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan Hải hồng (*Paphiopedilum delenatii*) *in vitro*", *Tạp chí Sinh học*, **36**(1se), tr.250-256.
- [11] A.R. Zuraida, K. Fatin Iyana Izzati, O. Ayu nazreena (2014), "*In vitro* plant propagation for rapid multiplication of *Melicope lunulankenda*: a plant species of high medicinal value", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **5**(1), pp.1148-1156.

Nghiên cứu chế biến nước uống lên men lactic từ củ khoai lang tím Nhật Bản (giống *Murasakimasari*)

Hoàng Thị Lệ Hằng*, Nguyễn Thị Thu Hường

Viện Nghiên cứu Rau quả

Ngày nhận bài 1/11/2018; ngày gửi phản biện 5/11/2018; ngày nhận phản biện 3/12/2018; ngày chấp nhận đăng 6/12/2018

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đưa ra quy trình công nghệ chế biến sản phẩm nước uống lên men lactic. Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học trong quy trình chế biến để tăng hiệu suất và chất lượng sản phẩm, đảm bảo ổn định tối đa hàm lượng các chất dinh dưỡng của nguyên liệu (đặc biệt là hợp chất anthocyanin) tạo ra sản phẩm có chất lượng tốt, đảm bảo an toàn thực phẩm, phù hợp thị hiếu người tiêu dùng. Trên cơ sở khảo sát các công đoạn chính trong quy trình chế biến, bao gồm: ứng dụng enzyme trong khi dịch hóa, đường hóa và khảo sát điều kiện lên men thông qua đánh giá các chỉ tiêu vật lý, hóa sinh và cảm quan của sản phẩm, kết quả nghiên cứu đã xác định được các thông số kỹ thuật công đoạn thủy phân tinh bột khoai lang bằng enzyme glucoamylase 0,15% ở nhiệt độ 60°C, thời gian 1,5 giờ và lên men bằng vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* với tỷ lệ tiếp giống 3% (tương ứng mật độ vi khuẩn lactic là 10⁶ CFU/ml) trong điều kiện nhiệt độ 41±1°C, thời gian lên men là 6 giờ. Từ đó, xây dựng được sơ đồ quy trình công nghệ chế biến nước uống lên men lactic từ củ khoai lang tím.

Từ khóa: anthocyanin, khoai lang tím, nước uống lên men, quy trình chế biến.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Khoai lang tím giống Murasakimasari là loại nông sản hiện đang được trồng nhiều tại Đồng bằng sông Cửu Long, đây là giống khoai vượt trội về năng suất, chất lượng và thời vụ thu hoạch cũng như hiệu quả kinh tế mang lại cho người dân địa phương. Ngoài giá trị cung cấp năng lượng với nhiều loại vitamin A, B, C, E và các chất khoáng K, Ca, Mg, Fe, Se..., giàu chất xơ thực phẩm thì khoai lang tím còn có những ưu điểm vượt trội do chứa một hàm lượng cao các hợp chất có hoạt tính sinh học, bao gồm các hợp chất anthocyanin carotenoid, phenol - là các chất chống oxy hóa có tác dụng ngăn chặn sự phát triển của tế bào ung thư, chống lão hóa [1].

Công nghệ chế biến các sản phẩm từ củ khoai lang nói chung và củ khoai lang tím nói riêng chưa được quan tâm đúng mức. Hiện nay, ngoài mục đích ăn tươi, củ khoai lang mới chỉ được chế biến chủ yếu dưới dạng khoai lang sấy, chiên... Tuy nhiên quy mô còn nhỏ lẻ, người dân chủ yếu sấy bằng than củi, chiên bằng dầu mỡ đã qua sử dụng nên không đảm bảo an toàn thực phẩm. Điều đó đã đặt ra một vấn đề với công tác nghiên cứu là cần đưa ra và hoàn thiện quy trình chế biến một số sản phẩm từ củ khoai lang tím, trong đó có sản phẩm nước uống lên men lactic, tạo ra các sản phẩm có giá trị cao phục vụ nhu cầu trong nước và hướng tới xuất khẩu, đa dạng hóa các sản phẩm

thực phẩm từ khoai lang tím, góp phần giải quyết đầu ra, tạo công ăn việc làm cho người lao động, kích thích ngành trồng trọt phát triển.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: khoai lang tím Nhật Bản (giống Murasakimasari) được trồng tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long, thu hoạch ở độ già 4,5 tháng (kể từ lúc trồng). Nguyên liệu khác: chế phẩm enzyme Glucoamylase 300L, Hãng Novo Nodisk - Đan Mạch; vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus platarum*, *Lactobacillus acidophilus* có mật độ 10¹¹ CFU/ml là chế phẩm thương mại được sản xuất bởi Công ty CHR-Hansen, Đan Mạch.

Thiết bị và địa điểm nghiên cứu: các thiết bị dùng cho nghiên cứu (nồi hấp thanh trùng, lên men...) tại Bộ môn Bảo quản chế biến - Viện Nghiên cứu Rau quả.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp công nghệ: nghiên cứu này tập trung vào hai công đoạn trong quy trình chế biến sản phẩm là thủy phân và lên men, các thí nghiệm được thực hiện như sau:

Nghiên cứu xác định các thông số công nghệ trong quá

*Tác giả liên hệ: Email: hoangthilehang@yahoo.com

Study on processing lacto-fermented drinks from Japanese purple sweet potatoes (*Murasakimasari*)

Thi Le Hang Hoang*, Thi Thu Huong Nguyen

Research Institute of Fruits and Vegetables

Received 1 November 2018; accepted 6 December 2018

Abstract:

This study aims at developing a technology for processing lacto-fermented drinks. The study applied biotechnologies in the processing to enhance production efficiency and quality, stabilising and optimising the nutrition of materials (especially anthocyanins) so that the outputs had good quality, ensured food safety and also appealed to consumers. The main stages in the processing, including the experiment with enzyme hydrolysis of purple sweet potato starch and fermentation conditions, were tested by measuring physical, biochemical and sensory indicators of the products. The study identified appropriate technical specifications for the hydrolysis of purple sweet potato starch with glucoamylase enzyme 0.15% at 60°C and for 1.5 hours. Fermentation conditions: addition of *Lactobacillus bulgaricus* 3%, at 41±1°C and for 6 hours. As the results, a technical flow chart for processing lacto-fermented drinks from purple sweet potatoes was developed.

Keywords: anthocyanin, fermented drinks, processing, purple sweet potato.

Classification number: 4.6

trình thủy phân dịch tinh bột khoai lang tím bằng enzyme glucoamylase: khoai lang tím sau khi sơ chế, định hình được được hấp chín ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 15 phút và nghiền nhuyễn với nước theo tỷ lệ khoai lang/nước là 1/4. Sau đó, tiến hành thủy phân bằng cách bổ sung enzyme glucoamylase ở các chế độ khảo sát với nồng độ 0,05; 0,1; 0,15; 0,2% và thời gian từ 0-3 giờ, bước nhảy 0,5 giờ. Trên cơ sở xác định một số chỉ tiêu chất lượng của dịch thu được, xác định điều kiện xử lý enzyme thích hợp.

Nghiên cứu lựa chọn chủng vi khuẩn lactic phù hợp cho quá trình lên men lactic dịch khoai lang tím: dịch khoai lang tím sau khi thủy phân được phối chế phụ gia, nồng độ cơ chất đạt 16°Bx rồi thanh trùng ở nhiệt độ 85°C trong thời gian 15

phút. Sau đó làm nguội và tiến hành khảo sát khả năng lên men của các chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*, chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* và chế phẩm vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* ở cùng một điều kiện. Kết thúc quá trình lên men, phân tích các chỉ tiêu chất lượng sản phẩm để lựa chọn chủng vi khuẩn thích hợp nhất.

Nghiên cứu xác định các điều kiện lên men lactic thích hợp cho dịch khoai lang tím: sau khi lựa chọn được chủng vi khuẩn thích hợp. Quá trình lên men được tiến hành khảo sát với các yếu tố như sau: tỷ lệ tiếp giống: 1, 2, 3, 4, 5% (so với dịch lên men); nhiệt độ lên men: 37±1, 41±1, 45±1°C; thời gian lên men: từ 0-10 giờ. Trên cơ sở xác định chất lượng của sản phẩm sau thời gian lên men để đưa ra điều kiện lên men thích hợp nhất.

Phương pháp phân tích hóa lý: xác định hàm lượng chất khô hòa tan tổng số theo TCVN 5533:1991. Xác định hàm lượng axit theo TCVN 6509: 2013 (ISO/TS 11869: 2012). Xác định hàm lượng anthocyanin theo phương pháp pH vi sai (AOAC 2005.02). Xác định hàm lượng đường khử theo phương pháp DNS. Mức độ thủy phân (DE) xác định bằng tỷ lệ % lượng đường khử trên tổng lượng tinh bột ban đầu. Xác định độ nhớt bằng máy đo độ nhớt DV-I+ Viscometer. Xác định pH bằng máy đo pH meter cầm tay theo TCVN 6492:1999.

Phương pháp vi sinh vật: kiểm tra tổng số vi khuẩn hiếu khí theo TCVN 4884:2005.

Phương pháp cảm quan: đánh giá chất lượng cảm quan theo phương pháp cho điểm Hedonic thang điểm 1-9 [2].

Phương pháp toán học: số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm SAS 9.0.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Các thông số công nghệ trong quá trình thủy phân tinh bột khoai lang tím bằng enzyme glucoamylase

Nồng độ enzyme glucoamylase: dịch khoai lang tím được bổ sung enzyme glucoamylase với các nồng độ khác nhau. Kết quả xác định một số chỉ tiêu chất lượng chính của dịch thu được sau quá trình thủy phân thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme glucoamylase đến chất lượng dịch khoai lang tím sau khi thủy phân.

Nồng độ enzyme (%)	Độ nhớt (CP)	Hàm lượng đường khử (%)	Hàm lượng TSS (°Bx)	Hàm lượng anthocyanin (mg/100 g)	Mức độ thủy phân (DE)
0,05	38,42 ^a	6,3 ^c	6,4 ^c	7,91 ^b	52,50 ^c
0,1	32,54 ^b	8,7 ^b	9,1 ^b	8,59 ^b	72,50 ^b
0,15	25,50 ^c	11,01 ^a	12,2 ^a	9,88 ^a	91,75 ^a
0,20	24,66 ^c	11,03 ^a	12,3 ^a	9,92 ^a	91,92 ^a

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa α=0,05.

Kết quả cho thấy, sau khi thủy phân, hàm lượng chất khô hòa tan tổng số (TSS), anthocyanin và mức độ thủy phân (DE) tăng tỷ lệ thuận với nồng độ enzyme, nhưng khi tăng nồng độ enzyme trên 0,15% thì mức độ tăng không đáng kể, kết quả các giá trị này ở nồng độ 0,15 và 0,20% không có sự khác biệt. Điều này được giải thích là do khi tăng nồng độ enzyme thì số phân tử enzyme trên một đơn vị diện tích tăng lên, do đó chúng sẽ xúc tác phân cắt được nhiều liên kết glucosid [3], thủy phân tinh bột thành đường, phá vỡ cấu trúc tế bào, giải phóng các chất bên trong, từ đó làm tăng lượng chất khô hòa tan. Khi hàm lượng đường tăng khiến cho giá trị DE tăng, chỉ tiêu này thể hiện rõ nhất ở hiệu suất của quá trình thủy phân, đạt 91,75% khi nồng độ enzyme là 0,15%. Tuy nhiên, khi tăng lượng enzyme trên 0,15% thì hiệu suất thủy phân là 91,92% - gần như không tăng thêm, điều này chứng tỏ với lượng enzyme 0,15% là có thể đủ để xúc tác, phân giải hết toàn bộ cơ chất trong dịch khoai lang tím. Sự biến thiên về độ nhớt cũng diễn ra tương tự nhưng theo chiều hướng ngược lại, khi nồng độ enzyme càng tăng thì độ nhớt càng giảm, tương ứng với sự thủy phân tinh bột càng nhiều.

Từ những nhận xét trên, chúng tôi chọn nồng độ enzyme glucoamylase 0,15% là thích hợp nhất để tiến hành quá trình thủy phân dịch khoai lang tím.

Thời gian xử lý enzyme glucoamylase: kết quả phân tích một số chỉ tiêu chất lượng của dịch khoai lang tím sau quá trình thủy phân ở các khoảng thời gian khác nhau được trình bày ở bảng 2 và 3.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme glucoamylase đến chất lượng dịch khoai lang tím sau khi thủy phân.

Thời gian xử lý (giờ)	Độ nhớt (CP)	Hàm lượng đường khử (%)	Hàm lượng TSS (°Bx)	Hàm lượng anthocyanin (mg/100 g)	Mức độ thủy phân (DE)
0,5	36,42 ^a	6,5 ^c	6,9 ^c	7,98 ^c	54,17 ^c
1,0	30,54 ^b	9,2 ^b	9,6 ^b	8,75 ^b	76,67 ^c
1,5	25,76 ^c	11,04 ^a	12,3 ^a	9,93 ^a	91,93 ^b
2,0	25,07 ^c	11,05 ^a	12,4 ^a	9,98 ^a	92,01 ^a
2,5	24,88 ^c	11,07 ^a	12,4 ^a	9,82 ^a	92,24 ^a
3,0	24,43 ^c	11,06 ^a	12,4 ^a	9,76 ^a	92,36 ^a

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme glucoamylase đến chất lượng cảm quan dịch khoai lang tím sau khi thủy phân.

Chỉ tiêu	Trạng thái	Màu sắc	Hương thơm
Thời gian (giờ)			
0,5	Phân lớp nhẹ	Tím hồng đặc trưng	Thơm đặc trưng
1,0	Phân lớp nhẹ	Tím hồng đặc trưng	Thơm đặc trưng
1,5	Phân lớp nhẹ	Tím hồng đặc trưng	Thơm đặc trưng
2,0	Phân lớp	Tím hồng đặc trưng	Thơm đặc trưng
2,5	Lắng cặn	Tím hồng đặc trưng	Thơm đặc trưng
3,0	Lắng cặn	Tím nhạt	Thơm đặc trưng

Bảng 2 cho thấy, chỉ tiêu TSS, DE (mức độ thủy phân tinh bột thành đường) và anthocyanin có sự biến thiên tỷ lệ thuận với thời gian xử lý. Mức độ tăng của chỉ số DE tương ứng với mức độ tăng của giá trị hàm lượng đường khử tạo ra trong dịch do sự thủy phân ngày càng nhiều các phân tử tinh bột. Đồng thời điều này làm cho độ nhớt của dịch giảm dần theo thời gian xử lý. Các chỉ tiêu đều có sự biến đổi mạnh trong khoảng thời gian xử lý từ 0,5-1,5 giờ, khi thời gian tăng lên sự biến đổi chậm lại và gần như không đáng kể. Điều này là do thời gian càng dài càng làm tăng khả năng tiếp xúc của cơ chất và enzyme, nhưng sau đó do lượng cơ chất không còn nhiều nên sản phẩm thủy phân tăng không đáng kể.

Về chất lượng cảm quan: kết quả bảng 3 cho thấy thời gian xử lý ảnh hưởng đến màu sắc và trạng thái dịch khoai lang. Khi thời gian xử lý kéo dài, màu sắc sản phẩm có chiều hướng sẫm màu hơn, màu tím nhạt dần. Sự biến màu của dịch một phần do hàm lượng anthocyanin giảm, nhưng phần lớn là do quá trình oxy hóa thành phân polyphenol bởi các hệ enzyme polyphenoloxidase có trong dịch. Cũng tương tự, trạng thái của dịch thu được phân lớp nhẹ khi thời gian xử lý ngắn (0,5-1,5 giờ) và bị phân lớp rõ rệt khi tăng thời gian trên 2 giờ. Từ đó, chúng tôi chọn thời gian thủy phân thích hợp là 1,5 giờ để chế biến sản phẩm nước uống lên men lactic.

Lựa chọn chủng vi khuẩn lactic phù hợp cho quá trình lên men dịch khoai lang tím

Kết quả phân tích chất lượng của dịch khoai lang tím sau thời gian lên men được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn lactic khác nhau tới chỉ tiêu cảm quan của dịch khoai lang tím.

Chỉ tiêu	Cấu trúc, màu sắc	Mùi	Vị	Điểm chấp nhận	Thời gian lên men (giờ)
Chủng vi khuẩn					
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dịch không đồng nhất, chia 2 lớp: lớp trên trong màu tím nhạt, lớp dưới lắng cặn màu tím đậm.	Thơm nhẹ	Chua gắt	7,8	8
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Dịch không đồng nhất, chia 3 lớp: lớp trên trong, màu tím; lớp giữa cặn nhỏ màu nâu tím nhạt, lớp cặn màu tím đậm.	Không thơm	Chua gắt	7,5	10
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Dịch đồng nhất, màu tím	Thơm	Chua ngọt hài hòa	8,2	8

Qua kết quả thu được, chúng tôi nhận thấy: tất cả các chủng vi khuẩn khảo sát đều có khả năng lên men rất tốt, tuy nhiên thời gian đạt đến giá trị pH theo yêu cầu (4,1-4,2) có khác nhau giữa các chủng. Chủng *Lactobacillus acidophilus* lên men trong thời gian dài nhất là 10 giờ, hai chủng còn lại lên men trong thời gian 8 giờ.

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, các mẫu sử dụng chủng

vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* và *Lactobacillus acidophilus* bị phân lớp, sản phẩm có vị chua gắt. Đối với mẫu sử dụng chủng vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* cho vị tốt, dịch đồng nhất, điểm chấp nhận sản phẩm cao nhất trong 3 chủng khảo sát. Do vậy, chủng vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* được lựa chọn sử dụng trong quá trình sản xuất nước uống lên men lactic từ khoai lang tím.

Các điều kiện lên men lactic thích hợp cho dịch khoai lang tím

Tỷ lệ tiếp giống thích hợp: kết quả xác định chất lượng của dịch khoai lang tím sau thời gian lên men với các tỷ lệ tiếp giống khác nhau được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến chất lượng sản phẩm lên men.

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Mật độ vi khuẩn lactic (CFU/ml)	Hàm lượng anthocyanin (mg/100 ml)	TSS (°Bx)	Hàm lượng axit lactic (%)	pH
1,0	4,8.10 ^{8d}	5,65 ^a	14,4 ^a	0,098 ^d	4,76 ^a
2,0	9,6.10 ^{8c}	5,64 ^a	14,0 ^a	0,112 ^c	4,57 ^b
3,0	1,4.10 ^{9b}	5,63 ^a	13,6 ^b	0,125 ^b	4,18 ^c
4,0	1,9.10 ^{9b}	5,65 ^a	13,1 ^b	0,130 ^b	4,12 ^c
5,0	2,4.10 ^{9a}	5,66 ^a	12,7 ^c	0,139 ^a	3,78 ^d

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

Kết quả cho thấy, số lượng vi khuẩn *L. bulgaricus* có trong dịch lên men ở các công thức thí nghiệm đều tăng tỷ lệ thuận với tỷ lệ tiếp giống. Ngược lại với sự tăng sinh khối của vi khuẩn thì hàm lượng chất khô hòa tan tổng số có trong dịch lên men lại giảm dần và các mẫu có tỷ lệ tiếp giống càng cao thì mức độ suy giảm càng nhiều. Điều này là do vi khuẩn *L. bulgaricus* sử dụng nguồn cacbon làm nguyên liệu cho quá trình lên men, do đó khi tỷ lệ tiếp giống càng cao thì tốc độ lên men càng lớn, tức là nhu cầu sử dụng nguồn cacbon càng nhiều.

Đồng thời với sự tăng sinh khối vi khuẩn, hàm lượng axit hữu cơ trong dịch lên men cũng tăng dần ở tất cả các công thức thí nghiệm (đây chính là sản phẩm của quá trình lên men). Vi khuẩn lactic sử dụng đường để chuyển hóa thành axit lactic, do vậy hàm lượng axit lactic tạo thành tăng theo nồng độ vi khuẩn [4] (từ 0,098 đến 0,139%). Sau 8 giờ lên men, hàm lượng axit lactic tổng số trong nước khoai lang tím khi tiếp giống với tỷ lệ 3% là 0,125%, 4% là 0,130% và không có sự khác nhau lớn giữa hai công thức này. Ngược lại, giá trị pH của dịch lên men ở các công thức đều giảm tương ứng với sự tăng lên của hàm lượng axit lactic. Sau 8 giờ lên men, giá trị pH của dịch với tỷ lệ tiếp giống 3 và 4% (tương đương với mật độ vi khuẩn ban đầu là 10⁶ CFU/ml) lần lượt là 4,18 và 4,12, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Bảng 6. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến chất lượng cảm quan sản phẩm lên men.

Tỷ lệ tiếp giống (%)	Trạng thái	Hương thơm	Vị	Màu sắc	Trung bình
1,0	8,8	8,1	7,1	8,6	8,2
2,0	8,7	8,3	7,2	8,7	8,2
3,0	8,7	8,5	8,5	8,7	8,6
4,0	8,7	8,3	8,2	8,5	8,4
5,0	8,7	7,7	7,0	7,9	7,8

Kết quả đánh giá cảm quan cho thấy, quá trình lên men tác động nhiều nhất đến vị, hương thơm và màu sắc của sản phẩm (bảng 6). Nước khoai lang tím lên men với tỷ lệ tiếp giống 3% đạt điểm cảm quan trung bình cao nhất sau 8 giờ lên men (điểm 8,6). Từ đó, chúng tôi lựa chọn tỷ lệ tiếp giống vi khuẩn *L. bulgaricus* phù hợp cho quá trình lên men dịch khoai lang tím là 3% để đảm bảo số lượng vi khuẩn *L. bulgaricus* trong nước khoai lang tím lên men lactic đạt trên 10⁸ CFU/ml sau lên men.

Nhiệt độ lên men: kết quả phân tích chất lượng của các mẫu sau thời gian lên men ở các nhiệt độ khác nhau trong thời gian 8 giờ được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến chất lượng sản phẩm lên men.

Nhiệt độ lên men (°C)	Mật độ vi khuẩn lactic (CFU/ml)	Hàm lượng anthocyanin (mg/100 ml)	TSS (°Bx)	Hàm lượng axit TS (%)	pH
37±1	4,7. 10 ^{8c}	5,65 ^a	14,5 ^a	0,117 ^a	4,53 ^a
41±1	1,4. 10 ^{9a}	5,64 ^a	13,7 ^b	0,126 ^a	4,21 ^b
45±1	7,5. 10 ^{8b}	5,60 ^a	13,9 ^b	0,115 ^a	4,39 ^b

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

Bảng 8. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên men đến chất lượng cảm quan sản phẩm lên men.

Nhiệt độ lên men (°C)	Trạng thái	Hương thơm	Vị	Màu sắc	Trung bình
37±1	8,6	8,5	8,2	8,5	8,5
41±1	8,5	8,6	8,7	8,6	8,6
45±1	8,6	8,5	6,7	8,4	8,1

Kết quả cho thấy, về mật độ vi khuẩn, mẫu được lên men ở nhiệt độ 41±1°C có mật độ vi khuẩn cao nhất và có sự khác biệt rõ rệt so với hai mẫu được lên men ở nhiệt độ 45±1°C và 37±1°C (bảng 7). Ngược lại, về giá trị pH và hàm lượng chất khô hòa tan tổng số đạt thấp nhất ở chế độ nhiệt độ 41±1°C. Về giá trị cảm quan, mẫu được lên men ở nhiệt độ 41±1°C cho kết quả đánh giá cảm quan cao nhất (bảng 8). Điều này là do ở các nhiệt độ lên men khác nhau thì vi khuẩn lactic phát triển với tốc độ khác nhau, đồng thời quá trình lên men sinh axit lactic cũng khác nhau, ở nhiệt độ 41±1°C chủng vi khuẩn *L. bulgaricus* phát triển mạnh

nhất, phân giải cơ chất và tạo ra hàm lượng axit lactic cao nhất, lượng axit tạo ra ảnh hưởng trực tiếp đến độ chua ngọt hài hòa của sản phẩm. Khi ở nhiệt độ thấp, vi khuẩn lactic phát triển chậm hơn hoặc khi nhiệt độ cao gây ức chế sự phát triển của nó. Vì vậy, nhiệt độ thích hợp cho sản phẩm nước uống lên men lactic từ dịch khoai lang tím Nhật Bản được chọn là $41 \pm 1^\circ\text{C}$.

Thời gian lên men thích hợp: kết quả phân tích chất lượng của các mẫu sau các khoảng thời gian lên men khác nhau được trình bày ở bảng 9 và 10.

Bảng 9. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến chất lượng sản phẩm.

Thời gian lên men (giờ)	Mật độ vi khuẩn lactic (CFU/ml)	Hàm lượng anthocyanin (mg/100 ml)	TSS ($^\circ\text{Bx}$)	Hàm lượng axit TS (%)	pH
0,0	$7,1 \cdot 10^6$ ^c	5,88 ^a	16,0 ^a	0,021 ^c	6,08 ^a
2,0	$9,3 \cdot 10^7$ ^d	5,83 ^{ab}	14,8 ^b	0,096 ^d	5,03 ^b
4,0	$2,6 \cdot 10^8$ ^c	5,76 ^b	14,3 ^c	0,109 ^c	4,75 ^c
6,0	$1,1 \cdot 10^9$ ^b	5,68 ^c	13,6 ^d	0,123 ^b	4,28 ^d
8,0	$1,4 \cdot 10^9$ ^b	5,65 ^c	13,5 ^d	0,125 ^b	4,20 ^d
10,0	$1,8 \cdot 10^9$ ^a	5,60 ^d	13,3 ^d	0,139 ^a	3,63 ^e

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau ở mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

Bảng 10. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến chất lượng cảm quan của sản phẩm.

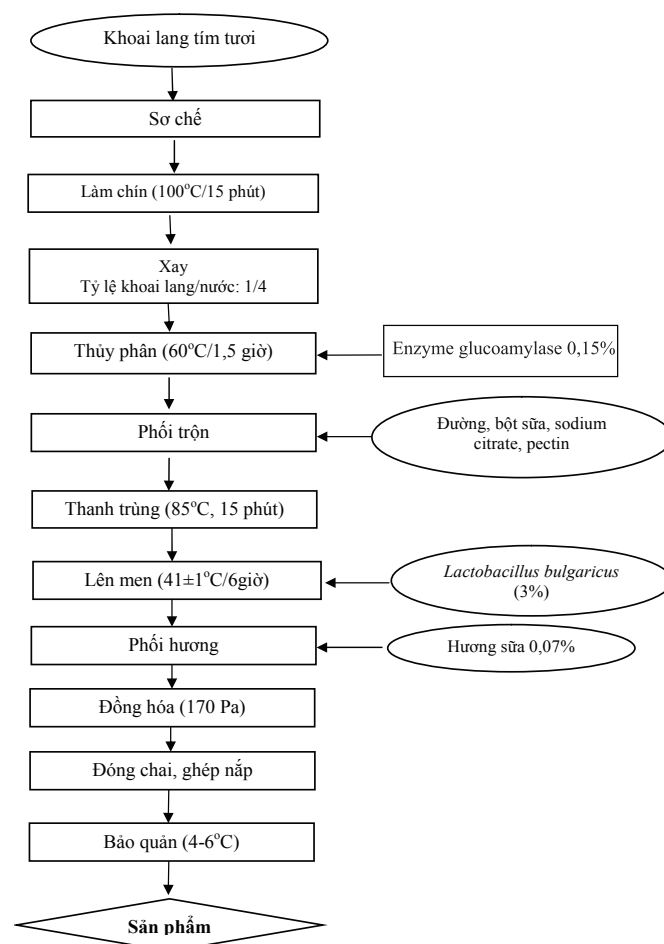
Thời gian lên men (giờ)	Trạng thái	Hương thơm	Vị	Màu sắc	Trung bình
0,0	8,6	7,5	6,7	8,1	7,7
2,0	8,6	7,6	6,9	8,2	7,8
4,0	8,7	8,1	7,1	8,6	8,1
6,0	8,7	8,5	8,9	8,7	8,7
8,0	8,6	8,5	8,7	8,6	8,6
10,0	7,8	7,7	7,0	7,9	7,6

Kết quả bảng 9 và 10 cho thấy, vi khuẩn *L. bulgaricus* trong dịch lên men tăng sinh khối theo thời gian. Số lượng vi khuẩn *L. bulgaricus* tăng lên rất nhanh trong 6 giờ đầu lên men, sau đó có xu hướng tăng chậm lại. Số lượng vi khuẩn *L. bulgaricus* đạt $1,1 \times 10^9$ CFU/ml sau 6 giờ và tăng lên chậm hơn sau 8 và 10 giờ lên men. Ngược lại, thời gian lên men càng dài thì độ pH, hàm lượng TSS càng giảm và tạo ra vị chua gắt khó chịu, ảnh hưởng tới chất lượng cảm quan của sản phẩm. Hàm lượng anthocyanin tuy có giảm dần do tác động của ánh sáng và oxy [5], nhưng mức độ giảm không nhiều. Các mẫu có thời gian lên men từ 6-8 giờ có trạng thái đồng nhất, hương vị tốt nhất và cho điểm cảm quan cao nhất. Khi kéo dài thời gian lên men (10 giờ) thì trạng thái sản phẩm bị thay đổi (có sự tách lớp), mùi vị không hài hòa và cho điểm cảm quan kém hơn. Như vậy, mẫu có thời gian lên men trong 6 giờ có điểm cảm quan được đánh giá là cao nhất, hương vị hài hòa, đạt mật độ tế bào vi khuẩn lactic trên 10^9 CFU/ml. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn thời gian

này cho quá trình lên men.

Kết thúc quá trình lên men, sản phẩm có thể được bổ sung thêm chất gia hương, đồng hóa, đóng chai và bảo quản trong điều kiện lạnh nhiệt độ $4-6^\circ\text{C}$. Sự biến đổi số lượng tế bào vi khuẩn sống trong dịch lên men là yếu tố quan trọng nhất trong thời gian bảo quản sản phẩm. Sự sống của vi khuẩn lactic phụ thuộc vào sự có mặt của oxy trong sản phẩm, chất lượng của bao bì bảo quản, thời gian lên men và nhiệt độ tồn trữ, đồng thời còn phụ thuộc vào các chất ức chế như hàm lượng axit được tạo ra trong thời gian bảo quản [6]. Số lượng vi khuẩn theo dõi sau 30 ngày bảo quản vẫn đảm bảo đạt yêu cầu với số lượng trên 10^8 CFU/ml.

Tổng hợp các kết quả trên, chúng tôi đề xuất quy trình công nghệ chế biến sản phẩm nước uống lên men lactic từ khoai lang tím như hình 1.



Hình 1. Sơ đồ quy trình công nghệ chế biến nước uống lên men lactic từ khoai lang tím.

Thuyết minh quy trình:

➤ **Yêu cầu nguyên liệu:** củ khoai lang tím phải đạt chuẩn chất lượng (giá trị dinh dưỡng, giá trị cảm quan) cho mục đích chế biến. Khoai thường được thu hoạch ở độ già 4,5 tháng (kể

từ thời gian bắt đầu trồng). Hàm lượng tinh bột, đường đạt tối đa tương ứng 24,34 và 5,05%.

➤ **Sơ chế:** khoai lang tím được lựa chọn, loại bỏ những củ bị hư hỏng, phần dập nát..., rồi tiến hành rửa sạch, gọt vỏ, thái lát theo chiều ngang củ với chiều dày khoảng 40 mm.

➤ **Làm chín:** khoai lang tím tươi được tiến hành làm chín bằng phương pháp hấp ở nhiệt độ 100°C trong thời gian 15 phút. Yêu cầu các lát khoai sau khi làm chín ít bị gãy nát, có độ chín đồng đều và có màu tím thẫm.

➤ **Xay:** sau khi làm chín, nguyên liệu được nghiền nhỏ, sau đó bột khoai lang tím được phối trộn với nước theo tỷ lệ khoai lang/nước: 1/4.

➤ **Thủy phân:** mục đích để thủy phân tinh bột tạo ra đường glucose. Sử dụng chế phẩm enzyme glucoamylase với nồng độ 0,15% và tiến hành ở nhiệt độ 60°C trong 1,5 giờ.

➤ **Phối trộn:** với mục đích tạo cho sản phẩm có hương vị hấp dẫn và tạo điều kiện cho quá trình lên men. Tiến hành bổ sung các chất điều vị và phụ gia như sau: bột sữa 3%, sodium citrate 0,15%, hương sữa 0,07%, pectin 0,05% và đường cho tới khi hàm lượng chất khô hòa tan tổng số của dịch đạt 16°Bx.

➤ **Thanh trùng:** mục đích tiêu diệt vi sinh vật bị nhiễm tạp trong quá trình chế biến, tránh các hư hỏng không mong muốn. Dịch sau khi phối trộn được gia nhiệt đến 85°C và giữ trong 15 phút. Sau đó được làm nguội đến nhiệt độ lên men 41±1°C.

➤ **Lên men:** mục đích của quá trình lên men là tạo điều kiện cho các vi khuẩn có ích phát triển, sản sinh axit lactic làm tăng giá trị dinh dưỡng và tăng giá trị cảm quan.

➤ **Cấy giống:** chế phẩm vi khuẩn lactic *Lactobacillus bulgaricus* thuần khiết với tỷ lệ 3%. Tiến hành lên men ở nhiệt độ 41±1°C trong thời gian 6 giờ.

➤ **Đồng hóa:** sản phẩm được đồng hóa ở áp suất 170 Pa nhằm góp phần ổn định trạng thái cho sản phẩm.

➤ **Đóng bao bì:** sản phẩm được đóng trong bao bì PC 100

ml hoặc chai HDPE 100 ml và dán kín.

➤ **Sản phẩm:** đồ uống lên men lactic từ khoai lang tím Nhật Bản được bảo quản ở nhiệt độ 4-6°C với thời hạn sử dụng 30 ngày.

Kết luận

Quá trình nghiên cứu đã xác định được thông số công nghệ các công đoạn chính là thủy phân tinh bột khoai lang bằng enzyme glucoamylase 0,15% ở nhiệt độ 60°C, thời gian 1,5 giờ và lên men bằng vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus* với tỷ lệ tiếp giống 3% (tương ứng mật độ vi khuẩn lactic là 10⁶ CFU/ml) trong điều kiện nhiệt độ 41±1°C, thời gian lên men là 6 giờ cho nước uống lên men lactic đạt chất lượng yêu cầu. Từ đó, thiết lập được sơ đồ quy trình công nghệ chế biến nước uống lên men lactic từ khoai lang tím đạt chỉ tiêu chất lượng, đảm bảo an toàn thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Ikuro, O. Tomoyuki, M. Mami, K. Mio, N. Yoichi, F. Shu (2003), "Physiological functionality of purple-fleshed sweet potatoes containing anthocyanin and their utilization in foods", *JARQ*, **37(3)**, pp.25-28.
- [2] Hà Duyên Tư (2010), *Kỹ thuật phân tích cảm quan thực phẩm*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [3] Đỗ Thị Xuân Hương (1996), *Nghiên cứu ảnh hưởng của biến thiên hoạt độ enzym amylase đến hàm lượng đường trong củ khoai lang khi bảo quản và chế biến*, Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.
- [4] Nguyễn Đức Lượng (2002), *Công nghệ vi sinh, tập I*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh.
- [5] Thái Thị Ánh Ngọc (2011), *Nghiên cứu thành phần của chất màu anthocyanin chiết từ khoai lang tím*, Luận văn thạc sỹ, Đại học Đà Nẵng.
- [6] K.Y. Yoon, E.E. Woodams, and Y.D. Hang (2004), "Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria", *J. Microbiol.*, **42(4)**, pp.315-318.

Tổng mục lục

TT	Tác giả	Tên bài	Số	Số trang
Khoa học tự nhiên				
1	Vũ Văn Khải, Nguyễn Huy Sinh...	Nghiên cứu sự thay đổi tính chất từ trong hệ hợp chất $\text{La}_{2/3}\text{Pb}_{1/3}\text{MnO}_3$ khi thay thế Co cho Mn.	1	1
2	Nguyễn Minh Thảo, Nguyễn Hoàng Khang...	Nghiên cứu cấu trúc electron của cluster SeSi_4^{-0} bằng phương pháp đa cấu hình CASSCF/CASPT2.	1	6
3	Nguyễn Thị Đông, Trần Trung...	Ứng dụng phương pháp SDS-PAGE trong nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng SDS đến khả năng chiết protein trong gạo.	1	14
4	Nguyễn Hữu Trọng, Lê Tiến Dũng...	Tuổi U-Pb zircon LA-ICP-MS và thành phần đồng vị Hf trong andesit khu vực đèo Rù Rì - Nha Trang và ý nghĩa địa chất.	3	1
5	Vũ Văn Ngọc, Trương Văn Bốn	Nghiên cứu, đánh giá khả năng ngập lụt vùng cửa sông ven biển tỉnh Quảng Ngãi do siêu bão.	3	7
6	Nguyễn Xuân Đồng	Cấu trúc tuổi và sự phát triển của cá phen trắng - <i>Polynemus dubius</i> Bleeker, 1851 (Polynemidae) ở hạ lưu hệ thống sông Sài Gòn - Đồng Nai.	3	11
7	Nguyễn Hùng Minh, Nguyễn Thị Minh Huệ...	Tích lũy sinh học của Dioxin/Furan trong sữa mẹ tại các khu vực gần sân bay quân sự Biên Hòa.	3	17
8	Nguyễn Thị Hồng Thắm, Tiêu Tư Doanh...	Hiệu ứng phối hợp ống nano các bon và graphite trong tính chất nhiệt của tấm dán tản nhiệt Bucky.	3	23
9	Phạm Ngọc Hoa, Nguyễn Xuân Lai	Vấn đề nhận giá trị và duy nhất của toán tử sai phân và tích sai phân đối với hàm phân hình trên một trường không Archimedes.	6	1
10	Hoàng Thu Trang, Ngô Quang Minh	Nghiên cứu bộ lọc quang học bậc cao dựa trên sự ghép nối tiếp của nhiều cộng hưởng qua khe dẫn sóng hẹp trong cấu trúc tinh thể quang tử hai chiều.	6	5
11	Bùi Doãn Cường, Chu Xuân Huy...	Phân tích quỹ đạo hoạt động để đánh giá khả năng phối hợp chụp ảnh của các hệ thống vệ tinh nhỏ, thử nghiệm với vệ tinh VNREDSat-1 và BKA.	6	9
12	Nguyễn Minh Thảo, Trần Thanh Tuấn...	Nghiên cứu trạng thái electron của các cluster VGe_n^{-0} ($n = 1-2$) bằng phương pháp CASSCF/CASPT2.	6	14
13	Nguyễn Ái Thạch	Sự thay đổi của một số thành phần hóa học và hợp chất có hoạt tính sinh học trong tép tòi (<i>Allium sativum</i> L.) trong quá trình tồn trữ.	6	20
14	Cao Đình Trọng, Thái Anh Tuấn...	Biểu hiện hoạt động động đất kích thích tại một số hồ thủy điện ở Việt Nam.	6	25
15	Trần Hoàng Dũng, Huỳnh Văn Hiếu...	Phân lập các chủng vi sinh vật có khả năng phân giải cellulose mạnh phục vụ sản xuất chế phẩm phân hủy rơm rạ.	6	32
16	Lê Cao Chiến, Nguyễn Thị Tâm...	Nghiên cứu đánh giá khả năng khí hóa chất thải rắn sinh hoạt làm nhiên liệu thay thế.	6	37
17	Trần Thanh Trâm, Võ Đình Bảy	Gom nhóm văn bản dựa trên mẫu hữu ích được đánh trọng phổ biến.	8	1
18	Trần Duy Tập	Nghiên cứu cấu trúc của màng điện cực polymer sử dụng cho pin nhiên liệu bằng phương pháp tán xạ tia X góc nhỏ và siêu nhỏ.	8	8
19	Bùi Văn Thắng, Lê Thanh Châu	Điều chế chất xúc tác hệ Fenton dị thể La/Fe-Bentonite ứng dụng xử lý ô nhiễm congô trong nước.	8	12
20	Nguyễn Thu Hương, Trần Thị Thúy Hà...	Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng phân giải phosphate khó tan từ đất vùng rễ lúa ở tỉnh Hải Dương.	8	18
21	Nguyễn Xuân Nghĩa, Nguyễn Xuân Đăng...	Hiện trạng quần thể Khỉ mặt đỏ (<i>Macaca arctoides</i>), Khỉ vàng (<i>Macaca mulatta</i>) và Khỉ mốc (<i>Macaca asamensis</i>) ở Khu bảo tồn thiên nhiên Xuân Liên, Thanh Hóa.	8	23
22	Lại Tuấn Anh, Nguyễn Ngọc Thạch...	Xây dựng hệ thống cảnh báo sớm lũ quét ở vùng núi, thử nghiệm tại huyện Thuận Châu, Sơn La.	8	28
23	Lương Văn Thanh, Phạm Văn Tùng	Nguyên nhân suy thoái giếng khoan khu vực có thành tạo bờ rời vùng ĐBSCL và giải pháp phục hồi nâng cao hiệu suất giếng khoan.	8	36
24	Từ Hoàn Phúc, Lê Ngọc Diệp...	Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến cấu trúc CeO_2 dạng bông hoa chế tạo bằng phương pháp thủy nhiệt.	10	1
25	Phạm Hòa Bình, Đoàn Văn Cánh...	Nghiên cứu xác định sự bổ cấp từ nước sông Hồng cho tầng chứa nước Pleistocen khu vực phía nam Hà Nội.	10	7
26	Trần Thị Trinh, Trần Thị Huế...	Khảo sát một số đặc tính sinh học của chủng xạ khuẩn biển có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh.	10	13
27	Lê Văn Thọ, Phan Doãn Đăng...	Thành phần loài và phân bố của động vật không xương sống cỡ lớn ven bờ ở Khu bảo tồn đất ngập nước Láng Sen.	10	18
28	Lê Đức Minh, Nguyễn Quảng Trường...	Phân bố địa lý của họ Tắc kè Gekkonidae ở miền Bắc Việt Nam: Vai trò của sông Hồng là biên giới tự nhiên.	10	23
29	Nguyễn Quỳnh Hương, Nguyễn Xuân Cự...	Một số giải pháp về quy hoạch sử dụng đất và phát triển trồng cỏ làm thức ăn xanh cho trâu bò ở tỉnh Hà Giang.	10	29
Khoa học kỹ thuật và công nghệ				
30	Lê Xuân Sanh, Trần Vũ Kiên	Nghiên cứu thiết kế hệ thống giám sát - điều khiển từ xa cho lưới phân phối điện hạ áp.	1	19
31	Bùi Mạnh Cường, Nguyễn Văn Dương	Đánh giá khả năng tăng tuổi thọ môi của kết cấu hàn khi được xử lý bằng phương pháp rung khử ứng suất dư.	1	25
32	Cao Ngọc Đầu, Nguyễn Anh...	Nghiên cứu, thiết kế và chế tạo máy tuyến than huyền phù kiểu bánh xe đứng.	1	30

33	Đặng Việt Hà	Nghiên cứu phương pháp xác định hệ số cân giảm chấn ô tô.	1	36
34	Lê Minh Tân, Võ Hữu Thảo	Nghiên cứu chế tạo và khảo sát các tính chất của blend EPDM/ENR50 liên kết ngang bằng nhựa phenolic.	1	40
35	Trần Văn Đăng, Trần Đồng	Phân tích thực nghiệm và mô hình số ứng xử cơ học của dầm gỗ liên hợp hiện đại.	1	45
36	Nguyễn Thị My, Nguyễn Thúy Hiền	Kết quả thử nghiệm hiệu lực của bã KIBAMID 7.5RB diệt kiến lửa (<i>Solenopsis geminata</i>) và kiến vàng nhỏ (<i>Monomorium pharaonis</i>).	1	51
37	Đào Thùy Dương, Lê Tất Khương...	Ảnh hưởng của công nghệ bảo quản CAS (cells alive system) đến chất lượng thịt gà đen.	1	55
38	Nguyễn Duy Hạng, Nguyễn Tấn Mân...	Nghiên cứu hiệu ứng của chế phẩm nano bạc tạo bằng phương pháp chiếu xạ gamma phối trộn với kẽm-EDTA lên nấm <i>Puccinia spp.</i> gây bệnh gỉ sắt ở cây hoa cúc.	1	60
39	Nguyễn Trung Hiếu, Lý Trần Cường	Nghiên cứu thực nghiệm hiệu quả gia cường dầm bê tông cốt thép chịu xoắn bằng vật liệu tấm sợi các bon CFRP.	3	29
40	Lê Phước Lành, Chu Tiến Dũng...	Nghiên cứu hệ số chuyển đổi vận tốc xung siêu âm theo phương pháp đo góc về phương pháp đo xuyên.	3	36
41	Trần Minh Quỳnh, Nguyễn Văn Bính...	Nghiên cứu tạo xanthan khối lượng phân tử thấp bằng phương pháp chiếu xạ.	3	41
42	Tường Thị Nguyệt Ánh, Trần Hùng Thuận...	Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và tốc độ dòng khí đến tính chất lớp phủ nhựa PA11 bảo vệ kim loại chế tạo bằng phương pháp tăng sôi.	3	45
43	Nguyễn Hữu Quang, Lê Văn Sơn...	Ứng dụng kỹ thuật đánh dấu khảo sát dòng rò thấm qua thân đập đất.	3	50
44	Nguyễn Kế Tường, Nguyễn Quang Phích	Nghiên cứu đề xuất mô hình dự báo thời điểm có thể xảy ra tai biến địa chất trong thi công xây dựng công trình ngầm.	3	58
45	Nguyễn Thị Thu Huyền	Ứng dụng ảnh viễn thám kết hợp mô hình thủy văn trong nghiên cứu dòng chảy lũ lưu vực sông Vệ tỉnh Quảng Ngãi.	6	44
46	Nguyễn Vũ Việt, Nguyễn Huy Vượng...	Giải pháp lưu giữ và khai thác nước trong một số thành tạo bờ rời khu vực Tây Nguyên.	6	50
47	Lê Văn Đạt, Nguyễn Ngọc Linh...	Đánh giá mức tiêu thụ năng lượng riêng cho băng tải mô hình lò có một cụm dẫn động sử dụng hộp giảm tốc bánh răng côn trụ.	6	55
48	Lê Thị Xuân Thủy, Lê Thị Sương...	Đánh giá khả năng xử lý ion Ni ²⁺ trong nước bằng đá nhân tạo.	6	59
49	Nguyễn Thị Hồng Hà, Trần Thị Mai...	Nghiên cứu chuyển hóa gellan thành gellan khử acyl.	6	64
50	Đỗ Tấn Khang, Trần Nhân Dũng...	Khả năng chống oxy hóa của phân đoạn dịch chiết từ gạo mầm và gạo lức.	6	70
51	Nguyễn Văn Sỹ	Nghiên cứu sử dụng PIN photodiode đo phóng xạ gamma liều cao.	8	43
52	Lê Viết Hải, Nguyễn Thị Trúc Quyên...	Tổng hợp vật liệu khung hữu cơ kim loại Zr-AzBDC và khảo sát hoạt tính xúc tác điện hoá cho phản ứng khử CO ₂ trong dung dịch nước.	8	46
53	Phạm Thị Thủy Triều, Bùi Thị Hằng	Tổng hợp Fe ₂ O ₃ bằng phương pháp sol-gel ứng dụng cho pin sắt - khí.	8	50
54	Võ Thị Thúy Huệ, Trần Thị Quỳnh Diệp...	Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn axit lactic và vi khuẩn axit acetic tham gia vào quá trình lên men hạt ca cao.	8	55
55	Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Thị Ngọc Mi...	Khảo sát hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của dịch trái giác (<i>Cayratia trifolia</i>) trước và sau lên men sử dụng nấm men chịu nhiệt <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HG1.3.	8	60
56	Nguyễn Thanh Đàm, Vũ Minh Tuấn...	Ứng dụng phương pháp điện di mao quản trong kiểm soát chất lượng thực phẩm bổ sung amino axit mạch nhánh.	10	34
57	Lê Viết Hải, Trần Quang Bình...	Kết hợp Ag vào vật liệu khung hữu cơ kim loại Zr-CPEB nhằm gia tăng hoạt tính xúc tác điện cho phản ứng sinh khí hydro.	10	41
58	Phạm Thị Thúy, Nguyễn Quốc Hưng...	Nghiên cứu tổng hợp vật liệu trao đổi ion từ nhựa thải bằng phản ứng sulfo hóa dạng đồng thể, ứng dụng loại bỏ Cr ³⁺ trong môi trường nước.	10	46
59	Trần Thị Huyền Nga, Đặng Thị Thanh Huyền...	Nghiên cứu chế tạo vật liệu mang vi sinh vật dạng chuyển động từ đá thủy tinh ứng dụng trong hệ bùn hoạt tính để xử lý nước thải sinh hoạt.	10	50
60	Chu Xuân Quang, Nguyễn Thu Trang...	Khảo sát một số điều kiện chế tạo màng lọc polyme sợi rỗng bằng phương pháp đông tụ đảo pha.	10	54
61	Phạm Việt Đức, Lê Đức...	Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố tới quá trình xử lý 2,4-D và 2,4,5-T trong dung dịch bằng Fe ^o nano.	10	58
62	Nguyễn Thúy Hiền, Trần Thị Thu Huyền...	Nghiên cứu cải tiến bã gián dạng gel Cobamid 7.5RB để tăng tính bền trong điều kiện thường.	10	63
63	Phan Thanh Tâm	Đánh giá sự biến đổi chất lượng của sản phẩm thịt lợn mát và thịt lợn ăm trong thời gian bảo quản.	10	67
Khoa học y - dược				
64	Nguyễn Văn Hiếu, Lê Văn Quảng...	Đánh giá kết quả hóa xạ trị tiền phẫu trong ung thư trực tràng giai đoạn xâm lấn.	2	1
65	Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Hồng Hà	Ứng dụng nội soi trong phẫu thuật bóc tách lấy cơ lưng rộng trong tạo hình ngực.	2	5
66	Nguyễn Đức Minh	Đánh giá tác dụng giảm đau của phương pháp từ trường kết hợp với điện châm điều trị bệnh thoái hóa cột sống thắt lưng.	2	8
67	Hồ Viết Hiếu, Lê Thành Đô...	Dịch tễ bệnh Chagas và tình hình nghiên cứu bọ xít hút máu <i>Triatoma rubrofasciata</i> (De Geer, 1773) ở Việt Nam.	2	13
68	Trần Thị Thúy Oanh, Phạm Đình Duy	Xây dựng công thức nhũ tương tạo bọt chứa dầu mè đen (<i>Sesamum indicum</i> L.), cao chiết Cỏ mực (<i>Eclipta prostrata</i> (L.) L.) và cao chiết Hồng hoa (<i>Carthamus tinctorius</i> L.).	2	21
69	Phạm Quang Tuyến, Nguyễn Minh Đức...	Đánh giá đa dạng di truyền một số mẫu giống sâm thu thập tại Lai Châu.	2	27
70	Phạm Văn Minh, Vũ Thị Duyên Trang	Đánh giá hiệu quả vận động trị liệu kết hợp vật lý trị liệu trong điều trị bệnh nhân viêm khớp vai thể đơn thuần.	5	1
71	Nguyễn Kim Thạch, Liêu Mỹ Đông...	Nghiên cứu tạo hệ phân phối thuốc hướng đích chủ động chitosan-mixen-paclitaxel-aptamer ứng dụng điều trị ung thư.	5	5
72	Nguyễn Cửu Khoa, Nguyễn Đại Hải	Nghiên cứu tổng hợp thuốc generic letrozole quy mô 100 g/mẻ đạt tiêu chuẩn dược điển USP38.	5	12

73	Trần Thị Ngọc Mai, Trần Công Luận	Phân tích vi học và thành phần hoá học của lan một lá <i>Nervilia aragoana</i> Gaudich - họ lan Orchidaceae thu hái ở Kon Tum.	5	17
74	Bùi Thị Ngọc Phượng, Nguyễn Lê Trang Anh...	Phương pháp đo các đặc tính quang học của mẫu y sinh học bằng hệ thống phân cực ánh sáng trong chẩn đoán và theo dõi bệnh tiểu đường.	5	22
75	Lê Thị Luyến, Trịnh Thị Hiền...	Nghiên cứu một số đặc điểm của vi khuẩn lao ở bệnh nhân lao phổi mới và lao phổi tái trị được chỉ định điều trị bằng thuốc chống lao hàng mới.	7	1
76	Nguyễn Thị Mai Hương, Nguyễn Phạm Anh Hoa...	Áp dụng phương pháp sinh học phân tử trong phát hiện sớm người mắc bệnh Wilson chưa có triệu chứng lâm sàng và mang gen bệnh.	7	6
77	Nguyễn Văn Huy, Nguyễn Văn Dân...	Khảo sát sự thay đổi tần số tim và huyết áp sau nhĩ áp huyết Tâm tai trái và phải trên người bình thường khi thực hiện nghiệm pháp kích thích thụ thể lạnh.	7	12
78	Triệu Tiến Sang, Trần Anh Đức...	Nghiên cứu xây dựng quy trình đánh giá mức độ đứt gãy ADN tinh trùng.	7	17
79	Đỗ Thị Thanh Trung, Phạm Thị Vui...	Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn <i>Helicobacter pylori</i> của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam.	7	23
80	Lương Hiền Minh, Huỳnh Thanh Trang...	Nghiên cứu khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện <i>in vitro</i> .	7	28
81	Ngô Mạnh Tiến, Nguyễn Thị Vân Anh...	Phát hiện đột biến gen BTK trên các bệnh nhân chẩn đoán bệnh không gammaglobulin máu liên kết nhiễm sắc thể giới tính X (XLA).	9	1
82	Triệu Tiến Sang, Vũ Hương Ly...	Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn gây nhiễm khuẩn âm đạo bằng phương pháp Multiplex PCR.	9	5
83	Trần Lê Tuyết Châu, Phạm Bảo Ngọc...	Điều chế hệ vi tự nhũ để cải thiện tính kém bền của schaftosid trong cao kim tiền thảo toàn phần.	9	10
84	Nông Thị Anh Thư, Nguyễn Trọng Thông...	Tác dụng chống viêm cấp và mạn tính của cao chiết từ phần trên mặt đất cây Mũi mác.	9	15
85	Tôn Nữ Thị Như Quỳnh, Trương Thị Đẹp...	Đa dạng nguồn tài nguyên cây thuốc ở Khu bảo tồn thiên nhiên Sơn Trà, TP Đà Nẵng.	9	20
86	Nguyễn Thị Trang, Trần Thị Hồng Nhung...	Thẩm định độ chính xác của bộ xét nghiệm tự pha để định lượng fructose trong tinh dịch phục vụ chẩn đoán vô sinh nam.	12	1
87	Nguyễn Ngọc Bảo Huy, Quan Quốc Đăng...	Xây dựng quy trình phát hiện đồng thời <i>Plasmodium falciparum</i> và <i>Plasmodium vivax</i> dựa trên kỹ thuật recombinase polymerase amplification.	12	7
88	Vũ Thị Thu Hiền, Phạm Duy Thái...	Đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của các chủng <i>Pseudomonas aeruginosa</i> phân lập tại Bệnh viện Việt Đức.	12	14
89	Nguyễn Hữu Vĩnh Trung, Nguyễn Thiện Hải...	Bảo chế và đánh giá động học phóng thích viên nén metformin hydroclorid 750 mg phóng thích kéo dài với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước.	12	19
90	Ngô Tiến Thịnh, Vũ Anh...	Điều chế SMEDDS chứa cao diệp cá toàn phần và khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ.	12	25
91	Phùng Công Thương, Nguyễn Văn Bắc...	Phân loại 2 chủng vi nấm phân lập tại Viện 69 và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của chúng.	12	30
Khoa học nông nghiệp				
92	Phạm Thị Mỹ Phương, Đoàn Văn Tú...	Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng cadimi và chì trong đất đến khả năng sinh trưởng và hấp thu các kim loại này của cây cỏ mần trầu (<i>Eleusine indica</i> L.).	2	32
93	Nguyễn Khánh Vân, Quân Xuân Hữu...	Tạo phôi bò nhân bản không có zona pellucida.	2	36
94	Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan...	Sự lưu hành và đặc tính di truyền của virus cúm gia cầm A/H5N6 tại một số tỉnh biên giới phía Bắc Việt Nam.	2	43
95	Nguyễn Quang Dương Nguyên, Nguyễn Phú Hòa	Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ N/P và độ mặn đến sự phát triển của vi khuẩn lam (<i>cyanobacteria</i>).	2	49
96	Dương Thị Nguyên, Trịnh Xuân Hoat	Phát hiện và giám định nhanh vi khuẩn <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> gây bệnh vi khuẩn tàn lụi sắn bằng kỹ thuật PCR.	2	53
97	Dương Xuân Tú, Phạm Thiên Thành...	Ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống lúa thơm kháng bệnh bạc lá cho các tỉnh phía Bắc.	2	59
98	Phạm Thị Thu, Lê Văn Vê...	Công nghệ nhân giống dịch thể, ứng dụng trong nuôi trồng nấm sò vàng (<i>Pleurotus citrinipileatus</i>).	5	27
99	Nguyễn Thị Thanh Mai, Chu Đức Hà...	Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn phân giải lân, kali khó tan từ đất trồng cà phê tại khu vực Tây Nguyên.	5	34
100	Đoàn Phạm Ngọc Ngà, Hà Thị Ngọc Trinh...	Nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng vi khuẩn nội sinh đến cây cao su - <i>Hevea brasiliensis</i> giai đoạn vườn ươm.	5	39
101	Trịnh Hồng Sơn, Lê Văn Sáng	Hệ số di truyền và giá trị giống ước tính về tăng khối lượng, độ dày mỡ lưng, độ dày cơ thân và tỷ lệ nạc của lợn đực Landrace có nguồn gốc từ Pháp và Mỹ.	5	43
102	Nguyễn Thị Bích Vân, Nguyễn Phú Hòa	Khảo sát hiện trạng kỹ thuật nuôi và sự tích lũy carbon hữu cơ, nitrogen và phosphorus trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh tại tỉnh Bạc Liêu.	5	49
103	Trần Thị Triều Hà, Lê Thị Thu Hằng...	Nghiên cứu khả năng nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh của chồi Vanilla (<i>Vanilla planifolia</i> Andr.) <i>in vitro</i> .	5	56
104	Nguyễn Thị Lài, Phạm Hương Sơn...	Nghiên cứu nhân giống lan Hoàng thảo Nghệ tâm (<i>Dendrobium loddigesii</i> Rolfe) bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào.	5	60
105	Nguyễn Thị Bích Vân, Võ Công Thành	Nghiên cứu sự thích ứng của 4 giống/dòng lúa (<i>Oryza sativa</i> L.) trong điều kiện khô hạn nhân tạo giai đoạn sinh dưỡng.	7	32
106	Nguyễn Duy Hạng, Nguyễn Trọng Hoàng Phong...	Ảnh hưởng của chitosan chiếu xạ kết hợp nấm <i>Trichoderma</i> tới bệnh chết héo <i>Phytophthora</i> spp. trên cây dâu tây.	7	38
107	Vũ Văn Long, Nguyễn Hoàng Kim Nương...	Đánh giá khả năng cung cấp lân của đất áp dụng phương pháp khuếch tán qua màng trên một số vùng đất canh tác lúa tại ĐBSCL.	7	42
108	Trương Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Thị Nguyễn...	Nghiên cứu khả năng diệt một số loài vi khuẩn và nấm của lá hẹ (<i>Allium tuberosum</i>).	7	48
109	Bùi Anh Tuấn, Nguyễn Đức Hiếu...	Phân tích đa dạng di truyền hệ gen ty thể và nguồn gốc tiến hóa của sáu giống lợn bản địa Việt Nam.	7	53

110	Vương Huy Minh, Ngô Thị Thùy Linh...	Chọn tạo các dòng ngô kháng bệnh mốc hồng bằng chỉ thị phân tử SSR.	7	60
111	Trần Đức Trung, Tạ Hồng Lĩnh...	Đánh giá tính kháng bệnh đạo ôn của một số mẫu giống lúa nhập nội từ Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế (IRRI) tại Việt Nam.	9	25
112	Nguyễn Quý Khiêm, Nguyễn Ngọc Dung...	Khả năng sản xuất của vịt Star 53 ông bà nhập nội.	9	31
113	Cù Thị Thiên Thu, Vũ Thị Ngân...	Ảnh hưởng của việc bổ sung bột bã nghệ sau tách chiết curcumin trong khẩu phần tới sức sản xuất thịt và độ vàng da của gà thịt JA-DABACO.	9	36
114	Lê Đình Khả, Nguyễn Thị Thanh Hương...	Một số giống Tràm trà giàu Terpinen-4-ol có triển vọng trên một số lập địa tại miền Bắc Việt Nam.	9	42
115	Trương Thị Mỹ Hạnh, Phạm Thị YẾN...	Hiện trạng nhiễm ký sinh trùng ở cá chim vây vàng (<i>Trachinotus</i> spp) nuôi lồng tại Hải Phòng.	9	48
116	Hoàng Thị Mỹ Hương, Trần Thị Kim Nhung...	Hiện trạng nuôi tôm hùm lồng bè tập trung và chất lượng môi trường nước tại vịnh Xuân Đài, tỉnh Phú Yên.	9	53
117	Lưu Hàn Ly, Lê Thị Thu Hiền...	Nghiên cứu chuyển gen mã hóa mannitol 1-phosphate dehydrogenase (mtID) vào cây ngô.	9	59
118	Nguyễn Thị Lại, Vũ Mạnh Hải...	Nghiên cứu nuôi trồng lan Hoàng thảo Nghệ tâm (<i>Dendrobium loddigesii</i> Rolfe) ở giai đoạn vườn ươm.	12	36
119	Đoàn Thị Bắc, Lê Tất Khương...	Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lạnh bằng công nghệ Hyokan đến chất lượng quả cam.	12	40
120	Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền...	Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nhân giống <i>Spirulina platensis</i> nước lợ phục vụ sản xuất sinh khối tại tỉnh Thanh Hóa.	12	45
121	Nguyễn Thị Lại, Phạm Hương Sơn...	Nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> cây Sâm cau (<i>Curculigo orchioides</i> Gaertn.) từ nuôi cấy dinh sinh trưởng.	12	50
122	Hoàng Thị Lê Hằng, Nguyễn Thị Thu Hương	Nghiên cứu chế biến nước uống lên men lactic từ củ khoai lang tím Nhật Bản (giống <i>Murasakimasari</i>).	12	55
Khoa học xã hội và nhân văn				
123	Trần Văn Công, Nguyễn Thị Hoài Phương	Mối quan hệ giữa chất lượng tinh bột và bắt nạt trực tuyến ở học sinh trung học phổ thông trên địa bàn Hà Nội.	4	1
124	Tô Ngọc Hưng, Nguyễn Đức Trung	Phân tích các yếu tố tác động đến quy mô vay vốn của hộ gia đình khu vực nông thôn mới.	4	6
125	Đỗ Thị Năng, Nguyễn Thị Hồng	Sự tham gia liên kết của hộ nông dân trong chuỗi giá trị nho Ninh Thuận.	4	13
126	Nguyễn Thị Minh Hòa, Nguyễn Phú Bảo	Đánh giá tác động của BDKH đến tổn thương sinh kế người dân TP Hồ Chí Minh.	4	19
127	Đào Ngọc Báu	Phân tích kinh tế học pháp luật đối với hành vi kỳ thị giá và đề xuất hoàn thiện Luật Cạnh tranh 2004.	4	23
128	Nguyễn Mạnh Dũng	Về hoạt động quản lý biển đảo của nhà nước quân chủ Việt Nam.	4	29
129	Nguyễn Khắc Sử	Những thành tựu nổi bật trong hợp tác nghiên cứu khảo cổ học Việt - Nga.	4	33
130	Lê Hương Thủy	Sự tương tác thể loại trong truyện ngắn Việt Nam đương đại.	4	40
131	Lê Thời Tân	Vận dụng thể văn bút ký vào kiến tạo diện mạo thể loại tiểu thuyết <i>Nho lâm ngoại sử</i> .	4	46
132	Vũ Tuấn Anh, Trần Văn Bình	Một số phương thức thương mại hóa và chuyển giao sản phẩm KH&CN của các trường đại học trên thế giới và gợi ý cho Việt Nam.	4	51
133	Bạch Tân Sinh	Chuyển đổi hệ thống quốc gia về đổi mới của Việt Nam: Nghiên cứu trường hợp của các viện nghiên cứu và triển khai công nghệ công nghiệp.	4	56
134	Nguyễn Thị Diệu Chi	Tác động của cấu trúc vốn nợ tới hiệu quả tài chính: Nghiên cứu điển hình các doanh nghiệp dịch vụ Việt Nam.	11	1
135	Phạm Thu Trang, Nguyễn Thị Hồng Loan	Vận dụng mô hình thê điểm cân bằng bền vững trong đánh giá hiệu quả kinh doanh của các doanh nghiệp khai thác than thuộc Tập đoàn Công nghiệp Than - Khoáng sản Việt Nam.	11	6
136	Phạm Tiến Mạnh, Trần Thị Phương Thảo...	Tác động của công bố thông tin cổ tức, lợi nhuận đến biến động giá cổ phiếu của các công ty niêm yết trên Sở giao dịch chứng khoán TP Hồ Chí Minh (HOSE).	11	10
137	Trần Văn Biên	Những vấn đề khác biệt trong giao kết hợp đồng điện tử.	11	16
138	Bùi Thị Minh Hà, Lê Thị Hoa Sen...	Phương pháp đánh giá tính dễ bị tổn thương về sinh kế của nông hộ do biến đổi khí hậu.	11	22
139	Trần Thị Tuyết	Tiếp cận chỉ số nhạy cảm hạn kinh tế - xã hội trong đánh giá tính dễ bị tổn thương do hạn hán tại tỉnh Ninh Thuận.	11	28
140	Nguyễn Trọng Nhân	Chợ nổi vùng Đồng bằng sông Cửu Long dưới góc nhìn sinh thái nhân văn.	11	34
141	Nguyễn Văn Anh, Kiều Đình Sơn	Hệ thống đền miếu nhà Trần tại Đông Triều, Quảng Ninh.	11	38
142	Lê Việt Liên	Nghiên cứu về mối quan hệ giữa nông thôn và thành thị thông qua việc tái tạo không gian thiêng.	11	42
143	Nguyễn Thị Thanh Thủy	Vài nhận xét về các cuộc vận động văn hóa - xã hội ở Việt Nam trong quá trình “Cận đại hóa”.	11	47
144	Đình Minh Hằng	Một cách hiểu về chủ nghĩa siêu thực trong thơ hiện đại.	11	54
145	Chu Văn Tuấn, Nguyễn Thành Trung	Xây dựng sản phẩm du lịch gắn với khai thác di sản tôn giáo, tín ngưỡng trong bối cảnh Cách mạng công nghiệp 4.0 ở Việt Nam hiện nay.	11	58

QUY ĐỊNH VỀ BÀI VIẾT ĐĂNG TẢI TRÊN TẠP CHÍ

Yêu cầu chung

Bài viết gửi đăng trên Tạp chí phải là bài viết nguyên thủy (chưa được công bố trước đó). Tác giả không được gửi đăng bài viết 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 viết gửi về Tòa soạn dưới dạng file mềm và bản in; có thể gửi trực tiếp đến Tạp chí (Phòng 507, số 113 Trần Duy Hưng, Cầu Giấy, Hà Nội) hoặc qua hòm thư điện tử, địa chỉ: khcnvn@most.gov.vn.

Tên bài báo

- Tên bài báo được viết bằng tiếng Việt và tiếng Anh, trên trang đầu của bài báo, 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.

Tóm tắt

Tóm tắt bằng tiếng Việt và tiếng Anh. 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. Chỉ số phân loại (theo hướng dẫn).

Dẫn nhập/đặt vấn đề

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.

Đối tượng và phương pháp

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...

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.

Bàn luận

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.

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.

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 1 hoặc [2, 5, 7-9] với nhiều số chỉ dẫn.

Tác giả (Năm xuất bản), "Tên tài liệu được trích dẫn", *Tên nguồn*, **tập (số)**, pp<trang đầu-trang cuối>

Tác giả: là tác giả/các tác giả của tài liệu được tham khảo, trích dẫn.

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...

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).

Tập (số): dành cho nguồn trích là tạp chí, sách hoặc các xuất bản phẩm khác (phần này in đậm).

Trang đầu-trang cuối là số thứ tự các trang phản ánh nơi cư trú của tài liệu được trích dẫn trong tài liệu nguồn.

Chú ý: nếu có ≥ 2 tài liệu tham khảo do cùng 1 tác giả/nhóm tác giả, cùng năm công bố, thì các tài liệu tham khảo này cần được đánh dấu a, b... sau năm xuất bản (ví dụ: 1986a).

Nếu có một số tài liệu tham khảo trong cùng 1 bài báo được trích dẫn có số trang khác nhau thì cần trích dẫn thêm số trang, ví dụ: Kitchen (1982, p 39).

Các yêu cầu khác

- Bài viết không đạt yêu cầu, Tòa 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.

PHÂN LOẠI LĨNH VỰC KHOA HỌC

1. Khoa học tự nhiên

- 1.1. Toán học và thống kê
- 1.2. Khoa học máy tính và thông tin
- 1.3. Vật lý
- 1.4. Hóa học
- 1.5. Khoa học trái đất và môi trường
- 1.6. Khoa học sự sống
- 1.7. Khoa học nano
- 1.8. Khoa học tính toán
- 1.9. Các lĩnh vực khác của khoa học tự nhiên

2. Khoa học kỹ thuật và công nghệ

- 2.1. Kỹ thuật dân dụng: kỹ thuật kiến trúc; kỹ thuật xây dựng; kỹ thuật kết cấu và đô thị; kỹ thuật giao thông vận tải; kỹ thuật thủy lợi; kỹ thuật địa chất công trình
- 2.2. Kỹ thuật điện, kỹ thuật điện tử, kỹ thuật thông tin
- 2.3. Kỹ thuật cơ khí, chế tạo máy
- 2.4. Kỹ thuật hóa học
- 2.5. Kỹ thuật vật liệu và luyện kim
- 2.6. Kỹ thuật y học
- 2.7. Kỹ thuật môi trường
- 2.8. Công nghệ sinh học công nghiệp
- 2.9. Công nghệ nano
- 2.10. Kỹ thuật thực phẩm và đồ uống
- 2.11. Các lĩnh vực khác của khoa học kỹ thuật và công nghệ

3. Khoa học y - dược

- 3.1. Y học cơ sở
- 3.2. Y học lâm sàng
- 3.3. Y học dự phòng
- 3.4. Dược học
- 3.5. Các lĩnh vực khác của Y - dược học

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 60 - Number 12 - December 2018

Thẩm định độ chính xác của bộ xét nghiệm tự pha để định lượng fructose trong tinh dịch phục vụ chẩn đoán vô sinh nam.

Nguyễn Thị Trang, Trần Thị Hồng Nhung, Bùi Bích Mai, Trần Lê Giang

Xây dựng quy trình phát hiện đồng thời *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* dựa trên kỹ thuật recombinase polymerase amplification.

Nguyễn Ngọc Bảo Huy, Quan Quốc Đăng, Nguyễn Hoàng Chương

Đặc điểm kháng kháng sinh và mối liên hệ kiểu gen của các chủng *Pseudomonas aeruginosa* phân lập tại Bệnh viện Việt Đức.

Vũ Thị Thu Hiền, Phạm Duy Thái, Trần Thị Vân Phương, Ngô Thị Hồng Hạnh, Bùi Thị Việt Hà, Trần Huy Hoàng

Bào chế và đánh giá động học phóng thích viên nén metformin hydroclorid 750 mg phóng thích kéo dài với hệ tá dược tạo khung matrix thân nước.

Nguyễn Hữu Vĩnh Trung, Nguyễn Thiện Hải, Phạm Đình Duy

Điều chế SMEDDS chứa cao chiết cá toàn phần và khảo sát tác động kháng viêm cấp tính của hệ.

Ngô Tiến Thịnh, Vũ Anh, Trần Lê Tuyết Châu

Phân loại 2 chủng vi nấm phân lập tại Viện 69 và xác định khả năng phân giải một số cơ chất sinh học của chúng.

Phùng Công Thường, Nguyễn Văn Bắc, Nguyễn Cao Vũ

Nghiên cứu nuôi trồng lan Hoàng thảo Nghệ tâm (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) ở giai đoạn vườn ươm.

Nguyễn Thị Lai, Vũ Mạnh Hải, Phạm Hương Sơn, Phạm Minh Duy, Bùi Thị Thanh Phương

Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản lạnh bằng công nghệ Hyokan đến chất lượng quả cam.

Đoàn Thị Bắc, Lê Tất Khương, Kouichi Omura, Lê Thị Minh Hằng, Đào Văn Minh, Tạ Thu Hằng

Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nhân giống *Spirulina platensis* nước lợ phục vụ sản xuất sinh khối tại tỉnh Thanh Hóa.

Trần Bảo Trâm, Nguyễn Thị Hiền, Phan Xuân Bình Minh, Nguyễn Thị Thanh Mai, Trương Thị Chiên, Phạm Hương Sơn

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.

Nguyễn Thị Lai, Phạm Hương Sơn, Bùi Thị Thanh Phương, Phạm Minh Duy, Đỗ Thị Thơm, Nguyễn Thị Bình, Nguyễn Ích Tân

Nghiên cứu chế biến nước uống lên men lactic từ củ khoai lang tím Nhật Bản (giống *Murasakimasari*).

Hoàng Thị Lệ Hằng, Nguyễn Thị Thu Hương

1 Verifying the accuracy of self-manufactured test kit for determination of fructose concentration in semen for male infertility diagnosis.

Thi Trang Nguyen, Thi Hong Nhung Tran, Bich Mai Bui, Le Giang Tran

7 Constructing a molecular assay based on the recombinase polymerase amplification technique for simultaneous detection of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*.

Ngoc Bao Huy Nguyen, Quoc Dang Quan, Hoang Chuong Nguyen

14 Antibiotic resistance characteristics and genotype correlation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at Viet Duc Hospital.

Thi Thu Hien Vu, Duy Thai Pham, Thi Van Phuong Tran, Thi Hong Hanh Ngo, Thi Viet Ha Bui, Huy Hoang Tran

19 Formulating and evaluating the release kinetics of metformin hydrochloride 750 mg extended release tablet prepared by hydrophilic matrix.

Huu Vinh Trung Nguyen, Thien Hai Nguyen, Dinh Duy Pham

25 Preparation of SMEDDS containing *Houttuynia cordata* (Thunb.) extract and examination of the acute anti-inflammatory effects.

Tien Thinh Ngo, Anh Vu, Le Tuyen Chau Tran

30 Classification of two fungal strains isolated at the Institute 69 and determining their ability to dissolve some biological substrates.

Cong Thuong Phung, Van Bac Nguyen, Cao Vu Nguyen

36 A study on cultivation of *Dendrobium loddigesii* Rolfe at the nursery stage.

Thi Lai Nguyen, Manh Hai Vu, Huong Son Pham, Minh Duy Pham, Thanh Phuong Thi Bui

40 Effects of cold storage conditions applying the Hyokan technology on the quality of oranges.

Thi Bac Doan, Tat Khuong Le, Kouichi Omura, Thi Minh Hang Le, Van Minh Dao, Thu Hang Ta

45 Effect of some factors on the cultivation of *Spirulina platensis* in brackish water for biomass production in Thanh Hoa province.

Bao Tram Tran, Thi Hien Nguyen, Xuan Binh Minh Phan, Thi Thanh Mai Nguyen, Thi Chien Truong, Huong Son Pham

50 Study on *in vitro* propagation of *Curculigo orchoides* Gaertn. through apical meristem culture.

Thi Lai Nguyen, Huong Son Pham, Thi Thanh Phuong Bui, Minh Duy Pham, Thi Thom Do, Thi Binh Nguyen, Ich Tan Nguyen

55 Study on processing lacto-fermented drinks from Japanese purple sweet potatoes (*Murasakimasari*).

Thi Le Hang Hoang, Thi Thu Huong Nguyen