ĐƠN VỊ TỔ CHỨC

TRUNG TÂM PHÁT TRIỂN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TRẺ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC MỞ TP. HỒ CHÍ MINH
HO CHI MINH CITY OPEN UNIVERSITY

ĐƠN VỊ ĐỒNG HÀNH

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
TP. HỒ CHÍ MINH

KỶ YẾU

HỘI THẢO KHOA HỌC TRẺ
NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

"NGHIÊN CỨU KHOA HỌC, CÔNG BỐ QUỐC TẾ, CHUYỂN GIAO CÔNG NGHỆ VÀ KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO"

TP. HỒ CHÍ MINH, THÁNG 4 NĂM 2021

LƯU HÀNH NỘI BỘ

MỤC LỤC

1. ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH TRÍCH LÁ CÂY TRÂM ỔI LÊN SỰ ỨC CHẾ HÌNH THÀNH TINH THỂ CALCIUM OXALATE TRONG ĐIỀU KIỆN IN VITRO..... 5

2. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA VỎ CHANH DÂY (*Passiflora edulis*)..... 14

3. ẢNH HƯỞNG CỦA KIỂU GENE MC4R VÀ PIT-1 ĐẾN TÍNH TRẠNG SINH TRƯỞNG VÀ CHẤT LƯỢNG THỊT TRÊN HEO DUROC XUẤT XỨ TỪ CANADA23

4. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA BỐN DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CHLORPYRIFOS ETHYL 33

5. BS. RÂU - CÂU CHUYỆN KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO 40

6. CIRCULAR ECONOMY APPROACH IN AGRICULTURAL WASTES MANAGMENT: A CASE STUDY IN MINH CHAU COMMUNE, BA VI, HA NOI 42

7. CRISPR/CAS9 AND ITS CURRENT APPLICATION STATUS ON PIG BREEDING51

8. ĐẶC ĐIỂM MÔ BỆNH HỌC XƠ VỮA ĐỘNG MẠCH VÀNH THEO PHÂN LOẠI AHA TRÊN NHỮNG TRƯỜNG HỢP ĐỘT TỬ TỰ NHIÊN QUA GIÁM ĐỊNH PHÁP Y .. 61

9. ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA DỊCH CHIẾT VI KHUẨN LAM (*ARTHROSPIRA* SP.) CÓ KHẢ NĂNG SINH INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)..... 70

10. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỐNG LÃO HÓA DA CỦA ASTAXANTHIN TỪ TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* VÀ*IN VIVO*..... 77

11. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KẾT HỢP VỚI KHÁNG SINH ỨC CHẾ HÌNH THÀNH BIOFILM TRÊN CHỦNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CỦA PHÂN ĐOẠN CAO ETHANOL TRÂM TRÒN 85

12. ĐÁNH GIÁ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY SAO NHÁI VÀNG (*Cosmos sulphureus* Cav.) VÀ SAO NHÁI HỒNG (*Cosmos caudatus* Kunth)..... 91

13. ĐO LƯỜNG MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN LO ÂU, TRẦM CẢM CỦA ĐỢT BÙNG PHÁT DỊCH COVID-19 ĐỐI VỚI NHÂN VIÊN Y TẾ LÂM SÀNG Ở MỘT SỐ BỆNH VIỆN TẠI HÀ NỘI NĂM 2020..... 95

14. DO SECONDARY PLANT METABOLITE REALLY WORK?: A REVIEW..... 102

15. HỖ TRỢ KHỞI NGHIỆP TRONG CÁC TRƯỜNG ĐẠI HỌC Ở VIỆT NAM: NHỮNG VẤN ĐỀ ĐẶT RA VÀ GIẢI PHÁP 115

16. IMPROVEMENT OF CURCUMIN BIOAVAILABILITY AND BIOACTIVITIES BY THE DESIGNED REDOX NANOPARTICLES 123

17. KHẢO SÁT BIẾN DẠNG CƠ TIM BẰNG SIÊU ÂM ĐÁNH DẤU MÔ Ở BỆNH NHÂN TĂNG HUYẾT ÁP..... 129

18. KHẢO SÁT CÁC ĐIỀU KIỆN THU HỒI DẦU TỪ HẠT CÂY SACHA INCHI (SACHI) TRỒNG TẠI VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP CƠ HỌC 136

19. KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT ENZYME L-ASPARAGINASE TỪ NẤM *Aspergillus terreus* ATEG-01943 BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BÁN RẮN 144

20. KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SẢN XUẤT LOVASTATIN TỪ NẤM *Asperillus terreus NIH2624* BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BÁN RẮN..... 154

21. KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN, THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN CHỦNG..... 163

22. *Streptomyces* sp. SS52 NHẰM THU NHẬN, TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNGKHÁNG OXY HOÁ CỦA GENISTEIN..... 163

23. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA VÀ TIỂU ĐƯỜNG TỪ DỊCH CHIẾT CỦA CÂY TẦM BÓP (*Physalis angulate*)..... 169

24. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG VI NẤM GÂY BỆNH TRÊN NGƯỜI TỪ CAO CHIẾT CHỦNG VI KHUẨN *Pseudomonas* sp. P20 NỘI SINH SÂM ĐẠI HÀNH (*Eleutherine Subaphylla Gagnep*.)..... 179

25. KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α-AMYLASE, α -GLUCOSIDASE VÀ KHÁNG OXY HÓA CỦA CÂY RAU SAM (*Portulaca oleracea* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM..... 180

26. KHỞI TẠO SÁNG CHẾ TỪ HOẠT ĐỘNG NGHIÊN CỨU KHOA HỌC: NGUYÊN TẮC VÀ KINH NGHIỆM..... 189

27. MATERNAL RNAi SCREENING OF POTENTIAL SRC64 TARGETS IN ACTOMYOSIN RING CONTRACTION DURING CELLULARIZATION..... 190

28. MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA GENE SET VỚI SỰ TIÊN LƯỢNG XẤU VÀ TÁI PHÁT SỚM TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ GAN NGUYÊN PHÁT..... 196

29. MỘT SỐ KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT CHẾ BIẾN TRÀ TÚI LỌC THÙ LÙ CẠNH (*Physalis angulata* L.) 207

30. NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO MÁY PHÁT ĐIỆN NANO MÔ PHỎNG VI CẤU TRÚC TỰ NHIÊN ỨNG DỤNG CẢM BIẾN DA NHÂN TẠO..... 216

31. NGHIÊN CỨU HÀNH TRÌNH KHỞI NGHIỆP TỪ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC ĐẾN KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO TRONG LĨNH VỰC CÔNG NGHỆ SINH HỌC..... 221

32. NGHIÊN CỨU MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA TÍNH CHẤT METHYL HÓA BẤT THƯỜNG GENE *ADMATS9* VÀ UNG THƯ VÒM HỌNG Ở NGƯỜI VIỆT NAM .. 225

33. NGHIÊN CỨU MỘT SỐ GENE LIÊN QUAN ĐẾN CON ĐƯỜNG CHUYỂN HÓA CORDYCEPIN TRÊN LOÀI NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG CORDYCEPS MILITARIS. 226

34. NGHIÊN CỨU PHẢN ỨNG CHỨC NĂNG VÀ PHẢN ỨNG SỐ LƯỢNG CỦA BỌ MẮT TO *Geocoris ochropterus* (LYGAEIDAE, HEMIPTERA)..... 227

35. NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHẾ BIẾN TRÀ TÚI LỌC TỪ LÁ TÍA TÔ (*Perilla frutescens* L.)..... 228

36. NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM TỪ DÒNG NẤM KÍ SINH CÔN TRÙNG *Isaria fumosorosea Bb-V3* ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC CÔN TRÙNG GÂY HẠI 236

37. NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP TOÀN PHẦN HOẠT CHẤT CHO THUỐC BELEODAQ 237

38. NGHIÊN CỨU TƯƠNG QUAN TRÊN TOÀN HỆ GEN VỀ KHẢ NĂNG CHỊU MẶN CỦA CÂY LÚA Ở GIAI ĐOẠN ĐẺ NHÁNH 242

39. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM BÓN GỐC (PHÂN HỮU CƠ VI SINH BIOROOT) TRONG SẢN XUẤT RAU AN TOÀN 244

40. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TƯỚI TIẾT KIỆM NƯỚC CHO VƯỜN CÂY THANH LONG TỈNH TIỀN GIANG THÍCH ỨNG VỚI BIẾN ĐỔI KHÍ HẬU 256

41. NGHIÊN CỨU VẬT LIỆU THAY THẾ BẠCH CẦU, TIỂU CẦU VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT, ĐỘ ỔN ĐỊNH SỬ DỤNG CHO MẪU NGOẠI KIỂM HUYẾT HỌC 264

42. NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU HÓA CÔNG THỨC GEL *IN SITU* NỔI TRONG DẠ DÀY CHỨA METRONIDAZOL 272

43. NHÂN NUÔI TÌM HIỂU VÒNG ĐỜI VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĂN NHỰA POLYETHYLENE CỦA ẤU TRÙNG BƯỚM SÁP *Achroia grisella*..... 277

44. PHÂN LẬP NẤM RỄ NỘI CỘNG SINH (ARBUSCULAR MYCORRHIZA) CÂY MÍA (*Saccharum*.spp) Ở TỈNH TÂY NINH..... 278

45. PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN *BACILLUS* SPP. NỘI SINH VÀ SỐNG TRÊN BỀ MẶTRỄ CÂY ĐẬU PHỘNG (*ARACHIS HYPOGAEA*) KHÁNG NẤM SINH AFLATOXIN *ASPERGILLUS FLAVUS* CDP2, ỨNG DỤNG LÀM PROBIOTIC CÂY TRỒNG 279

46. PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE TỪ BÃ MÍA..... 285

47. PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC THỰC KHUẨN THỂ (BACTERIOPHAGE) CÓ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT SINH HỌC VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) 291

48. PHÂN LẬP VI SINH VẬT NỘI SINH CỦ CÂY TAM THẤT NAM (*Stahlianthus thorelli* Gagnep.) CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM 292

49. PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH DO PHYTOPLASMA GÂY RA TRÊN CÂY TRỒNG: TÁC ĐỘNG VÀ Ý NGHĨA CỦA DỰ ÁN FIRST 1A ĐẾN ĐỔI MỚI SÁNG TẠO KHOA HỌC CÔNG NGHỆ 293

50. PRELIMINARY EXAMINATION OF ELECTRIC GENERATION FROM DOMESTIC WASTEWATER BY MICROBIAL FUEL CELL..... 294

51. SẢN XUẤT SẢN PHẨM THUỶ PHÂN PROTEIN TỪ THỊT VỤN CÁ NGỪ VÂY VÀNG BẰNG SỰ THỦY PHÂN BỞI ENZYME FLAVOURZYME..... 300

52. *S*CREENING OF NATURAL PRODUCTS AS POTENTIAL INHIBITORS OF SARS-COV-2 MAIN PROTEASE AND SPIKE PROTEIN TARGET *IN SILICO* 309

53. STUDY ON EXTRACTING CRUDE PHYCOCYANIN FROM SPIRULINA ALGAE AND DETERMINING ITS ABILITY IN PROTECTING FIBROBLASTS FROM OXIDATIVE STRESS OF HYDROXYL PEROXIDE 326

54. STUDYING ADVENTITIOUS ROOT FORMATION DERIVED FROM NODE OF *Morinda offcinalis* How. CULTURED *IN VITRO* 336

55. THANH NIÊN KHỞI NGHIỆP HỢP TÁC XÃ NÔNG NGHIỆPTRONG TÌNH HÌNH MỚI 344

56. THE ISOLATION, EVALUATION PROBIOTIC STRAINS FROM BREAST MILK AND STRAINS INHIBIT WITH *H.PYLORI* IN FERMENTED FOOD 351

57. TÌM KIẾM PHÂN TỬ TIỀM NĂNG CHỐNG LẠI PROTEIN FtsZ CỦA STAPHYLOCOCCUS AUREUS KHÁNG METHICILLIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC ẢO DỰA TRÊN CẤU TRÚC VÀ MÔ PHỎNG ĐỘNG HỌC PHÂN TỬ ..... 360_

58. TRIỂN KHAI NGHIÊN CỨU VỚI TƯ DUY KHỞI NGHIỆP CÔNG NGHỆ: TỪ LÝ THUYẾT TỚI THỰC TIỄN 370

59. TRIỂN VỌNG SÀNG LỌC VI KHUẨN GRAM ÂM ĐƯỜNG RUỘT KHÁNG KHÁNG SINH CARBAPENEM TẠI CÁC BỆNH VIỆN TUYẾN HUYỆN 371

60. VAI TRÒ CỦA REALTIME PCR TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ VIÊM PHỔI THÙY Ở TRẺ EM 374

ẢNH HƯỞNG CỦA DỊCH TRÍCH LÁ CÂY TRÂM ỔI LÊN SỰ ỨC CHẾ HÌNH THÀNH TINH THỂ CALCIUM OXALATE TRONG ĐIỀU KIỆN IN VITRO

Nguyễn Phạm Tuấn[1*]và Bằng Hồng Lam[2]

[1]Trung Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang

[2]Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: ngphamtuan1983@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu sử dụng dịch trích lá cây trâm ổi được thực hiện để đánh giá khả năng ức chế tinh thể Calcium oxalate (CaOx), gồm 03 giai đoạn chính là hình thành, phát triển và ngưng tụ. Mẫu lá cây trâm ổi được ly trích bằng phương pháp ngâm dầm với ethanol 80% và sóng siêu âm tạo cao chiết. Phần trăm ức chế hạt nhân tinh thể, phát triển và ngưng tụ tinh thể CaOx của cao chiết lá trâm ổi được xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở bước sóng 620 nm; 214 nm. Kết quả, độ ẩm và hiệu suất trích của lá cây trâm ổi lần lượt là 64.87% và 5,71%. Cao chiết lá cây trâm ổi có sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, steroid, alkaloid, saponin, terpenoid, tanin và phenol. Cao chiết lá cây trâm ổi có khả năng ức chế hình thành hạt nhân, phát triển và ngưng tụ tinh thể CaOx với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,23 mg/mL; 1,67 mg/mL và 0,92 mg/mL.

Từ khóa: *Calcium oxalate, cây trâm ổi, hình thành, ngưng tụ, phát triển.*

INHIBITION OF CALCIUM OXALATE CRYSTALLISATION IN VITRO BY AN EXTRACT OF *Lantana camara* LEAVES

Nguyen Pham Tuan[1*]and Bang Hong Lam[2]

[1]An Giang Biotechnology center

[2]An Giang University, Viet Nam Nation Universoty, Ho Chi Minh City

*Corresponding author: ngphamtuan1983@gmail.com

ABSTARCT

Study of using L. camara leaves extract to inhibit the formation of Calcium oxalate crystallisation, including three main phases: nucleation, growth, and aggregation is conducted. The plant samples were extracted by maceration method with ethanol 80% and ultrasound. The inhibitory percentage of nucleation, growth and aggregation of L. camara leaves extract was determined by spectrophotometer at 620 nm and 214 nm. The results showed that moisture and the yield of L. camara leaves extract were 64.87% and 5.71%. L. camara leaves extract has the presence of bioactive compounds such as alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, terpenoid, tannin and phenol. L. camara leaves extract has the ability to inhibit nucleation, growth and aggregation of Calcium oxalate crystallisation with an IC_{50} value of 3.23 mg/mL; 1.67 mg/mL and 0.92 mg/mL respectively.

Keywords: *aggregation, calcium oxalate, growth, nucleation, Lantana camara.*

GIỚI THIỆU

Tỷ lệ sỏi tiết niệu ngày càng tăng trên toàn thế giới và canxi oxalate (CaOx, CaC_2O_4) là thành phần chủ yếu của hầu hết các loại sỏi thận, tiếp theo là struvite, cystine, uric acid và các hợp chất khác [1]. Xác suất hình thành sỏi thận có sự khác biệt giữa các vùng trên Thế giới như Châu Á với tỷ lệ 1-5%; châu Âu với tỷ lệ 5-9% và Bắc Mỹ với tỷ lệ 13%. Tỷ lệ tái phát của sỏi thận là 75% sau khi tiến hành điều trị [2]. Tinh thể CaOx được tìm thấy dưới dạng hai loại khác nhau: CaOx monohydrate (COM) và CaOx dihydrate (COD) [3]. Các kỹ thuật hiện đại hiện có trong quản lý sỏi tiết niệu phụ thuộc vào kích thước và vị trí

của sỏi, mức độ tắc nghẽn, chức năng thận và các chức năng liên quan [4]. Phương pháp phẫu thuật hở để điều trị sỏi tiết niệu hiện nay không được sử dụng và đã được thay thế bằng các kỹ thuật hiện đại, bao gồm cả tán sỏi ngoài cơ thể hoặc nội soi niệu quản nhưng tỷ lệ tái phát vẫn được dự đoán là gần 50% [5]. Việc nghiên cứu sử dụng các loại thuốc thảo dược để thay thế các loại thuốc tân dược tổng hợp nhằm giảm thiểu tác dụng phụ là hết sức cần thiết. Theo kinh nghiệm dân gian, cây trâm ổi có chứa nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, phenolic, tannin,.. và được nghiên cứu và ứng dụng trong nông nghiệp, dược phẩm và thực phẩm,… Theo Venkatachalam [6] và Sasikala [7], cây trâm ổi được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến sỏi tiết niệu. Xuất phát từ thực tiễn đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả ức chế hình thành tinh thể CaOx gây sỏi thận của cây dược liệu hướng tới tạo ra sản phẩm có dược tính phòng và điều trị bệnh.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu

Lá cây trâm ổi được lấy thu thập từ nhà lưới của Trung tâm Công nghệ Sinh học An Giang (ấp Vĩnh Phước, xã Vĩnh Bình, huyện Châu Thành, tỉnh An Giang). Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ (Human, Hàn Quốc), máy đông khô chân không (Christ, Đức), Sodium oxalate, Tris HCl (Merck, Mỹ)… hóa chất và thiết bị khác.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tạo cao chiết từ lá cây trâm ổi

Lá của cây trâm ổi được rửa sạch, loại bỏ những lá bị sâu bệnh hại và đông khô bằng máy đông khô trong 96 giờ và nghiền thành bột mịn. Sau đó, 400 g mẫu bột ngâm dầm với dung môi nước cất với tỷ lệ dung môi và nguyên liệu là 1: 10 (w/v), ở nhiệt độ phòng, trong 72 giờ, kết hợp sóng siêu âm trong 12 giờ và để trong tối để tránh quá trình oxy hóa. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút để thu dịch lọc và bỏ phần cặn. Dịch lọc được lọc qua giấy lọc Whatman 0,45 µm, thu dịch lọc và bỏ phần cặn. Dịch lọc được tiến hành cô quay chân không ở 50^0C để đuổi dung môi và đông khô bằng máy đông khô chân không để thu cao chiết và bảo quản ở -20^0C.

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết lá cây trâm ổi

Tiến hành định tính các hợp chất sinh học theo phương pháp Yadav [8] (Bảng 1).

Bảng 1. Định tính hợp chất trong cao chiết ethanol của lá cây trâm ổi.

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (Mayer)	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer	Kết tủa màu nâu
Flavonoid	1mL dịch trích + 2mL $Pb(OAc)_4$ 10%	Xuất hiện màu vàng
Saponin (Foam)	3mL dịch trích+ 6mL H_2O→ đun nóng	Xuất hiện bọt
Steroid (Salkowski)	1mL dịch trích + 2mL $CHCl_3$ + 2mL $H_2SO_{4đậm đặc}$	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol (Braymer)	0,5mL dịch trích + 10mL H_2O + 2-3 giọt $FeCl_3$ 0,1%	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	2mL dịch trích + 2mL $(CH_3CO)_2O$ + 2-3 giọt H_2SO_4 đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

Khả năng ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx của cao chiết

Khả năng ức chế sự hình thành tinh thể CaOx được thực hiện theo Phatak [9]. Chuẩn bị dung dịch calcium chloride ở nồng độ 4 mM và natri oxalate ở nồng độ 50 mM trong buffer gồm Tris 0,05 M và Natri chloride 0,15 M ở điều kiện pH = 6,5. Phản ứng 950 µL calcium chloride trộn với 100 µL cao chiết và mẫu đối chứng (nước cất). Quá trình tạo hạt

nhân sỏi CaOx khi hỗn hợp phản ứng 950 µL natri oxalate, lắc đều trong 2-3 phút. Sự tạo thành tinh thể CaOx. % Ức chế hạt nhân = (C-S)/C x 100.

Trong đó: C: OD mẫu đối chứng; S: OD mẫu có cao chiết.

Chất chuẩn sử dụng để so sánh hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx là Natri citrate. Đánh giá hiệu quả ức chế dựa vào IC_{50}.

Khả năng ức chế sự phát triển tinh thể CaOx của cao chiết

Khả năng ức chế sự phát triển tinh thể CaOx theo Chaudhary [10]. Phản ứng cho 1 mL $CaCl_2$ 4 mM và 1 mL $Na_2C_2O_4$ 4 mM vào 1,5 mL dung dịch buffer chứa natri chloride (90 mM) và Tris HCl (10 mM) ở pH = 7,2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 30 µL tinh thể CaOx (1,5 mg/mL) chuẩn bị trong buffer natri acetate 50 mM (pH = 5,7), phản ứng $CaCl_2$ và natri oxalate trong 10 phút. Thêm 0,5 mL nước cất và đo độ hấp thu ở λ = 214 nm để xác định độ giảm của gốc oxalate tự do ban đầu. Đo giá trị OD mỗi phút 1 lần và vẽ đồ thị tính hệ số góc. % Ức chế phát triển= (C-S)/C x 100.

Trong đó: C: hệ số góc chất ức chế; S: hệ số góc chất đối chứng.

Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx của cao chiết

Chuẩn bị hỗn hợp tinh thể CaOx theo Saha [11]. Trộn đều hỗn hợp gồm $CaCl_2$ và $Na_2C_2O_4$ ở nồng độ 50 mM và ủ ở nhiệt độ 60^0C trong 1 giờ nhằm tinh thể cân bằng và ổn định [12] và làm mát ở 37^0C qua đêm. Hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút, thu phần cặn, được tinh thể CaOx và bảo quản tinh thể ở điều kiện nhiệt độ 4^0C. Khả năng ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx theo Saha [11]. Tinh thể CaOx (1 mg/mL) được hòa tan trong buffer gồm Tris 0,05 M và $CaCl_2$ 0,15 M ở pH = 6,5, nhiệt độ 37^0C, thêm 500 µL nước cất và đo độ hấp thu ở λ = 620 nm vào khoảng thời gian 30, 60, 90, 180 và 360 phút. % Ức chế ngưng tụ = (1-Si/Sc) x 100.

Trong đó: Si: hệ số góc chất ức chế; Sc: hệ số góc chất đối chứng.

Phương pháp thống kê

Số liệu xử lý và thống kê bằng phần mềm Excel và Statgraphics plus 16.0.

KẾT QUẢ VA THẢO LUẬN

Phương pháp tạo cao chiết từ lá cây Trâm ổi

Sấy mẫu trước khi ngâm dầm là phương pháp phổ biến cơ bản trong quá trình tạo cao chiết, phương pháp này giúp bảo quản các hợp chất có hoạt tính sinh học trong mẫu nguyên liệu. Đồng thời, sấy cũng góp phần làm giảm độ ẩm nguyên liệu cũng như phá vỡ màng tế bào thực vật với quy trình đơn giản, từ đó làm tăng diện tích tiếp xúc của mẫu nguyên liệu với dung môi cũng như làm tăng tỷ lệ dung môi sử dụng nên làm tăng hiệu suất ly trích [13]. Để đánh giá hiệu quả của phương pháp trích cao, người ta thường dựa trên hiệu suất trích cao. Hiệu suất trích cao phản ánh sự tối ưu của việc kết hợp các điều kiện khác nhau trong phương pháp ly trích. Độ ẩm của lá cây trâm ổi là 64,87% và hiệu suất chiết cao đạt 5,71% (Bảng 2).

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết lá cây trâm ổi

Cao chiết lá cây trâm ổi có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, flavonoid, tanin và phenol (Bảng 3) và tương đồng kết quả Akumu [14] và Sushama [15] khi định tính cao chiết lá cây trâm ổi.

Bảng 2. Độ ẩm và hiệu suất chiết của cao chiết lá cây trâm ổi.

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả
Khối lượng mẫu tươi (g)	2.000
Độ ẩm (%)	64,87
Khối lượng mẫu khô (g)	200
Khối lượng cao khô (g)	11,42
Hiệu suất chiết (%)	5,71

Bảng 3. Kết quả định tính hoạt chất sinh học của cao chiết lá cây Trâm ổi.

Định tính	Cao chiết ethanol
Saponin	+
Flavonoid	+
Terpenoids	+
Alkaloid	+
Tanin và phenol	+
Steroid	+

Ghi chú: '+': dương tính và '-': âm tính.

Hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx của cao chiết

Ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt cao nhất 92,12±0,07% và thấp nhất, ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt 0% (Bảng 4). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx và giá trị IC_{50} của Natri citrate là 1,55 mg/mL.

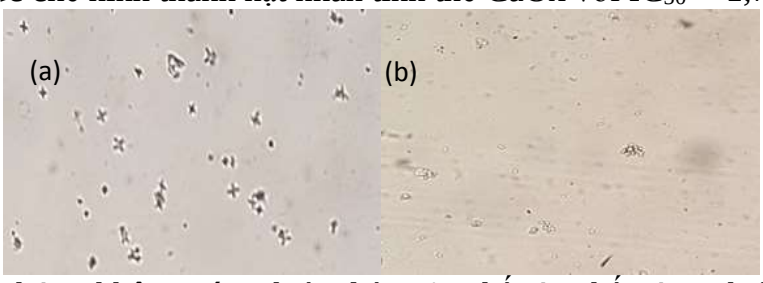
Bảng 4: Kết quả ức chế hình thành hạt nhân, phát triển và ngưng tụ của tinh thể CaOx bằng Natri citrate.

Nồng độ (mg/mL)	Ức chế hạt nhân (%)	Ức chế phát triển (%)	Ức chế ngưng tụ (%)
0	0^{l}	0^{l}	0^{l}
0,25	$17,69^{k}$±0,18	$15,09^{k}$±0,11	$18,11^{k}$±0,02
0,50	$29,65^{h}$±0,06	$30,21^{h}$±0,22	$34,31^{h}$±0,04
0,75	$36,96^{g}$±0,03	$35,56^{g}$±0,14	$40,06^{g}$±0,14
1	$41,19^{f}$±0,20	$40,07^{f}$±0,03	$45,36^{f}$±0,17
2	$57,56^{e}$±0,25	$54,20^{e}$±0,05	$55,13^{e}$±0,23
4	$61,39^{d}$±0,13	$59,39^{d}$±0,10	$62,78^{d}$±0,26
6	$70,23^{c}$±0,18	$65,78^{c}$±0,28	$69,07^{c}$±0,07
8	$79,98^{b}$±0,02	$76,19^{b}$±0,01	$74,19^{b}$±0,05
10	$92,12^{a}$±0,07	$80,19^{a}$±0,09	$82,89^{a}$±0,16
Phương trình, giá trị R^2	y = 17,858x + 22,366 R^2 = 0,9872	y = 15,578x + 23,459 R^2 = 0,9921	y = 13,133x + 29,762 R^2 = 0,9525
IC_{50} (mg/mL)	1,55	1,70	1,54

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Ở nồng độ cao chiết lá cây Trâm ổi 10 mg/mL, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt 83,18±0,04% và thấp nhất ở mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế sự hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt 0% (Bảng 5). Tiến hành xây dựng đường thể hiện khả năng ức chế hình thành hạt nhân CaOx và giá trị IC_{50} của cao chiết là 3,23 mg/mL. Kết

quả cao hơn Pareta [16], cao chiết *A. indica* Linn ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt 67,36% tại mức nồng độ 20%. Nirmaladevi [17], dịch trích hoa *H. rosa-sinensis* L. ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt khoảng 30% tại nồng độ 1,4 mg/mL. Agarwal [18], cao chiết *A. aspera* L. ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx đạt 60,06±0,19% ở nồng độ 1 mg/mL; cao chiết *B. pinnatum* L. đạt ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx 49,93±0,07% ở nồng độ 1 mg/mL. Trần Đức Tài [19], giá trị IC_{50} của cao chiết cây Bùm sụm cho hiệu quả ức chế hình thành hạt nhân tinh thể CaOx với IC_{50} = 1,76 mg/mL.



Hình 1. Mẫu đối chứng không có sự hiện diện của chất ức chế với sự hiện diện của các tinh thể COM (a); Mẫu cao chiết lá cây tram ổi 10 mg/mL trong mẫu có sự hiện diện của tinh thể COD mật độ thấp.

Khả năng ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx của cao chiết

Hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx đạt cao nhất là 80,19±0,09% ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL và thấp nhất, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx đạt 0% ở mẫu đối chứng. Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx và giá giá trị IC_{50} của Natri citrate là 1,70 mg/mL (Bảng 4).

Bảng 5: Kết quả ức chế hình thành hạt nhân, phát triển và ngưng tụ của tinh thể CaOx bằng cao chiết lá cây trâm ổi.

Nồng độ (mg/mL)	Ức chế hạt nhân (%)	Ức chế phát triển (%)	Ức chế ngưng tụ (%)
0	0^{l}	0^{l}	0^{l}
0,25	$10,98^{k}$±0,11	$13,97^{k}$±0,16	$22,90^{k}$±0,13
0,50	$27,38^{h}$±0,07	$32,68^{h}$±0,08	$33,19^{h}$±0,05
0,75	$30,11^{g}$±0,13	$37,07^{g}$±0,04	$44,59^{g}$±0,07
1	$35,01^{f}$±0,20	$42,69^{f}$±0,13	$52,19^{f}$±0,14
2	$42,02^{e}$±0,17	$53,16^{e}$±0,12	$64,75^{e}$±0,18
4	$55,09^{d}$±0,23	$62,09^{d}$±0,18	$79,89^{d}$±0,24
6	$62,05^{c}$±0,28	$70,29^{c}$±0,21	$86,16^{c}$±0,26
8	$71,09^{b}$±0,05	$76,98^{b}$±0,02	$61,01^{b}$±0,08
10	$83,18^{a}$±0,04	$49,36^{a}$±0,19	$55,03^{a}$±0,09
Phương trình, giá trị R^2	y = 7,6617x + 25,28 R^2 = 0,978	y = 13,265x + 27,306 R^2 = 0,972	y = 39,708x + 13,4 R^2 = 0,9939
IC_{50} (mg/mL)	3,23	1,67	0,92

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Tương tự, hiệu quả ức chế sự phát triển của tinh thể CaOx đạt cao nhất là 76,98±0,02% ở nồng độ cao chiết 8 mg/mL và thấp nhất, hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx đạt 0% ở mẫu đối chứng (Bảng 5). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể COM của cao chiết và giá trị IC_{50} của cao chiết là 1,67 mg/mL. Kết quả thấp hơn Nirmaladevi [17], cao chiết nước của *H. rosa-sinensis* Linn. hiệu quả ức chế sự phát triển tinh thể CaOx dưới 35% ở mức nồng độ 1,4 mg/mL và Kalpana [19], cao

chiết ethanol thân cây *B. cultivar* đạt hiệu quả 70% ức chế sự phát triển tinh thể CaOx ở nồng độ 1,6 mg/mL. Trần Đức Tài [20], cao chiết cây Bùm sụm ức chế sự phát triển tinh thể CaOx với IC_{50} = 1,5 mg/mL.

Hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx của cao chiết

Ngưng tụ (kết tụ tinh thể) là bước quan trọng nhất, vì nó diễn ra rất nhanh và có ảnh hưởng đáng kể đến kích thước hạt và các tinh thể kết tụ thường được tìm thấy trong nước tiểu và sỏi thận. Mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx đạt 0%; trong khi đó, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể CaOx đạt cao nhất 82,89±0,16% ở nồng độ Natri citrate 10 mg/mL (Bảng 4). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx và giá trị IC_{50} của Natri citrate là 1,54 mg/mL.

Tương tự, mẫu đối chứng, hiệu quả ức chế ngưng tụ tinh thể CaOx đạt 0%; trong khi đó, hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể CaOx đạt cao nhất 86,16±0,26% ở nồng độ cao chiết lá cây Trâm ổi 6 mg/mL (Bảng 5). Tiến hành xây dựng đường biểu diễn hiệu quả ức ngưng tụ tinh thể CaOx của cao chiết và giá trị IC_{50} của cao chiết là 0,92 mg/mL. Kết quả cao hơn Vyawahare [21], cao chiết lá cây *M. charantia* L. đạt hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi CaOx hơn 30% ở nồng độ 0,5 mg/mL. Agarwal [18] cây *P. niruri* L. hiệu quả ức chế ngưng tụ sỏi CaOx đạt mức 58,62%±0,02% ở nồng độ 1 mg/mL. Trần Đức Tài [20], cao chiết cây Bùm sụm cho hiệu quả ức chế ngưng tụ của tinh thể CaOx với IC_{50} = 0,8 mg/mL.

Thảo luận chung

Trong quá trình tạo cao chiết, dung môi ethanol 80% được sử dụng cho quá trình ly trích, nguyên nhân là do nếu sử dụng nước làm loại dung môi để ly trích thì mẫu trích nhiễm nhiều tạp chất như các acid hữu cơ, đường và protein tan trong nước ảnh hưởng tới quá trình định tính hay định lượng các hợp chất thiên nhiên. Ngoài ra, nếu sử dụng cồn tuyệt đối sẽ giảm hiệu suất chiết cao do ethanol khó thấm vào mẫu. Vì vậy, sử dụng ethanol 80% làm dung môi sẽ tạo một môi trường tối ưu cho việc ly trích, tăng sự tiếp xúc mẫu và dung môi, tăng hiệu suất trích ly và bảo quản mẫu khỏi các vi sinh vật [22]. Đồng thời, cấu trúc ethanol có nhóm OH vì vậy ethanol là chất phân cực nên có khả năng hoà tan các hợp chất có hoạt tính sinh học như tannin, flavonoid và ethanol ít độc hại và có giá thành thấp. Cao chiết lá cây trâm ổi có sự hiện diện của alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, flavonoid, tanin và phenol. Saranya [23], các hợp chất saponin, flavonoid và terpenoid có khả năng ức chế sự hình thành và làm tan tinh thể CaOx. Saponin có các đặc tính chống kết tinh bằng cách ngăn cản quá trình của mucoprotein, các chất thúc đẩy quá trình kết tinh. Flavonoid ức chế sự kết tinh CaOx ở nước tiểu của người cũng như trong các mô hình động vật và lắng đọng tinh thể [24].

Các hợp chất muối citrate là các chất ức chế quá trình hình thành sỏi CaOx và Calcium phosphate. Chúng tạo thành các phức chất với ion Calcium nên làm giảm nồng độ tinh thể CaOx, tăng hiệu quả ức chế ngưng tụ và kết tinh của sỏi bằng cách tăng hoạt tính của các urine macromolecule. Natri citrate hay Kali citrate giúp tăng độ hòa tan của acid uric, do đó ngăn ngừa sự kết tủa muối CaOx [25]. Vì vậy, Natri Citrate là chất chuẩn cho thí nghiệm ức chế quá trình hình thành sỏi CaOx, gồm ba giai đoạn: hạt nhân, phát triển và ngưng tụ.

Bước đầu tiên của sự hình thành sỏi là sự hình thành hạt nhân, các hạt nhân là các mầm tinh thể hoặc khi không có mầm tinh thể hạt nhân có thể là tạp chất khác [17]. Hiệu quả ức chế sự hình thành sỏi thận CaOx của cao chiết và Natri citrate được đánh giá qua giá trị IC_{50}. Kết quả, giá trị IC_{50} của cao chiết 3,26 mg/mL cao hơn IC_{50} của Natri citrate là 1,16 mg/mL. Nguyên nhân là do Natri citrate là một loại hợp chất hóa học kết hợp mạnh với ion Ca^{2+} tạo thành muối tan giảm mật độ của tinh thể nhanh chóng hơn so với cao chiết

[20, 25]. Hiệu quả ức chế của cao chiết thấp hơn Natri citrate là do tinh thể COD có ái lực so với màng tế bào thấp hơn so với tinh thể COM, nên khó bám vào màng tế bào gây sỏi thận, dễ dàng loại thải qua đường tiết niệu và không gây tổn thương đến hệ thống tiết niệu. Tinh thể COM có thể chuyển thành tinh thể COD hay giảm mật số là do sự hiện diện của các hợp chất thiên nhiên thuộc nhóm flavonoid [18]. Vì vậy, ở mẫu có cao chiết chủ yếu có sự xuất hiện của tinh thể COM với mật độ thấp là do cao chiết có chứa các hợp chất flavonoid, saponin và terpenoid.

Theo Agarwal và Varma [26], bước tiếp theo là sự phát triển của tinh thể (Growth) theo phản ứng: $CaCl_2 + Na_2C_2O_4 => CaC_2O_4 + NaCl$. Bởi vì phản ứng của $CaCl_2$ và $Na_2C_2O_4$ với mầm tinh thể khiến cho các tinh thể CaOx bao phủ lên bề mặt tinh thể [17]. Chất chuẩn Natri citrate có IC_{50} = 1,70 mg/mL cao hơn IC_{50} của cao chiết là IC_{50} = 1,67 mg/mL nên cao chiết có khả năng ức chế mạnh quá trình phát triển của tinh thể CaOx do có khả năng hình thành các hợp chất tan với ion calcium và ion oxalate làm giảm khả năng hình thành sỏi [19, 23]. Cao chiết lá cây Trâm ổi có khả năng ức chế sự phát triển của sỏi CaOx bằng cách bao phủ bên ngoài các hạt tinh thể nên ngăn cản khả năng kết hợp của chúng, ngoài ra các hợp chất thiên nhiên còn tương tác và ngăn cản sự kết hợp của ion Calcium và ion Oxalate, ngăn ngừa sự phát triển của sỏi [27]. Khi tăng nồng độ (10 mg/mL), hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết gia tăng sự hình thành của các tinh thể COD lên và giảm sự hình thành của COM, những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết lá cây Trâm ổi có khả năng ức chế phát triển.

Bước cuối cùng là ngưng tụ (Aggregation), các tinh thể CaOx sẽ tụ lại một khối nhờ các lực liên kết hóa học, tĩnh điện và sẽ ổn định lại cấu trúc và kích thước của sỏi [28]. Natri citrate có IC_{50} = 2,68 mg/mL cao hơn IC_{50} của cao chiết là IC_{50} = 1,13 mg/mL. Cao chiết lá cây Trâm ổi có khả năng ức chế mạnh giai đoạn ngưng tụ là do các hợp chất thiên nhiên trong cao chiết bao phủ bên ngoài các tinh thể khiến chúng không thể kết tụ lại với nhau và cây trâm ổi có chứa các hợp chất saponin, terpenoid là những chất có khả năng ức chế sự hình thành sỏi bằng cách tương tác ức chế với các mucoprotein, nguyên nhân chính gây sự quá bão hòa của các tinh thể COM, khiến chúng ngưng tụ tạo nên sỏi, nên hiệu quả ức chế của cao chiết sẽ tăng lên khi được nghiên cứu ở động vật. Tuy nhiên khi tăng mức nồng độ của cao chiết (8-10 mg/mL), hiệu quả ức chế giảm là do cao chiết giảm sự hình thành của các tinh thể COD lên nhiều lần, gia tăng sự hình thành của COM, nhưng những tinh thể COD không có ái lực lớn nên có thể dễ dàng có thể loại thải ra ngoài, không những thế giảm sự quá bảo hòa của tinh thể CaOx trong cơ thể, giảm nguy cơ sỏi thận nên cao chiết lá cây Trâm ổi có khả năng ức chế ngưng tụ [29].

KẾT LUẬN

Cao chiết ethanol của lá cây trâm ổi có khả năng ức chế sự hình thành, phát triển, ngưng tụ tinh thể CaOx gây bệnh sỏi thận trong điều kiện in vitro với giá trị IC_{50} lần lượt là 3,23 mg/mL; 1,67 mg/mL và 0,92 mg/mL. Tiếp tục nghiên cứu đánh giá hiệu quả của cao chiết trong điều kiện in vivo và phân tách các hợp chất có khả năng ức chế tinh thể CaOx từ cao chiết lá cây Trâm ổi.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Trinchieri, A. (2006). Epidemiological trends in urolithiasis. Impact on our health care systems. *Urol Res*, 34, 151-156.
[2] Abbagani, S., Gundimeda, S.D., Varre, S., Ponnala, D. & Mundluru, H,P. (2010). Kidney stone disease. Etiology and evaluation. *Int J Appl Biol Pharm Tech* 1, 175-182.
[3] Verkoelen, C.F., Boeve, E.R., Cao L.C., Schroder, F.H. (1995). Association of calcium oxalate monohydrate crystals with MDCK cells. *Kidney Int*, 48,129-138.
[4] Aboumarzouk O.M., Kata S.G., and Nabi G. 2012. Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL) versus ureteroscopic management for ureteric calculi. *Cochrane Database of Syst Rev*, 5 :1-46.
[5] Knoll T. (2007). Stone disease. *Eur Urol Suppl*, 6: 717-722
[6] Venkatachalam T, Kishor V, Kalai P, Avinash M. and Senthil N. 92011). Physicochemical and preliminary phytochemical studies on the *Lantana camara Fruits*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(1): 5251-5254.
[7] Sasikala, V., S. Radha and B. Vijayakumari. In vitro evaluation of *Rotula aquatica* Lour. for antiurolithiatic activity, journal of pharmacy research 6 (2013) 378-382.
[8] Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S.K. and Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International J.of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5): 539-542.
[9] Phatak, R.S., and Hendre, A.S. (2015). In-vitro antiurolithiatic activity of Kalanchoe pinnata extract. *Inter Jour of Pharma and Phyto Research*, 7: 275-279.
[10] Chaudhary, A., Singla, S.K. and Tandon, C. (2010). In vitro evaluation of *Terminalia arjuna* on calcium phosphate and calcium oxalate crystallization. *Indian journal of pharmaceutical sciences, 72* (3): 340-345.
[11] Saha, S., and Ramtej, J.V. (2013). Inhibition of calcium oxalate crystallisation in vitro by an extract of *Bergenia ciliata. Arab J. of Urology*, 11: 187-192.
[12] Hess, B., Nakagawa, Y. and Coe, F.L. (1989). Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystal aggregation by urine proteins. *Am. J. Physiol*., 257: 99-106.
[13] Müller, I.M. and Heindl, A.L. (2006). Drying of medicinal plants. *Medicinal and aromatic plants*, pp. 237-252.
[14] Akumu EO, Swamy A, and Miyogo E. (2014). Phytopharmacological evaluation of *Lantana camara* leaves' smoke. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences 2014; 4 (2): 28-34.
[15] Sushama RR. (2017). Preliminary phytochemical screening of *L. camara* L., a major invasive species of Kerala using different solvents. *Annals of plant Science* 6 (11): 1794-1798.
[16] Pareta, S.K., Patra, K.C. and Harwansh, R. (2011). In-vitro Calcium oxalate crystallization inhibition by *Achyranthes indica* linn. Hydroalcoholic extract: An approach to antilithiasis. *Int. J. Pharm. Bio. Sci, 2*: 432-437.
[17] Nirmaladevi, R., Kalpana, S. and Padma, R. (2012). Evaluation of antilithiatic potential of *H. rosa-sinensis* L, in vitro. *Journal of Phar Research, 5* (8): 4353-4356.
[18] Agarwal, K., and Varma, R. (2015). In-vitro Calcium oxalate crystallization inhibition by *Achyranthes aspera* L. and *Bryophyllum pinnatum* Lam. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (2): 146-152.
[19] Kalpana, S., Rai, T.S. and Karthika, P. (2013). Inhibition of Calcium oxalate crystallization in vitro by extract of *Banana cultivar* monthan. *International J. of P. and Pharmaceutical Sciences*, 5 (4): 649-653.

[20] Trần Đức Tài. (2016). Ảnh hưởng của dịch trích lá và thân cây Bùm sụm (*Carmona microphylla* L.) lên sự ức chế hình thành tinh thể Calcium oxalate gây bệnh sỏi thận trong điều kiện in vitro. Luận văn tốt nghiệp Đại học, ngành Công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ.

[21] Vyawahare, J.N., Shelke, P.A., Aragade, P.D. and Baheti, D.G. (2014). Inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by extract of *Momordica charantia* Linn. *International Journal Of Pharmaceutical And Chemical Sciences*, 3 (2): 448-452.

[22] Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hach, A., Saad, Z. and Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from *Lebanese Urtica Dioica*. *American J. of Phytomedicine and C. Therapeutics*, 6: 507-513.

[23] Saranya, R., and Geetha, N. (2014). Inhibition of calcium oxalate (caox) crystallization in vitro by the extract of beet root (*Beta Vulgais* L.). *International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (2): 361-365.

[24] Joshi, V.S, Parekh, B.B., Joshi, M.J., and Vaidya, A.B. (2005). Herbal extract of *Tribulus terrestris* and *Bergenia ligulata* inhibit of calcium oxalate monohydrate crystals in vitro. *J. Cyst. Growth*, 275: 1403-1408.

[25] De Cógáin, M.R., Linnes, M.P., Lee, H.J., Mendonça Uchôa J.C., Kim, S.H. and Lieske, J.C. (2015). Aqueous extract of *Costus arabicus* inhibits calcium oxalate crystal growth and adhesion to renal epithelial cells. *Urolithiasis*, 43 (2): 119-124.

[26] Gupta, M., Bhayana, S. and Sikka, S.K. (2011). Role of urinary inhibitors and promoters in calcium oxalate crystallisation. *International J. of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1: 793-798.

[27] Agarwal, K., and Varma, R. (2014). Investigating Antiuroliathiatic Potential of *Phyllanthus niruri* L. A Member of the Family *Euphorbiaceae*. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2 (7): 823-831.

[28] Yu, H., R. Sheikholeslami and W.O.S. Doherty. (2005). Calcium oxalate crystallization in silica and sugar solutions-characterization of crystal phases and habits. *Powder technology*, 160(1): 2-6.

[29] Atmani, F., and Khan, S.R. (2000). Effects of an extract from *Herniaria hirsuta* on calcium oxalate crystallization in vitro. *Bju International*, 85 (6): 621-625.

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN TRÍCH LY ĐẾN HÀM LƯỢNG POLYPHENOL VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA VỎ CHANH DÂY (*Passiflora edulis*)

Phan Thế Duy*, Nguyễn Thị Tố Oanh

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: duypt@hufi.edu.vn

TÓM TẮT

Vỏ của chanh dây được xử lý theo hai phương pháp là trích ly truyền thống và trích ly có sự hỗ trợ của siêu âm nhằm mục đích là thu được hàm lượng polyphenol cao nhất và đánh giá khả năng kháng oxy hóa của chúng. Kết quả cho thấy, có mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa. Đối với phương pháp trích ly truyền thống, hàm lượng polyphenol thu được cao nhất ở điều kiện sử dụng dung môi methanol với tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/ml) trong thời gian 60 phút tại nhiệt độ 60ºC. Tại điều kiện này, hàm lượng polyphenol thu được 6,19 mg GAE/g CKNL, khả năng kháng oxy hóa được đánh giá bằng phương pháp DPPH, FRAP, ABTS lần lượt là 446,10 µg/ml; 3,32 mg Fe^{2+}/g CKNL; 12,93 mg TE/g CKNL. Khi có sự hỗ trợ của siêu âm, hàm lượng polyphenol thu được cao nhất ở điều kiện sử dụng dung môi trích ly là methanol, công suất 45% trong thời gian 12 phút và tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/40 (g/ml). Tại điều kiện này, hàm lượng polyphenol là 7,35 mg GAE/g CKNL, đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH, FRAP, ABTS lần lượt là 344,06 µg/ml; 3,89 mg Fe^{2+}/g CKNL; 14,67 mg TE/g CKNL.

Từ khóa: *Chanh dây, Passiflora edulis, polyphenol, DPPH, FRAP, ABTS.*

EFFECT OF EXTRACTION CONDITIONS ON TOTAL POLYPHENOL CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PASSION FRUIT (*Passiflora edulis) PEELS*

Phan The Duy*, Nguyen Thi To Oanh

Ho Chi Minh City University of Food Industry

*Corresponding author: *duypt@hufi.edu.vn*

ABSTRACT

Passion fruit peel has been extracted by two methods, traditional extraction and ultrasonic-assisted extraction in order to obtain the highest polyphenol content and to assess their antioxidant activity. Results showed that there is a correlation between polyphenol content and antioxidant activity. For the traditional extraction method, the highest polyphenol content obtained under conditions of using methanol solvent with the ratio of material/solvent was 1/20 (g/ml) for 60 minutes at a temperature for 60°C. Under these conditions, the polyphenol content is 6.19 mg GAE/g CKNL, the ability to resist oxidation by DPPH, FRAP, ABTS methods is 446.10 µg/ml, 3.32 mg Fe^{2+}/g CKNL; 12.93 mg TE/g CKNL, respectively. With the ultrasound assisted extraction method, the highest polyphenol content obtained under the use of methanol for solvent, power capacity for 45%, the run time for 12 minutes and material/solvent ratio for 1/40 (g/ml). Under these conditions, the polyphenol content is 7.35 mg GAE/g CKNL, the ability to antioxidant determined by DPPH, FRAP, ABTS methods is 344.06 µg/ml, 3.89 mg Fe^{2+}/g CKNL, 14.67 mg TE/g CKNL, respectively.

Keyword: *Passion fruit peel, Passiflora edulis, polyphenol, DPPH, FRAP, ABTS.*

TỔNG QUAN

Chanh dây (*Passiflora edulis*) còn được gọi là Lạc tiên, Chanh leo, Dây mát,…thuộc họ Passifloraceae, là một trong những trái cây được trồng phổ biến ở Việt Nam. Hiện tại

chanh dây chủ yếu dùng để sản xuất nước ép cô đặc và một số sản phẩm nước giải khát khác. Việc khai thác chanh dây chỉ để sản xuất nước trái cây đã và đang tạo ra áp lực lớn với môi trường trong việc xử lý các phế phụ phẩm như vỏ và hạt chanh dây bởi phần không ăn được chiếm hơn một nửa khối lượng quả (Corrêa et al., 2016). Như vậy, để hạn chế vấn đề ô nhiễm môi trường cũng như gia tăng giá trị phụ phẩm thì việc biến những phụ phẩm thành những sản phẩm có giá trị cao đang rất được quan tâm.

Kết quả các nghiên cứu cho thấy rằng, các chất thải từ thực phẩm như vỏ trái cây, rau củ quả là những phụ phẩm tốt chứa các nguồn polyphenol, carotenoid cùng các chất có hoạt tính sinh học khác với tác dụng có lợi cho sức khỏe con người, giúp kháng khuẩn và ngăn ngừa các loại bệnh mãn tính (Dai and Mumper, 2010). Trong số các chất chống oxy hóa tự nhiên trong trái cây và phụ phẩm của chúng thì polyphenol là nhóm chất đang rất được quan tâm. Sự quan tâm đến hợp chất này dựa trên sự hiểu biết sâu hơn về vai trò của các gốc tự do trong sự tiến triển của những loại bệnh ung thư, xơ vữa động mạch cùng các quá trình kháng viêm. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh polyphenol cũng như các hoạt chất kháng oxy hóa có trong vỏ và hạt chanh dây có tác dụng điều trị bệnh tiểu đường, huyết áp và giảm "Stress oxy hóa" (Corrêa et al., 2016). Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích đánh giá sự ảnh hưởng của các yếu tố trích ly đến khả năng thu nhận polyphenol, hoạt tính chống oxy hóa trong cả hai phương pháp là trích ly truyền thống và trích ly có hỗ trợ siêu âm đối với nguyên liệu là vỏ chanh dây. Đây là cơ sở để xây dựng quy trình tối ưu hóa quá trình trích ly polyphenol cũng như phát triển các sản phẩm mới nhằm nâng cao giá trị của chanh dây.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu và dụng cụ

Vỏ chanh dây tím (*Passiflora edulis Sims*) thu mua tại tỉnh Tây Ninh. Vỏ tươi được loại bỏ lớp vỏ trắng bên trong, rửa sạch và sấy đối lưu ở nhiệt độ 50^{o}C trong 12 giờ để đạt độ ẩm khoảng 5,00%. Sau đó, vỏ khô được nghiền nhỏ, rây để đạt kích thước nhỏ hơn 2 mm và bảo quản trong các túi PE nhỏ.

Axit galic, thuốc thử Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhdrazyl), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic axit), Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethyl-2-carbocylic axit), TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) và một số hóa chất khác.

Phương pháp nghiên cứu

Quy trình trích ly polyphenol

Cân 2 g bột vỏ chanh dây vào bình tam giác, bổ sung dung môi và thực hiện quá trình trích ly theo phương pháp ngâm chiết truyền thống và trích ly có hỗ trợ siêu âm. Các mẫu dịch sau khi trích ly được đem đi lọc bằng giấy lọc để loại bỏ bã và cô quay chân không nhằm đuổi dung môi thu được cao chiết. Quá trình cô quay được thực hiện trên thiết bị cô quay chân không Eyela (Japan) với nhiệt độ được giữ cố định ở 45^{o}C, cho đến khi khối lượng bình cầu đựng mẫu (cao chiết) không đổi. Cao chiết thu được từ các khảo sát được bảo quản và thực hiện đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa bằng các phương pháp khác nhau.

Bố trí thí nghiệm

Phương pháp nghiên cứu đơn yếu tố được sử dụng, các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các thí nghiệm được bố trí với mục tiêu nghiên cứu sự ảnh hưởng của các yếu tố khảo sát đến hàm lượng polyphenol tổng và khả năng kháng oxy hóa, đồng thời tìm ra điều kiện trích ly tối ưu nhằm thu được hàm lượng polyphenol tổng lớn nhất.

Trong quá trình ngâm chiết, các yếu tố được lựa chọn để khảo sát bao gồm loại dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, nhiệt độ trích ly, thời gian trích ly. Để nghiên cứu ảnh hưởng của loại dung môi trích ly, sử dụng 3 loại dung môi khác nhau bao gồm: methanol, ethanol và nước. Các thông số khác được cố định: tỷ lệ nguyên liệu/dung môi, thời gian và nhiệt độ trích ly lần lượt là 1/10, 60 phút và 50^{o}C. Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi trích ly được nghiên cứu ở các mức 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 (g/ml). Thông số được giữ cố định bao gồm: dung môi được chọn ở thí nghiệm trên, thời gian 60 phút ở nhiệt độ 50^{o}C. Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly được nghiên cứu ở các mốc 30, 40, 50, 60 và 65^{o}C. Thông số được giữ cố định bao gồm: dung môi, tỷ lệ nguyên liệu/dung môi được chọn ở thí nghiệm trên, nhiệt độ 50^{o}C. Thời gian trích ly khảo sát từ 40-140 phút, bước nhảy 20 phút. Các thông số còn lại được cố định theo kết quả của các thí nghiệm trước.

Đối với trích ly có hỗ trợ siêu âm, thiết bị phát sóng siêu âm Sonics (công suất cực đại W_{max} = 750 W, tần số 20 kHz) được sử dụng, đầu phát siêu âm được nhúng ngập vào nguyên liệu > 2 cm tại tâm cốc chứa mẫu. Các yếu tố cố định ban đầu là sử dụng dung môi methanol trong thời gian siêu âm 6 phút với tỉ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/20 (g/ml). Các yếu tố khảo sát gồm: công suất phát siêu âm (30, 35, 40, 45 và 50% W_{max}), thời gian siêu âm (3-15 phút, với bước nhảy 3 phút), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50 g/ml). Những điều kiện khảo sát này đã được thăm dò trước nhằm đảm bảo không thất thoát dung môi do bay hơi.

Phương pháp phân tích

Xác định hàm lượng polyphenol tổng (TPC) bằng phương pháp so màu (Phương pháp Folin Ciocalteau)

Dựa vào phản ứng oxy hóa các hợp chất polyphenol bằng thuốc thử Folin-Ciocalteaul, thuốc thử này dùng axit phospho-vonfamic, trong quá trình khử các nhóm hydroxy phenol dễ bị oxy hóa, chất oxy hoá này sinh ra màu xanh có độ hấp thu cực đại ở bước sóng 765 nm.

Hút 1 ml mẫu đã pha loãng thêm 5 ml dung dịch Folin 10%, để yên trong 3 phút, sau đó bổ sung thêm 4 ml Na_2CO_3 7,5%, lắc đều, ủ trong 30 phút. Tiến hành đo độ hấp thu bằng máy quang phổ UV-VIS ở bước sóng 765 nm. Axit galic được sử dụng làm chất chuẩn ($y = 0,0108x + 0,0272$, $R^2 = 0,9992$), kết quả được biểu diễn bằng số mg axit galic tương đương trong 1 g chất khô nguyên liệu (mg GEA/g CKNL).

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Phương pháp này sử dụng 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) có khả năng tạo gốc tự do bên trong dung dịch methanol bão hòa. Khi có mặt chất chống oxy hóa, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl sẽ bị khử thành 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H), màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt, được xác định bằng độ hấp thu quang của dung dịch sau phản ứng đo tại bước sóng 517 nm (Garcia et al., 2012).

Quy trình thực hiện như sau: Bổ sung 5 ml DPPH (0,08 mM, pha trong methanol) vào mỗi ống nghiệm tối màu đã chứa 1 ml mẫu cao chiết đã pha loãng tại các nồng độ khác nhau. Để yên 30 phút trong bóng tối sau đó, tiến hành đo giá trị độ hấp thu tại bước sóng 517 nm. Mẫu trắng được thực hiện tương tự thay 1 ml mẫu bằng 1 ml methanol. Tỷ lệ phần trăm hoạt tính ức chế được xác định dựa vào sự khác nhau về độ hấp thu của mẫu trắng và mẫu thí nghiệm. Giá trị IC_{50} - khả năng ức chế 50% gốc tự do DPPH, được xác định dựa vào phương trình hồi quy của tỷ lệ phần trăm ức chế và nồng độ cao chiết. Giá trị này càng thấp chứng tỏ khả năng kháng oxy hóa càng cao.

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp $ABTS^+$

Phương pháp dựa trên khả năng làm giảm độ hấp thu của gốc tự do cation $ABTS^+$ bởi các hoạt chất có hoạt tính chống oxi hóa ở bước sóng 734 nm được mô tả bởi Nenadis và cộng sự (2004). Khi cho tác nhân chống oxy hóa vào dung dịch chứa $ABTS^+$, các tác nhân chống oxy hóa sẽ khử ion này thành ABTS. Cường độ màu của $ABTS^+$ tỷ lệ nghịch với các chất chống oxi hóa và thời gian phản ứng (Nenadis et al., 2004).

Hút 0,1 ml dịch chiết đã pha loãng theo các tỷ lệ cho vào ống nghiệm, cho thêm 3,9 ml $ABTS^+$. Lắc đều, ủ trong bóng tối 30 phút. Sau đó đem đi đo quang ở bước sóng 734 nm. Trolox được sử dụng làm chất chuẩn ($y = 0,4496x + 1,0222$, $R^2 = 0,9827$), kết quả được biểu diễn bằng số mg Trolox tương đương trong 1 g chất khô nguyên liệu (mg TE/g CKNL)

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp khử sắt (FRAP)

Phương pháp này dựa trên khả năng của các chất chống oxy hóa trong việc khử phức Fe^{3+} TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) (màu tía) thành phức Fe^{2+}-TPTZ (màu xanh dương đậm) ở pH thấp. Khi đó, độ tăng cường độ màu xanh tỷ lệ với hàm lượng chất chống oxy hóa có trong nguyên liệu. Mức độ tăng cường độ màu này được đo ở bước sóng 593 nm trong sự so sánh với chất chuẩn là dung dịch Fe^{2+} (Benzie and Strain, 1996).

Lấy 0,01 ml dịch chiết đã pha loãng vào ống nghiệm, cho thêm 4 ml FRAP. Lắc đều, ủ trong 15 phút ở 37°C. Sau đó đem đi đo quang ở bước sóng 593 nm và tính toán dựa trên phương trình đường chuẩn FRAP (Fe^{2+}): $y = 0,0284x + 0,0055$ với $R^2 = 0,9998$. Kết quả được biểu diễn bằng số mg Fe^{2+} tương đương trong 1 g chất khô nguyên liệu (mg Fe^{2+}/g CKNL).

Phương pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± giá trị sai số. Kết quả được xử lý bằng phần mềm thống kê Minitab 18. Kết quả phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) với độ tin cậy 95% được sử dụng để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử Tukey.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của điều kiện trích ly truyền thống đến hàm lượng polyphenol tổng

Ảnh hưởng của loại dung môi đến lượng polyphenol thu được và khả năng kháng oxy hóa

Với kỹ thuật trích ly rắn–lỏng thì việc lựa chọn dung môi phù hợp là rất quan trọng, có tính chất quyết định đến hiệu quả quá trình trích ly. Các thông số cần quan tâm của dung môi là độ phân cực, moment lưỡng cực, liên kết hydro, độ nhớt,… Theo nguyên tắc thì các dung môi phân cực hòa tan các hợp chất phân cực tốt nhất còn các dung môi không phân cực sẽ hòa tan các hợp chất không phân cực tốt nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của loại dung môi đến lượng polyphenol thu được và khả năng kháng oxy hóa

Dung môi	TPC (mg GEA/g CKNL)	DPPH-IC_{50} (µg/ml)	FRAP (mg Fe^{2+}/g CKNL)	ABTS (mg TE/g CKNL)
Methanol	$4,09±0,17^a$	$523,81±5,41^b$	$2,24±0,04^a$	$7,26±0,24^a$
Ethanol	$1,52±0,03^b$	$686,51±31,32^a$	$1,06±0,05^b$	$2,86±0,13^b$
Nước	$1,40±0,04^b$	$691,47±26,48^a$	$1,01±0,05^b$	$2,49±0,11^b$

$^{(a,b}$ Các giá trị có ký tự ở trên khác nhau nằm trong cùng một cột thì khác nhau có ý nghĩa ($p<0,05$))

Kết quả xử lý thống kê ở mức ý nghĩa 5% cho thấy loại dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng polyphenol tổng và khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Lượng polyphenol tổng thu được từ quá trình sử dụng dung môi là methanol là cao nhất (4,09 mg

GAE/g CKNL) và dung môi nước là thấp nhất (1,40 mg GAE/g CKNL). Điều này có thể được giải thích là do tính chất của dung môi methanol có khả năng hòa tan polyphenol tốt hơn mà không hòa tan thành phần polysacharide,.. trong bột vỏ chanh dây. Ngoài ra, dung môi nước có độ phân cực mạnh hơn methanol và ethanol nên trong quá trình trích ly thì ngoài polyphenol được trích ly thì còn lôi cuốn thêm nhiều hợp chất đại phân tử khác như polysaccharide, protein,..gây ảnh hưởng đến độ chính xác của các phép thử định lượng và hoạt tính riêng của polyphenol (Dai and Mumper, 2010). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu về các hợp chất phenolic của vỏ chuối (*Musa paradaisica L.)* (Aboul-Enein et al., 2016).

Kết quả ảnh hưởng của loại dung môi đến hả năng kháng oxy hóa của thể hiện qua ba phương pháp DPPH, ABTS và FRAP đều cho kết quả tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết. Việc dùng dung môi methanol để trích ly polyphenol sẽ cho kết quả cao nhất cả về hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính chống oxy hóa so với các dung môi khác trong khảo sát.

Ảnh hưởng của tỉ lệ nguyên liệu/dung môi đến tổng hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa

Thông thường với khối lượng nguyên liệu cố định thì khi tăng tỉ lệ nguyên liệu/dung môi sẽ làm tăng hiệu suất trích ly tuy nhiên việc sử dụng lượng dung môi quá lớn sẽ gây lãng phí dung môi, tăng chi phí sản xuất. Khi sử dụng quá ít dung môi thì hiệu suất trích ly thấp do lượng dung môi không đủ để hòa tan lượng chất cần chiết trong nguyên liệu. Như vậy, việc lựa chọn tỷ lệ nguyên liệu/dung môi sao cho hiệu suất trích ly cao và giảm thiểu chi phí sản xuất là rất cần thiết.

Bảng 1. Sự ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi đến hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa

Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	**TPC (mg GEA/g CKNL)**	**DPPH-IC_{50} (µg/ml)**	**FRAP (mg Fe^{2+}/g CKNL)**	**ABTS (mg TE/g CKNL)**
1/10	$4,09\pm0,17^{b}$	$523,81\pm5,41^{a}$	$2,24\pm0,06^{b}$	$7,26\pm0,24^{b}$
1/20	$5,69\pm0,20^{a}$	$501,32\pm12,25^{b}$	$3,29\pm0,10^{a}$	$11,38\pm0,26^{a}$
1/30	$5,73\pm0,13^{a}$	$484,41\pm4,42^{bc}$	$3,32\pm0,03^{a}$	$11,44\pm0,23^{a}$
1/40	$5,85\pm0,10^{a}$	$469,54\pm9,10^{c}$	$3,40\pm0,05^{a}$	$11,60\pm0,26^{a}$

(^{a,b} Các giá trị có ký tự ở trên khác nhau nằm trong cùng một cột thì khác nhau có ý nghĩa ($p<0,05$))

Kết quả xử lý thống kê với mức ý nghĩa 5% cho thấy tỷ lệ dung môi ảnh hưởng có ý nghĩa đến hàm lượng polyphenol thu được và khả năng kháng oxy của mẫu bột vỏ chanh dây ở các tỷ lệ khảo sát. Khi tăng lượng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi từ 1/10 đến 1/40 thì hàm lượng polyphenol trích ly cũng tăng theo. Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ nguyên liệu/dung môi lên 1/30; 1/40 thì độ tăng hàm lượng polyphenol không khác biệt có nghĩa. Kết quả như vậy được giải thích là do khi lượng dung môi càng lớn thì lượng polyphenol thu được càng cao do tạo ra được sự chênh lệch nồng độ cần thiết bên trong và bên ngoài môi trường, tức là luôn có động lực cho quá trình. Nhưng khi ngâm chiết với lượng dung môi quá nhiều, trong khi hàm lượng polyphenol là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha làm hiệu quả trích ly polyphenol không tăng, có xu hướng tiệm cận ngang. Để tránh lãng phí dung môi, tiết kiệm chi phí mà vẫn đảm bảo hiệu suất cao, ta chọn tỷ lệ 1/20 là mốc thu được hàm lượng polyphenol cao nhất trong các tỷ lệ khảo sát và được lựa chọn để thực hiện các khảo sát tiếp theo.

Ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến lượng polyphenol thu được và khả năng kháng oxy hóa

Nhiệt độ trích ly là một yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu suất thu hồi cao chiết, hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa, ngoài ra nó còn ảnh hưởng đến chi phí và chất lượng của dịch chiết polyphenol.

Bảng 2. Sự ảnh hưởng của nhiệt độ trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa

Nhiệt độ (ºC)	TPC (mg GEA/g CKNL)	DPPH-IC_{50} (µg/ml)	FRAP (mg Fe^{2+}/g CKNL)	ABTS (mg TE/g CKNL)
30	4,25±0,12^{c}	628,45±13,67^{a}	2,95±0,06^{c}	10,27±0,25^{c}
40	4,36±0,15^{c}	582,94±20,61^{b}	3,01±0,06^{b}	10,32±0,28^{c}
50	5,69±0,20^{b}	516,62±6,45^{c}	3,29± 0,10^{a}	11,38±0,26^{b}
60	6,19±0,21^{a}	498,17±6,34^{c}	3,32± 0,05^{a}	12,93±0,31^{a}
65	5,56±0,11^{b}	517,10±18,77^{c}	3,36±0,04^{a}	13,11±0,53^{a}

(^{a,b,c} Các giá trị có ký tự ở trên khác nhau nằm trong cùng một cột thì khác nhau có ý nghĩa ($p<0,05$))

Qua số liệu ở Bảng 3, nhận thấy hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa của bột vỏ chanh dây có tăng theo nhiệt độ trích ly. Cụ thể, ở khoảng nhiệt độ từ 30-60ºC hàm lượng polyphenol tăng dần đến nhiệt độ 60ºC thì hàm lượng polyphenol thu được là lớn nhất (6,19 mg GAE/g CKNL). Điều này có thể được giải thích là do nhiệt độ cao thì thúc đẩy sự xâm nhập của dung môi vào nguyên liệu, làm giảm độ nhớt của dung môi, tăng khuếch tán phân tử từ trong nguyên liệu ra bên ngoài và chiết rút nhiều polyphenol.Tuy nhiên, khi nhiệt độ trích ly đạt 65ºC thì hàm lượng polyphenol giảm do ở nhiệt độ 65ºC là nhiệt độ cao hơn nhiệt độ sôi của dung môi methanol (64,7ºC) nên làm tăng sự thất thoát của dung môi ra môi trường đồng thời nhiệt độ cao cũng làm giảm một số hoạt chất sinh học có trong mẫu. Kết quả này phù hợp với công bố của Ruenroengklin và cộng sự (2008) khi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết polyphenol từ vỏ vải cho thấy khi nhiệt độ tăng từ 40ºC đến 60ºC, hiệu quả chiết polyphenol tăng nhưng sau đó hiệu quả chiết polyphenol không tăng khi tăng nhiệt độ từ 60ºC đến 70ºC (Pinelo et al., 2005).

Việc tăng nhiệt độ trích ly một cách thích hợp làm tăng khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Do hàm mục tiêu là chọn ra thông số thu được hàm lượng polyphenol là lớn nhất nên 60ºC được chọn là nhiệt độ trích ly để tiến hành khảo sát ở các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của thời gian trích ly đến lượng polyphenol thu được và khả năng kháng oxy hóa

Bảng 3. Sự ảnh hưởng của thời gian trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa

Thời gian (phút)	TPC (mg GEA/g CKNL)	DPPH-IC_{50} (µg/ml)	FRAP (mg Fe^{2+}/g CKNL)	ABTS (mg TE/g CKNL)
40	5,15±0,16^{c}	533,02±8,56^{a}	2,82±0,05^{b}	12,05±0,08^{b}
60	6,19±0,21^{ab}	446,23±21,01^{c}	3,32±0,05^{a}	12,93±0,31^{ab}
80	6,20±0,12^{ab}	469,10±14,49^{bc}	3,15±0,08^{a}	13,28±0,65^{ab}
100	6,50±0,09^{a}	498,17±6,35^{ab}	3,25±0,11^{a}	13,67±0,67^{a}
120	6,15±0,10^{ab}	514,70±12,74^{a}	3,21±0,05^{a}	13,49±0,63^{a}
140	5,15±0,16^{c}	533,02±8,56^{a}	2,82±0,05^{b}	12,05±0,08^{b}

([a,b,c] Các giá trị có ký tự ở trên khác nhau nằm trong cùng một cột thì khác nhau có ý nghĩa (p<0,05))

Theo kết quả được biểu diễn ở Bảng 4, hàm lượng TPC thu được cao nhất ở 100 phút (6,50 mg GAE/g CKNL) và ở 140 phút thì bị giảm ở mức có ý nghĩa. Ở khoảng thời gian đầu từ 40 phút đến 100 phút khi nồng độ các chất trong dung môi còn thấp thì tốc độ hòa tan các chất vào trong dung môi trích ly còn cao. Nhưng khi tăng thời gian từ 100 phút đến 140 phút, hàm lượng polyphenol bắt đầu giảm bởi thời gian trích ly dài làm polyphenol dễ bị oxy hóa bởi các enzyme oxy hóa có trong nguyên liệu. Mặc dù hàm lượng polyphenol thu được ở điều kiện 100 phút là cao nhất nhưng nó không có sự khác biệt có nghĩa ở mức 5% so với 60 phút. Nên để tiết kiệm thời gian cũng như chi phí trích ly, có thể lựa chọn thời gian trích ly phù hợp là 60 phút.

Ảnh hưởng của điều kiện trích ly có hỗ trợ siêu âm đến hàm lượng polyphenol tổng

Trong nhiều nghiên cứu trước đây đã chỉ ra, tác nhân siêu âm đóng vai trò quan trọng trong việc hỗ trợ cho quá trình trích ly các hợp chất tự nhiên. Sóng siêu âm tác động làm tăng khả năng truyền khối bên trong và ngoài vách tế bào của nguyên liệu, năng lượng từ chu trình hình thành và phá vỡ bọt bóng làm rách thành tế bào, cho phép sự hấp thu dung môi vào trong tế bào và thực hiện khuếch tán, lôi kéo các chất tan ra ngoài thành tế bào nhờ đó làm tăng hiệu quả trích ly so với phương pháp truyền thống.

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện trích ly có hỗ trợ siêu âm tới hàm lượng polyphenol và khả năng kháng oxy hóa

Yếu tố		TPC (mg GEA/g CKNL)	DPPH-IC_{50} (µg/ml)	FRAP (mg Fe^{2+}/g CKNL)	ABTS (mg TE/g CKNL)
Công suất siêu âm (%)	30	3,09±0,05^{d}	436,99±4,75^{b}	1,75±0,02^{d}	6,32±0,09^{d}
	35	4,04±0,15^{c}	428,75±10,51^{b}	2,03±0,03^{c}	7,34±0,22^{c}
	40	4,84±0,10^{b}	420,22±7,66^{b}	2,40±0,08^{b}	7,97±0,22^{b}
	45	5,44±0,06^{a}	400,36±15,13^{b}	2,77±0,05^{a}	8,71±0,30^{a}
	50	5,34±0,15^{a}	408,45±6,70^{a}	2,64±0,07^{a}	8,51±0,34^{a}
Thời gian siêu âm (phút)	3	4,60±0,15^{d}	425,08±12,59^{a}	2,53±0,06^{d}	8,23±0,55^{c}
	6	5,44±0,06^{c}	400,36±15,13^{ab}	2,77±0,05^{c}	8,71±0,30^{b}
	9	6,08±0,10^{b}	399,97±8,68^{ab}	3,18±0,11^{b}	9,09±0,44^{a}
	12	6,74±0,16^{a}	372,85±8,29^{b}	3,40±0,11^{a}	9,42±0,33^{a}
	15	6,72±0,07^{a}	391,50±12,86^{b}	3,43±0,04^{a}	9,50±0,42^{a}
Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi (g/ml)	1/10	5,28±0,25^{c}	398,21±7,81^{a}	2,55±0,07^{c}	9,33±0,36^{d}
	1/20	6,74±0,16^{b}	372,85±8,29^{b}	3,40±0,11^{b}	9,42±0,33^{c}
	1/30	6,82±0,07^{b}	370,87±9,53^{b}	3,58±0,05^{b}	11,86±0,43^{b}
	1/40	7,35±0,22^{a}	344,06±7,36^{bc}	3,89±0,06^{a}	14,67±0,67^{a}
	1/50	7,30±0,20^{a}	353,73±7,50^{c}	4,11±0,10^{a}	14,87±0,58^{a}

([a,b,c,d] Các giá trị có ký tự ở trên khác nhau nằm trong cùng một cột và cùng một yếu tố thì khác nhau có ý nghĩa (p<0,05))

Đối với yếu tố công suất siêu âm thì TPC tăng khi tăng công suất từ 30-45(%) và bắt đầu giảm khi tăng lên 50%. Điều này có thể lý giải rằng cơ chế của sóng siêu âm làm tăng khả năng trích ly dựa vào việc tạo ra một áp lực lớn xuyên qua dung môi và tác động đến tế bào vỏ, tăng khả năng truyền khối tới bề mặt phân tách và phá vỡ tế bào trên bề mặt và bên trong của vỏ giúp quá trình thoát chất tan được dễ dàng (Hồ, 2014). Các bọt khí được tạo thành trong dung môi khi sóng siêu âm truyền qua. Dưới tác động của bọt khí bị

kéo, nén, sự tăng áp suất và nhiệt độ làm các bọt khí vỡ, làm tăng sự thoát ra của các chất nội bào vào dung dịch. Công suất siêu âm càng lớn thì nhiều bong bóng tạo bọt được tạo ra, phá vỡ cấu trúc tế bào làm tăng khả năng trích ly các chất hòa tan. Tuy nhiên, khi năng lượng siêu âm quá cao làm tăng sự phá hủy thành tế bào nguyên liệu từ đó tạo nhiều cặn lơ lửng gây bít các lỗ mao quản trong nguyên liệu làm cản trở quá trình trích ly. Ngoài ra, polyphenol là chất nhạy với tác nhân nhiệt và dễ bị oxy hóa nên khi tăng công suất tối đa thì dẫn đến sự dao động lớn làm nhiệt độ của dung dịch tăng gây ảnh hưởng đến tính chất polyphenol và hàm lượng polyphenol tổng số thu được.

Việc tăng công suất từ 30% lên 45% làm khả năng kháng oxy hóa tăng dần, ở mức công suất 45% cho kết quả hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất trong khoảng khảo sát công suất từ 30-50% (phương pháp DPPH ứng với IC_{50} là 400,36 µg/ml; phương pháp ABTS đạt 8,71 mg TE/g CKNL; phương pháp FRAP đạt 2,77 mg Fe^{2+}/g CKNL). Đến công suất tối đa 50% thì khả năng kháng oxy hóa có xu hướng giảm dần. Nguyên nhân là do công suất siêu âm quá cao gây phân hủy các hợp chất kháng oxy hóa, ảnh hưởng đến hiệu quả kháng oxy hóa của mẫu. Như vậy, hoạt tính kháng oxy hóa thể hiện qua cả ba phương pháp DPPH, ABTS và FRAP đều tỷ lệ thuận với hàm lượng polyphenol có trong dịch chiết cũng như công suất siêu âm. Mức 45% được chọn là mức công suất cố định để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả phân tích phương sai (Anova) của yếu tố thời gian siêu âm cho thấy có sự khác nhau về mặt thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức đối với hàm lượng polyphenol tổng và khả năng kháng oxy hóa. Điều này chứng tỏ rằng sự thay đổi thời gian siêu âm có ảnh hưởng rõ đến quá trình phá vỡ tế bào thực vật để trích ly polyphenol. Khi tăng thời gian siêu âm từ 3-12 phút thì hàm lượng polyphenol thu được tăng 1,5 lần, có thể giải thích là do siêu âm có khả năng làm tăng tốc độ phá vỡ thành tế bào và mô thực vật cũng như tốc độ truyền khối nên lượng dịch trích ly ra cao hơn. Nhưng thời gian siêu âm từ 12 đến 15 phút, hàm lượng polyphenol không tăng, có xu hướng giảm nhẹ nguyên nhân là do thời gian siêu âm kéo dài sẽ làm năng lượng các hợp chất cao phân tử được giải phóng ra từ đó có thể gây tắc các kênh dẫn dịch chiết trong khối nguyên liệu. Kết quả này tương tự nghiên cứu trên quả tầm xuân (Vo and Le, 2014).

Kết quả ở Bảng 5 đã cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa được xác định bằng 3 phương pháp có mối tương quan với nhau ở mức thời gian trích ly 12 phút cao hơn so với thời gian 3, 6, 9 phút. Khi thời gian siêu âm tăng sẽ làm hàm lượng polyphenol tăng rõ rệt và khả năng kháng oxy hóa cũng tăng chứng tỏ giữa hàm lượng polyphenol thể hiện tính tương quan mạnh mẽ với khả năng kháng oxy hóa.

Ảnh hưởng của tỷ lệ nguyên liệu/dung môi trong quá trình trích ly có hỗ trợ siêu âm đến hàm lượng polyphenol có xu hướng tăng dần từ tỷ lệ 1/10 (5,28 mg GAE/g CKNL) đến tỷ lệ 1/20 (6,74 mg GAE/g CKNL); từ tỷ lệ 1/20 đến 1/30 hàm lượng polyphenol có tăng nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa; tỷ lệ 1/40 cho kết quả hàm lượng polyphenol cao hơn các mức tỷ lệ trong khảo sát (7,35 mg GAE/g CKNL) và lượng polyphenol giảm dần ở tỷ lệ 1/50. Điều này có thể lý giải khi lượng dung môi quá ít, không đủ để hòa tan và trích ly hết lượng polyphenol ra khỏi tế bào. Do đó, khi tiếp tục tăng lượng dung môi thì hàm lượng polyphenol thu được xu hướng tăng. Tuy nhiên, khi sử dụng dung môi quá nhiều, mà hàm lượng polyphenol trong nguyên liệu là một số cố định nên sẽ nhanh chóng dẫn đến sự cân bằng giữa các pha, làm hàm lượng polyphenol không tăng (Maran et al., 2017).

KẾT LUẬN

Từ kết quả thực nghiệm sau khi tính toán và phân tích chúng tôi nhận thấy cả hai phương pháp trích ly truyền thống và trích ly có sự hỗ trợ của sóng siêu âm đều có tác dụng tích cực đến quá trình trích ly các hợp chất polyphenol và khả năng kháng oxy hóa từ vỏ chanh dây. Tuy nhiên phương pháp có sự hỗ trợ của sóng siêu âm cho kết quả TPC cao hơn. Cụ thể ở phương pháp có sự hỗ trợ của sóng siêu âm thu được kết quả hàm lượng polyphenol cao hơn xấp xỉ 0,84 lần so với phương pháp truyền thống. Đối với khả năng kháng oxy hóa được đánh giá qua DPPH, $ABTS^+$ và FRAP ở phương pháp siêu âm đều có kết quả cao hơn lần lượt là 0,77; 0,88 và 0,85 lần so với phương pháp truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

ABOUL-ENEIN, A. M., SALAMA, Z. A., GAAFAR, A. A., ALY, H. F., ABOU-ELELLA, F., AHMED, H. J. J. O. C. & RESEARCH, P. 2016. Identification of phenolic compounds from banana peel (Musa paradaisica L.) as antioxidant and antimicrobial agents. 8**,** 46-55.

BENZIE, I. F. & STRAIN, J. J. J. A. B. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. 239**,** 70-76.

CORRÊA, R. C., PERALTA, R. M., HAMINIUK, C. W., MACIEL, G. M., BRACHT, A., FERREIRA, I. C. J. T. I. F. S. & TECHNOLOGY 2016. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of Passiflora spp.(passion fruit). 58**,** 79-95.

DAI, J. & MUMPER, R. J. J. M. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. 15**,** 7313-7352.

GARCIA, E. J., OLDONI, T. L. C., ALENCAR, S. M. D., REIS, A., LOGUERCIO, A. D. & GRANDE, R. H. M. J. B. D. J. 2012. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. 23**,** 22-27.

HỒ, T. N. T. 2014. *Nghiên cứu ứng dụng sóng siêu âm cải thiện quá trình trích ly polyphenol từ trà oolong phụ phẩm.* Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

MARAN, J. P., MANIKANDAN, S., NIVETHA, C. V. & DINESH, R. J. A. J. O. C. 2017. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from Nephelium lappaceum L. fruit peel using central composite face centered response surface design. 10**,** S1145-S1157.

NENADIS, N., WANG, L.-F., TSIMIDOU, M., ZHANG, H.-Y. J. J. O. A. & CHEMISTRY, F. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. 52**,** 4669-4674.

PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., NÚÑEZ, M. J. J. J. O. A. & CHEMISTRY, F. 2005. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. 53**,** 2111-2117.

VO, H. & LE, V. J. I. F. R. J. 2014. Optimization of ultrasonic treatment of rose myrtle mash in the extraction of juice with high antioxidant level. 21**,** 2331.

ẢNH HƯỞNG CỦA KIỂU GENE MC4R VÀ PIT-1 ĐẾN TÍNH TRẠNG SINH TRƯỞNG VÀ CHẤT LƯỢNG THỊT TRÊN HEO DUROC XUẤT XỨ TỪ CANADA

Nguyen Huu Tinh [1], Nguyễn Văn Hợp [1], Đỗ Thế Anh [1], Nguyen Thi Lan Anh [1], Bùi Phú Nam Anh[2*]

Phân viện Chăn nuôi Nam bộ, KP. Hiệp Thắng, P. Bình Thắng, TX. Dĩ An, Bình Dương

Khoa Công Nghệ Sinh học, Đại học Mở Bán công tpHCM

[*]Tác giả liên lạc: anh.bpn@ou.edu.vn

ABSTRACT

This study was to estimate the polymorphism effects of MC4R gene with enzyme of TaqI and of PIT-1 gene with enzyme of RsaI on average daily gain (ADG), backfat thickness (BF) and loin deep (LD) in Duroc pigs at some breeding farms of Vietnam. The results from PCR-RFLP procedure for 263 males and 313 females of Duroc pigs indicated that three genotypes of MC4R as well as PIT-1 were found, including AA, AG and GG (PIT-1 gene) with observed frequencies respectively 0.09, 0.41 and 0.50; AA, AB and BB (MC4R gene) with observed frequencies respectively 0.37, 0.47 and 0.16. The polymorphism of MC4R as well as PIT-1 gene has associated closely with traits of ADG, BF and LD, in which, G allele (MC4R) and B allele (PIT-1) have more positive effects than others. For MC4R gene, the individuals carrying GG genotype had higher ADG by 50gram and lower BF by 1.4mm than AA genotype. For PIT-1 gene, pigs carrying BB genotype had higher ADG and LD than AA genotype, respectively by 37gram and by 1.9mm. Therefore, the increased selection of G allele, GG genotype (MC4R) and of B allele, BB genotype (PIT-1) should be considered to contribute to the improvement of ADG, BF and LD traits in Duroc population in current study.

Keywords: *MC4R, PIT-1 polymorphism, growth rate, backfat thickness, loin deep.*

TỔNG QUAN

Cùng với sự phát triển nhanh chóng của ngành di truyền phân tử, các cơ chế sinh lý về quá trình chuyển hóa và sinh trưởng, phát triển ở vật nuôi ngày càng được hiểu biết sâu hơn ở mức độ phân tử. Hướng tiếp cận các ứng cử gen được nghiên cứu gần đây có ảnh hưởng đến các tính trạng sản xuất ở vật nuôi đã gặt hái nhiều thành công. Ở động vật có vú, melanocortin-4 receptor là một thụ thể protein Rhodopsin-like G, đóng vai trò quan trọng trong việc điều tiết lượng thức ăn ăn vào, cân bằng năng lượng và khối lượng cơ thể (Govaerts và ctv, 2005; Adan và ctv 2006). Ở lợn, gen melanocortin-4 receptor (MC4R) thuộc gia đình gen MCR, nằm trên NST số 1, nó mã hóa cho một trình tự aa dài 322 nucleotides. Nó bao gồm 1 exon duy nhất MC4R là thụ thể Melanocortin số 4, là gen chính điều khiển khả năng hấp thụ và tiêu tốn năng lượng (Adan và ctv, 2006; Tao, 2010). Chính vì thế MC4R đã được đề xuất như một trong những ứng cử gen có liên kết với tính trạng sinh trưởng (Rothschild, 2000). Hầu hết những nghiên cứu chuyên sâu nhất về gen này đều được thực hiện trên lợn và đã được phát hiện ra 8 vị trí đa hình. Tại vị trí đa hình TaqI, một nucleotide đơn lẻ đã bị đột biến thay thế G bằng A (Kim và ctv, 2000a; Davoli và ctv, 2012). Do vậy, việc xác định tính đa hình gen MC4R được xem như chỉ thị phân tử tiềm năng đối với các tính trạng có liên quan đến sinh trưởng ở lợn, như tiêu thụ thức ăn, tốc độ sinh trưởng và dày mỡ lưng. Về ứng dụng, một số nghiên cứu về gen MC4R có ảnh hưởng tích cực ở các giống lợn công nghiệp, giống lợn bản địa Trung Quốc, lợn trắng Nga, lợn Pulawska (Poland) và lợn rừng đã được báo cáo (Kim và ctv, 2000b; Salajpal và ctv, 2007;

Szyndler-Nedza và ctv, 2010). Tuy vậy, các đặc tính di truyền của các quần thể khảo sát khác nhau, mức độ ảnh hưởng của gen MC4R đến các tính trạng trưởng có thể cũng khác nhau (Klimenko và ctv 2014). Ngoài gen MC4R, gen PIT-1 cũng đã được khám phá với vai trò như một gen điều hoà các hormone sinh trưởng ở tuyến yên và có tương quan chặt chẽ với tốc độ sinh trưởng, tỷ lệ nạc và dày mỡ lưng. Ở lợn, nhiều tác giả đã nghiên cứu và cho biết gen PIT-1 có liên quan mật thiết với tăng khối lượng bình quân/ngày, dày mỡ lưng (Yu và ctv, 1995) và tỷ lệ nạc (Stancekova và ctv, 1999).

Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm phân tích ảnh hưởng của đa hình gen MC4R và PIT-1 đến tốc độ sinh trưởng, dày mỡ lưng và dày thăn thịt ở đàn lợn Duroc in một số trại giống ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu tiến hành trên đàn giống Duroc thuần nuôi giữ tại trại heo giống Bình Minh, Công ty Khang Minh An, HTX Đồng Hiệp có nguồn gốc nhập khẩu từ Đài Loan, Đan Mạch và Canada. Trong giai đoạn khảo sát từ 2017 – 2018, tổng số 576 cá thể, bao gồm 263 đực và 313 cái hậu bị ở đàn giống Duroc thuần đã được kiểm tra năng suất cá thể Đàn giống hậu bị được kiểm tra năng suất cá thể trong giai đoạn 25 - 100 kg. Tại thời điểm kết thúc kiểm tra năng suất, tiến hành đo lường các chỉ tiêu năng suất cá thể về sinh trưởng, dày mỡ lưng, dày thăn thịt bằng kỹ thuật siêu âm hình ảnh tại vị trí P2 (xương sườn thứ 10), sử dụng máy Aloka SSD 500V.

Đồng thời, để phân tích kiểu gen MC4R và PIT-1, đã tiến hành thu thập mẫu máu (3-5ml) ở tĩnh mạch cổ (sau khi được sát trùng bằng cồn 70^o) cho vào ống nghiệm có chứa EDTA, lắc nhẹ và đều rồi chuyển về phòng thí nghiệm để tách chiết DNA bằng bộ Kit GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific). Nồng độ DNA được kiểm tra bằng máy đo quang phổ ở bước sóng OD 260/280. Mẫu DNA sau đó được bảo quản ở -20^{o}C cho đến khi phân tích kiểu gen.

Phân tích kiểu gen MC4R và PIT-1 bằng kỹ thuật PCR – RFLP sử dụng cặp mồi (Kim *và ctv*, 2000a): 5’- TACCCT GACCATCTTGATTG -3’ (F) và 5’- ATAGCAACAGATGATCTCTTTG -3’ (R) đối với gen MC4R và cặp mồi (Yu và ctv, 1994) có trình tự: 5’ AGTGTAGCCAGAGCATCT 3’ (F) và 5’ ACCACATCTGCACACTCA 3’ (R) đối với gen PIT-1. Phản ứng PCR gồm: 100 – 500 ng DNA, 200 µM mỗi dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 µl Tq polymerase, 10 pM mỗi mồi và 1x PCR buffer trong tổng thể tích cuối cùng là 25 µl. Chu trình nhiệt như sau: 94^{o}C trong 5 phút; 35 chu kỳ gồm: 94^{o}C trong 30 giây, 62^{o}C trong 30 giây, 72^{o}C trong 30 giây; cuối cùng là 72^{o}C trong 7 phút trong một hệ thống Gene Amp PCR System. Sau đó, sản phẩm PCR được cắt bởi enzyme giới hạn ủ ở 65^{o}C qua đêm với *TaqI* (đối với gen MC4R) và *RsaI* (đối với gen PIT-1). Sau đó kiểm tra kết quả bằng điện di trên gel agarose 3% nhuộm với TBR ở hiệu điện thế 150V trong 45 phút bằng bộ MultiSUB midi, rồi được kiểm tra dưới đèn cực tím trên máy ghi hình ảnh gel điện di GelDoc-It^2 (UVP, Mỹ) để nhận diện các alen.

Kiểu gen MC4R được xác định dựa trên chiều dài đoạn cắt 226 bp là alen A; đoạn cắt 156 và 70 bp là alen G. Trong khí đó, các kiểu gen PIT-1 được xác định bao gồm: kiểu gene AA (1 vạch 710bp), kiểu gen AB (3 vạch 710bp-388bp-322bp) kiểu gene BB (2 vạch 388bp và 322bp), trong tất cả kiểu gen đều có 3 vạch 774bp-153bp và 108bp.

Xác định tần số các alen của gen MC4R và PIT-1 theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg như sau: $p = \frac{2(AA)+(Aa)}{2N}$ và $(q = 1 - p)$, *Trong đó, p là tần số alen bình thường, q là tần số alen đột biến; N: Tổng số mẫu phân tích; AA: Số mẫu mang kiểu gen đồng hợp trội; Aa: Số mẫu mang kiểu gen dị hợp.*

Kiểm định phân bổ tần số kiểu gen *MC4R* tại vị trí đa hình *TaqI* và *PIT-1* tại vị trí đa hình *RsaI* theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg bằng phép trắc nghiệm chi bình phương (χ^2) và so sánh giữa tần số kiểu gen quan sát với tần số kiểu gen kỳ vọng. Tần số dị hợp mong đợi He được tính toán theo của Nei (1978): $He = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$, Trong đó, p_i là tần số alen thứ i.

Phân tích thống kê tìm sự liên quan giữa các kiểu gen AA, AG và GG (với gen MC4R), các kiểu gen AA, AB và BB (với gen PIT-1) với các tính trạng sinh trưởng, dày mỡ lưng và dày thăn thịt sử dụng mô hình tuyến tính (1) đối với gen MC4R và (2) đối với PIT-1 như sau:

$$\mathbf{Y_{ijk} = \mu + S_i + MC4R_j + e_{ijk}} \quad (1)$$

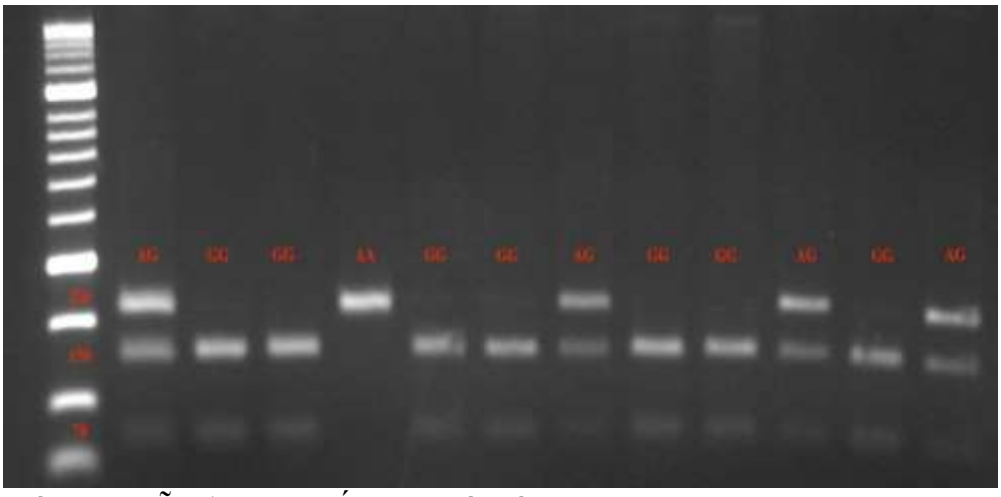
$$\mathbf{Y_{ijk} = \mu + S_i + PIT\text{-}1_j + e_{ijk}} \quad (2)$$

Trong đó, Y_{ijkl} là giá trị kiểu hình tính trạng khảo sát (ADG, BF, LD), μ là trung bình trung đàn giống khảo sát, S_i là ảnh hưởng của giới tính (i= đực, cái), $MC4R_j$ là ảnh hưởng của kiểu gen MC4R (j = AA, AG, GG), $PIT\text{-}1_j$ là ảnh hưởng của kiểu gen PIT-1 (j = AA, AB, BB), e_{ijk} = sai số ngẫu nhiên.

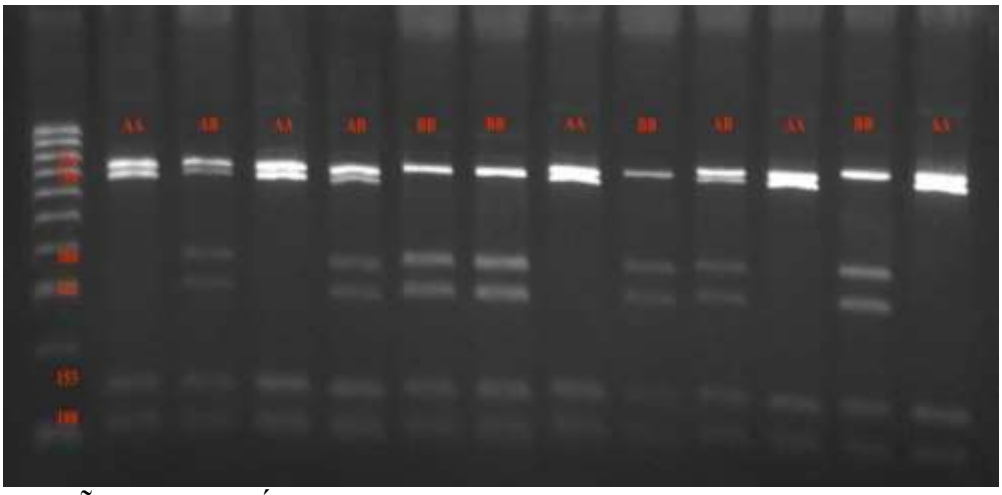
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa hình trên gene PIT-1 và MC4R

Như đã trình bày trong phần phương pháp, tổng số 576 cá thể (gồm 263 đực, 313 cái) đã được kiểm tra năng suất cá thể và có kết phân tích kiểu gen MC4R và PIT-1. Kết quả diện di cho thấy cả ba kiểu gen AA, AG và GG đối với gen MC4R và kiểu gen AA, AB và BB đối với gen PIT-1 đều xuất hiện trong đàn giống Duroc khảo sát như thể hiện trong hình 1 và hình 2 dưới đây. Ở hình 1, đây là hình ảnh mẫu đại diện kết quả phân tích PCR-RFLP tại điểm đa hình *TaqI* của gen MC4R và ở hình 2 chính là hình ảnh mẫu đại diện kết quả phân tích PCR-RFLP tại điểm đa hình *RsaI* gen PIT-1.



Hình 1: Mẫu đại diện kết quả phân tích PCR-RFLP với enzyme *TaqI* của gen MC4R



Hình 3.6: Mẫu đại diện kết quả phân tích PCR-RFLP với enzyme *RsaI* của gen PIT-1

Tần số kiểu gene và allele trên gene Pit-1 và MC4R

Đối với gen MC4R, kết quả khảo sát tần số gen và tần số kiểu gen trên 576 cá thể từ đàn giống Duroc tại ba cơ sở giống được trình bày trong bảng 1. Cả hai alen là A và G của gen MC4R đều được tìm thấy trong đàn giống khảo sát, nhưng với tần số rất khác nhau. Alen A xuất hiện với tần số thấp hơn (0,30), trong khi đó alen G xuất hiện với tần số cao hơn (0,70). Đồng thời, tần số xuất hiện của kiểu gen đồng hợp tử AA trong đàn giống khảo sát cũng rất nhỏ (0,09) so với kiểu gen đồng hợp tử GG (0,50). Trong một nghiên cứu tương tự ở giống lợn bản địa Phillippine, Octuraa và ctv (2014) cũng cho biết tần số alen A (0,38) nhỏ hơn so với tần số alen G (0,62) và tần số kiểu gen AA (0,16) cũng nhỏ hơn nhiều so với tần số kiểu gen GG(0,41). Trong một nghiên cứu khác trước đây, Kim và ctv, (2000b) đã cho biết kết quả phân tích tại vị trí đa hình *TaqI* chỉ ra rằng alen 2 có liên kết chặt chẽ với những cá thể có lượng mỡ nhiều với tần số gen là 0,60 trong quần thể khảo sát. Trên đàn lợn bản địa Philippine, Octura và ctv (2014) đã cho báo cáo tần số alen A và G tương ứng là 0,38 và 0,62; kiểu gen AA, AG và GG là 0,16; 0,43 và 0,41. Tại Nhật Bản, Hirose và ctv (2014) đã nghiên cứu trên đàn giống Duroc và cho biết tần số alen A và G tương ứng là 0,879 và 0,121; kiểu gen AA, AG và GG là 0,766; 0,226 và 0,008.

Như vậy, tần số gen có sự biến động giữa các quần thể giống khảo sát. Do đó, trong trường hợp muốn chọn lọc tăng tần số alen A và tần số kiểu gen AA thuộc gen MC4R trong đàn giống này sẽ gặp khó khăn và mất nhiều thời gian hơn so với việc chọn lọc tăng tần số alen G và kiểu gen GG. Mặc dù vậy, sự phân bố tần số gen và tần số kiểu gen MC4R ở đàn giống Duroc khảo sát đang ở trạng thái cân bằng theo định luật Hardy Weinberg, do không có sự sai khác nào về mặt thống kê giữa tần số quan sát với tần số kỳ vọng ở cả ba kiểu gen AA, AG và GG. Điều này chỉ ra rằng trong thời gian qua, những yếu tố như chọn lọc, du nhập nguồn giống mới hay pha trộn giữa các nguồn gen nhập khẩu, hầu như chưa có tác động nào làm thay đổi cấu trúc di truyền của đàn giống Duroc khảo sát ở ba cơ sở giống đối với kiểu gen MC4R.

Cũng trong bảng 1, hệ số dị hợp tử (He) ở mức trung bình (0,33) cho thấy khi nhân giống các cá thể có kiểu gen dị hợp tử ở các thế hệ kế tiếp, sự phân ly về kiểu gen sẽ tiếp tục diễn ra và như vậy, mức độ biến động di truyền giữa các cá thể ở đàn giống này có thể tăng lên. Do vậy, rất cần định hướng chọn lọc theo kiểu gen có lợi trong thời gian tới nhằm hướng tới mục tiêu cải thiện suất năng suất sinh trưởng của đàn giống Duroc khảo sát. Tuy nhiên, định hướng chọn lọc tăng tần số alen A hay alen G sẽ phụ thuộc vào việc phân tích

mối liên hệ giữa tính đa hình của gen MC4R với các tính trạng chọn lọc trong mục tiêu nhân giống đàn Duroc.

Bảng 1: Tần số kiểu gen và tần số alen của gen MC4R tại vị trí *TaqI* ở đàn Duroc khảo sát

Chỉ tiêu	Kiểu gen MC4R/*TaqI*			Alen MC4R/*TaqI*		He	χ^2 (3,841)
	AA	AG	GG	A	G		
1. Số lượng heo	54	236	286				
2. Tần suất xuất hiện	0,09	0,41	0,50	0,30	0,70	0,33	1,450
3. Tần xuất dự kiến	0,09	0,42	0,49				

Ghi chú: He (the expected Heterozygosity) là tần số dị hợp mong đợi

Đối với gen PIT-1, bảng 2 trình bày kết quả khảo sát tần số gen và tần số kiểu gen trên 588 mẫu từ đàn giống Duroc. Ở đàn giống khảo sát, cả hai kiểu alen là A và B của gen PIT-1 đều được tìm thấy với tần số gần tương ứng 0,60 với alen A và 0,40 với alen B. Đồng thời, cả ba kiểu gen tổ hợp từ hai alen này đều được phát hiện trong đàn giống khảo sát, nhưng với tần số xuất hiện tương đối khác nhau. Tương ứng với ba kiểu gen AA, AB và BB, tần số quan sát lần lượt là 0,37; 0,47 và 0,16. Trong đó kiểu gen dị hợp tử AB gần đạt tới giá trị cực đại (0,50). Điều này cho thấy sự phân bố các kiểu gen trong đàn giống có xu hướng nghiêm về kiểu gen dị hợp, trong khi hai kiểu gen đồng hợp tử có tần số xuất hiện thấp hơn. Đồng thời, các tần số kiểu gen quan sát lại không có sự khác biệt về mặt thống kê so với tần số kiểu gen kỳ vọng. Như vậy, đối với kiểu gen PIT-1 trong đàn giống này, các tác động từ chương trình chọn lọc, du nhập nguồn gen mới trong những năm qua chưa làm thay đổi cấu trúc di truyền của đàn giống Duroc trong nghiên cứu này. Do đó, sự phân bố tần số gen và tần số kiểu gen đối với PIT-1 ở đàn giống này đang ở trạng thái cân bằng theo định luật Hardy Weinberg.

Các nghiên cứu trước đây trên các đàn giống khác nhau, tại các thời điểm khảo sát khác nhau đều cho các kết quả về tần số gen và kiểu gen khác nhau. Trong đàn giống lai giữa Pietrain với Large White, Pierzchala và ctv (2003) đã cho biết tần số kiểu gen AA (0,425), AB (0,488) và BB (0,087). Một nghiên cứu khác của Song và ctv (2005) trên Duroc có nguồn gốc từ Hoa Kỳ và cho biết tại điểm *MspI* tần số alen C là 14,6 và alen D là 85,4 và tần số kiểu gen CC, CD và DD tương ứng là 0,051; 0,190 và 0,759. Tuy nhiên, tại *RsaI*, Song và ctv (2007) nghiên cứu trên đàn Duroc có nguồn gốc từ Hoa Kỳ lại không tìm thấy alen B trong đàn giống khảo sát mà chỉ tìm thấy alen A với tần số 1,00; tương tự ở đàn Landrace có nguồn gốc từ Đan Mạch, tần số alen B cũng rất thấp (0,12), nhưng cao hơn chút ở đàn Large White có nguồn gốc từ Anh với tần số alen B là 0,34. Trên đàn giống Pietrain và Large White, Silveira và ctv (2009) đã nghiên cứu trên 201 cá thể và báo cáo tần số alen A và B gần tương đương nhau, tương ứng 0,49 và 0,51; số số kiểu gen AA, AB và BB tương ứng là 0,22; 0,57 và 0,21. Gần đây nhất, Kim và ctv (2014) nghiên cứu ảnh hưởng của gen PIT-1 đến các chỉ tiêu chất lượng thịt xẻ trên 168 cá thể ở đàn giống lai thương phẩm giữa ba giống (Duroc, Yorkshre, Landrace) và cho biết tần số alen A và B tương ứng là 0,81 và 0,19; tần số kiểu gen AA, AB và BB tương ứng là 0,667; 0,286 và 0,476.

Qua thảo luận với các nghiên cứu trước đây và kết quả trong nghiên cứu hiện tại có thể thấy tần số alen A và B hay tần số kiểu gen AA, AB và BB của gen PIT-1 luôn thay đổi từ các đàn giống khảo sát khác nhau và tại các thời điểm nghiên cứu khác nhau. Sự thay đổi này có thể hình thành do quá trình chọn lọc các tính trạng sinh trưởng và tính trạng thịt

xẻ đã làm thay đổi cấu trúc di truyền của đàn giống sau một thời gian nhất định theo hướng tăng dần các alen có tác dụng tích cực đến tính trạng chọn lọc. Ở đàn giống Duroc hiện tại trong nghiên cứu này, do mức độ dị hợp tử về kiểu gen trong đàn giống cao, việc chọn lọc cải thiện năng suất các tính trạng liên kết với gen PIT-1 sẽ mất nhiều thời gian hơn, vì sẽ tiếp tục phân ly trong các thế hệ tiếp theo.

Bảng 2: Tần số kiểu gen và tần số alen của gen PIT-1 tại vị trí *RsaI* ở đàn Duroc khảo sát

Chỉ tiêu	Kiểu gen PIT-1/*RsaI*			Alen PIT-1/*RsaI*		He	χ^2 (3,841)
	AA	AB	BB	A	B		
1. Số lượng heo	217	276	95				
2. Tần suất xuất hiện	0,37	0,47	0,16	0,60	0,40	0,48	0,21
3. Tần xuất dự kiến	0,36	0,48	0,16				

Ghi chú: He (the expected Heterozygosity) là tần số dị hợp mong đợi

Ảnh hưởng giữa kiểu gene và tính trạng

Về ảnh hưởng của các đa hình gen MC4R đến các tính trạng năng suất, kết quả phân tích về mối liên kết giữa ba kiểu gen AA, AG và GG với tốc độ sinh trưởng, dày mỡ lưng và dày thăn thịt ở đàn giống Duroc ở nghiên cứu hiện tại được trình bày trong bảng 3. Trong ba tính trạng khảo sát, chỉ nhận thấy có sự sai khác thống kê giữa kiểu gen GG với kiểu gen AA ở hai tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày và dày mỡ lưng. Đối với tốc độ sinh trưởng của đàn giống giai đoạn 25 – 100kg, kiểu gen GG đạt 856 gam/ngày cao hơn 50 gam/ngày so với kiểu gen AA (806 gam/ngày). Tương tự, dày mỡ lưng ở kiểu gen GG đạt 11,8 mm thấp hơn 1,4 mm so với kiểu gen AA. Kết quả trong bảng 3 cũng cho thấy đối với dày thăn thịt, đây là tính trạng có liên quan trực tiếp đến tỷ lệ nạc ở lợn, lại không có sai khác thống kê giữa ba kiểu gen AA, AG và GG ở nghiên cứu này. Trong khi một số nghiên cứu trước đây cho biết kiểu gen GG có thể làm tăng thêm 1,2 – 2,0% tỷ lệ nạc so với kiểu gen AA (Maagdenberg *và ctv*, 2007; Kim và ctv, 2006; Dvorakova và ctv, 2011).

Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra gen MC4R có vai trò quan trọng trong việc điều các ảnh hưởng của Leptin liên quan đến lượng thức ăn tiêu thụ và khối lượng cơ thể (Seeley và ctv, 1997). Đồng thời, nó cũng có mối liên kết với độ dày mỡ lưng, sinh trưởng và tiêu thụ thức ăn ở các dòng lợn khác nhau (Kim và ctv, 2000b). Kết quả trong nghiên cứu hiện tại phù hợp với một số nghiên cứu trước đây, cho biết tốc độ tăng khối lượng bình quân/ngày trong giai đoạn kiểm tra năng suất ở các giống Yorkshire, Landrace và Duroc có sự chênh lệch từ 20-90 gam/ngày giữa hai kiểu gen AA và GG (Kim và ctv, 2000a). Tương tự, nghiên cứu trên đàn Duroc tại Nhật Bản, Hirose và ctv (2014) cũng cho biết các kiểu gen MC4R đã ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ sinh trưởng và dày mỡ lưng ở đàn giống khảo sát. Trong một nghiên cứu khác trên nhóm lai giữa ba giống Duroc, Yorkshire và Landrace, kiểu gen GG cho dày mỡ lưng thấp hơn 1,9 mm so với kiểu gen AA (Kwon và ctv, 2015). Trong khi đó, Klimenko và ctv (2014) lại cho biết không có sự sai khác thống kê giữa hai kiểu gen GG và AA đối với hai tính trạng sinh trưởng và dày mỡ lưng ở hầu hết các nhóm giống Landrace, Yorkshire có nguồn gốc từ Đan Mạch và Canada, ngoại trừ tính trạng dày mỡ lưng ở nhóm có nguồn gốc từ Canda.

Như vậy, từ thảo luận trên đây có thể thấy đối với các đàn giống có các đặc tính di truyền khác nhau, ảnh hưởng của đa hình gen MC4R đến các tính trạng sinh trưởng cũng có thể rất khác nhau (Kim và ctv, 2000a). Đồng thời, việc sử dụng các gen này như các chỉ thị phân tử trong đánh giá di truyền và chọn lọc các tính trạng năng suất còn nhiều tranh

cãi (Rothschild, 2000). Mặc dù vậy, với kết quả trong nghiên cứu hiện tại, việc chọn lọc tăng tần số alen G và kiểu gen GG đồng nghĩa với cải thiện tốc độ sinh trưởng và dày mỡ lưng và sẽ gặp nhiều thuận lợi vì tần số xuất hiện alen G và kiểu gen GG rất cao trong đàn giống Duroc khảo sát, tương ứng 0,70 và 0,50. Hay nói cách khác, cần xem xét ứng dụng đa hình kiểu gen MC4R trong chọn lọc cải thiện năng suất sinh trưởng và dày mỡ lưng ở đàn Duroc khảo sát trong nghiên cứu này.

Bảng 3: Liên kết giữa kiểu gen MC4R/*TaqI* với tăng khối lượng/ngày giai đoạn 25 - 100kg (ADG), dày mỡ lưng (BF) và dày thăn thịt (LD) ở đàn giống Duroc khảo sát ($\bar{x}$ ± SD)

Tính trạng	Kiểu gen MC4R/*TaqI*		
	AA	AG	GG
1. Tổng quan sát (cá thể)	54	236	286
2. Tăng khối lượng (g/ngày)	806^{b} ± 143	838^{b} ± 158	856^{a} ± 53
3. Dày mỡ lưng (mm)	$13,2^{a}$ ± 1,2	$12,8^{ab}$ ± 1,6	$11,8^{b}$ ± 1,7
4. Dày thăn thịt (mm)	55,7 ± 10,2	56,2 ± 8,7	56,1 ± 9,1

Các giá trị trên cùng một hàng mang các chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thuống kê (P<0.05)

Đối với gen PIT-1, ảnh hưởng đa hình về kiểu gen có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng, tỷ lệ nạc và dày mỡ lưng thông qua sự điều hoà hormone sinh trưởng GH ở tuyến yên (Franco và ctv, 2005), cũng như tương quan thuận giữa mRNA của gen này với nồng độ hormone trong huyết tương (Sun và ctv, 2002). Ở lợn, nhiều tác giả đã nghiên cứu và cho biết gen PIT-1 có sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê giữa các kiểu gen đối với khối lượng sơ sinh, khối lượng 21 và 42 ngày tuổi, tốc độ tăng khối lượng bình quân/ngày, dày mỡ lưng, diện tích thăn thịt, màu sắc và vân mỡ ở thăn thịt ở các dòng lợn có nguồn gốc từ Trung Quốc và Hoa Kỳ (Yu và ctv, 1995).

Trong nghiên cứu hiện tại, kết quả trong bảng 4 về mối liên kết giữa các kiểu gen PIT-1 với các tính trạng nghiên cứu cho thấy kiểu gen BB đã ảnh hưởng tích cực và sai khác có ý nghĩa thống kê so với kiểu gen AA và AB đối với tính trạng ADG và LD giai đoạn 25 – 100kg. Cao hơn tương ứng 37, 42 gram và 1,9, 1,4mm. Trong khi đó, đối với dày mỡ lưng, chỉ tìm thấy có sự sai khác thống kê giữa kiểu gen AB so với kiểu gen AA. Như vậy, trong hai alen A và B của gen PIT-1/*RsaI*, alen B có ảnh hưởng tích cực đến cả ba tính trạng khảo sát (ADG, BF và LD) và cần được quan tâm chọn lọc gia tăng tần số gen này trong quần thể Duroc khảo sát ở nghiên cứu này.

Trong nghiên cứu của Pierzchala và ctv (2003) trên đàn giống lai giữa Pietrain và Large White, các tác giả đã đề nghị rằng alen B có liên kết với sự phát triển của tổng lượng cơ bắp. Cụ thể hơn, khi nghiên cứu trên đàn giống Duroc, Song và ctv (2005) đã báo cáo kiểu gen BB có tốc độ sinh trưởng (617 g/ngày) cao hơn có ý nghĩa thống kê so với kiểu gen AA (595 g/ngày) và đề nghị chọn lọc kiểu gen này đối với tính trạng sinh trưởng. Đối với các tính trạng thịt xẻ, nghiên cứu của Stancekova và ctv (1999) cũng cho biết các kiểu gen PIT-1 đã có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ nạc, mỡ lưng ở những con lợn Large White và lai giữa Large White x Landrace. Gần đây, trên đàn giống lai thương phẩm giữa ba giống (Duroc, Yorkshre, Landrace), Kim và ctv (2014) đã nghiên cứu ảnh hưởng của gen PIT-1 đến các chỉ tiêu chất lượng thịt xẻ và cho biết các kiểu gen AA, AB và BB có ảnh hưởng rõ ràng đến khối lượng thịt xẻ, dày mỡ lưng và màu sắc thịt. Như vậy, so sánh với các kết quả đã công bố về ảnh hưởng của gen PIT-1, mặc dù các nghiên cứu tiến hành trên các giống khác nhau, các dòng khác nhau với các tính trạng khác nhau, song các kết quả trong

nghiên cứu hiện tại cũng như các nghiên cứu trước đây đều thống nhất một điều rằng alen B và kiểu gen BB có ảnh hưởng tích cực và rõ ràng đến tính trạng sinh trưởng (ADG), dày mỡ lưng (BF) và dày thăn thịt (LD). Từ kết quả này, đề nghị sử dụng kiểu gen PIT-1 trong chọn lọc nâng cao tốc độ sinh trưởng và dày thăn thịt ở đàn giống Duroc đã khảo sát trong nghiên cứu hiện tại.

Bảng 4: Liên kết giữa kiểu gen PIT-1/*RsaI* với tăng khối lượng/ngày giai đoạn 25 – 100kg (ADG), dày mỡ lưng (BF) và dày thăn thịt (LD) ở đàn giống Duroc khảo sát ($\bar{x}$ ± SD)

Tính trạng	Kiểu gen PIT-1/*RsaI*		
	AA	AB	BB
1. Tổng quan sát (cá thể)	217	276	95
2. Tăng khối lượng (g/ngày)	845^{b} ± 158	840^{b} ± 156	882^{a} ±125
3. Dày mỡ lưng (mm)	$13,2^{a}$ ± 1,3	$12,1^{b}$ ± 2,3	$12,8^{ab}$ ± 2,1
4. Dày thăn thịt (mm)	$54,7^{b}$ ± 12,2	$55,3^{b}$ ±11,1	$56,7^{a}$ ± 13,7

Ghi chú: các ký tự khác nhau trong cùng một hàng sai khác có ý nghĩa thống kê với P<0,05

Conclusions

Kết quả khảo sát tần số gen và tần số kiểu gen trên 576 cá thể từ đàn giống Duroc tại ba cơ sở giống cho thấy các kiểu gen AA, AG, GG (MC4R) và AA, AB, BB (PIT-1) là đều được tìm thấy trong đàn giống Duroc với các tần số tương ứng 0,09 ; 0,41; 0,50. (MC4R) và 0,37; 0,47; 0,16 (PIT-1). Đa hình gen MC4R và gen PIT-1 có liên kết với các tính trạng tăng khối lượng bình quân/ngày, dày mỡ lưng và dày thăn thịt. Đối với gen MC4R, alen G có tác động tích cực hơn so với alen A và các cá thể mang kiểu gen GG cho tốc độ sinh trưởng cao hơn 50 gam/ngày và mỡ lưng thấp hơn 1,4mm so với kiểu gen AA. Đối với gen PIT-1, alen B có tác động tích cực hơn alen A và kiểu gen BB cho tốc độ sinh trưởng cao hơn 37 và 42 gram so với kiểu gen AA và AB; dày thăn thịt cao hơn 1,9mm so với kiểu gen AA. Như vậy, để góp phần cải thiện năng suất sinh trưởng và dày mỡ lưng ở đàn giống Duroc khảo sát trong nghiên cứu này, cần tập trung chọn lọc nâng cao tần số alen G và kiểu gen GG đối với gen MC4R.; alen B và kiểu gen BB đối với gen PIT-1.

Acknowledgements

The study was performed within the project "Selection for genetic improvement of economically important traits in purebres of Duroc, Yorkshire and Landrace in South Vietanam", which was supported by the Ministry of Agriculture and Rural Development, Vietnam. We also thank the leaders and owners of pig breeding farms (Binh Minh, Khang Minh An and Dong Hiep Cooperative) for excellent care of the animals in this research.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adan R.A.H., Tiesjema B., Hillebrand J.J.G., la Fleur S.E., Kas M.J.H. và de Krom M. (2006). The MC4R receptor and control of appetite. British Journal of Pharmacology, 149: 815–27.

Davoli, R.,I., S. Nissi, L. Braglia, L. Fontanessi (2012). Buttazzoni and V. Russo. Analysis of *MC4R* polymorphism in Italian Large White and Italian Duroc Pigs: Association with carcass traits. *Meat Sci*. 90(4): 887-892

Dvořakova, V., R. Stupka, M. Šprysl, J. Čitek, M. Okrouhla, E. Kluzakova, H. Kratochvilova (2011). Effect of the missense mutation Asp298Asn in *MC4R* on growth and fatness traits in commercial pig crosses in the Czech Republic. *Czech J. Anim. Sci., 56 (4): 176–180*

Franco M. M., R.C. Antunes, H.D. Silva and L. R. Goulart (2005). Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. J Appl. Genet 46(2): 195-200

Govaerts C., S. Srinivasah, A. Shapiro (2005). Obesity-associated mutations in the melanocortin-4 receptor provide novel insights into its function. Peptides 26: 1909–1919.

HIROSE K., T. ITO, K.FUKAWA, A. ARAKAWA, S. MIKAWA, Y. HAYASHI and K.TANAKA (2014). Evaluation of effects of multiple candidate genes (*LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *PIK3C3*, and *VRTN*) on production traits in Duroc pigs. *Animal Science Journal* (**85):** 198–206

of Agricultural Research, 32: 681-690

Maagdenberg, K.V.D., A. Stinckens, E. Claeys, M. Seynaeve and A. Clinquart (2007). The Asp298Asn missense mutation in the porcine Melanocortin-4 Receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. Animal, 1: 1089-1098

Nei, M. (1978), Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.

Octuraa, J. E. R., R. R. C. S. Yambaob, R. C. Santiagoc, B. W. Chod and R. S.A. Vegae (2014). Polymorphism in the Melanocortin-4 Receptor (*MC4R*) Gene and its Effect on Fatness and Weight Performance of Philippine Native Pigs: A Preliminary Study. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR) Volume 15, No 1:464-474*

Pierzchala M., T. Blicharski and J. Kuryl (2003). Growth rate and carcass quality in pigs as related to genotype at loci *POU1F1/Rsa*I (*Pit1/Rsa*I) and *GHRH/Alu*I. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 21: 159-166.

Kim, K.S., N.J. Larsen and M.F. Rothschild (2000a). Rapid communication: Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene. *Journal of Animal Scence.* 78: 791- 792

Kim, K.S., N. Larsen, T. Short, G. Plastow and M.F.Rothschild (2000b). A missense variant of the porcine Melanocortin-4 Receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth and feed intake traits. Mammalian Genome, 11: 131-135.

Kim K.S., Lee J.J., Shin H.Y., Choi B.H., Lee C.K., Kim J.J., Cho B.W., Kim T.H., (2006). Association of melanocortin 4 receptor (MC4R) and high mobility group AT -hook 1 (HMGA1) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits. *Animal Genetics* 37(4): 419-421

Kim G.W., J. Y. Yoo and H. Y. Kim (2014). Association of genotype of POU1F1 intron 1 with carcass characteristics in crossbred pigs. Journal of Animal Science and Technology 2014, 56:25 http://www.janimscitechnol.com/content/56/1/25.

Klimenko, A., A. Usatov, Lyubov Getmantseva, Yu Kolosov, O. Tretyakova, S. Bakoev, O. Kostjunina and N. Zinovieva (2014). Effects of melanocortin-4 receptor gene on growth and meat traits in oig raised in Russia. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 9 (2): 232-237

Kwon, K., M. Cahyadi, H. Park, D. W. Seo, S. Jin, S. Kim, Y. Choi, K. S. Kim, T. Gotoh and J. H. Lee (2015). Association of Variation in the *MC4R* Gene with Meat Quality Traits in a Commercial Pig Population. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 60 (1): 113–118.

Rothschild, M.F. (2000). Advances in Pig Molecular Genetics. ITEA. 96A: 349-361

Salajpal K., M. Dikic, J. Karolyi, M. Matkovic and B. Liker (2007). Effect of *MC4R* polymorphism on physiological stress response in pigs. *Poljoprivreda Osijek.* 12: 1-6.

Seeley R.J., L.M. Sharon, S.C. Woods (1997). Th e effect of intragastric ethanol on meal size in the rat. Pharmacol Biochem Behav. 56:379-82.

Silveira A.C.P., T.F. Braga , J.F. Almeida , R.C. Antunes, P.F.A. Freitas , A.S.M. Cesar and E.C. Guimarães (2009). PIT1 gene polymorphism in Pietrain and Large White pigs after divergent selection. Genet. Mol. Res. 8 (3): 1008-1012 (2009)

Song C., B. Gao, Y. Teng, X. Wang, Z. Wang, Q. Li, H. Mi, R. Jing and J. Mao (2005). MspI olymorphisms in the 3rd intron of the swine POU1F1 gene and their associations with growth performance. J Appl Genet 46(3): 285-289

Song C.Y, B. Gao, S. H. Teng, X. Y. Wang, F. Xie, G. H. Chen, Z. Y. Wang, R. B. Jing and J. D Mao (2007). Polymorphisms in intron 1 of the porcine POU1F1 gene. J Appl Genet 48(4): 371–374

Stancekova K., D.Vasicek, D. Peskovicova, J. Bulla, A. Kubek (1999). Effect of genetic variability of the porcine pituitary-specific transcription factor (PIT1) on carcass traits in pigs. Anim Genet 30: 313–315.

Sun H.S., L.L. Anderson, T.P. Yu, K.S. Kim (2002). Neonatal Meishan pigs show POU1F1 genotype effects on plasma GH and PRL concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 223-237.

Szyndler-Nedza M., M. Tyra, T. Blicharski and K. Piorkowska (2010). Effect of mutation in MC4R gene on carcass quality in Pulawska pig included in conservation breeding programme. *Animal Science Papers and Reports.* 28: 37-45

Tao, Y. X. (2010). The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. Endocr Rev 31:506–543.

Yu T.P, C.B. Schmitz, M.F. Rothschild, C.K.Tuggle (1994). Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine PIT1 gene. Anim Genet 25: 229–233.

Yu T.P, C.K.Tuggle , C.B. Schmitz , M.F. Rothschild (1995). Association of PIT 1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. J Anim Sci 73: 1282–1288

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA BỐN DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY CHLORPYRIFOS ETHYL

Trương Quốc Tất[1*], Dương Minh Viễn[2]
[1] *Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang*
[2] *Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ*
* Tác giả liên lạc: truongquoctat@tgu.edu.vn

TÓM TẮT

Chlorpyrifos ethyl là hoạt chất trừ sâu góc lân hữu cơ, có thể lưu tồn, gây ô nhiễm môi trường đất và nước. Bốn dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl đã được phân lập từ đất nông nghiệp và được định danh lần lượt là Achromobacter xylosoxidans C3.1, Barrientosiimonas humi C4.3, Microbacterium sp. C8.9, Staphylococcus pasteuri C9.2. Nghiên cứu để thúc đẩy hoạt động phân hủy và ứng dụng 4 dòng vi khuẩn này trong xử lý tồn dư Chlorpyrifos ethyl là rất cần thiết. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon, pH, nhiệt độ và nồng độ Chlorpyrifos ethyl lên sự tăng trưởng của 4 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl. Thí nghiệm so sánh sự tăng trưởng của 4 dòng vi khuẩn khi bổ sung thêm nguồn carbon từ TSB hoặc glucose với hàm lượng 0,3% vào môi trường nuôi để kích thích vi khuẩn phân hủy Chlorpyrifos ethyl. Mặt khác, bốn dòng vi khuẩn này được khảo sát trong môi trường có các giá trị pH từ acid đến trung tính. Thí nghiệm được thực hiện gồm 4 nghiệm thức tương ứng với 4 giá trị pH: 4, 5, 6, 7. Đồng thời, đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự tăng trưởng của bốn dòng vi khuẩn này. Thí nghiệm được thực hiện gồm 3 nghiệm thức với 3 giá trị nhiệt độ: 25^{0}C, 30^{0}C và 37^{0}C. Bên cạnh đó, sự ảnh hưởng của nồng độ Chlorpyrifos ethyl đến sự tăng trưởng của bốn dòng vi khuẩn này cũng đã được đánh giá. Thí nghiệm được thực hiện với 3 nghiệm thức tương ứng với 3 nồng độ của Chlorpyrifos ethyl 20, 40 và 60 ppm. Kết quả cho thấy, nguồn carbon bổ sung từ TSB thúc đẩy sự gia tăng mật số của bốn dòng vi khuẩn hiệu quả hơn là nguồn carbon bổ sung từ glucose, bốn dòng vi khuẩn sinh trưởng tối ưu ở pH 6-7 và nhiệt độ là 30-37^{o}C. Trong môi trường khoáng tối thiểu, sự sinh trưởng của bốn dòng vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở 3 nồng độ Chlorpyrifos ethyl.

***Từ khóa**: Chlorpyrifos ethyl, pH, nhiệt độ, vi khuẩn*

THE EFFECT OF SOME FACTORS ON THE GROWTH OF FOUR BACTERIA STRAINS CAPABLE TO RESOLVING CHLORPYRIFOS ETHYL

Truong Quoc Tat[1*], Nguyen Minh Vien[2]
[1]*The Faculty of Agriculture and Food Technology - Tien Giang University*
[2]*The Faculty of Agriculture – Can Tho University*
*Corresponding author: truongquoctat@tgu.edu.vn

ABSTRACT

Chlorpyrifos ethyl is an organophosphate insecticide which can residue and make soil and water pollution. Four bacterial strains capable of decomposing Chlorpyrifos ethyl were isolated from agricultural soil and was identified as Achromobacter xylosoxidans C3.1, Barrientosiimonas humi C4.3, Microbacterium sp. C8.9, Staphylococcus pasteuri C9.2, respectively. Research to promote the decomposition activity and application of these 4 bacterial strains in the treatment of Chlorpyrifos ethyl residues is essential. Therefore, the objective of this study is to assess the effect of carbon source, pH, temperature and Chlorpyrifos ethyl concentration on the growth of 4 bacteria strains which capable of decomposing Chlorpyrifos ethyl. The experiment compared the growth of 4 bacterial strains with the addition of carbon sources from TSB or glucose at a 0.3% concentration

to the culture medium to stimulate bacterial decomposition of Chlorpyrifos ethyl. Next, these four strains were examined in an environment with pH values from acid to neutral. The experiment consisted of 4 treatments corresponding to 4 pH values: 4, 5, 6, 7. At the same time, the effect of temperature on the growth of these four bacterial strains was assessed. The experiment was conducted with 3 treatments with 3 temperature values: 25ºC, 30ºC and 37ºC. Finally, evaluate the effect of Chlorpyrifos ethyl concentration on the growth of these four bacterial strains. The experiment was conducted with 3 treatments corresponding to 3 concentrations of Chlorpyrifos ethyl 20, 40 and 60 ppm. The results showed that the additional carbon source from the TSB promotes an increase in the density of four bacterial strains more efficiently than the additional carbon source from glucose, the four optimal bacterial growth strains at pH 6-7 and temperature. is 30-37ºC. In a minimal mineral culture, the growth of four distinct bacterial strains was not statistically significant at three ethyl chlorpyrifos concentrations.
Key world: *Chlorpyrifos ethyl, pH, temperature, bacteria*

TỔNG QUAN

Ô nhiễm môi trường đất và nước do dư lượng Chlorpyrifos ethyl gây ra là mối nguy hại cho các hệ sinh thái và sức khỏe của con người. Chlorpyrifos ethyl là hoạt chất trừ sâu góc lân hữu cơ, gây độc hại cho người và động vật máu nóng (PMRA, 2000). Trong nghiên cứu của Trương Quốc Tất và ctv (2016), đã phân lập và định danh được 4 dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl từ đất canh tác nông nghiệp. Cụ thể, bốn dòng vi khuẩn này đã được định danh lần lượt là *Achromobacter xylosoxidans* C3.1, *Barrientosiimonas humi* C4.3, *Microbacterium* sp. C8.9, *Staphylococcus pasteuri* C9.2. Bốn dòng vi khuẩn này có tiềm năng sử dụng vào trong xử lý ô nhiễm Chlorpyrifos ethyl trong đất và nước. Vì thế để khai thác tối đa tiềm năng cũng như thúc đẩy hoạt tính sinh học của 4 dòng vi khuẩn này cần phải nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng cuả chúng. Nguồn carbon, pH, nhiệt độ và nồng độ Chlorpyrifos ethyl là 4 yếu tố có ảnh hưởng trực tiếp đến sự tăng trưởng của vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định được những thông số tối ưu về nguồn carbon, pH, nhiệt độ và nồng độ Chlorpyrifos ethyl cho sự tăng trưởng của 4 dòng vi khuẩn.

PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Bốn dòng vi khuẩn: *Achromobacter xylosoxidans* C3.1, *Barrientosiimonas humi* C4.3, *Microbacterium* sp. C8.9, *Staphylococcus pasteuri* C9.2 thu nhận từ phòng thí nghiệm Sinh học đất, Bộ môn Khoa học đất, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.

Hóa chất:

- Chất chuẩn Chlorpyrifos ethyl của Accustandard, các loại dung môi có độ tinh khiết cao như acetone (99,8%), toluene (99,9%), hexan (99,7%), **…** (T.Baker).

- Môi trường Tryptone Soya Broth (TSB), glucose.

- Môi trường khoáng tối thiểu: 870 mL nước khử khoáng, 25 mL dung dịch đệm (35 g $Na_2HPO_4.2H_2O$, 4 g KH_2PO_4 pha trong một lít nước khử khoáng), 100 mL dung dịch muối khoáng (10 g $(NH_4)_2SO_4$, 2 g $MgCl_2.6H_2O$, 1 g $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ pha trong một lít nước khử khoáng) và 5 mL dung dịch vi lượng (800 mg Na_2-EDTA, 8,2 mg $MnCl_2.2H_2O$, 1,5 mg $CuSO_4.5H_2O$, 2 mg $ZnCl_2$, 0,6 mg, $SnCl_2.2H_2O$, 2 mg KBr, 5,8 mg $BaCl_2.2H_2O$, 470 mg $FeCl_2.4H_2O$, 4 mg $CoCl_2.6H_2O$, 3 mg $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0,7 mg $LiCl.H_2O$, 1 mg H_3BO_3, 2 mg KI).

Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm 1: Đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự gia tăng số lượng tế bào vi khuẩn

Theo Vasudevan and Rajaram (2001), quá trình liên quan đến việc biến đổi môi trường để kích thích vi khuẩn có khả năng xử lý sinh học các chất mục tiêu. Điều này có thể được thực hiện bằng cách bổ sung chất dinh dưỡng như: P, N, O và C. Phương pháp này ứng dụng để xử lí các chất gây ô nhiễm môi trường. Vì vậy, qua kết quả của các thí nghiệm thăm do về nguồn carbon và phần trăm carbon thích hợp để bổ sung, trong thí nghiệm này bổ sung thêm nguồn carbon từ TSB và glucose với hàm lượng 0,3% để kích thích vi khuẩn phân hủy Chlorpyrifos ethyl.

Thí nghiệm được thực hiện với 3 nghiệm thức cho mỗi dòng vi khuẩn, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại. Thành phần của mỗi nghiệm thức cụ thể như sau:

Nghiệm thức 1: 3,9 mL môi trường khoáng tối thiểu và 100 µL dung dịch vi khuẩn (OD = 0,7 tương đương mật số 10^6 tế bào/mL).

Nghiệm thức 2: 3,9 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn carbon từ TSB (0,5%) và 100 µL dung dịch vi khuẩn (OD = 0,7 tương đương mật số 10^6 tế bào/mL).

Nghiệm thức 3: 3,9 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn carbon từ glucose (0,5%) và 100 µL dung dịch vi khuẩn (OD = 0,7 tương đương mật số 10^6 tế bào/mL).

Thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ phòng thí nghiệm (30^0C), môi trường có pH 7, lắc liên tục trong tối với tốc độ 130 vòng/phút. Mật số vi khuẩn được kiểm tra ở thời điểm ban đầu và sau 3 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt theo Hoben and Somasegaran (1982). Phương pháp này cũng được sử dụng để xác định mật số vi khuẩn trong các thí nghiệm sau.

Thí nghiệm 2: Đánh giá sự ảnh hưởng của pH đến sự gia tăng số lượng tế bào vi khuẩn

Bốn dòng vi khuẩn phân hủy chlorpyrifos ethyl được phân lập từ đất phèn và đất phù sa, 2 nhóm đất này có pH dao động từ acid đến trung tính và đây cũng là đặc điểm về pH của đất ở ĐBSCL. Do đó, 4 dòng vi khuẩn này được khảo sát trong môi trường có các giá trị pH từ acid đến trung tính. Thí nghiệm được thực hiện gồm 4 nghiệm thức cho mỗi dòng vi khuẩn tương ứng với 4 giá trị pH: 4, 5, 6, 7. Môi trường khoáng tối thiểu có giá trị pH khoảng 7 vì vậy sau khi pha môi trường chia ra 4 phần bằng nhau, cho vào 4 chai thủy tinh và sử dụng H_2SO_4 0,1N chuẩn để hiệu chỉnh môi trường về giá trị pH mong muốn: 4, 5, 6. Dựa trên kết quả Thí nghiệm 1 nên vi khuẩn được nuôi trong 3,9 mL môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung TSB (0,5%) và 100 µL dung dịch vi khuẩn (OD = 0,7 tương đương mật số 10^6 tế bào/mL). Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lặp lại. Thí nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ phòng, lắc liên tục trong tối với tốc độ 130 vòng/phút.

Mật số vi khuẩn được xác định ở thời điểm ban đầu và sau 3 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt.

Thí nghiệm 3: Đánh giá sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng số lượng tế bào vi khuẩn

Nhiệt độ ở phòng thí nghiệm có thể dao động từ 25^0C đến 37^0C. Mặt khác, phần lớn vi khuẩn đất thuộc nhóm ưa ấm và sinh trưởng tối ưu trong khoảng 25 - 35^0C. Vì thế với mục tiêu chọn được điều kiện nhiệt độ thích hợp để nhân mật số vi khuẩn phân hủy chlorpyrifos ethyl. Do đó, thí nghiệm được thực hiện gồm 3 nghiệm thức với 3 giá trị nhiệt độ: 25^0C, 30^0C và 37^0C. Với giá trị nhiệt độ 30^0C, các nghiệm thức được đặt trong tối ở nhiệt độ phòng. Với giá trị nhiệt độ 37^0C, các nghiệm thức được đặt trong tủ ủ và điều chỉnh nhiệt độ đạt 37^0C. Với giá trị nhiệt độ 25^0C, đặt các nghiệm thức vào nồi bình ổn

nhiệt có nắp đậy và điều chỉnh nhiệt độ đạt 25^0C. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lặp lại. Mỗi lặp lại gồm 3,9 mL môi trường khoáng tối thiểu bổ sung TSB (0,5%) và 100 µL dung dịch vi khuẩn (OD = 0,7 tương đương mật số 10^6 tế bào/mL). Dựa trên kết quả Thí nghiệm 2 để chọn pH tối ưu nhất cho sự phát triển mật số của 4 dòng vi khuẩn nên 2 dòng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* C3.1 và *Staphylococcus pasteuri* C9.2 được nuôi trong môi trường pH 6, 2 dòng vi khuẩn *Barrientosiimonas humi* C4.3, *Microbacterium* sp. C8.9 được nuôi trong môi trường pH 7. Thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện lắc liên tục trong tối với tốc độ 130 vòng/phút.

Mật số vi khuẩn được kiểm tra ở thời điểm ban đầu và sau 3 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt.

Thí nghiệm 4: Đánh giá sự ảnh hưởng của nồng độ Chlorpyrifos ethyl đến sự gia tăng số lượng tế bào vi khuẩn

Thí nghiệm được thực hiện gồm 3 nghiệm thức cho mỗi dòng vi khuẩn tương ứng nồng độ Chlorpyrifos ethyl ở các mức: 20 ppm, 40 ppm và 60 ppm, trong môi trường khoáng tối thiểu. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lặp lại. Chuẩn bị ống nghiệm đã có nồng độ Chlorpyrifos ethyl thích hợp cho từng nghiệm thức, sau đó thêm 3900 µl môi trường khoáng tối thiểu và chủng 100 µl vi khuẩn (mật số 10^6 tế bào/ml). Dựa trên trên kết quả Thí nghiệm 2, hai dòng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* C3.1 và *Staphylococcus pasteuri* C9.2 được nuôi trong môi trường pH 6, 2 dòng vi khuẩn *Barrientosiimonas humi* C4.3, *Microbacterium* sp. C8.9 được nuôi trong môi trường pH 7. Theo kết quả Thí nghiệm 3, hai dòng *Achromobacter xylosoxidans* C3.1 và *Barrientosiimonas humi* C4.3 được nuôi ở nhiệt độ 30^{o}C, hai dòng *Microbacterium* sp. C8.9 và *Staphylococcus pasteuri* C9.2 được nuôi ở nhiệt độ 37^{o}C. Thí nghiệm được thực hiện ở điều kiện lắc trên máy lắc tốc độ 130 vòng/phút

Chỉ tiêu theo dõi là mật số vi khuẩn được kiểm tra ở thời điểm ban đầu và sau 7 ngày nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống nhỏ giọt

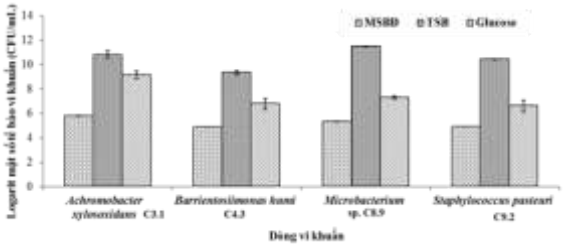
Phương pháp thống kê và xử lí số liệu

Số liệu được nhập, tính toán và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nguồn carbon đến mật số vi khuẩn

Sau 3 ngày nuôi ủ 4 dòng vi khuẩn trong dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn carbon TSB 0,5% hoặc glucose 0,5%. Kết quả về mật số của 4 dòng vi khuẩn được thể hiện qua Hình 4.31.



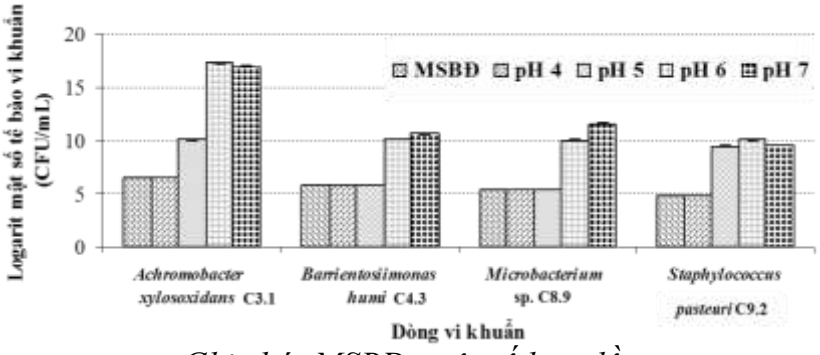
Ghi chú: MSBĐ- mật số ban đầu

Hình 1: Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sự gia tăng mật số vi khuẩn

Qua kết quả ở Hình 1 cho thấy tất cả 4 dòng vi khuẩn tăng mật số cao nhất khi nuôi ủ trong môi trường khoáng tối thiểu có bổ sung nguồn carbon từ TSB (0,5%). Do đó, TSB là môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của 4 dòng vi khuẩn này.

Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của pH đến mật số vi khuẩn

Sau 3 ngày nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu với 4 giá trị pH 4, 5, 6, 7. Kết quả cho thấy mật số trung bình của 2 dòng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* C3.1, *Staphylococcus pasteuri* C9.2 khi nuôi ở pH 6 lần lượt là 17,31 và 10,08 (giá trị Log(CFU/mL)) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số vi khuẩn trung bình khi nuôi chúng ở các giá trị pH khác. Mật số trung bình của dòng vi khuẩn *Microbacterium* sp. C8.9, ở giá trị pH 7 là 11,56 (giá trị Log(CFU/mL)) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số trung bình của dòng vi khuẩn này khi nuôi ở các giá trị pH còn lại. Mật số trung bình của dòng vi khuẩn *Barrientosiimonas humi* C4.3 khi nuôi ở pH 7 là 9,91 (giá trị Log(CFU/mL)) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số trung bình của dòng vi khuẩn này khi nuôi ở 2 giá trị pH 4 và pH 5. Tuy nhiên mật số trung bình của dòng vi khuẩn *Barrientosiimonas humi* C4.3 khi nuôi ở pH 7 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với mật số trung bình của dòng vi khuẩn này khi nuôi ở pH 6 (Hình 2).



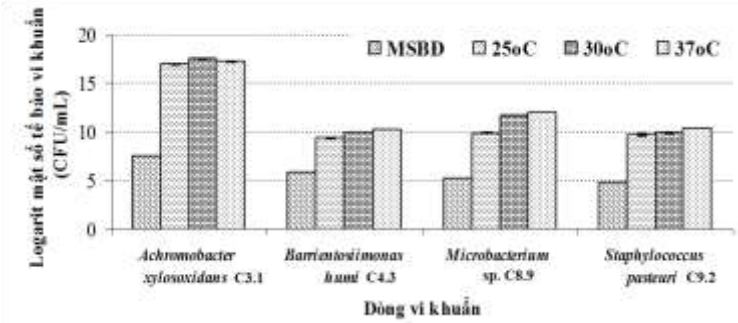
Ghi chú: MSBĐ- mật số ban đầu

Hình 2: Ảnh hưởng của pH đến mật số của 4 dòng vi khuẩn

Trong điều kiện TSB là nguồn thức ăn dễ tiêu, khảo sát với các giá trị pH khác nhau cho thấy vi khuẩn sinh trưởng gia tăng mật số ở các giá trị không giống nhau. Điều đó chứng tỏ sự sinh trưởng và phát triển của các dòng vi khuẩn phụ thuộc vào pH. Ở môi trường trung tính (pH 6 - 7) thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của các dòng vi khuẩn. Đối với giá trị pH 4 và pH 5, mật số vi khuẩn không tăng hoặc tăng ít. Có thể ở giá trị pH này gây nên sự ức chế hoạt tính enzyme dẫn đến quá trình chuyển hóa vật chất xảy ra chậm, vi khuẩn sinh trưởng và phát triển kém.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật số vi khuẩn

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến mật số vi khuẩn được thể hiện ở Hình 3.



Ghi chú: MSBĐ- mật số ban đầu

Hình 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự gia tăng mật số của 4 dòng vi khuẩn

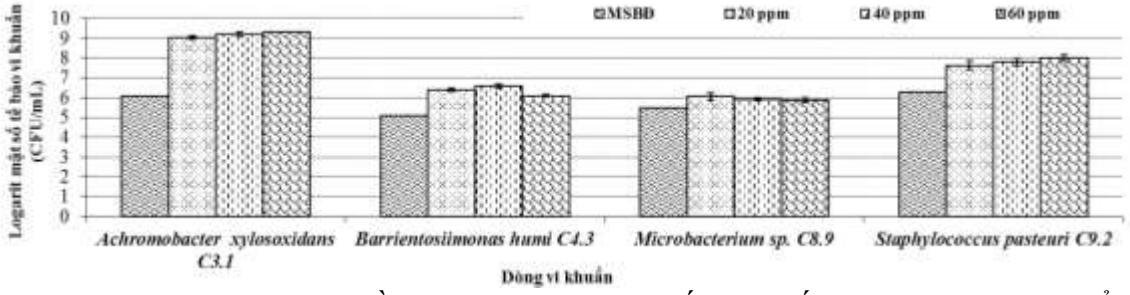
Qua kết quả ở Hình 3 cho thấy, sau 3 ngày khi nuôi 2 dòng vi khuẩn *Achromobacter xylosoxidans* C3.1, *Barrientosiimonas humi* C4.3 ở điều kiện nhiệt độ 30^0C thì mật số trung bình của chúng lần lượt là 16,9 và 9,95 (giá trị Log(CFU/mL)) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số trung bình của 2 dòng vi khuẩn này khi nuôi chúng ở điều

kiện nhiệt độ 25^0C và 37^0C. Mật số trung bình của 2 dòng vi khuẩn *Microbacterium* sp. C8.9, *Staphylococcus pasteuri* C9.2 khi nuôi ở 37^0C lần lượt là 11,95 và 10,44 (giá trị Log(CFU/mL)) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số trung bình của 2 dòng vi khuẩn này khi nuôi chúng ở 25^0C và 30^0C.

Trong điều kiện môi trường nuôi cấy gồm TSB và pH thích hợp cho vi khuẩn tăng trưởng, khảo sát với các điều kiện nhiệt độ khác nhau, kết quả sự gia tăng mật số của các dòng vi khuẩn là khác nhau. Mật số của các dòng vi khuẩn đạt cao nhất ở 30^0C và 37^0C. Ở điều kiện nhiệt độ này phù hợp cho hoạt tính của enzyme, nhiệt độ càng tăng (trong giới hạn không gây biến tính) thì hoạt tính của enzyme càng tăng, giúp cho các phản ứng hóa học nội bào xảy ra càng nhanh hơn. Ở 25^0C hoạt tính của enzyme bị hạn chế dẫn đến mật số vi khuẩn thấp hơn khi nuôi chúng ở 30^0C và 37^0C. Do đó sự sinh trưởng và phát triển của các dòng vi khuẩn phù hợp nhất là ở nhiệt độ 30^0C - 37^0C.

Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ Chlorpyrifos ethyl đến mật số vi khuẩn

Kết quả khảo sát nuôi cấy các dòng vi khuẩn trong môi trường khoáng tối thiểu với các mức nồng độ Chlorpyrifos ethyl khác nhau được thể hiện ở Hình 4.



Hình 4: Sự ảnh hưởng của nồng độ Chlorpyrifos đến mật số của các dòng vi khuẩn.

Qua kết quả ở hình 4.9 cho thấy, khi nuôi dòng vi khuẩn C3.1 trong dung dịch khoáng tối thiểu ở hàm lượng 60 ppm thì mật số vi khuẩn đạt 9,32 (giá trị Log(CFU/ml)) cao hơn khi nuôi vi khuẩn ở các hàm lượng khác và mật số này khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với mật số khi nuôi vi khuẩn ở hàm lượng Chlorpyrifos 20 ppm và 40 ppm.

Mật số của hai dòng vi khuẩn C4.4 và C8.19 khi nuôi trong dung dịch khoáng tối thiểu ở hàm lượng 20 ppm lần lượt là 7,39 và 6,07 (giá trị Log(CFU/ml)) cao hơn khi nuôi chúng ở các hàm lượng khác, tuy nhiên mật số này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) so với mật số vi khuẩn khi nuôi chúng ở hàm lượng Chlorpyrifos 40 ppm, 60 ppm.

Mật số của dòng vi khuẩn C9.2 khi nuôi trong dung dịch khoáng tối thiểu ở hàm lượng 60 ppm đạt 8,02 (giá trị Log(CFU/ml)) cao hơn khi nuôi vi khuẩn ở các hàm lượng khác, tuy nhiên mật số này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) so với mật số vi khuẩn khi nuôi chúng ở hàm lượng Chlorpyrifos ethyl 20 ppm và 40 ppm.

Qua kết quả khảo sát trên cho thấy, các dòng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường dung dịch khoáng tối thiểu có bổ sung hàm lượng Chlorpyrifos ethyl ở các mức khác nhau. Sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn đa số không bị ảnh hưởng bởi 3 mức này, ngoài trừ dòng vi khuẩn C3.1 có mật số vi khuẩn ở 60 ppm là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mật số mà vi khuẩn được nuôi ở 20 ppm, 40 ppm.

Kết quả tổng hợp các giá trị thích hợp của các yếu tố đối với các dòng vi khuẩn được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Giá trị thích hợp của các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn

Nhân tố / Dòng vi khuẩn	pH	Nhiệt độ (^oC)	Nồng độ Chlorpyrifos (ppm)	Nguồn carbon
Achromobacter xylosoxidans C3.1	6	30	60	TSB
Barrientosiimonas humi C4.3	7	30	20	TSB
Microbacterium sp. C8.9	7	37	20	TSB
Staphylococcus pasteuri C9.2	6	37	60	TSB

Kết quả khảo sát một số yếu tố môi trường sinh thái có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của các dòng vi khuẩn cho thấy đa số các dòng vi khuẩn thích nghi ở pH 6-7 và nhiệt độ 30^{o}C-37^{o}C. Như vậy trong điều kiện môi trường sống ở đất canh tác nông nghiệp, nơi mà các dòng vi khuẩn này tồn tại trong tự nhiên có điều kiện pH (4,2-4,8) thấp hơn điều kiện sinh trưởng tối ưu của chúng và khả năng là chúng sinh trưởng và phát triển bị hạn chế trong môi trường tự nhiên.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Bốn dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy Chlorpyrifos ethyl gia tăng mật số nhanh nhất khi bổ sung nguồn carbon từ TSB, pH môi trường nuôi cấy dao động từ 6-7 và nhiệt độ nuôi cấy dao động từ 30 - 37^{o}C. Đồng thời sự gia tăng mật số của bốn dòng vi khuẩn này không bị ảnh hưởng bởi nồng độ Chlorpyrifos ethyl trong khoảng từ 20-60 ppm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

HOBEN, H. AND P. SOMASEGARAN, (1982). Comparison of the Pour, Dpread, and Drop plate methods for enumeration of Rhizobium spp. in inculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*., vol. 44: 1246-1247.

PMRA (Pest Management Regulatory Agency), 2000. Environmental Assessment of Chlorpyrifos. Environmental Assessment Division, Pest Management Regulatory Agency, Ottawa, Ontario. (unpublished).

TRUONG, Q.T., NGUYEN, T.A.T., DUONG, M.V., (2016). Phân lập vi khuẩn phân hủy thuốc trừ sâu Chlorpyrifos ethyl từ đất canh tác lúa ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, số 9 năm 2016, 33-38.

TRUONG, Q.T. AND DUONG, M.V., (2016). Isolation and Identification of Chlorpyrifos-Degrading Bacteria From Rice-upland Crop Soil in The Mekong Delta. *Scientific Journal of Thu Dau Mot University*, ISSN 1859-4433.

VASUDEVAN, N. AND P. RAJARAM, (2001). Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environ. Int*, 26: 409-411.

BS. RÂU - CÂU CHUYỆN KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO

Th.S Trần Chí Thành
Công ty TNHH MVT Sắc Mộc Tinh

1. Hình thành ý tưởng sản xuất sản phẩm

Những "nỗi đau" của khách hàng (nam giới có nhiều râu) thường gặp liên quan việc cạo râu bao gồm: viêm da, viêm nang râu. Tuy nhiên, các sản phẩm cạo râu hiện có trên thị trường không giúp giải quyết được.

Bs. Râu là sản phẩm sáp cạo râu không dùng nước, được hình thành từ quá trình nghiên cứu phát hiện "nỗi đau" và đưa ra giải pháp "xoá nỗi đau" phù hợp. Sản phẩm Bs.Râu với công thức chiết xuất thảo dược thiên nhiên (dầu dừa, dầu oliu, trà xanh, vitamin E). Vaseline giúp cạo râu dễ dàng, các loại dầu và chiết xuất trà xanh cung cấp dinh dưỡng cho da và giảm tình trạng viêm da - viêm nang râu.

Ngoài ra, sản phẩm Bs. Râu còn có những tác động tích cực đối với môi trường bao gồm: tiết kiệm nước, giảm ô nhiễm nước và giảm rác thải rắn. Cụ thể, hoạt động cạo râu của nam giới hàng ngày sử dụng lượng nước tưởng ít nhưng lại rất nhiều do số lượng nam giới 50% dân số và số lần cạo râu nhiều. Song song đó là việc thải ra môi trường nước rất nhiều râu vụn và nhỏ không thể tự phân huỷ tự nhiên. Sản phẩm Bs. Râu làm râu mềm dễ cạo nên giúp tăng số lần sử dụng loại dao cạo dùng chỉ dùng 1 (một) lần thành 10 (mười) lần, điều đó nghĩa là giảm rác thải rắn (dao cạo) lên đến 10 lần.

2. Thăm dò hiệu quả và phản hồi trải nghiệm của các khách hàng đầu tiên

Ý tưởng về sản phẩm Bs. Râu cần được đánh giá mọi mặt, tác giả đã mang ý tưởng và sản phẩm mẫu (protype) đi dự thi cuộc thi khởi nghiệm đổi mới sáng tạo 2020 tại Đại học Nguyễn Tất Thành và vào top 12 dự án xuất sắc. Kết quả chung cuộc, sản phẩm Bs. Râu đoạt giải khuyến khích.

Các ý kiến phản hồi từ những khách hàng trải nghiệm sản phẩm đều tích cực và xác nhận được những ưu việt của sản phẩm đúng như những điều đã nêu ra trong ý tưởng sản phẩm và tỷ lệ hài lòng là 100% (khảo sát trên 30 sinh viên và giảng viên của Đại học Nguyễn Tất Thành trong tuần lễ tập huấn khởi nghiệm Đổi mới Sáng tạo do Vietnam Silicon Valley tổ chức). Trong tháng 3/2021, công ty đã cử nhân viên tiếp thị 100 tiệm tóc để gửi sản phẩm Bs. Râu dùng trải nghiệm và ký gửi kinh doanh thử. Kết quả số tiệm tóc hài lòng về sản phẩm và đồng ý ký gửi để bán cho khách hàng là 73 tiệm (73%). Các tiệm tóc từ chối (27%) ký gửi với lý do không quen dùng sản phẩm mới, sản phẩm không phù hợp xài cho tiệm tóc và họ không có kinh nghiệm bán hàng.

3. Tiếp cận các nhà đầu tư tiềm năng, quảng bá dự án sản xuất

Việc tiếp cận các nhà đầu tư là bước cực kỳ khó đối với các sản phẩm đổi mới sáng tạo, tác giả đã tranh thủ các cơ hội để có thể tiếp cận các nhà đầu tư và gây sự chú ý về sản phẩm Bs.Râu. Những khó khăn trong tiếp cận nhà đầu tư được ghi nhận là sản phẩm mới, chưa có nhà xưởng, chưa rõ khả năng cấp phép lưu hành cũng như sự tiếp nhận của thị trường, do đó, rủi ro đầu tư cao.

Sản phẩm Bs. Râu đã đăng ký và nhận được hỗ trợ quảng bá giới thiệu với các nhà đầu tư tại Triển lãm 2020 do Trung tâm Thông tin Khoa học Kỹ thuật Tp.HCM (CESTI). Đồng thời, sản phẩm Bs.Râu đã tham gia triển lãm Techfest 2020 Đông Nam Bộ tổ chức tại Bến Tre.

4. Triển vọng

Sản phẩm Bs. Râu có khả năng chiếm lĩnh thị trường về chất lượng tốt và giá cạnh tranh (1,800đ/lần cạo) và có khả năng xuất khẩu. Tuy nhiên, tính đến nay dự án vẫn chưa

gọi được nhà đầu tư lớn. Thay vào đó là những nhà đầu tư nhỏ lẻ cho quy mô sản xuất nhỏ thử nghiệm ban đầu cùng với nguồn đầu tư của công ty TNHH MTV Sắc Mộc Tinh. Sản phẩm mẫu đang được trưng bày mẫu tại gian hàng hỗ trợ khởi nghiệp của Trung tâm Thông tin Khoa học Kỹ thuật Tp.HCM, 79 Trương Định, Quận 1, Tp.HCM.

5. Bài học kinh nghiệm

Những đổi mới sáng tạo ứng dụng các thành tựu khoa học khả thi khi ra sản phẩm hay dịch vụ khi thấu hiểu nhu cầu xã hội hay giải quyết nỗi đau của khách hàng. Tuy nhiên, những khó khăn hay rào cản mà các nhà khoa học đang gặp phải là thiếu kỹ năng kinh doanh, thiếu khả năng lập kế hoạch kinh doanh và không thể thuyết phục những nhà đầu tư lớn. Ngoài ra, vấn đề nhà xưởng và quy mô sản xuất lớn không có khiến cho các dự án sản xuất các sản phẩm có tính đổi mới sáng tạo gặp nhiều trở ngại khi tính khả thi sản xuất quy mô lớn gần như bằng không. Công ty TNHH MTV Sắc Mộc Tinh đã đưa ra giải pháp ký hợp đồng thuê xưởng gia công, xin cấp phép lưu hành theo quy định của Bộ Y tế và bước đầu đưa sản phẩm phân phối qua các kênh B2B (tiệm tóc), cộng tác viên bán hàng trực tuyến và bán lẻ cho khách hàng có nhu cầu (B2C).

THÔNG TIN THAM KHẢO THÊM

*** Top 12 dự án thi khởi nghiệp tại Đại học Nguyễn Tất Thành 2020**
https://ntt.edu.vn/web/tin-tuc/lo-dien-12-du-an-xuat-sac-vao-vong-chung-ket-cuoc-thi-y-tuong-khoi-nghiep-doi-moi-sang-tao-nttu-start-up-2020

*** Triển lãm 2020 tại CESTI (Trung tâm Thông tin Khoa học Kỹ thuật Tp.HCM, 79 Trương Định, Q.1, Tp.HCM)**
http://techport.vn/70/-truc-tiep-hoi-thao-gioi-thieu-dr-rau-san-pham-duoc-my-pham-ung-dung-cac-chiet-xuat-va-tinh-dau-thao-duoc--91315.html

*** Triển lãm tại Techfest 2020 Đông Nam Bộ (Bến Tre)**
http://techport.vn/72/dr-rau-tai-techfest-dong-nam-bo-2020-91364.html?fbclid=IwAR3sgHpAVWwz3wJomFxq9njo-TXxLTAX8m52ZnJ_-gz6vMobQ0UjVxwLYbY

CIRCULAR ECONOMY APPROACH IN AGRICULTURAL WASTES MANAGMENT: A CASE STUDY IN MINH CHAU COMMUNE, BA VI, HA NOI

Pham Minh Hen[1,*], Nguyen Van Thanh[2], Vo Huu Cong[3]

[1]*K62KHMTA, Faculty of Environment, Vietnam National University of Agriculture*

[2]*Department of Resources and Environment, Ba Vi district, Hanoi*

[3]*Faculty of Environment, Vietnam National University of Agriculture*

Corresponding author's: *pmhen99@gmail.com*

ABSTRACT

This research aims to evaluate the potential of waste to biomass via nutrient recovery as a component of circular economy. A case study on livetock waste – plant cultivation system was conducted in Minh Chau commune, Hanoi. The results show that the commune developemt strategies focus on livestock production combined with high yield plants such as king grass, banana, and maize. As of 2020, the livestock production shared by 4,228 cows, 7,290 pig; and number of poultries were 21,977. The livestock sector contributes to 114.2 tons of waste (manure) per day. Manures from livestock are used for biogas (35% of the total manure volume), as fertilizer for plant (61.06%), as feedstuff for earthworm (3.06%), and for fish (0.01%). Beside commercial feeds, raw feeding stuffs such as king grass, banana and maizes were used as main supply with 92% of the total amount. King grass represents the highest amount for nitrogen source, roughly 8.09 tons/day (84.5%). This result indicates that nitrogen from waste uptake by king grass can be recycle via grass biomass. Phosphorus recovery presents small amount compare to that of nitrogen, however, the plants play a role as 60% phosphorus supply. This research focuses on recycle of wastes in term of nutrient flow, a further study should be conducted to quantify added values within recycle loops agaist time course change.

Keywords*: circular economy, sustainable development goal, zero waste, environmental sustainability, waste ultilization.*

INTRODUCTION

Livestock sector and crops are important components of agriculture and contributes significantly country's economy. However, the number of cattle and poultry continues increasing every year has posed big problem for waste collection and disposal activities (Cong et al., 2018a, Xia et al., 2020). In contrast, agricultural waste has shown its beneficial uses as an energy source, chemical recycling agent, and chemical adsorbent (Zhang et al., 2013, Cong et al., 2018b). In recent years, a number of animal waste treatment models aimed at recovering resources from elimination process have been invested and obtained initial results, application of recirculation economy, agriculture zero waste. It is a closing loop production model, minimizing the amount of waste discharged from the output of one process as input to the other, bringing about economic and environmental benefits.

Circular economy and the Sustainable Development Goals (SDGs) have a close relationship in many aspects. Circular economy practices directly contribute to achieve 21 targets of SDGs and indirectly to an additional 28 targets (Ghosh, 2020). It was reported that targets in SDG6 (Clean water and sanitation), SDG7 (afforable and clean energy), SDG8 (Decent work and economic growth), SDG12 (Responsible consumption and production), and SDG15 (Life on land) have the strongest relationships with the circular economy practices to achived by 2030 (Ghosh, 2020, United Nation, 2020). The design philosophy behind circular economy concept is to consider all materials involved in industrial and commercial processes to be nutrients, in which two main categories are the

actors: (1) technical and (2) biological. Thus, technical and biological process could contributes as main components of circular economy paradigm (Cong and Hang, 2019, Geissdoerfer et al., 2017). The application of circular economy has been innitiated an undergone different stages such as matured, progressive, and innitiated CE-driven societies. Vietnam has paid great attention on circular economy as innitiated CE-driven society (MONRE, 2020).

Minh Chau commune is an unique commune located within the inning land of Red river. The economic development is strongly based on livestock and crop production. The amount of waste from animal husbandry is estimated at 114.2 tons per day. A large number of animal husbandry owners have actively controlled waste through reultilizing manure, urine, and water through biogas system or sources of plants. However, many households have not yet controlled waste discharge and discharged directly into the environment, flowing into the Red River. Therefore, it is necessary to control the amount of waste from animal husbandry activities and water environment protection in Minh Chau commune. In the context of circular economy, feces and water are can be used as sources for nutrient. Therefore, this research is to investigate the reused potential of livestock waste for plants as an involment of closing loop to reduce wastes to environment.

RESEARCH METHODOLOGY

Study site

Minh Chau commune is selected as study site because its has special geographical characteristic. Its located on the accumulated land within the Red river without surrounding connection with other. Minh Châu is located about 5 km from the center of Ba Vi district, with a population of 6,517 people. Crop cultivation and animal husbandry are mainly contributed to household income.



Figure 1. Location of Minh Chau Commune

Data collection

Secondary data collection

Overall assessment of situation animal husbandry and cultivation: articles from scientific journals, data published in recent statistical yearbook; natural characteristics, socio-economic development situation of Minh Chau commune and relevant information are colected from the People's Committee of Minh Chau commune.

Primary data collection

Structure questionnaire interview

Questionnaires are used to collect primary data about production situation, husbandry process, forms of waste management and treatment by farms. The households have quite similar characteristics in terms of culture, experience and natural and social conditions, so in this study, information-gathering interviews were conducted with 60 households raise cows and 60 households raise pigs.

Waste audit method

Waste audit is conducted in 3 aspects: 1) Nutrition management (type of food, protein content, dietary fiber), water, energy and other components; 2) Waste management through forms of management such as use as fertilizer, worm farming, food for fish, direct application to crops, other activities and release to the environment; 3) Waste discharge.

Circular economy approach in waste management

In this research, cirular economy approach is considered in the way that effluent from livestock production could be reused as input via nutrient uptake for plant and vegetales, feeding stuffs for earth worms, and carbon sources for biogas generation. A different combination of households were survey to estimate the potential for waste reutilization and revenue could be obtained.

Data analysis

Secondary data on crop land use was summarized and analyzed. Primary data were statistically analyzed as mean, standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Agricultural patterns

Crop landuse

The total cultivated area is fixed as 283.44 ha, however, cultivation performances of crops are estimated at 1.5 times. Annually, there are 8 types of crop types including maize (22ha), soy beans (5ha), black bean (6 ha), green bean (4 ha), vegetables (40 ha), chilli (5.5ha), egg plant (8ha), banana (75ha), fruit (20 ha), king grass (239,66 ha). Figure 3 shows the percentages of crops of which king grass, banana and vegetables are dominant with more than 83.4% of the total cops area. If calculating direct food for cows, maize and king grass contribute about 24.99 milliion VND and 69.4 million VND per hectare. In term of income contribution, banana and fruit play highest contribution with 125-128 milliion VND per hectare. On average, farmers can obtain about 85.3 milliion VND per hectare.

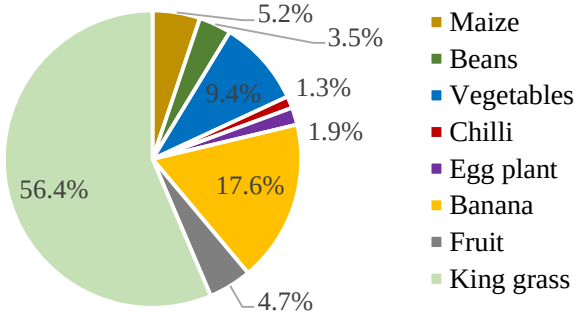


Figure 2. Distribution of crops in Minh Chau commune

Livestock production

Arcoding to the People committee of Minh Chau, the strategies for livestock production have been addressed on high productivity cows and dairy cows. As of June 2020, there are a total of 4,228 cows, of which there are 2,652 breeding cows, 356 male calves, 1,220 dairy cows, and 556 dairy cows. On average, each cow delivers about 18 kg

of milk per day. The total number of pigs is 7,290 heads, of which there are 1,046 sowing pigs and 6,232 pigs for meat. Poultry has 21,977 and 2,345 dogs (Table 1).

Table 1. Number of livestock as of June 2020

Type of livestocks	**Total number**	**Percentage (%)**
Cows	**4.228**	
Breeding cows	2.652	62.7
Male calves	356	8.40
Dairy cows	1.220	28.9
Pigs	**7.290**	
Sows	1.046	14
Pork	6.232	85
Poultry	**21.977**	
Dog	**2.345**	

It was reported that there are 452 households raising cows with the scale of households and farms ranging from 3-27 heads/household. The barn structures composed of solid and semi-solid accounts for 96.7%, other households use simple cages with soil floor and straw roof. The average barn area is about 78.05m^2. In particular, households with large breeding facilities are mainly dairy farmers, each cow has an average area of 8.6 m^2/cow, beef cattle account for about 7.1 m^2/head. Recently, the animal husbandry activities have shift to raising cattle for meat or dairy farming. The average cow raising period is from 18 months to 20 months. Forage consists of king grass, banana stalks, throne stems collected from field whereas comercial feeds include corn bran and milk-fortified pellets.

Cow breeding process

The cow raising process is divided into 4 stages with a total period of 20 months. At different stages, farmers feed the cows on different amount of foods based on nutrient demand. The calve period of 6 months is the stage of calving that has been completely weaned and fed with grass and bran. The amount of food given to them will vary and increase with their growth. Over the next 6 months, cows are supplemented with more concentrate to increase their nutrient intake. The period of cattle being 18 months old is the time when they are separated from the breeding cows for fattening. At this stage, cows are supplemented with both concentrate and roughage to increase cattle biomass. After the fattening process, when the market demand and reasonable prices will be slaughtered (Fig.3).

The solid waste, waste water and emissions are issues that arise during the entire production process at farms. On average, an adult beef cow will generate about 16.5 kg of manure/day, the amount of wastewater including water to wash the shed and urine is about 190 liters/day (Survey data, 2019). Emissions are also a concern in cow farming. This is one of the major sources of CH_4 and causes an unpleasant odor for people around, especially in cows with CH_4 emissions in an adult cow of about 200 liters per day. Although it has been collected and used a part of CH_4, the remaining gas has not been further processed but discharged directly into the environment, causing significant impacts on the environment.

-Water: 67,500L/head -Crude food: 5940 kg/head -Corn bran: 900	-Water: 20000L/head -Crude food: 1600 kg/head -Corn bran: 240	-Water: 71,250L/head -Crude food: 8,500kg/head -Corn bran:	-Water: 18,750L/head -Crude food: 2.250kg/head -Corn bran:

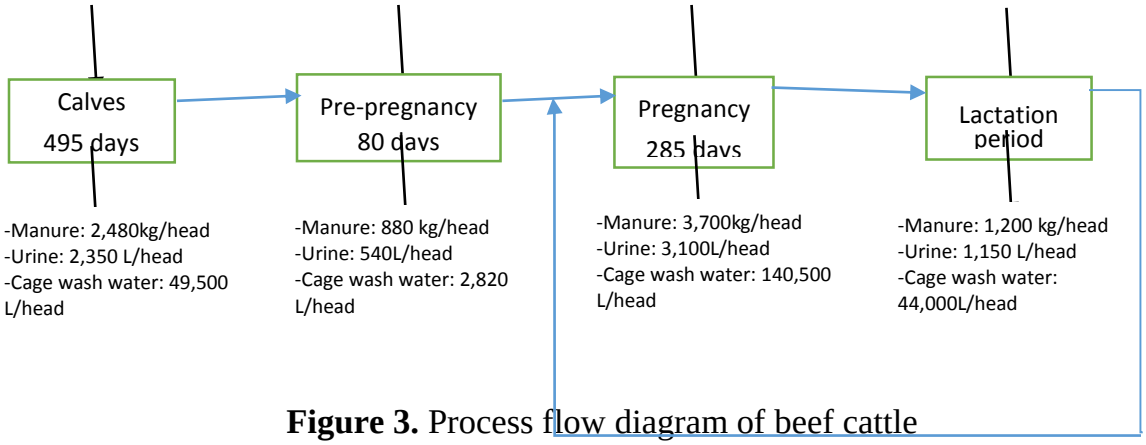


Figure 3. Process flow diagram of beef cattle

Waste collection and discharge from animal husbandry

Figure 4 shows the main waste collection from livestock activities. According to the survey data, manures from livestock are used for biogas (35% of the total manure volume), as fertilizer for plant (61.06%), as feed stuff for earthworm (3.06%), and for fish (0.01%). Households innitiated the biogas diggesters with an average volume of 10-15 m^3. Calculated on the scale of 60 households interviewed with average biogas volume per 0.3 m^3/head. But on a specific scale, there are times when people raise more, biogas tank system has not been able to handle it, so it has to be discharged directly into the environment. Most farmers do not use fresh fertilizer to plant but only use wastewater after biogas to fertilize crops. Pig manure contains a lot of eggs, worms, flukes, pathogenic microorganisms without treatment, which pollute the soil and cause disease to the plants themselves. Most households do not fully handle livestock wastes. The main reason is due to the lack of investment in waste water treatment facilities and the inadequate attention of the livestock owners themselves. Waste discharged directly into canals contaminates surface water, groundwater, stinking, disease germs spread.

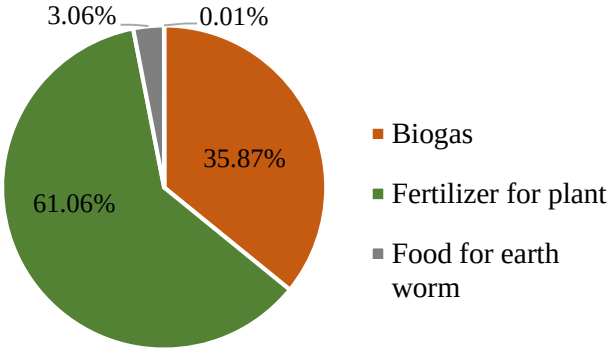


Figure 4. Situation of waste collection in Minh Chau commune

Nitrogen release from cow

Total nitrogen from cattle raising process in Minh Chau commune is shown in Table 2. The amount of nitrogen entering the breeding system is calculated from roughage, corn bran and water, estimated to 3496 tons/year. The amount of nitrogen discharged from cow farming is 865.92 tons/year. The waste disposal rate into the environment based on input is 7.79%. The nitrogen circulation system in the cow raising process is very important to minimize the impact on the environment. Farmers use fertilizer fertilizers directly for

farming including planting grasses and crops, worms and biogas production. This amount is mainly discharged from the biogas system.

Table 2. Estimation of Nitrogen release from cow production

No.	Type of waste	Emission (tons/day)	Amount of N	Amount of N	
				tons/day	tons/year
1	Manure	67.55	2.96%	2.00	729.79
2	Urine	47.84	1.99g/L	0.10	34.75
3	Cage wash water	845.52	328.5mg/L	0.29	101.38
	Total			**2.39**	**865.92**

Phosphorus release from cow

The amount of phosphorus entering the system is calculated according to the sources of the nitrogen stream. The total amount of P entering the system is 114.84 tons/year. Cattle raising produces 101.42 tons of phosphorus/year. Phosphorus is an essential nutrient for plants. However, when released into the environment in high concentrations, the plant cannot absorb all, P will accumulate in the soil, when washed away into the water sources causing eutrophication in water, causing imbalance in the system. Calculation results show that the amount of phosphorus accumulated in the waste circulation system is carried out by crops including grasses, crops and worms. The amount of waste released into the environment is mainly from the source after the biogas tank, corresponding to 24.25 tons/year.

Table 3. Estimation of Phosphorus release from cow production

No.	Type of waste	Emission (1 day)	Amount of P	Amount of P	
				Ton/day	Ton/year
1	Manure	67.55	0.36%	0.243	88.76
2	Urine	47.84	0.23g/L	0.011	4.02
3	Cage wash water	845.52	28mg/L	0.024	8.64
	Total			0.274	101.42

Nutrient recovery

Figure 5 demonstrates a possible paradigm of circular economy in Minh Chau commune with two typical components livestock – plants via nutrient cycles. Livetocks, such as cows, release large amount of solid waste and water contain high nutrients (nitrogen and phosphorus) becoming input as nutrient uptake for crops, fruits and king grass. A circular economy seeks to retain the added value of products for as long as possible by productively reusing resources when a product has reached the end of its life (Economic Affairs, 2016). In this research, added value was observed during the application of earth worm for manure valorization. The output products contains biomass of earth worms and fertilizer. A field survey shows that earth worm famming could gain a benefit of 35-40 million VND per month by selling earth worm while fertilizer can be use for vegetables within the commune (Sung A Ki, 2019). However, the amount of maure used for earth worm cultivation occupied only 3.06% of the total manure in the commune (Fig. 4).

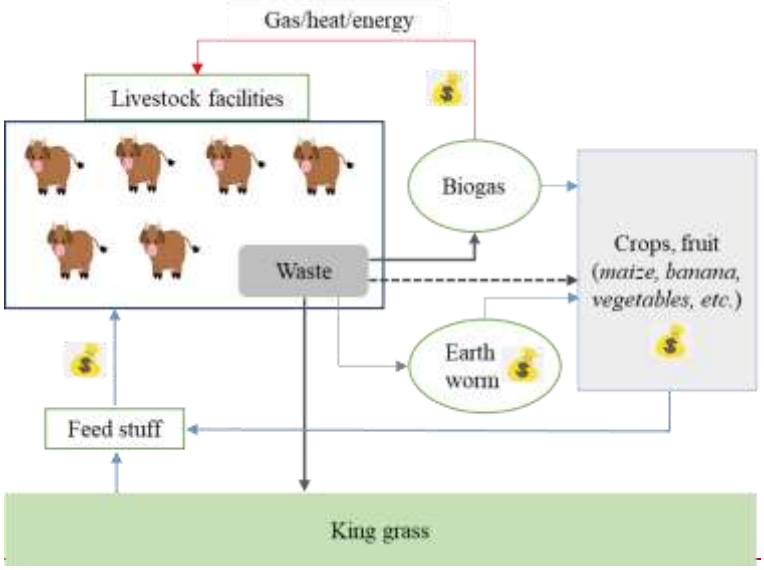


Figure 5. Livestock waste recovery as nutrient flow

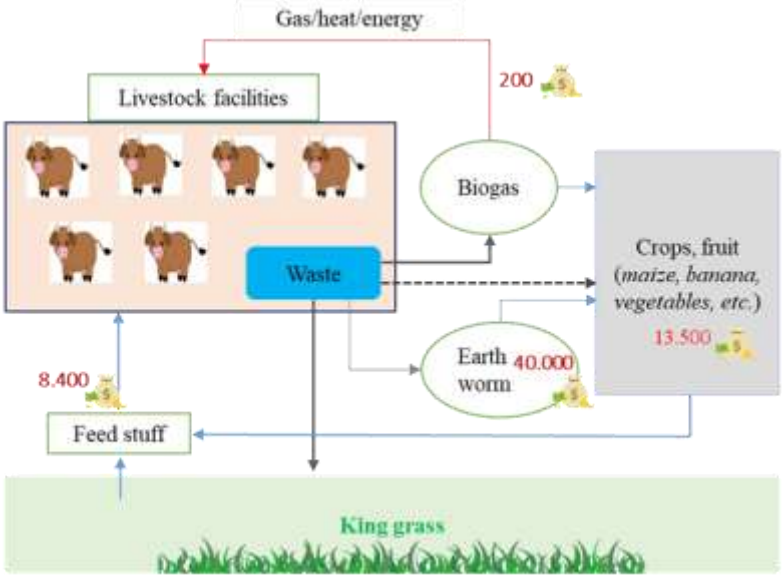


Table 4 shows the feeding components and amount for the total number of cows in Minh Chau commune. Beside commercial feeds, raw feeding stuffs such as king grass, banana and maizes were used as main supply with 92% of the total amount. King grass represents the highest amount for nitrogen source, roughly 8.09 tons/day (84.5%). This result indicates that nitrogen from waste uptake by king grass can be recycle via grass biomass. Phosphorus recovery presents small amount compare to that of nitrogen, however, the plants play a role as 60% phosphorus supply.

Table 4. Nutrient as Nitrogen and Phosphorus recovery as feeding stuffs

Feedings	**Total consumtion (tons/day)**	**Estimated Nitrogen (%w/w)**	**Nitrogen equivalent (tons/day)**	**Estimated Phosphorus (%w/w)**	**Phosphorus equivalent (tons/day)**
King grass	89.90	9.0%	8.09	0.07%	0.063
Banana	21.71	0.6%	0.13	0.03%	0.007
Maize	18.54	1.7%	0.32	0.40%	0.074

Maize (with corn)	4.43	8.0%	0.35	0.70%	0.031
Maize bran	9.09	3.4%	0.31	1.10%	0.100
Commercial bran	2.36	16.0%	0.38	0.90%	0.021
Total	**146.03**		**9.58**		**0.296**

CONCLUSION

Minh Chau commune has a total area of 563.33 ha, of which agricultural land account for 283ha (50.2%). It has good conditions for agricultural cultivation and livestock production. As of 2020, the livestock production shared by 4,228 cows, 7,290 pig; and number of poultries were 21,977. The livestock sector contributes to 114.2 tons of waste (manure) per day. Manures from livestock are used for biogas (35% of the total manure volume), as fertilizer for plant (61.06%), as feed stuff for earthworm (3.06%), and for fish (0.01%). Beside commercial feeds, raw feeding stuffs such as king grass, banana and maizes were used as main supply with 92% of the total amount. King grass represents the highest amount for nitrogen source, roughly 8.09 tons/day (84.5%). This result indicates that nitrogen from waste uptake by king grass can be recycle via grass biomass. Phosphorus recovery presents small amount compare to that of nitrogen, however, the plants play a role as 60% phosphorus supply. This research focuses on recyle of wastes in term of nutrient flow, a further study should be conducted to quantify added values within recyle loops agaist time course change. Also, the circular economy approach has shown a potential to reduce waste discharge into environment while generate economical values for farmers. Therefore, institional arrangement should be addressed to help more farmers involving in this model.

Acknowledgements

This work is funded by Vietnam National University of Agriculture (Grant number: T2019-04-20).

REFERENCES

CONG, V. H. & HANG, P. T. 2019. Waste Audit of Cattle Production in Minh Chau Commune, Ba Vi District, Hanoi. *TNU Journal of Science and Technology,* 207**,** 129 - 134.

CONG, V. H., LAM, N. T., VÂN, Đ. T. H., SƠN, C. T., GIANG, N. T. H. & HA, N. T. B. 2018a. Environmental Pollution and Potential Waste Management in Livestock Production. *Science Technology Journal of Agrculture and Rural Developement,* 12**,** 22-31.

CONG, V. H., UYEN, L. T. T., LAM, N. T. & CUONG, P. V. 2018b. Agricultural Residues and Field Wastes Generation in Cu Yen Commune, Luong Son District, Hoa Binh Province. *TNU Journal of Science and Technology,* 187**,** 25-20.

ECONOMIC AFFAIRS, E. E. A., EUROPE. 2016. *The Circular Economy Paradigm* [Online]. Available: http://www.europeanpublicaffairs.eu/the-circular-economy-paradigm/ [Accessed].

GEISSDOERFER, M., SAVAGET, P., BOCKEN, N. M. P. & HULTINK, E. J. 2017. The Circular Economy – A new sustainability paradigm? *Journal of Cleaner Production,* 143**,** 757-768.

GHOSH, S. K. 2020. *Circular Economy: Global Perspective*, Singapore, Springer Nature.

MONRE 2020. Selecting circular economy to create green future.

SUNG A KI. 2019. *A Research on Earth Worm Cultivation for Cow Manure treatment in Minh Chau commune, Ba Vi, Hanoi*. Bachelor, Vietnam National University of Agriculture.

UNITED NATION. 2020. About the Sustainable Development Goals.

XIA, B., ZHANG, J., ZHAO, X., FENG, J., TENG, Y., CHEN, B., SUN, X., ZHU, L., SUN, X. & QU, K. 2020. Polystyrene microplastics increase uptake, elimination and cytotoxicity of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in the marine scallop Chlamys farreri. *Environ Pollut,* 258**,** 113657.

ZHANG, Z., LI, C., DAVIES, E. G. R. & LIU, Y. 2013. Agricultural Waste. *Water Environment Research,* 85**,** 1377-1451.

CRISPR/CAS9 AND ITS CURRENT APPLICATION STATUS ON PIG BREEDING

Nguyen Huu Tinh [1], Anh Phu Nam Bui [2,*], Tran Thi Huyen Tran [3]

Institute of Animal Sciences for Southern Vietnam, Hiep Thang quarter, Binh Thang ward, Di An town, Binh Duong city, Vietnam.

Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh city Open University, 35 Ho Hao Hon street, Ho Chi Minh city, Vietnam

Faculty of Applied Sciences, Ton Duc Thang University, 19 Nguyen Huu Tho street, Tan Hung ward, District 7, Ho Chi Minh city, Vietnam

[*] Corresponding author: anh.bpn@ou.edu.vn

ABSTRACT

Pork provides substantial portion of daily meals for human. To meet the global demand for growing population, implementation of advanced technologies in pig breeding is required. The most recently gene editing CRISPR/Cas9 system provides novel tools to pig breeders to improve animal welfare, productivity, and performance. This paper aims to give principles of genome editing techniques and the latest update on CRISPR/Cas9 application on pig industry. We will also review the possible choices for delivering CRISPR/Cas9 system in pig research. It is hoped that with the adaptation of CRISPR/Cas9 technology, rapid genetic understanding and utilization in pig breeding will soon accelerate.

Keywords: *CRISPR/Cas9, genome editing, animal welfare, productivity, performance.*

INTRODUCTION

Providing sufficient food for the constant growing of the human population is currently a challenging mission. In order to feed the projected 9.7 billion people in 2050, the global demand for agricultural products is calculated to increase 60% 2050 (Alexandratos and Bruinsma, 2012). Specifically, a higher animal-based proteins demand for milk and meat outputs is estimated to augment at 60% and 76%, respectively. Consequently, the livestock industry is required to improve production efficiency in a way that balance the minimizing detrimental influences on the environment and ensuring animal welfares. According to United States Department of Agriculture, domestic pig (*Sus scrofa domestica*) production provides 42% of the total livestock production in 2018 (USDA, 2018), and 40% of human consumption of meat sources (Alexandratos and Bruinsma, 2012). This clearly reveals a significant contribution of pork in human daily meals. Because of its high finesses in meat quality, pork becomes a regular food in China, United States, and many European and Asian countries.

TRADITIONAL BREEDING AND GENOME ENGINEERING IN PIG BREEDING

A myriad of scientific reports has demonstrated various methods to improve pig production to meet the global demand. Classical selective breeding based on measurable traits of economic importance, for instance, feed conversion, litter sizes, carcass fat or meat quality, has tremendously increased the productivity. Specifically, from 1960s to 2000s, targeted breeding successfully enhanced 50% of litter sizes, 37% of lean pork meat, and doubling the lean pork meat per kg of feed intake (van der Steen et al., 2005). Later in the early of 20th century, with the participation of biotechnological solutions, molecular genetic approaches have revolutionized the swine genomic research by the advent of using genetic markers to construct genetic maps for the detection of quantitative trait loci (QTL) and candidate genes of desirable traits. With the aid from increasing powerful computer and

available bioinformatics database, hundreds of QTL conferring disease resistance or productivity have been reported in swine during the last twenty years (Elsik et al., 2009, Groenen et al., 2012). The introduction of assisted reproductive technologies including artificial insemination (Foote, 2002), semen sexing and cryopreservation (Sathe and Shipley, 2014, Rodríguez-Gil and Estrada, 2013), embryo transfer (Perry, 2018), in vitro fertilization (Brackett et al., 1982) have added more options to breeders to enhance pig production and research. With the rapid development of DNA techniques and animal cloning, genetically modified animals (GMA) has been enabled to emerge (Hammer et al., 1985, Whitworth et al., 2016, Whitworth et al., 2019, Burkard et al., 2018). These transgenic swine carrying exogenous genes of important agricultural traits have the potential to perform well against diseases and maintain the superior performance. Taken together, classical genetic and biotechnology-based approaches have transformed the swine production and health, and advanced our understanding of mechanisms in swine biology (Schultz et al., 2020).

However, these methods still have their limitations. While selective breeding and molecular genetic studies are restricted on genetic variation and linkage map within a population (McFarlane et al., 2019, Tait-Burkard et al., 2018), assisted reproductive technologies are technically challenging and costly procedures (Hansen, 2020). In recombinant DNA and animal cloning methods, many concerns about low efficiency in generating offspring, transgenic animal's health and approval for human consumption have been raised (Yum et al., 2018, Van Eenennaam et al., 2019). Most of these obstacles can be met with genome editing approaches. With the emergence of these recently discovered tools, swine breeders are offered a state-of-the-art technology to study and understand genes conferring any traits of interest.

GENOME-EDITING AND ITS PRINCIPLES

Gene editing is a molecular biology technique that intentionally targets user-defined DNA sites within the genome for the purpose of elucidating functions of unknown genes. Since modified genetic information in the parental lines is passed to next generations, gene editing can be employed to purposely alter traits of agricultural importance to develop new cultivars or breeding lines. Various gene editing techniques have been established including zinc finger nuclease (ZFN), transcription activator-like effector nuclease (TALEN) and cluster regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (CRISPR/Cas9). All of these tools rely on the specificity of the endonucleases that recognize and cleave DNA at desired sites to facilitate mutations induced by cellular repair mechanism. In this review, we aim to provide the latest updates of CRISPR/Cas9 application on swine breeding, although TALEN and ZFN can obtain the same outcomes.

ZFN and TALEN are two early gene editing techniques that employs similar conceptual nuclease structure to introduce genetic mutation. Both systems depend on the specificity of the DNA-binding domain of zinc finger protein (ZFP) in the ZFN system and transcription activator-like effector (TALE) in the TALEN system. Since each zinc finger in the ZFP recognizes every triplet on single-strand DNA, designing 3-6 zinc finger components in combination will therefore attach to 9-18 base pairs on aimed regions to achieve specificity. On the other hand, the improved targeting property of TALE relies on the programmable tandem repeat modules, of which each module specifically binds to a single base pair. The order of the tandem repeat modules can be rearranged to obtain better directing at chosen DNA sequence. After the binding to DNA region, both ZFP and TALE

will orchestrate the dimerized endonuclease Fok1 to break the double strand DNA at predetermined regions.

The introduction of DSB generated by ZFN and TALEN will trigger the DNA repair mechanisms including non-homologous end-joining (NHEJ) or homologous recombination (HR). In the error prone NHEJ pathway, the two ends of the cleaved DNA are joined and ligated, resulting in the generation of insertion or deletion at the site of DSB, thus producing knock-out mutation. In the HE pathway, a site-directed nuclease and an exogenous DNA template harboring homologous sequence to the DSB regions are required to facilitate the insertion of single or multiple transgenes, thereby gaining knock-in mutation. Accumulation of reports have demonstrated the successful application of ZFN (Whyte et al., 2011, Yang et al., 2011, Hauschild et al., 2011, Lutz et al., 2013, Kwon et al., 2013, Whyte and Prather, 2012) and TALEN (Carlson et al., 2012, Tan et al., 2013, Miyagawa et al., 2015, Cheng et al., 2016, Kang et al., 2016, Lee et al., 2014, Rao et al., 2016) in swine.

CRISPR/CAS9 SYSTEM AND ITS MECHANISM

The most recently discovered CRISPR/Cas9 was firstly identified in bacteria as an adaptive defense barrier against foreign DNA. This system has major advantages over the earlier ZFN and TALEN in many ways such as cost-effectiveness, simplicity, greater precision and efficiency (Gupta and Musunuru, 2014). It consists of two components including CRISPR and Cas9 nuclease complex. In the CRISPR, there are three elements: a leader sequence, an array of repeat sequences and spacer sequences. While the CRISPR locus upstream-localized leader sequence is a specie-specific promoter, the highly conserved palindromic repeats can form hairpin structure (Wu and Bazer, 2019). Each repeat in the array is interspaced by a spacer. As the spacer sequences are homologous to the viral sequences or plasmids, they stimulate the cell to capture and degrade the genetic invasion of these corresponding virus of plasmids (Whitworth et al., 2016). The Cas9 nuclease complex is composed of an endonuclease Cas9 protein, a CRISPR RNA (crRNA) and transactivation CRISPR RNA (tracrRNA). The crRNA is transcribed from the CRISPR locus and subsequently join to tracrRNA to become the single guide RNA (sgRNA). sgRNA and Cas9 protein will form Cas9 complex that recognize and create double-strand exogenous DNA break, thus terminate the invasion (Proudfoot et al., 2019).

For the gene editing purpose, the programing of sgRNA will determine the genomic location for DNA cleavage, therefore it will facilitate the DNA breakage of modification of chosen genes via DSB. CRISPR/Cas9-mediated DSB are recognized by cellular damage repair machinery. During the repairing process, indel mutations are introduced, subsequently inactivates the desired genes of interest via NHEJ pathway. In HR pathway, with the provision of DNA template, homologous recombination will be facilitated, and gene replacement will occur, leading to transgene insertion (Namula et al., 2019).

DELIVERY METHODS OF CRISPR/CAS9 SYSTEM

To precisely modify the studied genes, accomplishing introduction of CRISPR/Cas9 system into the zygote or reproductive cells is a matter of great importance. Various strategies for CRISPR/Cas9 system transporting can be categorized into two main platforms including viral and non-viral (Huafeng et al., 2019). In the non-viral platform, physical or chemical approaches, such as electroporation, microinjection, nanoparticles, and hydrodynamic injection, are required to achieve successful CRISPR/Cas9 reagents delivery (Liu et al., 2017). In the viral platforms, there are three frequently used viral vectors: lentivirus, adenovirus and adeno-associated virus which are utilized as vehicles to

incorporate CRISPR/Cas9 system into the cell's genome. Although both platforms possess their own advantages and disadvantages, they have achieved numerous successes in gene-editing research (Liu et al., 2017). However, according to latest research by McFarlane et al. (2019), of all the methods in two platforms, three latest advanced procedures in reproductive technologies including zygote electroporation, zygote transduction with recombinant adeno-associated virus (rAAV) and surrogate sire technology (SST), will be the most efficient tool in the future that enable efficient transferring CRISPR/Cas9 system into the zygote on farm settings (McFarlane et al., 2019).

Electroporation is a well-established approach to incorporate foreign reagents into mammalian cells but has recently been improved and optimized for application to zygote in genome editing context. The oocytes from donor super-ovulated females will be collected for in vitro fertilization. After artificial fertilization, zygotes will be subject to electroporation to introduce CRISPR/Cas9 reagents. Subsequently, the electroporated zygotes will be matured in vitro and verified to harbor the genome-edited sequences by screening. Confirmed embryos will be implanted into recipient female to produce genetically modified animals with superior qualities. Due to its computer-based design, online ordering and ready-to-use supplies for CRISPR/Cas9 components, successful genome editing in swine and other animals has been reported (Laible, 2018, Miao et al., 2019, Namula et al., 2019). Nevertheless, this technique still needs improvement in reduction of mosaicism in the edited offspring, and the length of homologous DNA repair template to induce the HR pathway (McFarlane et al., 2019).

Because of its non-pathogenicity, high infection efficiency and wide spectrum of cell specificity, employing rAAVs for gene transduction has generated successful results (Kaulich and Dowdy, 2015). Following the super ovulated females' oocytes collection and in vitro fertilization, the resulting fertilized zygotes will be immersed in a solution containing rAAVs. The rAAvs will infiltrate the zygote, hijack the cellular mechanism to express the CRISPR/Cas system and induce the genome editing process. Once the rAAVs-edited zygotes are screened by biopsy sequencing, they will be transferred to recipient females to develop into genetically superior animals. Although this approach is still confined in mice research (Yoon et al., 2018), due to the simplicity for the precision in foreign DNA into the host's genome, rAAV method is considered the most promising method for generating genome-edited livestock in the future (McFarlane et al., 2019).

The SST involves the production of male animals devoid of endemic germline stem cells. As a result, these animals lack the ability to establish mature sperm. The spermatogonial stem cells (SSCs) will be collected from the donor male and SSCs will undergo CRISPR/Cas9-mediated genetic manipulation to create elite genome edited sperm cells. The cells will be will be transplanted to juvenile sire recipient, resulting a desirable quality sperm bioreactor that can disseminate the traits of interest to progenies by natural breeding (Wang et al., 2017, Giassetti et al., 2019). In pig industry, SST boars will rapidly disseminate favorably edited genes in a shorter period of time compared to traditional breeding approaches (McFarlane et al., 2019).

APPLICATION OF CRISPR/CAS9 SYSTEM IN PIG BREEDING

Meat quality

Myostatin (MSTN) negatively regulates the development of skeletal muscle mass in vivo. In 2015, Wang et al. generated MSTN-knocked out swine by combined utilization of CRISPR/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer method (Wang et al., 2015). In 2016, another report by Bi et al. demonstrated a successful attempt to create MSTN-edited

pig by integrating CRISP/Cas9 and Cre/Lox9 approaches (Bi et al., 2016). Both results from two studies illustrated that genome-edited pigs have higher lean meat production, lower fat accumulation compared to the control pigs. However, there were associating detrimental effects associated with MSTN-null pigs, for instance, motor function impairment in newborn Landrace breed, and piglet's fatality after birth. To circumvent these hurdles, Zou et al. (2018) targeted new candidate gene FBXO40 which influences muscle development. CRISPR/Cas9-mediated pigs with nonfunctional FBXO40 gene exhibited similar MSTN-disable phenotypes without previously described deleterious impacts (Zou et al., 2018). Recently, a study by Xiang et al. (2018) has displayed mutated insulin-like growth factor (IGF2) gene, which stimulates growth and development in mammals during fetal and postnatal stages, resulted in the amelioration of meat quality in indigenous Chinese breed Bama pigs (Xiang et al., 2018). These results suggested that CRISPR/Cas9 can be applied in pig research to improve meat quality.

Disease resistance

CRISPR/Cas9 approach has been employed to target CD163, which is the main receptor for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. PRRS is one of the most devastating pig diseases which has caused global economic loss during past decades. In 2016, Whitworth et al. reported that CD-163 null pigs displayed complete resistance to both type I and type II PRRS virus isolates (Wells et al., 2017) and maintained normal biological functions (Whitworth et al., 2016). Another example in genome editing in generating disease resistance pigs is the directional targeting aminopeptidase N, which is the putative receptor of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV) (Delmas et al., 1992, Li et al., 2007). PEDV and TGEV are causative agents for severe diarrhea in pre-weaned piglets and have been linked to high morbidity and fatality (Proudfoot et al., 2019). Although edited aminopeptidase N- pigs showed resistance to TGEV, susceptibility to PEDV still remained. Since there is a link between defects of aminopeptidase N and blood cancers including leukemia and lymphoma, further investigation is needed to scrutinize the effect on health and productivity of the animals (Whitworth et al., 2019).

Animal welfare

In pigs, endogenous uncoupling protein 1 (UCP1) participates in thermoregulation during cold stress. Disruption of porcine UCP1 protein will result in the lack of formation of brown adipose tissue and subsequent absence of non-shivering thermogenesis mechanism (Trayhurn et al., 1989, Berg et al., 2006, Jastroch and Andersson, 2015). Consequently, newborn piglets without functional UCP1 gene are thus prone to cold exposure, which could lead to neonatal fatality. By employment of CRISPR/Cas9-mediated edition UCP1-edited pigs illustrated improvement in cold tolerance (Zheng et al., 2017).

CONCLUSION

Pork is an important source for the increasing demand for better quality and quantity meat protein. As a result, pig industry is pushed to enhance its productivity and reduce environmental impacts. Significant achievements in animal biotechnology have driven the pig breeding programs in many countries with many successes. With the introduction of CRISPR/Cas9 system, pig breeders and researchers are offered a novel tool to rapidly understand traits of great economic significance, augment the pig production and health. It is hoped that CRISPR/Cas9 system will accelerate the research progress in pig industry in the next coming decades.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are in debt to Institute of Animal Sciences for Southern Vietnam for their support during manuscript preparation.

CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

None

REFERENCES

ALEXANDRATOS, N. & BRUINSMA, J. 2012. World Agriculture Towards 2030/2050: The 2012 Revision. ESA Working paper No. 12-03. Rome: FAO.

BERG, F., GUSTAFSON, U. & ANDERSSON, L. 2006. The Uncoupling Protein 1 Gene (UCP1) Is Disrupted in the Pig Lineage: A Genetic Explanation for Poor Thermoregulation in Piglets. *PLOS Genetics,* 2**,** e129.

BI, Y., HUA, Z., LIU, X., HUA, W., REN, H., XIAO, H., ZHANG, L., LI, L., WANG, Z., LAIBLE, G., WANG, Y., DONG, F. & ZHENG, X. 2016. Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP. *Scientific reports,* 6**,** 31729-31729.

BRACKETT, B. G., BOUSQUET, D., BOICE, M. L., DONAWICK, W. J., EVANS, J. F. & DRESSEL, M. A. 1982. Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. *Biology of Reproduction,* 27**,** 147-158.

BURKARD, C., OPRIESSNIG, T., MILEHAM, A. J., STADEJEK, T., AIT-ALI, T., LILLICO, S. G., WHITELAW, C. B. A. & ARCHIBALD, A. L. 2018. Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection. *Journal of Virology,* 92**,** e00415-18.

CARLSON, D. F., TAN, W., LILLICO, S. G., STVERAKOVA, D., PROUDFOOT, C., CHRISTIAN, M., VOYTAS, D. F., LONG, C. R., WHITELAW, C. B. A. & FAHRENKRUG, S. C. 2012. Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 109**,** 17382-17387.

CHENG, W., ZHAO, H., YU, H., XIN, J., WANG, J., ZENG, L., YUAN, Z., QING, Y., LI, H., JIA, B., YANG, C., SHEN, Y., ZHAO, L., PAN, W., ZHAO, H.-Y., WANG, W. & WEI, H.-J. 2016. Efficient generation of GGTA1-null Diannan miniature pigs using TALENs combined with somatic cell nuclear transfer. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E,* 14**,** 77-77.

DELMAS, B., GELFI, J., L'HARIDON, R., VOGEL, SJÖSTRÖM, H., NORÉN & LAUDE, H. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature,* 357**,** 417-420.

ELSIK, C. G., TELLAM, R. L. & WORLEY, K. C. 2009. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science,* 324**,** 522-528.

FOOTE, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science,* 80**,** 1-10.

GIASSETTI, M. I., CICCARELLI, M. & OATLEY, J. M. 2019. Spermatogonial Stem Cell Transplantation: Insights and Outlook for Domestic Animals. *Annual Review of Animal Biosciences,* 7**,** 385-401.

GROENEN, M. A. M., ARCHIBALD, A. L., UENISHI, H., TUGGLE, C. K., TAKEUCHI, Y., ROTHSCHILD, M. F., ROGEL-GAILLARD, C., PARK, C., MILAN, D., MEGENS, H.-J., LI, S., LARKIN, D. M., KIM, H., FRANTZ, L. A. F., CACCAMO, M., AHN, H., AKEN, B. L., ANSELMO, A., ANTHON, C., AUVIL, L., BADAOUI, B., BEATTIE, C. W., BENDIXEN, C., BERMAN, D., BLECHA, F., BLOMBERG,

J., BOLUND, L., BOSSE, M., BOTTI, S., BUJIE, Z., BYSTROM, M., CAPITANU, B., CARVALHO-SILVA, D., CHARDON, P., CHEN, C., CHENG, R., CHOI, S.-H., CHOW, W., CLARK, R. C., CLEE, C., CROOIJMANS, R. P. M. A., DAWSON, H. D., DEHAIS, P., DE SAPIO, F., DIBBITS, B., DROU, N., DU, Z.-Q., EVERSOLE, K., FADISTA, J., FAIRLEY, S., FARAUT, T., FAULKNER, G. J., FOWLER, K. E., FREDHOLM, M., FRITZ, E., GILBERT, J. G. R., GIUFFRA, E., GORODKIN, J., GRIFFIN, D. K., HARROW, J. L., HAYWARD, A., HOWE, K., HU, Z.-L., HUMPHRAY, S. J., HUNT, T., HORNSHØJ, H., JEON, J.-T., JERN, P., JONES, M., JURKA, J., KANAMORI, H., KAPETANOVIC, R., KIM, J., KIM, J.-H., KIM, K.-W., KIM, T.-H., LARSON, G., LEE, K., LEE, K.-T., LEGGETT, R., LEWIN, H. A., LI, Y., LIU, W., LOVELAND, J. E., LU, Y., LUNNEY, J. K., MA, J., MADSEN, O., MANN, K., MATTHEWS, L., MCLAREN, S., MOROZUMI, T., MURTAUGH, M. P., NARAYAN, J., TRUONG NGUYEN, D., NI, P., OH, S.-J., ONTERU, S., PANITZ, F., PARK, E.-W., et al. 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature,* 491**,** 393-398.

GUPTA, R. M. & MUSUNURU, K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of clinical investigation,* 124**,** 4154-4161.

HAMMER, R. E., PURSEL, V. G., REXROAD, C. E., WALL, R. J., BOLT, D. J., EBERT, K. M., PALMITER, R. D. & BRINSTER, R. L. 1985. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature,* 315**,** 680-683.

HANSEN, P. J. 2020. Implications of Assisted Reproductive Technologies for Pregnancy Outcomes in Mammals. *Annual Review of Animal Biosciences,* 8**,** 395-413.

HAUSCHILD, J., PETERSEN, B., SANTIAGO, Y., QUEISSER, A.-L., CARNWATH, J. W., LUCAS-HAHN, A., ZHANG, L., MENG, X., GREGORY, P. D., SCHWINZER, R., COST, G. J. & NIEMANN, H. 2011. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 108**,** 12013-12017.

HUAFENG, L., QIUDI, D., LILI, L. & LEI, S. 2019. Application and Development of CRISPR/Cas9 Technology in Pig Research. *IntechOpen*.

JASTROCH, M. & ANDERSSON, L. 2015. When pigs fly, UCP1 makes heat. *Molecular Metabolism,* 4**,** 359-362.

KANG, J.-T., KWON, D.-K., PARK, A. R., LEE, E.-J., YUN, Y.-J., JI, D.-Y., LEE, K. & PARK, K.-W. 2016. Production of α1,3-galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology. *Journal of veterinary science,* 17**,** 89-96.

KAULICH, M. & DOWDY, S. F. 2015. Combining CRISPR/Cas9 and rAAV Templates for Efficient Gene Editing. *Nucleic Acid Therapeutics,* 25**,** 287-296.

KWON, D.-N., LEE, K., KANG, M.-J., CHOI, Y.-J., PARK, C., WHYTE, J. J., BROWN, A. N., KIM, J.-H., SAMUEL, M., MAO, J., PARK, K.-W., MURPHY, C. N., PRATHER, R. S. & KIM, J.-H. 2013. Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Scientific reports,* 3**,** 1981-1981.

LAIBLE, G. 2018. Production of Transgenic Livestock: Overview of Transgenic Technologies. *In:* NIEMANN, H. & WRENZYCKI, C. (eds.) *Animal Biotechnology 2: Emerging Breeding Technologies.* Cham: Springer International Publishing.

LEE, K., KWON, D.-N., EZASHI, T., CHOI, Y.-J., PARK, C., ERICSSON, A. C., BROWN, A. N., SAMUEL, M. S., PARK, K.-W., WALTERS, E. M., KIM, D. Y., KIM, J.-H., FRANKLIN, C. L., MURPHY, C. N., ROBERTS, R. M., PRATHER, R.

S. & KIM, J.-H. 2014. Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 111**,** 7260-7265.

LI, B. X., GE, J. W. & LI, Y. J. 2007. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus. *Virology,* 365**,** 166-172.

LIU, C., ZHANG, L., LIU, H. & CHENG, K. 2017. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society,* 266**,** 17-26.

LUTZ, A. J., LI, P., ESTRADA, J. L., SIDNER, R. A., CHIHARA, R. K., DOWNEY, S. M., BURLAK, C., WANG, Z.-Y., REYES, L. M., IVARY, B., YIN, F., BLANKENSHIP, R. L., PARIS, L. L. & TECTOR, A. J. 2013. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and Galactose α-1,3-Galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation,* 20**,** 27-35.

MCFARLANE, G. R., SALVESEN, H. A., STERNBERG, A. & LILLICO, S. G. 2019. On-Farm Livestock Genome Editing Using Cutting Edge Reproductive Technologies. *Frontiers in Sustainable Food Systems,* 3.

MIAO, D., GIASSETTI, M. I., CICCARELLI, M., LOPEZ-BILADEAU, B. & OATLEY, J. M. 2019. Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation†. *Biology of Reproduction,* 101**,** 177-187.

MIYAGAWA, S., MATSUNARI, H., WATANABE, M., NAKANO, K., UMEYAMA, K., SAKAI, R., TAKAYANAGI, S., TAKEISHI, T., FUKUDA, T., YASHIMA, S., MAEDA, A., EGUCHI, H., OKUYAMA, H., NAGAYA, M. & NAGASHIMA, H. 2015. Generation of α1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. *The Journal of reproduction and development,* 61**,** 449-457.

NAMULA, Z., WITTAYARAT, M., HIRATA, M., HIRANO, T., NGUYEN, N. T., LE, Q. A., FAHRUDIN, M., TANIHARA, F. & OTOI, T. 2019. Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal,* 55**,** 598-603.

PERRY, G. 2018. 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *In: The International Embryo Transfer Society Data Retrieval Committee*.

PROUDFOOT, C., LILLICO, S. & TAIT-BURKARD, C. 2019. Genome editing for disease resistance in pigs and chickens. *Animal Frontiers,* 9**,** 6-12.

RAO, S., FUJIMURA, T., MATSUNARI, H., SAKUMA, T., NAKANO, K., WATANABE, M., ASANO, Y., KITAGAWA, E., YAMAMOTO, T. & NAGASHIMA, H. 2016. Efficient modification of the myostatin gene in porcine somatic cells and generation of knockout piglets. *Molecular Reproduction and Development,* 83**,** 61-70.

RODRÍGUEZ-GIL, J. & ESTRADA, E. 2013. Artificial insemination in boar reproduction. *In: Boar Reproduction***,** 589-607.

SATHE, S. & SHIPLEY, C. F. 2014. Cryopreservation of Semen. *Bovine Reproduction.*

SCHULTZ, B., SERÃO, N. & ROSS, J. W. 2020. Chapter 23 - Genetic improvement of livestock, from conventional breeding to biotechnological approaches. *In:* BAZER, F. W., LAMB, G. C. & WU, G. (eds.) *Animal Agriculture.* Academic Press.

TAIT-BURKARD, C., DOESCHL-WILSON, A., MCGREW, M. J., ARCHIBALD, A. L., SANG, H. M., HOUSTON, R. D., WHITELAW, C. B. & WATSON, M. 2018.

Livestock 2.0 – genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals. *Genome Biology,* 19**,** 204.

TAN, W., CARLSON, D. F., LANCTO, C. A., GARBE, J. R., WEBSTER, D. A., HACKETT, P. B. & FAHRENKRUG, S. C. 2013. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 110**,** 16526-16531.

TRAYHURN, P., TEMPLE, N. J. & AERDE, J. V. 1989. Evidence from immunoblotting studies on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology,* 67**,** 1480-1485.

USDA 2018. Livestock and Poultry. World Markets and Trade: U.S. Department of Agriculture [Internet].

VAN DER STEEN, H. A. M., PRALL, G. F. W. & PLASTOW, G. S. 2005. Application of genomics to the pork industry. *Journal of Animal Science,* 83**,** E1-E8.

VAN EENENNAAM, A. L., WELLS, K. D. & MURRAY, J. D. 2019. Proposed U.S. regulation of gene-edited food animals is not fit for purpose. *npj Science of Food,* 3**,** 3.

WANG, K., OUYANG, H., XIE, Z., YAO, C., GUO, N., LI, M., JIAO, H. & PANG, D. 2015. Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System. *Scientific reports,* 5**,** 16623-16623.

WANG, Y., DING, Y. & LI, J. 2017. CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in Mouse Spermatogonial Stem Cells. *In:* ZHANG, B. (ed.) *RNAi and Small Regulatory RNAs in Stem Cells: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York.

WELLS, K. D., BARDOT, R., WHITWORTH, K. M., TRIBLE, B. R., FANG, Y., MILEHAM, A., KERRIGAN, M. A., SAMUEL, M. S., PRATHER, R. S. & ROWLAND, R. R. R. 2017. Replacement of Porcine CD163 Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 with a CD163-Like Homolog Confers Resistance of Pigs to Genotype 1 but Not Genotype 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of virology,* 91**,** e01521-16.

WHITWORTH, K. M., ROWLAND, R. R. R., EWEN, C. L., TRIBLE, B. R., KERRIGAN, M. A., CINO-OZUNA, A. G., SAMUEL, M. S., LIGHTNER, J. E., MCLAREN, D. G., MILEHAM, A. J., WELLS, K. D. & PRATHER, R. S. 2016. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotechnology,* 34**,** 20-22.

WHITWORTH, K. M., ROWLAND, R. R. R., PETROVAN, V., SHEAHAN, M., CINO-OZUNA, A. G., FANG, Y., HESSE, R., MILEHAM, A., SAMUEL, M. S., WELLS, K. D. & PRATHER, R. S. 2019. Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic Research,* 28**,** 21-32.

WHYTE, J. J. & PRATHER, R. S. 2012. CELL BIOLOGY SYMPOSIUM: Zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (Sus scrofa) genome1,2. *Journal of Animal Science,* 90**,** 1111-1117.

WHYTE, J. J., ZHAO, J., WELLS, K. D., SAMUEL, M. S., WHITWORTH, K. M., WALTERS, E. M., LAUGHLIN, M. H. & PRATHER, R. S. 2011. Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Molecular reproduction and development,* 78**,** 2-2.

WU, G. & BAZER, F. W. 2019. Application of new biotechnologies for improvements in swine nutrition and pork production. *Journal of Animal Science and Biotechnology,* 10**,** 28.

XIANG, G., REN, J., HAI, T., FU, R., YU, D., WANG, J., LI, W., WANG, H. & ZHOU, Q. 2018. Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs. *Cellular and Molecular Life Sciences,* 75**,** 4619-4628.

YANG, D., YANG, H., LI, W., ZHAO, B., OUYANG, Z., LIU, Z., ZHAO, Y., FAN, N., SONG, J., TIAN, J., LI, F., ZHANG, J., CHANG, L., PEI, D., CHEN, Y. E. & LAI, L. 2011. Generation of PPARγ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell research,* 21**,** 979-982.

YOON, Y., WANG, D., TAI, P. W. L., RILEY, J., GAO, G. & RIVERA-PÉREZ, J. A. 2018. Streamlined ex vivo and in vivo genome editing in mouse embryos using recombinant adeno-associated viruses. *Nature Communications,* 9**,** 412.

YUM, S.-Y., YOUN, K.-Y., CHOI, W.-J. & JANG, G. 2018. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific. *Journal of animal science and biotechnology,* 9**,** 16-16.

ZHENG, Q., LIN, J., HUANG, J., ZHANG, H., ZHANG, R., ZHANG, X., CAO, C., HAMBLY, C., QIN, G., YAO, J., SONG, R., JIA, Q., WANG, X., LI, Y., ZHANG, N., PIAO, Z., YE, R., SPEAKMAN, J. R., WANG, H., ZHOU, Q., WANG, Y., JIN, W. & ZHAO, J. 2017. Reconstitution of UCP1 using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 114**,** E9474-E9482.

ZOU, Y., LI, Z., ZOU, Y., HAO, H., LI, N. & LI, Q. 2018. An FBXO40 knockout generated by CRISPR/Cas9 causes muscle hypertrophy in pigs without detectable pathological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 498**,** 940-945.

ĐẶC ĐIỂM MÔ BỆNH HỌC XƠ VỮA ĐỘNG MẠCH VÀNH THEO PHÂN LOẠI AHA TRÊN NHỮNG TRƯỜNG HỢP ĐỘT TỬ TỰ NHIÊN QUA GIÁM ĐỊNH PHÁP Y

Âu Dương Quốc Uy[1], Phan Văn Hiếu[1], Lưu Sỹ Hùng[2], Phạm Kim Bình[3]

[1] Trung tâm Pháp Y thành phố Hồ Chí Minh

336 Trần Phú, phường 7, quận 5, thành phố Hồ Chí Minh

[2] Trường Đại học Y Hà Nội

1 Tôn Thất Tùng, phường Kim Liên, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

[3] Bệnh viện Hữu Nghị Việt Đức

40 Tràng Thị, phường Hàng Bông, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

Tác giả liên lạc: drquocuy@gmail.com

TÓM TẮT

TỔNG QUAN: *Bệnh mạch vành có xu hướng ngày càng gia tăng ở Việt Nam và trên thế giới. Việc phân độ mảng xơ vữa mạch vành rất quan trọng vì nó tương quan với các tổn thương tim đáng kể như nhồi máu cơ tim, xơ hóa cơ tim và phì đại thất trái,… Để nghiên cứu điều này trên người sống rất khó khăn do đó các nghiên cứu này được thực hiện thông qua giám định pháp y. Chúng tôi thực hiện tiến cứu trong 6 tháng trên những trường hợp đột tử tự nhiên nhằm mục đích mô tả đặc điểm xơ vữa động mạch vành theo phân loại của AHA.*

PHƯƠNG PHÁP: *Nghiên cứu này được thực hiện tại Trung tâm Pháp y TP.HCM. Quần thể nghiên cứu là những trường hợp đột tử tự nhiên trong 6 tháng đầu năm 2020. Tổng cộng có 152 quả tim thu thập được đánh giá đại thể và vi thể để tìm hiểu mức độ nặng của MXV mạch vành và tổn thương tim liên quan.*

KẾT QUẢ: *Tăng tỉ lệ tổn thương trung gian (típ III) ở những đối tượng trẻ (21 – 40 tuổi). Típ xơ vữa thường gặp nhất là típ III (40,9%). 55,6% là các mảng xơ vữa tiến triển (típ IV – VIII), trong đó thường gặp nhất là típ IV (23,4%). Động mạch vành thường gặp nhất là ĐM liên thất trước (56,2%) kế đến là ĐMV phải (32,2%). Ít gặp nhất là thân chung ĐMV trái (7,6%) và ĐMV mũ (16,3%). 88,2% gặp xơ vữa ở 1 nhánh, trong khi xơ vữa ở 2 hoặc 3 nhánh là 11,2% và 0,6%. Phần lớn các tổn thương tim thường liên quan với các tổn thương xơ vữa tiến triển (típ VI và típ VII). Mảng xơ vữa lệch tâm (87,1%) thường gặp hơn MXV đồng tâm (12,9%).*

KẾT LUẬN: *Nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ xơ vữa động mạch vành cao đáng báo động trong những trường hợp đột tử tự nhiên. Cơ chế bệnh sinh vủa XVĐMV bắt đầu từ những độ tuổi trẻ ở quần thể Việt Nam. Mặc dù tỉ lệ mới mắc XVĐMV thường gặp ở nam hơn nữa nhưng đây là yếu tố nguy cơ quan trọng của bệnh thiếu máu cơ tim cho cả hai giới và cần có chương trình tầm soát bắt đầu từ những độ tuổi trẻ.*

1. TỔNG QUAN

Trong các bệnh lý động mạch, xơ vữa động mạch (XVĐM) là bệnh lý thường gặp nhất [1]. Bệnh thường xuất hiện chủ yếu ở các động mạch kích cỡ lớn và trung bình, trong đó thường gặp nhất là động mạch vành (ĐMV). Tổn thương cơ bản là sự dày lên của lớp áo trong thành động mạch, gọi là mảng xơ vữa (fibroliquid plaque)[2]. Khi ĐMV bị tắc hẹp do mảng xơ vữa sẽ gây biến chứng mất cân bằng giữa tưới máu và nhu cầu oxy của cơ tim dẫn đến thiếu máu cục bộ cơ tim, hậu quả thường dẫn đến nhồi máu cơ tim[3].

Bệnh ĐMV và XVĐMV là nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới [4]. Theo thống kê của WHO năm 2017 [5], tại Mỹ có 479.223 trường hợp tử vong do bệnh ĐMV chiếm 20,9% tử vong nói chung. Tại Việt Nam, bệnh ĐMV là nguyên nhân tử vong đứng hàng thứ hai sau đột quỵ với 58.452 trường hợp chiếm tỉ lệ 11,58% (theo WHO năm 2017)

[5]. Dự đoán trong tương lai, gánh nặng do XVĐM ngày càng tăng do tuổi thọ ngày càng tăng và bệnh có xu hướng trẻ hóa"[6].

Trong lâm sàng hiện nay, xơ vữa mạch vành có thể được đánh giá bằng chẩn đoán hình ảnh (chụp mạch vành cản quang, siêu âm nội mạch, …) và đánh giá chức năng (nghiệm pháp thảm lăn, siêu âm gắng sức, …). Tuy nhiên, chẩn đoán hình ảnh thường có những điểm hạn chế khi suy diễn khả năng đánh giá chức năng; và ngược lại, đánh giá chức năng lại không đánh giá được những tổn thương hẹp kèm tái định dạng mạch máu hoặc tổn thương nguy cơ cao có thể gây biến cố tim mạch sớm[7]. Đồng thời, tỉ lệ mắc XVĐMV thực sự trong cộng đồng không thể đánh giá chính xác bằng hai phương pháp trên do tính chất xâm lấn và chi phí tốn kém [8]. Do đó, các nghiên cứu về động mạch vành trên tử thiết được xem là hữu ích giúp phác họa nên bức tranh toàn cảnh về xơ vữa ĐMV trong cộng đồng.

Trên thực tế, hiện nay tại các trung tâm Pháp Y trên toàn quốc, việc xác định, đánh giá tổn thương xơ vữa ĐMV trên đại thể và đặc điểm mô bệnh học vẫn chưa thống nhất. Năm 2000, Hiệp Hội Tim Mạch Hoa Kỳ đã công bố bảng phân loại xơ vữa động mạch với các tiêu chuẩn rõ ràng cho từng giai đoạn tiến triển của mảng xơ vữa. Bảng phân loại này được chấp nhận rộng rãi và hiện đang áp dụng tại nhiều nơi trên thế giới. Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục đích mô tả đặc điểm mô bệnh học xơ vữa động mạch vành theo phân loại của Hiệp Hội Tim mạch Hoa Kỳ năm 2000.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng

Là những trường hợp đột tử tự nhiên được giám định bởi Trung tâm Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh từ 1/2020 đến hết tháng 6/2020, có chẩn đoán mô bệnh học là xơ vữa động mạch vành.

Tiêu chuẩn chọn vào

- Các trường hợp đột tử tự nhiên có kết quả chẩn đoán mô bệnh học là xơ vữa động mạch vành.
- Có thu mẫu tim làm xét nghiệm mô bệnh học.
- Có đầy đủ tiêu bản và khối nến.
- Hồ sơ giám định có đầy đủ thông tin theo mẫu: tuổi, giới tính, hoàn cảnh tử vong, nguyên nhân tử vong.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Đối tượng giám định là người nước ngoài hoặc các vụ việc xảy ra nằm ngoài khu vực Thành phố Hồ Chí Minh
- Tử thi đã phân hủy hoặc chưa rõ tung tích.
- Các trường hợp tử vong liên quan với tai nạn giao thông, tai nạn lao động, ngộ độc, treo cổ, ngạt nước, độc chất, …
- Khối nến thất lạc, hư hỏng, …
- Hồ sơ giám định không đầy đủ thông tin.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang, tiến cứu

- Thời gian và địa điểm

Từ tháng 1/2020 đến hết tháng 6/2020 tại Trung tâm Pháp y TP.HCM

- Cỡ mẫu

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} p(1-p)/d^2$$

$Z_{(1-\alpha/2)}$: Hệ số giới hạn tin cậy, chọn tương ứng với mức ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$, ta có $Z_{(1-\alpha/2)} = 1,96$.

p: tỉ lệ xơ vữa động mạch vành trên các trường hợp đột tử tự nhiên. Theo nghiên cứu của tác giả Razuin Rahimi và cộng sự (2018)[9] thì p =0.8925.

d: sai số chọn mẫu. Do $0,7 < p \leq 0,9$ nên ta chọn d = 0,05.

Thay vào công thức, ta có cỡ mẫu tối thiểu n = 147.

Cỡ mẫu thực tế là 152.

- Quy trình nghiên cứu:

+ Trực tiếp phẫu tích bệnh phẩm tim theo Quy trình cải tiến của Hiệp Hội Bệnh Học Tim Mạch Châu Âu năm 2017[10]. Trên mỗi quả tim, có tổng cộng 4 nhánh ĐMV được khảo sát là thân chung ĐMV trái, ĐM liên thất trước, ĐMV mũ và ĐMV phải.

+ Mẫu bệnh phẩm được xử lý, làm tiêu bản nhuộm H&E theo quy trình thường quy.

+ Đọc tiêu bản, phân loại tổn thương mô bệnh học theo Hệ thống phân loại của Hiệp Hội Tim Mạch Hoa Kỳ năm 2000.

+ Kết quả được thẩm định độc lập bởi hai chuyên gia có kinh nghiệm.

+ Thu thập các thông tin về đặc điểm chung và đặc điểm mô bệnh học vào mẫu bệnh án đã thiết kế sẵn.

- Xử lý và phân tích số liệu:

Xử lý và phân tích số liệu bằng phần mềm IBM SPSS Statistics phiên bản 25.

2.3 Đạo đức nghiên cứu

- Nghiên cứu được sự đồng ý và thông qua bởi Hội đồng chấm luận văn Trường Đại học Y Hà Nội và Ban lãnh đạo Trung tâm Pháp y Thành phố Hồ Chí Minh.

- Đây là nghiên cứu hoàn toàn nhằm mục đích góp phần nâng cao chất lượng giám định pháp y. Mọi thông tin liên quan được bảo mật tuyệt đối và chỉ phục vụ cho mục đích nghiên cứu.

Bảng 2.1: Phân loại AHA năm 2000[11, 12]

Phân típ	Đặc điểm
Tổn thương ban đầu: Típ I, Típ II	
Típ I	Gia tăng số lượng đại thực bào có kiểu hình đại thực bào bọt, các đại thực bào bọt này phân bố tự do. Tổn thương này không nhìn thấy được.
Típ II	Sang thương nhìn thấy được. Đại thực bào bọt xếp thành nhiều lớp, có những giọt mỡ trong tế bào cơ trơn và trong khoảng gian bào chứa một ít hạt lipid thô và không đồng nhất.
Tổn thương trung gian: Típ III	
Típ III	Sang thương tương tự típ II nhưng kèm theo lắng đọng nhiều lipid ngoại bào thành nhiều ổ.
Tổn thương tiến triển: Típ IV, Típ V	
Típ IV	Hình thành khối vữa nhão (Atheroma): Các ổ lipid ngoại bào hợp lại với nhau tạo thành ổ lipid lớn hơn trong lớp áo trong, hay còn gọi là nhân lipid. Không có dấu hiệu mô xơ rõ cũng như không có các biến chứng như nứt bề mặt hoặc huyết khối. Giữa nhân lipid và tế bào nội mô bề mặt là chất nền ngoại bào giàu proteoglycan và các tế bào như lympho bào, đại thực bào, và đại thực bào bọt. Không có gây hẹp lòng mạch nhưng đường kính lòng mạch tăng lên.

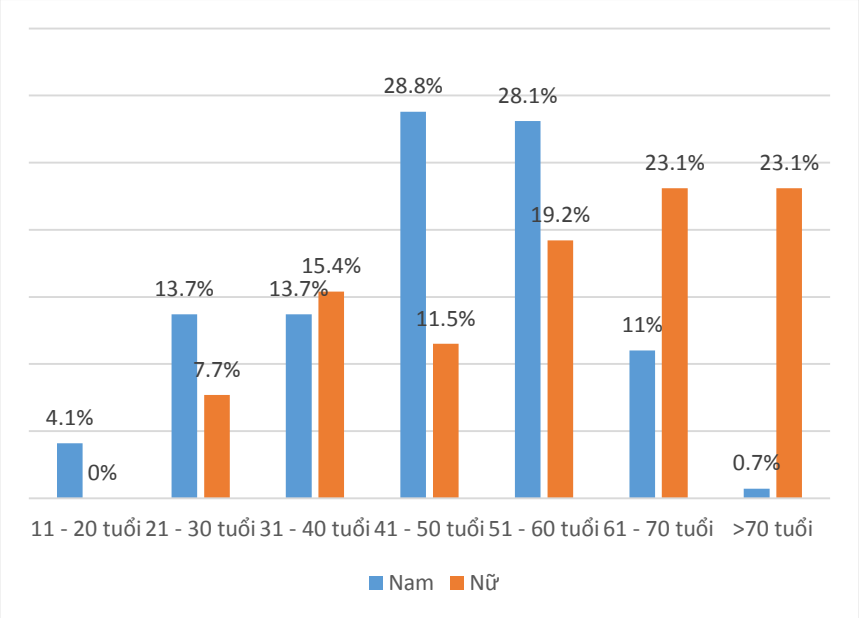
Típ V	Trở thành MXV hoàn chỉnh: khi khối vữa nhão có hình thành lớp vỏ mũ sợi rõ
Tổn thương gây biến chứng: Típ VI	
Típ VI	Thường là típ IV hoặc V nhưng kèm theo vỡ bề mặt và/hoặc xuất huyết trong mảng xơ vữa/u máu và/hoặc lắng đọng huyết khối
Tổn thương thoái hóa: Típ VII, VIII	
Típ VII	Vôi hóa trong MXV hoặc các phần khác của MXV.
TÍp VIII	Khối vữa nhão bị thay thế hoàn toàn bởi mô xơ

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong 6 tháng đầu năm 2020, có tổng cộng 172 trường hợp đột tử tự nhiên, trong đó có 152 trường hợp có xơ vữa động mạch vành (88,4%). Mỗi trường hợp đều được thu cả mẫu tim về làm vi thể. Mỗi quả tim đều được đánh giá đại thể lẫn vi thể các thành phần: van tim, cơ tim, động mạch vành, hệ thống dẫn truyền. 4 nhánh ĐMV được khảo sát bao gồm thân chung ĐMV trái, ĐM liên thất trước, ĐMV mũ, ĐMV phải. Tổng số nhánh ĐMV đã khảo sát là 608 nhánh.

3.1 Đặc điểm chung

Trong số 152 trường hợp này, nguyên nhân tử vong thường gặp nhất là tim mạch (67,1%), kế đến là hô hấp (20,4%) và thần kinh trung ương (7,2%). Nguyên nhân ít gặp là tiêu hóa (2,6%) và khác (2,7%). Trong nhóm tim mạch, nhồi máu cơ tim chiếm tỉ lệ cao nhất (79,4%).



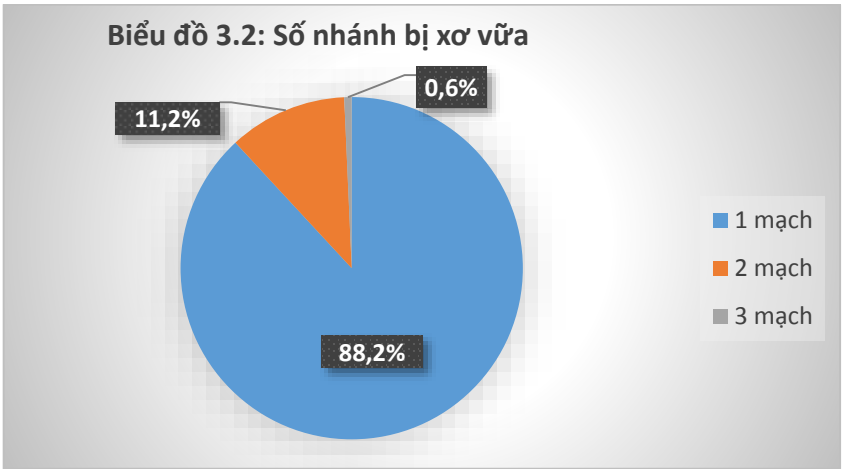
Biểu đồ 3.1: Đặc điểm về tuổi và giới

Nhận xét: Qua phân tích cho thấy tỉ lệ xơ vữa ĐMV ở nam cao hơn nữ ở mọi nhóm tuổi (trừ nhóm >60 tuổi và nhóm 31 – 40 tuổi). Tuổi trung bình của nữ (55,9 ± 16,2 tuổi) cao hơn nam (45,5 ± 13,4 tuổi). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.

3.2 Đặc điểm mô bệnh học XVĐMV theo phân loại AHA năm 2000

3.2.1 Đại thể

3.2.2.1 Số nhánh bị xơ vữa



Nhận xét: Xơ vữa mạch vành thường gặp ở 1 nhánh (88,2%) hoặc 2 nhánh (11,2%), hiếm gặp ở cả 3 nhánh động mạch vành (0,6%). Không gặp trường hợp nào xơ vữa cả 4 nhánh ĐMV.

3.2.2.2 Vị trí xơ vữa

Bảng 3.1: Vị trí xơ vữa

Vị trí	Xơ vữa động mạch		Tổng
	Có n (%)	Không n (%)	
Thân chung ĐMV trái	12 (7,6%)	140 (92,4%)	152
ĐMV liên thất trước	85 (56,2%)	67 (43,8%)	152
ĐMV mũ	25 (16,3%)	127 (83,7%)	152
ĐMV phải	49 (32,2%)	103 (67,8%)	152
Tổng	171 (28,1%)	437 (71,9%)	608

Nhận xét: XVĐM thường gặp ở ĐM liên thất trước (56,2%), ĐMV phải (32,2%) và ĐMV mũ (16,3%), ít gặp ở thân chung ĐMV trái (7,6%).

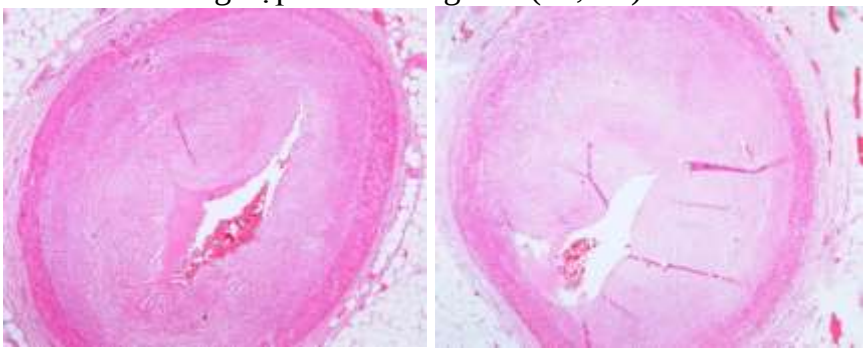
3.2.2 Vi thể

3.2.2.1 Hình thái mảng xơ vữa

Bảng 3.2: Hình thái mảng xơ vữa

Hình thái	n	Tỉ lệ %
Lệch tâm	149	87,1
Đồng tâm	22	12,9
Tổng	171	100

Nhận xét: Trong số 171 đoạn mạch xơ vữa, 149 trường hợp MXV lệch tâm (chiếm 87,1%), chỉ có 22 trường hợp MXV đồng tâm (12,9%).



Hình 1: Mảng xơ vữa đồng tâm (bên trái) và lệch tâm (bên phải)

(Hình trái: Dư Văn D, 51 tuổi, Số hồ sơ: 116/TT20. Hình phải: Đỗ Văn S, 56 tuổi, Số hồ sơ: 141/TT20, Vật kính x40, Nhuộm H&E)

3.2.2.2 Mức độ hẹp lòng mạch

Bảng 3.3: Mức độ hẹp của đoạn mạch xơ vữa

Mức độ hẹp	n	Tỉ lệ %
<50%	114	66,7
≥50%	57	33,3
Tổng	171	100

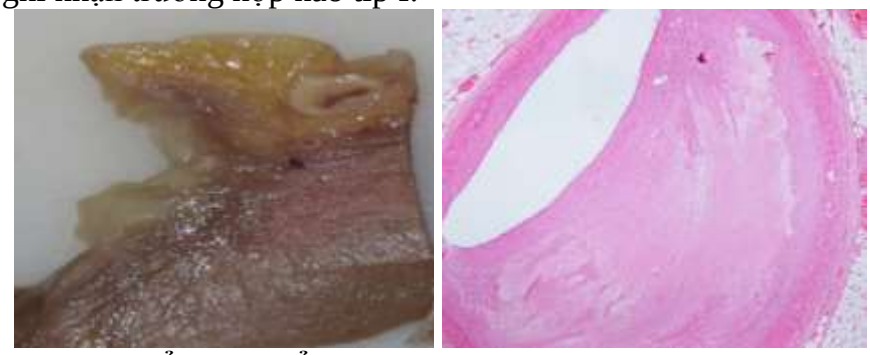
Nhận xét: Phần lớn các đoạn mạch xơ vữa có độ hẹp <50% (66,7%), chỉ có 33,3% còn lại là hẹp ≥50%.

3.2.2.3 Phân loại theo AHA năm 2000

Bảng 3.4: Phân loại AHA năm 2000

Típ MXV	n	Tỉ lệ %
I	0	0
II	6	3,5
III	70	40,9
IV	40	23,4
V	23	13,5
VI	18	10,5
VII	11	6,4
VIII	3	1,8
Tổng	171	100

Nhận xét: Típ xơ vữa thường gặp nhất là típ III (40,9%) và típ IV (23,4%). Ít gặp hơn là típ V (13,5%), típ VI (10,5%), típ VII (6,4%). Hiếm gặp típ II (3,5%) và típ VIII (1,8%). Không ghi nhận trường hợp nào típ I.



Hình 2: Đại thể và vi thể: Mảng xơ vữa típ IV theo AHA năm 2000

(Huỳnh Thanh H, 41 tuổi, Số hồ sơ: 291/TT20, Vật kính x40, Nhuộm H&E)

3.3 Mối liên quan giữa típ xơ vữa và nhồi máu cơ tim

Bảng 3.5 Mối liên quan giữa típ xơ vữa và nhồi máu cơ tim

Típ xơ vữa	Nhồi máu cơ tim		OR KTC 95%
	Có n (%)	Không n (%)	
≥IV	61 (72,6%)	23 (27,4%)	6,365 (3,134 – 12,929)
<IV	20 (29,4%)	48 (70,6%)	

Nhận xét: Bảng 3.5 cho thấy tỉ lệ nhồi máu cơ tim ở típ ≥IV (72,6%) cao hơn ở típ <IV (29,4%). Có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa típ xơ vữa và nhồi máu cơ tim với OR=6,365 KTC 95% 3,134 – 12,929.

4. BÀN LUẬN

Đặc điểm chung

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỉ lệ xơ vữa ĐMV ở nam cao hơn nữ ở mọi nhóm tuổi (trừ nhóm >60 tuổi và nhóm 31 – 40 tuổi) và có xu hướng ngày càng trẻ hóa. Kết qua nghiên cứu này khác với tác giả Razuin Rahimi (2018)[9] và tác giả Priti Vyas (2015) [13], nhưng lại tương đồng với tác giả Prasad VN và cộng sự (2014) [14]. Qua các bằng chứng trên cho thấy xơ vữa mạch vành có thể gặp ở mọi độ tuổi và ngày càng trẻ hóa (khoảng 50% các trường hợp xơ vữa gặp ở độ tuổi dưới 50 tuổi). Nguyên nhân được thể hiện rõ qua quá trình bệnh sinh của bệnh. Từ khi sinh ra, con người đã bắt đầu đi vào tiến trình hình thành mảng xơ vữa và nguy cơ này sẽ tăng dần theo tuổi tác, đặc biệt là sau 10 tuổi, đồng thời còn tùy theo sự tiếp xúc yếu tố nguy cơ sớm hay muộn. Theo sự tăng dần về tuổi tác thì lớp áo trong sẽ dày đáp ứng để thích nghi với nhu cầu tăng trưởng của cơ thể. Những vị trí dày lớp áo trong này thường dễ bị tổn thương tạo điều kiện cho sự hình thành mảng xơ vữa, đặc biệt là tại những nơi nhạy như chỗ chia nhánh động mạch**[15]**. Với sự tác động mạnh mẽ của yếu tố môi trường xã hội đối với sức khỏe người dân như quá trình đô thị hóa và sự chuyển hướng sang lối sống phương Tây của giới trẻ hiện nay đã góp phần gia tăng nguy cơ xơ vữa động mạch, đặc biệt là lớp trẻ. Những dữ liệu này đặt ra câu hỏi liệu các chiến lược dự phòng hiện tại có đủ hay không và đặt ra nhu cầu cần mở rộng phòng ngừa cho những lứa tuổi trẻ hơn.

Phân loại AHA năm 2000

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy thấy phần lớn các mảng xơ vữa là tổn thương trung gian (típ III: 40,9%) và tổn thương tiến triển (típ IV – V: 36,9%); đồng thời tỉ lệ MXV biến chứng (típ VI – 10,5%) lại cao hơn MXV thoái hóa (típ VII: 6,4%; típ VIII: 1,8%).Kết quả này có sự khác biệt với một số tác giả khác [13, 16]. Nguyên nhân có thể là do sự khác biệt về mô hình bệnh tật giữa các khu vực với nhau. Theo AHA năm 2000 (biểu đồ 1,1), các MXV típ III có thể tiến triển thành típ IV – V hoặc tiến lùi về típ II, từ típ IV – V chỉ có thể tiến triển thành típ VI hoặc típ VII hoặc típ VIII. Qua khảo sát trên cho thấy xơ vữa động mạch vành đang có chiều hướng tiến triển từ III → IV – V → VI, tức là đang có xu hưởng tiến triển thành MXV biến chứng, cũng tức là gia tăng nguy cơ đột tử do nguyên nhân tim mạch. Điều này giải thích vì sao nguyên nhân tim mạch lại chiếm ưu thế (67,1%) trong các trường hợp đột tử tự nhiên (bảng 3.2). Đây thật sự là một con số rất đáng báo động mà các nhà chăm sóc y tế cần phải quan tâm. Đồng thời, qua đây cũng cho thấy được tính ưu việt của bảng phân loại AHA năm 2000 đó là có ý nghĩa dự báo xu hướng tiến triển của của mảng xơ vữa.

Mối liên quan giữa típ xơ vữa và nhồi máu cơ tim

Bảng 3.12 cho thấy tỉ lệ nhồi máu cơ tim ở típ ≥IV (72,6%) cao hơn ở típ <IV (29,4%). Có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa típ xơ vữa và nhồi máu cơ tim với OR=6,365 KTC 95% 3,134 – 12,929. Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của tác giả Vadana P và cộng sự [17], đồng thời phù hợp với ghi nhận của y văn. Nhiều nghiên cứu cho thấy có mối liên quan mạnh giữa các yếu tố nguy cơ của xơ vữa ĐMV và yếu tố nguy cơ bệnh tim mạch như đái tháo đường, hút thuốc lá, tăng huyết áp và uống rượu[14]. Hơn thế nữa, các típ xơ vữa độ cao có liên quan đến nhiều yếu tố nguy cơ [17]. Sự tác động hiệp đồng giữa các yếu tố nguy cơ sẽ không những làm tăng nguy cơ mắc và biến chứng

của xơ vữa mạch vành song hành cùng làm tăng nguy cơ tim mạch. Biến chứng XVĐM quan trọng nhất là vỡ MXV. Các thành phần trong MXV kích thích mạnh sự hình thành huyết khối gây tắc nghẽn lòng mạch, dẫn đến mất cân bằng cung cầu của cơ tim, hậu quả là nhồi máu cơ tim. Sự tắc hẹp lòng mạch do huyết khối hoặc do MXV to lên thực chất không phải là yếu tố trọng tâm gây nhồi máu mà chỉ là một yếu tố trong hệ thống yếu tố nguy cơ tác động hiệp đồng lên cơ tim. Do đó, trong giám định pháp y, ở những trường hợp đột tử chưa rõ nguyên nhân, khi thu mẫu tim về phải có luôn cả cơ tim lẫn động mạch vành. Mẫu tim phải bao gồm cơ nhú thất phải, cơ nhú thất trái, ĐM liên thất trước, ĐMV mũ và ĐMV phải. Đồng thời, để khảo sát được toàn diện các nguyên nhân tiềm ẩn gây đột tử ở tim nên áp dụng quy trình phẫu tích tim của Hiệp Hội Bệnh Học Tim Mạch Châu Âu năm 2017[10]

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ xơ vữa động mạch vành cao đáng báo động trong những trường hợp đột tử tự nhiên. Cơ chế bệnh sinh vủa XVĐMV bắt đầu từ những độ tuổi trẻ ở quần thể Việt Nam. Cần xây dựng chiến lược dự phòng và tầm soát XVĐMV ở những đối tượng trẻ (đặc biệt dưới 40 tuổi). 2019

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1.Mohan H. *Textbook of PATHOLOGY 6th edition*. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010.

2.Nguyễn Sào Trung NĐT, Âu Nguyệt Diệu và cộng sự. *Bài giảng lý thuyết GIẢI PHẪU BỆNH y chính quy*. Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch; 2018.

3.Kumar V. AA, Aster J. , et al. The Heart. Robins And Cortans Pathological Basis of Disease. 2015;9th edition

4.Đặng Văn Phước PTD, Vũ Đình Hải và cộng sự. Khuyến cáo 2008 của Hội Tim mạch học Việt Nam về: Rối loạn lipid máu. *Chuyên đề Tim mạch học, Hội tim mạch TP HCM*. 2010;

5.WHO. World Health Review Vietnam vs United States. 2017;

6.Nguyễn Thanh Hiền TTP, Trần Dũ Đại. Dự phòng tiên phát biến cố tim mạch do xơ vữa: Cập nhật các khuyến cáo hiện hành. *Chuyên đề Tim mạch học - Hội tim mạch TP HCM*. 2014;

7.Hùng NM. Nghiên cứu hẹp động mạch vành mức độ trung gian bằng siêu âm nội mạch và phân suất dự trữ lưu lượng ở bệnh nhân bệnh mạch vành mạn tính. *Luận án tiến sĩ y học, Trường Đại học Y dược - Đại học Huế*. 2016;

8.Bhanvadia VM, Desai NJ, Agarwal NM. Study of coronary atherosclerosis by modified american heart association classification of atherosclerosis-an autopsy study. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(11):2494-2497. doi:10.7860/JCDR/2013/6828.3588

9.Rahimi R, Singh MKC, Noor NM, et al. Manifestation of Coronary Atherosclerosis in Klang Valley, Malaysia: An Autopsy Study. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(5):405-409. doi:10.5551/jat.39107

10.Cristina B, Beatriz A, al JBe. Guidelines for autopsy investigation of sudden cardiac death: 2017 update from the Association for European Cardiovascular Pathology. *Virchows Arch*. 2017;417(6):691 - 705.

11.Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, al e. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. Sep 1 2009;92(5):1355-74.

12. Stary HC CA, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*. 2005;14:840 - 856.
13. Vyas P, Gonsai RN, Meenakshi C, Nanavati MG. Coronary atherosclerosis in noncardiac deaths: An autopsy study. *Journal of mid-life health*. Jan-Mar 2015;6(1):5-9. doi:10.4103/0976-7800.153596
14. Vn P, Jha A, Adhikari R, Sayami G, Shrestha PK, Shrestha H. Coronary atherosclerosis in medico-legal autopsy cases. *Journal of Pathology of Nepal*. 09/30 2014;4doi:10.3126/jpn.v4i8.11492
15. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. May 2000;20(5):1177-8.
16. Kumar S, Kumar VA, Kumar N, Baranwal RK, Kumar VR, Singh M. Coronary atherosclerosis -- a postmortem histopathological study. *Bratislavske lekarske listy*. 2012;113(4):217-9. doi:10.4149/bll_2012_050
17. Vandana P. SK, Deepali J., et al. Histological Classifcation of Atherosclerosis and Correlation with Ischemic Heart Disease: A Autopsy Based Study. *Annals of Pathology and Laboratory Medicine*. 2016;3(2)

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT CỦA DỊCH CHIẾT VI KHUẨN LAM (*ARTHROSPIRA* SP.) CÓ KHẢ NĂNG SINH INDOLE-3-ACETIC ACID (IAA)

Phan Thị Thảo Nguyên*, Tống Văn Bảo Thạnh, Nguyễn Tiến Đạt, Ma Kim Đăng, Hồ Nhật Quang

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

*Tác giả liên lạc: pttnguyen1999@gmail.com

TÓM TẮT

Vi khuẩn lam (VKL) được biết là vi sinh vật quang tự dưỡng thải O2, phân bố rộng rãi trong đất và nước. Một số chủng VKL còn có khả năng cố định nitơ phân tử cao, ngoài ra chúng cũng có khả năng tổng hợp các chất điều hòa sinh trưởng cho cây trồng chẳng hạn như auxin. Trong đó, Arthrospira sp. là chủng VKL tiềm năng sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học đang ngày càng được chú ý và nghiên cứu rộng rãi. Kết quả nghiên cứu chúng tôi đã xác định được Arthrospira sp. sinh trưởng cực đại sau 18-20 ngày nuôi cấy ở điều kiện nuôi cấy tĩnh trong bình 50 mL. VKL Arthrospira sp. sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện pH 7,5 cho sinh khối tế bào và hàm lượng IAA đạt giá trị cao nhất, lần lượt là 10,56 10^4 tế bào/mL và 10,26 µg/mL IAA. Bước đầu đánh giá tác động của dịch chiết tảo cho thấy chúng có vai trò như là một loại phân bón giúp kích thích nảy mầm và sinh trưởng của cây đậu và lúa. Sử dụng phân bón sinh học từ dịch chiết VKL được xem là một giải pháp tối ưu được áp dụng cho các sản phẩm nông sản sạch, an toàn và thân thiện với môi trường.

Keywords: *Arthrospira sp., vi khuẩn lam, kích thích sinh trưởng thực vật, IAA, sinh khối.*

BIOMASS PRODUCTION OF *ARTHROSPIRA* STRAIN PRODUCING INDOLE-3- ACETIC ACID (IAA) AND ITS EXTRACT EFFECT ON PLANT GROWTH

Phan Thi Thao Nguyen*, Tong Van Bao Thanh, Nguyen Tien Dat, Ma Kim Dang, Ho Nhat Quang

University of Sciences, Hue University

*Corresponding author: pttnguyen1999@gmail.com

ABSTRACT

Cyanobacteria, which are known as O2-releasing photoautotrophic microorganisms and contribute widely in soil and water, are considered to be useful for agriculture. To be more specific, some cyanobacteria strains are able to high nitrogen molecular fixation, some strains are also capable of releasing bioactive compounds which are able to stimulate plant growth. Arthrospira sp. is one of cyanobacterial strain of, which has potential to produce bioactive compounds, such as auxin. The results of our study show that the growth of Arthrospira sp. reaches the highest after 18 days of culturing in Z8 medium under cultural condition in flasks of 50 mL. The best condition for Arthrospira sp. cyanobacterium's growth was achieved at pH 7.5 after 18 days of biomass culturing and the highest concentration of Indole-3-acetic acid (IAA) was 10,56 x 10^4 cells per mL and 10,26 µg IAA per mL, respectively. Impact assessment of cyanobacteria extracts demonstrated that they acted as a fertilizer which is useful for germination and growth stimulation of red bean and rice. Furthermore, using biological fertilizer extracted from cyanobacteria extracts is considered to be an optimal solution that is eco-friendly and could apply for safe agricultural products.

TỔNG QUAN

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng vai trò rất quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây. Trong đó, auxin là một trong những chất điều hòa sinh trưởng được nghiên cứu nhiều nhất và được cho là rất cần thiết cho thực vật, đặc biệt là Indole-3-acetic acid (IAA) là một trong các chất phổ biến nhất trong thực vật. Mặc dù khả năng sản xuất các hormon thực vật này chủ yếu là ở thực vật bậc cao, nhưng chúng cũng phổ biến rộng rãi trong các loại thực vật bậc thấp, vi khuẩn (bao gồm cả VKL), tảo và nấm. Hiện nay cùng với sự tăng trưởng của nền nông nghiệp thì việc người nông dân quá lạm dụng vào sử dụng các loại phân bón hóa học và chất kích thích sinh trưởng tổng hợp cũng là một vấn nạn đáng lo ngại, nó không chỉ gây ra các tác động tiêu cực đến chất lượng nông sản mà còn ảnh hưởng nghiêm trọng đến môi trường

sinh thái. Do đó, việc sử dụng phân bón sinh học từ dịch chiết VKL được xem là một giải pháp tối ưu đang được áp dụng cho các sản phẩm nông sản sạch, an toàn và thân thiện với môi trường.



Hình 1. Ảnh hiển vi của *Arthrospira*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Sinh khối tảo *Arthrospira* sp. và dịch chiết từ sinh khối

Hạt giống: đậu đỏ (*Vigna angularis*) giống Đà Lạt và hạt giống lúa (*Oryzasativa* L.) giống Hà Phát 3.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân sinh khối tảo

Chủng *Arthrospira* sp. được nhân sinh khối trong môi trường Z8 (Nguyễn Thị Thu Liên, 2015).

Phân tích định lượng

Sinh trưởng VKLđược xác định bằng cách theo dõi mật độ tế bào với phương pháp đếm tế bào sử dụng buồng đếm Sedgewick Rafter (dung tích 1 mL với 1000 ô đếm), sử dụng kính hiển vi Olympus với độ phóng đại ×10.

Phương pháp xác định hàm lượng IAA

Hàm lượng IAA được xác định bằng phương pháp so màu, đo độ hấp thụ quang (OD) ở bước sóng 530 nm trên máy quang phổ với thuốc thử Salkowski (Hussain và cs., 2010).

Khảo sát đường cong sinh trưởng

Nuôi sinh khối *Arthrospira* trong môi trường Z8 (50 mL) trong các chai dung tích 100 mL. Cấy giống trong tủ cấy vô trùng với mật độ tiếp giống ban đầu như nhau, tỷ lệ khoảng 10% (v/v). Thu mẫu để xác định mật độ tế bào sau 2, 4, 6…20 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của pH lên nhân sinh khối và xác định hàm lượng IAA của Arthrospira sp. Phân phối 50 mL môi trường Z8 ở các độ pH khác nhau: 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5. Mật độ tiếp giống ban đầu là 10%. Thu mẫu để xác định mật độ tế bào sau 2, 4, 6…20 ngày nuôi cấy. Thu sinh khối sau 18 ngày để xác định hàm lượng IAA.

Điều kiện nuôi cấy

Nuôi sinh khối *Arthrospira* trong môi trường Z8 (50 mL) trong các chai dung tích 100 mL ở nhiệt độ 24 – 27^{0}C, pH 7,2; cường độ ánh sáng 2000 – 3000 lux, chiếu sáng 8/16 giờ.

Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến khả năng nảy mầm của hạt và sinh trưởng của cây ở vườn ươm

Dịch chiết tảo được pha với nước cất tạo dung dịch có nồng độ 0; 10%; 20% và 100%. Ngâm hạt đậu đỏ và lúa trong djch chiết với thời gian khác nhau (8, 16 và 20 giờ). Hạt sau khi ngâm được cho vào đĩa petri có lót giấy ẩm, mỗi đĩa 10 hạt, ủ để hạt nảy mầm. Đánh giá hiệu quả của dịch chiết tảo đến khả năng nảy mầm qua tỷ lệ hạt nảy mầm và chiều dài mầm sau 12 giờ, 24 giờ và 36 giờ. Sau khi nảy mầm, các mầm phát triển đồng đều và không dị tật được chuyển ra chậu đất (đường kính 40 cm) đặt trong nhà màn, mỗi chậu 5 cây, có ánh sáng trung bình, tưới phun 1 lần/ngày. Ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến sinh trưởng của cây được đánh giá qua chiều cao cây thu được sau 5 ngày, 10 ngày và 15 ngày.

Nghiên cứu ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến khả năng nảy mầm của hạt trong nuôi cấy mô (nuôi cấy in vitro)

Hạt đậu đỏ và hạt lúa bóc vỏ được chà sạch bằng xà phòng và rửa lại nhiều lần bằng nước sạch. Chuyển hạt vào trong tủ cấy vô trùng, khử trùng sơ bộ bằng cồn 70^o trong 1 phút, sau đó khử trùng bằng NaClO 1%;trong khoảng 30 phút. Cuối cùng, rửa sạch hạt bằng nước cất vô trùng 5 lần, mỗi lần khoảng 5 phút. Sau khi khử trùng xong, hạt được cấy vào các bình nuôi chứa môi trường MS cơ bản có 8 g/L agar,30 g/L saccharose và bổ sung dịch chiết tảo với lượng 10 mL/L,mL/L và 30 mL/L. Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến sự nảy mầm hạt *in vitro* qua tỷ lệ nảy mầm và chiều dài mầm sau 48 giờ, 72 giờ và 96 giờ và chiều cao của cây con (cm) sau 15 ngày nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường cơ bản MS điều chỉnh pH = 5,8; được khử trùng ở 121^oC, 1 atm trong 17 phút. Phòng nuôi có nhiệt độ 25 ± 1^0C, cường độ chiếu sáng là 1.500–2.000 lux và thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

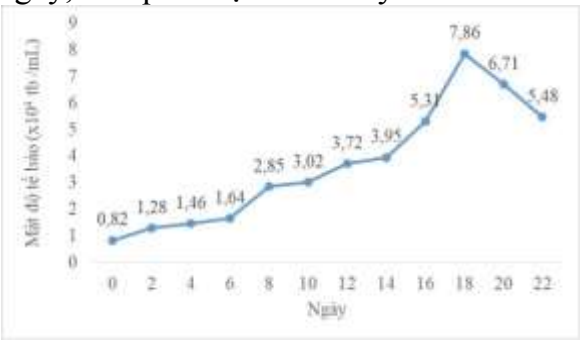
Xử lý thống kê

Mỗi thí nghiệm được lặp lại tích theo Duncan's test bằng suất có ý nghĩa $p \leq 0,05$ lần, mỗi lần quan sát n≥10 mẫu. Kết quả thí nghiệm được phân phần mềm SPSS 22 (SPSS Inc. Headquartes, 2004.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đường cong sinh trưởng của chủng *Arthrospira* sp.

Trong nghiên cứu thực nghiệm, việc xác định đường cong sinh trưởng là cần thiết để ước tính thời gian sinh trưởng của các chủng nuôi cấy, từ đó có thể xác định thời gian cấy chuyển, tiếp giống và thu sinh khối thích hợp. Tiến hành theo dõi sinh trưởng của *Arthrospira* sp. trong 22 ngày, kết quả được trình bày như hình 2.



Hình 2. Đường biểu diễn đường cong sinh trưởng của *Arthrospira* sp.

Kết quả cho thấy VKL nhanh chóng thích nghi với môi trường, tăng trưởng mạnh và mật độ tế bào cao nhất đạt $7,86 \times 10^4$ tb/mL sau 18 ngày nuôi cấy, rồi đi vào pha suy vong, mật độ suy giảm nhanh. Sự tăng mật độ VKL được thể hiện qua màu sắc của dịch nuôi. Mật độ tế bào càng cao, màu của dịch nuôi cấy càng đậm, đặc biệt trong khoảng thời gian từ ngày thứ 14-18 ngày nuôi cấy. Từ cuối pha tăng trưởng mạnh, màu của dịch nuôi

chuyển từ màu xanh đậm sang màu vàng úa và xuất hiện các tế bào chết lơ lửng (Ahmed và cs., 2010).

Khảo sát ảnh hưởng của pH lên sự sinh trưởng của *Arthrospira* sp.

Trong thí nghiệm này, để khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng của VKL *Arthrospira* sp., chúng tôi tiến hành cấy 10% giống vào trong môi trường có các độ pH khác nhau: 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

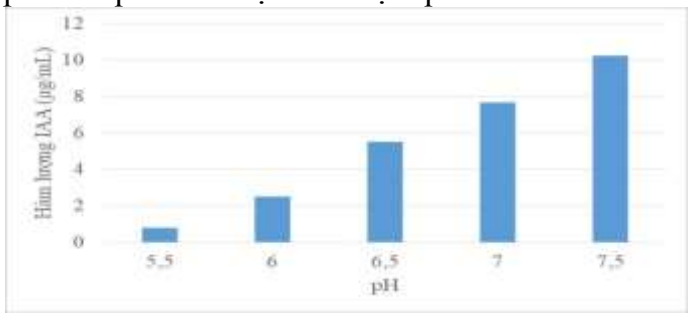
Bảng 1. Ảnh hưởng của pH đến sự sinh trưởng của *Arthrospira* sp.

				pH		
	Ngày					
		5,5	6	6,5	7	7,5
	0 ngày	0,93	0,86	0,66	0,92	0,8
	2 ngày	1,39	0,13	0,91	0,12	0,82
	4 ngày	0,14	0,16	1,18	0,14	1,56
	6 ngày	1,39	1,88	3,2	1,63	3,21
	8 ngày	2,01	1,8	4,21	3,85	5,56
Mật độ tb	10 ngày	2,06	2,02	5,06	3,94	7,86
($\times 10^4$ tb/mL)	12 ngày	2,58	3,56	6,13	5,62	7,89
	14 ngày	3,06	4,79	6,73	6,82	8,65
	16 ngày	4,56	7,1	8,16	8,31	9,01
	18 ngày	3,85	6,38	8,27	8,92	10,56
	20 ngày	2,97	6,87	7,04	8,2	10,03

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy *Arthrospira* sp. nhanh chóng thích nghi và đạt mật độ cực đại (10,56 × 10^4 tb/mL) ở pH 7,5 vào ngày thứ 18. Ở ngày nuôi cấy thứ 18, mật độ tế bào ở pH 6,5 và 7,0 cũng đạt tối đa lần lượt là 8,27 × 10^4 tb/mL và 8,92 × 10^4 tb/mL. Ở các mức pH còn lại, tốc độ sinh trưởng chậm và mật độ cực đại thấp hơn nhiều so với ở pH 7,5. Ở pH 5, VKL sinh trưởng chậm và mật độ tế bào thấp nhất, chỉ đạt 3,85 × 10^4 tb/mL sau 18 ngày.

Ảnh hưởng của pH đến hàm lượng IAA của chủng *Arthrospira* sp.

Nuôi cấy VKL *Arthrospira* sp. trong môi trường Z8 với các giá trị pH khác nhau (5,5; 6; 6,5; 7; 7,5). Sau 18 ngày nuôi cấy tiến hành thu sinh khối để xác định hàm lượng IAA của chủng *Arthrospira* sp.. Kết quả thu được thể hiện qua hình 3.



Hình 3. Biểu đồ biểu diễn hàm lượng IAA theo các giá trị pH

Qua biểu đồ cho thấy hàm lượng IAA hàm lượng IAA cao nhất đạt 10,26 µg/mL ở pH 7,5. Trong khi ở pH 5,5 hàm lượng IAA chỉ đạt 0,79 µg/mL, thấp hơn nhiều so với pH 7,5. Điều này là do *Arthrospira* sp. là chủng sinh trưởng và phát triển mạnh trong môi trường trung tính và kiềm nhẹ (Ahmed và cs., 2010).

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo *Arthrospira* sp. và thời gian ngâm hạt trong dịch chiết tảo *Arthrospira* sp. đến khả năng nảy mầm của hạt

Thí nghiệm trên hạt đậu đỏ và lúa được bố trí với 3 công thức/mỗi thí nghiệm về nồng độ dịch chiết, thời gian ngâm và công thức đối chứng. Sau 12 giờ ngâm, hạt bắt đầu nảy mầm, hình thành rễ mầm và chồi mầm.

Đậu đỏ

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo và thời gian ngâm hạt đậu đỏ đến khả năng nảy mầm của hạt sau 36 giờ ủ cho thấy hạt bắt đầu nảy mầm sau 12 giờ ủ. Tỷ lệ nảy mầm của hạt đậu đỏ cao nhất đạt 100% sau 36 giờ ủ ở công thức ngâm hạt 16 giờ trong dịch chiết tảo 10%. Chiều dài mầm tốt nhất, đạt 2,55-2,64 cm, ở công thức ngâm hạt 8-16 giờ trong dịch chiết tảo 10%. Tiếp tục tăng tỷ lệ dịch chiết và thời gian ngâm hạt, tỷ lệ nảy mầm có xu hướng giảm dần và kéo dài thời gian nảy mầm. Điều này có lẽ do nồng độ IAA cao trong dịch chiết tảo có tác dụng ức chế sự nảy mầm của hạt.

Lúa

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo và thời gian ngâm hạt lúa đến khả năng nảy mầm của hạt lúa sau 36 giờ ủ cho thấy tỷ lệ nảy mầm của hạt lúa tốt nhất đạt 80% hạt nẩy mầm sau 36 giờ ủ ở công thức ngâm hạt 16 giờ trong dịch chiết tảo 100%. Tuy nhiên, chiều dài mầm ở công thức ngâm hạt trong dịch chiết tảo sai khác không đáng kể đạt từ 0,40-0,61 cm, cao hơn so với đối chứng (chỉ đạt 0,35-0,36 cm). Sự sai khác về tỷ lệ nảy mầm và chiều dài mầm của hạt lúa xử lý bằng dịch chiết tảo so với đậu đỏ có lẽ do lúa có vỏ hạt cứng đã hạn chế sự thấm của dịch tảo, nên tác động lên phôi hạt cũng kém hơn.



A B C

Hình 4. Ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến sự nảy mầm của hạt đậu đỏ và hạt lúa

A. Sau 12 giờ ủ; B. Sau 24 giờ ủ; C. Sau 36 giờ ủ : Thước đo: 3 cm

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo *Arthrospira* sp. và thời gian ngâm hạt đến sinh trưởng cây non

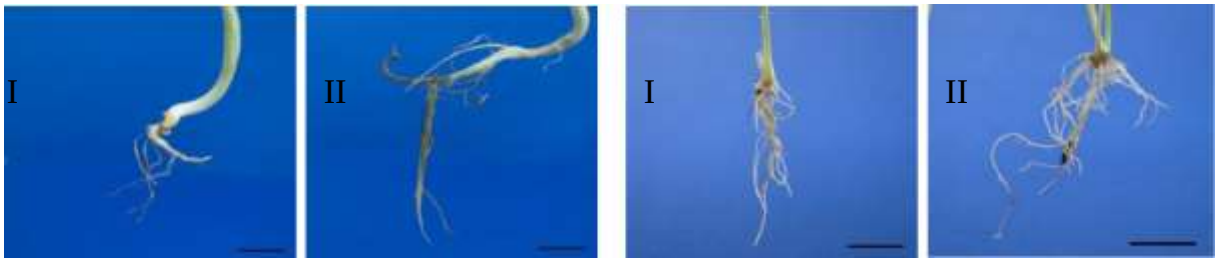
Sinh trưởng thể hiện sự biến đổi về lượng và chất của thực vật trong chu kỳ sống của chúng. Hạt sau khi nảy mầm được chuyển ra chậu và tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến sinh trưởng của chúng.

Đậu đỏ

Kết quả về ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo và thời gian ngâm hạt đậu đỏ đến khả năng sinh trưởng của hạt đậu sau 15 ngày theo dõi cho thấy cây có chiều cao tốt nhất đạt 27,59 cm ở công thức ngâm hạt 8 giờ trong dịch chiết tảo 100%, cao hơn nhiều so với đối chứng, chỉ đạt 22,97 cm. Như vậy, chất kích thích sinh trưởng trong dịch chiết tảo có tác động tích cực đến quá trình phân bào, làm tăng chiều cao cây. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng dộ dịch chiết tảo lên khả năng tạo rễ của cây đậu đỏ với thời gian ngâm hạt là 8 giờ cho thấy, ở công thức ngâm 100% dịch chiết tảo, chiều dài rễ cây đậu đỏ cao nhất đạt 8,59 cm sau 15 ngày trồng, cao hơn nhiều so với đối chứng chiều dài rễ chỉ đạt 5,88 cm cm sau 15 ngày trồng.

Lúa

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết tảo và thời gian ngâm hạt lúa đến khả năng sinh trưởng của hạt sau 15 ngày theo dõi cho thấy cây cao nhất (đạt 14,05-14,06 cm) lần lượt ở công thức xử lý dịch chiết tảo 10% trong 20 giờ và công thức xử lý dịch chiết tảo 20% trong thời gian ngâm hạt 16 giờ. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của nồng dộ dịch chiết tảo lên khả năng tạo rễ của cây lúa với thời gian ngâm hạt là 16 giờ cho thấy, hạt đậu đỏ ở công thức 20% dịch chiết tảo cho chiều dài rễ và số rễ cao nhất đạt 5,25 cm, 17,9 rễ sau 15 ngày trồng, khi tăng nồng độ dịch chiết tảo lên đến 100% thì khả năng hình thành rễ của cây lúa bị ức chế, với chiều dài rễ và số rễ chỉ đạt 2,52 cm, 15,40 rễ sau 15 ngày trồng.



Hình 5. Ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến chiều dài rễ

A. Cây đậu; B. Cây lúa; I. sau 10 ngày; II. Sau 15 ngày —— : Thước đo: 1 cm

Ảnh hưởng của hàm lượng dịch chiết tảo *Arthrospira* sp. đến khả năng nảy mầm hạt trong nuôi cấy *in vitro*

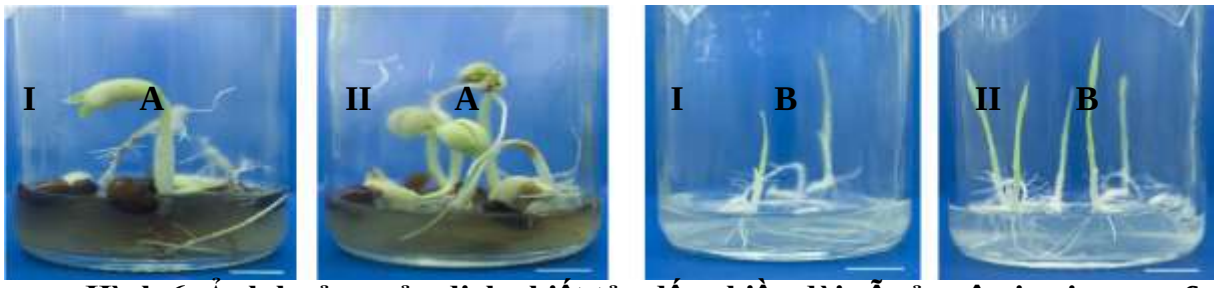
Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* trên hai đối tượng đậu đỏ và hạt lúa được bố trí với 3 công thức/mỗi thí nghiệm về tỷ lệ dịch chiết bổ sung vào môi trường nuôi cấy và công thức đối chứng không bổ sung dịch chiết tảo. Sau 2 ngày gieo hạt trên môi trường nuôi cấy, hạt bắt đầu nảy mầm, hình thành rễ mầm và chồi mầm.

Đậu đỏ

Hạt đậu đỏ được cấy trên môi trường MS bổ sung dịch chiết tảo với tỷ lệ 10-30 mL/L môi trường nuôi cấy. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến khả năng nảy nảy mầm của hạt đậu đỏ sau 6 ngày theo dõi cho thấy, hạt đậu đỏ trên môi trường MS bổ sung 20 mL/L dịch chiết tảo cho tỉ lệ hạt nảy mầm cao nhất đạt 98% sau 3 ngày cấy. Chiều dài mầm cao nhất ở môi trường bổ sung 10 mL/L dịch chiết sau 6 ngày cấy, đạt 3,05 cm, tiếp tục tăng tỷ lệ dịch chiết lên 30 mL/L chiều dài mầm giảm, chỉ còn 2,56 cm. Sau 6 ngày gieo hạt, chiều dài rễ cao nhất ở công thức bổ sung dịch chiết tỷ lệ 10 mL/L (đạt 3,39 cm) và thấp nhất ở công thức đối chứng (đạt 2.95 cm).

Lúa

Hạt lúa được cấy lên môi trường MS bổ sung dịch chiết tảo với tỷ lệ 10-30 mL/L môi trường nuôi cấy. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến khả năng nảy nảy mầm của hạt lúa sau 6 ngày theo dõi cho thấy, hạt lúa trên môi trường MS bổ sung 20 mL/L dịch chiết tảo cho tỉ lệ hạt nảy mầm cao nhất 72% sau 4 ngày cấy. Sau 6 ngày nuôi cấy, môi trường MS bổ sung 20 mL/L dịch chiết tảo cho chiều dài mầm và chiều dài rễ cao nhất lần lượt đạt 3,5 cm và 2,35 cm, cao hơn so với công thức đối chứng, chỉ đạt lần lượt là 2,24 cm và 1,66 cm.



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch chiết tảo đến chiều dài rễ của cây *in vitro* sau 6 ngày

A. Cây đậu; B. Cây lúa; I. Môi trường ĐC; II. Môi trường bổ sung dịch chiết tảo

: Thước đo: 1 c

KẾT LUẬN – ĐỀ NGHỊ

Arthrospira sp. sinh trưởng cực đại sau 18 ngày nuôi cấy trong môi trường Z8 ở điều kiện nuôi cấy tĩnh trong bình 50 mL.VKL *Arthrospira* sp. sinh trưởng tốt nhất ở điều kiện pH 7,5, sau 18 ngày nuôi cấy trong môi trường Z8 cho sinh khối và hàm lượng IAA đạt giá trị cao nhất, lần lượt là 10,56 10^4 tế bào/mL và 10,26 µg/mL IAA. Bước đầu đánh giá tác động của dịch chiết tảo cho thấy chúng có vai trò như là một loại phân bón giúp kích thích nảy mầm và sinh trưởng của cây đậu đỏ và lúa ở vườn ươm và ở điều kiện nuôi cấy *in vitro*. Từ đó, tiếp tục nghiên cứu tác động của dịch chiết tảo lên sự phát triển và năng suất của các giống cây trồng để làm cơ sở cho ứng dụng vào sản xuất nông nghiệp, sản xuất phân bón sinh học từ VKL áp dụng vào sản xuất nông nghiệp cho các sản phẩm nông sản sạch, an toàn và thân thiện với môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmed, M., Stal, L.J., Hasnain, S. 2010. 'Production of indole-3-acetic acid by the cyanobacterium Arthrospira platensis strain MMG-9' *J Microbiol Biotechnol.* 20(9): pp. 1259-1265.

Hussain, A., Krischke, M., Roitsch, T., Hasnain, S. 2010. 'Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria' *Curr Microbiol.* 61(5): pp. 361-369.

Nguyễn, T.T.L. 2015. *Giáo trình thực tập Công nghệ sinh học*: NXB Đại học Huế.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỐNG LÃO HÓA DA CỦA ASTAXANTHIN TỪ TẢO *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* VÀ *IN VIVO*

Trần Quang Diệu*, Nguyễn Đình Huy, Võ Thị Thanh Trúc, Huỳnh Thu Thảo, Tô Minh Quân

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

*Tác giả liên lạc: tranquangdieu.trn@gmail.com

TÓM TẮT

Astaxanthin (ASX) là một carotenoid có khả năng chống oxy hóa được chiết xuất từ tảo Haematococcus pluvialis (H. pluvialis). Trong nghiên cứu này, ASX được đánh giá khả năng bảo vệ nguyên bào sợi (NBS) trước tác nhân gây lão hóa H_2O_2 và bảo vệ da chuột khỏi tác hại của UV. Kết quả cho thấy ASX tại nồng độ 1 µg/ml kích thích sự tăng sinh của NBS và bảo vệ NBS khỏi tác hại của H_2O_2: duy trì sự toàn vẹn của NBS và giảm biểu hiện marker lão hóa b-galactosidase. Kết quả thử nghiệm trên mô hình chuột bị lão hóa da do tia UV cho thấy ASX nồng độ 200 và 20 µg/ml có khả năng làm giảm tác hại của tia UV đối với da. ASX (200 và 20 µg/ml) hạn chế hình thành nếp nhăn, duy trì cấu trúc mô học da tương tự như da chuột tự nhiên. Kết luận: ASX bảo vệ NBS khỏi H_2O_2 (1 µg/ml) và da khỏi tác nhân tia UV (20 µg/ml)

Từ khóa: *astaxanthin, carotenoid, nguyên bào sợi, mô hình chuột, lão hóa, UV.*

EVALUATION OF ASTAXANTHIN SKIN ANTI-AGING ABILITY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Tran Quang Dieu*, Nguyen Dinh Huy, Vo Thi Thanh Truc, Huynh Thu Thao, To Minh Quan

University of Science, NU-HCM

CorrespondingAuthor: tranquangdieu.trn@gmail.com

ABSTRACT

Astaxanthin (ASX) is an antioxidant carotenoid which is extracted from algae Haematococcus pluvialis (H. pluvialis). In this study, ASX was extracted by using sacha inchi oil and acetone. Then, we evaluated effect of ASX on the skin fibroblast's (SF) proliferation and protection ability of H_2O_2-exposed SF and UV-exposed mice.

The results showed that 1 µg/ml ASX increased SF's proliferation. 1 µg/ml ASX reduced expression of β-gal and maintained the integrity of nuclear shape on H_2O_2-exposed SF. Moreover, 200 and 20 µg/ml ASX treatment revealed the protection ability of UV-exposed mice. After 6 weeks of UV irradiation, ASX treatment reduced the aging characteristics by demonstrating reduction of wrinkled skin, elastosis areas and decrease epidermis thickness.

Key words: *astaxanthin, carotenoid, fibroblast, mouse model, senescence, aging, UV.*

TỔNG QUAN

Tia UV là những sóng ánh sáng có bước sóng từ 200-400 nm. Dựa vào độ dài bước sóng, tia UV được chia thành 3 loại: UVA (320-400nm), UVB (280-320 nm), và UVC (200-280nm). Trong đó, tia UVC được lọc lại phần lớn nhờ tầng ozone, chỉ có tia UVB và tia UVA có thể đến được bề mặt trái đất. Do có bước sóng ngắn nên tia UVB gây ra những tổn thương nghiêm trọng trên tế bào hơn tia UVA và là nguyên nhân chính gây ung thư da. Mặt khác, tuy UVA gây ra tổn thương tế bào ít nghiêm trọng hơn nhưng có khả năng đâm xuyên qua tầng biểu bì và trung bì dẫn tới sự hư hại collagen và elastin. Ngoài ra, tia UV còn tác động gây tổn thương gián tiếp trên tế bào bằng việc kích thích tạo ra những gốc tự do và phân tử oxy hóa chẳng hạn như H_2O_2. Những tác động gián tiếp và trực tiếp này đều

khiến da bị quang lão hóa, từ đó làm giảm khả năng cân bằng nội môi, đồng thời mất đi tính thẩm mỹ của cơ thể (Amaro-Ortiz, Yan and D'Orazio, 2014).

Astaxanthin (ASX) là một loại carotenoid chống oxy hóa rất mạnh. Nhờ vào cấu trúc phân tử có tính ổn định cao nên có thể trung hòa được nhiều gốc tự do, cao hơn 500 lần so với vitamin (Shimidzu, Goto and Miki, 1996; Focsan, Polyakov and Kispert, 2017). Ngoài ra, ASX còn tham gia vào con đường kích hoạt enzyme chống oxy hóa của tế bào chẳng hạn như con đường Nrf2/OH-1 (Tripathi and Jena, 2010), cho nên ASX phù hợp làm hoạt chất ngăn ngừa sự lão hóa do UV cũng như các nhân tố gây oxy hóa. Dầu sacha inchi tách chiết từ hạt sacha inchi được sử dụng những năm gần đây trong lĩnh vực chăm sóc da nhờ khả năng làm mềm da, chống oxy và kháng khuẩn. Do đó, việc kết hợp ASX và dầu sacha inchi có thể sẽ cho tác động cộng gộp trong việc chống lại tác nhân gây lão hóa da.

Từ những vấn đề nêu trên dẫn tới mục đích của đề tài là đánh giá khả năng bảo vệ của dịch chiết ASX từ tảo *H. pluvialis* trong dung môi dầu sacha inchi trên mô hình lão hóa *in vivo*.

VẬT LIỆU/PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị ASX từ tảo *H. pluvialis*

Tảo *H. Pluvialis* sấy khô (nuôi tại ĐH Khoa học tự nhiên) được tách chiết với dung môi acetone hỗ trợ bởi máy khuấy từ trong thời gian 90 phút. Hỗn hợp chiết được ly tâm với lực 1000xG (Sarada *et al.*, 2006). Hỗn hợp ly tâm được thu dịch nổi, lọc và làm khô. Lượng ASX được đánh giá bằng nồng độ bằng HPLC.

Thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ khỏi tác nhân lão hóa *in vitro* (Régnier *et al.*, 2015; Noren Hooten and Evans, 2017)

Tế bào nguyên bào sợi P5 được nuôi trong môi trường DMEM/F12 bổ sung 10% FBS, 1% kháng sinh Penicilin/Streptomycin ở 37^{o}C, 5%CO_2. ASX được hòa trong DMSO và pha vào môi trường nuôi DMEM/F12 bổ sung 10% FBS để đạt được nồng độ mong muốn (0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml). Lượng DMSO trong môi trường là 0,5%.

NBS được cấy lên đĩa 24 giếng với mật độ $2x10^4$/giếng, ủ trong 12 tiếng cho tế bào bám hoàn toàn. Mỗi 4 giếng tế bào được ủ với môi trường chứa ASX ở các nồng độ khác nhau 0.1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 1 µg/ml và ASX thương mại (Sigma) 1 µg/ml. Sau 24 giờ, các giếng tế bào được xử lý với môi trường DMEM F12 10% FBS chứa H_2O_2 ở nồng độ 175µM trong 90 phút. Sau khi xử lý với H_2O_2, các giếng tế bào được rửa với PBS và tiếp tục nuôi trong môi trường DMEM F12 10% FBS. Tế bào nuôi trong môi trường DMEM F12 10% FBS chứa 0.5% DMSO được sử dụng làm đối chứng. Sau 2 ngày, đĩa tế bào được đánh giá sự biểu hiện lão hóa bằng phương pháp nhuộm β-galactosidase và đánh giá hình thái nhân tế bào thông qua phương pháp nhuộm Hoechst kết hợp với hệ thống máy chụp nhân tế bào Cytell Cell Imaging (GE Healthcare, US). Các thao tác được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ NBS của ASX

Nhóm / Điều kiện	DC	MDC	A0.1	A0.5	A1	Atm
Tiền xử lý ASX (µg/ml)	0	0	0.1	0.5	1	1
Xử lý H_2O_2	0	175µM, 90 phút				

Thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ da chuột khỏi tia UV

Chuột Mus musculus var. Albino được mua ở viện Pasteur, nuôi ở nhiệt độ phòng với chu kỳ sang tối là 12:12, được ăn uống tự do. Chuột được chia thành các nhóm (n=3) như bảng:

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả bảo vệ da chuột của ASX.

Nhóm / Điều kiện	DC	MDC	Bsacha	Usacha	B20	U20	B200	U200
Chiếu UV	Không	Có						
Thành phần bôi/uống mỗi ngày (µg/ml)	Không xử lý	Không xử lý	Tá dược dầu Sachi inchi	Tá dược dầu Sachi inchi	Bôi ASX 20	Uống ASX 20	Bôi ASX 200	Uống ASX 200

Tạo mô hình chuột lão hóa da (Komatsu *et al.*, 2017)

Chuồng chuột sẽ được bố trí chiếu UVB+UVA (Reptile 25W) với cường độ UV trên bề mặt là UVA=360mJ/cm^2, UVB=60mJ/cm^2. Chuột được chiếu UV trong chu kỳ sáng với thời gian chiếu tương đương 1 MED (tương ứng với 15 phút) ở tuần đầu tiên và ở các tuần tiếp theo lần lượt là 2, 3, 4, 4, 4 MED. Chuột được chiếu 5 lần/tuần trong thời gian 6 tuần.

Khảo sát hiệu quả bảo vệ da chuột của ASX.

Chuột được thoa hoặc uống ASX (bảng 2) 5 giờ trước khi chiếu UV như quy trình trên. Quy trình thực hiện trong 6 tuần. Mỗi tuần tiến hành quan sát da chuột và nhuộm mô học da Trichrome ở tuần thứ 6.

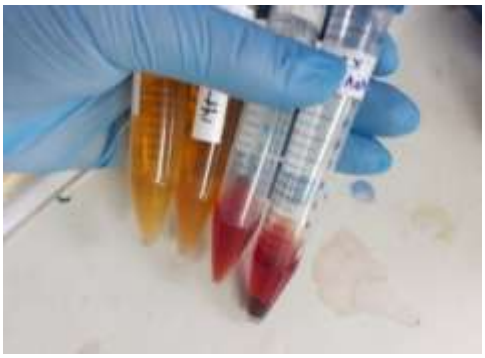
Phân tích số liệu

Kết quả được kiểm định thống kê bằng phần mềm Sigmaplot, so sánh nhiều nhóm bằng One Way ANOVA với $P \leq 0.05$. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Excel của bộ phần mềm Microsoft Office.

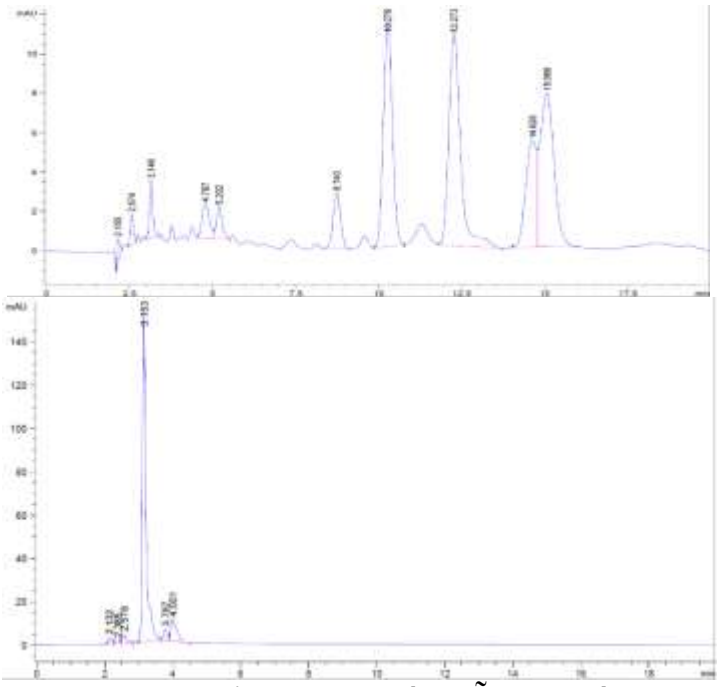
KẾT QUẢ/THẢO LUẬN

Kết quả HPLC

Kết quả HPLC cho thấy mẫu ban đầu có nhiều đỉnh hấp thụ bước sóng 480 nm. Tuy nhiên, sau khi tiến hành xà phòng hóa (khử liên kết ester) mẫu chỉ còn 1 đỉnh chiếm ưu thế và đỉnh này tương đương với ASX dạng tự do (không có liên kết ester). Kết quả cho thấy trong dịch chiết ban đầu, ASX tồn tại chủ yếu là dạng ester, dạng tự do chiếm tỉ lệ thấp (4,8%) (hình 1, 2).



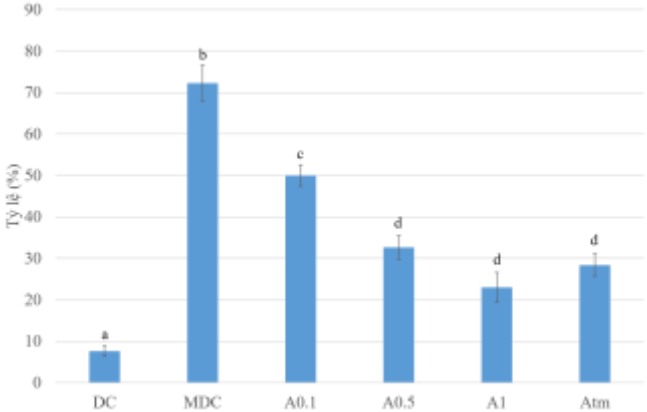
Hình 1: Dịch ASX



Hình 2: Kết quả HPLC của dịch ASX. Trái: mẫu tự nhiên, phải: khử ester

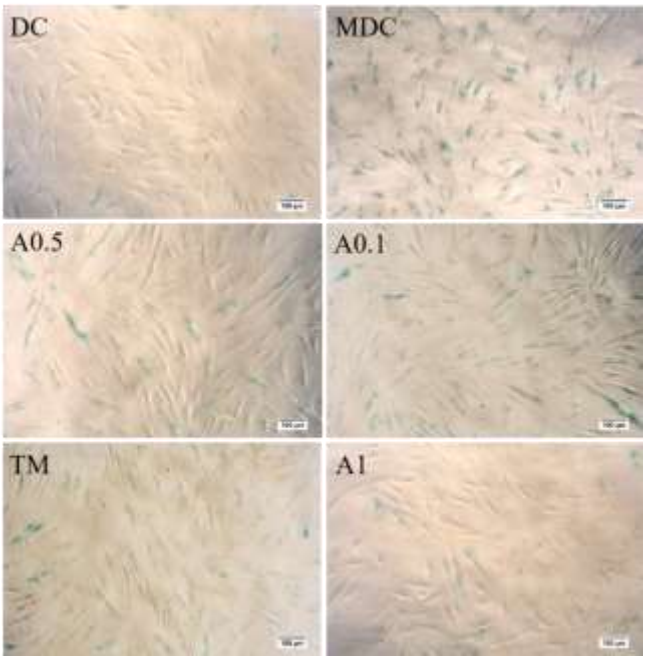
Đánh giá khả năng bảo vệ tế bào NBS của ASX *in vitro*

Ở kết quả nhuộm β-gal (**Hình 3**), các nhóm thí nghiệm ASX chiết từ tảo vẫn có tỷ lệ tế bào dương tính β-gal (A1: 23%, A0.5: 33%, A0.1: 55%) cao hơn nhóm đối chứng (8%) nhưng đều thể hiện tỷ lệ tế bào dương tính thấp hơn so với nhóm mô hình (72%). Tỷ lệ tế bào dương tính với β-gal giảm dần khi nồng độ ASX trong môi trường nuôi tăng dần. Nhóm thí nghiệm ASX thương mại (Atm) và nhóm thí nghiệm ASX tảo (A1) ở nồng độ 1µg/ml đạt tỷ lệ tế bào dương tính β-gal tuy chênh lệch 5% (A1: 23% và Atm: 28%) nhưng lại không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tuy kết quả trung bình cho thấy ASX tảo 1µg/ml giúp làm giảm tỷ lệ tế bào biểu hiện β-gal nhưng lại không tạo sự khác biệt về mặt thống kê so với nhóm ASX tảo 0.5 µg/ml (33%).



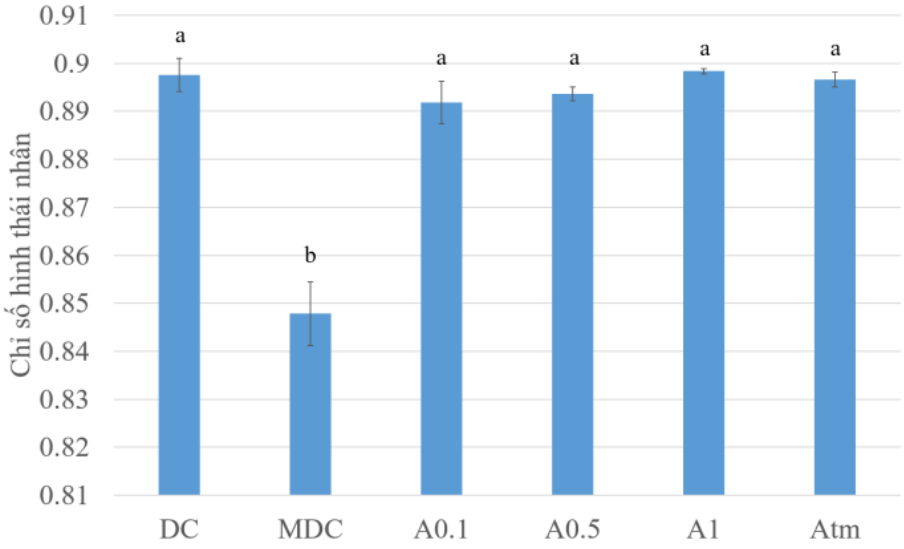
Hình 3: Tỷ lệ tế bào dương tính β-gal đã qua xử lý ASX, sau đó gây lão hóa với H_2O_2.

DC: đối chứng trắng, MDC: đối chứng mô hình, A0.1: thí nghiệm ASX 0.1 µg/ml, A0.5: thí nghiệm ASX 0.5 µg/ml, A1: thí nghiệm ASX 1 µg/ml, Atm: thí nghiệm ASX thương mại 1 µg/ml.

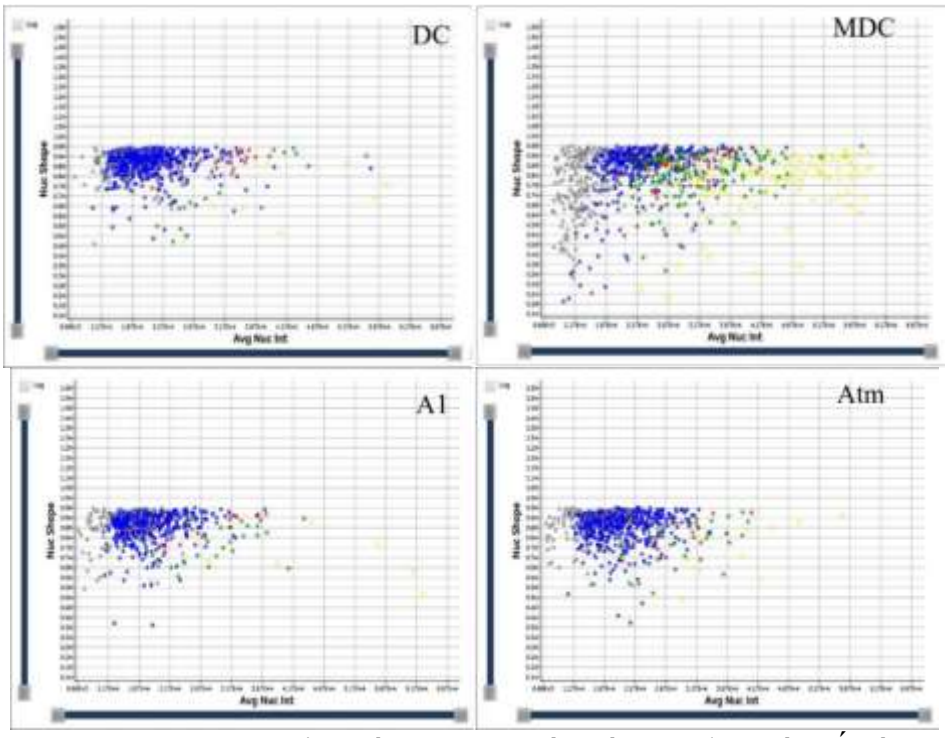


Hình 4: Nguyên bào sợi nhuộm β-gal đã qua xử lý ASX, sau đó gây lão hóa với H_2O_2.

Ở kết quả phân tích hình thái nhân tế bào (**Hình 5, hình 6**), chỉ số ở nhóm mô hình (MDC) là 0.848 thấp đáng kể tức nhân ít cân đối hơn so với nhóm đối chứng âm (DC) là 0.898. Chỉ số hình thái nhân của các nhóm A0.1, A0.5, A1 (0.893, 0.894, 0.898) không có sự khác biệt về mặt thống kê với nhau và với nhóm đối chứng âm. Các nồng độ cao hơn 0.1 µg/ml không tạo sự khác biệt trong việc bảo vệ tính toàn vẹn của nhân với tác nhân oxy hóa. Nhóm tế bào sử dụng ASX thương mại không tạo sự khác biệt thống kê so với ASX từ tảo.



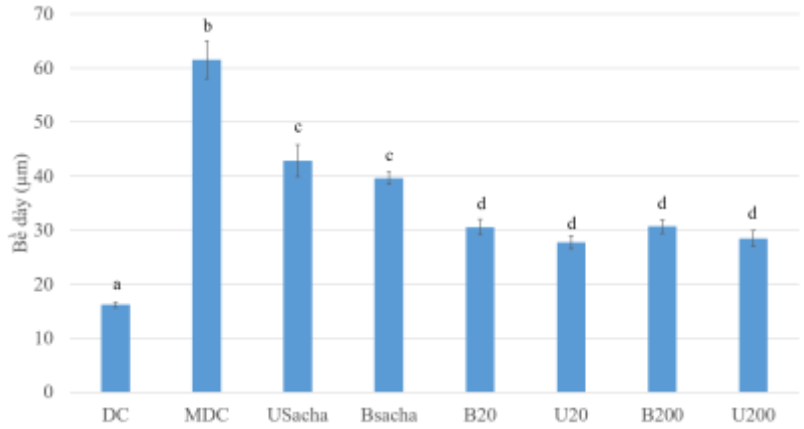
Hình 5: Kết quả đo hình thái nhân tế bào.



Hình 6: Sự tương quan giữa hình dạng nhân và mật độ nhân tế bào ở nhóm DC, MDC, A1, Atm.

Hình thái nhân và sự biểu hiện β-gal là những dấu hiệu chỉ thị lão hóa tế bào. Hình thái nhân được thể hiện thông qua chỉ số từ 1 đến 0, chỉ số hình thái nhân càng tiến về 1 thì nhân càng tròn. Thông thường nhân trong tế bào bình thường có xu hướng tròn và ít móp méo hơn nhân tế bào lão hóa. Một chỉ số khác để xác định mức độ lão hóa là mức độ dương tính với β-gal, tỷ lệ tế bào dương tính β-gal trong nhóm tế bào càng lớn tức nhóm tế bào khảo sát có mức độ lão hóa càng cao. Nhờ tiếp xúc trước với ASX nên khi tiếp xúc với H_2O_2, hình thái nhân tế bào được giữ toàn vẹn, tỷ lệ tế bào biểu hiện β-gal giảm so với đối chứng mô hình *in vitro* cho thấy ASX hấp thu vào tế bào đã hạn chế được tác động bất lợi của H_2O_2 lên NBS.

Đánh giá in vivo



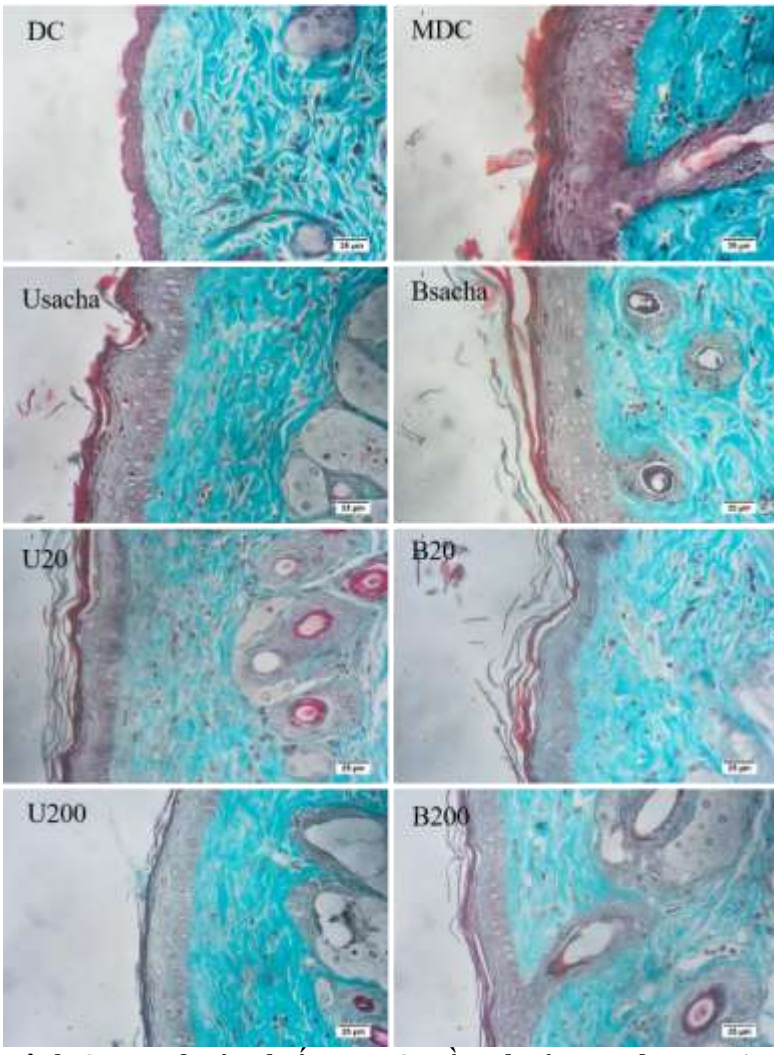
Hình 7: Độ dày biểu bì da chuột

Một trong những thông số quan trọng trong đánh giá quang lão hóa là độ dày lớp biểu bì. Quan sát kết quả **hình 7,** độ dày biểu bì không có sự khác biệt giữa nhóm uống/bôi dược chất. Nhóm mô hình có lớp biểu bì dày gần gấp 4 lần so với nhóm đối chứng (61.6 µm; 16.2 µm). Nhóm bôi/uống sacha inchi có lớp biểu bì mỏng hơn đáng kể so với nhóm mô hình (42.2/45.2µm; 61.6µm). Đặc

biệt, ở tất cả các nhóm thí nghiệm ASX đều không có sự khác biệt độ dày biểu bì ở các nồng độ khác nhau (B20/U20: 30.6/27.8 µm, B200/U200: 30.7/28.5 µm). Các nhóm thí nghiệm ASX có độ dày biểu bì mỏng hơn đáng kể so với nhóm mô hình và các nhóm sử dụng sacha inchi.

Kết quả mô học **hình 8** còn thể hiện một số khía cạnh khác về sự thay đổi cấu trúc trong da: nhóm đối chứng có tế bào biểu bì đều nhau, lớp tế bào đáy mỏng, nhân tế bào biểu bì nhỏ, sợi liên kết ở trung bì được xếp có tổ chức, tầng sừng mỏng. Trái ngược là nhóm mô hình và các nhóm sử dụng sacha inchi có lớp biểu bì dày, tế bào biểu bì có nhân lớn, không đều nhau, lớp tế bào đáy dày, sợi liên kết ở trung bì có sự chồng chéo thiếu tổ chức, tầng sừng dày. Tương tự các nhóm sử dụng dịch chiết chứa ASX cũng có lớp sừng dày tuy nhiên biểu bì của các nhóm sử dụng dịch chiết chứa ASX đều có lớp tế bào biểu bì xếp đều nhau, lớp tế bào đáy khá mỏng, sợi liên kết ở trung bì tương đối có tổ chức.

Các kết quả cho thấy, ASX đã hạn chế tác động có hại da của tia UV đối với da chuột. Như vậy, hướng sử dụng ASX trong các sản phẩm dưỡng da hoặc chống nắng hoàn toàn có tính khả thi.



Hình 8: Da chuột chiếu UV 6 tuần nhuộm trichrome (x400).

KẾT LUẬN

- ASX có khả năng bảo vệ tế bào khỏi gốc oxi hóa mạnh H_2O_2
- ASX hạn chế tác hại của tia UV lên da chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amaro-Ortiz, A., Yan, B. and D'Orazio, J. A. (2014) 'Ultraviolet radiation, aging and the skin: Prevention of damage by topical cAMP manipulation', *Molecules*, 19(5), pp.

6202–6219. doi: 10.3390/molecules19056202.
Focsan, A. L., Polyakov, N. E. and Kispert, L. D. (2017) 'Photo protection of haematococcus pluvialis algae by astaxanthin: Unique properties of astaxanthin deduced by epr, optical and electrochemical studies', *Antioxidants*, 6(4). doi: 10.3390/antiox6040080.
Komatsu, T. *et al.* (2017) 'Preventive effect of dietary astaxanthin on UVA-induced skin photoaging in hairless mice', *PLoS ONE*, 12(2), p. e0171178. doi: 10.1371/journal.pone.0171178.
Noren Hooten, N. and Evans, M. K. (2017) 'Techniques to induce and quantify cellular senescence', *Journal of Visualized Experiments*, 2017(123). doi: 10.3791/55533.
Régnier, P. *et al.* (2015) 'Astaxanthin from Haematococcus pluvialis prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity', *Marine Drugs*, 13(5), pp. 2857–2874. doi: 10.3390/md13052857.
Sarada, R. *et al.* (2006) 'An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), pp. 7585–7588. doi: 10.1021/jf060737t.
Shimidzu, N., Goto, M. and Miki, W. (1996) 'Carotenoids as Singlet Oxygen Quenchers in Marine Organisms', *Fisheries Science*, 62(1), pp. 134–137.
Tripathi, D. N. and Jena, G. B. (2010) 'Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: Role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes', *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 696(1), pp. 69–80. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.12.014.
Wu, H. *et al.* (2015) 'Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases', *Marine Drugs*, 13(9), pp. 5750–5766. doi: 10.3390/md13095750.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KẾT HỢP VỚI KHÁNG SINH ỨC CHẾ HÌNH THÀNH BIOFILM TRÊN CHỦNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* CỦA PHÂN ĐOẠN CAO ETHANOL TRÂM TRÒN

Dương Chí Ái *, Vương Quốc Tiểu An, Vũ Thị Thu Thanh,
Mai Thị Ngọc Lan Thanh
Trường Đại học Thủ Dầu Một
Tác giả liên lạc: thanhmtnl@tdmu.edu.vn

TÓM TẮT

Staphylococcus aureus (S.aureus) là chủng vi khuẩn nguy hiểm gây nhiễm trùng bệnh viện, ngày nay chủng này đã xuất hiện nhiều cơ chế kháng thuốc và gây tử vong trong các ca mắc bệnh. Có 56 loài thuộc chi Trâm được công nhận ở Đông Nam Á, Trâm Tròn (Syzygium glomerulatum) là một trong tám loài phân bố rất ít. Đồng thời, cao ethanol Trâm Tròn thu nhận tại thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương, được báo cáo cho hoạt tính kháng MRSA và khả năng kết hợp một phần với kháng sinh vancomycin (Thanh MTNL et al 2020). Trong nghiên cứu này, các cao phân đoạn được thu nhận từ cao tổng thông qua phương pháp chiết lỏng-lỏng trong dung môi hữu cơ theo độ phân cực tăng dần, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của phân đoạn ethyl acetate được xác định bằng 0.5 mg/mL thông qua phương pháp pha loãng, đồng thời thể hiện sự kết hợp với kháng sinh thông qua việc làm giảm MIC của kháng sinh cefoxitin xuống 4 lần (từ 0.004 mg/mL xuống chỉ còn 0.001 mg/mL khi phối hợp) và thông qua chỉ số FICI bằng 0.5. Mặc khác thử nghiệm khả năng kháng sự hình thành biofilm trên chủng MSSA (ATCC 6538) bằng phương pháp nhuộm bắt màu với crystal violet. Kết quả lần đầu tiên được báo cáo khả năng ức chế hình thành biofilm trên chủng MSSA của cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn, với giá trị nồng độ là 0.25 mg/mL và bằng ½ MIC.

Từ khóa: *Biofilm, FICI, hoạt tính kháng khuẩn, MSSA, Syzygium.*

EVALUATION OF SYNERGYSM BETWEEN THE FRACTION OF ETHANOL *SYZYGIUM GLOMERATUM* AND ANTIBIOTIC INHIBIT THE BIOFILM OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Duong Chi Ai *, Vuong Quoc Tieu An, Vu Thi Thu Thanh,
Mai Thi Ngoc Lan Thanh
Thu Dau Mot University
Corresponding Author: thanhmtnl@tdmu.edu.vn

ABSTRACT

Staphylococcus aureus infections are a major health problem and a challenge in hospital-acquired infections. Nowadays, this strain is appearing a lot of mechanisms which resist antibiotic and causing a high mortality rate. In the other research, the ethanol extract from Syzygium glomeratum has been published the potency of anti-Staphylococcus aureus and partial synergy with vancomycin. In this study, the fractions of ethanol extract of Syzygium glomeratum are accumulated through the liquid-liquid extract method in which the solvents are used to follow the increase of polarization, the antibacterial activity of this fractions are determined though the diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the fraction is determined by using the microdilution method, which is recorded to equal 0.5 mg/mL. Futher, using the checkerboard assay showed the synergism of ethylacetate Syzygium glomeratum with cefoxitin though FICI equal 0.5. The study of resistance to biofilm formation on methicillin antibiotic (MSSA ATCC6538) by crystal violet staining

were also carried out. Our result is fisrt report of the anti-biofilm effect of ethyl acetate fraction of Syzygium glomeratum with the inhibitive concentration of 0.25 mg/mL.
Keywords: *Biofilm, FICI, antibacterial activity, MSSA, Syzygiu***TỔNG QUAN**

Nhiễm trùng mãn tính gây ra bởi màng sinh học *S.aureus* thường dẫn đến đáng kể tỷ lệ mắc bệnh và tử vong. Điều này tạo ra rất nhiều nỗ lực trong việc nghiên cứu để hiểu các cơ chế phân tử nhằm kiểm soát sự hình thành màng sinh học của *S.aureus* và tạo nên cơ sở cho việc tính toán lại việc điều trị bằng kháng sinh cho các cấu trúc đa bào này (R. C. Lowrence et al, 2019). **Các EPI (Efflux Pump Inhibitor–EPI) giúp khôi phục tính mẫn cảm với kháng sinh/kháng ung thư, sử dụng đồng thời một EPI với thuốc kháng sinh/kháng ung thư có thể làm giảm mức độ đề kháng của vi khuẩn/tế bào ung thư (**Hancock et al, 2008**).**

Tổng cộng có 56 loài được công nhận ở Đông Nam Á, Trâm Tròn (*Syzygium glomerulatum*) là một trong tám loài phân bố rất ít (Soh W.-K. and Parnell J, 2015). Năm 2017 đã có 1526 loài thực vật thuộc chi Trâm được tìm thấy trên thế giới (J. Kalwij and M. Palmer, 2012)**.** Đến năm 2018, Chi Trâm (*Syzygium*) được sửa đổi cho Đông Dương (Campuchia, Lào và Việt Nam) (P. S. Shuichiro Tagane et al, 2018).

Tính đến nay rất ít nghiên cứu về cây này, có lẽ do sự phân bố ít của nó nên ít được quan tâm đến. Tính đến nay rất ít nghiên cứu về cây này, có lẽ do sự phân bố ít của nó nên ít được quan tâm đến.

Tiêu biểu về chi Trâm, có thể kể đến nghiên cứu về hoạt tính của chiết xuất lá phân đoạn ethyl acetate *Syzygium cumini*. K. Gupta et al (2019), kết luận ở nồng độ 900 µg/mL không cho thấy bất kỳ ảnh hưởng nào đến sự tăng trưởng của *P. aeruginosa* và *S. aureus*. Nhưng ở nồng độ này lại cho thấy sự ức chế màng sinh học lên tới 86 ± 1,19% và 86,40 ± 1,19% ở *P. aeruginosa* và *S. aureus*.

Với tiền đề ở một nghiên cứu khác gần đây về "Hoạt tính kháng khuẩn của chiết xuất Trâm Tròn (*Syzygium glomerulatum*) chống lại *Staphylococcus aureus* kháng methicillin" của tác giả Thanh MTNL et al (2020). Kết quả cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của cao ethanol *Syzygium glomerulatum* là 2,85714 µg/mL.Trong khi đó, ở nồng độ 35 lần MIC, *Syzygium glomerulatum* không gây độc tính trên tế bào ung thư gan G2 và tế bào nguyên bào sợi. Chỉ số FICI của sự kết hợp của *Syzygium glomerulatum* và kháng sinh vancomycin là 0,53544, cho thấy khả năng kết hợp một phần của cao ethanol *Syzygium glomerulatum* và kháng sinh vancomycin.

Góp phần cho thấy tiềm năng giải quyết được mối quan ngại về độc tính và chứng minh được tiềm năng của các EPI tự nhiên ở loài thực vật này thông qua các đánh giá về hoạt tính hỗ trợ, kháng lại các hình thức kháng thuốc, các yếu tố độc lực ở vi khuẩn, ví dụ như: Màng sinh học (biofilm), beta-lactamase, độc tố tan huyết … của chiết xuất Trâm Tròn (*Syzygium glomerulatum*) trong tương lai.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Hoạt tính kháng Chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus nhạy methicillin* (MSSA) ATCC 6538 (Microbiologics, USA), từ phân đoạn ethyl acetate cao ethanol Trâm Tròn.

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) cao phân đoạn

Nồng độ ức chế tối thiểu được định nghĩa là nồng độ thấp nhất ức chế sự phát triển của vi khuẩn sau 24h nuôi cấy. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu bằng phương pháp pha loãng dãy nồng độ trong các ống. Sử dụng đĩa nuôi cấy 96 giếng, mỗi giếng sẽ gồm các thành phần: 10 mL dịch vi khuẩn có nồng độ 10^6 CFU/mL, cao phân đoạn được pha loãng thành một dãy với độ pha loãng ½, mỗi giếng gồm 100 mL dịch cao chiết và cuối cùng

thêm vào 90 mL môi trường lỏng LB để có thể tích cuối là 200 mL. Sử dụng hai giếng là mẫu đối chứng, một chỉ có môi trường LB là đối chứng âm, một giếng chỉ có môi trường LB và chủng vi khuẩn làm đối chứng dương. Các giếng sẽ được ủ hiếu khí ở 37 °C trong vòng 24h. Sau thời gian ủ, nồng độ thấp nhất trong dãy nồng độ mà ức chế sự phát triển của vi khuẩn được ghi nhận là nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Đánh giá khả năng kết hợp của cao phân đoạn với kháng sinh

Dựa trên phương pháp pha loãng, xác định giá trị MIC của phân đoạn/tinh chất và kháng sinh trên chủng vi khuẩn, tính toán và giải thích kết quả chỉ số FICI dựa theo phương pháp checkerboard. Kết quả của thử nghiệm này được quan sát tại các điểm cuối mà có hoạt động ức chế vi khuẩn do sự kết hợp của hai chất. Tương tự, tính toán và giải thích dựa trên chỉ số này sẽ bao gồm các giá trị MIC. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường có sự hiện diện hai chất. Định nghĩa về ảnh hưởng kết hợp là nồng độ thấp nhất của các chất mà không phát hiện sự phát triển của vi khuẩn sau 24h.

Xác định chỉ số kết hợp FICI dựa theo công thức bên dưới.

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B} = \frac{\text{MIC A trong sự kết hợp}}{\text{MIC A}} + \frac{\text{MIC B trong sự kết hợp}}{\text{MIC B}}$$

Thang đánh giá:

1. Hợp lực (synergy) khi $FIC_{index} \leq 0.5$;
2. Hợp lực một phần (partial synergy) khi $0.5 < FIC_{index} \leq 0.75$
3. Cộng hợp (addition) khi $0.75 < FIC_{index} \leq 1$
4. Không có tương tác (antagonism) khi $2 < FIC_{index}$

Đánh giá khả năng ức chế hình thành biofilm của cao phân đoạn

Thí nghiệm này được thực hiện (Mataraci và Dosler 2012) với một số sửa đổi nhỏ. Các ống

eppendorf được chuẩn bị gồm: dịch cao phân đoạn ethyl acetate ở nồng độ cuối bằng 2 mg/mL và kháng sinh cefoxitin. Mỗi giếng được bổ sung 10 mL dịch huyền phù MSSA đã phát triển 24h trước khi tiến hành thí nghiệm với 90 mL TSB + 1% glucose và 100 µL dịch khảo sát. Thể tích cuối cùng của mỗi giếng là 200 µL sau đó được ủ trong 24h ở 35°C. Sau khi ủ, định lượng tế bào sản xuất màng sinh học được thực hiện dựa trên các phương pháp nhuộm màu tím pha lê (Durham-Colleran et al., 2010). Môi trường và vi khuẩn được loại bỏ bằng nước cất ba lần với thể 250 µL mỗi lần, để khô. Sau khi khô, 200 µL dung dịch metanol 99% được thêm vào từng giếng trong 20 phút để cố định. Sau đó, dung môi được loại bỏ và được để khô trong 15 phút. Tiếp đó, các giếng được nhuộm màu tím pha lê 0.1% trong 15 phút. Sử dụng nước cất rửa vết bẩn dư thừa và đĩa được để khô trong không khí. Rửa giải bằng cách thêm 200 µL ethanol 96^0 trong 10 phút.

Kết quả được đọc dựa vào sự bắt màu thuốc nhuộm.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Định lượng giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp phương pháp pha loãng (*Broth microdilution method*).

Bảng 1. Sơ đồ bố trí thí nghiệm và kết quả đánh giá MIC cao ethyl acetate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TSB	TSB +VK	DMSO 20%	DMSO 10%	2MIC CEFO	MIC CEFO	SCTT EA (2 mg/mL, DMSO 20%)					



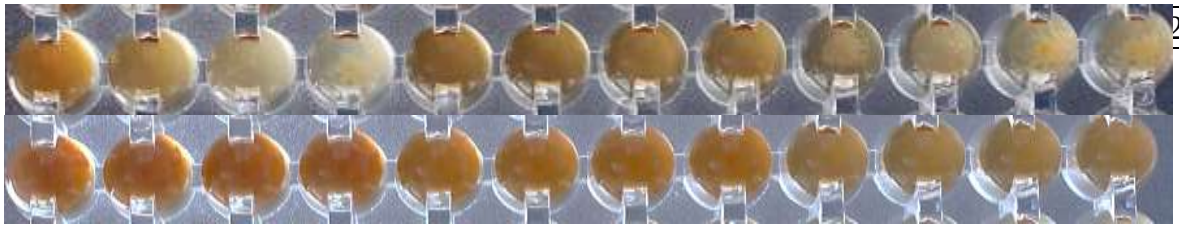
							Pha loãng ½ nồng độ					
A	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Hình 1. Đánh giá MIC của cao ethyl acetate trên MSSA

Kết quả xác định phân đoạn cao ethyl acetate của Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế sự sinh trưởng ở giá trị MIC là 0.5 mg/mL [(TSB+VK)/(SCTT EA) = 1:1 v/v] trên chủng MSSA (ATCC 6538). Đồng thời giá trị MIC của phân đoạn cao ethyl acetate của Trâm Tròn được kiểm chứng lại ở thí nghiệm đánh giá khả năng kết hợp với kháng sinh cefoxitin.

Đánh giá giá khả năng kết hợp của cao phân đoạn với kháng sinh Cefoxitin



Hình 2. Kết quả đánh giá khả năng kết hợp

Bảng 2. Sơ đồ bố trí thí nghiệm và kết quả đánh giá khả năng kết hợp

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TSB	TSB +VK	DMSO 20%	DMSO 10%	2MIC CEFO	MIC CEFO	SCTT EA (2mg/ml, DMSO 20%) Pha loãng ½ nồng độ					
C	Kết hợp SCTT Ea (2; 1; 0.5 mg/mL) với cefoxitin (MIC , ½ MIC, ¼ MIC, ⅛ MIC)											
	SCTT Ea 2 mg/mL →				SCTT Ea 1 mg/mL →				SCTT Ea 0.5 mg/mL →			
	MIC CEFO	½ MIC	¼ MIC	⅛ MIC	MIC	½ MIC	¼ MIC	⅛ MIC	MIC	½ MIC	¼ MIC	⅛ MIC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
C	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Bảng 3. Chỉ số FICI phân đoạn Ethyl acetate Trâm Tròn và Cefoxitin trên MSSA

Chủng vi khuẩn	MSSA
Giếng kết hợp	SCTTEa - cefo 2
MIC SCTT Ea (mg/mL) trong sự kết hợp	0.125
MIC SCTT Ea một mình (mg/mL)	0.5
MIC cefo (mg/mL) trong sự kết hợp	0.001
MIC cefo một mình (mg/mL)	0.004
FIC SCTT Ea	0.25
FIC cefo	0.25
FICI	**0.5**

Phân đoạn cao ethyl acetate Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế sự sinh trưởng ở giá trị là 0.5 mg/mL là chính xác so với kết quả khảo sát MIC của phân đoạn này ở thí nghiệm trước đồng thời thể hiện sự kết hợp với kháng sinh thông qua việc làm giảm MIC của kháng sinh cefoxitin xuống 4 lần và thông qua chỉ số FICI bằng 0.5.

Đánh giá định lượng ức chế hình thành biofilm của cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn



Hình 3. Kết quả ức chế hình thành biofilm trên chủng MSSA (ATCC 6538)

Bảng 4. Sơ đồ bố trí và kết quả đánh giá khả năng ức chế hình thành biofilm

(1)	(2)	(3)	(4)	(5) – (6) – (7)		
TSB 1% glucose (-)	TSB 1% glucose DMSO 20 % + VK (+)	TSB 1% glucose DMSO 10 % + VK (+)	TSB 1% glucose CEFO 2MIC + Vk (-)	SCTT Ea 2 mg/mL → TSB + 1 % glucose + VK		
				1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL

Dựa vào sự bắt màu thuốc nhuộm tím pha lê (crystal violet) ở thành ống eppendorf, ta thấy phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn cho hoạt tính ức chế sự hình thành biofilm trên chủng MSSA, so với đối chứng. Cụ thể nồng độ cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn cho khả năng ức chế hình thành biofilm là 0.25 mg/mL và bằng ½ MIC của cao phân đoạn này đối với chủng MSSA. Như vậy, cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn ở nồng độ bằng ½ nồng độ ức chế tối thiểu đã cho khả năng ức chế hình thành biofilm là hình thức chính được xác định trong sự kháng kháng sinh ở vi khuẩn *S.aureus* (V. Hancock et al, 2018).

Qua đây đã chứng minh cho tiềm năng về hoạt tính của phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn trong điều trị nhiễm khuẩn do màng sinh học của vi khuẩn *S.aureus* nói riêng và là tiền đề cho các nghiên cứu tác động đến hình thức gây độc khác ở vi khuẩn.

KẾT LUẬN – KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn ethyl acetate từ cao ethanol Trâm Tròn cho hoạt tính kháng MSSA, thể hiện khả năng kết hợp với kháng sinh cefoxitin thông qua chỉ số FICI bằng 0.5. Hơn nữa, cao phân đoạn ethyl acetate Trâm Tròn còn cho khả năng ức chế hình thành biofilm trên MSSA ở nồng độ 0.25 mg/mL bằng giá trị ½ MIC của cao phân đoạn trên MSSA (ATCC 6538).

Từ đó tạo nên cơ sở cho các đánh giá chuyên sâu hơn về hoạt tính hỗ trợ**, cho thấy tiềm năng** kết hợp với thuốc điều trị giúp mở rộng phổ kháng khuẩn, tái lập lại hoạt động của các kháng sinh thế hệ cũ đã bị kháng bởi vi khuẩn kháng thuốc, hy vọng làm giảm tần suất đề kháng và sự xuất hiện các chủng đột biến mới ở loài thực vật này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Kuok C-F, Hoi S-O, Hoi C-F, Chan C-H, Fong I-H, Ngok C-K (2017). Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant

Staphylococcus aureus: A computational and experimental study. Exp Ther Med;242(7):731-43.

Mataraci, E., & Dosler, S. (2012). In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant Staphylococcus aureus biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56(12), 6366-637

M. Kvist, V. Hancock, and P. Klemm, "Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation," Appl Environ Microbiol, vol. 74, pp. 7376-82, Dec 2008.

Wayne, (2012). Edition, A.S.E.,CLSI document M02-A11,PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, p. 76.

Soh W.-K. & Parnell J, 2015, A revision of Syzygium Gaertn. (Myrtaceae) in Indochina (Cambodia, Laos and Vietnam). Adansonia, sér. 3, 37 (2): 179-275.

ĐÁNH GIÁ THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY SAO NHÁI VÀNG (*Cosmos sulphureus* Cav.) VÀ SAO NHÁI HỒNG (*Cosmos caudatus* Kunth)

Đặng Gia Lệ*, Lê Thị Gấm

Khoa Dược – Điều dưỡng, Trường Đại học Tây Đô

Tác giả liên lạc: danggiale149272@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu của đề tài nhằm đánh giá thành phần hóa học và một số hoạt tính sinh học như kháng oxy hóa, ức chế α-glucosidase và gây độc tế bào ung thư của cao chiết ethanol 50% của 2 loài Sao nhái (chi Cosmos). Kết quả cho thấy tổng hàm lượng polyphenol và flavonoid trong lá nhiều hơn hoa, đặc biệt là lá Sao nhái hồng (Cosmos caudatus) (308,25 mg GAE/g dược liệu khô và 288,99 mg QE/g dược liệu khô). Các cao chiết Sao nhái hồng cũng thể hiện khả năng kháng oxy hóa, ức chế α-glucosidase mạnh hơn so với Sao nhái vàng nhưng ở hoạt tính gây độc tế bào thì Sao nhái vàng thể hiện nổi bật hơn.

CHEMICAL COMPOSITION ASSESSMENT AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF COSMOS SULPHUREUS CAV. AND COSMOS CAUDATUS KUNTH

Dang Gia Le*, Le Thi Gam

Faculty of Pharmacy and Nursery, Tay Do University

Corresponding Author: danggiale149272@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the chemical compositions and biological activities such as the anti-oxidant, inhibition of α-glucosidase and cytotoxicity abilities in the 50% ethanol extracts from leaves and flowers of two kinds of Cosmos caudatus and Cosmos sulphureus. The results showed that the total contents of polyphenols and flavonoids in the leaves were more than those of flowers, especially given that C. caudatus (308.25 mg GAE/g dried weight and 288.99 mg QE/g dried weight). Those C. caudatus extracts also exhibited the antioxidant ability and the inhibition of α-glucosidase at the higher level compared to those of C. sulphureus extracts. However the cytoxicity ability in C. sulphureus extracts were higher than those of C. caudatus.

Keywords: *α-glucosidase, DPPH, flavonoid, cytotoxicity, antioxidant, Cosmos caudatus, Cosmos sulphureus, polyphenol.*

GIỚI THIỆU

Quá trình sản xuất và tích lũy quá mức các gốc tự do trong cơ thể là nguyên nhân chính dẫn đến lão hóa và các bệnh thoái hóa như bệnh đái tháo đường, ung thư, xơ vữa động mạch… Ngoài ra, chất kháng oxy hóa tổng hợp (như butylated hydroxyanisol và butylated hydroxytoluen) được sử dụng nhiều trong ngành công nghiệp thực phẩm đã được chứng minh là có hại cho sức khỏe do độc tính tiềm tàng và là các tác nhân gây ung thư. Do đó, ngày càng có nhiều mối quan tâm đối với việc tìm kiếm các hợp chất kháng oxy hóa có nguồn gốc tự nhiên như nhóm polyphenol và flavonoid, là thành phần dinh dưỡng quan trọng nhất trong thực vật và có khả năng kháng oxy hóa cao, có mặt trong tất cả các bộ phận của cây.

Ở Đông Nam Á, Sao nhái là loài cây mọc hoang, hay được trồng trang trí quanh nhà và là một loại rau dùng trong bữa ăn, là một vị thuốc cổ truyền (Thái Lan, Brazil, Indonesia). Bên cạnh đó, Sao nhái cũng được chứng minh có các hoạt tính sinh học tốt thông qua các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* như: Kháng oxy hóa, ức chế tế bào ung thư, chống loãng xương, hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường và tăng huyết áp….Tại Việt Nam, công bố khoa học trên các loài Sao nhái vẫn còn hạn chế nên cần được nghiên cứu làm rõ hơn về hoạt

chất cũng như hoạt tính sinh học. Thông qua sự đánh giá thành phần hóa học và hoat tính sinh học của cây Sao nhái vàng (*Cosmos sulphureus* Cav.) và Sao nhái hồng (*Cosmos caudatus* Kunth) giúp khẳng định hơn tiềm năng của loài cây này, làm phong phú cho nguồn dược liệu trong nước và định hướng cho nghiên cứu tiếp theo.

PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu nghiên cứu

Mẫu lá và hoa các cây Sao nhái (hồng, vàng) được thu hái ở Đồng bằng sông Cửu Long vào tháng 9/2019 - 12/2020, nguyên liệu được rửa sạch và sấy khô ở 40^{o}C, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp nghiên cứu

Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng: Ethanol (Chemsol), methanol (Xilong), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH - Sigma), acid gallic (Sigma), Folin - Ciocalteu (Merck), quercetin (Sigma), acid ascorbic (Prolabo), acarbose (Sigma), acid trichloroacetic (Sigma), Eagle Minimum Essential Medium (E'MEM), *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranosid (Sigma), L-glutamin, α-glucosidase (Sigma), sulforhodamin B (Sigma), acid 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazineethanesulfonic (HEPES), streptomycin, amphotericin B, penicillin G, huyết thanh bào thai bò Fetal Bovine Serum (FBS).

Chiết xuất cao toàn phần

Lá và hoa của 2 loại Sao nhái được chiết kiệt theo phương pháp ngâm lạnh có hỗ trợ siêu âm (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Thu được 4 mẫu cao chiết gồm lá Sao nhái hồng (LH), hoa Sao nhái hồng (HH), lá Sao nhái vàng (LV) và hoa Sao nhái vàng (HV).

Xác định hàm lượng một số hợp chất

Hàm lượng polyphenol được thực hiện theo phương pháp Folin - Ciocalteu được mô tả bởi Ramirez *et al*. (2016) và hàm lượng flavonoid được thực hiện theo phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ được mô tả bởi Marinova *et al*. (2005) với một số hiệu chỉnh.

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa

Khả năng kháng oxy hóa được thực hiện theo phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Chanda and Dave, 2009).

Xác định hoạt tính ức chế α-glucosidase

Khảo sát hoạt tính ức chế α-glucosidase được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Kwon *et al.*, 2008; Andrade-Cetto*et al.*, 2008 và Dong *et al.*, 2012 với một số hiệu chỉnh.

Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào ung thư

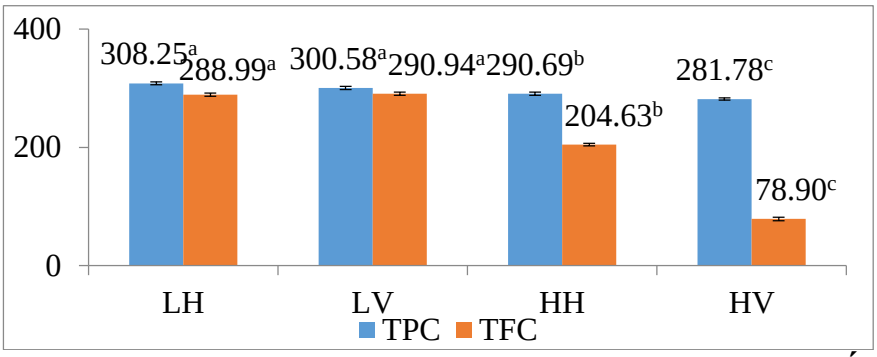
Khảo sát hoạt tính gây độc tế bào bằng phương pháp sulforhodamin B (SRB) mô tả bởi Nguyễn Thái Hoàng Tâm và *ctv.*, 2007; Nguyen and Ho, 2016.

Số liệu được tính toán, phân tích ANOVA và so sánh trung bình bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định hàm lượng polyphenol và flavonoid toàn phần

Kết quả ở Hình 1 cho thấy các mẫu cao chiết đều cho hàm lượng polyphenol và flavonoid cao, bên cạnh đó lượng polyphenol, flavonoid có trong mẫu lá cũng cao hơn hoa, đặc biệt là lá Sao nhái hồng (LH) có hàm lượng hợp chất cao nhất trong các mẫu chiết với 308.25 mg GAE/g dược liệu khô và 288.99 mg QE/g dược liệu khô.



Hình1. Hàm lượng polyphenol, flavonoid của các cao chiết

Các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Hoạt tính kháng oxy hóa

Hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu thử nghiệm được đánh giá qua khả năng ức chế gốc tự do DPPH. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, mặc dù lá và hoa của 2 cây Sao nhái đều có tác dụng ức chế gốc tự do DPPH, tuy nhiên, khả năng ức chế còn thấp khi so với chứng dương acid ascorbic (IC_{50} là 28.73 µg/mL) thì hiệu quả ức chế gốc tự do của các cao chiết thử nghiệm thấp hơn ít nhất khoảng 3 lần. Bên cạnh đó, các chiết xuất từ hoa cho thấy khả năng kháng oxy mạnh hơn lá, nhất là hoa Sao nhái vàng (HV) và hồng (HH) với IC_{50} lần lượt là 85.70 µg/mL và 85.87 µg/mL, kế đến là LH và LV.

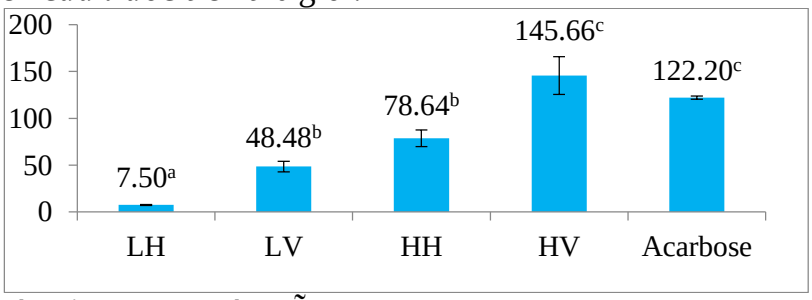
Bảng 1. Hoạt tính kháng oxy hóa của các cao chiết

Mẫu	Phương trình tuyến tính	R^2	IC_{50} (µg/mL)
Acid ascorbic	y = 2.3316x–16.9340	0.9990	28.73 ± 0.10^{a}
LH	y = 0.4513x+10.3540	0.9973	87.84 ± 1.31^{bc}
HH	y = 0.4844x + 8.4160	0.9957	85.87 ± 1.74^{b}
LV	y = 0.4156x+11.2705	0.9987	93.19 ± 1.76^{c}
HV	y = 0.5434x + 2.6164	0.9915	85.70 ± 1.95^{b}

Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Hoạt tính ức chế α-glucosidase

Kết quả khảo sát cho thấy từ Hình 2, tất cả các cao chiết đều có khả năng ức chế *α*-glucosidase mạnh, đặc biệt cao chiết LH với giá trị IC_{50} nhỏ nhất là 7.50 µg/mL, tương ứng khả năng ức chế *α*-glucosidase tốt hơn chứng dương acarbose (IC_{50} = 122.20 µg/mL) gấp 16 lần và cao chiết HV (IC_{50} = 145.59 µg/mL) có khả năng ức chế *α*-glucosidase yếu nhất. So sánh hiệu quả ức chế *α*-glucosidase của thực nghiệm nhìn chung thể hiện hoạt tính tốt hơn những nghiên cứu trước trên thế giới.



Hình 2. Gía trị IC_{50} của các mẫu cao thử nghiệm

Các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Turkey.

Kết quả khảo sát hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Kết quả được trình bày ở Bảng 2 cho thấy bốn mẫu cao chiết lá và hoa Sao nhái có khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư vú MCF-7 với tỷ lệ phần trăm ức chế dao động từ 28.04% - 72.54%, trong khi đó, đối với dòng tế bào ung thư phổi, các cao chiết lá (LV và LH) không có khả năng ức chế tế bào ung thư nhưng các cao chiết hoa (HV và HH) thì ngược lại, thể hiện khả năng ức chế tương đương nhau.

Bảng 2. Kết quả phần trăm gây độc của các cao thử nghiệm trên dòng ung thư vú MCF-7 và ung thư phổi NCI H460.

Mẫu	**Nồng độ (µg/mL)**	**Phần trăm gây độc tế bào (%)**	
		MCF-7	**NCI H460**
HV	500	72.54 ± 2.34^{c}	11.46 ± 3.00^{b}
HH	500	55.67 ± 3.82^{b}	6.32 ± 3.93^{b}
LV	500	63.34 ± 5.13^{bc}	-1.51 ± 2.87^{a}
LH	500	28.04 ± 5.61^{a}	-2.64 ± 3.16^{a}
Camptothecin	0.01	55.65 ± 5.81	-
	0.007	-	76.86 ± 3.11

KẾT LUẬN

Cả 2 loài Sao nhái (chi *Cosmos*) đều có các thành phần polyphenol, flavonoid và có một hàm lượng đáng kể trong cây. Ngoài ra, chúng cũng có khả năng kháng oxy hóa, ức chế α-glucosidase, gây độc tế bào ung thư, đặc biệt là Sao nhái hồng (*Cosmos caudatus*). Kết quả thu được làm tiền đề có các nghiên cứu trên cây Sao nhái về hoạt tính sinh học trên mô hình *in vivo*, định hướng cho việc sử dụng dược liệu, bào chế các sản phẩm trong phòng ngừa và điều trị bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

CHANDA, S. AND DAVE, R. (2009). *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. African Journal of Microbiology Research 3(13) 981-996.

DONG, H.Q., LI, M., ZHU, F., LIU, F.L. HUANG, J.B. (2012). Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α-glucosidase and α-amylase linked to type 2 diabetes. Food Chemistry 130 261-266.

MARINOVA, D., RIBAROVA, F., ATANASSOVA, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 40 (3) 255-260.

ĐO LƯỜNG MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN LO ÂU, TRẦM CẢM CỦA ĐỢT BÙNG PHÁT DỊCH COVID-19 ĐỐI VỚI NHÂN VIÊN Y TẾ LÂM SÀNG Ở MỘT SỐ BỆNH VIỆN TẠI HÀ NỘI NĂM 2020

Nguyễn Thị Thúy Liễu*, Phạm Ngọc Ánh, Đặng Thị Vân Anh, Trần Đỗ Bảo Nghi

Trường Đại học Y tế Công cộng

*Tác giả liên lạc: thuylieu270499@gmail.com

TÓM TẮT

Tính đến nay, tình hình dịch bệnh do COVID-19 gây ra đã lây lan ra hầu hết các khu vực trên thế giới với tỷ lệ ca nhiễm và người tử vong tăng cao. Trước diễn biến phức tạp của dịch bệnh, nhân viên y tế (NVYT) có nguy cơ phải chịu những áp lực tâm lý, thậm chí là rủi ro rất lớn khi chăm sóc, bảo vệ cho sức khỏe của cộng đồng

Phương pháp: *Nghiên cứu cắt ngang được thực hiện từ 04/2020 đến 08/2020 với 341 NVYT lâm sàng tham gia tại bệnh viện Bệnh viện Đa khoa Đống Đa và Đa khoa Đông Anh.*

Kết quả: *Có 33,1% đối tượng tham gia nghiên cứu gặp tình trạng rối loạn lo âu. Đối tượng làm việc tại khoa Truyền nhiễm có nguy cơ có biểu hiện lo âu cao hơn gấp 4,96 lần so với đối tượng làm việc ở khoa cấp cứu (OR = 4,96, KTC 95%: 1,4 – 17,23). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, có 23,2% NVYT có biểu hiện trầm cảm từ nhẹ đến rất nặng. Nhân viên làm việc tại khoa Truyền nhiễm có khả năng có biểu hiện trầm cảm cao hơn gấp 5,9 lần so với nhân viên làm việc ở khoa cấp cứu (OR= 5,5, KTC 95%: 1,5 – 22,9).*

Kết luận: *Một số NVYT tham gia vào nghiên cứu đã ghi nhận có các biểu hiện về rối loạn lo âu và trầm cảm từ nhẹ đến rất nặng. Các yếu tố về khoa làm việc, nguy cơ rủi ro tại nơi làm việc và sự kì thị của cộng đồng có mối liên quan có ý nghĩa thống kê tới mức độ biểu hiện lo âu, trầm cảm của NVYT lâm sàng.*

Từ khóa: *COVID-19, lo âu, trầm cảm, nhân viên y tế, yếu tố liên quan, Hà Nội.*

MEASURING THE LEVEL OF EXPRESSION OF ANXIETY AND DEPRESSION IN CLINICAL HEALTH CARE WORKERS DURING THE COVID-19 OUTBREAK IN A NUMBER OF HOSPITALS IN HANOI, 2020

Nguyen Thi Thuy Lieu*, Pham Ngoc Anh, Dang Thi Van Anh, Tran Do Bao Nghi

HaNoi University of Public Health

*Corresponding author: thuylieu270499@gmail.com

Background*: Up to now, the disease situation caused by COVID-19 has spread to most areas of the world with high rates of infection and deaths. Facing the complicated developments of the epidemic, clinical medical staffs (CMS) are at risk of suffering not only psychological pressure but also great risks when caring for and protecting the community's health.*

Methods: *A cross-sectional study was conducted from April 2020 to August 2020 using self – administered questionnaire amongst 341 CMS at Dong Da General Hospital and Dong Anh General Hospital.*

Results: *33.1% of participants in the study had an anxiety disorder. CMS working in the Department of Infectious Diseases were 4.96 times more likely to develop anxiety than those working in the emergency department (OR = 4.96, 95% CI: 1.4 – 17.23). The results also showed that 23.2% of CMS exhibited mild to very severe depression. Staffs working in the Department of Infectious Diseases were 5.9 times more likely to manifest depression than those working in the emergency department (OR = 5.5, 95% CI: 1.5 – 22.9).*

Conclusion: This study suggests that CMS experience anxiety and depression during the COVID-19 pandemic, the finding is consistent with previous western studies. workplace

risks, and community stigma were statistically related to the level of anxiety and depression expressed byCMS

Keywords: *COVID-19, anxiety, depression, medical staff, related factors, Hanoi.*

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Tính đến ngày 10/1102020 toàn thế giới đã ghi nhận hơn 51.200.000 ca mắc COVID-19 với hơn 1.200.000 người tử vong do căn bệnh này (1). Trong những đợt dịch lớn, nhu cầu về nhân viên chăm sóc sức khỏe tăng cao (2). Ngoài các rủi ro về việc lây nhiễm trực tiếp phát sinh do tiếp xúc gần với bệnh nhân hoặc đồng nghiệp trong đại dịch COVID-19, nhân viên y tế cũng có nguy cơ gia tăng căng thẳng và rủi ro về sức khỏe tâm thần tương tự như đã xảy ra trong trường hợp dịch SARS vào năm 2003 (3). Một nghiên cứu của Lijun Kang và cộng sự năm 2020 thực hiện trên 994 NVYT và điều dưỡng làm việc tại Vũ Hán chỉ ra rằng 36,9% bị rối loạn sức khỏe tâm thần dưới ngưỡng, 34,4% bị rối loạn, 22,4% có rối loạn ở mức trung bình và 6,2% bị xáo trộn nghiêm trọng ngay sau khi dịch bệnh COVID-19 xảy ra (4). Bên cạnh đó các trường hợp tự tử đã được báo cáo ở Ấn Độ và ở các quốc gia khác, bao gồm cả Ý, nơi hai y tá người Ý bị nhiễm bệnh đã tự tử nguyên nhân có thể là do sợ lây truyền COVID-19 cho bệnh nhân (5).

Đại dịch đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến tất cả lĩnh vực kinh tế-xã hội, y tế, chính trị trên cả thế giới và Việt Nam cũng không ngoại lệ. Hệ thống y tế tại Việt Nam trong thời điểm dịch bệnh diễn ra đã có những áp lực nhất định như quá tải về nhân lực, cơ sở hạ tầng và trang thiết bị không đầy đủ, các dụng cụ y tế cần thiết… Tại Việt Nam, dịch bệnh đã được kiểm soát và đẩy lùi nhờ vào các biện pháp kiên quyết của Chính phủ Việt Nam. Các nghiên cứu được công bố về nghề điều dưỡng chỉ báo cáo về các rối loạn tâm thần, chẳng hạn như căng thẳng, lo lắng và trầm cảm (6)(7)(8)(9)(10)(11). Qua các nghiên cứu về rối loạn sức khỏe tâm tâm thần của các nhân viên y tế, tỷ lệ nhân viên có vấn đề về rối loạn tâm thần dao động từ 13,2 - 45,2%. Tỷ lệ giữa các vấn đề rối loạn là khác nhau tỷ lệ căng thẳng tự báo cáo, lo lắng và trầm cảm lần lượt là 18,5%, 39,8% và 13,2% (12). Các vấn đề về áp lực tâm lý trở thành một trong những vấn đề được quan tâm hàng đầu trong cuộc chiến với Đại dịch toàn cầu COVID19. Kết quả của các nghiên cứu đi trước là minh chứng cho sự khẩn cấp về tình trạng sức khỏe tâm thần của các nhân viên y tế đang trực tiếp làm việc với các bệnh nhân dương tính với SARS-CoV-2 trên toàn thế giới, đặc biệt là tại Việt Nam trong điều kiện cơ sở vật chất y tế chưa hoàn thiện.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện trên 341 NVYT bao gồm bác sĩ, điều dưỡng, hộ sinh, hộ lý của các khoa lâm sàng (khoa Cấp cứu, khoa Truyền nhiễm, khoa Nội, khoa Ngoại và các Chuyên khoa lẻ), đang làm việc liên tục tối thiểu 1 năm và có hợp đồng lao động tại bệnh viện Đa khoa Đống Đa và bệnh viện Đa khoa Đông Anh, Hà Nội.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu:

Từ tháng 04/2020 – 08/2020 tại Bệnh viện Đa khoa Đống Đa và bệnh viện Đa khoa Đông Anh.

Phương pháp thu thập số liệu

Khảo sát online với các nhân viên thuộc các khoa lâm sàng của cả 2 bệnh viện, dựa trên bộ công cụ thu thập thông tin là bộ câu hỏi online được tạo trên phần mềm Kobotool box, được thiết kế sẵn dựa trên mục tiêu và các biến số nghiên cứu.

Công cụ đo lường

Mức độ trầm cảm và lo âu lần lượt được đánh giá qua thang sàng lọc trầm cảm gồm 9 tiểu mục (9-item Patient Health Question PHQ-9) và thang sàng lọc lo âu gồm 7 tiểu mục

(7-iteam General Anxiety Disorder). Chúng tôi phân loại biểu hiện lo âu, trầm cảm như sau: không có biểu hiện trầm cảm (0 – 4 điểm); có biểu hiện trầm cảm (5 – 27 điểm); không có biểu hiện rối loạn lo lắng (0 – 4 điểm); có biểu hiện rối loạn lo lắng (5 – 21 điểm).

Phương pháp phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm SPSS 20.0 để phân tích số liệu: Thống kê mô tả sử dụng để mô tả các đặc điểm thông tin chung, thực trạng lo âu, trầm cảm và các yếu tố nguy cơ, sự kì thị của cộng đồng đối với NVYT.

Sử dụng mô hình hồi quy Logistic nhị phân để tìm hiểu mối liên quan tới biểu hiện lo âu, trầm cảm của NVYT lâm sàng với kết quả biểu thị dưới dạng OR, KTC 95% và $p < 0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

Bảng 1. Thông tin chung của đối tượng nghiên cứu

Đặc điểm	*Tần số (n)*	*Tỷ lệ (%)*
Giới tính		
Nam	77	22,6
Nữ	264	77,4
Nghề nghiệp		
Bác sĩ	100	29,3
Điều dưỡng	227	66,6
Khác	14	4,1
Khoa làm việc		
Cấp cứu	40	11,7
Truyền nhiễm	39	11,4
Khoa Nội	44	12,9
Khoa Ngoại	37	10,9
Chuyên khoa lẻ	181	53,1
Sống trong khu vực cách ly		
Có	26	7,6
Không	315	92,4

Trong tổng số 341 đối tượng tham gia nghiên cứu, tỷ lệ nữ (77,4%) nhiều hơn gấp 3,4 lần so với tỷ lệ nam giới (22,6%). Tỷ lệ NVYT là điều dưỡng chiếm 66,6% tiếp sau đó là bác sĩ là 29,3% và chỉ có 4,1% là các kĩ thuật viên, hộ sinh và hộ lý.

Phần lớn nhân viên y tế (92,4%) không phải sống trong khu vực cách ly trong thời điểm xảy ra dịch bệnh và chỉ có 7,6% nhân viên là sống trong khu vực cách ly.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện rối loạn lo âu của ĐTNC

Không lo âu n (%)	**Biểu hiện rối loạn lo âu**			
	Lo âu nhẹ n (%)	Lo âu vừa phải n (%)	Lo âu nghiêm trọng n (%)	Tổng n (%)
228 (66,9)	94 (27,6)	9 (2,6)	10 (2,9)	113 (33,1)
Không trầm cảm n (%)	**Biểu hiện trầm cảm**			
	Trầm cảm nhẹ n (%)	Trầm cảm vừa phải n (%)	Trầm cảm nặng, rất nặng n (%)	Tổng n (%)

262 (76,8)	58 (17,0)	13 (3,8)	8 (2,4)	79 (23,2)

Bảng 2 cho thấy, nhân viên y tế tham gia vào nghiên cứu không gặp phải tình trạng rối loạn lo âu chiếm tỷ lệ 66,9% cao hơn gấp 2 lần đối tượng gặp phải tình trạng này (33,1%), trong đó tỷ lệ "lo lắng nhẹ" là cao nhất (27,6%) và thấp nhất là "lo lắng nghiêm trọng" (2,9%). Nhân viên y tế tham gia vào nghiên cứu không bị trầm cảm chiếm phần lớn tỷ lệ (76,8%) cao hơn gấp 3,3 lần so với đối tượng bị trầm cảm (23,2%). So với nghiên cứu của Jianbo Lai tỷ lệ này thấp hơn khoảng 2,17 lần (15)

Bảng 3. Mức độ biểu hiện rối loạn lo âu, trầm cảm theo khoa làm việc của đối tượng

Đặc điểm	**Biểu hiện lo âu**				**Biểu hiện trầm cảm**			
	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p
Khoa làm việc								
Cấp cứu	5 (12,5)	20 (87,5)	1	-	8 (20,0)	32 (80,0)	1	-
Truyền nhiễm	16 (41,0)	23 (59,0)	4,96 (1,4-17,2)	**0,01**	10 (25,6)	29 (74,4)	5,9 (1,53-22,9)	**0,01**
Khoa nội	22 (50,0)	22 (50,0)	1,4 (0,3-1,7)	0,4	7 (15,9)	30 (84,1)	0,89 (0,35-2,3)	0,7
Khoa ngoại	6 (16,2)	31 (83,8)	4,22 (1,34-13,3)	**0,01**	17 (45,9)	27 (54,1)	3,28 (1,05-10,2)	**0,04**
Các chuyên khoa lẻ	64 (35,4)	117 (64,6)	1,3 (0,6-2,7)	0,5	37 (20,4)	144 (79,6)	2,53 (1,15-5,6)	**0,02**

Kết quả chỉ ra rằng, những đối tượng làm việc tại khoa truyền nhiễm có nguy cơ mắc rối loạn lo âu và trầm cảm lần lượt cao hơn gấp 4,96 lần và 5,9 lần so với những đối tượng làm việc tại khoa cấp cứu [OR = 4,96 (95% CI: 1,4 – 17,2), OR = 5,9)95% CI: 1,53 – 22,9), tương ứng]. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Tung Ping Su và cộng sự năm 2003 khi chỉ ra các y tá ở đơn vị điều trị SARS mắc trầm cảm lớn hơn so với các y tá đơn vị không điều trị SARS (13).

Bảng 4. Mối liên quan giữa biểu hiện lo âu, trầm cảm với các nguy cơ rủi ro

Đặc điểm	**Biểu hiện lo âu**				**Biểu hiện trầm cảm**			
	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p
Tình trạng thiếu nhân lực								
Không	31 (18,6)	136 (81,4)	1	-	17 (10,2)	150 (89,8)	1	-
Có	82 (47,1)	92 (52,9)	3,2 (1,72-5,89)	< **0,001**	62 (35,6)	112 (64,4)	2,61 (1,26-5,38)	**0,009**
Gặp tình trạng thiếu vật tư, trang thiết bị y tế								

Không	62 (27,7)	162 (72,3)	1	-	33 (14,7)	191 (85,3)	1	-
Có	51 (43,6)	66 (56,4)	1,1 (0,63-1,89)	0,7	46 (39,3)	71 (60,7)	2,2 (1,23-4,04)	**0,008**

Kết quả cho thấy, đối tượng gặp phải tình trạng thiếu nhân lực có nguy cơ mắc rối loạn lo âu cao hơn gấp 3,2 lần và nguy cơ mắc trầm cảm cao hơn gấp 2,61 lần so với những đối tượng không gặp phải tình trạng này [OR = 3,2 (95% CI: 1,72 – 5,89), OR = 2,61 (95% CI: 1,26 – 5,38), tương ứng]. Bên cạnh đó, kết quả còn chỉ ra rằng nhóm đối tượng gặp phải tình trạng thiếu vật tư, trang thiết bị y tế có nguy cơ mắc trầm cảm cao hơn gấp 2,2 lần so với nhóm không gặp phải tình trạng này (OR = 2,2, 95% CI: 1,23 – 4,04).

Bảng 5. Mối liên quan giữa biểu hiện lo âu, trầm cảm và sự kì thị của cộng đồng

Đặc điểm	**Biểu hiện lo âu**				**Biểu hiện trầm cảm**			
	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p	Có n (%)	Không n (%)	OR (95% CI)	p
Bị xúc phạm bằng lời nói								
Một lần	16 (50,0)	16 (50,0)	1,96 (0,7 - 5,1)	0,2	16 (50,0)	16 (50,0)	2,4 (0,85-6,7)	0,09
Nhiều lần	39 (48,8)	41 (51,2)	1,9 (0,96-3,8)	0,06	29 (36,2)	51 (63,8)	2,1 (0,96-4,6)	0,06
Thường xuyên	2 (66,7)	1 (33,3)	4,5 (0,3-74,8)	0,3	2 (66,7)	1 (33,3)	24,4 (1,5-397,8)	**0,02**
Gia đình bị chịu ảnh hưởng từ công việc nhân viên y tế								
Một lần	15 (60,0)	10 (40,0)	3,4 (1,2-9,6)	**0,02**	13 (52,0)	12 (48,0)	3,01 (1,03-8,77)	**0,04**
Nhiều lần	22 (75,9)	7 (24,1)	4,7 (1,5-14,7)	**0,007**	15 (51,7)	14 (48,3)	1,77 (0,6-5,5)	0,3
Thường xuyên	2 (50,0)	2 (50,0)	1,3 (0,9-18,1)	0,85	1 (25,0)	3 (75,0)	0,42 (0,01-12,7)	0,6
Cảm thấy vị trí nhân viên y tế mang lại nhiều trục trặc								
Một lần	16 (69,6)	7 (30,4)	7,8 (2,6-23,4)	**<0,001**	14 (69,0)	9 (39,1)	8 (2,2-23,4)	**<0,001**
Nhiều lần	30 (56,6)	23 (43,4)	1,8 (0,8-4,2)	0,1	25 (47,2)	28 (52,8)	2,5 (1,03-6,05)	**0,04**
Thường xuyên	4 (100)	0 (0,0)	-	-	1 (25,0)	3 (75,0)	0,09 (0,05-2,08)	0,1

Kết quả cho thấy rằng, nhóm đối tượng thường xuyên bị xúc phạm bằng lời nói của cộng đồng có nguy cơ mắc trầm cảm cao hơn gấp 24,4 lần so với nhóm không gặp phải tình trạng này (OR = 24,4, 95% CI: 1,5 – 397,8). Trong quá khứ khi đại dịch SARS diễn ra nỗi lo lắng của của nhân viên chăm sóc sức khỏe bị ảnh hưởng nhiều hơn bởi sự kỳ thị ngày càng tăng và sự mất lòng tin của chính cộng đồng của họ (14). Bên cạnh đó, những đối tượng thường xuyên "không được tham gia các hoạt động của gia đình" có nguy cơ mắc rối loạn lo âu cao và trầm cảm lần lượt cao hơn gấp 7,99 lần và 14 lần so với nhóm đối tượng không gặp phải tình trạng này [OR = 7,99 (95% CI: 2,2 – 28,8), OR = 14 (95% CI: 3,8 – 52,1), tương ứng).

KẾT LUẬN – KHUYẾN NGHỊ

Kết luận

Một bộ phận nhân viên y tế ở một số bệnh viện tại Việt Nam đã phải chịu áp lực tâm lý trong đợt bùng phát dịch COVID-19 năm 2020. Cụ thể trong đó có 1/3 đối tượng tham gia nghiên cứu đã gặp phải tình trạng rối loạn lo âu (33,1%) và có 23,2% NVYT lâm sàng gặp phải tình trạng trầm cảm từ nhẹ đến rất nặng.

Khuyến nghị

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phần lớn NVYT có các triệu chứng nhẹ cho cả trầm cảm và lo lắng, trong khi các triệu chứng vừa và nặng ít phổ biến hơn ở những người tham gia. Điều này nhấn mạnh sự cần thiết và tầm quan trọng của việc phát hiện sớm và điều trị hiệu quả các triệu chứng tâm lý lâm sàng nhẹ hơn hoặc các hội chứng dưới ngưỡng trước khi chúng phát triển thành các phản ứng tâm lý phức tạp và lâu dài hơn. Bên cạnh đó, bệnh viện cần tổ chức buổi hướng dẫn, trang bị kĩ năng ứng phó với áp lực tâm lý cho NVYT trong mọi hoàn cảnh nói chung và trong các mùa đại dịch nói riêng, đặc biệt đối với các khoa có nguy cơ dễ bị lây nhiễm. Ngoài ra, bệnh viện cần trang bị đủ các trang thiết bị, vật tư y tế để NVYT sẵn sàng đáp ứng được trước nhu cầu về dịch vụ y tế gia tăng. Cùng với đó là ban hành các giải pháp truyền thông làm thay đổi cách nhìn nhận của cộng đồng và giúp hạn chế sự kì thị đối với các NVYT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ministry of Health Vietnam. [HOME] Update daily. Ministry of Health, Vietnam. 2020.

Penghui Yang X %J CW và molecular immunology. COVID-19: a new challenge for human beings. 2020;17(5):555–7.

Sim MR. The COVID-19 pandemic: Major risks to healthcare and other workers on the front line [Internet]. Vol. 77, Occupational and Environmental Medicine. BMJ Publishing Group; 2020 [cited 2020 Aug 4]. p. 281–2. Available from: https://oem.bmj.com/content/77/5/281.

Lijun Kang và các cộng sự. Impact on mental health and perceptions of psychological care among medical and nursing staff in Wuhan during the 2019 novel coronavirus disease outbreak: A cross-sectional study. 2020.

Goyal K, Chauhan P, Chhikara K, Gupta P, Singh MP. Fear of COVID 2019: First suicidal case in India ! [Internet]. Vol. 49, Asian Journal of Psychiatry. Elsevier B.V.; 2020 [cited 2020 Aug 4]. p. 101989. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7130010/

Dwight L Evans và các cộng sự. Treating and preventing adolescent mental health disorders: What we know and what we don't know. Oxford University Press. 2005.

Edith Lahner và các cộng sự. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in health workers (HWs) and diagnostic test performance: the experience of a teaching hospital in central italy. 2020;17(12):4417.

Yingjian Liang và các cộng sự. Screening for Chinese medical staff mental health by SDS and SAS during the outbreak of COVID-19. 2020;133:110102.

Hans Selye. The stress of life. 1956.

Alice %J Los Angeles Times Los Angeles Los Angeles Times Feb Su. Doctors and Nurses fighting Coronavirus in China die of both infection and fatigue. (25).

Tung-Ping Su và các cộng sự. Tung-Ping Su và các cộng sự. (2007), "Prevalence of psychiatric morbidity and psychological adaptation of the nurses in a structured SARS caring unit during outbreak: a prospective and periodic assessment study

Thi Thu Thuy Tran và các cộng sự. Stress, anxiety and depression in clinical nurses in Vietnam: a cross-sectional survey and cluster analysis. 2019;13(1):3.

Lahner E, Dilaghi E, Prestigiacomo C, Alessio G, Marcellini L, Simmaco M, et al.

Prevalence of Sars-Cov-2 infection in health workers (HWs) and diagnostic test performance: the experience of a teaching hospital in central Italy. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2020 Jun 2 [cited 2020 Aug 4];17(12):1–12. Available from: /pmc/articles/PMC7345358/?report=abstract

Chen Q, Liang M, Li Y, Guo J, Fei D, Wang L, et al. Mental health care for medical staff in China during the COVID-19 outbreak [Internet]. Vol. 7, The Lancet Psychiatry. Elsevier Ltd; 2020 [cited 2020 Aug 4]. p. e15–6. Available from: http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqfkdt/202002/16

Lai J, Ma S, Wang Y, Cai Z, Hu J, Wei N, et al. Factors Associated With Mental Health Outcomes Among Health Care Workers Exposed to Coronavirus Disease 2019. JAMA Netw open [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2020 Aug 4];3(3):e203976. Available from: https://jamanetwork.com/

DO SECONDARY PLANT METABOLITE REALLY WORK?: A REVIEW

Nguyen Thuong Thuong
Vietnam National University of Agriculture
Corresponding author: thuongthuong@vnua.edu.vn

ABSTRACT

The plant secondary metabolites are bioactive materials with antimicrobial, antiparasitic, insecticidal, sedative, and anticonvulsant effects which have been using in both human and veterinary medicine for a long time. The plant secondary metabolites (essential oils – EOs) are basically plant extracts. They're made by steaming or pressing various parts of a plant (flowers, bark, leaves or fruit) to capture the compounds that produce fragrance. In addition to creating scent, essential oils perform other functions in plants, too. This paper summarized and analysed the insights and findings from previous studies on the effects of EOs on animal health.

Keywords: *plant secondary metabolites, essential oils, animal health*

CHẤT CHUYỂN HÓA THỨ CẤP CỦA THỰC VẬT CÓ THỰC SỰ CÓ ÍCH?: TỔNG QUAN

Nguyễn Thương Thương
Học viện Nông nghiệp Việt Nam
Tác giả liên lạc: thuongthuong@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Các chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật là các chất có hoạt tính sinh học có tác dụng kháng khuẩn, chống ký sinh trùng, diệt côn trùng, an thần và chống co giật đã được sử dụng trong y học cả người và thú y từ lâu. Các chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật (tinh dầu - EOs) về cơ bản là các chất chiết xuất từ thực vật. Chúng được tạo ra bằng cách hấp hoặc ép các bộ phận khác nhau của cây (hoa, vỏ, lá hoặc quả) để thu nhận các hợp chất tạo ra hương thơm. Ngoài việc tạo ra mùi hương, tinh dầu còn thực hiện các chức năng khác của thực vật. Bài báo này tóm tắt và phân tích những hiểu biết và phát hiện từ các nghiên cứu trước đây về tác động của EOs đối với sức khỏe động vật.

Từ khóa: *chất chuyển hóa thứ cấp của thực vật, tinh dầu, sức khỏe động vật*

INTRODUCTION

Several products and technologies have been developed over the years to optimize livestock production and achieve the maximum profitability. Feed additives, including antibiotics, are used to manipulate the ruminal fermentation since the 1950s. However, antibiotics utilization has been questioned due to the risk of resistant bacteria strains leading to concerns on public health. The European Union, considering the precautionary principle, banned the antibiotics as animal growth promoters (Regulation 1831/2003/EC). Therefore, alternative natural compounds have been developed to partly replace antibiotics. Among the natural compounds, essential oils may be highlighted as potential rumen modulators.

Essential oils are complex mixtures of volatile lipophilic secondary metabolites, obtained from volatile fractions of plants by steam distillation process (Gershenzon and Croteau, 1991). It is produced by plants to defend against predators, parasites, environmental stress, and diseases. The word ‘essential’ is used to indicate the occurrence of the oils in essences and not to imply that they are required by animals. Plant extracts or essential oils have distinct odors and are used mainly in the production of perfumes, flavors and pharmaceuticals. EOs (essential oils) are not only appealing to humans but also to animals. Applications of EOs are as feed additives and for treating diseases in pets and farm

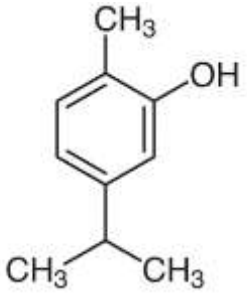
animals. Collectively, EOs have a large number of beneficial properties on health through their well-known antioxidant and free radical scavenging activities.

These are some of outstanding EOs which is easily found around us, such as thyme, orange peel, pepper and cinnamon.

CARVACROL

Carvacrols (2-Methyl-5-(propan-2-yl) phenol) are members of the methane family in which the cyclohexane structure has been oxidized to an aromatic (phenolic) ring. Oils containing these phenolic terpenes have been shown to be particularly effective as antibacterial agents (Kalemba and Kunicka, 2003).

Carvacrol are the major monoterpene phenols, are found in high concentration in the essential oil of thyme, Thymus spp., and oregano, Origanumvulgare (Lamiaceae).



Carvacrol

Mart´ ınez et al. (2006) observed that the concentration of carvacrol in thyme EO varied widely depending on the species of the thyme plant: in Thymus hyemalis Lange essential oil is 24.3%, but that content in Thymus zygissubsp. Gracilisis is only 3.13%.

Carvacrol has beneficial effects on some functions in the body, those are indicated below.

Firstly, carvacrol affects digestive function in the body. In early-weaned pigs, the incorporation of carvacrol, cinnamaldehyde and capsicum oleoresin promoted changes in digestive function and microbial ecology (Manzanilla et al., 2004), while herbal extract containing cinnamon, thyme, and oregano (Origanumvulgare L.) extract reduced the proliferation of coliform bacteria (Namkung et al., 2004). In addition, essential oil from oregano, cinnamon, pepper, sage (Salvia officinalis L.), thyme, and rosemary has been shown to improve apparent whole-tract and ileal digestibility in chickens (Hernández et al., 2004).

Thyme contains thymol and carvacrol, which are also considered to possess strong antioxidant activity. Some recent evidence does not entirely support this effect in rabbits, however. The oxidative stability of raw rabbit loins supplemented with 3% thyme leaves was confirmed during nine days of retail display (Dal Bosco et al., 2014). This effect was not seen in raw or cooked hind-leg meat (Dalle Zotte et al., 2014a).

In addition, carvacrol is known for their strong and broad antimicrobial activity due to the presence of a hydroxyl group in their structure (Calsamiglia et al., 2007; Benchaar and Greathead, 2011) which further affects the pH homeostasis and equilibrium of inorganic ions (Helander et al., 1998; Lambert et al., 2001). Several studies showed that carvacrol and thymol manifest their antimicrobial effects on Gram-negative bacteria by disintegrating their outer membrane, releasing lipopolysaccharides and increasing the permeability of the cytoplasmic membrane to ATP, and for Gram-positive bacteria,

carvacrol and thymol are able to inhibit bacterial growth by disrupting their cell membrane (Lambert et al., 2001). Besides, carvacrol can change fatty acid composition of bacterial cell membrane (Lambert et al., 2001; Benchaar and Greathead, 2011). For those reasons, the volatile oils of black pepper, clove, geranium, nutmeg, oregano, and thyme (all of which contain carvacrol) are effective against Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Salmonella pullorum, Staphylococcus aureus, and Yersinia enterocolitica, with the essential oil of thyme being the strongest inhibitor (Dorman and Deans, 2000). Carvacrol also acts as a transmembrane carrier of monovalent cations by exchanging its hydroxyl proton (from the phenolic group) for a cation such as K+, thereby reducing ATP synthesis and causing cell death (Busquet et al., 2006; Ultee et al., 2002).

Furthermore, carvacrols have been shown to affect ruminal nitrogen metabolism in a dosedependent manner. For instance, Busquet et al. (2006) demonstrated that oregano oil and its main components - carvacrol markedly inhibited NH3-N concentration at high concentrations (i.e., 3000 mg/l), but effects were marginal at moderate doses (i.e., 300 mg/l) and nonexistent at low doses (i.e., 3 mg/l). The decreased ruminal NH3-N concentration was, however, associated with a reduction in total volatile fatty acid (VFA) concentration, suggesting a reduction in overall fermentation of the diet. Because VFA are the principal source of energy for ruminants, decreasing ruminal VFA production could have adverse nutritional consequences if this effect was expressed in vivo.

Numerous in vitro studies have demonstrated the efficacy of EO in inhibiting methane production and modulating rumen fermentations. The most consistent results on methane production were observed using EO from thyme, oregano, cinnamon, and garlic or their principal components (thymol, carvacrol, cinnamaldehyde, and allicin, 6 respectively). For example, Macheboeuf et al. (2008) recorded 98% reduction of methane production by 5 mM oregano EO or cinnamon EO but only 12% inhibition by dill EO at the same dose. Moreover, they found that carvacrol and transcinnamaldehyde at 5 mM demonstrated a lower, although slightly, mitigation efficiency compared with oregano EO and cinnamon EO. However, some results suggested that the anti-methanogenic activity of some EO or their compounds is non-specific and reduction in methane production was accompanied by decrease in feed digestion and fermentation.

D-LIMONENE

D-limonene (1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexene), a monoterpene, is the main constituent of the EO of sweet orange peel oil extracted from citrus peel (Citrus sinensis, Rutaceae) as well as of other citrus fruit peel oils.



d-Limonene

Previous studies conducted by dual flow continuous culture system indicated that supplementation of 1.5 (Castillejos et al., 2005) and 5 mg/l of essential oils blend (EOB) containing limonene (Castillejos et al., 2007) increased the concentration of total SCFA 7 without affecting other fermentation parameters. On the contrary, Newbold et al. (2004)

and Beauchemin and McGinn (2006) reported that EOB had no effect on SCFA concentration when sheep were fed 110 mg/day or cattle fed 1.0 g/day.

Meanwhile, supplementation of 0.5 ml EOB/head/day increased neutral detergent fiber (NDF) digestion compared to 1.0 ml EOB/head/day and control group (Mariam et al., 2014).

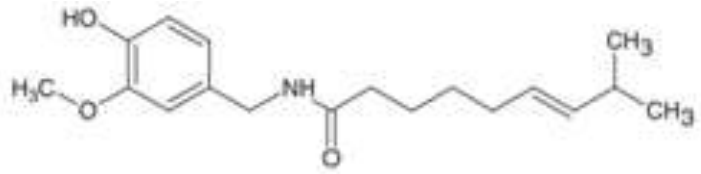
On the other hand, most of the conducted studies on EOB containing limonene, and thymol, eugenol, vanillin, noticed that EOB inhibited protein degradation (Molero et al., 2004; Newbold et al., 2004). 0.5 ml EOB/head/day decreased crude protein (CP) digestion in sheep without positive impacts on other nutrients utilization and ruminal fermentation patterns, which may be related to the additive effects of the combination of EO and inadequate dose supplementation in the sheep diets. The truly degraded organic and dry matter also slightly decreased at 1.0 ml EOB/head/day tested (Mariam et al., 2014).

Furthermore, citrus fruits are a very interesting source for the occurrence of antioxidants. The EO of Citrus sinesisOsbeck var. Sanguinea Tanaka form a Tarocco (Tarocco orange) which contains as major component limonene (84.5%) shows a very high antioxidative activity of about more than 90%. Also all the citrus EOs show an antioxidative activity against linoleic acid peroxidation (Song et al., 2001).

CAPSAICIN

Capsaicin, a phenolic amide, is the pungent principle derived from fruits of cayenne pepper—Capsicum annum, C. frutescens (Solanaceae). Capsaicin is one among five natural capsaicinoids (the others are nordihydrocapsaicin, dihydrocapsaicin, vanillyl decanamide and homodihydrocapsaicin). However, capsaicin is the most pungent that can be isolated. It is sparingly soluble in water but very soluble in fats, oils and alcohol.

Capsaicin's composition ($C_{18}H_{27}NO_3$) is similar to piperine ($C_{17}H_{19}NO_3$), which gives black pepper its bite.



Capsaicin

According to the study of Alford et al in lamp (2016), total VFA concentrations were lowest for unprotected capsaicin (DCAP), intermediate for ruminally-protected capsaicin (RPCAP), and greatest for no capsaicin diet (CON). Acetate proportions (mol/100 mol) tended to be lower for DCAP than CON and RPCAP.

Fecal excretions of DM, OM, NDF, and ADF were lower; in other words, DM, OM, NDF, and ADF digestibility (% of intake) were greater for lambs fed DCAP than CON and RPCAP. Greater differences in rumen VFA concentrations between DCAP and CON than RPCAP and CON suggest that shifts in microbial fermentation were greater when capsaicin was not ruminally-protected in a prill.

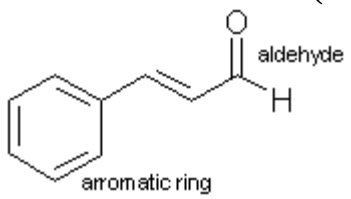
Capsaicins are known to exert beneficial actions within the digestive tract as well. Manzanilla et al. (2004) fed a combination of essential oils and capsaicin to swine and observed that gastric emptying was slowed down by these feed additives.

Finally, addition of capsicum oil (1 g/day of capsicum extract containing 15% capsaicin) to a concentrate based diet of beef cattle stimulated intake and fermentation (Cardozo et al., 2006).

CINAMALDEHYDE

Cinnamon yields mainly leaf and bark oils, which are used in perfumery and flavouring. The major component of leaf oil is eugenol, while that of bark oil is cinnamaldehyde (3-fenil-2-propenalphenol), a non-phenolicphenylpropene.

The bark oil content in cassia ranged from 1.2 to 4.9%. The principal component in the oil, cinnamaldehyde, varied between 61.5 and 91% (Krishnamoorthy et al., 1999).



Cinnamaldehyde

Cinnamaldehyde has effect on the components of VFA profile. However, Cardozo et al. (2005) showed in vitro that effects are pH-dependent. For instance, at pH 7.0, cinnamon EO and its main component cinnamaldehyde resulted in higher acetate to propionate ratio whereas, at pH 5.5, the acetate to propionate ratio was lower with cinnamon EO and cinnamaldehyde.

Cinnamon bark extract and this derives both from its proanthocyanidin tannins and most notably from trans-cinnamaldehyde has potent activity against Ascaris suum in vitro, an important nematode parasite of swine that also serves as a model for the closely related human parasite A. lumbricoides. Subsequent observation of the larvae during incubation in the cinnamon extract revealed that at concentrations ≥250μg/mL, all larvae died within hours of incubation (Andrew et al, 2015).

Cinnamaldehyde possessed strong antibacterial activity against nine strains of bacteria, including E. coli, P. aeruginosa, E. faecalis, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, methicillin-resistant S. aureus (MRSA), Klebsiella pneumoniae, Salmonella sp. and Vibrio parahaemolyticus. Both Gram positive and Gram negative bacteria have been reported to be sensitive to cinnamon oil and cinnamaldehyde (Ouattara et al., 1997; Helander et al., 1998; Smith-Palmer et al., 1998). Cinnamaldehyde has been shown to exhibit antimicrobial activity similar to that of the phenolics thymol and carvacrol (Helander et al., 1998). However, unlike thymol and carvacrol, it does not have a hydroxyl or acid group to act as a proton carrier to disrupt the outer membrane or deplete the intracellular ATP pool (Helander et al., 1998). Alternatively, the antimicrobial properties of cinnamaldehyde are thought to arise through its carbonyl group binding and inactivating microbial enzymes (Burt, 2004).

On the other hand, cinnamaldehyde affect negatively in feed intake. An EO mixture of cinnamaldehyde (180 mg/d) and eugenol (90 mg/d) in beef cattle, and high doses of cinnamaldehyde (500 mg/day) in dairy cattle (Busquet et al., 2003; cited by Calsamiglia et al., 2007) adversely affected feed intake. This reduction of intake might be related to palatability problems, suggesting that the product needs to be encapsulated to overcome this problem (Calsamiglia et al., 2007).

CONCLUSION

Although people say essential oils can make a positive impact on animal's health and well-being as long as we use them in a safe way, there's not enough research to determine their effectiveness in animal's health. Therefore, it is recommended to conduct further studies to obtain the deep understanding about essential oils.

REFERENCES

Beauchemin, K.A., McGinn, S.M. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. J. Anim. Sci. 84, 1489–1496.

Benchaar, C., Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 166, 338–355.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microb. 94, 223–253.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 89, 761–771.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90, 2580–2595.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. Anim. Feed Sci. Technol. 119, 29–41.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Losa, R. and Ferret, A. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 132, 186-201.

Dal Bosco, A., Gerencsér, Zs., Szendrő, Zs., Mugnai, C., Cullere, M., Kovàcs, M., Ruggeri, S., Mattioli, S., Castellini, C., Dalle Zotte, A. 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, 114–119.

Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. 88, 308–316.

Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46, 3590–3595.

Hernández, P., Aliaga, S., Pla, M., Blasco, A. 2004. The effect of selection for growth rate and slaughter age on carcass composition and meat quality traits in rabbits. J. Anim. Sci. 82, 3138–3143.

Kalemba, D., Kunicka, A. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, Vol. 10 Issue 10, 813.

Krishnamoorthy, B., Zachariah, T.J., Rema, J. and Mathew, P.A. 1999. Evaluation of selected Chinese cassia (Cinnamomum cassia Blume) accessions for chemical quality. Journal of Spices and Aromatic Crops 8(2), 193–195.

Lambert, R., Skandamis, P.N., Coote, P.J., Nychas, G.J. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91, 453–462.

Macheboeuf, D., Morgavi, D.P., Papon, Y., Mousset, J.L., Arturo-Schaan, M. 2008. Dose–response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 335–350.

Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J. 2004. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. J Anim Sci.; 82:3210–3218.

Mariam G. Ahmed, Samir Z. El-Zarkouny, Khaled A. El-Shazly & Sobhy M. A. Sallam. 2014. Impact of Essential Oils Blend on Methane Emission, Rumen Fermentation

Characteristics and Nutrient Digestibility in Barki Sheep. Journal of Agricultural Science; Vol. 6, No. 7, 144-156.

Molero R., Ibars A., Calsamiglia S., Ferret A. and Losa R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in 34 heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. Anim. Feed Sci. Technol., 114, 91-104.

Newbold, C.J., McIntosh, F.M.,Williams, P., Losa, R.,Wallace, R.J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 114, 105–112.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Lett. Appl. Microbiol. 26, 118–122.

Song, H.S., H. Ukeda and M. Sawamura. 2001. Antioxidative activities of citrus peel essential oils and their components against linoleic acid oxidation. Food Sci. Technol. Res., 7: 50-.56.

Ultee, A., Bennik, M. H. & Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl Environ Microbiol 68, 1561–1568.

GIẢM BIỂU HIỆN CỦA GEN *DHRS1* DỰ ĐOÁN KHẢ NĂNG SỐNG SÓT THẤP Ở BỆNH NHÂN UNG THƯ TẾ BÀO BIỂU MÔ GAN

Nguyễn Minh Nam*, Nguyễn Đình Trường*, Lê Tâm Vy

Trường Đại học Tân Tạo

*Tác giả liên lạc: nmnam@medvnu.edu.vn, truong.nguyen@ttu.edu.vn

TÓM TẮT

Ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) vẫn là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong liên quan đến ung thư trên toàn thế giới với các giai đoạn vô cùng phức tạp và hầu như không có triệu chứng biểu hiện lâm sàng rõ ràng. Gần đây, các phương pháp chẩn đoán đa dạng đã được nghiên cứu và phát triển nhưng hầu hết khó áp dụng trong tiên lượng ung thư biểu mô tế bào gan ở giai đoạn đầu, vì vậy nghiên cứu này nhằm khảo sát sự biểu hiện của dehydrogenase / reductase 1 (DHRS1) trong ung thư biểu mô tế bào gan, cũng như mối tương quan của nó với bệnh lý lâm sàng, nguy cơ tái phát và sự sống sót của bệnh nhân sau khi cắt bỏ có thể hỗ trợ các kết quả lâm sàng và tiên lượng. Sự điều hòa giảm của DHRS1 trong ung thư biểu mô tế bào gan liên quan đến sự phát triển của khối u và dự đoán kết quả lâm sàng kém. DHRS1 sẽ được coi là một chỉ số tiềm năng giúp cải thiện hiệu quả của các phương pháp chẩn đoán và tiên lượng hiện tại trong HCC.

Từ khóa: Dấu ấn sinh học, chẩn đoán, DHRS1, dhrs1, ung thư biểu mô tế bào gan, HCC, ung thư gan, tiên lượng

DOWN-REGULATION OF *DHRS1* PREDICTS POOR SURVIVAL OUTCOME OF PATIENTS ASSOCIATED WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Nguyen Minh Nam*, Nguyen Dinh Truong*, Le Tam Vy

Tan Tao University

*Corresponding authors: nmnam@medvnu.edu.vn and truong.nguyen@ttu.edu.vn

ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) remains a leading cause of cancer-related deaths worldwide with extremely complicated stages and almost no obvious symptoms for clinical manifestations. Recently, diverse diagnostic methods have been studied and developed but mostly difficult to be applied in HCC prognosis at the early stage, so this study aimed to investigate the expression of dehydrogenase/reductase 1 (DHRS1) in HCC, as well as its correlation with the clinic-pathology, recurrence risk, and patient survival after resection which could support the clinical outcomes and prognosis. We have identified DHRS1 as a novel tumor-suppressor gene. Down-regulation of DHRS1 in HCC associates with tumor development and anticipates poor clinical outcomes. DHRS1 would be considered as a potential indicator which improves the effectiveness of the current diagnosis and prognosis methods in HCC.

***Keywords*:** Biomarker, diagnosis, DHRS1, dhrs1, hepatocellular carcinoma, HCC, liver cancer, prognostic

Introduction

Hepatocellular carcinoma (HCC), liver cancer, is one of the leading causes of increasing cancer-related deaths worldwide (Siegel, Miller, & Jemal, 2019), especially in Asia and Africa (Rawla, Sunkara, Muralidharan, & Raj, 2018). In addition, most patients are symptomatic and display some degree of hepatic impairment in the advanced stages, while there are no symptoms at the early stages. At these, there are virtually no appealing treatments that would enhance overall survival (Crocetti, Bargellini, & Cioni, 2017). In addition, HCC is heterogeneous throughout the world, which makes it difficult to track the histological information of the patient and organize them into the correct group. Only 20% of patients can be treated with the transplant method (Pons, Varela, & Llovet, 2005); however, it is expensive and takes time to find compatible donors. Thus, there should be a novel way to diagnose and prognosis HCC in the early stages.

Materials and methods

Patients and gene expression profiles

Gene expression profiles and clinical information of patients with hepatic carcinoma were downloaded from National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) and TCGA (https://www.cbioportal.org/). The data must have the follow-up information of the patients (such as survival status, staging status, recurrence time, disease free survival, tumor types, etc.).

DHRS1 selection and its correlation clinical information

There were 647 patients who were selected to observe the mRNA levels of *DHRS1* between normal and tumor tissues from GSE14520, GSE121248, and GSE17856 sets of data. Besides, 221 patients in GSE14520, and 361 patients in TCGA with all required clinical information were used to analyzed for other clinical information. The Kaplan-Meier curve was used to analyze survival. Chi-square and log-rank tests were used to assess survival risk, recurrence time, and disease-free time (Shahid et al., 2016).

Statistical methods

The raw data was processed for normalization using z-score transformation methods. The Kaplan-Meier curves, a two-sample t-test, Chi-squared tests and log-rank tests were performed using R language environment (www.r-project.org) to evaluate the prognostic value of *DHRS1*. In all statistical analyzes, a *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

Results

DHRS1 expression level is down regulated in tumor samples

To investigate whether there is any differential expression of *DHRS1* between normal and tumor tissue. At first, *DHRS1* mRNA expression level of 647 samples from GSE14520, GSE17856, and GSE121248 datasets were used for the analysis. In the tumor group, the mRNA expression level of *DHRS1* was dramatically higher than in the normal group (Fig. 1A, 1B, 1C). These results indicate that both mRNA and protein expression levels of *DHRS1* decreased in tumor tissues compared to the associated non-tumor tissue of patients with hepatocellular carcinoma and liver of the healthy donor, as well.

A B C

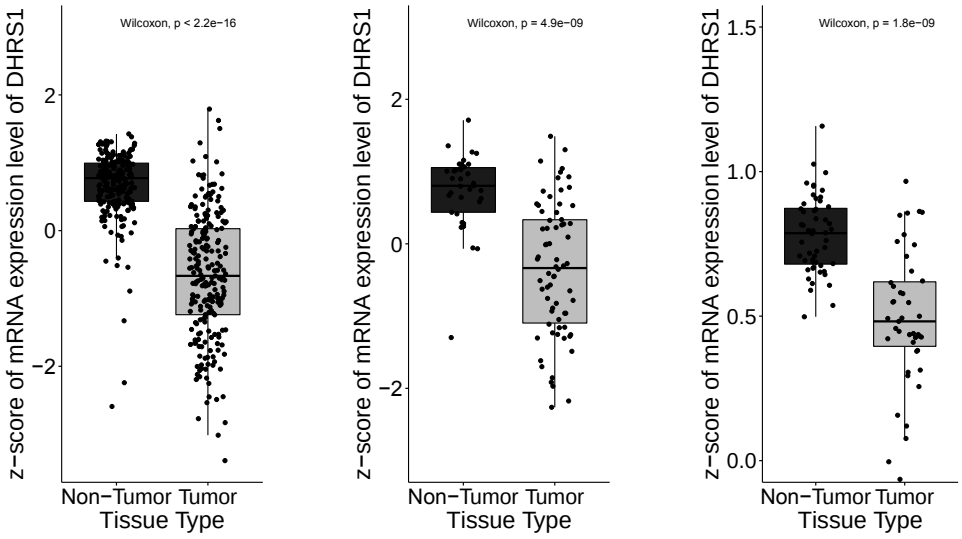


Figure 1: *DHRS1* level was downregulated in tumors and correlated to the poor survival outcome in HCC. Box plots of the mRNA expression levels of *DHRS1* in normal and liver tumor tissues in GSE14520 (A), GSE121248 (B), and GSE17856 (C). IHC staining of *DHRS1* proteins in three normal tissues and three hepatocellular carcinoma samples (D).

High expression of DHRS1 associated with longer survival time, recurrence time, and disease-free time

To investigate whether the expression of *DHRS1* showed any differences on survival outcomes. HCC patients were classified into two groups based on median value of mRNA expression levels of *DHRS1*. High expression of *DHRS1* was associated with better survival outcomes in both datasets GSE14520 (p = 1.29e-06, Fig. 2A) and TCGA (p = 0.000225, Fig. 2C). Moreover, HCC patients with high expression of *DHRS1* had a longer recurrence time in GSE14520 (p = 0.000636, Fig. 2B) and a greater disease-free time in TCGA (p = 0.0038, Fig. 2D). Taken together, high expression of *DHRS1* not only associates with a good survival outcome but also gives a longer recurrence time and extends the length of disease-free survival time in HCC.

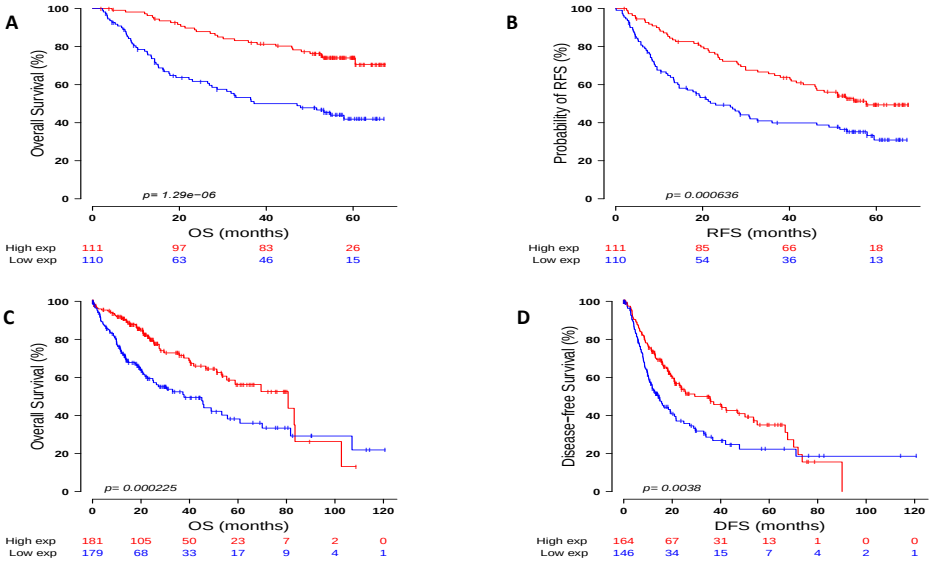
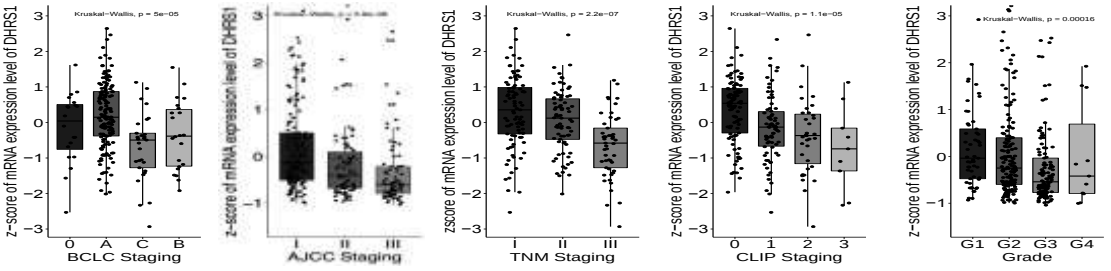


Figure 2*:* High expression of DHRS1 associated with longer survival times. Kaplan-Meier survival curves of *DHRS1* expression level from overall survival (A), and recurrence time (B) of patients in GSE14520; overall survival (C) and disease-free survival (D) of patients in TCGA. The red curves represented for the high *DHRS1* expression groups of HCC patients, and blue curves is for the low expression of *DHRS1*. The high *DHRS1* expression groups had a longer time of survival as well as the recurrence and disease-free time.

DHRS1 expression decreases in advanced stages

The gradual decline on *DHRS1* mRNA levels in advanced stages was observed. To go further in advanced stages in BCLC staging, the *DHRS1* expression generally decreases, unexpectedly stage 0 has not have the highest starting point of *DHRS1* expression, its highest expression is from stage A, continuously reduces in advanced stages, and slightly increase at the final stage (Fig. 3A). Besides, the expression of *DHRS1* in AJCC staging (Fig. 3B) and TNM staging (Fig. 3C) shows a

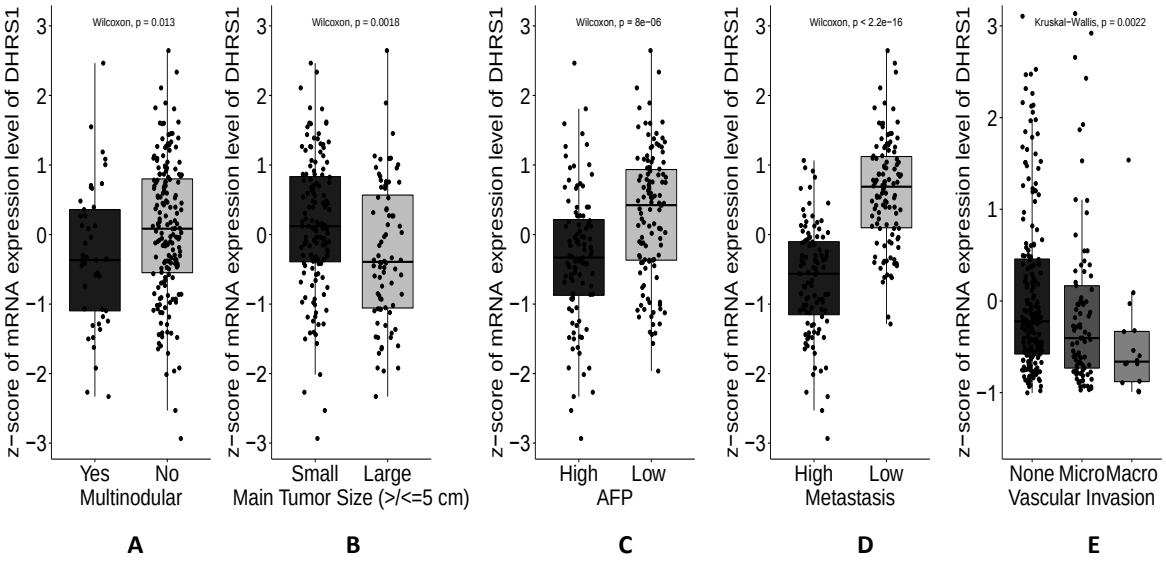


decreasing trend from stage I to stage III as well as the grade system (Fig. 3E). In CLIP staging system, it shows seamless reduction of *DHRS1* level from the early stage to stage 3 (Fig. 3D). Altogether, the *DHRS1* expression reveals dimensional reduction in advanced stages.

Figure 3: Association of the DHRS1 *expression with different stages*. Difference staging systems were used to analyze and confront with *DHRS1* expression. BCLC staging (A), AJCC staging (B), TNM staging (C), CLIP staging (D), and Grade (E) in GSE14520 and TCGA datasets.

Downregulation of DHRS1 associated with large tumor size, multinodular forming, high AFP level, high risk of metastasis, and macro vascular invasion

The *DHRS1* expression level of high and low group differs in the tumor size, multinodular characteristics, and AFP level. Firstly, the patients with large tumor had a lower expression level of *DHRS1* than the small-tumor patients (p = 0.0018, Fig. 4B). Secondly, patients who were diagnosed with a positive status of multinodular, display a low expression of *DHRS1* (p = 0.013, Fig. 4A). Thirdly, AFP concentration was higher in HCC patients who had low expression of *DHRS1* (p = 8e-06, Fig. 4C). The mRNA expression level of *DHRS1* also highly expressed in the high-risk group of metastases (Fig. 4D), and gradually decreased to the larger invasion of vascular (Fig. 4E). To conclude, the expression of *DHRS1* decreases significantly in the enlargement of tumor, the forming of



many nodular, and the preoperative serum AFP level is inversely proportional to the *DHRS1* expression.

Figure 4: *Correlation of the* DHRS1 *expression with other clinical information such as large tumor, multinodular forming, AFP level, the metastasis prediction, and vascular invasion status*. *DHRS1* expression level is high in patients who had multinodular (A), large tumor size (B), the low level of AFP (C). Besides, *DHRS1* expression also associated with the high risk of metastasis (D), and the vascular invasion (E) in the larger sizes.

The DHRS1 is an independent predictor of survival outcomes and recurrence time in HCC

Univariate and multivariate Cox regression analyses were used to compare the prognostic value of *DHRS1* expression to its covariates. The result showed that the expression level of *DHRS1* and the recurrence time were significantly correlated with the

overall survival either in univariate or in multivariate ($p < 0.001$, Table 2). Therefore, *DHRS1* expression and recurrence time showed stronger prognostic predictive ability than the other covariates. However, recurrence time took a longer time to figure out the prognostic result than the *DHRS1* expression level. Accordingly, this data considered *DHRS1* expression as a predictor for OS in HCC. It is generally self-reliant with tumor size, stages, AFP and tumor grade status.

Parameter		Univariate			Multivariate		
		HR	**95% CI**	***p*-value**	**HR**	**95% CI**	***p*-value**
Gender	F vs M	1.7	0.8 - 3.4	0.175	0.95	0.41 - 2.2	0.896
Age50	<50 vs >=50	0.86	0.56 -1.3	0.492	0.66	0.4 - 1.1	0.111
HBV	AVR-CC vs CC	0.75	0.47 - 1.2	0.222	0.87	0.5 - 1.5	0.624
	AVR-CC vs N	0.68	0.16 - 2.9	0.606	0.3	0.1 - 1.4	0.132
Main Tumor Size	Large vs Small	0.48	0.31 - 0.74	<0.001	0.81	0.42 - 1.6	0.523
Multinodular	No vs Yes	1.6	0.96 - 2.5	0.073	0.44	0.2 - 1.3	0.126
Cirrhosis	No vs Yes	4.8	1.2 - 19	0.029	3.77	0.9 - 16.4	0.077
AFP	High vs Low	0.6	0.39 - 0.93	0.021	2.59	0.9 - 6.7	0.052
ALT	High vs Low	0.92	0.6 - 1.4	0.714	1.73	1.0 - 3.0	0.045
TNM Staging	I vs II	2	1.2 - 3.5	0.012	1.15	0.6 - 2.1	0.653
	I vs III	4.9	2.8 - 8.7	<0.001	0.54	0.2 - 1.6	0.253
BCLC Staging	0 vs A	4.3	1.0 - 17	0.045	4.24	0.9 - 18.3	0.052
	0 vs B	8.9	2.0 - 40	0.004	5.14	0.8 - 33.2	0.086
	0 vs C	17.6	4.1 - 76	<0.001	16.11	2.7 - 97.6	0.002
CLIP Staging	0 vs 1	1.5	0.88 - 2.6	0.15	3.26	1.3 - 8.3	0.013
	0 vs 2	3.2	1.80 - 5.6	<0.001	9.59	2.4 - 38.3	0.001
	0 vs 3	4.4	1.75 - 10.4	<0.001	17.13	2.4 - 121.2	0.004
RFS	0 vs 1	106	15 - 764	<0.001	141.59	19 - 1056.6	<0.001
Exp	High vs Low	3	1.9 - 4.8	<0.001	2.83	1.6 - 4.9	<0.001

Table 2: Univariate and Multivariate hazard regression analyses of clinical variables in GSE14520. *DHRS1* expression showed stronger prognostic predictive ability than the other covariates. Based on multivariate results, overall survival (OS) and recurrence-free survival (RFS) were significant with *DHRS1* expression and this data considered *DHRS1* expression as predictor for overall survival time. It is generally self-reliance with age, tumor size, stages, AFP and tumor grade status.

DISCUSSION

This study suggests that the AFP level, and staging systems were significantly correlation to overall survival in univariate test; however, in the multivariate test, the factors were given the insignificant value (Table 2). In the intermediate level, AFP serum was difficult to diagnose patients into low and high risk group due to the fact that liver cancer complicatedly develops at this level (Nguyen, Garcia, Simpson, Wright, & Keeffe, 2002). Staging systems build a simply successful in diagnosis but not at all stages of HCC

(Pons et al., 2005). The BCLC staging and TNM staging had the same diagnostic figures following the *DHRS1* expression in both GSE14520, and TCGA. Whereas, the *DHRS1* expression level decreased gradually but slightly increased at the final stage, CLIP staging was slightly increased at stage 4 and continually decreased at the final stage. Therefore, *DHRS1* expression can be considered as a complementary factor which could combine and support for some of the diagnosis methods.

REFERENCES

Agrawal, P., Fontanals-Cirera, B., Sokolova, E., Jacob, S., Vaiana, C. A., Argibay, D., Darvishian, F. (2017). A systems biology approach identifies FUT8 as a driver of melanoma metastasis. *Cancer cell, 31*(6), 804-819. e807.

Berasain, C., Ujue Latasa, M., Urtasun, R., Goñi, S., Elizalde, M., Garcia-Irigoyen, O., Ávila, M. A. (2011). Epidermal growth factor receptor (EGFR) crosstalks in liver cancer. *Cancers, 3*(2), 2444-

HỖ TRỢ KHỞI NGHIỆP TRONG CÁC TRƯỜNG ĐẠI HỌC Ở VIỆT NAM: NHỮNG VẤN ĐỀ ĐẶT RA VÀ GIẢI PHÁP

Đặng Danh Hướng [1]*

[1]Trường THPT Hoàng Văn Thụ

Tác giả liên lạc: danhhuong01071988@gmail.com

TÓM TẮT

Trong thời đại công nghệ phát triển như hiện nay, các trường Đại học ở Việt Nam đều coi hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp là giải pháp hữu hiệu để khuyến khích phát triển các năng lực, kỹ năng của sinh viên. Do vậy, hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong các trường Đại học rất phong phú, đa dạng về loại hình và chất lượng. Bài viết nghiên cứu hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong trường Đại học ở Việt Nam. Từ đó, đề xuất một số giải pháp triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong trường Đại học trong thời gian tới.

Từ khóa: *Khởi nghiệp, Đại học, Việt Nam.*

STARTUP SUPPORTING AT UNIVERSITIES IN VIET NAM: PROBLEMS AND SOLUTIONS

Dang Danh Huong[1]*

[1]Hoang Van Thu high school

Corresponding author: danhhuong01071988@gmail.com

ABSTRACT

In the current era of technological advancement, Vietnamese universities have considered vocational training schemes and startup aids as effective solutions to encourage the development of competence and skills of their students. Thus, there are a variety of training models and startup aids in terms of forms and qualities. This article is going to research into some modes of training and startup supporting in Vietnamese universities. Besides, some solutions to establish training model and startup supporting will be suggested in the upcoming time.

Keywords: *Startup, University, Viet Nam.*

TỔNG QUAN

Những năm qua, trước sự tác động của cuộc Cách mạng công nghiệp lần thứ 4, các trường Đại học ở Việt Nam hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp được khởi phát từ nhu cầu học tập, nghiên cứu của sinh viên. Những mô hình này không chỉ truyền thụ kiến thức còn thúc đẩy các ý tưởng kinh doanh và tiền đề cho những dự án khởi nghiệp tại giảng đường (Trường Đại học Văn Lang, 2020). Do đó, gần đây các nhà trường ở Việt Nam đồng loạt triển khai mô hình hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp như: trường Đại học Văn Lang, Đại học Quốc gia Hà Nội, trường Đại học Ngoại thương, trường Đại học FPT, trường Đại học Tây Bắc, trường Đại học Công nghệ TP.HCM, trường Đại học Bách khoa Hà Nội, trường Đại học Hải Dương… Chính hoạt động này đã và đang giúp các trường Đại học ngày càng thu hút nhiều sinh viên tham gia học tập, nghiên cứu, đây được coi là hướng đi đúng đắn của các trường Đại học trong chiến lược triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp nhằm nâng cao chất lượng giáo dục.

Đặc biệt, hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp là yếu tố quan trọng góp phần gia tăng số doanh nghiệp thành công, tạo thêm việc làm và cải thiện kinh tế - xã hội cho địa phương. Và trong trường đại học hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp cần được tiếp tục hoàn thiện để khu vực này có thể đóng góp nhiều nhất trong thời gian tới (Tuấn & Hà, 2020). Theo nghiên cứu của hai tác giả Bùi Anh Tuấn, Lê Thị Thu Hà cho biết: Ở nước ta,

trong khoảng một thập kỷ vừa qua, việc xây dựng hệ sinh thái khởi nghiệp quốc gia được Đảng và Nhà nước đặc biệt quan tâm, trong đó nhấn mạnh trường đại học là một trong những thành tố quan trọng cấu thành hệ thống.

Một số nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng: hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong trường đại học sẽ tạo ra cơ hội để sinh viên học tập, trao đổi kinh nghiệm với nhau và nhà trường triển khai các hoạt động hỗ trợ sinh viên khởi nghiệp, giúp các dự án khởi nghiệp của sinh viên kết nối với các doanh nghiệp, các nhà đầu từ. Và hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong trường đại học không chỉ trang bị kiến thức khởi nghiệp mà còn nâng cao nhận thức, tiếp cận bài học về sự kiên trì nỗ lực, cũng như hứng thú, đam mê thúc đẩy sinh viên khởi nghiệp trước khi "vào đời"... (Trường Đại học Văn Lang, 2020).

Một số nghiên cứu đã đề xuất các giải pháp có tính tình thế trong hoạt động đào tạo, hỗ trợ, định hướng khởi nghiệp cho sinh viên như: Khoa Kinh tế - Quản trị tại Trường Đại học Hải Dương, chọn mô hình Đại học - Doanh nghiệp để tự tin khởi nghiệp (trường Đại học Hải Dương, 2020). Vì vậy, để triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp các trường đại học, cần phải: (i) Định kỳ hàng năm, tiếp tục tổ chức cuộc thi tìm kiếm ý tưởng khởi nghiệp; (ii) Mở các khoá đào tạo, bồi dưỡng ngắn hạn cho sinh viên về kỹ năng khởi nghiệp; (iii) Tổ chức sự kiện 1 lần/tháng: gặp gỡ doanh nhân, giao lưu, chia sẻ ý tưởng và kinh nghiệm khởi nghiệp; (iv) Xúc tiến thành lập Vườn ươm khởi nghiệp đổi mới sáng tạo trong khuôn viên Nhà trường; (v) Đề xuất đổi mới kế hoạch tổ chức một quy trình ươm tạo khởi nghiệp từ 3-4 tháng (Trường Đại học Tây Bắc, 2020).

VẬT LIỆU/PHƯƠNG PHÁP

Bài viết vận dụng phương pháp thu thập và phân tích các tài liệu thứ cấp tại trường Đại học Văn Lang, Đại học Quốc gia Hà Nội, trường Đại học Ngoại thương, trường Đại học FPT, trường Đại học Tây Bắc, trường Đại học Công nghệ TP.HCM, trường Đại học Bách khoa Hà Nội, trường Đại học Hải Dương… đây là những trường đại học đã và đang triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp cho sinh viên.

KẾT QUẢ/THẢO LUẬN

1. Thực trạng triển khai hỗ trợ khởi nghiệp trong trường Đại học.

Tại các trường Đại học Việt Nam hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp là một trong những thành tố quan trọng để nâng cao chất lượng giáo dục. Nên các trường Đại học đã thành lập doanh nghiệp khoa học công nghệ và vườn ươm khởi nghiệp để hỗ trợ sinh viên khởi nghiệp:

Trường Đại học Ngoại thương (FTU) hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp được triển khai dưới hình thức thành lập Trung tâm FIIS nhằm tạo lập vườn ươm khởi nghiệp kết nối các hoạt động giữa nhà trường và doanh nghiệp, tổ chức các cuộc thi khởi nghiệp, hỗ trợ hoạt động khởi nghiệp một cách bài bản. Và FIIS đã triển khai các chương trình: FTalk truyền cảm hứng sáng tạo và tinh thần khởi nghiệp cho sinh viên; Chương trình hỗ trợ và định hướng sinh viên khởi nghiệp (Support and Orientation for Startup - SOS); Chuỗi khóa đào tạo Tôi tự tin sáng tạo (Turn on Innovation); Chương trình Pre-Incubation Bootcamp/Hackathon huấn luyện nâng cao giúp các ý tưởng sáng tạo thành các dự án khả thi, được phối hợp triển khai với các đối tác doanh nghiệp, các trường đại học khu vực và quốc tế... Nhờ vậy, trường Đại học Ngoại thương đã nhận được nhiều giải thưởng và được tham gia các khóa đào tạo nâng cao về quản trị - kinh doanh của các tổ chức, quỹ chuyên nghiệp. Qua thực tiễn cho thấy hoạt động đào tạo khởi nghiệp cho sinh viên đã mang lại các kết quả khả quan cho hoạt động đào tạo khởi nghiệp của Nhà trường. Một số chương trình, trong đó có SIP100 do FIIS chủ trì phối hợp với các tổ chức/quỹ… tổ chức luôn được đánh giá cao. Năm 2018, đã có 7 dự án "khởi nghiệp" gồm: Dự án Vinarongbien; Dự án

Slide Factory Vietnam; Dự án ứng dụng trò chuyện với người lạ Hearty; Dự án vườn ươm cây giống theo công nghệ Israel; Dự án mô hình lọc nước; Dự án sản xuất bột bã mía để nuôi tôm; Dự án hệ thống nhận diện khuôn mặt BKFace... **(Tuấn & Hà, 2020)**. Tuy nhiên, bên cạnh đó vẫn còn có một số hạn chế như: chưa triển khai cho sinh viên năm thứ nhất, năm thứ hai của nhà trường. Chưa hình thành được hệ thống website và kết nối dữ liệu, thông tin hệ thống giảng viên, các chương trình đào tạo khởi nghiệp. Khuyến khích các ý tưởng sáng tạo – khởi nghiệp chưa thể hiện thống nhất, liên tục và xuyên suốt qua mọi môn học của Nhà trường. Chưa khuyến khích các sinh viên am hiểu các lĩnh vực khác nhau cùng thành lập đội/nhóm khởi nghiệp. Việc kết nối giữa các chuyên gia, các nhà đầu tư, các doanh nghiệp với trường đại học cùng đồng hành cho một số dự án khởi nghiệp còn hạn chế.

Đại học Quốc gia Hà Nội, ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp là mô hình spin off để nuôi dưỡng các ý tưởng sáng tạo, tiềm năng. Mô hình này đã tồn tại với hệ thống đại học ở các nước phát triển rất nhiều năm nay với Đại học Quốc gia Hà Nội đây là việc hoàn toàn mới và hiện mới. Khó khăn là dù đã có quy định cho phép trường đại học thành lập doanh nghiệp nhưng Luật Công chức, Luật Viên chức chưa có điều khoản mở để cán bộ, giảng viên tham gia doanh nghiệp. Không chỉ có vậy, cơ chế về sử dụng nhà đất của các trường công lập cho ươm tạo doanh nghiệp cũng chưa có cơ chế rõ ràng. Tuy nhiên, việc triển khai mô hình khởi nghiệp spin off trong Nhà trường được tạo điều kiện cho thầy và trò trong việc biến các ý tưởng, công nghệ trở thành sản phẩm thương mại hóa được với thị trường **(Viet Times, 2019)**.

Trường Đại học Văn Lang, triển khai mô hình start-up (khởi nghiệp) từ giảng đường. Mô hình này được ứng dụng vào công tác giảng dạy nhằm giúp sinh viên thực hành và cọ xát thực tế với những chuyên môn đang theo học. Nhiều năm qua đã tổ chức nhiều chương trình kinh doanh cho sinh viên và đã có dấu ấn nhất định trong xã hội như The Coffee Bike, Happy Young House, Gác – Măng – Giê,… Ngoài ra, nhà trường còn tổ chức nhiều sự kiện mang định hướng tính thiết thực như: Talkshow "AI – Blockchain và câu chuyện khởi nghiệp", Ngày hội việc làm, các buổi chia sẻ từ các anh chị cựu sinh viên,… Bên cạnh đó, chương trình cộng đồng "Xuân yêu thương" gây quỹ từ thiện cho các mái ấm Cộng đồng hay các sân chơi thường niên của trường: Ngày hội Sinh viên Văn Lang, chương trình cấp Khoa như: Hòa sắc, NEON, Gamma, Kiến – Xây,… là nơi để các bạn sinh viên thể hiện tài năng và cả khả năng kinh doanh của mình, khám phá và cải thiện kỹ năng của chính bản thân thông qua những việc "cung cấp" vật liệu cho chương trình **(Trường Đại học Văn Lang, 2020)**.

Trường Đại học FPT, cũng như trường Đại học Văn Lang triển khai mô hình khởi nghiệp (start-up). Sinh viên được khơi dậy tinh thần khởi nghiệp từ rất sớm và định hướng để chuyển hóa một cách hiệu quả ý tưởng sáng tạo của mình thành một startup. Đây là lý do rất nhiều sinh viên tốt nghiệp sẵn sàng từ bỏ cơ hội việc làm ngàn đô để lựa chọn khởi nghiệp và đạt được thành công như start-up ColorMe là một dự án "Giáo dục tự chọn" về thiết kế đồ họa lớn nhất Hà Nội; start-up TopCV cho phép người dùng thiết kế sẵn các mẫu CV; start-up KidiCode là môi trường trẻ, năng động, vừa học vừa thực hành phù hợp với tâm lý trẻ nhỏ; start-up APPA N1 cho phép các chủ trang trại có thể chăm sóc cây trồng ở bất cứ nơi nào; start-up Be The Best English là một mô hình học tập Talker/Walker và các dịch vụ liên quan đến Tiếng Anh như dịch thuật, huấn luyện cá nhân và chăm sóc lắng nghe **(Trường Đại học FPT, 2020)** .

Trường Đại học Tây Bắc, để triển khai hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp nhà trường phối hợp với Hiệp hội doanh nghiệp và Tỉnh Đoàn Sơn La tư vấn cho UBND tỉnh Sơn La

xúc tiến thành lập Quỹ hỗ trợ khởi nghiệp và Trung tâm hỗ trợ thanh niên khởi nghiệp tỉnh Sơn La; thành lập Trung tâm đổi mới sáng tạo tại Sơn La; tổ chức các diễn đàn, hội nghị, hội thảo về khởi nghiệp: Năm 2016 phối hợp với Báo Diễn đàn Doanh nghiệp, Phòng Thương mại và Công nghiệp Việt Nam (VCCI), Hiệp hội Doanh nghiệp tỉnh Sơn La tổ chức thành công "Diễn đàn khởi nghiệp Tây Bắc" với sự tham gia khoảng 1.000 sinh viên và thanh niên Sơn La và Điện Biên. Năm 2017 tổ chức "Seminar Khởi nghiệp và Thương mại hóa kết quả nghiên cứu khoa học" vào tháng 5/2017 do Đoàn Thanh niên chủ trì. Tháng 11/2018 phối hợp cùng Hiệp hội Doanh nghiệp tỉnh Sơn La tổ chức Diễn đàn Giao lưu - khởi nghiệp với sự tham gia của 25 doanh nghiệp và hơn 900 thanh niên sinh viên; thành lập Câu lạc bộ Sáng tạo khởi nghiệp với 200 thành viên trực thuộc Đoàn trường. Câu lạc bộ được tạo điều kiện tham gia các khóa tập huấn về khởi nghiệp đổi mới sáng tạo, Giảng viên nguồn (TOT) về khởi nghiệp do VCCI, BSA tổ chức; tổ chức và tham gia các cuộc thi về ý tưởng khởi nghiệp: Năm 2018, 01 dự án đại học Tây Bắc đạt giải nhất cuộc thi khởi nghiệp toàn quốc, 01 dự án đạt giải khuyến khích cuộc thi khởi nghiệp do đại học Lâm nghiệp tổ chức. Năm 2019 hỗ trợ 4 ý tưởng của 04 nhóm cựu sinh viên Trường Đại học Tây Bắc đạt giải xuất sắc (trong tổng số 05 giải xuất sắc), mỗi giải thưởng được phần thưởng 50 triệu đồng. Trong đó có 02 ý tưởng được gửi đi dự thi vòng quốc gia, kết quả có 01 dự án đạt giải Ba toàn quốc nhận được giải thưởng và vốn hỗ trợ đầu tư; thực hiện các nghiên cứu, các dự án về hỗ trợ khởi nghiệp như đề tài KHCN cấp cơ sở "Nghiên cứu khuyến nghị vận dụng các chính sách hỗ trợ khởi nghiệp tại Trường Đại học Tây Bắc", đề tài KHCN tỉnh Sơn La "Nghiên cứu thực trạng việc làm và xây dựng nội dung tư vấn khởi nghiệp cho thanh niên ở tỉnh Sơn La"…; tư vấn hỗ trợ các mô hình khởi nghiệp và những thành công như: Hợp tác xã thủy sản và du lịch sinh thái Quỳnh Nhai, Hợp tác xã nông nghiệp xanh AMO, Công ty cổ phần phát triển nông nghiệp Sơn La, Mô hình khởi nghiệp chăn nuôi dế và chế biến sản phẩm từ dế; Các đối tác quan trọng trong hoạt động hỗ trợ khởi nghiệp: nhà trường đã kết nối với các đối tác Nhật Bản, Australia… hỗ trợ khởi nghiệp của sinh viên. Tuy nhiên các ý tưởng chưa đi vào thực tiễn và chưa có tính đổi mới sáng tạo. Tổ chức cuộc thi tìm kiếm ý tưởng, trao giải và gửi dự án tham gia các cuộc thi ở cấp cao hơn. Nhưng các dự án chưa trải qua được giai đoạn trải nghiệm thực tế để học hỏi và điều chỉnh nên việc đánh giá ở cuộc thi cấp cao hơn chưa cao. Sự hiểu biết của các startup về mô hình kinh doanh chưa tốt, các startup đi theo "lối mòn tư duy", làm theo những mô hình người đi trước đã làm. Quỹ hỗ trợ khởi nghiệp và kết nối các quỹ, các nhà đầu tư chưa tiếp cận được nhiều các quỹ này ở Trung ương và tỉnh Sơn La. Trong quá trình hoạt động, các bộ phận như Đoàn thanh niên và phòng Công tác chính trị - Quản lý người học vẫn có những công việc bị chồng chéo nhau do cả hai bộ phận này đều có chức năng hỗ trợ đoàn viên, thanh niên, học sinh trong hình thành ý tưởng và xây dựng dự án khởi nghiệp. Nguyên nhân: sinh viên, cán bộ giảng viên, nhân viên chưa hiểu rõ bản chất của một ý tưởng khởi nghiệp đổi mới sáng tạo (chưa được đào tạo hiểu biết về startup), chưa có đội nhóm tốt cùng làm, chưa có trải nghiệm và chưa biết cách xây dựng kế hoạch của một dự án khởi nghiệp đổi mới sáng tạo; Các quỹ hỗ trợ khởi nghiệp chủ yếu dành cho các dự án về công nghệ thông tin hoặc những dự án có sự đột phá về sự phát triển thị trường, trong khi đó các dự án khởi nghiệp của nhà trường thiên về phát triển tài nguyên nông lâm nghiệp tại khu vực Tây Bắc nên rất khó tiếp cận (Trường Đại học Tây Bắc, 2020).

Trường Đại học Công nghệ TP.HCM (HUTECH), một trong những trường đại học tiên phong về ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp theo hướng kết nối Đại học - Doanh nghiệp. Trong mô hình này, sinh viên HUTECH thường xuyên được tham gia các học kỳ doanh nghiệp - học tập ngay tại doanh nghiệp để kịp thời hoàn thiện bản thân, phát hiện những

điều mà thị trường đang cần. Bên cạnh đó, không gian khởi nghiệp toàn diện, khơi gợi ý tưởng cho sinh viên qua các chương trình tọa đàm, hội thảo với những gương sáng khởi nghiệp cũng được tổ chức thường xuyên để "tiếp lửa" cho sinh viên. Không chỉ đào tạo thực tiễn, giàu tính ứng dụng và "kích thích" tinh thần sáng tạo, mô hình Đại học - Doanh nghiệp còn giải pháp phát triển kỹ năng mềm một cách toàn diện…Và trong môi trường như thế thì cùng với kiến thức chuyên môn, tinh thần lăn xả và kỹ năng làm việc đồng đội (hay kỹ năng teamwork) chính là yêu cầu cần thiết để tự tin khởi nghiệp. Mô hình khởi nghiệp HUTECH chính là một minh chứng sinh động cho những ý tưởng khởi nghiệp giá trị trên nhiều lĩnh vực: ngành Công nghệ thực phẩm đạt Top 10 giải thưởng Tài năng Lương Văn Can 2017 với dự án khởi nghiệp từ mứt chôm chôm, ứng dụng công nghệ in 3D hỗ trợ cho người khuyết tật trong chấn thương chỉnh hình và ý tưởng ngón tay robot MicroPush trong sản xuất công nghiệp được vinh danh những dự án tiềm năng tại Lễ hội Khởi nghiệp Thanh niên Toàn cầu Việt – Hàn… (Trung, 2018).

Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, triển khai mô hình BK Holding (vườn ươm khởi nghiệp của Đại học Bách khoa Hà Nội) đã ươm tạo được rất nhiều doanh nghiệp khởi nghiệp. Ngoài tập trung phát triển các sản phẩm công nghệ có khả năng thương mại hóa, nhà trường còn phải gọi được vốn cho các spin off và không ít người trong cộng đồng cựu sinh viên rất quan tâm đến hoạt động này và sẵn sàng đầu tư. Chính vậy, công tác cựu sinh viên rất quan trọng vì vừa tạo được mối gắn kết cộng đồng vừa chính là nguồn đầu tư cho các nghiên cứu và hoạt động khởi nghiệp của các thế hệ sau. Tuy nhiên, sự thành công hay không của các mô hình khởi nghiệp trong trường đại học không chỉ là công nghệ mà khâu thương mại hóa là rất quyết định. Vì thế, chủ nhân các ý tưởng công nghệ chỉ nên là giám đốc kỹ thuật, còn giám đốc kinh doanh, giám đốc điều hành nên là những người có trình độ và được đào tạo về kinh tế, quản trị kinh doanh song vẫn là lý tưởng nếu giám đốc điều hành có cả chuyên môn về kỹ thuật lẫn quản trị kinh doanh (Viet Times, 2019).

Trường Đại học Hải Dương, hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp được Nhà trường đưa vào chương trình đào tạo đối từ năm học 2018-2019. Bài giảng Học phần Khởi nghiệp được thảo luận và biên soạn kỹ lưỡng, khoa học, thường xuyên cập nhật kiến thức lý thuyết và thực tiễn mới. Các giảng viên tham gia giảng dạy có trình độ chuyên môn và kinh nghiệp thực tế vững vàng, từng trải nghiệm hoạt động bán hàng và kinh doanh thành công. Trong quá trình giảng dạy học phần Khởi nghiệp, giảng viên xây dựng các modun kiến thức để trang bị cho sinh viên, giúp sinh viên hiểu được Bản chất của khởi nghiệp; Tinh thần khởi nghiệp; Làm thế nào để trở thành một doanh nhân thành công. Bên cạnh đó, Học phần Khởi nghiệp đặc biệt chú trọng xây dựng các modun bài tập thực hành: Tổ chức thực hành mô hình kinh doanh mũ tại lớp học; Lập một dự án kinh doanh; Bài tập ước lượng doanh thu, chi phí, lợi nhuận, ước lượng dòng tiền… Từ đó giúp đánh giá dự án khởi nghiệp có khả thi hay không, có đủ vốn để kinh doanh không v.v… Ngoài ra, nhà trường còn tổ chức các buổi tọa đàm về khởi nghiệp; Tổ chức các lớp kỹ năng về khởi nghiệp; Tổ chức cho sinh viên đi trải nghiệm, thực tế, thực tập; Tạo sân chơi bổ ích để sinh viên tham gia rèn luyện và phát triển kỹ năng mềm hỗ trợ cho hoạt động khởi nghiệp; Kết nối doanh nghiệp hỗ trợ nguồn hàng cho sinh viên khởi nghiệp có nhu cầu; Hỗ trợ tư vấn, truyền thông, kết nối khách hàng, đối tác cho sinh viên khởi nghiệp (Nguyệt, 2020).

Tóm lại, ở các trường Đại học Việt Nam hiện nay, hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp rất phong phú, đa dạng về loại hình và chất lượng. Mô hình này đã nuôi dưỡng các ý tưởng sáng tạo, tiềm năng giúp sinh viên thực hành và cọ xát thực tế với những chuyên môn đang theo học. Đặc biệt, các sản phẩm công nghệ có khả năng thương mại hóa, khi hỗ trợ khởi nghiệp cho sinh viên dễ thành công và mang lại hiệu ứng cao. Mặt khác, chúng ta

có thể thấy thông qua các chương trình tọa đàm, hội thảo khơi gợi ý tưởng khởi nghiệp cho sinh viên, "tiếp lửa" khởi nghiệp cho sinh viên, từ đó "kích thích" tinh thần sáng tạo khởi nghiệp, tinh thần lăn xả và kỹ năng làm việc đồng đội cho sinh viên, đây chính là giải pháp phát triển kỹ năng mềm một cách toàn diện cho sinh viên. Tuy nhiên, mô hình còn bộc lộ một số hạn chế về ý tưởng sáng tạo, về quy trình ươm tạo, về mô hình kinh doanh, về quỹ hỗ trợ khởi nghiệp, về cơ chế, chính sách của Nhà trường…

2. Những vấn đề đặt ra

Hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp ở một số trường mới triển khai cho sinh viên năm thứ ba, năm thứ tư chưa thực hiện triển khai cho sinh viên năm thứ nhất, năm thứ hai ở các nhà trường như Đại học Quốc gia Hà Nội, trường Đại học Ngoại thương, trường Đại học FPT, trường Đại học Tây Bắc…

Luật Công chức, Luật Viên chức chưa có điều khoản mở để cán bộ, giảng viên tham gia doanh nghiệp dù đã có quy định cho phép trường đại học thành lập doanh nghiệp. Do vậy, cơ chế về sử dụng nhà đất của các trường công lập cho ươm tạo doanh nghiệp rất khó khăn cụ thể tại Đại học Quốc gia Hà Nội.

Các ý tưởng chưa đi vào thực tiễn và chưa có tính đổi mới sáng tạo, một số startup làm theo những mô hình người đi trước đã làm như trường Đại học Tây Bắc.

Trong quá trình hoạt động, chức năng và nhiệm vụ của một số phòng ban bị chồng chéo nhau, đều có chức năng hỗ trợ sinh viên trong hình thành ý tưởng và xây dựng dự án khởi nghiệp như Đoàn thanh niên và phòng Công tác chính trị - Quản lý của trường Đại học Tây Bắc đều có chức năng hỗ trợ đoàn viên, thanh niên, sinh viên xây dựng dự án khởi nghiệp.

Một số nhà trường chưa thu hút được cựu sinh viên tham gia vào hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp. Việc thu hút cựu sinh viên rất quan trọng bởi khi cựu sinh viên tham gia vào hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp của nhà trường sẽ tạo ra mối gắn kết cộng đồng và chính là nguồn đầu tư cho các nghiên cứu và hoạt động khởi nghiệp của các sinh viên thế hệ sau.

Chủ nhân các ý tưởng công nghệ chỉ nên là giám đốc kỹ thuật, còn giám đốc kinh doanh, giám đốc điều hành nên là những người có trình độ được đào tạo về kinh tế, quản trị kinh doanh song vẫn là lý tưởng nếu giám đốc điều hành có cả chuyên môn về kỹ thuật lẫn quản trị kinh doanh như mô hình BK Holding của trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Hiện tại, rất nhiều trường chưa hình thành được hệ thống website và kết nối với nhau cung cấp các cơ sở dữ liệu, thông tin của các cơ sở đào tạo, hệ thống giảng viên, các chương trình/khóa đào tạo khởi nghiệp phong phú để đáp ứng nhu cầu của sinh viên.

Khuyến khích các ý tưởng sáng tạo, khởi nghiệp chưa thống nhất, liên tục và xuyên suốt qua mọi môn học của Nhà trường. Chưa khuyến khích các sinh viên trong các lĩnh vực khác nhau công nghệ, công nghệ thông tin, nông nghiệp, y tế… cùng thành lập đội/nhóm khởi nghiệp.

Kết nối các nguồn lực giữa trường đại học, chuyên gia, các nhà đầu tư và các doanh nghiệp lớn để hỗ trợ và đồng hành cho một số dự án khởi nghiệp của sinh viên ở một số nhà trường còn hạn chế.

3. Giải pháp triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, khởi nghiệp trong trường Đại học.

Để triển khai hiệu quả hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp trong trường Đại học thời Cách mạng công nghệ 4.0, đồng thời đáp ứng được yêu cầu nâng cao chất lượng đào tạo, các trường Đại học Việt Nam cần thực hiện:

Cần phải triển khai thống nhất, liên tục và xuyên suốt qua mọi đối tượng, mọi môn học của Nhà trường. Khuyến khích tất cả các sinh viên từ năm thứ nhất đến năm cuối đều tích cực tham gia tránh tình trạng như Đại học Quốc gia Hà Nội, trường Đại học Ngoại thương, trường Đại học FPT, trường Đại học Tây Bắc…. mới triển khai được cho sinh viên năm thứ ba, năm thứ tư. Phải thành lập đội/nhóm sinh viên khởi nghiệp bao gồm các sinh viên trong các lĩnh vực khác nhau như công nghệ, công nghệ thông tin, nông nghiệp, y tế… Chủ nhân các ý tưởng công nghệ phải là người có cả chuyên môn về kỹ thuật lẫn quản trị kinh doanh như mô hình BK Holding của trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Chính phủ cần chỉnh sửa các điều khoản Luật Công chức, Luật Viên chức để tạo điều kiện cho cán bộ, giảng viên các trường Đại học có thể tham gia hỗ trợ sinh viên, học sinh khởi nghiệp và có cơ chế hợp lý để cán bộ, giảng viên có thể sử dụng nhà đất của các trường công lập cho ươm tạo ý tưởng khởi nghiệp của sinh viên, học sinh.

Các dự án ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp phải trải qua giai đoạn thực nghiệm thực tế để học hỏi và điều chỉnh nên việc đánh giá tránh đi theo "lối mòn tư duy", làm theo những mô hình người đi trước đã làm. Đặc biệt, các ý tưởng đổi mới – sáng tạo – khởi nghiệp phải đáp ứng được nhu cầu kinh tế, xã hội của địa phương, của khu vực, tránh tình trạng như trường Đại học Tây Bắc nhu cầu của địa phương, của khu vực là dự án công nghệ thông tin hoặc những dự án có sự đột phá về sự phát triển thị trường, trong khi đó các dự án khởi nghiệp của nhà trường thiên về phát triển tài nguyên nông lâm nghiệp tại khu vực Tây Bắc nên rất khó tiếp cận với quỹ hỗ trợ khởi nghiệp và kết nối các quỹ, các nhà đầu tư.

Tránh sự chồng chéo nhau về chức năng, nhiệm vụ một số phòng ban trong hỗ trợ sinh viên thình thành ý tưởng và xây dựng dự án khởi nghiệp như trường Đại học Tây Bắc.

Các nhà trường nên có chính sách thu hút lực lượng cựu sinh viên tham gia hỗ trợ khởi nghiệp. Bởi thu hút cựu sinh viên rất quan trọng vì vừa tạo được mối gắn kết cộng đồng vừa chính là nguồn đầu tư cho các nghiên cứu và hoạt động khởi nghiệp của các thế hệ sau. Ví như trường Đại học Tây Bắc năm 2019 hỗ trợ 4 ý tưởng của 04 nhóm cựu sinh viên Trường Đại học Tây Bắc đạt giải xuất sắc (trong tổng số 05 giải xuất sắc), mỗi giải thưởng được phần thưởng 50 triệu đồng…

Các nhà trường thành lập hệ thống website và kết nối với nhau cung cấp các cơ sở dữ liệu, thông tin của các cơ sở đào tạo, hệ thống giảng viên, các chương trình/khóa đào tạo khởi nghiệp phong phú để đáp ứng nhu cầu của sinh viên.

Tiếp tục hỡ trợ cơ sở vật chất ban đầu để giúp đỡ cho sinh viên khởi nghiệp như: Thuê văn phòng giá rẻ hoặc hỗ trợ sử dụng thiết bị, phòng thí nghiệm lúc ban đầu khởi nghiệp…

KẾT LUẬN/ĐỀ NGHỊ

Thực tế những năm qua, hệ thống giáo dục đại học của Việt Nam đã có bước phát triển đáng kể, một số trường lọt top các trường đại học hàng đầu thế giới như Đại học Quốc gia Hà Nội và Đại học Quốc gia TP.HCM. Tuy nhiên, để khuyến khích phát triển các năng lực tư duy của sinh viên trong học tập, vẫn là bài toán khó của nhiều trường. Do vậy, nghiên cứu và tìm hiểu hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp có ý nghĩa vô cùng quan trọng đối với các trường Đại học Việt Nam. Bởi nghiên cứu về các mô hình này sẽ giúp Ban lãnh đạo các trường Đại học nhận thức được các mặt tích cực cũng như mặt hạn chế của hoạt động ươm tạo, hỗ trợ khởi nghiệp đã triển khai. Từ đó, các trường Đại học có thể lựa trọn giải pháp phù hợp, có thể áp dụng thành công vào hệ thống giáo dục toàn diện của nhà trường, góp phần phát triển các năng lực, kỹ năng của sinh viên trong thực tế học tập.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyệt, L. T. (2020, 04 17). *Hoạt động đào tạo, hỗ trợ, định hướng khởi nghiệp cho sinh*

viên Khoa Kinh tế - Quản trị tại Trường Đại học Hải Dương. Đã truy lục 03 05, 2021, từ uhd.edu.vn: http://uhd.edu.vn/hoat-dong-dao-tao-ho-tro-dinh-huong-khoi-nghiep-cho-sinh-vien-khoa-kinh-te-quan-tri-tai-truong-dai-hoc-hai-duong-dt4227.html

Trung, T. (2018, 04 09). *Chọn mô hình Đại học - Doanh nghiệp để tự tin khởi nghiệp*. Đã truy lục 03 08, 2021, từ tuoitre.vn: https://tuoitre.vn/chon-mo-hinh-dai-hoc-doanh-nghiep-de-tu-tin-khoi-nghiep-20180409065934082.htm

Trường Đại học FPT. (2020, 02 27). *Điểm danh những dự án khởi nghiệp "đình đám" của cựu SV trường Đại học FPT*. Đã truy lục 03 05, 2021, từ daihoc.fpt.edu.vn: https://daihoc.fpt.edu.vn

Trường Đại học Tây Bắc. (2020, 05 11). *Một số thành tựu đạt được trong lĩnh vực hỗ trợ khởi nghiệp đổi mới sáng tạo từ năm 2015-2020 của Trường Đại học Tây Bắc*. Đã truy lục 03 09, 2021, từ utb.edu.vn: http://utb.edu.vn

Trường Đại học Văn Lang. (2020, 06 05). *Khởi nghiệp từ giảng đường*. Đã truy lục 03 06, 2021, từ Trường Đại học Văn Lang: https://tuyensinh.vanlanguni.edu.vn/khoi-nghiep-tu-giang-duong/

Tuấn, B. A., & Hà, L. T. (2020). Thúc đẩy vườn ươm khởi nghiệp trong trường đại học. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 57-60.

Viet Times. (2019, 12 21). *Thúc đẩy mô hình khởi nghiệp spin off trong trường đại học*. Đã truy lục 01 30, 2021, từ viettimes.vn: https://viettimes.vn/thuc-day-mo-hinh-khoi-nghiep-spin-off-trong-truong-dai-hoc-post121055.html

IMPROVEMENT OF CURCUMIN BIOAVAILABILITY AND BIOACTIVITIES BY THE DESIGNED REDOX NANOPARTICLES

Vinh Dinh-Xuan Nguyen[1,2], Dat Van-Tien Nguyen[1,2], Anh Duc-The Doan[1,2], Long Binh Vong [1,2]*

[1]School of Biomedical Engineering, International University, 700000 Ho Chi Minh, Vietnam.

[2]Vietnam National University Ho Chi Minh city (VNU-HCMC), 700000 Ho Chi Minh, Vietnam

* Corresponding author: vblong@hcmiu.edu.vn

ABSTRACT

Chronic inflammation is associate with various severe diseases, with reactive oxygen species (ROS) being one of the root causes. Curcumin, on the other hand, possesses admirable antioxidant and anti-inflammatory capacities. However, curcumin poor bioavailability and low oxidative resistance has hindered its application. In this research, curcumin loaded siRNP (CUR@siRNP) with the size of about 156 nm in diameter were employed as an efficient nanocarrier for curcumin via dialysis method. After encapsulation, CUR@siRNP improved solubility and stable release rate. Via in vitro assays, CUR@siRNP demonstrated impressive antioxidant and anti-inflammation capability. Moreover in vivo mouse models for pharmacokinetics and anti-inflammation at colon demonstrated that potential treatment of curcumin with formula CUR@siRNP was increased significantly compare to free curcumin in oral administrator. The CUR@siRNP combination showed potential to be further investigated and developed for a novel antioxidant and anti-inflammatory nano-formulation in treatment of chronic inflammation.

***Keywords**: inflammation, antioxidant, redox nanoparticles, curcumin, reactive oxygen species*

TÓM TẮT

Viêm mãn tính có liên quan đến các bệnh nghiêm trọng khác nhau, với các loại oxy phản ứng (ROS) là một trong những nguyên nhân gốc rễ. Mặt khác, curcumin có khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm tốt. Tuy nhiên, sinh khả dụng kém của curcumin và dễ dàng bị oxy hóa đã cản trở ứng dụng của nó trong thực tiễn. Trong nghiên cứu này, curcumin được bọc bởi hạt siRNP (CUR@siRNP) với kích thước đường kính khoảng 156 nm được sử dụng như một phương pháp vẫn chuyển bằng hệ thống nano đạt hiệu quả cho curcumin thông qua phương pháp thẩm tách. Sau khi bao bọc curcumin, CUR@siRNP cải thiện độ hòa tan và tốc độ giải phóng ổn định. Thông qua các thử nghiệm trong ống nghiệm, CUR@siRNP đã chứng minh khả năng kháng oxy hóa và kháng viêm vượt trội. Hơn nữa, các mô hình chuột in vivo về dược động học và điều trị viêm ở ruột kết đã chứng minh rằng khả năng điều trị của curcumin với trong CUR@siRNP đã tăng lên đáng kể so với curcumin thông thường ở đường uống. Sự kết hợp CUR@siRNP cho thấy tiềm năng được nghiên cứu và phát triển thêm để tạo ra một công thức nano kháng viêm và kháng oxy hóa mới trong điều trị viêm mãn tính.

Từ khóa: bệnh lý viêm, kháng oxy hóa, hạt nano oxy hóa khử, curcumin, ROS.

INTRODUCTION

Chronic diseases, including chronic inflammation, is one of the greatest threats to patients. Chronic inflammation plays a central role in challenging diseases, including cancer and cardiovascular diseases. The overproduction of reactive oxygen species (ROS) due to environmental stress (e.g., UV, toxin, or heat exposure), leads to an oxidative stress imbalance that creates toxic effects through the development of peroxides and free radicals.

Consequently, these processes not only lead to endothelial dysfunction and tissue injury but also internal damages and even apoptosis.

Curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$) is a polyphenolic compound derived from the rhizome of turmeric – a traditional herb and spice common around Southeast Asia. Curcumin has diverse pharmacological effects, including anti-inflammatory, antioxidant, and anti-angiogenic activities. Most notably, curcumin has demonstrated inhibition of the pro-inflammatory pathways associated with chronic diseases by blocking the development of tumor necrosis factor (TNF) and TNF-mediated cell signaling. Despite the admirable therapeutic effects of curcumin, many of its drawbacks have inhibited the use of curcumin in clinical applications. Curcumin's poor water solubility, slow absorption, rapid metabolism, and low biological half-life were clearly connected to its extremely low bioavailability, which lead to poor bioactivity.

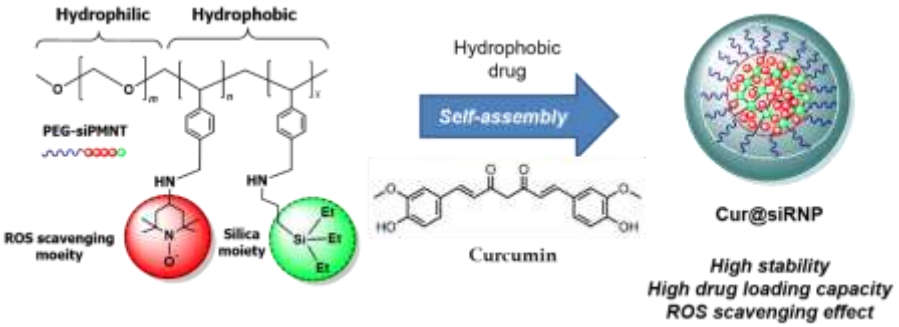


Figure 1. Design of silica-containing redox nanoparticle (siRNP). Curcumin is encapsulated into the nanocarrier by self-assembly of hydrophilic PEG segment and hydrophobic segment with ROS scavenging feature.

Previously, silica-containing redox nanoparticle (siRNP) (**Figure 1**) was developed, featuring a ROS scavenging fragment of nitroxide radical and a drug absorptive fragment of silica that can optimize drug loading capability. siRNP should be potential nanocarrier of hydrophobic drugs such as curcumin for improvement of therapeutic application. In this research, the synthesized curcumin-loaded siRNP (CUR@siRNP) characterization were investigated, along with antioxidant and anti-inflammatory capacity *in vitro* and pharmacokinetic *in vivo*.

MATERIAL AND METHOD

Synthesis of CUR@siRNP

siRNP was synthesized through dialysis of PEG-siPMNT in dimethylformamide (DMF) against water. Hydrophilic PEG segment facing outward while covering hydrophobic PMNT segment with nitroxide group and silica group within its core. Curcumin was encapsulated via the hydrophobic interaction and absorption in the silica core in of siRNP.

Characterization of CUR@siRNP

Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the size of siRNP and CUR@siRNP with an angle 173° using Zetasizer ZS (Malvern, UK). CUR@siRNP release profile, encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC) are also measured.

Investigation of CUR@siRNP bioactivities *in vitro*

CUR@siRNP bioactivities are assessed in term of antioxidant and anti-inflammation. The antioxidant effect of curcumin and CUR@siRNP was investigated using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Fujifilm Wako Chemicals) assay. The anti-

inflammatory effect of curcumin and CUR@siRNP was studied using albumin denaturation inhibition assay, and nitric oxide assay.

Investigation of CUR@siRNP pharmacokinetic in *vivo*

Curcumin in CMC (0.5%) and CUR@siRNP are administrated by oral gavage with dose 25 mg/kg. Pharmacokinetics process was evaluated by some main parameters such as elimination rate, time half-life, clearance,…In term of treatment colitis, disease cause by Dextran Sulfate Sodium (DSS) 3% and mice were accessed sample in 7 days. Evaluating the course of treatment by Disease activity index (DAI) on entire colon.

Statistical analysis

All experiments were conducted at least thrice, and the data represent the mean ± SEM. The results were analyzed and considered statistically significant differences when $p < 0.05$ using a two-tailed t-test.

RESULTS AND DISCUSSION

CUR@siRNP characterization

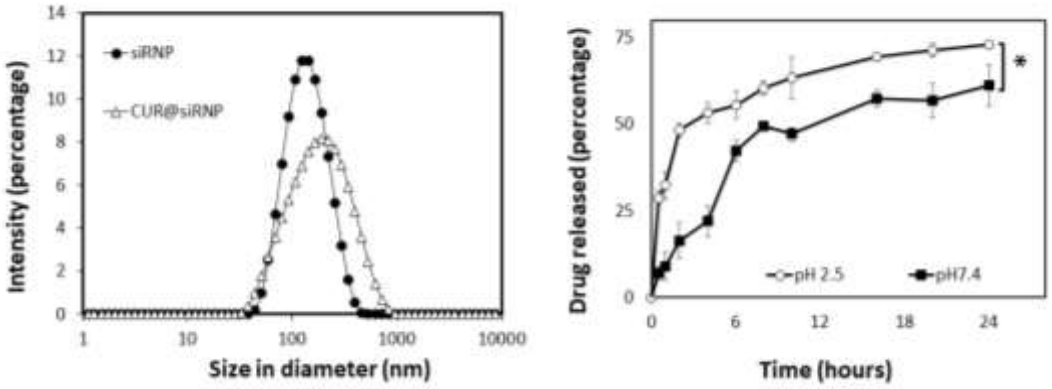


Figure 2. CUR@siRNP and siRNP characteristic: (A) Size distribution, (B) drug release profile. (*p<0.05 and **p<0.01 by Student's t-test).

Table 3. Nanosize, polydisperse index (PDI), EE and LC of CUR@siRNP and siRNP

	Size (nm)	PDI	EE (%)	LC (%)
CUR@siRNP	156.1 ± 2.563	0.283	78%	7.8%
siRNP	121.2 ± 3.247	0.253	-	-

The size of siRNP slightly increased from 121.2 ± 3.247 nm (siRNP) to 156.1 ± 2.563 nm (CUR@siRNP), which suggested that curcumin was encapsulated into the core of siRNP. In addition, monodispersity was observed with low PDI value (<0.3), suggesting narrow size distribution of siRNP and CUR@siRNP.

The EE and LC were 78% and 7.8%, respectively. As compared to the conventional polymeric nanoparticle, siRNP exhibited higher EE and LC due to the drug absorption silica core. Next, the release of CUR@siRNP was tested in the phosphate buffer with pH 2.5 and pH 7.4 by dialysis method.The release of CUR@siRNP was more rapid at pH 2.5 (≈50% released after 4 hours) compared to pH 7.4 (≈20% released after 4 hours). However, it still maintains relatively long release interval, which enhance circulation and longer half-life.

CUR@siRNP improves solubility and bioactivities *in vitro*

Free curcumin remained insoluble in distilled water, evidenced by small particles accumulated at the bottom of vial. While CUR@siRNP resulted in a relatively dark brown

solution and solution was transparent (**Figure. 4B**), indicating the improvement of water solubility of curcumin. This data suggests that siRNP has potential to increase the bioavailability of curcumin through overcoming the drug's low solubility.

Curcumin is a natural antioxidant agent, which exerted high antioxidant effect (65% DPPH radical scavenging at 80 µg/mL); however, when encapsulated by siRNP with free-radical scavenging feature, they both have developed an admirable simultaneous antioxidant activity. At the same concentration, CUR@siRNP reached 77% antioxidant effect, which was higher than both free curcumin and siRNP individually. This makes siRNP an ideal nanocarrier for curcumin, by enhancing curcumin's natural antioxidant profile.

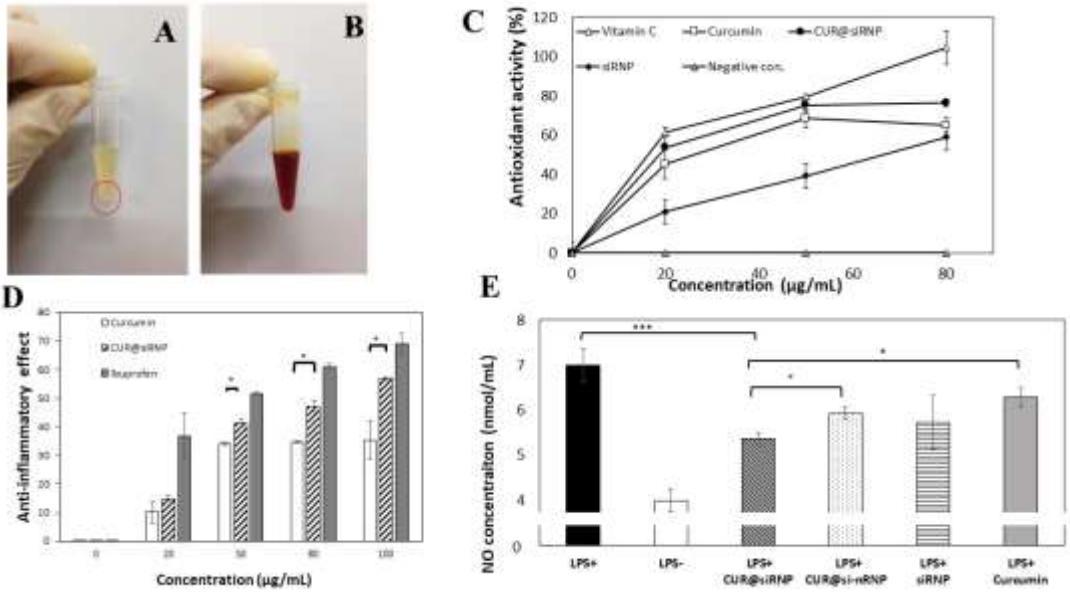


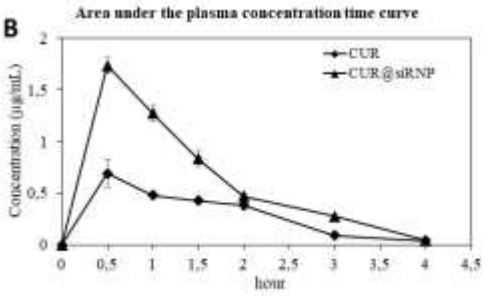
Figure 4. Free curcumin (A) and CUR@siRNP (B) in water. CUR@siRNP results on antioxidant activities via DPPH assay (C), anti-inflammatory effect via albumin denaturation assay (D) and nitric oxide assay (E). (*p<0.05 and ***p<0.01 by Student's t-test)

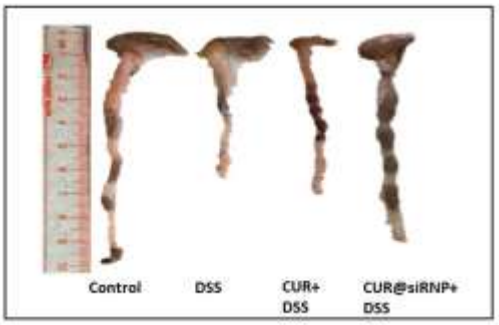
Via albumin denaturation assay, CUR@siRNP demonstrated significantly higher efficiency (57%) than curcumin sample (35%) at high concentrations (50, 80 and 100 µg/mL). This should be understood that the encapsulation of siRNP has greatly improved curcumin anti-inflammatory profile, enhancing valuable therapeutic effect. While nitric oxide assay confirms the elevation of anti-inflammatory efficiency of CUR@siRNP at 100 µg/mL concentration.

Potential treatment of CUR@siRNPI *in vivo* mouse model

A

Pharmacokinetic parameter	Formulation	
	Free curcumin	CUR@siRNP
Dose (mg/kg)	25	25
AUC (µg.h/mL) **	1,336 ± 0,088	2,789 ± 0,108
C_{max}(µg/mL) *	0,691 ± 0,135	1,735 ± 0,077
T_{max}(h)	0,5	0,5
K_e (1/h)	0,713 ± 0,529	0,621 ± 0,138
$t_{1/2}$ (h)	1,335 ± 0,763	1,554 ± 0,252
V_d (mL)	37,008 ± 22,48	14,856 ± 2,614
Cl (mL/h) **	18,772 ± 0,975	8,978 ± 0,339





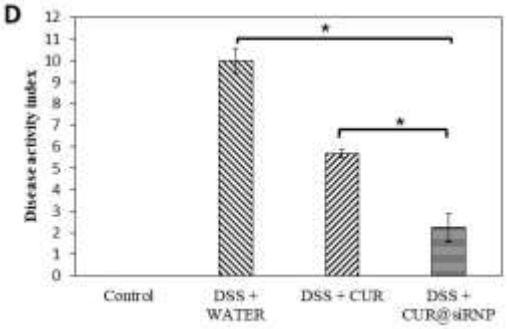


Figure 5. Summary the main results of *in vivo* study, (A) Table of pharmacokinetics parameter, (B) Comparison of *in vivo* plasma concentration vs. time profiles of the curucmin and CUR@siRNP. (C) Realistic colon length image. (D) Disease activity index (DAI) of each group (*p<0.05 and ***p<0.01 by Student's t-test)

The AUC parameter of free curcumin is very low, but the AUC of CUR@siRNP is 2-fold higher (172.951 ± 8.386) and it is significant increasing. After the oral administration**,** both formulations were adsorbed quickly and achieved the highest plasma drug concentration after 0,5 hour. But the maximum concentration of curcumin free is 0,691 ± 0,135 µg/mL , which is very low. Opposite, the drug concentration maximum of CUR@siRNP is increasing 3-fold (1,735 ± 0,077), this proves that, with curcumin covered by siRNP has improved the absorption of the curcumin into the bloodstream. It is potential for increasing treament capacity of curucmin.

The colon length of the DSS group was the shortest, only about 5 cm, while the control group was 11 cm, 2.5-fold shorter and that indicated that the DSS group had severe colitis. At the same time, can see that the length of colon in the group treated with CUR@siRNP (9cm) was longer than the group disease and group free curcumin. This demonstrate that the drug is effective against inflammation and preserves the length of the colon. The significant difference of DAI between group CUR@siRNP to group disease and free curcumin. It showed that CUR@siRNP nanoparticles could limit the inflammatory damage in the colon by DSS, expression significant treament of CUR@siRNP with free curcumin.

IMPLEMENTATION

Other assays should be employed to investigate CUR@siRNP bioactivities, including detection of other inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α, etc), inhibition of denaturation other molecules (protein carbonyl, lipid, etc.) and examination of CUR@siRNP interaction with ROS. Besides, pharmacokinetics for CUR@si-nRNP, quantitative drug accumulation of organs in the body and hematology are other concerns worth considering for the future works.

REFERENCES (Lưu ý, bài này không đánh số ref trong bài và trong phần ref)

He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? Molecules. 2015;20(5):9183-213.

Vong LB, Kimura S, Nagasaki Y. Newly Designed Silica-Containing Redox Nanoparticles for Oral Delivery of Novel TOP2 Catalytic Inhibitor for Treating Colon Cancer. Advanced healthcare materials. 2017;6(20):1700428.

Vareed, S.K., et al., *Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects.* Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2008. **17**(6): p. 1411-1417.

Yang, K.-Y., et al., *Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from Curcuma longa by LC–MS/MS.* Journal of chromatography B, 2007. **853**(1-2): p. 183-189.

KHẢO SÁT BIẾN DẠNG CƠ TIM BẰNG SIÊU ÂM ĐÁNH DẤU MÔ Ở BỆNH NHÂN TĂNG HUYẾT ÁP

Nguyễn Hoài Thanh*, Lê Minh Khôi**

** Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh*

Bệnh viện Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: nhthanh.y14@ump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Siêu âm tim giúp đánh giá phân suất tống máu thất trái (LV EF) và khối cơ thất trái (LVM), tuy nhiên chỉ phát hiện khi có giảm phân suất tống máu thất trái hoặc phì đại thất trái (PĐTT) ở giai đoạn muộn của tăng huyết áp (THA).

Mục tiêu: Xác định tỉ lệ thay đổi của biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái (LV GLS) được phát hiện bằng siêu âm đánh dấu mô ở bệnh nhân THA và các yếu tố liên quan LV GLS.

Phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu cắt ngang mô tả ở 55 bệnh nhân THA nguyên phát tại bệnh viện Đại học Y Dược TP.HCM.

Kết quả: Tỉ lệ LV GLS giảm là 70,9%. LV GLS có mối tương quan thuận với LV EF (r = 0,533, p < 0,001) và mối tương quan nghịch với LVM (r = - 0,50, p < 0,001). Có 23 bệnh nhân (63,9%) chưa có PĐTT nhưng LV GLS đã giảm. HA tâm trương và HA trung bình càng cao thì LV GLS càng giảm (p < 0,05). Nhóm bệnh nhân không tuân thủ điều trị có LV GLS giảm nhiều hơn so với nhóm tuân thủ điều trị (-14,36 ± 0,67 so với -16,80 ± 0,47, p = 0,008).

Kết luận: LV GLS giảm ở phần lớn bệnh nhân THA, trong khi chưa có biến đổi trên các thông số siêu âm tim thường qui.

***Từ khóa**: Tăng huyết áp, biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái, phân suất tống máu thất trái, phì đại thất trái.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

THA là một trong những bệnh lý thường gặp nhất trong cộng đồng. THA là một yếu tố nguy cơ rõ rệt của bệnh lý tim mạch và gây nên quá tải áp lực thất trái đưa đến những thay đổi khác nhau về hình thái thất trái. Những biến đổi này dần dần sẽ gây nên suy tim có chức năng tâm thu bảo tồn hoặc suy tim có giảm chức năng tâm thu thất trái [10].

Siêu âm tim thường quy có thể phát hiện được những thay đổi chức năng tâm thu thất trái liên quan đến tình trạng phì đại thất trái nhưng lại không phát hiện được bất thường về chức năng tâm thu vì phân suất tống máu thất trái vẫn nằm trong giới hạn bình thường cho đến tận giai đoạn muộn của THA [17]. Cho dù phân suất tống máu thất trái nằm trong giới hạn bình thường nhưng chức năng tâm thu của thất trái đã có những biến đổi bất lợi. Việc phát hiện sớm những rối loạn chức năng tâm thu thất trái tiềm tàng ngay trước cả khi thất trái có biểu hiện phì đại có thể là một thông số quan trọng trên lâm sàng hỗ trợ cho việc đưa ra quyết định điều trị tích cực nhằm giảm thiểu tỉ lệ bệnh tật và tử vong tim mạch. Những biến đổi dưới lâm sàng của chức năng tâm thu thất trái có thể được lượng giá bằng thay đổi trong biến dạng cơ tim thất trái [15].

Các nghiên cứu gần đây cho thấy biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái (LV GLS) bằng kỹ thuật siêu âm đánh dấu mô cơ tim có nhiều ưu điểm hơn LV EF trong nhiều tình trạng bệnh lý khác nhau như bệnh cơ tim phì đại, bệnh cơ tim thâm nhiễm, suy tim, bệnh van tim [22]. Một số nghiên cứu ban đầu cũng cho thấy LV GLS có thể phát hiện sớm những biến đổi chức năng tâm thu thất trái ở bệnh nhân (BN) THA trong khi LV EF vẫn còn trong giới hạn bình thường [8]. Đây chính là lý do chúng tôi chọn LV GLS để khảo sát những biến đổi về cơ học cơ tim thất trái ở BN THA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung so sánh giá trị của LV GLS và LV EF, một thông số thường được sử dụng trong siêu âm

thường quy, trong phát hiện những biến đổi chức năng tâm thu thất trái. Đồng thời, chúng tôi cũng tìm hiểu mối liên quan giữa LV GLS với khối cơ thất trái và một số yếu tố lâm sàng khác liên quan đến THA.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Dân số nghiên cứu

Bệnh nhân từ 18 tuổi trở lên, tăng huyết áp nguyên phát, đồng ý siêu âm tim đánh dấu mô tại Đơn vị Hình ảnh Tim mạch, Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh. Những trường hợp sau sẽ được loại ra khỏi nghiên cứu: bệnh nhân có loạn nhịp tim, nhịp tim nhanh hoặc có đặt máy tạo nhịp, có bệnh tim mạch thực thể (luồng thông trái – phải; hở van tim từ trung bình đến nặng và hoặc hẹp van bất kỳ mức độ nào), có bệnh cơ tim phì đại, có tiền căn đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim hoặc hình ảnh siêu âm tim có giảm động vùng, vô động vùng, phình vách thất hoặc có cửa sổ siêu âm tim hạn chế khảo sát hình thái thất trái.

Đối tượng nghiên cứu

55 bệnh nhân tăng huyết áp nguyên phát được siêu âm tim đánh dấu mô tại Đơn vị Hình ảnh Tim mạch, Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang mô tả, thu thập số liệu lâm sàng và siêu âm tim đánh dấu mô.

Các biến số thu thập

Lâm sàng: tuổi, giới tính, BMI, BSA, thời gian THA, tình trạng hút thuốc lá, sự tuân thủ điều trị, tần số tim và thuốc hạ áp.

Siêu âm 2D: khối cơ thất trái (LVM), chỉ số khối cơ thất trái (LVMI), phân suất tống máu thất trái (LV EF), thể tích nhĩ trái, chỉ số thể tích nhĩ trái (LAVI).

Khối cơ thất trái được đo theo khuyến cáo của Hội Siêu âm tim Hoa Kỳ (ASE) năm 2016: Độ dày trung bình được tính từ ngoại tâm mạc và nội tâm mạc, tính các diện tích cắt ngang trên trục ngắn cạnh ức ở mức cơ nhú, với quy ước cơ nhú được coi là một phần của buồng thất trái.

Khối thất trái = (Thể tích đo tại vùng ngoại tâm mạc - thể tích đo tại vùng nội tâm mạc) x 1,05 = Thể tích cơ tim x 1,05.

Chỉ số khối cơ thất trái (LVMI): LVMI = LVM / BSA (g / m^2). Gọi là có PĐTT khi LVMI > 95 g / m^2 ở nữ và > 115 g / m^2 ở nam [3].

Siêu âm Doppler xung dòng chảy qua van hai lá: Vận tốc tối đa của sóng E, vận tốc tối đa của sóng A và tỷ lệ E/A.

Siêu âm Doppler mô cơ tim: vận tốc sóng E` vách. Tỷ lệ E/ E` tương ứng.

Siêu âm tim đánh dấu mô: Biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái (LV GLS) được đo như sau: Tốc độ khung hình trung bình là 40 – 80 khung hình / giây [16]. Mặt cắt trục dọc phải đi qua mỏm tim hoặc với mặt cắt trục ngắn lấy ảnh thất trái phải tròn [9]. Sau khi tối ưu hóa chất lượng hình ảnh, mở rộng tối đa tốc độ khuôn hình, giảm tối thiểu sự co ngắn để làm giảm sai số, tiến hành đo LV GLS trên 3 mặt cắt chuẩn từ mỏm và lấy trung bình. Mặt cắt trục dọc từ mỏm được sử dụng đầu tiên để quan sát van động mạch chủ đóng. Không nên tính LV GLS nếu kỹ thuật đánh dấu theo vùng từ hai đoạn cơ tim trở lên không đạt chất lượng tối ưu trên cùng một mặt cắt [3].

Bốn thông số được khuyến cáo trong đánh giá rối loạn chức năng tâm trương (RLCNTTr) của ASE 2016 và điểm cắt giá trị bất thường của chúng là: E` vách < 7 cm / s,

E` bên < 10 cm / s, tỷ lệ E / E` trung bình > 14. Chỉ số thể tích nhĩ trái > 34 ml / m^2 và vận tốc tối đa dòng hở van ba lá > 2,8m / s.

Phương pháp phân tích số liệu

Số liệu sau khi thu thập được mã hóa và phân tích bằng phần mềm SPSS 26. Các biến định tính được mô tả bằng tần số và tỉ lệ phần trăm. Các biến định lượng được mô tả bằng trung bình và độ lệch chuẩn. Các biến số định lượng có phân phối không chuẩn sẽ được mô tả bằng trung vị và khoảng tứ phân vị. Tương quan giữa các biến liên tục sử dụng phân tích tương quan Pearson (phân phối chuẩn) hoặc tương quan Spearman (phân phối không chuẩn). Trị số p < 0.05 được xem như có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ

Nghiên cứu thực hiện ở 55 bệnh nhân: 31 nam và 24 nữ, tuổi trung bình là 59,11 ± 1,35 tuổi, BSA trung bình là 1,64 ± 0,02 m^2, BMI trung bình là 24,31 ± 0,36. Tỉ lệ bệnh nhân béo phì là 32,73 %. Tỉ lệ bệnh nhân nam hút thuốc lá là 77 %.

Đặc điểm các thông số siêu âm

Bảng 1. Đặc điểm các thông số siêu âm

Thông số	Giá trị trung bình (n = 55)
LVM 2D	162,51 ± 5,90
LVMI	96,91 ± 3,27
LV EF	59,92 ± 0,65
LV GLS	-16,18 ± 3,03

Không có bệnh nhân nào có LV EF giảm dưới 50%, nhưng có đến 70,9% BN có LV GLS giảm. Có 34 BN (61,8%) có LV GLS trong khoảng -12% đến -18%; 5 BN (9,1%) giảm nặng < -12%.

Bảng 2. Mối liên quan LV GLS với LV EF, LVM 2D và LVMI

LV GLS	**≥ -18% (n = 16)**	**-18% đến -12% (n = 34)**	**< -12% (n = 5)**	**p**
LV EF	62,78 ± 1,20	59,42 ± 0,65	54,12 ± 2,32	< 0,001
LVM 2D	128,93 ± 5,12	173,51 ± 7,31	195,20 ± 22,12	< 0,001
LVMI	85,22 ± 4,77	100,30 ± 4,33	111,29 ± 9,20	0,044

Có mối tương quan thuận giữa LV EF với LV GLS (r = 0,533, p < 0,001). Nhóm có LV EF ≥ 60% thì LV GLS cao hơn so với nhóm có LV EF 50 – 60% (-17,50 ± 0,59 so với -14,81 ± 0,44). Có mối tương quan nghịch giữa khối cơ thất trái với LV GLS (r = - 0,50, p < 0,001). Khối cơ thất trái càng tăng thì LV GLS càng giảm. Tương tự, có mối tương quan nghịch giữa LVMI với LV GLS (r = - 0,383, p = 0,044). Có đến 23 bệnh nhân (63,9%) chưa có PĐTT nhưng LV GLS đã giảm. Trong nhóm BN không có RLCNTTr, có 63,2% BN có LV GLS giảm.

Các yếu tố liên quan LV GLS

So với BN dưới 50 tuổi, BN lớn tuổi (≥ 50 tuổi) có LV GLS thấp hơn (p = 0,787), chỉ số khối cơ thất trái cao hơn (p = 0,028). Không có BN nào dưới 50 tuổi có PĐTT. Ngược lại, có 19 BN (41,3%) từ 50 tuổi trở lên có PĐTT.

BN nam có LV GLS thấp hơn BN nữ (-15,37 ± 2,99 so với -17,23 ± 2,81, p < 0,05).

Bảng 3. Các yếu tố lâm sàng liên quan LV GLS

LV GLS	**≥ -18% (n = 16)**	**< -18% (n = 39)**	**p**

BSA	1,61 ± 0,04	1,66 ± 0,02	0,308
BMI	23,51 ± 0,64	24,63 ± 0,43	0,159
Tần số tim	73,88 ± 2,65	78,95 ± 1,87	0,139
HA tâm thu	131,44 ± 4,29	143,05 ± 3,29	0,052
HA tâm trương	76,88 ± 2,61	87,08 ± 1,77	0,003
HA trung bình	95,06 ± 2,99	105,74 ± 2,11	0,007

Chưa thấy có mối liên quan giữa LV GLS với tuổi, thể trạng, hút thuốc lá, thời gian THA, tần số tim và HA tâm thu của bệnh nhân THA. Các yếu tố có thể có liên quan đến LV GLS ở BN THA bao gồm: giới tính, HA tâm trương, HA trung bình và tuân thủ điều trị. HA tâm trương và HA trung bình càng cao thì LV GLS càng giảm ($p < 0,05$). Nhóm BN không tuân thủ điều trị có LV GLS giảm nhiều hơn so với nhóm BN tuân thủ điều trị (-14,36 ± 0,67 so với -16,80 ± 0,47, $p = 0,008$).

BÀN LUẬN

Một số nghiên cứu sử dụng STE đã chứng minh rằng ở người luyện tập thể thao, cơ tim có phì đại nhưng LV GLS lại bình thường hoặc tăng chứ không giảm. Ngược lại, BN THA có phì đại cơ tim và có giảm LV GLS. Bệnh tim do THA được đặc trưng bằng phì đại cơ tim thất trái do tăng hậu tải. Trong giai đoạn sau của THA, hiện tượng xơ hóa cơ tim sẽ dần dần xuất hiện [6]. Trong giai đoạn đầu của THA, LV EF còn trong giới hạn bình thường nhưng chức năng tâm thu của thất trái thực sự đã có những thay đổi. Những biến đổi dưới lâm sàng của chức năng tâm thu thất trái có thể được lượng giá thông qua LV GLS [5]. Nghiên cứu của chúng tôi không có BN nào có LV EF < 50%, nhưng có 39 BN (70,9%) có LV GLS giảm (< -18%). Các nghiên cứu khác cũng cho thấy tất cả BN đều có LV EF bảo tồn nhưng tỉ lệ giảm LV GLS là 45,5% đến 94,7% (Bảng 4). Điều này chứng tỏ trong nhóm BN THA, LV EF vẫn còn trong giới hạn bình thường trong khi đó LV GLS đã có thay đổi rõ rệt.

Bảng 4. Tỉ lệ giảm LV GLS so sánh với các nghiên cứu khác

	LV GLS giảm	**Ngưỡng cắt LV GLS**
Santos và cs [17]	66,67%	-18,7%
Soufi Taleb Bendiab và cs [13]	45,5%	-17%
Nguyễn Thị Diễm [1]	94,7%	-16,52%
Chúng tôi	70,9%	-18%

LV GLS thay đổi sớm trên BN THA có thể được lý giải là do sự thay đổi về sinh hóa hay huyết động hoặc phối hợp cả hai. Sự gia tăng mãn tính áp lực thành tim cuối tâm thu có thể thúc đẩy sự tổng hợp collagen ở lớp dưới nội mạc, vì vậy làm giảm biến dạng theo trục dọc. Cùng với sự thay đổi về hóa sinh này, xơ hóa cơ tim là một trong những yếu tố góp phần làm suy giảm chức năng cơ tim ở BN THA. Về huyết động, sự gia tăng áp lực thành tim cuối tâm thu, còn gọi là tăng hậu tải, đóng vai trò quan trọng trong rối loạn chức năng cơ tim theo trục dọc ở BN THA [7].

Ở những BN suy tim có phân suất tống máu bảo tồn, LV GLS có thể phát hiện rối loạn về cơ học của cơ tim. Park và cs tìm thấy giá trị LV GLS giảm ở khoảng 84% BN suy tim có phân suất tống máu bảo tồn và có liên quan đến tăng tỷ lệ tử vong do mọi nguyên nhân [10]. Mặt dù bằng chứng lâm sàng ít hơn so với LV EF, LV GLS cũng đã chứng minh được độ tin cậy và độ lặp lại cao, đồng thời có giá trị tiên lượng ngày càng tăng ở các BN không chọn lọc, để đánh giá chức năng thất trái khi nghỉ [8],[14].

LV EF là một trong các thông số siêu âm tim thường được sử dụng trên lâm sàng để tiên lượng BN suy tim. Tuy nhiên, LV EF là một thông số phụ thuộc vào hình dạng của thất, đặc biệt phụ thuộc vào công thức ước tính hình học, không phản ánh chính xác chức năng của thất. LV GLS là một thông số khách quan, đánh giá được sự biến dạng cơ học của thất, không bị ảnh hưởng bởi sự co cơ thụ động của vùng cơ tim thiếu máu hoặc mô sẹo, đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu là có giá trị tiên lượng và dự báo tử vong độc lập ở các BN suy tim [38]. Trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hoài và cs, với điểm cắt là -7,2%, LV GLS là một yếu tố tiên lượng độc lập ở BN suy tim mạn tính có LV EF < 40%. LV GLS có giá trị tiên lượng tử vong và tái nhập viện tốt hơn LV EF, đường kính tâm trương thất trái, đường kính nhĩ trái, nồng độ NT – proBNP, nồng độ Troponin T lúc nhập viện [2].

STE đã được công nhận là một phương pháp khảo sát biến dạng cơ tim, khi so sánh với cộng hưởng từ - được xem là tiêu chuẩn vàng để đánh giá rối loạn cấu trúc và chức năng cơ tim. Trong một nghiên cứu thực nghiệm, Amundsen và cs đã ghi nhận khảo sát LV GLS bằng STE có thể cho kết quả tương tự như thông số biến dạng cơ tim tâm thu theo trục dọc của cộng hưởng từ (r = 0,90, p < 0,001) [4].

Khối cơ thất trái của nghiên cứu của Santos và cs cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi do thực hiện ở người Brazil có chiều cao, cân nặng và BSA cao hơn người Việt Nam. Sau khi hiệu chỉnh với diện tích da, nhìn chung, không quá khác biệt về chỉ số khối cơ thất trái giữa hai nghiên cứu [17]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Diễm [1] có tỉ lệ BN có PĐTT thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi, dù thời gian THA, phân độ THA đều cao hơn, tuy nhiên BMI và tỉ lệ BN hút thuốc lá lại thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi.

Nghiên cứu của chúng tôi có 19 bệnh nhân (34,5%) có PĐTT. Soufi Taleb Bendiab và cs cho thấy PĐTT xảy ra ở 136 BN (68%). Giá trị LV GLS thấp (< -17%) được tìm thấy ở 91 BN (45,5%), trong đó 68 BN có PĐTT và 23 BN không có PĐTT. Trong phân tích đơn biến, LV GLS giảm có liên quan đến PĐTT đồng tâm (p = 0,001). Trong phân tích đa biến, PĐTT (p = 0,001) vẫn liên quan đến sự giảm LV GLS. Tỷ lệ BN THA chưa có PĐTT nhưng có LV GLS giảm là 35,9%. Tỷ lệ BN THA có PĐTT nhưng LV GLS bình thường là 68 / 136 (50%) [13].

Nghiên cứu của chúng tôi có 62,46% BN THA có RLCNTTr độ I và độ II. Nghiên cứu của Slama M và cs. cho thấy RLCNTTr là yếu tố chính góp phần vào bệnh tim THA và tiến triển thành suy tim sung huyết có triệu chứng. Khoảng 40% BN THA có RLCNTTr [12]. RLCNTTr thường gặp ở người lớn tuổi có THA, tần suất RLCNTTr trung bình – nặng ở BN có LV EF > 50% là 5,6% [11].

KẾT LUẬN

Tóm lại, STE được tự động hóa, khách quan hơn, không bị nhiễu bởi sự co thụ động của các vùng cơ tim thiếu máu hoặc hoại tử kế cận. Đồng thời STE không bị phụ thuộc bởi góc đo và ít bị phụ thuộc vào sức tải của tim. LV GLS là một thông số có thể được sử dụng để chẩn đoán và điều trị suy tim với phân suất tống máu bảo tồn. LV GLS bị giảm ở những BN suy tim bất kể LV EF và thông số này đã chứng minh giá trị tiên lượng tốt hơn LV EF [10]. Với độ lặp lại và độ tin cậy cao, LV GLS không chỉ được ứng dụng trong THA mà còn nhiều bệnh lý khác như bệnh cơ tim phì đại, bệnh cơ tim do hóa trị, hẹp động mạch chủ, nhồi máu cơ tim và bệnh tim thiếu máu cục bộ [15].

Việc thực hiện siêu âm tim đánh dấu mô đánh giá biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái ở các bệnh nhân tăng huyết áp là cần thiết, dù chưa có biến đổi trên các thông số siêu âm tim thường qui. Đặc biệt cần khảo sát bệnh nhân tăng huyết áp có béo phì, hút thuốc lá, không tuân thủ điều trị và chưa kiểm soát huyết áp mục tiêu nhằm phát hiện sớm các biến

đổi về chức năng cơ tim. Từ đó giúp phân tầng nguy cơ tim mạch, lựa chọn chiến lược điều trị thích hợp và tiên lượng cho bệnh nhân. Cần nghiên cứu với quy mô lớn hơn, đánh giá theo thời gian, tìm mối liên quan giữa biến dạng cơ tim tổng dọc thất trái với các yếu tố như rối loạn lipid máu ở bệnh nhân tăng huyết áp. Các nghiên cứu tiếp theo có thể đánh giá thay đổi LV GLS sau điều trị THA một thời gian nhất định**.**

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Diễm (2017), "Nghiên cứu chức năng thất trái bằng siêu âm đánh dấu mô cơ tim ở bệnh nhân tăng huyết áp nguyên phát", Luận án Tiến sĩ Y học, Trường đại học Y dược Huế.
2. Nguyễn Thị Thu Hoài (2018), "Nghiên cứu giá trị tiên lượng tái nhập viện và tử vong của chỉ số sức căng dọc thất trái trên siêu âm tim đánh dấu mô speckle tracking ở bệnh nhân suy tim mạn tính", *Tạp chí Tim mạch học Việt Nam* số 82, tr.33-40.
3. Lang M. R., Badano P. L. et al (2016), "Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of, Cardiovascular Imaging", *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*, 17 (4), 412.
4. Amundsen B. H., Helle-Valle T., Edvardsen T., et al (2006), "Noninvasive myocardial strain measurement by speckle tracking echocardiography: validation against sonomicrometry and tagged magnetic resonance imaging", *J Am Coll Cardiol*, 47 (4), 789-93.
5. Cuspidi C., Meani S., Valerio C., et al (2006), "Left ventricular hypertrophy and cardiovascular risk stratification: impact and cost-effectiveness of echocardiography in recently diagnosed essential hypertensives", *J Hypertens*, 24 (8), 1671-7.
6. Geyer H., Caracciolo G., Abe H., et al (2010), "Assessment of myocardial mechanics using speckle tracking echocardiography: fundamentals and clinical applications", *J Am Soc Echocardiogr*, 23 (4), 351-69; quiz 453-5.
7. Lorell B. H., Carabello B. A. (2000), "Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis", *Circulation*, 102 (4), 470-9.
8. Mignot A., Donal E., Zaroui A., et al (2010), "Global longitudinal strain as a major predictor of cardiac events in patients with depressed left ventricular function: a multicenter study", *J Am Soc Echocardiogr*, 23 (10), 1019-24.
9. Mor-Avi V., Lang R. M., Badano L. P., et al (2011), "Current and evolving echocardiographic techniques for the quantitative evaluation of cardiac mechanics: ASE/EAE consensus statement on methodology and indications endorsed by the Japanese Society of Echocardiography", *J Am Soc Echocardiogr*, 24 (3), 277-313.
10. Park J. J., Park J. B., Park J. H., et al (2018), "Global Longitudinal Strain to Predict Mortality in Patients With Acute Heart Failure", *J Am Coll Cardiol*, 71 (18), 1947-1957.
11. Redfield M. M., Jacobsen S. J., Burnett J. C., Jr., et al (2003), "Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic", *Jama*, 289 (2), 194-202.
12. Slama M., Susic D., Varagic J., et al (2002), "Diastolic dysfunction in hypertension", *Curr Opin Cardiol*, 17 (4), 368-73.
13. Soufi Taleb Bendiab N., Meziane-Tani A., Ouabdesselam S., et al (2017), "Factors associated with global longitudinal strain decline in hypertensive patients with normal left ventricular ejection fraction", *Eur J Prev Cardiol*, 24 (14), 1463-1472.

14. Yingchoncharoen T., Agarwal S., Popovic Z. B., et al (2013), "Normal ranges of left ventricular strain: a meta-analysis", *J Am Soc Echocardiogr*, 26 (2), 185-91.
15. Collier Patrick, Phelan Dermot, Klein Allan (2017), "A Test in Context: Myocardial Strain Measured by Speckle-Tracking Echocardiography", *Journal of the American College of Cardiology*, 69 (8), 1043-1056.
16. Marwick Thomas, Yu C. M., Sun Jing Ping (2008), "Myocardial Imaging - Tissue Doppler and Speckle Tracking".
17. Santos A. B. S., Foppa M. (2019), "Stage I hypertension is associated with impaired systolic function by strain imaging compared with prehypertension: A report from the prever study", 21 (11), 1705-1710.

KHẢO SÁT CÁC ĐIỀU KIỆN THU HỒI DẦU TỪ HẠT CÂY SACHA INCHI (SACHI) TRỒNG TẠI VIỆT NAM BẰNG PHƯƠNG PHÁP CƠ HỌC

Phan Thế Duy*, Lê Thị Diên, Nguyễn Thị Tố Oanh, Lê Xuân Tín
Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh
*Tác giả liên lạc: duypt@hufi.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện đối với mẫu hạt Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) thu hoạch ở Daklak. Hạt được phơi khô đến độ ẩm khoảng 5-6%, tiến hành tách bỏ vỏ cứng màu nâu đen sau đó đem nghiền và ép dầu. Phân tích thành phần hóa học cho thấy nhân hạt Sachi có hàm lượng dầu khoảng 54,41%, hàm lượng protein là 31,30%. Nghiên cứu này đánh giá sự ảnh hưởng của điều kiện ép bao gồm: kích thước hạt, tốc độ vòng quay của trục vít và nhiệt độ đầu ép đến hiệu suất ép, độ kháng oxy hóa và chất lượng của dầu hạt Sachi thô. Theo khảo sát, điều kiện cho hiệu suất ép cao nhất khoảng 91% khi ép ở nhiệt độ đầu ép là 90℃ với kích thước 3-5 mm và tốc độ vòng quay là 70 rpm. Dầu hạt Sachi sau khi ép ở điều kiện trên được phân tích thành phần và các chỉ số về chất lượng dầu. Dầu có chỉ số iodine là 176,37 g/100g, chỉ số axit khoảng 2,06 mg/g, chỉ số peroxit là 8,95 meq O_2/kg dầu và giá trị IC_{50} là 90,58 mg/ml.

***Từ khóa**: Dầu Sachi, ép trục vít, DPPH*

OIL EXTRACTED CONDITIONS FROM SACHA INCHI (SACHI) SEED HARVESTED IN VIETNAM BY MECHANICAL METHOD

Phan The Duy*, Le Thi Dien, Nguyen Thi To Oanh, Le Xuan Tin
Ho Chi Minh City University of Food Industry
Corresponding author: *duypt@hufi.edu.vn*

ABSTRACT

The study was performed on the Sacha inchi seed (Plukenetia volubilis L.) harvested in Daklak (Vietnam). Seeds are dried to a moisture content of 5-6%, peeling off the black hard shell, crushing and pressing oil. Chemical composition of Sachi kernel content about 54.41% for oil, 31.30% for protein. The extraction condition effects were examined on the pressing efficiency, oxidation degree and quality of crude Sachi kernel oi, include: particle size, rotation speed of the shaft and pre-heat temperature. According to the survey, the highest extraction efficiency (~91%) obtained at 90^{o}C for pre-heat temperature, 3-5 mm for the particle size and 70 rpm for the rotation speed. Sachi oil obtained under these conditions is determined the chemical composition and oil quality indexes. The oil quality are descripted with 176,37 g/100g for iodine index, 2.06 mg/g for acidity index, 8,95 meq O_2/kg for peroxide index and 90,58 mg/ml for IC_{50} value.

***Keyword:** Sachi Oil, Extrusion, DPPH*

TỔNG QUAN

Cây Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L) gọi tắt là Sachi, là một loài dây leo lâu năm có thân bán gỗ, thuộc họ Thầu dầu (Euphorbiaceae) thường mọc trong các rừng nhiệt đới của Mỹ ở độ cao từ 200 đến 1500 m. Loại cây này có nguồn gốc từ vùng rừng rậm nhiệt đới Amazon ở Peru và thường biết đến với cái tên "Đậu phộng Inca", "Đậu phộng hoang dã" hay "Đậu núi" (Guillén và cộng sự, 2003). Hiện nay, nhiều nước trên thế giới đã phát triển việc trồng cây Sachi như Peru, Ecuador, Colombia. Thị trường xuất khẩu chủ yếu là Mỹ, Nhật Bản và các nước thành viên thuộc Liên minh EU.

Cây Sacha inchi được đưa về trồng ở Việt Nam từ năm 2012 và được biết đến với một số tên khác như đậu núi, đậu sao (vì quả có hình ngôi sao). Sachi được xếp vào loại cây dược liệu mới ở Việt Nam và đã được trồng ở các tỉnh ở Tây Nguyên và miền núi phía Bắc như Sơn La, Hòa Bình, Vĩnh Phúc (Tram NT, 2016).

Theo nghiên cứu của Guillén và cộng sự (2003), thì hạt Sachi ở Peru chứa hàm lượng chất dầu cao (35-60%), bao gồm các thành phần axit béo tốt với hàm lượng chất béo không bão hòa cao. Theo nghiên cứu của Học viện Nông nghiệp Việt Nam, hạt Sachi trồng tại Việt Nam có hàm lượng dầu là 47,7% (Lien NTK, 2019). Dầu Sachi có lượng chất béo không bão hòa đa cao khoảng 84% tổng số axit béo, lượng axit không bão hòa đơn là 9% và lượng chất béo bão hòa là 7% (Muangrat et al., 2018). Axit α-linolenic (ω-3, 46,8-50,8%) là axit béo chính được tìm thấy trong dầu Sachi, tiếp theo là axit linoleic (ω-6, 33,4-36,2%), axit oleic (ω-9, 8,7-9,6%). Tỷ lệ axit béo ω-6/ω-3 của dầu Sachi nằm trong khoảng 0,81-1,12 (Chirinos et al., 2013). Khi tỷ lệ ω-6/ω-3 là 0,25-1,0 được coi là tốt cho sức khỏe con người (Simopoulos, 2011), do đó dầu Sachi có thể nói có rất nhiều lợi ích khi được chế biến và sử dụng hợp lý trong thực phẩm.

Các sản phẩm từ Sachi đã được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Dầu Sachi có giá trị thương mại cao với nhiều đặc tính tốt cho sức khỏe và hương vị độc đáo. Trong y dược, dầu Sachi được sử dụng để chăm sóc da, làm mềm da, chữa lành vết thương, điều trị các vết côn trùng cắn và da bị nhiễm trùng (Moser et al., 2007). Các sản phẩm mỹ phẩm từ Sachi được biết đến với khả năng kháng khuẩn, chống viêm, săn chắc da và chống lão hóa. Các mỹ phẩm, dược phẩm có chứa protein, dầu từ hạt Sachi đã liên tục được phát triển và được cấp nhiều bằng sáng chế (Gonzalez et al., 2015). Với những lợi ích mà dầu Sachi mang lại, dầu Sachi hứa hẹn là một "siêu thực phẩm" có giá trị dinh dưỡng cũng như giá trị kinh tế cao trong tương lai. Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất ép cũng như đánh giá chất lượng dầu thu được bằng phương pháp cơ học sử dụng máy ép trục vít quy mô nhỏ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu và dụng cụ

Nguyên liệu được chọn nghiên cứu là hạt Sachi phơi khô được bao gói trong các túi hút chân không. Hạt được đặt mua từ thôn Tân Xuân, xã Eatoh, huyện Krong Năng, tỉnh Daklak. Phần nhân hạt được thu bằng cách tách bỏ vỏ cứng màu nâu đen và loại bỏ những hạt hư hỏng. Sau đó phần nhân này được đem đi nghiền nhỏ, rây để phân loại theo các kích thước khảo sát và được bảo quản trong các túi zip ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu đơn yếu tố được sử dụng. Thí nghiệm sau kế thừa kết quả nghiên cứu của thí nghiệm trước. Để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đầu ép, tiến hành khảo sát ở 4 mốc nhiệt độ khác nhau: 75^{o}C, 90^{o}C, 105^{o}C và 120^{o}C. Các thông số khác được cố định: kích thước nguyên liệu, tốc độ vòng quay trục vít lần lượt là 3-5 mm và 70 rpm. Nhiệt độ thích hợp được chọn dựa vào hiệu suất.

Để nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu, khảo sát 3 khoảng kích thước khác nhau: 1-2 mm, 2-3 mm và 3-5 mm bằng rây kỹ thuật. Các thông số khác được cố định: nhiệt độ đầu ép, tốc độ vòng quay trục vít lần lượt là 90^{o}C và 70 rpm. Kích thước hạt thích hợp được chọn dựa vào hiệu suất.

Ảnh hưởng của tốc độ vòng quay đến hiệu suất thu hồi, khảo sát ở 5 mức khác nhau lần lượt ở các mức là 40, 50, 60, 70 và 80 rpm. Thông số được giữ cố định: nhiệt độ, kích

thước hạt được chọn ở thí nghiệm trên. Tốc độ vòng quay thích hợp được chọn dựa vào hiệu suất.**Phương pháp xác định**

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp bắt gốc tự do DPPH (Muangrat et al., 2018)

Về nguyên tắc, các chất kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydrogen, làm giảm độ hấp thu tại bước sóng cực đại và màu của dung dịch phản ứng nhạt dần, chuyển từ màu tím sang màu vàng nhạt. Giá trị độ hấp thu càng thấp chứng tỏ khả năng bắt gốc tự do DPPH càng cao.

Tiến hành trích ly pha phenolic của các mẫu dầu bằng cách trộn 10 g dầu Sachi với 10 ml n-hexane và 10 ml dung dịch methanol/nước (80/20, v/v). Hỗn hợp được khuấy mạnh bằng máy lắc vortex trong 3 phút và tiếp tục được ly tâm ở tốc độ 5500 rpm trong 15 phút. Phần dịch trích pha phenolic nằm phía trên được đem đi pha loãng bằng methanol thành các nồng độ 10-100 mg/ml. Phần dịch trích pha phenolic này được sử dụng để xác định khả năng kháng oxy hóa của mẫu dầu.

Quy trình xác định thực hiện như sau: Bổ sung 5 ml DPPH (0,08 mM, pha trong ethanol) vào mỗi ống nghiệm đã chứa 1 ml mẫu dịch trích pha phenolic tại các nồng độ khác nhau (10-100 mg/l). Để yên 30 phút trong bóng tối sau đó, tiến hành đo giá trị độ hấp thu tại bước sóng 517 nm. Mẫu trắng được thực hiện tương tự thay 1 ml mẫu bằng 1 ml ethanol.

Tỷ lệ phần trăm hoạt tính kháng oxy hóa (%ƯC) được xác định theo công thức sau:

$$\% \text{ ƯC} = \frac{\text{Ao-A1}}{\text{Ao}} * 100$$

Trong đó:

Ao: độ hấp thụ của mẫu kiểm chứng

A1: độ hấp thụ của mẫu thí nghiệm

Từ vào kết quả trên, tính được giá trị IC_{50} - hay còn gọi là EC_{50} (Efficient concentration). Dựa vào IC_{50} để khẳng định độ kháng oxy hóa của mẫu dầu phân tích.

Phương Pháp xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại ba lần, kết quả được trình bày ở dạng giá trị trung bình ± giá trị sai số. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Microft Office Excel 2016 và phần mềm SPSS. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử LSD, Ducan.

Đồ thị được vẽ bằng chương trình Microsoft Office Excel 2016.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát thành phần hoá lý mẫu hạt Sachi

Từ Bảng 1 nhận thấy nguyên liệu có độ ẩm tương đối thấp (5,21±0,04%), nằm trong khoảng độ ẩm từ 0-13%, khoảng độ ẩm phù hợp cho việc chế biến và lưu trữ mà không bị vi sinh vật phân hủy triacylgycerols (James, 2013). Như vậy, nguyên liệu có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng mà không cần sấy để giảm độ ẩm.

Hàm lượng chất béo, protein trong nguyên liệu ở mức cao lần lượt là 54,41±0,72% và 31,30±0,49%, kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Follegatti và cộng sự (2009), về hàm lượng dầu (54%), hàm lượng protein (33%) trong hạt Sachi ở Peru (54%). So với nghiên cứu của Viện Dinh dưỡng về hạt Sachi ở Việt Nam (2019) (Lien NTK, 2019) thì cho kết quả cao hơn với hàm lượng dầu là 47,7% và hàm lượng protein là 27,5%. Sự khác nhau này có thể là do có sự khác biệt về điều kiện khí hậu, đất đai, phương pháp canh tác, giống cây trồng hoặc cũng có thể do phương pháp phân tích khác nhau.

Bảng 1. Thành phần có trong mẫu nguyên liệu

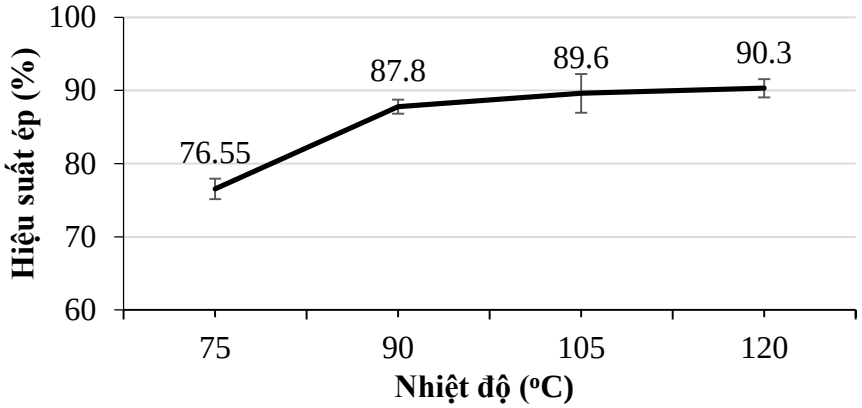
Chỉ tiêu	Độ ẩm (%)	Tro toàn phần (%)	Hàm lượng chất béo (%)	Hàm lượng protein (%)
Giá trị	5,21 ± 0,04	2,76 ± 0,02	54,41 ± 0,72	31,30 ± 0,49

Kết quả thí nghiệm khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình ép

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ đầu ép đến hiệu suất ép dầu Sachi

Nhiệt độ đầu ép là một trong những yếu tố quan trọng quyết định đến hiệu suất ép cũng như chất lượng dầu sau khi ép. Kết quả cho thấy nhiệt độ càng tăng dần thì hiệu suất ép của máy cũng tăng theo (Kartika et al., 2005). Máy ép trục vít dùng phương pháp ép và tách dầu bằng nhiệt độ, ép sẽ thành dầu thô, kết hợp với nhiệt độ trong buồng ép để làm chín nguyên liệu thành dạng dầu tinh. Mục đích của việc làm nóng đầu ép là loại bỏ nước dư thừa trong nguyên liệu và cải thiện chất lượng dầu thu được. Do đó, ở nhiệt độ 75^{o}C chưa đủ để làm chín nguyên liệu dẫn đến lượng dầu ép thu được chưa triệt để kéo theo hiệu suất chưa đạt tối ưu nhất.

Tuy nhiên nếu tiếp tục gia nhiệt đầu ép lên trên 100^{o}C, hiệu suất ép thu được gần như là bão hoà và không thể tăng được nữa, đồng thời màu sắc của dầu ép bắt đầu có dấu hiệu chuyển sang màu sẫm hơn và xuất hiện mùi khét. Để hạn chế sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên chất lượng dầu mà vẫn đảm bảo hiệu suất ép cao, nhiệt độ đầu ép 90^{o}C được lựa chọn để khảo sát các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả trên khá tương đồng với nghiên cứu của Muangrat và cộng sự (2018).

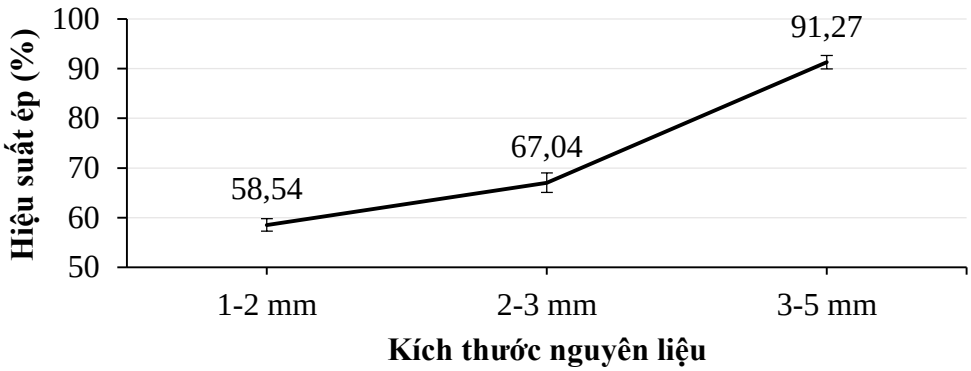


Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đầu ép đến hiệu suất ép dầu

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của kích thước hạt đến hiệu suất ép dầu Sachi

Hình 2 thể hiện hiệu suất ép bị ảnh hưởng bởi kích thước nguyên liệu khi cho vào máy ép trục vít, với kích thước 3-5 mm sẽ thu được hiệu suất cao nhất, kích thước nguyên liệu càng nhỏ hoặc càng lớn (> 5 mm) thì quá trình thực hiện dễ bị kẹt trục ép dẫn đến khó khăn trong việc thu hồi dầu. Nguyên nhân là áp lực trong lòng máy ép vít được tạo thành là do sự nén nguyên liệu và sức phản kháng của nguyên liệu, áp lực này lớn hay bé tùy thuộc vào cấu tạo lồng ép và trục vít. Tiết diện khe côn tại cửa ra không bé hơn bất cứ điểm nào trong lồng ép, vì thế nên nguyên liệu chuyển động sẽ bị nén trở lại tức là tạo cho máy ép có áp lực. Mặt khác, do trục vít có sự thay đổi bước vít (ngắn dần về phía ra bã ép), đường kính của lòng ép cũng thay đổi, nhỏ dần về cửa ra bã ép, cho nên muốn chứa được lượng nguyên liệu từ đoạn sau chuyển tới buộc phải xảy ra sự nén, tức là tạo nên áp lực. Nếu cho vào máy ép một lượng hạt có kích thước quá nhỏ, khi trục vít quay dễ xảy ra sự

kẹt nguyên liệu vì diện tích tiếp xúc của nguyê liệu quá lớn. Từ kết quả phân tích trên thì kích thước nguyên liệu là 3-5 mm sẽ được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

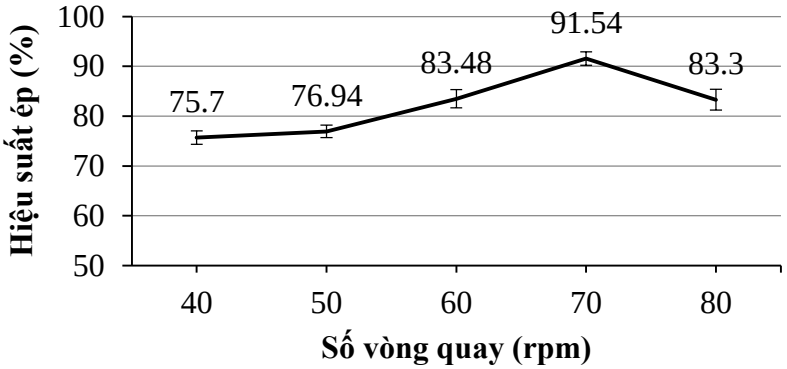


Hình 2. Ảnh hưởng của kích thước nguyên liệu đến hiệu suất ép

Kết quả thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của tốc độ quay của trục vít đến hiệu suất ép dầu Sachi

Nguyên liệu được tiến hành ép ở các mức tốc độ khác nhau, nhằm xác định tốc độ của trục phù hợp để ép dầu cho hiệu suất cao. Số vòng quay của trục được khảo sát ở các mức độ lần lượt là 40, 50, 60, 70 và 80 rpm.

Kết quả thu được cho thấy khi tăng tốc độ quay từ 70 rpm thì hiệu suất ép dầu ổn định nhất, nhưng tiếp tục tăng tốc độ trục ép thì hiệu suất giảm nhẹ. Nhìn chung, nếu tốc độ trục quay quá lớn thì hiệu suất ép dầu giảm. Nguyên nhân chính là do tốc độ quay có liên quan đến lực nén trên chiều dài trục ép khi tốc độ quay cao, làm cho lượng dầu thoát ra ít hơn dẫn đến hiệu suất giảm. Khi tốc độ quay của trục quá chậm dẫn đến thời gian nén trên trục kéo dài và các tế bào dính kết vào nhau, do vậy trục nén không thể nén và lực không trải đều trên cả chiều dài của trục nén. Đồng thời nhiệt sinh ra lớn trong suốt thời gian dài nén, làm cho thất thoát dầu có thể tăng cao. Do vậy, tốc độ quay của trục ép là 70 rpm để thu được hiệu suất ép dầu là cao nhất. Kết quả trên tương đối phù hợp với nghiên cứu của Akkarachaneeyakorn và cộng sự (2015).



Hình 3. Ảnh hưởng của tốc độ vòng của trục máy đến hiệu suất ép

Kết quả phân tích thành phần và đánh giá chất lượng dầu thu được

Dầu sau khi được ép ra khỏi máy ép được bảo quản trong hũ thuỷ tinh nâu 100 ml có nắp đậy nhằm loại bỏ các yếu tố bất lợi có tác động đến chất lượng dầu. Sau khi được ly tâm tách cặn, mẫu dầu sẽ được gửi đi tiến hành phân tích thành phần bằng phương pháp GC-MS. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2 cho thấy dầu Sachi thu được có hàm lượng axit béo không bão hòa cao. Axit béo ω-3 chiếm 39,50%, axit ω-6 chiếm 34,45, axit ω-9 chiếm 13,20%,…Trong đó, tỉ lệ giữa ω-6/ω-3 của dầu Sachi là khoảng 0,87. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Chirinos và cộng sự (2013) về tỉ lệ ω-6/ω-3 (0,81-1,12). Đây được xem là tỉ lệ tốt cho sức khỏe con người (Simopoulos, 2011), thích hợp để phát triển thêm các sản phẩm thực phẩm mới có bổ sung nguồn ω-3, ω-6 từ thực vật.

Bảng 2. Một số thành phần axit béo có trong dầu Sachi

Axit béo	Kết quả (% tổng lượng axit béo)
C16:0 (axit palmitic)	6,72
C18:0 (axit stearic)	4,77
C18:1 (axit oleic)	13,20
C18:2 (axit linoleic)	34,45
C18:3 (axit α-linolenic)	39,50

Ảnh hưởng của nhiệt độ đầu ép đến chỉ số axit

Dựa vào kết quả trên ta nhận thấy với mỗi mức nhiệt độ tăng dần thì chỉ số axit của dầu tăng nhẹ, nhìn chung dầu Sachi sau khi ép qua máy ép trục vít có chỉ số axit tương đối ổn định phù hợp với kết quả nghiên cứu của Muangrat và cộng sự (2018). Nguyên nhân của sự gia tăng chỉ số axit khi nhiệt độ tăng là do khi đầu ép bị đốt nóng khiến lượng dầu sau khi ép ra cũng bị làm nóng đồng thời có sự tham gia của oxi không khí dẫn đến làm thúc đẩy các phản ứng oxi hoá làm tạo thành các sản phẩm oxi hoá với các nhóm cacboxyl tự do (Velasco et al., 2004).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đầu ép đến chỉ số axit

Nhiệt độ trục ép	**75ºC**	**90ºC**	**105ºC**	**120ºC**
Chỉ số axit (mg KOH/g dầu)	2,06 ± 0,05	2,29 ± 0,08	2,40 ± 0,07	2,72 ± 0,12

Ảnh hưởng của số vòng quay của trục vít đến chỉ số iodine

Dựa vào kết quả trên cho thấy ảnh hưởng của số vòng quay trục vít lên chỉ số iodine tương đối không đáng kể, chỉ biến động nhẹ trong khoảng 172-176 (g I_2/ 100g dầu) phù hợp với kết quả nghiên cứu của Liu và cộng sự (2014). Chỉ số iodine đặc trưng cho số lượng axit béo không no trong thành phần của chất béo, khả năng ổn định của chất béo đối với sự oxy hóa, polymer hóa và mức độ bảo quản chất béo. Số liệu ở Bảng 4 đã cho thấy chỉ số iodine ở tất cả các số vòng quay đều đạt giá trị cao trên 100. Chỉ số này càng cao chứng tỏ dầu càng giàu axit béo chưa bão hòa, những axit béo chưa no này (oleic, linoleic, linolenic, …) rất đặc trưng cho dầu Sachi, cần thiết và có giá trị dinh dưỡng rất cao đối với con người. Tuy nhiên dầu rất dễ bị oxi hoá cần phải có phương pháp bảo quản hợp lý trong quá trình tồn trữ để sử dụng về sau.

Bảng 4. Ảnh hưởng của số vòng quay của trục vít đến chỉ số iodine

Số vòng quay	**40 rpm**	**50 rpm**	**60 rpm**	**70 rpm**	**80 rpm**
Chỉ số iodine (g I_2/100 g dầu)	173,77 ± 1,01	172,78 ± 2,00	172,17 ± 1,58	176,37 ± 1,55	174,58 ± 1,60

Kết quả thí nghiệm đánh giá độ kháng oxi hoá của dầu sau khi ép theo phương pháp bắt gốc tự do DPPH

Chất chống oxy hóa là một chất hoặc một nhóm hợp chất có khả năng ngăn ngừa và loại bỏ tác dụng độc hại của các gốc tự do một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Chất chống oxy hóa có thể trực tiếp phản ứng với các gốc tự do hoạt động để tạo ra những gốc tự do mới kém hoạt động hơn, từ đó có thể ngăn cản chuỗi phản ứng dây chuyền được khơi mào bởi các gốc tự do.

Từ kết quả của Bảng 5, với sự gia tăng của nhiệt độ của đầu ép trục vít thì chỉ số DPPH IC_{50} cũng tăng. Các giá trị thu được lần lượt là 43,77; 90,58, 158,53 và 170,21 mg/ml đối với dầu có nhiệt độ đầu ép là 75, 90, 105 và 120^{o}C. Những kết quả này cho thấy rằng nhiệt độ đầu ép tăng sẽ làm giảm khả năng kháng oxi hóa của dầu, do đó nên chọn nhiệt độ đầu ép thấp nhất (75^{o}C) khi thu hồi dầu từ hạt Sachi. Điều này luôn luôn đúng với việc khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng kháng oxi hóa của bất kỳ hợp chất sinh học.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ đầu ép đến độ kháng oxi hoá của dầu

Nhiệt độ (^{o}C)	75^{o}C	90^{o}C	105^{o}C	120^{o}C
Giá trị IC_{50} (mg/ml)	43,77 ± 1,89	90,58 ± 2,31	158,53 ± 0,61	170,21 ± 0,84

KẾT LUẬN

Sachi là một loại hạt giàu chất béo, với hàm lượng lipid có trong nguyên liệu hạt khoảng 54%. Ở mỗi điều kiện khảo sát khác nhau sẽ cho hiệu suất thu hồi dầu khác nhau, trong đó yếu tố được chọn là 90^{o}C. Tuy nhiên nếu gia nhiệt quá cao, dầu ép thu được sẽ có chất lượng không tốt cả về cảm quan và giá trị dinh dưỡng. Với điều kiện thay đổi kích thước hạt nguyên liệu ép cũng như số vòng quay của trục máy ép trục vít thì lần lượt tối ưu ở kích thước lớn hơn 3 mm và số vòng quay ở 70 rpm sẽ cho hiệu suất ép cao khoảng 91%. Dầu hạt Sachi sau khi ép ở điều kiện tối ưu được phân tích thành phần và các chỉ số về chất lượng dầu. Dầu có chỉ số iodine là 176,37 g/100g, chỉ số axit khoảng 2,06 mg/g, chỉ số peroxit là 8,95 meq O_2/kg dầu và giá trị IC_{50} là 90,58 mg/ml. Các chỉ số này đều đáp ứng được yêu cầu về dầu thô trong sản xuất thực phẩm. Dầu Sachi thu được có hàm lượng axit béo không bão hòa cao, là nguồn thực phẩm mới có giá trị cao trong sản xuất thực phẩm, thực phẩm chức năng và dược phẩm.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin được chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí thực hiện của Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh (HUFI), thông qua Hợp đồng số 38/HĐ-DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

GUILLÉN M D, RUIZ A, CABO N, CHIRINOS , PASCUAL G. (2003) *Characterization of sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) Oil by FTIR spectroscopy and 1 H-NMR Comparison with linseed oil*, Journal of the American Oil Chemists' Society (2003) 755-762.

N T TRAM. (2016) *Cây đậu núi (Plukenetia volubilis L.): Kết quả nghiên cứu bước đầu và khả năng phát triển ở Việt Nam*. Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn, Vol. 3+4, pp. 62-70.

N T K LIÊN. (2019) *Đánh giá chất lượng và tỷ lệ dầu trong hạt Sacha inchi trồng tại Vĩnh Phúc*. Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Vĩnh Phúc.

MUANGRAT R, VEERAPHONG P, CHANTEE N. (2018) *Screw press extraction of Sacha inchi seeds: Oil yield and its chemical composition and antioxidant properties*. Journal of food processing and preservation, 42(6), e13635

CHIRINOS R, ZULOETA G, PEDRESCHI R, MIGNOLET E, LARONDELLE Y, CAMPOS D. (2013) *Sacha inchi (Plukenetia volubilis): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity*, Food chemistry 1732-1739.

SIMOPOULOS A P. (2011) *Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain*, Molecular neurobiology 203-215.

MOSER P, FREIS O, GILLON V, DANOUX L. (2007) *Extract of a plant belonging to the genus Plukenetia volubilis and its cosmetic use*, U.S. Patent Application.

GONZALEZ ASPAJO G, BELKHELFA H, HADDIOUI-HBABI L, BOURDY G, DEHARO, E. (2015) *Sacha Inchi Oil (Plukenetia volubilis L.), effect on adherence of Staphylococus aureus to human skin explant and keratinocytes in vitro*, Journal of ethnopharmacology 330-334.

C. S. JAMES. (2013) *Analytical chemistry of foods*. Springer Science & Business Media.

FOLLEGATTI-ROMERO, PIANTINO C R, GRIMALDI R, CABRAL F A. (2009). *Supercritical CO_2 extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) seeds*. The Journal of Supercritical Fluids, 49(3), 323-329.

KARTIKA ET AL. (2005) *Oil extraction of oleic sunflower seeds by twin screw extruder: influence of screw configuration and operating conditions*. vol. 22, no. 3, pp. 207-222.

AKKARACHANEEYAKORN ET AL. (2015) *Optimization of oil extraction from gac (Momordica cochinchinensis Spreng) aril using a screw press*. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences, vol. 14, no. 3, pp. 257-268.

VELASCO ET AL, (2004) *Formation of short‐chain glycerol‐bound oxidation products and oxidised monomeric triacylglycerols during deep‐frying and occurrence in used frying fats*, European Journal of Lipid Science Technology, vol. 106, no. 11, pp. 728-735.

LIU Q, XU Y K, ZHANG P, NA Z, ET AL. (2014). *Chemical composition and oxidative evolution of Sacha Inchi (Plukentia volubilis L.) oil from Xishuangbanna (China)*. Grasas y aceites, 65(1), 012

KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH SẢN XUẤT ENZYME L-ASPARAGINASE TỪ NẤM *Aspergillus terreus* ATEG-01943 BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BÁN RẮN

Nguyễn Phạm Tuấn[1*] và Bằng Hồng Lam[2]

[1]Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang

[2]Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: ngphamtuan1983@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định điều kiện thích hợp cho quá trình sản xuất enzyme L-asparaginase từ nấm bằng phương pháp lên men bán rắn và làm tiền đề cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh. Hoạt tính enzyme L-asparaginase, hàm lượng protein, hoạt độ riêng enzyme L-asparaginase và sinh khối nấm được xác định bằng phương pháp quang phổ và phương pháp sấy. Kết quả cho thấy, nấm A. terreus W0707 sản xuất enzyme L-asparaginase dưới các điều kiện như môi trường (Czapek's Dox broth cải tiến), pH môi trường (pH = 8), cơ chất lên men (bã đậu nành), độ mịn cơ chất (2 mm), độ ẩm lên men (70%), mật số bào tử nấm (10^7 bào tử/mL) và thời gian lên men (6 ngày) cho hoạt tính enzyme, hàm lượng protein, hoạt độ riêng enzyme và sinh khối nấm đạt cao nhất lần lượt là 129,78 U/g; 4,07 mg/g; 39,93 IU/mg và 10,15 g.

Từ khóa: *A. terreus ATEG-01943, cơ chất, pH, thời gian lên men, L-asparagianse.*

INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF ENZYME L-ASPARAGINASE FROM *Aspergillus terreus* ATEG-01943 BY SOLID STATE FERMENTATION

Nguyen Pham Tuan[1*] and Bang Hong Lam[2]

[1]An Giang Biotechnology center

[2]An Giang University, Viet Nam Nation University, Ho Chi Minh City

Corresponding author: ngphamtuan1983@gmail.com

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effect of factors on the production of L-asparaginase from this type of fungi by solid state fermentation method and is a prerequisite for the production of products capable of supporting and treating diseases. Enzyme L-asparaginae activity, protein content, biomass fungal and enzyme specific activity assay were determined by spectrophotometer and drying method. The results showed that, A. terreus W0707 strains produced enzyme L-asparaginase under conditions as medium (modified Czapek's Dox broth), substrates (soybean meal), moisture (70%), initial cell density (10^7 spore/mL), pH of medium (pH = 8), size of substrate (2 mm) and fermentation time (6 day), Enzyme L-asparaginae activity, protein content and enzyme specific activity reaches 129.78 U/g; 4.07 mg/g; 39.93 IU/mg and 10.15 g respectively.

Keywords*: A. terreus ATEG, L-asparaginase, pH, substrate, time of fermentation.*

GIỚI THIỆU

Enzyme L-asparagianse (EC3.5.1.1) là một enzyme xúc tác quá trình thủy phân L-asparagine thành L-aspartate và ammonia. Trong điều trị ung thư, L-asparaginase giúp loại bỏ L-asparagine trong các tế bào khối u, do đó kiểm soát tăng trưởng khối u hiệu quả. Trong thực tế, L-asparaginase được sử dụng để điều trị bệnh ung thư Bạch cầu lympho ác tính. Trong tự nhiên, enzyme L-asparaginase có thể được tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau như vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm,… Enzyme L-asparaginase chủ yếu được sản xuất từ vi khuẩn (*E. coli* và *E. carotovora*) do chi phí sản xuất thấp nhưng có nhiều tác dụng phụ, chủ

yếu là phản ứng dị ứng và sốc phản vệ. Những năm trở lại đây, nấm được xem là nguồn tổng hợp enzyme L-asparaginase phong phú và tiềm năng trong tự nhiên [1]. Nấm tổng hợp L-asparaginase bằng hai phương pháp lên men chìm và bán rắn, quá trình lên men bán rắn sản xuất L-asparaginase chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học [2]. Lên men trạng thái bán rắn đã được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm cho các mục đích khác nhau như sản xuất enzyme, sản xuất acid hữu cơ, màu sắc,... [3]. Lên men bán rắn là môi trường sống tự nhiên của hầu hết các vi sinh vật (chủ yếu là nấm và nấm mốc); đòi hỏi ít năng lượng để khử trùng (vì hoạt động của nước thấp hơn); ít bị nhiễm vi khuẩn; sản xuất các sản phẩm có năng suất cao hơn; có một số lợi thế về môi trường; dễ sử dụng cơ chất trong quá trình sản xuất (tận dụng phụ phế phẩm) và dễ quản lý nước thải [4]. Trong quá trình lên men bán rắn để sản xuất hợp chất có hoạt tính sinh học, nấm chịu tác động của các yếu tố như pH, cơ chất, độ mịn cơ chất, mật số bào tử, và thời gian lên men,…. Với những ưu điểm của sản phẩm L-asparaginase và lợi thế của quá trình lên men sản xuất các sản phẩm từ nấm *A. terreus*. Từ đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các yếu tố thích hợp cho quá trình sản xuất L-asparaginase từ nấm và làm nguyên liệu để sản xuất các sản phẩm có hoạt tính sinh học để hỗ trợ và điều trị bệnh.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu

Mẫu nấm *A. terreus* ATEG-01943 được lưu giữ trên môi trường PDA ở 4^0C ở Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ (Human, Hàn Quốc), cân phân tích (Ohaus, Mỹ), $(NH_4)_2SO_4$, TCA, Nessler (Merck, Mỹ),… hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của môi trường lên men đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Nấm *A. terreus* được hoạt hóa trên PDA broth trong 05 ngày, kiểm tra mật số bào tử nấm bằng buồng đếm hồng cầu. Chuẩn công thức chứa 20 g bột bắp và 25 mL môi trường khác nhau ở pH = 7 và độ ẩm 50%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^5 bào tử/mL) và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày. Sau lên men, enzyme thô từ cơ chất được chiết xuất bằng 0,1M dung dịch phosphate (pH = 8), lắc 150 vòng/phút trong 30 phút, ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4^0C, thu phần dịch để phân tích. Hoạt tính L-asparaginase theo Imada [5],: 0,5 mL L-asparagine 4M và 0,5 mL Tris-HCl (pH = 7,2), thêm 0,5 mL enzyme thô và ủ 37^0C trong 30 phút. Sau đó, thêm 0,5 mL tricholoroacetic acid dừng phản ứng (TCA). Mẫu đối chứng tương tự nhưng cho TCA vào trước enzyme. Tiếp theo 0,1 mL dung dịch, 3,75 mL nước cất và 0,2 mL thuốc thử Nessler, ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút và đo độ hấp thụ ở λ=450 nm. Một đơn vị hoạt độ của L-asparaginase là lượng enzyme giải phóng 1 µmol amoniac trong 1 phút ở điều kiện 37^0C.

$$\frac{Unit}{mg}\ enzyme = \frac{\mu mol\ NH_3\ phóng\ thích\ *\ 2,5}{30 * 1 * 0,1}$$

Trong đó: 2,5: tổng thể tích phản ứng (mL); 0,1: thể tích hỗn hợp enzyme sử dụng phản ứng cuối (mL); 30: thời gian phản ứng (phút); 1: thể tích enzyme sử dụng (mL).

Hàm lượng protein theo Lowry [6] và hoạt độ riêng UI/mg = hoạt tính enzyme/hàm lượng protein. Hàm lượng protein được tính dựa vào đường chuẩn BSA. Cách tính hàm lượng protein hòa tan (mg/g): C (mg/g) = A_t /a.

C: Hàm lượng protein (mg/g); A_t: Nồng độ protein của dung dịch phân tích được đọc trên máy (mg/mL); a: Số mg protein đem phân tích.

Sinh khối nấm: cơ chất sau khi lên men được chiết xuất thu enzyme thô, phần cặn được sấy khô ở nhiệt độ 60^0C để xác định sinh khối của nấm sau lên men (g).

Ảnh hưởng của pH môi trường đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g cơ chất (bột bắp) và bổ sung 25 mL môi trường Czapek's Dox broth cải tiến (CD) có pH khác nhau (4; 5; 6; 7; 8 và 9) và độ ẩm 50%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^5 bào tử/mL) vào các công thức và ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày.

Ảnh hưởng của cơ chất lên men đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g cơ chất khác nhau (bột bắp, vỏ lựu, bột đậu nành, cám gạo và bã mía) và bổ sung 25 mL môi trường CD có pH = 8 và độ ẩm 50%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^5 bào tử/mL) vào các công thức và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày.

Ảnh hưởng của độ mịn cơ chất đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g bột đậu nành với độ mịn khác nhau (0,2; 0,5; 1 và 2 mm) qua ray lọc và bổ sung 25 mL môi trường CD có pH = 8 và độ ẩm 50%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^5 bào tử/mL) vào các công thức và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày.

Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g bột đậu nành với độ mịn 2 mm qua ray lọc và bổ sung 25 mL môi trường CD có pH = 8 và độ ẩm khác nhau (30; 50; 70 và 90%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ 10^5 bào tử/mL) vào các công thức và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày.

Ảnh hưởng của mật số tế bào đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g cơ chất (bột đậu nành) với độ mịn 2 mm qua ray lọc và bổ sung 30 mL môi trường CD lên men có pH = 8 và độ ẩm 70%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử nấm khác nhau) vào các công thức và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 3 ngày.

Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Chuẩn bị các công thức thí nghiệm có chứa 20 g bột đậu nành với độ mịn 2 mm qua ray lọc và bổ sung 30 mL môi trường CD có pH = 8 và độ ẩm 70%. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^7 bào tử/mL) vào các công thức và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian lên men khác nhau.

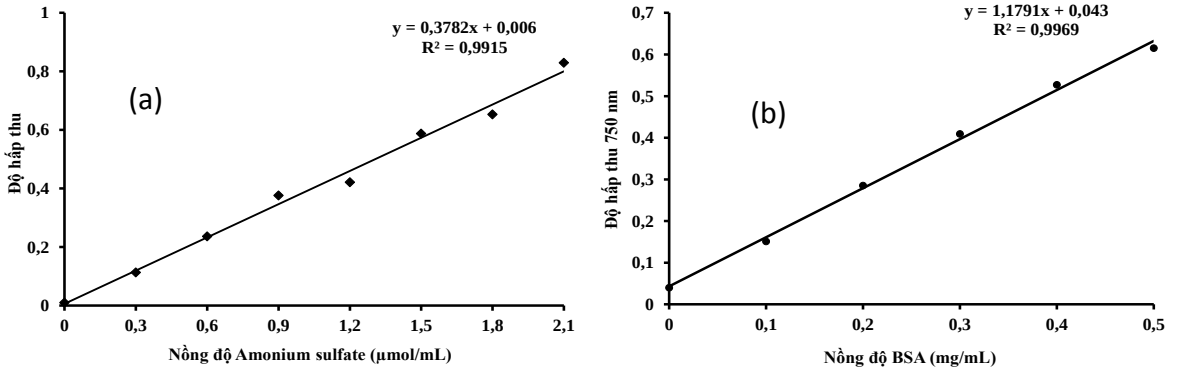
Phương pháp thống kê

Số liệu xử lývà thống kê bằng phần mềm Excel và Statgraphics plus 16.0.

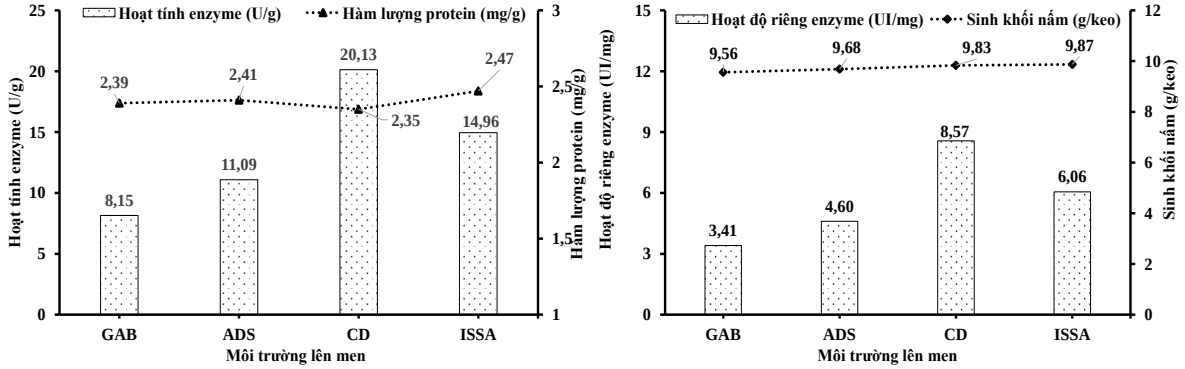
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của môi trường lên men đến sản xuất L-asparaginase

Hoạt tính enzyme L-asparaginase và hàm lượng protein được xác định dựa vào đường chuẩn amonium sulfate ($y = 0,3782x + 0,006$; $R^2 = 0,9915$) theo công thức của Imada [5] và BSA ($y = 1,1791x + 0,043$; $R^2 = 0,9969$). Nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của môi trường lên men đến sản xuất L-asparaginase được thực hiện trên 4 loại môi trường Glucose Asparagine Broth (GAB), Asparagine Dextrose Salts Broth, Czapek's Dox broth cải tiến (CD) và Inorganic Salts Starch Asparagine (ISSA).



Hình 1. Đường chuẩn amonium sulfate (a) và đường chuẩn BSA (b).



Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường lên men đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

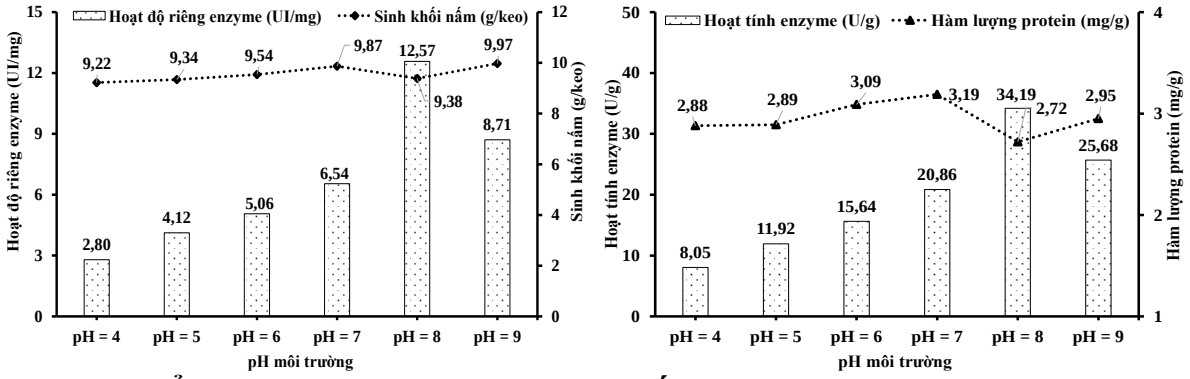
Hoạt tính L-asparaginase thể hiện cao nhất môi trường CD đạt giá trị 20,13 U/g; ở môi trường GAB, hoạt tính L-asparaginase thể hiện thấp nhất chỉ đạt 8,15 U/g (Hình 2a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở ISSA đạt 2,47 mg/g; ở môi trường CD, hàm lượng protein chỉ đạt 2,35 mg/g (Hình 2a). Bên cạnh đó, hoạt độ riêng L-asparaginase đạt 8,57 UI/mg khi môi trường CDM; ngược lại ở môi trường GAB, hoạt độ riêng L-asparaginase chỉ đạt 3,41 UI/mg (Hình 2b). Môi trường ISSA cho sinh khối nấm cao nhất đạt 9,87 g và thấp nhất, ở môi trường GAB cho sinh khối nấm chỉ đạt 9,56 g. Môi trường CD thích hợp cho sản xuất L-asparaginase hơn so với 03 loại môi trường là do trong CD có chứa nguồn nitrogene là sucrose giúp nấm dễ sử dụng và kích thích quá trình sản xuất enzyme. Đồng thời, CD có chứa natri nitrate là nguồn nitrogene thích hợp hơn so với peptone và yeast extract, do mỗi loại nấm sẽ sử dụng một nguồn nitrogene khác nhau và ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất [7].

Ảnh hưởng của pH môi trường đến sản xuất L-asparaginase

Hoạt động của các enzyme vi sinh vật phụ thuộc vào sự thay đổi hiện diện trên bề mặt của các amin acid. Bất kỳ thay đổi nào trong pH môi trường đều có thể tăng cường hoạt động của enzyme hoặc ức chế hoạt động của enzyme. Do đó pH có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của vi sinh vật. Mỗi loài vi sinh vật có phạm vi pH cụ thể cho sự tăng trưởng. Độ pH ban đầu ảnh hưởng đến hệ thống enzyme và sự vận chuyển enzyme qua màng tế bào [8]. Điện tích của các amin acid thay đổi theo giá trị pH của môi trường theo hằng số phân ly của chúng. Sự thay đổi giá trị pH có thể ảnh hưởng đến điện tích và cấu hình của vị trí hoạt động và do đó thay đổi hoạt động, tính ổn định cấu trúc hoặc độ hòa tan của các enzyme.

Hoạt tính enzyme L-asparaginase thể hiện cao nhất ở pH = 8 đạt giá trị 34,19 U/g; ở pH = 4, hoạt tính enzyme L-asparaginase thể hiện thấp nhất chỉ đạt 8,05 U/g. Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở pH = 7 đạt 3,19 mg/g; ở pH = 8, hàm lượng protein chỉ

đạt 2,72 mg/g (Hình 3a). Bên cạnh đó, hoạt độ riêng L-asparaginase đạt 12,57 UI/mg khi pH = 8; ở pH = 4, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất, đạt 2,80 UI/mg (Hình 3b). Ở pH = 9 cho sinh khối nấm cao nhất 9,97 g và thấp nhất, ở pH = 4 cho sinh khối nấm chỉ đạt 9,22 g.

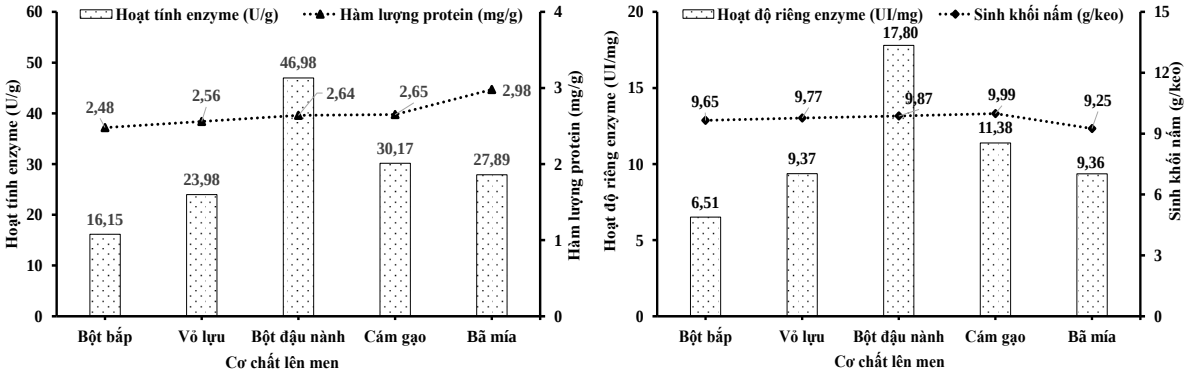


Hình 3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

Kết quả tương tự Varalakshmi và Raju [9], nấm *A.terreus* sản xuất L-asparaginase cao nhất ở pH = 8, hàm lượng 191,3 U/g. Thirumurugan [10], nấm *A. terreus* sản xuất L-asparaginase cao nhất ở pH = 8. Trong khi đó, sản xuất L-asparaginase cao nhất của *A. terreus* KLS 2 ở pH = 4,5 khi vỏ carot được sử dụng làm chất nền [10]. Do đó, nấm phân lập từ các nguồn khác nhau có pH tối ưu khác nhau cho quá trình sản xuất L-asparaginase. Pallem [12]; Hosamani và Kaliwal [14], pH = 7 phù hợp cho sản xuất L-asparaginase từ nấm *F. oxysporum* và *F. Equiseti* khi cám lúa mì và bột đậu nành là chất nền. Tuy nhiên, hoạt động của enzyme giảm khi pH của chất nền(pH.7). Điều này có thể là do sự biến tính enzyme bằng cách phá hủy amin acid đặc trưng ở pH cao hơn. Swathi [15], pH = 9 là tối ưu sản xuất L-asparaginase từ nấm *Beauveria bassiana* (MSS 18/41) khi cám lúa mì được sử dụng làm chất nền. Điều này có thể là do các chủng nấm có phản ứng rõ rệt với sự thay đổi pH của môi trường để sản xuất enzyme bằng cách cung cấp pH sinh lý lý tưởng cho sự tăng trưởng và phát triển hoặc bằng cách ảnh hưởng đến hoạt động, sự ổn định cấu trúc và độ hòa tan của enzyme.

Ảnh hưởng của cơ chất lên men đến sản xuất L-asparaginase

Lên men bán rắn là một phương pháp có chi phí thấp cho quá trình sản xuất của các enzyme vì lên men bán rắn cung cấp sự kiểm soát quá trình tốt hơn, năng suất cao hơn bên cạnh một số khía cạnh có lợi khác [16]. Lựa chọn cơ chất thích hợp để sản xuất enzyme là rất quan trọng trong quá trình lên men bán rắn vì nó phụ thuộc vào một số yếu tố chủ yếu liên quan đến chi phí, giá trị dinh dưỡng và tính sẵn có của chất nền [17]. Do tầm quan trọng của enzyme trong dược phẩm, công nghiệp thực phẩm, nhiều nghiên cứu quan tâm trong việc phát triển các phương pháp để giảm chi phí sản xuất enzyme.



Hình 4. Ảnh hưởng của cơ chất lên men đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

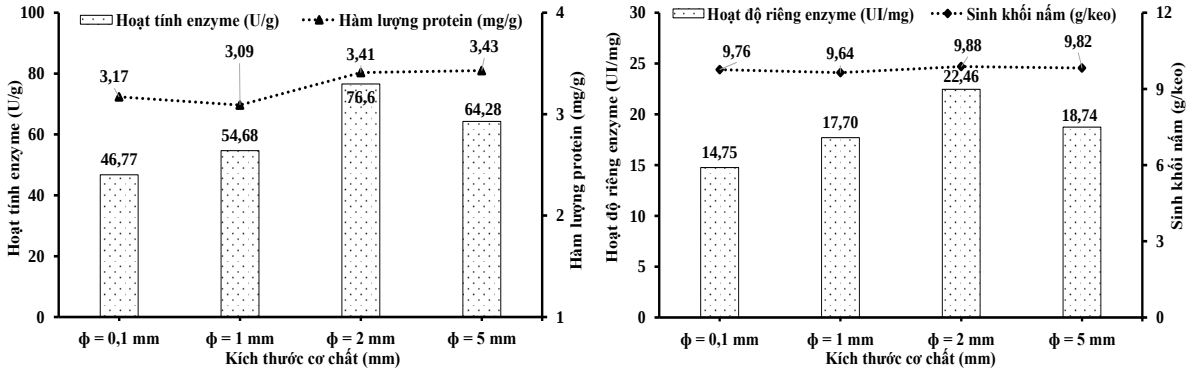
Hoạt tính L-asparaginase thể hiện cao nhất ở cơ chất bã đậu nành đạt 46,98 U/g; ở cơ chất bột bắp, hoạt tính L-asparaginase thấp nhất 16,15 U/g (Hình 4a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở cơ chất bã mía 2,98 mg/g; ở cơ chất bột bắp, hàm lượng protein 2,48 mg/g (Hình 4a). Bên cạnh đó, hoạt độ L-asparaginase đạt 17,80 UI/mg khi cơ chất bột đậu nành; ở cơ chất bột bắp, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất 6,51 UI/mg (Hình 4b). Ở cơ chất cám gạo, sinh khối nấm cao nhất 9,99 g và thấp nhất cơ chất bã mía cho sinh khối nấm 9,25 g (Hình 4b).

Các chất nền khác nhau như cám lúa mì, cám gạo, bã mía, trấu, bánh dầu dừa, bánh dầu lạc, bánh dầu hạt bông, lõi ngô, vỏ ngô, rơm Bột ngô và chất thải từ trà được xem là chất nền phù hợp cho sản xuất L-asparaginase [18]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu bột đậu nành là chất nền phù hợp nhất để tăng cường quá trình sản xuất L-asparaginase. Bột đậu nành không phải là sản phẩm phụ trong các ngành chế biến đậu nành, do đó, nguồn carbon có thể làm giảm chi phí sản xuất enzyme. Bột đậu nành cũng được sử dụng như môi trường để sản xuất các enzyme như lipase, xlyanase, cellulase và polygalacturonase [19]. Hơn nữa, thành phần sinh hóa của bột đậu nành, tức là protein cao (48-60%) và hàm lượng lignin thấp làm cho bột đậu nành trở thành chất nền lý tưởng cho sự tăng trưởng và sản xuất L-asparaginase [20].

Ảnh hưởng của độ mịn cơ chất lên men đến sản xuất L-asparaginase

Trong số một số yếu tố quan trọng đối với sự phát triển của vi sinh vật và sản xuất enzyme theo phương pháp lên men bán rắn như độ ẩm của chất nền, độ mịn hạt của chất nền và thể tích chủng chủng là những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, sinh tổng hợp và bài tiết các chất chuyển hóa khác nhau. Trong quá trình lên men bán rắn, diện tích bề mặt của các hạt chất nền đóng vai trò quan trọng đối với sự gắn kết của vi sinh vật, vận chuyển sinh khối chất dinh dưỡng và sản xuất enzyme [20].

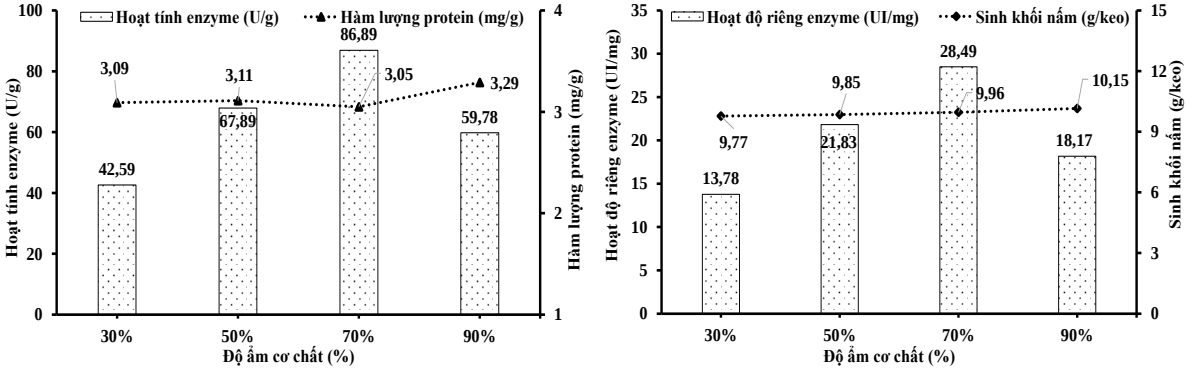
Hoạt tính L-asparaginase thể hiện cao nhất ở độ mịn 2 mm đạt 76,60 U/g; ở độ mịn 0,1 mm, hoạt tính L-asparaginase chỉ đạt 46,77 U/g (Hình 5a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở mức độ mịn 5 mm đạt 3,43 mg/g; ở mức độ mịn 1 mm, hàm lượng protein 3,09 mg/g (Hình 5a). Bên cạnh đó, hoạt độ L-asparaginase đạt 22,46 UI/mg khi độ mịn 2 mm; ngược lại ở mức độ mịn 0,1 mm, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất 14,75 UI/mg (Hình 5b). Ở mức độ mịn 2 mm, sinh khối nấm cao nhất 9,88 g và thấp nhất, ở mức độ mịn 1 mm, sinh khối nấm 9,64 g (Hình 5b). Độ mịn chất nền 2 mm cho hiệu quả sản xuất L-asparaginase cao nhất. Trong khi đó, nếu giảm hoặc tăng độ mịn cơ chất làm giảm quá trình sản xuất L-asparaginase. Điều này là do sự liên kết của hạt với không khí và diện tích bề mặt hạn chế để cho vi sinh vật bám vào [20].



Hình 5. Ảnh hưởng của độ mịn cơ chất đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Độ ẩm ban đầu đóng vai trò quan trọng vai trò trong sản xuất enzyme bằng phương pháp lên men bán rắn. Tối ưu hóa độ ẩm có thể được sử dụng để điều chỉnh và thay đổi hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật. Độ ẩm của chất nền cao dẫn đến giảm độ xốp, khuếch tán oxy thấp hơn, tăng nguy cơ nhiễm vi khuẩn, tăng cường hình thành sợi nấm trên không, giảm thể tích khí, giảm trao đổi khí và thay đổi phẩm chất của lignin. Ngược lại, độ ẩm thấp có thể dẫn đến giảm độ hòa tan các chất dinh dưỡng của chất rắn, mức độ trương thấp hơn và độ căng của nước cao hơn [9].

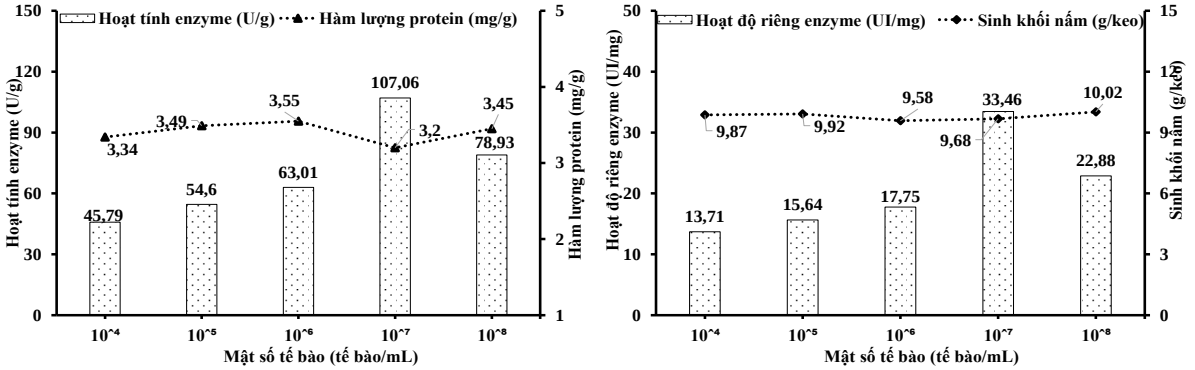


Hình 6. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

Hoạt tính L-asparaginase thể hiện cao nhất ở độ ẩm 70% đạt 86,89 U/g; ở độ ẩm 30%, hoạt tính L-asparaginase thấp nhất đạt 42,59 U/g (Hình 6a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở độ ẩm 90% đạt 3,29 mg/g; ở độ ẩm 70%, hàm lượng protein đạt 3,05 mg/g (Hình 6a). Bên cạnh đó, hoạt độ riêng L-asparaginase đạt 28,49 UI/mg khi độ ẩm 70%; ở độ ẩm 30%, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất 13,78 UI/mg (Hình 6b). Ở độ ẩm 90%, sinh khối nấm cao nhất 10,15 g và thấp nhất, ở độ ẩm 30%, sinh khối nấm đạt 9,77 g (Hình 6b). Kết quả tương tự Varalakshmi và Raju [9], nấm *A. terreus* sản xuất L-asparaginase cao nhất ở độ ẩm 70%, hàm lượng 185,3 U/g. Mishra [12], độ ẩm 70% tối ưu sản xuất L-asparaginase bởi nấm *A. niger*. Hosamani và Kaliwal [14], độ ẩm 70% tối ưu sản xuất L-asparaginase bởi nấm *F. equiseti*.

Ảnh hưởng của mật số bào tử đến quá trình sản xuất L-asparaginase

Trong quá trình lên men bán rắn, mật số bào tử ban đầu ảnh hưởng quan trọng đến quá trình sản xuất enzyme [20]. Hoạt tính enzyme L-asparaginase thể hiện cao nhất ở mật số bào tử 10^7 bào tử/mL đạt giá trị 107,06 U/g; ở mật số bào 10^4 bào tử /mL, hoạt tính enzyme L-asparaginase thấp nhất 45,79 U/g (Hình 7a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở mật số bào tử 10^6 bào tử/mL đạt 3,55 mg/g; ở mật số bào tử 10^7 bào tử/mL, hàm lượng protein chỉ đạt 3,2 mg/g (Hình 7a). Bên cạnh đó, hoạt độ riêng L-asparaginase đạt 33,46 UI/mg khi mật số bào tử 10^7 bào tử/mL; ở mật số bào tử 10^4 bào tử/mL, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất 13,71 UI/mg (Hình 7b). Ở mật số bào tử 10^8 bào tử/mL, sinh khối nấm cao nhất 10,02 g và thấp nhất, ở mật số bào tử 10^7 bào tử/mL, sinh khối nấm đạt 9,68 g (Hình 7b).

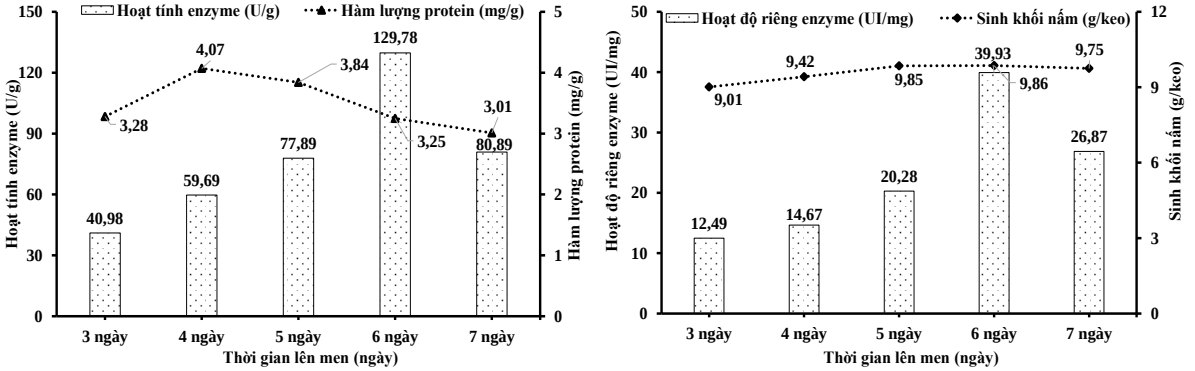


Hình 7. Ảnh hưởng của mật số bào tử đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

Mật số bào tử 10^7 bào tử/mL cho quá trình sản xuất L-asparaginase cao nhất nhưng khi gia tăng mật số bào tử làm giảm quá trình sản xuất L-asparaginase. Điều này có thể là do sự suy giảm các chất dinh dưỡng trong một thời gian ngắn hơn, dẫn đến giảm hoạt động trao đổi chất [21]. Nhìn chung, mật số bào tử thấp hơn đòi hỏi thời gian dài hơn để các tế bào nhân lên và có thể không đủ để bắt đầu tăng trưởng vi sinh vật và sản xuất enzyme, trong khi đó việc tăng mật số bào tử sẽ đảm bảo tăng sinh nhanh chóng và tổng hợp enzyme tiếp theo [22].

Ảnh hưởng của thời gian lên men đến sản xuất L-asparaginase

Thời gian lên men là một yếu tố quan trọng khác để tối ưu hóa quá trình sản xuất lovastatin trong quá trình lên mem bán rắn. Thời gian lên men ngắn có thể góp phần hiệu quả để tăng lợi nhuận khi sản xuất ở quy mô công nghiệp [23]. Hoạt tính enzyme L-asparaginase thể hiện cao nhất ở thời gian lên men 6 ngày đạt 129,78 U/g; ở thời gian lên men 3 ngày, hoạt tính enzyme L-asparaginase thấp nhất chỉ đạt 40,98 U/g (Hình 8a). Tương tự, hàm lượng protein đạt cao nhất ở thời gian lên men 4 ngày đạt 4,07 mg/g; ở thời gian lên men 7 ngày, hàm lượng protein chỉ đạt 3,01 mg/g (Hình 8a). Bên cạnh đó, hoạt độ riêng L-asparaginase đạt 39,93 UI/mg khi thời gian lên men 6 ngày; ở thời gian lên men 3 ngày, hoạt độ riêng L-asparaginase thấp nhất, chỉ đạt 12,49 UI/mg (Hình 8b). Ở thời gian lên men 6 ngày, sinh khối nấm cao nhất đạt 9,86 g và thấp nhất ở thời gian lên men 3 ngày, sinh khối nấm chỉ đạt 9,01 g (Hình 8b).



Hình 8. Ảnh hưởng của thời gian lên men đến hàm lượng protein và hoạt tính L-asparaginase (a); hoạt độ riêng L-asparaginase và sinh khối nấm (b).

Sau 6 ngày lên men cho thấy sự giảm sản xuất L-asparaginase, có thể là do sự bất hoạt của enzyme do sự hiện diện của một loại hoạt động phân giải protein hoặc sự tăng trưởng của sinh vật có thể đã đạt đến giai đoạn mà nó không thể cân bằng được nữa, tăng trưởng ổn định với sự sẵn có của chất dinh dưỡng trong môi trường. Hơn nữa, hoạt động của enzyme giảm có thể là do cạn kiệt chất dinh dưỡng, tích lũy các sản phẩm độc hại

không mong muốn [9] và do sự biến tính của enzyme do tương tác với các thành phần khác trong môi trường hoặc do sự suy giảm các chất dinh dưỡng kích thích sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp, dẫn đến sản lượng enzyme thấp hơn [24]. Kết quả tương tự Varalakshmi và Raju [9], nấm *A. terreus* sản xuất L-asparaginase cao nhất ở thời gian lên men là 5-6 ngày, hàm lượng 169,46 U/g. Mishra [13] và Kumar [25], nấm *A. niger* và *Cladosporium* sp. sản xuất L-asparaginase cao nhất vào ngày 4-5 sau khi lên men. Anil [20], nấm *F. culmorum* sản xuất L-asparaginase cao nhất vào ngày 6 sau khi lên men.

KẾT LUẬN

Nấm *A. terreus* ATEG-01943 sản xuất L-asparaginase dưới các điều kiện như môi trường Czapek's Dox broth cải tiến, pH = 8, cơ chất bã đậu nành, độ mịn cơ chất 2 mm, độ ẩm lên men 70%, mật số bào tử 10^7 bào tử/mL và thời gian lên men 6 ngày cho hoạt tính enzyme, hàm lượng protein, hoạt độ riêng enzyme và sinh khối nấm đạt cao nhất lần lượt là 129,78 U/g; 4,07 mg/g; 39,93 IU/mg và 10,15 g. Nghiên cứu đánh giá hiệu quả sinh học của enzyme L-asparagianse trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang đã hỗ trợ và tạo điều kiện để nhóm nghiên cứu thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Sanjotha, G. and Manawadi, S.I. (2017). Isolation, screening, optimization and production of Anti Asparaginase by fungi from karwar coastal region. *Research Journal of Recent Sciences*, 6 (3): 1-7.

[2] Subhan, M., Faryal, R. and Macreadie, I. (2016). Exploitation of *Aspergillus terreus* for the production of natural statins. *J Fungi*. 2: 13-19.

[3] Jian, C. and Yang, Z. (2013). Solid State Fermentation for Foods and Beverages. CRC Press.

[4] Carlos, R., Costa, L. and Junior, A. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology research and Innovation*, 1: 52-71.

[5] Imada, A., Nakahama, K. and Isono, M. (1973). Lasparaginase and glutaminase activities of Microorganisms. *Journal of General Microbiology*, 76: 85-99.

[6] Lowry O.H., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1): 265-275.

[7] Abeer, A.E., Rania, Z. and Mostafa, H. (2017). Statistical optimization of L-asparaginase production by using *F. solani*. *Egyptian Pharma Journal*, 16: 16-23.

[8] Mohana, S., Shah, A., Divecha, J. and Madamwar, D. (2008). Xylanase production by Burkholderia sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. *Bioresour. Technol*, 99: 7553-7564.

[9] Varalakshmi, V. and Raju, K.J. (2013). Optimization of l-asparaginase production by *A. terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2 (9): 121-129.

[10] Thirumurugan, G., Moses, J., and Rajarammohan S, . (2011). Effect of Inducers and Physical Parameters on the Production of L-Asparaginase Using *Aspergillus Terreus*. *J Bioprocess Biotechniq* 1:110 doi:10.4172/2155- 9821.1000110.

[11] Siddalingeshwara, K.G. and Lingappa, K. (2010). Screening and optimization of L-asparaginase, a tumour inhibitor from *Aspergillus terreus* through solid state fermentation. *J. Adv. Sci. Res*. 1: 55-60.

[12] Pallem, C., Nagarjun. V. and Srikanth, M. (2011). Production of a tumor inhibitory enzyme, L-asparaginase through solid state fermentation using *Fusarium oxysporum*. *International Jour of PharSciences Review and Research*, 7 (2): 189-192.

[13] Mishra, A. (2006). Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *A. niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied Bio and Biotech*, 135: 33-42.

[14] Hosamani, R. and Kaliwal, B.B. (2011). Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*., *Int J Microbiol Res*, 3 (2): 108-119.

[15] Swathi, N., Kamalakumari, P. and Prabhakar, T. (2014). Production of L-asparaginase by solid substrate fermentation using marine fungus. *BioMed. Res. Biochem*. 1: 1-9.

[16] Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J. and Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malays. J. Microbiol*. 1: 10-16.

[17] Pandey, A. (2002). Synthesis of alpha-amylase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. J. *Basic Microbiol*. 42: 320-326

[18] Elshafei, M., and El-Ghonemy, D. (2015). Screening and media optimization for enhancing l-asparaginase production, an anticancer agent, from different filamentous fungi in solid state fermentation. *British Biotechnology Journal* 9 (3): 1-15.

[19] Coffman, M., Li, Q. and Ju, L.K. (2014). Effect of natural and pretreated soybean hulls on enzyme production by *T. reesei*. *J. Am. Oil Chem*. Soc. 91: 1331-1338.

[20] Anil, K.M., and Janakiraman, S. (2017). Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). *Biocatalysis and Agricultural Bio* 11: 124-130.

[21] Kashyap, P., Sabu, A. and Szakacs, G. (2002). Extra-cellular L-glutaminase production by *Zygosaccharomyces rouxii* under solid state fermentation. *Process Biochem*. 38: 307-312.

[22] Sabu, A., Daud, M.J. and Szakacs, G. (2005). Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Bioresour. Technol*. 96: 1223-1228.

[23] Sadia, J., Meraj, M., Mahmood, S., Hameed, A., Naz, F., Hassan S. and Irfan, R. (2017). Biosynthesis of lovastatin using agro-industrial wastes as carrier substrates. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February*, 16 (2): 263-269.

[24] Ramachandrana, A., Patel, K. and Pandey, A. (2004). Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α-amylase. Bio.Techno, 93 (2): 169-174.

[25] Kumar, M.N.S., Ravi, R. and Manonmani, H.K. (2013). Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid substrate fermentation. *Ind. Crops Prod*. 43: 150-158.

KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SẢN XUẤT LOVASTATIN TỪ NẤM *Asperillus terreus NIH2624* BẰNG PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN BÁN RẮN

Nguyễn Phạm Tuấn[1] và Bằng Hồng Lam[2]*
[1]Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang
[2]Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: ngphamtuan1983@gmail.com

TÓM TẮT

Lovastatin một loại thuốc thuộc nhóm statin và được sử dụng để hạ cholesterol. Lovastatin cũng được sử dụng điều trị bệnh tim mạch vành, bệnh Alzheimer và các bệnh về xương,…. Nấm *Asperillus terreus* được xem là một trong những nguồn tổng hợp lovastatin, trong quá trình tổng hợp lovastatin chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm bằng phương pháp lên men bán rắn. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men từ nấm *A. terreus NIH2624* như cơ chất, pH, nguồn carbon, nguồn nitrogen và thời gian lên men được đánh giá. Hàm lượng lovastatin được xác định bằng phương pháp đo quang ở bước sóng λ=238 nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, nấm *A. terreus NIH2624* sản xuất lovastatin tốt nhất dưới điều kiện như cơ chất (gạo trắng), pH môi trường (pH = 6), nguồn carbon (glucose 5 g/L), nguồn nitrogen (pepton 5 g/L) và thời gian lên men (8 ngày), hàm lượng lovastatin đạt 6,05 mg/g.

Từ khóa: *Asperillus terreus NIH2624, cơ chất, glucose, lovastatin, pH, thời gian.*

INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING THE PRODUCTION OF LOVASTATIN FROM *Asperillus terreus NIH2624* BY SOLID STATE FERMENTATION

Nguyen Pham Tuan[1*] and Bang Hong Lam[2]
[1]An Giang Biotechnology center
[2]An Giang University, Viet Nam national University Ho Chi Minh City
Correspnding author: Tác giả liên hệ: ngphamtuan1983@gmail.com

ABSTRACT

Lovastatin is a drug belonged to statin group and used to reduce cholesterol. Lovastatin is also applied to treat coronary heart disease, Alzheimer's disease and bone diseases. A. terreus is considered to be one of the potential sources of lovastatin, but the lovastatin synthesis processis influenced by various biological and abiotic factors. The study was conducted to evaluate the effect of factors on the production of lovastatin from this type of fungi by solid state fermentation method. The effect of factors on the production of lovastatin from A. terreus NIH2624 as substrates, pH of medium, carbon source, nitrogen and fermentation time were investigated. Lovastatin assay was determined by spectrophotometer at 328 nm. The results showed that, A. terreus NIH2624 strains produced lovastatin under conditions as substrates (rice), pH of medium (pH = 6), carbon source (glucose 5 g/L), nitrogen source (peptone 5 g/L) and fermentation time (8 day) and the amount of lovastatin reaches 6.05 mg/g.

Keywords: *Asperillus terreus NIH2624, glucose, lovastatin, pH, substrate, time*.

GIỚI THIỆU

Tăng cholesterol máu, một trong những yếu tố nguy cơ hàng đầu dẫn đến xơ vữa động mạch và các bệnh tim mạch vành và là một vấn đề lớn trên toàn thế giới. Trên Thế gới, statin được sử dụng thường xuyên trong điều trị tăng cholesterol. Lovastatin là một thành viên của nhóm thuốc statin, được sử dụng để hạ cholesterol ở những người có sự gia tăng cholesterol máu và góp phần ngăn ngừa bệnh tim mạch. Lovastatin là một loại

thuốc hypercholesterolemic mạnh sử dụng cho việc làm giảm lượng cholesterol trong máu. Lovastatin là một chất ức chế cạnh tranh của 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzym A reductase, các enzyme hạn chế tỷ lệ sinh tổng hợp cholesterol [1]. Ngoài ra, lovastatin đã được sử dụng trong các ứng dụng y sinh học như điều trị bệnh tim mạch vành, bệnh Alzheimer và các bệnh về xương [2]. Lovastatin được tổng hợp từ nhiều nguồn vi sinh vật khác nhau như xạ khuẩn, nấm mốc và nấm ăn và nấm dược liệu [3]. Trong đó, nấm *A. terreus* được xem là một trong những nguồn tổng hợp lovastatin. Nấm tổng hợp bằng hai phương pháp lên men chìm và lên men bán rắn, quá trình lên men bán răn sản xuất lovastatin chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh học và phi sinh học [4]. Lên men trạng thái rắn đã được sử dụng trong ngành công nghiệp thực phẩm cho các mục đích khác nhau như enzyme, acid hữu cơ, chất màu,... [5]. Lên men bán rắn là môi trường sống tự nhiên của hầu hết các vi sinh vật (chủ yếu là nấm và nấm mốc); đòi hỏi ít năng lượng để khử trùng (vì hoạt động của nước thấp hơn); ít bị nhiễm vi khuẩn; sản xuất các sản phẩm có năng suất cao hơn; có một số lợi thế về môi trường; dễ sử dụng cơ chất trong quá trình sản xuất (tận dụng phụ phế phẩm) và dễ quản lý nước thải [6]. Trong quá trình lên men bán rắn để sản xuất hợp chất có hoạt tính sinh học, nấm chịu tác động của các yếu tố như pH, cơ chất, nguồn nitrogen, carbon, thể tích cấy và thời gian lên men,…. Với những ưu điểm của sản phẩm lovastatin và lợi thế của quá trình lên men sản xuất các sản phẩm từ nấm *A. terreus*. Từ đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Dòng nấm nội sinh *A. terreus NIH2624* được lưu giữ phòng thí nghiệm vi sinh của Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang. Chuẩn bị dung dịch lên men: môi trường lên men để tạo sinh khối của nấm *A. terreus NIH2624* bao gồm peptone 2 g/L, sucrose 5 g/L, $MgSO_4$ 0,1 g/L và KH_2PO_4 0,5 g/L điều chỉnh về pH = 5,6. Chuẩn bị bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường dinh dưỡng đã được thanh trùng và để nguội, cấy 3 tản nấm (đường kính 1 x 1 mm) và ủ trong điều kiện nhiệt độ phòng và lắc với tốc độ 140 vòng/phút trong 3-5 ngày và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của cơ chất đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi [7], bao gồm $MgSO_4$. $7H_2O$ (0,15 g/L); $(NH_4)_2HPO_4$ (0,25 g/L); NaCl (1 g/L), điều chỉnh về pH = 5,5. Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất khác nhau (gạo trắng, cám gạo, vỏ bắp, lõi bắp, bã mía và vỏ trấu) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^8 bào tử/mL) vào các công thức thí nghiệm và ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong thời gian 7 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của pH đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi [7], điều chỉnh về pH khác nhau (pH = 5, 6, 7, 8 và 9). Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^8 bào tử/mL) vào các công thức thí nghiệm. Các công thức nấm được ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 7 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi [7], bổ sung nguồn carbon khác nhau (glucose, sucrose, lactose, dextrose 5 g/L và đối chứng không bổ sung). Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ

ẩm thí nghiệm (70%) và nguồn carbon bổ sung khác nhau, điều chỉnh về pH = 6. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^8 bào tử/mL) vào các công thức thí nghiệm và ủ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 7 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi [7], bổ sung nguồn carbon là glucose 5 g/L Chuẩn bị 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (50-70%) và nguồn nitơ bổ sung khác nhau (yeast extract, malt extract, peptone, beef extract, NH_4NO_3 5 g/L và đối chứng không bổ sung), điều chỉnh về pH = 6. Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^8 bào tử/mL) vào các công thức thí nghiệm và ủ ở nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian 7 ngày.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất lovastatin

Chuẩn bị môi trường lên men của Mouafi [7], điều chỉnh về pH = 6, glucose 5 g/L và peptone 5 g/L. Chuẩn bị các công thức thí nghiệm gồm 20 g cơ chất (gạo trắng) và bổ sung 30 mL dinh dưỡng để đảm bảo đủ độ ẩm thí nghiệm (70%). Tiến hành cấy 10 mL dung dịch nhân sinh khối nấm (mật độ bào tử 10^8 bào tử/mL) vào các công thức thí nghiệm và ủ ở điều kiện nhiệt độ phòng trong khoảng thời gian lên men khác nhau.

Phương pháp phân tích hàm lượng lovastatin

Sau khi lên men vào ngày thứ 8, tiến hành thu sản phẩm và sấy khô ở nhiệt độ là 50°C trong 24 giờ và xay nhuyễn thành bột để tiến hành phân tích hàm lượng lovastatin. Cân 2 g mẫu chiết với ethyl acetate (pH = 3) trong bình tam giác 250 mL ủ ở nhiệt độ 28 ±2°C trên máy lắc với tốc độ tốc độ 200 vòng/phút trong 2 giờ. Sau đó, tiến hành ly tâm hỗn hợp với tốc độ 10.000 vòng/phút cho 10 phút và thu phần dịch, bỏ phần bả. Phần dịch được lọc qua màng lọc 0,45 µm, đem phân tích hàm lượng loavastatin theo Mouafi [7]. Hỗn hợp phản ứng bao gồm 1 mL dung dịch qua màng lọc, 1 mL acid trifluroacetic (1%) phản ứng trong 10 phút (lacton hóa axit hydroxyl của lovastatin). Lấy 0,5 mL dung dịch bên trên pha loãng 10 lần với methanol và đo độ hấp thụ ở bước sóng 238 nm.

Phương pháp thống kê

Các số liệu thô của thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê bằng phần mềm Statgraphics 16.0 plus.

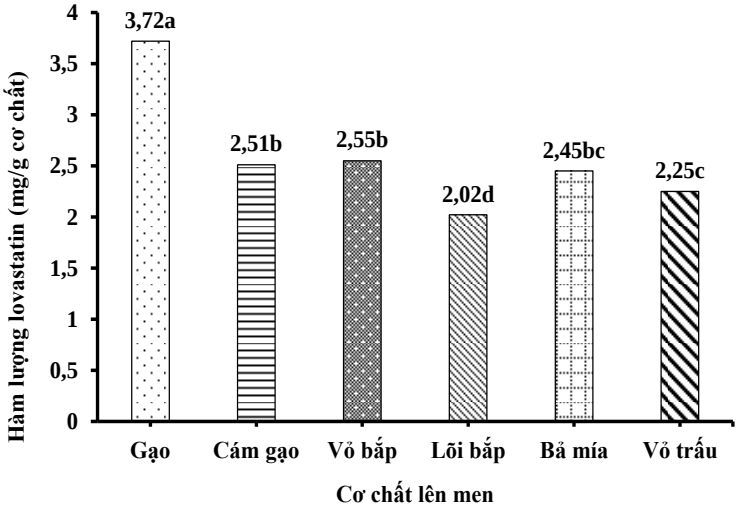
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của cơ chất đến quá trình sản xuất lovastatin

Yếu tố quan trọng trong quá trình lên men bán rắn là sự lựa chọn cơ chất phù hợp cho quá trình lên men. Để giảm chi phí cho quá trình sản sản xuất lovastatin; lovastatin được sản xuất bằng cách sử dụng các sản phẩm từ nông nghiệp với giá cả thích hợp. Môi trường sản xuất lovastatin thường đơn giản, sử dụng phụ phẩm trong công nghiệp-nông nghiệp như cám lúa mì, cám gạo hoặc rơm lúa mì làm cơ chất [8]. Hàm lượng lovastatin được đánh giá dựa vào phương trình đường chuẩn ammonium: y = 0,4139x - 0,0298 và giá trị R^2 = 0,9877. Hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn cơ chất ban đầu là gạo với hàm lượng là 3,72 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn cơ chất cám gạo và vỏ bắp với hàm lượng lovastatin lần lượt là 2,51 mg/g cơ chất; 2,55 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn cơ chất lõi bắp và vỏ trấu, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 2,02 mg/g cơ chất và 2,25 mg/g cơ chất (Hình 1).

Dựa trên nghiên cứu sàng lọc nguồn cơ chất, gạo được chọn là cơ chất thích hợp để tối ưu hóa thêm nghiên cứu theo trình lên men bán rắn. Gạo chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật. gạo trắng chứa các chất dinh dưỡng như carbohydrate, protein, sắt, vitamin B_1 và lipid. Kết quả nghiên cứu tương tự nghiên cứu của Wei [9] cho rằng, gạo và cám lúa mì thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A.*

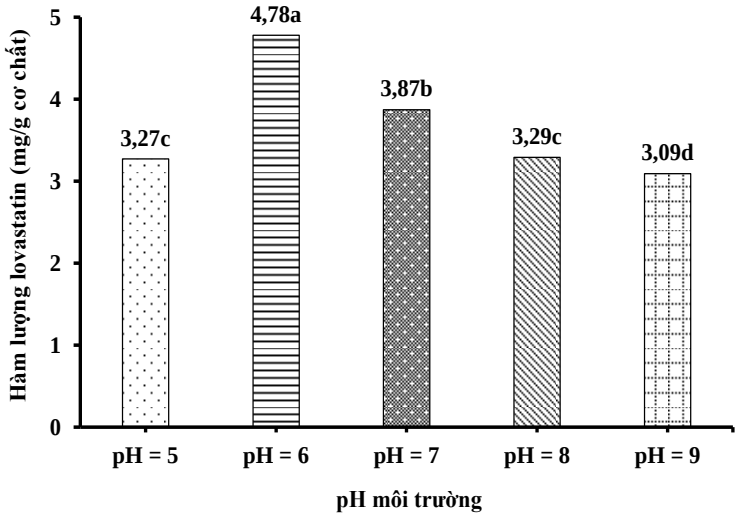
terreus cho hàm lượng lovastatin lần lượt là 2,20 mg/g cơ chất khô và 2,00 mg/g cơ chất khô. Điều này được giải thích là do lovastatin là một sản phẩm nội bào, sự tăng trưởng tốt hơn của sợi nấm có nghĩa là sợi nấm nhiều hơn và năng suất lovastatin cao hơn. Nếu cơ chất có nhiều dinh dưỡng sẽ làm cho nấm sự phát triển của tế bào và sự tích lũy lovastatin cao hơn so với cơ chất có hàm lượng chất dinh dưỡng thấp hơn.



Hình 1. Ảnh hưởng cơ chất đến sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624*.

Ảnh hưởng của pH đến quá trình sản xuất lovastatin

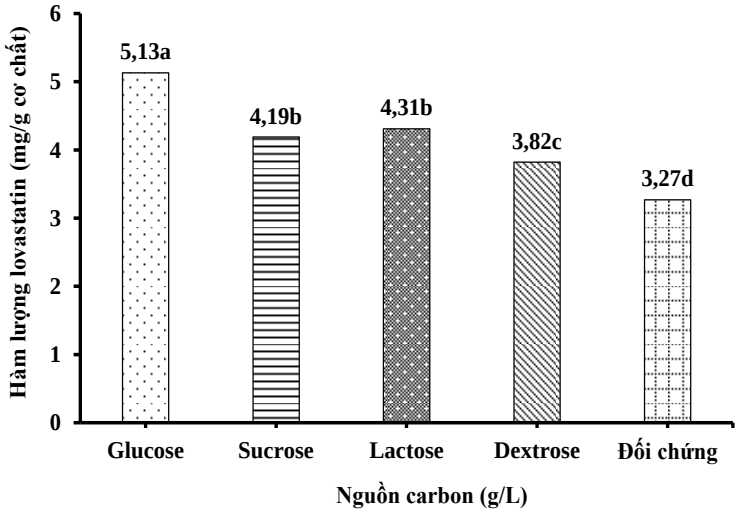
pH của môi trường lên men ban đầu ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình sản xuất lovastatin. Để đánh giá ảnh hưởng của giá trị pH trong cơ chất lên quá trình sản xuất lovastatin từ nấm, giá trị pH được điều chỉnh bằng cách thêm HCl hoặc NaOH. Hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với pH môi trường ban đầu là pH = 6 với hàm lượng là 4,78 mg/g; kế đến là pH môi trường ban đầu là pH = 7 và pH = 8 với hàm lượng lovastatin lần lượt là 3,78 mg/g cơ chất; 3,29 mg/g cơ chất và thấp nhất là pH = 5 và pH = 9, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,27 mg/g cơ chất và 3,09 mg/g cơ chất (Hình 2). Khi pH tăng thêm dẫn đến giảm dần hàm lượng lovastatin do sự biến tính hoặc bất hoạt của cấy vi sinh vật vì pH mạnh ảnh hưởng đến việc vận chuyển các thành phần khác nhau trên màng tế bào cho sự tăng trưởng tế bào và hình thành sản phẩm và hầu hết các loại nấm hoạt động trong khoảng pH = 3,5-7,0 và pH thấp hơn cũng tránh được sự nhiễm bẩn của các vi khuẩn khác [10]. Kết quả nghiên cứu phù hợp với Atalla [11], hàm lượng lượng tối đa của mevinolin (96,22 mg/L) ở pH = 6,5 bằng cách sử dụng *A. terreus*. Nghiên cứu của Szakacs [12], hàm lượng lovastatin đạt tối đa dưới điều kiện pH = 6,2 trong môi trường nuôi cấy có chứa bột của cây sorghum ngọt khi sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus*. Valera [13], hàm lượng lovastatin đạt cao nhất trong môi trường có chứa cám lúa mì ở điều kiện pH = 5 khi sản xuất lovastatin từ nấm *A. flavipes*. Foukia [10], hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với pH môi trường ban đầu là pH = 6 với hàm lượng 0,228 mg/mL khi sản xuất lovastatin từ nấm *A. fumigatus*. pH = 6 thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus* là do tất cả các hoạt động trao đổi chất thứ cấp thường xảy ra ở một số pH cụ thể và sự thay đổi pH trong quá trình lên men ảnh hưởng mạnh đến nấm [14]. Có thể là do ở pH = 6, tính thấm của màng tế bào được tăng cường bởi ion kim loại để sản xuất lovastatin tối đa trong quá trình lên men [15].



Hình 2. Ảnh hưởng pH đến sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624*.

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình sản xuất lovastatin

Trong quá trình sản xuất lovastatin chịu sự ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau trong quá trình lên men. Để xác định hiệu quả của việc kết hợp các nguồn carbon bổ sung đến hàm lượng lovastatin, các nguồn carbon khác nhau cụ thể là glucose, dextrose, sucrose, lactose và đối chứng (không bổ sung) được thêm vào môi trường lên men của quá trình lên men bán rắn của nấm. Hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn carbon bổ sung ban đầu là glucose với hàm lượng là 5,13 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn carbon bổ sung là sucrose và lactose với hàm lượng lovastatin lần lượt là 4,19 mg/g cơ chất; 4,31 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn carbon bổ sung dextrose và không bổ sung, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,82 mg/g cơ chất và 3,27 mg/g cơ chất (Hình 3).



Hình 3. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624*.

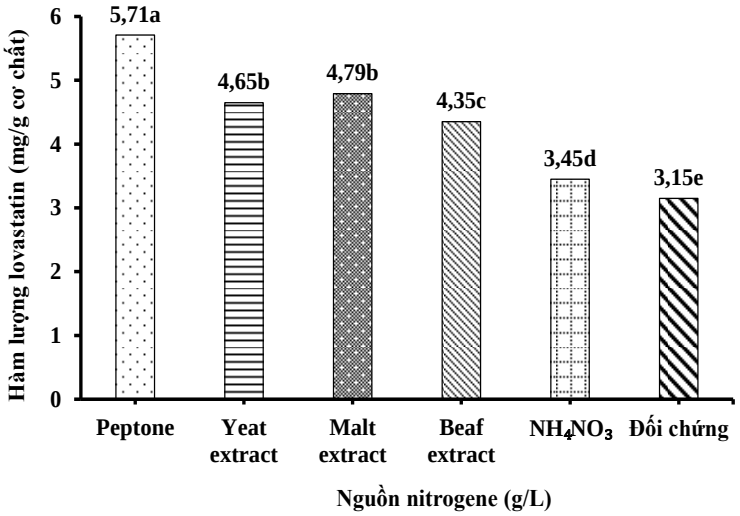
Kết quả nghiên cứu tương tự Wei [9], nguồn carbon là glucose thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 2,7 mg/g cơ chất khô. Tương tự, nghiên cứu của Foukia [10] cho rằng, nguồn carbon là glucose (3,5 g/L) thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 0,209 mg/mL. Arjumand [16], nguồn carbon là glucose (9 g/L) thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus*, hàm lượng lovastatin đạt 253,33 mg/L. Glucose được xem như là nguồn carbon tốt nhất khi bổ sung vào môi trường để sản xuất lovastatin từ nấm *A.*

terreus là do glucose như là nguồn carbon sẵn có và glucose dễ bị oxy hóa rất nhanh trong các tế bào do đó hoạt động như một nguồn năng lượng sẵn có so với các nguồn carbon khác [16].

Ảnh hưởng của nguồn nitơ bổ sung đến quá trình sản xuất lovastatin

Nguồn và loại nguồn carbon và nitơ là một trong những yếu tố quan trọng nhất cho bất kỳ quá trình lên men. Nguồn nitơ là một trong những thành phần chính trong môi trường lên men và nguồn nitơ vô cơ hoặc hữu cơ thường được ưa thích nuôi cấy của nấm *A. terreus* [17]. Nguồn nitơ hữu cơ rất giàu protein và nguồn acid amin cho sinh vật. Acid amin rất quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp lovastatin [18]. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến quá trình sản xuất lovastatin từ nấm được khảo sát ở các loại nitơ khác nhau như peptone, yeast extract, malt extract, beef extract, NH_4NO_3 và đối chứng không bổ sung. Hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với nguồn nitơ bổ sung ban đầu là peptone với hàm lượng lovastatin là 5,71 mg/g cơ chất; kế đến là nguồn nitơ bổ sung là yeast extract và malt extract, với hàm lượng lovastatin lần lượt là 4,65 mg/g cơ chất; 4,79 mg/g cơ chất và thấp nhất là nguồn nitơ bổ sung NH_4NO_3 và không bổ sung, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 3,45 mg/g cơ chất và 3,15 mg/g cơ chất (Hình 4).

Kết quả nghiên cứu tương tự như nghiên cứu của Manzoni và Rollini [18] cho rằng, peptone và yeast extract là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *Asperillus terreus*, hàm lượng lovastatin đạt lần lượt là 3,72 mg/g và 3,40 mg/g cơ chất khô lên men. Nghiên cứu của Foukia [10] cho rằng, nguồn nitơ là peptone và yeast extract thích hợp cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. fumigatus*, hàm lượng lovastatin đạt 0,318 và 0,302 mg/mL. Hơn nữa nghiên cứu của Chaynika và Shivakumar [19] cho rằng, peptone là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất lovastatin tư nấm *A. terreus*, hàm lượng lovastatin đạt tối đa 3,17 mg/g cơ chất. Trong khi đó, Jaberi [20] cho rằng, yeast extract, đậu nành và ngô là nguồn nitơ tốt nhất cho quá trình sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus* và được sử dụng rộng rãi hơn so với peptone.



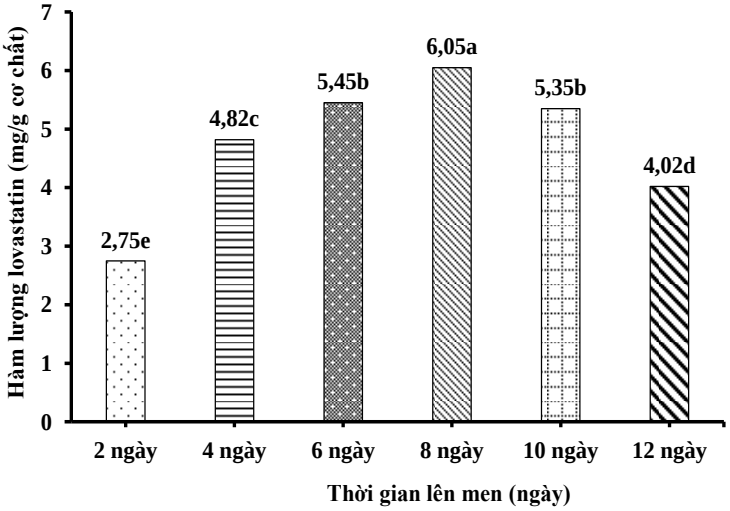
Hình 4. Ảnh hưởng nguồn nitơ đến sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624*.

Ảnh hưởng của thời gian lên men đến quá trình sản xuất lovastatin

Thời gian lên men là một yếu tố quan trọng khác để tối ưu hóa quá trình sản xuất lovastatin trong quá trình lên mem bán rắn. Thời gian lên men ngắn có thể góp phần hiệu quả để tăng lợi nhuận khi sản xuất ở quy mô công nghiệp [21]. Để xác định thời gian lên men tối ưu, các bình lên men được nuôi trong các khoảng thời gian khác nhau (2-12

ngày). Hàm lượng lovastatin được phân tích 48 giờ sau khi lên men. Hàm lượng lovastatin thể hiện cao nhất với thời gian lên men là 8 ngày với hàm lượng là 6,05 mg/g cơ chất; kế đến là thời gian lên men là 6 và 10 ngày với hàm lượng lovastatin lần lượt là 5,45 mg/g cơ chất; 5,35 mg/g cơ chất và thấp nhất với thời gian lên men 2 ngày, hàm lượng lovastatin chỉ đạt 2,75 mg/g cơ chất (Hình 5).

Kết quả này tương tự Siamak [22], nấm *A. terreus*, sản xuất lovastatin đạt cao nhất 55 mg /lít môi trường trong thời gian lên men là 7 ngày. Hơn nữa, các nghiên cứu trước đây cũng cho rằng, thời gian lên men 6-10 ngày là tối ưu cho quá trình sản xuất lovastatin từ các loài nấm khác nhau. Foukia [10] cho rằng, hàm lượng lovastatin đạt cao nhất vào ngày thứ 9 của quá trình lên men của nấm *A. terreus* và đạt hàm lượng 0,97 mg/mL khi sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus*. Hơn nữa, nghiên cứu của Foukia [23], hàm lượng lovastatin đạt cao nhất vào ngày thứ 12 của quá trình lên men và đạt hàm lượng 3,53 mg/g cơ chất khi sản xuất lovastatin từ nấm *A. fumigatus*. Thời gian lên men chịu ảnh hưởng của quá trình sinh trưởng của nấm, trong giai đoạn đầu tăng trưởng (trophase), sợi nấm tăng trưởng tăng theo cấp số nhân và ít hoặc không có chất chuyển hóa thứ cấp được tạo ra, khi nấm bước vào giai đoạn thứ hai (idiophase), sinh khối trở nên ổn định và các chất chuyển hóa thứ cấp được tổng hợp cho đến khi bắt đầu quá trình ly giải [24].



Hình 5. Ảnh hưởng thời gian lên men đến sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624*.

KẾT LUẬN

Nấm *A.terreus* là nguồn tiềm năng và phong phú để sản xuất lovastatin trong tự nhiên, góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh. Điều kiện thích hợp cho quá trình lên men bán rắn để sản xuất lovastatin từ nấm *A. terreus NIH2624* là cơ chất (gạo trắng), pH môi trường (pH = 6), nguồn carbon bổ sung (glucose 5 g/L), nguồn nitơ (peptone 5 g/L) và thời gian lên men (8 ngày), cho hàm lượng lovastatin đạt cao nhất 6,05 mg/g cơ chất.

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học tỉnh An Giang và Sở Khoa học và Công nghệ An Giang đã tạo điều kiện và hỗ trợ để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Seenivasan A., Subhagar S., and Viruthagir. T. (2008). Microbial production and biomedical applications of lovastatin. *Indian J Pharm Sci*. 70:701-709.

[2] Aravindan R., S. Subhagar, and T. Viruthagiri, (2008). Microbial Production and Biomedical Applications of Lovastatin. *Indian J Pharm Sci*. 70 (6): 701-709.

[3] Vijay, V.P., V.K. Varshney and A. Pandey. (2019). Lovastatin: A Journey from Ascomycetes to Basidiomycetes Fungi. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 9 (3): 162-178.

[4] Subhan M, Faryal R & Macreadie I. (2016). Exploitation of *Aspergillus terreus* for the Production of Natural Statins. *J Fungi*. 2:13. doi: 10.3390/jof2020013.

[5] Jian C and Yang Z. (2013). Solid State Fermentation for Foods and Beverages. CRC Press.

[6] Carlos S., Eduardo S., F. Luiz and A. Junior. (2017). Recent developments and innovations in solid statefermentation. *Biotech research and Innovation*, 1:52-71.

[7] Mouafi, M., M Elkomy and Abo Elsoud, (2016). Optimization of Lovastatin production under sub-merged fermentation and its effect on cholesterol blood level in rats. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*: 2349-2759.

[8] Nathiya K, Nath SS, J Angayarkanni, (2011). Screening of a high glutaminolytic producing strain and its extracellular production by solid state fermentation. Int J Pharm Biosci 2: 297- 302.

[9] Wei, P., X. Zhinan and C. Peilin,. (2007). Lovastatin production by *A. terreus* in solid-state fermentation. *Journal of Zhejiang University science A* 8 (9): 1521-1526.

[10] Foukia E., M Elkomy and M.A. Elsoud,. (2016a). Optimization of Lovastatin production under sub-merged fermentation and its effect on cholesterol blood level in rats. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*, 3 (4): 33-42.

[11] Atalla, M.M., E.R. Hamid and A.R. El-Shami. (2008). Optimization of culture medium for increased mevinolin production *by Aspergillus terreus* strain. *Malay. J. of Microbiol*., 4 (2): 6-10.

[12] Szakacs G., Morovjan G. and Tengerdy RP. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnology letter* 20: 411-415.

[13] Valera HR., Gomes J., Laxmi S., Gururaj R., and Kumar D. (2005). Lovastatin production by SSF using *Aspergillus flavipes*. *Enzymes Microb Techol* 37: 521-526.

[14] Kysilka, R. (1993). Determination of lovastatin (mevinolin) and mevinolinic acid in fermentation liquids. *J. Chromatol*., 630: 415-417.

[15] Madan, M. and K.S. Thind. (2000). Physiology of fungi. 1st edition. A. P. H. publishing corporation. New Delhi p. 52-54.

[16]Arjumand A., H. Mukhtar, U. Gohar and I. UlHaq,. (2013). Production of lovastatin from *A. terreus* through submerged fermentation. *Pak. J. Bot*., 45 (5): 1795-1800.

[17] Casas, L.J.L., J.A. Sánchez Pérez, J.M. Fernández Sevilla, E.M.R. Porcel, and Y. Chisti,. (2005). Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus. J. Biotechnol*. 116: 61-77.

[18] Manzoni, M. and Rollini, M. (2002). Biosynthesis and Biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 58: 555-564.

[19] Chaynika P. and S.Shivakumar,. (2017). Lovastatin Production from Agrowastes using *A. terreus* by Solid state fermentation. *Advances in Bioresearch*, 8 (4): 216-224.

[20] Jaberi, F.A., H.J. Mansoorian, H. Jalili and M. Azizi. (2016). A Review of the effective factors for lovastatin production by *Aspergillus terreus* Atcc 20542 in Liquid Submerged Fermentation. *J Babol Univ Med Sci*; 18(12): 40-48.

[21] Sadia J., M. Meraj, S. Mahmood, A. Hameed, F. Naz, S. Hassan and R. Irfan,. (2017). Biosynthesis of lovastatin using agro-industrial wastes as carrier substrates. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research February* 16 (2): 263-269.

[22] Siamak, M., N. Moazami, S. Mirdamadi and M. Bakhtiari. (2003). Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iran Biomed. J*. 7 (1): 29-33.

[23] Foukia E.M., G.S. Ibrahim and M. Elsoud,. (2016b). Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus. J Genet Eng Biotechnol*. 14 (2): 253-259.

[24] Martin, J.F. and A.L. Demain, (1980). Microbiol. Rev., 44: 230-251. Cited in (P.S. Masurekar. (1992). Therapeutic Metabolites). Chapter 10 (PP. 241-301) in Biotechnology of Filamentous Fungi, Technology and Products. D. B. Finkelstein and C. Ball, (Editors). Butterworth-Heineman, Boston, London, Sydney, Toronto.

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN, THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG LÊN MEN CHỦNG *Streptomyces* sp. SS52 NHẰM THU NHẬN, TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNGKHÁNG OXY HOÁ CỦA GENISTEIN

Nguyễn Trần Thanh Thủy, Huỳnh Thế Vinh

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: thanhthuy2510hcm@gmail.com, huynhthevinh7@gmail.com

TÓM TẮT

Một loài Streptomyces sp. SS52 được phân lập từ cây Phyllanthus urinaria tại tỉnh Trà Vinh có khả năng thủy phân liên kết glycosidic của isoflavone glycoside, điều này được phát hiện bằng cách kiểm tra hoạt động -glucosidase của nó. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện khảo sát thành phần môi trường FM3 và điều kiện lên men chủng Streptomyces sp. SS52, sau đó tiến hành tinh sạch để thu nhận và xác định khả năng kháng oxy hoá của genistein. Mục đích là thu nhận được genistein có hàm lượng và độ tinh sạch cao, từ đó có nhiều ứng dụng trong ngành mỹ phẩm, y dược và đời sống. Kết quả khảo sát cho thấy môi trường FM3 cải tiến gồm: 4,4 (g/l) CaCO3, 5 (g/l) YE, 2,2 (g/l) Peptone, 22 (g/l) tinh bột, bột đậu nành 19,5 (g/l), pH 7.3; điều kiện nhiệt độ 25 ^oC, thời gian nuôi là 6 ngày. Hiệu suất chiết và tinh sạch genistein lần lượt là 36,713% và 47,027%. Nồng độ bắt 50% gốc tự do DPPH của genistein là 9,022 (µg/ml).

Từ khóa: *-glucosidase, Genistein, Đậu nành, Isoflavone, Kháng oxi hóa, Phyllanthus urinaria, Tinh sạch, Streptomyces sp.*

SURVEY EFFECT OF CONDITIONS, ENVIRONMENTAL COMPOSITION ON *Streptomyces* sp. SS52 ACCESSORIES, CLEANING, AND DETERMINATION OF GENISTEIN'S RESISTANCE TOXICOLISTIC

Nguyen Tran Thanh Thuy, Huynh The Vinh

University of Science - VNU Ho Chi Minh City

Corresponding author: thanhthuy2510hcm@gmail.com, huynhthevinh7@gmail.com

ASTRACT

The Streptomyces sp. SS52 strain was isolated from the plant, namely Phyllanthus urinaria in Tra Vinh province, capable of hydrolyzing the glycosidic bond of isoflavone glycosides, was isolated by detecting its β-glucosidase activity. In this study, we performed a component survey on fermented the FM3 media of Streptomyces sp. SS52 aims to acquire and purify genistein and then determine the antioxidant capacity of genistein. Conducted fermentation on the FM3 field under aerobic conditions collected fermentation after four days. Next, to quantify genistein in culture solution by the spectrometric method. Then run the thin plate and column chromatography for semi-purified and genistein purified. Finally, the antioxidant activity of genistein was determined by the DPPH method. The results of FM3 environmental survey show that the content changes of the following ingredients: 4,4 (g/l) CaCO3, 5 (g/l) YE, 2,2 (g/l) Peptone, 22 (g/l) Starch, Soybean 19,5 (g/l), pH 7,3; temperature conditions 25^oC, culture time is six days. The results showed that the percentage of genistein recovery after extracted with ethyl acetate and after purified by column chromatography are 36,713% and 47,027%, respectively. The antioxidant concentration of genistein required to reduce 50% of the DPPH present in this study is 9,022 (µg/ml).

Key: *-glucosidase, Antioxidation, Cleanning, Isoflavone, Genistein, Phyllanthus urinaria, Soybean, Streptomyces sp.*

MỞ ĐẦU

Genistein là một phytoestrogen và thuộc nhóm isoflavone, chúng là chất chuyển hoá thứ cấp được tìm thấy trong tự nhiên, chủ yếu trong đậu nành. Genistein có cấu trúc diphenol giống với estrogen nội sinh của con người, nhờ vị trí tương đồng giữa các nhóm OH ở genistein và estrogen mà genistein có khả năng liên kết với các phân nhóm thụ thể của estrogen và giải quyết được một số rối loạn chức năng ở phụ nữ mãn kinh. Bên cạnh đó, genistein còn là một chất có hoạt

tính kháng oxy hoá, chất chống ung thư,… Với nhiều chức năng và ứng dụng, genistein là một thành phần tiềm năng cho các sản phẩm dược, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và chế phẩm sinh học cho nuôi trồng thuỷ sản. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng chủng *Streptomyces* sp. có khả năng tạo ra genistein. Do đó, mục đích của đề tài là thu nhận genistein với hàm lượng và độ tinh sạch cao từ dịch lên men chủng *Streptomyces* sp. nhằm tiết kiệm chi phí sản xuất và thời gian thu nhận genistein, qua đó có thể đánh giá được phương pháp thu nhận genistein từ dịch lên men chủng *Streptomyces* sp. SS52. Về tính khoa học, từ môi trường đã được cải tiến có thể tiến hành nghiên cứu nuôi cấy tối ưu môi trường để thu genistein có hàm lượng cao, sau đó đem tinh sạch để thu genistein tinh khiết nhất, phục vụ cho việc kháng oxi hóa, chống lão hóa trong công nghiệp mỹ phẩm, chống ung thư, hạn chế đáp ứng của tế bào với estrogene trong lĩnh vực y học. Đồng thời, từ phương pháp thực hiện tinh sạch genistein đã thực hiện có thể phát triển các phương pháp này tốt hơn nhằm tinh sạch hoàn toàn genistein, hoặc tinh sạch một phần tùy theo mục đích sử dụng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu Sơ đồ thực nghiệm Chủng *Streptomyces* sp. SS52 sử dụng trong đề tài được phân lập từ cây diệp hạ châu (*Phyllanthus urinaria*) ở tỉnh Trà Vinh, Việt Nam và định danh bởi Trung tâm nghiên cứu và Ứng dụng Khoa học Công nghệ.



Các dụng cụ và thiết bị của phòng thí nghiệm sinh hóa – trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Phương pháp đo quang phổ

$AlCl_3$ có thể liên kết với các gốc 5-hydroxy-4-keto, 3-hydroxy-4-keto or o-dihydroxyl trong nhóm flavonoids, genistein có trong mẫu sẽ tạo phức màu vàng với dung dịch $AlCl_3$, cường độ màu của phản ứng tỉ lệ thuận với hàm lượng genistein, và phản ứng này được nhận biết khi đo ở bước sóng 382 nm

Phương pháp Sắc ký lớp mỏng

Chuẩn bị giấy bản mỏng sắc ký TLC silica gel 60 F254. Dung môi theo tỷ lệ 10 cloroform: 1 metanol: 20 ethyl acetate. Chấm sắc ký. Tiến hành chạy sắc ký TLC sau 1 giờ xem dưới UV 253 nm.

Phương pháp Sắc ký cột

Chuẩn bị cột thuỷ tinh có kích thước đường kính khoảng 1 cm và chiều dài từ 70 – 80 cm, sau đó tiến hành nhồi cột: Pha tĩnh là silicagel 60 (0,04 – 0,063 mm); pha động là hệ dung môi ly giải 10 cloroform: 1 methanol. Nạp mẫu vào cột.

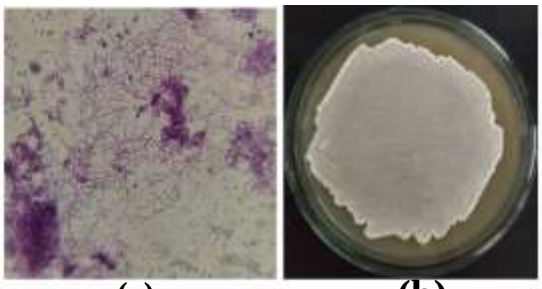
Phương pháp xác định khả năng kháng oxy hoá của Genistein

Thực hiện phản ứng kháng oxy hoá của genistein từ dịch lên men sau khi tinh sạch bằng phương pháp DPPH. Sau 30 phút, các ống nghiệm được tiến hành đo mật độ quang ở bước sóng 517 nm. Tính phần trăm bắt gốc tự do DPPH. Từ tỉ lệ % hoạt tính bắt gốc tự do DPPH, xây dựng phương trình tương quan tuyến tính, từ đó chúng tôi xác định giá trị IC_{50} để làm cơ sở so sánh khả năng kháng oxy hóa giữa các mẫu. Mẫu nào có giá trị IC_{50} càng thấp thì hoạt tính kháng oxy hóa càng cao.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái của *Streptomyces* sp. SS52 trên môi trường SFM

Streptomyces sp. SS52 là sinh vật hiếu khí. Khi nuôi cấy trên môi trường SFM, khuẩn lạc có cấu trúc chắc chắn, dạng màng bọc đâm sâu vào cơ chất. Bề mặt xạ khuẩn được phủ bằng khuẩn ty khí sinh dạng nhung và có tính kị nước. Khi các sợi khí sinh bắt đầu già, khuẩn lạc sẽ có màu nâu và đậm dần theo thời gian. Quan sát dưới kính hiển vi, *Streptomyces* sp. SS52 là một loài thuộc vi khuẩn gram dương, tế bào có dạng sợi và sắp xếp thành một mạng lưới gọi là sợi nấm. *Streptomyces* sp. SS52 có xu hướng mọc thành cụm và sinh sản vô tính bằng cách tạo bào tử.



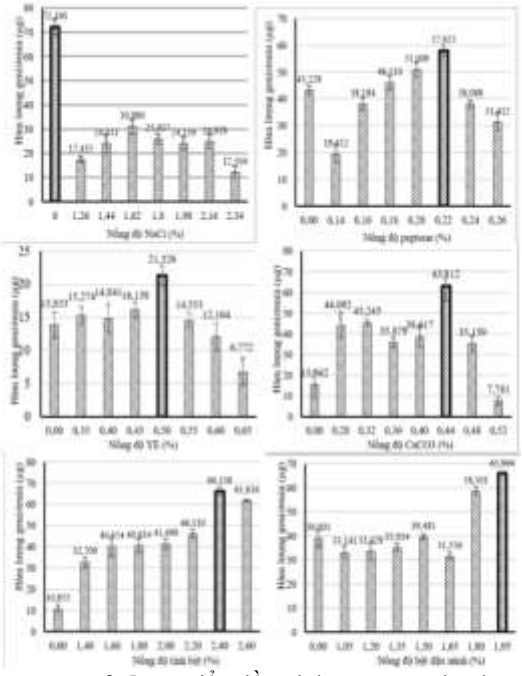
Hình 1: *Streptomyces* sp. SS52 **(a)** trên kính hiển vi x40 và **(b)** trên môi trường SFM sau 4 ngày cấy

Khảo sát thành phần môi trường FM3 ảnh hưởng đến khả năng sinh genistein của *Streptomyces* sp. SS52

Khảo sát nồng độ YE: Sau khi lên men *Streptomyces* sp. SS52 trong môi trường FM3 với nồng độ YE thay đổi ở các nồng độ 0%, 0.35%, 0.4%, 0.45%, 0.5%, 0.55%, 0.6%, 0.65% và nhận thấy nồng độ YE 0.5% cho hàm lượng genistein cao nhất đạt 21,326 ± 0,877 (µg).

Khảo sát nồng độ $CaCO_3$: Khảo sát nồng độ $CaCO_3$ 3 các nồng độ 0%, 0,28%, 0,32%, 0,36%, 0,40%, 0,44%, 0,48%, 0,52% và thu được hàm lượng genistein cao nhất ở nồng độ 0.44% với 63,112 ± 4,134 (µg).

Khảo sát nồng độ NaCl: Khảo sát nồng độ NaCl ở các nồng độ 0%, 1,26%%, 1,44%, 1,62%, 1,8%, 1,98%, 2,16%, 2,34% và thu được hàm lượng genistein cao nhất ở nồng độ 0% với 72,19 ± 1,939 (µg).



Hình 2: Biểu đồ ảnh hưởng của thành phần môi trường FM3 lên khả năng sinh genistein của *Streptomyces* sp. SS52

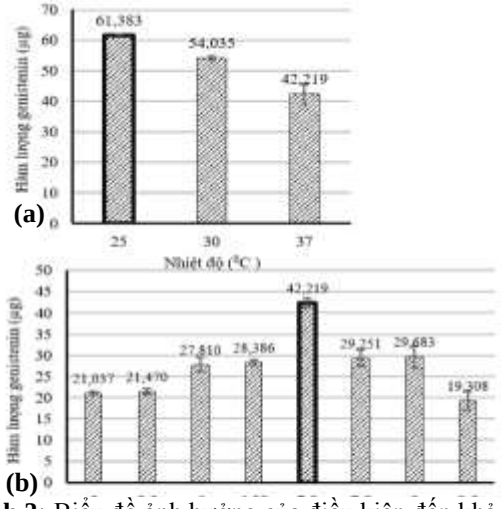
Khảo sát nồng độ Peptone: Khi khảo sát peptone ở các nồng độ 0%, 0,14%, 0,16%, 0,18%, 0,20%, 0.22%, 0,24%, 0,26% và ở nồng độ 0,22% cho hàm lượng genistein cao nhất với 57,925 ± 1,088 (µg).

Khảo sát nồng độ tinh bột: Khảo sát tinh bột ở các nồng độ 0%, 1,4%, 1,6%, 1,8%, 2%, 2,2%, 2,4%, 2,6% và nhận thấy nồng độ tinh bột ở 2.4% hàm lượng genistein cao nhất đạt 66,138 ± 1,04 (µg).

Khảo sát nồng độ bột đậu nành: Khảo sát bột đậu nành 4 các nồng độ 0%, 1,05%, 1,2%, 1,35%, 1,5%, 1,65%, 1,8%, 1,95%, nhận thấy nồng độ bột đậu nành ở 1,95% hàm lượng genistein cao nhất đạt 65,994 ± 0,382 (µg).

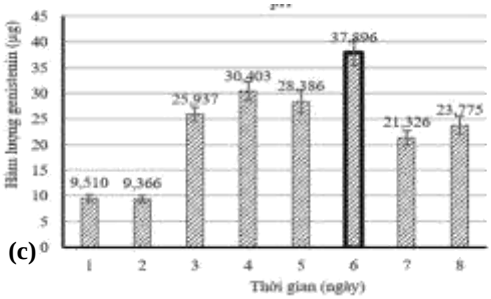
Khảo sát điều kiện nuôi cấy sinh genistein từ *Streptomyces* sp. SS52

Khảo sát Nhiệt độ: Nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và phản ứng enzyme tham gia vào quá trình tổng hợp chất chuyển hóa. Chúng tôi tiến hành khảo sát ở 25^0C, 30^0C, 37^0C và nhận thấy 25^0C cho hàm lượng genistein cao nhất đạt 61,383 ± 0,250 (µg) từ dịch lên men.



Hình 3: Biểu đồ ảnh hưởng của điều kiện đến khả năng sinh genistein của *Streptomyces* sp. SS52

Khảo sát pH: pH có ảnh hưởng đáng kể đến động học sinh trưởng của vi sinh vật, hoạt động của enzyme trong các chủng sinh sản rất nhạy cảm với sự thay đổi pH, tiến hành khảo sát pH ở các giá trị 5, 5.5, 6, 6.39, 7.3, 7.5, 8, 8.5 và pH ở 7.3 cho hàm lượng genistein cao nhất đạt 42,219 ± 0,629 (µg).

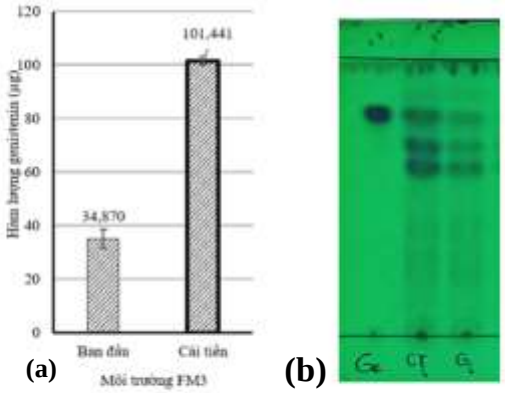


(c)

Khảo sát thời gian: Thời gian ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng và tăng trưởng của xạ khuẩn, điều này ảnh hưởng đến hàm lượng genistein tạo ra. Khảo sát thời gian lên men *Streptomyces* sp. SS52 từ 1-8 ngày trong môi trường FM3 và xác định được ngày thứ 6 có hàm lượng genistein cao nhất đạt 37,897 ± 1,420 (µg).

Thành phần môi trường sau cải tiến và so sánh hàm lượng genistein sau khi cải tiến Bảng 1: Thành phần môi trường sau cải tiến

Thành phần môi trường FM3	(g/l)
$CaCO_3$	4,4
NaCl	0
YE	5
Peptone	2,2
Tinh bột	22
Bột đậu nành	19,5
Điều kiện nuôi cấy	
pH	7.3
Nhiệt độ	25^0C
Thời gian lên men	6 ngày



(a) (b)

Hình 4: (a) Biểu đồ thể hiện hàm lượng genistein trong môi trường FM3 trước và sau cải tiến **(b)** Kết quả chạy TLC môi trường FM3 ban đầu và cải tiến

Lên men *Streptomyces* sp. SS52 với môi trường FM3 cải tiến cho hàm lượng genistein cao đạt 101,441(µg), gấp ba lần so với hàm lượng genistein từ môi trường lên men FM3 ban đầu với 34,871(µg). Trong kết quả nghiên cứu, hàm lượng genistein thu hồi sau khi lên men *Streptomyces* sp. SS52 trong môi trường FM3 cải tiến đạt 346,82 µg genistein/1g cơ chất bột đậu nành, cao hơn 47,52 mg genistein/1g cơ chất bột đậu nành so với kết quả nghiên cứu của NT Pandit và cộng sự (2011). Với kết quả so sánh này, có thể nhận định rằng, môi trường FM3 cải tiến phù hợp với *Streptomyces* sp. SS52 sinh genistein. Kết quả chạy TLC cho thất vệt genistein ở cột môi trường FM3 cải tiến đậm màu hơn so với vệt genistein ở cột môi trường FM3 ban đầu.

Tinh sạch genistein từ dịch lên men *Streptomyces* sp. SS52

Bảng 1: Hiệu suất thu hồi genistein sau khi chiết

Mẫu	Trước khi chiết	Sau khi chiết
Thể tích mẫu (ml)	100	3,2
Nồng độ genistein (µg/ml)	6,523 ± 0,222	74,832 ± 1,531
Hàm lượng genistein (µg)	652,3 ± 22,2	239,462 ± 4,899
Hiệu suất thu hồi genistein (%)	36,711	

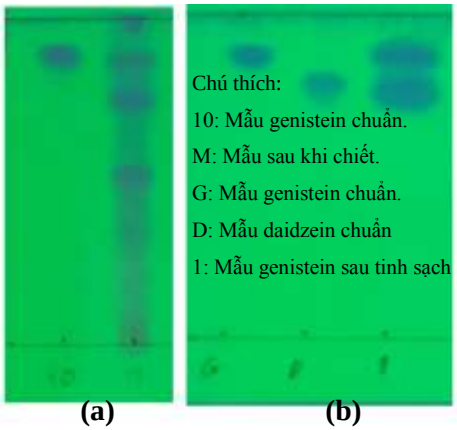
Bảng 2: Hiệu suất thu hồi genistein sau tinh

Mẫu	Trước khi chạy sắc ký cột	Sau khi chạy sắc ký cột
Thể tích (ml)	1	6
Nồng độ genistein (µg/ml)	1340,634	105,476
Hàm lượng genistein (µg)	1340,634	632,856
Hiệu suất thu hồi genistein (%)	47,026	

Hiệu suất thu hồi genistein sau khi chiết và sau khi tinh sạch

Kết quả chạy TLC của dịch lên men sau khi chiết và sau khi tinh sạch

Kết quả ở **bảng 1** hiệu suất thu hồi genistein sau khi chiết là 36,711%, nguyên nhân hiệu suất thu hồi genistein tương đối thấp là do trong quá trình lên men, *Streptomyces* sp. SS52 tạo ra lớp dầu ở bề mặt môi trường FM3 đã ảnh hưởng đến khả năng hoà tan của genistein vào pha dung môi ethyl acetate. Theo nghiên cứu của N. T. Pandit và cộng sự (2011), hiệu suất thu hồi hàm lượng genistein sau khi chiết với dung môi ethyl acetate đạt 67,01 (%) và nhóm tác giả cũng đã giải thích về hiệu suất chiết thu hồi hàm lượng genistein tương đối thấp có thể do lớp dầu được tạo ra trong quá trình lên men *Streptomyces roseolus* NRRL B-5424. Kết quả **bảng 2** cho thấy hàm lượng genistein sau khi chạy sắc ký cột đạt hiệu suất thu hồi genistein là 47,026%. Trong thí nghiệm, phương pháp định lượng còn hạn chế do $AlCl_3$ 2% vẫn có thể phản ứng với genistin và tạo phức, nên ảnh hưởng một phần đến giá trị mật độ quang hấp thụ cực đại ở bước sóng 382 nm. So sánh kết quả chạy TLC của dịch lên men sau khi chiết và sau khi tinh sạch ở **hình 5(a)(b)**, dịch chiết sau khi tinh sạch chỉ xuất hiện hai vạch là genistein và daidzein so với kết quả chạy TLC của dịch chiết ban đầu vẫn còn xuất hiện nhiều vạch và vệt kéo dài, điều này chứng tỏ dịch sau tinh sạch đã loại bỏ được nhiều tạp chất và sạch hơn so với ban đầu.



Hình 5: (a) Kết quả chạy TLC dịch chiết **(b)** Kết quả chạy TLC của dịch chiết sau khi tinh sạch genistein

Khả năng kháng oxy hoá của genistein từ dịch lên men *Streptomyces* sp. SS52 sau khi đã tinh sạch.

Bảng 3: Khả năng kháng oxy hoá của genistein từ dịch sau tinh sạch và khả năng kháng oxy hoá của acid ascorbic

Loại mẫu	Nồng độ khử được 50% gốc tự do DPPH (IC_{50})
Mẫu sau tinh sạch (genistein)	9,022 ± 0,670 (µg/ml)
Mẫu acid ascorbic	6,604 ± 0,052 (µg/ml)

Dựa vào kết quả **bảng 3** mẫu sau tinh sạch có khả năng kháng oxy hoá cao với nồng độ genistein khử được 50% gốc tự do DPPH là 9,022 0,670 (µg/ml), không quá cao hơn mẫu acid ascorbic với giá trị IC_{50} là 6,604 0,052 (µg/ml). Vì vậy, khả năng kháng oxy hoá của genistein từ dịch sau lên men tương đối cao.

So sánh với kết quả nghiên cứu của Salah Hamza Sherif và cộng sự (2018), với nồng độ genistein 58,90 (µg/ml) có thể khử được 50% gốc tự do DPPH, nồng độ này cao hơn 6.5 lần so với kết quả nghiên cứu. Kết quả này tương ứng với khả năng kháng oxy hoá của genistein có trong dịch sau tinh sạch gấp 6,5 so với kết quả nghiên cứu của Salah Hamza Sherif và cộng sự (2018).

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Từ các kết quả khảo sát, môi trường cải tiến đã giúp tăng hàm lượng genistein gấp ba lần so với môi trường ban đầu, khi lên men chủng *Streptomyces* sp. SS52 trong môi trường FM3 cải tiến với thành phần môi trường: 4,4 (g/l) $CaCO_3$, 5 (g/l) YE, 2,2 (g/l) Peptone, 22 (g/l) tinh bột, bột đậu nành 19,5 (g/l), pH=7.3 ở điều kiện 25^0C trong vòng 6 ngày. Nghiên cứu cũng đã thu nhận và tinh sạch genistein từ dịch lên men *Streptomyces* sp. SS52 chỉ bao gồm genistein và daidzein, đã loại bỏ được nhiều tạp chất từ dịch lên men ban đầu với hiệu suất thu hồi genistein sau khi chiết và sau khi tinh sạch đạt 36.711% và 47.026%. Nồng độ khử được 50% gốc tự do DPPH (IC50) của genistein là 9,022 ± 0,670 (µg/ml) và của acid ascorbic là 6,604 ± 0,052

(μg/ml). Nghiên cứu cũng là tiền đề cung cấp dữ liệu cho các nghiên cứu sau này về thu nhận genistein
từ dịch lên men *Streptomyces* để ứng dụng genistein như là thành phần quan trọng trong các sản phẩm dược, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và chế phẩm sinh học cho nuôi trồng thuỷ sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

CÉSAR I. D. C. ET AL. (2008), "Quantitation of genistein and genistin in soy dry extracts by UV-Visible spectrophotometric method", Química Nova. 31 (8), pp. 1933-1936.

HUONG NGUYEN VAN. ET AL. (2019), "Genome sequence data of *Streptomyces* sp. SS52, an endophytic strain for daidzein biosynthesis", *Data in brief*. 27, pp. 104746.

PANDIT N. ET AL. (2011), "Design and optimization of a novel method for extraction of genistein", *Indian journal of pharmaceutical sciences*. 73 (2), pp. 184.

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG CHỐNG OXY HÓA VÀ TIỂU ĐƯỜNG TỪ DỊCH CHIẾT CỦA CÂY TẦM BÓP (*Physalis angulate*)

Nguyễn Thanh Quang[1*], Lê Nguyễn Quang Trường[1], Nguyễn Nhựt Huỳnh[1], Võ Thanh Sang[2]

[1] *Khoa Công nghệ, trường Đại học Văn Lang, Tp. Hồ Chí Minh*

[2] *Viện Kỹ thuật Công nghệ cao, trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Tp. Hồ Chí Minh*

[*] Tác giả liên lạc: quang.nguyen@vlu.edu.vn

TÓM TẮT

Cây tầm bóp (Physalis angulata) là một loài thực vật thuộc họ Solanaceae, đóng một vai trò quan trọng trong việc khắc phục các triệu chứng viêm như hen suyễn, viêm gan, viêm da, thấp khớp và điều trị một số rối loạn sức khỏe như cảm lạnh, ho, sốt, sốt rét và các bệnh thần kinh. Ngoài ra, P.angulata còn được sử dụng như một loại thuốc truyền thống để cải thiện tình trạng tăng đường huyết. Vì vậy, nghiên cứu này nhằm mục đích tìm hiểu cơ chế hoạt động của P.angulata đối với hoạt tính chống đái tháo đường của nó bằng mô hình In-vitro.

Chiết xuất ethanol của P.angulata được chuẩn bị trong điều kiện ethanol 98% và tỷ lệ 1/4 (w/v) trong 4 giờ ở 60 ^{O}C. Các nồng độ 50, 100 và 200 µg/mL của chiết xuất được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm. Sự ức chế α–amylase đã được nghiên cứu thông qua các xét nghiệm axit dinitrosalicylic. Sự hấp thu glucose được xác định bằng cách sử dụng mô hình tế bào LO-2. Khả năng kháng oxy hóa được kiểm tra thông qua khảo sát hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và ABTS^{+}. Sản xuất oxit nitric được đo bằng phản ứng Griess, trong khi khả năng sống của tế bào được kiểm tra bằng xét nghiệm MTT. Kết quả cho thấy chiết xuất của P.angulata có thể ức chế hoạt động của alpha-amylase lên đến 56,6 ± 4,7% ở nồng độ 200 µg/mL. Hơn nữa, P.angulata sở hữu khả năng hấp thụ glucose lên đến 2,2 ± 0,18 mM glucose/g chiết xuất tương đương 156 ± 10,1%. Ngoài ra, thử nghiệm hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và ABTS^{+} của chiết xuất P.angulata cũng cho thấy hiệu quả khá cao, với hiệu suất lần lượt là 52,6 ± 3,5% và 59,7 ± 2,6% và giảm khả năng sản xuất NO xuống 34,2 ± 3,8% từ các tế bào RAW 264.7.

PHƯƠNG PHÁP

Xử lý mẫu

Các nguyên liệu thực vật bao gồm lá và thân của *P.angulata* được làm khô trong mát và xay thành bột bằng máy xay. Bột (100 mg) được ngâm trong 10 mL ethanol 98% kéo dài 4 giờ ở 60^{O}C sau đó thu hết dịch chiết. Dịch chiết ethanol thu được sau khi làm bay hơi sẽ được giữ ở 4^{O}C để sử dụng trong tương lai.

Thử nghiệm ức chế α–amylase

Thử nghiệm ức chế α–amylase được thực hiện như mô tả của Bhutkar và Bhise[12]. 1 mL dịch chiết (50, 100 và 200 µg/mL) hoặc acarbose (100 µg/mL) được ủ với 1 mL α–amylase (A4582, được pha loãng trong dung dịch đệm natri phosphate 20 mM, pH 6,9) trong 30 phút. Sau đó, 1 mL dung dịch tinh bột (10 mg / mL) được thêm vào và ủ trong 10 phút ở 37^{O}C. Tiếp theo, 1 mL thuốc thử DNS được thêm vào và đun nóng trong 5 phút. Độ hấp thụ được đo ở bước sóng 540 nm bằng máy quang phổ (Genova Nano, Jenway, Anh). Phần trăm ức chế được tính theo các công thức sau (OD = mật độ quang):

Sự ức chế α–amylase (%) = $[((OD_C - OD_B) - (OD_T - OD_B))/(OD_C - OD_B)]$ x 100%

Trong đó, C = tinh bột 1% + α–amylase + nước cất; B = dịch chiết + α–amylase + nước cất; T = tinh bột 1% + α–amylase + dịch chiết + nước cất.

Xác định khả năng hấp phụ glucose

Khả năng hấp phụ glucose của dịch chiết được xác định theo Ou và cộng sự[13]. Dịch chiết được thêm vào 25 mL dung dịch glucose (10, 50 hoặc 100 mM) để đạt được nồng độ dịch chiết cuối cùng là 10 mg/mL. Hỗn hợp được trộn đều, ủ trong nồi lắc cách thủy ở 37^{O}C trong 6 giờ, ly tâm 4000 v/p trong 20 phút và xác định hàm lượng glucose trong phần nổi phía trên. Sự hấp phụ glucose được tính theo công thức sau:

Sự hấp phụ Glucose = [(G_1 – G_2) x khối lượng hỗn hợp]/ 1g dịch chiết

Trong đó, G_1 là nồng độ glucose của dung dịch ban đầu; G_2 là nồng độ glucose sau 6 giờ.

Hấp thu glucose ở tế bào gan người bình thường (LO-2)

Sự hấp thu glucose trong dòng tế bào gan người bình thường (LO-2) được xác định như được mô tả bởi Van de Venter và cộng sự[14]. Các tế bào (1 x 10^4 tế bào/mL) được xử lý bằng dịch chiết (50, 100, và 200 µg/mL) hoặc metformin (20 µg/mL) trong 48 giờ. Sau đó, thay thế phần dịch nổi phía trên bề mặt nuôi cấy tế bào được thay thế bằng dung dịch đệm ủ 50 µL chứa 8 mM glucose và tiếp tục được duy trì trong 3 giờ ở 37^{O}C. Nồng độ glucose trong phần dịch sau đó được đo bằng cách sử dụng máy đo đường huyết Contour ™ Plus (Ascensia Diabetes Care, Thụy Sĩ). Lượng glucose hấp thu được tính theo phần trăm so với đối chứng C (nhóm tế bào không được điều trị). Lượng glucose hấp thụ được tính theo công thức sau:

Sự hấp thụ glucose (%) = [(8 – T)/(8 – C)] x 100

Trong đó, T là nồng độ glucose trong phần nổi của nhóm tế bào được xử lý, C là nồng độ glucose trong phần nổi của nhóm tế bào không được xử lý.

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết được xác định bằng khảo sát bắt gốc tự do DPPH như được mô tả bởi Vo và cộng sự[15]. Theo đó, 100 µL dịch chiết (50, 100, và 200 µg/mL) được trộn với 100 µL dung dịch DPPH (0,3 mM) và ủ 30 phút trong bóng tối ở nhiệt độ phòng. Độ hấp thụ của hỗn hợp sau đó được đo ở bước sóng 490 nm bằng máy quang phổ (Genova Nano, Jenway, Anh). Vitamin C 20 µg/mL) được sử dụng làm đối chứng. Khả năng loại bỏ gốc tự DPPH của mẫu được xác định theo công thức sau:

Hiệu ứng quét DPPH (%) = [($OD_{control}$ – $OD_{extract}$) / $OD_{control}$] x 100%

Khảo sát khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$

Thử nghiệm này được thực hiện theo mô tả của Võ và cộng sự[15]. 0,9 mL dung dịch $ABTS^+$ được trộn với 0,1 mL dịch chiết (50, 100 và 200 µg/mL) hoặc vitamin C (20 µg/mL) trong 45 giây. Tác dụng chống oxy hóa của dịch chiết được tính theo công thức:

Hiệu ứng quét $ABTS^+$ (%) = [($OD_{control}$ – $OD_{extract}$) / $OD_{control}$] x 100%

Khảo sát khả năng sản xuất oxit nitric (NO)

Để điều tra sự sản sinh NO, các tế bào đại thực bào RAW 264.7 đã được xử lý trước bằng chiết xuất *P.angulata* (50, 100 và 200 µg/mL) trước khi kích thích bằng lipopolysaccharide (0,5 µg/mL) trong 24 giờ. Mức NO trong dịch nuôi cấy được đo bằng phản ứng Griess theo cách mô tả của Vo và cộng sự[16]. Theo đó, hỗn hợp gồm 100 µL môi trường nuôi cấy tế bào và 100 µL thuốc thử Griess được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Độ hấp thụ sau đó được đo ở bước sóng 540 nm. Mức sản xuất NO được tính theo tỷ lệ phần trăm so với mức đối chứng (không xử lý chiết xuất).

Tỷ lệ phát hành (%) = (T – B) / (C – B) × 100

Trong đó, B = trích xuất; C = LPS; T = trích xuất + LPS.

Thử nghiệm khả năng sống của tế bào

Mức độ sống sót của tế bào LO-2 trong gan và tế bào đại thực bào RAW 264.7 được xác định bằng xét nghiệm 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). Tóm lại, các tế bào (1 x 10^5 tế bào/mL) được ủ với dịch chiết (50, 100, hoặc 200 µg/mL) trong 24 giờ. Môi trường được lấy ra và các tế bào được ủ với dung dịch MTT 1 mg/mL trong 4 giờ. Cuối cùng, phần nổi phía trên được loại bỏ và DMSO được thêm vào để hòa tan muối formazan đã tạo thành. Lượng muối formazan được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm sử dụng đầu đọc vi phiến (Tecan Austria GmbH, Grodig / Salzburg, Austria). Khả năng sống sót của ô được tính theo phần trăm so với ô trống.

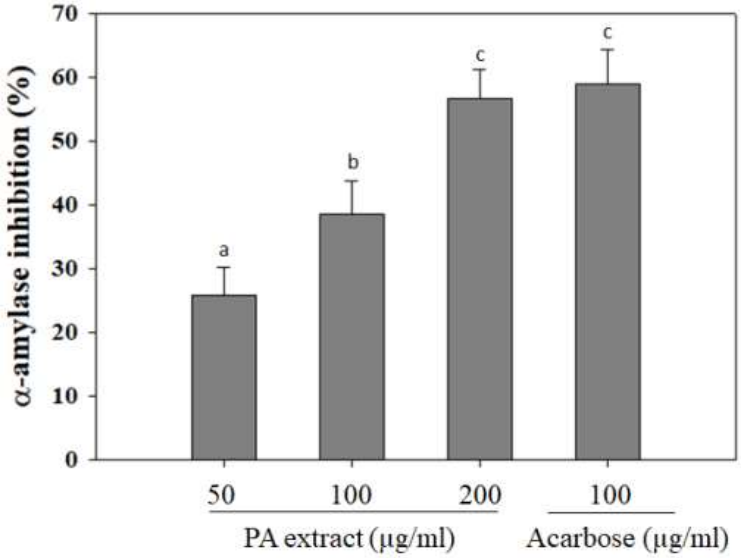
Phân tích thống kê

Dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng phép thử phân tích phương sai (ANOVA) của gói thống kê dành cho khoa học xã hội (SPSS). Sự khác biệt thống kê giữa các nhóm được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm của Duncan. Sự khác biệt được coi là có ý nghĩa ở p <0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hoạt động ức chế α–amylase của chiết xuất *P.angulata*

Việc ức chế α–amylase được coi là một chiến lược hiện quả để ngăn chặn hoặc làm chậm sự hấp thụ carbohydrate sau khi ăn, góp phần kiểm soát quá trình tăng đường huyết ở bệnh nhân đái tháo đường[18]. Trong nghiên cứu này, chiết xuất ethanol của *P.angulata* đã được kiểm tra về khả năng làm giảm sự hoạt động của α–amylase. Tùy theo liều lượng, người ta thấy rằng chiết xuất *P.angulata* có sự ức chế đáng kể đối với enzyme α–amylase (p < 0,05) (Hình 1). Tác dụng ức chế được quan sát thấy lên đến 56,6 ± 4,7% ở nồng độ 200 µg/mL. Hoạt tính của nó có thể so sánh với acarbose 59,0 ± 5,3% ở nồng độ 100 µg/mL. Hiện nay, acarbose, miglitol và voglibose là những loại thuốc chống tiểu đường hoạt động chủ yếu bằng cách ức chế các enzym liên quan đến tiêu hóa carbohydrate như α–amylase, sucrase, maltase và α–glucosidase[19]. Tuy nhiên, việc sử dụng chúng đã bị hạn chế do tác dụng phụ của chúng chẳng hạn như đầy hơi và tiêu chảy. Do đó, tác dụng ức chế của chiết xuất *P.angulata* đối với α–amylase có thể làm giảm phần nào tình trạng tăng đường huyết ở bệnh tiểu đường tuýp 2.



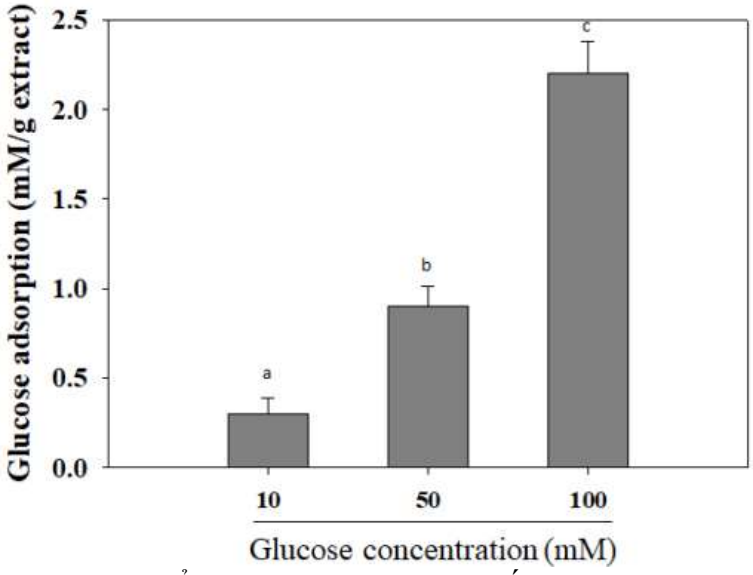
Hình 1. Hiệu quả ức chế α–amylase của dịch chiết *P.angulata*.

Acarbose đã được sử dụng như một đối chứng tham khảo. Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá

trị trung bình ± SD. Các chữ cái a – c khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (p <0,05).

Khả năng hấp phụ glucose của dịch chiết *P.angulata*

Bên cạnh sự ức chế ezyme tiêu hóa carbonhydrate, khả năng hấp phụ glucose của các chất có hoạt tính sinh học cũng góp phần vào việc ngăn ngừa hấp thu carbonhydrate sau khi ăn. Các loại cây thảo dược khác nhau (nhân sâm, mướp đắng, cỏ cà ri, chuối…) đã được tìm thấy như chất hấp phụ glucose và có tác dụng hạ đường huyết ở bệnh tiểu đường tuýp 2[20].



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết *P.angulata*

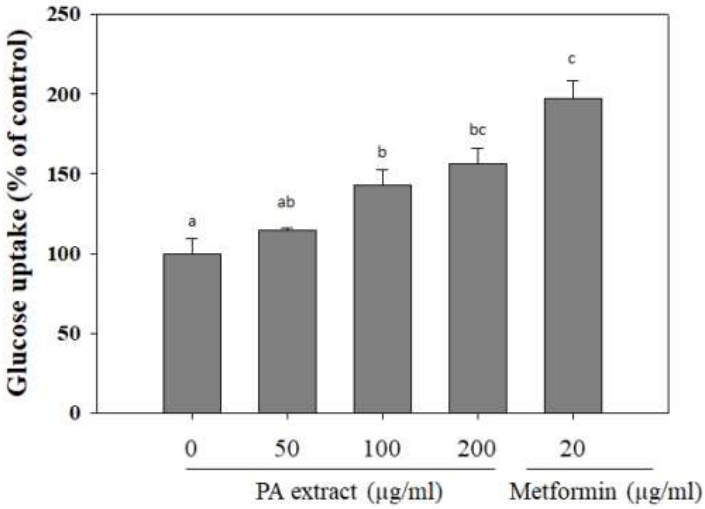
Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái a – c khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (p <0,05).

Trong nghiên cứu này, khả năng hấp phụ glucose của chiết xuất *P.angulata* đã được khảo sát. Thông qua việc đo lượng glucose còn lại sau khi trộn với dịch chiết *P.angulata* với các nồng độ đã được chỉ định.

Kết quả của thử nghiệm này cho thấy 1% (10mg/mL) chiết xuất *P.angulata* thể hiện khả năng hấp phụ glucose ở các nồng độ khác nhau (Hình 2). Theo đó, khả năng hấp phụ của dịch chiết *P.angulata* tỷ lệ thuận với nồng độ glucose. Lượng glucose liên kết sẽ tăng lên khi nồng độ glucose tăng. Đặc biệt, khả năng hấp phụ của *P.angulata* lên đế. 0,30 ± 0,09 mM/g chiết xuất, 0,90 ± 0,11 mM/g chiết xuất và 2,20 ± 0,18 mM/g chiết xuất ở nồng độ glucose lần lượt là 10, 50 và 100 mM. Từ các kết quả, hoạt động ức chế α-amylase và khả năng hấp phụ glucose của dịch chiết PA có thể góp phần làm giảm tăng đường huyết sau ăn ở bệnh nhân đái tháo đường tuýp 2.

Khả năng hấp thụ glucose của chiết xuất *P.angulata*

Sự hấp thu glucose vào mô là một quá trình quan trọng để điều chỉnh cân bằng nội môi glucose. Ở bệnh nhân đái tháo đường tuýp 2, tình trạng kháng hoặc thiếu hụt insulin dẫn đến giảm hấp thu glucose và tăng sản xuất glucose nội tiết ở gan, do đó dẫn đến tăng đường huyết. Trong nghiên cứu này, tác động kích thích của chiết xuất *P.angulata* đối với sự hấp thụ glucose ở tế bào LO-2 ở gan đã được kiểm tra.



Hình 3. Tác động kích thích của chiết xuất *P.angulata* đối với sự hấp thu glucose trong tế bào LO-2 ở gan người

Metformin đã được sử dụng như một đối chứng tham khảo. Kết quả được biểu thị theo phần trăm kiểm soát. Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái a – c khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (p <0,05).

Như kết quả thể hiện ở Hình 3, việc xử lý bằng dịch chiết *P.angulata* làm tăng sự hấp thu glucose trong tế bào LO-2 so với đối chứng. Dịch chiết *P.angulata* làm tăng cường hấp thu glucose lên đến 156,0 ± 10,1% ở nồng độ 200 µg/mL. Trong khi đó, với nghiệm thức thử nghiệm là metformin sự kích thích hấp thu glucose lên đến 197,0 ± 11,3%. So với metformin, mặc dù hiệu quả kích thích hấp thu glucose này không đáng kể, nhưng chiết xuất *P.angulata* vẫn có thể góp phần vào tác dụng hạ đường huyết khi được sử dụng làm thuốc thay thế ở bệnh nhân đái tháo đường.

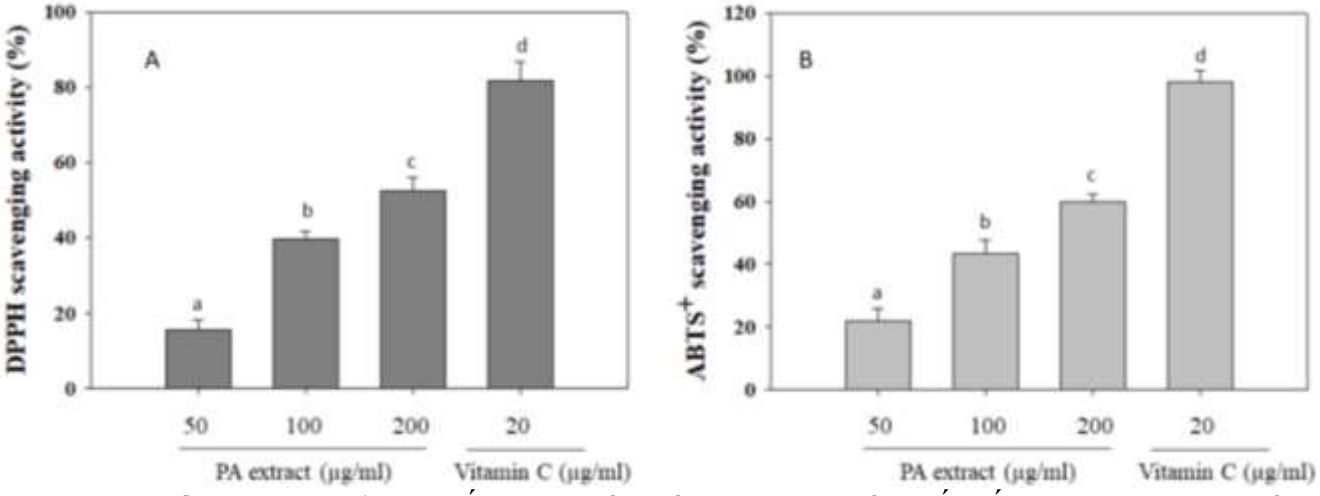
Khả năng bắt gốc tự do của chiết xuất *P.angulata*

Các gốc tự do gây ra quá trình oxy hóa một số thành phần tế bào và các phân tử sinh học như lipid, protein và DNA bởi điện tử chưa ghép đôi của nó[23]. Trên thực tế, các gốc tự do có liên quan đến rất nhiều các phản ứng oxy hóa khác nhau, khi các gốc tự do trong cơ thể tăng cao sẽ dẫn đến việc tăng áp lực oxy hóa[25]. Các gốc tự do này cũng đã được chứng minh là nguyên nhân của một số bệnh lý, bao gồm cả bệnh tiểu đường và các biến chứng của nó.

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chất chống oxy hóa đóng một vai trò quan trọng trong việc ngăn ngừa bệnh tiểu đường cũng như các biến chứng của bệnh bằng cách kích thích làm tăng cường sự trung hòa số lượng gốc tự do có trong cơ thể[26], hoạt tính chống oxy hóa của chiết xuất *P.angulata* cũng được nghiên cứu thông qua việc đo lường khả năng bắt gốc tự do của nó trên các gốc DPPH và $ABTS^+$.

Kết quả thể hiện ở Hình 4 cho thấy chiết xuất *P.angulata* ở nồng độ 200 µg/mL đã quét các gốc DPPH và $ABTS^+$ với hiệu suất khá cao, lần lượt là 52,6 ± 3,5% và 59,7 ± 2,6%. Trong khi đó, vitamin C loại bỏ đáng kể các gốc tự do ở nồng độ 20 µg/mL (81,8% đối với DPPH và 98% đối với $ABTS^+$). Kết quả này cho thấy rằng hoạt tính bắt gốc tự do của vitamin C mạnh hơn hoạt tính của dịch chiết *P.angulata*. Tuy nhiên, các thành phần được tìm thấy của dịch chiết *P.angulata* bao gồm các loại acid khác nhau (axit ellagic, axit caffeic, axit chlorogenic và axit gallic) và flavonoid (kaempferol, isoquercitrin, rutin, quercitrin và quercetin) đã được chứng minh ngoài khả năng chống oxy hóa, chúng còn có nhiều tác dụng sinh học khác và đóng một vai trò quan trọng trong việc điều trị và quản lý các bệnh lý liên quan đến tiểu đường[27,28,29].

Do đó, hoạt tính chống oxy hóa của chiết xuất *P.angulata* cũng có thể được xem là một trong những vai trò liên quan đến việc ngăn ngừa và điều trị bệnh tiểu đường cũng như các biến chứng liên quan của nó.



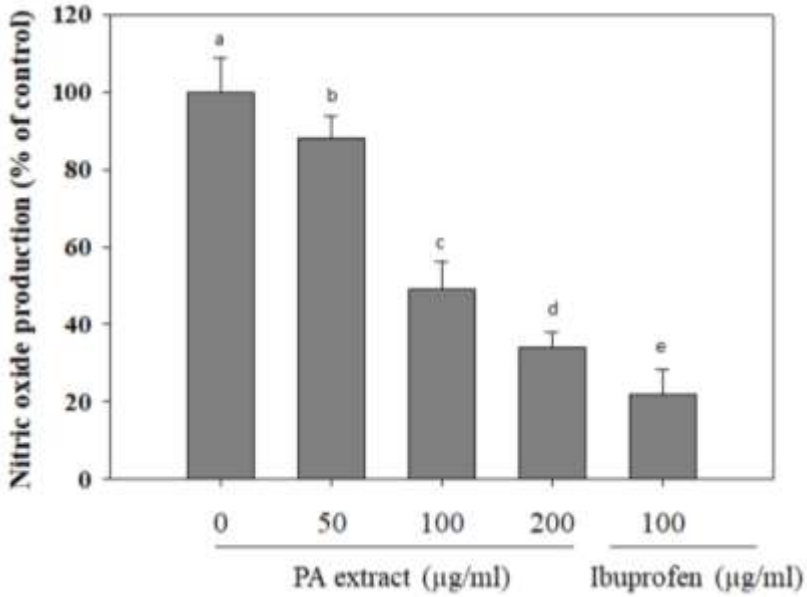
Hình 4. Hoạt động chống oxy hóa thông qua hoạt tính bắt gốc tự do DPPH (a) và $ABTS^+$ (b) của dịch chiết *P.angulata*

Vitamin C được sử dụng như một đối chứng tham khảo. Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái a – d khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (p <0,05).

Tác dụng ức chế sự sản sinh oxit nitric (NO) của chiết xuất *P.angulata*

Một số nghiên cứu đã ghi nhận rõ rằng oxit nitric (NO) có một số lợi ích nhất định trong các chức năng sinh lý và tế bào. Tuy nhiên, nồng độ NO cao có thể gây tổn thương tế bào do tạo ra các gốc peroxynitrite[30]. Theo Adela và cộng sự, việc sản sinh NO cao được quan sát thấy ở chuột mắc bệnh tiểu đường và bệnh nhân tăng đường huyết so với đối chứng[31]. Hơn nữa, đã có báo cáo cho rằng NO có thể có liên quan đến sự phát triển của các biến chứng tiểu đường bao gồm cả các bệnh lý về tim mạch[32]. Do đó, NO cũng được đề xuất là mục tiêu tiềm năng để quản lý các biến chứng liên quan đến bệnh tiểu đường.

Trong nghiên cứu này, các tế bào được xử lý trước bằng dịch chiết *P.angulata* có thể làm giảm đáng kể mức sản xuất NO theo cách phụ thuộc vào liều lượng. Kết quả ở Hình 5 cho thấy ở các mức nồng độ 50, 100 và 200 μg/mL của dịch chiết *P.angulata* mức sản xuất NO giảm xuống, lần lượt được ghi nhận là 88,0 ± 5,0%, 49,0 ± 7,2% và 34,2 ± 3,8%. Mặc dù hoạt động ức chế này của chiết xuất *P.angulata* vẫn còn kém hơn so với chất chuẩn (Ibuprofen, 100 μg/mL) với hiệu quả trong việc giảm sản sinh NO đến 22,0 ± 6,3% nhưng nó vẫn được đánh giá là tương đồng với một số đối tượng thử nghiệm khác như trà oolong (*Camellia sinensis*) và Gừng đỏ (*Zingiber officinale*)[33,34]. Để lý giải cho điều này, một số nghiên cứu cho rằng flavonoid có hoạt động ức chế mức độ biểu hiện của iNOS mRNA và protein, sau đó nó sẽ làm giảm việc sản sinh NO trong một số dòng tế bào[35]. Đáng chú ý, cơ chế trung tâm điều hòa sự biểu hiện iNOS của flavonoid được đưa ra là do sự bất hoạt của yếu tố nhân kappa B (NF-kB) và Kinase protein hoạt hóa mitogen (MAPK). Như vậy, các flavonoid có thể được xem là tác nhân chịu trách nhiệm về tác dụng ức chế việc sản xuất NO từ các tế bào RAW 264,7 của dịch chiết *P.angulata*. Từ đó cho thấy, dịch chiết *P.angulata* với hoạt tính bắt gốc tự do và khả năng ức chế việc sản sinh NO sẽ rất tiềm năng trong việc ngăn ngừa các biến chứng ở bệnh tiểu đường tuýp 2.

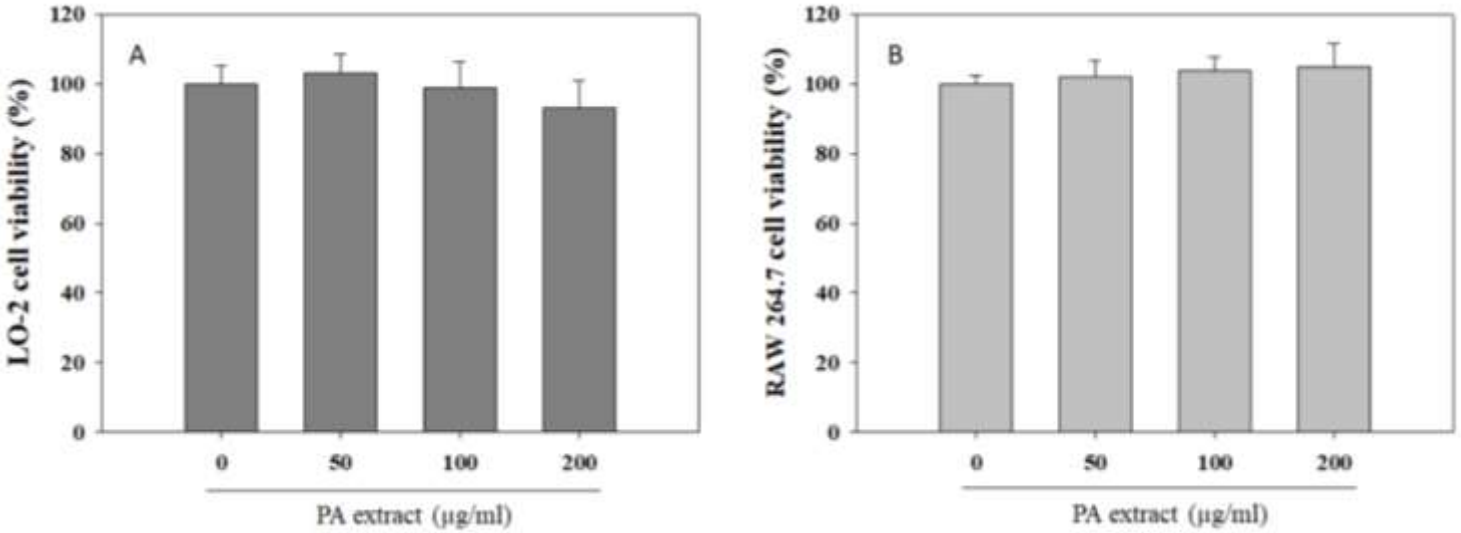


Hình 5. Hiệu quả ức chết sản sinh NO từ các tế bào RAW 264,7 của dịch chiết *P.angulata*.

Ibuprofen được sử dụng như một biện pháp kiểm soát tích cực. Kết quả được biểu thị theo phần trăm kiểm soát. Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái a – e khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm (p <0,05).

Ảnh hưởng của dịch chiết *P.angulata* đến khả năng sống của tế bào

Nhiều loại cây thảo dược đã được biết đến với tác dụng chữa bệnh và có thể dùng trực tiếp hoặc kết hợp với các loại cây khác để làm thuốc[38]. Bên cạnh đó, kiến thức liên quan đến tính an toàn của các sản phẩm này cũng rất quan trọng. Do đó, các nghiên cứu sơ bộ liên quan đến tác dụng gây độc tế bào của các cây thảo dược cần được đánh giá để đảm bảo việc sử dụng chúng tương đối an toàn. Đối với mô hình *In-vitro*, xét nghiệm MTT được sử dụng để đo độc tính tế bào. Xét nghiệm này dựa trên sự giảm trao đổi chất của muối MTT hòa tan, phản ánh chức năng bình thường của hoạt động dehydrogenase của ty thể và khả năng tồn tại của tế bào. Trong nghiên cứu này, các xét nghiệm MTT được thực hiện trên tế bào LO-2 ở gan và tế bào đại thực bào RAW 264.7 đã được xử lý trước với dịch chiết *P.angulata* ở các nồng độ khác nhau trong 24 giờ. Kết quả cho thấy mức độ sống sót của tế bào thu được trong khoảng 93 – 103% đối với tế bào LO-2 và 102 – 105% đối với tế bào đại thực bào RAW 264.7 so với mẫu trắng (Hình 6). Nó chỉ ra rằng dịch chiết *P.angulata* không có tác dụng gây độc tế bào đối với tế bào gan và tế bào đại thực bào ở các nồng độ 50, 100 và 200 μg/mL.



Hình 6. Khả năng tồn tại của tế bào LO-2 (a) và RAW 264.7 (b) của chiết xuất *P.angulata*

Khả năng sống sót của tế bào được đánh giá bằng phương pháp MTT và kết quả được biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm tế bào sống sót so với các tế bào trống. Mỗi phép xác định được thực hiện trong ba thí nghiệm độc lập và dữ liệu được hiển thị dưới dạng giá trị trung bình ± SD.

KẾT LUẬN

Với các khả năng như ức chế enzyme tiêu hóa tinh bột (α–amylase), hấp phụ và hấp thu glucose, chống oxy hóa thông qua hoạt tính bắt gốc tự do và ức chế sản xuất NO, dịch chiết của cây tầm bóp *P.angulata* được đánh giá là một chất tiềm năng cho việc chống lại bệnh tiểu đường. Do đó, *P.angulata* có thể được coi là một nguyên liệu đầy hứa hẹn cho việc phát triển các sản phẩm dược phẩm có khả năng làm giảm sự tăng đường huyết và ngăn ngừa các biến chứng liên quan đến bệnh tiểu đường. Tuy nhiên, cần thực hiện thêm nhiều nghiên cứu sâu hơn về tính an toàn và hiệu quả của *P.angulata* trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kharroubi AT and Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. World J Diabetes 2015; 6:850–867.
2. Li G, Zhang P, Wang J, Gregg EW, Yang W, Gong Q. The long-term effect of life style interventions to prevent diabetes in the China Da Qing diabetes prevention study: a 20-year follow-up study. Lancet 2008; 371:1783–1789.
3. Babiker A and Dubayee MA. Anti-diabetic medications: How to make a choice? Sudan J Paediatr. 2017; 17:11–20.
4. Kooti W, Farokhipour M, Asadzadeh Z, Ashtary-Larky D, Asadi-Samani M. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. Electron Physician 2016; 8:1832–1842.
5. George BO, Osioma E, Falodun A. Effect of Atiko (Aframium Sceptrium) and African Nutmeg (Monodora Myristica) on reduced glutathione Uric acid levels of liver marker enzymes in streptozotocin induced diabetic rats. Egy J Biochem Mol Biol. 2010; 28(2):67-78.
6. Mirzaee F, Hosseini AS, Askian R, Azadbakht M. Therapeutic activities and phytochemistry of Physalis species based on traditional and modern medicine. Res J Pharmacogn. 2019; 6:79-96.

7. Ruiz L, Ruiz L, Maco M, Cobos M, Gutierrez-Choquevilca AL, Roumy V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. J Ethnopharmacol. 2011; 133:917–921.
8. Bastos GN, Silveira AJ, Salgado CG, Picanço-Diniz DL, Nascimento JL. Physalis angulata extract exerts antiinflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. J Ethnopharmacol. 2008; 118:246–251.
9. Renjifo-Salgado E and Vargas-Arana G. Physalis angulata. L (Bolsa Mullaca): A review of its traditional uses, chemistry and pharmacology. Boletin Latino Americano Caribe Plant Med Aromat. 2013; 12:431–445.
10. Raju P and Mamidala E. Anti-diabetic activity of compound isolated from Physalis angulata fruit extracts in alloxan induced diabetic rats. The Ame J Sci Med Res. 2015; 1:40– 43.
11. Do Huy Bich, Dang Quang Chung, Bui Xuan Chuong. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, Tập II. (1st ed.). Hà Nội: Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật; 2016; 792-793 p.
12. Bhutkar MA and Bhise SB. In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of some indigenous plants. Int J Chem Sci. 2012; 10:457–462.
13. Ou S, Kwok KC, Li Y, Fu L. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose. J Agri Food Chem. 2001; 49:1026–1029.
14. van de Venter M, Roux S, Bungu LC, Louw J, Crouch NR, Grace OM, Maharaj V, Pillay P, Sewnarian P, Bhagwandin N, Folb P. Antidiabetic screening and scoring of 11 plants traditionally used in South Africa. J Ethnopharmacol. 2008; 119:81–86.
15. Vo TS, Le PU, Ngo DH. The increased gammaaminobutyric acid content by optimizing fermentation conditions of bacteria from kimchi and investigation of its biological activities. EurAsian J BioSci. 2018; 12:369–376.
16. Vo TS, Le PU, Ngo DH. Free radical scavenging and antiproliferative activities of avocado (Persea americana Mill.) seed extract. Asian Pac J Trop Biomed. 2019; 9:91–97.
17. Mahmood N. A review of α-amylase inhibitors on weight loss and glycemic control in pathological state such as obesity and diabetes. Comp Clin Path. 2016; 25:1253–1264.
18. Rehman K, Chohan TA, Waheed I, Gilani Z, Akash MSH. Taxifolin prevents postprandial hyperglycemia by regulating the activity of α-amylase: Evidence from an in vivo and in silico studies. J Cell Biochem. 2019; 120:425–438.
19. Agarwal P and Gupta R. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. J Med Health Sci. 2016; 5:1–8.
20. Prabhakar PK and Doble M. Mechanism of action of natural products used in the treatment of diabetes mellitus. Chin J Integr Med. 2011; 17:563–574.
21. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. Molecular mechanisms of insulin resistance. Diabet Med. 2005; 22:674–682.
22. Xia EQ, Zhu SS, He MJ, Luo F, Fu C, Zou TB. Marine peptides as potential agents for the management of type 2 diabetes mellitus - A prospect. Mar Drugs 2017; 15:88.
23. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. Saudi Pharm J. 2016; 24:547–553.
24. Chikezie PC, Ojiako OA, Ogbuji AC. Oxidative stress in diabetes mellitus. Int J Biol Chem. 2015; 9:92–109.

25. Singh R, Devi S, Gollen R. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidaemia: larger-than-life. Diabetes Metab Res Rev. 2015; 31:113–126.
26. Zatalia SR and Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications and management of diabetes mellitus. Acta Med Indones. 2013; 45:141–147.
27. Susanti RF, Kurnia K, Vania A, Reynaldo IJ. Total phenol, flavanoid and antioxidant activity of Physalis angulata leaves extract by subcritical water extraction. Mod Appl Sci. 2015; 9:190-198.
28. Akomolafe SA, Oyeleye SI, Olasehinde TA, Oboh G. Phenolic characterization, antioxidant activities, and inhibitory effects of Physalis angulata and Newbouldia laevis on enzymes linked to erectile dysfunction. Int J Food Prop. 2018; 21:645-654.
29. Aryaeian N, Sedehi SK, Arablou T. Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. Med J Islam Repub Iran 2017; 31:1-14.
30. Pal P, Joseph SB, Lucas L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 2007; 87:315–424.
31. Adela R, Nethi SK, Bagul PK, Barui AK, Mattapally S, Kuncha M, Patra CR, Reddy PN, Banerjee SK. Hyperglycaemia enhances nitric oxide production in diabetes: a study from south Indian patients. PLoS One 2015; 10:e0125270.
32. Giacco F and Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 2010; 107:1058–1070.
33. Novilla A, Djamhuri DS, Nurhayati B, Rihibiha DD, Afifah E, Widowati W. Anti-inflammatory properties of oolong tea (Camellia sinensis) ethanol extract and epigallocatechin gallate in LPS-induced RAW 264.7 cells. Asian Pac J Trop Biomed. 2017; 7:1005–1009.
34. Shimoda H, Shan SJ, Tanaka J, Seki A, Seo JW, Kasajima N, Tamura S, Ke Y, Murakami N. Anti-inflammatory properties of red ginger (Zingiber officinale var. Rubra) extract and suppression of nitric oxide production by its constituents. J Med Food 2010; 13:156–162.
35. Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NFkappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. Mediators Inflamm. 2007; 2007:1-10.
36. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and downregulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. Eur J Pharmacol. 2007; 557:221-229.
37. Li J, Xu L, Sang R, Yu Y, Ge B, Zhang X. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Astragalus by regulating NF-kB and MAPK signalling pathways in RAW 264.7 macrophages. Pharmazie 2018; 73:589-593.
38. Sen T and Samanta SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2015; 147: 59–110.

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG VI NẤM GÂY BỆNH TRÊN NGƯỜI TỪ CAO CHIẾT CHỦNG VI KHUẨN *Pseudomonas* sp. P20 NỘI SINH SÂM ĐẠI HÀNH (*Eleutherine Subaphylla Gagnep*.)

Dương Nhật Linh[1*], Nguyễn Phương Thảo[1], Nguyễn Đinh Hồng Nguyệt[1], Dương Ngọc Linh[1], Nguyễn Trần Ngọc Dung[1]

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: *linh.dn@ou.edu.vn*

TÓM TẮT

Hiện nay, các hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ vi sinh vật nội sinh cây dược liệu được ứng dụng trong lĩnh vực y tế và nông nghiệp. Trong nghiên cứu này đã khảo sát khả năng kháng một số chủng vi nấm gây bệnh Microsporum gypseum, Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes và Trichophyton rubrum vi khuẩn Pseudomonas sp. P20 nội sinh sâm đại hành, kết quả cho thấy Pseudomonas sp. P20 có khả năng *kháng 4 chủng vi nấm gây bệnh, trong đó kháng mạnh nhất với vi nấm M. canis (***39,98±0,51** mm). Bằng phương pháp cô quay chân không với các hệ dung môi khác nhau, đã thu nhận được được cao chiết chủng vi khuẩn nội sinh **Pseudomonas sp. P20**. Khả năng kháng nấm của cao chiết vi khuẩn Pseudomonas sp. P20 được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và xác định giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC). Kết quả cho thấy cao chiết của chủng **Pseudomonas sp. P20** được thu từ dung môi Methanol có khả năng kháng với vi nấm ***M. cannis (***24,53±0,45 mm)**,** vi nấm M. gypseum (19,63± 0,47 mm***), T. rubrum (21,26 ± 0,64 mm) và T. mentagrophytes (19,8 ± 0,32mm). Đồng thời, kết quả MIC từ cao chiết*** ức chế vi nấm M. cannis, T. rubrum và T. mentagrophytes là 125 µg/mL, vi nấm M. gypseum, là 31,25 µg/mL. Kết quả này là tiền đề để phát triển nghiên cứu sâu hơn về các hợp chất có nguồn gốc từ vi sinh vật nội sinh cây Sâm Đại Hành (Eleutherine Subaphylla Gagnep.) để làm nguồn nguyên liệu mới trong việc điều trị bệnh nấm da.

Từ khóa: cao chiết, Kháng nấm, Sâm đại hành, vi khuẩn nội sinh, vi nấm gây bệnh ở người

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ ENZYME α-AMYLASE, α -GLUCOSIDASE VÀ KHÁNG OXY HÓA CỦA CÂY RAU SAM (*Portulaca oleracea* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Nguyễn Phạm Tuấn[1*] và Bằng Hồng Lam[2]

[1]Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang

[2]Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: ngphamtuan1983@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu được thực hiện để tìm hiểu khả năng ức chế hoạt động của enzyme liên quan đến sự thủy phân tinh bột và tạo đường glucose của cao chiết cây rau sam và kháng oxy hóa ở phòng thí nghiệm. Mẫu cây rau sam được ly trích bằng phương pháp ngâm dầm với ethanol 70% và sóng siêu âm. Khả năng ức chế enzyme α-amylase, enzyme α-glucosidase và kháng oxy hóa được xác định bằng việc đo quang phổ ở bước sóng 660 nm, 405 nm và 517 nm. Kết quả, độ ẩm và hiệu suất trích của cao chiết đạt lần lượt 78,25% và 5,63%. Cao chiết cây rau sau có sự hiện diện của các hợp chất như flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, terpenoid, tannin và phenol. Cao chiết cây rau sam có khả năng ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase và giá trị IC_{50} lần lượt là 127,82 µg/mL và 110,22 µg/mL. Cao chiết cây rau sam có khả năng khử gốc tự do DPPH với IC_{50} là 66,94 µg/mL.

Từ khóa: *α-amylase, α-glucosidase, kháng oxy hóa, DPPH, cây rau sam.*

SCREENING α –AMYLASE, α -GLUCOSIDASE INHIBITOR ACTIVITIES AND ANTIOXIDANT OF *Portulaca oleracea* L BY IN VITRO

Nguyen Pham Tuan[1*]and Bang Hong Lam[2]

[1]An Giang Biotechnology center

[2]An Giang University, Viet Nam Nation University, Ho Chi Minh City

*Corresponding author: ngphamtuan1983@gmail.com

ABSTRACT

This study was to evaluate the inhibitory effects of extracts of P.oleracea on enzyme α-amylase and α-glucosidase, antioxidant at in vitro. The plant extraction was carried out by marceration method with ethanol 70% and ultrasound. Inhibition activities of α-amylase, α-glucosidase and antioxidant were measured by spectrophotometer at 660 nm, 405 nm and 517 nm wavelength. The results showed that the moisture and the yields of ethanolic extract from P. oleracea extract was 78.25% and 5.63%. P. oleracea extract has the presence of bioactive compounds such as alkaloids, flavonoids, saponins, terpenoids, steroids, tannin and phenol. P. oleracea extract has the ability to inhibit α-amylase and α-glucosidase with an IC_{50} values of 127.82 µg/mL and 110.22 µg/mL, respectively. P. oleracea extract has antioxidant ability by DPPH method with IC_{50} value of 66.94 µg/mg.

Keywords: *α -amylase, α-glucosidase, antioxidant, DPPH, Portulaca oleracea.*

GIỚI THIỆU

Đái tháo đường (ĐTĐ) là bệnh do sự rối loạn chuyển hóa carbohydrate khi hormone insulin của tuyến tụy bị thiếu hay giảm tác động trong cơ thể. ĐTĐ biểu hiện bằng lượng glucose trong máu cao hơn bình thường. Đối với người bệnh tiểu đường type 2, việc tăng glucose trong máu thường gây những biến chứng nguy hiểm. Kiểm soát đường huyết đặc biệt là đường huyết sau bữa ăn được xem là một mục tiêu quan trọng trong điều trị bệnh đái tháo đường [1]. Điều này có thể đạt được thông qua việc ức chế enzyme tiêu hóa carbohydrate như enzyme α-amylase và α-glucosidase. Hiện nay, ĐTĐ được kiểm soát bằng nhiều phương pháp khác nhau như sử dụng thuốc duy

trì lượng glucose trong máu ổn định (Sulfonylurea), chất ức chế tiêu hóa và hấp thu tinh bột (Glucobay), thuốc cảm ứng độ nhạy của insulin nhưng các thuốc điều trị có giá thành cao và nhiều tác dụng phụ như béo phì, vàng da, suy đường huyết,… gây nhiều khó khăn trong quá trình điều trị và chăm sóc bệnh nhân. Với xu hướng hiện nay trên thế giới và Việt Nam, nghiên cứu và phát triển các loại thuốc hạ đường huyết, có nguồn gốc thực vật được sử dụng phổ biến trong dân gian, nhằm tìm những loại thuốc mới hiệu quả và không gây tác dụng phụ so với các thuốc hóa dược là rất cần thiết. Đồng thời, tận dụng được nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi để người bệnh và thầy thuốc có thêm lựa chọn. Nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học về các cây dược liệu có khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase như lá bằng lăng tím [2], lá dâu tằm [3],... Việc sử dụng các chất ức chế có nguồn gốc thiên nhiên có hiệu quả cao, chi phí thấp trong điều trị bệnh đái tháo đường luôn là một vấn đề được quan tâm. Theo Gopinath [4] , các loại thực vật có chứa các hợp chất như flavonoid, alkaloid, phenolic và tannin,… có tiềm năng ức chế α-amylase và α-glucosidase. Từ đó, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả ức chế 02 enzyme tham gia vào bước đầu của quá trình thủy phân tinh bột, góp phần tạo nguồn nguyên liệu cho quá trình sản xuất các sản phẩm có khả năng hỗ trợ và điều trị bệnh tăng glucose huyết.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên vật liệu

Mẫu cây rau sam được thu thập tại nhà lưới Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang. Hóa chất và thiết bị gồm máy đo quang phổ (Human, Hàn Quốc), cân phân tích (Ohaus, Mỹ), Nồi hấp thanh trùng (Hirayama, Nhật Bản), DPPH, α-amylase, α-glucosidase (Merck, Mỹ),… hóa chất và thiết bị cần thiết khác.

Phương pháp nghiên cứu

Lá và thân của cây Rau sam được rửa sạch, loại bỏ những lá bị sâu bệnh hại và đông khô bằng máy đông khô trong 96 giờ và nghiền thành bột mịn. Sau đó, 200 g mẫu được ngâm dầm với ethanol với tỷ lệ dung môi và nguyên liệu là 1: 10 (w/v), ở nhiệt độ phòng, trong 72 giờ, sóng siêu âm trong 12 giờ và để trong tối để tránh quá trình oxy hóa. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm 5.000 vòng/phút để thu dịch lọc và bỏ phần cặn. Dịch lọc được lọc qua giấy lọc Whatman 0,45 µm, và cô quay chân không dịch lọc ở 50^0C để đuổi dung môi và đông khô bằng máy đông khô chân không để thu cao chiết thô và bảo quản ở -20^0C và thực hiện các thí nghiệm.

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học theo Yadav [5] (Bảng 1).

Hiệu quả ức chế enzyme α-amylase của cao chiết

Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của α-amylase theo Đái Thị Xuân Trang [6]: 50 µL α-amylase 0,5 U/mL được ủ với 100 µL cao chiết ở nồng độ khác nhau và 100 µL dung dịch đệm phosphate pH = 7, ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 10 phút, thêm 250 µL tinh bột 1 mg/mL và ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 10 phút. Sau đó, hỗn hợp được thêm 100 µL HCl 1N để dừng phản ứng và 300 µL thuốc thử Iodine 0,1N để nhận biết lượng tinh bột còn lại dựa trên phản ứng màu xanh đặc trưng của phức hợp tinh bột-iodine và đo quang ở λ = 660 nm để xác định lượng tinh bột còn lại sau phản ứng. Phần trăm enzyme α-amylase bị ức chế (%): dựa vào lượng tinh bột ban đầu và lượng tinh bột còn lại sau phản ứng thông qua giá trị đo độ hấp thu quang phổ.

Phần trăm enzyme α-amylase bị ức chế (%) = 100 - Hiệu suất phản ứng (%)

Hiệu suất phản ứng (%) = $(A_o - A_1)/A_o$ x 100

Trong đó: A_o: Giá trị quang của dung dịch đối chứng (lượng tinh bột ban đầu). A_1: Giá trị quang của dung dịch sau phản ứng (lượng tinh bột còn lại). Acarbose là chất chuẩn thực hiện tương tự mẫu cao chiết và so sánh qua giá trị IC_{50}.

Bảng 1. Định tính hợp chất trong cao chiết ethanol cây rau sam.

Hợp chất	Thực nghiệm	Hiện tượng
Alkaloid (Mayer)	1mL dịch trích + vài giọt TT Mayer	Kết tủa màu nâu
Flavonoid	1mL dịch trích + 2mL $Pb(OAc)_4$ 10%	Xuất hiện màu vàng
Saponin (Foam)	3mL dịch trích+ 6mL H_2O→ đun nóng	Xuất hiện bọt
Steroid (Salkowski)	1mL dịch trích + 2mL $CHCl_3$ + 2mL $H_2SO_{4đậm đặc}$	Xuất hiện vòng đỏ nâu giữa 2 lớp
Tannin và phenol (Braymer)	0,5mL dịch trích + 10mL H_2O + 2-3 giọt $FeCl_3$ 0,1%	Kết tủa xanh dương đen
Terpenoid	2mL dịch trích + 2mL $(CH_3CO)_2O$ + 2-3 giọt H_2SO_4 đậm đặc	Xuất hiện màu đỏ đậm

Hiệu quả ức chế enzyme α-glucosidase của cao chiết

Phản ứng ức chế sự thủy phân tinh bột của α-glucosidase theo Đái Thị Xuân Trang [6]: 100 µL α-glucosidase được ủ với 50 µL cao chiết ở các mức nồng độ, ở nhiệt độ 37^0C trong 10 phút, thêm 50 µL pNPG nồng độ 4mM và ủ ở nhiệt độ 37^0C trong 20 phút. Sau cùng, kết thúc phản ứng bằng bổ sung 1000 µL Na_2CO_3 0,2M và đo quang phổ ở λ = 405 nm. Phần trăm α-glucosidase bị ức chế (%) được tính dựa vào lượng p-nitrophenol tạo thành từ pNPG trong phản ứng qua giá trị đo độ hấp thu quang phổ.

Phần trăm enzyme α-glucosidase bị ức chế (%) = (B - A)/B x 100

Trong đó: A: Giá trị quang của mẫu thật. B: Giá trị quang của mẫu đối chứng. Acarbose là chất chuẩn thực hiện tương tự mẫu cao chiết.

Hiệu quả kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH của cao chiết

Khảo sát khả năng ức chế gốc tự do DPPH theo Shekhar và Anju [7]: 1 mL cao chiết phản ứng với 1 mL dung dịch DPPH 0,1 M, ở nhiệt độ phòng trong 30 phút và trong điều kiện tối để tránh oxy hoá và đo độ hấp thụ ở λ = 517 nm. Khả năng ức chế gốc tự do DPPH được xác định theo công thức: $AA\% = (A_o - A_1/A_o) \times 100$

Trong đó: AA%: Phần trăm ức chế gốc tự do DPPH; A_o: Độ hấp thụ quang phổ của mẫu đối chứng; A_1: Độ hấp thụ quang phổ của mẫu cao chiết. Vitamin C là chất chuẩn được thực hiện tương tự mẫu cao chiết.

Phương pháp thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và thống kê bằng phần mềm Statgraphics plus 16.0. Số liệu trình bày dưới dạng trung bình ± sai số chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo cao chiết

Để đánh giá hiệu quả của phương pháp trích cao, người ta thường dựa trên hiệu suất trích cao. Hiệu suất trích cao phản ánh sự tối ưu của việc kết hợp các điều kiện khác nhau trong phương pháp ly trích. Quy trình trích cao chiết cây rau sam được thực hiện với nguyên liệu ban đầu là 200 gram (khô). Độ ẩm và hiệu suất trích ly của cây rau sam là 78,25 % và 5,64% (Bảng 2).

Định tính các hợp chất có hoạt tính sinh học trong cao chiết

Cao chiết cây rau sam có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, flavonoid, tanin và phenol (Bảng 3) và tương đồng kết quả Sabeeha và Tabassum [8] khi định tính cao chiết cây rau sam.

Bảng 2. Độ ẩm và hiệu suất chiết của cao chiết cây rau sam.

Chỉ tiêu theo dõi	Kết quả
Khối lượng mẫu tươi (g)	2.000
Độ ẩm (%)	78,25
Khối lượng mẫu khô (g)	200
Khối lượng cao khô (g)	11,28
Hiệu suất chiết (%)	5,64

Bảng 3. Kết quả định tính hoạt chất sinh học của cao chiết cây rau sam.

Định tính	Cao chiết ethanol
Saponin	+
Flavonoid	+
Terpenoids	+
Alkaloid	+
Tanin và phenol	+
Steroid	+

Ghi chú: '+': dương tính và '-': âm tính.

Hiệu quả ức chế enzyme α-amylase của cao chiết

Trong cơ thể, α-amylase có vai trò thủy phân các liên kết α-1,4-glucoside của tinh bột, glycogen và các polysaccharide khác tạo thành glucose và maltose. Enzyme α-amylase xúc tác thủy phân tinh bột tạo ra nhiều glucose, làm tăng lượng glucose trong máu dẫn đến nguy cơ dễ mắc bệnh ĐTĐ. Do đó, ức chế α-amylase có thể được xem là một cơ chế để làm giảm glucose trong máu và hạn chế nguy cơ mắc bệnh ĐTĐ.

Bảng 4. Hiệu quả ức chế enzyme α-amylase của acarbose và cao chiết.

Nồng độ (µg/mL)	Ức chế α-amylase của acarbose (%)	Ức chế α-amylase của cao chiết (%)
0	$0,0^{k}$	$0,0^{k}$
25	$25,59^{h}$±0,10	$10,53^{h}$±0,13
50	$32,25^{g}$±0,06	$23,21^{g}$±0,06
75	$45,67^{f}$±0,21	$31,28^{f}$±0,28
100	$56,78^{e}$±0,15	$41,59^{e}$±0,08
125	$67,89^{d}$±0,09	$49,65^{d}$±0,15
150	$77,01^{c}$±0,23	$57,89^{c}$±0,19
175	$86,05^{b}$±0,09	$65,79^{b}$±0,11
200	$95,35^{a}$±0,14	$76,56^{a}$±0,04
Phương trình, giá trị R^2	y = 0,4497x + 9,0976 R^2 = 0,9806	y = 0,3732x + 2,2944 R^2 = 0,9961
IC_{50}	90,95	127,82

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Ở nồng độ acarbose 200 µg/mL, khả năng ức chế α-amylase đạt 95,35±0,14%% và thấp nhất, ở nồng độ acarbose 25 µg/mL, khả năng ức chế α-amylase đạt 25,59±0,10% (Bảng 4). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả

năng ức chế α-amylase của acarbose và giá trị IC_{50} của acarbose là 90,95 µg/mL. Tương tự, ở nồng độ cao chiết cây rau sam 200 µg/mL, khả năng ức chế α-amylase đạt 76,56±0,04%% và thấp nhất, ở nồng độ cao chiết cây rau sam 25 µg/mL, khả năng ức chế α-amylase đạt 10,53±0,13% (Bảng 4). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α-amylase của cao chiết và giá trị IC_{50} của cao chiết là 127,82 µg/mL.

Hiệu quả ức chế enzyme α-glucosidase của cao chiết

Enzyme α-glucosidase của ruột non ở người có vai trò thủy phân các liên kết α-1,4 của oligosaccharide thành glucose và sau đó được hấp thu qua niêm mạc ruột non và thẩm thấu vào máu. Bên cạnh đó, nồng độ glucose trong máu cao là biểu hiện của bệnh ĐTĐ, do đó, ức chế α-glucosidase sẽ điều khiển được lượng đường huyết trong máu, góp phần điều trị hiệu quả ĐTĐ. Ở nồng độ acarbose 200 µg/mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 83,19±0,25%; kế đến, ở nồng độ acarbose 175 µg/ mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 77,89±0,09% và thấp nhất, ở nồng độ acarbose 25 µg/mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 12,35±0,02% (Bảng 5). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α-glucosidase của acarbose và giá trị IC_{50} của acarbose là 110,22 µg/mL.

Bảng 5. Hiệu quả ức chế enzyme α-glucosidase của acarbose và cao chiết.

Nồng độ (µg/mL)	% ức chế α-glucosidase của cao chiết (%)	% ức chế α- glucosidase của acarbose (%)
0	$0,0^{k}$	$0,0^{k}$
25	$8,91^{h}$±0,12	$12,35^{h}$±0,02
50	$16,65^{g}$±0,07	$26,35^{g}$±0,21
75	$27,82^{f}$±0,13	$35,89^{f}$±0,09
100	$35,69^{e}$±0,05	$48,29^{e}$±0,17
125	$46,79^{d}$±0,20	$57,69^{d}$±0,23
150	$55,39^{c}$±0,22	$69,28^{c}$±0,06
175	$67,59^{b}$±0,27	$77,89^{b}$±0,09
200	$79,16^{a}$±0,03	$83,19^{a}$±0,25
Phương trình, giá trị R^2	y = 0,3928x - 1,7198 R^2 = 0,9969	y = 0,4247x + 3,1896 R^2 = 0,9918
IC_{50}	131,67	110,22

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Tương tự, ở nồng độ cao chiết cây rau sam 200 µg/mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 79,16±0,03%%; kế đến, ở nồng độ cao chiết cây rau sam 175 µg/ mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 67,59±0,27% và thấp nhất, ở nồng độ cao chiết cây rau sam 25 µg/mL, khả năng ức chế α-glucosidase đạt 8,91±0,12% (Bảng 5). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả năng ức chế α-glucosidase của cao chiết và giá trị IC_{50} của cao chiết là 131,67 µg/mL.

Hiệu quả kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH của cao chiết

Gốc tự do là các nguyên tử có ít nhất một electron chưa ghép cặp trong vỏ ngoài cùng và có khả năng tồn tại độc lập. Gốc tự do được sản xuất trong quá trình trao đổi chất bình thường của cơ thể, stress sinh lý và là nguyên nhân gây ra nhiều bệnh như ung thư, bệnh tim mạch, bệnh Alzheimer,... Hiệu quả khử gốc tự do của vitamin C đạt cao nhất ở nồng độ 100 µg/mL, đạt 85,27±0,13%. Kế đến là nồng độ 80 µg/mL với hiệu suất 71,15±0,19% và nồng độ 20 µg/mL, với hiệu suất 23,28±0,12% (Bảng 6). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả năng kháng oxy hóa của

Vitamin C và giá trị IC_{50} của Vitamin C là 55,73 µg/mL. Tương tự, hiệu quả khử gốc tự do của cao chiết đạt cao nhất ở nồng độ 100 µg/mL, đạt 70,19±0,19%. Kế đến là nồng độ 80 µg/mL với hiệu suất 59,25±0,09% và nồng độ 20 µg/mL, với hiệu suất 19,21±0,08% (Bảng 6). Tiến hành xây dựng phương trình đường chuẩn biểu diễn khả năng kháng oxy hóa của cao chiết và giá trị IC_{50} của cao chiết là 66,94 µg/mL.

Bảng 6. Hiệu quả kháng oxy hóa bằng DPPH của Vitamin C và cao chiết.

Nồng độ (µg/mL)	Phần trăm kháng oxy hóa của Vitamin C (%)	Phần trăm kháng oxy hóa của cao chiết cây rau sam (%)
0	$0,0^{f}$	$0,0^{f}$
20	$23,28^{e}$±0,12	$19,21^{e}$±0,08
40	$37,19^{d}$±0,05	$30,65^{d}$±0,22
60	$54,22^{c}$±0,21	$49,56^{c}$±0,16
80	$71,15^{b}$±0,19	$59,25^{b}$±0,09
100	$85,27^{a}$±0,13	$70,19^{a}$±0,19
Phương trình, giá trị R^2	Y = 0,8383x+3,2718 R^2 = 0,9948	y = 0,7x + 3,1448 R^2 = 0,9877
IC_{50}	55,73	66,94

Trong cùng 1 cột các giá trị theo sau bởi cùng một kí tự không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa 5%.

Thảo luận chung

Trong quá trình tạo cao chiết, dung môi ethanol 80% được sử dụng cho quá trình ly trích, nguyên nhân là do nếu sử dụng nước làm loại dung môi để ly trích thì mẫu trích nhiễm nhiều tạp chất như các acid hữu cơ, đường và protein tan trong nước ảnh hưởng tới quá trình định tính hay định lượng các hợp chất thiên nhiên. Ngoài ra, nếu sử dụng cồn tuyệt đối sẽ giảm hiệu suất chiết cao do ethanol khó thấm vào mẫu. Vì vậy, sử dụng ethanol 80% làm dung môi sẽ tạo một môi trường tối ưu cho việc ly trích, tăng sự tiếp xúc mẫu và dung môi, tăng hiệu suất trích ly và bảo quản mẫu khỏi các vi sinh vật [9]. Đồng thời, cấu trúc ethanol có nhóm OH vì vậy ethanol là chất phân cực nên có khả năng hoà tan các hợp chất có hoạt tính sinh học như tannin, flavonoid và ethanol ít độc hại và có giá thành thấp.

Cao chiết cây rau sam có sự hiện diện của các hợp chất alkaloid, terpenoid, saponin, steroid, flavonoid, tanin và phenol. Theo Gopinath [4], các dịch chiết thực vật có tác dụng ức chế enzyme α-amylase, α-glucosidase là do có sự hiện diện của các hợp chất flavonoid, alkaloid, saponin và tannin, ….

Để đánh giá hiệu quả ức chế α-amylase và α-glucosidase của cao chiết, các nhà nghiên cứu thường so sánh với một đối chứng có hoạt tính ức chế α-amylase và α-glucosidase (đối chứng dương). Acarbose được biết đến như một chất ức chế α-glucosidase và đang được sử dụng phổ biến cho bệnh nhân ĐTĐ type 2. Acarbose cũng được sử dụng như một đối chứng dương trong các nghiên cứu về khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase của các cao chiết thực vật [10].

Khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase được đánh giá dựa vào việc so sánh giá trị IC_{50} của cao chiết cây rau sam và acarbose. Giá trị IC_{50} của cao chiết cây rau sam đạt 127,82 µg/mL cao hơn gần 1,4 lần so với IC_{50} của đối chứng dương acarbose là 90,95 µg/mL đối với α-amylase (Bảng 4). Trong khi đó, giá trị IC_{50} của cao chiết cây rau sam đạt 131,67 µg/mL cao hơn gần 1,19 lần so với IC_{50} của đối chứng dương acarbose là 110,22 µg/mL đối với α-glucosidase (Bảng 5). Cao chiết cây rau sam có khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase thấp hơn so với acarbose là do cao chiết cây rau sam còn lẫn nhiều tạp chất, chưa được tinh sạch hay tách phân đoạn

ra từng chất ức chế cụ thể nhưng vẫn có khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase khi so sánh với thuốc thương mại acarbose. Đồng thời, acarbose là pseudotetrasaccharide, có nguồn gốc vi khuẩn, được chuyển hóa nhờ vi khuẩn đường ruột nên hiệu quả ức chế của acarbose không cao (chỉ được hấp thụ <2%) [11].

Bên cạnh đó, nghiên cứu khác cũng cho thấy các cao chiết thực vật có hoạt tính ức chế α-amylase và α-glucosidase phụ thuộc vào polyphenol [12]. Ngoài ra, flavonoid là một nhóm chính của hợp chất polyphenol đã được báo cáo có khả năng ức chế α-amylase và α-glucosidase [13]. Các nhóm chất trên có hoạt tính ức chế enzyme trên là do số và vị trí nhóm hydroxyl của chúng trong phân tử đã xác định các yếu tố ức chế enzyme. Sự ức chế tăng hoạt động đáng kể với sự gia tăng số lượng nhóm hydroxyl trên vòng B [14]. Các nhóm hydroxyl trong cấu trúc phân tử flavonoid có thể hình thành liên kết hydro với nhóm -OH trong chuỗi bên hoạt động của các acid amin chức năng của enzyme giúp cản trở phản ứng giữa enzyme amylase và tinh bột sẽ ức chế quá trình thủy phân tinh bột [15]. Trong nghiên cứu này, nguồn enzyme tiêu hóa ở động vật bậc cao là α-amylase tụy và α-glucosidase ruột có liên quan chặt chẽ về mặt cấu trúc và cơ học với enzyme của con người rất thích hợp cho việc khảo sát hoạt tính trong điều kiện in vitro [16]. Enzyme α-glucosidase đường ruột là enzyme chủ chốt tiêu hóa nguồn carbohydrate đã được công nhận là một mục tiêu cần ức chế trong điều trị đái tháo đường. So sánh hiệu quả ức chế α-amylase và α-glucosidase của cao chiết cây rau sam với acarbose dựa vào giá trị IC_{50} cho thấy cao chiết thể hiện hiệu quả thấp hơn chất chuẩn. Đồng thời, nghiên cứu cũng cho thấy cao chiết cây rau sam có khả năng ức chế α-glucosidase cao hơn enzyme α-amylase. Một số nghiên cứu khác cho thấy, ức chế α-glucosidase đóng vai trò chính trong việc kiểm soát glucose huyết sau bữa ăn của bệnh nhân đái tháo đường [17].

Thực vật là nguồn nguyên liệu phong phú có chứa hàm lượng chất chống oxy hóa lớn. Chất chống oxy hóa tự nhiên làm tăng khả năng chống oxy hóa của huyết tương và làm giảm nguy cơ mắc phải một số bệnh: ung thư, tim mạch và đột quỵ… [18]. Đây cũng là những biến chứng thường gặp ở người bệnh tiểu đường type 2. Theo Colak [19] stress oxy hóa và suy giảm hệ thống chống oxy hóa là đặc trưng ở bệnh đái tháo đường type 2 và xuất hiện rất sớm, trước khi có biến chứng. Hợp chất DPPH có một gốc proton và có màu tím đặc trưng hấp thụ cựa đại ở bước sóng 517 nm, màu tím sẽ giảm dần khi dốc proton được trung hòa. Đặc tính này của DPPH đã được sử dụng rộng rãi để đánh giá tác dụng thu gôm gốc tự do của các chất kháng oxy hóa tự nhiên. Giá trị IC_{50} của cao chiết cây rau sam (IC_{50} = 66,94 μg/mL) cao hơn 1,2 lần so với đối chứng dương vitamin C (IC_{50} = 55,73 μg/mL). Điều này cho thấy rằng, hiệu quả khử gốc tự do của cao chiết ethanol từ các mẫu lá thấp hơn so với vitamin C. Nguyên nhân của sự khác biệt là do cao chiết cây rau sam được trích bằng phương pháp ngâm dầm rồi đem lọc và cô quay, trong quá trình lọc có thể chưa loại bỏ được hết các tạp chất nên sản phẩm chưa được tinh sạch. So với vitamin C là một chất chống oxy hóa cao và là sản phẩm thương mại nên sẽ có độ tinh sạch cao hơn nên cho hiệu quả ức chế gốc tự do cao hơn cao chiết từ cây rau sam. Cao chiết cây rau sam có khả năng khử gốc tự do là do các hợp chất phenolic có nguồn gốc thảo dược không chỉ được biết đến bởi khả năng chống oxy hoá (nhường hydro hoặc nhường điện tử) mà còn là chất chuyển hoá trung gian ổn định. Các flavonoid là nhóm hợp chất có khả năng chống oxy hoá nổi bật nhất trong số các hợp chất phenolic thực vật [20].

KẾT LUẬN

Cao chiết cây rau sam có sự hiện diện của các hợp chất có hoạt tính sinh học như tannin, steroid, terpenoid, flavonoid, saponin và alkaloid. Cao chiết cây rau sam

có khả năng ức chế enzyme α-amylase và α-glucosidase, kháng oxy hóa bằng phương pháp DPPH với giá trị IC_{50} lần lượt là 127,82 µg/mL; 110,22 µg/mL và 66,94 µg/mL. Nghiên cứu đánh giá hiệu quả hạ glucose huyết của cao chiết rau sam trên mô hình động vật và phân tách các hợp chất có hoạt tính sinh học của cao chiết cây rau sam.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học tỉnh An Giang đã hỗ trợ và tạo điều kiện để nhóm nghiên cứu thực hiện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Yao, Y., Sang, W., Zhou, M., Ren G., (2010). Antioxidant and α-glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *J. Agric. Food chem*, 58 (2): 770-774.

[2] Miura T., S. Takagi and T. Ishida, (2012). Management of diabetes and its complications with Banaba (*Lagerstroemia speciosa* L.) and corosolic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 5: 321-329.

[3] Habeeb, M., R. Prakash and S. Fahmi. (2012). Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by *Morus alba* L leaf extracts. *Journal of Pharmacy Research*, 5 (1): 285-289.

[4] Gopinath, S., P. Priyanka, M. Reddy, M. Ashwini and D.V. Nair. 2013. In vitro Inhibitory Effect of Polyherbal Formulation on alpha-amylase. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2 (9): 4556-4566

[5] Yadav, M., Chatterji, S., Gupta, S.K. and Watal, G. (2014). Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *International J.of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (5): 539-542.

[6] Đái Thị Xuân Trang, Phạm Thị Lan Anh, Trần Thanh Mến và Bùi Tấn Anh, 2012. Khảo sát khả năng điều trị bệnh tiểu đường của cao chiết lá ổi (Psidium guajava l.). *Tạp chí Khoa học Đại Học Cần Thơ*, 2012:22b 163-171.

[7] Shekhar TC, Anju G. (2014). Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of *A. conyzoides* L leaves. *American Journal of Ethnomedicine*, 1(4):244-249.

[8] Sabeeha, S. and N. Tabassum. (2015). Preliminary phytochemical screening, renal and haematological effects of *Portulaca oleracea* (whole plant) in swiss albino mice. Int. Res. J. Pharm. 2015, 6 (6): 349-353.

[9] Bandar, H., Hijazi, A., Rammal, H., Hach, A., Saad, Z. and Badran, B. (2013). Techniques for the extraction of bioactive compounds from *Lebanese Urtica* Dioica. *American J. of Phytomedicine and C. Therapeutics*, 6: 507-513.

[10] Đỗ Trung Quân. (2014). Đái tháo đường và điều trị. Nxb Y học, Hà Nội.

[11] Carl E.M. (2007). Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments. The Role of Alpha-Glucosidase Inhibitors (Acarbose). In: Professor Carl Erik Mogensen editor. Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments. Diabetes: Endocrinology. Part 2. US Springer: pp 143-152.

[12] **Kang**, B., **K. Racicot** and **E Apostolidis**. (2014). Evaluation of the in vitro anti-hyperglycemic effect of *C. cassia* derived phenolic phytochemicals, via carbohydrate hydrolyzing enzyme inhibition. ***Plant Foods for Human Nutrition*** 69: 155-160.

[13] Williamson, G.,. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. Mol Nutri Food Res, 57: 48-57.

[14] Tadera K, Minami Y, Takanatsu K, Matsuoka T. (2006). Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by flavonoids. *J. Nutr Sci Vitamol*, 52: 99-103.
[15] Ng K, Gu C, Zhang H and Patri CY. (2015). Evaluation of alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activity of flavonoids. *Int J Nutr Sci*, 2(6):1-6
[16] Bayer, E., Morag, E., Wilcheck, M., Lamed, R., Yaron, S. and Shoham, Y. (1995). Cellulosome domains for novel biotechnological application. In: Carbohydrate bioengineering, B. Petersen, B. Srensson & S. Pedersen (Ed.), pp. (251-259), Progress in biotechnology, Elsevier, ISBN 0-444-82223-2, The Netherlands
[17] Javed A., Kamran J.N., **Mohd A., and Mohd S. (2011).** Review on role of natural αlpha-glucosidase inhibitors for management of diabetes mellitus. *International Journal of Biomedical Research* 6: 374-380.
[18] Nair. D., R. Panneerselvam and G. Ragupathi. (2012). Studies on methanolic extract of *Rauvolfia species* from Southern Western Ghats of India - In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals. *Industrial Crops and Products* 39 (1): 17-25
[19] Colak E., N. Majkic-Singh, S. Stankovic, K. Lalic and N. Lalic, (2005). Parameters of antioxidative defense in type 2 diabetic patients with cardiovascular complications. *Ann Med*, 37 (8): 613-620.
[20] Lê Trung Hiếu, Trương Thị Như Tâm, Nguyễn Thị Ánh Huyền, Lê Thuỳ Trang, 2014. Bước đầu nghiên cứu đánh giá khả năng kháng oxy hoá của một số đối tượng làm nguồn dược liệu. *Tạp chí khoa học và công nghệ, trường đại học khoa học Huế*. 1(1): 22-31.

KHỞI TẠO SÁNG CHẾ TỪ HOẠT ĐỘNG NGHIÊN CỨU KHOA HỌC: NGUYÊN TẮC VÀ KINH NGHIỆM

Phạm Thị Thùy Phương

Viện Công nghệ Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Với chủ trương "Sử dụng công cụ sở hữu trí tuệ làm đòn bẩy thúc đẩy hoạt động đổi mới sáng tạo, nâng cao năng lực cạnh tranh, góp phần phát triển kinh tế xã hội" của chính phủ Việt Nam, việc xác lập quyền sở hữu trí tuệ cho cho các kết quả nghiên cứu khoa học ngày càng được toàn xã hội quan tâm. Cùng với các chỉ số liên quan đến công bố khoa học, bằng độc quyền sáng chế và giải pháp hữu ích (patent) đang được coi là tiêu chí để đánh giá năng suất hoạt động khoa học và công nghệ của một nhà khoa học, nói riêng, và của cả một quốc gia, nói chung. Mặc dù những năm gần đây Việt Nam đã đạt được những thành tích đáng kể trong việc công bố quốc tế và đang rút ngắn khoảng cách so với các nước dẫn đầu trong khu vực nhưng số lượng sáng chế được bảo hộ hằng năm vẫn còn khá khiêm tốn. Nguyên nhân chính là do những người làm công tác nghiên cứu khoa học thường không được trang bị những kiến thức và kỹ năng cần thiết để thiết lập quyền sở hữu trí tuệ. Họ thường bỏ qua hoặc xem nhẹ việc tra cứu dữ liệu patent và non-patent nên kết quả nghiên cứu không đáp ứng tính mới và do đó, không đủ điều kiện để được cấp bằng độc quyền. Ngoài ra, việc thiếu vắng kỹ năng viết bản mô tả sáng chế và theo đuổi sáng chế trong giai đoạn thẩm định nội dung của tác giả sáng chế cũng khiến cho hành trình thiết lập quyền sở hữu bị dở dang. Chính vì vậy, báo cáo này tập trung trình bày một số nguyên tắc chung và kinh nghiệm của riêng bản thân người viết về hành trình khởi tạo patent từ hoạt động nghiên cứu khoa học qua các giai đoạn: (i) nhận diện sáng chế; (ii) đăng ký sáng chế; và (iii) theo đuổi sáng chế.

MATERNAL RNAi SCREENING OF POTENTIAL SRC64 TARGETS IN ACTOMYOSIN RING CONTRACTION DURING CELLULARIZATION

Anh Phu Nam Bui [1*], Tammy Y. Carter [2, 3], Jeffrey H. Thomas [2]

[1] Faculty of Biotechnology, Ho Chi Minh city Open University, Vietnam

[2] Department of Cell Biology and Biochemistry, Texas Tech University Health Sciences Center

[3] Clinical Laboratory Science, Texas Tech University Health Sciences Center

** Corresponding author: anh.bpn@ou.edu.vn*

ABSTRACT

***Introduction**: The Src protein is a non-receptor tyrosine kinase associated with vascular homeostasis and cancer. Src family kinases regulate several cellular processes, including cell proliferation, morphology, motility, adhesion and cytoskeletal reorganization. Src64 is one of two Src family kinases in Drosophila. Src64 is involved in actomyosin ring contraction during Drosophila cellularization. Mutations in Src64 that reduce or eliminate Src64 protein expression, or eliminate kinase activity, cause microfilament rings to adopt irregular shapes and fail to constrict. This phenotype is thought to be caused by reduced microfilament contractile tension in src64 mutants. Our previous proteomics studies identified proteins that are differentially expressed in response to reduced Src64 expression levels, and our previous phospho-proteomics studies identified proteins that are differentially phosphorylated in response to the elimination of Src64 catalytic activity.*

***Hypothesis**: These proteins likely act downstream of Src64. Maternal RNAi knockdown of Src64 produces celllularization front and microfilament ring phenotypes similar to that of the hypormorphic $src64^{\Delta 17}$ allele.*

***Methods**: Proteins that are associated with cell signaling or actin cytoskeleton are being tested by maternal RNAi knockdown. Embryos are assayed for cellularization front defects and microfilament rings defects. Microfilament ring phenotypes will be quantified using the microfilament circularity assay previously described. We expect those that exhibit src64-like defects to be involved in the Src64 signal translation pathway or to be involved in actin remodeling in response to Src64 signaling.*

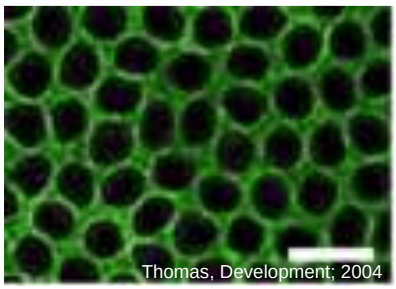
***Results**: Currently, we have evaluated 15 RNAi knockdown lines. Thus far, we have found that Sbf RNAi knockdown causes defects similar to src64 RNAi knockdown. Sbf phosphorylation is reduced in catalytically inactive src64 mutant embryos. Sbf has previously been implicated in cortical remodeling of Drosophila hemocytes.*

BACKGROUNDS



After fertilization, the embryo undergoes nuclear mitotic division without cytokinesis	Syncytial blastoderm	Membrane starts to invaginate between the nuclei, moving inward with the help of actomyosin ring	Basal closure of actomyosin rings by constriction; separation of peripheral nuclei into cells, forms a "cellular blastoderm"

Src64 wild type



Src64 mutant

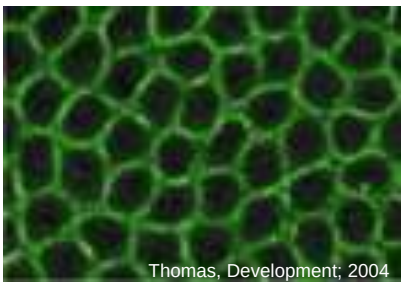


Figure 1: *src64* mutations cause cellularization front defects. The cellularization front is wavy and irregular in early cellularization. Mutations in *src64* that reduce or eliminate Src64 protein expression, or eliminate kinase activity, cause microfilament rings to adopt irregular shapes and fail to constrict. This phenotype is thought to be caused by reduced microfilament contractile tension in *src64* mutants

INTRODUCTION

Cellularization is a modified process of cytokinesis that occurs during early embryogenesis in Drosophila. After fertilization, the embryo undergoes 13 cycles of mitotic nuclear division, producing approximately 6000 nuclei in the cortical cytoplasm. This multinucleate embryo is called a syncytial blastoderm (Figard et al., 2013). The syncytial blastoderm then becomes a cellular blastoderm in a process called cellularization. During cellularization, membrane first invaginates between the nuclei and then, through the contraction of actomyosin rings, closes basally to form a cellular blastoderm. The Src protein is a non-receptor tyrosine kinase associated with vascular homeostasis and cancer. Src family kinases regulate several cellular processes, including cell proliferation, morphology, motility, adhesion and cytoskeletal reorganization. Src64 is one of two Src family kinases in Drosophila. Src64 is involved in actomyosin ring contraction during Drosophila cellularization (Thomas and Wieschaus, 2004). Our previous proteomics studies identified proteins that are differentially expressed in response to reduced Src64 expression levels, and our

previous phospho-proteomics studies identified proteins that are differentially phosphorylated in response to the elimination of Src64 catalytic activity (Carter et al., 2019). These proteins likely act downstream of Src64. Maternal RNAi knockdown of Src64 produces celllularization front and microfilament ring defects similar to that of the hypormorphic *src64*^{A17} allele. Proteins that are associated with cell signaling or actin cytoskeleton are being tested by maternal RNAi knockdown. Embryos are assayed for cellularization front defects and microfilament ring defects. Microfilament ring phenotypes will be quantified using the microfilament circularity assay previously described (Thomas and Wieschaus, 2004).

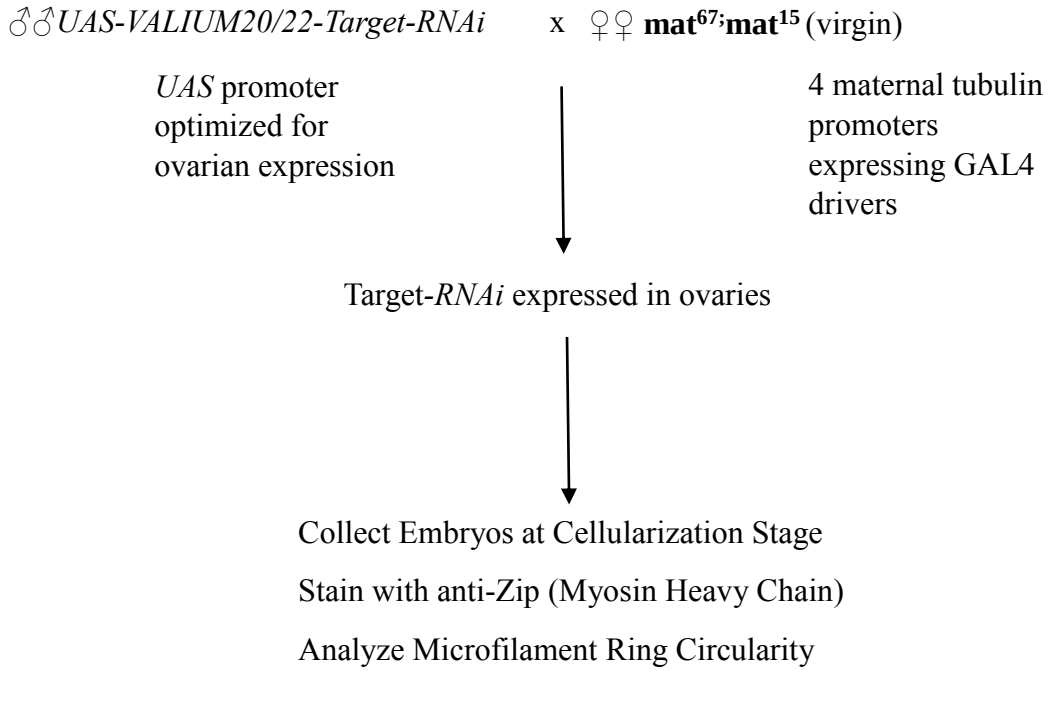
MATERIALS AND METHODS

Drosophila stocks and genetics

Flies were cultured at 22.5^{0}C and fed a standard medium. *OreR* was used as the wild-type strain. *RNAi- src64* lines were used as control lines. Maternal driver line **mat$^{67;}$mat^{15}** carries matα4-GAL-VP16 (Häcker and Perrimon, 1998) in homozygous inserts on II and III. When genes are maternally expressed, virgin females of UAS lines are crossed to males of **mat$^{67;}$mat^{15}**, and F_1 females are crossed to males of appropriate genotypes to produce embryos with maternally loaded gene products

Immunofluorescence and image analysis

Embryos were heat-methanol fixed (Wieschaus and Nüsslein-Volhard, 1998) and the vitelline membrane was removed by shaking in a 1:1 mixture of heptane: methanol for 30 s, transferred to a clean tube, washed three times in methanol, and stored in methanol at −20^{0}C. Embryos were stained with rabbit anti-myosin II heavy chain (Chougule et al., 2016) (Zip, 1:100), mouse anti-green fluorescent protein (GFP) (1:100, Cell Signaling), and mouse anti-Sxl M18 (1:10; DSHB) (Bopp et al., 1991). Secondary antibodies used were conjugated to Alexa Fluor 546 and Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, Thermo Scientific, Waltham, MA USA). Hoechst dye was used as a nuclear stain. Embryos were mounted in Aquapolymount (PolySciences, Warrington, PA USA). Imaging was performed using a Nikon Ti-E A1 confocal microscope.

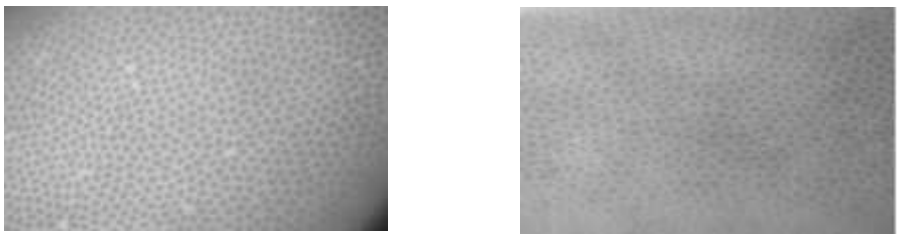


Results and Discussion

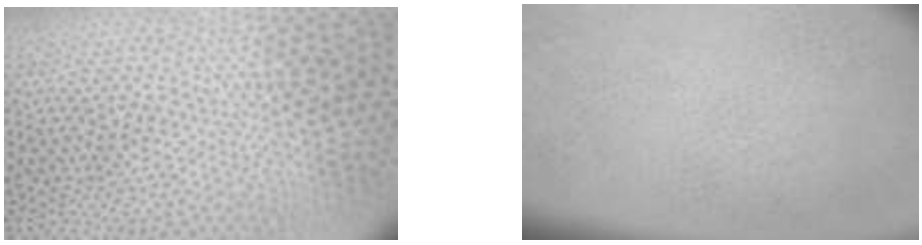
We expect that genes knocked down by RNAi that exhibit *src64*-like defects are involved in signal transduction or are involved in actin remodeling in response to Src64 signaling.

Currently, we have evaluated 34 RNAi knock-down lines. Thus far, we have found that *LamC* knock-down, *Abl* knock-down, and *RhoGEF2* knock-down cause defects similar to *src64* RNAi knock-down (Fox and Peifer, 2007). Phosphorylation of two tyrosine residues in Abl is eliminated in the catalytically inactive $src64^{D404N}$ mutant embryos. In $src64^{D404N}$ mutant embryos, phosphorylation of a serine residue is decreased by two and a half-fold in RhoGEF2, and phosphorylation of a serine residue is increased by more than two-fold in LamC. *LamC*, *Abl* and *RhoGEF2* have previously been implicated in the regulation of actin filament organization of Drosophila (Dialynas et al., 2010, Wenzl et al., 2010, Thomas and Wieschaus, 2004, Zaremba-Czogalla et al., 2012).

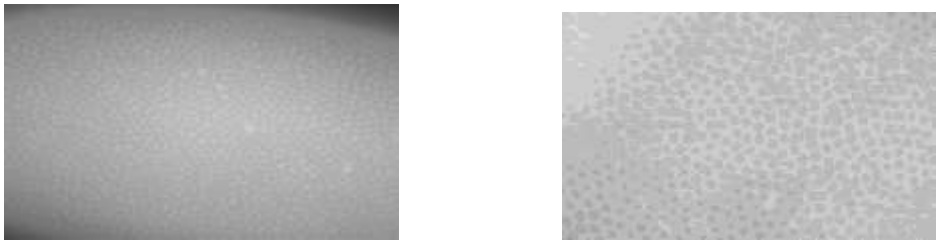
EARLY CELLULARIZATION LATE CELLULARIZATION



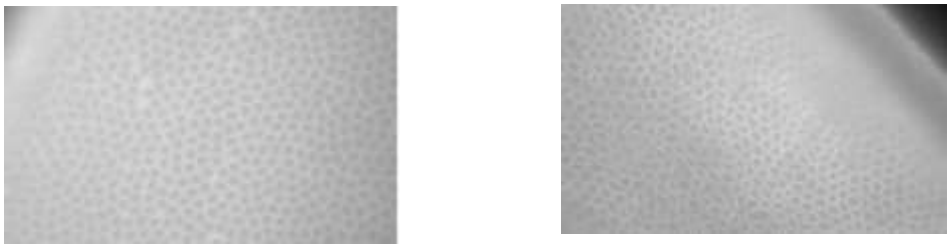
src64-RNAi x mat67mat15



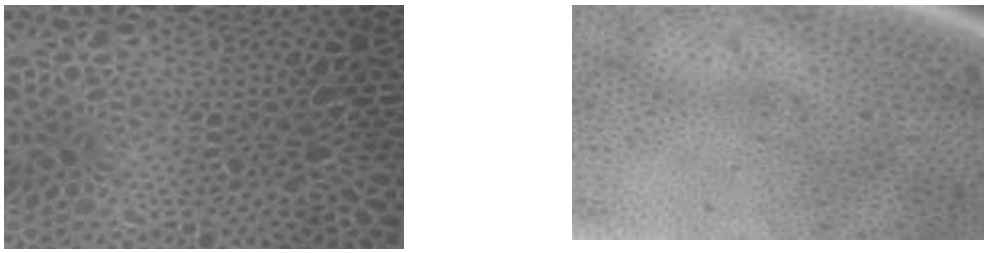
OreR x mat67mat15



LamC-RNAi x mat67mat15



RhoGEF2-RNAi x mat67mat15



Abl-RNAi x mat67mat15

Figure 2: Early and late cellularization of RNAi lines: src64, OreR, LamC, RhoGEF2, and Abl

CONCLUSIONS

Currently, we have evaluated 15 RNAi knockdown lines. Thus far, we have found that *Sbf* RNAi knockdown causes defects similar to s*rc64* RNAi knockdown. Sbf phosphorylation is reduced in catalytically inactive *src64* mutant embryos. Sbf has previously been implicated in cortical remodeling of Drosophila hemocytes.

SELECTED REFERENCES

BOPP, D., BELL, L. R., CLINE, T. W. & SCHEDL, P. 1991. Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in Drosophila melanogaster. *Genes Dev,* 5**,** 403-15.

CARTER, T. Y., GADWALA, S., CHOUGULE, A. B., BUI, A. P. N., SANDERS, A. C., CHAERKADY, R., CORMIER, N., COLE, R. N. & THOMAS, J. H. 2019. Actomyosin contraction during cellularization is regulated in part by Src64 control of Actin 5C protein levels. *genesis,* 57**,** e23297.

CHOUGULE, A. B., HASTERT, M. C. & THOMAS, J. H. 2016. Drak Is Required for Actomyosin Organization During Drosophila Cellularization. *G3 (Bethesda, Md.),* 6**,** 819-828.

DIALYNAS, G., SPEESE, S., BUDNIK, V., GEYER, P. K. & WALLRATH, L. L. 2010. The role of Drosophila Lamin C in muscle function and gene expression. *Development,* 137**,** 3067-3077.

FIGARD, L., XU, H., GARCIA, H. G., GOLDING, I. & SOKAC, A. M. 2013. The plasma membrane flattens out to fuel cell-surface growth during Drosophila cellularization. *Developmental cell,* 27**,** 648-655.

FOX, D. T. & PEIFER, M. 2007. Abelson kinase (Abl) and RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in Drosophila. *Development,* 134**,** 567-578.

HÄCKER, U. & PERRIMON, N. 1998. DRhoGEF2 encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in Drosophila. *Genes & development,* 12**,** 274-284.

THOMAS, J. H. & WIESCHAUS, E. 2004. src64 and tec29 re required for microfilament contraction during Drosophila cellularization. *Development,* 131**,** 863-871.

WENZL, C., YAN, S., LAUPSIEN, P. & GROßHANS, J. 2010. Localization of RhoGEF2 during Drosophila cellularization is developmentally controlled by slam. *Mechanisms of Development,* 127**,** 371-384.

WIESCHAUS, E. & NÜSSLEIN-VOLHARD, C. 1998. CLooking at embryos. In D. B. Roberts (Ed.), Drosophila: A practical approach. *Oxford: Oxford University Press.***,** 179-214.

ZAREMBA-CZOGALLA, M., PIEKAROWICZ, K., WACHOWICZ, K., KOZIOŁ, K., DUBIŃSKA-MAGIERA, M. & RZEPECKI, R. 2012. The Different Function of Single Phosphorylation Sites of Drosophila melanogaster Lamin Dm and Lamin C. *PLOS ONE,* 7**,** e32649.

MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA GENE SET VỚI SỰ TIÊN LƯỢNG XẤU VÀ TÁI PHÁT SỚM TRÊN BỆNH NHÂN UNG THƯ GAN NGUYÊN PHÁT

Nguyễn Văn Gió[1], **Trần Công Mạnh**[1], **Nguyễn Văn Lâm**[1], **Trần Quỳnh Hoa**[1], **Nguyễn Minh Nam**[2]*

[1] *Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Tp. HCM*

[2] *Khoa Y, Đại học Quốc gia Tp. HCM*

*Tác giả liên lạc: nmnam@medvnu.edu.vn

TÓM TẮT

Mục đích: *Ung thư biểu mô tế bào gan là căn bệnh phức tạp và có tỷ lệ tử vong cao. Tìm kiếm các chỉ thị sinh học có thể chẩn đoán sớm và tiên lượng bệnh ung thư biểu mô tế bào gan là rất cần thiết nhằm hạn chế các gánh nặng của ung thư biểu mô tế bào gan gây ra cho bệnh nhân, gia đình và xã hội.* ***Phương pháp****: Phương pháp tin sinh học được dùng để nghiên cứu sự biểu hiện của gen SET nuclear proto-oncogene (SET) trong tế bào, trên các mô, đồng thời tìm mối tương quan của SET với bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Các dữ liệu từ các cơ sở dữ liệu mở được sử dụng như: Kaplan-Meier Plotter, TIMER, UALCAN, The Cancer Genome Atlas database và Gene Expression Omnibus.* ***Kết quả:*** *Biểu hiện mRNA của SET ở mẫu mô ung thư biểu mô tế bào gan cao hơn mẫu mô gan không ung thư. Gen SET là một yếu tố độc lập cho việc chẩn đoán và tiên lượng bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan có biểu hiện gen SET cao có thời gian sống còn và sống không tái phát ngắn hơn nhóm bệnh nhân có mức độ biểu hiện SET thấp. Biểu hiện của SET có sự tương quan có ý nghĩa với tế bào B, tế bào T CD8+, tế bào T CD4+, đại thực bào, bạch cầu trung tính và đặc biệt là tế bào đuôi gai trong mô ung thư biểu mô tế bào gan.* ***Kết luận****: Biểu hiện cao của SET liên quan tới sự tiên lượng xấu trên bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. Nghiên cứu này chứng tỏ rằng SET là một chỉ thị sinh học tiềm năng trong việc chẩn đoán sớm và tiên lượng bệnh ung thư biểu mô tế bào gan.*

Từ khóa: *SET, chỉ thị sinh học, chẩn đoán sớm, tiên lượng, ung thư, ung thư gan, HCC, ung thư biểu mô tế bào gan.*

TỔNG QUAN

Theo thống kê của tổ chức y tế thế giới trong năm 2018, bệnh ung thư gan đứng vị trí thứ sáu về số ca mắc mới và đứng thứ tư về số ca tử vong trong số 36 loại ung thư trên thế giới (Freddie Bray et al., 2018). Cụ thể hơn, ung thư gan có hơn 841.000 trường hợp mắc mới và 782.000 trường hợp tử vong trong năm 2018 và được dự đoán sẽ có hơn một triệu ca tử vong do ung thư gan gây ra trong năm 2030 (Freddie Bray et al., 2018). Ung thư biểu mô tế bào gan (UTBMTBG) là ung thư gan nguyên phát phổ biến nhất, chiếm hơn 75% tổng số các trường hợp mắc ung thư gan (Freddie Bray et al., 2018). Nhiều yếu tố nguy cơ gây UTBMTBG đã được xác định, trong đó xơ gan do lạm dụng thức uống có cồn, bệnh gan nhiễm mỡ, nhiễm vi rút viêm gan C và D là các yếu tố nguy cơ phổ biến nhất (Singal and El-Serag, 2015). Hiện nay việc chuẩn đoán và phát hiện sớm UTBMTBG còn nhiều hạn chế bởi căn nguyên phức tạp của bệnh này (Jing Fu and Hongyang Wang, 2018). Phần lớn các bệnh nhân được chẩn đoán mắc UTBMTBG ở giai đoạn muộn dẫn đến tỷ lệ sống sót sau 5 năm chỉ 10,1% (Hongmei Zeng et al., 2015), nếu các bệnh nhân được chẩn đoán ở giai đoạn sớm thì tỷ lệ sống sót sau 5 năm với sự can thiệp của phẫu thuật là >93% (Tadatoshi Takayama et al., 2008). Như vậy, việc phát hiện sớm UTBMTBG là một yếu tố rất là quan trọng việc tăng hiệu quả điều trị và tăng tỷ lệ sống cho bệnh nhân.

Hiện nay, các phương pháp chính trong việc sàng lọc và chẩn đoán UTBMTBG là chẩn đoán hình ảnh (ví dụ: chụp CT hoặc RMI) và xét nghiệm hàm lượng α-fetoprotein (AFP) (Shreya Sengupta and Neehar D Parikh, 2017). Tuy nhiên, vẫn còn nhiều thách thức để phân biệt các UTBMTBG ở giai đoạn sớm với các nốt xơ gan bằng chẩn đoán hình ảnh khi kích thước khối u rất nhỏ (<2cm) (T Kumagi et al., 2009). Mặc dù hàm lượng AFP trong huyết thanh từ lâu đã được sử dụng làm chỉ thị sinh học để sàng lọc và chẩn đoán UTBMTBG, nhưng AFP không phải là dấu ấn sinh học đặc hiệu cho UTBMTBG (Jie Li1 et al., 2018). Gần đây, AFP đã bị loại trừ khỏi các hướng dẫn giám sát UTBMTBG của Hiệp hội Nghiên cứu Bệnh gan Hoa Kỳ do có độ nhạy thấp (độ nhạy chỉ đạt từ 18–60%). Bên cạnh đó, nhiều chỉ thị sinh học khác cũng đã được xác định như: glypican 3 (GPC3), Golgi protein-73 (GP73), descarboxyprothrombin (DCP), glutamic pyruvic transaminase-(GPT) và gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) nhưng độ nhạy và độ đặc hiệu UTBMTBG vẫn còn nhiều hạn chế, đặc biệt là độ nhạy rất kém ở giai đoạn sớm (khi khối u <2 cm) (Nicha Wongjarupong et al., 2018). Do đó, việc tìm kiếm các dấu ấn sinh học mới trong chẩn đoán sớm và tiên lượng chính xác UTBMTBG là rất cần thiết.

Gen *SET* nuclear proto-oncogene (*SET*), còn được gọi với các tên khác như I2PP2A, PHAP-II hay TAF- Iβ (Xiao-Nan Dai et al., 2014). *SET* nằm ở nhiễm sắc thể số 9 với kích thước 12.977 base và sản phẩm protein của *SET* có kích thước khoảng 39 kDa . *SET* mã hóa cho một protein đa chức năng tham gia vào nhiều quá trình sinh học như: lắp ráp nucleosome, liên kết histone, kiểm soát chu kỳ tế bào, cell migration, phiên mã gen, apoptosis và đặc biệt là tác nhân gây ra các khối u (Koji Umata et al., 2019). *SET* là chất ức chế nội sinh mạnh của protein phosphatase 2A (PP2A) (Mei Li et al., 1996). Trong khi đó, PP2A là một chất ức chế khối u quan trọng và điều chỉnh nhiều con đường dẫn truyền tín hiệu gây ung thư (Pieter J.A. Eichhorn et al., 2008). Điều này chỉ ra rằng, hoạt động gây ung thư của *SET* có thể được thực hiện bởi việc ức chế PP2A (Dale J. Christensen et al., 2016). Do đó, *SET* có thể đóng một vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy hoặc ngăn chặn sự phát triển của ung thư (Koji Umata et al., 2019). Để hiểu thêm về các chức năng, cơ chế và sự liên quan của *SET với UTBMTBG*. Chúng tôi đã tiến hành phân tích mức độ biểu hiện, vai trò và phân bố của gen này trong các mô, cơ quan và tiên lượng trong bệnh nhân UTBMTBG.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đánh giá biểu hiện của gen *SET* và khả năng tiên lượng bệnh ung thư biểu mô tế bào gan

Cơ sở dữ liệu Kaplan-Meier Plotter (Otília Menyhárt et al., 2018) có thể phân tích và đánh giá sự ảnh hưởng của 54.675 gen đối với sự sống còn và sống còn không tái phát thông qua 10.461 mẫu ung thư trên cơ sở dữ liệu TCGA. Mối liên quan giữa biểu hiện *SET* với sự sống còn và sống còn không tái phát của bệnh nhân ung thư gan đã được phân tích bằng Kaplan-Meier Plotter.

Cơ sở dữ liệu UALCAN (Darshan S. Chandrashekar et al., 2017) được sử dụng để phân tích các mối liên quan giữa mức độ biểu hiện của *SET* với khả năng sống còn của các bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan và không ung thư thông qua các biến như: ung thư và không ung thư, chủng tộc, giới tính, độ tuổi, giai đoạn ung thư và mức độ biệt hóa khối u.

Hồ sơ GSE14520 (Xin Chen et al., 2002) từ cơ sở dữ liệu Gene Expression Omnibus đã được phân tích để kiểm định lại mối liên quan giữa biểu hiện *SET* với sự sống còn của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. Phương pháp robust multi-array được thực hiện để chuyển dữ liệu biểu hiện gen về dạng đã được tính trung vị. Mặc dù

hồ sơ có 488 bệnh nhân nhưng chỉ có 242 bệnh nhân được sử dụng cho thí nghiệm, còn 246 bệnh nhân đã được loại bỏ do thiếu thông tin lâm sàng. Đường cong Kaplan-Meier được sử dụng để phân tích tỷ lệ sống của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan. Các phương pháp Chi bình phương và log-rank test đã được sử dụng để đánh giá nguy cơ sống còn và sống còn không tái phát. Các phân tích hồi quy tỷ lệ đơn biến và đa biến Cox đã được thực hiện để đánh giá các yếu tố tiên lượng độc lập liên quan đến sự sống của bệnh nhân và thời gian tái phát. Các đồng biến liên quan đến biểu hiện *SET* được phân tích bao gồm: tuổi, giới tính và giai đoạn ung thư gan theo phân loại Barcelona (BCLC). Ngoài ra, sự sống còn không tái phát của UTBMTBG cũng được phân tích với các bước làm tương tự như phân tích sự sống còn để đánh giá thêm mối liên hệ của *SET* với sự sống còn không tái phát.

Phân tích sự biểu hiện của *SET* trong mô ung thư, không ung thư và tế bào miễn dịch

Cơ sở dữ liệu TIMER (Taiwen Li1 et al., 2017) được sử dụng để phân tích mối liên hệ của *SET* với sự đồng nhất (là tỷ lệ phần trăm của tế bào ác tính trong khối u) của khối u và các tế bào miễn dịch như: tế bào B, tế bào T $CD4^+$, tế bào T $CD8^+$, đại thực bào, bạch cầu trung tính và tế bào đuôi gai trong UTBMTBG thông qua mối liên kết với cơ sở dữ liệu TCGA.

Phương pháp thống kê

Phương pháp Kaplan-Meier, t-test, Chi bình phương và log-rank test đã được thực hiện để kiểm ra ý nghĩa thống kê và đánh giá giá trị tiên lượng của *SET* trong các phân tích bằng ngôn ngữ lập trình R (www.r-project.org). Phương pháp Wilcoxcon được sử dụng để kiểm tra thứ hạng của hai nhóm dữ liệu.

Các mối tương quan trong biểu hiện gen được đánh giá bằng cách sử dụng các phép thử tương quan của Spearman để xác định ý nghĩa thống kê và độ mạnh của mối tương quan được xác định bằng cách làm theo hướng dẫn cho giá trị tuyệt đối: 0,00 - 0,19, rất yếu; 0,20 - 0,39, yếu; 0,40 - 0,59, trung bình; 0,60 - 0,79, mạnh và 0,80 - 1,00, rất mạnh. Giá trị p nhỏ hơn 0,05 được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

KẾT QUẢ

Sự khác biệt về biểu hiện mRNA và protein SET giữa tế bào ung thư biểu mô gan và mô không ung thư

Cơ sở dữ liệu UALCAN đã được sử dụng để phân tích mức độ biểu hiện mRNA của *SET* trên các các mẫu mô từ bệnh nhân UTBMTBG và không ung thư thông. Kết quả trong hình 1 cho thấy, biểu hiện mRNA của *SET* có sự khác biệt có ý nghĩa ($p<0,0001$) giữa nhóm bệnh nhận UTBMTBG (TPM trung vị là 62,45) và nhóm không ung thư (TPM trung vị là 40,78).

Biểu hiện của *SET* có liên quan đến thời gian sống còn toàn bộ (OS) và sống còn không tái phát (RFS) của bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan

Cơ sở dữ liệu Kaplan-Meier Plotter được dùng để phân tích mối tương quan giữa biểu hiện của *SET* với sự sống còn và sống còn không tái phát thông qua cơ sở dữ liệu TCGA. Kết quả cho thấy biểu hiện của *SET* có liên quan có ý nghĩa với sự sống còn (p=3,90e-04; Hình 2A) và sống còn không tái phát (p=4,80e-03; Hình 2B). Nhóm bệnh nhân có biểu hiện gen *SET* cao có thời gian sống còn và sống còn không tái phát ngắn hơn nhóm biểu hiện thấp.

Tập dữ liệu GSE14520 (n=242) đã được sử dụng để tiến hành phân tích mối tương quan giữa biểu hiện của *SET* với sự sống còn và sống còn không tái phát của bệnh nhân UTBMTBG. Bệnh nhân được chia thành hai nhóm: nhóm biểu hiện cao (n=121) và nhóm biểu hiện thấp (n=121) dựa vào trung vị mức độ biểu hiện của *SET*.

Dựa vào phân tích Kaplan-Meier cho thấy, biểu hiện *SET* có liên quan đến sự sống còn của bệnh nhân UTBMTBG (*p*=6,36E-04; Hình 2C). Bệnh nhân có biểu hiện *SET* cao có thời gian sống ngắn hơn bệnh nhân có biểu hiện *SET* thấp. Chúng tôi đã phân tích thêm khía cạnh liên quan của *SET* với sự sống còn không tái phát và các bước làm được thực hiện tương tự phân tích sự sống còn. Kết quả cho thấy *SET* cũng liên quan đến sự sống còn không tái phát của bệnh nhân UTBMTBG *(p*=1,33e-02, Hình 2D) và những bệnh nhân biểu hiện *SET* cao có thời gian sống còn không tái phát ngắn hơn những bệnh nhân có *SET* biểu hiện thấp. Nhìn chung, biểu hiện cao của *SET* liên quan mật thiết đến sự tiên lượng xấu của bệnh UTBMTBG cho cả sự sống còn và sống còn không tái phát.

Biểu hiện của mRNA của *SET* là yếu tố tiên lượng độc lập của ung thư biểu mô tế bào gan

Cơ sở dữ liệu UALCAN đã được dùng để phân tích xác định mối liên hệ giữa mức độ biểu hiện của *SET* với khả năng sống sót của các bệnh nhân UTBMTBG và không ung thư thông qua các biến như: ung thư và không ung thư, chủng tộc, giới tính, độ tuổi, giai đoạn ung thư và mức độ khối u. Kết quả được trình bày ở hình 3. Biểu hiện cao của *SET* không có sự khác biệt giữa giới tính nam và giới tính nữ (Hình 3A). Biểu hiện của *SET* không có sự khác biệt giữa độ tuổi từ 21 - 40 tuổi so với 41 - 60 tuổi, 61 - 80 tuổi so với 80 - 100 tuổi, 21 - 40 tuổi so với 80 - 100 tuổi, chỉ có sự khác biệt có ý nghĩa giữa 41 - 60 tuổi so với 61 - 80 tuổi ($p<0.05$) và tất cả các độ tuổi đều có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với nhóm không ung thư ($p<0,001$) (Hình 3B). Biểu hiện của *SET* không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa người da trắng với người Mỹ gốc phi, người Mỹ gốc phi với người châu Á, chỉ có sự khác biệt có ý nghĩa giữa người da trắng với người châu Á ($p<0,02$) và tất cả các chủng tộc đều có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với nhóm không ung thư ($p<0,001$) (Hình 3C).

Biểu hiện của *SET* không có sự khác biệt giữa giai đoạn ung thư 1 với giai đoạn ung thư 2, giai đoạn ung thư 3 với giai đoạn ung thư 4, giai đoạn ung thư 1 với 4, mà chỉ có sự khác biệt giữa giai đoạn ung thư 2 với giai đoạn ung thư 3 ($p<0,01$). Tất cả các giai đoạn ung thư đều có sự khác biệt có ý nghĩa với nhóm không ung thư ($p<0,001$), ngoại trừ giai đoạn 4 (Hình 3D) có thể là do số bệnh nhân ở giai đoạn này nhỏ nên không tạo ra sự khác biệt thống kê. Biểu hiện của *SET* không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa mức độ biệt hóa khối u ở độ 1 với độ 2, độ 3 với độ 4, độ 1 với độ 4 và chỉ có sự khác biệt giữa mức độ biệt hóa khối u ở độ 2 với độ 3 ($p<0,001$). Tất cả các mức độ biệt hóa khối u đều có sự khác biệt có ý nghĩa với nhóm không ung thư ($p<0,001$) (Hình 3E).

Phương pháp phân tích hồi quy tỷ lệ đơn biến và đa biến Cox đã được thực hiện để tìm các mối tương quan của *SET* trên hồ sơ GSE14520 (Bảng 1). Trong phân tích đơn biến thì độ tuổi và giới tính không có mối liên hệ với sự sống còn và sống còn không tái phát. Nhưng sự biểu hiện của *SET* lại có mối liên hệ chặt với sự sống còn (HR: 0,49; 95% CI: 0,33-0,75; p=8,50e-04) và sống còn không tái phát (HR: 2,49; 95% CI: 0,31-0,72; p=4,63e-04). Trong phân tích đa biến thì độ tuổi và giới tính không có mối liên hệ với sự sống còn và sống còn không tái phát. Nhưng sự biểu hiện của *SET* có mối liên hệ chặt với sự sống còn (HR: 0,65; 95% CI: 0,47-0,92; p=0,01) và sống còn không tái phát (HR: 0,62; 95% CI: 0,44-0,88; p=6,65e-03). Từ những kết quả trên cho thấy, *SET* là một chỉ thị sinh học độc lập và tiềm năng cho việc chẩn đoán sớm và tiên lượng bệnh UTBMTBG.

Phân tích mối liên hệ của *SET* với các loại tế bào miễn dịch trong UTBMTBG

Sự biểu hiện của *SET* có sự tương quan có ý nghĩa với tế bào B (p=9,05e-16), tế bào T CD8+ (p=6,10e-18), tế bào T CD4+ (p=1,58e-11), đại thực bào (p= 3,24e-20), bạch cầu trung tính (p=1,13e-18) và tế bào đuôi gai (p=4.19e-25) (Hình 4).

THẢO LUẬN

Ung thư biểu mô tế bào gan là một trong mười loại ung thư phổ biến nhất thế giới, với tỷ lệ mắc mới đang tăng lên từng năm và có tỷ lệ tử vong rất cao (Freddie Bray et al., 2018). Nguyên nhân gây ra UTBMTBG rất đa dạng, bị tác động bởi nhiều gen điều khiển khác nhau (Jingxian Duan et al., 2019) và việc hình thành khối u UTBMTBG có liên quan đến tăng hoặc giảm hàm lượng các protein khác nhau khiến cho UTBMTBG rất phù hợp với nghiên cứu liên quan đến chỉ thị sinh học (Tara Behne and aM. Sitki Copur, 2012). Hai phần ba bệnh nhân UTBMTBG được chẩn đoán ở giai đoạn muộn sau khi đã di căn dẫn đến tỷ lệ sống sau 5 năm <10,7% (Hongmei Zeng et al., 2015) . Chẩn đoán sớm và tiên lượng UTBMTBG đã góp phần làm tăng thời gian sống sót của bệnh nhân bằng cách cung cấp các phương pháp điều trị hiệu quả (Roongruedee Chaiteerakij et al., 2015). Chỉ thị sinh học UTBMTBG lý tưởng là một chỉ thị cho phép bác sĩ chẩn đoán cho những bệnh nhân không có triệu chứng và có thể được sử dụng rộng rãi trong quá trình sàng lọc (Amy S. Farrell et al., 2014). Mục tiêu của nghiên cứu này là chứng minh *SET* là một chỉ thị sinh học tiềm năng cho việc chẩn đoán sớm và tiên lượng UTBMTBG.

SET là một oncoprotein đa chức năng có liên quan đến nhiều quá trình trong tế bào . Năm 1992, lần đầu tiên *SET* được xác định với tên là set-can, một gen sinh ung thư giả định liên quan đến sự hình thành bệnh bạch cầu dòng tủy (Marieke Von Lindern et al., 1992). Ở người, *SET* có 8 exon, nằm ở vị trí q34.11 trên nhiễm sắc thể số 9 và có 2 đồng dạng là *SET* - α và *SET* - β (Yoshifumi Adachi et al., 1994). Biểu hiện cao của gen *SET* được chứng minh có liên quan đến sự tiên lượng xấu cho nhiều loại ung thư về cả sự sống còn, sự sống còn khi khối u chưa di căn, sự sống còn không tái phát và sự sống còn không bệnh. Thông qua cơ sở dữ liệu Human Protein Atlas, chúng tôi xác định được sự biểu hiện của *SET* trong mẫu mô UTBMTBG cao hơn rất nhiều so với mẫu mô không ung thư và sự phát hiện của *SET* trên mẫu UTBMTBG là 100% (phát hiện 6/6 mẫu mô UTBMTBG được thực hiện hóa mô miễn dịch). Sự biểu hiện của gen *SET* ở bệnh nhân UTBMTBG cao hơn bệnh nhân không ung thư (1,5-2 lần). Trong phân tích đơn biến, đa biến thông tin lâm sàng của hồ sơ GSE14520 và mối tương quan của *SET* với thông tin lâm sàng từ cơ sở dữ liệu TCGA, cho thấy *SET* là một chỉ thị sinh học độc lập cho bệnh UTBMTBG với các biến như tuổi, giới tính và chủng tộc. Đặc biệt, biểu hiện của *SET* ở nhóm bệnh nhân UTBMTBG giai đoạn 1 (khối u <2 cm, theo hệ thống phân loại ung thư Hoa Kỳ) và mức độ biệt hóa khối u ở độ 1 có sự khác biệt rất có ý nghĩa với nhóm bệnh nhân không ung thư. Sự khác biệt này rất quan trọng trong việc chẩn đoán sớm bệnh UTBMTBG. Mức độ biểu hiện *SET* không chỉ tương quan với khả năng sống còn mà còn cả sống còn không tái phát. Bệnh nhân UTBMTBG có biểu hiện *SET* cao có tỷ lệ sống còn và sống còn không tái phát thấp hơn có ý nghĩa so với bệnh nhân UTBMTBG có biểu hiện *SET* thấp. Sự biểu hiện cao của *SET* dẫn đến sự tiên lượng xấu cho bệnh nhân UTBMTBG. Những phát hiện này gợi ý rằng sự biểu hiện của *SET* có thể đóng vai trò như một yếu tố tiên lượng thuận lợi và là một dấu ấn sinh học đầy hứa hẹn để dự đoán sự tái phát trong ung thư biểu mô tế bào gan ở giai đoạn sớm.

Bên cạnh đó chúng tôi muốn cung cấp thêm một mối tương quan của *SET* với các tế bào miễn dịch trong UTBMTBG. Độ đồng nhất của mỗi khối u không liên quan đến mức độ biểu hiện *SET*, cho thấy rằng *SET* không được biểu hiện cao bởi các tế bào

miễn dịch trong vi môi trường khối u, nhưng có nhiều khả năng sẽ biểu hiện quá mức ở các tế bào ung thư. Nghiên cứu đã chứng minh rằng, biểu hiện của của *SET* tỷ lệ thuận với sự biểu hiện của tế bào B, tế bào T CD8+, T CD4+, đại thực bào, bạch cầu trung tính và đặc biệt là tế bào đuôi gai có sự tương quan mạnh nhất trong tất cả các tế bào miễn dịch được phân tích.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã cung cấp một cái nhìn tổng quát hơn về mối tương quan giữa biểu hiện của *SET* và bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Biểu hiện mRNA của *SET* trên mẫu mô ung thư biểu mô tế bào gan cao hơn so với trên mẫu mô không ung thư. *SET* là một chỉ thị sinh học độc lập có thể sử dụng trong chẩn đoán và tiên lượng bệnh ung thư biểu mô tế bào gan. Ở nhóm bệnh nhân ung thư biểu mô tế bào gan có biểu hiện *SET* cao sẽ có thời gian sống còn và sống còn không tái phát ngắn hơn nhóm bệnh nhân có mức độ biểu hiện *SET* thấp, từ đó cho thấy biểu hiện cao của *SET* dẫn đến tiên lượng xấu cho bệnh ung thư biểu mô tế bào gan cả về sự sống còn và sống còn không tái phát.

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Nhóm tác giả cam kết rằng không có xung đột lợi ích khi thực hiện nghiên cứu này.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuân khổ Đề tài mã số C2021-44-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

AMY S. FARRELL, BRITTANY ALLEN-PETERSEN, COLIN J. DANIEL, XIAOYAN WANG, ZHIPING WANG, SARAH RODRIGUEZ, SOREN IMPEY, JESSICA ODDO, MICHAEL P. VITEK, CHARLES LOPEZ, DALE J. CHRISTENSEN, BRETT SHEPPARD & ROSALIE C. SEARS 2014. Targeting Inhibitors of the Tumor Suppressor PP2A for the Treatment of Pancreatic Cancer. *Mol Cancer Res,* 12**,** :924–939.

DALE J. CHRISTENSEN, YOUWEI CHEN, JESSICA ODDO, KAREN M. MATTA, JESSICA NEIL, EVAN D. DAVIS, ALICIA D. VOLKHEIMER, MARK C. LANASA, DAPHNE R. FRIEDMAN, BARBARA K. GOODMAN, JON P. GOCKERMAN, LOUIS F. DIEHL, CARLOS M. DE CASTRO, JOSEPH O. MOORE, MICHAEL P. VITEK & J. BRICEWEINBERG 2016. SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood,* 118**,** :4150-4158.

DARSHAN S. CHANDRASHEKAR, BHUWAN BASHEL, SAI AKSHAYA HODIGERE BALASUBRAMANYA, CHAD J. CREIGHTON, ISRAEL PONCE-RODRIGUEZ, BALABHADRAPATRUNI V.S.K. CHAKRAVARTHI & SOORYANARAYANA VARAMBALLY 2017. UALCAN: A Portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasma,* 19**,** :649-658.

FREDDIE BRAY, JACQUES FERLAY, ISABELLE SOERJOMATARAM, REBECCA L. SIEGEL, LINDSEY A. TORRE & AHMEDIN JEMAL 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca Cancer J Clin,* 68**,** :394–424

HONGMEI ZENG, RONGSHOU ZHENG, YUMING GUO, SIWEI ZHANG & XIAONONG ZOU 2015. Cancer survival in China, 2003–2005: A population-based study. *Int. J. Cancer,* 136**,** 1921–1930.

JIE LI1, XU HAN, XIAONA YU, ZONGZHEN XU, GUANGSHENG YANG, BINGQI LIU & PENG XIU 2018. Clinical applications of liquid biopsy as prognostic and predictive biomarkers in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research,* 37**,** :1-13.

JING FU & HONGYANG WANG 2018. Precision diagnosis and treatment of liver cancer in China. *Cancer Lett,* 412**,** :283-288.

JINGXIAN DUAN, YULING WU, JIKUI LIU, JIAJIA ZHANG, ZHICHAO FU, TIESHAN FENG, MING LIU, JIE HAN, ZHICHENG LI & SHIFU CHEN 2019. Genetic biomarkers for hepatocellular carcinoma In the era of precision medicine. *Journal of Hepatocellular Carcinoma,* 6**,** :151–166.

KOJI UMATA, YUSUKE SAKAI, SHUNTA IKEDA, SHUNYA TSUJI, HIDEYOSHI KAWASAKI, TAKASHI OHAMAID1 & KOICHI SATO 2019. Distribution of SET/I2PP2A protein in gastrointestinal tissues. *Plos One,* 14**,** :1-14.

MARIEKE VON LINDERN, SJOZEF VAN BAAL, JOOP WIEGANT, ANTON RAAP, ANNE HAGEMEIJER & GERARD GROSVELDL 1992. Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene. *Molecular And Cellular Biology,* 12**,** :3346-55.

MEI LI, ANTHONY MAKKINJE & ZAHI DAMUNI 1996. The myeloid leukemia associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A. *The Journal of Biological Chemistry,* 271**,** :11059–11062.

NICHA WONGJARUPONG, GABRIELA M NEGRON-OCASIO, ROONGRUEDEE CHAITEERAKIJ, BENYAM D ADDISSIE, ESSA A MOHAMED, KRISTIN C MARA, WILLIAM S HARMSEN, J PAUL THEOBALD, BRIAN E PETERS & JOSEPH G BALSANEK 2018. Model combining pre-transplant tumor biomarkers and tumor size shows more utility in predicting hepatocellular carcinoma recurrence and survival than the BALAD models. *World J Gastroenterol,* 24**,** :1321-1331.

OTÍLIA MENYHÁRT, ÁDÁM NAGY & BALÁZS GYŐRFFY 2018. Determining consistent prognostic biomarkers of overall survival and vascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Royal Society Open Science,* 5**,** 1-15.

PIETER J.A. EICHHORN, MENNO P. CREYGHTON & RENÉ BERNARDS 2008. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1795**,** :1-15.

ROONGRUEDEE CHAITEERAKIJ, XIAODAN ZHANG, BENYAM D. ADDISSIE, ESSA A. MOHAMED, WILLIAM S. HARMSEN, PAUL J. THEOBALD, BRIAN E. PETERS, JOSEPH G. BALSANEK, MELISSA M. WARD, NASRA H. GIAMA, CATHERINE D. MOSER, ABDUL M. OSEINI, NAOKI UMEDA1, SUDHAKAR VENKATESH, DENISE M. HARNOIS, MICHAEL R. CHARLTON, HIROYUKI YAMADA, SHINJI SATOMURA, ALICIA ALGECIRAS-SCHIMNICH, MELISSA R. SNYDER, TERRY M. THERNEAU & LEWIS R. ROBERTS 2015. Combinations of biomarkers and milan criteria for predicting hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl,* 21**,** :599–606.

SHREYA SENGUPTA & NEEHAR D PARIKH 2017. Biomarker development for hepatocellular carcinoma early detection: current and future perspectives. *Hepatic Oncology,* 4**,** :111–122.

SINGAL, A. G. & EL-SERAG, H. B. 2015. Hepatocellular Carcinoma From Epidemiology to Prevention: Translating Knowledge into Practice. *Clin Gastroenterol Hepatol,* 13**,** 2140-51.

T KUMAGI, Y HIASA & G M HIRSCHFIELD 2009. Hepatocellular carcinoma for the non-specialist. *Clinical Review,* 339**,** :1366-1370.

TADATOSHI TAKAYAMA, MASATOSHI MAKUUCHI, MASAMICHI KOJIRO, GREGORY Y LAUWERS, REID B ADAMS, STEPHANIE R WILSON, HYUN-JUNG JANG, CHUSILP CHARNSANGAVEJ & BACHIR TAOULI 2008. Early hepatocellular carcinoma: pathology, imaging, and therapy. *Ann Surg Oncol,* 15**,** :972-978.

TAIWEN LI1, JINGYU FAN, BINBIN WANG, NICOLE TRAUGH, QIANMING CHEN, JUN S LIU4, BO LI & X. SHIRLEY LIU 2017. TIMER: A web server for comprehensive analysis of tumor infiltrating immune cells. *Cancer Res,* 77**,** :e108–e110.

TARA BEHNE & AM. SITKI COPUR 2012. Biomarkers for hepatocellular carcinoma. *International Journal ofHepatology,* 2012.

XIAO-NAN DAI, SHAN LIU, LI SHAO, CHAO GAO, LI GAO, JIA-YIN LIU & YU-GUI CUI 2014. Expression of the SET protein in testes of mice at different developmental stages. *Asian Journal of Andrology,* 16**,** :689–693.

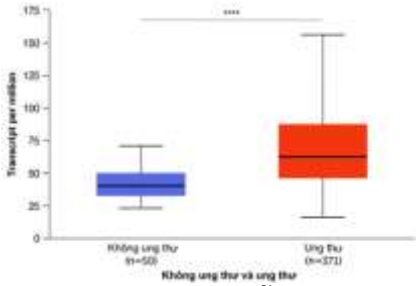
XIN CHEN, SIU TIM CHEUNG, JOHN HIGGINS, MATT VAN DE RIJN, SAMUEL SO, SHEUNG TAT FAN, KIN-MAN LAI, JIAFU JI, DAVID BOTSTEIN & PATRICK O. BROWN 2002. Gene Expression Patterns in Human Liver Cancers. *Molecular Biology of the Cell* 13**,** :1929–1939.

YOSHIFUMI ADACHI, GEORGE N. PAVLAKIS & TERRY D. COPELAND 1994. Identification and characterization of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation break point in acute undifferentiated leukemia. *The Journal of Biological Chemistry,* 269**,** :2258-2262.

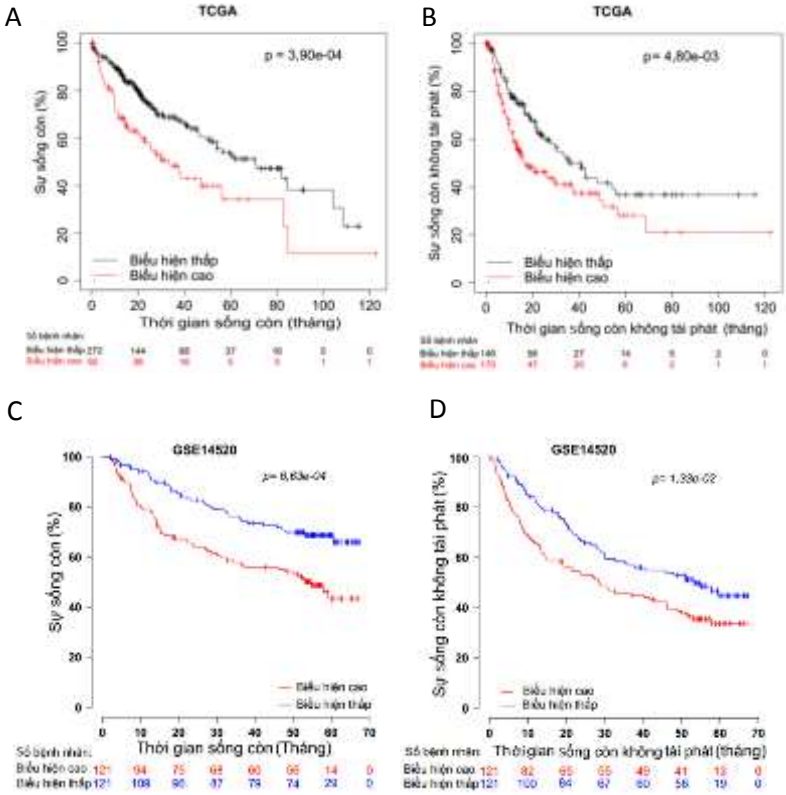
Bảng 1: Phân tích dữ liệu lâm sàng của hồ sơ GSE14520 thông qua phương pháp hồi quy đơn biến với mô hình nguy cơ tỷ lệ Cox đơn biến và đa biến.

Biến		Đơn biến				Đa biến		
		HR	95% CI	*p*-value		HR	95% CI	*p*-value
OS	**Tuổi**	0,96	0,79 - 1,20	0,69		0,94	0,63 - 1,40	0,76
	Giới tính	1,90	0,90 - 3,80	0,09		1,07	0,98 - 4,20	0,06
	Biểu hiện	0,49	0,33 - 0,75	8,50e-04		2,49	0,31 - 0,72	4,63e-04
RFS	**Tuổi**	1,00	0,88 - 1,02	0,66		1,15	0,82 - 1,61	0,42
	Giới tính	2,40	1,20 - 5,50	9,00e-03		2,53	1,32 - 4.84	4,77e-03
	Biểu hiện	0,65	0,47 - 0,92	0,01		0,62	0,44 - 0.88	6,65e-03

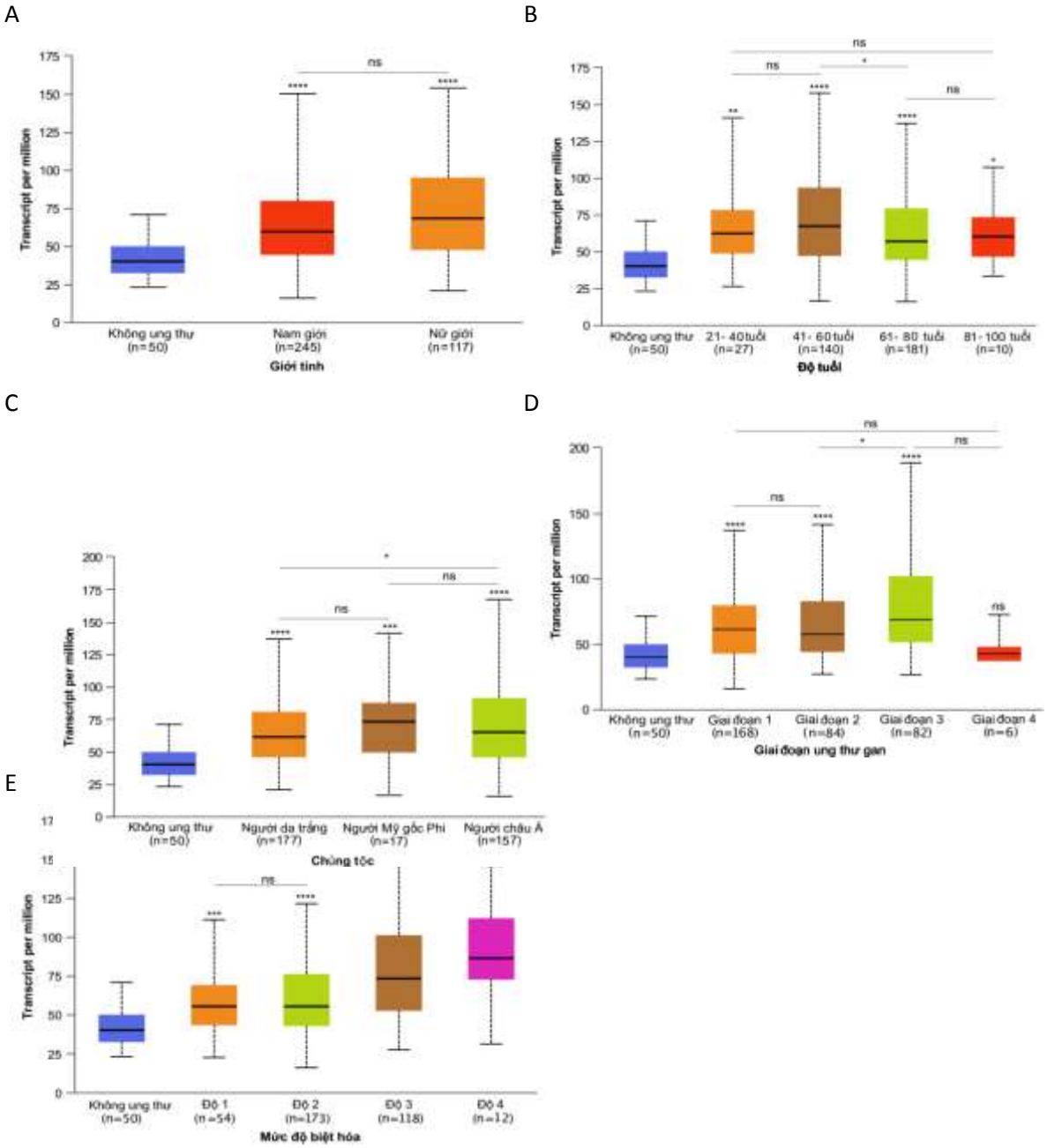
*Chú thích: OS, sự sống còn; RFS, sự sống còn không tái phát; HR, tỷ lệ rủi ro; CI: khoản tin cậy***;** *p*- value <0,05 sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.



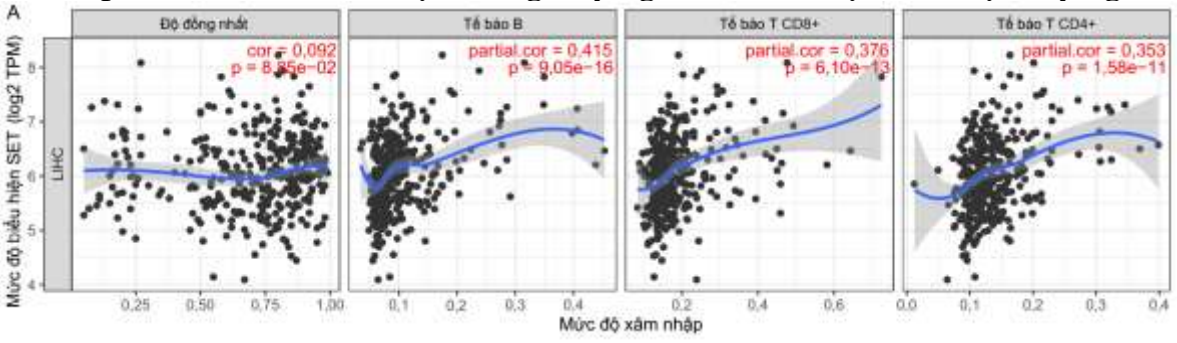
Hình 1: Biểu hiện mRNA của *SET* trên mẫu mô UTBMTBG và không ung thư. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, ****, p<0,0001; ns, khác biệt không có ý nghĩa. P<0,05 sự khác biệt có ý nghĩa.

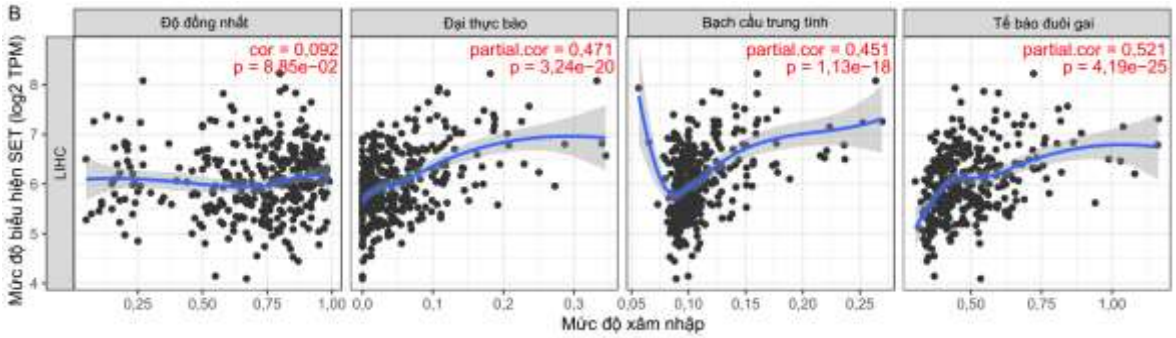


Hình 2: Phân tích biểu hiện của gen *SET* liên quan đến sự sống còn và sống còn không tái phát. A - Liên quan đến sự sống còn thông qua cơ sở dữ liệu TCGA. B - Liên quan đến sự sống còn không tái phát thông qua cơ sở dữ liệu TCGA. C - Liên quan sự sống còn thông qua cơ sở dữ liệu GSE14520. D - Liên quan đến sự sống còn không tái phát thông qua cơ sở dữ liệu GSE14520



Hình 3: Mối tương quan của biểu hiện *SET* với các biến được phân tích dựa trên cơ sở dữ liệu TCGA. A - Giới tính. B - Độ tuổi. C - Chủng tộc. D - Giai đoạn ung thư. E - Mức độ biệt hóa khối u. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, ****, p<0,0001; ns, khác biệt không có ý nghĩa. P<0,05 sự khác biệt có ý nghĩa.





Hình 4: Mối liên quan giữa biểu hiện *SET* và sự thâm nhập miễn dịch trong UTBMTBG. A - Mối quan hệ giữa sự biểu hiện *SET* với độ đồng nhất của ung biểu mô tế bào gan và sự xâm nhập của tế bào B, tế bào CD8+ và tế bào CD4+. B - Mối quan hệ giữa sự biểu hiện *SET* và sự xâm nhập của các đại thực bào, bạch cầu trung tính và tế bào đuôi gai. p<0,05, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mối tương quan cor: 0,00 - 0,19, rất yếu; 0,20 - 0,39, yếu; 0,40 - 0,59, trung bình; 0,60 - 0,79, mạnh và 0,80 - 1,00, rất mạnh.

MỘT SỐ KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT CHẾ BIẾN TRÀ TÚI LỌC THÙ LÙ CẠNH (*Physalis angulata* L.)

Tôn Nữ Liên Hương[1,*], Lưu Nguyệt Thảo[2], Mai Duy[3]

[1,]Khoa Khoa học tự nhiên, Đại học Cần Thơ, khu 2, đường 3/2, Xuân Khánh, Ninh Kiều, Cần Thơ,*

[2, 3]Sinh viên K43, Cao học K27, Khoa Khoa học tự nhiên, Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Dịch chiết từ phần trên mặt đất của cây Thù lù cạnh (Physalis angulata L.) thu hái tại tỉnh Vĩnh Long được chiết ngâm dầm trong dung môi ethanol sau đó chiết phân đoạn với các dung môi hữu cơ tạo thành các cao có độ phân cực tăng dần lần lượt là n-Hexane (Hex), dichloromethane (DC), ethyl acetate (EA) và cao ethanol/nước còn lại để thử nghiệm khả năng kháng gốc tự do DPPH và độc tính trên các dòng tế bào ung thư. Kết quả thử hoạt tính kháng oxy hóa trên cao chiết EA từ lá cây Thù lù cạnh thấp hơn khả năng kháng oxy hóa của acid ascorbic khoảng 9 lần và là kết quả tốt nhất so với các cao chiết khác. Bên cạnh đó, các thử nghiệm in vitro của cao chiết với tế bào ung thư ở người như các dòng A459, KB, MDA-MB-231, KB-VIN and MCF7 chứng thực cây Thù lù ức chế khối u của ung thư phổi, biểu mô và ung thư vú rất tốt.

Từ lá tươi qua quá trình chế biến tạo ra trà túi lọc Thù lù có khối lượng tịnh 2g/gói. Kết quả khảo sát độc tính cấp in vivo cho thấy trà không có độc tính, độ sử dụng an toàn là 2 gói/kg thể trọng trên chuột.

SOME PRELIMINARY RESULTS SURVEY TEA BAG PROCESSING OF *Physalis angulata* L.

Ton Nu Lien Huong[1,*], Luu Nguyet Thao[2], Mai Duy[3]

[1]College of Natural Siences, Cantho University, Campus II, 3/2 Street, Xuan Khanh, Ninh Kieu, Can Tho

[2, 3]Student of 43rd and Graduate student of 27rd Course, CNS, Cantho University

[*]Corresponding author: tnlhuong@ctu.edu.vn

ABSTRACT

The aerial parts of Physalis angulata L. plant collected from Vinh Long province were extracted by ethanol then partitioned with organic solvents as n-hexane (Hex), dichloromethane (DC), ethyl acetate (EA) và ethanol/water to obtain different extracts for testing antioxidant activity by the use of DPPH free radical method and toxicity on the cancer cell lines. In the DPPH test results, the EA extract showed the best free redical eliminate activity, in comparision with acid ascorbic as the positive control. Besides, testing on the cancer cell lines including A459, KB, MDA-MB-231, KB-VIN and MCF7 proved that Physalin angulata L. obtained good inhibition on the tumors of breast, lung and epithelium. The polarity extracts were inhibited better than nonpolarity extract.

The tea bag was produced from the leaves of Physalis angulata L. and were determined toxicity by in vivo testing. From the fresh leaves, through the preliminary processing to create tea bags with net weight of 2g/bag. The results showed that surveyed the safe for health, on mice the safe dose was 2 bags/kg.

Keywords: *Physalis angulata L., antioxidant, DPPH, tea bags, inhibition cancer cell lines.*

1.GIỚI THIỆU

Thù lù cạnh (*Physalis angulata* L.) thuộc họ Cà (Solanaceae) phân bố tại các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Ở Việt Nam, cây Thù lù cạnh được biết đến không chỉ

là một loại rau ăn hằng ngày mà nó còn góp mặt vào không ít các bài thuốc dân gian cũng như các phương thuốc y học cổ truyền[4]. Trong các bài thuốc Đông y hiện đang áp dụng tại các trạm thuốc Y học dân tộc, cây Thù lù cạnh được dùng toàn bộ phần trên mặt đất để phối hợp sắc uống điều trị các bệnh ngoài da, bệnh về gan, đường huyết, nhiễm trùng. Trên thế giới hiện nay có nhiều nghiên cứu về dược tính của cây *Physalis angulata* này [1, 6]. Tại Việt Nam, Thù lù cạnh chỉ được dùng trong Đông Y và còn ít có nghiên cứu khoa học nào về tác dụng của nó. Trong những năm gần đây, khảo sát phân lập các hợp chất tự nhiên có hoạt tính trong cây Thù lù cạnh cũng dã được công bố, với nhiều hợp chất khung physalin[3, 9-11].

Vì vậy, khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa và thử độc tính cấp trên trà túi lọc làm từ cây thù lù cạnh - *Physalis angulata* L. là một công việc cần thiết và có ý nghĩa khoa học, nhằm đóng góp thêm thông tin hoạt tính và khả năng ứng dụng dược liệu vào đời sống.

1. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Nguyên liệu được sử dụng trong nghiên cứu là lá cây Thù lù cạnh được thu hái tại Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Phần lá cây tươi (2,1 kg) được dùng chế biến trà. Mẫu trên mặt đất của cây (1,1 kg) được rửa sạch, loại bỏ phần hư, cắt nhỏ, phơi khô trong bóng râm và sấy lại ở nhiệt độ 60ºC, sau đó được xay thành bột mịn (100 g) dùng cho nghiên cứu . Sử dụng lá cỏ ngọt khô đóng gói (có thương hiệu, được phân phối tại các siêu thị) để phối hợp tạo trà Thù lù.

Vật liệu, phương tiện

Đèn UV (bước sóng 365 nm và 254 nm) dùng để kiểm tra bản mỏng. Máy ELISA reader, máy cô quay Heidolph, tủ sấy Ecocell, bộ rây lọc. Một số dụng cụ khác để bảo quản mẫu, chiết xuất cao,thử nghiệm sinh học, micropipet, bản mỏng sắc ký tráng sẵn silica gel F_{254}.

Chuột nhắt trắng Swiss, 3-4 tuần tuổi, được nuôi bằng thức ăn chế biến phù hợp, nhốt riêng chuồng

Dung môi, hóa chất

Chiết các cao phân đoạn **(**Chemsol, Việt Nam): ethanol, *n*-hexan, dichloromethane, ethyl acetate, nước cất.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa, ức chế tế bào ung thư, thử độc tính cấp trên trà lá thù lù: methanol, 1,1-dipheny-2picrylhydrazyl (DPPH, Sigma), acid ascorbic (Sigma), DMSO. nước tinh khiết

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xử lý nguyên liệu

Quy trình chế biến trà: Diệt men và vò trà theo quy trình chế biến trà xanh, phối hợp thêm nguyên liệu có vị để tạo thành phẩm. Đóng gói túi lọc kín, đạt điều kiện bảo quản chống ẩm.

Chiết cao có độ phân cực khác nhau để thử nghiệm sinh học

Áp dụng các phương pháp thường quy trong tách chiết hợp chất thiên nhiên, gồm ngâm dầm, chiết phân đoạn bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng

Nguyên liệu lá cây Thù lù cạnh sau khi được thu hái tại Thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu lá tươi (1,1 kg) được loại bỏ phần hư, rửa sạch, phơi khô trong bóng râm và sấy ở nhiệt độ 60ºC. Mẫu khô được xay thành bột, cho vào các túi vải buộc kín miệng và ngâm với ethanol trong bình thủy tinh lớn có nắp đậy, ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ ngâm thì thay mới dung môi. và lặp lại nhiều lần đến chiết kiệt. Các dung dịch chiết được thu gom, lọc, cô quay thu hồi ethanol dưới áp suất giảm thu được cao ethanol

(cao tổng) dạng sệt có khối lượng là 10 g. Tiếp theo, pha cao tổng trong nước (tỷ lệ 1:1 về thể tích) và tiến hành chiết lỏng-lỏng cao tổng lần lượt với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần và cô quay thu hồi dung môi của các dịch chiết để có được các cao là *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate và cao ethanol/H_2O còn lại dung đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá.

Khảo sát hoạt tính kháng oxy hóa

Thử nghiệm kháng oxy hóa DPPH được tiến hành theo phương pháp của Sharma và cộng sự. (2009) có hiệu chỉnh [7].

*Dung dịch chuẩn:*acid ascorbic được pha trong methanol thành nồng độ 1 mg/mL (1000 µg/mL). Sau đó, tiến hành pha loãng 10 lần để có được dung dịch Vitamin C có nồng độ 100 µg/mL.

Dung dịch DPPH: Pha dung dịch DPPH có nồng độ 1 mg/mL trong methanol, bảo quản lạnh trong tối.

Dung dịch cao chiết: Cao chiết được pha thành nồng độ 10 mg/mL trong methanol. Sau đó tiến hành pha loãng 10 lần để có được dung dịch có nồng độ 1mg/mL (1000 µl/mL). Trong quá trình thử nghiệm pha thành các nồng độ để khảo sát.

Quy trình thử nghiệm:

Tiến hành pha các mẫu thử acid ascorbic trong methanol với nồng độ tăng dần từ 0 đến 15 µg/mL. Thêm DPPH vào cho đạt tổng thể tích của dung dịch phản ứng là 1 mL, chứa trong tuýp eppendorf đã được bọc bằng giấy bạc, đảm bảo ánh sáng không thể xuyên qua. Sau khi cho DPPH vào, hỗn hợp được ủ trong tối 60 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó hỗn hợp được đo độ hấp thu quang ở bước sóng: $\lambda = 517$ nm.

Tương tự các mẫu cao chiết như Hex, DC, Ea từ cây thù lù cạnh cũng được pha trong methanol. Các bước thí nghiệm cũng tương tự như mẫu acid ascorbic nhưng chỉ khác nhau ở các nồng độ ban đầu của cao chiết, chẳng hạn với cao EA là nồng độ (µg/mL): 18,75, 37,5, 75,0, 150, 300 và 600.

Hoạt tính kháng oxy hóa HTKO (%) được tính theo công thức:

$$\text{HTKO (\%)} = \frac{(Ac - At)}{Ac} \times 100$$

Trong đó A_c: Độ hấp thu quang của ống đối chứng

A_t: Độ hấp thu quang của ống thử

Từ giá trị HTKO (%) và nồng độ mẫu với phần mềm Excel có được phương trình tuyến tính giữa nồng độ mẫu thử và HTKO (%) có dạng y = ax + b, thế y = 50 để suy ra IC_{50}. Giá trị IC_{50} càng thấp tương ứng với HTKO càng cao và ngược lại.

Xử lý số liệu: Trong nghiên cứu, mỗi thí nghiệm tiến hành lặp lại 3 lần, kết quả trình bày ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Microft Office Excel. Số liệu được xử lý tương quan bằng phần mềm Minitab 16. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% khi $P < 0,05$.

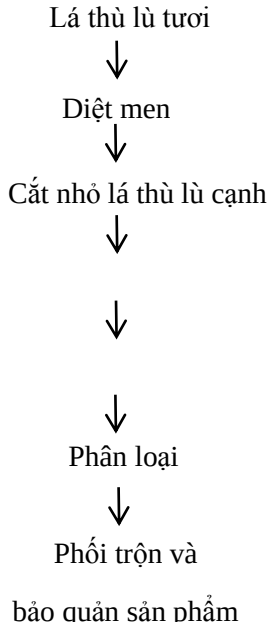
Quy trình làm trà

Các công đoạn làm trà lá cây Thù lù cạnh được trình bày tóm lược trong sơ đồ Hình 1, gồm các bước quan trọng là diệt men, vò trà theo quy trình chế biến trà xanh. Trong các công đoạn chế biến, khâu diệt men được thực hiện ở 100°C trong vòng 2 phút. Kế tiếp vò trà thủ công, trong túi vải và thời gian vò là 2-5 phút. Sau khi vò lá, sấy trà ở 50°C đến khi lá trà khô giòn. Trà được để nguội và dùng rây (ϕ 1mm) để loại vụn.

Ngoài ra, căn cứ trên những ưu điểm của nguyên liệu lá Cỏ ngọt trong nghiên cứu trước đây của nhóm T.N.LHuong và cộng sự [8], chiết xuất chất stevioside có độ ngọt gấp 300 lần đường mía, lá cây Cỏ ngọt được chọn để phối hợp cùng lá Thù lù tạo thành sản phẩm trà túi lọc. Việc bổ sung lá cây Cỏ ngọt nhằm điều chỉnh vị cho trà lá

Thù lù bớt đắng, dễ uống, phù hợp với số đông người nhất là trẻ nhỏ. Mặt khác với hoạt tính ức chế enzyme □-glucosidase của lá Cỏ ngọt đã được công bố [8], cũng góp phần làm tăng tính thuyết phục khi sử dụng trà túi lọc Thù lù

Tiến hành phối trộn lá trà Thù lù với lá Cỏ ngọt theo tỉ lệ 4:1 về khối lượng tịnh, qua rây để loại vụn và cho vào túi lọc.



*Hình 1:*Sơ đồ quy trình chế biến trà

Thử độc tính cấp trên trà

Qui trình thử độc tính cấp mã số MT/WI-DL-09 được thực hiện tại Viện Kiểm nghiệm thuốc[2],[5].

Thử nghiệm thăm dò: Chọn 4 chuột, cho uống liều tối đa có thể, quan sát chuột trong 48 giờ.

- Trường hợp 1: Nếu không có chuột nào chết, tiếp tục thử nghiệm chính thức.
- Trường hợp 2: Nếu tất cả chuột tử vong thì giảm liều đến khi tìm được liều có ít nhất một chuột sống, lấy liều đó làm cơ sở tiếp tục các bước thử nghiệm xác định theo tài liệu hướng dẫn.

Thử nghiệm chính thức:

- Trường hợp 1: Cho 12 chuột (50% chuột đực, 50% chuột cái) uống mẫu thử theo liều xác định được từ thử nghiệm thăm dò. Nếu không có chuột nào chết sau 48 giờ thì quan sát tiếp trong 14 ngày.
- Trường hợp 2: Chia chuột làm nhiều lô thử nghiệm khác nhau, mỗi lô ít nhất 6 con chuột. Chia liều ở các lô theo cấp số cộng khoảng từ LD_0– LD_{100}. Ở những liều gần LD_{50}, tăng số lượng chuột để sự đo lường chính xác hơn.

Chỉ tiêu đánh giá: Ghi nhận biểu hiện độc, mức độ nghiêm trọng, sự xuất hiện độc, tiến triển và phục hồi của chuột trong thời gian thử nghiệm (cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, tiêu biểu,…), số lượng chuột chết/sống ở mỗi lô, lập bảng số liệu để tính LD_{50} (nếu có). LD_{50} được tính theo phương pháp Behrens (1929).

Chỉ tiêu đánh giá theo tài liệu "Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu" do Cục Khoa học công nghệ và Đào tạo ban hành, QĐ 141/QĐ-K2ĐT 2015.

Khảo sát hoạt tính gây độc bằng phương pháp Sulforhodamin B (SRB)

Các dòng tế bào ung thư phổi (A549), ung thư vú (MCF-7) và ung thư vú sau di căn từ khối u ở phổi (MDA-MB-231), cùng tế bào ung thư biểu mô (KB) và (KB-VIN) được nuôi cấy trong môi trường E'MEM có bổ sung L-glutamin (2 mL), HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/mL), penicillin G (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS và ủ ở 37°C, 5% CO_2. Tế bào đơn được cấy trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 104 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, quần thể tế bào tiếp tục được ủ với chất khảo sát ở các nồng độ trong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch acid trichloroaceic 50% và nhuộm với dung dịch SRB 0,2%.

Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai bước sóng 492 nm và 620 nm.

Thử nghiệm được thực hiện tại khoa Dược, trường Đại học North Carolina, Mỹ.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Quá trình chiết cao cho thử nghiệm

Bằng phương pháp ngâm dầm trong ethanol rồi cô quay thu hồi dung môi và chiết lỏng-lỏng cao tổng với các dung môi hữu cơ có độ phân cực tăng dần, đã thu được các cao dùng cho thử nghiệm hoạt tính sinh học, số liệu kết quả dược tóm tắt trong bảng 1.

Bảng 1.Hiệu suất chiết cao tổng và các cao phân đoạn

Mẫu	Khối lượng (g)	Hiệu suất chiết (%)
Cao alcol tổng	10,00	10,0
Cao Hex	4,28	428
Cao DC	3,11	31,1
Cao EA	2,16	21,6
Cao alcol/nước còn lại	0,35	3,5

3.2 Khả năng kháng oxy hóa của các loại cao chiết

Trong mô hình thử nghiệm kháng oxy hoá của các cao chiết, chọn mô hình kháng DPPH bằng acid ascorbic (là một trong những chất thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do tốt nhất). Với mẫu thử là các cao chiết của lá Thù lù có DPPH lần lượt đánh giá hiệu suất thải loại hay nói khác đi trung hoà gốc tự do so với mẫu đối chứng acid ascorbic.

Đầu tiên mẫu trắng (mẫu chứng âm) không có acid ascorbic, tứ là nồng độ acid ascorbic được chọn làm mẫu đối chứng âm là 0, còn trong các thí nghiệm tiếp theo nhằm xây dựng đường chuẩn hiệu quả trung hoà gốc tự do cho acid ascorbic thì lượng mẫu acid ascorbic có trong dung dịch đã thêm DPPH lần lượt là 0,25; 0,50; 1,0; 2,0; 4,0 và 8,0 µg/mL

Đối với các loại cao có tính phân cực như cao ethyl acetate (EA), cao alcol/nước và cao alcol tổng, chọn mức độ nồng độ mẫu cao để pha với DPPH trong khoảng 50-1000 (µg/mL), riêng cao *n*-hexane không chứa các hợp chất polyphenol và flavonoid được thử nghiệm với ngưỡng nồng độ rộng hơn, từ 100; 200; 400; 800; 1600 và 3200 (µg/mL)

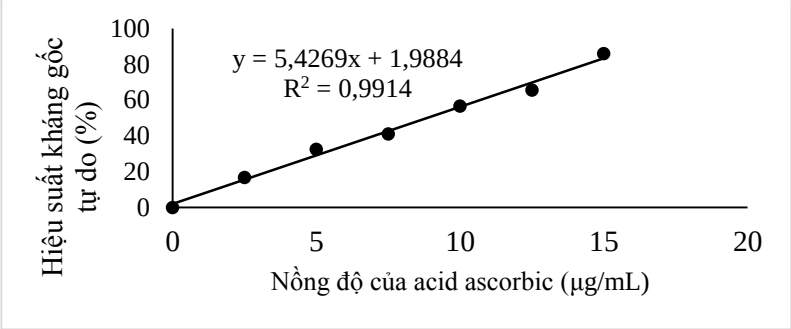
Trong phản ứng với DPPH, lượng gốc tự do giảm, nên mật độ quang (OD) của DPPH đo ở bước sóng 517 nm giảm. Tỷ lệ giá trị mật độ quang giảm khi tăng nồng độ acid ascorbic (hay các cao có hoạt tính trung hoà gốc tự do) thể hiện hiệu suất trung hòa gốc tự do của acid ascorbic (hay của các cao có hoạt tính trung hoà gốc tự do).

Đối với acid ascorbic, phương trình đường chuẩn hấp thụ quang $y = 5,4269x + 1,9884$ (với giá trị $R^2 = 0,9914$) được xây dựng từ đồ thị biểu thị hiệu suất trung hòa gốc tự do của acid ascorbic theo nồng độ. Trong thực nghiệm này, khả năng trung hòa 50% gốc tự do của acid ascorbic được thể hiện qua EC_{50} là 8,85 µg/mL.

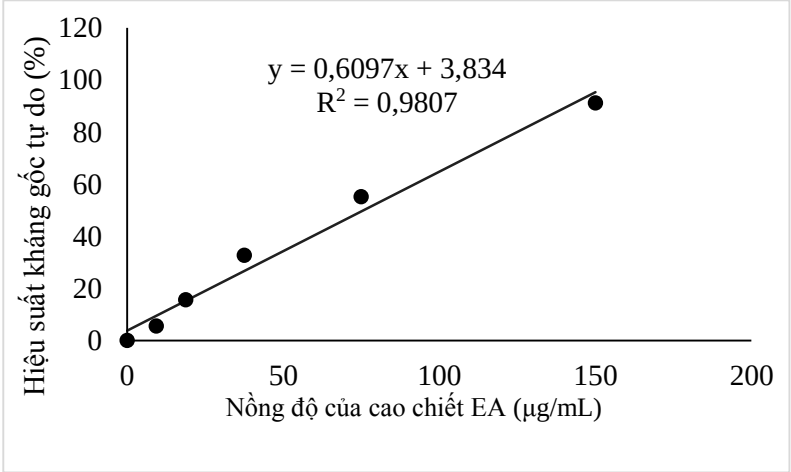
Các mẫu cao được lần lượt xây dựng đường chuẩn đánh giá hiệu suất trung hoà gốc tự do (loại trù gốc tự do). Ở đây chỉ đề cập cụ thể đường chuẩn xây dựng trên cơ sở thực nghiệm từ cao ethyl acetate và đánh giá, so sánh khả năng kháng oxy hoá của cao EA so với các cao còn lại.

Bảng 2. Số liệu độ hấp thụ quang của cao chiết EA

	Nồng độ cao EA sau khi thêm DPPH, (µg/mL)						
Độ hấp thụ quang	0	9,375	18,75	37,5	75	150	300
ABS lần 1	2,0954	1,9172	1,6949	1,3198	0,9668	0,1812	0,1381
ABS lần 2	2,1486	2,0456	1,7910	1,4491	0,9292	0,1874	0,1676
ABS lần 3	2,1217	2,0522	1,8871	1,5144	0,955	0,1931	0,1600
ABS trung bình	2,1219	2,0050	1,7910	1,4278	0,9503	0,1872	0,1552
Hiệu suất kháng gốc tự do (thải loại gốc tự do DPPH) (%)	0,0000	5,5092	15,5945	32,7128	55,2131	91,1761	92,6842



*Hình 2:*Đồ thị đường chuẩn acid ascorbic



*Hình 3:*Đồ thị đường chuẩn cao chiết EA

Phương trình đường chuẩn của cao EA: y=0,6097x+3,834, R^2=0,9807, và nồng độ trung hoà 50% gốc tự do của cao ethyl acetate là EC_{50}=75,72 µg/mL. Hiệu suất kháng oxy hóa của cao EA lá Thù lù thấp hơn đối chứng dương là acid ascorbic khoảng 9 lần**.**

Tương tự, xây dựng các đường chuẩn giá trị kháng DPPH với các mẫu cao khác và xác định nồng độ trung hoà 50% gốc tự do của các cao khác lần lượt là (EC_{50} µg/mL) của cao Hex là 1795,17; cao DC là 865,70; cao alcol/nước còn lại là 489,08. Qua đó cho thấy khả năng kháng gốc tự do DPPH của cao EA là tốt nhất trong các cao được thử nghiệm.

3.3 Kết quả quy trình thử nghiệm độc tính *in vitro* của các cao trên 5 dòng tế bào ung thư

Khảo sát hoạt tính gây độc bằng phương pháp Sulforhodamin B (SRB)

Các cao chiết được dung trong thử nghiệm chỉ gồm cao Hex, cao EA, cao alcol/nước và cao alcol tổng. Mẫu cao DC bị làm lạc mất.

Các dòng tế bào ung thư như A549, MCF-7, MDA-MB-231,KB và KB-VIN sau khi được nuôi cấy trong môi trường thích hợp để dùng trong thí nghiệm.Tế bào đơn được cấy trên đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 104 tế bào/giếng. Sau 24 giờ, quần thể tế bào tiếp tục được ủ với chất khảo sát ở các nồng độ khác nhautrong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch acid trichloroaceic 50% và nhuộm với dung dịch SRB 0,2%.

Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai bước sóng 492 nm và 620 nm.

Kết quả trung bình các lần thử nghiệm lặp lại nhằm đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư sau 72 giờ nuôi cấy, với mẫu thử là các cao pha trong DMSO ở nồng độ 20 µg/mL theo phương pháp SRB, được mô tả theo bảng 3 sau:

Bảng3. Phần trăm tế bào còn phát triển trong thử nghiệm ức chế tế bào ung thư

Mẫu thử	Nồng độ mẫu thử (µg/ml)	Dòng tế bào				
		A459	KB	MDA-MB-231	KB-VIN	MCF-7
Cao ethanol tổng	20	-13,0	4,8	2,8	2,9	4,7
Cao *n*- hexane	20	106,1	108,4	104,8	110,1	100,6
Cao ethyl acetate	20	4,8	2,3	6,0	48,6	33,9
Cao ethanol/nước còn lại	20	51,3	63,3	1,0	86,2	52,3
DMSO (dung môi pha mẫu)	20	100	100	100	100	100

Khi giá trị tỷ lệ tế bào phát triển càng nhỏ chứng tỏ cao chiết càng có độc tính trên dòng tế bào ung thư đem thử nghiệm. Qua thí nghiệm sơ bộ, nhận thấy các cao của cây Thù lù cạnh có hoạt tính ức chế tế bào ung thư rất tốt ($MIC_{cao\ chiết} < 100$ µg/ml).

Trong mức nồng độ của các mẫu cao là 20 µg/ml, nhận thấy cao alcol tổng thể hiện có độc tính với cả 5 dòng tế bào ung thư, nên khả năng ứng dụng cây Thù lù cạnh vào thực tế là rất khả thi. Cao ethyl acetate ức chế tốt các dòng gây ung thư phổi A459, biểu mô KB và ung thư vú di căn từ khối u phổi (MDA-MB-231) tốt hơn so với 2 dòng tế bào KB-VIN và MSF7. Cao alcol /nước lại đặc biệt ức chế có tính chon lọc với dòng tế bào ung thư vú do di căn, dòng MDA-MB-231, rõ hơn so với các dòng khác.

Từ bảng số liệu cho thấy cao ít phân cực không gây độc tế bào ung thư, số tế bào vẫn phát triển cũng như mẫu thử là dung môi DMSO. Thử nghiệm này dùng mẫu đối chứng dương là hoạt chất có khả năng diệt tế bào ung thư là ellipticine.

3.4 Kết quả thử độc tính cấp *in vivo* trên mẫu thành phẩm trà túi lọc

Qua các khâu kiểm tra đánh giá cảm quan trà có hương thơm dịu, không đắng và không chát, nước trà có màu vàng nhạt vì chế biến theo quy cách diệt men làm trà xanh. Trà túi lọc có khối lượng tịnh 2g, tiện dụng, có thể sử dụng ngay. Có thể sử dụng trà nhiều lần trên ngày tùy theo thể trạng, bệnh trạng.

Thử độc tính cấp của dược phẩm hay thực phẩm là xác định liều gây chết 50% động vật thí nghiệm sau khi dùng sản phẩm ấy trong điều kiện nhất định và được ký hiệu là LD_{50}

Cùng với sự xác định LD_{50}, việc theo dõi và báo cáo những biểu hiện ngộ độc, tiến triển phục hồi hoặc chết của động vật thí nghiệm trong thời gian theo dõi là rất quan trọng trong việc đánh giá kết quả của mẫu thử.

Động vật gặm nhấm như chuột nhắt thường được sử dụng trong các thử nghiệm về độc tính và tiến hành trên cả hai giới tỉ lệ 50% cho mỗi nhóm thử. Đối với chuột nhắt trắng, thể tích cho uống từ 0.2 - 0.5 mL/ chuột 20 g, như vậy thể tích uống trong thử nghiệm là phù hợp. Điều kiện chăn nuôi, dinh dưỡng không ảnh hưởng đến quá trình tăng trưởng bình thường của chuột thử nghiệm.

Phương pháp thử dựa trên việc thử nghiệm bằng đường uống ở các liều xác định theo quy trình các bước, kết quả thu được dùng để tính LD_{50} (nếu có), hoặc xác định LD_0 (liều cao nhất không gây độc tính) hoặc D_{max} (liều dung nạp tối đa không gây độc tính).

Liều dùng tối đa không gây độc tính D_{max}= 2 gói/kg thể trọng của chuột.

Ở liều 2 gói/Kg thể trọng chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* (gấp 50 lần liều dùng hàng ngày của người lớn tính theo thể trọng), chuột không chết (không thể tăng liều, do đó không xác định được LD_{50}).

4. KẾT LUẬN

Từ lá cây Thù lù cạnh - *Physalis angulata* L. thu tại Vĩnh Long, chiết xuất được các loại cao: alcol tổng, cao *n*-hexane, cao dichloromethane, cao ethyl acetate, cao ethanol-nước còn lại để dùng vào thử nghiệm đánh giá hoạt tính sinh học. Kết quả khảo sát khả năng kháng gốc tự do DPPH cho thấy cây Thù lù cạnh là loài dược liệu có khả năng kháng oxy hóa tốt, có hiệu quả thải loại gốc tự do, giúp chậm sự lão hoá.

Bên cạnh đó, các cao chiết trong thử nghiệm *in vitro* đều thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư phát triển. Cụ thể cao ethanol tổng và cao ethanol/nước còn lại đều ức chế rất tốt những dòng tế bào gây ung thư phổi, ung thư vú các loại và ung thư biểu mô. Cao ethyl acetate trong thử nghiệm không hiệu quả bằng, nhưng chính là phân đoạn mà các nghiên cứu trước đây công bố chứa nhiều physalin có độc tính với tế bào ung thư. Vậy việc sử dụng toàn cây hoặc chọn lọc lá cây chế biến thành trà uống có tác dụng nhất định đối với sức khoẻ.

Từ các kết quả trên, việc làm trà túi lọc nhằm đưa cây dược liệu Thù lù cạnh vào thực tế cuộc sống được thực hiện. Quá trình chế biến cho sản phẩm dạng gói trà túi lọc gồm lá cây Thù lù cạnh phối hợp với lá Cỏ ngọt theo tỷ lệ về khối lượng khô là 4:1. Liều độc tính cấp đã được đánh giá với liều dùng tối đa không gây độc tính là D_{max}=2 gói/kg. Các kết quả chế biến trà là bước đầu ứng dụng dược liệu Thù lù cạnh vào đời sống còn cần nhiều nghiên cứu tiếp thêm nữa.

***Lời cảm ơn**: Nhóm nghiên cứu trân trọng cảm ơn nguồn kinh phí NCKH Trường Đại học Cần thơ, đề tài sinh viên NCKH mã số TSV-2020-064. Chúng tôi trân trọng cảm ơn TS. Đặng Minh Quân, ThS. Từ Đức Dũng và Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh đã tận tình hỗ trợ nhóm nghiên cứu.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahid Sultana, M.A. Hassan, Montaz Begum and Mahbuba Sultana -*Physalis angulata* L. (Solanaceae)-A new angiospermic record for Bangladesh. Bangladesh Journal of Botanical, **37**(2) (2008) 195-198.

Bộ Y tế - Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Quyết định 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 về *"Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu"*.

Damu, A.G., Kuo, P.C., Su, C.R., Kuo, T.H., Chen, T.H., and Bastow, K.F.- Isolation, strutures, and strutures-cytotoxic activity relationships of Withanolides and

Physalin from *Physalis angulata* L. Journal of Natural Products, **70** (7) (2007) 1146-1152.

Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiển, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập và Trần Toàn. Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, Hà Nội, tập **2** (2006) trang 792-793.

Đỗ Trung Đàm -Phương pháp xác định độc tính của thuốc, NXB Y học, Hà Nội, (2014)tr. 15-157, 199-215.

Ping-Chung Kuo, Tsung-Hsiao Kuo, Amooru G. Damu, Chung-Ren Su, E-Jian Lee, Tian-Shung Wu, Rexen Shu,Chou-Ming Chen,Kenneth F. Bastow, Tzu-Hsuan Chen, and Kuo-Hsiung Lee - Physanolide A, a novel skeleton of steroid, and other cytotoxic principles from *Physalis angulata*. Organic letters, **8**(14) (2016) 2953-2956.

Sharma, O.P., Bhat, T.K. - DPPH antioxidant assay revisited, Food Chemistry, **113** (4) (2009) 1202-1205.

Tôn Nữ Liên Hương, Võ Hoàng Duy, Dương Mộng Hòa, Đỗ Duy Phúc, Nguyễn Duy Thanh. Chiết xuất Stevioside từ cây Cỏ ngọt, *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ, **36** (2015) 73–76.

Ton Nu Lien Huong, Ly Anh Van, Nguyen Duy Thanh, Nguyen Thi Thu Suong, Nguyen Hoang Phuong, Nguyen Dinh Cung Tien -Chemical constituents of *Physalis angulata* L. (Family Solanaceae). Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ, Tập**2** (tiếng Anh) (2016) 46-49

Ton Nu Lien Huong, Ly Anh Van, Nguyen Dinh Cung Tien, Nguyen Hoang Phuong, Nguyen Duy Thanh, - Study on chemical constituents of *Physalis angulata* L.. Journal of Science and Technlogy, **54** (2B) (2016) 32-37

Ton Nu Lien Huong, Nguyen Minh Thuy, Ma Huu Dat, Tran Khanh My, Phung Van Trung, Isolated five compounds: Physalin B, D, G, F and I from the ethyl acetate extract ò Physalis angulata L. (Solanaceae), Proceeding ò International workshop 2019 on track and science- technology development in the Mekong Delta in the context of international intergration, (2019) 560-567

NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO MÁY PHÁT ĐIỆN NANO MÔ PHỎNG VI CẤU TRÚC TỰ NHIÊN ỨNG DỤNG CẢM BIẾN DA NHÂN TẠO

Phạm Hoài Thanh Vy*, Trần Thị Yến Vy

Trường Đại học Bách Khoa - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: thanhvy.tvph@gmail.com

TÓM TẮT

Máy phát điện nano ma sát (Triboelectric Nanogenerator - TENG) là một trong những công nghệ hiệu quả nhất thu hồi năng lượng dao động cơ học (dao động, chuyển động, gió, dòng chảy, sóng biển ...vv) chuyển hóa thành điện năng cấp nguồn cho các thiết bị điện tử di động. Đặc biệt, TENG có thể hoạt động như một cảm biến tự cấp nguồn trong Internet vạn vật. Để sử dụng TENG làm nguồn cấp cho các thiết bị di động đeo tay (portable wearable electronics) hoặc ứng dụng làm cảm biến theo dõi sức khỏe cho con người thì TENG cần được chế tạo từ các vật liệu y sinh có khả năng tương thích sinh học tốt. Tuy nhiên, các vật liệu y sinh có nguồn gốc tự nhiên thường cho hiệu quả phát điện kém hơn so với các vật liệu tổng hợp. Do đó, chúng tôi tập trung phát triển thiết bị TENG có hiệu quả phát điện cao từ vật liệu y sinh (chitosan), quan trọng hơn, chúng tôi đã ứng dụng TENG hoạt động như một cảm biến da nhân tạo có khả năng theo dõi chuyển động và sức khỏe con người. Nghiên cứu này được lấy cảm hứng từ các cấu trúc sinh thực vật tự nhiên, có các tính chất đặc biệt tốt cho ứng dụng trong TENG. Cụ thể, chúng tôi đã phát triển một phương pháp mới, chế tạo bề mặt vật liệu ma sát mô phỏng vi cấu trúc giác bám dính của con nhái. TENG chế tạo từ vật liệu y sinh có bề mặt mô phỏng cấu trúc tự nhiên đã thể hiện hiệu quả phát điện rất cao, trong khi vẫn duy trì được tính thân thiện tương thích sinh học của vật liệu.

Từ khóa: *Triboelectric Nanogenerator - TENG, vật liệu y sinh.*

TỔNG QUAN

Internet vạn vật trong lĩnh vực khoa học sức khỏe đóng vai trò là một trong những trụ cột của CMCN 4.0, nó được xây dựng dựa trên sự kết nối một số lượng vô cùng lớn các cảm biến di động (wearable sensors) để thu thập một lượng lớn dữ liệu sức khỏe của người bệnh. Việc tăng lên nhanh chóng số lượng của các cảm biến và thiết bị điện tử di động kéo theo việc phải sử dụng một số lượng vô cùng lớn các nguồn cung cấp năng lượng cho chúng. Các nguồn cấp này phải có các đặc tính phù hợp như ***gọn nhẹ, mềm dẻo, dễ dàng tích hợp*** với các thiết bị điện tử di động. Công nghệ TENG dựa trên việc thu năng lượng cơ học chuyển hóa thành điện năng là một công nghệ mới, rất phù hợp để tích hợp với các thiết bị điện tử di động nhằm tạo nên các hệ thống điện tử tự cấp nguồn. Đặc biệt, TENG sử dụng cho các thiết bị điện tử đeo tay, cảm biến sức khỏe đòi hỏi phải được chế tạo từ các loại vật liệu thân thiện, tương thích sinh học.

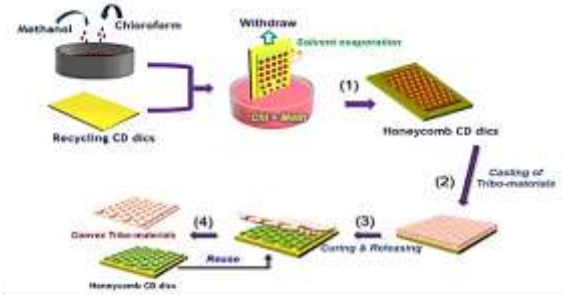
Chúng tôi được gợi cảm hứng từ các cấu trúc tự nhiên, đặc biệt các cấu trúc có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực TENG. Ví dụ như giác bám dính của con nhái giúp nó dễ dàng bám dính leo trèo trên nhiều các bề mặt khác nhau. Qua phân tích vi cấu trúc (**Hình 1**), giác bám dính được cấu thành từ các micro pattern hình lục giác, không ghép sát. Kết quả phân tích chỉ ra rằng, cấu trúc này tăng cường cả tính chất ma sát động và ma sát tĩnh của bề mặt tiếp xúc. Cấu trúc dạng này cũng đã được mô phỏng và ứng dụng trong sản xuất lốp xe [1].



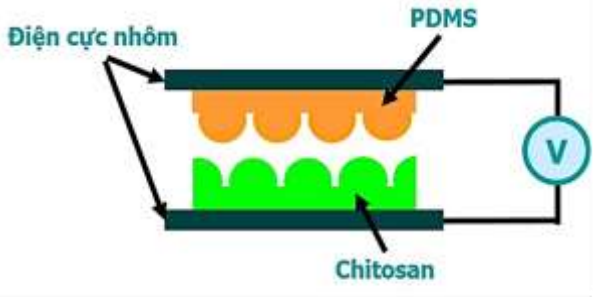
Hình 1. Vi cấu trúc giác bám dính của con nhái và ứng dụng trong sản xuất lốp xe [19].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới sử dụng tối đa các sản phẩm tái chế, hoặc có nguồn gốc từ phụ phẩm phế thải, nhằm mục đích ***giảm thiểu ô nhiễm rác thải nhựa, giảm ô nhiễm môi trường***.



Hình 2. Sơ đồ mô tả phương pháp chế tạo vật liệu ma sát cấu trúc lồi micro trật tự cao, mô phỏng vi cấu trúc giác bám dính của con nhái.



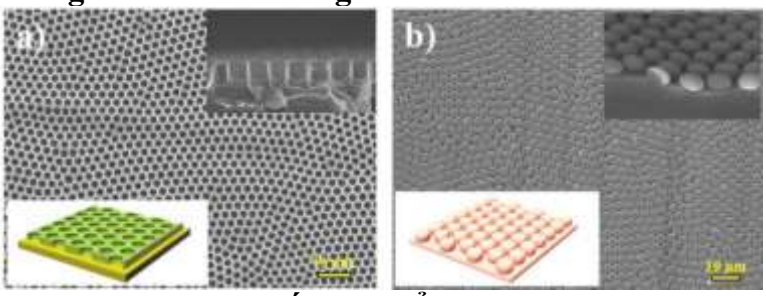
Hình 3. Hình minh họa cấu tạo của thiết bị TENG hoạt động ở chế độ tiếp xúc – tách rời (contact-separation mode).

Đầu tiên, chúng tôi chế tạo khuôn đúc vi cấu trúc dạng tổ ong (***honeycomb patterned mold***) sử dụng đĩa CD đã qua sử dụng. Đĩa CD được cấu tạo từ polycarbonate (PC). Cấu trúc tổ ong được tạo thành trên bề mặt đĩa CD bằng phương pháp phân pha nâng cao (IPS). Phương pháp này do nhóm chúng tôi tự phát triển và đã được cấp bằng sáng chế tại Mỹ [2]. Tiếp theo, màng mỏng ma sát tích điện dương (chitosan) và màng mỏng ma sát tích điện âm polydimethylsiloxane (PDMS) với cấu trúc bề mặt lồi trật tự cao, kích thước micro được chế tạo nhờ vào sử dụng khuôn đúc cấu trúc tổ ong. Các bước chế tạo được thể hiện qua các bước 2-4 trong **Hình 2**.

Máy phát điện nano được chế tạo từ màng chitosan và màng PDMS hoạt động ở chế độ tiếp xúc-tách rời (contact-separation mode) (**Hình 3**).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chế tạo màng chitosan và màng PDMS cấu trúc lồi micro

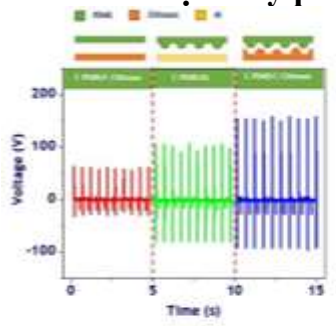


Hình 4. Ảnh SEM của khuôn có cấu trúc tổ ong (ordered honeycomb structure) và vật liệu ma sát có cấu trúc lồi (convex-patterned surface).

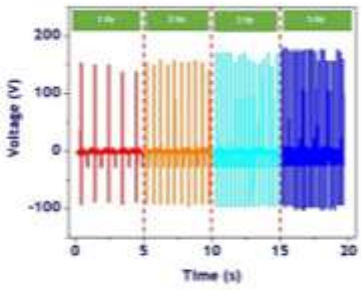
Hình 4 cho thấy cấu trúc tổ ong được tạo ra trên bề mặt đĩa CD có độ đồng đều và độ trật tự cao (Hình 4a). Đường kính lỗ xốp khoảng 2.7 µm. Ảnh SEM chụp bề mặt cắt ngang cấu trúc tổ ong cho thấy, cấu trúc xốp dạng đơn lớp và cấu trúc này chính là

1 phần của đế CD. Cấu trúc lồi của vật liệu ma sát được tạo thành bởi quá trình đúc sử dụng đế tổ ong làm khuôn, do đó cấu trúc lồi có dạng nghịch đảo của cấu trúc xốp. Ảnh SEM chụp bề mặt và mặt cắt ngang thấy rằng các cục u lồi lên có kích thước tương đương với kích thước lỗ xốp, và giữa các cục u này có khoảng cách (không ghép sát). Cấu trúc lồi này tương tự như vi cấu trúc giác bám dính của con nhái, giúp tăng cường tính chất ma sát động và ma sát tĩnh của bề mặt vật liệu ma sát.

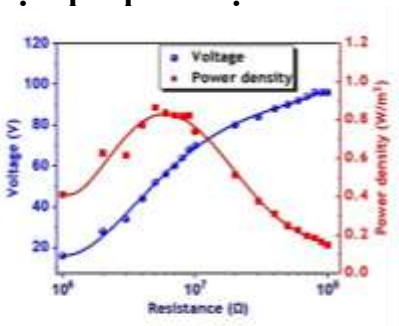
Chế tạo máy phát điện nano ma sát và khảo sát hiệu quả phát điện



Hình 5. Hiệu quả phát điện (V_{oc}) của thiết bị TENG sử dụng các bề mặt ma sát khác nhau.

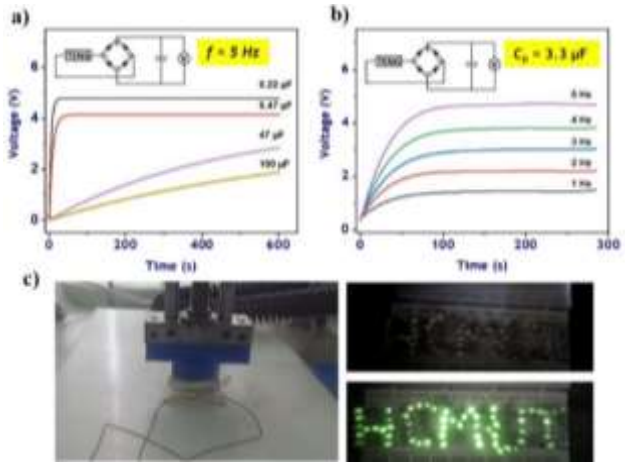


Hình 6. Ảnh hưởng của tần số lực tác động lên hiệu quả phát điện của thiết bị C-TENG.



Hình 7. Ảnh hưởng của tổng trở mạch ngoài đến công suất phát điện và điện thế đầu ra của thiết bị C-TENG.

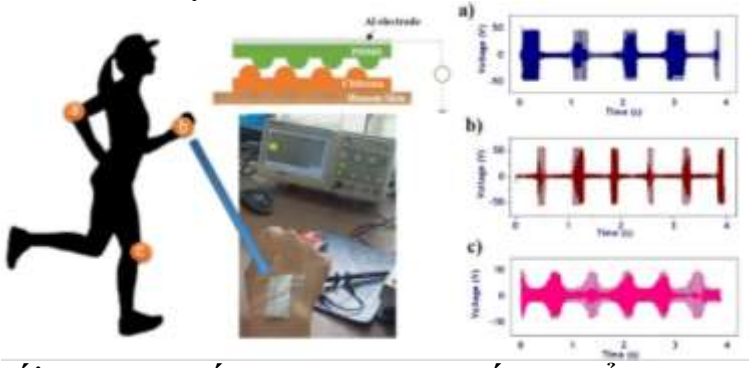
TENG được chế tạo từ vật liệu ma sát tích điện dương (chitosan) và vật liệu ma sát tích điện âm (PDMS) và hoạt động ở chế độ tiếp xúc – tách rời. Vật liệu ma sát có cấu trúc lồi (C-Chitosan và C-PDMS) được sử dụng để chế tạo TENG. Chitosan và PDMS với bề mặt phẳng nhẵn thông thường (F-Chitosan và F-PDMS) cũng được sử dụng để so sánh. **Hình 5** mô tả điện thế hở mạch đầu ra của các thiết bị TENG. TENG cấu tạo từ các bề mặt lồi cho hiệu quả phát điện cao hơn hẳn TENG chỉ sử dụng màng phẳng thông thường. Chúng tôi cũng sử dụng nhôm là vật liệu ma sát tích điện dương để so sánh với màng chitosan. Kết quả cho thấy rằng màng lồi chitosan chế tạo ra có hiệu quả cao hơn nhiều so với bề mặt nhôm thông thường. Qua các kết quả, có thể thấy rằng màng chitosan khi được chế tạo có cấu trúc lồi mô phỏng cấu trúc tự nhiên cho hiệu quả phát điện vượt trội trong khi vẫn duy trì được tính chất tương thích sinh học của nó. **Hình 6** cho thấy hiệu quả phát điện của TENG tăng chút ít với sự tăng của tần số lực tác động. Tuy nhiên ở các tần số trên 5 Hz, hiệu quả phát điện gần như không thay đổi. **Hình 7** mô tả quan hệ của điện thế và công suất của thiết bị TENG theo tổng trở mạch ngoài. Theo đó, điện thế mạch ngoài giảm khi điện trở mạch nhỏ và ngược lại. Qua tính toán sơ bộ, TENG chế tạo từ màng cấu trúc lồi có công suất phát điện cao hơn khoảng 9 lần so với thiết bị sử dụng màng phẳng nhẵn thông thường. Điều này đạt được dựa trên tính chất ma sát và ma sát - điện tuyệt vời của cấu trúc lồi mô phỏng cấu trúc tự nhiên.



Hình 8. Khả năng phát điện của thiết bị C-TENG. (a) Điện thế của tụ điện được cấp nguồn bởi C-TENG với các giá trị điện dung khác nhau; (b) Điện thế của tụ điện khi được tích điện bởi C-TENG hoạt động ở các tần số khác nhau; (c) Thiết bị TENG thu năng lượng dao động cơ học thắp sáng trực tiếp 58 đèn LED.

Để chứng tỏ khả năng cấp nguồn của thiết bị TENG, năng lượng điện từ TENG được tích cho tụ điện và được sử dụng trực tiếp để thắp sáng đèn LED. **Hình 8**a và b mô tả quá trình sạc điện cho tụ điện có các giá trị điện dung khác nhau. Ngoài ra, sử dụng TENG cấp nguồn trực tiếp thắp sáng cho 58 đèn LED. Từ kết quả thực nghiệm thấy rằng TENG sử dụng bề mặt cấu trúc lồi có kích thước 4.5 × 4.5 cm, có thể thắp sáng khoảng gần 1000 đèn LED.

Chế tạo cảm biến da nhân tạo



Hình 9. Ứng dụng thiết bị TENG cảm biến chuyển động của cơ thể. (a) TENG gắn ở khủy tay; (b) TENG gắn ở cổ tay; (c) TENG gắn ở đầu gối.

Hình 9 mô tả ứng dụng TENG làm cảm biến chuyển động của cơ thể. Chitosan là polymer y sinh có khả năng tương hợp sinh học rất tốt, do đó sử dụng chitosan làm vật liệu cảm biến sẽ không gặp các vấn đề về kích ứng da. Cảm biến được chế tạo từ hai lớp vật liệu lồi ghép sát, trong đó màng chitosan tiếp xúc trực tiếp với da còn 1 điện cực thu tín hiệu điện được gắn vào bề mặt lớp PDMS. Cảm biến được gắn vào cổ tay, khủy tay và đầu gối, các tín hiệu điện thu được tương ứng như trong **Hình 9** a, b, c. Kết quả chỉ ra rằng khi các khớp chuyển động thay đổi 1 góc nhất định sẽ tương ứng với 1 tín hiệu điện đầu ra. Hình dạng tín hiệu được đặc trưng bởi chuyển động. Ví dụ, độ lớn tín hiệu sẽ liên quan đến góc mở của khớp, trong khi khoảng cách tín hiệu cho ta biết độ nhanh chậm của chuyển động. Bằng việc gắn nhiều cảm biến ở các vị trí khác nhau trên cơ thể, chúng ta hoàn toàn có thể mô phỏng chuyển động của cơ thể dựa trên việc phân tích các tín hiệu điện đầu ra của từng cảm biến.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đã chế tạo thành công khuôn đúc vi mô cấu trúc tổ ong trật tự cao từ đĩa CD tái chế. Tiếp đó, đã chế tạo thành công vật liệu polyme y sinh có bề mặt mô phỏng cấu trúc giác bám dính của con nhái (cấu trúc lồi trật tự cao, các cục u kích thước khoảng 2.7 µm chiều cao 2 µm và không ghép sát) (nonclose-packed hexagonal micropattern) với các tính chất ma sát và ma sát-điện rất tuyệt vời. Đã chế tạo thành công thiết bị TENG có hiệu quả phát điện đầu ra cao như sau: điện thế đầu ra V_{oc}= 160, và mật độ công suất phát điện – power density 0.9 W/m^2. Đã chế tạo thành công cảm biến da nhân tạo từ vật liệu y sinh (chitosan và PDMS), có khả năng cảm biến chuyển động, theo dõi sức khỏe khi được gắn lên cơ thể người. Chúng tôi đề nghị tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện thêm các thiết kế của thiết bị TENG để có thể hoạt động ở nhiều chế độ khác nhau, đồng thời phát triển thêm các ứng dụng thực tế hữu ích cho xã hội

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Ivanović, A. Vencl, B. Stojanović, B. Marković, Biomimetics Design for Tribological Applications, Tribology in Industry 40 (2018) 448-456.

[2] Van-Tien Bui *et al.*, METHOD FOR PREPARING FREE-STANDING POLYMER FILM WITH MICROPORES, US 10,369,725 B2, 2020, United State.

NGHIÊN CỨU HÀNH TRÌNH KHỞI NGHIỆP TỪ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHOA HỌC ĐẾN KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO TRONG LĨNH VỰC CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nguyễn Thị Hồng Tâm
Trường Đại học Công Nghệ TP.HCM (HUTECH)
Tác giả liên lạc: hongtamm25092000@gmail.com

TÓM TẮT

Thời gian qua, hệ sinh thái khởi nghiệp đổi mới sáng tạo (KNĐMST) của Việt Nam từng bước được hình thành và phát triển, các chủ thể trong hệ sinh thái đã tham gia tương đối chủ động và tích cực. Hệ thống pháp lý thúc đẩy KNĐMST khá đầy đủ, hỗ trợ cho hoạt động của các doanh nghiệp trong lĩnh vực này. Giai đoạn tới, hệ sinh thái KNĐMST cần bứt phá, phát triển mạnh mẽ hơn nữa, nhằm huy động các nguồn lực từ khu vực nhà nước lẫn khu vực tư nhân, trong nước và nước ngoài, tăng cường liên kết và phối hợp hiệu quả giữa các chủ thể trong hệ sinh thái. Tìm kiếm sáng kiến, giải pháp để sớm hình thành mạng lưới không gian sáng tạo, cơ sở trợ giúp kỹ thuật, trung tâm kết nối nguồn lực và tư vấn, cung cấp dịch vụ cho ĐMST tại các cơ sở đào tạo.
Từ khóa: Hệ sinh thái khởi nghiệp đổi mới sáng tạo, kết nối nguồn lực, trợ giúp kỹ thuật, dịch vụ

I. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Giai đoạn 2016 - 2020 có thể xem là giai đoạn đầu phát triển hệ sinh thái khởi nghiệp ĐMST quốc gia, với sự ra đời của Đề án "Hỗ trợ hệ sinh thái khởi nghiệp đổi mới sáng tạo quốc gia đến năm 2025" (Đề án 844). Trong giai đoạn này, với vai trò chủ trì của Bộ KH&CN và sự tham gia tích cực của các bộ, ngành, địa phương, các tổ chức chính trị xã hội, hệ sinh thái khởi nghiệp ĐMST đã cơ bản được hình thành, các chủ thể trong hệ sinh thái đã tham gia một cách đầy đủ, toàn diện. Hệ thống pháp lý hỗ trợ, thúc đẩy khởi nghiệp ĐMST tương đối đầy đủ, hỗ trợ kịp thời các doanh nghiệp khởi nghiệp trên nền tảng nghiên cứu, ứng dụng các công nghệ mới, công nghệ tiên tiến, khai thác tài sản trí tuệ, mô hình kinh doanh mới.

Cho rằng Việt Nam trong thời kỳ dân số vàng, nguồn nhân lực dồi dào, dư địa tăng trưởng còn lớn, nếu áp dụng các thành tựu khoa học, công nghệ sẽ giúp tăng trưởng nhanh, bắt kịp với thế giới. Muốn vậy, cần có chính sách khuyến khích được sự sáng tạo, cống hiến nhiều hơn của người dân, thu hút người tài trong và ngoài nước, ai có năng lực đều có thể cống hiến và sáng tạo, khơi dậy khát vọng dân tộc, ý chí tự cường và phát huy sức mạnh của khối đại đoàn kết toàn dân tộc để xây dựng đất nước phát triển và thịnh vượng. Việt Nam hiện có hơn 1.400 tổ chức có năng lực hỗ trợ khởi nghiệp, trong đó có 196 khu làm việc chung, 69 vườn ươm doanh nghiệp và 28 tổ chức thúc đẩy kinh doanh. Số lượng quỹ đầu tư mạo hiểm coi Việt Nam là thị trường mục tiêu hoặc có hoạt động tại Việt Nam hiện nay là 108 quỹ. Trong đó, có 23 quỹ có pháp nhân Việt Nam, 23 quỹ thuần Việt. Các con số này liên tục tăng trong những năm qua thể hiện sự tham gia tích cực của hệ sinh thái.

Chương trình Khởi nghiệp quốc gia và các chương trình hỗ trợ doanh nghiệp nhỏ và vừa đang phát huy thế mạnh trong thúc đẩy khởi nghiệp, thu hút sự quan tâm, vào cuộc của cộng đồng khởi nghiệp trên cả nước và một số tổ chức quốc tế; quy tụ đội ngũ chuyên gia, cố vấn khởi nghiệp ĐMST hàng đầu tại Việt Nam để triển khai các hoạt động khởi nghiệp chuyên sâu và cao cấp. Tháng 4/2020, Hội đồng Cố vấn khởi nghiệp đã được thành lập, góp phần thực hiện hiệu quả hơn các mục tiêu của quốc gia. Khởi nghiệp và khởi nghiệp sáng tạo là động cơ chính để kinh tế đất nước phát

triển bền vững. Đó không chỉ là yêu cầu thành lập nhiều doanh nghiệp mới mà còn là yêu cầu làm mới với tất cả các doanh nghiệp đang tồn tại. Đặc biệt, khởi nghiệp sáng tạo là mệnh lệnh của kỷ nguyên số.

II. THỰC TRẠNG KHỞI NGHIỆP ĐỔI MỚI SÁNG TẠO NGÀY NAY

Theo đánh giá của các chuyên gia, hệ sinh thái KNĐMST của Việt Nam đang phát triển mạnh nhờ quy mô của nền kinh tế quốc gia ngày càng mở rộng. Năm 2020, thị trường tại Việt Nam được đánh giá là điểm đến an toàn, được các nhà đầu tư, các quỹ đầu tư lựa chọn. Trưởng đại diện Quỹ đầu tư Nhật Bản Genesia Ventures tại Việt Nam cho biết, các nhà đầu tư có sự tin tưởng rất lớn vào tiềm năng của hệ sinh thái KNĐMST của Việt Nam, kỳ vọng đây là thị trường tiềm năng ở châu Á, sau In-đô-nê-xi-a. Việt Nam có quy mô dân số trẻ, với lòng đam mê khởi nghiệp; số lượng doanh nghiệp KNĐMST (startup) nhiều, chất lượng đào tạo nhân lực tốt và có sự đồng hành rất lớn từ Chính phủ.

Thời gian qua, Bộ Khoa học và Công nghệ (KH và CN) đã triển khai nhiều chương trình, dự án là nền tảng để xây dựng hệ thống đổi mới sáng tạo quốc gia, như: Chương trình đối tác đổi mới sáng tạo Phần Lan - Việt Nam; Chương trình thương mại hóa kết quả nghiên cứu theo mô hình thung lũng Silicon tại Việt Nam. Đặc biệt, Đề án Hỗ trợ hệ sinh thái KNĐMST quốc gia đến năm 2025 (Đề án 844) đã tập trung nâng cao năng lực, tổ chức đào tạo, huấn luyện cho các chủ thể trong hệ sinh thái, đồng thời, phát triển hợp tác, liên kết, truyền thông. Kết quả đưa đến hình thành một thế hệ doanh nghiệp KNĐMST mới với việc phát triển các mô hình, giải pháp mới ứng dụng công nghệ 4.0 trong nhiều lĩnh vực, như: Abivin (giải pháp tối ưu hóa vận hành chuỗi cung ứng); Nami (phần mềm quản lý nhà cho thuê); Ekid (ứng dụng đồ chơi và giáo cụ thông minh); Medlink (giải pháp kết nối các nhà thuốc)… Đáng chú ý, có hai startup được định giá hơn một tỷ USD là Công ty cổ phần VNG (Vinagame), VNP và khoảng 10 startup được định giá hơn 100 triệu USD. Ngoài ra, có 61 quỹ đầu tư hoạt động ở Việt Nam, tăng 50% so với năm 2018; 57 cơ sở ươm tạo và 25 tổ chức có triển khai các chương trình thúc đẩy kinh doanh, tăng gấp từ ba đến bốn lần so với năm 2016; 170 khu cơ sở vật chất hỗ trợ khởi nghiệp...

III.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Huy động nguồn lực cho khởi nghiệp sáng tạo

Tập trung thảo luận về Chính sách xây dựng hệ sinh thái khởi nghiệp ĐMST; phát triển tiềm lực trong hệ sinh thái khởi nghiệp ĐMST quốc gia; đưa ra các giải pháp làm sao kết nối được các nguồn nhân lực để khởi nghiệp, từ đào tạo trong các trường đại học, cao đẳng, đến việc hình thành các trung tâm hỗ trợ khởi nghiệp tại các trường đại học, cao đẳng; việc kết nối với lực lượng sinh viên học sinh ở nước ngoài; tổ chức các diễn đàn tri thức, thu hút tri thức về Việt Nam; mạng lưới hỗ trợ khởi nghiệp ĐMST; các nguồn lực hỗ trợ khởi nghiệp ĐMST cũng như vấn đề gắn kết giữa ĐMST và sở hữu trí tuệ; thúc đẩy hợp tác giữa các nguồn lực, các tổ chức hỗ trợ khởi nghiệp ĐMST trong nước, quốc tế; tăng cường mối liên kết viện – trường – doanh nghiệp, thúc đẩy sự sáng tạo từ con người và vì con người. Các chuyên gia quốc tế cũng đã chia sẻ kinh nghiệm, cách thức để kết nối, thu hút mạng lưới tổ chức, cá nhân hỗ trợ khởi nghiệp ĐMST, hình thành tư duy ĐMST cho thế hệ trẻ, đặc biệt đội ngũ sinh viên các trường đại học, cơ sở giáo dục nghề nghiệp,… để thúc đẩy hệ thống ĐMST quốc gia, trở thành động lực để phát triển kinh tế - xã hội.

3.2 Hệ thống chính sách cho KNĐMST

Hệ thống chính sách cho KNĐMST cũng cần tiếp tục sửa đổi, bổ sung, tháo gỡ các rào cản, đồng thời, có những ưu đãi để khuyến khích đầu tư cho KNĐMST. Hiện

nay, các quỹ đầu tư thường được đặt ở nước ngoài và xu hướng các startup hoạt động tại Việt Nam nhưng thành lập tại Xin-ga-po để nhận vốn đầu tư. Đại diện Công ty cổ phần đầu tư Medlink cho biết, nhu cầu nói chung của các startup là nhận đầu tư giai đoạn tiền hạt giống (Pre-seed) và hạt giống (Seed). Ở các giai đoạn này, chủ yếu nhà đầu tư thiên thần đầu tư chứ không phải các quỹ, nhưng quy định lại yêu cầu các nhà đầu tư thiên thần phải có đại diện và mở tài khoản tại Việt Nam, thủ tục phức tạp, mất nhiều thời gian khiến nhà đầu tư ngại và nhiều startup phải đăng ký thành lập tại Xin-ga-po để nhận vốn đầu tư thuận lợi. Các startup đăng ký hoạt động ở nước ngoài hầu hết có chất lượng tốt, và nếu chính sách không cải thiện sẽ rơi vào tình trạng "chảy máu" startup.

Để huy động các nguồn lực nêu trên và tạo đột phá trong hỗ trợ và xây dựng hệ sinh thái KNĐMST cần hình thành những mô hình mới. Thí dụ, mô hình Trung tâm hỗ trợ KN ĐMST cung cấp dịch vụ công đặc thù cho startup, các trung tâm hỗ trợ KNĐMST tư nhân, vườn ươm, trường đại học. Mô hình kết hợp giữa các trường đại học, viện nghiên cứu với khu vực nhà nước và doanh nghiệp nhằm huy động và khai thác có hiệu quả sức mạnh nguồn nhân lực, tri thức, kết quả nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ trong khối cơ sở đào tạo, giáo dục nghề nghiệp. Mô hình xây dựng hệ sinh thái KNĐMST tại các tập đoàn nhằm khai thác hiệu quả nguồn lực chuyên gia, chuỗi cung ứng, đối tác của các tập đoàn hỗ trợ cho startup, đồng thời, là phương thức nâng cao khả năng cạnh tranh của tập đoàn trong bối cảnh mới. Vườn ươm công lập cần thiết cho lĩnh vực liên quan đến an ninh, quốc phòng hoặc công nghệ có ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng (vắc-xin, thuốc phòng, chống dịch bệnh), công nghệ bảo vệ môi trường (thiên tai, động đất, sóng thần...). Các giải pháp đồng bộ nêu trên chắc chắn sẽ tạo bước chuyển biến mạnh mẽ cho hệ sinh thái KNĐMST quốc gia.

Nhiều chuyên gia cho rằng, giai đoạn tới, hệ sinh thái KNĐMST cần phát triển hơn nữa để thật sự trở thành môi trường thuận lợi kiến tạo, nuôi dưỡng các ý tưởng và doanh nghiệp KNĐMST. Hiện, hệ sinh thái có sự tham gia mạnh mẽ từ khu vực tư nhân, nhất là của các chuyên gia, nhà đầu tư, người Việt Nam thành công ở nước ngoài, do đó cần thiết phải có một đầu mối thống nhất quản lý, đóng vai trò điều phối các nguồn lực, như công nghệ, con người, vốn đầu tư. Các sự kiện liên quan KNĐMST cần hướng tới phục vụ các mục tiêu, mục đích khác nhau, tránh trùng lặp, dàn trải. Vai trò của Nhà nước, Chính phủ và một đầu mối điều phối chung có tính quyết định trong việc hình thành và nuôi dưỡng sự phát triển lành mạnh của hệ sinh thái KNĐMST. Nhà nước cần tác động toàn diện tới các thành tố của hệ sinh thái, thúc đẩy mối liên kết, từ đó giúp hình thành lực lượng doanh nghiệp mạnh, làm đòn bẩy tăng trưởng kinh tế nhanh, chất lượng và bền vững

3.3 Hình thành và hỗ trợ phát triển Mạng lưới khởi nghiệp đổi mới sáng tạo quốc gia

Xây dựng, phát triển mạng lưới tổ chức, cá nhân khởi nghiệp đổi mới sáng tạo, đầu tư, chuyên gia, tổ chức tư vấn, huấn luyện, đào tạo, truyền thông, cung cấp dịch vụ cho khởi nghiệp đổi mới sáng tạo tại địa phương, vùng, quốc gia; tham gia với tư cách thành viên vào hoạt động của các mạng lưới ở phạm vi khu vực và thế giới, thu hút nguồn lực quốc tế hỗ trợ cho khởi nghiệp đổi mới sáng tạo trong nước.

Hoạt động hợp tác với chuyên gia, tổ chức quốc tế trong đào tạo, huấn luyện; truyền thông; tổ chức hội thảo khoa học, hội nghị, hành trình khởi nghiệp đổi mới sáng tạo trong nước và ngoài nước; tư vấn chuyển giao công nghệ, đầu tư, phát triển thị trường; nghiên cứu, khảo sát, báo cáo đánh giá, tư vấn hoàn thiện thể chế, chính sách

hỗ trợ khởi nghiệp đổi mới sáng tạo; mời chuyên gia, cố vấn, người Việt Nam thành công ở nước ngoài đến làm việc, tư vấn thường xuyên, cung cấp dịch vụ cho các khu dịch vụ tập trung hỗ trợ khởi nghiệp đổi mới sáng tạo ở phạm vi ngành, vùng, địa phương, cơ sở. Tổ chức hội nghị, hội thảo khoa học, Diễn đàn cấp cao Mạng lưới khởi nghiệp đổi mới sáng tạo hằng năm, ở quy mô quốc gia, quốc tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Harvard Business Review Press (2018): HBR - On Innovation - Đổi Mới Sáng Tạo, NXB Công Thương

Clayton M Christensen, Michael E Raynor (2018): Giải Pháp Cho Đổi Mới Và Sáng Tạo, NXB Thế Giới

Theo báo Nhân dân, 14.12.2020, Tạo đột phá cho hệ sinh thái khởi nghiệp đổi mới sáng tạo quốc gia

Theo báo Chính phủ, 9.2.2021, Phát triển đổi mới sáng tạo quốc gia

NGHIÊN CỨU MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA TÍNH CHẤT METHYL HÓA BẤT THƯỜNG GENE *ADMATS9* VÀ UNG THƯ VÒM HỌNG Ở NGƯỜI VIỆT NAM

Thiều Hồng Huệ[1], Nguyễn Hữu Dũng[2], Nguyễn Trọng Minh[3], Lao Đức Thuận[1], Lê Huyền Ái Thúy[1,*]

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Mở Tp.HCM

[2]Trường Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

[3]Bệnh viện Chợ Rẫy Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: thuy.lha@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Ung thư vòm họng là một trong những bệnh ung thư ác tính và phổ biến ở khu vực Châu Á đặc biệt là ở Trung Quốc và Việt Nam. Hiện tượng methyl hóa tại các đảo CpG đã được chứng minh là một trong những nguyên nhân gây nên ung thư. ADAMTS9 là một gene ức chế khối u định vị trên NST số 3 và có vai trò quan trọng trong quá trình apoptosis, ức chế sự tăng sinh tế bào và sự hình thành mạch máu ở UTVH. Tuy nhiên, hiện nay, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về sự methyl hóa bất thường của gene ADAMTS9 trên UTVH. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát mối tương quan giữa tính chất methyl hóa bất thường của gene ADAMTS9 và ung thư vòm họng ở người Việt Nam. Trong nghiên cứu, 93 mẫu sinh thiết vòm họng và 100 mẫu dịch phết lành thu nhận từ Bệnh viện Chợ Rẫy Tp.HCM được sử dụng để kiểm tra tính chất methyl hóa của gene mục tiêu bằng phương pháp MSP. Đồng thời, các công cụ tin sinh học như phần mềm Methprimer, Bio-edit… cũng đươc sử dụng nhằm tìm kiếm các đảo CpG và phân tích kết quả giải trình tự; và mối tương quan giữa tính chất methyl hóa bất thường gene ADAMTS9 và ung thư vòng họng sẽ được phân tích dựa trên phép toán Chi-square. Kết quả ghi nhận được sự methyl hóa của gene ADAMTS9 ở mẫu sinh thiết vòm họng và mẫu dịch phết lành lần lượt là 61,29% (57/93) và 19,00% (19/100). Đồng thời, kết quả cũng ghi nhận được mối tương quan rất chặt chẽ giữa sự methyl hóa bất thường gene ADAMTS9 và ung thư vòm họng ở người Việt Nam ($p < 0,0001$). Ở nhóm có sự methyl hóa của gene ADAMTS9 thì tỷ lệ mắc bệnh UTVH cao hơn gấp 6,75 lần so với nhóm không có sự methyl hóa gene ADAMTS9 (OR= 6,75). Tóm lại, nghiên cứu đã bước đầu cung cấp cơ sở dữ liệu về mối tương quan giữa tính chất methyl hóa bất thường gene ADAMTS9 và ung thư vòm họng người Việt Nam. Từ các dữ liệu phân tử này, chúng ta hướng đến xây dựng một dấu chứng sinh học cho việc sàng lọc và chẩn đoán sớm bệnh ung thư vòm họng ở Việt Nam.

Từ khóa: *methyl hóa, gene ADAMTS9, UTVH.*

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ GENE LIÊN QUAN ĐẾN CON ĐƯỜNG CHUYỂN HÓA CORDYCEPIN TRÊN LOÀI NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG CORDYCEPS MILITARIS.

Nguyễn Thanh Tùng[1], Võ Thanh Nhàn[1], Lê Thị Tuyết Trinh[1], Phạm Thị Phương Trinh[1], Trương Bình Nguyên[2], Lao Đức Thuận[1], Lê Huyền Ái Thúy[1]*

[1]*Trường Đại Học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh.*

Trường Đại Học Đà Lạt, Lâm Đồng

*Tác giả liên lạc: thuy.lha@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Cordycepin là một hợp chất sinh học quan trọng có tiềm năng ứng dụng to lớn trong y dược do có tác dụng điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống oxy hóa. Cordycepin được cô lập lần đầu tiên từ dịch chiết của loài cordyceps militaris, nhưng các cơ chế phân tử liên quan đến quá trình hình thành cordycepin vẫn chưa được rõ ràng. Trong nghiên cứu này chúng tôi thực hiện phân tích sự hiện diện và biểu hiện của một số gene có liên quan mật thiết đến con đường sinh tổng hợp cordycepin trên cordyceps militaris. Từ đó, hướng tới làm một dấu chứng sinh học để đánh giá các loài nấm ký sinh côn trùng nói chung có tiềm năng sản xuất cordycepin phục vụ cho y học. Mẫu cordyceps militaris được thu nhận từ vườn quốc gia sau đó được tách chiết RNA tổng số từ quả thể nấm và từ đó thực hiện phản ứng nhân bản và phân tích sự biểu hiện của các gene bao gồm: 5'-nucleotidase, Saicar synthase, adenylosuccinate – synthetase bằng phương pháp Real time PCR và thu nhận trình tự bằng phương pháp giải trình tự sanger. Kết quả nghiên cứu cho thấy các gene 5'-nucleotidase, Saicar synthase, adenylosuccinate – synthetase đều có sự biểu hiện trên mẫu cordyceps militaris. Cụ thể là gene 5'-nucleotidase, Saicar synthase, adenylosuccinate – synthetase lần lượt ghi nhận biểu hiện ở chu kỳ 24,98, 23,65 và 27,24. Kết quả phân tích cho thấy các gene trên đều có sự hiện diện và biểu hiện liên quan đến quá trình sinh tổng hợp cordycepin. Từ đó cho thấy các gene trên đều là những gene tiềm năng có khả năng tác động đến sự chuyển hóa cordycepin trên cordycep militaris thông qua sự tác động và ảnh hưởng của các gene kể trên.

Key word: *Cordyceps militaris, cordycepin, 5'-nucleotidase, Saicar synthase, IMP cyclohydrolase, adenosine deaminase, adenylosuccinate – lyase, adenylosuccinate – synthetase*

NGHIÊN CỨU PHẢN ỨNG CHỨC NĂNG VÀ PHẢN ỨNG SỐ LƯỢNG CỦA BỌ MẮT TO *Geocoris ochropterus* (LYGAEIDAE, HEMIPTERA)

Lê Thụy Tố Như[1], Nguyễn Thị Mỹ Hằng[1], Nguyễn Thị Thu Ngân[1], Nguyễn Quốc Thanh[1],Nguyễn Ngọc Bảo Châu[1, *]

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

* Tác giả liên lạc: chau.nnb@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Bọ xít mắt to Geocoris ochropterus thuộc họ Lygaeidae, bộ Hemiptera, là loài côn trùng nhỏ thuộc kiểu biến thái không hoàn toàn, có ở nhiều nơi trên thế giới. Chúng là loài côn trùng nhận được nhiều sự quan tâm, nghiên cứu ở Florida và các nơi khác bởi lợi ích mà loài thiên địch này mang lại cho cây trồng (Mead, 2001). Bọ mắt to là loài có phổ ăn mồi rất rộng (Ricardo Ramirez, 2011), kiểm soát sinh học hiệu quả, giúp duy trì quần thể dịch hại dưới ngưỡng thiệt hại (Funderbuck, 2003). Bọ mắt to sinh trưởng và phát triển trong các đám cỏ, bụi hoa dại, bụi rậm. Thành trùng cái bọ mắt to đẻ trứng trên lá, chồi của cây chủ. Việc ứng dụng bọ mắt to trong phòng trừ sinh học sâu hại trong thời gian lâu dài là hết sức cần thiết. Vì vậy, trong bài báo ngắn này chúng tôi có một số thảo luận về ảnh hưởng của các loài hoa đến đời sống của bọ mắt to và nghiên cứu khả năng ăn mồi của bọ mắt to qua hai thí nghiệm phản ứng chức năng và phản ứng số lượng. Các loài hoa khác nhau có ảnh hưởng đến hiệu suất tiêu diệt rầy mềm, ở nghiệm thức hoa cúc nhám và hoa dừa kem có hiệu suất tiêu diệt rầy mềm tương đương và cao hơn so với nghiệm thức hoa sao nhái. Nguồn thức ăn từ hoa cũng tác động đến tuổi thọ của bọ mắt to và cũng như số trứng đẻ, tuổi thọ của con cái và số trứng đẻ ở nghiệm thức hoa cúc nhám và hoa dừa kem là như nhau, thấp nhất là nghiệm thức hoa sao nhái, tuổi thọ của con đực ở nghiệm thức hoa cúc nhám cao hơn so với nghiệm thức hoa dừa kem và thấp nhất là nghiệm thức hoa sao nhái. Hoa cúc nhám và hoa dừa kem kết hợp với nguồn thức ăn tự nhiên như rầy mềm thích hợp để sử dụng nhân nuôi thiên địch bọ mắt to ngoài tự nhiên và áp dụng vào các mô hình canh tác hữu cơ một cách hiệu quả. Về mặt tự nhiên, côn trùng gây hại là nguồn thức ăn chính cho bọ mắt to thông qua hoạt động chích hút (dịch). Thông thường để hoàn thành chu kỳ sống, mỗi cá thể bọ mắt to phải giết rất nhiều loài gây hại. Qua phản ứng chức năng, các tính toán của phương trình cùng hồi quy tuyến tính có thể thấy được bọ mắt to trưởng thành tiêu diệt rầy mềm trên vùng diện tích 1,843920 m² và trong thời gian 0,0096 giờ (0,5 phút). Phản ứng số lượng qua hệ số tương quan R > 0 cho thấy số lượng bọ mắt to càng tăng thì số rầy mềm bị tiêu diệt càng tăng và ngược lại.

Từ khóa: *bọ mắt to, Geocoris ochropterus, thiên địch.*

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHẾ BIẾN TRÀ TÚI LỌC TỪ LÁ TÍA TÔ (*Perilla frutescens* L.)

Nguyễn Duy Khánh*, Trương Quốc Tất
Khoa Nông nghiệp và Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Tiền Giang
*Tác giả liên lạc: duykhanh.tgu98@gmail.com

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng quy trình công nghệ để chế biến sản phẩm trà thảo mộc tía tô túi lọc chứa nhiều hoạt chất sinh học có tác dụng tốt cho sức khỏe. Nghiên cứu đã được thực hiện trên cơ sở đánh giá một số yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm trà thảo mộc túi lọc gồm chế độ sấy nguyên liệu để bất hoạt enzyme polyphenol oxydase (PPO) và peroxydase (POD) và tỷ lệ phối trộn (%) tía tô : trà xanh : cỏ ngọt : gừng. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy chế độ sấy tối ưu để làm khô nguyên liệu lá tía tô là sấy ở 80℃ trong 15 phút để bất hoạt enzyme PPO và POD rồi tiếp tục sấy ở 50℃ cho đến khi độ ẩm lá tía tô đạt ≤ 10%; tỷ lệ phối trộn (%) các thành phần lá tía tô : trà xanh : cỏ ngọt : gừng là 60 : 25 : 10 : 5 tạo ra sản phẩm có giá trị cảm quan cao và đạt các yêu cầu chất lượng theo TCVN 7975:2008 về các sản phẩm trà thảo mộc túi lọc.

Từ khóa: Anthocyanin, polyphenol, tannin, tía tô, trà thảo mộc

THE RESEARCH ON THE PROCESS OF PRODUCING TEA BAGS FROM PERILLA LEAVES (*Perilla frutescens* L.)

Nguyen Duy Khanh*, Truong Quoc Tat
The Faculty of Agriculture and Food Technology - Tien Giang University
*Corresponding author: duykhanh.tgu@98gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study is to develop a technological process for producing perilla tea bags containing many biological active ingredients with beneficial effects on health. The study was conducted on the basis of evaluating a number of factors affecting the quality of herbal tea bags, including the raw material drying to inactivate enzymes polyphenol oxidase (PPO) and peroxydase (POD) and the mixing ratio (%) perilla: green tea: sweet grass: ginger. The results have shown that the optimal drying mode for drying perilla leaves is drying at 80℃ for 15 minutes to inactivate PPO and POD enzymes and then continuing to dry at 50℃ until perilla leaves moisture content reaches ≤ 10% and the mixing ratio (%) of the perilla leaves : green tea : sweet grass: ginger is 60: 25: 10: 5 to create products with high sensory value and meet the quality requirements according to TCVN 7975: 2008 about herbal tea bags.

Key words: Anthocyanin, herbal tea, polyphenol, tannin, Perilla frutescens (L.).

TỔNG QUAN

Cây tía tô (*Perilla frutescens* L.) là một loại rau thơm quen thuộc và phổ biến ở nước ta và một số quốc gia Châu Á. Bên cạnh đó, cây tía tô còn là một vị thuốc trong y học cổ truyền, thường dùng để trị các bệnh như cảm, ho, viêm họng, bệnh về phổi, lỵ, viêm ruột, nhiễm trùng đường tiết niệu, bí tiểu tiện, đau răng và nấm da,... Các nghiên cứu gần đây cho thấy cây tía tô chứa nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học và khả năng chống oxy hóa cao điển hình là nhóm polyphenols. Hiện nay, các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học của nhóm polyphenols như tannin và anthocyanin đang được nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước quan tâm nghiên cứu vì có nhiều tác dụng tích cực đối với sức khỏe con người như: chống oxi hóa mạnh, chống suy nhược thần kinh, kháng khuẩn, điều hòa lượng cholesterol trong máu, phòng và chữa bệnh tiểu đường (Lê Ngọc Tú và ctv, 2002). Với mong muốn nâng cao giá trị cho cây

tía tô tại địa phương thông qua việc sử dụng nguồn nguyên liệu này chế biến thành các sản phẩm chức năng, nên đề tài *"Nghiên cứu quy trình chế biến trà túi lọc từ lá tía tô (Perilla frutescens* L.)*"* đã được thực hiện.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Mẫu: Tía tô tươi (*Perilla frutescens* L.) được thu mua trực tiếp từ rẫy của các hộ nông dân ở xã Thân Cửu Nghĩa, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang. Lá tía tô được rửa sạch, để ráo và sấy khô ở 50℃ đến khi đạt độ ẩm ≤ 10%. Sau đó, lá tía tô được xay thành bột mịn, cho túi zip PA và bảo quản ở tủ đông -20℃ (Trương Quốc Tất và Nguyễn Duy Khánh, 2020).



Hình 1. Tía tô nguyên liệu

Hóa chất: thuốc thử Folin-Ciocalteu, Folin-Denis, gallic acid, tannic acid (Merck) và một số hóa chất thí nghiệm thông dụng (Trung Quốc).

Phương pháp phân tích

Xác định độ ẩm

Cân 5 g lá tía tô với sai số không vượt quá 0,001 g cho vào chén cân đã được sấy cùng với nắp đến khối lượng không đổi, cho chén cân và nắp vào tủ nâng nhiệt độ lên 105℃ và sấy đến khối lượng không đổi. Hàm ẩm trong mẫu được xác định dựa trên độ chênh lệch khối lượng của mẫu trước và sau khi nung.

$$X = \frac{G1-G2}{G1-G} \times 100$$

Trong đó: X là hàm lượng ẩm của mẫu (%), G là khối lượng cốc (g), G_1 là khối lượng cốc và mẫu trước khi sấy (g), G_2 là khối lượng cốc và mẫu sau khi sấy (g).

Phương pháp trích ly

Bột lá tía tô sấy khô đã nghiền mịn được cân chính xác 1 g cho vào bình tam giác thủy tinh 100 mL, thêm 25 mL nước cất và tiến hành đun cách thủy trong 15 phút. Tiếp theo, hỗn hợp sau khi đun được lọc qua giấy lọc Whatman's No.1 và định mức lên 50 mL (dung dịch 1), 10 mL dung dịch 1 được định mức lên 100 mL bằng nước cất và thực hiện phân tích các chỉ tiêu (Nguyễn Thị Ngọc Trâm và ctv, 2014).

Định tính một số hợp chất tự nhiên

Phương pháp định tính được thực hiện theo mô tả của Sofowora *et al.,* (1993) và Tiwari *et al.,* (2011) có hiệu chỉnh. Dịch trích lá tía tô với dung môi nước được định tính với các hóa chất và thuốc thử, các bước thực hiện như Bảng 1.

Bảng 1. Các phương pháp định tính một số hợp chất tự nhiên

Hợp chất	Thực hiện phản ứng định tính	Hiện tượng
Phenolic và tannin	1 mL dịch chiết + 2 -3 giọt $FeCl_3$ 5%	Tủa màu xanh đen
Anthocyanin	1 mL dịch chiết + vài giọt HCl 0,1 M + vài giọt NaOH 10%	Chuyển màu từ đỏ sang không màu
Flavonoid	1 mL dịch chiết + 2-3 giọt $Pb(CH_3COO)_2$ 10%	Tủa màu vàng
Quione	1 mL dịch chiết + 3-4 giọt HCl 0,1 M	Chuyển màu đỏ
Coumarin	1 mL dịch chiết + 3 - 4 giọt NaOH 10%	Chuyển màu vàng
Streroid	1 mL dịch chiết + 10 mL $CHCl_3$ + 2-3 giọt $H_2SO_{4đđ}$	Chuyển màu đỏ gạch hoặc xanh lá
Saponin	1 mL dịch chiết + vài giọt dầu oliu + đun nóng 90℃.	Nhũ tương màu sữa

Xác định hàm lượng polyphenol tổng số (TPP)

Hàm lượng polyphenol tổng số được xác định theo phương pháp Folin-Ciocalteau. Dung dịch gallic acid nồng độ 0, 20, 40, 60, 80 và 100 µg/mL lần lượt được hút 1 mL vào các ống nghiệm, tiếp theo cho vào mỗi ống nghiệm 2,5 mL thuốc thử Folin-Ciocalteu 10% và để phản ứng trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 2 mL dung dịch Na_2CO_3 2%. Hỗn hợp được để yên trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 60 phút và xác định độ hấp thụ OD bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 765 nm. Giá trị OD được ghi nhận để vẽ đường chuẩn được sử dụng cho việc xác định hàm lượng polyphenol tổng số trong các mẫu dịch trích. Các mẫu dịch trích được tiến hành tương tự với polyphenol chuẩn. Hàm lượng polyphenol tổng số được tính theo công thức:

$$P = \frac{a \times V \times K}{1000 \times m \times (1 - w)}$$

Trong đó: P là hàm lượng polyphenol tổng số (mgGAE/g DM) với DM: Dry Material; a là giá trị x từ đường chuẩn với gallic acid (µgGAE/mL); V là thể tích dung dịch trích (mL); m là khối lượng bột lá tía tô (g); w là độ ẩm của bột lá tía tô; K là độ pha loãng (Yadav and Agarwala, 2011).

Xác định hàm lượng tannin

Hàm lượng tannin được xác định theo phương pháp Folin-Denis. Dung dịch tannic acid nồng độ 0, 20, 40, 60, 80 và 100 (µg/mL) lần lượt được hút 1 mL vào các ống nghiệm, tiếp theo thêm vào ống nghiệm 0,5 mL nước cất và 0,5 mL thuốc thử Folin-Denis. Sau đó, thêm tiếp 2 mL dung dịch Na_2CO_3 20% lắc đều, làm ấm bằng bể nước sôi trong 1 phút và làm nguội. Đo độ hấp thụ của phức màu ở bước sóng 700 nm. Giá trị OD được ghi nhận để vẽ đường chuẩn được sử dụng cho việc xác định hàm lượng tannin trong các mẫu dịch chiết. Các mẫu dịch chiết được tiến hành tương tự với tannic acid chuẩn. Hàm lượng tannin được tính theo công thức:

$$T = \frac{a \times V \times K}{1000 \times m \times (1 - w)}$$

Trong đó: T là hàm lượng tannin tổng (mgTAE/g DM); a là giá trị x từ đường chuẩn với tannic acid (µgTAE/mL); V là thể tích dung dịch trích (mL); m là khối lượng bột lá tía tô (g); w là độ ẩm của bột lá tía tô; K là độ pha loãng (Laitonjam *et al.*, 2013).

Xác định hàm lượng hợp chất màu anthocyanin

Hàm lượng anthocyanin được xác định bằng phương pháp pH vi sai. Các mẫu dịch trích lá tía tô được pha loãng trong các dung dịch đệm (pH 1,0 và pH 4,5) với tỷ lệ 1:3 và xác định bước sóng có độ hấp thụ cực đại tại pH 1,0 (mỗi nguyên liệu chứa anthocyanin sẽ cho 1 bước sóng có độ hấp thụ cực đại khác nhau). Mẫu dịch trích lá tía tô có độ hấp thụ cực đại tại bước sóng λ = 515 nm. Sau đó, đo độ hấp thụ OD của dịch trích lá tía tô tại bước sóng 515 nm và 700 nm. Hàm lượng anthocyanin được tính theo công thức:

$$A = \frac{A \times M \times K \times V}{\mathcal{E} \times m \times (1 - w)}$$

Trong đó: a là lượng anthocyanin (µgCE/g DM); $A = (A_{\lambda max.pH=1} - A_{700nm.pH=1})$ - $(A_{\lambda max.pH=4,5} - A_{700nm.pH=4,5})$, với $A_{\lambda max}$, A_{700nm} là độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700 nm ở pH = 1 và pH = 4,5; M là khối lượng phân tử của anthocyanin (449,2); V là thể tích dịch chiết (mL); m là khối lượng bột lá tía tô (g), w là độ ẩm của bột lá tía tô, K là độ pha loãng, ε là Hệ số hấp thụ phân tử (ε = 26.900 L mol^{-1} cm^{-1}) (Lee *et al.*, 2005).

Đánh giá cảm quan

Các mẫu trà thí nghiệm đã được đánh giá cảm quan bằng phương pháp cho điểm dựa theo bảng mô tả đã được xây dựng trên cơ sở yêu cầu chất lượng của TCVN 7975:2008 về các sản phẩm trà thảo mộc túi lọc.

Xử lý và phân tích số liệu

Số liệu đã được nhập bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm Minitab 16.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân tích độ ẩm và định tính một số hợp chất tự nhiên có trong lá tía tô

Qua kết quả phân tích độ ẩm và định tính ở bảng 2 cho thấy trong lá tía tô có hàm ẩm rất cao (86,74%) và chứa đa dạng các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học. Trong đó, hợp chất tự nhiên đặc trưng của cây tía tô 2 màu là nhóm polyphenols với hàm lượng polyphenol tổng là 34,80 (mgGAE/g DM); tannin là 27,91 (mgTAE/g DM) và anthocyanin là 40,87 (mgCE/100g DM). Với sự đa dạng các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học nên lá tía tô là nguyên liệu rất tốt để chế biến thành sản phẩm trà có chứa các hoạt chất sinh học có tác dụng tốt đối với sức khỏe người tiêu dùng.

Bảng 2. Kết quả định tính một số hợp chất tự nhiên

Hợp chất	Phenolic và tannin	Anthocyanin	Flavonoid	Quione	Coumarin	Streroid	Saponin
Kết quả	+	+	+	+	+	+	+

**Ghi chú: (+) dương tính*

Ảnh hưởng của chế độ sấy để bất hoạt enzyme polyphenol oxydase (PPO) và peroxydase (POD) đến chất lượng sản phẩm trà

Kết quả hàm lượng polyphenol tổng và màu tổng của dịch trà được xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD bằng các phương pháp cho thấy 2 phương pháp bất hoạt enzyme PPO và POD được khảo sát đều có hiệu quả trong việc hạn chế sự tổn thất hàm lượng hợp chất polyphenol và tannin trong quá trình sấy lá tía tô, trong đó phương pháp xử

lý bằng vi sóng trong 25 giây có hiệu quả nhất với việc cải thiện 18,45% hàm lượng polyphenol so với mẫu đối chứng (Bảng 3 và Hình 2).

Bảng 3. Hàm lượng hợp chất polyphenol, tannin và màu của dịch trích lá tía tô khô được xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD

Phương pháp bất hoạt enzyme	Polyphenol (mgGAE/g DM)(1)	Tannin (mgTAE/g DM)(2)	Màu tổng
Đối chứng	16,09±0,59^{c}	8,05±0,81^{b}	0,95±0,03^{a}
Sấy ở 80℃ trong 15 phút	17,67±0,76^{b}	9,64±0,59^{ab}	0,49±0,02^{b}
Xử lý bằng vi sóng	19,07±0,58^{a}	10,46±0,86^{a}	0,42±0,02^{c}

**Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.*



Hình 2. Xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD

Bên cạnh đó, phương pháp xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD cũng có ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan của dịch trà tía tô. Kết quả đánh giá cảm quan dịch trà tía tô được xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD bằng 2 phương pháp được thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4. Điểm đánh giá cảm quan dịch trà tía tô được xử lý bất hoạt enzyme

Phương pháp bất hoạt enzyme PPO và POD	Màu	Mùi	Tổng điểm
Đối chứng	2,89±0,33^{b}	3,56±0,53^{b}	12,29
Sấy ở 80℃ trong 15 phút	4,22±0,83^{a}	4,33±0,50^{a}	17,10
Xử lý vi sóng	4,11±0,33^{a}	2,78±0,44^{c}	13,78
Hệ số quan trọng	2,00	2,00	

**Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.*

Qua Bảng 4 cho thấy, hai phương pháp bất hoạt enzyme có ảnh hưởng rất lớn đến giá trị cảm quan của dịch trà tía tô (màu và mùi). Mẫu dịch trà tía tô đối chứng được sấy ở 50℃ giữ được mùi đặc trưng của tía tô nhưng màu của nước pha sậm, có điểm cảm quan kém hơn 2 mẫu được xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD. Hai mẫu được xử lý bất hoạt enzyme cho mẫu dịch trà có màu sắc tươi sáng, điểm cảm quan cao ở chỉ tiêu màu khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Nhưng mùi đặc trưng của tía tô ở cả 2 mẫu

này giảm nhiều so với mẫu đối chứng, tạo cảm quan tốt hơn cho sản phẩm trà khi giảm mùi nồng của lá tía tô. Điều này cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Trâm và ctv (2014). Theo nhóm tác giả này việc xử lý bất hoạt enzyme PPO và POD trong lá trà xanh bằng cách xử lý vi sóng trong 25 giây có tác dụng tích cực trong việc bất hoạt hai enzyme này. Nó được biểu hiện thông qua sự khác nhau về hàm lượng polyphenol tổng, theaflavin và màu tổng. Hàm lượng polyphenol cao hơn, trong khi hàm lượng theaflavin thấp hơn mẫu đối chứng và dịch trích có màu vàng sáng giống với màu của trà xanh khi không còn tác động của 2 enzyme PPO và POD. Mặt khác, hàm lượng thearubigin như nhau, hàm lượng theaflavin khác nhau sẽ cho dịch trích có màu khác nhau hay nói cách khác, hàm lượng theaflavin ảnh hưởng mạnh mẽ đến màu sắc của dịch trà.

Mặc dù, phương pháp sấy lá tía tô ở 80℃ trong 15 phút cải thiện hàm lượng polyphenols trong lá tô thấp hơn phương pháp xử lý bằng vi sóng trong 25 giây. Nhưng do hiệu quả kinh tế và sự lựa chọn của cảm quan viên nên phương pháp sấy lá tía tô ở 80℃ trong 15 phút được chọn làm chế độ bất hoạt enzyme PPO và POD sau đó tiếp tục sấy ở 50℃ cho đến khi độ ẩm đạt ≤ 10% làm nguyên liệu cho các thí nghiệm sau.

Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn tía tô với cỏ ngọt đến chất lượng sản phẩm trà

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ phối trộn tía tô với cỏ ngọt có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng các hợp chất sinh học: polyphenol, tannin và anthocyanin trong sản phẩm (Bảng 5).

Bảng 5. Hàm lượng các hợp chất sinh học trong các mẫu trà được phối trộn từ các tỷ lệ tía tô với cỏ ngọt khác nhau

Tỷ lệ tía tô với cỏ ngọt (%)	Polyphenol (mgGAE/g DM)(1)	Tannin (mgTAE/g DM)(2)	Anthocyanin (mgCE/100g DM)
70 : 0	30,30±0,46^{a}	24,18±0,98^{a}	33,28±1,09^{a}
65 : 5	26,87±0,41^{b}	21,60±0,56^{b}	30,58±0,47^{b}
60 : 10	24,54±0,48^{c}	19,57±0,47^{c}	27,02±0,57^{c}
55 : 15	23,56±0,31^{cd}	18,75±0,28^{cd}	25,21±0,61^{c}
50 : 20	23,09±0,29^{d}	17,92±0,48^{d}	21,32±1,22^{d}

**Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.*

Bên cạnh đó, kết quả điểm cảm quan của các mẫu dịch trà (Bảng 6) cho thấy tỷ lệ cỏ ngọt bổ sung với lượng là 10% sẽ cho sản phẩm trà có giá trị cảm quan tốt nhất, tương đồng với một số nghiên cứu sản xuất trà bổ sung cỏ ngọt trước đây. Trong quy trình sản xuất trà hoa đậu biếc *(Clitoria ternatean* L.*)* của Nguyễn Thị Hiền và Nguyễn Thị Kim Phụng (2019) đã xác định tỷ lệ phối trộn các thành phần 55% hoa đậu biếc, 10% cỏ ngọt, 25% trà xanh và 10% hoa cúc cho thành phẩm trà hoa đậu biếc có chất lượng tốt nhất.

Bảng 6. Điểm cảm quan của các mẫu trà tía tô

Tỷ lệ tía tô : cỏ ngọt (%)	Màu	Mùi	Vị	Tổng điểm
70 : 0	2,89±0,78^{b}	3,00±0,71^{b}	2,11±0,60^{b}	10,56
65 : 5	3,00±0,87^{b}	3,56±1,01^{ab}	2,67±0,50^{b}	11,67
60 : 10	4,33±0,71^{a}	4,11±0,78^{a}	4,11±0,78^{a}	16,67
55 : 15	4,11±0,78^{a}	2,78±0,67^{b}	3,89±0,78^{a}	14,12

50 : 20	3,56±0,53[a b]	3,11±0,78[a b]	2,78±0,83[b]	12,40
HSQT	1,00	1,50	1,50	

**Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5% bằng phép thử Tukey.*

Như vậy, từ kết quả trên đã xác định tỷ lệ phối trộn lá tía tô 60%, trà xanh 25%, cỏ ngọt 10% và gừng 5% là tối ưu cho sản phẩm trà thảo mộc tía tô vừa chứa hàm lượng các hợp chất sinh học cao vừa có giá trị cảm quan tốt.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật chế biến trà thảo mộc túi lọc thơm ngon và chứa hàm lượng các hợp chất sinh học cao. Lá tía tô được sấy bất hoạt enzyme PPO và POD ở 80℃ trong 15 phút rồi tiếp tục sấy ở 50℃ cho đến khi độ ẩm đạt ≤ 10%. Tỷ lệ phối trộn (%) lá tía tô : trà xanh : cỏ ngọt : gừng là 60 : 25 : 10 : 5 sẽ cho sản phẩm trà thảo mộc tía tô chứa hàm lượng hợp chất sinh học cao như: polyphenol tổng là 24,54 (mgGAE/g DM), tannin là 19,57 (mgTAE/g DM) và anthocyanin là 27,02 (mgCE/100g DM)), sản phẩm đạt các yêu cầu chất lượng của TCVN 7975:2008 về các sản phẩm trà túi lọc.

Lời cảm ơn: Xin chân thành gửi lời cảm ơn đến Khoa Nông nghiệp & Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang đã tạo điều kiện để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

LAITONJAM ,W.S., R. YUMNAM, S.D. ASEM AND S.D. WANGKHEIRAKPAM. (2013). Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of Phlogacanthus pubinervius T. Anderson and Phlocanthus jenkincii C.B. Clarke leaves. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 4 (1): 67-72.

LE, N.T., LE, V.C., DANG, T.T., PHAM, Q.T., NGUYEN, T.T., BUI, D.H., LUU, D., LE D.D. (2002). Hóa sinh công nghiệp. *Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật Hà Nội*.

LEE, J., R.W. DURST AND R.E. WROLSTAD. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88 (5): 1269-1278

MEDIANI, A., F. ABAS, T.C. PING, A. KHATIB AND N.H. LAJIS. (2012). Influence of growth stage and season on the antioxidant constituents of Cosmos caudataus. *Plant Foods for Human Nutrition*, 67: 344-350.

NGUYEN, N.T., HUYNH. N.O., PHAN, P.H. (2014). Sự biến động của các hợp chất phenolic trong lá trà trong quy trình chế biến trà Oolong. *Tạp chí phát triển khoa học công nghệ*, tập 17 số K1.

NGUYEN, T. H., NGUYEN, T.K.P. (2019). Nghiên cứu quy trình sản xuất trà hoa đậu biếc. *Kỷ yếu hội nghị An toàn thực phẩm & an ninh lương thực lần 3 năm 2019*, 38 - 49.

SOFOWORA, A. (1993). Screening Plants for Bioactive Agents. Medicinal Plants and Traditional Medicinal in Africa. *Spectrum Books Ltd*, 134-156.

TIWARI, P., KUMAR, B., KAUR, M., KAUR, G., KAUR, H., (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*. 1(1): 98-106.

TRUONG, Q.T., NGUYEN, D.K. (2020). Đánh giá sự ảnh hưởng của chế độ sấy đến hàm lượng hợp chất polyphenol tổng số, các hợp chất màu và hoạt tính chống oxy hóa của lá tía tô (*Perilla frutescens* L.) trồng ở huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí khoa học hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2020*, 340 – 345.

YADAV, R.N.S. AND AGARWALA, M (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*. 3(12): 10-14.

NGHIÊN CỨU TẠO CHẾ PHẨM TỪ DÒNG NẤM KÍ SINH CÔN TRÙNG *Isaria fumosorosea Bb-V3* ĐỂ ỨNG DỤNG TRONG PHÒNG TRỪ SINH HỌC CÔN TRÙNG GÂY HẠI

Nguyễn Thanh Triều, Lê Thuỵ Tố Như, Nguyễn Ngọc Phi Uyên, Lê Thị Ý, Nguyễn Ngọc Bảo Châu*

Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: chau.nnb@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Isaria fumosorosea Bb-V3 là một loài nấm ký sinh côn trùng thuộc chi Isaria, được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trong công tác bảo vệ thực vật ở nhiều nước trên thế giới. Kết quả nghiên cứu cho thấy: nuôi cấy trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm I. fumosorosea Bb-V3 với tốc độ đường kính khuẩn lạc nhanh, cao nhất là 4,3 cm và mật độ bào tử cao nhất là 7,43x10^9 bào tử/cm^2 sau 12 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu khả năng tiêu diệt của chủng nấm I. fumosorosea Bb-V3 đối với vật chủ ruồi đục trái Bactrocera dosalis gây hại chủ yếu trên cây ăn trái cho thấy, hiệu lực tiêu diệt nhộng ruồi đục trái Bactrocera dosalis có hiệu quả cao sau 10 ngày phun dịch bào tử nấm, cao nhất ở nồng độ 10^9 bào tử/ml đạt 73,72 %. Thử nghiệm tạo môi trường nuôi cấy bán rắn để sản xuất chế phẩm với thành phần chính là cám gạo, cám bắp, bã đậu nành, vỏ trấu cho thấy, chủng nấm I. fumosorosea Bb-V3 tạo nhiều bào tử trên môi trường CT2: 40% cám gạo + 20% cám bắp + 30% bã đậu nành + 10% vỏ trấu (tỷ lệ nước với chế phẩm là 1:1) đạt cao nhất 6,73x 10^9 bào tử/g sau 20 ngày nuôi cấy. Bước đầu đánh giá hiệu quả của chế phẩm từ dòng nấm kí sính công trùng I. fumosorosea Bb-V3 cho thấy, hiệu quả phòng trừ nhộng ruồi đục trái Bactrocera dosalis cao đạt 73.81 % tỷ lệ nhộng chết sau 10 ngày xử lý trong điều kiện phòng thí nghiệm. Đây là những dẫn liệu đầu tiên nghiên cứu về khả năng phòng trừ sinh học của dòng nấm ký sinh côn trùng I. fumosorosea Bb-V3 trên nhộng ruồi đục trái Bactrocera dosalis.

Từ khóa: *Nấm kí sinh côn trùng, Isaria fumosorosea Bb-V3, Bactrocera dosalis, nhộng ruồi đục trái, chế phẩm*

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP TOÀN PHẦN HOẠT CHẤT CHO THUỐC BELEODAQ

Huỳnh Như Thảo*, Nguyễn Cường Quốc
Trường Đại học Cần Thơ
Tác giả liên lạc: thaohuynh171198@gmail.com

TÓM TẮT

Quy trình tổng hợp hoạt chất cho thuốc Beleodaq được sử dụng trong chữa trị ung thư tế bào lympho T ngoại vi đã được phát triển gồm có 6 bước với các nguyên liệu đầu rẻ tiền và dễ dàng mua được trên thị trường, hiệu suất toàn quá trình là 10.5%. Dựa vào quy trình tổng hợp hoạt chất cho thuốc Beleodaq mới này, đề tài tiếp tục tổng hợp thành công bốn dẫn xuất tương tự, trong đó có ba dẫn xuất mới. Các dẫn xuất này đều cho thấy khả năng ức chế tốt enzyme HDAC8, được đánh giá nhờ vào sự hỗ trợ của phần mềm Autodock Tools.

***Từ khóa**: belinostat, ung thư tế bào lympho-T ngoại vi, Autodock Tools*

RESEARCH ON THE TOTAL SYNTHESIS OF THE ACTIVE INGREDIENT OF BELEODAQ

Huynh Nhu Thao*, Nguyen Cuong Quoc
Can Tho University
Corresponding author: thaohuynh171198@gmail.com

ABSTRACT

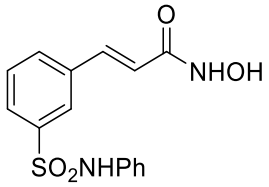
A simple procedure for the preparation of the active ingredient of Beleodaq, a drug used for the treatment of Peripheral T-cell. lymphoma (PTCL) has been developed with six steps in total and the overall yield being 10.5%. Following this new synthetic process, four derivatives were synthesized, with three out of four being recognized as new compounds. All of which present decent inhibition of HDAC8, which was evaluated by the use of Autodock Tools software.

***Keywords**: belinostat, Peripheral T-cell lymphoma, Autodock Tools*

TỔNG QUAN

Ung thư hạch không Hodgkin (PTCL) là ung thư phát triển từ tế bào lympho. Đây được xem là một loại ung thư khó chữa trị vì khối u được phát triển từ tế bào lympho (tế bào máu trắng). Tế bào này được tìm thấy ở hạch bạch huyết, lá lách và các cơ quan khác của hệ thống miễn dịch. Chính vì lý do này mà ung thư hạch không Hodgkin có thể xảy ra ở bất kỳ bộ phận nào và lan sang các cơ quan khác trong cơ thể dẫn đến di căn [1]. Đây cũng là một trong những lý do khiến cho bệnh ung thư hạch không Hodgkin chưa có biện pháp cụ thể nào trong điều trị, và càng không thể áp dụng các phương pháp truyền thống như phẫu thuật hay xạ trị cho bệnh nhân. Theo như các nghiên cứu đã được công bố, một trong những nguyên nhân dẫn đến sự phân chia bất thường của tế bào bạch cầu này là do sự rối loạn enzyme histone deacetylase (HDAC), do đó việc tìm ra các chất ức chế enzyme HDAC được xem là liệu pháp cấp thiết để chữa trị căn bệnh này [2]. Những đồng phân của acid hydroxamic cho các kết quả tốt trong thử nghiệm tiền lâm sàng trong việc ức chế enzyme HDAC, một trong số đó phải kể đến belinostat, hoạt chất của thuốc Beleodaq. Cuối cùng, sau nhiều nỗ lực và trải qua các bước lâm sàng để kiểm chứng sự hiệu quả, Beleodaq đã cho thấy khả năng đáp ứng tốt và lâu dài với độc tính ở mức kiểm soát được của bệnh nhân ung thư hạch không Hodgkin, và đã được xét duyệt bởi hiệp hội FDA của Hoa Kỳ năm 2014 [3]. Đến nay, Beleodaq được xem là thuốc điều trị PTCL mới nhất với khả năng ức chế HDAC loại I, II và IV [4].

Tuy nhiên, các quy trình tổng hợp toàn phần hoạt chất cho thuốc Beleodaq được công bố vẫn còn hạn chế và phần lớn những quy trình này sử dụng các tác chất và xúc tác đắt tiền, điều kiện tổng hợp không phù hợp với phòng thí nghiệm tại Việt Nam. Vậy nên, việc nghiên cứu và tối ưu hóa con đường tổng hợp Beleodaq, hướng đến con đường tổng hợp đơn giản, thân thiện với môi trường và hiệu suất cao là vô cùng cần thiết.



Hình 1. Công thức cấu tạo của hoạt chất thuốc Beleodaq

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu – Thiết bị

Các hóa chất có xuất xứ Merck, Đức và được sử dụng ngay sau khi mua mà không trải qua các quá trình tinh chế khác. Các dữ liệu phổ ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR được ghi trên máy Bruker Advance 500 MHz (Viện Công Nghệ, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội). Độ dịch chuyển hóa học được tính bằng ppm, hằng số ghép cặp, *J*, tính bằng Hz. Silica gel 60 F_{254} (0.04-0.06), bản mỏng TLC xuất xứ Merck. **Các phần mềm sử dụng bao gồm Chem3D 16.0, Gaussian 09W, GaussView 6.0, Open Babel, AutoDock 4.2, AutoDock Vina, Discovery Studio 2019 Client được chạy trên máy tính Toshiba Satellite P55-A5200 vi xử lý Intel® Core™ i5- 3337U, GPU Intel HD Graphics 4000, RAM 8GB, Window 10. Cấu trúc tinh thể enzyme được tải về từ trang web chính thức của ngân hàng dữ liệu Protein Data Bank (PDB).**

Phương pháp thực hiện

Tổng hợp 3-nitrobenzaldehyde (2)

Cho 1,1 g KNO3 vào 4ml H2SO4 đậm đặc, khuấy đến khi KNO3 tan hoàn toàn trong H2SO4 đậm đặc. Sau đó làm lạnh hỗn hợp này trong chậu nước đá, vừa khuấy vừa nhỏ đến hết 1.06g benzaldehyde. Tiếp tục khuấy trong 1 giờ, nhiệt độ của bình phản ứng trong khoảng 5-10^{o}C. Sau khi phản ứng kết thúc, rót hỗn hợp sản phẩm thô từ từ vào cốc nước đá xay nhuyễn, vừa rót vừa khuấy, thấy xuất hiện kết tủa vàng dưới đáy bình. Rửa lại kết tủa với 2ml Na2CO3 5% đến khi pH>7 rồi sau đó với 100ml nước cất. Lọc lấy sản phẩm **2** có dạng rắn màu vàng.

Tổng hợp (*E*)-3-(3-nitrophenyl)acrylic acid (3)

Cho 0.52g acid malonic vào bình cầu 100 ml, thêm vào 0.25 ml pyridine và lắc đều để hòa tan acid malonic. Sau đó cho tiếp 0.775 g m-nitrobenzaldehyde vào bình cầu. Gắn bình cầu vào hệ thống đun hoàn lưu trên bếp đun cách thủy, nhiệt độ khoảng 70^{o}C trong vòng 2 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, trung hòa acid dư bằng NH3 đậm đặc, sau đó HCl 1N, sẽ thấy kết tủa trắng mịn xuất hiện. Làm lạnh hỗn hợp trong vòng 1 giờ để kết tinh hoàn toàn và lọc lấy sản phẩm. …. Thu được sản phẩm **3** dạng bột mịn có màu trắng.

Tổng hợp Methyl (*E*)-3-(3-nitrophenyl)acrylate (4)

Cho 4g sản phẩm **3** vào bình phản ứng 250 ml, thêm tiếp 75ml methanol và 0,0187g H2SO4 đậm đặc. Đun hoàn lưu ở nhiệt độ 80^{o}C trong vòng 4 giờ. Sau phản ứng, trung hòa acid bằng NaHCO3 đến khi ngừng sủi bọt khí sẽ thấy tủa màu trắng, làm lạnh bình phản ứng trong vòng 1 giờ để tủa hoàn toàn. Sau đó lọc sản phẩm bằng máy lọc chân không sẽ thu được **4** dạng bột mịn màu trắng.

Tổng hợp Methyl (*E*)-3-(3-aminophenyl)acrylate (5)

0.389mg SnCl2. 2 H2O được hòa trong 5 ml EtOH, sau đó trộn với 0,104mg **4**, hỗn hợp trên được đun ở 80^{o}C trong vòng 3 giờ. Để hỗn hợp nguộc đến nhiệt độ phòng, sau đó cô quay để bay hơi bớt lượng dung môi. Phần còn lại cho vào nước đá và trung hòa đến pH=7 bằng Na2CO3 bão hòa. Hỗn hợp thu được chiết với EA. Phần dịch chiết thu được rửa lại với NaCl, sau đó làm khan bằng Na2SO4, cô quay đuổi dung môi thì thu được **5**.

Tổng hợp Methyl (*E*)-3-(3-aminophenyl)acrylate (6)

Hoà tan (191mg, 1mmol) **5** trong hỗn hợp 10mL HCl đậm đặc và 3mL HOAc đậm đặc, làm lạnh hỗn hợp trên. Sau khoảng 5 phút thêm từ từ 3mL dung dịch NaNO2 4M giữ nhiệt độ phản ứng không vượt quá 5^{o}C, khuấy phản ứng trong 45phút.

Trong một bình cầu khác khí SO2 được sục vào 10mL HOAc trong nhiệt độ nhỏ hơn 5^{o}C đến khi bão hoà. Thêm tiếp (50mg, 0.5mmol) CuCl vào, tiếp tục sục khí SO2 cho đến khi dung dịch từ màu xanh lục chuyển sang màu xanh nhạt. Thêm từ từ dung dịch muối diazonium ban đầu vào hỗn hợp trên và khuấy ở nhiệt độ phòng. Sau 2 giờ chiết hỗn hợp phản ứng với EtOAc, dịch chiết hữu cơ được rửa lại nhiều lần bằng NaHCO3 và làm khan bằng Na2SO4. Tiến hành cô đuổi dung môi, thu được sản phẩm là chất dầu màu đen, sản phẩm được sử dụng trực tiếp cho bước tiếp theo mà không cần tinh chế.

Dầu đen phía trên được hoà tan vào 5 mL pyridine và thêm từ từ vào (47,25mg, 0,6mmol) Aniline, phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 10 giờ. Sau khi cô đuổi hết dung môi hữu cơ thêm tiếp vào 5mL nước khuấy trong 1 giờ. Tiến hành chiết với EA và rửa dịch chiết nhiều lần với dung dịch HCl 1N. Cô đuổi dung môi, tinh chế sản phẩm bằng sắc kí cột silicagel.

Tổng hợp (*E*)-*N*-Hydroxy-3-[3-(phenylsulfamoyl)phenyl]acrylamide (belinostat) (**7**)

Hoà tan (2g, 35mmol) KOH và (2,4g, 35mmol) $NH_2OH.HCl$ trong 8mL EtOH khan hỗn hợp được giữ lạnh dưới 5^{o}C sau đó lọc phần không tan. KOH (336mg, 6mmol) và 5 (317mg, 1mmol) được thêm vào dịch lọc hỗn hợp được khuấy và làm lạnh dưới 5oC. Sau 1 giờ thêm vào 25mL nước, trung hoà lại bằng dung dịch HCl 2N. Có kết tủa xuất hiện. Thu kết tủa và sấy khô. Tiến hành kết tinh lại bằng MeOH lạnh thu được chất rắn màu trắng.

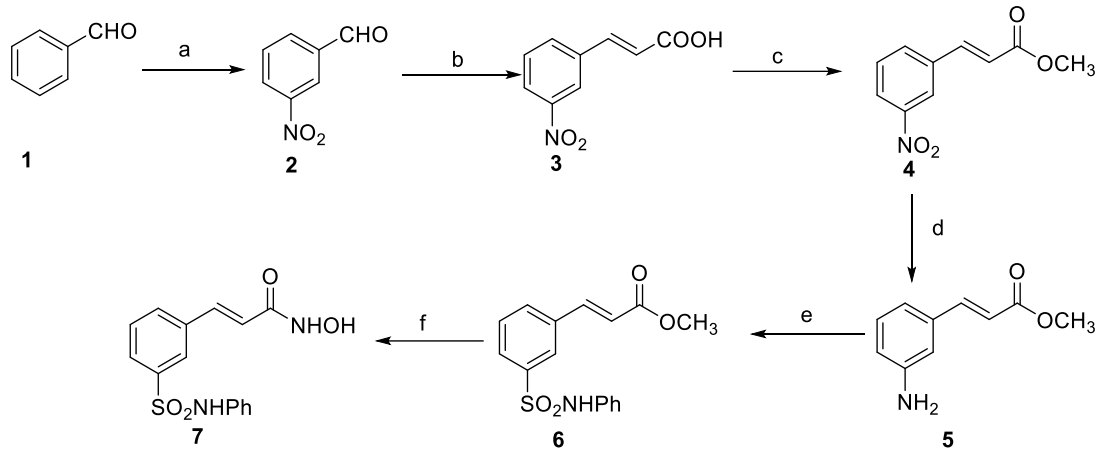
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng hợp hóa học

Quy trình tổng hợp belinostat (**Sơ đồ 1**) bắt đầu với phản ứng nitro hóa giữa benzaldehyde **1** và hỗn hợp gồm KNO3 và acid sulfuric đậm đặc. Phản ứng nitro hóa tạo ra **2** là 3-nitrobenzaldehyde với hiệu suất 69.4%. Sau đó **2** tiếp tục tham gia phản ứng cộng Knoevenagel với acid malonic, dung môi pyridine tạo ra **3** với hiệu suất 82%. Acid của **3** được chuyển thành dạng ester, còn nhóm -NO2 thì được khử thành -NH2, sử dụng $SnCl_2$. $2H_20$, hiệu suất của 2 quá trình này lần lượt là 88.5 và 95.6%.

Bước chuyển amine **5** thành sulfonamide **6** , tạo ra chất trung gian **5a**, được xem là giai đoạn quyết định của chuỗi phản ứng. Theo như các quy trình được công bố, sự chuyển đổi này chủ yếu dựa vào oleum (khó bảo quản và vận chuyển) [5] hay chlorosulfonic acid (không phổ biến và giá thành cao) [6], để khắc phục những hạn chế này, nghiên cứu của chúng tôi thực hiện bằng cách khử amine thơm thành muối diazonium, sau đó biến đổi thành chất trung gian sulfonyl chloride sử dụng tác nhân SO_2 hoặc $SOCl_2$, tiếp theo là amine hóa bởi aniline để tạo thành **6**. Hiệu suất của quy trình ba bước này là 22.6%. Cuối cùng, **6** tham gia phản ứng oxime hóa với

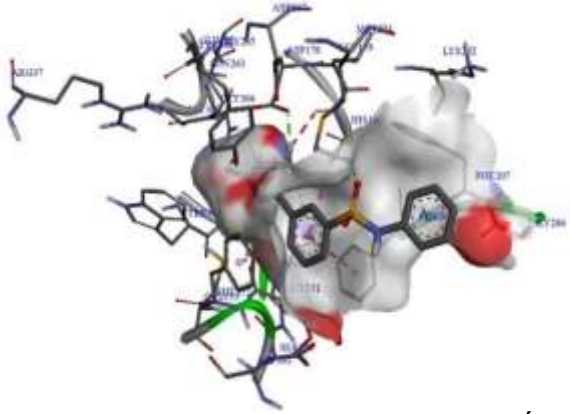
hydroxylamine hydrochloride để chuyển gốc ester thành hydroxamic và tạo thành sản phẩm mong muốn là belinostat **7**, hiệu suất 84%.



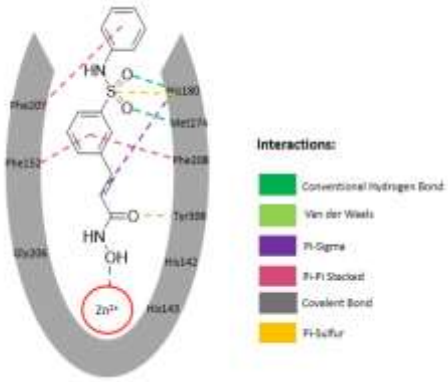
Sơ đồ 1. Quy trình tổng hợp toàn phần belinostat: (a) KNO_3, H_2SO_4 đậm đặc, 1h, 0-5^oC, (b) $CH_2(COOH)_2$, pyridine, reflux, 2h (c) CH_3OH, H_2SO_4 đậm đặc, reflux, 4h (d) $SnCl_2$. $2H_2O$, EtOH, 80^oC, (e) 1. SO_2, CuCl, HCl, AcOH 2. Aniline, rt, 2h, (f) NH2OH. HCl/ KOH, EtOH, 1h.

Docking phân tử đánh giá khả năng ức chế enzyme HDAC8

Kết quả docking cho thấy khả năng liên kết tốt của hoạt chất thuốc Beleodaq với enzyme HDAC8 (PDB code: 1t67) thông qua liên kết cộng hóa trị với ion kẽm tại vùng đáy của trung tâm hoạt động. Bên cạnh liên kết với vùng liên kết với ion kim loại kẽm, vùng cầu nối cũng cho thấy những liên kết quan trọng. Hoạt chất được gắn với vùng kỵ nước nơi mà các bức tường xung quanh được cấu thành bởi các amino acid như Phe152, Phe208, His180, Gly151 và Tyr 306 (**Hình 3**). Sự hình thành liên kết pi-pi stacked giữa vòng thơm của belinostat và Phe152/Phe208 giúp ổn định túi liên kết. Nhờ vào các liên kết kỵ nước và liên kết hydro, belinostat đã thể hiện được bản chất là một chất ức chế HDAC8 chọn lọc tiềm năng, với năng lượng tự do và nồng độ ức chế ở mức thấp (lần lượt là -8.69 kcal/mol và 424.2 nM) (**Hình 2 và Hình 3**).



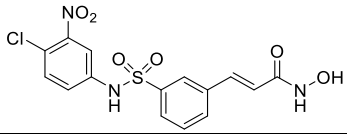
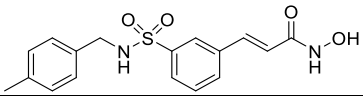
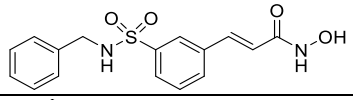
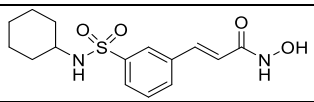
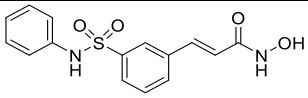
Hình 2. Mô hình 3D mô phỏng liên kết giữa Beleodaq và HDAC8.



Hình 3. Mô hình 2D mô phỏng liên kết giữa Beleodaq và HDAC8.

Tổng hợp các dẫn xuất của hoạt chất thuốc Beleodaq và đánh giá khả năng ức chế

Bảng 1. Hiệu suất tổng hợp và giá trị RMSD, năng lượng tự do liên kết dự đoán và giá trị hằng số ức chế K_i của kết quả docking các dẫn xuất tương tự hoạt chất cho Beleodaq

Stt	Ký hiệu	Cấu trúc	Hiệu suất	Giá trị RMSD (Å)	Năng lượng tự do liên kết dự đoán (kcal/mol)	Hằng số ức chế K_i (nM)
1	**7a**		11.6 %	1.004	-9.35	139.1
2	**7d**		29%	1.225	-8.47	619.1
3	**7f**		21%	1.220	-8.22	948.7
4	**7k**		21.3 %	1.071	-7.91	1058
5	**Beleodaq**		13%	1.050	-8.69	424.2

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Với những hóa chất cơ bản tại phòng thí nghiệm, đề tài đã thực hiện thành công quy trình tổng hợp toàn phần hoạt chất cho thuốc Beleodaq. Kết quả chính của nghiên cứu có thể tóm tắt như sau: (1) Quy trình tổng hợp toàn phần hoạt chất cho thuốc Beleodaq đạt hiệu suất 10.5%; (2) Hoạt chất của thuốc Beleodaq cho thấy khả năng ức chế tốt enzyme HDAC8 (3) Tổng hợp thành công và đánh giá khả năng ức chế của bốn dẫn xuất của hoạt chất của thuốc Beleodaq. Vì hạn chế về thời gian và thiết bị phòng thí nghiệm, đề tài kiến nghị nên thực hiện các đánh giá tương đương sinh học để so sánh hiệu quả chữa trị so với biệt dược gốc trên thị trường, đồng thời kết hợp với phương pháp tổng hợp polymer phân hủy sinh học và tương thích sinh học với kích thước nano nhằm kéo dài thời gian tác dụng và giảm tác dụng phụ của thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Karanfilski, O., 2013. The time to target and terminate the threat of PTCL. *University Hematology Hospital, Medical Faculty.*

[2] Parbin, S., Kar, S., Shilpi, A., *et al.*, 2014. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 62(*1*): 11-33.

[3] Barneda-Zahonero, B. and Parra, M., 2012. Histone deacetylases and cancer. *Molecular oncology.* 6(*6*): 579-589.

[4] Sawas, A., Radeski, D., & O'Connor, O. A., 2015. Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: a perspective review. *Therapeutic advances in hematology*, *6*(4), 202-208.

[5] Bao, X., Song, D., Qiao, X., Zhao, X. and Chen, G., 2016. The development of an effective synthetic route of Belinostat. *Organic Process Research & Development.* 20(*8*): 1482-1488.

[6] Reisch, Helge A, Leeming, Peter, and Raje, Prasad S., 2014, Methods of synthesis of certain hydroxamic acid compounds, Editor^Editors, Google Patents.

NGHIÊN CỨU TƯƠNG QUAN TRÊN TOÀN HỆ GEN VỀ KHẢ NĂNG CHỊU MẶN CỦA CÂY LÚA Ở GIAI ĐOẠN ĐẺ NHÁNH

Phan Thị Hồng Nhung[1,2,*], Đỗ Thành Long[3],Phạm Văn Cường[1], Pierre Bertin[2]

[1] Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

[2] Trường Đại học Công giáo Louvain, Bỉ

[3] Lớp K62KHCTA, Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Tác giả liên lạc: phannhung@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Mở đầu: Xâm nhập mặn đe dọa diện tích và năng suất lúa ở nhiều nước trên thế giới, nhất là ở các nước Nam Á và Đông Nam Á. Vì vậy, nghiên cứu về việc chọn tạo giống lúa chịu mặn mới là rất cần thiết.

Phương pháp nghiên cứu: Chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chịu mặn (SES) của 2.391 giống lúa ở điều kiện mặn nhân tạo 60 mM NaCl ở giai đoạn mạ. Nghiên cứu tương quan trên toàn bộ hệ gen (GWAS – genome-wide association study) về SES của 2.391 giống và của các loài phụ (gồm 1.142 giống thuộc indica, 650 giống japonica, 182 giống aus, và 65 giống aromatic) được tiến hành bằng phần mềm FaST-LMM. Quá trình phân tích GWAS được tiến hành với 235.210 SNPs và SES của 2.391 giống, có sử dụng 3 thành phần chính (PCA) đầu tiên cùng với 58.800 SNPs để so sánh sự khác nhau về mặt di truyền. Các SNPs vượt qua ngưỡng ý nghĩa ($p < 0,0001$) và ở gần nhau trên cùng một nhiễm sắc thể (khoảng cách các SNPs nhỏ hơn ngưỡng LD) được coi là một QTL.

Kết quả: Kết quả chúng tôi xác định được 18 QTL liên quan đến tính trạng SES được xác định ở các quần thể khác nhau, trong đó có 4 QTL được xác định ở 2 quần thể khác nhau và 14 QTL còn lại chỉ được xác định ở một quần thể duy nhất. Có 6 QTL liên quan đến tính trạng chịu mặn của lúa nằm trong vùng di truyền được công bố trước đó, gồm có 4 QTL ở nhiễm sắc thể số 1 (vị trí đỉnh lần lượt là 13,3 Mb, 13,5 Mb, 13,9 Mb, và 23,3 Mb), và 2 QTL ở nhiễm sắc thể số 6 (có vị trí đỉnh là 24.6 Mb và 25.4 Mb). Hai QTL này thuộc vùng di truyền có mang gen OsiSAP8 và OsHAK10 liên quan đến khả năng chịu mặn của cây lúa.

Thảo luận: Các QTL được xác định có độ tin cậy cao và từ đó chúng tôi có thể xác định được gen triển vọng liên quan đến khả năng chịu mặn của lúa.

Kết luận: Những QTL liên quan đến khả năng chịu mặn của cây lúa được phát hiện từ nghiên cứu này sẽ cung cấp thông tin hữu ích về mặt di truyền và phục vụ tốt cho công tác chọn giống lúa chịu mặn trong tương lai.

Từ khóa: *GWAS, chịu mặn, lúa, QTL, FaST-LMM*

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY ON SALT TOLERANCE IN RICE AT EARLY SEEDLING STAGE

Phan Thi Hong Nhung[1,2,*], Do Thanh Long[3], Pham Van Cuong[1], Pierre Bertin[2]

[1] Agronomy faculty, Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam

[2] Earth and Life Institue, Université catholique de Louvain, 1348 Louvain la Neuve, Belgium

[3] K62KHCTA, Agronomy faculty, Vietnam National University of Agriculture, Hanoi, Vietnam

Corresponding author: phannhung@vnua.edu.vn

ABSTRACT

Background: Salt threatens rice cultivation in many countries. Hence, breeding new varieties with high salt tolerance is important.

Methods: 2,391 rice accessions, including 1,422 indica accessions, 650 japonica accessions, 182 aus accessions, and 65 aromatic accessions from 3K Rice Genome Project were selected to evaluate salt tolerance via the standard evaluation score (SES) in hydroponics under 60 mM NaCl at the seedling stage. The GWAS in the different panels, viz. whole population and each subspecies group, were analyzed by using a Factored Spectrally Transformed Linear Mixed Model (FaST-LMM) by FaST-LLM software. The analysis was carried out with 235,210 SNPs, of which 58,800 SNPs were used to measure similarities between the accessions, and top three principal components analysis of 588,792 SNPs as covariate. The significant threshold was set at $p < 0.0001$ (-log10 P-value > 4). Multiple SNPs significant in a range of LD decay in the same chromosome were considered as a single QTL.

Results: A total of 18 QTLs associated with SES trait in different panels were identified by GWAS. Among them, 4 QTLs were detected in two different panels, and each of the 14 others in one panel only. Six QTLs previously reported as related to salt tolerance were found: 4 QTLs in chromosome 1 (peak position at 13.3 Mb, 13.5 Mb, 13.9 Mb, and 23.3 Mb), and 2 QTLs in chromosome 6 (peak position at 24.6 Mb and 25.4 Mb). These last were mapped in intervals containing OsiSAP8 gene and OsHAK10 previously reported regulating salt tolerance.

Discussion: The false positive probability of the QTLs identified in this study could be very low, and thereby the candidate genes could be further detected.

Conclusions: The identified QTLs, including well-known genes and novel QTLs, would provide useful genetic information for future genetic improvement of salt tolerance in rice.

Keywords: *GWAS, salt tolerance, rice, QTL, FaST-LMM*

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHẾ PHẨM BÓN GỐC (PHÂN HỮU CƠ VI SINH BIOROOT) TRONG SẢN XUẤT RAU AN TOÀN

Nguyễn Hồng Thủy[1]*

[1]Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang

Tác giả liên lạc: nguyenhongthuy@tgu.edu.vn

TÓM TẮT

Tại Tiền Giang, một sản phẩm khoa học công nghệ của Trung tâm Đấu tranh sinh học (trực thuộc Viện Bảo vệ thực vật) - chế phẩm bón gốc (Phân hữu cơ vi sinh Bioroot) sau đây gọi tắt là Bioroot - đã được chuyển giao cho Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học (trực thuộc Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang) từ 12/2006 đến tháng 12/2010 trong khuôn khổ Dự án nông thôn miền núi "Xây dựng mô hình sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất rau - quả an toàn" nhằm góp phần đẩy mạnh sản xuất nông nghiệp theo hướng sản xuất hàng hóa có chất lượng cao, an toàn cho người tiêu dùng và môi trường. Bioroot sau đó tiếp tục được nghiên cứu ứng dụng ở vùng rau chuyên canh của tỉnh Long An từ năm 2012 - 2015 cùng các loại chế phẩm sinh học khác trên đối tượng rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả, trong đề tài nghiên cứu khoa học "Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn đạt chứng nhận VietGAP tại 3 huyện Cần Đước, Cần Giuộc, Đức Hòa tỉnh Long An" nhằm tìm ra các loại chế phẩm sinh học có khả năng hỗ trợ duy trì năng suất, chất lượng rau khi phải giảm lượng phân đạm bón cho cây, nhất là vào giai đoạn cuối và đảm bảo thời gian cách ly phân đạm trước khi thu hoạch để các loại rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả phù hợp yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm của tiêu chuẩn VietGAP. Đây là một sản phẩm khoa học công nghệ được chuyển giao thông qua một dự án nông thôn miền núi từ cơ quan nghiên cứu ứng dụng cấp trung ương xuống cơ quan nghiên cứu ứng dụng cấp địa phương. Trong thời gian dài, sản phẩm đã được địa phương tiếp nhận, thử nghiệm, nghiên cứu ứng dụng trên nhiều đối tương cây trồng khác nhau cho thấy sự phù hợp của sản phẩm này với nhiều chủng loại cây trồng tại địa phương, đồng thời cũng phù hợp với các tiêu chí sản xuất an toàn theo tiêu chuẩn VietGAP.

Từ khóa: *chế phẩm sinh học, rau an toàn, chất lượng, chuyển giao công nghệ*

RESEARCH ON APPLICATION OF BASE FERTILIZER (BIOROOT ORGANIC FERTILIZER) IN SAFE VEGETABLE PRODUCTION

Nguyen Hong Thuy

The Department of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University

Corresponding author: nguyenhongthuy@tgu.edu.vn

ABSTRACT

In Tien Giang, a scientific and technological product of the Center for Biological Struggle (under the Institute of Plant Protection) - base fertilizer (Bioroot organic biofertilizer) hereinafter referred to as Bioroot - was transferred and assigned to the Center for Engineering and Biotechnology (under Tien Giang Department of Science and Technology) from December 2006 to December 2010 in the framework of the mountainous rural project "Building production models and using bioproducts for safe vegetable - fruit production" in order to contribute to promoting agricultural production in the direction of producing high quality goods, safe for consumers and the environment. Bioroot then continued to be studied and applied in specialized vegetable areas of Long An province from 2012-2015 together with other bioproducts on leaf vegetables, spice vegetables, fruit vegetables, in the scientific research project "Building a model of safe vegetable production with VietGAP certification in 3 districts of Can Duoc, Can Giuoc, Duc Hoa, Long An province" in order to find out bioproducts

that can help maintain vegetable productivity and quality when it is necessary to reduce the amount of nitrogenous fertilizer for plants, especially in the final stage and ensure the time to isolate nitrogen fertilizers before harvest so that the leaf vegetables, spice vegetables, fruit vegetables are suitable for hygiene and safety requirements for food of VietGAP standard. This is a scientific and technological product transferred through a mountainous rural project from a central research agency to a local applied research agency. For a long time, the product has been received, tested, researched and applied locally on many different crops, showing its suitability with many types of local crops, at the same time, also in accordance with VietGAP standards of safe production.

Key words: *biofertilizer, safe vegetable, quality, technology transfer*

1. Đặt vấn đề

Rau là thực phẩm không thể thiếu trong bữa ăn hàng ngày của mọi người. Sản xuất rau ở nước ta nói chung và tại Tiền Giang nói riêng về cơ bản đáp ứng nhu cầu tiêu thụ rau xanh của người dân, tuy nhiên, kỹ thuật trồng rau thâm canh sử dụng nhiều phân bón hóa học, hóa chất bảo vệ thực vật, chất điều hòa sinh trưởng chưa đảm bảo tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm.

Nhiều năm qua, tại Tiền Giang, nhiều biện pháp quản lý và kỹ thuật đã được nghiên cứu ứng dụng để sản xuất ra sản phẩm rau an toàn phục vụ người dân. Tính đến năm 2020, Tiền Giang có tổng diện tích rau đạt chứng nhận VietGAP trên 150 ha, cung cấp sản lượng hằng năm trên 18 ngàn tấn[1]. Công nghệ thủy canh được nghiên cứu ứng dụng tại Tiền giang vào năm 2016 với 7 giàn thuỷ canh hồi lưu quy mô sản xuất, 1 giàn thuỷ canh ngập chìm tạm thời, 2 giàn thuỷ canh nhỏ giọt quy mô sản xuất và 2 giàn thuỷ canh hồi lưu quy mô gia đình được nghiên cứu, thiết lập và chuyển giao cho Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ Sinh học Tiền Giang[2], sau đó, tiếp tục được nghiên cứu ứng dụng, chuyển giao trong các dự án sản xuất thử nghiệm trên địa bàn Thị trấn Chợ Gạo[3] và huyện Cái Bè[4] Tiền Giang. Năm 2020, Công nghệ khí canh của Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và Dịch vụ Khoa học công nghệ - Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang được nghiên cứu ứng dụng và chuyển giao cho người dân thành phố trồng rau xanh với dung dịch chất dinh dưỡng sẽ được phun sương từ trên xuống dưới, lượng dung dịch này sau khi thấm đủ cho bộ rễ của cây sẽ rơi xuống bồn chứa bên dưới và tiếp tục tuần hoàn sử dụng. Dinh dưỡng được sử dụng hoàn toàn từ hữu cơ nên cây dễ hấp thu, tăng trưởng nhanh, không cần sử dụng đất trồng nên hạn chế sâu bệnh phát sinh, giảm chi phí sản xuất[5].

Công nghệ sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý phế phụ liệu nông nghiệp sẵn có ở địa phương là mạt cưa sau trồng nấm, mụn xơ dừa, với bộ chủng vi sinh vật bản địa có khả năng phân giải cellulose cao tạo ra giá thể hữu cơ sạch cũng đã được nghiên cứu ứng dụng phục vụ vùng trồng rau, hoa của tỉnh[6]. Nhà màng được thiết kế và chế tạo với đầy đủ các yếu tố quan trọng để việc chăm sóc, bón phân, tưới nước được thực hiện theo đúng quy trình kỹ thuật, kiểm soát được nhiều yếu tố như mưa, nắng, gió, ngăn chặn xâm nhập của nhiều loại côn trùng… qua đó làm giảm chi phí đầu tư, công lao động và hạn chế đáng kể sử dụng thuốc BVTV. Hệ thống tưới nhỏ giọt là biện pháp tưới tiết kiệm nước nhất, giúp giảm đến 30-60% lượng nước so với phương pháp tưới truyền thống. Hệ thống tưới này cung cấp nước thường xuyên, duy trì độ ẩm thích hợp theo nhu cầu sinh trưởng và phát triển của các loại cây trồng. Nhờ đó, cây sinh trưởng tốt, phát triển nhanh, đạt năng suất cao, góp phần ngăn chặn sự phát triển của cỏ dại quanh gốc cây và sâu bệnh vì lượng nước chỉ cung cấp làm ẩm gốc cây. Biện pháp kỹ thuật "Nhà màng kết hợp hệ thống tưới nhỏ giọt" đã được nghiên cứu ứng dụng thành

công và chuyển giao cho Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học - Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang[7], sau đó được nhân rộng trên địa bàn 11 huyện, thị xã, thành phố của tỉnh Tiền Giang và chuyển giao thành công cho các tỉnh Hậu Giang, Cần Thơ, Vĩnh Long, Long An, Bến Tre, Bình Thuận, Thanh Hóa, góp phần mở rộng vùng sản xuất rau an toàn trong và ngoài tỉnh[8].

Sử dụng chế phẩm bón gốc là một trong những biện pháp kỹ thuật hiệu quả trong sản xuất rau an toàn. Một sản phẩm khoa học công nghệ của Trung tâm Đấu tranh sinh học (trực thuộc Viện Bảo vệ thực vật) - chế phẩm bón gốc (Phân hữu cơ vi sinh Bioroot) sau đây gọi tắt là Bioroot - đã được chuyển giao cho Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học (đơn vị sự nghiệp trực thuộc Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang) từ 12/2006 đến tháng 12/2010 trong khuôn khổ Dự án nông thôn miền núi "Xây dựng mô hình sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất rau - quả an toàn" nhằm góp phần đẩy mạnh sản xuất nông nghiệp theo hướng sản xuất hàng hóa có chất lượng cao, an toàn cho người tiêu dùng và môi trường[9]. Sau đó, Bioroot tiếp tục được nghiên cứu ứng dụng ở vùng rau chuyên canh của tỉnh Long An cùng các loại chế phẩm sinh học khác trên đối tượng rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả, trong đề tài nghiên cứu khoa học "Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn đạt chứng nhận VietGAP tại 3 huyện Cần Đước, Cần Giuộc, Đức Hòa tỉnh Long An" nhằm tìm ra các loại chế phẩm sinh học có khả năng hỗ trợ duy trì năng suất, chất lượng rau khi phải giảm lượng phân đạm bón cho cây, nhất là vào giai đoạn cuối và đảm bảo thời gian cách ly phân đạm trước khi thu hoạch để các loại rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả phù hợp yêu cầu vệ sinh an toàn thực phẩm của tiêu chuẩn VietGAP[10].

Bioroot được nghiên cứu ứng dụng trên nhiều chủng loại rau và trên nhiều địa bàn khác nhau để chứng minh sự phù hợp của sản phẩm với các vùng sản xuất rau an toàn trong và ngoài tỉnh.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Bioroot có chứa thành phần hữu cơ ≥ 20%, acid humic ≥ 3,5%, N_{ts} ≥ 0,5%, P_2O_{5hh}≥1%, K_2O_{hh}≥0,5%, CaO≥1,5%, MgO≥1,2%, S≥0,5%, *Trichoderma*: ≥ $1x10^8$ CFU/ gram, vi sinh vật (VSV) phân giải cellulose: ≥ $1x10^8$ CFU/ gram, VSV phân giải lân: ≥ $1x10^8$ CFU/ gram, VSV cố định đạm: ≥ $1x10^8$ CFU/ gram, Vi sinh ức chế bệnh: ≥ $1x10^8$ CFU/ gram, thảo mộc chứa Saponin.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất rau - quả an toàn

Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm này được triển khai trên hầu hết các địa bàn thuộc 7 huyện/thị xã/thành phố, 19 xã của tỉnh Tiền Giang với tổng diện tích là 183,77 ha trên các loại: rau ăn lá *(cải tùa xại, cải xanh, cải ná, cải ngọt bông, cải ngọt, cải bắp, cải bông, cải dún, cải thìa, củ cải trắng, tần ô, mồng tơi, dền, bù ngót, hành, hẹ, xà lách, ngò rí, rau quế, rau húng cây, rau diếp cá, rau má)*, rau ăn quả *(bầu, bí đao, bí hồ lô, mướp, đậu cove, đậu đũa, đậu bắp, cà chua, cà tím, ớt, dưa hấu, dưa leo, khổ qua)*; hoa *(huệ, vạn thọ)*; cây ăn quả *(bưởi, cam, vú sữa).*

Phương pháp xử lý chế phẩm: bón lót một lần trước khi trồng hoặc trước khi bồi đất lần 1; tiến hành rắc chế phẩm rồi trộn đều với đất trong rãnh trồng, rồi dùng đất bột phủ đều lên trên và tưới nhẹ. Có thể phối hợp cùng với việc bón phân lót cho cây ngay khi trồng.

Liều lượng: đối với các loại cây ngắn ngày sử dụng 0,5 tấn/ha.

Ghi nhận các chỉ tiêu:

- Sự gia tăng chiều cao cây;
- Quan sát *(cảm quan)*: màu sắc lá, độ dày lá, độ cứng cây; có ít hoặc nhiều sâu bệnh tấn công, gây hại;
- Bệnh: quan sát triệu chứng héo rũ/chết cây con/chạy dây để tính tỷ lệ.

Thời gian ghi nhận chỉ tiêu: trung bình là 7 ngày/lần, nếu loại rau có thời gian sinh trưởng ngắn thì 3 - 4 ngày/lần.

- Ghi nhận 5 điểm theo đường chéo góc trên cá thể cố định (mỗi điểm ghi nhận khoảng 5-10 cá thể) hoặc ghi nhận trên khung với diện tích khung cố định *(khung 0,4 m x 0,5 m hoặc khung 0,2 m x 0,2 m).*
- Mỗi nghiệm thức ghi nhận ít nhất 30 điểm cố định hoặc 30 khung cố định.

2.2.2. Nghiên cứu ứng dụng các loại chế phẩm sinh học, trong đó có Bioroot, nhằm giảm lượng phân Ure (đạm) bón cho các loại rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả

* Cải ngọt

- Bố trí 05 nghiệm thức, 03 lần lặp lại, diện tích ô khảo nghiệm: 11,25 m^2 (S = 1,5m x 7,5m)

Nghiệm thức	**Lượng phân cho mỗi ô lặp lại 11,25 m^2**					
	Bón lót	**4 ngày sau cấy (NSC)**	**10 NSC**	**13 NSC**	**16 NSC**	**18 NSC**
ĐC	Phân gà xử lý Humix: 0,85 kg Lân: 0,85 kg	Ure: 0,55 kg	Ure: 0,55 kg	-	-	-
A	Phân gà xử lý Humix: 0,85 kg Lân: 0,85 kg	Ure: 0,55 kg Phân đầu gà: 0,85 kg	Ure: 0,30 kg	-	-	-
B (Agribio)	Lân: 0,85 kg Agribio: Tỷ lệ Agri:nước (*1ml:300ml*) *Phun 3 ngày trước khi trồng.*	Ure: 0,55 kg Agribio:Tỷ lệ Agri: nước (*1ml:1500m*)	Ure: 0,40 kg	-	-	-
C (Bioroot)	Lân: 0,85 kg Bioroot: 0,85 kg	Ure: 0,55 kg	Ure: 0,40 kg	-	-	-
D (Bioking)	Lân: 0,85 kg VVS: 20 ml (*tưới vào đất*)	Ure: 0,25 kg VVS: 15ml (*tưới vào rễ*)	Ure: 0,30 kg VVS: 15ml (*tưới vào rễ*) VVS lá: 10 ml (*phun*)	Ure: 0,10 kg VVS lá: 20 ml (*phun*)	VVS lá: 20 ml (*phun*)	VVS lá: 20 ml (*phun*)

Ghi chú:

+ NSC: ngày sau cấy

+ ĐC: nghiệm thức đối chứng (công thức bón của nông dân)

+ A: nghiệm thức cải tiến từ công thức bón của nông dân, bổ sung thêm lượng hữu cơ đầu gà vào lần bón thúc đầu và giảm ½ lượng phân đạm vào lần bón phân cuối.

+ B: nghiệm thức bón kết hợp với phân hữu cơ vi sinh Agribio và giảm 1/4 lượng phân đạm vào lần bón phân cuối.

+ C: nghiệm thức sử dụng chế phẩm bón gốc (Bioroot) để bón lót và sẽ giảm 1/4 lượng phân đạm vào lần bón phân cuối.

+ D: nghiệm thức sử dụng phân bón sinh học Bioking để phun, tưới và giảm 40% tổng lượng phân đạm.

* Húng cây

- Bố trí 04 nghiệm thức, 03 lần lặp lại, diện tích ô khảo nghiệm: 22,4 m^2 (S = 1,6m x 14m)

Lượng phân cho mỗi ô lặp lại 22,4 m^2				
Nghiệm thức	**Tưới lót**	**10 NSC**	**20NSC**	**30NSC**
ĐC	Lân: 2,24kg Phân gà xử lý Humix: 4,48kg	Ure: 0,3584kg	Ure: 0,448kg	Ure: 0,224kg
A	Lân: 2,24kg Phân gà xử lý Humix: 4,48kg	Ure: 0,3584kg Phân gà xử lý Humix: 4,48kg	Ure: 0,448kg	Ure: 0,112kg
B (Agribio)	Lân: 2,24kg	Ure: 0,3584kg	Ure: 0,448kg	Ure: 0,112kg
	Phân gà xử lý Humix: 2,24kg Agribio (1:300): 2,5ml	Agribio (1:1000): 1ml	-	-
C (Bioroot)	Lân:1,8kg Bioroot: 4,48kg	Ure: 0,3584kg	Ure: 0,448kg	Ure: 0,112kg

Ghi chú:

+ ĐC: nghiệm thức đối chứng (công thức tưới của nông dân)

+ A: nghiệm thức cải tiến từ công thức bón của nông dân, bón thêm phân hữu cơ vào lần bón thúc đầu, giảm ½ lượng phân đạm vào lần tưới phân cuối cùng.

+ B: nghiệm thức bón kết hợp với phân hữu cơ vi sinh Agribio và giảm ½ lượng phân đạm vào lần bón phân cuối.

+ C: nghiệm thức sử dụng chế phẩm bón gốc (Bioroot) để bón lót, giảm 20% lượng phân lân bón lót và ½ lượng phân đạm vào lần bón phân cuối.

* Khổ qua

- Bố trí 03 nghiệm thức, 03 lần lặp lại, diện tích ô khảo nghiệm: 60 m^2 (S = 2,5m x 24m)

Nghiệm thức	**Bón lót (*kg*)**	**20NSG (*kg*)**	**30NSG (*kg*)**	**40 NSG (*kg*)**	**50NSG (*kg*)**	**60NSG (*kg*)**
ĐC	Phân chuồng: 97	20.20.15 : 1,60	Bánh dầu: 1,6	Ure: 0,25	Ure: 0,25	Ure: 0,25
	Bánh dầu: 1,60		20.20.15 : 1,2	16.16.8: 1,2	16.16.8 : 1,2	16.16.8: 1,2
	Tro dừa: 0,80		Nitrabor : 0,8			

Nghiệm thức	Bón lót (*kg*)	20NSG (*kg*)	30NSG (*kg*)	40 NSG (*kg*)	50NSG (*kg*)	60NSG (*kg*)
	Lân Văn Điển: 6,50					
	Kali: 0,80					
	Ure: 0,80					
A	Phân chuồng: 97	20.20.15 : 1,60	Bánh dầu: 1,6	Ure: 0,2	Ure: 0,2	Ure: 0,2
	Bánh dầu: 1,60	Bioroot: 3,00	20.20.15 : 0,96	16.16.8: 0,96	16.16.8 : 0,96	16.16.8: 0,96
	Tro dừa: 0,80		Nitrabor : 0,64			
	Lân Văn Điển: 6,50					
	Kali: 0,80					
	Ure: 0,80					
B	Phân chuồng: 97	20.20.15 : 1,60	Bánh dầu: 1,6	Ure: 0,18	Ure: 0,18	Ure: 0,18
	Bánh dầu: 1,60	Bioroot: 6,00	20.20.15 : 0,84	16.16.8: 0,84	16.16.8 : 0,84	16.16.8: 0,84
	Tro dừa: 0,80		Nitrabor : 0,56			
	Lân Văn Điển: 6,50					
	Kali: 0,80					
	Ure: 0,80					

Ghi chú:

+ NSG: ngày sau gieo

+ ĐC: nghiệm thức đối chứng (công thức bón của nông dân)

+ A: nghiệm thức bổ sung 50kg phân hữu cơ vi sinh Bioroot/1000m^2, giảm 20% lượng phân hóa học từ lần bón 30NSG.

+ B: nghiệm thức bổ sung 100kg phân hữu cơ vi sinh Bioroot/1000m^2, giảm 30% lượng phân hóa học từ lần bón 30NSG.

* Ghi nhận các chỉ tiêu:

- Năng suất;

- Hàm lượng nitrate trong rau khi sử dụng công thức phân truyền thống so với khi sử dụng các chế phẩm sinh học ở các thời điểm: 17 NSC đối với Cải ngọt; tại thời điểm cách ly với lần bón phân đạm 10 ngày đối với Húng cây; trái thương phẩm đối với Khổ qua ở thời điểm 2, 4, 8 ngày sau khi bón đạm; Kết quả hàm lượng nitrate trong rau được so sánh theo mức giới hạn chỉ tiêu nitrat thấp nhất đối với rau trồng ngoài đồng ruộng là 2.000 mg/kg theo thông tư 68/2010/TT- BNNPTNT Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn ngày 3 tháng 12 năm 2010 ban hành "Danh mục chỉ tiêu, mức giới hạn cho phép về an toàn vệ sinh thực phẩm đối với một số sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc thực vật nhập khẩu, sản xuất lưu thông trong nước thuộc phạm vi quản lý của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn".

- Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm thống kê SAS 9.1

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất rau - quả an toàn

Bảng 1. Hiệu quả gia tăng chiều cao và năng suất rau trong việc sử dụng Bioroot

Loại cây trồng	*Số ruộng ghi nhận*	*So sánh*	*Chiều cao cây*	*Năng suất (kg/1.000m)*	*Chênh lệch năng suất (kg)*
			TB các lần đo (cm)		
Cải dún	3	AD	14,04	1.616,67	50,00
		ĐC	12,56	1.566,67	
Cải ngọt bông	3	AD	11,73	1.316,67	83,34
		ĐC	10,36	1.233,33	
Cải xanh	3	AD	13,33	1.633,33	50,00
		ĐC	11,96	1.583,33	
Cải thìa	1	AD	7,80	1.300,00	50,00
		ĐC	7,23	1.250,00	
Bí hồ lô	1	AD	408,47	544,75	54,00
		ĐC	398,17	490,75	
Ớt	3	AD	43,62	1.396,67	240,00
		ĐC	41,15	1.156,67	
Hẹ	3	AD	34,21	2.853,33	286,67
		ĐC	33,33	2.566,67	
Cải tùa xại	3	AD	46,02	2.853,33	286,67
		ĐC	43,32	2.566,67	
Đậu cove	3	AD	534,87	589,00	84,89
		ĐC	506,41	504,11	
Cải bắp	3	AD	54,09	2.317,33	740,00
		ĐC	49,41	1.577,33	
Dưa hấu	3	AD	485,31	2.190,00	151,67
		ĐC	465,22	2.038,33	

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy sự gia tăng chiều cao trung bình của cây ở các ruộng có sử dụng Bioroot (AD) đều cao hơn so với ruộng đối chứng không sử dụng (ĐC); bên cạnh đó, các ruộng AD cũng đều cho năng suất cao hơn so với các ruộng ĐC. Như vậy, việc sử dụng Bioroot để bón lót vào giai đoạn làm đất trước khi trồng giúp kích thích sự tăng trưởng của cây rau, dẫn đến gia tăng năng suất từ 50-740 kg/1.000m^2 (tăng khoảng 3,1-31,9%) tùy theo chủng loại rau, phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phạm Xuân Lân (2007) là việc sử dụng chế phẩm sinh học và phân bón tạo bởi chế phẩm vi sinh đã giúp sản lượng rau tăng từ 15 - 20%[11].

Bảng 2. Hiệu quả hạn chế bệnh, chết cây trong việc sử dụng Bioroot

Loại cây trồng	*Số ruộng ghi nhận*	*Tỷ lệ bệnh - chết cây (%)*			*Lượng phân hóa học sử dụng (*) (kg/1.000m^2)*			*Năng suất (kg/1.000m^2)*		
		AD	*ĐC*	*Chênh lệch*	*AD*	*ĐC*	*Chênh lệch*	*AD*	*ĐC*	*Chênh lệch*

Mồng tơi	3	1,33[a]	6,00[b]	4,67	17,67	21,00	3,33	2.167[a]	1.633[a]	533
Củ cải trắng	3	3,33[a]	8,00[b]	4,67	52,33	47,67	4,67	3.600[a]	3.133[a]	467
Đậu cove	3	2,67[a]	8,00[b]	5,33	58,33	93,33	35,00	3.233[a]	2.933[a]	300
Ngò rí	3	11,07[a]	25,40[b]	14,33	21,67	21,67	-	433[a]	343[a]	90
Dưa hấu	3	2,67[a]	12,00[b]	9,33	82,00	82,00	-	2.467[b]	2.167[a]	300
Dưa leo	3	1,33[a]	5,33[b]	4,00	41,00	71,67	30,67	3.200[a]	2.600[a]	600
Rau cần	3	5,33[a]	15,33[b]	10,00	23,67	39,67	16,00	2.263[a]	1.810[a]	453
Rau quế	3	3,33[a]	7,33[a]	4,00	73,33	133,33	60,00	2.347[a]	1.853[a]	493
Cải tùa xại	3	5,33[a]	8,67[a]	3,33	52,67	64,33	11,67	2.750[a]	2.300[a]	450
Khổ qua	3	6,00[a]	12,00[b]	6,00	55,67	89,00	33,33	3.067[a]	2.683[a]	383
Cà chua	3	8,67[a]	15,33[b]	6,67	67,00	90,33	23,33	3.573[b]	3.110[a]	463

Ghi chú:

- Trong cùng một cột, các giá trị được biểu thị bởi những chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa theo phân tích thống kê ANOVA (ở mức độ tin cậy 95%).

- (*) Loại phân sử dụng: DAP, UREA, NPK.

Qua Bảng 2 cho thấy ở các ruộng AD đều có tỷ lệ cây bệnh, cây chết thấp hơn so với ruộng ĐC trung bình từ 3,33 - 14,33% (tùy theo loại). Ngoài ra, năng suất của các ruộng AD cũng đều cao hơn so với ruộng ĐC, ngay cả ở các hộ *(27/33)* mạnh dạn cắt giảm lượng phân hóa học DAP, Urea, NPK sử dụng ở ruộng AD trung bình là 242,2 kg/ha cũng đều cho năng suất cao hơn ruộng ĐC.

Qua ghi nhận thực tế, ruộng rau có bón Bioroot kích thích cây phát triển xanh tốt; lá dày; thân cây khỏe, cứng cáp hơn; chống chọi tốt với điều kiện khắc nghiệt của thời tiết trong mùa mưa; giảm được tỷ lệ chết cây con, tỷ lệ bệnh héo rũ, cháy lá, bệnh khảm, bệnh nứt thân, chạy dây trên cây họ bầu bí; giúp tăng năng suất, tăng lợi nhuận hơn so với ruộng đối chứng trên cùng một đơn vị diện tích. Có được kết quả như vậy vì là ngoài thành phần phân hữu cơ và các chất vi lượng cần thiết, trong Bioroot còn có chứa nhóm VSV chức năng có khả năng cố định đạm; VSV phân giải các hợp chất lân khó tan thành các hợp chất lân hòa tan mà cây trồng dễ dàng hấp thu; VSV phân giải Cellulose làm thúc đẩy quá trình phân hủy Cellulose được triệt để và nhanh chóng thành các chất hữu cơ bón vào đất, giúp cho đất tơi xốp, tăng độ màu mỡ của đất tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và chất lượng nông sản; nhóm VSV ức chế VSV gây bệnh vùng rễ. Ngoài ra còn có nấm đối kháng *Trichoderma* không những có khả năng tiêu diệt các loài nấm gây hại rễ (như *Phytophthora, Fusarium, Rhizoctonia solani,* …) mà nó còn có khả năng phân hủy Cellulose, phân giải lân chậm tan. Đặc biệt trong thành phần của Bioroot còn có thảo mộc chứa một hàm lượng Saponin - yếu

tố rất hiệu quả trong phòng trừ tuyến trùng hại vùng rễ. Từ đó giúp cây trồng sinh trưởng mạnh, tăng năng suất, chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường.

Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Trần Thị Mai Lan và ctv (2019) khi so sánh với các công thức chỉ bón lót với NPK và phân chuồng ủ, phân hữu cơ biochar có tác động tốt tới một số chỉ tiêu sinh trưởng và chất lượng của cây cải ngọt[12].

3.2. Nghiên cứu ứng dụng các loại chế phẩm sinh học, trong đó có Bioroot, nhằm giảm lượng phân Ure (đạm) bón cho các loại rau ăn lá, rau gia vị, rau ăn quả

* Cải ngọt

Theo dõi năng suất của 5 chế độ bón phân khác nhau, kết quả thu thập (Bảng 3) cho thấy năng suất cải ngọt dao động từ 48,18 - 57,15 tấn/ha và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Điều này cho thấy việc sử dụng các loại phân, chế phẩm sinh học *(phân gà xử lý Humix, Agribio, Bioroot và bioking*) và giảm tổng lượng phân đạm hay ở kỳ bón phân đạm cuối trong các nghiệm thức đều không làm ảnh hưởng đến năng suất của cây cải ngọt. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Cao Ngọc Điệp và ctv (2011) cho thấy bón phân hữu cơ vi sinh cho rau xanh không những tiết kiệm phân nửa lượng phân hóa học mà còn không làm giảm năng suất và vẫn đảm bảo chất lượng sản phẩm[13].

Bảng 3. Năng suất cải ngọt và hàm lượng nitrat ở 17 NSC

Nghiệm thức	**Năng suất (tấn/ha)**	**Hàm lượng nitrat ở 17 NSC(*) (mg/kg)**
ĐC	52,71^{a}± 8,808	1121,3
A	57,15^{a}± 9,827	1889
B	48,18^{a}± 4,072	2419
C	52^{a}± 4,924	1621,3
D	51,56^{a} ± 1,0	1299,3

Ghi chú: Các số liệu có cùng chữ số theo sau trong cùng một cột thì khác biệt không ý nghĩa mức ý nghĩa 95%; (*): Trung bình 3 lần lặp lại.

Kết quả hàm lượng nitrat của các nghiệm thức ĐC, A, C, D đều nằm trong ngưỡng cho phép (Bảng 3). Kết quả của nghiệm thức B (Agribio) vượt ngưỡng cho phép.

Tổng hợp kết quả về năng suất và hàm lượng nitrat thì chế độ phân bón của nghiệm thức đối chứng, phân gà xử lý Humix, Bioroot và bioking được khuyến cáo sử dụng. Nghiên cứu của Trần Thị Mai Lan và ctv (2019) cũng cho kết quả phân ủ hữu cơ biochar làm giảm đáng kể hàm lượng nitrat trong lá cây cải ngọt[12].

* Húng cây

Theo dõi năng suất của 4 chế độ bón phân khác nhau, kết quả thu thập (Bảng 4) cho thấy năng suất húng cây dao động từ 21,4 - 22 tấn/ha và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Điều này cho thấy việc sử dụng các loại phân, chế phẩm sinh học *(phân gà xử lý Humix, Agribio, Bioroot*) và giảm tổng lượng phân đạm hay ở kỳ bón phân đạm cuối trong các nghiệm thức đều không làm ảnh hưởng đến năng suất của cây húng cây.

Bảng 4. Năng suất rau húng cây và hàm lượng nitrat ở 43 NSC

Nghiệm thức	Năng suất (*tấn/ha*)	Hàm lượng nitrat ở 10 ngày sau bón đạm(*) (mg/kg)
ĐC	21,4^{a} ±2,6	644
A	22,0^{a} ±4,0	630
B	21,7^{a} ±3,5	696
C	21,5^{a} ±1,5	565

Ghi chú: *Các số liệu có cùng chữ số theo sau trong cùng một cột thì khác biệt không ý nghĩa mức ý nghĩa 95%, (*): Trung bình 3 lần lặp lại.*

Cùng với kết quả hàm lượng nitrat của các nghiệm thức đều nằm trong ngưỡng cho phép (Bảng 4). thì chế độ phân bón của nghiệm thức đối chứng, phân gà xử lý Humix, Agribio, Bioroot được khuyến cáo sử dụng.

Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Cao Ngọc Điệp và ctv (2011) cho thấy đối với rau gia vị, bón 15 đến 30 tấn phân hữu cơ vi sinh/ha và 50 N - 42,5 P_2O_5 - 20 K_2O kg/ha cho năng suất tương đương với rau bón 100 N - 85 P_2O_5 - 40 K_2O kg/ha; bón 15 đến 30 tấn phân phân hữu cơ vi sinh /ha 80 N - 47 P_2O_5 - 20 K_2O kg/ha cho năng suất tương đương với bón 160 N - 94 P_2O_5 - 40 K_2O kg/ha cho hành lá nhưng hàm lượng nitrat thấp[13].

* Khổ qua

Sau 19 lần thu hoạch, kết quả khảo nghiệm thể hiện năng suất đạt được của các nghiệm thức không khác biệt có ý nghĩa thống kê (Bảng 5).

Bảng 5. Năng suất khổ qua (19 lần thu hoạch) của các nghiệm thức và hàm lượng nitrate trên trái khổ qua ở các thời điểm khác nhau sau khi bón đạm

Nghiệm thức	**Năng suất (tấn/ha)**	**Hàm lượng nitrat sau khi bón đạm (mg/kg)(*)**		
		2 ngày	4 ngày	8 ngày
ĐC	$33,6^a$ ±11	565	632	558
A	$33,6^a$ ±5	547	614	517
B	$32,8^a$ ± 8	521	596	498

Ghi chú: Các số liệu có cùng chữ số theo sau trong cùng một cột thì khác biệt không ý nghĩa mức ý nghĩa 95%, (*): Trung bình 3 lần lặp lại.

Mẫu khổ qua được lấy kiểm tra chỉ tiêu nitrat được lấy để kiểm tra hàm lượng nitrat cho thấy hàm lượng nitrat trên các mẫu khổ qua của các nghiệm thức đều đạt yêu cầu về hàm lượng nitrat ở các thời điểm 2, 4, 8 ngày sau khi bón phân đạm. So với đối chứng bón theo nông dân, sử dụng Bioroot giúp giảm lượng phân đạm bón cho cây mà không làm ảnh hưởng năng suất, góp phần giảm ô nhiễm môi trường.

Kết quả nghiên cứu này tương tự với kết quả thí nghiệm của Nguyễn Văn Lẹ và Cao Ngọc Điệp (2012) cho thấy việc sử dụng phân bón vi sinh góp phần tiết kiệm từ 25% phân bón hóa học cho đậu bắp và ớt sừng vàng, đến 50% phân bón hóa học cho cà sọc lem lai mà năng suất vẫn tương đương với nghiệm thức bón 100% phân hóa học. Đồng thời phẩm chất sản phẩm từ các nghiệm thức sử dụng phân bón vi sinh được cải thiện thông qua hàm lượng nitrate trong quả thấp hơn nghiệm thức bón 100% phân hóa học[14].

4. KẾT LUẬN

Chế phẩm bón gốc (Phân hữu cơ vi sinh Bioroot) là một sản phẩm khoa học công nghệ được chuyển giao thông qua một dự án nông thôn miền núi từ cơ quan nghiên cứu ứng dụng cấp trung ương xuống cơ quan nghiên cứu ứng dụng cấp địa phương. Trong thời gian dài, sản phẩm đã được địa phương tiếp nhận, thử nghiệm, nghiên cứu ứng dụng trên nhiều chủng loại rau và trên nhiều địa bàn khác nhau cho thấy sự phù hợp của sản phẩm với các vùng sản xuất rau an toàn trong và ngoài tỉnh.

Từ năm 2016, Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học - Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang đã bắt đầu tiến hành các bước đăng ký hợp quy và đăng ký kinh doanh để có thể lưu hành sản phẩm trên thị trường, song song với việc mở rộng nghiên cứu ứng dụng sản phẩm trên cây ăn quả và bước đầu đạt được kết quả khả quan.

Trung tâm cũng đã tiến hành vay vốn từ Quỹ phát triển khoa học và công nghệ tỉnh để thực hiện Dự án "Xưởng sản xuất phân hữu cơ vi sinh Bioroot", đầu tư thêm máy móc, thiết bị để có khả năng sản xuất số lượng lớn sản phẩm đáp ứng nhu cầu sản xuất rau, quả an toàn trong và ngoài tỉnh./.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Sỹ Nguyên (2020). Hướng tới vùng chuyên canh nông sản an toàn, truy cập online theo địa chỉ: http://baoapbac.vn/kinh-te/201804/huong-toi-vung-chuyen-canh-nong-san-an-toan-790901/, truy cập ngày 12/10/2020.

[2] Trần Thị Như Thùy (2016). Nghiên cứu ứng dụng công nghệ thủy canh vào nông nghiệp đô thị Tiền Giang. Báo Báo cáo tổng kết Đề tài nghiên cứu khoa học. Trường Đại học Nguyễn Tất Thành. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[3] Trần Hoàng Phúc (2019). Xây dựng mô hình canh tác rau ăn lá ứng dụng công nghệ thủy canh tại Thị trấn Chợ Gạo, Tiền Giang. Báo cáo tổng kết Dự án sản xuất thử nghiệm. Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học Tiền Giang. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[4] Hồ Ngọc Hân (2019). Ứng dụng công nghệ cao trong canh tác các loại rau quy mô hộ gia đình trên địa bàn huyện Cái Bè. Báo cáo tổng kết Dự án sản xuất thử nghiệm. Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học Tiền Giang. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[5] Nguyễn Thị Thanh Trúc (2019). Khí canh trụ đứng - Giải pháp mới cho nông nghiệp xanh. Tập san khoa học và công nghệ tháng 2/2019. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[6] Trần Hoàng Dũng, 2016. Nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh để sản xuất giá thể hữu cơ sạch từ phế phụ liệu nông nghiệp phục vụ nhu cầu trồng hoa và rau sạch tại tỉnh Tiền Giang. Báo Báo cáo tổng kết Đề tài nghiên cứu khoa học. Trường Đại học Nguyễn Tất Thành - Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[7] Lê Sĩ Ngọc (2016). Đề tài "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ cao trong sản xuất, sơ chế, đóng gói và bảo quản rau quả". Báo Báo cáo tổng kết Đề tài nghiên cứu khoa học. Trung tâm Nghiên cứu & Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao TP. Hồ Chí Minh. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[8] Nguyễn Hồng Thủy (2018). Ứng dụng công nghệ cao sản xuất rau theo hướng nông nghiệp đô thị. Tạp chí khoa học và công nghệ Việt Nam, số 8/2018.

[9] Nguyễn Thị Hữu Hạnh (2010). Xây dựng mô hình sản xuất và ứng dụng chế phẩm sinh học phục vụ rau - quả an toàn. Báo cáo tổng kết Dự án sản xuất thử nghiệm. Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học Tiền Giang. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

[10] Nguyễn Hồng Thủy và Võ Thị Nhất (2015). Xây dựng mô hình sản xuất rau an toàn đạt chứng nhận VietGAP tại 3 huyện Cần Đước, Cần Giuộc, Đức Hòa tỉnh Long An. Báo cáo tổng kết Dự án Khoa học và Công nghệ. Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học Tiền Giang. Sở Khoa học và Công nghệ Long An.

[11] Phạm Xuân Lân (2007). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại phân hữu cơ vi sinh tới năng suất, hàm lượng NO_3^- của rau cải bắp và hóa tính đất trồng rau tại thị xã Hà Giang. Luận Văn Thạc Sĩ. Đại học Nông lâm Thái Nguyên.

[12] Trần Thị Mai Lan, Nguyễn Thị Thanh Hương, Chu Thị Bích Ngọc (2019). Sinh trưởng và một số chỉ tiêu chất lượng của cây cải ngọt *(Brassica integrifolia)* dưới ảnh hưởng của phân ủ hữu cơ Biochar. Trường Đại học Hùng Vương, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Tập 14, Số 1 (2019): 47-53.

[13] Cao Ngọc Điệp, Nguyễn Thanh Tùng, Nguyễn Vân Anh và Trần Thị Giang (2011). Hiệu quả của phân hữu cơ - vi sinh trên năng suất và chất lượng rau xanh. Trường Đại học Cần Thơ, Tạp chí Khoa học 2011:18b, tr. 18-28.

[14] Nguyễn văn Lẹ và Cao Ngọc Điệp (2012). Hiệu quả phân bón vi sinh đến năng suất rau xanh (rau ăn quả) trồng trên đất phù sa huyện Ô Môn Thành phố Cần Thơ. Trường Đại học Cần Thơ, Tạp chí Khoa học 2012:23a, tr.213-223.

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TƯỚI TIẾT KIỆM NƯỚC CHO VƯỜN CÂY THANH LONG TỈNH TIỀN GIANG THÍCH ỨNG VỚI BIẾN ĐỔI KHÍ HẬU

Nguyễn Hồng Thủy

Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm - Trường Đại học Tiền Giang

Tác giả liên hệ: nguyenhongthuy@tgu.edu.vn; ĐT: 0984626327

TÓM TẮT

Là cây trồng chủ lực của tỉnh Tiền Giang với những vùng chuyên canh rộng lớn nên cây thanh long luôn được tỉnh quan tâm đầu tư nghiên cứu ứng dụng khoa học công nghệ để giải quyết các hạn chế tồn tại trong sản xuất. Đặc biệt, trong tình hình nước ngọt trở nên khan hiếm do biến đổi khí hậu, xâm nhập mặn, việc nghiên cứu ứng dụng, chuyển giao công nghệ tưới tiết kiệm nước cho người dân trồng thanh long có ý nghĩa hết sức quan trọng đối với triển vọng duy trì và phát triển diện tích trồng thanh long trên địa bàn tỉnh. Bài viết giới thiệu 03 đề tài nghiên cứu ứng dụng công nghệ tưới tiết kiệm nước đã và đang được triển khai trên địa bàn tỉnh, từ quy mô nhỏ đến quy mô lớn, từ vận hành thủ công đến điều khiển tự động nhằm giảm được công lao động tưới, góp phần giảm chi phí sản xuất, nâng cao thu nhập cho người trồng, khắc phục được tình trạng thiếu nước trong mùa khô, nhất là trong điều kiện nguồn nước ngày càng cạn kiệt do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu.

Từ khóa: *thanh long, ứng dụng, công nghệ tưới, tiết kiệm nước.*

RESEARCH ON APPLICATION OF WATER-SAVING WEDDING TECHNOLOGY FOR THANH LONG GARDEN TIEN GIANG PROVINCE, ADAPTING TO CLIMATE CHANGE

Nguyen Hong Thuy

The Department of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University

Corresponding author: nguyenhongthuy@tgu.edu.vn

Corresponding author: nguyenhongthuy@tgu.edu.vn0984626327

ABSTRACT

As the main crop of Tien Giang province with many large specialized cultivation areas, dragon fruit trees have been taken into consideration of investing in research and application of science and technology to solve shortcomings in production. Especially, when fresh water becomes scarce due to climate change and saltwater intrusion, the applied research and technological transfer of water-saving irrigation to dragon fruit growers are of very important significance to the prospects for dragon fruit area maintenance and development. This article introduces 03 research projects on application of water-saving irrigation technology that have been deployed in the province, from small to large scale, from manual operation to automatic control to reduce labor to irrigate, contribute to reduce production costs, increase income for growers, overcome water shortages in the dry season, especially in conditions of increasingly depleted water resources due to the effects of climate change.

Keywords: *dragon fruit, application, irrigation technology, water saving*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tiền Giang là một trong các tỉnh đứng đầu cả nước về diện tích và sản lượng thanh long. Cây thanh long được trồng tại Tiền Giang cách đây hơn 25 năm và có mức tăng trưởng mạnh về diện tích, năng suất, sản lượng. Tỉnh hiện có 9.070 ha thanh long, diện tích cho thu hoạch 6.638 ha, sản lượng mỗi năm 200.517 tấn quả; tập trung nhiều nhất ở huyện Chợ Gạo với 6.876 ha trong đó diện tích cho thu hoạch 5.134 ha và sản lượng 155.130 tấn/năm (Niên giám thống kê, 2019). Là một trong những cây trồng chủ

lực của tỉnh, cây thanh long luôn được các cấp lãnh đạo quan tâm chỉ đạo đầu tư phát triển (Quyết định 3788/QĐ-UBND ngày 01/12/2008 về việc phê duyệt Đề án phát triển cây thanh long huyện Chợ Gạo, tỉnh Tiền Giang, Quyết định số 783/QĐ-UBND ngày 11/4 2013 của Ủy ban nhân dân tỉnh về việc cho phép triển khai Chương trình Hỗ trợ ứng dụng công nghệ cao sản xuất 100 ha thanh long (*Hylocereus undatus*) vùng Chợ Gạo, Tiền Giang, Quyết định số 1882/2017/QĐ-UBND về việc Phê duyệt Đề án Phát triển cây thanh long tỉnh Tiền Giang đến năm 2025). Từ đó, việc nghiên cứu ứng dụng khoa học công nghệ góp phần giải quyết các hạn chế tồn tại trong canh tác thanh long đã và đang được triển khai trong hơn một thập niên qua, giúp tăng năng suất, chất lượng trái, gia tăng sức hút thương mại cho sản phẩm thanh long. Đặc biệt, trong tình hình biến đổi khí hậu, xâm nhập mặn ngày càng xảy ra thường xuyên và gay gắt trên địa bàn tỉnh, nước ngọt trở nên khan hiếm, công nghệ tưới nước tiết kiệm cho cây thanh long đã và đang được quan tâm nghiên cứu ứng dụng tại Tiền Giang.

NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Các nghiên cứu ứng dụng công nghệ tưới tiết kiệm nước quy mô nhỏ

Khởi đầu phổ biến tại vùng chuyên canh thanh long Tiền Giang trước đây là phương pháp tưới thủ công, dùng ống dây dẫn nước tưới đến từng trụ thanh long. Phương pháp này tốn nhiều công sức, thời gian, chi phí cao cho lao động tưới giản đơn. Khoảng năm 2012, lần đầu tiên trên địa bàn tỉnh Tiền Giang xuất hiện hệ thống tưới nhỏ giọt sử dụng năng lượng mặt trời do Công ty Mono Ennergy lắp đặt thử nghiệm tại vườn thanh long của ông Võ Ngọc Diệp, Lương Hòa Lạc, Chợ Gạo, Tiền Giang mang lại một số hiệu quả nhất định như tiết kiệm nước tưới, tiết kiệm điện, tiết kiệm công tưới. Hệ thống tưới này có kết cấu khá đơn giản, bao gồm: một tấm panel (lắp hệ thống pin và bo mạch) để thu năng lượng mặt trời (biến quang năng thành điện năng); hộp điều khiển (được đấu với panel bằng 2 dây dẫn điện) gồm 1 đèn báo và nút lựa chọn các mức điện áp (gồm 5 mức điện áp một chiều: 180, 144, 108, 72 và 36 Vol) để cung cấp nguồn điện cho mô-tơ vận hành. Hệ thống bơm được vận hành bằng một mô-tơ điện 3 pha có công suất 750w (1 HP hay 1 mã lực) và hệ thống đường ống dẫn nước đến các gốc thanh long. Mỗi gốc thanh long được lắp 2 van tưới thấm (mỗi giờ cung cấp khoảng 1 lít nước), thời gian tưới từ 6-7 giờ/ngày, cách 3 ngày tưới 1 lần.

Đến năm 2015, trong khuôn khổ chương trình "Hỗ trợ ứng dụng công nghệ cao phát triển 100 ha Thanh Long *(Hylocereus undatas)* vùng Chợ Gạo, Tiền Giang", đề tài "Nghiên cứu chế tạo một số dụng cụ chuyên dùng trong kỹ thuật canh tác thanh long nhằm giảm chi phí và lao động" đã nghiên cứu chế tạo, lắp đặt hệ thống tưới phun mưa cho 1.000 m^2 và hệ thống tưới nhỏ giọt cho 1.000 m^2 mô hình thanh long trồng trụ ở Chợ Gạo, có thể điều khiển được bằng tay hoặc tự động kết hợp bón phân hóa học như sau:

(i) Hệ thống tưới phun mưa bao gồm: Máy bơm nước được sử dụng có công suất 3HP, hút nước trực tiếp từ kênh. Nước trước khi vào máy bơm đã được lược bỏ rác sơ bộ nhờ lưới được bọc ở lúp-bê, điều này giúp làm giảm hiện tượng nghẹt ở các vòi tưới phun. Đường ống chính từ máy bơm đến các van điện từ là ống Φ 90 mm, ống phụ và ống dẫn tới các béc tưới có đường kính lần lượt là 42 mm và 21 mm. Máy bơm tại mỗi thời điểm có thể cấp nước cho khoảng 60 béc. Ở phần hệ thống tưới phun, tưới cho 129 trụ thanh long, lắp 147 béc, phân chia thành 3 nhóm, mỗi nhóm được điều khiển việc cấp nước thông qua van điện từ Φ 60 mm. Mắc nối tiếp với van điện từ là 2 van điều khiển bằng tay Φ 60 mm, điều này giúp người trồng thanh long có thể điều khiển việc cấp nước thủ công cho từng nhóm béc tưới khi van điện từ gặp sự cố. Ống cấp nước trực tiếp cho các đầu phun mưa có đường kính Φ 21 mm. Các đầu phun mưa

được lắp đặt giữa các hàng trụ thanh long nhưng vẫn đảm bảo giữ lối đi cho quá trình chăm sóc và thu hoạch (Hình 1a).

(ii) Hệ thống tưới nhỏ giọt bao gồm: Máy bơm được dùng để bơm nước từ kênh lên bồn có công suất nhỏ (0,5 HP). Bồn được sử dụng là bồn nhựa có thể tích 300 lít. Thời gian để máy bơm nước đầy bồn là 4 phút. Khi bồn đầy, lượng nước trong bồn đủ cung cấp nước cho hệ thống nhỏ giọt trong khoảng thời gian 20 phút. Trên nắp của bồn có lắp công tắc phao điện để hệ thống tự ngắt máy bơm khi bồn đầy nước và tự bật máy bơm khi bồn cạn nước. Nước trước khi được đưa đến hệ thống ống nhỏ giọt phải được đi qua van điện từ và van lọc. Van điện từ có kích thước Φ 27 mm, việc sử dụng van điện từ nhằm phục vụ cho nhu cầu tưới tự động theo yêu cầu về thời gian, nhiệt độ và độ ẩm, van điện từ sẽ mở cho nước đi qua khi được cấp nguồn điện 220VAC. Sau khi qua van điện từ, trước khi được đưa vào hệ thống ống nhỏ giọt thì nước phải được đưa qua bộ lọc đĩa. Đây là yêu cầu bắt buộc bởi các lỗ nhỏ giọt có kích thước rất nhỏ, nếu sử dụng nguồn nước trực tiếp từ kênh hoặc chỉ lọc bằng lưới thì sẽ bị hiện tượng nghẹt các lỗ nhỏ giọt. Bộ lọc được sử dụng có đường kính 3,8 cm, kích thước lỗ lọc 120 mesh, cho lưu lượng nước tối đa lên đến 8 m^3/h. Bộ lọc này có khả năng lọc các bụi bẩn rong rêu nhỏ, bộ lọc được vệ sinh định kỳ bằng tay. Đường ống chính là ống PVC có đường kính 42 mm, ống này dẫn nước từ bộ lọc đến đầu mỗi hàng. Tại đầu mỗi hàng, ống chính được giảm kích thước để kết nối với ống PE có đường kính Φ 16 mm. Ống PE sẽ được dẫn chạy dọc ở mỗi hàng, đi ngang qua từng gốc thanh long. Tại mỗi gốc thanh long, ống nhỏ giọt sẽ được kết nối với các ống nhánh PE bằng các đầu nối chuyên dụng. Ống này có kích thước rất bé (Φ 8 mm), ống quấn quanh gốc cây (Hình 1b), trên ống nhỏ giọt các lỗ nhỏ giọt được bố trí cách nhau 20 cm, trung bình mỗi gốc có từ 10 đến 12 lỗ nhỏ giọt.



A



B

Hình 1. (a) Đầu phun mưa được lắp giữa hàng trụ thanh long; (b) Ống nhỏ giọt được quấn quanh trụ thanh long

(Nguồn: Nguyễn Thành Long và Nguyễn Quang Sáng, 2015)

Đây là hệ thống tưới phun mưa và tưới nhỏ giọt có thể được điều khiển bằng tay hoặc tự động kết hợp bón phân hóa học. Hệ thống điều khiển này được thiết kế và lắp đặt gọn nhẹ, thao tác đơn giản, dễ vận hành và bảo dưỡng đối với nông dân. Hệ thống có cấu tạo đơn giản, giá thành thấp.

Năm 2019, Trung tâm Kỹ thuật và Công nghệ sinh học (đơn vị sự nghiệp thuộc Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang) thông qua đề tài "Nghiên cứu xây dựng mô hình vườn thanh long kiểu mẫu ứng dụng công nghệ cao tại xã Kiểng Phước, huyện Gò Công Đông, tỉnh Tiền Giang" đã nghiên cứu trang bị, lắp đặt hệ thống tưới tiết kiệm nước cho mô hình vườn thanh long kiểu mẫu 0,2 ha tại xã Kiểng Phước huyện Gò Công Đông tỉnh Tiền Giang. Hệ thống tưới thanh long 0,2 ha được thiết kế gồm hệ

thống bồn pha phân, hồ chứa nước, máy bơm nước, vật tư, phụ kiện hệ thống tưới. Hệ thống ống chính PVC Φ 90 Bình Minh; hệ thống ống nhánh PVC Φ 60 Bình Minh; hệ thống béc phun, các phụ kiện điện nước. Tại khu vực điều hành trung tâm: 01 hồ chứa nước tưới và pha phân bón bằng xi măng 27 m^3 kích thước 6m x 2m x 1,5m; 01máy bơm 03 Hp cho 2 khu vực tưới, bộ lọc, bộ phận hút tưới phân qua hệ thống tưới phun. Vườn thanh long chia ra làm 02 khu vực, mỗi khu vực có 2 hệ thống: (1) tưới béc phun tưới gốc bù áp kết hợp bón phân, (2) tưới xả đầu trụ bù áp kết hợp phun thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) (Hình 2) nhằm đảm bảo cung cấp đầy đủ nước cho vườn thanh long vào mùa khô, rửa sương muối cho cây thanh long khi cần thiết, tránh bệnh nám cành do nắng nóng làm bỏng mô cây tạo điều kiện cho nấm mốc phát triển, tạo độ ẩm cần thiết cho vườn thanh long vào mùa khô, kết hợp phun thuốc BVTV giúp người trồng không phải tiếp xúc trực tiếp với thuốc BVTV.



Hình 2. Hệ thống tưới béc phun tưới gốc bù áp kết hợp bón phân và hệ thống tưới xả đầu trụ bù áp kết hợp phun thuốc BVTV

Đây là hệ thống tưới phun mưa 2 trong 1 vừa dùng béc tưới gốc (kết hợp bón phân) vừa dùng béc tưới xả đầu trụ (kết hợp phun thuốc BVTV), điều khiển bằng tay. Hệ thống có cấu tạo đơn giản, vận hành thủ công, thao tác đơn giản, dễ bảo dưỡng, giá thành thấp. Mùa khô năm 2019-2020, hạn mặn kéo dài làm cạn kiệt các nguồn nước ngọt tại khu vực Gò Công Đông – Tiền Giang. Việc ứng dụng công nghệ tưới tiết kiệm nước, lượng nước sử dụng cho cây rất ít nhưng vẫn đảm bảo thấm sâu, cùng với việc tủ gốc kỹ, bón nhiều phân hữu cơ đã giúp cho vườn cây thanh long vượt qua được giai đoạn thời tiết khắc nghiệt. Hiện vườn cây đã phục hồi tốt sau hạn mặn và đang cho trái vụ nghịch.

Các nghiên cứu ứng dụng công nghệ tưới tiết kiệm nước quy mô lớn

Năm 2020, Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và dịch vụ khoa học công nghệ (đơn vị sự nghiệp thuộc Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang) thông qua đề tài "Nghiên cứu xây dựng mô hình vườn thanh long kiểu mẫu ứng dụng công nghệ cao" tiếp tục tập trung nghiên cứu, lắp đặt một hệ thống tưới thông minh hoàn chỉnh cho mô hình vườn thanh long kiểu mẫu 2 ha tại xã Thanh Bình huyện Chợ Gạo tỉnh Tiền Giang. Hệ thống tưới này được thiết kế gồm hai kiểu tưới: tưới phun mưa gốc (béc thấp) kết hợp bón phân và tưới phun mưa đầu trụ (béc cao) kết hợp phun thuốc. Trên diện tích 2 ha được chia làm 6 ô tưới: ô tưới số 1 đến ô tưới số 4, mỗi ô có 26 line trồng thanh long, mỗi line dài 38 m; ô tưới số 5 và số 6 mỗi ô tưới có 40 line trồng thanh long, chiều dài mỗi line là 25 m. Trên mỗi ô tưới được lắp đặt 2 van điện từ để điều khiển hai kiểu tưới, mỗi lần tưới một ô cho một kiểu tưới. Hai kiểu tưới với các thông số kỹ thuật như sau: kiểu tưới béc thấp lưu lượng nước tưới là 35 - 40 m^3/h cho một ô tưới;

kiểu tưới béc cao lưu lượng nước tưới là 25 - 30 m^3/h cho một ô tưới; áp suất nước tại béc tưới của hai kiểu tưới phải lớn hơn 0,8 bar (Hình 3).



Hình 3. Hệ thống tưới hoạt động theo từng khu vực riêng rẻ

Hệ thống tưới được trang bị 5 máy bơm (Q=40 - 200 L/phút; H=66 - 40 m; Công suất 3Hp - 220V - 50Hz), trong đó hoạt động thường trực từ 3 - 4 máy bơm, còn lại là dự phòng. Hệ thống tưới được trang bị 4 lọc dĩa 30 micron, công suất mỗi lọc 40 m^3/h (được thiết kế rửa nhanh khi bị nghẹt); đồng hồ đo áp và bộ van xả khí tự động làm nhiệm vụ thoát khí ra ngoài, để tránh hiện tượng hình thành bọt khí gây cản trở dòng chảy. Ngược lại, khi ngừng cấp nước, van có tác dụng đưa không khí vào để tránh phát sinh chân không trong đường ống. Hệ thống ống kết nối với bơm là ống PVC Φ 90 và Φ 114 kết hợp với bộ phận hút phân (hoặc thuốc BVTV) được nối với bồn chứa phân (hoặc thuốc BVTV) 2 m^3 bằng vật liệu composite. Nước tưới được lấy từ mương chứa có dung tích khoảng 120 m^3 (kích thước: 20m x 3m x 2m), lượng nước trên mương được bổ sung liên tục từ giếng khoan.

Hệ thống ống dẫn chính PVC Φ 90 dẫn từ bơm đến hệ thống ống nhánh PVC Φ 60 của từng ô tưới, mỗi ô tưới có hai hệ thống ống nhánh cho béc tưới thấp và béc tưới cao. Tại mỗi ô tưới ống nhánh được kết nối với ống chính bằng van điện từ, bố trí 12 van điện từ (6 van cho 6 ô tưới béc thấp và 6 van cho 6 ô tưới béc cao). Đối với béc tưới thấp, ống dẫn trên từng line (hàng trồng) sử dụng ống LDPE Φ 20 được cố định trên các trụ trồng (trụ bê tông) cách mặt đất 25 cm kết nối với ống nhánh PVC Φ 60, trên đường ống này bố trí các béc tưới phun mưa cục bộ (loại béc chống côn trùng, 25 - 45L/h) khoảng cách các béc là 0,8 m. Đây là loại béc chống côn trùng phun mưa cục bộ có nắp chặn và lỗ thoát nước nhỏ, có khả năng chống được côn trùng, mối, kiến, nhện ... chui vào ẩn nấp làm nghẹt béc. Đối với béc tưới cao, ống dẫn trên từng line sử dụng ống PVC Φ 27 kết nối với ống nhánh PVC Φ 60, trên đường ống này kết nối với các trụ tưới bằng ống PVC Φ 27 cao 2 m cố dịnh trên các trụ trồng (trụ bê tông), trên đỉnh gắn béc tưới phun mưa đầu trụ (loại béc phun mưa tự quay, 95 - 100L/h) khoảng cách các béc là 5 m. Tất cả các ống PVC được chôn trong đất để chống lão hóa.

Mỗi ô tưới (béc thấp hoặc béc cao) được điều khiển bởi một van điện từ. Van điện từ đóng, mở bằng áp suất thủy lực thông qua solenoid được điều khiển bởi dòng điện 24V DC. Áp suất hoạt động của van từ 0,35 - 10bar, đường kính van Φ 90, lưu

lượng 15 - 80m^3/h. Van có 3 chế độ hoạt động: tự động (auto), mở (open) và đóng (close).



Hình 4. Bộ điều khiển hệ thống tưới

Hệ thống tưới được điều khiển bởi tủ điện; tủ điện được lắp bộ điều khiển bơm tưới và hệ thống 12 van điện từ bằng ứng dụng trên smartphone thông qua sóng điện thoại (điều khiển bằng app trên smartphone không sử dụng tin nhắn SMS) hoặc điều khiển bằng tay. Người dùng có thể điều khiển bật, tắt tức thời hoặc hẹn giờ cho từng van làm việc độc lập nhau theo thời gian thực. Thời gian bật, tắt một van từ một phút tới 9999 phút và mỗi van được lập được 5 mốc bật, tắt/1 ngày. Với việc sử dụng sóng GSM (Global System for Mobile Communications) tương tác với các nhà mạng viễn thông (Viettel, Mobifone, Vinaphone) nên có thể điều khiển ở bất cứ nơi nào có sóng điện thoại (chỉ cần nghe gọi 2 chiều) mà không cần wifi, 3G, 4G. Có mật khẩu bảo vệ, có chế độ phân quyền, chỉ người chủ mới điều khiển được thiết bị. Có thể tra cứu thông tin, trạng thái đóng, mở của từng van. Khi một van từ được mở thì máy bơm mới được bật theo thông qua khởi động từ và các relay nhiệt bảo vệ quá dòng cho máy bơm. Điều này tránh việc máy bơm bật trước van từ làm vỡ đường ống hoặc hỏng van do áp suất đường ống lên cao. Bộ điều khiển còn được tích hợp cổng thường đóng (NC) và cổng thường mở (NO) dùng để đấu nối với những bộ cảm biến: cảm biến ẩm, cảm biến mưa (điều khiển ngưng tưới khi trời mưa hoặc độ ẩm đất còn cao,..), cảm biến áp suất bảo vệ đường ống không bị vỡ (khi quá áp do van từ không mở-do đường dây bị đứt hoặc nguồn điện có vấn đề), cảm biến báo cạn nước khi mà nước trong mương bị cạn hoặc luppe bơm bị rò. Khi đó bộ điều khiển sẽ ngắt máy bơm và gửi cảnh báo cho người dùng biết sự cố dưới dạng tin nhắn SMS và đồng thời gọi điện thoại cho người quản lý (Hình 4).

Van điện từ đóng, mở bằng áp suất thủy lực thông qua solenoid được điều khiển bởi dòng điện 24V DC. Do solenoid được lắp rời trên van thông qua các ống dẫn thủy lực, do đó khi lắp đặt solenoid được tách ra khỏi van và lắp tại nhà điều hành sau đó solenoid kết nối và điều khiển van thông qua ống dẫn thủy lực (thay cho dây điện), vừa đảm bảo an toàn và tiện dụng khi vận hành (Hình 5). Mặt khác, với cách lắp đặt này khi muốn điều khiển tưới bằng tay, người vận hành có thể điều khiển van thông qua nút xoay về vị trí open trên solenoid mà không phải đến các ô tưới để điều khiển van. Đây là cải tiến mang lại lợi ích lớn nhất cho chủ vườn vì chỉ cần một hệ thống đường dẫn nước nhỏ, được dẫn ngầm ra 12 van điện từ ngoài đồng, không cần dẫn thêm đường dây điện vừa tốn kém, vừa mất an toàn, vừa tốn công đi mở đóng từng van điện từ.



Hình 5. Bộ phận điều khiển thuỷ lực cho các van điện từ

Đây là hệ thống tưới thông minh kiểm soát được lượng nước tưới kết hợp với việc thời gian tưới nhằm xác định chính xác lượng nước được tưới đảm bảo tưới đủ và tiết kiệm cho vườn thanh long; hệ thống được tích hợp rất nhiều tính năng tiện dụng cho người vận hành như điều khiển qua ứng dụng (không cần ghi nhớ cú pháp soạn tin nhắn SMS để điều khiển như những thiết bị điều khiển khác qua sóng điện thoại), tích hợp các cảm biến để điều khiển tưới nhằm tiết kiệm nước tưới, hệ thống van điện từ điều khiển linh hoạt và tiện dụng,…

KẾT LUẬN

Qua nhiều năm thực hiện các đề tài nghiên cứu ứng dụng, chuyển giao công nghệ tưới tiết kiệm nước cho người dân trồng thanh long tỉnh nhà, ngành khoa học và công nghệ tỉnh Tiền Giang đã ứng dụng được khoa học công nghệ phục vụ đời sống người dân, cụ thể đã đưa các giải pháp tưới tiết kiệm vào thực tiễn sản xuất từ quy mô nhỏ đến quy mô lớn, từ vận hành thủ công đến điều khiển tự động, giúp giảm công lao động tưới, góp phần giảm chi phí sản xuất, nâng cao thu nhập cho người trồng, khắc phục được tình trạng thiếu nước trong mùa khô, nhất là trong điều kiện nguồn nước ngày càng cạn kiệt do ảnh hưởng của biến đổi khí hậu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dương Văn Bon, Lê Hoàng Việt (2020). Nghiên cứu xây dựng mô hình vườn thanh long kiểu mẫu ứng dụng công nghệ cao tại xã Kiểng Phước, huyện Gò Công Đông, tỉnh Tiền Giang. Báo cáo nội dung khoa học, tiến độ thực hiện nhiệm vụ (phục vụ đánh giá, nghiệm thu giai đoạn). Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

Phan Hà, Nguyễn Văn Hòa, Nguyễn Văn Mẫn (2020). Nghiên cứu xây dựng mô hình vườn thanh long kiểu mẫu ứng dụng công nghệ cao. Chương trình "Hỗ trợ ứng

dụng công nghệ cao phát triển 100 ha Thanh Long *(Hylocereus undatas)* vùng Chợ Gạo, Tiền Giang". Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và dịch vụ khoa học công nghệ. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

Nguyễn Thành Long, Nguyễn Quang Sáng (2015). Nghiên cứu chế tạo một số dụng cụ chuyên dùng trong kỹ thuật canh tác thanh long nhằm giảm chi phí và lao động. Chương trình "Hỗ trợ ứng dụng công nghệ cao phát triển 100 ha Thanh Long *(Hylocereus undatas)* vùng Chợ Gạo, Tiền Giang". Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và dịch vụ khoa học công nghệ. Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang.

NGHIÊN CỨU VẬT LIỆU THAY THẾ BẠCH CẦU, TIỂU CẦU VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT, ĐỘ ỔN ĐỊNH SỬ DỤNG CHO MẪU NGOẠI KIỂM HUYẾT HỌC

Võ Ngọc Nguyên[1,2,3*], Trần Hữu Tâm[3],Trương Quân Thụy[3], Vũ Đình Dũng[3] ,Nguyễn Thúy Hương[1,2]

[1]Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

[3]Trung tâm Kiểm chuẩn Xét nghiệm TP.HCM

Tác giả liên lạc: vnnguyen.sdh20@hcmut.edu.vn

TÓM TẮT

Kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học là một hoạt động bắt buộc của Bộ Y tế, để thực hiện được hoạt động này thì cần phải có mẫu ngoại kiểm huyết học chứa đựng các thành phần tế bào máu: hồng cầu, tiểu cầu, bạch cầu. Bạch cầu, tiểu cầu là tế bào kém bền trong số các tế bào máu nên không thể sử dụng tế bào bạch cầu, tiểu cầu người để làm mẫu ngoại kiểm. Nghiên cứu này nhằm điều chế vật liệu thay thế bạch cầu, tiểu người gọi là bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định và được đánh giá độ đồng nhất, độ ổn định để sử dụng làm mẫu ngoại kiểm huyết học. Phương pháp: xử lý, tách chiết và cố định các vật liệu thay thế trong dung dịch bảo quản, đánh giá độ đồng nhất và độ ổn định trong thời gian 100 ngày, ở nhiệt độ 2 – 8^{0}C. Kết quả: điều chế được vật liệu thay thế bạch cầu người từ hồng cầu ngỗng gọi là "bạch cầu giả định"; vật liệu thay thế tiểu cầu là hồng cầu dê gọi là "tiểu cầu giả định" bảo quản trong nước muối sinh lý và chứng minh mẫu sau điều chế đạt độ đồng nhất, độ ổn định trong 100 ngày, ở nhiệt độ 2 – 8^{0}C.

Từ khoá: *ngoại kiểm, bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định.*

STUDY WHITE BLOOD CELL AND PLATELET BY MATERIAL AND THE STABILITY, HOMOGEINITY USED IN SAMPLES OF HEMATOLOGY EQA SCHEME

Vo Ngoc Nguyen[1,2,3*], Tran Huu Tam[3], Truong Quan Thuy[3], Vu Dinh Dung[3], Nguyen Thuy Huong[1,2]

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh City University of Technology (HCMUT), 268 Ly Thuong Kiet Street, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

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

[3]Center for Standardization and Quality control in medical Lab of HCMC, 75A Cao Thang Street, District 3, Ho Chi Minh City, Vietnam

Corresponding Author: vnnguyen.sdh20@hcmut.edu.vn

ABSTRACT

External quality assessment (EQA) is a compulsory activity in Medical laboratories following to Ministry of Health regulations. In order to carry out, it is necessary to have EQA material containing blood cell elements at least red blood cells, white blood cells and platelets that among these white blood cells and platelets are unstable and unable to use material from human platelet in EQA samples. The aim of research is to find out a subtance obtained the stability and homogeinity that can be used to replace the real ones in the sample of Hematology EQA scheme. Method: selecting, fixing the material and evaluating the stability and homogenity within 100 days.Results: finding

out the materials that are similar to human white blood cells from goose blood cells and to platelets form goat blood cells for replacing in EQA samples which be called "fake white blood cells" and "fake platelets"; this research has studied and desmontrated the stability at least in 90 days as well as the homogenity of materials, can be used in samples of Hematology EQA scheme.
Suggestion: Lasting the study time of stability to define the maximum capacity in the stability of fake white blood cells and platelets.
Key words: *external quality assessment, fake white blood cells, fake platelet.*

TỔNG QUAN

Xét nghiệm huyết học là một trong những lĩnh vực xét nghiệm cơ bản và trọng yếu trong các xét nghiệm cận lâm sàng. Xét nghiệm huyết học góp phần rất lớn vào việc chẩn đoán và điều trị một số bệnh về máu. Vì vậy, kết quả xét nghiệm huyết học đòi hỏi phải có độ tin cậy cao, được kiểm soát chất lượng bằng công cụ như nội kiểm, ngoại kiểm [1-3].

Việc nghiên cứu và sản xuất mẫu ngoại kiểm huyết học đã được triển khai từ lâu trên thế giới. Kim et al. đã nghiên cứu mẫu ngoại kiểm huyết học sử dụng các nguồn nguyên liệu là hồng cầu người và hồng cầu động vật để thay thế bạch cầu và tiểu cầu như hồng cầu cá mập, cá sấu, gà tây, mẫu đọc được trên dòng máy huyết học tự động đo điện trở kháng và tán xạ ánh sáng của hãng Abbott và Streck [4], [5]. Ở Nhật Bản Y. Kawai et al. cũng đã sản xuất mẫu ngoại kiểm huyết học sử dụng máu tươi từ bệnh nhân và triển khai ngoại kiểm thông số bạch cầu ở 9 phòng xét nghiệm, tuy nhiên mẫu phải được phân tích trong vòng 8 giờ sau khi thu thập mẫu [6]. Ở Việt Nam hiện chưa có mẫu ngoại kiểm huyết học để thiết kế phù hợp bệnh cảnh của các phòng xét nghiệm, toàn bộ mẫu sinh phẩm huyết học trong chương trình ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm huyết học đang nhập khẩu từ nước ngoài, chủ yếu từ các công ty như Randox, Biorad. Chính vì vậy việc nghiên cứu sản xuất mẫu ngoại kiểm huyết học giúp cho các phòng xét nghiệm ở Việt Nam chủ động được nguồn mẫu và giảm chi phí mua mẫu. Để đáp ứng yêu cầu của một mẫu ngoại kiểm huyết học là thời gian bảo quản tối thiểu 3 tháng ở nhiệt độ 2 – 8^0C, 3 thành phần tế bào hồng cầu, bạch cầu, tiểu cầu và đảm bảo độ đồng nhất, tính ổn định của các tế bào. Tuy nhiên, Tế bào bạch cầu có trong máu người là những tế bào có nhân có sự khác biệt, đa dạng về hình dạng và kích thước dao động từ 10 - 15µm tùy thuộc vào thể loại bạch cầu. Số lượng tế bào bạch cầu trong máu người sức khỏe bình thường là 4-12 x 10^9/L trong khi ở các dạng bệnh lý số lượng này có thể thay đổi từ nhỏ hơn 4 x 10^9/L hoặc đến trên 12 x 10^9/L. Bạch cầu chỉ có thể tồn tại bên ngoài cơ thể người trong khoảng thời gian từ 6 - 9 ngày. Bạch cầu của người không thể sử dụng trong các mẫu kiểm tra chất lượng xét nghiệm nhằm đối chiếu hoặc làm chuẩn cho xét nghiệm phân tích công thức máu [8], [10].

Tiểu cầu trong máu người là một trong ba thành phần tế bào của máu, không nhân, có đường kính dao động trong khoảng từ 2 – 4 µm, có dạng hình đĩa dẹp. Số lượng tiểu cầu trong máu người bình thường 150 - 450 x 10^9/l, số lượng này biến đổi ngoài khoảng bình thường biểu hiện các dấu hiệu bệnh lý. Tiểu cầu sau khi được chiết tách tồn tại từ 24 giờ đến 5 ngày tùy thuộc vào điều kiện thu thập và trong hệ thống mở, tiểu cầu chỉ tồn tại tối đa 4 giờ [9]. Vì vậy tế bào tiểu cầu người không thể sử dụng để làm vật liệu ngoại kiểm.

Do đó, cần phải có vật liệu thay thế gần giống với bạch cầu, tiểu thật của người đảm bảo là thời gian bảo quản tối thiểu 3 tháng ở nhiệt độ 2 – 8^0C. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành điều chế từ vật liệu thay thế bạch cầu từ hồng cầu ngỗng, vật

liệu thay thế tiểu cầu từ hồng câu dê. Hồng cầu ngỗng là tế bào trứng dẹp ở hai đầu, có nhân ở giữa, có kích thước trung bình trong khoảng 12 – 14µm, tương đương với kích thước của bạch cầu người, số lượng hồng cầu trung bình ở ngỗng 4 tháng tuổi là 2,06 ± 0,08 x 10^{12}/L. Tương tự, hồng cầu ở dê có kích thước trong khoảng 3,09 – 3,60 µm (trung bình 3,39 µm), tương đối nhỏ nhất trong số các hồng cầu của các động vật khác và tương đương với kích thước của tiểu cầu người, sau khi điều chế tiến hành đánh giá độ đồng nhất, độ ổn định của 2 loại vật liệu này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Do các tế bào hồng cầu động vật có kích thước tương tự như bạch cầu và tiểu cầu của người nên sử dụng máu ngỗng để tạo mẫu bạch cầu giả định và hồng cầu từ máu dê làm vật liệu thay thế bạch cầu và tiểu cầu người. Đây là những động vật nuôi phổ biến và dễ thu thập mẫu ở Việt Nam. Máu toàn phần của ngỗng, dê được thu thập tại trại nuôi dê, ngỗng tại đường 164, ấp 5, xã Bình Mỹ, huyện Củ Chi, TP. HCM.

Chất kháng khuẩn, kháng nấm: neomycin sulfate, các dung môi ổn định tế bào máu: glycerol, ethylene glycol, formaldehyde và glutaraldehyde. Tất cả hóa chất từ hãng Sigma-Aldrich (Mỹ).

Phương pháp

Điều chế bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định từ các vật liệu thay thế:

Thu thập mẫu hồng cầu dê, ngỗng

Dê có độ tuổi từ 1,5 năm trở lên sẽ được lựa chọn để lấy mẫu máu toàn phần. Dung dịch máu dê được chứa trong các chai Duran 500ml đã tiệt trùng có chứa chất chống đông CPDA-1 (Citrate Phosphate Dextrose Adenin-1). Ngỗng có độ tuổi từ 5 tháng tuổi trở lên sẽ được lựa chọn để lấy mẫu máu toàn phần. Do lượng máu ngỗng rất ít và khó thu thập nên mỗi lượt thu thập sử dụng ống falcon 50ml đã tiệt trùng có chứa chất chống đông CPDA-1.

Để đảm bảo chất lượng, mẫu được đưa về phòng thí nghiệm và bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8^0C trước khi tiến hành phân tích.

Phân tích hồng cầu dê, ngỗng

Máu toàn phần ngỗng được gạn tách phần dịch nổi, phần cặn lắng chứa các tế bào máu được phết lam và áp dụng phương pháp nhuộm tế bào bằng dung dịch Wright-Giemsa, quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại X1000.

Máu toàn phần dê được thu thập và phân tích trên máy huyết học tự động và quan sát dưới kính hiển vi nhằm xác định nồng độ và hình thái các tế bào máu trước khi xử lý mẫu.

Điều chế tế bạo bạch cầu giả định

Máu toàn phần của dê, ngỗng được ly tâm ở 2000 vòng/phút trong 15 phút để tách hồng cầu và huyết tương. Thu nhận dịch lắng là hồng cầu và loại bỏ dịch nổi (huyết tương). Dịch lắng hồng cầu rửa bằng đệm đẳng trương PBS (Phosphate Buffered Saline) 03 lần để thu nhận hồng cầu sạch. Dịch hồng cầu rửa này hay còn gọi là bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định được cố định bằng đệm PBS, glutaraldehyde 25% và ethylenglycol 3%, có bổ sung kháng sinh neomycin sulfate 0,033%. Trộn đều hỗn hợp trên máy lắc: đối với tiểu cầu giả định trong 18 giờ ở nhiệt độ 37^0C, đối với bạch cầu giả định trong 1 giờ. Sau đó đem ly tâm 2000 vòng/phút trong 15 phút và thu nhận dịch lắng. Dịch lắng này được rửa bằng nước cất từ hai đến 2 – 3 lần cho đến khi mẫu trong không còn màu đỏ tán huyết thì dừng lại. Dịch bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định này đã được cố định hoàn toàn và bảo quản trong nước muối sinh lý.

Đánh giá độ động nhất bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định:

Mẫu bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định trong dung dịch bảo quản (100 ml) được trộn đều nhẹ nhàng và phân phối vào 50 lọ, mỗi lọ chứa 2 ml, chia thành 2 lô (tương đương với 25 lọ/lô). Lấy ngẫu nhiên 10% mẫu trong mỗi lô (3 lọ), đo số lượng bạch cầu có trong mỗi lọ, thực hiện lặp lại 3 lần, tính trung bình. Đánh giá độ đồng nhất của mẫu, sử dụng phương pháp kiểm định F và tính toán bằng phần mềm Excel [7].

Đánh giá độ ổn định bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định:

Song song với việc đánh giá độ đồng nhất của mẫu, tiến hành lấy ngẫu nhiên 1 lọ/lô/5 ngày để kiểm tra số lượng tiểu cầu trong 100 ngày, ở nhiệt độ 2 – 8^0C. Đánh giá độ ổn định của mẫu, sử dụng phương pháp kiểm định t [7].

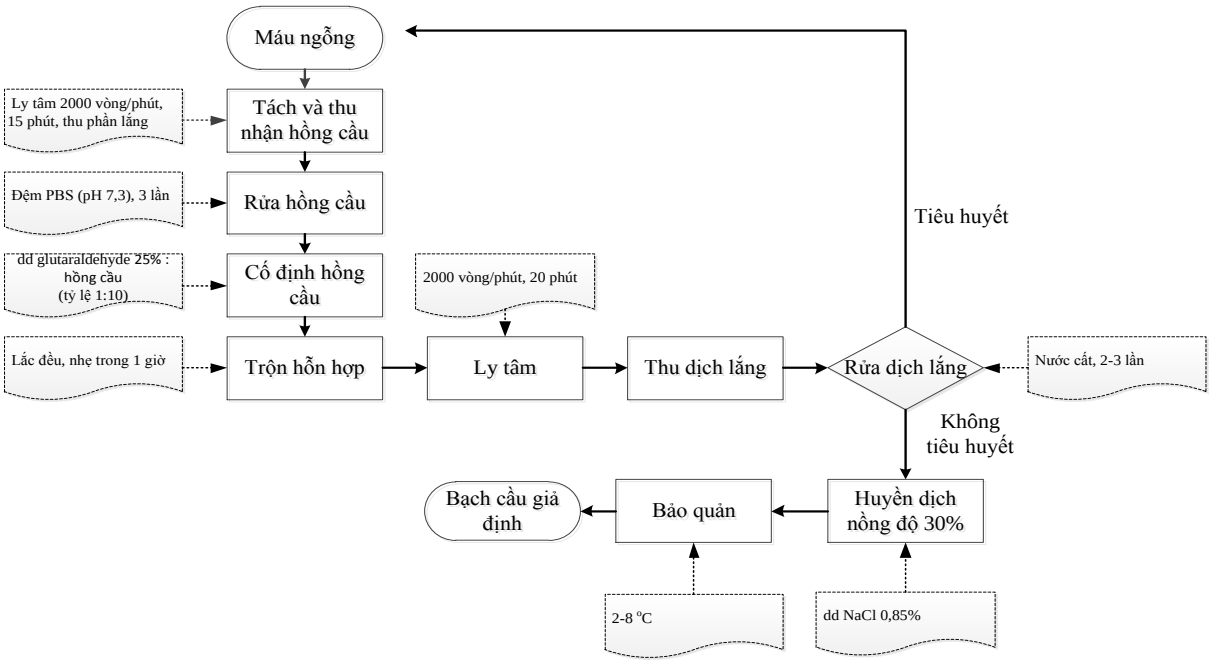
Phương pháp thống kê

Tính toán số liệu dựa trên phần mềm Excel 2010; Stata 10.0;

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

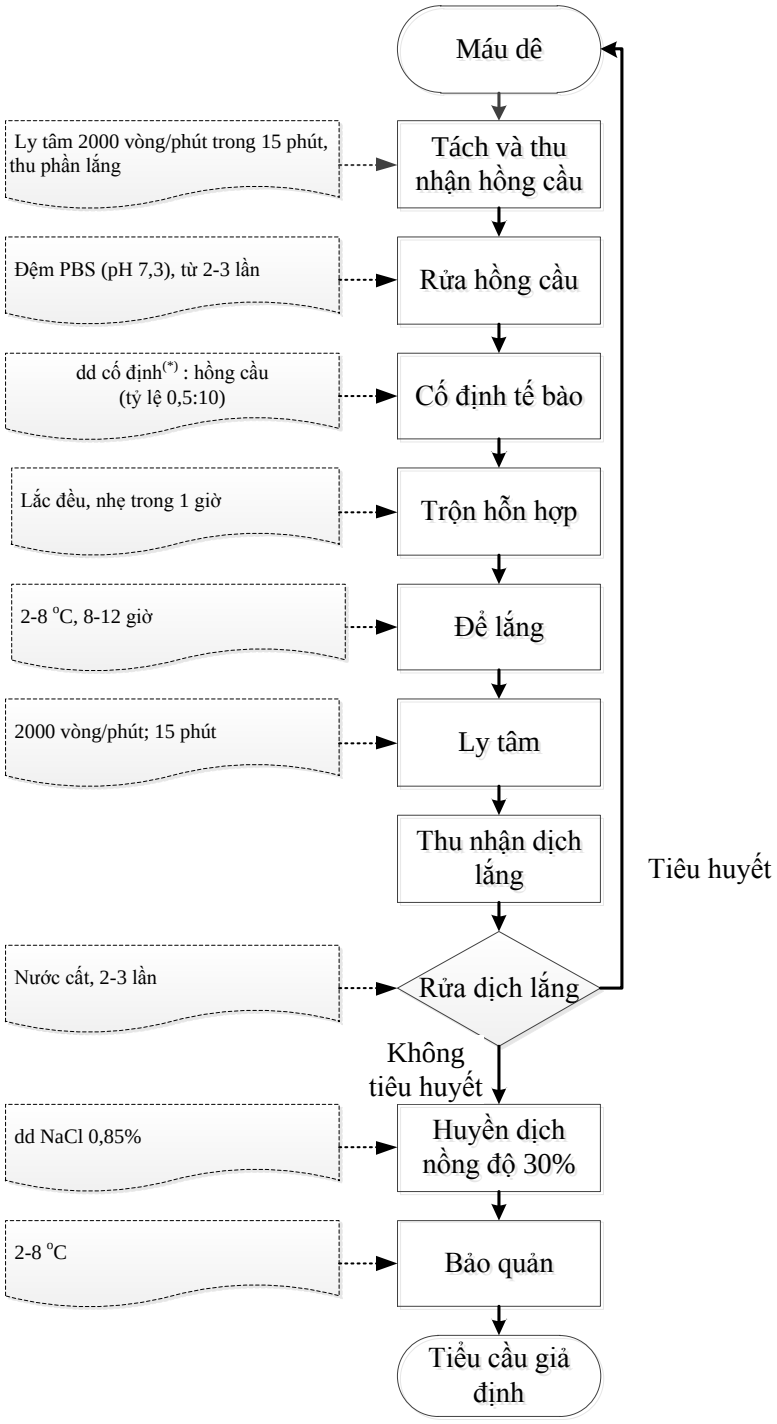
Kết quả điều chế bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định từ vật liệu thay thế

Máu toàn phần của dê, ngỗng sau khi thu thập, vận chuyển về phòng thí nghiệm, được điều chế theo các sơ đồ sau:



Hình 1. Sơ đồ chế tạo mẫu tế bào bạch cầu giả định

Bạch cầu giả định sau khi được điều chế từ vật liệu thay thế, tiến hành nhuộm Wright-Giemsa, quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại X1000, kết quả ghi nhận "bạch cầu giả định" khá đồng đều và bắt màu đạt yêu cầu.



Hình 2. Sơ đồ điều chế mẫu tiểu cầu giả định

Tiểu cầu giả định sau khi được điều chế từ vật liệu thay thế được quan sát dưới kính hiển vi có kích thước gần giống với tiểu cầu người. Do đó, tiểu cầu giả định được lựa chọn làm vật liệu thay thế cho tiểu cầu.

Kết quả kiểm tra độ đồng nhất của bạch cầu giả định

Mẫu bạch cầu giả định sau khi được điều chế từ vật liệu thay thế tiến hành đánh giá độ đồng nhất, thu được kết quả theo bảng 1.

Bảng 1. Kết quả độ đồng nhất mẫu bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định

Lọ	Số lượng bạch cầu (10^9/L)	
	Lô 1	Lô 2
1	5,82	5,60
2	5,61	5,56

Lọ	Số lượng bạch cầu (10^9/L)	
	Lô 1	Lô 2
3	5,72	5,52
	Số lượng tiểu cầu (10^9/L)	
1	110	111
2	111	111
3	109	110

Giả thiết rằng H_0: $S_1^2 = S_2^2$ là 2 lô mẫu đồng nhất và H_1: $S_1^2 \neq S_2^2$ là 2 lô mẫu không đồng nhất (mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$), kết quả $F_{\text{thực nghiệm}} = 6,4606 < F_{\text{lý thuyết}} = 19$ nên chấp nhận giả thiết H_0. Như vậy, số lượng bạch cầu giả định ở các lọ là đồng nhất.

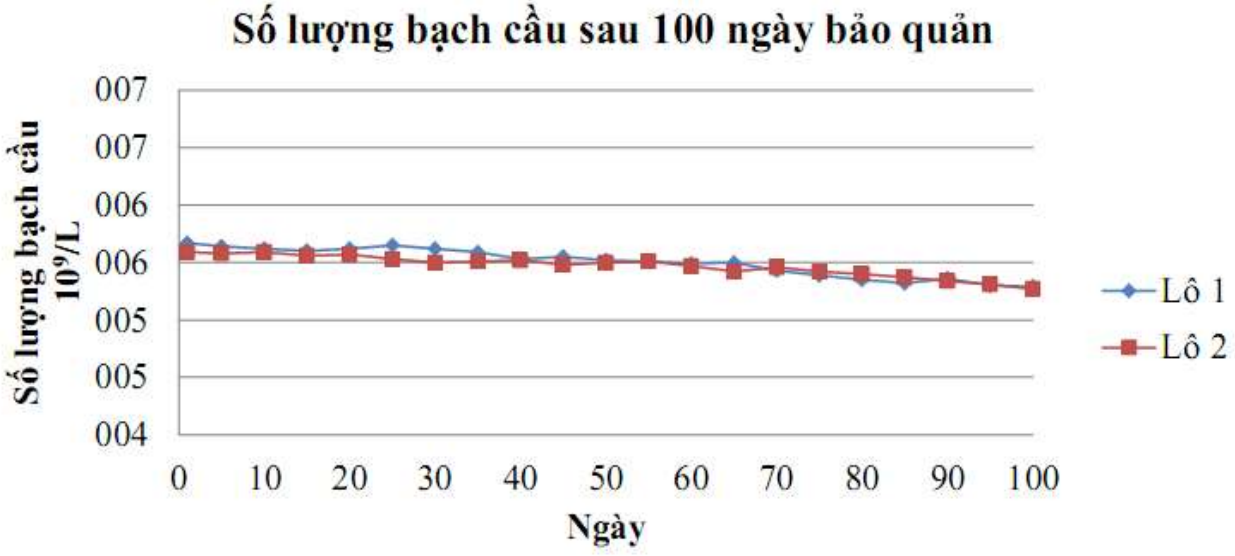
Kết quả kiểm tra độ đồng nhất của tiểu cầu giả định

Mẫu tiểu cầu định sau khi được điều chế từ vật liệu thay thế tiến hành đánh giá độ đồng nhất, thu được kết quả theo bảng 1.

Giả thiết rằng H_0: $S_1^2 = S_2^2$ là 2 lô mẫu đồng nhất và H_1: $S_1^2 \neq S_2^2$ là 2 lô mẫu không đồng nhất (mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$), chúng tôi có kết quả $|F_{\text{thực nghiệm}}| = 1,5833 < F_{\text{lý thuyết}} = 19$ nên chấp nhận giả thiết H_0. Như vậy, số lượng tiểu cầu ở các lọ là đồng nhất.

Kết quả kiểm tra độ ổn định của bạch cầu giả định

Song song với việc đánh giá độ đồng nhất của mẫu, nhóm nghiên cứu tiến hành lấy ngẫu nhiên 1 lọ/lô/5 ngày để kiểm tra số lượng tiểu cầu trong 100 ngày theo hình 3.

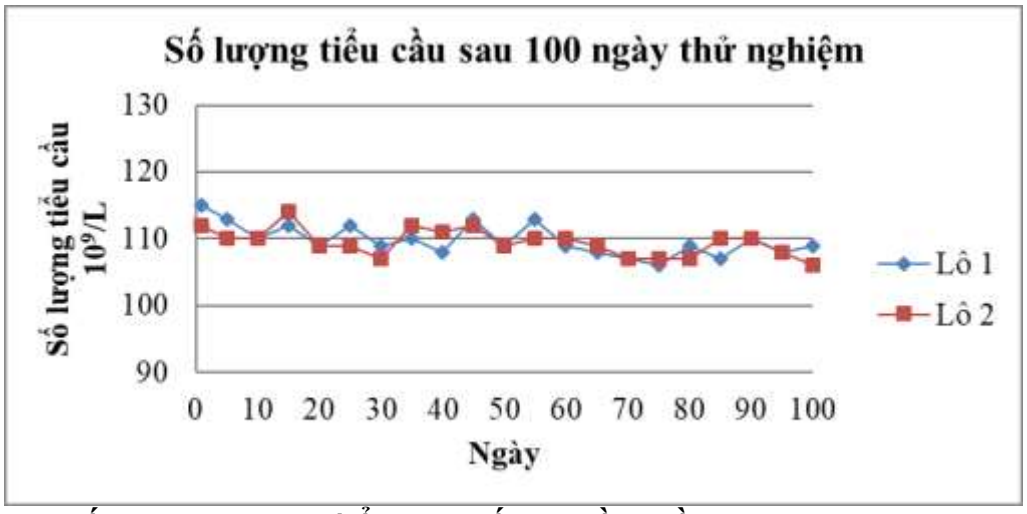


Hình 3. Độ ổn định tế bào bạch cầu giả định trong 100 ngày bảo quản

Số lượng bạch cầu giả định sau 100 ngày vẫn không thay đổi nhiều so với ngày đầu tiên. Sử dụng phương pháp kiểm định t để đánh giá độ ổn định của mẫu bạch cầu giả định sau 100 ngày bảo quản cho thấy: giả thiết rằng H_0: $\mu_1 = \mu_2$ là 2 lô mẫu có nồng độ ổn định và H_1: $\mu_1 \neq \mu_2$ là 2 lô mẫu có nồng độ không ổn định (mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$), kết quả thu được từ kiểm định là $t_{\text{thực nghiệm}} = 0,9114 < t_{\text{lý thuyết}} = 2,0262$ nên chấp nhận giả thiết H_0. Như vậy, số lượng bạch cầu giả định vẫn ổn định trong thời gian bảo quản 100 ngày (tương đương 3 tháng 10 ngày) với số lượng dao động từ 5,27 - 5,67 x 10^9/L. Số liệu này có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$.

Kết quả kiểm tra độ ổn định của tiểu cầu giả định

Song song với việc đánh giá độ đồng nhất của mẫu, nhóm nghiên cứu tiến hành lấy ngẫu nhiên 1 lọ/lô/5 ngày để kiểm tra số lượng tiểu cầu trong 100 ngày theo hình 4.



Hình 4. Kết quả theo dõi độ ổn định tế bào hồng cầu trong 100 ngày bảo quản

Theo hình 4, số lượng tiểu cầu giả định sau 100 ngày vẫn không có hiện tượng giảm rõ rệt. Kết quả phân tích thống kê theo phương pháp kiểm định t và tính toán bằng phần mềm Excel để đánh giá độ ổn định của mẫu tiểu cầu giả định sau 100 ngày bảo quản cho thấy: giả thiết rằng H_0: $\mu_1 = \mu_2$ là 2 lô mẫu có nồng độ ổn định và H_1: $\mu_1 \neq \mu_2$ là 2 lô mẫu có nồng độ không ổn định (mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$), kết quả thu được từ kiểm định là $|t_{\text{thực nghiệm}}| = 0,4899 < t_{\text{lý thuyết}} = 2,0227$ nên chấp nhận giả thiết H_0. Như vậy, số lượng tiểu cầu vẫn ổn định trong thời gian bảo quản 100 ngày.

Do đó, kết luận tế bào tiểu cầu giả định có độ đồng nhất và thời gian bảo quản là 100 ngày (tương đương 3 tháng 10 ngày) với số lượng dao động từ 106 - 115 x 10^9/L. Số liệu này có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Nghiên cứu đã điều chế vật liệu thay thế bạch cầu từ hồng cầu ngỗng gọi là bạch cầu giả định, vật liệu thay thế tiểu cầu từ hồng cầu dê, gọi là tiểu cầu giả định bảo quản trong nước muối sinh lý NaCl 0,85%. Bạch cầu giả định, tiểu cầu giả định đạt độ đồng nhất và độ ổn định trong 100 ngày, ở nhiệt độ 2 – 8^0C sử dụng cho mẫu ngoại kiểm huyết học.

Đề nghị

Nghiên cứu thêm độ đồng nhất và độ ổn định của tế bào hồng cầu người. Tiến hành lựa chọn chất nền bảo quản phù hợp, khảo sát và tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến tế bào máu.

Lời cảm ơn: Chúng tôi cảm ơn Trung tâm Kiểm chuẩn Xét nghiệm và Sở Khoa học Công nghệ TP.HCM. Đề tài này được thực hiện với sự hợp tác của Trung tâm Kiểm chuẩn Xét nghiệm và Sở Khoa học Công nghệ TP.HCM, đã hỗ trợ kính phí, trang thiết bị, cơ sở vật chất cho nghiên cứu này. Chúng tôi cảm ơn trường Đại học Bách khoa, ĐHQG – HCM đã hỗ trợ thời gian, phương tiện và cơ sở vật chất cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

BỘ Y TẾ (2013), Thông tư hướng dẫn thực hiện quản lý chất lượng xét nghiệm tại cơ sở khám bệnh, chữa bệnh, số 01/2013/TT-BYT, Hà Nội.

TRẦN HỮU TÂM (2012), Nội kiểm tra chất lượng xét nghiệm, , NXB Y học, TP.HCM.
TRẦN HỮU TÂM (2015), Ngoại kiểm tra chất lượng xét nghiệm – Tái bản lần 1, NXB Y học, TP.HCM.
AL.,K.E (1999), Hematology reference control and method of preparation. United States Patent,US5858790.
HARRISON, G.J. AND T.L. LIGGTFOOT (2006), Diagnostic Value of Hematology, in Clinical avian medicine, J. Samour, Editor, Spix Pub.: Palm Beach, FL.
KAWAI, Y., ET AL. (2016), Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood samples. International journal of laboratory hematology.
INTERNATIONAL STANDARD (1997), Proficiency testing by interlaboratory comparisons (ISO/IEC Guide 43:1997), Geneva.
MARTIN GRAHAM (2005), Principle of automated blood cell counters, in the Science of laboratory diagnosis, John Crocker & David Burnett, Editors. John Wiley & Sons.
ROBACK JD, COMBS RM, GROSSMANG JB, AND HILLYER CD (2008), AABB technical manual, Bethesda, MD: American Association of Blood Banks (AABB).
TURGEON MARY LOUISE (2005), Clinical hematology: theory and procedures, Lippincott Williams & Wilkins.

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU HÓA CÔNG THỨC GEL *IN SITU* NỔI TRONG DẠ DÀY CHỨA METRONIDAZOL

Võ Thị Kiều Oanh, Bùi Nguyễn Huyền Linh, Trần Ngọc Nam
Khoa Dược, Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: vtkoanhd15@ump.edu.vn

TÓM TẮT

Gel in situ nổi trong dạ dày chứa metronidazol giúp kéo dài thời gian lưu giữ metronidazol tại dạ dày để cải thiện tác dụng tại chỗ và đạt được hiệu quả điều trị nhiễm khuẩn tốt hơn. Phương pháp được sử dụng là khảo sát các tá dược và tỷ lệ, xây dựng thiết kế thực nghiệm theo mô hình D-Optimal. Xác định mối quan hệ nhân quả, tối ưu hóa công thức và cuối cùng kiểm tra công thức tối ưu. Kết quả nhóm thu được công thức tối ưu chứa 2,5% MTZ, 1% natri alginat, 0,49% HEC, 0,87% $CaCO_3$, 0,1% paraben, 1,13% $NaHCO_3$, 0,3% natri citrat, 0,15% aspartam và 20% sorbitol. Gel cho cảm quan tốt, tiềm thời nổi ngắn, độ nhớt vừa phải và kiểm soát tốt sự phóng thích MTZ (30% ở 15 phút và 80% ở 120 phút).

***Từ khóa**: Metronidazol, gel in situ nổi trong dạ dày, thiết kế thực nghiệm, D-Optimal.*

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF FLOATING ORAL *IN SITU* GEL FORMULATION CONTAINING METRONIDAZOLE 2,5%

Vo Thi Kieu Oanh, Bui Nguyen Huyen Linh, Tran Ngoc Nam
Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh city
Corresponding author: vtkoanhd15@ump.edu.vn

ABSTRACT

Floating oral in situ gel containing metronidazole extended gastric residence time of MTZ, thus led to improvement of the effect at stomach and increase of antibiotic efficacy. Regarding to study method, firstly, excipients and their proportions were investigated, then an experimental design technique based on D-Optimal model was applied in order to define reason-result relations. Finally, the formulation was optimized and evaluated. The optimal formulation consists of 2,5% MTZ, 1% sodium alginate, 0,49% HEC, 0,87% CaCO3 , 0,1% paraben, 1,13% NaHCO3, 0,3% sodium citrate, 0,15% aspartame and 20% sorbitol. The obtained gel shows good appearance, short floating lag time, medium viscosity and well-controlled release of MTZ (30% at 15 minutes and 80% after 120 minutes).

***Key words**: Metronidazole, floating in situ gel, experimental design, D-Optimal.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Helicobacter pylori (*H. pylori*) là nguyên nhân gây nên một số bệnh dạ dày như loét dạ dày, ung thư dạ dày. Năm 2014, tổ chức y tế thế giới (WHO) đã xác định việc tiệt trừ *H. pylori* là một biện pháp chủ yếu để phòng ngừa ung thư dạ dày [1]. Metronidazol (MTZ), kháng sinh nhóm 5-nitroimidazol, được sử dụng phối hợp trong các phác đồ diều trị *H. pylori*. Các nghiên cứu bào chế dạng thuốc chứa MTZ hiện nay đang hướng tới mục tiêu kéo dài thời gian lưu trữ thuốc ở dạ dày để cải thiện tác dụng tại chỗ và đạt được hiệu quả điều trị nhiễm khuẩn tốt hơn [2].

Một số hệ thống phân phối thuốc nổi tại dạ dày được phát triển như hạt, pellet và viên nén nổi trong dạ dày [2]. Tuy nhiên trong vài năm gần đây, sự phát triển của hệ gel *in situ* nổi trong dạ dày nhận được nhiều chú ý bởi những lợi ích mà nó mang lại như khả năng kiểm soát phóng thích hoạt chất kéo dài hơn so với hệ thống phân

phối thuốc thông thường dẫn đến giảm số lần sử dụng thuốc trong ngày, cải thiện sự tuân trị của bệnh nhân và tăng hiệu quả điều trị [3].

Trong nước chưa có các nghiên cứu công bố về hệ gel *in situ* nổi trong dạ dày chứa MTZ đồng thời để khắc phục nhược điểm của các phương pháp sàng lọc truyền thống, do đó đề tài "Nghiên cứu xây dựng và tối ưu hóa công thức gel *in situ* nổi trong dạ dày chứa metronidazol 2,5%" được thực hiện nhằm xây dựng công thức điều chế gel *in situ* nổi chứa MTZ bằng phương pháp thiết kế thực nghiệm.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Phương pháp nghiên cứu

Sàng lọc tá dược trong công thức gel *in situ* nổi trong dạ dày chứa MTZ

Các tá dược được khảo sát là tỷ lệ natri alginat (1, 2, 3%), tỷ lệ $CaCO_3$ (0,5; 1; 1,5%), loại polymer giúp kiểm soát sự phóng thích hoạt chất (HPMC, NaCMC, gôm xanthan, HEC) và tỷ lệ các polymer này (0,3; 0,6 và 0,9%). Cố định tỷ lệ các tá dược còn lại: MTZ 2,5%, nipagin (methyl paraben : propyl paraben 9:1) 0,1%, natri citrat 0,3%, aspartam 0,15%, sorbitol 20%. Các chỉ tiêu được đánh giá là độ nhớt, cảm quan, tiềm thời nổi, thời gian nổi, pH, độ nhớt, định lượng và độ GPHC *in vitro* trong 2 giờ. Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Chỉ tiêu đánh giá gel *in situ* nổi trong dạ dày

Khả năng tạo gel *in vitro*

Đánh giá khả năng tạo gel dựa trên cảm quan và hành vi nổi trong môi trường HCl pH 1,2.

- Cảm quan: đánh giá cảm quan gel tạo thành trên 3 mức độ: gel dạng mỏng, dễ vỡ; gel dạng mảng, bền và gel dạng mảng, thể chất đặc, bền.
- Hành vi nổi:

Tiềm thời nổi: thời gian từ ngay lúc cho mẫu vào đến lúc gel nổi hoàn toàn trên bề mặt thoáng.

Thời gian gel nổi: thời gian gel nổi ổn định trên bề mặt môi trường hòa tan.

Độ nhớt

Kết quả đánh giá độ nhớt dựa theo tốc độ lắng sau khi được ly tâm, được mã hóa từ 1 đến 3 theo xu hướng tăng dần độ nhớt: Rất nhanh (1), nhanh (1,5), trung bình (2), chậm (2,5), rất chậm (3).

pH: Pha loãng 1 g gel trong 100 ml nước cất, lọc qua giấy lọc, đo pH dịch lọc , .

Thử nghiệm độ hòa tan: Máy đo độ hòa tan kiểu cánh khuấy, môi trường HCl pH 1,2 (nhiệt độ ở 37 ^oC, tốc độ khuấy 50 vòng/phút). Định lượng nồng độ MTZ trong mẫu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis, bước sóng 276,5 nm ở các thời điểm 15, 30, 60 và 120 phút .

Định lượng: Định lượng nồng độ MTZ trong mẫu bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis, bước sóng 276,5 nm.

Lựa chọn tá dược nhằm xây dựng công thức trong nghiên cứu thực nghiệm

Nguyên tắc: từ kết quả sàng lọc tá dược ở trên, biến độc lập và biến phụ thuộc được lựa chọn để tham gia vào thiết kế thực nghiệm.

Phương pháp thiết kế thực nghiệm

Tối ưu hóa công thức điều chế gel in situ nổi trong dạ dày chứa metronidazol

18 công thức khác nhau được sử dụng làm dữ liệu phân tích cho thiết kế D-Optimal, phương pháp bề mặt đáp ứng. Các biến độc lập là tỷ lệ $CaCO_3$, tỷ lệ natri alginat, loại và tỷ lệ polymer. Độ nhớt, độ GPHC thời điểm 15 phút, 120 phút là các biến phụ thuộc.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Sàng lọc tá dược trong công thức

Kết quả sàng lọc tá dược được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả sàng lọc tá dược (n=3)

Tá dược	Tỷ lệ (%)	Tỷ lệ phóng thích tích lũy (%)			
		15 phút	30 phút	60 phút	120 phút
Natri alginat*	1	83,05 ± 1,51	85,52 ± 1,53	88,01 ± 0,96	93,06 ± 0,74
	2	60,19 ± 1,75	70,67 ± 1,75	76,47 ± 0,82	84,65 ± 1,30
	3	77,18 ± 1,45	80,36 ± 1,53	84,80 ± 0,95	89,70 ± 0,57
$CaCO_3$*	1	69,01 ± 2,18	78,52 ± 1,71	84,18 ± 1,77	94,52 ± 1,73
	0,5	79,55 ± 1,64	85,72 ± 1,06	93,21 ± 1,53	99,48 ± 1,37
	1,5	73,50 ± 2,70	80,65 ± 0,97	89,36 ± 1,43	96,53 ± 1,08
HPMC**	0,6	79,90 ± 9,18	84,97 ± 3,54	86,61 ± 3,71	89,67 ± 2,64
	0,3	80,89 ± 5,02	84,63 ± 4,16	87,87 ± 4,71	79,23 ± 2,51
	0,9	80,49 ± 7,73	85,55 ± 2,97	87,68 ± 2,67	82,88 ± 7,88
NaCMC**	0,3	83,35 ± 1,16	87,66 ± 1,28	92,28 ± 1,56	100,29 ± 1,65
	0,6	80,73 ± 2,80	87,32 ± 1,85	93,70 ± 1,34	97,88 ± 2,30
	0,9	84,85 ± 2,14	88,71 ± 1,51	97,58 ± 1,17	99,28 ± 2,89
Gôm xanthan*	0,3	87,20 ± 0,44	91,57 ± 1,85	96,43 ± 1,54	97,21 ± 0,60
	0,6	85,83 ± 0,51	87,83 ± 0,35	93,03 ± 2,67	95,27 ± 0,55
	0,9	83,15 ± 0,47	85,64 ± 1,09	92,63 ± 2,60	94,32 ± 0,53
HEC*	0,3	56,86 ± 0,80	71,87 ± 0,70	79,55 ± 0,97	83,66 ± 0,48
	0,6	40,02 ± 0,75	67,37 ± 0,21	68,03 ± 0,23	82,72 ± 0,23
	0,9	37,22 ± 0,72	43,56 ± 0,44	77,18 ± 0,23	95,22 ± 0,92

** p-value <0,05; ** p-value >0,05*

Từ bảng kết quả trên cho thấy, tỷ lệ natri alginat (1-2%), tỷ lệ $CaCO_3$ (0,5-1,5%), HEC và gôm xanthan (0,3-0,9%) là các yếu tố ảnh hưởng đến tính chất của gel.

THIẾT KẾ THỰC NGHIỆM VÀ MỐI QUAN HỆ NHÂN QUẢ

Dữ liệu thiết kế thực nghiệm

Kết quả độ nhớt và độ GPHC trong 2 giờ của 18 công thức được thiết kế theo mô hình D-Optimal được trình bày ở Bảng 3.

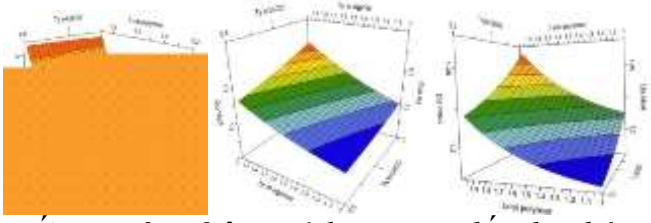
Bảng 3. Kết quả thực nghiệm theo mô hình D-Optimal (n=3)

	Nhóm	X1	X2	X3	X4	Y1	Y2	Y3
1	1	1,5	1	0,3	Gôm xanthan	1	85,4166	96,7054
2		0,5	2	0,3	Gôm xanthan	1,5	87,1967	97,2087
3	2	1,5	2	0,9	HEC	3	19,1988	77,5228
4		0,5	2	0,9	HEC	3	37,2166	95,2161
5		1	1	0,9	HEC	2,5	16,7550	81,2956
6	3	0,5	1	0,3	HEC	1	56,8570	83,6595
7		1	2	0,3	HEC	1,5	28,1745	82,4913
8		1,5	1	0,3	HEC	1	22,0988	80,6949
9	4	1,5	1	0,6	HEC	2	21,1533	79,8554
10		0,5	2	0,6	HEC	2,5	40,0219	82,7216
11	5	1	1	0,6	Gôm xanthan	1,5	84,6010	95,0432
12		0,5	2	0,6	Gôm xanthan	2	85.2220	95,5997

13		1,5	2	0,6	Gôm xanthan	2	82,2584	94,7812
14	6	0,5	1	0,3	Gôm xanthan	1	86,7475	97,1293
15		1,5	2	0,3	Gôm xanthan	1,5	85,9567	96,5432
16	7	1,5	1	0,9	Gôm xanthan	2	80,0955	90,9134
17		0,5	1	0,9	Gôm xanthan	2	83,4819	94,5912
18		1	2	0,9	Gôm xanthan	3	81,3756	92,8580

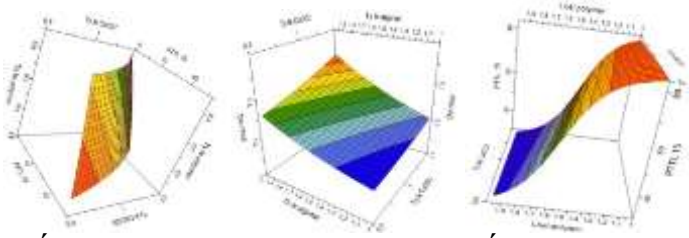
Mối quan hệ nhân quả

Mối quan hệ nhân quả liên quan đến độ nhớt



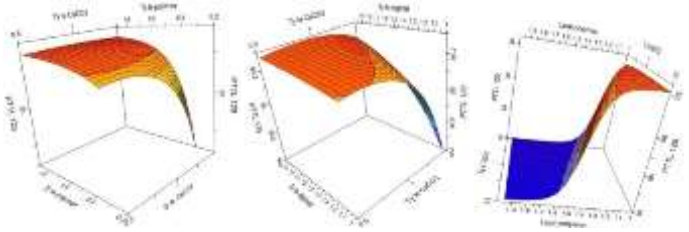
Tỷ lệ polymer và tỷ lệ natri alginat tỷ lệ thuận với độ nhớt. Các công thức sử dụng HEC có độ nhớt lớn hơn so với các công thức sử dụng gôm xanthan. Ngược lại, độ nhớt không phụ thuộc vào tỷ lệ $CaCO_3$.

Mối quan hệ nhân quả liên quan đến độ phóng thích tích lũy ở thời điểm 15 phút



Tỷ lệ $CaCO_3$, tỷ lệ natri alginat và tỷ lệ polymer cao tỷ lệ nghịch với độ GPHC ở 15 phút thấp. Các công thức sử dụng HEC kiểm soát sự phóng thích MTZ tốt hơn rất nhiều so với gôm xanthan.

Mối quan hệ nhân quả liên quan đến độ phóng thích tích lũy ở thời điểm 120 phút



Khi tỷ lệ $CaCO_3$ nhỏ hơn 1%, ở bất kỳ tỷ lệ polymer, tỷ lệ natri alginat, độ phóng thích tích lũy ở thời điểm 120 phút cao. Khi tỷ lệ $CaCO_3$ lớn hơn 1%, tỷ lệ polymer nhỏ hơn 0,5% và tỷ lệ natri alginat nhỏ hơn 1,5%, độ phóng thích tích lũy ở thời điểm 120 phút giảm. Các công thức sử dụng HEC kiểm soát sự phóng thích MTZ tốt hơn rất nhiều so với gôm xanthan.

Tối ưu hóa công thức

Ràng buộc cho biến X_i: $0.5 \leq X_1 \leq 1.5$; $1 \leq X_2 \leq 2$; $0.3 \leq X_3 \leq 0.9$

Hàm mục tiêu cho biến Y_i: Y_1: Tiến đến 1,5; Y_2: Tối thiểu; Y_3: Tiến đến 80

Giá trị R^2 luyện và R^2 thử được trình bày ở Bảng 4.

Tối ưu hóa công thức

Ràng buộc cho biến X_i: $0.5 \leq X_1 \leq 1.5$; $1 \leq X_2 \leq 2$; $0.3 \leq X_3 \leq 0.9$

Hàm mục tiêu cho biến Y_i: Y_1: Tiến đến 1,5; Y_2: Tối thiểu; Y_3: Tiến đến 80

Giá trị R^2 luyện và R^2 thử được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Giá trị R^2 luyện và R^2 thử

Biến phụ thuộc	R^2 luyện	R^2 thử
Y_1	0,9521	0,9431
Y_2	0,9346	0,9423
Y_3	0,9623	0,9712

Các giá trị R^2 luyện và R^2 thử đều nằm trong khoảng 0,9 đến 1, do đó biến độc lập và biến phụ thuộc có mối tương quan cao. Mô hình được thiết lập cho cơ sở tốt để tối ưu hóa và dự đoán

Kết quả tối ưu hóa và dự đoán bằng phần mềm BC PharSoft OPT được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả tối ưu hóa và dự đoán

Biến	Kết quả tối ưu hóa				Kết quả dự đoán		
	X_1	X_2	X_3	X_4	Y_1	Y_2	Y_3
Giá trị	0,87	0,49	1	HEC	1,5	30,73	80,53

Kiểm tra công thức tối ưu

Kết quả độ hòa tan trong 2 giờ của 3 lô được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả độ hòa tan trong 2 giờ của 3 lô (n=3)

Thời điểm	Độ GPHC (%)	RSD (%)	T_{stat}	T_{crit}
15 phút	30,19 ± 0,39	1,26	- 1,35	1,86
30 phút	48,29 ± 0,71	0,89	-	-
60 phút	65,25 ± 0,78	0,67	-	-
120 phút	80,05 ± 1,06	0,42	1,35	1,86

Nhận xét: giá trị RSD ở các thời điểm điều nhỏ hơn 2%, do đó công thức có độ lặp lại cao. Sử dụng T-test để kiểm tra sự khác biệt giữa kết quả dự đoán và kết quả thực nghiệm thì sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê.

Đánh giá các chỉ tiêu khác

Kết quả đánh giá các chỉ tiêu khác được trình bày ở Bảng 7.

Bảng 7. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu khác

Chỉ tiêu	Kết quả	Chỉ tiêu	Kết quả
Cảm quan	Gel dạng mảng, bền	pH	9,2
Tiềm thời nổi (phút)	< 1 phút	Định lượng (%)	100,13 ± 2,93
Thời gian gel nổi	> 12 giờ	Độ nhớt	1,5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Đề tài đã xây dựng và tối ưu hóa thành công công thức gel *in situ* nổi trong dạ dày chứa metronidazol, một dạng bào chế mới, dễ điều chế, mang nhiều ưu điểm trong việc tăng thời gian lưu của kháng sinh tại dạ dày và có khả năng kiểm soát giải phóng hoạt chất kéo dài, góp phần tăng hiệu quả của các phác đồ tiệt trừ *H. pylori*.

Để tiếp tục hoàn thiện đề tài, công việc cần thực hiện bao gồm:

- Hoàn chỉnh cảm quan cho công thức (màu sắc, mùi, vị)
- Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng metronidazol trong gel *in situ* nổi trong dạ dày bằng phương pháp HPLC
- Đánh giá khả năng nổi *in vivo* của gel *in situ* nổi trong dạ dày chứa MTZ
- Đánh giá độ ổn định của chế phẩm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Mahachai V., Vilaichone R. K., Pittayanon R. et al. (2018), "Helicobacter pylori management in ASEAN: The Bangkok consensus report", *J Gastroenterol Hepatol*. **33** (1), pp. 37-56.

[2] Thomas L. M. (2014), "Formulation and evaluation of floating oral *in-situ* gel of metronidazole", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **6** (10), pp. 265-269.

[3] Padhan A., Nanda B. K. , Behera B. C. (2019), "Floating oral in-situ gel, a comprehensive approach of gastro-retentive drug delivery system: A review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **10** (9), pp. 4026-4039.

NHÂN NUÔI TÌM HIỂU VÒNG ĐỜI VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ĂN NHỰA POLYETHYLENE CỦA ẤU TRÙNG BƯỚM SÁP *Achroia grisella*.

Lê Thị Ý, Lê Thụy Tố Như, Vương Gia Thanh, Nguyễn Ngọc Bảo Châu*

[1]*Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành Phố Hồ Chí Minh*

Tác giả liên lạc: chau.nnb@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Bướm sáp Achroia grisella thuộc họ Pyralidae, bộ Lepidotera là loài côn trùng thuộc kiểu biến thái hoàn toàn, chúng sống ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt những nơi có tổ ong. Ấu trùng bướm sáp là loài phá hoại tổ ong mạnh mẽ, tuy nhiên cũng được coi là loài có ích cho việc phá hủy sáp tổ ong còn dư lại, nơi chứa nhiều mầm bệnh và thuốc trừ sâu. Các nhà nghiên cứu đã chỉ ra rằng ấu trùng bướm sáp có khả năng tiêu thụ túi nilon polyethyne và có hai chủng vi khuẩn được phân lập từ đường ruột của sâu sáp có khả năng phân hủy nhựa polyethylene. Những kết quả này chỉ ra rằng côn trùng có thể là một nguồn đầy hứa hẹn để phân lập được các chủng vi khuẩn có khả năng phân hủy polyethylene (Liu Ren và cộng sự, 2019). Vì vậy trong bài báo ngắn này chúng tôi có một số thảo luận về vòng đời của bướm sáp, nhân nuôi trong phòng thí nghiệm và khảo sát khả năng ăn nhựa polyethylen của ấu trùng bướm sáp qua các tuổi trong giai đoạn ấu trùng. Kết quả thí nghiệm cho thấy có tất cả 4 giai đoạn trong vòng đời của bướm sáp Achroia grisella, giai đoạn ấu trùng gồm 5 tuổi, vòng đời của chúng dao động từ 20 – 35 ngày. Chúng sống tốt trong điều kiện kín gió, ánh sáng yếu, độ ẩm thấp, nhiệt độ tối ưu từ 25 – 38^{0}C với nguồn thức ăn chủ yếu là sáp tổ ong, mật ong pha loãng và túi nilon polyethylene. Kết quả thí nghiệm khảo sát khả năng ăn nhựa polyethylene cho thấy rằng ấu trùng bướm sáp ở tất cả các độ tuổi đều có khả năng tiêu thụ túi nilon polyethylene, trong đó ấu trùng tuổi tuổi 3 có khả năng ăn nilon polyethylene mạnh nhất, tiếp đến là sâu sáp tuổi 2,1,4 và sâu sáp tuổi 5 có khả năng ăn nilon polyethylene thấp nhất.

Từ khóa: *Bướm sáp, Achroia grisella, Lesser wax worm, beeswax, biodegradation, plastic wastes.*

PHÂN LẬP NẤM RỄ NỘI CỘNG SINH (ARBUSCULAR MYCORRHIZA) CÂY MÍA (*Saccharum.*spp) Ở TỈNH TÂY NINH

Trần Hoàng Tú[1]*,*Phạm Thị Mỹ Tiên[1] và Nguyễn Văn Minh[1]*

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh
*Tác giả liên lạc: *princetran2819@gmail.com*

TÓM TẮT

Nấm rễ nội cộng sinh (Arbuscular Mycorrhiza) là nấm cộng sinh tồn tại trong cả rễ và đất, cộng sinh hơn 80 % rễ các loài thực vật. Nấm rễ cộng sinh làm tăng quá trình hình hấp thụ và vận chuyển chất dinh dưỡng trong thực vật. Nấm AM được phân lập từ đất bằng phương pháp sàng ướt và lọc. Kết qủa phân lập bào tử, đánh giá xâm nhiễm các mẫu rễ và đất vùng rễ mía được thu thập tại cánh đồng mía huyện Dương Minh Châu, tỉnh Tây Ninh cho thấy tỉ lệ xâm nhiễm đạt 55,22%, mật độ bào tử (SD) nấm AM trong 100g đất là 449 bào tử. Tiêu chuẩn phân loại và định danh dựa trên đặc điểm hình thái về màu sắc, hình dạng, số lớp của vách bào tử, hình dạng cuống bào tử và tên chi bào tử. Chúng được chia vào 9 chi: Acaulospora, Ambispora, Archaeospora, Entrophospora, Gigaspora, Glomus, Sacculospora, Scutellospora, Sclerocystis. Trong đó chi Acaulospora, Glomus, Archaeospora và Sacculospora là những chi chiếm ưu thế. Kết quả nghiên cứu này góp một phần vào cơ sở dữ liệu về nấm rễ cộng sinh trên cây mía trong nước và đồng thời xây dựng bộ sưu tập nấm AM hướng đến chế phẩm sinh học nấm rễ nội cộng sinh.

Từ khóa: *Nấm rễ nội cộng sinh, đất vùng rễ mía, Tây Ninh*

PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN *BACILLUS* SPP. NỘI SINH VÀ SỐNG TRÊN BỀ MẶTRỄ CÂY ĐẬU PHỘNG (*ARACHIS HYPOGAEA*) KHÁNG NẤM SINH AFLATOXIN *ASPERGILLUS FLAVUS* CDP2, ỨNG DỤNG LÀM PROBIOTIC CÂY TRỒNG

Trịnh Lai Lợi*, Lê Nguyễn Ái Mi, Lâm Minh Khoa

Ngành Công nghệ Sinh học, Viện Công nghệ Việt Nhật, Trường Đại học Công nghệ TP. Hồ Chí Minh (HUTECH)

*Tác giả liên lạc: trinhlailoi@gmail.com

TÓM TẮT

Từ rễ và hạt đậu phộng thu nhận tại Hòa Khánh Tây, Long An, 14 chủng vi khuẩn hình que sinh bào tử nghi ngờ thuộc chi Bacillus được phân lập, trong đó 11 chủng có hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng (cố định đạm, sinh IAA, phân giải lân và sinh enzyme ngoại bào), 10 chủng có khả năng ức chế Aspergillus flavus CDP2 sinh aflatoxin và 9 chủng có cả 2 hoạt tính. Từ đó tuyển chọn được 2 chủng NNK24 và NDP61 và tiến hành thí nghiệm kháng nấm in vivo. Kết quả cho thấy khi cấy vi khuẩn trước nấm 24 giờ, hiệu quả kháng nấm không khác biệt so với xử lý hạt bằng thuốc hóa học Cruiser Plus 312.5FS. Xử lý hạt giống đậu phộng bằng dịch nuôi cấy NNK24 và NDP61 tăng tỉ lệ nảy mầm từ 56.7% lên đến 93.3%, khối lượng và chiều dài cây non tăng 2 lần, độ khỏe mầm tăng hơn gần gấp 3 lần sau 15 ngày xử lý hạt. Định danh 2 chủng này bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA và so sánh khoảng cách di truyền cho thấy cả 2 chủng đều thuộc loài Bacillus albus. Kết quả cho thấy 2 chủng này tiềm làm probiotic cây đậu phộng, sử dụng để xử lý hạt giống, bảo vệ hạt giống đậu phộng khỏi nấm mốc sinh aflatoxin và thúc đẩy nảy mầm cũng như tăng trưởng cây non.

Từ khóa: *Nấm mốc sinh aflatoxin, probiotic cây trồng, vi khuẩn bề mặt, vi khuẩn hỗ trợ tăng trưởng cây trồng, vi khuẩn nội sinh, xử lý hạt giống.*

ISOLATION AND SELECTION OF PEANUT ROOT ENDOPHYTIC AND EPIPHYLLOUS *BACILLUS* SPP. AS ANTAGONISTS AGAINST AFLATOXIGENIC *ASPERGILLUS FLAVUS* CDP2 FOR USE AS PLANT PROBIOTICS

Trinh Lai Loi*, Le Nguyen Ai Mi, Lam Minh Khoa

Department of Biotechnology, Vietnam Japan Institute of Technology, Ho Chi Minh City University of Technology, VietNam

Corresponding author: trinhlailoi@gmail.com

ABSTRACT

From peanut roots and seeds collected in Long An Province, 14 strains of gram-positive, non-motile, rod-shaped, spore-forming and catalase/oxidase-positive bacilli were isolated endophytically and epiphyllously. The strains were screened for antifungal activity against aflatoxigenic Aspergillus flavus CDP2 on SDA plates. Plant growth promoting activities such as extracellular enzymes, nitrogen fixation, phosphate solubilization, indole-3-acetic acid (IAA) production were also screened. The results showed among 14 isolates, 11 strains were plant growth promoting, 10 strains were fungal antagonists and 9 strains were found with both beneficial features. Two strains NNK24 and NDP61 were selected to be assayed in in vivo antifungal test. As the results, when inoculated 24 h before Aspergillus flavus CDP2, both strains

displayed significant antifungal activity, similar to Cruiser Plus 312.5FS, a chemical usually recommended by Syngenta for seed treatment.
Peanut seed treatment with culture broth of these two bacterial strains helped to increase seeds germination from 56.7 to 93.3%, seedling fresh weight and seedling length 2 folds and vigor index 3 folds at 15 days after seed treatment. Identification of the two strains by 16SrRNA gene sequencing and blast search showed both strains belong to species Bacillus albus. The above results suggested that 2 selected strains are good candidates for peanut probiotics used as seed inoculants to protect seeds from aflatoxigenic fungi and promote seed germination and seedling growth.
Keywords: *Aflatoxigenic fungi, endophytic bacteria, epiphyllous bacteria, plant growth promoting bacteria, plant probiotics, seed treatment.*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Aflatoxin là một nhóm chất chuyển hóa thứ cấp gây ung thư gan, thường sinh ra trên ngũ cốc nhiễm nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus,* phát triển mạnh ở khí hậu nóng và ẩm (Dhanasekaran *et al.,* 2011). Biện pháp ngăn ngừa aflatoxin hiệu quả nhất là ngăn sự phát triển mầm bệnh ở mức độ tiền thu hoạch ở các cây dễ nhiễm mốc này như đậu phộng, bắp, đậu nành…Phương pháp can thiệp tiền thu hoạch hữu hiệu nhất là sử dụng hạt giống sạch mầm bệnh (Abdu *et al.,* 2013). Xử lý hạt giống bằng hóa chất gây ô nhiễm môi trường. Ngày nay để phát triển nông nghiệp hữu cơ, người ta chú ý đến nhóm vi sinh vật có hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng phân giải các hợp chất hữu cơ, cố định đạm, phân giải lân, sinh tổng hợp hormone tăng trưởng thực vật, giúp cây chống chịu các điều kiện khắc nghiệt của môi trường, đồng thời có khả năng tổng hợp các hợp chất kháng nấm… Các vi sinh vật này thường thuộc về hệ vi sinh bình thường của thực vật, sống nội sinh hoặc trên bề mặt rễ. Chúng được phân lập tuyển chọn theo các hoạt tính có lợi để đưa trở lại cây trồng, đóng vai trò probiotic cho cây (Imran *et al.,* 2019). Trong các vi khuẩn này có chi *Bacillus* (Esther, Paula, 2017). Vì vậy mục tiêu nghiên cứu này là phân lập các *Bacillus* spp. nội sinh và sống trên bề mặt rễ cây đậu phộng, tuyển chọn theo hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây cây trồng, kháng nấm sinh aflatoxin *Asperigillus flavus* để làm chế phẩm probiotic cây trồng ứng dụng xử lý hạt giống đậu phộng.

II.VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Nguồn phân lập: Rễ và hạt vùng rễ cây đậu phộng, được thu từ tại Xã Hòa Khánh Tây, Huyện Đức Hòa, Tỉnh Long An, Việt Nam.

Chủng nấm mốc chỉ thị thuộc *Aspergillus flavus* CDP2 phân lập từ hạt đậu phộng mốc được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm VKHUD, Đại học Công Nghệ TP. Hồ Chí Minh.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Phân lập *Bacillus* spp. nội sinh và bề mặt rễ cây đậu phộng

Tiến hành theo Waheeda và Shyam (2007), nước rửa rễ sau khi sửa sạch đất và rễ sau khử trùng bề mặt, nghiền được xử lý nhiệt 80^{o}C, 15 phút, cấy trang trên trên môi trường NA ủ trong 24 giờ để phân lập chủng thuần khiết.

2.2.2 Xác định các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa các chủng phân lập

Các chủng VK vừa phân lập được xác định đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa theo khóa phân loại của Bergey 2nd edition (Paul *et al.,* 2009).

2.2.3. Khảo sát hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng *in vitro*

Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Môi trường chứa thành phần dinh dưỡng và cơ chất 1% tinh bột, 0.5% CMC (Carboxy methyl cellulose), 1% Casein, 2% huyền phù chitin.

Khả năng cố định đạm được xác định bằng phương pháp nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường Ashby lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ phòng. Sau 3 ngày ly tâm 6000 vòng/phút trong 15 phút thu dịch và định tính $NH4^+$ sinh ra trong môi trường bằng thuốc thử Nessler.

Khả năng sinh IAA của các chủng vi khuẩn được khảo sát bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường Tryptone water-yeast, lắc 180 vòng/phút. Sau 3 ngày, IAA trong dịch nuôi cấy sau khi ủ với thuốc thử Salkowski định lượng bằng phương pháp quang phổ bước sóng 530 nm (Mohite, 2013).

Phân giải lân được thực hiện trên đĩa thạch môi trường Pikovskaya có chỉ thị màu bromocresol purple theo Athakorn và đồng cộng sự (2014). Khả năng phân giải lân được đo qua chỉ số PSI (phosphate solubilizing index).

2.2.4. Khảo sát khả năng ức chế nấm *Aspergillus flavus* CDP2 *in vitro*

Vi khuẩn được cấy 2 điểm trên đĩa môi trường SDA sao cho từ tâm đĩa đến 2 vị trí cấy có khoảng cách là 2.5 cm, ủ trong 24 giờ, sau đó chuyển miếng thạch tơ nấm đường kính 5mm *Aspergillus flavus* CDP2 vào tâm đĩa, ủ nhiệt độ phòng 96 giờ. Ở nghiệm thức cấy cùng lúc, thực hiện như trên, tuy nhiên vi khuẩn và nấm được cấy đồng thời.

2.2.5. Tuyển chọn vi khuẩn có khả năng ức chế nấm sinh aflatoxin *Aspergillus flavus* CDP2 trên hạt đậu phộng (*in vivo*)

Hạt đậu phộng được khử trùng bề mặt, cấy vi khuẩn với mật độ 10^5CFU/g, sau 24 giờ, cấy bào tử *Aspergillus flavus* CDP2 mật độ 10^2 bào tử/g vào đậu phộng. Sau 72 giờ tính từ khi cấy nấm, thu hồi sinh khối nấm mốc phát triển trên hạt đậu phộng và xác định mật độ bào tử bằng cách cấy trang trên môi trường DRBC.

2.2.5. Khảo sát khả năng hỗ trợ tăng trưởng cây trồng của vi khuẩn tuyển chọn *in vivo* (thí nghiệm xử lý hạt giống)

Vi khuẩn được nuôi cấy lắc 180 vòng/ phút trong môi trường NB, 24 giờ. Hạt đậu phộng được khử trùng bề mặt, ngâm trong dịch nuôi cấy trong 30 phút. Đối chứng dương là thuốc xử lý hạt giống Cruiser Plus 315FS và đối chứng âm là nước ấm 50^{o}C. Theo dõi kết quả nẩy mầm trong 5 ngày, trồng ra đất theo dõi cây non.

2.2.7 Đinh danh

Các chủng tuyển chọn được gửi đi giải trình tự gene 16S rRNA tại Công ty PHUSA BIOCHEM-Cần Thơ bằng phương pháp Sanger, sử dụng cặp mồi

27F(5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'),1492R(5'TACGGYTACCTTG TTAACTT3').

Tra cứu trên ngân hàng gene (Genbank) sử dụng BLAST search của National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) và so sánh tỉ lệ tương đồng với các chủng trên Genbank.

2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý thống kê theo phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) ($p<0.05$), so sánh trung bình theo phương pháp trắc nghiệm Duncan. Các số liệu ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập vi khuẩn nội sinh và sống trên bề mặt rễ

Từ mẫu rễ và hạt đậu phộng đã thu mẫu ở xã Hòa Khánh Tây, Long An, 14 chủng vi khuẩn được phân lập, trong đó 6 chủng là nội sinh rễ đậu phộng, 4 chủng bề mặt rễ và 4 chủng bề mặt hạt đậu phộng. Các chủng đã phân lập được đều có khuẩn lạc tròn, trắng đục, vài chủng có màu vàng xám. Các chủng này đều là gram dương, hình que và sinh bào tử, dương tính với thử nghiệm catalase, nghi ngờ thuộc chi *Bacillus*.

3.2 Khảo sát hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng *in vitro*

Các chủng vi sinh phân lập được khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase và chitinase. Vi sinh vật vùng rễ có các hoạt tính này giúp tăng cường dinh dưỡng dễ hấp thu cho cây, ngoài ra các hoạt tính protease, cellulase và chitinase có thể là một phần cơ chế giúp chúng kháng nấm vùng rễ.

Khả năng cố định đạm của 14 chủng phân lập được thể hiện sau khi nuôi cấy trong môi trường Ashby và kiểm tra $NH4^+$ sinh ra. Các chủng NNK23, NNK24, A2R4, 0405-02 có khả năng cố định đạm tốt (+++) thể hiện qua màu vàng cam đậm trong phản ứng màu với thuốc thử Nessler. Các chủng có phản ứng màu cam là chủng ANNK11, ANNK16, ANNK17, NNK21 và DP62 có khả năng cố định đạm trung bình (++) (bảng 1).

Bảng 1: Các hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng của các chủng phân lập

STT	CHỦNG	Cố định đạm	Nồng độ IAA (µg/ml) sau 72 giờ	Phân giải lân PSI	Kháng nấm *in vitro* (%)
1	**ANNK11**	++	$3.20^{d} \pm 0.30$	$3.02^{abcd} \pm 0.65$	$40.91^{cd} \pm 4.01$
2	**ANNK16**	++	$2.02^{a} \pm 0.44$	$2.32^{ab} \pm 0.12$	$6.57^{ab} \pm 2.31$
3	**ANNK17**	++	$3.55^{de} \pm 0.31$	$3.75^{bcd} \pm 0.18$	$24.75^{bc} \pm 33.07$
4	**NNK21**	++	$3.49^{de} \pm 0.19$	$2.16^{a} \pm 0.10$	$74.24^{efgh} \pm 6.60$
5	**NNK23**	+++	$4.70^{f} \pm 0.64$	$2.43^{ab} \pm 0.12$	$1.52^{a} \pm 3.03$
6	**NNK24**	+++	$2.99^{bcd} \pm 0.24$	$3.18^{abcd} \pm 0.95$	$83.33^{gh} \pm 4.01$
7	**NNK25**	+	$3.96^{e} \pm 0.71$	$4.28^{d} \pm 1.49$	$87.37^{h} \pm 2.31$
8	**A2R4**	+++	$2.32^{ab} \pm 0.44$	$10.67^{e} \pm 1.53$	$19.70^{abc} \pm 23.81$
9	**0405-02**	+++	$2.41^{abc} \pm 0.15$	$10.83^{e} \pm 0.76$	$76.77^{fgh} \pm 7.78$
10	**R54**	+	$3.12^{cd} \pm 0.63$	$2.15^{a} \pm 0.16$	$66.16^{efgh} \pm 10.96$
11	**NDP61**	+	$2.88^{bcd} \pm 0.25$	$2.36^{ab} \pm 0.27$	$70.20^{efgh} \pm 3.81$
12	**DP61**	+	$2.42^{abc} \pm 0.22$	$3.93^{cd} \pm 1.11$	$63.13^{defg} \pm 12.34$
13	**DP62**	++	$2.09^{a} \pm 0.40$	$2.82^{abc} \pm 0.20$	$59.60^{def} \pm 11.17$
14	**DP63**	+	$2.01^{a} \pm 0.76$	$2.26^{a} \pm 0.17$	$51.52^{de} \pm 8..02$

Chú thích màu tạo giữa dịch nuôi cấy môi trường Ashby và thuốc thử Nessler: (+++): tạo phức
màu vàng cam đậm, cố định đạm tốt; (++): tạo phức màu vàng cam, cố định đạm trung bình; (+): tạo phức màu vàng nhạt, cố định đạm yếu; (-): không thay đổi màu thuốc thử Nessler, không có khả năng cố định đạm.

Sau 3 ngày thì khả năng sinh IAA của các chủng sinh ra không nhiều. Theo kết quả của (Mohite, 2013) đã công bố thì các chủng vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu này cho kết quả sinh IAA thấp đến trung bình, trong 14 chủng thì chủng cho giá trị

sinh IAA cao nhất là NNK23 có sự khác biệt về giá trị thống kê so với 13 chủng còn lại.

Khả năng phân giải lân thể hiện qua chỉ số hòa tan phosphat (PSI). Chủng A2R4 và 0405-02 là 2 chủng có chỉ số PSI lớn nhất là 10.83 và 10.66 tương ứng. Các chủng còn lại thể hiện giá trị PSI từ 2.15 đến 4.28, thấp hơn hẳn hai chủng trên.

3.3 Khả năng đối kháng nấm

***Aspergillus flavus* CDP2 *in vitro* của các chủng phân lập** Các chủng đều có khả năng đối kháng tốt *Aspergillus flavus* CDP2 khi cấy khuẩn trước khi cấy nấm 24 giờ. Từ kết quả nuôi cấy trước 24 giờ và nuôi cấy cùng lúc thì NNK24 và NDP61 là 2 chủng cho kết quả đối kháng tốt nhất.

3.4 Khả kháng nấm *Aspergillus flavus* CDP2 trên hạt đậu phộng (*in vivo*)

Khi cấy vi khuẩn 24 giờ rồi gây nhiễm nấm ở mật độ 10^2 bào tử/g có sự khác biệt rất lớn so với đối chứng âm, kháng nấm hiệu quả hơn hoặc tương đương đối chứng dương, khi cấy cùng lúc không thể hiện hoạt tính, chứng tỏ khả năng ức chế bào tử nấm nảy mầm chứ không có khả năng tiêu diệt. Khả năng đối kháng của NNK24 và NDP61 khi cấy vi khuẩn trước nấm hiệu quả hơn so với *Streptomyces* sp. ASBV-1 (Zucchi *et al.*, 2008).

3.5 Hoạt tính probiotic trong hỗ trợ tăng trưởng cây đậu phộng (*in vivo*)

Xử lý hạt giống đậu phộng bằng 2 chủng NNK24, NDP61 trong 30 phút tăng tỉ lệ nảy mầm từ 56.7% lên đến 93.3%, khối lượng và chiều dài tăng khoảng 2 lần, độ khỏe mầm tăng gần gấp 3 lần sau 15 ngày xử lý hạt (bảng 2, hình 2).

Bảng 2: Chỉ số theo dõi cây đậu phộng sau 15 ngày xử lý hạt giống

Nghiệm thức	Khối lượng tươi (g)	Chiều dài cây (cm)	Độ khỏe mầm (cm*%)
ĐC (-)	$2.38^{a} \pm 0.24$	$12.53^{a} \pm 0.93$	$706.67^{a} \pm 286.45$
ĐC (+)	$2.75^{a} \pm 0.33$	$12.80^{a} \pm 1.54$	$944.33^{a} \pm 189.41$
NNK24	$4.06^{b} \pm 0.19$	$25.17^{bc} \pm 1.33$	$2001.33^{b} \pm 429.308$
NDP61	$4.25^{b} \pm 0.33$	$27.87^{c} \pm 1.44$	$2590.00^{b} \pm 200.75$



Hình 2: Cây đậu phộngsau 15 ngày xử lý vớidịch vi khuẩn; ĐC (-): Đối chứng âm, ĐC (+):Đối chứng dương, NNK24: Vi khuẩn phân lập chủng NNK24, NDP61: Vi khuẩn phân lập chủng NDP61

3.5 Định danh từ trình tự 16SrRNA

Giải trình tự gene 16SrRNA của NNK24 và NDP61 thu được trình tự nucleotide chiều dài lần lượt là 1424 bp và 1372 bp. Đối chiếu trình tự nghiên cứu với các trình tự 16S rDNA của các loài vi khuẩn đã được công bố cho thấy có sự tương đồng cao với các loài vi khuẩn thuộc *Bacillus cereus* group lần lượt là 97-99% và 98-99%, gần nhất với *Bacillus albus.* So sánh khoảng cách di truyền và đặc điểm sinh lý, sinh hóa cho phép kết luận hai chủng được phân lập nội sinh và bề mặt rễ cây đậu phộng thuộc loài *Bacillus albus*, một loài nội sinh cây có hoạt tính hỗ trợ tăng trưởng cây trồng và kháng nấm bệnh cây.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu tạo tiền đề sản xuất chế phẩm probiotic cây đậu phộng ứng dụng xử lý hạt giống đậu phộng nói riêng và hạt giống nói chung để ngăn ngừa sự phát triển nấm sinh aflatoxin và hỗ trợ tăng trưởng cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dhanasekaran, D., S. Shanmugapriya, N., Thajuddin and Panneerselvam, A. 2011. 'Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals'. *Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology*

Abdu, s.h., Tesfamariam, I.G., Yucheng, Z and Zhen, G.Z. 2013. 'Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review)' *ONCOLOGY LETTERS* 5: 1087-1092

Imran, A., Zabta, K.S., Shomaila, S., Shaheen, S. 2019. 'Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants' *Microbiological Research* 221 36–49.

Esther, M. and Paula, G.F. 2017. 'Plant probiotic bacteria: solutions to feed the world' *AIMS Microbiology,* 3(3): 502-524.

Waheeda, K. and Shyam, K.V. 2017. 'Formulation of Novel Surface Sterilization Method and Culture Media for the Isolation of Endophytic Actinomycetes from Medicinal Plants and its Antibacterial Activity' *Plant Pathol Microbiol*, 8:2

Paul, D.V., George M. G., Dorot, J., Noel, R.K., Wolfgang, L., Fred, A.R., Karl, H.S. and William, B.W. 2009. Volume Three The Firmicutes, *Bergey's Manual of*

Systematic Bacteriology Second Edition, DOI: 10.1007/b92997

Mohite, B. 2013. 'Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth' *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 638-649

Athakorn, P., Montree, I., Warin, I., Chiradej, C. and Punnawich, Y. 2014. 'Phosphate Solubilization and Growth Promotion of Rubber Tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.) by *Trichoderma* Strains' *Journal of Agricultural Science*: Vol. 6, No. 9; 2014

Zucchi, T.D., Moraes, L.A.B. and Melo, I.S. 2008. '*Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains' *Journal of Applied Microbiology* ISSN

PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI CELLULOSE TỪ BÃ MÍA

Trương Quốc Tất*, Phan Thị Bích Ngọc
Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm – Trường Đại học Tiền Giang
Tác giả liên lạc: truongquoctat@tgu.edu.vn

TÓM TẮT

Sử dụng phụ phẩm nông nghiệp làm phân hữu cơ vi sinh đang là giải pháp có hiệu quả cao do vừa giảm thiểu chất thải gây ô nhiễm môi trường vừa tận dụng để làm phân hữu cơ giàu chất dinh dưỡng thay thế cho phân hóa học. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này là xác định được một số dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose nhằm xử lý phế phẩm bã mía để làm phân hữu cơ vi sinh. Kết quả nghiên cứu cho thấy có 4/13 dòng vi khuẩn đã phân lập từ bã mía tạo vòng sáng halo khi nhuộm với thuốc thử lugol. Trong đó 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 có khả năng sinh tổng hợp enzyme cellulase mạnh với đường kính vòng phân giải CMC lần lượt là 10,38 mm và 10,13 mm. Đồng thời 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 cũng có khả năng phân giải bột giấy photocopy. Trong đó chủng BM3.4 có khả năng phân giải khá cao với tỷ lệ phần trăm khối lượng giấy bị phân giải là 11,17% sau 7 ngày. Kết quả phân tích di truyền phân tử dựa trên trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn BM3.4 tương đồng 100% với chủng Bacillus subtilis nên được gọi là Bacillus subtilis BM3.4.

Từ khóa: Bacillus subtilis, bã mía, cellulose, enzyme cellulase.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF CELLULOLYTIC BACTERIA FROM BAGASSE

Truong Quoc Tat*, Phan Thi Bich Ngoc
Department of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University
Corresponding author: truongquoctat@tgu.edu.vn

ABSTRACT

Using agricultural by-products as micro-organic fertilizers is a highly effective solution by minimizing waste causing environmental pollution and making use of compost rich nutrients to replace for chemical fertilizers. The effect of this study is identify some bacteria strains capable of resolving cellulose from bagasse to product compost. The results of study showed that 2/13 strains that were isolated from bagasse made a hago glow when stain them with lugol reagent. In which, 2 strains BM1.2 and BM3.4 capable of biosynthesis cellulase strongly with resolution ring diameter 10,38 mm and 10,13 mm respectively. Beside that, BM1.2 and BM3.4 strains capable of resolving photocopy pulp. In which, BM3.4 strain has quite high decomposition ability with the percent of resolved paper weight is 11,17% after 7 days. The results of analysis the 16S-rRNA gen sequence of BM3.4 strain similar 100% with Bacillus subtilis, so that it was determinned as Bacillus subtilic BM3.4.

Key words: *Bacillus subtilic, bagasse, cellulose, cellulase enzyme.*

TỔNG QUAN

Mía (*Saccharum officinarum*) là loại cây nhiệt đới, được trồng để làm nguyên liệu cho ngành công nghiệp chế biến đường và phụ phẩm của nó là khối lượng rất lớn bã mía. Hiện nay, mía đang được tiếp tục phát triển tại Việt Nam do đó lượng bã mía từ các nhà máy đường thải ra môi trường là rất lớn. Lâu nay các nhà máy đường đem đốt một phần bã mía sau khi sản xuất đường để cung cấp điện cho nhà máy, phần lớn thải ra môi trường bên ngoài. Theo nghiên cứu của Viện Sinh học Nhiệt đới – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, trong bã mía có hàm lượng cellulose khoảng 50%

và hemicellulose khoảng 25% nên có thể tận dụng nguồn carbon này để vi khuẩn sinh tổng hợp enzyme cellulase. Việc sử dụng vi khuẩn phân giải cellulose đã và đang được các nhà khoa học trong và ngoài nước nghiên cứu. Ở Ấn Độ, B.C. Behera *et al.*, (2014) đã phân lập vi khuẩn phân giải cellulose từ đất rừng Đước và xác định đó là các loài *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. Tại Việt Nam, Võ Văn Song Toàn *và ctv* (2017) đã phân lập và định danh được 3 chủng vi khuẩn thuộc chủng *Achromobacter* spp., *Bacillus* spp. từ dạ cỏ của bò để phân giải cellulose có trong bột bã mía trong điều kiện *in vitro*. *Mặc dù bã mía là nguồn vật liệu chứa nhiều cacbon thích hợp để làm phân hữu cơ rất có lợi cho cây trồng nhưng phần lớn vẫn chưa được xử lý đúng cách và là nguyên nhân gây ô nhiễm môi trường*. Do đó, đề tài "Phân lập và định danh vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose từ bã mía" đã được thực hiện với mục đích phân lập và định danh các dòng vi khuẩn phân giải cellulose từ bã mía và bước đầu đánh giá khả năng phân giải giấy của các dòng vi khuẩn phân lập được ở điều kiện phòng thí nghiệm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu: các mẫu bã mía được thu tại vựa mía Lương Phú, xã Thân Cửu Nghĩa, huyện Châu Thành, tỉnh Tiền Giang (Hình 1).



Hình 1. Mẫu bã mía

Hóa chất: môi trường CMC, Mfp (Merch, Đức), thuốc thử Lugol, NaCl, KOH, H_2O_2 (Trung Quốc).

Phương pháp

Xử lý mẫu

Các mẫu bã mía sau khi thu về phòng thí nghiệm được cắt nhỏ và cho vào bao kín, bổ sung ít nước để tăng độ ẩm và đem ủ ở nhiệt độ thường. Lấy mẫu để phân lập vi khuẩn ở các thời điểm 7, 14, 21 và 28 ngày sau khi ủ (Hình 2).



Hình 2. Mẫu bã mía sau các khoảng thời gian ủ
(A: ủ 7 ngày, B: ủ 14 ngày, C: ủ 21 ngày, D: ủ 28 ngày)

Phân lập vi khuẩn

Các mẫu bã mía sau khi ủ sẽ được đồng nhất, phân lập trực tiếp bằng phương pháp pha loãng và cấy trải trên môi trường CMC agar, ủ ở 37^{o}C trong 48 giờ. Chọn khuẩn lạc mọc riêng rẽ, đặc trưng cấy chuyền nhiều lần đến khi thu được khuẩn lạc đồng nhất và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở 4^{o}C (Ryckeboer *et al.*, 2003).

Kiểm tra đặc tính của vi khuẩn

Mô tả đặc điểm khuẩn lạc, hình thái tế bào, xác định đặc tính Gram, catalase và oxidase.

Đánh giá khả năng thủy phân CMC của các dòng vi khuẩn

Dùng que cấy nhọn cấy chấm điểm trên môi trường CMC agar, ủ 72 giờ ở 30^{o}C. Sau đó đĩa môi trường được nhuộm với dung dịch lugol (1 g/L) trong 15 phút, cuối cùng rửa với dung dịch muối NaCl 1M. Vi khuẩn thủy phân CMC sẽ tạo vòng sáng halo do enzyme cellulase đã phân giải cơ chất CMC trong môi trường làm cho môi trường trở nên trong suốt (Ganesh D. Saratete *et al.,* 2009).

Đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào của các dòng vi khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch

Thí nghiệm đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào của các chủng vi khuẩn đã phân lập được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 nhân tố là dòng vi khuẩn, mỗi nghiệm thức được lặp lại 4 lần. Các dòng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường CMC lỏng với tốc độ lắc 150 rpm. Sau 72 giờ, dịch vi khuẩn được ly tâm 5000 rpm ở 4^{o}C trong 15 phút. Thu nhận và nhỏ 40 µL phần dịch enzyme thô này vào mỗi lỗ đã đục trên đĩa petri chứa cơ chất CMC, ủ các đĩa thạch ở 30^{o}C. Sau 24 giờ, các đĩa thạch được nhuộm với dung dịch lugol. Quan sát vòng phân giải tạo thành. *Nếu vi khuẩn sinh ra enzyme cellulase thì sẽ tạo một vòng trong suốt quanh lỗ đục (Ganesh D. Saratete* et al.*, 2009).*

$$\Delta D = D - d \text{ (mm)}$$

Trong đó: D: đường kính vòng phân giải (mm)

d: đường kính lỗ thạch (mm).

Đánh giá khả năng phân giải giấy photocopy của các dòng vi khuẩn đã phân lập

Các dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào cao được nuôi trong 10 Ml môi trường Mfp lỏng (0,2 g giấy photocopy cắt nhỏ/ 10 Ml môi trường M). Nguồn giống chủng được nuôi trong môi trường CMC lỏng trong 3 ngày, chủng giống với tỉ lệ 1%. Sau 7 ngày ủ, đánh giá khả năng phân giải giấy photocopy của các dòng vi khuẩn thông qua phần trăm khối lượng giấy bị hao hụt sau. Công thức tính khối lượng giấy hao hụt:

% hao hụt = [(khối lượng ban đầu - khối lượng lúc sau) / khối lượng ban đầu] x 100

Định danh dòng vi khuẩn tiềm năng

DNA của dòng vi khuẩn tiềm năng có khả năng phân giải giấy photocopy tốt được tách chiết theo quy trình sau: Cân 0,45 gram cát mịn sạch, đã tiệt trùng cho vào các ống eppendorf 1,5 mL; lấy 8 - 10 khuẩn lạc đã thuần từ đĩa môi trường TSA cho vào ống eppendorf; cho 1 mL CTAB 3% vào mỗi ống eppendorf, trộn đều hỗn hợp khuẩn lạc và cát trong dung dịch Cetyltrimethylammonium bromua; lắc đều các ống eppendorf sau đó đem ủ ở 65 ℃ trong 1 - 2 giờ, cách 15 phút lắc đều các ống eppendorf để mẫu nóng đều; ly tâm ở tốc độ 13.000 rpm trong 10 phút; chuyển 700 µL dịch trong bên trên cho sang ống eppendorf 1,5 mL mới; cho thêm 500 µL chloroform vào 700 µL dịch trong vừa chuyển và lắc nhanh để tăng sự tiếp xúc của mẫu và chloroform; ly tâm ở tốc độ 13.000 rpm trong 8 phút; chuyển 500 µL dịch trong bên trên sang ống eppendorf 1,5 mL mới; kết tủa DNA bằng 750 µL isopropanol lạnh, giữ lạnh trong 30 phút; ly tâm mẫu ở tốc độ 13000 rpm trong 30 phút; loại bỏ isopropanol cẩn thận, tránh làm trôi DNA; làm sạch DNA bằng 200 µL ethanol lạnh; ly tâm ở tốc độ 6.500 rpm trong 5 phút; loại bỏ ethanol và để khô mẫu qua đêm; cho thêm 30-100 µL TE vào để trữ mẫu và cho vào tủ đông ở - 20℃ (Ihmark *et al.,* 2012).

Sau đó, sản phẩm DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F/1492R có trình tự: 27F (5'-3'): AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG' và 1492R (5' - 3'): TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT. Hai đoạn mồi này nhắm vào đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: giai đoạn sơ khởi 95℃ (300 giây); 30 chu kì: 95℃ (60 giây) - 53℃ (30 giây) - 72℃ (90 giây) - 72℃ (300 giây). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5% trước khi giải trình tự. Kết quả giải trình tự được so sánh và dò tìm trên ngân hàng gene NCBI (trang web http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) để xác định mức độ loài của dòng vi khuẩn.

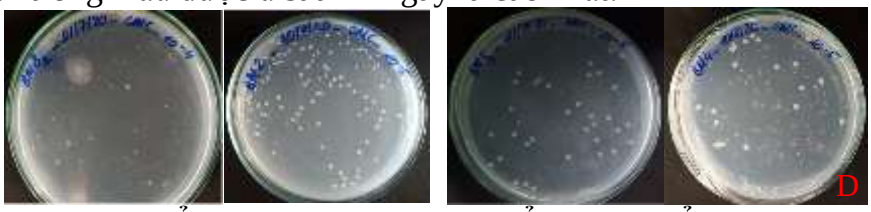
Xử lý số liệu

Số liệu được nhập và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, phân tích thống kê ANOVA, $LSD_{0,05}$ bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập vi khuẩn

Từ 4 mẫu bã mía sau 7 đến 28 ngày ủ, đã xác định được 13 chủng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose trên môi trường phân lập có chứa cơ chất CMC (Hình 3). Mật số vi khuẩn trong mẫu được ủ sau 14 ngày là cao nhất.



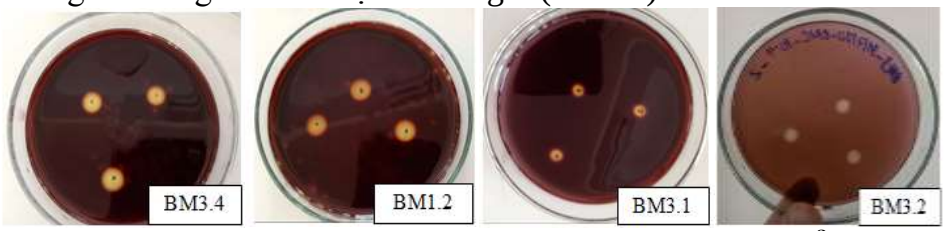
Hình 3. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phát triển sau 48 giờ (A: bã mía ủ 7 ngày; B: bã mía ủ 14 ngày; C: bã mía ủ 21 ngày; D: bã mía ủ 28 ngày)

Kiểm tra đặc tính của các dòng vi khuẩn đã phân lập

Đa số các chủng vi khuẩn phân lập có khuẩn lạc dạng tròn (92,3%), bìa nguyên (69,2%) hoặc răng cưa (23,1%), màu trắng sữa (23,1%) hoặc trắng đục (53,8%), kích thước nhỏ với đường kính từ 1 đến 3 mm. Khi quan sát hình dạng tế bào dưới kính hiển vi cho thấy phần lớn có dạng hình que (53,8%), hình ovan chiếm (38,5%) và hình cầu chiếm (7,7%). Kết quả xác định gram cho thấy có 76,9% dòng vi khuẩn phân lập được là vi khuẩn gram dương, gram âm chiếm 23,1% và đa số đều cho kết quả dương tính khi thử catlase và oxidase với tỉ lệ lần lượt là 84,6% và 69,2%.

Đánh giá khả năng thủy phân CMC của các dòng vi khuẩn

Từ 13 dòng vi khuẩn đã phân lập từ bã mía có 4 dòng vi khuẩn có khả năng thủy phân CMC chiếm 21,05% thể hiện qua vòng phân giải không màu quanh khuẩn lạc trên môi trường CMC agar khi nhuộm với lugol (Hình 4).



Hình 4. Vòng thủy phân CMC của 4 chủng vi khuẩn

Đánh giá khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào của các dòng vi khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch

Khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào của các dòng vi khuẩn đã phân lập được đánh giá thông qua đường kính vòng phân giải CMC (Bảng 1).

Bảng 1. Đường kính vòng phân giải của 4 chủng vi khuẩn phân lập được

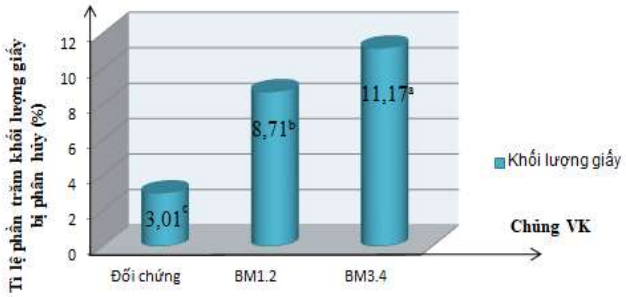
Nghiệm thức	Đường kính vòng phân giải (mm)
Chủng BM1.2	10,13[a]
Chủng BM3.2	7,88[b]
Chủng BM3.1	8,75[b]
Chủng BM3.4	10,38[a]
F tính	**
CV (%)	6,07 %

Các số trong một cột có cùng chữ theo sau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức ý nghĩa 1%. Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 4 lần lặp lại.

Qua bảng 1 cho thấy, cả 4 dòng vi khuẩn đều có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào với đường kính vòng phân giải từ 8,75 đến 10,38 mm. Trong đó 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 dòng còn lại nhưng giá trị đường kính vòng phân giải giữa chúng lại khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Theo *Trần Thị Ánh Tuyết và Trương Quốc Huy (2010) thì enzyme cellulase do 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 sinh ra thuộc nhóm enzyme có độ mạnh trung bình do* 10 < D-d < 19,5 mm. Từ kết quả ở Bảng 2, hai dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 được chọn để thực hiện các thí nghiệm sau.

Đánh giá khả năng phân giải giấy photocopy của các dòng vi khuẩn

Qua kết quả ở hình 5 cho thấy, 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 đều có khả năng phân giải giấy photocopy tương đối tốt. Trong đó tỷ lệ phần trăm khối lượng giấy bị hao hụt của chủng BM3.4 là 11,17% khác biệt có ý nghĩa với mức ý nghĩa 1% so với chủng BM1.2 và mẫu đối chứng. Khả năng phân giải giấy photocopy của 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 trong nghiên cứu này thấp hơn trong nghiên cứu của Võ Văn Phước Quệ và Cao Ngọc Điệp (2011) khi nhóm tác giả này phân lập vi khuẩn từ dạ cỏ bò với phần trăm giấy photocopy bị phân giải là 53 – 61,33% trong cùng khoảng thời gian nuôi ủ là 7 ngày. Bên cạnh đó, khả năng thủy phân CMC của 2 dòng vi khuẩn BM1.2 và BM3.4 ở thí nghiệm trước là tương đối giống nhau nhưng khả năng phân giải giấy photocopy giữa 2 dòng này lại có sự khác biệt. Theo Fields *et al.*, (1998) thì quá trình phân giải cellulose của vi sinh vật là sự kết hợp của 1 hệ enzyme cellulase phức tạp chứ không chỉ cần mỗi enzyme ß-D glucanase đã phân giải CMC. Do đó, hoạt tính thủy phân CMC chưa thể đánh giá toàn diện khả năng phân giải cellulose của vi sinh vật.



Hình 5. Tỉ lệ phần trăm khối lượng giấy bị phân hủy của các chủng VK

Kết quả định danh

Dòng vi khuẩn BM3.4 có hoạt tính sinh tổng hợp enzyme cellulase khá cao và khả năng phân giải giấy photocopy tốt được chọn để định danh. DNA của dòng vi khuẩn BM3.4 được trích và thực hiện PCR với cặp mồi tổng quát 27F-1492R nhằm vào đoạn gene 16S-rRNA. Bộ gen của vi khuẩn đã được trích ly thành công với sản

phẩm PCR thu được có chất lượng tốt, băng rõ duy nhất cho mỗi dòng vi khuẩn trên gel điện di với kích thước đoạn gen là 1054 bp.

Sản phẩm PCR của dòng vi khuẩn BM3.4 được giải mã trình tự và định danh dựa trên sự kết hợp các đặc điểm hóa sinh và so sánh trình tự nucleotide trong gene 16S-rRNA của dòng vi khuẩn BM3.4 với gene tương ứng trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng BlastN. Kết quả cho thấy dòng BM3.4 có trình tự nucleotide của gene 16S-rRNA tương đồng 100% với gene của dòng *Bacillus subtilic*. Nên dòng BM3.4 được định danh là *Bacillus subtilic* BM3.4.

KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

Từ các mẫu bã mía sau 7 đến 28 ngày ủ đã phân lập được 13 dòng vi khuẩn. Các dòng vi khuẩn phân lập được có sự đa dạng về hình thái, màu sắc. Trong đó có 4/13 dòng vi khuẩn có khả năng thủy phân CMC.

Hai dòng vi khuẩn BM3.4 và BM1.2 có khả năng sinh enzyme ngoại bào khá cao với enzyme sinh ra có độ mạnh trung bình.

Cả 2 dòng BM3.4 và BM1.2 đều có khả năng phân giải giấy photocopy. Trong đó dòng BM3.4 có khả năng phân hủy cao hơn với tỷ lệ phần trăm khối lượng giấy hao hụt là 11,17%.

Dòng vi khuẩn BM3.4 có hoạt tính sinh tổng hợp enzyme cellulase mạnh và khả năng phân giải giấy photocopy tốt đã được định danh là *Bacillus subtilis* BM3.4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

BEHERA B.C., PARIDA S., DUTTA S.K., THATOIH.N (2014). Isolation and identification ofxenlulo degrading bacteria from mangrovesoil of Mahanadi River Delta and theircellulase production ability. AmericanJournal of Microbiological Research 2(1):41-46.

FIELDS, M. W., J. B. RUSSELL AND D. B. WILSON (1998). The role of ruminal carboxymethyl cellulases in the degradation of β-glucans from cereal grain. *FEMS Microbiol. Ecol* 27:261–268.

GANESH D. SARATETE, YUNG-CHUNG LO, WEN-MING CHANG, MING_DER BAI, JO- SHU CHANG (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic and applications of the cellulosetic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology* 44(417-425).

IHRMARK KTM, INGA KCM, BÖDEKER F, HANNA K, ARIANA S, JESSICA S, YLVA S, JAN BD, MIKAEL EC, KARINA, BJORN DL. New primers to amplify the fungal ITS2 region - evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities 2012.

RYCKEBOER, J., J. MEGAERT, J. COOSEMANS, K. DEPRINS, J. SWINGS (2003). Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl Microbiol* 94: 127 – 137.

VÕ VĂN SONG TOÀN, ĐỖ THỊ CẨM HƯỜNG, HỒ QUẢNG ĐỒ, TRẦN NHÂN DŨNG (2017). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn dạ cỏ của bò để phân giải bột bã mía trong điều kiện invitro. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ* 2017:48B trang 71- 80.

VÕ VĂN PHƯỚC QUỆ, CAO NGỌC ĐIỆP (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. Tạp chí khoa học Đại học Cần Thơ 2011:18a trang 177-184

PHÂN LẬP VÀ SÀNG LỌC THỰC KHUẨN THỂ (BACTERIOPHAGE) CÓ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT SINH HỌC VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Nguyễn Văn Minh[1*], Dương Nhật Linh[1], Trần Thị Kiều Hương[1], Nguyễn Duy Thùy[1], Trần Thị Bảo Yến[1], Nguyễn Hồng Phúc[1]

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên lạc: minh.nv@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Hội chứng gan tụy cấp tính (tên tiếng Anh là Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome - AHPNS) do Vibrio parahaemolyticus gây ra đang được quan tâm vì bệnh có tỷ lệ chết và nhiều thiệt hại kinh tế đến ngành nuôi tôm của thế giới. Do đó việc nghiên cứu để tìm ra những phương pháp hiệu quả trong phòng trừ các bệnh nhiễm khuẩn luôn được nghiên cứu và phát triển, trong đó có liệu pháp thực khuẩn thể (một phương pháp sử dụng thực khuẩn thể để tiêu diệt vi khuẩn gây bệnh). Trong nghiên cứu này, từ 65 mẫu nước ao tôm được thu thập ở các tỉnh Tiền Giang, Kiên Giang, Bình Thuận, Trà Vinh đã phát hiện và phân lập được 2 thực khuẩn thể dựa vào hiện tượng ly giải vi khuẩn bằng phương pháp thạch 2 lớp. Kết quả sàng lọc của nghiên cứu này cho thấy tiềm năng ứng dụng của thực khuẩn thể nhằm kiểm soát tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy, giúp giảm thiểu tình trạng lạm dụng kháng sinh trong quá trình nuôi tôm.

Từ khóa: *Hội chứng gan tụy cấp tính, phân lập, thực khuẩn thể, tôm, Vibrio parahaemolyticus*

PHÂN LẬP VI SINH VẬT NỘI SINH CỦ CÂY TAM THẤT NAM (*Stahlianthus thorelli* Gagnep.) CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN, KHÁNG NẤM

Dương Nhật Linh[1*], Nguyễn Thị Thanh Nguyệt[1], Huỳnh Thị Ánh Xuân[1], Nguyễn Ngọc Cẩm Tiên[1], Mai Thị Thùy Trang[1]

[1]Khoa Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: linh.dn@ou.edu.vn

TÓM TẮT

Trong y học cổ truyền, tam thất nam (Stahlianthus thorelli Gagnep.) được sử dụng trong các bài thuốc dân gian với nhiều công dụng: điều hòa kinh nguyệt, đau nhức xương khớp, ức chế sự hình thành khối u, viêm loét, tiêu chảy,... Ở nghiên cứu này, 66 chủng vi khuẩn nội sinh và 21 chủng vi nấm nội sinh đã phân lập từ các mẫu củ tam thất khỏe mạnh được thu thập ở Đăk Lăk và Lâm Đồng. Từ các chủng vi sinh vật nội sinh được phân lập, tiến hành khảo sát khả năng kháng với 6 chủng vi khuẩn gây bệnh Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus kháng Methicillin và 5 chủng vi nấm gây bệnh Microsporum gypseum, Microsporum canis, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton rubrum, Candida albicans bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. Kết quả thu được chủng vi khuẩn nội sinh DLK7 kháng mạnh nhất với chủng vi khuẩn MRSA (30,00 ± 0,00 mm). Chủng vi nấm nội sinh DN13 kháng mạnh nhất với S. typhi (17,02 ± 0,44 mm). Chủng vi nấm nội sinh DN11 có hoạt tính kháng mạnh nhất với T. rubrum (70,5 ± 1,25 %). Từ kết quả của nghiên cứu này cho thấy tiềm năng kháng khuẩn, kháng nấm từ các chủng vi sinh vật nội sinh củ cây tam thất nam (Stahlianthus thorelli Gagnep.), giúp định hướng và phát triển những nghiên cứu mới về các hợp chất có hoạt tính sinh học từ vi sinh vật nội sinh cây dược liệu.

Từ khóa: *Tam thất nam, kháng khuẩn, kháng nấm, vi sinh vật nội sinh.*

PHÁT TRIỂN KỸ THUẬT LAMP TRONG CHẨN ĐOÁN BỆNH DO PHYTOPLASMA GÂY RA TRÊN CÂY TRỒNG: TÁC ĐỘNG VÀ Ý NGHĨA CỦA DỰ ÁN FIRST 1A ĐẾN ĐỔI MỚI SÁNG TẠO KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

PGS.TS.Nguyễn Bảo Quốc

Khoa Khoa học Sinh học, trường Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bệnh chổi rồng (witches'broom disease) do phytoplasma gây ra hiện nay được xem là dịch bệnh lan rộng và gây thiệt hại rất lớn đến năng xuất cây trồng đặc biệt là trên cây sắn và nhãn từ miền Đông Nam Bộ đến đồng bằng sông Cửu Long. Chính vì vậy việc phát triển các quy trình LAMP cho việc chẩn đoán nhanh các nhóm phytoplasma gây bệnh chổi rồng trên cây trồng như sắn, nhãn, mía cũng như các bệnh do phytoplasma gây ra trên các cây trồng khác sẽ được nghiên cứu như là một phương pháp thay thế nhanh và hiệu quả so với các phương pháp truyền thống hiện nay đang dùng trong chẩn đoán như PCR, RFLP và giải trình tự vốn đòi hỏi mất rất nhiều thời gian, công sức, tiền bạc và phải được thực hiện trong phòng thí nghiệm với các trang thiết bị tốt. Phương pháp LAMP có thể thực hiện ngay trên đồng ruộng và chỉ mất khoảng 30 phút để phát hiện các nhóm phytoplasma. Điều này rất có ý nghĩa trong việc chẩn đoán sớm nhằm phát hiện kịp thời mầm bệnh trên đồng ruộng, giúp người nông dân chủ động trong việc kiểm soát và hạn chế sự lây lan của mầm bệnh do phytoplasma gây ra. Sự đổi mới phương pháp chẩn đoán này đang nhận được sự quan tâm, kỳ vọng của nhiều tổ chức quốc tế và chính phủ các nước trong đó có chính phủ Việt Nam hiện nay. Với sự tham gia và hợp tác của GS. Matthew Dickinson tại Đại học Nottingham, Anh quốc và sự tài trợ kinh phí của hợp phần chyên gia giỏi nước ngoài, dự án FIRST-1a về đổi mối sáng tạo khoa học công nghệ, các nhà khoa học trong nước để có thể làm chủ công nghệ và nâng cao năng lực nghiên cứu và khả năng ứng dụng kỹ thuật LAMP trong việc chẩn đoán phytoplasma, hiểu được các cơ chế gây bệnh và kiểm soát sự lây lan của chúng trên đồng ruộng. Tác động và ý nghĩa của dự án FIRST-1a được trình bày dựa trên nghiên cứu này.

PRELIMINARY EXAMINATION OF ELECTRIC GENERATION FROM DOMESTIC WASTEWATER BY MICROBIAL FUEL CELL

Vo Huu Cong[1,*], Nguyen Thanh Lam[1], Ho Thi Thuy Hang[1,2]

[1] *Faculty of Environment, Vietnam National University of Agriculture*

[2] *PhD student, Vietnam National University of Agriculture Agriculture*

Corresponding author: vhcong@vnua.edu.vn

ABSTRACT

This research was conducted to evaluate the possibility to generate electricity from wastewater using a microbial fuel cell system. The simple two-chamers aparatus was fed with real wastewater collected from domintory discharge. Three batch experiments were carried out with 2 liters of wastewater with influence concentration of 518 mg/L BOD_5 and 750 mg/L COD. The results showed that the microbial fuel cell system generates a voltage from 0.29 to 0.45V for 7 days in presence of 1.0-1.5% Bacillus subtilis. The highest removal efficiency of BOD_5 and COD reached 56% and 63%, respectively. It is suggested that futher studies on effects of operating conditions and equipment should be continued.

Key words: *Microbial fuel cell, domestic wastewater, renewable energy, electric generation, Bacillus subtilis*

INTRODUCTION

Microbial fuel cells (MFCs) are bio-electrochemical systems capable to degrading organic compounds through microbial activities, while simultaneously releasing electrons (e^-) and protons (H^+), thereby generating electricity (Pandit and Das, 2018). Initial application of MFC was introduced to decompose glucose in aqueos solution using *Escherichia coli* and obtained an electric potential of 500 mV at 1000 ohms (Ω) for 1 hour (Davis and Yarbrough, 1962). Until 1980s, a number of researches discovered that adding electron mediators could enhance current density and power output (Allen R.M. and H.P., 1993, Vega and Fernández, 1987, Park and Zeikus, 2000, Ikeda and Kano, 2003, Ieropoulos et al., 2005). At the early stage of MFC research and development, much efforts were paid on investigation of microbes, substrates and electrode materials configuration. It was reported that microorganisms capable of transfer electrons directly to the anode stably and highly efficient without electron mediators were *Shewanella putrefaciens* (Kim et al., 1999), *Geobacteraceae sulferreducens* (Bond and Lovley, 2003), *Rhodoferax ferrireducens* (Chaudhuri and Lovley, 2003), *Geobacter metallicireducens* (Min et al., 2005). Substates play an important roles to the system as carbon sources. In addition to glucose, starch, glucose, lactate, molasses (Niessen et al., 2004), acetate, sucrose (Park and Zeikus, 2000). The concept of bioelectricity were used commonly when culture *Escherichia coli* and *Saccharomyces* on platinum electrodes (Du et al., 2007). Since then, there were significant increase on application of MFCs technology for renewable energy, especically, generation of electricity from wastewater.

In Vietnam, it was reported that domestic wastewater generated throughout the country has been significantly increased, Hanoi and Ho Chi Minh City reaching approximately 900,000 m^3/day and 2.67 million m^3/day, respectively (Ministry of Natural Resources and Environment, 2016). However, Municipal wastewater treatment plants only carry out 14% total amount generated, up to 86% of urban wastewater untreated directly discharges into the environment (World Bank, 2013). The general characteristic of domestic wastewater often contains many organic substances and nutritional components such as nitrogen, phosphorus, and pathogenic

microorganisms (Son et al., 2020). The discharge of large amounts of wastewater into the environment has a significant impact on the receiving source and distract recoverable resource from the wastewate. Domestic wastewater discharge in rural area are commonly mixed with livestock wastewater, therefore contains significant amount of BOD and nitrogen (Cong and Hang, 2019). One the other hand, domestic wastewater treatment forcus on application biochemical and chemical technologies to minimize the concentration of pollutants is not yet applied energy recovery technologies incorporated in the treatment system. The researches on MFCs in Vietnam have focused on selecting electrode materials for MFCs and using biosensors in assessing water quality (Nong Minh Tuan, 2014) . This research was conducted to assess the electricity gneration from domestic wastewater employed a simple design of MFC.

MATERIALS AND METHODS

Wastewater

The real wastewater was collected at the discharge point from dormitory of Vietnam National University of Agriculture between 11:00-11:30 am. Wastewater was separated for experimental run and initial condition analysis. Water quality parameters including pH, TSS, BOD_5, COD, NO_3^- , PO_4^{3-}, Coliform were collected and analyzed follow TCVN 6663-1:2011 and TCVN 5999:1995. The pH values was measured based on TCVN 6492:2011 *Water quality-Determination of pH;* BOD_5*: TCVN 6001- 1:2008 (ISO 5815-1:2003) Water quality-Determination of biochemical oxygen demand after n days* (BOD_n)*;* COD: TCVN 6491:1999 (ISO 6060:1989) *Water quality - Determination of the chemical oxigen demand;* TSS: *SMEWW 2540-Water quality-Determination of TSS;* Nitrate (NO_3^-): *TCVN 7323-2:2004 Water quality-Determination of nitrate;* PO_4^{3-}: *TCVN 6202:2008 Water quality-Determination of phosphorus;* Coliform: *TCVN 6187-1:2009 Water quality – Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria.*

Experimental aparatus

The experimental system was designed as two-chamber MFC system, one chamber acts as a cathode, and other acts as anode. The volume of each chamber is 2 liters, connected by 3% KCl salt bridge through cylindrical pipe with a diameter of 2 cm and a length of 7 cm. Each chamber is fixed with a graphite electrode (2cm×2cm×0.5cm) and connected through Victor VC 890D potentiometer with copper wire (Fig. 1).



Fig. 1. Experimental aparatus. [A] Anode chamber, [C] Cathode chamber

Experimental operation conditions

The reseach was conducted batch experiment in annaerobic condition with 3 runs (Table 1). The *Bacillus subtilis* strain was selected because it has been reported

possible for bioelectricity generation (Nimje et al., 2009, Ismail and Jaeel, 2013). In this study, *Bacillus subtilis* was propagated at level 1 in a specialized environment (0.4g meat broth, 1g pepton, 0.5g NaCl, 2g Jelly, 100 mL distilled water) in the laboratory. The original amount of culture provide inoculant of 11.1 x 10^{10} (CFU/100 mL).

Table 1. Experimental operation conditions

Run	Treatment vollume	Suplement of microbe
R1- Control	2000 mL	No addition of microbe
R2	2000 mL	1.0% (v/v) of *Bacillus subtilis*
R3	2000 mL	1.5% (v/v) of *Bacillus subtilis*

Experimental measurement

The voltage of MFCs is continuously measured with a Victor VC 890D meter. BOD_5, COD was measured before and after the operation.

RESULTS AND DISCUSSION

Wastewater characterization

The wastewater generation was estimated at 62-75 liters/person/day and recived from the domitory of 10,000 students. Wastewater qualities is characterized by pH, BOD_5, TSS, COD, N-NO_3^-, P-PO_4^{3-}, and coliform (Table 2). The results show that concentrations of COD (750 mg/L) and BOD_5 (518 mg/L) are 5 to 10 times higher than the regulated values by QCVN 14-MT:2015/BTNMT (category B). This result are similar to the general characteristics of the organic content in domestic wastewater published elsewhere (Hoa, 2017). These are components that are easily broken down by microorganisms, and associated with electricity generation. However, the nutrient content of N, P dissolved in the form of NO_3^- and PO_4^{3-} is still within the permitted limits of QCVN 14-MT:2015. The ratio of BOD:N:P is necessary to maintain suitable conditions for aerobic or anaerobic treatment by microorganisms.

Table 2. Characteristics dormitory wastewater

No.	Indicator	Unit	Measured value	QCVN 14-MT: 2015 (B)
1	pH	-	7,07	5 – 9
2	BOD_5	*mg/L*	518	50
3	TSS	*mg/L*	76	100
4	COD	*mg/L*	750	150
5	N-NO_3^-	*mg/L*	0,49	50
6	P-PO_4^{3-}	*mg/L*	6,68	10
7	Coliforms	*CFU/100mL*	133.630	5.000

Electric generation efficiency

The efficiency of electricity generation is assessed by the voltage obtained during the operation of the MFC operation. The results followed 216-hour shows that the presence of B. *subtilis* bacteria increased the ability of electricity production compared with no supplementation. When increasing the volume of B. *subtilis* supplemented from 1% to 1.5%, the voltage appeared earlier and maintained after 32 hours (from 36 to 168 hours). At formula 1 with 1% volume of B. *subtilis* addition, the voltage is almost non-existent during the first 24 hours, after increasing rapidly and reaching a pick of at 78 hours (0.44V), decreasing substantially to around 0.265V at 150 hours then continued its downward trend to roungly 0.091V at 168 hours. The

control formula without B. subtilis supplement indicate that the voltage was nearly below the detection value of the device. The research results are similar to some other researches (Nimje et al., 2009, Ismail and Jaeel, 2013) when adding B. *subtilis* electric current generate higher and stable. In another research (Liu et al., 2011), when operating the MFC system with domestic wastewater COD 415 ± 50 mg/l, the generated electricity remained stable after 270 hours to reach more than 200mV and continue to generate electricity until the end of the experiment for 1200 hours.

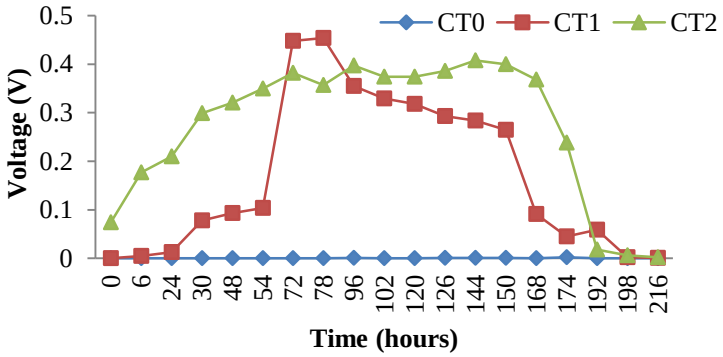


Fig 2. Electric generation within 216 hours

Fig 3 show capacity of domestic wastewater used as a substrate source for the generation of electricity by MFCs. Beside electric generation, the concentration of organic pollutants in the wastewater also decline significantly, with BOD_5 and COD value are downward trend in all of formula. Removal efficiency was obatained at 34%, 49% and 56% for BOD_5, respectively. COD removal efficiency also reached the highest efficiency in Run 2, with 63% of COD content removed after the experiment. This results are similar to the research by Min and Logan, 2004, treated domestic wastewater with flat plate MFC (Min and Logan, 2004). COD treatment efficiency from 42%-79% when changing retention time and flow capacity, generated electricity reaching 7.2 ± 1 mW/m^2 and 43 ± 1 mW/m^2.

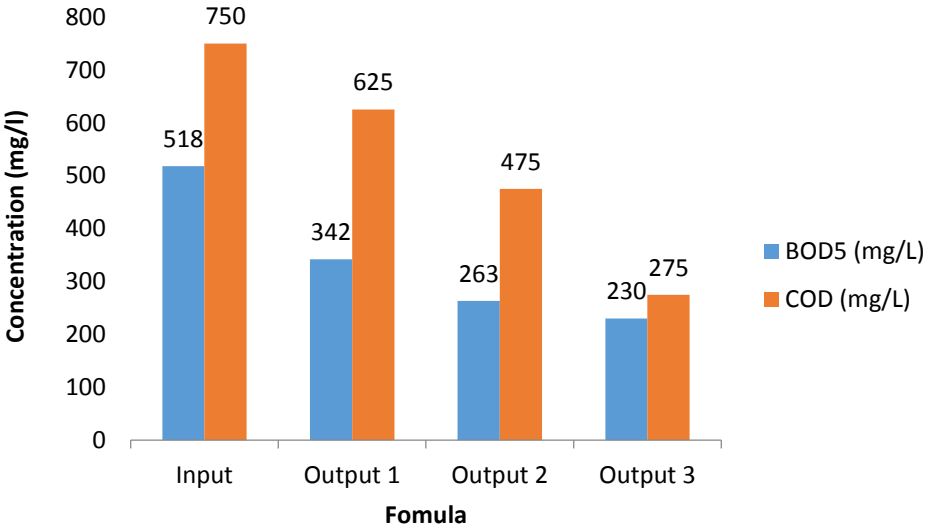


Fig 3. Removal of BOD and COD after the operation

CONCLUSION

This preliminary research employed a simple design of MFC with 2000 mL of real domestic wastewater with adding different proportion of *Bacillus subtilis*. Results confirm a potential to generate electricity in the range of 300-500 mV during 3-7 days after operation of experiment. This voltage equates to a third of the value of

commercial batteries. The BOD_5 removal efficiency obtained about 30-50%. The result indicates a further stabilization of MFC system could be achieved with involvement of other controlling parameters such as pH, BOD:N:P rate, microbial strains.

ACKNOWLEDEMENT

This work was supported by Vietnam's National Foundation for Science and Technology Development (NAFOSTED) (105.08-2018.312).

REFERENCES

ALLEN R.M. & H.P., B. 1993. Microbial Fuel-Cells electricity production from Carbohydrates. *Applied Biochemistry and Bioteehnology,* 39/40**,** 27-40.

BOND, D. R. & LOVLEY, D. R. 2003. Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes. *Appl Environ Microbiol,* 69**,** 1548-55.

CHAUDHURI, S. K. & LOVLEY, D. R. 2003. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat Biotechnol,* 21**,** 1229-32.

CONG, V. H. & HANG, P. T. 2019. Waste audit of cattle production in Minh Chau commune, Ba Vi district, Hanoi. *TNU Journal of Science and Technology,* 207**,** 129 - 134.

DAVIS, J. B. & YARBROUGH, H. F. J. 1962. Preliminary Experiments on a Microbial Fuel Cell. *Science,* 137**,** 615-616.

DU, Z., LI, H. & GU, T. 2007. A state of the art review on microbial fuel cells: A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv,* 25**,** 464-82.

HOA, T. T. H. 2017. Study on ammonium removal in domestic wastewater from dormitory of National University of Civil Engineering. *Journal of Science and Technology in Civil Engineering* 11**,** 191-197.

IEROPOULOS, I. A., GREENMAN, J., MELHUISH, C. & HART, J. 2005. Comparative study of three types of microbial fuel cell. *Enzyme and Microbial Technology,* 37**,** 238-245.

IKEDA, T. & KANO, K. 2003. Bioelectrocatalysis-based application of quinoproteins and quinoprotein-containing bacterial cells in biosensors and biofuel cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,* 1647**,** 121-126.

ISMAIL, Z. Z. & JAEEL, A. J. 2013. Sustainable power generation in continuous flow microbial fuel cell treating actual wastewater: influence of biocatalyst type on electricity production. *ScientificWorldJournal,* 2013**,** 713515.

KIM, B. H., IKEDA, T., PARK, H. S., KIM, H. J., HYU, M. S., KANO, K., TAKAGI, K. & TATSUMI2, H. 1999. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, Shewanella putrefaciens IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnology Techniques,* 13**,** 475–478.

LIU, G., YATES, M. D., CHENG, S., CALL, D. F., SUN, D. & LOGAN, B. E. 2011. Examination of microbial fuel cell start-up times with domestic wastewater and additional amendments. *Bioresour Technol,* 102**,** 7301-6.

MIN, B., CHENG, S. & LOGAN, B. E. 2005. Electricity generation using membrane and salt bridge microbial fuel cells. *Water Res,* 39**,** 1675-86.

MIN, B. & LOGAN, B. 2004. Continuous Electricity Generation from Domestic Wastewater and Organic Substrates in a Flat Plate Microbial Fuel Cell. *Environ. Sci. Technol.,* 38**,** 5809-5814.

MINISTRY OF NATURAL RESOURCES AND ENVIRONMENT 2016. Special issue: Urban Environment. National Environmental Status Report.

NIESSEN, J., SCHRODER, U. & SCHOLZ, F. 2004. Exploiting complex carbohydrates for microbial electricity generation ? a bacterial fuel cell operating on starch. *Electrochemistry Communications,* 6**,** 955-958.

NIMJE, V. R., CHEN, C.-Y., CHEN, C.-C., JEAN, J.-S., REDDY, A. S., FAN, C.-W., PAN, K.-Y., LIU, H.-T. & CHEN, J.-L. 2009. Stable and high energy generation by a strain of Bacillus subtilis in a microbial fuel cell. *Journal of Power Sources,* 190**,** 258-263.

NONG MINH TUAN. 2014. *Research and development of microbial fuel cells used as biosensors to assess wastewater quality.* Master thesis, Vietnam National University.

PANDIT, S. & DAS, D. 2018. Principles of Microbial Fuel Cell for the Power Generation. 21-41.

PARK, D. H. & ZEIKUS, J. G. 2000. Electricity Generation in Microbial Fuel Cells Using Neutral Red as an Electronophore. *Applied and Environmental Microbiology,* 66**,** 1292–1297.

SON, C. T., GIANG, N. T. H., NUI, N. H., THAO, T. P., LAM, N. T. & CONG, V. H. 2020. Assessment of Cau River water quality assessment using a combination of water quality and pollution indices. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua,* 69**,** 160-172.

VEGA, C. A. & FERNÁNDEZ, I. 1987. Mediating effect of ferric chelate compounds in microbial fuel cells with Lactobacillus plantarum, Streptococcus lactis, and Erwinia dissolvens. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics,* 17**,** 217-222.

WORLD BANK 2013. Vietnam UrbanWastewater ReviewExecutive Summary.

SẢN XUẤT SẢN PHẨM THUỶ PHÂN PROTEIN TỪ THỊT VỤN CÁ NGỪ VÂY VÀNG BẰNG SỰ THỦY PHÂN BỞI ENZYME FLAVOURZYME

Nguyễn Thị Mỹ Hương
Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nha Trang
Tác giả liên lạc: huongntm@ntu.edu.vn

TÓM TẮT

Đặc tính dinh dưỡng và chức năng của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng đã được nghiên cứu. Bốn sản phẩm thủy phân protein thu được bằng cách thủy phân thịt vụn cá ngừ vây vàng bởi enzyme Flavorzyme 0,5% ở nhiệt độ 50^{o}C và thời gian thủy phân khác nhau (1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ). Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng sau 4 giờ thủy phân có hàm lượng nước 6,1%, protein 63,6%, lipit 0,7% và tro 8,8%. Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có hàm lượng tổng axit amin là 35,36g/100g và tỉ lệ axit amin không thay thế so với tổng axit amin là 37,84%. Sản phẩm thủy phân protein thịt vụn cá ngừ giàu glycine, glutamic, aspartic, alanine, proline và leucine. Sau 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ thủy phân thịt vụn cá ngừ vây vàng, độ thủy phân đạt được lần lượt là 15,3%, 20,8%, 23,7% và 25,4%. Độ hòa tan của các sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ tăng lên khi thời gian thủy phân và độ thủy phân tăng. Các sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ có độ hòa tan trong khoảng 86,5%- 98,6%. Khả năng tạo bọt của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ đạt giá trị cao nhất (30,2%) ứng thời gian thủy phân 2 giờ và độ thủy phân 20,8%. Khả năng nhũ hóa của các sản phẩm thủy phân protein thịt vụn cá ngừ vây vàng trong khoảng 15,6 - 23,4 ml/g. Nghiên cứu này cho thấy sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có giá trị dinh dưỡng cao và đặc tính chức năng tốt. Cho nên sản phẩm thủy phân protein này có thể được sử dụng làm nguồn protein trong thực phẩm cho con người, thủy sản và động vật khác.

Từ khóa: Đặc tính dinh dưỡng, đặc tính chức năng, sản phẩm thủy phân protein, thịt vụn cá ngừ vây vàng.

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM YELLOWFIN TUNA TRIMMINGS BY ENZYMATIC HYDROLYSIS WITH FLAVOURZYME

Nguyen Thi My Huong
Faculty of Food Technology, Nha Trang University
Corresponding author: huongntm@ntu.edu.vn

ABSTRACT

The nutritional and functional properties of protein hydrolysates from yellowfin tuna trimmings were studied. Four protein hydrolysates were obtained by hydrolysis of yellowfin tuna trimmings with Flavourzyme 0.5% at 50^{o}C and different hydrolysis times (1 hour, 2 hours, 3 hours and 4 hours). The protein hydrolysate from yellowfin tuna trimmings after 4h of hydrolysis had a moisture content of 6.1%, protein content of 63.6%, lipid content of 0.7% and ash content of 8.8%. The protein hydrolysate from yellowfin tuna trimmings had a total amino acids content of 35.36 g/100g and a ratio of essential amino acids to total amino acids of 37.84%. The protein hydrolysate from yellowfin tuna trimmings was rich in glycine, glutamic, aspartic, alanine, proline and leucine. After 1 hour, 2 hours, 3 hours and 4 hours of hydrolysis of yellowfin tuna trimmings, the degree of hydrolysis obtained 15,3%, 20,8%, 23,7% và 25,4%, respectively. The solubility of protein hydrolysate increased when hydrolysis time and

degree of hydolysis increased. The protein hydrolysates from yellowfin tuna trimmings had solubility in the range of 86,5% - 98,6%. The study results showed that the foaming capacity of protein hydrolysate from yellowfin tuna trimmings reached a maximun value (30.2%) at hydrolysis time of 2h and degree of hydrolysis of 20.8%. The emulsifying capacity of protein hydrolysates from yellowfin tuna trimmings was in the range of 15,6-23,4 ml/g. This study showed that the protein hydrolysates from yellowfin tuna trimmings had a high nutritional value and good functional properties. Thus, these protein hydrolysates could be used as a protein source in food for human beings, fisheries and other animals.
Key works: *Nutritional property, functional property, fish protein hydrolysate, yellowfin tuna trimmings.*

TỔNG QUAN

Cá ngừ đại dương đặc biệt là cá ngừ vây vàng là một trong các loài cá có giá trị kinh tế cao. Ở Việt Nam ngành công nghiệp chế biến cá ngừ để xuất khẩu tạo ra khoảng 40-60% phụ phẩm bao gồm đầu, khung xương, nội tạng, thịt vụn, da,... trong đó thịt vụn cá ngừ rất giàu protein. Cũng như các loại phụ phẩm khác, thịt vụn cá ngừ dễ bị hư hỏng và gây ô nhiễm môi trường. Vì vậy cần phải tận dụng thịt vụn cá ngừ để sản xuất sản phẩm thủy phân protein. Thủy phân bởi enzyme là một trong những phương pháp hiệu quả nhất để thu hồi protein từ thịt vụn cá. Sản phẩm thủy phân protein từ phụ phẩm cá chứa các peptit và các axit amin có giá trị dinh dưỡng cao. Ngoài ra, sản phẩm thủy phân protein cá còn có các đặc tính chức năng quan trọng như khả năng hòa tan, khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa…cho nên có thể được sử dụng làm nguồn protein để bổ sung vào nhiều sản phẩm thực phẩm khác nhau cho con người và động vật nuôi. Ngày nay, sản phẩm thủy phân protein cá đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học cũng như các nhà công nghệ sinh học bởi hàm lượng protein cao với các axit amin không thay thế rất cần thiết cho cơ thể con người và các peptit có hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, kháng khuẩn, điều hòa huyết áp.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sản xuất sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng bằng cách thủy phân bởi enzyme Flavourzyme, xác định giá trị dinh dưỡng và một số đặc tính chức năng của sản phẩm thủy phân protein. Việc sản xuất sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ để ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm và trong nuôi trồng thủy sản là rất cần thiết. Điều này không những góp phần hạn chế ô nhiễm môi trường do phụ phẩm cá gây ra mà còn nâng cao hiệu quả sử dụng thịt vụn cá từ công nghiệp chế biến cá ở nước ta.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thịt vụn cá ngừ vây vàng

Thịt vụn cá ngừ vây vàng *(Thunnus albacares*) được mua ở Công ty TNHH Hoàng Hải, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa. Thịt vụn cá ngừ vây vàng ở trạng thái đông lạnh được vận chuyển trong thùng xốp về phòng thí nghiệm, sau đó thịt vụn cá ngừ được rã đông, xay nhỏ bằng máy xay và cho vào các túi nhựa (500 g/túi). Các túi này được cấp đông và bảo quản đông ở nhiệt độ - 20 ± 2^{o}C để sử dụng trong quá trình nghiên cứu.

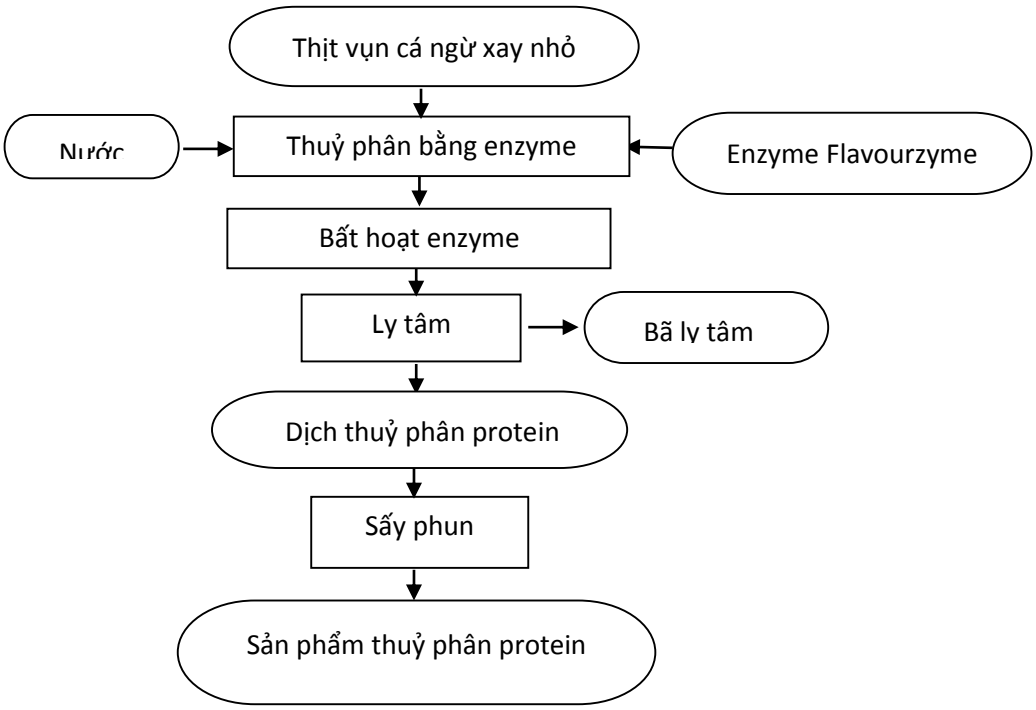
Enzyme Flavouzyme 500 MG

Enzyme Flavourzyme 500 MG được sản xuất bởi công ty Novozymes của Đan Mạch. Nó là một phức hợp protease/peptidase có nguồn gốc từ nấm mốc *Aspergillus oryzae*. Flavourzyme có cả tính exopeptidase và endoprotease nhưng chủ yếu là

exopeptidase. Điều kiện thích hợp cho Flavourzyme hoạt động là nhiệt độ 50°C và pH 5 - 7.

Thuỷ phân thịt vụn cá ngừ vây vàng

Quá trình thuỷ phân thịt vụn cá ngừ vây vàng bằng enzyme Flavourzyme được thể hiện ở sơ đồ Hình 1 như sau:



Hình 1. Sơ đồ quá trình thuỷ phân thịt vụn cá ngừ bằng enzyme Flavourzyme

Bốn mẫu thịt vụn cá ngừ vây vàng đã xay nhỏ, đông lạnh được rã đông qua đêm trong tủ lạnh, sau đó được thuỷ phân bằng enzyme Flavourzyme với tỉ lệ 0,5 % so với nguyên liệu, tỉ lệ nước/ nguyên liệu là 1/1, ở nhiệt độ 50 °C, pH tự nhiên (pH = 6), thời gian thủy phân lần lượt là 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ. Sau khi thuỷ phân, enzyme được bất hoạt ở nhiệt độ 85 °C trong 10 phút. Hỗn hợp được đem ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 20 phút. Sau khi ly tâm thu được 2 phần riêng biệt là dịch thuỷ phân protein và bã ly tâm. Dịch thuỷ phân protein được bổ sung maltodextrin với tỷ lệ 8% rồi đem sấy phun thành bột thuỷ phân protein. Thông số sấy phun như sau: Nhiệt độ đầu vào 180 °C, nhiệt độ đầu ra 80 °C, tốc độ nhập liệu 12 vòng/phút, tốc độ đĩa phun 15.000 vòng/phút. Bột thủy phân này được dùng để xác định các thành phần hóa học và một số đặc tính chức năng như độ hòa tan, khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa.

Phương pháp phân tích

Hàm lượng nước được xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ 100-105°C theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 3700:90. Hàm lượng tro tổng số được xác định bằng phương pháp nung ở nhiệt độ 550-600°C theo TCVN 5105:90. Hàm lượng nitơ tổng số được xác định theo TCVN 3705-90. Hàm lượng protein thô = Nitơ tổng số x 6,25. Hàm lượng lipit được xác định theo phương pháp Folch. Thành phần axit amin được xác định theo phương pháp sắc ký. Độ thủy phân được xác định theo Nguyen *et al*. (2011).

Xác định đặc tính chức năng của sản phẩm thủy phân protein

Độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein được xác định theo Souissi *et al*. (2007). Hòa tan 1 g sản phẩm thủy phân protein trong 100 ml nước cất. Dung dịch được khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và sau đó ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong

10 phút. Sau khi ly tâm thu dịch và đem đi xác định hàm lượng protein hòa tan bằng phương pháp biuret. Độ hòa tan được tính theo công thức:

Độ hòa tan (%) = (Lượng protein tan / Lượng protein trong mẫu) x 100

Khả năng tạo bọt được xác định theo Amiza *et al.* (2012). Hòa tan 3 g sản phẩm thủy phân protein trong 100 ml nước cất, hỗn hợp được đồng hóa trong 1 phút. Sau đó rót hỗn hợp vào ống đong 250 ml và đọc tổng thể tích. Khả năng tạo bọt được thể hiện qua phần trăm thể tích tăng sau đồng hóa. Khả năng tạo bọt (FC) được tính theo công thức sau:

FC (%) = (Thể tích sau đồng hóa - Thể tích trước đồng hóa) x 100 / thể tích trước đồng hóa.

Khả năng nhũ hóa được xác định theo Diniz & Martin (1997). 0,5 g sản phẩm thủy phân protein và 30 ml dầu thực vật được cho vào 60 ml dung dịch NaCl (30 g/l), hỗn hợp được đồng hóa ở tốc độ 9.500 vòng/phút trong 30 phút. Sau khi đồng hóa thêm 30 ml dầu nữa và tiếp tục đồng hóa thêm 30 giây. Hỗn hợp được chuyển vào ống ly tâm và giữ trong bể nước ở nhiệt độ 85 ^{o}C trong 15 phút, sau đó được ly tâm với tốc độ 3.000 vòng/phút trong 30 phút. Khả năng nhũ hóa (EC) được xác định theo công thức:

$EC\ (ml/g) = (V_A - V_R) / W_S$. Trong đó:

V_A: Thể tích dầu cho vào để tạo nhũ tương (ml)

V_R: Thể tích dầu được giải phóng sau khi ly tâm (ml)

W_S: Khối lượng mẫu sản phẩm thủy phân protein (g)

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2013 và SPSS 20 để đánh giá sự khác biệt giữa các mẫu.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Thành phần hoá học của thịt vụn cá ngừ vây vàng và sản phẩm thủy phân protein

Thành phần hoá học của thịt vụn cá ngừ vây vàng và sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng thu được sau 4 giờ thủy phân được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hoá học của thịt vụn cá ngừ vây vàng và sản phẩm thủy phân protein

Thành phần hoá học	Thịt vụn cá ngừ vây vàng	Sản phẩm thủy phân protein
Nước (%)	75,2 ± 0,3	6,1 ± 0,1
Protein (%)	22,5 ± 0,2	63,6 ± 0,2
Lipit (%)	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1
Tro (%)	1,1 ± 0,1	8,8 ± 0,1

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng protein của thịt vụn cá ngừ vây vàng là 22,5%, cao hơn hàm lượng protein của thịt cá chép (18,4%) và hàm lượng protein của thịt lươn (16, 88%). Tuy nhiên hàm lượng lipit của thịt vụn cá ngừ vây vàng là 0,5%, thấp hơn hàm lượng lipit của thịt cá chép (3,52%) và thịt lươn (3,41%) được báo cáo bởi Saputra & Nurhayati (2016) và Halim & Sarbon (2017). Hàm lượng tro của thịt vụn cá ngừ vây vàng là 1,1%, cao hơn như hàm lượng tro trong thịt cá chép (1,07%) (Saputra & Nurhayati, 2016) và hàm lượng tro trong thịt lươn (0,89%) (Halim & Sarbon, 2017). Từ kết quả nghiên cứu cho thấy thịt vụn cá ngừ vây vàng có hàm lượng protein cao, thích hợp cho việc tận dụng để sản xuất sản phẩm thủy phân protein.

Sản phẩm thuỷ phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có hàm ẩm 6,1%, hàm lượng protein 63,6%, cao hơn hàm lượng protein (40,43% - 43,11%) trong sản phẩm

thủy phân protein từ khung xương cá bớp (Amiza *et al*., 2012). Hàm lượng protein trong sản phẩm thủy phân thịt vụn cá ngừ vây vàng tương tự với hàm lượng protein trong sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá hồi (62,3-64,8%) được báo cáo bởi Sathivel *et al*. (2005). Hàm lượng lipit của sản phẩm thuỷ phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng là 0,7%, thấp hơn nhiều so với hàm lượng lipit (7,55%) của sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá nục (Ishak & Sarbon, 2018). Sản phẩm thuỷ phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có hàm lượng tro là 8,8%, thấp hơn so với hàm lượng tro (10,4%) của sản phẩm thuỷ phân protein từ khung xương cá nục (Ishak and Sarbon, 2018). Từ kết quả ở Bảng 1 cho thấy tổng hàm lượng nước, protein, lipit và tro trong sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng khoảng 80%. Như vậy trong sản phẩm thủy phân này còn có carbonhydrat tổng với hàm lượng cao. Điều này có thể là do bổ sung maltodextrin vào dịch thủy phân trước khi sấy phun để hỗ trợ cho quá trình sấy phun.

Axit amin của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng

Hàm lượng axit amin của sản phẩm thủy phân protein thu được từ sự thuỷ phân thịt vụn cá ngừ vây vàng trong 4 giờ được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Hàm lượng axit amin của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng

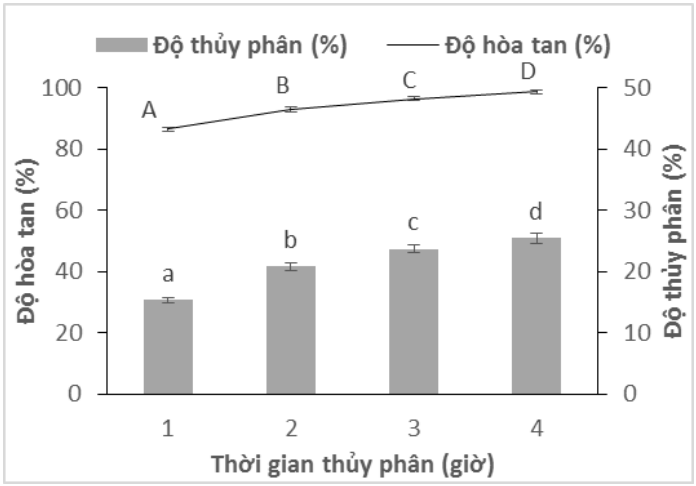
Thành phần axit amin	Hàm lượng (g/100g)
Alanine	3,23 ± 0,17
Aspartic	3,48 ± 0,14
Glutamic	4,65 ± 0,19
Glycine	5,21 ± 0,16
Histidine	1,83 ± 0,07
Isoleucine	1,57 ± 0,09
Leucine	2,88 ± 0,15
Lysine	1,64 ± 0,11
Methionine	0,84 ± 0,05
Phenylalanine	1,33 ± 0,08
Proline	2,89 ± 0,12
Serine	1,56 ± 0,06
Threonine	1,28 ± 0,08
Tyrosine	0,96 ± 0,04
Valine	2,01 ± 0,12
Tổng axit amin	35,36 ± 0,27
Tổng axit amin không thay thế	13,38 ± 0,15
Tổng axit amin thay thế	21,98 ± 0,18
Tỉ lệ axit amin không thay thế/axit amin thay thế	0,61 + 0,03
Tỉ lệ axit amin không thay thế so với tổng axit amin (%)	37,84 ± 0,28

Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có tổng hàm lượng axit amin là 35,36 g/100g, trong đó hàm lượng axit amin không thay thế là 13,38 g/100g, và hàm lượng axit amin thay thế là 21,98 g/100g. Tỉ lệ axit amin không thay thế/axit amin thay thế trong sản phẩm thủy phân từ thịt vụn cá ngừ vây vàng là 0,61, cao hơn tỉ lệ axit amin không thay thế/axit amin thay thế trong sản phẩm thủy phân protein từ

thịt cá đuối (0,51) (Lassoued *et al.*, 2015) và thịt lươn (0,57) (Halim and Sarbon, 2017), nhưng thấp hơn tỉ lệ axit amin không thay thế/axit amin thay thế trong sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá nục (0,71) (Ishak & Sarbon, 2018). Axit amin không thay thế chiếm tỉ lệ 37,84% tổng lượng axit amin. Các axit amin có hàm lượng cao trong sản phẩm thủy phân protein thịt vụn cá ngừ vây vàng là glycine, glutamic, aspartic, alanine, proline và leucine. Ngược lại, các axit amin có hàm lượng thấp là methionine và tyrosine. Amiza *et al.*, (2012) đã cho thấy tổng hàm lượng axit amin của sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá bớp là 28,16 - 33,77%. Các axit amin có hàm lượng cao trong sản phẩm thủy phân khung xương cá bớp cũng là glutamic, glycine và alanine. Nghiên cứu này đã cho thấy sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có giá trị dinh dưỡng cao với các axit amin không thay thế như histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine và valine rất cần thiết cho cơ thể con người, thủy sản nuôi và động vật khác. Vì vậy sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có thể được ứng dụng để bổ sung vào nhiều sản phẩm thực phẩm khác nhau cho con người hoặc làm thức ăn cho thủy sản cũng như động vật khác.

Độ thủy phân và độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein

Độ thủy phân và độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng được thể hiện ở Hình 2.



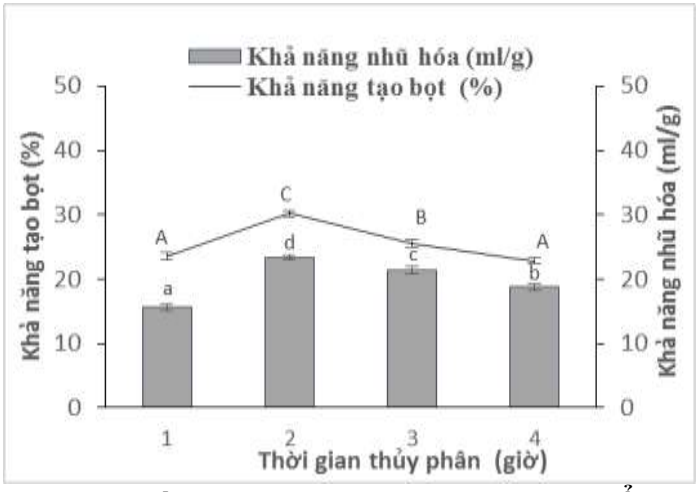
Hình 2. Độ thủy phân và độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng. Các giá trị trung bình mang ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (P<0,05)

Kết quả nghiên cứu cho thấy độ thủy phân tăng theo thời gian thủy phân. Ứng với thời gian thủy phân 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ, sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có độ thủy phân lần lượt là 15,3%, 20,8%, 23,7% và 25,4%. Tốc độ thủy phân tăng nhanh ở 2 giờ đầu tiên của quá trình thủy phân, sau đó tốc độ thủy phân tăng chậm dần. Độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng tăng dần theo thời gian thủy phân từ 1giờ, 2 giờ, 3 giờ đến 4 giờ và có giá trị lần lượt là 86,5%, 92,7%, 96,4% và 98,6%. Độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng cao hơn độ hòa tan (85-86%) của sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá bớp (Amiza *et al*., 2012). Ishak & Sarbon (2018) đã cho thấy độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá nục trong khoảng 85,45% - 92,98%. Độ hòa tan của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng tăng khi thời gian thủy phân và độ thủy phân tăng là do quá trình thủy phân

protein bằng enzyme làm cắt đứt liên kết peptit của phân tử protein tạo thành các peptit nhỏ hơn, khi thời gian thủy phân càng kéo dài, các peptit nhỏ được tạo ra càng nhiều, làm gia tăng số lượng các nhóm phân cực, hình thành liên kết hydro với nước, dẫn đến làm tăng độ hòa tan. Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có độ hòa tan cao chỉ ra tiềm năng ứng dụng sản phẩm thủy phân trong công nghiệp thực phẩm. Chẳng hạn sản phẩm thủy phân protein này được sử dụng trong việc sản xuất các thức uống dinh dưỡng cho con người.

Khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein

Hình 3 thể hiện khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng.



Hình 3. Khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng. Các giá trị trung bình mang ký tự khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (P<0,05)

Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tạo bọt của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng đạt giá trị cao nhất (30,2%) ứng với thời gian thủy phân 2 giờ và độ thủy phân đạt 20,8%. Khi thời gian thủy phân kéo dài từ 2 giờ đến 4 giờ thì khả năng tạo bọt giảm từ 30,2% xuống còn 22,8%. Khả năng tạo bọt của sản phẩm thủy phân protein giảm khi thời gian thủy phân kéo dài và độ thủy phân tăng cũng được thấy tương tự đối với sản phẩm thủy phân protein từ đầu và nội tạng cá mòi (Souissi *et al.*, 2007) và sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá bóp (Amiza *et al.*, 2012). Khả năng tạo bọt của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng thấp hơn so với khả năng tạo bọt (23,3% - 70%) của sản phẩm thủy phân protein từ cơ thịt cá nục (Thiansilakul *et al.*, 2007). Diniz & Martin (1997) đã nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian thủy phân và độ thủy phân đến các đặc tính chức năng của sản phẩm thủy phân protein cá nhám và cho thấy rằng khi độ thủy phân 6,5%; 13%; 18,8% thì khả năng tạo bọt sản phẩm thủy phân protein lần lượt là 136,3%; 66,5% và 63,5%. Theo Diniz & Martin (1997), sản phẩm thủy phân protein được tạo ra từ quá trình thủy phân kéo dài thường cho khả năng tạo bọt thấp. Điều này là do kích thước nhỏ của các peptit được tạo ra khi thời gian thủy phân kéo dài làm giảm hoạt động bề mặt của nó và do đó cản trở sự hình thành màng ổn định xung quanh các bong bóng khí.

Ứng với thời gian thủy phân 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ thì khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng lần lượt là 15,6 ml/g, 23,4 ml/g, 21,3 ml/g và 18,8 ml/g, cao hơn khả năng nhũ hóa (3-12 ml/g) của sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá bớp (Amiza *et al.*, 2012) nhưng thấp hơn khả năng nhũ hóa (22,33 - 27,33 ml /0,5g) của sản phẩm thủy phân protein từ thịt cá rô phi (Foh

et al., 2010). Khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng đạt giá trị cao nhất (23,4 ml/g) khi thời gian thủy phân 2 giờ và độ thủy phân đạt 20,8%. Khả năng nhũ hóa giảm khi độ thủy phân tăng cũng đã được thấy đối với sản phẩm thủy phân protein từ đầu và nội tạng cá mòi được nghiên cứu bởi Souissi *et al*., (2007), mà ở đó các tác giả này đã cho thấy các sản phẩm thủy phân protein từ đầu và nội tạng cá mòi tương ứng với độ thủy phân 6,62%, 9,31% và 10,16% có khả năng nhũ hóa lần lượt là 20 ml/g, 15,2 ml/g và 10,8 ml/g. Amiza *et al*. (2013) cũng chỉ ra rằng sản phẩm thủy phân protein từ khung xương cá tra tương ứng với độ thủy phân 43%, 55% và 68% có khả năng nhũ hóa lần lượt là 29,8 ml/g, 23,8 ml/g và 17,2 ml/g. Khi thủy phân protein cá trong một giới hạn nhất định sẽ tạo ra các peptit lớn làm cải thiện khả năng nhũ hóa so với protein ban đầu. Sự giảm khả năng nhũ hoá khi quá trình thủy phân kéo dài hay độ thủy phân tăng là do thay đổi kích thước của peptit trong quá trình thủy phân, thời gian thủy phân dài hơn dẫn đến sự có mặt của các peptit nhỏ hơn, các peptit nhỏ này có hoạt động bề mặt ít hơn, làm giảm khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein (Souissi *et al*., 2007).

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Thịt vụn cá ngừ vây vàng là phụ phẩm cá giàu protein và được tận dụng để sản xuất sản phẩm thủy phân protein. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc thủy phân thịt vụn cá ngừ vây vàng bằng enzyme Flavourzyme với thời gian thủy phân khác nhau có ảnh hưởng đến độ hòa tan, khả năng tạo bọt và khả năng nhũ hóa của sản phẩm thủy phân protein thu được. Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng thu được ứng với 2 giờ thủy phân có khả năng tạo bọt cao nhất (30,2%) và khả năng nhũ hóa cao nhất (23,4 ml/g), sản phẩm thủy phân protein ứng với 4 giờ thủy phân có độ hòa tan cao nhất (98,6%). Sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có giá trị dinh dưỡng cao với các axit amin không thay thế rất cần thiết cho con người, thủy sản và động vật khác. Ngoài ra, sản phẩm thủy phân này còn có các đặc tính chức năng tốt, cho nên có tiềm năng lớn trong việc ứng dụng làm nguồn protein cho dinh dưỡng con người hoặc thủy sản, động vật nuôi và mở ra cơ hội lớn cho ngành công nghiệp thực phẩm để cải thiện chất lượng thực phẩm. Nghiên cứu này đã cho thấy sản phẩm thủy phân protein từ thịt vụn cá ngừ vây vàng có thể được sử dụng trong việc sản xuất thức uống dinh dưỡng, hoặc làm thành phần để hỗ trợ sự hình thành bọt trong một số sản phẩm như bia, kem tươi, và để hỗ trợ sự hình thành nhũ tương trong một số sản phẩm như bơ thực vật, xúc xích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AMIZA, M.A., KONG, Y.L., FAAZAZ, A.L., (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia *(Rachycentron canadum)* frame hydrolysate, *International Food Research Journal* 19 (1) 199 - 206.
2. AMIZA, M. A., OW, Y.W., FAAZAZ, A.L., (2013). Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius sp.*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*, 20 (3): 1255-1262.
3. DINIZ, F.M., MARTIN, A.M., (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *LWT- Food science and Technology*, 30 (3) 266-272.
4. FOH, M.B.K, Amadou. I., Foh. B.M, Kamara. M.T., Xia. W., (2010). Functionality and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences* 11 (4) 1851-1869.

5. HALIM, N. R. A., SARBON, N.M., (2017). A response surface approach on hydrolysis condition of eel (*Monopterus Sp*.) protein hydrolysate with antioxidant activity. *International Food Research Journal* 24 (3) 1081- 1093.
6. ISHAK, N.H., SARBON, N. M., (2018). Physicochemical characterization of enzymatically prepared fish protein hydrolysate from waste of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *International Food Research Journal* 25(6) 2593-2600.
7. LASSOUED, I., MORA, L., NASRI, R., AYDI, M., TOLDRA, F., ARISTOY, M.C., BARKIA, A., NASRI, M., (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray *(Raja clavata)* muscle. *Journal of Proteomics* 128: 458-468.
8. NGUYEN, H.T.M., SYLLA, K.S.B., RANDRIAMAHATODY, Z., DONNAY-MORENO, C., MOREAU, J., TRAN, L.T., BERGE, J.P., (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using Protamex protease. *Food Technology and Biotechnology* 49 (1) 48 - 55.
9. SAPUTRA D; NURHAYATI, T., (2016). Production of fish hydrolysate protein from waste of fish carp (*Cyprinus carpio*) by enzymatic hydrolysis. *ComTech*, 7 (1): 11-18.
10. SATHIVEL, S., SMILEY S., PRINYAWIWATKUI W., BECHTEL, P.J., (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70 (6) 401-406.
11. SOUISSI, N., BOUGATEF, A., TRIKI-ELLOUZ, Y., NASRI, M., (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) byproduct hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* 45(2) 187-194.
12. THIANSILAKUL, Y., BENJAKUL , S., SHAHIDI, F., (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry* 103 (4) 1385-1394.

SCREENING OF NATURAL PRODUCTS AS POTENTIAL INHIBITORS OF SARS-COV-2 MAIN PROTEASE AND SPIKE PROTEIN TARGET IN SILICO

Bui Thanh Tung*, Nguyen Hong Nhung, Ta Thi Thu Hang, Vu Khanh Linh, Le Minh Ngoc

**VNU University of Medicine and Pharmacy, Vietnam National University Hanoi*

Corresponding author: tungasia82@gmail.com

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease triggering acute respiratory syndrome. Until now there is no official drug that has been announced. Finding the bioactive compounds for the treatment COVID 19 is a must now. Spike protein plays an important role in the viral transmission and main protease's role in the replication of the virus. In this study, we screened in silico natural products compounds activity to inhibit two targets of spike proteins and main proteases. Our data were compared with hydroxychloroquine and X77, which have been demonstrated inhibitory activity of these targets, respectively. Our results showed that 12/59 compounds have a higher ability to inhibit main protease than X77 and 51/51 compounds have higher ability to inhibit spike protein than hydroxychloroquine. Notably, four compounds with the most powerful inhibitory ability of main protease are amentoflavone, punigluconin, amarogentin, emblicanin A. In addition, we found seven compounds with the most powerful inhibitory ability of spike protein are amentoflavone, hesperidin, rutin, glycyrrhizin, myricitrin, puerarin, daidzein. Among these compounds, amentoflavone is the natural compound with the highest inhibitory ability for main protease and spike protein. Finally, ADMET profile and Lipinski's rule of five criterion analysis suggested amentoflavone has drug-likeness property, which may be further explored as anti-SARS-CoV-2 agents.

Keywords: *Bioactive compounds; Main protease; Molecular docking; SARS-CoV-2; Spike protein;*

INTRODUCTION

COVID-19 is an infectious disease triggering acute respiratory syndrome, originating in a seafood market, Wuhan City, Hubei Province, China [1]. On the 11th of January, 2020, the first infected case was reported. The disease was forcefully spread because of the crowd migration of Chinese people during the lunar New Year 2020 [2]. Until 19 September 2020, there have been 30 693 474 reported cases of COVID-19 disease and 956 422 reported deaths in the global [3]. In Vietnam, there have been 1.060 reported cases of infected COVID-19 disease and 35 reported deaths to date (19/Sept/2020). The symptoms of COVID-19 are diverse but some people are asymptomatic. Symptoms include fever, sore throat, cough, shortness of breath, headache, fatigue, muscle aches. The disease can progress to pneumonia, respiratory failure and death in a small number of patients by the first week of infection because of a sharp increase in inflammatory cytokines [2]. In addition, the accompanying diseases can be diabetes, hypertension, cardiovascular and breathing diseases, that worsen the patient's condition [2] . The incubation period disease from 2 to 14 days [4]. The mean time from symptom onset to dyspnea is 5 days and acute respiratory distress syndrome is 8 days [1].

COVID-19 is a virus with single-stranded RNA [5]. Its genome encodes 9,860 amino acids, with a length of 29,881 bp [6]. The most important structural proteins of COVID-19 are the spiny protein (S), the envelope protein (E), the membrane protein

(M), and the nucleocapsid protein (N) [7]. Protein S is a class I glycoprotein trimericTM involved in viral penetration and infection. It is present in all types of HcoV, HIV, influenza virus, ebola… [8].

The surface of SARS-CoV-2 is covered by a lot of glycosylated S proteins (spike protein). Spike protein has two main functions including receptor binding and viral fusion [9]. In detail, S protein include two functional subunits: S1 subunit is accountable for binding to ACE2 receptor of the host cell, S2 subunit mergers the viral and membrane cells [10]. As the result, inhibition of the spike protein benefits for preventing the entrying to the host cell and replication of the viral.

Main protease has a length of about 306 amino acids [7]. Main protease (also known as 3CLpro), an important enzyme for viral replication, cleaves polyproteins that are translated from viral RNA to produce functional proteins [5]. Therefore, preventing the activity of this enzyme would block replication of SARS-CoV-2.

Molecular docking is a modeling technique to predict the favorable position and configuration that the substrate molecule can bind to a protein. The substrate molecule is displaced through space and encircled the protein molecule to find the position with the most negative binding energy. Therefore, it is an easy method to find the compounds, which are the best pharmacological effects, without any experimentation. The advantages of the in silico method are the significant saving time, expense and effort [9].

In the face of an urgent pandemic worldwide, we investigated to find natural compounds that could inhibit the spike protein and main protease, which are target effective in the treatment of COVID-19.

MATERIAL AND METHOD

Protein Receptors Preparation

The 3D structure of main protease from SARS-CoV-2 (PDB ID: 6W63, resolution of 2.10 Å) and spike protein(PDB ID: 6VYB, resolution of 3.2Å) was downloaded from the protein data bank RCSB (https://www.rcsb.org/). The spike protein of SARS- CoV-2 with ID 6VYB consists of 3 chains: A, B,C and chain A was separated to use for docking [10]. In terms of main protease (ID 6W63), this crystal structure is complex with a non-covalent inhibitor X77 and also suitable for the fragment-based drug discovery approach [11-13]. The co-crystal ligand X77 (N-(4-tert-butylphenyl)-N- [(1R)-2-(cyclohexylamino)-2-oxo-1-(pyridin-3-yl) ethyl]-1H-imidazole-4-carboxamide) was used as a control compound in the optimization of molecular docking protocol. All water molecules and co-crystal were removed from the protein molecule using Discovery Studio Visualizer 4.0 software. After that, hydrogen atoms will be added to the protein before regenerating the active site using MGL Autodock tools 1.5.6 software. The grid center for 6W63 was set as X= -20.313, Y= 18.742, and Z= -28.341 with dimensions of the grid box 20Å×20Å×20Å [13]. The active site of 6VYB was covered by grid box dimensions of 60Å×60Å×60Å [14] and the spacing was 1Å [13, 14]. Then, we saved the protein with pdbqt format to prepare for docking program.

Preparation of ligands

The ligand structures were collected from the literature on main protease and spike protein targets involved 59 natural compounds [15-22]. The 3D structure was downloaded from PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) in SDF format and then converted into PDB format using PyMol software. After that, the ligands were

optimized by Avogadro software using Conjugate Gradients and converted to pdbqt format using Autodock Tools software.

Performance of molecular docking

These collected compounds were docked into the active site using Autodock vina software. The ligand-protein interaction energy is calculated by the scoring function of Autodock vina.

Validation of docking protocol

After separating the co-crystal molecule from the protein with Discovery Studio Visualizer 4.0 software, we saved the molecule in pdb format and convert to pdbqt format. The ligand from co-crystal were re-docked into the target's active site before the screening. The procedure was successful if the value the root mean square deviation (RMSD) was less than or equal to 1.5Å.

Prediction of ADME by computational analysis

The *in silico* pharmacological study was predicted by ADMET profile. The ADMET profiling including absorption, distribution, metabolism, elimination, and toxicity was predicted using the pkCSM tool (http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction) [23]. The canonical SMILE molecular structures of collected compounds were retrieved from the PubChem database (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

Lipinski's rule of five

Lipinski rule of 5 helps to compare drug-like and non drug-like molecules [24]. We used the online tool (http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp) to evaluate the Lipinski's rule of five [25]. The chemical structures were downloaded from the Pubchem database (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) and set at pH 7.0 [10].

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular docking validation

Before the screening, the docking protocol needed to be validated. The co-crystal ligand X77 of Mpro (ID protein: 6W63) needs to be re-docked into the target's active position. We determined the root mean square deviation (RMSD) and evaluated the structural similarity using Chimera 1.14 software. The results obtained the structural superposition of the co-crystal ligand before and after the docking and the RMSD value was 0.986Å. The RMSD value is less than 1.5Å, proving that the result of molecular docking on the target is reliable (Figure 1 and Figure 2).

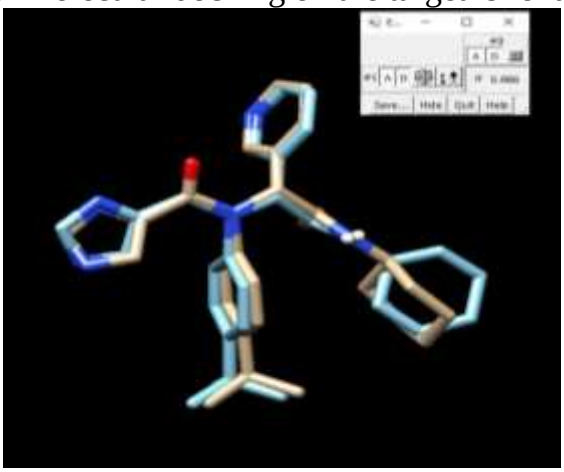


Figure 1: The result of re-docking

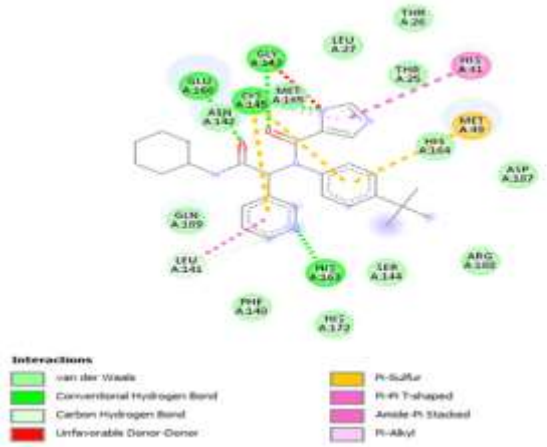
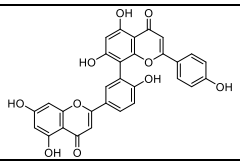
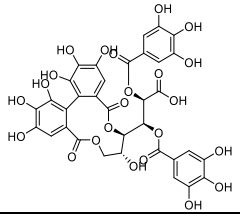
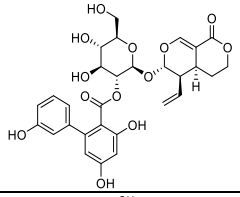
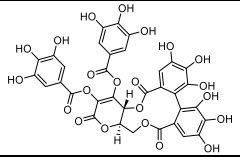
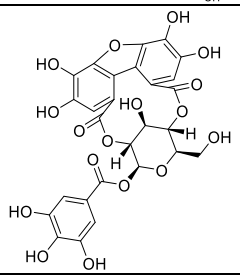
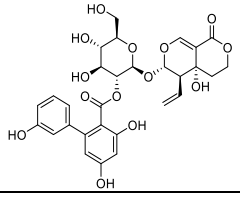
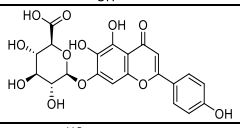
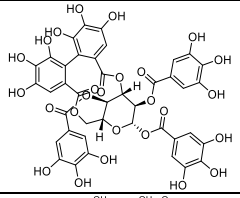
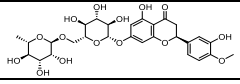


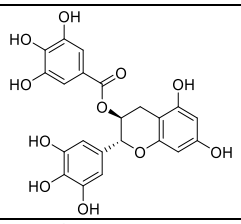
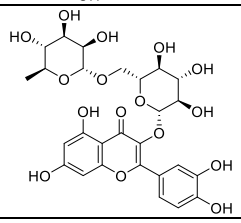
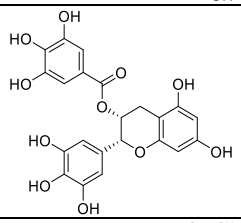
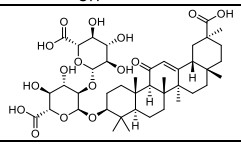
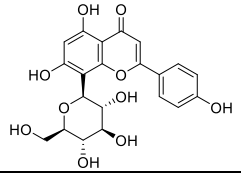
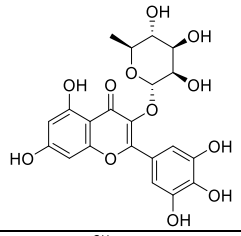
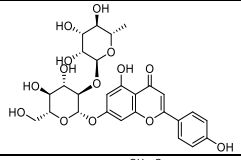
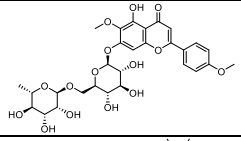
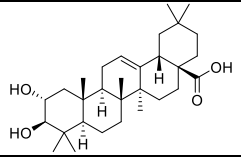
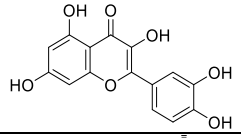
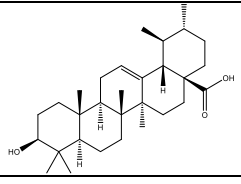
Figure 2: Interaction of co-crystal ligand X77 with Mpro amino acids

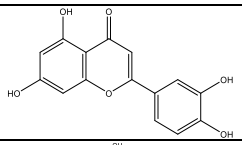
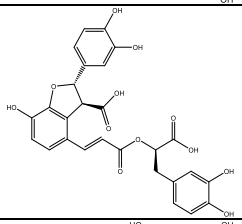
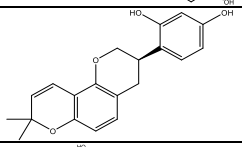
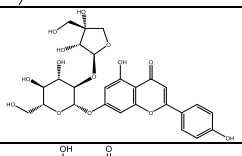
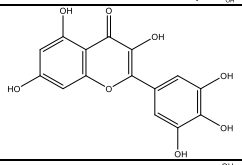
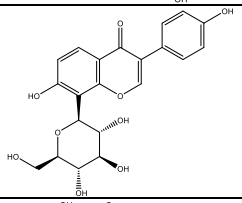
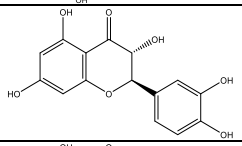
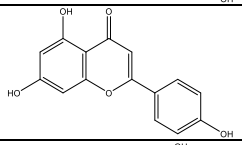
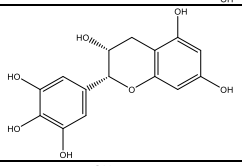
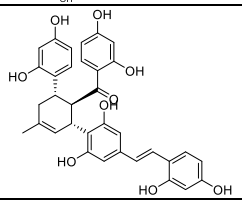
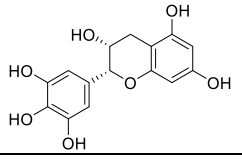
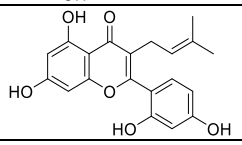
Binding free energy

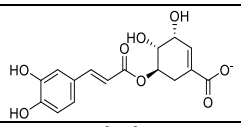
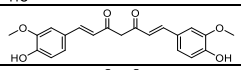
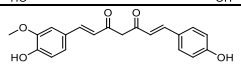
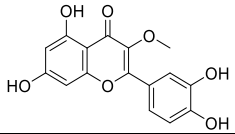
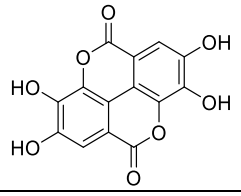
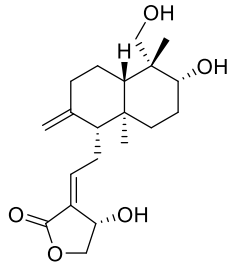
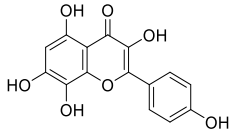
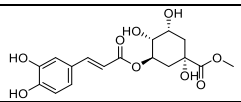
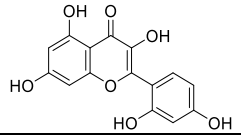
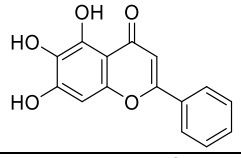
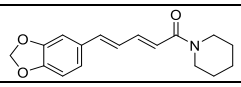
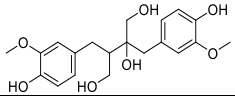
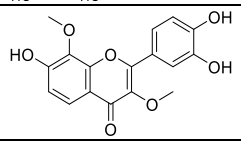
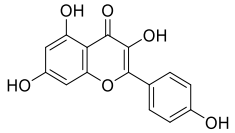
After preparing the ligands, we docked 59 natural compounds collected with Mpro and SARS-COV-2S to screen targets inhibitory activity. The results are shown in Table 1.

Table 1: The docking results of 59 natural compounds with Mpro and S protein

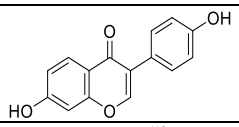
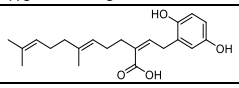
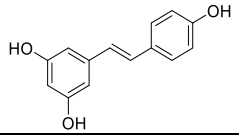
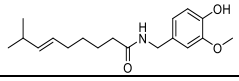
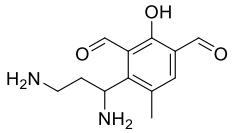
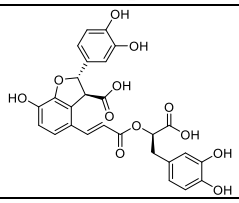
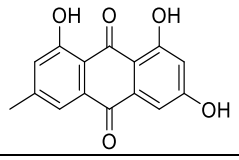
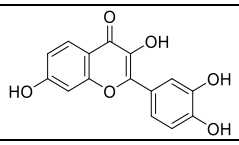
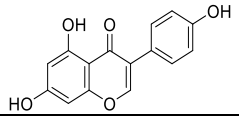
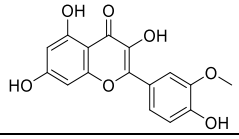
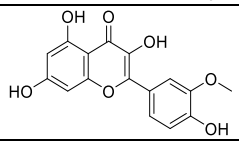
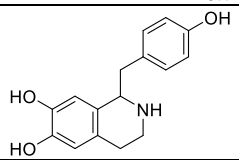
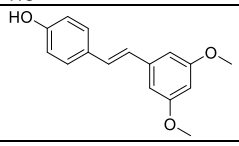
No	Name	Structure	Binding energy with main protease (kcal/mol)	Binding energy with spike protein (kcal/mol)
1	Amentoflavone		-9.8	-9.9
2	Punigluconin		-9.2	-8.1
3	Amarogentin		-9.1	-8.6
4	Emblicanin A		-9.0	-8.7
5	Phyllanemblinin A		-8.9	-8.6
6	Amaroswerin		-8.8	-8.0
7	Scutellarin		-8.8	-8.6
8	Punicafolin		-8.7	-8.5
9	Hesperidin		-8.7	-9.3

10	Gallocatechin gallate		-8.6	-7.2
11	Rutin		-8.6	-9.5
12	EGCG (Epigallocatechin gallate)		-8.6	-7.5
13	Glycyrrhizin		-8.5	-9.0
14	Vitexin		-8.5	-8.8
15	Myricitrin		-8.4	-9.2
16	Rhoifolin		-8.1	-8.8
17	Pectolinarin		-8.1	-8.9
18	Maslinic acid		-8.1	-8.0
19	Quercetin		-8.1	-8.4
20	Ursolic acid		-8.1	-7.8

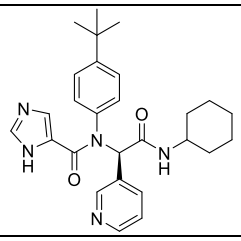
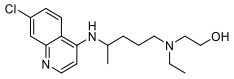
21	Luteolin		-8.0	-8.3
22	Lithospermic Acid		-8.0	-8.7
23	Glabridin		-8.0	-8.2
24	Apiin		-8.0	-8.9
25	Myricetin		-7.8	-8.4
26	Puerarin		-7.6	-9.1
27	Taxifolin		-7.6	-8.7
28	Apigenin		-7.5	-7.7
29	Epigallocatechin		-7.5	-8.5
30	Kuwanon x		-7.5	-7.7
31	EGC (Epigallocatechin)		-7.5	-8.5
32	Albanin A		-7.4	-7.3

33	5-O-Caffeoylshikimate		-7.4	-7.4
34	Curcumin		-7.3	-7.1
35	Demethoxycurcumin		-7.3	-7.5
36	3-O-Methylquercetin		-7.3	-8.3
37	Ellagic Acid		-7.3	-8.9
38	Andrographolide		-7.2	-7.0
39	Herbacetin		-7.2	-7.6
40	Methyl Chlorogenate		-7.2	-7.3
41	Morin		-7.2	-8.2
42	Baicalein		-7.2	-8.1
43	Piperine		-7.1	-7.2
44	Carinol		-7.1	-7.0
45	7,3',4'-Trihydroxy-3,8-dimethoxyflavone		-7.1	-8.1
46	Kaempferol		-7.1	-7.6

Hydroxychloroquine is a treatment for malaria, which is currently FDA approved urgently for the treatment of COVID 19 [26]. Moussa Sehailia et al. demonstrated

47	Daidzein		-6.9	-9.0
48	Ganomycin B		-6.8	-7.7
49	Resveratrol		-6.7	-7.9
50	Capsaicin		-5,6	-6.5
51	SCHEMBL8401456		-5,3	-6.5
52	Acid Lithospermic		-8.0	-8.7
53	Emodin		-7.0	-8.7
54	Fisetin		-7.5	-8.5
55	Genistein		-7.4	-8.5
56	Isorhamnetin		-7.3	-8.3
57	Eriodictyol		-7.6	-8.2
58	Demethyl - coclaurine		-7.4	-7.7
59	Pterostilbene		-6.8	-6.6

hydroxychloroquine acts as a spike protein inhibitor [27]. Therefore, in this study, we compared the docking scores of the ligands with hydroxychloroquine to evaluate the compounds' ability to inhibit SARS-COV-2S. Figure 3 shows the interaction between hydroxychloroquine and target S protein.

60	X77		-8.6	
61	Hydroxychloroquine			-6.4

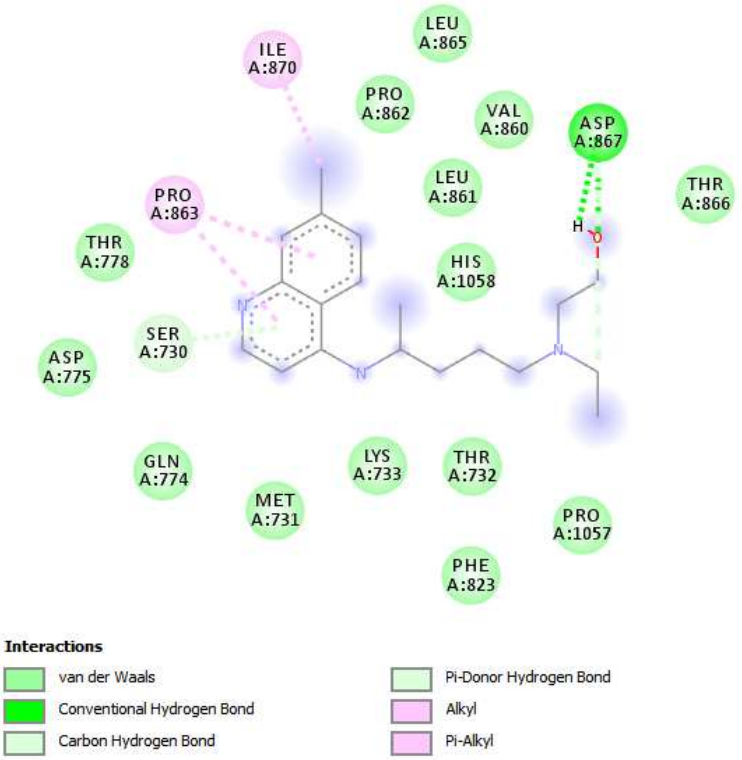


Figure 3: Interaction between hydroxychloroquine and spike protein amino acids

From the results in Table 1, we obtained 12/59 natural compounds with energy binding levels lower than or equal to that of co-crystal X77 (-8.6 kcal/mol) and all compounds satisfy lower binding energy than hydroxychloroquine (-6.4 kcal/mol). Among them, there are 10 compounds with the most negative scores: amentoflavone, punigluconin, amarogentin, emblicanin A, hesperidin, rutin, glycyrrhizin, myricitrin, puerarin, daidzein. Ligand-amino acid interactions of these are shown in Table 2.

Table 2: Ligand-amino acid interactions of ten scoring bioactive compounds against the SARS-CoV-2 main protease and spike protein.

No	Name	Main protease		Spike protein	
		Binding energy (kcal/mol)	Involved amino acids	Binding energy (kcal/mol)	Involved amino acids
1	Amentoflavone	-9.8	HIS41, CYS44, MET49, GLY143, GLU166, CYS145, THR25,	-9.9	PRO863, SER730, ASP867, VAL860, PRO862, LEU861, LYS733, THR732, ALA956,

			GLN189, PRO168		HIS1058, PRO1057
2	Punigluconin	-9.2	HIS41, MET49, GLY143, SER144, GLU166, CYS145, PHE140, LEU141, MET165, THR25, THR26, SER46, GLN189, THR190, GLN192	-8.1	PRO863, ILE870, SER730, ASP867, VAL860, HIS1058, GLY1059
3	Amarogentin	-9.1	HIS41, CYS44, GLU166, CYS145, MET165, LEU141, THR25, LEU27, GLN189	-8.6	PRO863, ILE870, SER730, ASP867, MET731, GLY1059, HIS1058, ALA1056
4	Emblicanin A	-9.0	HIS41, MET49, CYS145, MET165, TYR54, ARG188, GLN189, ASN142	-8.7	PRO863, ILE870 SER730, VAL860, THR778, LYS733, ALA1056, HIS1058
5	Hesperidin	-8.7	MET49, GLY143, GLU166, CYS145, MET165	-9.3	PRO863, ILE870, SER730, ASP867, GLU868, LEU865, MET861, PHE823, THR778, SER1055, HIS1058
6	Rutin	-8.6	HIS41, CYS44, MET49, GLU166, MET165, PRO168, THR190, GLN192	-9.5	PRO863, SER730, ASP867, ALA1056, PRO1057, HIS1058, GLY1059, PHE823, LEU865, THR778
7	Glycyrrhizin	-8.5	MET49, GLU166, MET165, GLY143, ASN119	-9.0	GLY744, SER967, ASN856, TYR741, ILE742, ARG1000

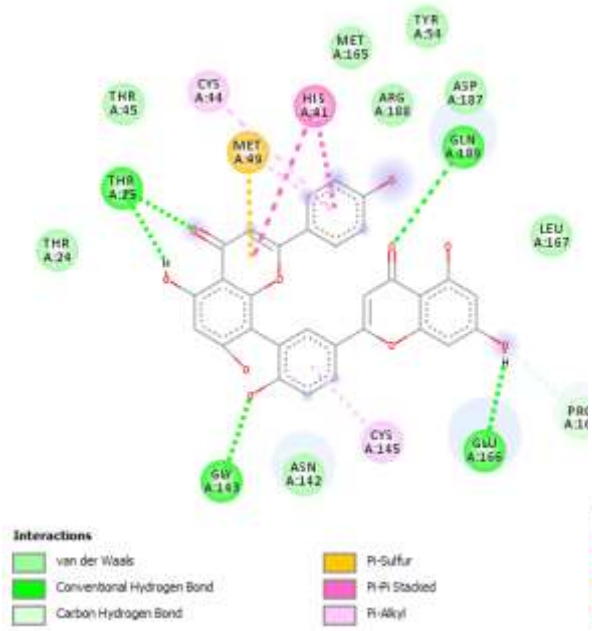
8	Myricitrin	-8.4	GLU166, MET165, HIS163, THR26, PHE140, SER144	-9.2	PRO863, SER730, ASP867, LYS733, MET731, ALA1056, PRO1057, HIS1058, GLY1059
9	Puerarin	-7.6	HIS41, CYS44, MET49, GLU166, CYS145, THR26, ARG188	-9.1	PRO863, SER730, LYS733, ALA1056, PRO862, VAL860, THR732, ALA1056
10	Daidzein	-6.9	HIS41, CYS44, MET49, GLY143, TYR54, GLY145, ARG188	-9.0	PRO863, SER730, ILE870, LYS733, LEU861, HIS1058

The interactions of ten compounds with amino acids are similar to co-crystal X77 and HCQ. This is shown through the interaction with amino acids of main protease such as HIS41, MET49, GLY143, CYS145, THR25, GLU166, GLN189. Comparing the interactions of all 10 molecules with hydroxychloroquine, we can see that the bonds of most molecules have similarities with hydroxychloroquine. This is demonstrated by their association with several important amino acids such as ILE870, SER730, and ASP867, and especially the π-alkyl bond with PRO863. In addition, it also binds to many other amino acids such as ALA1056, GLY1059, HIS1058, PRO862, MET731. Amarogentin is a secoiridoid glycoside which has been isolated from S*wertia chirata* plant. It has a wide range of pharmacological activities such as antibacterial, anti-hepatitis, anti-tumor, antileishmanial activity [28]. Amarogentin interferes with main protease by interacting with important amino acids like HIS163, THR25, LEU141, CIS145, LEU27 and HIS41. Also emblicanin A and puligluconin are polyphenols present in many medicinal plants such as *Emblica officinalis* and *Phyllanthus emblica* and they have antioxidant, antiinflammatory, immunomodulatory, cytoprotective and anticancer activities [29].

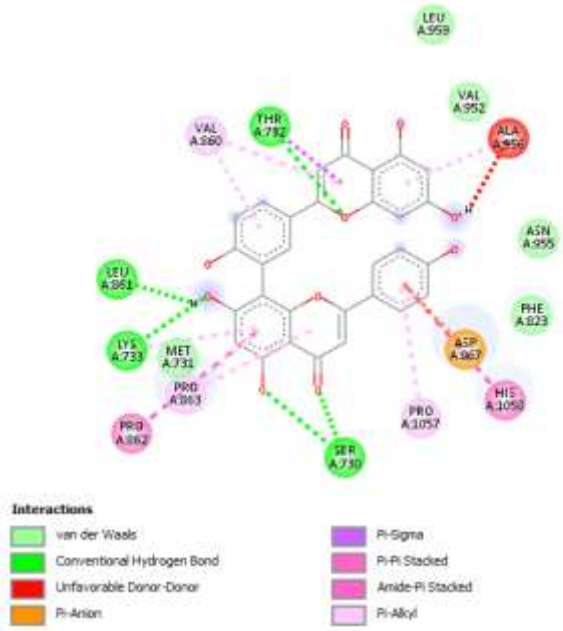
Myricitrin, puerarin and daidzein give relatively high energy binding to Mpro (-8.4, -7.6, -6.9 kcal/mol) but they interact with many important amino acids, similar to co-crystal X77. In addition, these 3 substances were shown to inhibit S protein with relatively negative energy levels, both less than or equal to -9.0 kcal/mol. Therefore, they are all potential therapeutic agents for SAR-COV-2.

Especially, amentoflavone showed the most negative energy level: -9.8 kcal/mol with main protease, -9.9 kcal/mol with spike protein, T-shaped pi-pi binding with HIS41 among many other interactions. Amentoflavone is a bioflavonoid found in many traditional plants including *Selaginellaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae* family… Amentoflavone has anti-inflammatory, anti-tumor, anti-virus, antifungal activities, etc [30]. Interestingly, a previous study showed that amentoflavone from *Selaginella* family could inhibit respiratory syncytial virus (RSV) infection with IC50 values of 5.5 μg/ml *in vitro* [31]. Moreover, amentoflavone combined with ledipasvir

could inhibit the binding of spike protein and ACE2 receptor [32]. In our study, we showed that amentoflavone is the most negative binding energy with main protease and interacts with GLU166, GLY143, GLN189, THR25 acid amine by a conventional hydrogen bond. The interaction of amentoflavone with Mpro and S protein in figure 4. Therefore, amentoflavone could be a potential inhibitor of SARS-CoV-2 activities.



a) Interaction between amentoflavone and Mpro amino acids



b) Interaction between amentoflavone and S protein amino acids

Figure 4: The interaction of amentoflavone with Mpro and S protein

Lipinski's rule of five

Lipinski's rule of five is popularly used to evaluate the potential molecular to become a therapeutical drug. It acts as a filter to screen promising compounds with a particular pharmacological and bioactive effect just at the beginning of the program, thereby decreasing the labor and cost of clinical drug development and to limit late-stage clinical failures [10, 24].

Lipinski rule of 5 helps in distinguishing between drug-like and non drug-like molecules. It predicts high probability of success or failure due to drug-likeness for molecules complying with 2 or more of the following rules: Molecular mass (MW) less than 500 Dalton; High lipophilicity (expressed as LogP less than 5); Less than 5 hydrogen bond donors(HBD); Less than 10 hydrogen bond acceptors(HBA1); Molar refractivity(MR) should be between 40-130

Table 3: Result of Lipinski's rule of five

No	Natural compounds	Molecular weight(Dalton)	HBD	HBA1	logP	MR	Drug-likeness
1	Amentoflavone	538.0	6.0	10.0	2.158710	123.888	Yes
2	Punigluconin	802.6	13.0	23.0	0.781960	156.528	No
3	Amarogentin	586.5	5.0	13.0	3.2795	135.249	No
4	Emblicanin A	782.5	12.0	22.0	0.6317	151.201	No

5	Hesperidin	610.5	8.0	15.0	3.0561	139.017	No
6	Rutin	610.5	10.0	16.0	1.8385	132.336	No
7	Glycyrrhizin	822.9	8.0	16.0	2.2456	202.8404	No
8	Myricitrin	464.4	8.0	12.0	1.0315	98.7924	Yes
9	Puerarin	416.4	6.0	8.0	1.7499	96.348	Yes
10	Daidzein	254.0	2.0	3.0	2.8712	71.966	Yes

Among ten potential natural compounds, four of them are satisfied more than 2 criteria, then we suggest that they are potential candidates for drug development. They are: amentoflavone, myricitrin, puerarin and daidzein (Table 3). Then, we focus analyzed the pharmacokinetic properties of these compounds: absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity.

Prediction of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) profile.

In order to analyze the physiochemical efficiency of four above mentioned compounds to inhibit the target protein, we used *in silico* ADMET profiling. ADMET profile involves five parameters: absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity that play a significant role to demonstrate the likelihood of success of a drug. The prediction of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity profile of four selected compounds were showed in Table 4.

Table 4. The result of ADMET profile

Properties	**Amentoflavone**	**Myricitrin**	**Purerarin**	**Daidzein**
Absorption				
Water solubility (log mol/L)	-2.892	-2.892	-2.72	-3.793
Caco2 permeability (log Papp in 10^{-6} cm/s)	0.145	-0.982	0.223	0.903
Intestinal absorption (human) (% Absorbed)	84.356	43.334	67.446	94.839
Skin Permeability (log Kp)	-2.735	-2.735	-2.735	-2.748
Distribution				
VDss (human) (log L/kg)	-1.066	1.552	0.377	-0.172
Fraction unbound (human) (Fu)	0.268	0.182	0.187	0.107
BBB permeability	-1.653	-1.811	-1.204	-0.064
CNS permeability (log PS)	-3.2	-4.376	-3.594	-1.992
Metabolism				
CYP2D6 substrate	No	No	No	No
CYP3A4 substrate	Yes	No	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No
Excretion				

Total Clearance (log ml/min/kg)	0.484	0.303	-0.007	0.164
Renal OCT2 substrate (human)	No	No	No	No
Toxicity				
AMES toxicity	No	No	No	No
Hepatotoxicity	No	No	No	No
Skin Sensitisation	No	No	No	No

In terms of absorption progress, human colon adenocarcinoma-2 cell line (Caco2) permeability and human intestinal absorption (HIA) are key parameters to decide the total bioavailability of a drug [33, 34]. Myricitrin, daidzein showed relatively low Caco2 permeability potential (<1 × 10−6 cm/s) while amentoflavone, puerarin indicated moderate permeability(1 x 10-6 cm/s < Papp < 10 x 10-6 cm/s). The intestinal absorption (human) percentage of all mentioned compounds is comparatively high: amentoflavone (84.356%), myricitrin (43.334%), puerarin (67.446%), daidzein (94.839%). Hence, four compounds could be absorbed via the human intestine. The distribution of a drug is managed by many parameters such as lipid-solubility, concentration in plasma and binding ability to plasma proteins, transport proteins, etc. The volume of distribution at steady-state (VDss) suggests that had a lower theoretical dose required for uniform distribution in the plasma due to the logVDss< -0.15) except myricitrin. The predictions through the distribution of the drugs via the central nervous system and blood-brain barrier showed that these four compounds are poorly distributed to the brain and unable to penetrate the central nervous system. Cytochromes P450 (CYP) isozymes play crucial roles in drug metabolism. It has been observed that amentoflavone a substrate of CYP3A4 and hence, can be efficiently metabolized by CYP3A4. On the other hand, daidzein is a CYP1A2 inhibitor, CYP2C19 inhibitor, CYP2C9 inhibitor. All four compounds predicted not to be the substrate of renal organic cation transporter-2 (Renal OCT2). We also analyzed the toxicity profile of these compounds. The toxicity prediction from the AMES test (*Salmonella typhimurium* reverse mutation assay) indicated that all the compounds could be considered as non-mutagenic agents. Amentoflavone, myricitrin, puerarin were observed to inhibit the hERG gene. All of the compounds do not possess the acute toxicity, hepatotoxicity and skin sensitisation.

CONCLUSION

In this study, we have found four potentially effective natural compounds that could inhibit both main protease and spike protein. All four compounds can be potential candidates in drug development for COVID-19 treatment in the future. We highly recommend the compound amentoflavone, which can be found in *Selaginellaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae* family plants, is the most effective bioactive compound and has drug-likeness **property.** Deeper studies in vitro and in vivo need to conduct to develop promised compounds into drugs for the treatment of COVID-19 disease.

REFERENCES

1. Wang, C., et al., *A novel coronavirus outbreak of global health concern.* The Lancet, 2020. **395**(10223): p. 470-473.

2. Singhal, T., *A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19).* The Indian Journal of Pediatrics, 2020: p. 1-6.
3. WHO. *Coronavirus disease (COVID-19). WHO*. 2020.
4. Yang, J., et al., *Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis*. International Journal of Infectious Diseases, 2020. **94**: p. 91-95.
5. Chen, L., et al., *RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak.* Emerging microbes & infections, 2020. **9**(1): p. 313-319.
6. Zhang, L., et al., *Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α-ketoamide inhibitors.* Science, 2020. **368**(6489): p. 409-412.
7. Hilgenfeld, R., *From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design.* The FEBS journal, 2014. **281**(18): p. 4085-4096.
8. Weissenhorn, W., et al., *Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses.* Molecular membrane biology, 1999. **16**(1): p. 3-9.
9. Cheung, I.W., et al., *Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (Avena sativa) proteins by in silico and in vitro analyses.* Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(19): p. 9234-9242.
10. Pandey, P., et al., *Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: an in silico study for drug development.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020: p. 1-11.
11. Yin, P., et al., *Identification and inhibitory activities of ellagic acid-and kaempferol-derivatives from Mongolian oak cups against α-glucosidase, α-amylase and protein glycation linked to type II diabetes and its complications and their influence on HepG2 cells' viability.* Arabian journal of chemistry, 2018. **11**(8): p. 1247-1259.
12. Pant, S., et al., *Peptide-like and small-molecule inhibitors against Covid-19.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020: p. 1-10.
13. Ferraz, W.R., et al., *Ligand and structure-based virtual screening applied to the SARS-CoV-2 main protease: an in silico repurposing study.* Future Medicinal Chemistry, 2020(0).
14. Ahmed, S.A., et al., *Destabilizing the structural integrity of COVID-19 by caulerpin and its derivatives along with some antiviral drugs: An in silico approaches for a combination therapy.* Structural Chemistry, 2020: p. 1-22.
15. Enmozhi, S.K., et al., *Andrographolide as a potential inhibitor of SARS-CoV-2 main protease: an in silico approach.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020: p. 1-7.
16. Tripathi, V., A. Mishra, and Y. Pathak, *Natural compounds as potential inhibitors of novel coronavirus (COVID-19) main protease: An in silico study*. 2020.
17. Ranjan, P., B. Mohapatra, and P. Das, *A rational drug designing: What bioinformatics approach tells about the wisdom of practicing traditional medicines for screening the potential of Ayurvedic and natural compounds for*

their inhibitory effect against COVID-19 Spike, Indian strain Spike, Papain-like protease and Main Protease protein. 2020.

18. Das, S., et al., *An investigation into the identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 main protease using molecular docking study.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020(just-accepted): p. 1-18.
19. Mahmud, S., et al., *Molecular docking and dynamics study of natural compound for potential inhibition of main protease of SARS-CoV-2.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020: p. 1-9.
20. Barros, R.O., et al., *Interaction of drug candidates with various SARS-CoV-2 receptors: An in silico study to combat COVID-19.* Journal of Proteome Research, 2020.
21. Smith, M. and J.C. Smith, *Repurposing therapeutics for COVID-19: Supercomputer-based docking to the SARS-CoV-2 viral spike protein and viral spike protein-human ACE2 interface.* 2020.
22. Ho, T.-Y., et al., *Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction.* Antiviral research, 2007. **74**(2): p. 92-101.
23. Pires, D.E., T.L. Blundell, and D.B. Ascher, *pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures.* Journal of medicinal chemistry, 2015. **58**(9): p. 4066-4072.
24. Lipinski, C.A., *Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution.* Drug Discovery Today: Technologies, 2004. **1**(4): p. 337-341.
25. Jayaram, B., et al. *Sanjeevini: a freely accessible web-server for target directed lead molecule discovery*. in *BMC bioinformatics*. 2012. Springer.
26. Lenzer, J., *Covid-19: US gives emergency approval to hydroxychloroquine despite lack of evidence.* bmj, 2020. **369**: p. m1335.
27. Sehailia, M. and S. Chemat, *Antimalarial-agent artemisinin and derivatives portray more potent binding to Lys353 and Lys31-binding hotspots of SARS-CoV-2 spike protein than hydroxychloroquine: potential repurposing of artenimol for COVID-19.* Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2020: p. 1-11.
28. Patel, K., et al., *Amarogentin as topical anticancer and anti-infective potential: scope of lipid based vesicular in its effective delivery.* Recent patents on anti-infective drug discovery, 2019. **14**(1): p. 7-15.
29. Yadav, S.S., et al., *Traditional knowledge to clinical trials: a review on therapeutic actions of Emblica officinalis.* Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **93**: p. 1292-1302.
30. Yu, S., et al., *A review on the phytochemistry, pharmacology, and pharmacokinetics of amentoflavone, a naturally-occurring biflavonoid.* Molecules, 2017. **22**(2): p. 299.
31. BUT, P.P.-H., et al., *Antiviral amentoflavone from Selaginella sinensis.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2001. **24**(3): p. 311-312.
32. Miroshnychenko, K. and A.V. Shestopalova, *Combined use of amentoflavone and ledipasvir could interfere with binding of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 to ACE2: the results of molecular docking study.* 2020.

33. Larregieu, C.A. and L.Z. Benet, *Drug discovery and regulatory considerations for improving in silico and in vitro predictions that use Caco-2 as a surrogate for human intestinal permeability measurements.* The AAPS journal, 2013. **15**(2): p. 483-497.
34. Cabrera-Pérez, M.Á., et al., *In Silico assessment of ADME properties: advances in Caco-2 cell monolayer permeability modeling.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2018. **18**(26): p. 2209-2229.

STUDY ON EXTRACTING CRUDE PHYCOCYANIN FROM SPIRULINA ALGAE AND DETERMINING ITS ABILITY IN PROTECTING FIBROBLASTS FROM OXIDATIVE STRESS OF HYDROXYL PEROXIDE

Quan To Minh[1]*, Nhan Tran Dinh[1], Phuc Pham Thi Kim[2], My Ho Truong Nhu[2],
Bien Lai Dinh[2], Tri Le Quang[3], Long Le Thanh[4], Son Hoang Nghia[4]
[1)] University of Science, HCM National University, [2)] HCMC University of Food Industry,
[3)] 7A Military Hospital, [4)] Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology
Corresponding author: tomquan@hcmus.edu.vn

ABSTRACT

Phycocyanin is a powerful natural antioxidant from Arthrospira platensis. In this study, crude phycocyanin (crPC) was extracted, and its ability to protect fibroblast from hydroxyl peroxide (H_2O_2) in vitro was determined. crPC was extracted from Spirulina by a step-by-step method: 1/ cell breaking by a repeated freezing/thawing method; 2/ contaminant removal by 8% active charcoal and ammonium sulfate 15%; 3/ phycocyanin obtaining by ammonium sulfate 50% and dialysis. Abilities of crPC 6, 12.5, 25, 50 and 75 µg/ml in inducing cell proliferation and migration were tested on fibroblasts. The protective ability of crPC against oxidative stress of H_2O_2 was determined on fibroblasts as the following method: fibroblasts were pretreated with crPC 25 µg/ml for 24 hours before exposing to H_2O_2 175 µM for 90 minutes (experimental group). Then cell viability, cell phase and senescence β-galactosidase expression were evaluated. The results showed that: PI of crPC was 2.79 ± 0.03 and concentration was 1.13 ± 0.05 (n=5). crPC below 150 µg/ml was non-toxic to fibroblasts and crPC above 25 µg/ml stimulated cell proliferation (doubling time was 44.5 ± 1.2 hours, n=3) and migration (24 hours, n=3). Compared to control group (cells were treated only with H_2O_2 175 µM), cell viability in the experimental group was higher (79.3 ± 5.4% vs 53.4 ± 2.3%, n=3) and cell ratio in G0/G1 and senescence β-galactosidase expression was lower (78.7 ± 4.1% vs 85.8 ± 6.1%) (22.8 ± 4.6% vs 68.4 ± 6.8%). Conclusion: crPC was extracted successfully from Arthospira platensis, and crPC 25 µg/ml was able to protect fibroblast against oxidative stress of H_2O_2.

***Keywords*:** *Phycocyanin, hydroxyl peroxide, fibroblast.*

1 Introduction

Arthrospira platensis (Cyanobacteria) is acknowledged as one of the most superfoods that contain many necessary nutritious elements, especially a powerful antioxidant, phycocyanin (PC) [1]. PC is a blue accessory pigment which transfers light energy to chlorophyll. Phycocyanin is water-soluble, non-toxic, antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer. Today, PC is mainly employed as a coloring agent or nutritional ingredient in fields of food, cosmetics [2]. Moreover, many researches focus on its antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer function. These findings showed that PC could effectively eliminate Reactive Oxygen Species (ROS) involved in some diseases, for example, atherosclerosis, liver fibrosis, neurodegenerative diseases [3]. In the cosmetic field, PC was used as a natural dye for some commercial products composed of lipsticks, eye-shadows… but its antioxidant characteristics have the most value. UV radiation is the main reason for photoaging. UV-light affects the skin by generating ROS in the dermis of the skin. An excessive amount of ROS leads to cell damage, alternation of structure and function of the protein in the skin, including

collagen, elastin… [4; 5]. Photoaging can be curbed by antioxidants such as PC which has the ability to scavenge or inhibit ROS such as hydroxyl peroxide (H_2O_2) [2]. Moreover, PC shows its proliferation and migration effects on skin cells, for example, fibroblast and keratinocyte [6; 7]. In 2008 and 2013, Madhyastha proved PC (75 µg/ml and 75 µM) induced migration of skin cells to full-thickness wounds in **Sprague-Dawley male rats** after 6-day treatment, so wound healing process is faster than control [6; 8]. Consequently, PC has a large potential to be an anti-aging agent in skincare. In the market, the value of PC is depended on the purity of PC (PI) which determined by OD_{620}/OD_{280}. It is divided into food grade (PI >= 0.7) and analytical grade (PI >= 4). It costs from 500 USD/kg to 15 USD/mg [9]. In cosmetic products, food graded PC is frequently utilized; however, the quality is different among companies. Even though the effect of PC on various diseases has been proved, such as cancer, its anti-aging was neglected [10]. Furthermore, the use of over-purified PC could be costly to be adapted for industrial products. In this study, we want to extract crude PC (crPC) by a simple protocol to make a high-quality and low-cost material used in cosmetics.

2 Materials and Methods

2.1 Materials and Reagents

Arthrospira platensis was received from the University of Science, Vietnam National University of Ho Chi Minh City.

2.2 Extraction and purification of C-Phycocyanin

The extraction and purification process was performed according to Mahdieh Safaei (2019) with some modification [10]. The biomass of *Arthrospira platensis* was added to lysis buffer (Na phosphate or $CaCl_2$) with a ratio of 1 g dried biomass/20 ml solution. The solution was subjected to repeated freezing/thawing cycle (-20^{o}C for 3 hours and 4^{o}C for 8 hours) with 3 replications for cell breaking. Then, the solution was centrifuged at 8000 rpm for 10 min to obtain supernatant (crude Arthrospira extraction, CRE).

Next, activated charcoal was applied to CRE (8g/100ml), and the mixture was centrifuged at 8,000 rpm for 15 min to discard pellet (1st step). Then, the crude phycocyanin (crPC) was purified by 2-step salting-out method using ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$). $(NH_4)_2SO_4$ was supplemented to CRE to reach saturation of 15% (2nd step, to remove contaminants) and 50% (3rd step, to obtain phycocyanin precipitation). Then, the precipitation was resuspended in 10 ml sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0), dialyzed against distilled water overnight at 4^{o}C and filtered stepwise with 0.8, 0.45 and 0.22 µm membrane. The absorbance spectra were obtained to determine the concentration and purity of C-PC by using the following equation of Safaei, 2019. Purity index: OD_{620}/OD_{280} and concentration: (OD620 – 0.474 x A650)/5.34.

2.3 Evaluation of cytotoxicity of crPC *in vitro* [11]

Human fibroblasts were cultured in DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were seeded at a density of 5 x 10^4 cells/well in 24-well plate. After 24 hours, crPC was added to wells with concentrations: 150, 100, 50, 25, 12.5 and 0 µg/ml and incubated for 24 hours. One day later, the medium was changed, and the MTT assay was performed to assess the cytotoxicity of crPC at various concentrations.

2.4 Evaluation of the proliferation effect of crPC [12]

Human fibroblasts were seeded in 24-well plate with a concentration of $5x10^3$ cells/well and exposed to medium containing crPC (75, 50, 25, 12.5 and 0 µg/ml) for 7 days, and the medium was exchanged 2 days per time. After 2, 4, 6 culturing days, cell number in each group was determined by hemocytometer.

2.5 Evaluation of the migration effect of crPC by Wound Healing assay [13]

Human fibroblast was seeded into a 24-well plate with concentration $5x10^4$ cells/well. After 24 hours, a scratch was made on a cell monolayer in each well. Then medium containing crPC at concentrations of 75, 50, 25, 12.5 and 0 µg/ml was supplemented to wells. The migration of fibroblasts was observed by microscope until 24 hours.

2.6 Evaluation of the protective ability of crPC against H_2O_2

The H_2O_2-induced oxidative stress was performed according to Dimozi (2015) with some modifications [14]. The experiment was divided into 3 groups: normal group (fibroblasts were cultured in DMEM/F12 medium), control group (fibroblasts were treated with H_2O_2 175 µM for 90 minutes), experimental group (fibroblasts were pretreated with medium containing crPC 25 µg/ml for 1 day, followed by treating with H_2O_2 175 µM for 90 minutes). Cell viability, cell ratio in the G0/G1 phase and senescence β-galactosidase (SβGA) expression were determined in each group.

2.7 Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times, and the results were shown as mean ± S.D. One-way ANOVA using Statgraphics 18 was employed to analyze the results statistically. A value of $P < 0.05$ was considered as significant.

3 Result

3.1 Extraction of crPC

As shown in table 1, the highest purity index (PI) of CRE was obtained in the group using $CaCl_2$ as lysis buffer (1.01 ± 0.07), and its concentration was 1.77 ± 0.04 mg/ml. The result obtained from the salting method showed that the previous adding of salt to 15% increased the purity of C-PC in the solution to 1.29 mg/ml. After the pellet was discarded, the further supplement of ammonium sulfate precipitated C-PC, C-PC was precipitated the most by 50% of the salt solution. The concentration of crPC group was 1.13 ± 0.05 mg/ml, and the purity index was 2.79 ± 0.25 (Fig. 1).

Table 1. The result of extraction and purification of crPC from *Arthrospira platensis*. ^{a}, ^{b} and ^{c} were different statistically, $\alpha = 0.05$

Phase	Variants	Concentration (mg/ml)	PI
CSE	1% Calcium chloride	1.77 ± 0.04^a	1.01 ± 0.07^a
	2% Calcium chloride	1.68 ± 0.06^b	1.00 ± 0.02^a
	10 mM Na phosphate buffer	1.56 ± 0.03^c	0.42 ± 0.04^b
	100 mM Na phosphate buffer	1.79 ± 0.04^a	0.48 ± 0.04^b
	Distilled water	1.62 ± 0.06^b	0.45 ± 0.05^b

1st purification	8% Activated charcoal	1.65 ± 0.08	1.52 ± 0.08
2nd purification	15% Ammonium sulfate	1.60 ± 0.03	1.84 ± 0.04
crPC	45% Ammonium sulfate	1.13 ± 0.05	2.79 ± 0.03

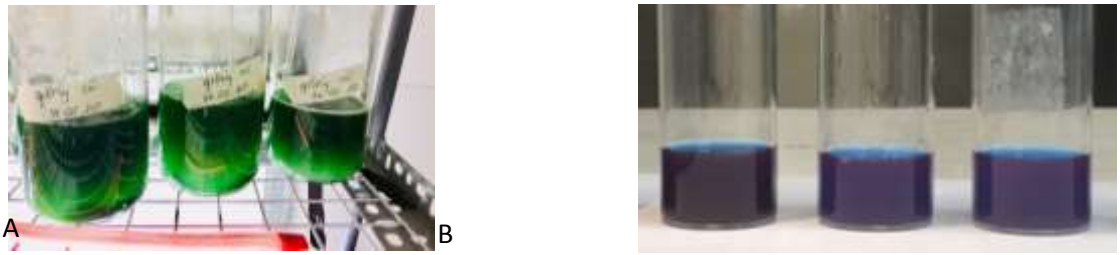


Fig 1. Crude phycocyanin. A: Arthrospira, B: crPC

3.2 Evaluation of cytotoxicity of crPC

This test is according to ISO 10993 standard. The fibroblasts are seeded in the plate and contacted the agent (crPC). Later, MTT assay is carried out to determine the OD of cells in experiment group (exp) and control group (con). The cytotoxic level is based on OD_{exp}/OD_{con}. The result of MTT assay showed that OD absorption in all experimental groups (medium containing crPC at 12.5-150 µg/ml) was higher than the control group (fibroblasts were cultured in DMEM/F12), the ratio of OD597 ex/con was higher than 1. Cytotoxicity degree is 0, crPC was not toxic to fibroblasts at 200 µg/ml and lower.

Table 2. The results of the cytotoxicity test

	Control	**crPC 12.5**	**crPC 25**	**crPC 50**	**crPC 100**	**crPC 150**
Aver	0.30 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.32 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.03
Ratio		1.2 ± 0.06	1.09 ± 0.15	1.11 ± 0.14	1.25 ± 0.04	1.2 ± 0.11

3.3 Evaluation of proliferation effect of crPC

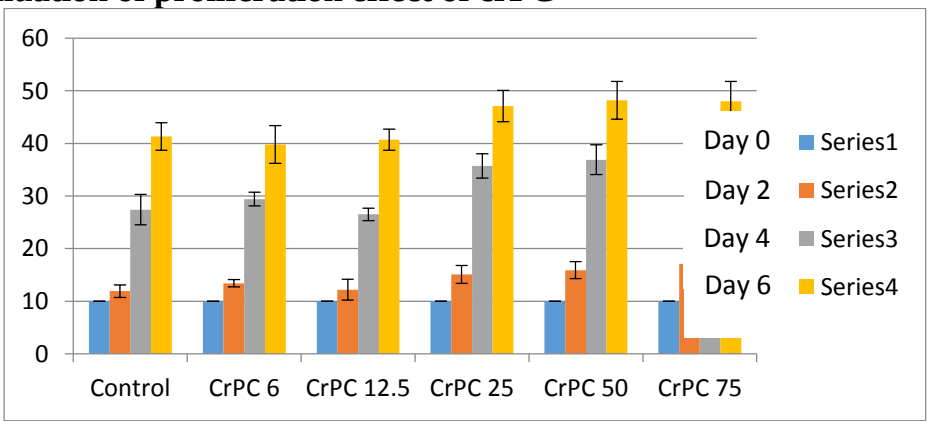


Fig. 2. The results of the proliferation effect test

Table 3. The number of cells in all groups after 6 days in culture [a] and [b] were different statistically, α = 0.05

	Control	crPC 6	crPC 12.5	crPC 25	crPC 50	crPC 75
Concentration ($x10^4$)	41.3 ± 2.5[a]	39.8 ± 3.7[a]	40.7 ± 2.0[a]	47.1 ± 3.0[b]	48.2 ± 3.5[b]	47.9 ± 3.8[b]
DT	47.3 ± 1.4[a]	48.2 ± 2.1[a]	47.6 ± 1.2[a]	44.5 ± 1.2[b]	44.1 ± 1.4[b]	44.2 ± 1.5[b]

Fibroblasts were cultured in medium containing crPC 6, 12.5, 25, 50, 75 µg/ml for 6 days. After 6-day in culture, cells in control group covered about 90% surface area and reached a density of 41.3 ± 2.5x10^4 cells/well. In experimental groups, cells in crPC reached the full confluence with concentration from 47.1x10^4 - 47.9x10^4 cells/well and cell proliferation in these groups was faster than crPC 6, 12.5 µg/ml (Fig. 3, Table 2). The results showed that crPC stimulated proliferation of fibroblast in vitro at concentrations above 25 µg/ml.

3.4 Evaluation of migration of crPC

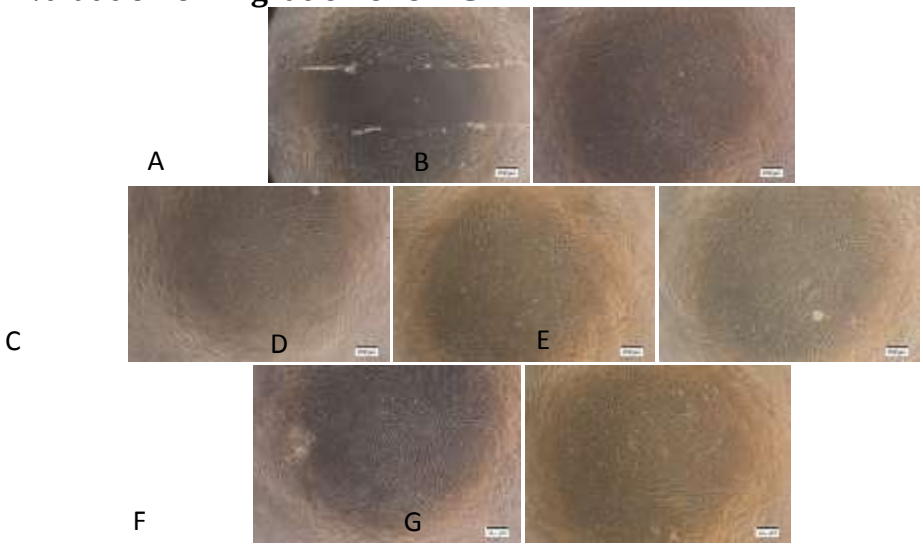


Fig. 3. Wound Healing test. A: the scratch on cell monolayer; B, C, D, E, F, G: cell migration on crPC 0, 6, 12.5, 25, 50, 75 µg/ml

After 24 hours, cells in all groups migrated into the scratch with different levels. In control and crPC6 groups, cells reached to the scratch center but did not cover total wound area (close to 50%). In groups of crPC 12.5, crPC 25, crPC 50 and crPC 75, cell invaded completely into the wound and covered over 90% of the scratch (Fig. 3). The results showed that crPC at concentrations above 12.5 µg/ml enhanced the cell migration effectively.

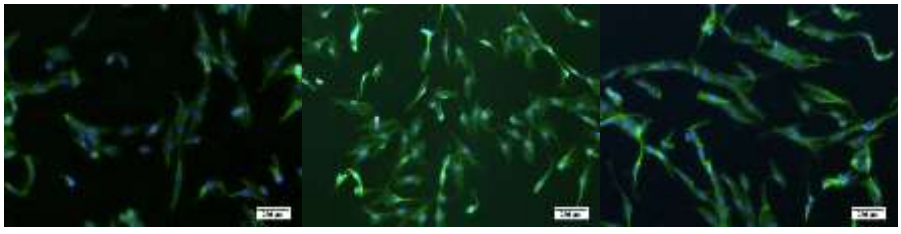


Fig. 4. Fibroblasts were stained with Hoetch and actin staining. Left, normal group; center, control group; right: experimental group

3.5 Evaluation of the protective ability of C-PC against H_2O_2

Table 3 shows the results of this protective effect test. The result showed that in the normal group, most cells were in the G0/G1 phase (72.5 ± 4.8%) and a few cells expressed Sβ-GA (4.4 ± 2.1%). In the control group, cell viability declined to 53.4 ± 2.3%, cell ratio in G0/G1 increased to 85.8 ± 6.1%, percentage of Sβ-GA expressed cells increased to 68.4 ± 6.8% (about 17 times). These results showed that H_2O_2 affected negatively on cell: it led to cell death and senescence. In the experimental group, cells were pretreated with crPC at a concentration of 25 µg/ml before exposing to H_2O_2 (Fig. 4, 5, 6 and Table 4). The results showed that crPC alleviated oxidative stress of H_2O_2 on fibroblasts: viability was higher than the control group and the ratio of G0/G1 cells, Sβ-GA expressed cells was lower than the control group.

Table 4. The result of protective effect test. [a], [b], and [c] were different statistically, $\alpha = 0.05$

		Normal group	Control group	Experimental group
Cell viability		100%[a]	53.4 ± 2.3%[b]	79.3 ± 5.4%[c]
Ratio cells in the G0/G1 phase		72.5 ± 4.8%[a]	85.8 ± 6.1%[b]	78.7 ± 4.1%[c]
Sβ-GA expression		4.4 ± 2.1%[a]	68.4 ± 6.8%[b]	22.8 ± 4.6%[c]

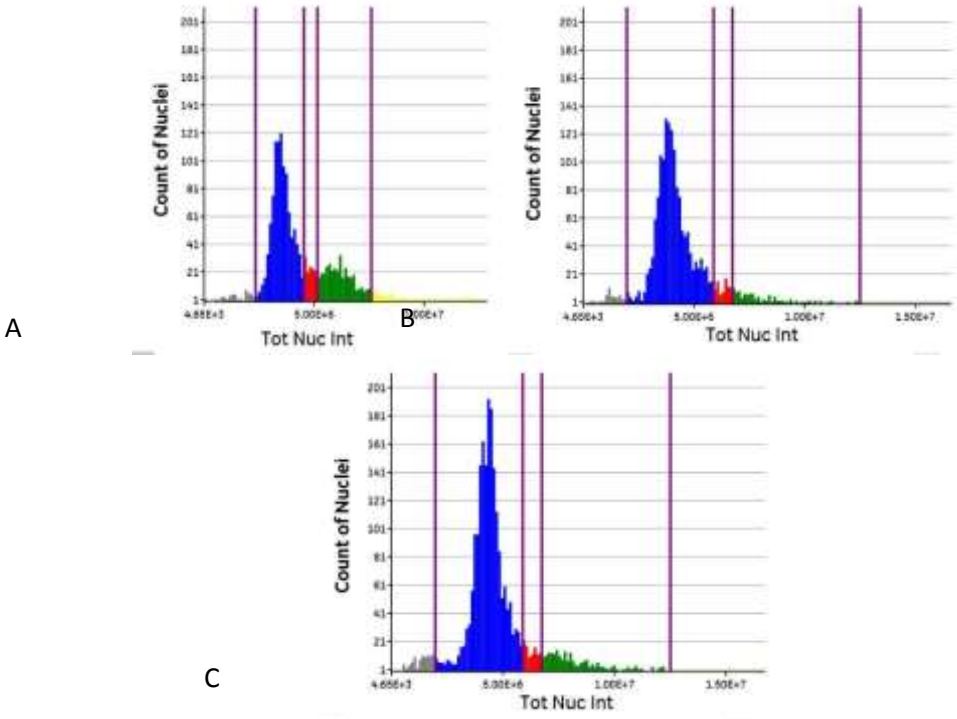


Fig. 5. Flow cytometry results of cells in protective effect test. A, normal group; B, control group, C, experimental group.

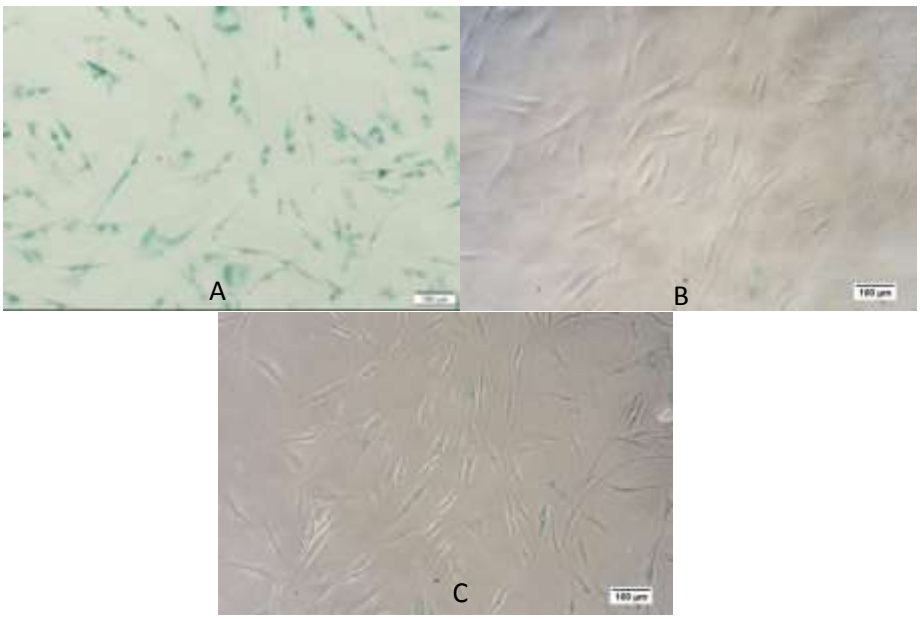


Fig. 6. Senescence – β galactosidase staining. A, normal group; B, control group; C, experiment group.

4.Discussion and Conclusion

Phycocyanin is a powerful natural antioxidant. It costs from 500 USD/kg to 15 USD/mg, which depend on its purity. Purity index (PI) is calculated by formulation of A620/A280 and divided to food-grade (PI >= 0.9) and analysis grade (PI >= 4) [15]. In the cosmetic field, PC is used as a natural dye. PC was proved to have positive effects on proliferation and migration of skin cells such as fibroblasts and keratinocytes *in vitro [8; 10; 16]*. However, affection of PC on protecting skin cells from oxidation agent *in vitro* is limited. Most commercial PC products belong to food grade. PC used in the experiment is analysis grade, but it is too expensive to apply in commercial products. In this study, we want to extract crude PC whose purity is in a range of 2.5-3 with low price and determine its ability in protecting skin cells (fibroblasts) against oxidative stress. Thus, we used a simple and cheap process to extract the PC from Spirulina. Crude Spirulina extract (CSE) was obtained by repeated freezing/thawing method with 3 replications. Then, contaminants were discarded by using activated charcoal and ammonium sulfate 15% combined with centrifugation. Final, PC was precipitated by charcoal and ammonium sulfate 50%, dialyzed against sodium phosphate overnight and cryopreserved (crude phycocyanin, crPC). The crPC had a concentration of 1.13 mg/ml and a PI of 2.89.

Some of its biological characteristics were determined in vitro, including cytotoxicity, proliferation and migration induction on fibroblasts and ability in protecting fibroblasts. Fibroblasts are the major cells in the skin's dermal layer. In physiological condition, fibroblasts synthesize collagen and elastin which retain the strength and elasticity of skin [17]. When being hurt by flame or chemicals, fibroblasts move into the wound and proliferate to regenerate the dermis [18]. In aging skin, the number of fibroblasts is diminished, and they produce less collagen and elastin. The skin becomes thinner, weaker and looser [19; 20]. In cytotoxicity, proliferation and migration test, crPC in concentrations of 6, 12.5, 25, 50, 75, 150 µg/ml was used. Cytotoxicity test was performed according to ISO 10993 standard. OD597 obtained from MTT assay in all experimental groups (cells were cultured in medium supplemented with crPC) was higher than control (cells were cultured in culturing

medium). This result showed that crPC was not toxic to fibroblasts from 6-150 μg/ml. Migration test was performed according to Wound Healing assay. After 24 hours, fibroblasts cultured in crPC 12.5 - 75 μg/ml moved faster and covered more scratch area than in control and crPC 6 μg/ml. In proliferation effect test, after 6 days, cells in groups of crPC 25 - 75 μg/ml reached 100% confluence and had doubling times about 41 hours. While cells in groups of control and crPC 6-12.5 μg/ml covered nearly 90% the surface and had DT longer. Based on these results, we concluded that crPC was not toxic to fibroblasts with concentration under 150 μg/ml. Moreover, 25 μg/ml was the minimum concentration of crPC, which can stimulate both proliferation and migration of fibroblast, so this concentration was used in the following experiments.

Next, we assessed affection for its ability to protect fibroblasts from hydroxyl peroxide (H_2O_2). H_2O_2 is a strong oxidant which could damage cell compartments including membrane, nucleus ... Oxidants such as H_2O_2 were produced in the body as the by-products of metabolisms. Oxidants were overproduced in aging skin or by the affection of UV light. H_2O_2 can destroy the skin cells or make the cells become senescence and break up collagen and elastin, and this symptom occurs in photoaging [21; 22; 23]. PC can inhibit H_2O_2 - induced injuries on hepatocyte, porcine embryos but its protective ability on fibroblast in vitro was not concerned [24; 25; 26]. So, we tried to evaluate crPC protective ability on fibroblast from H_2O_2. The cells were pretreated with crPC 25 μg/ml for 24 hours and exposed to H_2O_2 175 μM for 90 minutes as our previous protocol (experimental group). Three aspects were evaluated: cell viability (MTT assay), cell ratio in G0/G1 phase (Hoetch staining and using Cytell machine) and senescence – β galactosidase expression (staining). This result showed H_2O_2 175 μM destroyed fibroblasts (cell viability decreased to 50%) and most remain cells had signs of senescence: 85% of cells were arrested in G0/G1 phase and 60% of cells expressed SA – β galactosidase. In the experimental group (crPC – pretreated cells), viability was higher than control, and cell rate was arrested in G0/G1 was lower and fewer cells expressed SA – β galactosidase. We concluded crPC 25 μg/ml inhibited oxidative stress of H_2O_2 175 μM on fibroblasts.

5 Conclusion

crPC was successfully extracted from *A. platensis*, and crPC inhibited oxidative stress of H_2O_2 on fibroblasts.

6 Conflicts of Interest

The authors have no conflict of interest to declare

REFERENCES

1. Jung, F., Krüger-Genge, A., et al.: Spirulina platensis, a super food? Journal of Cellular Biotechnology. **5**, pp 43-54 (2019). doi:
2. de Morais, M. G., da Fontoura Prates, D., et al.: Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications. Industrial Biotechnology. **14**, pp 30-37 (2018). doi:
3. İlter, I., Akyıl, S., et al.: Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using different techniques. Journal of Food Composition and Analysis. **70**, pp 78-88 (2018). doi: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007.
4. Tu, Y. and Quan, T. J. C.: Oxidative stress and human skin connective tissue aging. **3**, pp 28 (2016). doi: 10.3390/cosmetics3030028.
5. Wang, B.: Photoaging: a review of current concepts of pathogenesis. J Cutan Med Surg. **15 Suppl 1**, pp S374-7 (2011). doi: 10.2310/7750.2011.00006.

6. Madhyastha, H. K., Radha, K. S., et al.: uPA dependent and independent mechanisms of wound healing by C-phycocyanin. Journal of cellular and molecular medicine. **12**, pp 2691-2703 (2008). doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00272.x.
7. Gur, C. S., Erdogan, D. K., et al.: In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude Spirulina extract and C-phycocyanin. J. Medicinal Plants Res. **7**, pp 425-433 (2013). doi:
8. Madhyastha, H., Madhyastha, R., et al.: Regulation of growth factors-associated cell migration by C-phycocyanin scaffold in dermal wound healing. Clin Exp Pharmacol Physiol. **39**, pp 13-9 (2012). doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05627.x.
9. Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., et al.: Stepwise extraction of high-value chemicals from Arthrospira (Spirulina) and an economic feasibility study. Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands). **20**, pp e00280-e00280 (2018). doi: 10.1016/j.btre.2018.e00280.
10. Safaei, M., Maleki, H., et al.: Development of a novel method for the purification of C-phycocyanin pigment from a local cyanobacterial strain Limnothrix sp. NS01 and evaluation of its anticancer properties. Scientific Reports. **9**, pp 9474 (2019). doi: 10.1038/s41598-019-45905-6.
11. Aslantürk, Ö. S.: In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. pp (2018). doi: 10.5772/intechopen.71923.
12. Hao, S., Li, S., et al.: C-Phycocyanin Suppresses the In Vitro Proliferation and Migration of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells through Reduction of RIPK1/NF-κB Activity. Marine drugs. **17**, pp 362 (2019). doi: 10.3390/md17060362.
13. Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., et al.: An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. Cell adhesion & migration. **8**, pp 440-451 (2014). doi: 10.4161/cam.36224.
14. Dimozi, A., Mavrogonatou, E., et al.: Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. Eur Cell Mater. **30**, pp 89-102; discussion 103 (2015). doi: 10.22203/ecm.v030a07.
15. Liu, Q., Huang, Y., et al.: Medical Application of Spirulina platensis Derived C-Phycocyanin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **2016**, pp 7803846 (2016). doi: 10.1155/2016/7803846.
16. Gunes, S., Tamburaci, S., et al.: In vitro evaluation of Spirulina platensis extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. Pharmaceutical Biology. **55**, pp 1824-1832 (2017). doi: 10.1080/13880209.2017.1331249.
17. Rodrigues, M., Kosaric, N., et al.: Wound Healing: A Cellular Perspective. Physiological Reviews. **99**, pp 665-706 (2018). doi: 10.1152/physrev.00067.2017.
18. Gonzalez, A. C. d. O., Costa, T. F., et al.: Wound healing - A literature review. Anais brasileiros de dermatologia. **91**, pp 614-620 (2016). doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741.
19. Lago, J. C. and Puzzi, M. B.: The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. PLOS ONE. **14**, pp e0219165 (2019). doi: 10.1371/journal.pone.0219165.

20. Tigges, J., Krutmann, J., et al.: The hallmarks of fibroblast ageing. Mech Ageing Dev. **138**, pp 26-44 (2014). doi: 10.1016/j.mad.2014.03.004.
21. Bladier, C., Wolvetang, E. J., et al.: Response of a primary human fibroblast cell line to H2O2: senescence-like growth arrest or apoptosis? Cell Growth Differ. **8**, pp 589-98 (1997). doi:
22. Sander, C. S., Chang, H., et al.: Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. J Invest Dermatol. **118**, pp 618-25 (2002). doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01708.x.
23. Shin, M. H., Rhie, G. E., et al.: H2O2 accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo. J Invest Dermatol. **125**, pp 221-9 (2005). doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23823.x.
24. Ou, Y., Zheng, S., et al.: Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. Chem Biol Interact. **185**, pp 94-100 (2010). doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.013.
25. Niu, Y.-J., Zhou, W., et al.: C-Phycocyanin protects against mitochondrial dysfunction and oxidative stress in parthenogenetic porcine embryos. Scientific Reports. **7**, pp 16992 (2017). doi: 10.1038/s41598-017-17287-0.
26. Liang, S., Guo, J., et al.: C-Phycocyanin supplementation during in vitro maturation enhances pre-implantation developmental competence of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. Theriogenology. **106**, pp 69-78 (2018). doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.09.001.

STUDYING ADVENTITIOUS ROOT FORMATION DERIVED FROM NODE OF *Morinda offcinalis* How. CULTURED *IN VITRO*

Trinh Thi Huong[1]*, Ngo Thi Kim Mong[1], Le Thanh Loc[1], Nguyen Thi Quy Co[2], Tran Trong Tuan[3]

[1]*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

[2]*The Binh Chanh – Cu Chi forest's management authorities*

[3]*Plant Cell Technology Department - Institute of Tropical Biology, VAST*

Tác giả liên lạc: *trinhthihuongcsdl@gmail.com*

ABSTRACT

Morinda offcinalis is a precious medicinal plant with high economic value in Vietnam. In recent years, along with the tendency of breeding and preserving medicinal plants, the cultivation of biomass roots has been paying attention. In this study, the role of IBA, method of placing node on root induction were investigated. The results showed that SH medium supplemented with 2 mg/L IBA was suitable for adventitious root induction of Morinda offcinalis cultured in vitro. The node explant placed vertically obtained the higher ratio of root formation (100%) and numbers of root (13.46 roots/sample) than node explant placed horizontally. The state of medium culture and the concentration of sucrose also play an important role in the proliferation of adventitious root. The results indicated that explants cultured on solid SH medium (agar 8.0 g/L) had higher growth rates than explants cultured on shaking liquid medium (without agar). In the experiment using sucrose, the medium supplemented with 45 g/L sucrose was suitable for adventitious root proliferation. The fresh weight of adventitious root achieved the highest value which was six times higher than initial used weight (1,2 g). The results of the study can be referred for the process of culturing Morinda officinalis root biomass at large scale, providing materials for pharmaceutical industry.

***Keywords**: Adventitious root, indole butyric acid, Morinda offcinalis, node, sucrose*

1. INTRODUCTION

The roots of the *M. officinalis* contain bioactive compounds that have high pharmacological value, so this species is considered as a valuable medicinal plant in traditional medicine. *M. officinalis* is distributed mainly in Laos, Vietnam, China, India and North Korea. It is a herbaceous plant, vines which can live for years. In Vietnam, *M. officinalis* is ranked first in the group of positive tonic herbs because the roots contain many valuable medicinal ingredients such as anthranoid, physcion, rubiadin, daucosterol,... The root extract of *M. officinalis* has various health effect, such as nourishing the kidney, reducing blood pressure, good for the brain, increasing appetite and improving sleeping quality. Due to the recently increasing demand for medicinal materials, the wild *M. officinalis* has been heavily exploited. The growth of *M. officinalis* in nature depends on ecological conditions, and it takes 3-5 years to harvest. Besides, it is also affected by insects, diseases,… Currently, the technology of culturing plant cell biomass has many advantages such as being able to actively control the process of producing large biomass in a short time without being affected by natural factors, and the quality of biomass is stable. From this biomass, bioactive substances can be extracted as raw materials for the production of medicinal products, functional foods, and cosmetics. This technology has been creating valuable products for many areas of life, especially the pharmaceutical industry. In this situation, besides of conducting propagation of *M. officinalis*, it is also necessary to develop the culturing of plant cell biomass of *M. officinalis* to create a stable source of raw materials for the

pharmaceutical industry. In particular, culturing adventitous root biomass is considered as a potential solution.

Adventitious roots are primarily derived from the cells surrounding vascular and medullary tissues. However, in some cases it is derived from epidermal cells [1]. Basically, the adventitious root has endogenous origin due to the differentiation of parenchymal cells located around the vascular tissue system by the action of auxin. During the process of differentiation, cells of the medullary and cortex region restore their ability to divide. However, only the certain cells, such as the phloem tissue of the meristem, are able to differentiate into the initial roots [2, 3].

During the cell and organ differentiation, the role of plant growth regulator is important. Auxin determines root differentiation, and sometimes auxin is considered as a root stimulant. If auxin concentration in the medium is too low, the explants should not stimulate rooting or slow rooting. There is a correlation between the positive polar movement of auxin and the root formation. This movement is an active transport process that occurs in the phloem parenchymal cells. When a sample of tissue is removed, their physiological properties are disordered, leading to redistribution of some substances, in particular auxin. Endogenous auxin is usually concentrated in the stem segment, the root formation position, and the amount of auxin in the stem will determine to promote or inhibit the process of forming new roots. Therefore, supplement of plant growth regulator helps to increase the ability of adventitious root formation [4].

In order to meet the high demand for medicinal materials of *M.oficinalis* and utilize the technology of root biomass culture, this study was conducted to investigate the influence of several factors of culture media including IBA concentration, the state of culture medium, sucrose concentration and placing the explants on the surface of the medium on the process of adventitious root formation and multiplication derived from nodes of *M. officinalis* How.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Material

The initial samples were nodes of the shoots of *M. officinalis* cultured *in vitro*.

The medium used in the experiments was SH medium (Schenk and Hildebrant, 1972) [5] supplemented with 30 g/L sucrose (except for investigation of sugar concentration's effect), 8.0 g/L agar, and the pH was adjusted to 5.8 before autoclaving.

2.2. Method

2.2.1. Effect of IBA on the ability of inducing adventitious roots from node of M. officinalis

Nodes (length of 1.5 cm) of *M. officinalis* were placed horizontally on SH medium supplemented with IBA at diferrent concentrations (1, 2, 3, 4, 5 mg/L). The control was the SH medium without IBA.

2.2.2. Effect of placed sample on the ability of inducing adventitious roots from node of M. officinalis

Nodes (length of 1.5 cm) of *M. officinalis* were cultured on the SH medium supplemented with IBA (with the suitable concentration obtained from the experiment 2.2.1) in two ways: (1) The node explants were placed vertically (similar to the natural direction of the shoots) into the medium; (2) The node explants were placed horizontally exposured to surface of the medium.

2.2.3. Effect of the state of culture medium on the adventitious root multiplication of M. officinalis

0.2 g fresh weight of adventitious roots which were obtained from the two above experiments were inoculated on SH medium supplemented with IBA (at appropriate concentration from the experiment 2.2.1). The experiment investigated two different medium states that affected on the adventitious root multiplication. They were solid medium (addition of 8 g/L agar) and liquid shaking medium (without agar) with a shaking rate of 100 rpm.

2.2.4. Effect of sucrose concentration on the adventitious root multiplication of M. officinalis

Adventitious roots (0.2 g fresh weight) which were obtained from the two above experiments were inoculated on SH medium supplemented with IBA (at appropriate concentration from the experiment 2.2.1) and added sucrose with different concentrations of 15, 30, 45, 60 g/L.

2.2.5. Cultural conditions

All root induction and multiplication experiments were cultured in the dark under temperature conditions of 23 ± 2ºC, and average humidity of 55 - 60%. The shoots were cultured under lighting condition of 12 hours/day with light intensity of 2500 - 3000 lux.

2.2.6. Evaluation

For root induction: The ratio of rooting samples, number of roots/explant.

For root multiplication: The fresh weight root obtained after culture, multiplication coefficient.

$$Multiplication\ coefficient\ = \frac{The\ fresh\ weight\ root\ obtained\ after\ culture}{Initial\ fresh\ weight\ root}$$

2.2.7. Statistical analysis

Experiments were arranged completely randomly with three replicates. The criteria were observed after 4-6 weeks of culture. The data were analyzed statistically by Microsoft Excel and Statgraphics software at 95% confidence level.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1.Effect of IBA on the adventitious root formation from node of *M. officinalis*

Adventitious roots are induced directly from different organs or indirectly through callus on the medium supplemented with auxin. In this experiment, effect of SH medium supplemented with IBA at concentrations of 0 - 5.0 mg/L on the ability of inducing adventitious root fomation from node was studied. After 6 weeks of culture, the results showed that 50% of node explants formed adventitious roots with average number of roots of 1.25 roots/explant in the control. When IBA was added to the culture medium at concentration of 1 - 4 mg/L, the rooting rate and number of roots/explant were higher than the control. The rooting rate (100%) and the number of roots (5.58 roots/explant) were the highest at experiment using 2 mg/L IBA (Table 1). Morphological observation showed that the roots were long and branched at concentration of 2 mg/L IBA. In addition, new shoots were formed at concentrations of 1 - 3 mg/L IBA.

Table 1. Effects of IBA concentration on the adventitious root induction from node of M. officinalis after 6 weeks of culture

IBA (mg/L)	The rate of root formation (%)	Number of root/explant

0	50.00^{d}	1.25^{e}
1	91.67^{ab}	2.42^{c}
2	100.00^{a}	5.58^{a}
3	83.33^{bc}	3.25^{b}
4	75.00^{c}	1.83^{de}
5	58.33^{d}	0.67^{f}
P	*	*

**In the same column, means with different letter differ at a significant level of $p < 0.05$*



Figure 1. Effect of IBA concentration on the adventitious root induction from node of *M. officinalis* after 6 weeks of culture. A, B, C, D, E, F: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L IBA, respectively.

Auxin is a factor that determines root differentiation [4]. In plant cell tissue culture, IAA, IBA and NAA are main auxins used to stimulate rooting, and IBA is more effective for adventitious root culture than other auxins [6]. Trinh Thi Huong et al. (2012) reported that IBA (5 mg/L) had stronger influence on adventitious root formation of Ngoc Linh ginseng than NAA and IAA [7]. San José et al., (2012) also demonstrated that addition of 0.1 mg/L IBA to the culture medium helped to increase the secondary root formation of *Alnus glutinosa* compared to the control (without IBA) [8]. Concentration and kind of auxin added to the culture medium to induce adventitious root differ for different plant species. Ninh Thi Thao et al. (2016) also conducted the study of adventitious root culture derived from node of *M. officinalis* [9]. The results indicated that IBA was not suitable for adventitious root induction, and the medium for growth of adventitious roots was MS supplemented with 0.75 mg/L NAA; on this medium, the rate of root formation was 100% and the number of root reached 4.53 roots/sample.

3.2. Effect of placed sample on the adventitious roots formation from node of *M. officinalis*

Adventitious root formation is a profound change in histological activity, due to differentiation of parenchymal cells located around the vascular tissue system under the action of auxin. In most cases, it has endogenous origin, that means it starts from the center or in the conduction tissue [10]. In this study, node was cultured on SH medium supplemented with 2 mg/L IBA and placed on medium by two ways (vertical and horizontal). The results showed that explant placed vertically had number of root (13.46 roots/sample) higher than explant placed horizontally (3.54 roots/sample) (Table 2, Figure 2). The reason for this is that the polar movement of auxin and the root formation correlated with each other when node were placed vertically. This movement is an active transport process that takes place in the phloem parenchymal cell system of node when the node is in direct contact with the culture medium. As a result, the vertically placed explant absorbs nutrient and auxin better than horizontally placed explant.

Table 2. **Effect of placed explant on the adventitious root formation from node of *M. officinalis* after 6 weeks of culture**

How to place a sample	The number of root/sample
Node explants were placed vertically	13.46
Node explants were placed horizontally	3.54
P	*

**There are significantly different at 95% confidence.*



Figure 2. **Effect of placed explant on the adventitious root formation from node of *M. officinalis***

A: Node explants were placed horizontally after 6 weeks; B: Node explants were placed vertically after 6 weeks (B1), and 10 weeks (B2).

3.3. Effect of the state of culture medium on the adventitious root multiplication of *M. officinalis*

The adventitious roots obtained from the two prevous experiments were used as materials to study of root multiplication on solid and liquid media. The results showed that on the solid medium the fresh weight of root was 0.38 g, and multiplication coefficient was 1.9 times. On the shaking liquid medium, however, the fresh weight of root was 0.29 g, and multiplication coefficient was 1.4 times. The reason is that on a shaking liquid culture medium the roots are submerged in the medium led to lack of oxygen, so the roots grown slowly (Table 3). Duong Tan Nhut et al. (2012) studied effect of several culture systems on multiplication of adventitious roots and secondary roots of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.); the results also indicated that the semi-solid medium was more suitable for the multiplication of roots than the shaking liquid medium [11].

Table 3. Effect of the state of culture medium on the adventitious root multiplication of *M. officinalis* after 4 weeks.

State of culture medium	Fresh weight of roots (g)	Multiplication coefficient (times)
Solid medium	0.38	1.9
Shaking liquid medium	0.29	1.4
P	*	

**There are significantly different at 95% confidence.*

Morphological observation showed that roots swelled, and secondary roots was short; the roots began to brown and died after 2 weeks of culturing on the shaking liquid medium. However, on solid cultures, secondary roots tended to extended and penetrated the medium surface, formed white callus tissue surrounding the roots (Figure 3).

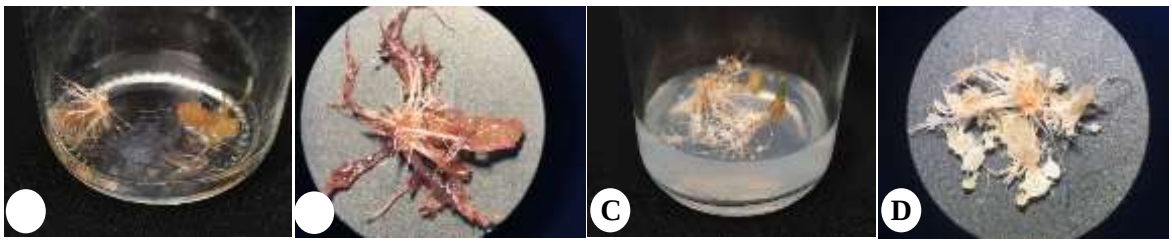


Figure 3. Effect of the state of culture medium on the adventitious root multiplication of *M. officinalis.* A,B: Shaking liquid medium; C,D: Solid medium.

3.4. Effect of sucrose concentration on the adventitious root multiplication of *M. officinalis*

In *in vitro* culture, sucrose is the source of carbon for plants, and the concentration of sucrose added in the medium is usually 30 g/L. However, in root biomass culture, the amount of sucrose added to the medium varies depending on the species. In this study, the fresh weight of roots did not increase in the control (without sucrose). When the concentration of sucrose increased from 15 to 45 g/L, the fresh weight of roots increased gradually. In particular, at the concentration of 45 g/L sucrose, the fresh weight of roots reached the highest (1.20 g), and multiplication coefficient was 6 times. Nguyen Trung Thanh and Paek Kee Yoeup (2008) studied multiplication of adventitious roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer. The results also indicated that the concentration of 30 g/L sucrose was not suitable for multiplication of adventitious roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer., and the most appropriate concentration of sucrose was 50 g/L [12]. When sucrose concentration increased to 60 g/L, the fresh weight of root decreased (1.01 g) (Table 4). This is because the high sucrose concentration causes osmotic pressure, which lead to inhibition of nutrient absorption of roots. According to Khuri and Moorby (1995), sucrose at a concentration of 2 - 5% was suitable for *in vitro* culture process, and it was quickly absorbed in the roots [13]. This experiment clearly showed the important role of sucrose in adventitious root growth. However, when sucrose was added to the culture medium at high concentration, root growth decreased. This is also similar to study on the roots of *Panax ginseng* C.A. Meyer by Hahn et al. (2003) [14]. Therefore, the appropriate concentration of sucrose for adventitious root growth of *M. officinalis* was 45 g/L.

Table 4. Effect of sucrose concentration on the adventitious root multiplication of M. officinalis after 6 weeks of culture

Sucrose (g/L)	Initial fresh weight of root (g)	Fresh weight of root (g)	Multiplication coefficient (times)
0	0.20	0.20^{d*}	1.0
15		0.87^{c}	4.35
30		1.07^{b}	5.35
45		1.20^{a}	6.0
60		1.01^{b}	5.05
P		*	

**In the same column, means with different letter differ at a significant level of $p < 0.05$.*

4. CONCLUSION

The appropriate concentration of IBA for adventitious root induction from the node of *M. officinalis* was 2 mg/L. Vertical culture of the node explants was more suitable for root formation than horizontal culture.

For the multiplication of *M. officinalis* root, the solid medium was more suitable than shaking liquid medium, and the appropriate sucrose concentration was 45 g/L.

REFERENCES

1. Attfield E. M., and Evans P. K. - Stages in the initiation of root and shoot organogenesis in cultured leaf exphant of *Nicotiana tabacum cv*. Xanthi nc, Journal of Experimental Botany **42** (1991) 59-63.
2. Harbage J. T., Stimart D. P., and Evert R. F. - Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of malus domestica Borkh 'Gala', Journal of American Society for Horticultural Science **118** (1993) 680-688.
3. Mitsuhashi K. M., Shibaoka H., Shimokoriyama M. - Anatomical and physiological aspects of developmental processes of adventitious root formation in *Azukia* cutting, Plant and Cell Physiology **19** (1978) 867-874.
4. Vu Van Vu – Applied Plant Physiology, Education Publishing (1999) 5-33.
5. Schenk R. U., Hildebrandt A. C. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, Can J Bot **50** (1972) 199-204.
6. George E. F., Sherington P. D. - Plant propagation by tissue culture, Exegetics Ltd. Eversley, England (1984) 709.
7. Trinh Thi Huong, Ho Thanh Tam, Ha Thi My Ngan, Ngo Thanh Tai, Nguyen Phuc Huy, Hoang Xuan Chien, Nguyen Ba Nam, Vu Quoc Luan, Vu Thi Hien, Nguyen Thi Thuy Huong, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, Duong Tan Nhut – Effect of explant source, explant size and auxin on *in vitro* adventitious roots generation ability of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.), Journal of Biotechnology **10 (4A)** (2012) 877-886.
8. San José M. C., Romero L., Janeiro L. V. - Effect of indole-3-butyric acid on root formation in *Alnus glutinosa* microcuttings, Silva Fennica **46(5)** (2012) 643-654.
9. Ninh Thi Thao, Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Thuy Linh, Nguyen Tuan Minh, Nguyen Quynh Chi, Tran Thi Anh Đao - Adventitious root induction and culture of *Morinda officinalis* How., Vietnam Journal of Agricultural Sciences **14(06)** (2016) 921- 930.
10. Vo Thi Bach Mai - Shoot and root development, HCMC National University Press, 2004.
11. Duong Tan Nhut, Nguyen Cuu Thanh Nhan, Hoang Xuan Chien, Nguyen Phuc Huy, Nguyen Ba Nam, Tran Xuan Ninh, Pham Phong Hai, Vu Quoc Luan, Phan Quoc Tam, Vu Thi Hien, Trinh Thi Huong, Tran Cong Luan, Paek Kee Yoeup - Some culture systems in rapid proliferation of adventitious and secondary roots of Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha *et* Grushv.), Journal of Biotechnology **10(4A)** (2012) 887-897.
12. Nguyen Trung Thanh, Paek Kee Yoeup – Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.V. Meyer: factors affecting adventitious root growth and ginsenosides production, The VNU Journal of Science **(24)** (2008) 318-323.
13. Khuri S., Moorby J. - Investigation into the role of sucrose in potato: Estima microtuber production *in vitro*. Ann Botany **75** (1995) 295-303.
14. Hahn E. J., Kim Y. S., Yu K. W., Joeng C. S., Paek K. Y. - Adventitious root cultures of *Panax ginseng* C.A. Meyer and ginsenoside production through large scale bioreactor system. *J Plant Biotechnol* **5(1)** (2003) 1-6.

NGHIÊN CỨU TẠO RỄ BẤT ĐỊNH TỪ ĐỐT THÂN CỦA CÂY BA KÍCH (*Morinda offcinalis* How.) TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY *IN VITRO*

Trịnh Thị Hương[1]*, Ngô Thị Kim Mộng[1], Lê Thành Lộc[1], Nguyễn Thị Quý Cơ[2], Trần Trọng Tuấn[3]

[1]Trường Đại học Công nghiệp Thực Phẩm TP.HCM

[2]Ban quản lý rừng phòng hộ Bình Chánh-Củ Chi

[3]Viện Sinh học Nhiệt đới TP.HCM

*Tác giả liên lạc: *trinhthihuongcsdl@gmail.com*

TÓM TẮT

Cây ba kích là một cây dược liệu quý và có giá trị kinh tế cao của nước ta. Trong những năm gần đây cùng với xu hướng nhân giống và bảo tồn các loài cây dược liệu thì nuôi cấy tạo sinh khối rễ cây ba kích cũng đang được quan tâm. Trong nghiên cứu này, vai trò của IBA và phương pháp đặt mẫu trong sự cảm ứng phát sinh rễ bất định đã được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu đốt thân được đặt đứng và nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 2 mg/L IBA thích hợp cho sự cảm ứng tạo rễ bất định cây ba kích in vitro, với tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100% và số rễ đạt 13,46 rễ/mẫu. Trạng thái môi trường nuôi cấy và nồng độ sucrose cũng đóng vai trò quan trọng đối với sự tăng sinh rễ bất định cây ba kích. Đối với quá trình tăng sinh rễ bất định, các mẫu được nuôi cấy trên môi trường SH có bổ sung 8 g/L agar có hệ số tăng sinh cao hơn so với các mẫu được nuôi cấy trong môi trường lỏng lắc (không bổ sung agar). Trong thí nghiệm nghiên cứu về nồng độ đường, môi trường có bổ sung 45 g/L sucrose thích hợp cho sự tăng sinh khối rễ bất định. Khối lượng mẫu tươi thu được sau 6 tuần nuôi cấy tăng gấp 6 lần so với khối lượng được sử dụng ban đầu (1,2 g). Kết quả đạt được của nghiên cứu là tiền đề cho quy trình nuôi cấy thu nhận sinh khối rễ ba kích ở quy mô lớn, nhằm cung cấp nguồn nguyên liệu ba kích một cách chủ động cho ngành công nghiệp dược.

***Từ khóa**: Cây ba kích, đốt thân, indole butyric acid, rễ bất định, sucrose.*

THANH NIÊN KHỞI NGHIỆP HỢP TÁC XÃ NÔNG NGHIỆP TRONG TÌNH HÌNH MỚI
YOUTH STARTUP AGRICULTURAL COOPERATION IN THE NEW SITUATION

Ths. Nguyễn Minh Diễm Quỳnh
GV Khoa Luật- Khoa học Chính trị. Trường Đại học An Giang. ĐHQG.HCM
Tác giả liên lạc: nmdquynh@agu.edu.vn

TÓM TẮT

Việt Nam đang trong tiến trình hội nhập kinh tế quốc tế đã tạo nhiều cơ hội mới và thách thức cho các chủ thể sản xuất kinh doanh. Trong số đó, nông nghiệp là lĩnh vực chịu nhiều tác động nhất nên cần sự cải cách thể chế một cách thực chất, nghiêm túc và hiệu quả. Thị trường xuất khẩu tiềm năng và cạnh tranh cao. Môi trường đầu tư cần cải cách mạnh mẽ. Trình độ khoa học và công nghệ trong sản xuất nông nghiệp cần được nâng cao theo từng khâu hay cả chuỗi sản xuất nhằm gia tăng giá trị sản phẩm. Trước bối cảnh ấy, mô hình hợp tác xã thanh niên đã và đang mang đến sự khởi sắc, đặc biệt là lĩnh vực nông nghiệp. Trên cơ sở thu thập và phân tích thông tin, tác giả sẽ đề xuất các giải pháp cụ thể để để phong trào khởi nghiệp sáng tạo đạt hiệu quả bền vững, phát triển sản xuất, kinh doanh theo mô hình hợp tác xã trong tình hình mới.
Từ khoá: *nông nghiệp; hợp tác xã; thanh niên khởi nghiệp.*

ABSTRACT

Vietnam is in the process of international economic integration, which has created many new opportunities and challenges for production and business entities. That is, agriculture is the most affected sector, so it needs substantial, serious and effective institutional reform. High potential and competitive export market. The investment environment needs strong reform. The level of science and technology in agricultural production should be improved in each stage or the whole production chain in order to increase product value. In that context, the youth cooperative model has been bringing prosperity, especially in the agricultural sector. On the basis of information collection and analysis, the author will propose specific solutions for the creative start-up movement to achieve sustainable efficiency, to develop production and business according to the cooperative model in the new situation.
Keywords: *agriculture**;** cooperative**;** young entrepreneur startups*

TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

Khởi nghiệp đổi mới sáng tạo là một trong những yếu tố then chốt quyết định sự phát triển kinh tế đột phá của các quốc gia. Nhiều chính sách, đề án, kế hoạch, chương trình của các bộ, ngành và địa phương được ban hành nhằm đổi mới sáng tạo và khởi nghiệp. Nông nghiệp tuy là lĩnh vực ứng dụng công nghệ còn nhiều hạn chế do các nguyên nhân khác nhau nhưng lại là cánh đồng màu mỡ nhất để sáng tạo, thử nghiệm, khởi nghiệp và đầu tư ứng dụng cách mạng 4.0. Đó là cuộc cách mạng số hoá toàn bộ chu trình và các yếu tố liên quan trong sản xuất nông nghiệp trên toàn bộ hệ thống trên chính mảnh ruộng hay trang trại của người dân. Sản phẩm cuối cùng chủ thể kinh tế cung cấp không chỉ là giống, phân bón, công cụ sản xuất mà cả giải pháp hỗ trợ quản lý và ra quyết định sản xuất nông nghiệp một cách thông minh.

Khởi nghiệp nông nghiệp trong bối cảnh công nghiệp 4.0 bao gồm: các lĩnh vực dịch vụ web, thông tin truyền thông, công nghệ di động. Điều này đã làm nên phong trào đổi mới sáng tạo mạnh mẽ và tiềm năng trong đào tạo nguồn nhân lực chất lượng

cao, có khả năng sáng tạo và khởi nghiệp. (Nguyễn Thị Lan. Khai thác tại: www.pvcfc.com.vn)

Tính đến thời điểm này, theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, cả nước có hơn 14.500 hợp tác xã nông nghiệp. Trong đó, hơn 50% hoạt động hiệu quả, số còn lại được đánh giá có tiềm năng phát triển trong tương lai. Trong 6.000 hợp tác xã được thành lập 5 năm gần đây, đội ngũ lãnh đạo hợp tác xã đa phần đều trẻ tuổi. Đây là lợi thế để các hợp tác xã tiếp cận khoa học - công nghệ cao, tạo chuỗi liên kết thúc đẩy sản xuất, tiêu thụ nông sản trong bối cảnh hội nhập, góp phần phát triển kinh tế địa phương.

Theo số liệu của Trung ương Đoàn, năm 2019 có 50 thanh niên là những nhà nông trẻ xuất sắc được bình chọn từ 63 tỉnh - thành đoàn cả nước vinh dự đón nhận Giải thưởng Lương Định Của lần thứ 13 của Trung ương Đoàn. Trong đó, có 37 thanh niên có doanh thu hằng năm hơn một tỷ đồng, tạo việc làm cho nhiều lao động; 17 thanh niên là chủ doanh nghiệp, giám đốc hợp tác xã; 33 thanh niên là chủ cơ sở sản xuất, kinh doanh, trực tiếp phát triển mô hình trồng trọt, chăn nuôi, phát triển kinh tế tại địa phương.

Như vậy, có thể nói, khi phần lớn những người trẻ sống ở nông thôn chọn hướng thoát ly ra thành phố để lập nghiệp thì cũng có những thanh niên chọn cách khởi nghiệp tại chính quê hương mình. Họ tham gia vào hợp tác xã nông nghiệp để tận dụng nguồn đất đai dồi dào của địa phương trồng các loại nông sản. Nhờ sự ủng hộ của các đoàn viên thanh niên và bà con nông dân, hợp tác xã đã trở thành đầu mối bao tiêu sản phẩm, hướng dẫn kỹ thuật cho người dân địa phương, góp phần hạn chế được tình trạng sản xuất nhỏ lẻ, thay đổi tư duy trong canh tác nông nghiệp nhằm từng bước đáp ứng nhu cầu thị trường. Đây là điểm mới, tín hiệu đáng mừng đối với các hợp tác xã nông nghiệp.

Bởi lẽ, hợp tác xã là tổ chức kinh tế tập thể, đồng sở hữu, có tư cách pháp nhân, do ít nhất 07 thành viên tự nguyện thành lập và hợp tác tương trợ lẫn nhau trong hoạt động sản xuất, kinh doanh, nhằm đáp ứng nhu cầu chung của thành viên trên cơ sở tự chủ, tự chịu trách nhiệm, bình đẳng và dân chủ trong quản lý hợp tác xã. Cá nhân trở thành thành viên hợp tác xã phải đáp ứng đủ các điều kiện: là công dân Việt Nam hoặc người nước ngoài cư trú hợp pháp tại Việt Nam, từ đủ 18 tuổi trở lên, có năng lực hành vi dân sự đầy đủ; hộ gia đình có người đại diện hợp pháp theo quy định của pháp luật; cơ quan, tổ chức là pháp nhân Việt Nam. (Quốc hội, 2012)

Tại tỉnh An Giang, Khoa Nông nghiệp- Tài nguyên thiên nhiên, trường Đại học An Giang thuộc Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh đào tạo các ngành có liên quan đến nông nghiệp và tài nguyên thiên nhiên như Công nghệ chế biến thực phẩm, Công nghệ sinh học, Khoa học cây trồng, Bảo vệ thực vật, Nuôi trồng thủy sản, Chăn nuôi, Phát triển nông thôn. Hiện tại, khoa thực hiện đào tạo trình độ đại học và cao đẳng dưới hình thức chính quy và giáo dục thường xuyên. Từ năm 2014, khoa bắt đầu tuyển sinh đào tạo thạc sĩ ngành Khoa học cây trồng (theo Quyết định số 5228 QĐ/ BGDĐT ngày 27/8/2014 của Bộ Giáo dục và Đào tạo) mở ra triển vọng mới về đào tạo; thực hiện nghiên cứu khoa học và chuyển giao tiến bộ khoa học kỹ thuật nhằm giải quyết các vấn đề liên quan đến nông nghiệp của tỉnh và khu vực Đồng Bằng sông Cửu Long.

Trong 20 năm qua, khoa đã đào tạo 16 khóa với hơn 5.000 kỹ sư ra trường. Hiện nay, khoa có gần 1.600 SV đang theo học dưới hình thức chính quy và giáo dục thường xuyên bao gồm Cao học, Cao đẳng, Đại học. Phần lớn sinh viên tốt nghiệp của khoa đều có việc làm ổn định, phù hợp chuyên môn đào tạo. Nhiều sinh viên tốt nghiệp đang giữ cương vị quan trọng trong các đơn vị kinh doanh , đặc biệt là các hợp tác xã, chủ

các trang trại làm ăn đạt hiệu quả cao.(Trường Đại học An Giang. Khai thác tại: www.agu.edu.vn),

Mặt khác, để mở rộng vùng nguyên liệu, hợp tác xã chủ động liên kết với người dân qua phương thức hợp tác xã hỗ trợ kỹ thuật, bao tiêu toàn bộ sản phẩm; người dân góp đất, góp nhân công theo quy trình sản xuất khép kín. Chính nhờ mối liên kết trong sản xuất đã giúp sản phẩm của hợp tác xã duy trì ổn định chất lượng theo đúng quy định an toàn vệ sinh thực phẩm. Đến nay, tất cả những sản phẩm do hợp tác xã cung cấp ra thị trường đều có nhãn mác, mã số, mã vạch do cơ quan chức năng cấp. Không chỉ làm tốt khâu sản xuất, phân phối sản phẩm theo hướng truyền thống, hợp tác xã nông nghiệp thanh niên còn đi đầu trong ứng dụng công nghệ khi xây dựng trang mạng riêng có đăng ký sàn giao dịch thương mại điện tử toàn cầu. Đặc biệt, hệ thống bán hàng trực tuyến, quảng cáo thương hiệu, đã và đang được xem là thành công của những thành viên là thanh niên trẻ trên con đường lập thân, lập nghiệp; tiếp cận nguồn vốn hỗ trợ thanh niên khởi nghiệp, chính sách về đất đai cùng chương trình chuyển giao tiến bộ khoa học kỹ thuật là một trong những lợi thế của hợp tác xã trẻ.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Thành tựu đạt được trong khởi nghiệp hợp tác xã nông nghiệp

Theo số liệu thống kê, đến tháng 9/2019, cả nước có 23.905 hợp tác xã, tăng 6,5% so với năm 2018, trong đó, 22.649 hợp tác xã đang hoạt động, 1.256 hợp tác xã ngừng hoạt động. Số hợp tác xã đang hoạt động được phân loại như sau: nông- lâm- ngư-diêm nghiệp thủy sản là 4.379 hợp tác xã, công nghiệp - tiểu thủ công nghiệp: 1.923 hợp tác xã, thương mại là 1.944 hợp tác xã, vận tải và dịch vụ vận tải là 1.375 hợp tác xã; xây dựng - sản xuất vật liệu xây dựng là 852 hợp tác xã; môi trường là 483 hợp tác xã. Cả nước có 54/63 tỉnh, thành phố tăng số lượng hợp tác xã. Cụ thể, số hợp tác xã vùng Tây Bắc tăng 4%, chiếm 9% tổng số hợp tác xã, vùng Đông Bắc tăng 4%, chiếm 18%, vùng Đồng bằng Sông Hồng giảm 5%, chiếm 25%, vùng Bắc Trung bộ tăng 4%, chiếm 18%, vùng Duyên hải Nam Trung bộ giảm 4%, chiếm 5%, Tây Nguyên tăng 6%, chiếm 6%, Đông Nam Bộ tăng 3% và chiếm 8%, vùng Đồng bằng sông Cửu Long tăng 4%, chiếm 12%.

Trong 9 tháng đầu năm 2019, cả nước thành lập mới 02 liên hiệp hợp tác xã, nâng tổng số liên hiệp hợp tác xã trên toàn quốc là 76, chủ yếu hoạt động trong lĩnh vực nông nghiệp, thương mại, vận tải. Có 1.500 hợp tác xã sản xuất, kinh doanh gắn với chuỗi giá trị thị trường trong nước và nước ngoài, áp dụng công nghệ cao, tiêu chuẩn vệ sinh an toàn sản phẩm, ký kết hoạt động tiêu thụ sản phẩm dài hạn với doanh nghiệp.

Đến nay, mô hình hợp tác xã sản xuất kinh doanh theo chuỗi giá trị sản phẩm chủ lực của quốc gia, vùng, địa phương ngày càng được mở rộng, trở thành xu thế chuyển đổi hình thức tổ chức sản xuất để hợp tác xã nâng cao hiệu quả và phát triển bền vững như: hợp tác xã lâm nghiệp công nghệ cao tỉnh Phú Yên (với quy mô cấp tỉnh), hợp tác xã bò sữa Evergrowth tỉnh Sóc Trăng (đã xây dựng thành công và đưa vào hoạt động nhà máy trộn thức ăn tinh cho bò sữa), hợp tác xã dịch vụ nông nghiệp tổng hợp Anh Đào tỉnh Lâm Đồng sản xuất rau an toàn, liên kết với các siêu thị và trực tiếp tiêu thụ trên 52 tỉnh trong cả nước và xuất khẩu sang Hàn Quốc; hợp tác xã Thanh Long Tầm Vu ở Long An; hợp tác xã xoài La Ngà ở Định Quán, Đồng Nai… Các địa phương trong cả nước đã chỉ đạo thực hiện phát triển hợp tác xã gắn với Chương trình xây dựng nông thôn mới, Chương trình OCOP, Đề án phát triển 15.000 hợp tác xã, Liên hiệp hợp tác xã nông nghiệp hoạt động hiệu quả theo Quyết định số 461/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ; Đề án xây dựng mô hình sản xuất theo chuỗi giá trị… qua đó,

góp phần tăng trưởng kinh tế - xã hội, giải quyết việc làm, tăng thu nhập, cải thiện đời sống, đảm bảo an sinh xã hội và giảm nghèo bền vững**.** (Đặng Văn Thanh, 2020)

Trong những năm qua, sản xuất nông nghiệp luôn được xem là nền tảng và là đầu tàu của nền kinh tế tỉnh An Giang. Thế mạnh của tỉnh là sản xuất lúa và cá nước ngọt đã đạt những thành tựu to lớn trong sản xuất. Trong đó, diện tích gieo trồng lúa năm 2018 đạt 628 ngàn ha. Sản lượng lúa ổn định ở mức gần 4 triệu tấn; sản xuất rau màu và cây ăn trái đạt 557,3 ngàn tấn; sản lượng các loại cây lâu năm đạt gần 206 ngàn tấn; diện tích mặt nước nuôi cá tra của An Giang năm 2018 là 1.431 ha với sản lượng 371 ngàn tấn; tăng 75 ngàn tấn so với năm 2017.

Kết quả thực hiện liên kết sản xuất, tiêu thụ lúa gạo năm 2018, đã có 37 doanh nghiệp (27 công ty lương thực và 10 công ty giống) triển khai liên kết sản xuất thông qua 20 hợp tác xã và 10 tổ hợp tác với diện tích là 30.333 ha, đạt tỉ lệ trên 55% diện tích kế hoạch (55.100 ha); 13 vùng được cấp chứng nhận đủ điều kiện sản xuất rau an toàn với tổng diện tích 2.697 ha. Hơn 206 ha diện tích nuôi cá tra của các hộ dân có hợp đồng liên kết với các doanh nghiệp.

Tính đến cuối tháng 9/2019, toàn tỉnh An Giang có 191 hợp tác xã hoạt động trên 6 lĩnh vực như:136 hợp tác xã nông nghiệp, thủy sản (chiếm 71,2%); 24 quỹ tín dụng nhân dân (chiếm 12,57%); 23 hợp tác xã vận tải (chiếm 12,04%); 6 hợp tác xã tiểu thủ công nghiệp (chiếm 3,14%); 1 hợp tác xã thương mại - dịch vụ - du lịch - nông nghiệp (chiếm 0,52%); 1 hợp tác xã tài nguyên và môi trường (chiếm 0,52%). Như vậy, hợp tác xã nông nghiệp và thuỷ sản chiếm đa số trong lĩnh vực kinh doanh của hợp tác xã.

Như vậy, có thể nói, trong sản xuất nông sản, liên kết chính là chìa khóa giúp phát triển một nền nông nghiệp hiện đại, đảm bảo hài hòa lợi ích của các chủ thể tham gia. Quá trình liên kết đó có những đặc điểm riêng và đóng vai trò quan trọng, góp phần đảm bảo các bên cùng có lợi; làm tăng hiệu quả sản xuất nông sản; góp phần nâng cao hiệu quả, vai trò quản lý nhà nước về kinh tế.

Khó khăn đối với thanh niên khởi nghiệp hợp tác xã nông nghiệp

Sự thành công của mô hình sản xuất trẻ trong các hợp tác xã đã mang đến một diện mạo mới, sức sống mới cho các hợp tác xã nông nghiệp. Nhưng để phong trào thanh niên khởi nghiệp thành công, rất cần sự hỗ trợ từ Nhà nước trong đào tạo, bồi dưỡng kiến thức để người trẻ có thể hiểu rõ bản chất hợp tác xã. Từ đó, các hợp tác xã hoạt động tuân thủ quy định của pháp luật.

Trên thực tế, phần lớn thanh niên sống chung với gia đình. Nếu cha hoặc mẹ đã được vay nguồn vốn từ các đoàn thể Hội Nông dân, Hội Phụ nữ thì thanh niên sẽ không được vay vốn ưu đãi từ Ngân hàng Chính sách xã hội. Bên cạnh đó, điều kiện được vay vốn phải là hộ nghèo, cận nghèo nên đã phần nào hạn chế đối tượng được vay. Đây cũng là trở ngại thường gặp đối với thanh niên trong quá trình khởi nghiệp (Ngọc Sơn, 2020)

Tâm lý chung đối với thanh niên khởi nghiệp thường thích chọn mô hình doanh nghiệp để kinh doanh nên không tránh khỏi hiện tượng e ngại mô hình nhỏ lẻ của hợp tác xã. Mặt khác, hợp tác xã nông nghiệp vốn đặc thù ngành nghề gắn với "cánh đồng" nên chưa đủ sức hấp dẫn đối với sinh viên mới tốt nghiệp ra trường chuộng nơi làm việc ở đô thị so với nông thôn. Vị thế của thành viên hợp tác xã cũng chưa tương xứng với nhân viên doanh nghiệp về mặt thực tiễn.

Biến động giá cả thị trường cùng khí hậu, dịch bệnh phức tạp đã ảnh hưởng không nhỏ đến sản xuất kinh doanh của các hợp tác xã. Cùng với đó, việc tuyên truyền thực hiện Luật hợp tác xã năm 2012 từ ban lãnh đạo hợp tác xã đến thành viên còn khó khan. Tình trạng nhiều hợp tác xã yếu kém hoặc duy trì hoạt động ở mức trung bình

hay mới chỉ cung cấp một số dịch vụ thiết yếu cho thành viên vẫn còn diễn ra phổ biến. Việc ứng dụng khoa học công nghệ trong quản lý, điều hành của các hợp tác xã còn nhiều hạn chế.

Nguồn kinh phí hỗ trợ phát triển hợp tác xã còn hạn chế. Số lượng hợp tác xã được tiếp cận chính sách chưa nhiều. Hợp tác xã có quy mô nhỏ, cơ sở vật chất còn nhiều khó khăn, chất lượng đội ngũ cán bộ ở một số hợp tác xã chưa đồng đều về tuổi đời và năng lực trước yêu cầu của tình hình mới.

Sự liên kết, hợp tác giữa các hợp tác xã chưa chặt chẽ, hiệu quả thấp. Vai trò của liên hiệp hợp tác xã chưa được phát huy. Nhiều hợp tác xã, liên hiệp hợp tác xã trong tình trạng khó khăn, yếu kém kéo dài. Năng lực nội tại của các hợp tác xã còn yếu. Cơ sở vật chất nghèo nàn. Trình độ công nghệ lạc hậu. Năng lực, trình độ cán bộ quản lý trong khu vực hợp tác xã còn hạn chế, không đáp ứng được nhiệm vụ sản xuất kinh doanh trong điều kiện hiện nay.

Một số tổ hợp tác trong nông nghiệp còn gặp phải những khó khăn do cạnh tranh với các thành phần kinh tế khác nhất là như doanh nghiệp; về khoa học công nghệ, giá thành và chất lượng sản phẩm nhưng chưa được chia sẻ thông tin kịp thời. Nền nông nghiệp cơ bản còn nhiều vấn đề cần được giải quyết như: cơ sở hạ tầng còn lạc hậu, dịch vụ phụ trợ còn chưa phát triển, cơ giới hóa, hiện đại hóa nông nghiệp chưa có nhiều đột phá, các ứng dụng công nghệ thông tin trong nông nghiệp còn hạn chế về cả lượng và chất lượng. (Đặng Văn Thanh, 2020)

Cơ hội và thách thức đối với thanh niên khởi nghiệp hợp tác xã nông nghiệp

Nông sản sạch, có nguồn gốc xuất xứ rõ ràng, chất lượng đảm bảo đang trở thành nhu cầu bức thiết và ngày một gia tăng. Cơ hội xuất khẩu nông sản sạch, an toàn, hữu cơ ra thị trường thế giới còn nhiều tiềm năng, mở ra cơ hội xuất khẩu tốt cho các công ty trong nước. Trong 5 năm gần đây, lĩnh vực nông nghiệp cũng nhận được nhiều hơn những hỗ trợ từ Chính phủ, góp phần thu hút các doanh nghiệp lớn đầu tư vào nông nghiệp công nghệ cao.

Nguồn vốn ngoại tìm đến lĩnh vực nông nghiệp nước ta có xu hướng gia tăng, mang đến cơ hội khởi nghiệp đối với thanh niên. Nhiều kết quả nghiên cứu và nguồn nhân lực được đào tạo tại các trường đại học, trung tâm ươm tạo công nghệ và hợp tác xã khởi nghiệp được nhân rộng quá trình hình thành và phát triển. Nguồn nhân lực chất lượng cao được qua đào tạo ở các trường đại học rất dồi dào. Sức trẻ, tinh thần nhiệt huyết và sẵn sàng dấn thân khởi nghiệp trong hợp tác xã nông nghiệp phong phú. Năng lực chuyên môn đáp ứng nhu cầu sản xuất kinh doanh là yếu tố then chốt phát huy lợi thế nâng cao hiệu quả trong sản xuất, góp phần phát triển kinh tế.

Những rào cản đang gây trở ngại cho thành viên hợp tác xã khởi nghiệp phát triển như: thiếu hệ sinh thái khởi nghiệp, chưa có hành lang pháp lý hoàn chỉnh cho khởi nghiệp hợp tác xã. Đóng góp của khoa học và đổi mới công nghệ trong tăng trưởng nông nghiệp còn hạn chế. Công nghiệp chế biến và dịch vụ hỗ trợ nông nghiệp chưa thu hút được nhiều doanh nghiệp đầu tư và đổi mới công nghệ; thiếu hạ tầng kết nối, hạ tầng thông tin trong nông nghiệp nông thôn.

Các đầu tư cho chương trình khởi nghiệp, hỗ trợ sinh viên và thanh niên tri thức ở nông thôn khởi nghiệp còn hạn chế. Do đó, để phong trào khởi nghiệp được thành công, ngoài đẩy mạnh công tác đào tạo nhân lực chất lượng cao cho hợp tác xã, những quy định mang tính hành chính bắt buộc về đối tượng và điều kiện được vay vốn cần được thay đổi. Đó cũng là tiền đề và điều kiện thuận lợi nhiều hơn cho điển hình thanh niên sản xuất, kinh doanh giỏi, góp phần cổ vũ phong trào lập nghiệp ở các địa phương và quá trình xây dựng nông thôn mới.

Giải pháp tạo điều kiện để thanh niên khởi nghiệp hợp tác xã nông nghiệp

Một là, Phát triển chương trình đào tạo tại các trường đại học nông nghiệp trọng điểm nhằm đào tạo, tăng cường nhận thức, xây dựng mô hình thành công cho các đối tượng tiềm năng là sinh viên, thanh niên nông thôn tri thức phục vụ phát triển khởi nghiệp ngành nông nghiệp.

Hai là, Xây dựng, hoàn thiện khung pháp lý, chính sách, các quy định về thành lập và vận hành hệ thống trung tâm ươm tạo hợp tác xã khởi nghiệp sáng tạo bên cạnh các doanh nghiệp hiện có trong lĩnh vực này. Các cơ chế chính sách tài trợ vốn và ưu đãi tài chính sẽ tạo cơ chế huy động vốn cho thành lập và hoạt động của các trung tâm ươm tạo hợp tác xã khởi nghiệp sáng tạo.

Ba là, Các khoản vay ưu đãi, xây dựng quỹ đầu tư cho dự án, hợp tác xã khởi nghiệp nông nghiệp; kêu gọi đầu tư, hỗ trợ cho các dự án khởi nghiệp nông nghiệp có tính khả thi.

Bốn là, Xây dựng bộ tiêu chí đánh giá kết quả, hiệu quả hoạt động của các dự án khởi nghiệp nông nghiệp. Quy định chuẩn bài giảng, giáo trình để tập huấn, đào tạo khởi nghiệp tại các trường đại học, cao đẳng; xây dựng văn hoá và kỹ năng khởi nghiệp. Song song đó, các cơ sở giáo dục đào tạo nhân lực kỹ sư nông nghiệp kết hợp yếu tố công nghệ ngay từ thời sinh viên để có tinh thần khởi nghiệp gắn liền với thực tế.

Năm là, Các doanh nghiệp phối hợp hợp tác xã, tổ chức, cá nhân trong và ngoài nước xây dựng trung tâm ươm tạo hợp tác xã khởi nghiệp sáng tạo, xây dựng các mô hình khởi nghiệp nông nghiệp thành công để nhân rộng tại các địa phương và nhà trường nhằm khơi dậy tinh thần khởi nghiệp, đổi mới sáng tạo trong nhóm thanh niên, sinh viên, chủ trang trại, doanh nghiệp, hộ kinh doanh cá thể.

Sáu là, Hoạt động nghiên cứu khoa học cần được gắn kết với khởi nghiệp để đảm bảo tính khả thi, thương mại hoá trong nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu có có thể được đấu giá để chuyển giao quyền sở hữu hoặc hỗ trợ, kêu gọi đầu tư tiếp tục phát triển công trình thành dự án kinh doanh, thương mại hoá sản phẩm. Ngoài ra, tăng cường gắn kết khởi nghiệp nông nghiệp với chương trình mục tiêu quốc gia: xây dựng nông thôn mới; mỗi xã một sản phẩm; 15.000 hợp tác xã nông nghiệp hoạt động có hiệu quả; đào tạo nghề cho lao động nông thôn.

Bảy là, Các trường đại học, cao đẳng cần tổ chức đưa sinh viên mới tốt nghiệp đi làm việc, thực hành, thực tập ở các nước phát triển; tổ các các hoạt động cho cán bộ hợp tác xã và thành viên hợp tác xã đi tập huấn, đào tạo, lao động, làm việc ở nước ngoài. Bên cạnh đó, địa phương cần có chính sách thu hút những người kết thúc thực hành, thực tập, lao động ở nước ngoài với những kinh nghiệm và kiến thức mới để công tác, khởi nghiệp tại các hợp tác xã, các trang trại, doanh nghiệp.

Tám là, Chính quyền địa phương phối hợp các cơ quan, đơn vị hữu quan cần có kế hoạch đầu tư cơ sở vật chất, kỹ thuật cho hệ sinh thái khởi nghiệp nông nghiệp, nơi cung cấp không gian làm việc, sáng tạo ý tưởng, kết nối mạng lưới cộng đồng khởi nghiệp; phát huy mô hình hoạt động, đào tạo, tập huấn, sàn giao dịch ý tưởng cho cộng đồng khởi nghiệp nông nghiệp. Chi cục Phát triển nông thôn tham mưu Sở Nông nghiệp các tỉnh, thành xây dựng mô hình siêu chợ tập trung trực tuyến để các hợp tác xã khởi nghiệp lĩnh vực nông nghiệp gặp nhau và gặp bên mua sản phẩm để trao đổi hàng hoá, đấu giá hoặc đặt hàng. Kết nối giao thương với các chợ trực tuyến hiện có của thế giới để tăng cường giao dịch quốc tế cho các thị trường nước ngoài. Từ đó, tích hợp công nghệ vận chuyển, phân phối điểm đầu điểm cuối, giám sát theo thời gian thực để đảm bảo tiến độ vận chuyển của hàng hoá; thông báo tình trạng vận chuyển, tối ưu việc lưu kho, giảm thiểu chi phí cho các sản phẩm nông nghiệp nhằm hỗ trợ cho các

doanh nghiệp khởi nghiệp nông nghiệp và truy xuất nguồn gốc sản phẩm để đảm bảo tính minh bạch của sản phẩm, tạo thương hiệu cho các doanh nghiệp khởi nghiệp. (Nguyễn Thị Lan. Khai thác tại: www.pvcfc.com.vn)

KẾT LUẬN

Tóm lại, hợp tác xã đã và đang phát triển rộng khắp trên các vùng miền, địa phương, cả nông thôn và thành thị. Nhận thức của người dân, doanh nghiệp về tổ chức sản xuất theo mô hình hợp tác xã ngày càng được nâng lên. Số lượng hợp tác xã, liên hiệp hợp tác xã thành lập mới tăng nhanh. Quy mô và hiệu quả hoạt động sản xuất, kinh doanh của các hợp tác xã được cải thiện. Nhiều hợp tác xã, liên hiệp hợp tác xã tăng quy mô số lượng thành viên, tài chính và mở rộng phạm vi hoạt động. Đặc biệt là thanh niên khởi nghiệp hợp tác xã nông nghiệp đã dánh dấu bước khởi sắc đáng kể. Điều này làm thay đổi tư duy và cung cách hoạt động của bộ phận thanh niên được đào tạo kỹ năng chuyên môn và theo kịp xu hướng trong thời hội nhập. Bởi lẽ, hợp tác xã nộng nghiệp là tổ chức kinh tế hoạt động như một loại hình doanh nghiệp, góp phần vào chuỗi liên kết tiêu thụ nông sản, hướng tới thành tựu chung phát triển kinh tế xã hội tại từng địa phương và trên phạm vi cả nước.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

ĐẶNG VĂN THANH (2020), Một số giải pháp phát triển khu vực kinh tế tập thể, hợp tác xã. Khai thác tại tapchitaichinh.vn.

NGỌC SƠN (2020), Thúc đẩy hợp tác xã thanh niên khởi nghiệp ở nông thôn. Khai thác tại nhandan.com.vn)

NGUYỄN THỊ LAN, VŨ NGỌC HUYÊN, NGUYỄN VIỆT LONG, Khởi nghiệp nông nghiệp trong bối cảnh CMCN 4.0. Khai thác tại: www.pvcfc.com.vn

QUỐC HỘI (2012), Luật Hợp tác xã

TRƯỜNG ĐẠI HỌC AN GIANG (2020). Khai thác tại: www.agu.edu.vn

THE ISOLATION, EVALUATION PROBIOTIC STRAINS FROM BREAST MILK AND STRAINS INHIBIT WITH *H.PYLORI* IN FERMENTED FOOD

Dang Dinh Hiep, Nguyen Thuy Huong
Bach khoa university

ABSTRACTS

In this newspaper, we want to isolate lactic strains have potential probiotic from breast milk and first steps evaluate the inhibition of lactic strains from fermented food with H.pylori. As a result, 22 lactic strains were isolated from 7 samples (breast milk) and chose 8 strains had potential probiotic. These 8 lactic strains survived in hard conditions such as acid stomarch, bile salt and resisted to bacteria with diameter clear zone 6mm-15mm. Beside, they have high adhesive activity. To obtain lactic strains have various probiotic properties, 4 lactic strains were selected and determined by 16S rDNA, they include Lactobacillus paeacasei HV3.2; Lactobacillus paracasei HV4.1; Lactbacillus acidophilus HV4.2 and Lactobacillus rhamnosus M3.2. In addition; 20 lactic strains were isolated from fermented food and chose a strain from 20 strains has the biggest inhibition with H.pylori. The Selecting strain were determined Lactobacillus plantarum by 16S rDNA and its inhibition with H.pylori was the strongest (the rate percent of inhibition is 70.48%).

Keywords: lactic strains, probiotic properties, breast milk, H.pylori

I. INTRODUCTION

Probiotic strains were isolated from vegetable fermented food, fermented milk; besides, breast milk is also a potential probiotic source. Breast milk contains 700 lactic strains most *Streptococcus, Lactococucs, Leuconostoc and Staphylococcus* and decrease harmful microorganisms, promote growth and stability of beneficial bacteria [3].

Moreover; probiotic strains have precious properties such as resisting bacteria especially inhibition of *H.pylori.* This reduces antibiotic side effects, there is a clear need for the development of new treatment approaches replacing antibiotic [1].

Therefore; our research in this newspaper was performed to isolate and evaluate potential lactic strains from breast milk; lactic strains inhibit *H.pylori* in fermented food.

II. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

4 samples (breast milk) considered HV1, HV2, HV3, HV4 provided by Hung Vuong hospital. HV1 was provided by operated born. HV2, HV3, HV4 were provided by normal born. M1, M2, M3 samples were provided by mothers raising babies in 1 month, 2 months and 3 months. Fermented food were obtained from supermarkets in Ho Chi Minh city. These samples were analyzed during 24 hours and they were stored at 5-8^0 C in laboratory (Bach khoa university).*Helicobacter pylori* (PH9) were obtained in Pasteur Institude and it may resistance to clarithromycin.

2.2. Research methods

2.2.1. Preparation of samples

2.2.1.1. Preparation of samples and activation LAB strains in breast milk

Samples (breast milk) were collected from mothers, they were contained in sterile polyethylene bags and stored in 4-6^0 C. Then, these samples were carried to the laboratory.

Samples (breast milk) added to sterile MRS broth (1ml/4ml) to activate probiotic strains in breast milk during 2 hours, under anaerobic condition at 37^0 C [4].

2.2.1.2. Isolation of LAB

After activating samples, 1 ml samples was added to sterile physiological water (0.9% NaCl) and was further serially diluted. Then, 0.1 ml liquid of the samples suitable dilutions were plated onto MRS agar. The plates were incubated in 37^0 C during 48 hours. After two days, the resulting isolates were randomly selected from the medium surface and were streaked on fresh MRS to be purified [3].

2.2.1.3. Acid and Bile Salt Tolerance Assay

Acid tolerance

Preparing Simulated Gastric Juice (SGJ) at pH 2.5 in test tube and sterilize in 121^0 C. Samples were added to SGJ at 10% the volume of SGJ and incubated in 0,1,2,3 hours. Samples were diluted to 10^6 and spread on the plates to count colony, then calculate colony forming units (CFU/ml) lactic strains survive at pH 2.5 and colony forming units (CFU/ml) lactic strains in control sample [4].

The percent of survival= colony forming units survive/colony forming units in sample control*100

Bile Salt Tolerance

Lactic strains are evaluated bile salt tolerance in above experiment. Lactic strains were cultured in SGJ medium added 0.3% bile salt and incubated in 37^0 C during 0.5 hours, 1 hours, 1.5 hours. Then, determining the percentage of survival by counting colonies on plates [4].

The percentage of survival= colony forming units survive/colony forming units in sample control*100.

2.2.1.4. Adhesion to epithelial intestine

Culture medium was activated two times in 30 ml MRS broth, centrifuge 4000 rpm/minutes in 15 minutes and collected biomass washed two times in PBS buffer solution (pH 6.5) then dissolved again in 4 ml PBS buffer solution. Adhesion was performed during 5 hours. In zero hour, samples were vortex 10 seconds, took 0.1 ml samples dissolved in 3.9 ml buffer solution and measured OD at 600 nm. At 1, 3, 5 hour, took 0.1 ml samples dissolved in 3.9 ml buffer solution and measured OD at 600 nm [5].

The percentage of adhesion=$(1-A_t/A_0)*100$

A_0: OD_{600} measured at 0 hour

A_t: OD_{600} measured at 1, 3, 5 hour

2.2.1.5. Evaluation of properties probiotic

Samples were cultured in MRS broth during 48 hours and incubated in 37^o C. Culture medium were collected by centrifuging, culture medium (suspension) were controlled in pH 6.5 by NaOH and sterilized by filter membrane. Suspension was spread within each well contained tested bacteria (*Escherichia coli A*TTC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* resist to methicillin (MRSA) and incubated in 37^0 C during 48 hours. The antimicrobial activity was assessed by measuring the clear zone that formed around each well [6].

2.2.2. Evaluating the inhibition of lactic strains (fermented food) with H.pylori

2.2.2.1. H.pylori growth inhibition

H.pylori was activated in pylori broth medium, then incubated for 72 h at 37^0C under microaerophilic conditions. *H.pylori* is dilluted to 10^6 and spread on the plates to count the colony. We caculate colony forming units (CFU/ml) *H.pylori* and colony forming units (CFU/ml) *H.pylori* in control sample is also determined. Then, we

caculate colony forming units (CFU/ml) *H.pylori* at 1%,2%,3%,4%,5% the volume of lactic strains over *H.pylori*.

x= colony forming units (CFU/ml) *H.pylori* (1%,2%,3%,4%,5%)/ colony forming units (CFU/ml) *H.pylori* in sample control (x is the rate of survive *H.pylori*)

The percentage of inhibition =100-x (x is the rate of survive *H.pylori*) [2].

2.2.2.2 Agar well diffusion method

Antibacterial activity was evaluated using the modified method described by Gavidson and Parish (1989), where antimicrobial activity was determined by measuring the clear zones formed around the 6 mm. The selecting lactic strain was cultured for 24h, a suspension was prepared, 80 µl was spread within each well contained *H.pylori*. After incubation for 72h at 37^0C under microaerophilic conditions, the antimicrobial activity was assessed by measuring the clear zone that formed around each disc. Control sample only contain *H.pylori* [2].

2.3. Determination of isolated strains

Isolated lactic strains were determined by 16SrRNA in Nam Khoa company HCM city

2.4. Data analyses

Data were processed by Excel and SPSS.

III. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1. *The results and name of isolated lactic strains*

A total 7 samples (breast milk) were provided by Hung Vuong hospital and mothers raising babies from 1 to 3 month, isolated 22 lactic strains from normal born (HV2, HV3, HV4, M1, M2, M3) and we did not isolate lactic strains from HV1 (operated born) after 1 day. The isolated lactic strains were selected based on colony morphology, cell morphology. 22 isolated lactic strains were suitable with *Lactobacillus* because they have rod shaped morphology and Gram +. The name an some characteristics of isolated lactic strains were showed in table 1.

Table 1. Name and phenotype characteristics of isolated strains from breast milk

Group	Sample	Strains	Gram	Morphology cell	Group	Sample	Strain	Gram	Morphology cell
1	HV2	HV2.1	(+)	Rod shape	11	M1	M1.1	(+)	Rod shape
2		HV2.2	(+)	Rod shape	12		M1.2	(+)	Rod shape
3		HV2.3	(+)	Rod shape	13		M1.3	(+)	Rod shape
4		HV2.4	(+)	Rod shape	14		M1.4	(+)	Rod shape
5	HV3	HV3.1	(+)	Rod shape	15	M2	M2.1	(+)	Rod shape
6		HV3.2	(+)	Rod shape	16		M2.2	(+)	Rod shape
7		HV3.3	(+)	Rod shape	17		M2.3	(+)	Rod shape
					18		M2.4	(+)	Rod shape
8	HV4	HV4.1	(+)	Rod shape	19	M3	M3.1	(+)	Rod shape
9		HV4.2	(+)	Rod shape	20		M3.2	(+)	Rod shape
10		HV4.3	(+)	Rod shape	21		M3.3	(+)	Rod shape
					22		M3.4	(+)	Rod shape

Lactic strains in breast milk were affected strongly by normal born or operated born, physiological disorder in operated born is heavier than normal born since lactic strains in breast milk are changed. In operated born, anesthetic affects to the production of milk in mothers; besides, antibiotics prevent infections after operated born also inhibit created milk hormones and lactic strains in breast milk. Babies in operated born do not have useful lactic strains, but they have harmful bacteria such as *Enterococcus* and *Klebsiella.* In contrast*;* babies in normal born have useful lactic strains such as *Lactobacillus acidophilus* [3].

3.2. Evaluation of probiotic strains

3.2.1. Tolerance to Acids

The colony forming units lactic strains at 0 hour in pH 2.5 had differences. Most colony forming units of isolated strains decreased after 3 hours. 12/22 isolated strains had ability exist in low pH well, the rate of survival were over 50%; besides, 7 strains had the rate of survival over 90% and the rate of survival of HV4.1 were 100%. According to Wenjun Liu (2020), *B. lactic* Probio-M8 and *L. rhamnosus* Probio-M9 have high rate of survival in pH 2.5 (97.25%, 78.33%). The result of tolerance to acids were showed in table 2.

Table 2. The rate of isolated strains at 3 hours in culture medium pH 2.5.

Group	Samples	The percent of living (%)	Group	Samples	The percent of living (%)
1	HV2.1	91,21	12	M1.2	94,53
2	HV2.2	95,61	13	M1.3	4,97
3	HV2.3	0,48	14	M1.4	0,94
4	HV2.4	3,29	15	M2.1	0,75
5	HV3.1	96,7	16	M2.2	96,63
6	HV3.2	72,8	17	M2.3	0,93
7	HV3.3	54,6	18	M2.4	0,81
8	HV4.1	100	19	M3.1	1,39
9	HV4.2	95,5	20	M3.2	75,75
10	HV4.3	67,8	21	M3.3	6,76
11	M1.1	3,64	22	M3.4	77,57

The isolated strains could not tolerance to acids, their rate of survival were very low (<10%). pH 2.5 is harsh condition with microorganism includes lactic strains. The reason is that pH 2.5 inhibits enzyme activities and biochemistry mechanisms in microorganism. Therefore, the percent of living is low or cannot exist in pH 2.5 [8].

3.2.2. Tolerance bile salt

We used SGJ culture medium added 0.3% bile salt to evaluate tolerance bile salt in isolated lactic strains. The reason is that 0.3% bile salt is normal concentration in human gut. After 3 hours, we evaluated the rate of survival isolated strains and results were showed in table 3. There were 8 over 22 isolated strains survived in bile salt medium (>50%) and SGJ medium. In addition; there were 3 over 8 strains survived 100% included HV2.2, HV4.1, M3.2. These results similar to the results of Ramos, Meltem Asan (2018) that performed in *Lactobacillus fermentum* isolated from breast milk.

14 strains (remaining strains) had low the rate of survival in SGJ added bile salt (<50%). In addition; 2 strains could not survive in medium added bile salt included M2.3, M3.1 (<10%). The colony forming units lactic strains decreased quickly after 3 hours; according to Wei Tang (2012), the colony form units lactic strains decreased a half after 3 hours.

Table 3.The percent of living lactic strains at 3 hours in SGJ medium added 0.3% bile salt

Group	Samples	Group	Samples	The percent of living (%)
1	HV2.1	12	M1.2	50,69
2	HV2.2	13	M1.3	32,81

3	HV2.3	14	M1.4	16,21
4	HV2.4	15	M2.1	32,14
5	HV3.1	16	M2.2	63,38
6	HV3.2	17	M2.3	9,26
7	HV3.3	18	M2.4	31,40
8	HV4.1	19	M3.1	4,49
9	HV4.2	20	M3.2	100
10	HV4.3	21	M3.3	24,27
11	M1.1	22	M3.4	12,02

3.2.3. Adhesion to epithelium intestine

Adhesion to epithelium intestine helps lactic strains survive and develop well in digest system. In addition; adhesion helps to prevent harmful bacteria attack digest system. The adhesion of isolated strains were showed in table 4.

According to Rajoka (2017), isolated strains have ability adhere to epithelium intestine well after 5 hours (>40%). HV4.1 strain had the best adhesion after 5 hours (96.2%). M3.1 strain had the lowest adhesion after 5 hours (55.9%). According to Rajoka (2017), adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from breast milk over 30%, all isolated strains were high adhesion after 24 hours (>50%). [7].

Table 4. Adhesion of isolated lactic strains

Group	Samples	The percent of adhesion (%)		
		1 hour	3 hours	5 hours
1	HV2.1	12.3	45.6	75.2
2	HV2.2	13.1	41.5	80.5
3	HV2.3	10.5	39.5	69.6
4	HV2.4	14.2	44.5	84.9
5	HV3.1	12.5	42.9	90.6
6	HV3.2	12.1	42.1	87.3
7	HV3.3	11.5	51.4	81.9
8	HV4.1	14.2	58.5	96.2
9	HV4.2	12.8	51.8	91.7
10	HV4.3	14.1	54.0	94.0
11	M1.1	13.5	47.8	87.7
12	M1.2	12.2	52.0	82.9
13	M1.3	12.5	52.1	82.2
14	M1.4	12.1	59.1	96.1
15	M2.1	11.5	51.4	91.8
16	M2.2	13.5	43.9	73.0
17	M2.3	12.4	42.7	62.8
18	M2.4	13.1	45.6	65.0
19	M3.1	13.5	42.6	55.9
20	M3.2	12.2	42.5	62.2
21	M3.3	10.6	40.8	60.2
22	M3.4	14.2	44.6	64.1

After evaluating probiotic activities such as surviving in harsh conditions in digest system, adhering of lactic strains. We continue to evaluate probiotic properties in isolated lactic strains.

3.3. Antimicrobial and antibiotic susceptible activity

Lactic strains move from stomach to small intestine, lactic strains express their probiotic properties such as resisting to harmful bacteria. We evaluated antimicrobial activity in 22 isolated strains with two tested bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia coli* ATCC 25922), antibiotic susceptible activity with tested bacteria *Staphylococcus aureus* (MRSA). Lactic strains inhibit harmful bacteria cause gut disease by producing organic acids decrease pH and antimicrobial substances. Isolated strains have high antimicrobial activity when they have large clear zone.

Antimicrobial activity was evaluated by using Agar well diffusion method, where antimicrobial activity was determined by measuring the clear zone . After 16 hours, the clear zone was formed around each disc, the result was showed in table 5.

The result showed that isolated strains have ability resist three tested bacteria. Most isolated strains have average resistance to *S.aureus*, the clear zone was from 3-14 mm. This result similar to Parisa Shokryzdan's research (2014), *L.acidophilus* and *L.fermentum* resisted to *S.aureus*, the clear zone were 6.7 mm and 14,5 mm.

The isolated lactic strains had average resistance to MRSA and *E.coli*, the clear zone MRSA were from 7.6-12.5 mm, the clear zone *E.coli* were from 8.3 to 12.3 mm. The result similar to Ashraf's research (2014), the clear zone diameter of *L.salivarius*, *L.acidophilus* with *E.coli were* 6.8 mm and 8 mm.

Table 5. The result of anti bacteria activity

Samples	*S.aureus* ATCC 29213		MRSA		*E.coli* ATCC 25922	
	The clear zone (mm)	Sensitive	The clear zone (mm)	Sensitive	The clear zone (mm)	Sensitive
HV2.1	6,0	(**)	10,1	(**)	9,4	(**)
HV2.2	5,0	(*)	10,5	(**)	10,1	(**)
HV2.3	3,0	(*)	12,5	(**)	12,3	(**)
HV2.4	6,0	(**)	10,3	(**)	9,2	(**)
HV3.1	5,8	(*)	7,6	(**)	9,8	(**)
HV3.2	9,6	(**)	9,1	(**)	8,6	(**)
HV3.3	10,5	(**)	10,2	(**)	10,8	(**)
HV4.1	12,4	(**)	11,5	(**)	11,9	(**)
HV4.2	12,1	(**)	11,8	(**)	11,1	(**)
HV4.3	11,5	(**)	10,9	(**)	11,6	(**)
M1.1	5,0	(*)	10,4	(**)	9,3	(**)
M1.2	5.0	(*)	12,4	(**)	11,1	(**)
M1.3	10,0	(**)	11,5	(**)	10,2	(**)
M1.4	9,0	(**)	9,0	(**)	9,2	(**)
M2.1	10,0	(**)	10,8	(**)	10,1	(**)
M2.2	5,0	(*)	10,5	(**)	10,2	(**)
M2.3	13,0	(**)	10,9	(**)	12,3	(**)
M2.4	10,0	(**)	11,0	(**)	10,3	(**)
M3.1	4,0	(*)	10,1	(**)	8,8	(**)
M3.2	14,0	(**)	9,5	(**)	8,5	(**)
M3.3	12,0	(**)	11,6	(**)	8,3	(**)
M3.4	8,0	(**)	9,0	(**)	9,2	(**)

S.aureus resist to methicillin (MRSA) and cause infection in the hospital. According to Hanna Sikorska, *L. reuteri* and *L. rhamnosus* GG resist to *S.aureus*; besides, *L.acidophilus* also inhibit the growth of *S.aureus* (MRSA) by creating biofilm.
The resistance of M 3.2 strain with *S.aureus* were the strongest antibacterial activity (diameter = 14 mm), the resistance of HV 2.3 with MRSA were the strongest (diameter = 12.5 mm). M 3.2 and HV 2.3 strains resist to *Ecoli* well (diameter = 12.3 mm).

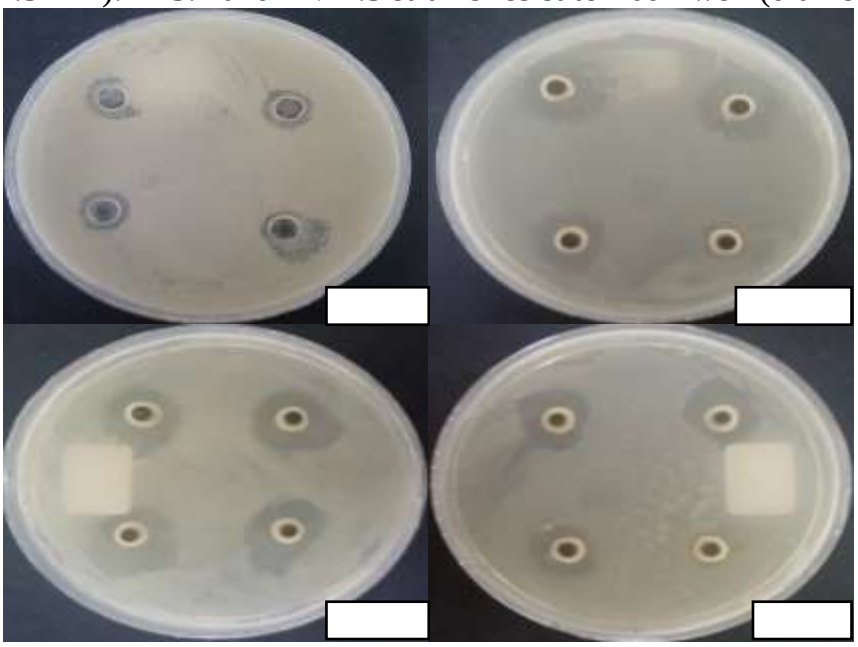


Figure 1. The picture of isolated strains resist to S.aureus

3.4. Estimating the inhibition of lactic strains from fermented food with *H.pylori*

After isolating 20 lactic strains from fermented food, estimate the inhibition of 20 lactic strains with *H.pylori.* Then, we selected lactic strain which has the biggest rate of inhibition *H.pylori*.

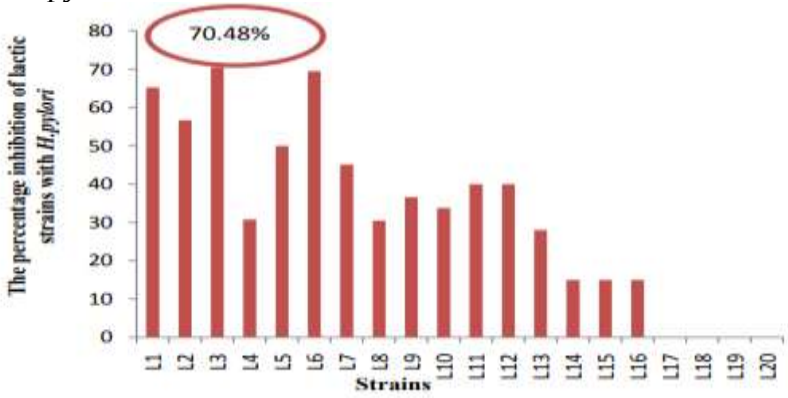


Figure 2. The percent inhibition of lactic strains from fermented food with *H.pylori*

According to figure 2, 16 lactic strains (L1-L16) inhibite *H.pylori*, 4 lactic strains (L17-L20) can not inhibite *H.pylori.* L3 has the biggest percentage inhibition of lactic strain with *H.pylori* (70.48%). According to the previous studies, lactic strains also inhibite *H.pylori*, the percentage inbition of lactic strains with *H.pylori* is 72.46% and these results are similar to the result in this thesis. Lactic strains produce acid lactic, acid acetic or bacteriocins. These organic compounds prevent *H.pylori* to release urease in stomarch. Therefore, H.pylori can not neutrolize acid in the stomarch, so *H.pylori* is killed in the stomarch.

3.5. Agar well diffusion method

After selecting lactic strain (L3) has the biggest percentage of inhibition H.pylori (70.48%). Then, the inhibition of lactic strain (L3) with *H.pylor*i is tested by agar well diffusion method. The result is showed in figure 3.

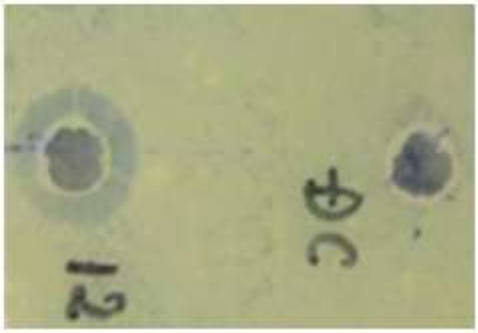


Figure 3.The inhibition of lactic strain (L3) with *H.pylori*

Therefore; both culture-spread on plates and agar well diffusion method show that lactic strain (L3) inhibite H.pylori. In contrast, control sample does not inhibite *H.pylori.*

IV. CONCLUSION

22 probiotic strains were isolated from 7 samples (breast milk), they were determined by kit AIP included *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevi*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus rhamnosus* và *Pediococcus lolii.* In addition*;* 8 over 22 isolated strains survived in harsh conditions such as stomach, bile salt. In summary; isolated strains resist to the bacteria well (diameter clear zone were form 6 mm-15 mm) and have adhesive activities that were very high. Besides; choosing a lactic strain from 10 strains isolated from fermented foods, 10 strains stored at Biotechnology Department and the selecting strain is determined *Lactobacillus plantarum* can inhibite *H.pylori* (the percentage inhibition of *L.plantarum* with *H.pylori* is 70.48%).

REFERENCES

1. Aiba, Y., N. Suzuki, A. M. Kabir, A. Takagi, and Y. Koga. 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus.*

2. Ahmed, F.E, 2003. *Gennetically modified probiotics in foods*. Trends Biotechnol, 21:491-497.
3. Bahremand S, Nematollahi LR, Fourutan H et al. (2006), "Evaluation of triple and quadruple *Helicobacter pylori* eradication therapies in Iranian children: a randomized clinical trial", Eur J Gastroenterol Hepatol. 18(5), pp. 511-514.
4. G Madhavi, M Shiva Prakash, G Sumalatha, KB Chathyushya, R Hemalatha, Archana Giri, M Alimelu, 2019. *Assessment of potentiality of bifidobacteria Animalis Subsp Lactic (HBM-NIN-06) isolated from huma breast milk and its use in the development of probiotic curd*. Internationak Journal of Food And Nutritional Sciences.
5. H.P. Ho, M.C. Adams, 2006. *Selection and identification of a novel probiotic strain of Lactobacillus fermentum isolated from Vietnamese fermented food*. Proceedings of the 20th Scientific Conference of Hanoi University of Technology.
6. Joseph Nordvist, 2013. *Bacteria In Breast Milk Identified*.

7. Meltem Asan and Ozusaglam, 2018. *Lactobacillus fermentum strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects.* Food Science and Biotechnology.
8. Parisa Shokryazdan, Chin Chin Sieo, Ramasamy Kalavathy, Juan Boo Liang, Noorjahan Banu Alitheen, Mohammad Faseleh Jahromi, 2014. *Probiotic Potential of Lactobacillus Strain with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains*. BioMed Research International
9. Quesia S. Damaceno, Jaqueline P. Souza, Jacques R. Nicoli, Raquel L. Paula, Gabriela B. Assis, Henrique C. Figueiredo, Vasco Azevedo and Flaviano S. Martins, 2017. *Evaluation of Potential Probiotics Isolated from Human Milk and Colostrum*.
10. Ted Jost, Christophe Lacroix, Christian Braegger and Christophe Chassard, 2013. *Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches*. Britisb Journal of Nutrition.

TÌM KIẾM PHÂN TỬ TIỀM NĂNG CHỐNG LẠI PROTEIN FtsZ CỦA STAPHYLOCOCCUS AUREUS KHÁNG METHICILLIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC ẢO DỰA TRÊN CẤU TRÚC VÀ MÔ PHỎNG ĐỘNG HỌC PHÂN TỬ

Lờ Anh Vũ[1], Nguyễn Thùy Hương[2]
[1,2] *Khoa Kỹ Thuật Hóa Học – Trường Đại học Bách Khoa TP. HCM*
Tác giả liên lạc: lavu68@gmail.com

TÓM TẮT

Staphylococcus aureus kháng methicillin (MRSA) được coi là biến thể Staphylococcus gây tử vong cao nhất và nó ảnh hưởng đến cả các cơ sở y tế và trong cộng đồng. Sự gia tăng kháng thuốc đối với MRSA đã được báo cáo trong vùng lưu hành. Để kiểm soát sự lây nhiễm MRSA, cần thiết phải phát triển các phân tử chống tụ cầu mới có hiệu quả cao và độc tính không đáng kể. Các chương trình có sự hỗ trợ của máy tính như docking phân tử, ước tính năng lượng liên kết tự do, dự đoán ADMET và mô phỏng động lực phân tử có thể được sử dụng để khảo sát các phân tử kháng tụ cầu mới trong thời gian ngắn. Trong nghiên cứu này, sử dụng cấu trúc protein FtsZ làm mục tiêu cho việc sàng lọc và docking phân tử dựa trên cấu trúc, nghiên cứu đã xác định bốn phân tử tiềm năng tương tác với vị trí hoạt động của FtsZ. Trong số bốn phân tử này, ZINC60292288 [[[(2S, 3S, 4R, 5R) -5- (2-amino-6-oxo-3H-purin-9-yl) -3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl] methoxy-hydroxy- cho thấy kết quả tương tác tối ưu nhất thông qua mô phỏng động học phân tử. Nghiên cứu tính toán cho thấy phân tử ZINC60292288 có thể được sử dụng như một ứng viên thuốc tiềm năng và thích hợp để thực hiện những thử nghiệm sâu hơn nhằm phát triển phân tử điều trị các vấn đề gây ra bởi MRSA.

Từ khóa: docking phân tử; mô phỏng động học phân tử; MRSA; mục tiêu thuốc; phân tử tiềm năng; sàng lọc ảo in silico.

IDENTIFICATION OF POTENTIAL MOLECULE AGAINST THE FtsZ METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY STRUCTURE BASED VIRTUAL SCREENING AND MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION

Le Anh Vu[1], Nguyen Thuy Hương[2]
[1,2] *Faculty of Chemistry Egineering – HoChiMinh University of Technology*
* Corresponding Author: lavu68@gmail.com

ABSTRACT

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is considered the most fatal form of Staphylococcus and it affects in both medical facilities and communities. Increasing drug resistant for MRSA has been reported in the endemic region. To control the MRSA, it is necessary to develop new antistaphylococcal compounds with high efficacy and negligible toxicity. Computer aided programs such as molecule docking, binding free energy estimation, ADMET prediction and molecular dynamics simulation can be used to investigate novel antistaphylococcal molecules in shorter duration. In this research, using FtsZ protein structure as a target for a structure based virtual screening and molecular docking, the research identified four potential molecules interacting with FtsZ active site. Of these four molecules, ZINC60292288 [[[(2S,3S,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-3H-purin-9-yl)-3,4-dihydroxy-tetrahydrofuran-2-yl]methoxy-hydroxy- shows the most optimal interaction results through molecular dynamic simulation. The presented drug discovery based on computational study

confirms that ZINC60292288 molecule can be used as a potential drug candidate and warrants further experimental investigation to fight against MRSA.
Keywords: antibacterial compounds; drug targets; in silico virtual screening; molecular docking; molecular dynamic simulation; MRSA.

TỔNG QUAN

Trong nghiên cứu được báo cáo bởi Vu et al. (2018), các tác giả đã sàng lọc *in silico* được hai protein mục tiêu thuốc tốt nhất ở 15 chủng vi khuẩn MRSA được khảo sát, bao gồm NarG và FtsZ. Vì protein FtsZ rất cần thiết cho sự phân chia tế bào vi khuẩn MRSA và là mục tiêu lý tưởng cho các loại thuốc chống khuẩn mới. Gần đây protein này đã trở thành mục tiêu mới trong việc phát triển các chất kháng khuẩn mới. Do tính mới của nó như là một mục tiêu thuốc, các hợp chất nhắm mục tiêu FtsZ sẽ không bị ảnh hưởng bởi các cơ chế kháng thuốc hiện tại. Hiện nay, có nhiều hợp chất được đánh giá là chất ức chế protein FtsZ, bao gồm cả các phân tử nhỏ tổng hợp (ví dụ: PC190723), polypeptide và chất ức chế có nguồn gốc tự nhiên, cũng như các chất ức chế acid nucleic biểu hiện gen *ftsZ* (Matsui et al., 2012). Nghiên cứu hiện tại được thực hiện để sàng lọc các chất ức chế FtsZ tiềm năng và đánh giá phân tử tiềm năng tốt nhất bằng các công cụ *in silico*. Để đạt được mục tiêu trên, đề tài đã sử dụng phương pháp sàng lọc ảo dựa trên cấu trúc nhắm mục tiêu vào vị trí hoạt tính của protein FtsZ, theo sau đó là các nghiên cứu về docking phân tử và động học phân tử.

PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Quy trình sàng lọc chi tiết một số cơ sở dữ liệu phân tử phổ biến nhằm xác định các phối tử tiềm năng hướng mục tiêu liên kết protein FtsZ được mô tả như trong Hình 1.

Chuẩn bị mô hình protein FtsZ

Cấu trúc tinh thể tia X protein FtsZ của *Staphylococcus aureus* (chủng MRSA 252) trong phức hợp không gian ba chiều (3D) với phối tử tự nhiên GDP (UniProtKB ID: Q6GHP9) đã được trích xuất từ CSDL UniProtKB. Phương pháp chuẩn bị mô hình protein cho nghiên cứu docking được thực hiện theo "Trình Hướng Dẫn Chuẩn Bị Protein Tự Động" theo mô tả của Sastry et al. (2013).

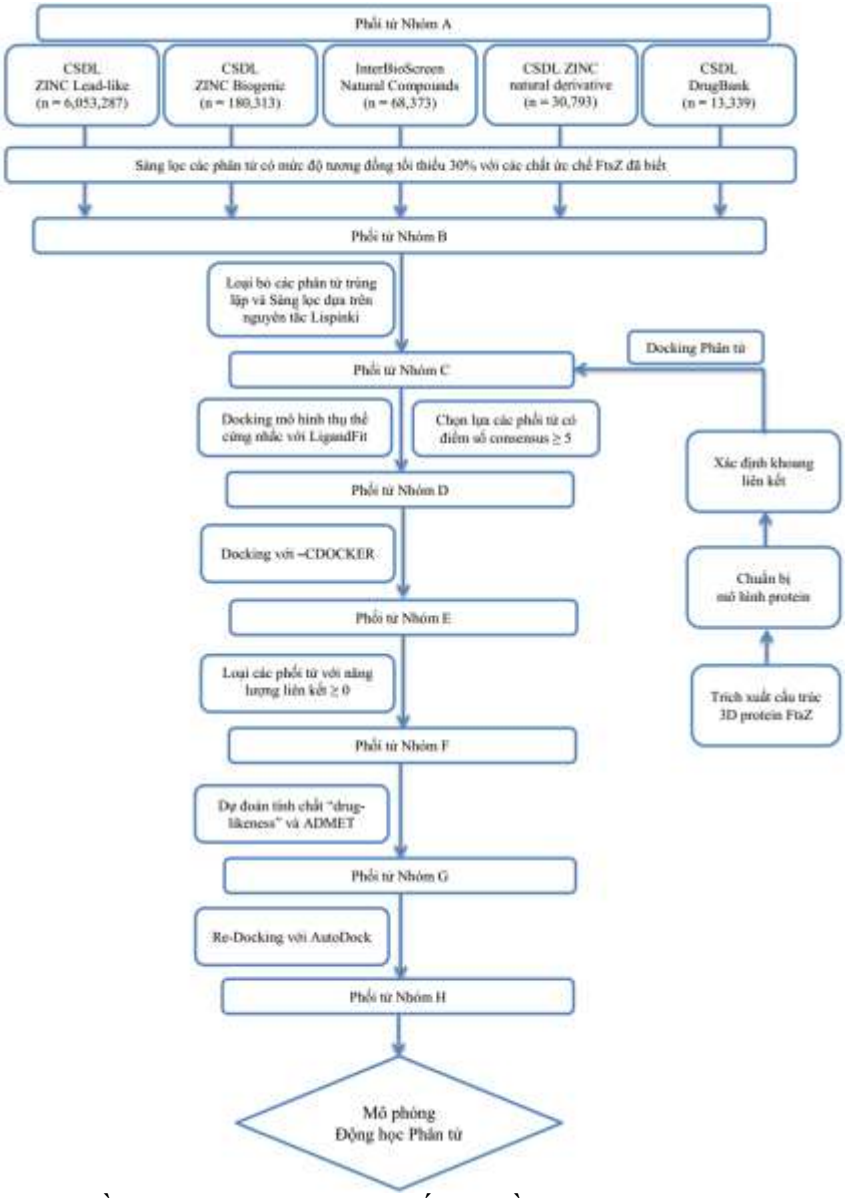
Chuẩn bị cơ sở dữ liệu phối tử

Sử dụng chức năng "Molecular Similarity of Chemicals based on FingerPrints" của chương trình ChemDes, các hợp chất có ít nhất 30% cấu trúc tương tự với các chất ức chế FtsZ đã biết được xác định trong năm cơ sở dữ liệu hợp chất hóa học (Phối tử nhóm A) (Hình 1). Các chất ức chế FtsZ được sử dụng cho tìm kiếm này thuộc về hai nhóm, nhóm các sản phẩm tự nhiên và nhóm các phân tử tổng hợp (Haranahalli et al., 2016). Các chất có cấu trúc tương tự chất ức chế FtsZ đã biết được xác định (Phối tử nhóm B), sau đó được sàng lọc cấu trúc trùng lặp. Ngoài ra, các cấu trúc không phù hợp theo quy tắc "Lipinski's rule of five" (Lipinski, 2004) cũng bị loại bỏ để xây dựng cơ sở dữ liệu cho các chất ức chế tiềm năng của FtsZ (Phối tử nhóm C).

Sàng lọc ảo dựa trên cấu trúc

Sàng lọc ảo hiệu năng cao được thực hiện bằng cách sử dụng chức năng docking thụ thể cứng nhắc LigandFit được triển khai trong chương trình BIOVIA Discovery Studio 2019 để sàng lọc nhanh chóng và hiệu quả các hợp chất trong Phối tử nhóm C. Các phối tử có điểm đồng thuận ≥ 5 đã được chọn (Phối tử nhóm D) làm đầu vào cho việc docking bằng CDOCKER, một thuật toán docking động lực phân tử dựa trên khung lưới sử dụng trường lực CHARMM; cài đặt mặc định của phần mềm đã được sử dụng trong quá trình này. Các phối tử có điểm năng lượng -CDOCKER tốt hơn

ngưỡng này (Phối tử nhóm E) được tính toán năng lượng tự do liên kết trung bình của thụ thể phối tử, ước tính mức độ của một phối tử liên kết với thụ thể, sử dụng giao thức "Calculate Binding Energies" của chương trình Accelrys DS 2.0 (Venkatachalam et al., 2003). Điểm năng lượng liên kết âm cho thấy ràng buộc mạnh hơn và điểm năng lượng liên kết dương cho thấy ràng buộc không thuận lợi. Vì vậy, các phối tử có giá trị liên kết dương bị loại bỏ và các phối tử còn lại (Phối tử nhóm F) được chọn để phân tích thêm.



Hình 1. Sơ đồ quy trình sàng lọc phối tử tiềm năng.

Phân tích đặc tính "drug-likeness" và ADMET

Các đặc tính hấp thu, phân phối, chuyển hóa, bài tiết và độc tính (ADMET) chiếm gần 60% thất bại của các thuốc bước vào giai đoạn lâm sàng. Do đó, các tính chất này đóng một vai trò quan trọng trong quy trình thiết kế thuốc. Phối tử nhóm F đã được sử dụng máy chủ Molinspiration để đánh giá các đặc tính của chúng như mức độ "drug-likeness", logarit của hệ số phân chia octanol/nước (MiLogP) và diện tích bề mặt cực (topological polar surface area). Phối tử nhóm F cũng được nhập vào máy chủ admetSAR để đánh giá các thuộc tính ADMET của chúng.

Phân tích Re-Docking

Tất cả phối tử sau khi đã được kiểm tra tính chất "drug-likeness" và ADMET (Phối tử nhóm G) và hợp chất tham chiếu PC190723 đã được re-docking bởi Autodock Vina. Giới hạn bốn mươi cấu hình liên kết đã được tạo ra cho mỗi phối tử. Các kết quả được phân cụm theo các giá trị RMSD và được xếp hạng theo năng lượng liên kết tự do.

Mô phỏng động học phân tử

Nghiên cứu mô phỏng động lực học phân tử được thực hiện với hệ thống máy tính sử dụng GROMACS 4.6.5 như được mô tả bởi Abraham et al., 2015. Những phối tử sau khi qua phân tích re-docking (Phối tử nhóm H) đã được sử dụng trong khoảng thời gian 40 giây của nghiên cứu mô phỏng. Ngoài ra, một hệ thống mô phỏng khác cũng được tạo ra để dự đoán tính ổn định của cấu trúc protein apo-FtsZ tự nhiên. Quỹ đạo được phân tích bằng động lực phân tử trực quan và Chimera 1.10.2. Cuối cùng, Origin 6.0 được sử dụng để tạo và biểu diễn các đồ thị.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định các phối tử tiềm năng mà hướng mục tiêu liên kết với protein FtsZ ở vi khuẩn MRSA. Bằng cách sử dụng phương pháp tiếp cận sàng lọc ảo dựa trên cấu trúc, các phối tử được phân loại và xác định theo các tiêu chí đã lựa chọn. Bảng 1 mô tả số lượng các protein đầu ra được sàng lọc ở mỗi bước.

Bảng 5. Kết quả sàng lọc in silico phối tử tiềm năng ức chế protein FtsZ.

Các bước sàng lọc	Số lượng phối tử tìm được	Kí hiệu
Phối tử từ các CSDL	ZINC Lead-like (6,053,287) + ZINC Biogenic (180,313) + InterBioScreen (68,373) + ZINC natural derivative (30,793) + DrugBank (13,339)	(Phối tử Nhóm A)
Phối tử >30% mức độ tương đồng với các chất ức chế FtsZ đã biết	ZINC Lead-like (2130) + ZINC Biogenic (568) + InterBioScreen (847) + ZINC natural derivative (63) + DrugBank (8)	(Phối tử Nhóm B)
Phối tử không trùng lặp và thỏa mản nguyên tắc Lispinki's rule of five	2700	(Phối tử Nhóm C)
Phối tử sau khi thực hiện sàng lọc với LigandFit	341	(Phối tử Nhóm D)
Phối tử sau khi thực hiện sàng lọc với -CDOCKER	22	(Phối tử Nhóm E)
Phối tử với năng lượng liên kết ≤ 0	17	(Phối tử Nhóm F)
Phối tử sau khi phân tích tính chất "drug-likeness" và ADMET	8	(Phối tử Nhóm G)
Phối tử sau khi docking với AutoDock Vina	4	(Phối tử Nhóm H)
Phối tử được chọn cho nghiên cứu mô phỏng động học phân tử	4	

Chuẩn bị cấu trúc 3D protein FtsZ

Cấu trúc tinh thể của protein FtsZ với độ phân giải 3,3Å đã được trích xuất từ UniProtKB. FtsZ là một homodimer dài 390 acid amin với hai phối tử GDP tự nhiên và 2 cofactor Mg^{2+}. Vì tinh thể protein thiếu liên kết hydro và chỉ chứa các nguyên tử nặng, phân tử nước và một số phân tử kết tinh khác như dị hợp tử, phối tử và cofactor. Trong nghiên cứu hiện tại, protein FtsZ đã được chuẩn bị bằng cách xóa các phân tử nước và phối tử tự nhiên của enzyme, tuy nhiên, các phân tử nước và cofactor trong vị trí hoạt động đã được giữ lại. Với cấu trúc này, các liên kết hydro đã được thêm vào và protein được giảm thiểu năng lượng với năng lượng tiềm năng cuối cùng là -1404 Kcal/mol và năng lượng chính cuối cùng là -12336 Kcal/mol.

Việc tạo ra một khoang liên kết thích hợp trên bề mặt của protein đóng vai trò quan trọng trong docking vì nó giúp giới hạn việc tìm kiếm các cấu hình chỉ trong và xung quanh vị trí gắn kết. Chiến lược này tiết kiệm rất nhiều thời gian và cung cấp cấu hình tương tác phù hợp. Do đó, khung lưới phân tử đã chuẩn bị được tạo ra tại vị trí hoạt động với kích thước X = -27,2612Å, Y = -9.0991Å, Z = -0.7016Å. Các residue ở vị trí hoạt động là Glu139 (phân cực), Arg143 (tích điện dương) và Asp185 (tích điện âm). Các acid amin này được chọn vì chúng có khả năng tham gia vào các liên kết hydro vì bản chất tích điện và cực của các nhóm R. Khung lưới được đặt ở trung tâm của vị trí hoạt động, cho phép các phối tử có kích thước 20Å để neo, với khoảng cách lưới là 0,5Å.

Sàng lọc cơ sở dữ liệu phối tử

Sàng lọc năm cơ sở dữ liệu hợp chất hóa học (Phối tử nhóm A) đã xác định được 3616 hợp chất (Phối tử nhóm B) với độ tương đồng cấu trúc ≥30% so với các chất ức chế FtsZ đã biết. Các hợp chất trùng lặp và hợp chất vi phạm quy tắc "Lipinski's rule of five" (n = 916) đã được loại bỏ. Sau đó, tập hợp các phối tử không trùng lặp và thỏa mãn quy tắc "Lipinski's rule of five" (Phối tử nhóm C, n = 2700) đã được thực hiện sàng lọc ảo hiệu năng cao dựa trên cấu trúc protein FtsZ đã chuẩn bị.

Sàng lọc ảo dựa trên cấu trúc và Docking phân tử

Sàng lọc ảo bằng cách docking thụ thể cứng nhắc LigandFit của Phối tử nhóm C (n = 2700) với khoang liên kết của FtsZ, đã xác định tổng cộng 341 phối tử (Phối tử nhóm D) có điểm đồng thuận là ≥ 5. Phối tử nhóm D và 21 chất ức chế FtsZ đã biết đã được docking vào vị trí hoạt động của FtsZ. Các phối tử được xếp hạng theo năng lượng -CDOCKER. Năng lượng -CDOCKER của phối tử PC190723 là cao nhất và được coi là giá trị giới hạn. Trong số 341 hợp chất, 22 hợp chất cho thấy năng lượng -CDOCKER tốt hơn so với mức giới hạn này. Năm phối tử, cụ thể là INC265489, DBA99233, ZINC03010433, INC98649 và ZINC00518460, có năng lượng liên kết trung bình > 0 và do đó bị loại trừ (Bảng 2). Các phối tử còn lại (Phối tử nhóm E, n = 17) đã được sử dụng để phân tích thêm.

Bảng 2: Kết quả docking bằng -CDOCKER của các phối tử tiềm năng và phân tử tham chiếu PC190723. ZBC: Zinc Biogenic Compound; INC: InterBioScreen Natural Compounds; DBA: DrugBank.

Thông tin phối tử			Năng lượng -CDOCKER (Kcal/mol)	Năng lượng liên kết trung bình (kcal/mol)
STT	Ligand ID	Source		
1	ZINC60292288	ZBC	64.42	−57.78
2	87854	INC	62.96	-8.82
3	639696	INC	57.67	-4.38
4	524136	INC	57.53	-46.78

5	ZINC1306071	ZBC	56.72	-76.46
6	408925	INC	56.04	-10.14
7	379420	INC	55.77	-48.18
8	524121	INC	55.60	-54.66
9	ZINC2111081	ZBC	55.39	-66.89
10	408926	INC	54.91	-24.26
11	265489	INC	54.59	1008.53
12	99233	DBA	53.53	1839.84
13	444719	DBA	53.15	86.67
14	ZINC03010433	ZND	52.97	311.614
15	322477	INC	52.93	-33.73
16	ZINC31166374	ZBC	52.25	-49.19
17	98649	INC	52.00	3735.70
18	ZINC04097194	ZBC	51.93	-100.58
19	ZINC00518462	ZBC	51.37	-63.13
20	ZINC00518460	ZBC	50.69	264.94
21	83890	DBA	49.89	-42.12
22	PC190723	DBA	49.00	-57.85

Phân tích in silico đặc tính "drug-likeness" và ADMET

Tính chất "drug-likeness" được sử dụng rộng rãi để tối ưu hóa phối tử tiềm năng trong khám phá thuốc. Phối tử nhóm E (n = 17) đã được đưa vào máy chủ Molinspiration để phân tích tính chất "drug-likeness". Ba hợp chất, bao gồm INC87854, ZINC31166374 và ZINC0409719 cho thấy diện tích bề mặt cực >150 $Å^2$, cho thấy khả dụng sinh học thấp của chúng (Martin, 2005). Ngoài ra, không có phối tử nào vi phạm quy tắc Lipinski's rule of five, như được sàng lọc trước đó. Trong đánh giá *in silico* sơ bộ về các đặc tính của ADMET cho thấy ba hợp chất, ZINC1306071, ZINC2111081 và ZINC04097194 có sự thâm nhập kém vào hàng rào máu não và khả năng hấp thụ kém. Bảy trong số 17 chất ức chế FtsZ tiềm năng dự đoán, bao gồm INC87854, ZINC1306071, INC379420, ZINC2111081, INC322477, ZINC00518462 và ZINC04097194 được dự đoán là chất nền cho P-glycoprotein; các hợp chất này có khả năng được vận chuyển tích cực bởi P-glycoprotein, dẫn đến hiện tượng "drug-efflux", và do đó sẽ làm giảm sinh khả dụng. Hợp chất INC87854 được dự đoán sẽ ức chế cytochrom P450 isoform 3A4, bên cạnh các hợp chất ZINC2111081 và ZINC04097194 được dự đoán là cơ chất cho cytochrom P450 isoform 3A4; do đó, các hợp chất này có thể dẫn đến tương tác thuốc của thuốc do không chuyển hóa được thuốc và có thể là sự tích lũy thuốc (Lynch and Price, 2007). Bên cạnh đó, 17 chất ức chế tiềm năng này cũng được dự đoán là không độc hại đối với con người. Tổng hợp các yếu tố dự đoán ở trên, 8 chất ức chế FtsZ tiềm năng đã được cho phân tích tiếp theo (Phối tử nhóm F; Bảng 3).

Bảng 3: Tám phối tử tiềm năng (Phối tử nhóm F) được xác định qua quá trình sàng lọc tính chất dược động học.

STT	Ligand ID	Nguồn	Dự đoán kiểu tương tác		
			Liên kết hydro	Tĩnh điện	Kỵ nước
1	ZINC60292288	ZBC	Thr576, Ser578, Ser394, Ser449, Asn451, Lys575,	Lys397	Gln580 Val432

			Ser623, Gly393, Leu488, Thr561, Gly577, Ser622		
2	639696	INC	Ser578, Ser394, Asn451 Leu488, Ser623	Lys397	
3	524136	INC	Thr621, Ser578, Ser394 Gly577	Lys397	Val432
4	408925	INC	Ser394, Ser578, Ser449 Thr621, Gly577		Val432, Leu488
5	524121	INC	Ser578, Leu488, Ser394 Asn451, Gly577	Lys397 Lys575	Val432
6	408926	INC	Ser394, Lys575, Ser578 Thr621, Ser449, Gly577		Val432, Leu488
7	444719	DBA	Asn448, Ser394, Ser578 Asn431		Val432
8	83890	DBA	Ser578, Thr621, Ser394 Ser449, Gly577	Lys397	Leu488

Phân tích Re-Docking

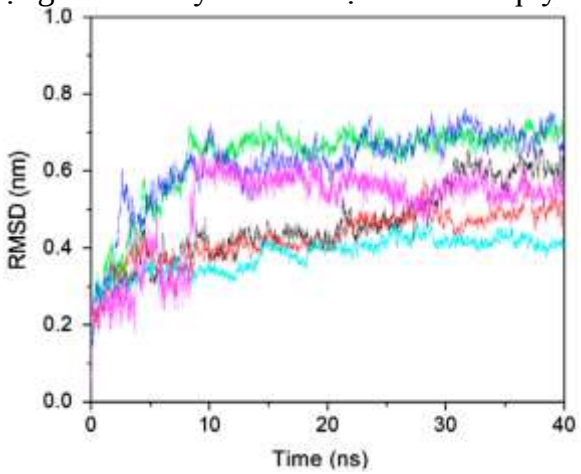
Từ sàng lọc ảo hiệu năng cao, dự đoán tính chất "drug-likeness" và ADMET, 8 hợp chất ức chế tiềm năng của FtsZ được chọn. Quá trình re-docking các hợp chất trên đã được thực hiện để dự đoán kết quả cụ thể hơn. Do đó, tất cả 8 phối tử này đã được docking lại trong cùng một khoang liên kết đã được tạo trong quá trình sàng lọc ảo ban đầu bằng Autodock để dự đoán năng lượng liên kết và phân tích phức hợp docking chính xác nhất. Hợp chất tham chiếu PC190723 cho thấy năng lượng liên kết là −3.88 kcal/mol. Từ Autodock, bốn hợp chất hàng đầu là INC524136, INC524121, DBA83890 và ZINC60292288 với năng lượng liên kết thấp hơn hợp chất tham chiếu lần lượt là −7,41, −7,21, −6,94 và −6,91 kcal/mol. Trong tất cả các hợp chất này, Trp93, Asp108, Ser191, Gly192, His193, Arg228 và His352 được tìm thấy có vai trò chính trong liên kết phối tử - protein. Những residue này đã có mặt trong tất cả 10 hợp chất được re-docking. Từ kết quả của sàng lọc ảo và kết quả re-docking, chúng tôi đã dự đoán rằng tất cả các hợp chất tương tác với FtsZ đều bị ràng buộc vào cùng một khoang. Cuối cùng, từ những kết quả này, chúng tôi đã chọn bốn hợp chất INC524136, INC524121, DBA83890 và ZINC60292288 để phân tích thêm bằng mô phỏng động lực phân tử (MDS).

Mô phỏng động học phân tử (MDS)

MDS đã được thực hiện để tìm hiểu chi tiết cấu trúc, hành vi hình dạng và tính ổn định của các phức hợp phối tử - protein mục tiêu. Tất cả các MDS phụ thuộc thời gian nguyên tử bao gồm một tính toán trường lực mạnh cho từng nguyên tử trong một hệ thống, sau đó là bước tích hợp, giúp nâng cao vị trí và tính chất động của các nguyên tử theo quy luật chuyển động cổ điển. MDS cho phép làm sáng tỏ các tính năng cấp nguyên tử của các quá trình phân tử sinh học bao gồm phân tích độ ổn định của các phức chất phối tử protein. Phân tích độ ổn định của protein tự nhiên (apo-FtsZ) và các phức hợp protein – phối tử (FtsZ-INC524136, FtsZ-INC524121, FtsZ- DBA83890, FtsZ-ZINC60292288, FtsZ-PC190723) được thực hiện bằng cách bao quanh chúng vào một hộp hình khối với nhiệt độ được duy trì ở mức 300 K. Các phân tích tính toán khác nhau đã được thực hiện để đánh giá tính ổn định của các hệ thống.

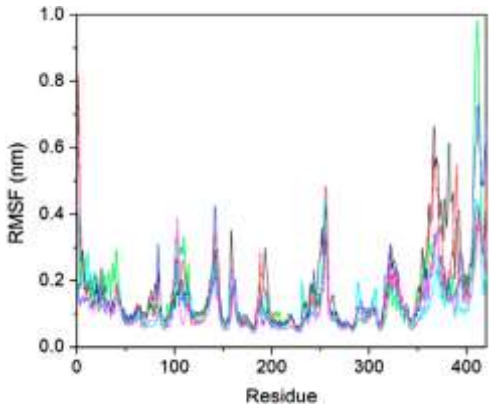
RMSD (Root-mean-square deviation of atomic positions) được sử dụng để đo sự khác biệt giữa xương sống của protein từ cấu trúc ban đầu đến vị trí cuối cùng của nó. Độ ổn định của protein liên quan đến cấu tạo của nó có thể được xác định bởi độ lệch

được tạo ra trong quá trình mô phỏng. Độ lệch nhỏ hơn cho thấy cấu trúc protein ổn định hơn. Giá trị RMSD cho đường trục Cα đã được tính toán cho mô phỏng 40 ns để đánh giá tính ổn định của tất cả các hệ thống. Hình 2 cho thấy đồ thị của RMSD (nm) so với thời gian (ns) cho apo-FtsZ và bốn phức hợp phối tử với FtsZ (INC524136, INC524121, DBA83890 và ZINC60292288). Các giá trị RMSD trung bình cho apo-FtsZ, FtsZ-PC190723, FtsZ-INC524136, FtsZ-INC524121, FtsZ- ZINC60292288 và FtsZ-DBA83890 lần lượt là 0.46, 0.42, 0.62, 0.61, 0.38, và 0.50 nm. INC524136, INC524121 cho thấy giá trị RMSD cao hơn so với phức hợp apo-protein và các phối tử khác, trong khi ZINC60292288 cho thấy giá trị thấp nhất, khẳng định độ ổn định cao hơn các phức chất khác. Toàn bộ quỹ đạo đạt được trạng thái cân bằng sau 30 ns; do đó, RMSF và số lượng liên kết hydro đã được tính cho quỹ đạo 10 ns cuối cùng.



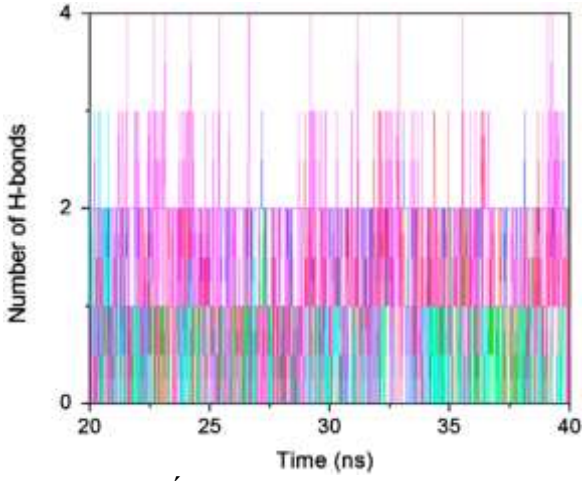
Hình 2: RMSD của nghiên cứu mô phỏng động lực phân tử. Các màu sắc chỉ ra - apo-FtsZ (đen), FtsZ-PC190723 (đỏ), FtsZ-INC524136 (xanh lá), FtsZ- INC524121 (xanh lơ), FtsZ- ZINC60292288 (tím), và DBA83890 (chàm).

Các phân tích về RMSF (root mean square fluctuations of aligned residues) cho các phức hệ phối tử - protein cung cấp thông tin về các vùng linh hoạt của các phức hợp. Trong protein, vòng lặp, vòng quay và cuộn cho thấy giá trị RMSF cao hơn so với cấu trúc xoắn ốc và tấm. Giá trị RMSF cao hơn biểu thị các vòng lặp hoặc đầu cuối được tổ chức lỏng lẻo và giá trị RMSF thấp chỉ ra các vùng có cấu trúc tốt. Hình 3 cho thấy các sơ đồ RMSF cho apo-FtsZ và các phức hợp protein. Các giá trị RMSF trung bình cho apo-FtsZ, FtsZ-PC190723, FtsZ-INC524136, FtsZ-INC524121, FtsZ-ZINC60292288 và FtsZ-DBA83890 lần lượt là 0.17, 0.16, 0.14, 0.15, 0.12 và 0.12 nm. FtsZ-ZINC60292288 và FtsZ-DBA83890 cho thấy biến động RMSF ít hơn so với apo-FtsZ và hợp chất tham chiếu FtsZ-PC190723, điều này cho thấy rằng sự ràng buộc của phối tử dẫn đến giảm tính linh hoạt của residue xúc tác quan trọng, và do đó, các phân tử này được dự đoán có khả năng ức chế hoạt động xúc tác của FtsZ. Do liên kết phối tử, giá trị dao động RMSF giảm ngoại trừ trong phức hợp với INC524136, INC524121. Kết quả cho thấy do liên kết của phối tử, biến động RMSF của residue xúc tác giảm, dẫn đến sự thay đổi về cấu tạo của protein và do đó, ức chế hoạt động của FtsZ.



Hình 3: RMSF của nghiên cứu mô phỏng động lực phân tử. Các màu sắc chỉ ra - apo-FtsZ (đen), FtsZ-PC190723 (đỏ), FtsZ-INC524136 (xanh lá), FtsZ-INC524121 (xanh lơ), FtsZ- ZINC60292288 (tím) và DBA83890 (chàm).

Số lượng liên kết hydro được tính cho quỹ đạo trong khoảng thời gian 10 ns cuối cùng của mô phỏng động học phân tử. Việc xem xét các đặc tính liên kết hydro trong thiết kế thuốc rất quan trọng vì ảnh hưởng mạnh mẽ của chúng đến tính đặc hiệu của thuốc, chuyển hóa và hấp phụ (Williams & Ladbury, 2008). Hình 4 cho thấy FtsZ-PC190723, FtsZ-INC524136, FtsZ-INC524121, FtsZ-ZINC60292288 và FtsZ-DBA83890 có trung bình lần lượt là hai, một, hai, bốn và ba liên kết hydro. Quỹ đạo 10 ns cuối cùng được sử dụng để xác định các residue acid amin quan trọng tương tác với các phối tử và phần trăm thời gian của mỗi liên kết hydro. Ser191 (59.24%), Trp93 (50.05%) và Thr347 (0.10%) là các residue chính tham gia vào tương tác liên kết hydro trong FtsZ-INC524121. Asp108 (0.30%), His352 (1.20%), Arg228 (2.00%) và Ser191 (0.40%) là các residue chính tham gia tương tác liên kết hydro trong FtsZ-ZINC60292288 trong khi Leu194 (1.60%), Asn313 (8.19 %), Thr347 (0.80%) và Ser317 (0.20%) là các residue chính tham gia vào tương tác liên kết hydro trong FtsZ-DBA83890. Gln94 (5.90%), Gly192 (5.00%) và một số residue xúc tác khác hình thành tương tác liên kết hydro trong FtsZ-INC524136, trong khi Asp108 (6.8%) và Ser191 (0.10%) là các residue chính tham gia vào liên kết hydro trong FtsZ-PC19073. Tất cả những kết quả này chỉ ra rằng ZINC60292288 hình thành phức hợp ổn định với FtsZ. Kết luận này cũng phù hợp với kết quả dự đoán thu được bằng phân tích docking, RMSD và RMSF.



Hình 4: Đánh giá số lượng liên kết hydro ở các phức hợp protein – phối tử bằng mô phỏng động học phân tử. Các màu sắc chỉ ra - apo-FtsZ (đen), FtsZ-PC190723 (đỏ), FtsZ-INC524136 (xanh lá), FtsZ-INC524121 (xanh lơ), FtsZ- ZINC60292288 (tím), and FtsZ- DBA83890 (chàm).

KẾT LUẬN

Các kết quả thu được từ nghiên cứu này sử dụng chuỗi các công cụ *in silico* đã sàng lọc được các phân tử INC524136, INC524121, DBA83890 và ZINC60292288 có tiềm năng để phát triển như các chất kháng MRSA nhắm vào mục tiêu protein FtsZ. Hơn nữa, đánh giá sơ bộ đặc tính dược động học của bốn hợp chất này đều cho thấy tính không độc hại và các tính chất "drug-likeness" của chúng. Ngoài ra, các ái lực liên kết của bốn hợp chất này cao hơn hợp chất tham chiếu PC19073 khi thực hiện mô phỏng động học phân tử, thể hiện chúng có nhiều tiềm năng sẽ liên kết chặt chẽ với khoang hoạt động của FtsZ. Trong số bốn hợp chất này, ZINC60292288 có nhiều khả năng ức chế FtsZ nhất và có thể được sử dụng cho các nghiên cứu sâu hơn về quá trình phát hiện thuốc chống lại MRSA. Trong tương lai, việc đánh giá *in vitro* và *in vivo* của các phân tử này sẽ có thể xác nhận hoạt tính kháng khuẩn của nó và sau đó có thể sử dụng để phát triển một hợp chất chống lại MRSA.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Bách khoa – Đại học Quốc gia TP. HCM trong khuôn khổ đề tài mã số TNCS-KTHH-2017-12.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

LÊ ANH VŨ, PHAN THỊ CẨM QUYÊN, NGUYỄN THÚY HƯƠNG (2018). Xác định mục tiêu thuốc giả định ở vi khuẩn Staphylococcus aureus kháng methicillin (MRSA) bằng các phương pháp tin học tính toán. Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2018, trang 612 – 618.

MATSUI, T., YAMANE, J., MOGI, N., YAMAGUCHI, H., TAKEMOTO, H., YAO, M., TANAKA, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from Staphylococcus aureus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 9) : 1175-88.

SASTRY, G.M., ADZHIGIREY, M., DAY, T., ANNABHIMOJU, R., SHERMAN, W. (2013). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. J *Comput Aided Mol Des* 27(3) : 221-34.

HARANAHALLI, K., TONG, S., OJIMA, I. (2016) Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ. *Bioorg Med Chem* 24(24) : 6354-6369.

LIPINSKI, C.A. (2004). Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Dis Today*: *Tech* 1(4) : 337-341.

VENKATACHALAM, C.M., JIANG, X., OLDFIELD, T., WALDMAN, M. (2003). LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model* 21(4) : 289-307.

ABRAHAM, M.A., MURTOLA, T., SCHULZ, R., PÁLL, S., SMITH, J.C., HESS, B., LINDAHL, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1(2) : 19-25.

LYNCH, T. AND PRICE, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 76(3) : 391-6 .

WILLIAMS, M.A. AND LADBURY, J.E. (2008). Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. In Protein Science Encyclopedia, A.R. Fersht (Ed.).

TRIỂN KHAI NGHIÊN CỨU VỚI TƯ DUY KHỞI NGHIỆP CÔNG NGHỆ: TỪ LÝ THUYẾT TỚI THỰC TIỄN

TS. Lưu Xuân Cường

Giám đốc Công ty Cổ phần Quốc tế AOTA

Trưởng khoa Dược – Mỹ phẩm và Thực phẩm – Trường Cao đẳng Công nghệ Cao Đồng An

Tác giả liên lạc: xuancuong.luu@gmail.com

TÓM TẮT

Làm sao để triển khai nghiên cứu một cách hiệu quả và kết quả nghiên cứu thật sự trở thành động lực trong việc tạo ra lợi thế cạnh tranh của sản phẩm/dịch vụ và của doanh nghiệp là một câu hỏi lớn ở nhiều nước. Điều này đặc biệt quan trọng cho nước đang phát triển như Việt Nam khi nguồn kinh phí nghiên cứu còn nhiều hạn chế và nền sản xuất phát triển chưa đồng đều và hạn chế về chiều sâu.

Trong bài viết này tác giả trình bày tham luận về cách tiếp cận triển khai nghiên cứu với tư duy khởi nghiệp công nghệ và cách thức triển khai nghiên cứu tương ứng dựa trên lý thuyết, quan sát và trải nghiệm của tác giả. Trong nội dung trình bày chúng tôi tập trung vào 3 nội dung chính: (1) *Khởi nghiệp công nghệ - một vài bài học rút ra từ silicon Valley*; (2) *Cách thức tiếp cận và triển khai nghiên cứu với tư duy khởi nghiệp công nghệ;* (3) *Một số nguyên tắc cho khởi nghiệp công nghệ*.

Trong nội dung 1 về "*Khởi nghiệp công nghệ - một vài bài học rút ra từ silicon Valley*" chúng tôi tập trung phân tích đến vai trò của "**tư duy thị trường**" trong nghiên cứu. Ví dụ chúng tôi phân tích cách thức để đẩy nhanh quá trình kiểm tra sự tương thích của sản phẩm với thị trường tạo thêm thông tin cho nghiên cứu và dòng tiền để phát triển nghiên cứu. Điều này đặc biệt quan trọng trong khi nhà nghiên cứu "truyền thống" mặc định trong rằng đó là công việc của các nhà kinh tế, doanh nghiệp (tức là của người khác), khiến cho sự phù hợp của nghiên cứu và thị trường rất hạn chế.

Trong nội dung 2 "*Cách thức tiếp cận và triển khai nghiên cứu với tư duy khởi nghiệp công nghệ"* chúng tôi phân tích một vài cách thức để tư duy thị trường được chuyển hóa thành các mục tiêu nghiên cứu, các giai đoạn nghiên cứu, thang đo về hiệu quả và tính khả thi của nghiên cứu. Ví dụ chúng tôi trình bày cách thức lựa chọn và tạo thành sản phẩm mẫu với các đặc tính quan trọng TỐI THIỂU để có thể thương mại hóa, thu thập thông tin để cải tiến sản phẩm và có dòng tiền để tiếp tục nghiên cứu.

Trong nội dung cuối về "*Một số nguyên tắc cho khởi nghiệp công nghệ*" chúng tôi rút ra một số bài học và nhận xét như là các trường hợp "case study" cho việc phân tích và nghiên cứu. Trong đó chúng tôi đề cập tới nguyên tắc đưa sản phẩm ra thị trường sớm, nguyên tắc phối hợp giữa thông tin thị trường, xử lý thông tin và triển khai nghiên cứu cải tiến.

Chúng tôi hi vọng rằng tham luận của nhóm sẽ giúp làm sáng tỏa một số lý thuyết về khởi nghiệp công nghệ trong điều kiện Việt Nam. Đồng thời cũng giúp các nhà khoa học triển khai hiệu quả các nghiên cứu cũng như sự hợp tác giữa nhà khoa học, doanh nghiệp và nhà đầu tư một cách hiệu quả.

TRIỂN VỌNG SÀNG LỌC VI KHUẨN GRAM ÂM ĐƯỜNG RUỘT KHÁNG KHÁNG SINH CARBAPENEM TẠI CÁC BỆNH VIỆN TUYẾN HUYỆN

Th.S Trần Chí Thành

Đại học Nguyễn Tất Thành

Viện Nghiên cứu Y học Đinh Tiên Hoàng

Viện Karolinska, Thuỵ Điển

Tổng quan

Vi khuẩn đường ruột kháng carbapenem (Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae - CRE) kháng lại gần như tất cả các loại kháng sinh, khiến cho việc điều trị nhiễm trùng do các vi khuẩn này gây ra rất khó khăn. Bên cạnh đó, CRE có thể chuyển các gene kháng kháng sinh cho các loại vi khuẩn khác, dẫn đến việc các vi khuẩn này cũng kháng với các loại kháng sinh carbapenem. Các vi khuẩn đường ruột có thể lan truyền một cách dễ dàng và trở thành nguyên nhân gây ra nhiều loại nhiễm trùng, chủ yếu là nhiễm trùng đường tiết niệu, máu và viêm phổi.[1]

Nghiên cứu của các nhà khoa học Thụy Điển và các bệnh viện tại Việt Nam (Bệnh viện Saint Paul, Bệnh viện Phụ sản Hà Nội, Bệnh viện Nhi Trung ương, Bệnh viện Uông Bí, Bệnh viện Bạch Mai, Bệnh viện Quân đội 108, Bệnh viện Chợ Rẫy TPHCM) đã thực hiện trên hơn 2.200 bệnh nhân thuộc 63 tỉnh thành đang được điều trị tại 12 bệnh viện. Các mẫu vật vi khuẩn đường ruột được lấy từ các miếng gạc từ trực tràng của bệnh nhân. Họ nhận thấy, khi một người mang CRE thì họ có thời gian điều trị dài hơn và dễ bị nhiễm một loại bệnh trong thời gian này, vẫn được biết đến với tên gọi "nhiễm trùng bệnh viện". Chỉ sau 2 tuần nằm viện, 1/8 số bệnh nhân (13%) mang CRE đã tăng lên thành 7/8 bệnh nhân (87%) mang CRE. Một nguy cơ rủi ro khác cho bệnh nhân trong nghiên cứu này là bệnh nhân đã được điều trị với thuốc carbapenem, góp phần tăng thêm số lượng vi khuẩn kháng thuốc. [2]

Trong một nghiên cứu được thực hiện trước đó với 328 trẻ sơ sinh trong một khu chăm sóc đặc biệt, các nhà nghiên cứu cho thấy tỷ lệ tử vong có liên hệ chặt chẽ với người mang CRE và hiện tượng nhiễm trùng bệnh viện khi bệnh nhi được đưa vào điều trị tại đây. "Công bố này cho thấy tỷ lệ tử vong trong số những người nhiễm trùng bệnh viên và người mang CRE đã tăng lên 5 lần". [2]

Th.S Trần Chí Thành (Trường ĐH Nguyễn Tất Thành) cùng các cộng sự đã nghiên cứu và sản xuất thành công đĩa thạch ChromAgar CRE dùng chẩn đoán và sàng lọc nhanh vi khuẩn đường ruột kháng carbapenem với độ nhạy (97,4%) và độ đặc hiệu (98,8%) tương đương sinh phẩm ngoại nhập và hạn sử dụng là 3 tháng (hơn 3 lần so với hãng Biomerieux). [3]

Sự lây lan trên diện rộng của các ví khuẩn CRE cho thấy, cần phải có các biện pháp hiệu quả để giảm thiểu sự lan truyền của lây nhiễm trong các bệnh viện như vệ sinh chân tay, vô trùng khi phẫu thuật, xử lý ống thông tĩnh mạch hay cách ly bệnh nhân mang vi khuẩn đường ruột đa đề kháng. Bên cạnh đó cần theo dõi bệnh nhân ngay cả khi họ đã xuất viện nhằm giảm thiểu sự lây lan trong cộng đồng. Chúng ta cần sàng lọc CRE ở các bệnh viện tuyến huyện, tuy nhiên, rào cản lớn nhất về cơ sở vật chất cần thiết là phòng xét nghiệm vi sinh.

Mục tiêu: Thử nghiệm và đánh giá quy trình sàng lọc CRE trực tiếp tại khoa lâm sàng do các điều dưỡng thực hiện.

Phương pháp: Sàng lọc CRE ở bệnh nhân bằng 2 quy trình: (1) Quy trình chuẩn phòng xét nghiệm vi sinh (do kỹ thuật viên xét nghiệm y khoa thực hiện); (2) Quy trình sàng lọc trực tiếp tại khoa lâm sàng (do điều dưỡng thực hiện).

Địa điểm nghiên cứu: Bệnh viện Việt -Tiệp Hải Phòng

Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang, thực hiện tháng 11/2019

Quy trình sàng lọc trực tiếp:

(1) Lấy mẫu phết trực tràng và cấy ngay mẫu lên đĩa CRE tại giường bệnh nhân

(2) Ủ vào tủ ủ ấm gia dụng (ủ sữa chua) có kèm nhiệt kế theo dõi đạt 37 độ C ở 1 phòng riêng biệt được quản lý nghiêm ngặt và có khoá.

(3) Đọc kết quả sau 24 giờ theo hướng dẫn.

(4) Thu gom đĩa đã cấy theo rác thải y tế có nguy cơ lây nhiễm.



Hình 1: Tủ ủ ấm gia dụng



Hình 2: Khúm khuẩn *Klebsiella pneumoniae* (xanh) *E.coli* (hồng)

Kết quả & Bàn luận

Chúng tôi đã tiến hành sàng lọc CRE từ 2 khoa lâm sàng (21 bệnh nhân khoa hậu phẫu ; 65 bệnh nhân ở khoa truyền nhiễm) với tổng số 86 bệnh nhân.

Các kết quả nuôi cấy tại khoa vi sinh là 17 ca dương tính với CRE (19,8%), trong đó, có 14 ca *Kleb.pneumoniae*, 01 *E.coli* và 01 cả hai bị nhiễm *Kleb.pneumoniae* và *E.coli* (sử dụng tiêu chuẩn vàng cho so sánh, tổng số *Kleb.pneumoniae* 15, *E.coli* 02). Kết quả sàng lọc CRE trực tiếp tại khoa lâm sàng là 16 trường hợp dương tính với CRE (18,6%), trong đó, có 11 *Kleb.pneumoniae* chỉ có 01 E.coli và 01 cả nhiễm *Kleb.pneumoniae* và *E.coli*. (tổng số *Kleb.pneumoniae* 12, *E.coli* 02).

Chúng tôi ghi nhận 01 ca dương tính chênh lệch CRE giữa kết quả nuôi cấy tại khoa vi sinh (17) và kết quả cấy tại khoa lâm sàng (16). Kết quả sai lệch này có thể do điều kiện ủ trong tủ cấy vi sinh tối ưu như duy trì nhiệt độ 37 độ C ổn định với quạt khí đối lưu kèm độ ẩm được kiểm soát và 5% khí CO_2 [4]. Trong khi đó, tủ ủ ấm gia dụng chỉ duy trì 37 độ C đơn thuần và không có đối lưu khí. Tủ ủ ấm gia dụng với điều

kiện kém tối ưu cũng đã cho được tỷ lệ dương tính 94,1% so với tủ ủ ấm chuyên dụng cho nuôi cấy vi sinh.

Đánh giá độ nhạy và đặc hiệu với 02 tác nhân vi khuẩn chính, chúng tôi không đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu với tác nhân *E.coli* do số mẫu dương tính thấp (02 ca). Đối với *Kleb.pneumoniae*, chúng tôi ghi nhận độ nhạy là 80,0% (12/15) và độ đặc hiệu là 98,5% (70/71) thông qua việc chọn kết quả nuôi cấy từ phòng vi sinh là tiêu chuẩn để so sánh.

Kết luận :

Kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy triển vọng sàng lọc CRE trực tiếp khả thi tại khoa lâm sàng và cần nghiên cứu thời gian dài hơn để thu thập thêm mẫu để phân tích. Trong tương lai, sàng lọc CRE sẽ được thực hiện ở các vùng nông thôn nơi không có phòng xét nghiệm vi sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. The Lancet infectious diseases. 2019;19(1):56-66.

2. Tran DM, Larsson M, Olson L, Hoang NTB, Le NK, Khu DTK, et al. High prevalence of colonisation with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among patients admitted to Vietnamese hospitals: Risk factors and burden of disease. J Infect. 2019;79(2):115-22.

3. Thanh C Tran, Binh T Pham, Van H Pham, The A Ngo, Håkan Hanberger, Mattias Larsson, Linus Olson, Assessment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae—plate formula and quality control procedure, MicrobiologyOpen. 2020;00:e1130.

4. TCVN 6404: 1998, *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations. (https://vanbanphapluat.co/tcvn-6404-1998-nguyen-tac-chung-ve-kiem-tra-vi-sinh-vat)*

VAI TRÒ CỦA REALTIME PCR TRONG CHẨN ĐOÁN VÀ ĐIỀU TRỊ VIÊM PHỔI THÙY Ở TRẺ EM

Ths. BS. Trần Quang Khải[1*], PGS. TS. BS. Phan Hữu Nguyệt Diễm[2], TS. BS. Phạm Hùng Vân[3]

[1]Bộ Môn Nhi Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

[2]Bộ Môn Nhi Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

[3]Phòng Xét Nghiệm Nam khoa Biotek

Tác giả liên lạc: tqkhai@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Viêm phổi thuỳ là một thể lâm sàng viêm phổi. Bệnh thường nặng, khó chẩn đoán hơn so với các thể khác nếu chỉ dựa vào lâm sàng. Realtime PCR là một kỹ thuật hiện đại có độ nhạy và độ đặc hiệu cao giúp tìm ra tác nhân gây bệnh một cách nhanh chóng và chính xác. Chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu này nhằm có cái nhìn tổng quan về bệnh, chẩn đoán chính xác hơn tác nhân vi khuẩn gây bệnh và sử dụng kháng sinh phù hợp hơn.*

Phương pháp nghiên cứu: *Mô tả cắt ngang.*

Nghiên cứu này được thực hiện trên 67 bệnh nhi viêm phổi thùy nhập khoa Nội Tổng Quát 2 Bệnh viện Nhi Đồng 1 từ tháng 6/2015 đến tháng 5/2016. Bệnh nhân được tiến hành làm NTA, soi cấy tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 và Realtime PCR tại Phòng Xét Nghiệm Nam khoa Biotek.

Kết quả: *Viêm phổi thùy xảy ra chủ yếu ở trẻ từ 3 – 7 tuổi (46,3%). Triệu chứng lâm sàng thường gặp là ho (100%), sốt (95,5%), thở nhanh (98,5%), rút lõm ngực (53,7%), khò khè (44,8%). Tổn thương trên X quang phổi: thùy trên phải chiếm đa số (38,8%), kế đến thùy dưới trái (16,4%). Kết quả phân lập PCR NTA: Mycoplasma pneumoniae chiếm tỷ lệ nhiều nhất (69,7%), kế đến Streptococcus pneumoniae (53%). Kháng sinh ban đầu phần lớn được sử dụng là Cephalosporin thế hệ thứ 3 (C3G) (50,7%), kế đến là C3G + Azithromycin (47,8%). 58,2% trường hợp đáp ứng tốt với kháng sinh ban đầu, C3G + Azithromycin có tỷ lệ đáp ứng khá tốt (81,2%). Tỷ lệ đáp ứng kháng sinh bước 2 khá cao (92,9%), chủ yếu nhờ vào kết quả PCR NTA. Kết quả điều trị 100% khỏi bệnh. Có 2 trường hợp PCR NTA phát hiện lao được chuyển Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch điều trị.*

Kết luận: *Realtime PCR hỗ trợ đắc lực trong việc tìm tác nhân gây bệnh một cách nhanh chóng và chính xác, hướng dẫn điều trị kháng sinh hiệu quả, đặc biệt trong những trường hợp lâm sàng đáp ứng kém.*

Từ khoá: *Realtime PCR, viêm phổi thùy, trẻ em.*

THE ROLE OF REALTIME PCR IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF LOBAR PNEUMONIA IN CHILDREN

Khai Quang Tran[1*], Diem Huu Nguyet Phan[2], Van Hung Pham[3]

[1]Peadiatric Deparment – Can Tho University of Medicine and Pharmacy

[2]Peadiatric Deparment – University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

[3]Nam khoa Biotek Company

Corresponding Author: tqkhai@ctump.edu.vn

ABSTRACT

Background: *Lobar pneumonia is a clinical form of pneumonia. The disease is often more severe, more difficult to diagnose than other forms if clinically. Realtime*

PCR is a modern technique that has a high sensitivity and specificity to help identify pathogens quickly and accurately. We conducted this study to obtain an overview of the disease, to better diagnose the causative agent and to use antibiotics more appropriately.

Materials and methods : *Descriptive cross-sectional study.*

This study included 67 patients with lobar pneumonia admitted to Children's Hospital 1, from June 2015 to May 2016. All of nasotracheal aspiration (NTA) specimens of patients were collected, considered, cultured at Children's Hospital 1 and done Realtime PCR at the laboratory of Nam khoa Biotek Company.

Results: *Lobar pneumonia occurred mainly in children from 3 – 7 years old (46.3%). The clinical manifestations were cough (100%), fever (95.5%), tachypnea (98.5%), lower chest-wall indrawing (53.7%), wheezing (44.8%). Chest X ray images: right upper lobe pneumonia was the most (38.8%), left lower lobe pneumonia (16.4%). The Realtime PCR on NTA results: the rate of Mycoplasma pneumonia was the most (69.7%), next was Streptococcus pneumonia (53%). The original antibiotics were mostly used as 3rd generation cephalosporins (C3G) (50.7%),C3G + Azithromycin (47,8%). 58.2% of cases were responsible for the original antibiotics. The successful rate of C3G + Azithromycin was 81.2%. The rate responsible for the second antibiotics was so high (92.9%), mainly based on the results of PCR on NTA. 100% of patinents were cured. There were 2 cases found tuberculosis, based on results of PCR on NTA, moved to Pham Ngoc Thach Hospital for treatment.*

Conclusion: *Realtime PCR efficient supported in finding pathogens quickly and accurately, guided effective antibiotic therapy, especially in cases of poor clinical response.*

Keywords: *Realtime PCR, lobar pneumonia, children.*

I. TỔNG QUAN

Viêm phổi là một trong những nguyên nhân hàng đầu dẫn đến tử vong ở trẻ em. Viêm phổi thuỳ là một thể lâm sàng viêm phổi, thường gặp ở trẻ trên 3 tuổi. Bệnh thường nặng, khó chẩn đoán hơn so với các thể khác nếu chỉ dựa vào lâm sàng.

Realtime PCR là một kỹ thuật hiện đại có độ nhạy và độ đặc hiệu cao giúp tìm ra tác nhân gây bệnh một cách nhanh chóng và chính xác [1].

Trong những năm qua, nghiên cứu về viêm phổi trẻ em rất nhiều nhưng nghiên cứu chuyên về viêm phổi thùy và tác nhân gây bệnh còn ít. Tại Việt Nam, hiện nay có 2 công trình nghiên cứu chuyên về viêm phổi thùy trẻ em. Một, nghiên cứu của Đào Minh Tuấn tại khoa Hô Hấp Bệnh viện Nhi Trung Ương năm 2008 – 2010 [2]. Hai, nghiên cứu của Đinh Thị Yến tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng năm 2013 – 2014 [3]. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thực hiện đề tài nghiên cứu này tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 với các mục tiêu cụ thể như sau:

1. Xác định tỷ lệ các đặc điểm dịch tễ, lâm sàng, X quang phổi thường gặp của bệnh viêm phổi thùy ở trẻ em.
2. Xác định tỷ lệ các tác nhân vi khuẩn gây bệnh viêm phổi thùy qua kết quả soi, cấy và PCR dịch khí quản lấy bằng phương pháp NTA.
3. Xác định tỷ lệ kết quả điều trị của bệnh viêm phổi thùy ở trẻ em.
4.

II. PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng: 67 trẻ em từ 2 tháng đến 15 tuổi được chẩn đoán bệnh viêm phổi thùy nhập khoa Nội Tổng Quát 2 Bệnh viện Nhi Đồng 1 từ tháng 6/2015 đến tháng 5/2016.

Tiêu chuẩn chọn mẫu: Trẻ nhập khoa Nội Tổng Quát 2 Bệnh Viện Nhi Đồng 1 thỏa 3 tiêu chuẩn:

1. Tuổi: 2 tháng – 15 tuổi.
2. Lâm sàng: ho, khó thở, thở nhanh theo tuổi ± rút lõm ngực.
   Thở nhanh theo tuổi theo WHO:
   - 2 – < 12 tháng: ≥ 50 lần/ phút
   - 12 tháng – < 5 tuổi: ≥ 40 lần/ phút
   - ≥ 5 tuổi: ≥ 30 lần/ phút
3. X quang phổi: có hình ảnh viêm phổi thùy điển hình (hình mờ tương đối đồng nhất chiếm một thùy hoặc phân thùy phổi và có hình ảnh đường hơi phế quản ở bên trong) hoặc không điển hình (đám mờ thâm nhiễm có dạng hình tròn tại một vùng của phổi, kích thước khoảng 3 – 4 cm, bờ rõ, không có nốt vôi hóa).

Tiêu chuẩn loại trừ: trẻ có gia đình từ chối tham gia nhóm nghiên cứu.

Phương pháp nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

Nội dung nghiên cứu: Tất cả những trẻ thỏa tiêu chuẩn chọn mẫu sẽ được đưa vào lô nghiên cứu. Thực hiện bệnh án mẫu và điều trị theo phác đồ bệnh viện. Tiến hành làm NTA (do chính người làm nghiên cứu thực hiện). Gửi mẫu bệnh phẩm đến 2 nơi: Phòng xét nghiệm vi sinh Bệnh viện Nhi Đồng 1 để soi, cấy và phòng xét nghiệm Nam Khoa Biotek để làm Realtime PCR. Sau khi có kết quả vi sinh, nếu phân lập được tác nhân thì điều trị theo tác nhân. Nếu không phân lập được thì điều trị theo kinh nghiệm. Đánh giá kết quả điều trị thông qua số ngày điều trị và có tử vong hay không.

Xử lý số liệu: theo phương pháp thống kê y học, nhập số liệu và phân tích bằng phần mềm SPSS 18.0.

III. KẾT QUẢ

Đặc điểm dịch tễ, lâm sàng, cận lâm sàng

Bảng 1. Đặc điểm tuổi, giới tính trong nhóm nghiên cứu**ĐẶC ĐIỂM**		**TẦN SUẤT (N=67)**	**TỶ LỆ %**	**χ^2, p**
Tuổi	< 12 th 12 – 35 th 36 – 84 th > 84 th	4 15 31 17	6 22,3 46,3 25,4	χ^2 = 22,015 p < 0,001
Giới tính	Nam Nữ	34 33	50,7 49,3	χ^2 = 0,015 p = 0,903

Tuổi trung bình của mẫu nghiên cứu là 60,9 ± 35 tháng tuổi, nhỏ nhất là 7 tháng, lớn nhất là 136 tháng. Lứa tuổi thường gặp nhất là 3 – 7 tuổi (46,3%), ít gặp ở trẻ < 12 tháng tuổi (6%). Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (χ^2 = 22,015, p < 0,001). Tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ gần như tương đương nhau (χ^2 = 0,015, p = 0,903). Bé trai chiếm 50,7%, bé gái (49,3%) .

Triệu chứng cơ năng thường gặp nhất là ho và sốt. 100% đều có triệu chứng ho, 64/67 ca có triệu chứng sốt (chiếm 95,5%). Các triệu chứng cơ năng còn lại lần lượt là nôn ói (43,3%), tiêu chảy (6%), đau bụng (3%), khó thở (3%) và đau đầu chiếm 1,5%.

Thở nhanh chiếm tỷ lệ gần như tuyệt đối trong nhóm triệu chứng thực thể, 66/67 ca chiếm 98,5%, kế đến là triệu chứng rút lõm ngực (53,7%), khò khè (44,8%) và co kéo cơ hô hấp phụ chiếm 37,3%.

Bảng 2. Vị trí tổn thương trên X quang phổi thẳng

Vị trí	**Tần suất**	**Tỷ lệ %**	**Tỷ lệ cộng dồn %**

Thùy trên phải	26	38,8	38,8
Thùy dưới phải	10	14,9	53,7
Thùy giữa	2	3,0	56,7
Thùy trên trái	10	14,9	71,6
Thùy dưới trái	11	16,4	88
2 thùy 1 bên phổi	5	7,5	95,5
2 thùy 2 bên phổi	3	4,5	100
Tổng	**(N = 67)**		
χ^2, p	$\chi^2 = 41,134$, $p < 0,001$		

Trong mẫu nghiên cứu, tổn thương đơn thuần 1 thùy phổi chiếm đa số (88%), 2 thùy phổi chiếm 12% (2 thùy 2 bên phổi chiếm 4,5% và 2 thùy 1 bên phổi chiếm 7,5%). Đa phần tổn thương bên phổi phải (64,2%) (tính cả tổn thương đơn thuần 1 thùy bên phổi phải 56,7% và 2 thùy 1 bên phổi phải 7,5%); bên trái chiếm tỷ lệ 31,3% và tổn thương cả 2 bên phổi chiếm 4,5%.

Viêm phổi thùy trên phải chiếm tỷ lệ nhiều nhất (38,8%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($\chi^2 = 41,134$, $p < 0,001$); kế đến thùy dưới trái (16,4%), thùy dưới phải và thùy trên trái cùng chiếm 14,9%, tổn thương 2 thùy 1 bên phổi chiếm 7,5% (cả 5 trường hợp đều là tổn thương thùy dưới phải và thùy giữa), tổn thương 2 thùy 2 bên phổi (4,5%) và tổn thương đơn thuần thùy giữa chiếm 3%.

Tác nhân vi khuẩn gây bệnh

Trong 67 trường hợp viêm phổi thùy được lấy mẫu NTA, có 1 mẫu NTA không đủ tin cậy để cấy (kết quả thang điểm Barlett = 0 qua soi), còn lại 66 mẫu được cấy tại phòng xét nghiệm Vi sinh Bệnh viện Nhi Đồng 1 và làm Realtime PCR tại phòng xét nghiệm Nam khoa Biotek. Với 66 mẫu đem cấy, 100% cho kết quả âm tính. Với 66 mẫu gửi làm Realtime PCR, có 2 mẫu kết quả trả về âm tính, còn lại 64 mẫu dương tính, chiếm 97%.

Kết quả PCR gọi là dương tính khi có 1 tác nhân được phát hiện > 10^5 bản sao/ml. Trong trường hợp có nhiều tác nhân dương tính trên 1 mẫu NTA, chúng tôi đánh giá tác nhân chính và tác nhân phối hợp. Tác nhân chính là tác nhân được phát hiện với số bản sao/ml cao nhất.

Trong 64 mẫu PCR dương tính, kết quả thu được có 2 trường hợp ra *Mycobacterium tuberculosis*, được chuyển Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch điều trị.

Bảng 3. Tổng hợp các tác nhân phân lập qua Realtime PCR

Tác nhân	**Lượt phân lập dương tính**				
	Tác nhân chính (N)	**Tác nhân phối hợp (N)**	**Dương tính N (%)**	**Âm tính N (%)**	**Tổng**
Mycoplasma pneumoniae	35	11	**46 (69,7%)**	20 (30,3%)	66
Streptococcus pneumoniae	19	16	**35 (53%)**	31 (47%)	66
Staphylococcus aureus	5	13	**18 (27,2%)**	48 (72,8%)	66
Haemophilus influenzae	3	6	**9 (13,6%)**	57 (86,4%)	66
Moraxella catarrhalis	0	5	**5 (7,6%)**	61 (92,4%)	66
Mycobacterium tuberculosis	2	0	**2 (3%)**	64 (97%)	66
Tổng	**(N = 64)**				

Qua 66 lượt phân lập cho mỗi tác nhân, chúng tôi ghi nhận *Mycoplasma pneumoniae* chiếm tỷ lệ nhiều nhất 69,7% (vừa là tác nhân chính trong 35 lượt phân lập và vừa là tác nhân phối hợp trong 11 lượt phân lập), kế đến *Streptococcus pneumoniae* (53%), *Staphylococcus aureus* (27,2%), *Haemophilus influenzae* (13,6%), *Moraxella catarrhalis* (7,6%) và *Mycobacterium tuberculosis* (3%). Trong 9 ca phân lập *Haemophilus influenzae*, chỉ có 1 ca được xác định là chủng *Haemophilus influenzae type b*. Tuy nhiên, trường hợp này *Haemophilus influenzae type b* không phải là tác nhân chính. Trong 18 ca phân lập *Staphylococcus aureus*, có đến 11 ca là chủng kháng Methicillin (5 chủng mang gen MecA, 3 chủng mang gen Nuc và 3 chủng mang gen FemA). Nhưng cả 11 ca này đều không phải tác nhân chính. Với cả 2 trường hợp phát hiện ra lao, ban đầu đều cho kết quả PCR âm tính, chúng tôi đã đổi/thêm kháng sinh nhưng lâm sàng vẫn không đáp ứng. Chúng tôi quyết định phân lập tiếp với *Mycobacterium tuberculosis*, kết quả dương tính với số copies khá cao.

Kết quả điều trị

Trong 67 mẫu nghiên cứu, có 2 trường hợp kết quả Realtime PCR NTA dương tính với *Mycobacterium tuberculosis*, được chuyển Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch điều trị. Còn lại 65 mẫu tiếp tục điều trị tại khoa Nội Tổng Quát 2 Bệnh viện Nhi Đồng 1.

Kháng sinh ban đầu phần lớn được sử dụng là C3G (34 ca chiếm 50,7%), kế đến là C3G + Azithromycin 32 ca (47,8%), 1 trường hợp sử dụng Vancomycin (1,5%). Trường hợp sử dụng Vancomycin ngay khi mới vào viện là vì trường hợp này bệnh nhân đã được điều trị tại Bệnh viện Pháp Việt với Vancomycin 2 ngày trước khi chuyển Bệnh viện Nhi Đồng 1. Có 1 trường hợp chúng tôi dùng Azithromycin ngay cho trẻ < 5 tuổi (55 tháng tuổi) vì đó là trường hợp trẻ có anh ruột bị viêm phổi thùy do *Mycoplasma pneumoniae*, cũng trong mẫu nghiên cứu của chúng tôi. Nên chúng tôi quyết định dùng kháng sinh Azithromycin sớm trong trường hợp này. Trẻ đáp ứng tốt với kháng sinh. Sau đó, kết quả PCR NTA trả về cũng thu được dương tính với *Mycoplasma pneumoniae*.

Có 39 trường hợp (chiếm 58,2%) đáp ứng tốt với kháng sinh ban đầu. Còn lại 41,8% cần phải đổi/thêm kháng sinh. Trong các kháng sinh ban đầu, C3G + Azithromycin có tỷ lệ đáp ứng khá tốt (chiếm 81,2%). Chỉ có 6 trường hợp phải đổi/thêm kháng sinh.

Tỷ lệ đáp ứng kháng sinh sau đổi/thêm khá cao (92,9%). Trong đó, có 25 ca đổi/thêm kháng sinh theo tác nhân từ kết quả PCR NTA, 3 ca theo kinh nghiệm (1 ca kết quả PCR NTA âm tính và 2 ca lao do ban đầu PCR NTA âm tính). Với 25 ca đổi/thêm kháng sinh theo tác nhân, 100% đều đáp ứng tốt. Trong 3 ca đổi/thêm kháng sinh theo kinh nghiệm, có 2 ca không đáp ứng, phải đổi/thêm kháng sinh lần 2. Thực sự đây là 2 ca lao. Kháng sinh được đổi/thêm lần 1 chủ yếu là Azithromycin (chiếm 29,9%), kế đến Vancomycin (22,4%), Ceftazidim (9%), Imipenem (4,5%) và ít nhất là Cefipime (chiếm 1,5%). Với 2 ca lao không đáp ứng sau đổi/thêm kháng sinh lần 1, kháng sinh được đổi/thêm lần 2 là Imipenem + Vancomycin (1 ca) và Azithromycin (1 ca).

Kết quả 65 trẻ tiếp tục điều trị tại Bệnh viện Nhi Đồng 1 đều khỏi bệnh, đáp ứng tốt sau khi đổi/thêm kháng sinh 1 lần. Không có trường hợp nào tử vong. Thời gian nằm viện trung bình là 13,11 ± 4,65 ngày, ngắn nhất là 6 ngày, lâu nhất là 24 ngày. Đa số có thời gian nằm viện < 14 ngày (chiếm 65,7%).

IV. BÀN LUẬN

Lứa tuổi thường gặp nhất là 3 – 7 tuổi, ít gặp ở trẻ < 12 tháng tuổi. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Đào Minh Tuấn tại khoa Hô Hấp Bệnh viện Nhi Trung Ương năm 2008 – 2010, lứa tuổi viêm phổi thùy đa số cũng từ 3 – 7 tuổi (chiếm 61,76%) và ít gặp ở trẻ < 1 tuổi (chiếm 5,88%) [2]. Nghiên cứu của Đinh Thị Yến tại Bệnh viện Trẻ em Hải Phòng năm 2013 – 2014 thì ghi nhận lứa tuổi viêm phổi thùy nhiều nhất từ 2 – 5 tuổi

(chiếm 69,8%) [3]. Kết quả này cũng phù hợp với y văn về bệnh viêm phổi thùy ở trẻ em thường gặp ở trẻ > 3 tuổi; trong khi viêm phổi cộng đồng nói chung thường gặp ở trẻ < 5 tuổi, nhiều nhất < 3 tuổi, trong đó trẻ < 12 tháng tuổi đa số [4]. Trong mẫu nghiên cứu, tỷ lệ mắc bệnh ở nam và nữ gần như tương đương nhau. Nhiều nghiên cứu về viêm phổi cộng đồng trẻ em nói chung ghi nhận tỷ lệ nam: nữ thường >1. Tuy nhiên vẫn chưa có đủ bằng chứng khẳng định cho sự khác biệt này [5].

Theo tác giả Margolis P, ho là triệu chứng có độ nhạy cao (98%), và độ đặc hiệu là 70% đối với viêm phổi trẻ em [6]. Ho có độ nhạy và độ đặc hiệu khá cao trong viêm phổi [4]. Sốt cũng là triệu chứng thường gặp trong viêm phổi, với độ nhạy trong nghiên cứu của chúng tôi là 95,5%. Tuy nhiên, sốt lại là triệu chứng của rất nhiều bệnh, nên độ đặc hiệu không cao. Triệu chứng khò khè trong nghiên cứu của chúng tôi khá cao (44,8%) so với các nghiên cứu của Lanks CW (25%) [7], Marangu D (24,8%) [8]. Trong 30 trường hợp khò khè, có 26 trường hợp (chiếm 86,7%) là do tác nhân *Mycoplasma pneumoniae*, 13,3% là do các tác nhân khác ($\chi^2 = 2,694$, $p = 0,031$).

Trong mẫu nghiên cứu chúng tôi, vị trí tổn thương thường gặp là thùy trên phải (38,8%). Kết quả nghiên cứu viêm phổi thùy của Đào Minh Tuấn cũng ghi nhận chủ yếu viêm 1 thùy phổi (88,24%), trong đó tổn thương thường gặp nhất là thùy trên phổi phải (44,29%) [2]. Nghiên cứu viêm phổi thùy của Đinh Thị Yến cũng ghi nhận tổn thương bên phải chiếm đa số (81%), nhiều nhất vẫn là viêm thùy trên phổi phải (30,2%) [3]. Đây là sự khác biệt rõ nét về vị trí tổn thương tập trung ở các thùy phổi khác nhau. Liệu điều này có liên quan đến các yếu tố giải phẫu, sinh lý của quá trình thông khí hay một yếu tố nào khác?

Tại phòng Xét nghiệm Nam Khoa Biotek, chúng tôi thực hiện Realtime PCR NTA. Kết quả thu được 97% dương tính. Độ nhạy và độ đặc hiệu của PCR được chứng minh rất cao trong nhiều nghiên cứu (> 90% cho cả độ nhạy và độ đặc hiệu) [1]. Mặc dù chưa có sẵn trên lâm sàng, nhưng PCR cho thấy hứa hẹn đáng kể trong việc chẩn đoán các tác nhân gây viêm phổi đặc biệt viêm phổi không điển hình.

Qua kết quả phân lập các tác nhân vi khuẩn gây bệnh viêm phổi thùy, chúng tôi ghi nhận *Mycoplasma pneumoniae* chiếm tỷ lệ nhiều nhất 69,7%. Trong cả nhóm đơn nhiễm và đồng nhiễm, *Mycoplasma pneumoniae* vẫn là vi khuẩn chủ yếu gây bệnh, kế đến là *Streptococcus pneumoniae*. Kết quả này khác hẳn so với các nghiên cứu về tác nhân viêm phổi thùy trước đó. Theo nghiên cứu của Đinh Thị Yến, tác nhân phổ biến gây viêm phổi thùy là *Streptococcus pneumoniae* (50%) [3]. Theo Đào Minh Tuấn, viêm phổi thùy chủ yếu do 2 tác nhân *Staphylococcus aureus* (38,09%) và *Streptococcus pneumoniae* (28,57%) [2]. *Streptococcus pneumoniae* còn được ghi nhận là tác nhân hàng đầu gây viêm phổi thùy trong nhiều nghiên cứu khác và do đó, viêm phổi thùy còn được mệnh danh là "viêm phổi phế cầu" [4]. Tuy nhiên, với các tác giả Đinh Thị Yến và Đào Minh Tuấn, phân lập tác nhân dựa vào kết quả nuôi cấy dịch tỵ hầu (theo Đinh Thị Yến), cấy bệnh phẩm dịch nội khí quản hoặc dịch rửa phế nang bằng phương pháp nội soi phế quản (theo Đào Minh Tuấn) [2],[3]. Còn nghiên cứu chúng tôi là PCR NTA. Giá trị PCR cũng được minh chứng rõ ràng trong nhiều nghiên cứu. Do đó, sự khác biệt này đặt ra nghi vấn liệu nghiên cứu của chúng tôi còn có sai lầm khác hay chăng; hay thực sự cần có cái nhìn khác hơn về tác nhân viêm phổi thùy? Điều này cần thêm nhiều nghiên cứu, với cỡ mẫu lớn hơn.

Xét trên tổng thể 67 mẫu nghiên cứu, có 58,2% trẻ đáp ứng tốt với kháng sinh ban đầu, còn lại 41,8% cần phải đổi/thêm kháng sinh. Tỷ lệ thất bại điều trị kháng sinh ban đầu đối với viêm phổi cộng đồng dao động tùy nghiên cứu, đối tượng, thời điểm, vùng miền khác nhau. Các vấn đề của kháng sinh nhóm Macrolide ngày càng được quan tâm.

Hiệu quả của kháng sinh Macrolide vẫn còn đang gây tranh cãi. Theo một nghiên cứu khác của Ambroggio L, sử dụng β lactam kết hợp nhóm Macrolide trên viêm phổi mắc phải cộng đồng nói chung giúp rút ngắn thời gian nằm viện 20% [9]. Còn với nghiên cứu chúng tôi, trong các kháng sinh ban đầu, C3G + Azithromycin có tỷ lệ đáp ứng khá tốt (81,2%). Chỉ có 6 trường hợp phải đổi/thêm kháng sinh.

Tỷ lệ đáp ứng kháng sinh sau đổi/thêm lần 1 khá cao (92,9%). Trong đó, có 25 ca đổi/thêm kháng sinh theo tác nhân từ kết quả PCR NTA, 3 ca theo kinh nghiệm. Với 25 ca đổi/thêm kháng sinh theo tác nhân, 100% đều đáp ứng tốt. Điều này càng cho thấy vai trò PCR trong chẩn đoán và điều trị các bệnh nhiễm trùng, cụ thể viêm phổi.

V. KẾT LUẬN

Realtime PCR hỗ trợ đắc lực trong việc tìm tác nhân gây bệnh một cách nhanh chóng và chính xác, có khả năng phát hiện được tác nhân mới không mọc được trên môi trường nuôi cấy truyền thống; đồng thời, giúp hướng dẫn điều trị kháng sinh hiệu quả, đặc biệt trong những trường hợp lâm sàng đáp ứng kém.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Charlton, C.L.; Babady, E.; Ginocchio, C.C.; Hatchette, T.F.; Jerris, R.C.; Li, Y.; Loeffelholz, M.; McCarter, Y.S.; Miller, M.B.; Novak-Weekley, S., et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. *Clinical microbiology reviews* **2019**, *32*, e42-e90, doi:10.1128/cmr.00042-18.
2. Đào Minh Tuấn. Nghiên cứu biểu hiện lâm sàng và căn nguyên viêm phổi thùy ở trẻ em. *Tạp chí Y Học Quân Sự* **2011**, *5*, 34-38.
3. Đinh Thị Yến. Lâm sàng, cận lâm sàng và kết quả điều trị 63 trường hợp viêm phổi thùy tại Bệnh viện trẻ em Hải Phòng. *Tạp chí Nhi khoa* **2015**, *8*, 23-29.
4. Marcelo, C.S.; Paulo, J.C.M.; Renato, T.S. Pneumonia in children. In *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*, 9th ed.; Wilmott, R.W., Ed. PA: Elsevier: Philadelphia, 2018; pp. 1597-1644.
5. Jonnalagadda, S.; Rodríguez, O.; Estrella, B.; Sabin, L.L.; Sempértegui, F.; Hamer, D.H. Etiology of severe pneumonia in Ecuadorian children. *PloS one* **2017**, *12*, e0171687, doi:10.1371/journal.pone.0171687.
6. Margolis, P.; Gadomski, A. The rational clinical examination. Does this infant have pneumonia? *Jama* **1998**, *279*, 308-313, doi:10.1001/jama.279.4.308.
7. Lanks, C.W.; Musani, A.I.; Hsia, D.W. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *The Medical clinics of North America* **2019**, *103*, 487-501, doi:10.1016/j.mcna.2018.12.008.
8. Marangu, D.; Zar, H.J. Childhood pneumonia in low-and-middle-income countries: An update. *Paediatric respiratory reviews* **2019**, *32*, 3-9, doi:10.1016/j.prrv.2019.06.001.
9. Ambroggio, L.; Taylor, J.A.; Tabb, L.P.; Newschaffer, C.J.; Evans, A.A.; Shah, S.S. Comparative effectiveness of empiric β-lactam monotherapy and β-lactam-macrolide combination therapy in children hospitalized with community-acquired pneumonia. *The Journal of pediatrics* **2012**, *161*, 1097-1103, doi:10.1016/j.jpeds.2012.06.067.

