

## BAN BIÊN TẬP TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

| STT       | Họ tên                       | Đơn vị                                                                      | Nhiệm vụ          |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>I</b>  | <b>Thành viên trong nước</b> |                                                                             |                   |
| 1         | Nguyễn Hay                   | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Tổng biên tập     |
| 2         | Chế Minh Tùng                | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Phó tổng biên tập |
| 3         | Nguyễn Đình Phú              | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM<br>University of California, Irvine, Mỹ      | Biên tập viên     |
| 4         | Lê Đình Đôn                  | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 5         | Lê Quốc Tuấn                 | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 6         | Nguyễn Bạch Đằng             | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 7         | Nguyễn Huy Bích              | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 8         | Phan Tài Huân                | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 9         | Nguyễn Phú Hòa               | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 10        | Võ Thị Trà An                | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| 11        | Tăng Thị Kim Hồng            | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM                                              | Biên tập viên     |
| <b>II</b> | <b>Thành viên nước ngoài</b> |                                                                             |                   |
| 12        | Tô Phúc Tường                | Nguyên chuyên gia IRRI, Việt Nam                                            | Biên tập viên     |
| 13        | Peeyush Soni                 | Asian Institute of Technology, Thái Lan                                     | Biên tập viên     |
| 14        | Ta-Te Lin                    | National Taiwan University, Đài Loan                                        | Biên tập viên     |
| 15        | Glenn M. Young               | University of California, Davis, Mỹ                                         | Biên tập viên     |
| 16        | Soroosh Sorooshian           | University of California, Irvine, Mỹ                                        | Biên tập viên     |
| 17        | Katleen Raes                 | Ghent University, Bỉ                                                        | Biên tập viên     |
| 18        | Vanessa Louzier              | Lyon University, Pháp                                                       | Biên tập viên     |
| 19        | Wayne L. Bryden              | The University of Queensland, Úc                                            | Biên tập viên     |
| 20        | Jitender Singh               | Sardar Vallabhbhai Patel University of<br>Agriculture and Technology, Ấn Độ | Biên tập viên     |
| 21        | Kevin Fitzsimmons            | University of Arizona, Mỹ                                                   | Biên tập viên     |
| 22        | Cyril Marchand               | University of New-Caledonia, Đức                                            | Biên tập viên     |
| 23        | Koichiro Shiomori            | University of Miyazaki, Nhật Bản                                            | Biên tập viên     |
| 24        | Kazunari Tsuji               | Saga University, Nhật Bản                                                   | Biên tập viên     |
| 25        | Sreeramanan Subramaniam      | Universiti Sains Malaysia, Malaysia                                         | Biên tập viên     |

## BAN THƯ KÝ TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

| STT | Họ tên            | Đơn vị                         | Nhiệm vụ          |
|-----|-------------------|--------------------------------|-------------------|
| 1   | Huỳnh Tiến Đạt    | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM | Trưởng ban thư ký |
| 2   | Trương Quang Bình | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM | Trưởng ban trị sự |
| 3   | Huỳnh Hữu Nhân    | Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM | Thành viên        |

**Tạp chí Nông nghiệp và Phát Triển**

Giấy phép xuất bản:  
567/GP-BVHTT-24/12/2002  
175/GP-BTTTT-20/04/2018

**Tòa soạn:**

Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM  
Khu phố 6, Phường Linh Trung, Quận Thủ Đức, TP.HCM  
Điện thoại: (028)37245670  
Email: jad@hcmuaf.edu.vn

## MỤC LỤC (CONTENT)

- Nông học, Lâm nghiệp (Agronomy and Forestry Sciences)**
- 1 Evaluation of stability and adaptability of heat-tolerant rice lines in Mekong delta  
*Lot V. Tran, Lang T. Nguyen, Phuoc T. Nguyen, & Buu C. Bui*
- Đánh giá tính ổn định và thích nghi của các dòng lúa chịu nóng tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long  
*Trần Văn Lợt, Nguyễn Thị Lang, Nguyễn Trọng Phước & Bùi Chí Bửu*
- 10 Effects of different nitrogen fertilizer levels on yield, leave color, and content of bioactive compounds of *Pouzolzia zeylanica* L. Benn  
*Tuyen T. X. Vo, Tan D. Nguyen, & Thuy M. Nguyen*
- Ảnh hưởng của mức bón phân đạm lên năng suất, màu sắc lá và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây thuốc dòi (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn)  
*Võ Thị Xuân Tuyền, Nguyễn Duy Tân & Nguyễn Minh Thủy*
- 19 Effects of lime and sawdust on arsenic reduction in corn planted on the inside of the dyke at Quoc Thai commune, An Phu district, An Giang province  
*Chinh T. Nguyen, & Chuong V. Nguyen*
- Ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa đến sự giảm thiểu asen trên cây bắp trồng trong đê bao tại xã Quốc Thái – An Phú – An Giang  
*Nguyễn Trung Chính & Nguyễn Văn Chương*
- 26 Modification of Cellulose from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for nanocomposite materials  
*Hien V. Nguyen, Thuy T. T. Le, & Duy Q. Tran*
- Nghiên cứu biến tính Cellulose từ lục bình định hướng làm pha gia cường cho vật liệu nanocomposite  
*Nguyễn Văn Hiền, Lê Thị Thanh Thủy & Trần Quang Duy*
- Chăn nuôi, Thú y, Thủy sản (Animal Sciences, Veterinary Medicine and Aquaculture)**
- 33 Utilization of knife fish bone (*Chitala chitala*) as a material for fish protein and mineral powder production by enzyme hydrolysis  
*Thuy T. M. Le, & Truc T. Tran*
- Nghiên cứu tận dụng xương cá thác lác còm (*Chitala chitala*) để sản xuất bột đạm và bột khoáng bằng phương pháp thủy phân enzyme  
*Lê Thị Minh Thủy & Trần Thanh Trúc*

- 42 Effects of types and quantity of live food on growth performance and survival rate of cobia larvae (*Rachycentron canadum*)  
*Luong T. Le, Nhan T. Dinh, Hoa T. B. Nguyen, Quyen T. T. Nguyen, Trang T. N. Pham, & Phu T. N. Nguyen*

Nghiên cứu ảnh hưởng của loại và lượng thức ăn sống lên tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp (*Rachycentron canadum*)

*Lê Thế Lương, Đinh Thế Nhân, Nguyễn Thị Bích Hòa, Nguyễn Thị Thu Quyên, Phạm Thị Ngọc Trang & Nguyễn Thị Ngọc Phú*

### **Công nghệ sinh học (Biotechnology)**

- 51 Isolation and selection of microorganisms in cocoa fermentation  
*Phong X. Huynh, Thuy H. T. P. Ho, & Thanh N. Nguyen*

Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật trong lên men cacao

*Huỳnh Xuân Phong, Hồ Huỳnh Thị Phương Thủy & Nguyễn Ngọc Thanh*

- 62 Construction of artificial microRNA expression vectors for inhibition of *Minc16281* gene in root-knot nematode *Meloidogyne incognita*  
*Phong V. Nguyen, Loan T. N. Nguyen, Thang B. Tran, & Linh B. Ton*

Tổng hợp vector mang cấu trúc microRNA nhân tạo sử dụng ức chế sự biểu hiện gene *Minc16281* của tuyến trùng sung rễ *Meloidogyne incognita*

*Nguyễn Vũ Phong, Nguyễn Thị Ngọc Loan, Trần Bảo Thắng & Tôn Bảo Linh*

### **Công nghệ thực phẩm (Food Science and Technology)**

- 70 Effect of coconut oil, milk powder on the viscosity and hardness of mixtures of cocoa powder and cocoa butter  
*Uyen N. H. Truong, Giang T. Tran, & Bach T. Nguyen*

Ảnh hưởng của dầu dừa, sữa bột đến độ nhớt và độ cứng của hỗn hợp bột cacao/bơ cacao  
*Trương Nữ Hạ Uyên, Trần Thanh Giang & Nguyễn Trọng Bách*

- 81 Production of sprouted garlic powder  
*Thanh T. Le, Phong N. Le, Phuoc H. Le, Tri M. T. Le, & Trang T. T. Nguyen*

Nghiên cứu quy trình chế biến bột mầm tỏi từ tỏi Phan Rang

*Lê Thị Thanh, Lê Nhã Phong, Lê Hồng Phước, Lê Trần Minh Trí & Nguyễn Thị Thanh Trang*

- 90 Optimization of drying the semi-dried lamb meat product (jerky)  
*Trình A. Nguyen, Thao T. T. Nguyen, & Linh T. Le*

Tối ưu hóa quá trình sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo

*Nguyễn Anh Trinh, Nguyễn Thị Thanh Thảo & Lê Trúc Linh*

- 99 Chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf  
*Cang H. Mai, Nguyen H. Nguyen, Giao T. Huynh, & Y T. N. Le*

Nghiên cứu tách chiết Chlorophyll từ lá mướp (*Egyptian Luffa*)

*Mai Huỳnh Cang, Nguyễn Hồng Nguyên, Huỳnh Thị Giao & Lê Thị Như Ý*

## Evaluation of stability and adaptability of heat-tolerant rice lines in Mekong delta

Lot V. Tran<sup>1\*</sup>, Lang T. Nguyen<sup>2</sup>, Phuoc T. Nguyen<sup>2</sup>, & Bui C. Bui<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Cuu Long Delta Rice Research Institute, Can Tho, Vietnam

<sup>3</sup>Institute of Agricultural Science for Southern Vietnam, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: January 15, 2019

Revised: March 01, 2019

Accepted: March 22, 2019

#### Keywords

Adaptability

Heat-tolerant rice lines

Stability

#### \*Corresponding author

Tran Van Lot

Email: tvlot@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

In two crop seasons of 2018, Winter-Spring and Summer-Autumn, in Long An, Can Tho, Hau Giang, An Giang and Tra Vinh provinces, an assessment of stability and adaptability of heat-tolerant rice lines (HTL) was conducted. The experiment was performed as a randomized complete block design (RCBD) with 3 replicates. The quantity of fertilizers was equally applied for all treatments, including 100 kg N, 40 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> and 30 kg K<sub>2</sub>O/ha. The results showed that HTL1, HTL2, HTL5, HTL7, and HTL8 were promising hybrid lines as they had short growth periods and high yields with good heat-tolerance. These rice lines were adapted well to both Winter-Spring and Summer-Autumn crops as indicated by the analysis of rice line and environment interaction.

**Cited as:** Tran, L. V., Nguyen, L. T., Nguyen, P. T., & Bui, B. C. (2019). Evaluation of stability and adaptability of heat-tolerant rice lines in Mekong delta. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 1-9.

## Đánh giá tính ổn định và thích nghi của các dòng lúa chịu nóng tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long

Trần Văn Lọt<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Lang<sup>2</sup>, Nguyễn Trọng Phước<sup>2</sup> & Bùi Chí Bửu<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long, Cần Thơ

<sup>3</sup>Viện Khoa Học Kỹ Thuật Nông Nghiệp Miền Nam, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 15/01/2019

Ngày chỉnh sửa: 01/03/2019

Ngày chấp nhận: 22/03/2019

#### Từ khóa

Dòng lúa chịu nóng

Tính ổn định

Tính thích nghi

#### \*Tác giả liên hệ

Trần Văn Lọt

Email: tvlot@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Cùng với yếu tố năng suất cao và đặc tính nông học tốt, một giống mới được chọn phải có tính ổn định và có tính thích nghi cao trong các điều kiện môi trường khác nhau để gia tăng độ tin cậy về các đặc tính tốt của giống. Bởi vì, khi được trồng tại nhiều địa điểm khác nhau, một số tính trạng về nông học và năng suất có thể sẽ thay đổi do sự tương tác giữa gen và môi trường. Trong hai vụ trồng Đông - Xuân 2017 - 2018 và vụ Hè - Thu 2018 tại các tỉnh Long An, Cần Thơ, Hậu Giang, An Giang và Trà Vinh đã tiến hành đánh giá tính thích nghi và ổn định của các dòng lúa chịu nóng. Các thí nghiệm được bố trí theo khối đầy đủ ngẫu nhiên (RCBD) với ba lần lặp lại. Nền phân bón được áp dụng là 100 kg N, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> và 30 kg K<sub>2</sub>O/ha. Kết quả đã xác định có 5 dòng đẳng gen (NIL) triển vọng, ngắn ngày, năng suất cao, chịu nóng là HTL1, HTL2, HTL5, HTL7 và HTL8. Các dòng đẳng gen này thích nghi cả hai vụ Đông - Xuân và Hè - Thu thông qua kết quả phân tích tương tác giữa giống với môi trường.

### 1. Đặt Vấn Đề

Việt Nam là một trong số những nước nhiệt đới có khí hậu nóng quanh năm. Trong mùa hè, có những ngày nhiệt độ lên 37°C - 40°C (MARD, 2013), đây là ngưỡng gây hại cho cây lúa trong giai đoạn thụ phấn, thụ tinh. Do đó, việc nghiên cứu lai tạo và phát triển những dòng lúa có khả năng chống chịu sốc sinh lý (stress) do nhiệt độ cao là vô cùng bức thiết cho sản xuất lúa gạo tại miền Nam Việt Nam. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học về chọn giống đã lai tạo ra nhiều dòng lúa chịu nóng thích ứng với điều kiện biến đổi khí hậu.

Trong chọn tạo giống cây trồng nói chung và đối với cây lúa nói riêng, chọn lọc và đánh giá giống là những công đoạn quan trọng nhất. Cùng với yếu tố năng suất cao và đặc tính nông học tốt, giống được chọn phải có tính ổn định và có tính thích nghi cao trong các điều kiện môi trường khác nhau để gia tăng độ tin cậy về các đặc tính

tốt của giống. Bởi vì, khi được trồng tại nhiều địa điểm khác nhau, một số tính trạng về nông học và năng suất có thể sẽ thay đổi do sự tương tác giữa gen và môi trường. Tính ổn định thông thường bao hàm sự thống nhất trong biểu hiện tính trạng, có nghĩa là sự thay đổi tối thiểu giữa các môi trường đối với một kiểu gen cụ thể nào đó (Chahal & Gosal, 2002). Có những tính trạng do yếu tố di truyền bên trong chi phối; có những tính trạng do cả hai yếu tố di truyền và ngoại cảnh cùng chi phối với nhau hoặc có những tính trạng bị chi phối bởi ngoại cảnh (Bui & Nguyen, 2003; Bui, 2004). Điều này gây ra khó khăn trong việc chứng minh tính ưu việt của một giống nào đó.

Từ năm 2013, các nhà chọn giống tại Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long kết hợp với các chuyên gia Hàn Quốc đã lai tạo ra các dòng lúa chịu nóng bằng phương pháp lai hồi giao của các tổ hợp lai giữa giống lúa chịu nóng N22 và Dular với giống lúa AS996, là giống ngắn ngày năng suất

cao nhưng mẫn cảm với nhiệt độ nóng. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu phân tích tính ổn định và thích nghi trên tính trạng năng suất của các dòng lúa ngắn ngày chịu nóng triển vọng nhằm mục tiêu chọn lọc giống phù hợp cho từng vùng sinh thái khác nhau của Đồng bằng sông Cửu Long.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu bao gồm 8 dòng lúa chịu nóng triển vọng được chọn lọc từ hai tổ hợp lai hồi giao (AS996/N22; AS996/Dular) và giống N22 là giống đối chứng chịu nóng (nhập nội từ Viện Lúa quốc tế - IRRI) (Bảng 1).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm thực hiện trong hai vụ: Đông - Xuân 2017 - 2018 và vụ Hè - Thu 2018. Địa điểm thí nghiệm gồm: Hậu Giang, An Giang, Long An, Cần Thơ và Trà Vinh. Các thí nghiệm được thực hiện trên ruộng của nông dân, bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Thí nghiệm được thực hiện bằng phương pháp cây (15 × 20 cm, 1 tép/bụi), phân bón 100 kg N, 40 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> và 30 kg K<sub>2</sub>O/ha. Mẫu năng suất được thu hoạch là 10 m<sup>2</sup>. Năng suất được qui về 14% ẩm độ, sau đó qui ra đơn vị tấn/ha (IRRI, 2012).

Số liệu phân tích từng điểm, qua nhiều điểm bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm SAS 9.1, trắc nghiệm phân hạng theo kiểu Duncan. Dựa vào kết quả đánh giá khả năng cho năng suất của các dòng/giống lúa qua các địa điểm khác nhau để phân tích, đánh giá tính ổn định, tính thích nghi của các dòng/giống lúa bằng phần mềm phân tích tính ổn định và tính thích nghi của giống Version 3.0 của Nguyen & Le (2007) và các công thức tính toán theo mô hình của Eberhart & Russel (1966).

$$Y_{ij} = \mu_i + b_i I_j + \delta_{ij}$$

$Y_{ij}$ : Năng suất biểu hiện kiểu gen thứ  $i$  ( $i^{th}$ ) ở môi trường thứ  $j$  ( $j^{th}$ ).

$\mu$ : Năng suất trung bình của tất cả các kiểu gen trên tất cả môi trường.

$b_i$ : Hệ số hồi qui của kiểu gen  $i^{th}$  theo chỉ số môi trường.

$\delta_{ij}$ : Độ lệch từ hồi quy kiểu gen  $i^{th}$  ở môi trường  $j^{th}$ .

$I_j$ : Chỉ số môi trường và tính bằng công thức  $I_j = \Sigma Y_{ij}/G - \Sigma \Sigma Y_{ij}/GL$ .

Hệ số hồi qui  $b_i$  đo lường phản ứng của kiểu gen theo sự thay đổi môi trường. Sự thích nghi, ổn định của từng kiểu gen qua các môi trường được mô phỏng bằng phương trình hồi qui:  $Y_{ij} = x_i + b_i I_j$ .

Từ đó, năng suất của các giống có thể dự đoán theo phương trình hồi qui:  $Y = X_i + b_i I_j + S_{di}^2$ .

$X_i$ : năng suất trung bình của giống qua các môi trường.

Hệ số hồi qui  $b_i$  được tính theo công thức:

$b_i = \Sigma(Y_{ij}I_j)/\Sigma I_j^2$  với  $I_j = \Sigma Y_{ij}/G - \Sigma \Sigma Y_{ij}/GL$  ( $G$  - Số giống,  $L$  - Số điểm thí nghiệm).

Chỉ số ổn định được xác định theo công thức:

$$S_{di}^2 = \frac{\Sigma \delta_{ij}^2}{L - 2} - S_e^2$$

$$\text{với } \Sigma \delta_{ij}^2 = \Sigma Y_{ij}^2 - \frac{Y_i^2}{L} - \frac{(\Sigma Y_{ij} I_j^2)^2}{\Sigma I_j^2}$$

$S_e^2$ : Trung bình phương sai của kiểu gen trên tất cả môi trường.

$r$ : số lần lặp lại của một kiểu gen trên một môi trường.

Chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) của giống:

Nếu  $b_i = 1$  biểu thị tính thích nghi rộng của giống.

Nếu  $b_i < 1$  biểu thị giống thích nghi theo điều kiện môi trường bất lợi.

Nếu  $b_i > 1$  biểu thị tính thích nghi của giống theo điều kiện môi trường thuận lợi.

Chỉ số ổn định  $S_{di}^2$  của giống có xu hướng tiến đến 0 nếu:

$S_{di}^2 = 0$  được xem là ổn định;  $S_{di}^2 \neq 0$  thì không ổn định.

$S_{di}^2 > 0$  có ý nghĩa, giống sẽ có năng suất không ổn định. Không chấp nhận giả thuyết về tương tác gen và môi trường (G×E) tuyến tính.

Phân tích theo mô hình tương tác đa phương AMMI:

Mô hình tương tác đa phương AMMI do Ramagora và Fox (1993) đề xuất, được trích dẫn bởi Bui & Nguyen, 2003.

Mô hình tổng quát:  $Y_{ij} = \mu + g_i + e_j + d_{ij}$

Trong đó:

$Y_{ij}$ : Năng suất của giống thứ  $i^{th}$  ở môi trường thứ  $j^{th}$ .

$\mu$ : Năng suất trung bình trên tất cả các điểm.

**Bảng 1.** Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> (cm) trong ống Durham

| Tên giống <sup>1</sup> | Dòng lai    | Tổ hợp lai hồi giao | Đặc điểm                                           |
|------------------------|-------------|---------------------|----------------------------------------------------|
| HTL1                   | BC3-2-2-3-1 | AS996*4/N22         | Chịu nóng, ngăn ngày, năng suất cao, phẩm chất tốt |
| HTL2                   | BC3F2-1-9   | AS996*4/N22         | Ngăn ngày, năng suất cao, phẩm chất tốt, chịu nóng |
| HTL3                   | BC3-1-5     | AS996*4 Dular       | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng                |
| HTL4                   | BC3-32      | AS996*4/Dular       | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng                |
| HTL5                   | BC3F2-32    | AS996*4/N22         | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng                |
| HTL6                   | BC3F2-34    | AS996*4/N22         | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng                |
| HTL7                   | BC3F2-35    | AS996*4/N22         | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng                |
| HTL8                   | BC3F2-40    | AS996*4/N22         | Ngăn ngày, năng suất cao, chịu nóng, phẩm chất tốt |
| N22                    |             | Từ Hàn Quốc (IRRI)  | Ngăn ngày, chịu nóng                               |

<sup>1</sup>HTL: Heat-tolerant line.

$g_i$ : Độ lệch chuẩn với giá trị trung bình của giống  $i$ .

$e_j$ : Độ lệch chuẩn với giá trị trung bình của môi trường  $j$ .

$d_{ij}$ : Độ lệch chuẩn còn lại chưa được giải thích bởi  $\mu$ ,  $g_i$  và  $e_j$ .

Mô hình AMMI được phân tích trên phần mềm IRRISTAT 5.0 theo phương pháp thông dụng là xếp nhóm, phân tích thành phần chính đóng góp vào tính trạng theo dõi, xác định quan hệ giữa các kiểu gen thí nghiệm và giữa các môi trường canh tác.

### 3. Kết Quả và Thảo Luận

#### 3.1. Đánh giá tính ổn định, thích nghi về năng suất và tương tác giữa kiểu gen và môi trường của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

##### 3.1.1. Phân tích năng suất qua nhiều điểm của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

Phân tích qua nhiều điểm có thể giải thích tầm quan trọng sự biến đổi của giống, địa điểm và sự tương tác giữa giống và địa điểm. Tuy nhiên, sự phân tích này không thể xác định những giống nào ổn định hơn. Khi các giống được thử nghiệm qua nhiều điểm thì sự xếp hạng của các giống này có thể thay đổi từ địa điểm này đến địa điểm khác. Vì thế, nó trở nên khó để khuyến cáo giống nào là ưu việt (Nguyen & Le, 2007).

Kết quả Bảng 2 cho thấy năng suất của các dòng lai ở các địa điểm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) ngoại trừ điểm thí nghiệm tại Trà Vinh, trong đó đa số các dòng

đẳng gen cho năng suất cao khác biệt với dòng đẳng gen HTL3.

Phân tích phương sai (ANOVA) qua nhiều điểm cho thấy năng suất giữa các địa điểm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) và năng suất trung bình của các địa điểm giữa các dòng đẳng gen có sự khác biệt rất có ý nghĩa ( $P < 0,01$ ). Dòng đẳng gen HTL5 cho năng suất cao nhất (7,38 tấn/ha), khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các dòng đẳng gen HTL7, HTL8, HTL1, HTL2 nhưng khác biệt với các dòng đẳng gen còn lại và giống đối chứng N22.

Số liệu Bảng 2 cũng cho thấy chỉ số môi trường ( $I_j$ ) theo thứ tự từ môi trường thuận lợi đến kém thuận lợi: Cần Thơ = An Giang > Trà Vinh > Long An > Hậu Giang theo thứ tự: 0,133; 0,133; 0,052; 0,037; - 0,356.

##### 3.1.2. Phân tích ổn định, thích nghi các dòng lúa chịu nóng triển vọng về năng suất trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

Kết quả phân tích ANOVA cho phép xem xét mối tương tác giữa giống và môi trường ở đây là tuyến tính. Phân tích chỉ số ổn định và chỉ số thích nghi của các giống được đánh giá là quan trọng trong việc đánh giá một giống tốt. Giống ổn định về năng suất là giống có năng suất trung bình cao qua các địa điểm, có chỉ số ổn định ( $S^2_{di} \approx 0$ ) và thích nghi rộng ( $b_i \approx 1$ ). Nếu  $b_i < 1$ , biểu thị tính thích nghi theo điều kiện bất lợi. Nếu  $b_i > 1$ , biểu thị tính thích nghi theo điều kiện thuận lợi của môi trường. Nếu  $S^2_{di} \neq 0$ : giống không ổn định năng suất (Bui, 2003; Nguyen & Le, 2007; Nguyen & ctv., 2016).

Số liệu ở Bảng 3 cho thấy ba dòng đẳng gen HTL5, HTL7 và HTL8 cho năng suất trung bình

**Bảng 2.** Năng suất (tấn/ha) của bộ giống lúa khảo nghiệm tại 5 điểm vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

| Tên giống <sup>1</sup> | Cần Thơ | Long An | An Giang | Trà Vinh           | Hậu Giang | Trung bình         |
|------------------------|---------|---------|----------|--------------------|-----------|--------------------|
| HTL1                   | 7,46    | 7,20    | 7,23     | 7,37 a             | 6,32      | 7,12 <sup>ab</sup> |
| HTL2                   | 7,53    | 7,16    | 7,16     | 7,47 <sup>ab</sup> | 6,06      | 7,08 <sup>ab</sup> |
| HTL3                   | 7,03    | 6,60    | 6,76     | 6,17 <sup>c</sup>  | 6,53      | 6,64 <sup>b</sup>  |
| HTL4                   | 6,73    | 6,66    | 6,83     | 7,27 ab            | 6,73      | 6,85 <sup>ab</sup> |
| HTL5                   | 7,46    | 7,60    | 7,73     | 7,37 <sup>ab</sup> | 6,73      | 7,38 <sup>a</sup>  |
| HTL6                   | 6,86    | 7,10    | 6,76     | 7,03 <sup>ab</sup> | 6,86      | 6,93 <sup>ab</sup> |
| HTL7                   | 7,16    | 6,93    | 7,63     | 7,33 <sup>ab</sup> | 7,06      | 7,23 <sup>a</sup>  |
| HTL8                   | 7,26    | 7,40    | 7,50     | 7,30 <sup>bc</sup> | 6,96      | 7,29 <sup>a</sup>  |
| N22                    | 7,03    | 6,93    | 6,93     | 6,53 <sup>bc</sup> | 6,86      | 6,86 <sup>ab</sup> |
| Trung bình             | 7,17    | 7,08    | 7,17     | 7,09               | 6,68      | 7,04               |
| CV (%)                 | 4,68    | 7,07    | 7,15     | 6,51               | 6,61      | 6,46               |
| Prob.                  | > 0,05  | > 0,05  | > 0,05   | < 0,05             | > 0,05    | < 0,01             |
| Chỉ số I <sub>j</sub>  | 0,133   | 0,037   | 0,133    | 0,052              | -0,356    |                    |

<sup>1</sup>HTL: Heat-tolerant line.

<sup>a-c</sup>Trong cùng một cột, các số có cùng chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$  và  $0,01$  theo trắc nghiệm Duncan.

**Bảng 3.** Năng suất trung bình (tấn/ha), chỉ số ổn định và chỉ số thích nghi của các dòng lúa trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

| Tên giống <sup>1</sup> | Năng suất trung bình giống nhau, dùng để nhận xét chỉ số $S_{di}^2$ và $b_i$ | Chỉ số ổn định ( $S_{di}^2$ ) | Chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) | Sai số chuẩn của chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| HTL1                   | 7,12 <sup>abc</sup>                                                          | - 0,051                       | 2,149*                      | 0,324                                        |
| HTL2                   | 7,08 <sup>abc</sup>                                                          | - 0,020                       | 2,744*                      | 0,543                                        |
| HTL3                   | 6,64 <sup>c</sup>                                                            | 0,053                         | 0,512                       | 0,858                                        |
| HTL4                   | 6,85 <sup>bc</sup>                                                           | 0,006                         | 0,232                       | 0,673                                        |
| HTL5                   | 7,38 <sup>a</sup>                                                            | - 0,045                       | 1,783                       | 0,378                                        |
| HTL6                   | 6,93 <sup>abc</sup>                                                          | - 0,044                       | 0,024*                      | 0,386                                        |
| HTL7                   | 7,23 <sup>ab</sup>                                                           | 0,009                         | 0,589                       | 0,686                                        |
| HTL8                   | 7,29 <sup>ab</sup>                                                           | - 0,057                       | 0,870                       | 0,268                                        |
| N22                    | 6,86 <sup>bc</sup>                                                           | - 0,020                       | 0,098                       | 0,541                                        |

<sup>1</sup>HTL: Heat-tolerant line.

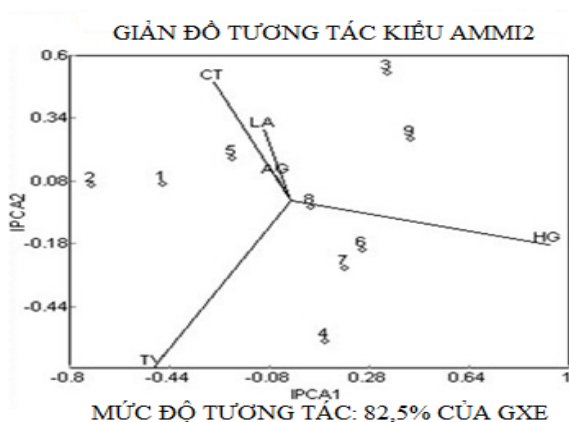
<sup>a-c</sup>Trong cùng một cột, các số có cùng chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,01$  theo trắc nghiệm Duncan; \*: có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$  ( $b_i \neq 1$ ).

cao lần lượt là 7,78; 7,23 và 7,29 tấn/ha, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với nhau; có chỉ số ổn định  $S_{di}^2 \approx 0$  ( $P > 0,05$ ); chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) từ 0,589 đến 1,783  $\approx 1$  ( $P > 0,05$ ). Do đó, các dòng đẳng gen này ổn định về năng suất và thích nghi rộng. Đặc biệt, dựa vào số liệu Bảng 3 cũng cho thấy dòng đẳng gen HTL1 và HTL2 có năng suất trung bình cao, ổn định ( $S_{di}^2 \approx 0$ ) không khác biệt với HTL5, HTL7 và HTL8 nhưng thích nghi với môi trường thuận lợi ( $b_i > 1$ ).

### 3.1.3. Phân nhóm kiểu gen và môi trường của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018

Giản đồ Biplot (Hình 1) cho thấy sự tương tác kiểu gen với môi trường đạt 82,5% theo mô hình AMMI 2. Giản đồ cho thấy mỗi dòng đẳng gen có sự tương tác với môi trường khác nhau. Những dòng đẳng gen phân bố gần điểm giao nhau của các đường thẳng thì thích nghi rộng với môi trường đó. Và cũng theo lý thuyết mô hình AMMI 2 (Nguyen, 2002), dòng đẳng gen HTL8 nằm gần trục trung tâm do đó thích nghi rộng

với tất cả các môi trường.

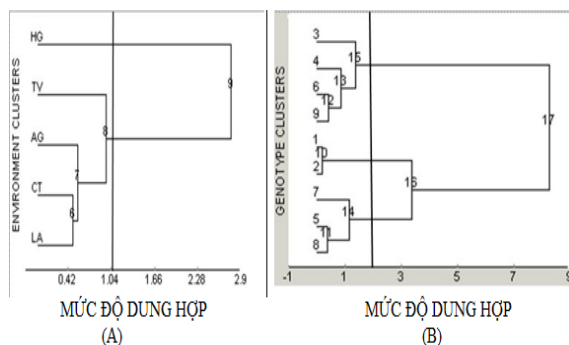


**Hình 1.** Giản đồ Biplot tương tác kiểu gen và môi trường theo mô hình AMMI2.

Dòng lai: 1. HTL1, 2. HTL2, 3. HTL3, 4. HTL4, 5. HTL5, 6. HTL6, 7. HTL7, 8. HTL8, 9. N22 (đ/chứng). HTL: Heat-tolerant line.

Địa điểm: AG: An Giang, CT: Cần Thơ, HG: Hậu Giang, LA: Long An, TV: Trà Vinh.

Giản đồ phân nhóm môi trường theo mô hình AMMI của các dòng lúa trồng vụ Đông - Xuân 2017 - 2018 được trình bày ở Hình 2(A). Giữa các nhóm môi trường có sự khác biệt khá lớn với mức độ dung hợp (Fusion level) từ 0,42 đến 2,90; dựa vào mức độ dung hợp 1,04 chia các địa điểm trồng thành 2 nhóm: Nhóm 1 gồm Cần Thơ, Long An, An Giang và Trà Vinh; năng suất trung bình cao từ 7,08 đến 7,17 tấn/ha; Nhóm 2: Hậu Giang; năng suất thấp 6,68 tấn/ha.



**Hình 2.** Phân nhóm môi trường (A) và kiểu gen (B) của các dòng lai qua 5 môi trường vụ Đông - Xuân 2017 - 2018. AG: An Giang, CT: Cần Thơ, HG: Hậu Giang, LA: Long An, TV: Trà Vinh.

Giản đồ phân nhóm kiểu gen của các dòng lúa thí nghiệm trong vụ Đông - Xuân năm 2017 -

2018 được thể hiện qua Hình 2(B). Qua giản đồ này thì các kiểu gen giống nhau thì xếp cùng nhóm và ở mức dung hợp 1,98 và với hệ số xác định ( $R^2 = 0,727$ ) so sánh UPGMA hệ số Euclid bằng phần mềm SAS 9.1 chia các dòng đẳng gen thành 3 nhóm: Nhóm 1 có ba dòng đẳng gen HTL3, HTL4, HTL6 và giống đối chứng N22; trong nhóm này các dòng đẳng gen đạt năng suất thấp theo thứ tự là 6,64 tấn/ha; 6,85; 6,93 và 6,86 tấn/ha; Nhóm 2: Hai dòng đẳng gen HTL1 và HTL2 với biểu hiện năng suất tương đối cao theo thứ tự là 7,12 tấn/ha và 7,08 tấn/ha; Nhóm 3: Ba dòng đẳng gen HTL7, HTL8 và HTL5; các dòng đẳng gen này cho năng suất rất cao theo thứ tự là 7,23; 7,28 và 7,38 tấn/ha.

### 3.2. Đánh giá tính ổn định, thích nghi về năng suất và tương tác giữa kiểu gen và môi trường của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Hè - Thu năm 2018

#### 3.2.1. Phân tích qua nhiều điểm các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Hè - Thu năm 2018

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy phân tích phương sai (ANOVA) qua nhiều điểm năng suất ở các địa điểm khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ ) và năng suất trung bình của các địa điểm thí nghiệm giữa các dòng lai có sự khác biệt rất có ý nghĩa ( $P < 0,01$ ). Có bốn dòng đẳng gen cho năng suất tương đương nhau khác biệt có ý nghĩa thống kê so với giống đối chứng N22. Trong đó, dòng đẳng gen HTL7 đạt năng suất cao nhất 5,97 tấn/ha, dòng đẳng gen HTL8 đạt 5,84 tấn/ha. Hai dòng đẳng gen này cũng cho năng suất cao nhất ở vụ Đông - Xuân 2017 - 2018.

Số liệu ở Bảng 4 cũng cho thấy chỉ số môi trường ( $I_j$ ) theo thứ tự từ môi trường thuận lợi đến kém thuận lợi: Hậu Giang > Trà Vinh > An Giang > Long An > Cần Thơ theo thứ tự: 0,373; 0,096; 0,062; - 0,156; - 0,375.

#### 3.2.2. Phân tích ổn định, thích nghi các dòng lúa chịu nóng triển vọng về năng suất trồng vụ Hè - Thu 2018

Kết quả trình bày ở Bảng 5 cho thấy ba dòng đẳng gen HTL 6, HTL7 và HTL8 cho năng suất trung bình cao theo thứ tự: 5,89; 5,97 và 5,84 tấn/ha, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với nhau, có chỉ số ổn định  $S^2_{di} \approx 0$  ( $P > 0,05$ ), chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) theo thứ tự: 1,441; 1,62 và  $1,89 \approx 1$  ( $P > 0,05$ ). Do đó, các dòng đẳng gen này ổn định về năng suất và thích nghi rộng.

**Bảng 4.** Năng suất (tấn/ha) của bộ giống lúa khảo nghiệm tại 5 địa điểm vụ Hè - Thu 2018

| Tên giống <sup>1</sup>        | Cần Thơ | Long An | An Giang | Trà Vinh | Hậu Giang | Trung bình         |
|-------------------------------|---------|---------|----------|----------|-----------|--------------------|
| HTL1                          | 5,43    | 5,57    | 5,30     | 5,60     | 6,13      | 5,60 <sup>ab</sup> |
| HTL2                          | 5,00    | 5,67    | 5,57     | 5,77     | 5,67      | 5,53 <sup>ab</sup> |
| HTL3                          | 5,20    | 5,77    | 5,67     | 5,03     | 6,37      | 5,60 <sup>ab</sup> |
| HTL4                          | 5,67    | 5,40    | 5,87     | 5,37     | 5,60      | 5,58 <sup>ab</sup> |
| HTL5                          | 5,77    | 5,37    | 5,53     | 6,00     | 6,10      | 5,75 <sup>a</sup>  |
| HTL6                          | 5,70    | 5,20    | 5,93     | 6,00     | 6,60      | 5,87 <sup>a</sup>  |
| HTL7                          | 5,37    | 5,40    | 6,08     | 6,70     | 6,30      | 5,97 <sup>a</sup>  |
| HTL8                          | 4,96    | 5,50    | 6,27     | 6,20     | 6,27      | 5,84 <sup>a</sup>  |
| N22                           | 4,30    | 5,50    | 5,13     | 4,97     | 5,10      | 5,00 <sup>b</sup>  |
| Trung bình                    | 5,27    | 5,49    | 5,70     | 5,74     | 6,02      | 5,64               |
| CV(%)                         | 10,56   | 11,93   | 14,24    | 15,81    | 9,34      | 12,62              |
| Prob.                         | > 0,05  | > 0,05  | > 0,05   | > 0,05   | > 0,05    | < 0,01             |
| Chỉ số ( $I_j$ ) trường $I_j$ | -0,375  | -0,156  | 0,062    | 0,096    | 0,373     |                    |

<sup>1</sup>HTL: Heat-tolerant line.<sup>a-b</sup>Trong cùng một cột, các số có cùng chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,01$  theo trắc nghiệm Duncan.**Bảng 5.** Năng suất trung bình (tấn/ha), chỉ số ổn định và chỉ số thích nghi của các dòng lúa trồng vụ Hè - Thu năm 2018

| Tên giống <sup>1</sup> | Năng suất trung bình | Chỉ số ổn định ( $S^2_{di}$ ) | Chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) | Sai số chuẩn của chỉ số thích nghi ( $b_i$ ) |
|------------------------|----------------------|-------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------|
| HTL1                   | 5,61 <sup>ab</sup>   | - 0,099                       | 0,782                       | 0,469                                        |
| HTL2                   | 5,53 <sup>ab</sup>   | - 0,111                       | 0,798                       | 0,427                                        |
| HTL3                   | 5,61 <sup>ab</sup>   | 0,062                         | 1,135                       | 0,853                                        |
| HTL4                   | 5,58 <sup>ab</sup>   | - 0,113                       | 0,002*                      | 0,420                                        |
| HTL5                   | 5,75 <sup>ab</sup>   | - 0,083                       | 0,614                       | 0,522                                        |
| HTL6                   | 5,89 <sup>a</sup>    | - 0,045                       | 1,441                       | 0,624                                        |
| HTL7                   | 5,97 <sup>a</sup>    | - 0,000                       | 1,621                       | 0,730                                        |
| HTL8                   | 5,84 <sup>a</sup>    | - 0,091                       | 1,893                       | 0,497                                        |
| N22                    | 5,00 <sup>b</sup>    | 0,033                         | 0,714                       | 0,799                                        |
| Prob.                  | < 0,01               |                               |                             |                                              |

<sup>1</sup>HTL: Heat-tolerant line.<sup>a-b</sup>Trong cùng một cột, các số có cùng chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,01$  theo trắc nghiệm Duncan; \*: có ý nghĩa thống kê ở mức  $P < 0,05$  ( $b_i \neq 1$ ).

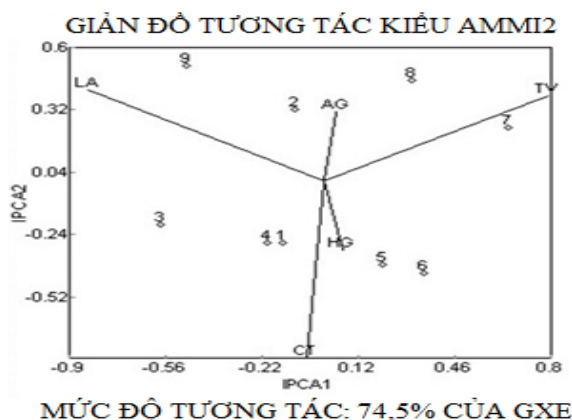
### 3.2.3. Phân nhóm kiểu gen và môi trường của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trồng vụ Hè - Thu năm 2018

Giản đồ Biplot (Hình 3) cho thấy sự tương tác kiểu gen với môi trường đạt 74,5% theo mô hình AMMI2. Giản đồ cho thấy mỗi dòng lúa có sự tương tác với môi trường khác nhau. Dòng đẳng gen HTL7 nằm gần đường thẳng của điểm Trà Vinh nên cho năng suất cao và thích nghi rộng với môi trường này.

Giản đồ phân nhóm môi trường theo mô hình AMMI của các dòng đẳng gen trồng vụ Hè - Thu 2018 được trình bày ở Hình 4A. Giữa các nhóm môi trường có sự khác biệt khá lớn với

mức độ dung hợp (Fushion level) từ -0,2 đến 3,60; dựa vào mức độ dung hợp 1,2 chia các địa điểm thí nghiệm thành 3 nhóm: Nhóm 1 gồm hai môi trường khảo nghiệm là Cần Thơ và Hậu Giang; tại môi trường Hậu Giang năng suất đạt cao nhất 6,02 tấn/ha; Nhóm 2 gồm một môi trường là Long An; năng suất đạt 5,49 tấn/ha; Nhóm 3 gồm hai môi trường thí nghiệm An Giang và Trà Vinh. Tại hai môi trường này năng suất các dòng lai đạt tương đương nhau và đạt khá cao. Điểm An Giang đạt 5,7 tấn/ha và điểm Trà Vinh đạt 5,74 tấn/ha.

Giản đồ phân nhóm kiểu gen của các dòng lúa khảo nghiệm trong vụ Hè - Thu năm 2018 được



**Hình 3.** Giản đồ Biplot tương tác kiểu gen và môi trường theo mô hình AMMI2.

Dòng lai: 1. HTL1, 2. HTL2, 3. HTL3, 4. HTL4, 5. HTL5, 6. HTL6, 7. HTL7, 8. HTL8, 9. N22 (đ/chứng). HTL: Heat-tolerant line.

Địa điểm: AG: An Giang, CT: Cần Thơ, HG: Hậu Giang, LA: Long An, TV: Trà Vinh.

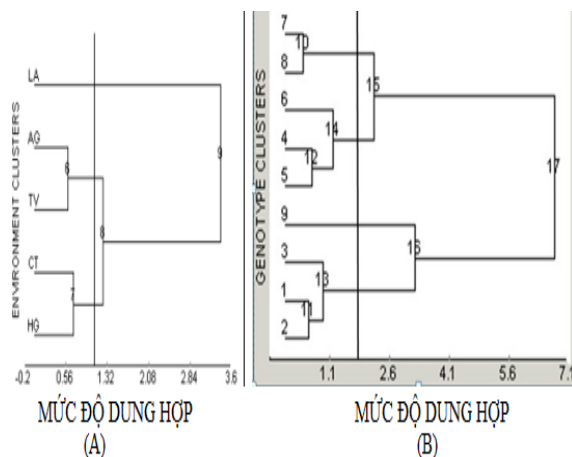
thể hiện qua Hình 4B. Qua giản đồ này thì các kiểu gen giống nhau thì xếp cùng nhóm và ở mức dung hợp 1,8 và với hệ số xác định ( $R^2 = 0,763$ ) so sánh UPGMA hệ số Euclidean bằng phần mềm SAS 9.1 chia các dòng lúa thành 4 nhóm: Nhóm 1 có duy nhất giống đối chứng N22; đạt năng suất thấp nhất 5,00 tấn/ha; Nhóm 2: Ba dòng đẳng gen HTL1, HTL2 và HTL3 với biểu hiện năng suất tương đối cao theo thứ tự là 5,61; 5,53 và 5,61 tấn/ha; Nhóm 3: Ba dòng đẳng gen HTL4, HTL5 và HTL6; các dòng lúa này cho năng suất cao theo thứ tự là 5,58; 5,75 và 5,89 tấn/ha; Nhóm 4: Hai dòng đẳng gen HTL7 và HTL8. Các dòng đẳng gen này cho năng suất rất cao theo thứ tự là 5,97 và 5,84 tấn/ha.

Tóm lại, qua phân tích tính ổn định, thích nghi của các dòng lúa chịu nóng triển vọng trong hai vụ Đông - Xuân 2017 - 2018 và vụ Hè - Thu 2018 theo mô hình tuyến tính của Eberhart & Russell (1966) cho thấy dòng đẳng gen HTL8 cho năng suất cao ổn định, thích nghi rộng qua hai vụ.

## 4. Kết Luận và Đề Nghị

### 4.1. Kết luận

Kết quả thí nghiệm về phân tích tính ổn định về năng suất của tám dòng lúa chịu nóng triển vọng qua hai vụ Đông - Xuân 2017- 2018 và Hè - Thu 2018 qua năm tỉnh Cần Thơ, Long An,



**Hình 4.** Phân nhóm môi trường (A) và kiểu gen (B) của các dòng lai qua 5 môi trường vụ Hè - Thu 2018. AG: An Giang, CT: Cần Thơ, HG: Hậu Giang, LA: Long An, TV: Trà Vinh.

An Giang, Trà Vinh và Hậu Giang đã xác định có 5 dòng lúa triển vọng, ngắn ngày, năng suất cao, chịu nóng được chọn lọc là HTL1, HTL2, HTL5, HTL7 và HTL8. Các dòng lúa này thích nghi cả hai vụ Đông - Xuân và Hè - Thu thông qua kết quả phân tích tương tác giữa giống với môi trường. Trong đó, dòng lúa HTL8 cho năng suất cao ổn định, thích nghi rộng qua hai vụ, đây là dòng lúa có triển vọng có thể đưa vào khảo nghiệm các bước tiếp theo.

### 4.2. Đề nghị

Dòng lúa HTL8 cho năng suất cao, ổn định, thích nghi rộng qua hai vụ, đây là dòng lúa có triển vọng có thể đưa vào khảo nghiệm có hệ thống, nhanh chóng phát triển trong sản xuất.

## Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bui, B. C. (2004). Selection of rice varieties by the traditional method of improving rice varieties to meet the requirements of agricultural development till 2010. In *National conference on selection of rice varieties*. Can Tho, Vietnam: Cuu Long Delta Rice Research Institute.
- Bui, B. C., & Nguyen, L. T. (2003). A textbook of quantitative genetics. Ha Noi, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Chahal, G. S., & Gosal, S. S. (2002). Genetic transformation and production of transgenic plants. In *Principles and Procedures of Plant Breeding - Biotechnical and Convention Approaches* (486-508). Pangbourne, UK: Narosa Publishing House.

- Eberhart, S. A., & Russel, W. L. (1966). Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science* 6(1), 36-40.
- IRRI (International Rice Research Institute). (2013). Standard evaluation system for rice (5<sup>th</sup> ed.). Manila, Philippines: IRRI.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2013). Summation meeting of rice production in 2012 and plan for the year 2013 in South Vietnam. Ha Noi, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Nguyen, H. D., & Le, K. Q. (2007). Analysis stability index in plant breeding. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences* 5(1), 67-72.
- Nguyen, L. T. (2002). Statistical lectures: gene and environment interaction. Cuu Long Delta Rice Research Institute, Can Tho, Vietnam.
- Nguyen, L. T., Pham, T. C., Nguyen, H. N., Tran, X. T. T., & Bui, B. C. (2016). Evaluation of genotype and environment interaction of salt-tolerant rice varieties in Mekong delta. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* 68, 40-44.

## Effects of different nitrogen fertilizer levels on yield, leave color, and content of bioactive compounds of *Pouzolzia zeylanica* L. Benn

Tuyen T. X. Vo<sup>1\*</sup>, Tan D. Nguyen<sup>1</sup>, & Thuy M. Nguyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture and Natural Resources, An Giang University, An Giang, Vietnam

<sup>1</sup>College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: November 10, 2018

Revised: January 05, 2019

Accepted: February 18, 2019

#### Keywords

Bioactive compounds

Color of leaves

Nitrogen fertilizer level

*Pouzolzia zeylanica* plant

#### \*Corresponding author

Vo Thi Xuan Tuyen

Email: vtxtuyen@agu.edu.vn

### ABSTRACT

The study was carried out to investigate the effect of 4 levels of nitrogen fertilizer (10, 15, 20 and 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup>) applied on the color of leaves (chlorophyll index SPAD and the red-purple color by a\* value in Hunter' color system), yield and bioactive compounds content (anthocyanin, flavonoid, polyphenol and tannin) of *Pouzolzia zeylanica* plant. The results showed that different nitrogen fertilizer levels had significant effects ( $P \leq 0.05$ ) on leave color, yield and content of bioactive compounds of this plant. At the level of 20 kg urea/1000 m<sup>2</sup>, the leaves had red-purple color and the obtained a\* value was 8.06; the index of chlorophyll SPAD was 38.36; the yield was 1.64 ton/1000 m<sup>2</sup>, and the content of bioactive compounds was higher than other nitrogen fertilizer levels. The contents of anthocyanin, flavonoid, polyphenol and tannin were 0.296 mg CE/g dried material (DM), 5.03 mg QE/g DM, 15.54 mg GAE/g DM and 10.05 mg TAE/g DM, respectively.

**Cited as:** Vo, T. T. X., Nguyen, T. D., & Nguyen, T. M. (2019). Effects of different nitrogen fertilizer levels on yield, leave color, and content of bioactive compounds of *Pouzolzia zeylanica* L. Benn. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 10-18.

## Ảnh hưởng của mức bón phân đạm lên năng suất, màu sắc lá và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây thuốc dòi (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn)

Võ Thị Xuân Tuyền<sup>1\*</sup>, Nguyễn Duy Tân<sup>1</sup> & Nguyễn Minh Thủy<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Nông Nghiệp và Tài Nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại Học An Giang, An Giang

<sup>2</sup>Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 10/11/2018

Ngày chỉnh sửa: 05/01/2019

Ngày chấp nhận: 18/02/2019

#### Từ khóa

Các hợp chất có hoạt tính sinh học

Cây thuốc dòi

Màu sắc lá

Mức độ bón phân đạm

#### \*Tác giả liên hệ

Võ Thị Xuân Tuyền

Email: vtxtuyen@agu.edu.vn

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của 4 mức độ bón phân đạm (10, 15, 20 và 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup>) lên màu sắc lá (chỉ số diệp lục tố SPAD và giá trị a\* trong hệ màu Hunter), năng suất và hàm lượng các hợp chất sinh học (anthocyanin, flavonoid, polyphenol và tannin) của cây thuốc dòi. Kết quả cho thấy khi thay đổi các mức độ bón phân đạm khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt lên màu sắc lá, năng suất và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học của cây thuốc dòi ( $P \leq 0,05$ ). Ở mức đạm bón 20 kg urea/1000 m<sup>2</sup>, lá có màu tím đỏ và giá trị a\* đo được là 8,06; chỉ số diệp lục tố SPAD là 38,36; năng suất 1,64 tấn/1000 m<sup>2</sup> và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học đều cao hơn so với các mức đạm khác. Hàm lượng anthocyanin, flavonoid, polyphenol và tannin lần lượt là 0,296 mg CE/g nguyên liệu khô (DM); 5,03 mg QE/g DM; 15,54 mg GAE/g DM và 10,05 mg TAE/g DM.

### 1. Đặt Vấn Đề

Cây thuốc dòi có tên khoa học *Pouzolzia zeylanica* L. Benn, thuộc họ Gai (*Urticaceae*), phát triển tốt ở điều kiện khí hậu Việt Nam và được trồng phổ biến ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long. Theo Đông y, cây thuốc dòi có vị ngọt nhạt, tính mát, có tác dụng chỉ khát, tiêu đờm, dùng chữa ho lâu ngày, ho lao, viêm họng và viêm thanh phế quản. Bên cạnh đó, cây thuốc dòi có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học cao như isoflavone, alkaloid, polyphenol, tannin, flavonoid và glycoside. Những chất này có khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế sự phát triển của tế bào và ngăn ngừa ung thư (Le, 2007; Paul & Saha, 2012; Vo, 2012).

Ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, cây thuốc dòi được người dân sử dụng như một loại rau để ăn sống, nấu canh hoặc phối hợp với các loại nguyên liệu khác như mã đề, rễ tranh, lá dứa, mía lau... nấu nước uống để bồi dưỡng cơ thể,

thanh nhiệt và trị ho. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học không những quan tâm đặc biệt về thực vật làm thuốc mà còn nghiên cứu chiết tách và thử nghiệm tác dụng trị bệnh của chúng để tìm kiếm những hợp chất mới thay thế những chất hóa học mà có thể hạn chế được những tác dụng phụ trong điều trị bệnh. Nhiều công ty và doanh nghiệp không ngừng nghiên cứu và đẩy mạnh việc ứng dụng cây thuốc vào sản xuất thực phẩm chức năng và dược phẩm.

Tuy nhiên, việc nghiên cứu trên cây thuốc dòi hiện nay còn rất ít. Đặc biệt là kỹ thuật canh tác hầu như chưa được nghiên cứu. Phần lớn cây thuốc dòi được trồng xen canh trong các vườn cây ăn trái với diện tích nhỏ và chỉ xem là cây trồng phụ. Theo Chu & ctv. (2006), cây thuốc cần nhiều chất dinh dưỡng để sinh trưởng, phát triển, ra hoa và làm củ. Cung cấp nitơ có ảnh hưởng lớn đến bộ máy quang hợp như sự phát triển của lá, diện tích lá, quá trình sinh tổng hợp protein và chlorophyll và ảnh hưởng đến quá trình quang hợp của thực

vật (Bojović & Marković, 2009). Phân đạm là một trong những loại phân thiết yếu giúp cho cây tăng trưởng nhanh, gia tăng diện tích lá. Nếu bón thiếu đạm cây sẽ cằn cỗi, lá vàng, hoa không trổ hoặc thưa, ngược lại bón đạm nhiều cây mọc vống, hoa quả ít, củ ít tinh bột, khó chế biến và phẩm chất kém. Tất cả các chất dùng để bón đều cần được áp dụng một cách tiết kiệm theo đúng nhu cầu cụ thể của loài cây thuốc và khả năng cung cấp của đất (WHO, 2003). Do đó, để đáp ứng được cho ngành công nghiệp sản xuất thuốc thì cần phải có những nghiên cứu về quy trình kỹ thuật canh tác, trong đó chế độ bón phân cũng là một trong những nhân tố có ảnh hưởng rất lớn đến năng suất, màu sắc lá và sự tổng hợp các chất có hoạt tính sinh học trong cây thuốc dồi.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên cây thuốc dồi thân tím đỏ (*Pouzolzia zeylanica* L. Benn). Nguồn giống hom được lấy từ một hộ nông dân trồng cây thuốc dồi tại xã Hòa Bình, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang. Phân đạm sử dụng là phân đạm Phú Mỹ.

Thiết bị sử dụng: Máy đo diệp lục tố (SPAD 502, Nhật); máy đo màu (Chroma Meter CR-400, Nhật); máy nghiền dược liệu (Polymix 90D, Thụy sĩ); máy đo hấp thụ quang phổ (SP-1920, Nhật); bể điều nhiệt (Memmert, Pháp), Vortex.

Hóa chất: Thuốc thử Folin-cioalteau, Folin-denis và các chất chuẩn gallic acid, quercetin, tannic acid được mua từ công ty hóa chất Sigma (St. Louis, Mo. USA). Aluminum chloride, sodium carbonate, sodium acetate, glacial acetic acid, potassium chloride, hydrochloric acid and ethanol được mua từ công ty Analytical Reagent (Xilong Chemical Co. Ltd., China).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí tại khu Thực nghiệm Trường Đại học An Giang. Thời gian thực hiện từ tháng 8 - 10/2016. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên với một nhân tố và 3 lần lặp lại. Nhân tố là mức độ bón phân đạm được khảo sát ở (10, 15, 20, 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup>), tương ứng với các mức đạm bón lần lượt là 60, 90, 120 và 150 g trên diện tích lô 6 m<sup>2</sup> cho mỗi

thí nghiệm (Hình 1).



Hình 1. Một số hình ảnh trong bố trí thí nghiệm, trồng và thu hoạch cây thuốc dồi.

#### 2.2.2. Kỹ thuật trồng và chăm sóc

Cách chọn hom: Chủ yếu lấy hom từ ngọn không quá non hoặc quá già nhằm giúp hom nhanh ra rễ và sinh trưởng khỏe. Chiều dài hom trung bình khoảng 10 - 15 cm.

Cách trồng: Sử dụng 3 hom/hốc, sau 5 - 7 ngày sau khi trồng (NSKT) tiến hành dặm lại những chỗ hom mọc không đều để đảm bảo đúng mật độ trồng (20 × 20 cm).

Bón phân: Đầu vụ trồng bón lót phân Super lân (30 kg/1000 m<sup>2</sup>), phân kali (30 kg/1000 m<sup>2</sup>), phân chuồng (phân bò) 2 tấn/1000 m<sup>2</sup>. Đối với phân urea chia làm 3 lần bón ở 15, 30 và 45 ngày sau khi trồng với tỷ lệ bón là 1/3 trên tổng lượng phân cần bón.

Cách thu hoạch và tiêu chuẩn thu hoạch: Dùng dao hoặc kéo bén để thu hoạch cây thuốc dồi, cắt chừa phần gốc còn lại khoảng 5 cm. Thu hoạch khi cây có chiều cao 25 - 30 cm (thời gian sinh trưởng 2 tháng sau khi trồng).

#### 2.2.3. Phân tích các chỉ tiêu hóa lý

Phân tích đất trước khi trồng: Phân tích hàm lượng đạm tổng số theo phương pháp Micro - Kjeldahl; lân tổng số theo phương pháp Loren; chất hữu cơ theo phương pháp Walkley Black, kali trao đổi và pH nước của đất (Truong, 1994; Do, 1999; Ngo, 2005). Cách lấy mẫu đất: lấy ở 5

điểm ngẫu nhiên cho mỗi lần lặp lại sau đó trộn lại thành một mẫu. Số mẫu đất phân tích 3 mẫu.

Do màu sắc của lá: Giá trị màu  $a^*$  bằng máy (Chroma Meter CR-400, Nhật), chỉ số diện lục tổ bằng máy (Konica Minolta SPAD 502, Nhật). Đo vị trí lá thứ 3 và ở giữa lá trên 10 cây khác nhau cho mỗi mẫu thí nghiệm.

Năng suất thực tế: Thu hoạch toàn cây thuốc dồi trong lô thí nghiệm, cân khối lượng tươi và sau đó qui ra trên 1000 m<sup>2</sup>.

Trọng lượng tươi: Thu 5 bụi cho một ô thí nghiệm theo hình chéo góc, cân trọng lượng tươi lúc thu hoạch.

Trọng lượng khô: Cho các mẫu cây tươi vào túi giấy đem sấy ở 60°C đến khi mẫu khô hoàn toàn rồi đem mẫu cân (trừ túi giấy) thu được trọng lượng khô.

#### 2.2.4. Phân tích hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học

Qui trình ly trích mẫu: Cây thuốc dồi sau khi thu hoạch → Rửa sạch loại bỏ tạp chất → Phơi khô (để trong túi giấy phơi 3 - 5 ngày, ẩm ≤ 12%) → Nghiền mịn (qua rây đường kính 3 mm) → Trích ly (5 g bột, 100 mL cồn 60% ở 60°C trong thời gian 60 phút, lặp lại 2 lần, trên bể điều nhiệt) → Lọc qua giấy lọc Whatman's No.1 → Dịch trích → Phân tích.

Phân tích anthocyanin theo phương pháp pH vi sai (Ahmed & ctv., 2013; Santos & ctv., 2013): Hút 2 mL các mẫu dịch trích nguyên chất cho vào các bình định mức 50 mL, sau đó định mức đến vạch bằng dung dịch đệm CH<sub>3</sub>COONa pH = 4,5 và dung dịch đệm KCl pH = 1,0. Lắc đều và để ổn định trong 15 phút rồi tiến hành đo độ hấp thụ của các mẫu ở bước sóng 520 nm và 700 nm. Hàm lượng anthocyanin được tính toán theo công thức: Hàm lượng anthocyanin (mg/L) =  $(A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times 1)$ . Trong đó,  $A = [(A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) \text{ pH } 1,0] - [(A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}}) \text{ pH } 4,5]$ ; MW (khối lượng phân tử của cyanidin-3-glycoside) = 449,2 g/mol; DF (hệ số pha loãng);  $\epsilon$  = 26900 hệ số hòa tan của cyanidin-3-glycoside, lít/mol/cm; 1 = chiều dài của cuvet, cm; 1000 = hệ số chuyển đổi từ gram thành miligram.

Phân tích flavonoid theo phương pháp Aluminium Chloride Colorimetric (Eswari & ctv., 2013; Mandal & ctv., 2013). Hút 1 mL các mẫu dịch trích đã pha loãng/dung dịch chuẩn với nồng độ khác nhau cho vào ống nghiệm. Sau đó, cho

tiếp 3 mL ethanol, 0,2 mL dung dịch AlCl<sub>3</sub> 10%, 2 mL dung dịch CH<sub>3</sub>COONa 1 M và 5,8 mL nước cất. Các ống nghiệm được lắc đều với vortex. Giữ yên ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng ở 415 nm. Hàm lượng flavonoid được tính toán dựa vào đường chuẩn quercetin pha trong ethanol ( $y = 0,0054x + 0,0026$  và  $r^2 = 0,9995$ ), kết quả thể hiện là miligram đương lượng quercetin trên gram nguyên liệu khô (mg QE/g DM).

Phân tích polyphenol theo phương pháp Folin-Ciocalteu (Hossain & ctv., 2013). Hút 0,2 mL dịch trích đã pha loãng trong ethanol vào ống nghiệm và thêm 1,5 mL dung dịch thuốc thử Folin-Ciocalteu 10%. Sau đó, các ống nghiệm được giữ trong tối 5 phút. Cuối cùng, cho thêm 1,5 mL dung dịch Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% và lắc đều với vortex. Đem các ống nghiệm giữ trong tối 2 giờ. Sau đó, đo độ hấp thụ ở bước sóng 750 nm. Hàm lượng polyphenol được xác định dựa vào đường chuẩn của acid gallic pha trong ethanol ( $y = 0,0082x + 0,0595$  and  $r^2 = 0,9996$ ), kết quả thể hiện là miligram đương lượng acid gallic trên gram nguyên liệu khô (mg GAE/g DM).

Phân tích tannin theo phương pháp Folin-Denis (Laitonjam & ctv., 2013). Hút 0,5 mL dịch trích đã pha loãng trong ethanol và 0,5 mL nước cất vào ống nghiệm, tiếp theo cho thêm 0,5 mL dung dịch thuốc Folin-Denis 10% và 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20%, lắc đều với vortex, làm nóng với nước sôi trong 1 phút. Sau đó để nguội xuống nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ của phức màu ở bước sóng 700 nm. Hàm lượng tannin được tính toán dựa vào đường chuẩn acid tannic pha trong ethanol ( $y = 0,0098x + 0,0478$  và  $r^2 = 0,9996$ ), kết quả thể hiện là miligram đương lượng acid tannic trên gram nguyên liệu khô (mg TAE/g DM).

#### 2.2.5. Phân tích dữ liệu

Số liệu thu thập được xử lý thống kê theo phần mềm EXCEL, SPSS 16.0. Dùng trắc nghiệm F (ANOVA) và phép thử DUNCAN để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

### 3. Kết Quả và Thảo Luận

#### 3.1. Thành phần dinh dưỡng trong đất thực nghiệm

Để đánh giá độ chua của đất thì độ chua hiện tại pH nước là chỉ tiêu đánh giá khá quan trọng

và rất cần thiết. Bảng 1 cho thấy pH dao động từ 5,8 - 6,0; còn ở mẫu đất trồng thuốc dòi tại xã Hòa Bình, huyện Chợ Mới là 5,6. Như vậy, pH nước của đất thích hợp cho cây thuốc dòi tím sinh trưởng và phát triển. Đất thí nghiệm có hàm lượng chất hữu cơ ở mức rất nghèo (0,87% OM), nghèo hơn mẫu đất trồng thuốc dòi ở xã Hòa Bình (3,21% OM, hàm lượng chất hữu cơ ở mức trung bình) (Do, 1999). Do đó, để tăng lượng chất hữu cơ cho đất, trong thí nghiệm có bón bổ sung thêm phân bò ủ hoai với số lượng 2 tấn/1000 m<sup>2</sup>.

Theo thang đánh giá của Truong (1994) đất thí nghiệm được đánh giá ở mức rất nghèo (đạm tổng số trung bình 0,05% N), trong khi đó đất canh tác thuốc dòi tím ở xã Hòa Bình có đạm tổng số cao hơn (0,14% N) (Bảng 1), do vậy cũng có thể ảnh hưởng đến năng suất cây thuốc dòi tím. Kết quả phân tích cũng cho thấy đất thí nghiệm kể cả đất canh tác thuốc dòi tím ở xã Hòa Bình có hàm lượng lân tổng số và K trao đổi ở mức rất thấp (0,01 meq/100 g) (Lê Văn Căn, trích dẫn bởi Ngo, 2005).

### 3.2. Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên màu sắc lá của cây thuốc dòi

#### 3.2.1. Chỉ số diệp lục tố (SPAD) trong lá

Nitơ là nguyên tố tham gia vào thành phần cấu tạo nên diệp lục tố. Thiếu đạm diệp lục không hình thành và lá vàng tuy nhiên bón thừa đạm làm lá có màu xanh đậm, cây yếu và dễ bị sâu bệnh tấn công. Thông qua chỉ số SPAD ta có thể đánh giá hàm lượng diệp lục tố trong lá. Trên cây thuốc dòi nhận thấy sự hình thành diệp lục tố bị ảnh hưởng bởi lượng phân đạm bón. Bón mức đạm N4 (25 kg urea/1000 m<sup>2</sup>) nhận thấy lá xanh nhất và các mức độ đạm N3, N2 và N1 màu xanh giảm dần và màu đỏ mặt trên lá tăng lên. Do đặc điểm cây thuốc dòi mặt trên lá màu lục, mặt dưới màu lục ánh tím đến tím; nên màu lục mặt trên giảm thì màu đỏ sẽ hiện rõ hơn (Hình 2).

Kết quả Bảng 2 cũng chứng minh mức độ bón phân đạm có ảnh hưởng rất lớn lên sự hình thành diệp lục tố trong lá cây thuốc dòi. Mức đạm N4 có chỉ số SPAD cao nhất là 40,68; sau đó lần lượt là N3, N2 và thấp nhất là N1 với chỉ số SPAD là 31,41; sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa ( $P \leq 0,01$ ).

Màu tím đỏ trên thân và lá cây thuốc dòi bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như giống, lượng nước

**Bảng 1.** Các chỉ tiêu phân tích đất thí nghiệm trước khi trồng

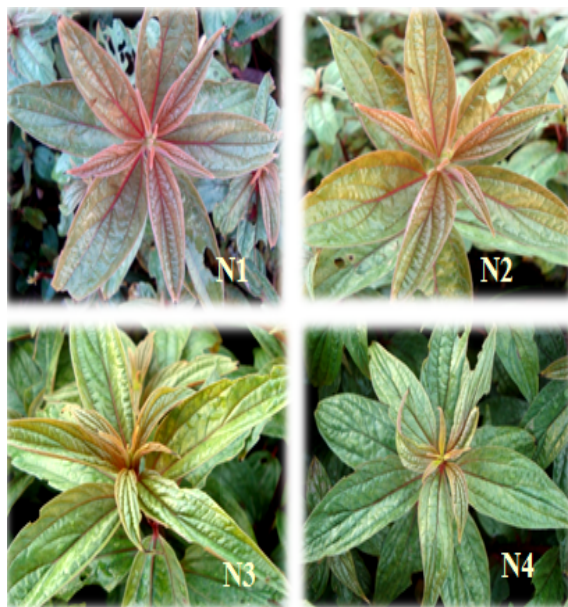
| Mẫu đất phân tích <sup>1</sup> | pH nước | Chất hữu cơ (% OM) | Đạm tổng số (% N) | Lân tổng số (%P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | K trao đổi (meq/100 g) |
|--------------------------------|---------|--------------------|-------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| 1                              | 6,0     | 1,04               | 0,06              | 0,06                                          | 0,014                  |
| 2                              | 5,8     | 0,85               | 0,04              | 0,07                                          | 0,008                  |
| 3                              | 5,9     | 0,73               | 0,04              | 0,04                                          | 0,009                  |
| Trung bình (1, 2, 3)           | 5,9     | 0,87               | 0,05              | 0,06                                          | 0,010                  |
| 4                              | 5,6     | 3,21               | 0,14              | 0,05                                          | 0,010                  |

<sup>1</sup>Mẫu 1, 2, 3 là số lần lặp lại của mẫu đất tại nơi thí nghiệm và 4 là mẫu đất trồng thuốc dòi của người dân ở xã Hòa Bình, huyện Chợ Mới, tỉnh An Giang.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên chỉ số SPAD và giá trị màu sắc a\*

| Thí nghiệm                           | Chỉ số diệp lục tố (SPAD) <sup>1</sup> | Giá trị a*                |                          |
|--------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                                      |                                        | lá mặt trên <sup>1</sup>  | lá mặt dưới <sup>1</sup> |
| N1 (10 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 31,41 <sup>d</sup> ± 0,52              | -5,76 <sup>a</sup> ± 0,15 | 8,47 <sup>b</sup> ± 0,09 |
| N2 (15 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 34,92 <sup>c</sup> ± 0,43              | -5,74 <sup>a</sup> ± 0,11 | 8,38 <sup>b</sup> ± 0,06 |
| N3 (20 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 38,36 <sup>b</sup> ± 0,85              | -6,18 <sup>a</sup> ± 0,08 | 8,06 <sup>b</sup> ± 0,04 |
| N4 (25 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 40,68 <sup>a</sup> ± 0,91              | -6,78 <sup>a</sup> ± 0,12 | 7,05 <sup>a</sup> ± 0,02 |
| Trung bình thí nghiệm                | 36,34                                  | -6,11                     | 7,99                     |
| F                                    | **                                     | ns                        | *                        |
| CV (%)                               | 15,18                                  | 17,56                     | 6,90                     |

<sup>1</sup>Giá trị trung bình (n = 10) và ± độ lệch chuẩn (SD); (ns) Không khác biệt thống kê ( $P > 0,05$ ); (\*\*) Khác biệt thống kê ở mức  $P \leq 0,01$ ; (\*) Khác biệt thống kê ở mức  $P \leq 0,05$ .

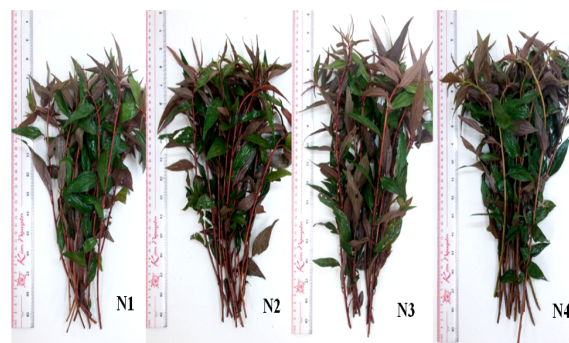


**Hình 2.** Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên sự hình thành diệp lục tố của lá.

tươi, ánh sáng, chế độ bón phân, mùa vụ,... Trong đó, mức độ bón phân đạm là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến màu sắc lá. Để xác định chính xác sự thay đổi màu sắc lá thuốc dòi, nghiên cứu sử dụng máy đo màu (Chroma Meter CR - 400) để đo màu tím đỏ trên lá thuốc dòi. Trong đó chọn giá trị a\* để theo dõi sự biến đổi về màu sắc của lá, giá trị a\* biến động trong khoảng từ -128 (xanh) đến 127 (đỏ), trị số a\* càng dương màu đỏ càng tăng dần.

Màu sắc lá được ghi nhận ở thời điểm thu hoạch của cây thuốc dòi và đo ở vị trí lá thứ ba và ở giữa lá. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy trị số a\* của mặt trên lá chưa có sự khác biệt về thống kê ( $P > 0,05$ ). Tuy nhiên, ở mặt dưới lá thuốc dòi có màu tím đỏ và trị số a\* đo được có sự khác biệt thống

kê ( $P \leq 0,01$ ), trong đó nhỏ nhất là mức đạm N4 (7,05) và cao nhất là mức đạm N1 (8,47), giữa mức đạm N1, N2 và N3 thì chưa có sự khác biệt về mặt thống kê. Kết quả cho thấy trong điều kiện của thí nghiệm với mức phân đạm bón 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup> làm cho màu tím đỏ trên thân lá cây thuốc dòi giảm đi (Hình 3).



**Hình 3.** Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên màu sắc thân lá cây thuốc dòi.

Theo nghiên cứu của Yasemin & ctv. (2017) cho thấy nồng độ chlorophyll (thông qua giá trị SPAD) của lá cây oải hương tăng khi tăng nồng độ nitơ trong dung dịch tưới đến mức tối ưu và sẽ giảm xuống khi tiếp tục tăng nồng độ nitơ trong dung dịch tưới. Nồng độ chlorophyll được duy trì trong cây oải hương nhưng có giá trị thấp nhất khi nồng độ nitơ trong dung dịch tưới lên tới 800 mg/L. Tương tự, Hassanpouraghdam & ctv. (2008) cho rằng khi ứng dụng nitơ ở mức cao sẽ làm gia tăng cả hàm lượng chlorophyll của thực vật và tăng hiệu quả sử dụng nitơ trong sinh tổng hợp diệp lục tố. Họ phát hiện ra rằng hàm lượng chlorophyll (giá trị SPAD) của lá cúc tây tăng đáng kể khi tăng nồng độ nitơ trong dung dịch dinh dưỡng và hàm lượng nitơ lớn nhất được

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên trọng lượng và năng suất cây thuốc dòi

| Nghiệm thức                          | Trọng lượng tươi <sup>1</sup><br>(g/bụi) | Trọng lượng khô <sup>1</sup><br>(g/bụi) | Năng suất thực tế <sup>1</sup><br>tấn/1000 m <sup>2</sup> |
|--------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| N1 (10 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 53,13 <sup>a</sup> ± 0,62                | 5,87 <sup>a</sup> ± 0,07                | 1,32 <sup>a</sup> ± 0,06                                  |
| N2 (15 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 52,28 <sup>a</sup> ± 0,37                | 6,32 <sup>a</sup> ± 0,05                | 1,33 <sup>a</sup> ± 0,03                                  |
| N3 (20 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 81,72 <sup>b</sup> ± 0,89                | 9,17 <sup>b</sup> ± 0,08                | 1,64 <sup>b</sup> ± 0,05                                  |
| N4 (25 kg urea/1000 m <sup>2</sup> ) | 82,53 <sup>b</sup> ± 0,28                | 8,12 <sup>b</sup> ± 0,06                | 1,61 <sup>b</sup> ± 0,07                                  |
| Trung bình nghiệm thức               | 67,42                                    | 7,37                                    | 1,48                                                      |
| F                                    | **                                       | **                                      | **                                                        |
| CV (%)                               | 28,09                                    | 40,10                                   | 36,74                                                     |

<sup>1</sup> Giá trị trung bình (n = 3) và ± độ lệch chuẩn (SD); (\*\*) Khác biệt thống kê ở mức  $P \leq 0,01$ .

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của các mức độ bón phân đạm lên hàm lượng các hợp chất sinh học trong cây thuốc dòi

| Mức độ đạm<br>(kg/1000 m <sup>2</sup> ) | Anthocyanin <sup>1</sup><br>(mg CE/g DM) | Flavonoid <sup>1</sup><br>(mg QE/g DM) | Polyphenol <sup>1</sup><br>(mg GAE/g DM) | Tannin <sup>1</sup><br>(mg TAE/g DM) |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|
| N1-10                                   | 0,285 <sup>a</sup> ± 0,003               | 4,25 <sup>b</sup> ± 0,07               | 11,94 <sup>b</sup> ± 0,08                | 8,22 <sup>b</sup> ± 0,08             |
| N2-15                                   | 0,287 <sup>a</sup> ± 0,002               | 4,37 <sup>ab</sup> ± 0,04              | 11,87 <sup>b</sup> ± 0,03                | 7,83 <sup>b</sup> ± 0,45             |
| N3-20                                   | 0,296 <sup>a</sup> ± 0,005               | 5,03 <sup>a</sup> ± 0,05               | 15,54 <sup>a</sup> ± 0,14                | 10,05 <sup>a</sup> ± 0,21            |
| N4-25                                   | 0,251 <sup>b</sup> ± 0,006               | 3,36 <sup>c</sup> ± 0,06               | 7,32 <sup>c</sup> ± 0,13                 | 5,68 <sup>c</sup> ± 0,15             |
| Trung bình                              | 0,280                                    | 4,25                                   | 11,67                                    | 7,95                                 |
| F                                       | **                                       | **                                     | *                                        | **                                   |
| CV (%)                                  | 17,67                                    | 20,97                                  | 20,07                                    | 7,56                                 |

<sup>1</sup> Giá trị trung bình (n = 3) và ± độ lệch chuẩn (SD); (\*\*) Khác biệt thống kê ở mức  $P \leq 0,01$ ; (\*) Khác biệt thống kê ở mức  $P \leq 0,05$ .

quan sát thấy là 400 mg/L.

### 3.3. Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm đến trọng lượng và năng suất cây thuốc dòi khi thu hoạch

Phân đạm có vai trò sinh lý đặc biệt quan trọng đối với sinh trưởng phát triển và hình thành năng suất của cây trồng, giúp cây gia tăng nhanh chiều cao cũng như diện tích lá. Qua kết quả thí nghiệm cho thấy mức phân đạm có ảnh hưởng rất lớn đến sự gia tăng sinh khối của cây ( $P \leq 0,01$ ). Ở mức độ bón 25 kg/1000 m<sup>2</sup> có trọng lượng tươi cao nhất 82,53 g/bụi, tuy nhiên chưa khác biệt có ý nghĩa với mức độ bón 20 kg/1000 m<sup>2</sup>. Trong khi đó, mức độ bón 20 kg/1000 m<sup>2</sup> có trọng lượng khô và năng suất thực tế cao nhất lần lượt là 9,17 g/bụi và 1,64 tấn/1000 m<sup>2</sup> và chưa có sự khác biệt với mức độ bón 25 kg/1000 m<sup>2</sup> (Bảng 3).

Theo kết quả nghiên cứu của Biesiada & Kus (2010) trên rau húng quế cho thấy có sự gia tăng tổng năng suất trung bình từ 2,65 kg lên 4,05 kg/m<sup>2</sup> khi bón phân tăng từ mức 50 kg lên 150 kg/ha. Khi tăng mức độ bón cao hơn nữa 250 kg/ha

thì năng suất tăng lên rất ít 4,34 kg/m<sup>2</sup>. Sifola & Barbieri (2006) đã chứng minh rằng, húng quế rất nhạy cảm với liều phân đạm bón, khi tăng dần liều phân đạm lên tới 300 kg/ha, trong điều kiện tưới nhỏ giọt, đã thu được sự gia tăng đáng kể năng suất theo trọng lượng tươi của các bộ phận trên mặt đất và lá lên tới 43,1 tấn/ha. Yassen & ctv. (2003) đã báo cáo rằng sản lượng rau húng quế cao nhất (23,2 tấn/ha) khi bón phân đạm với liều tối ưu 120 kg/ha.

### 3.4. Ảnh hưởng của mức độ bón phân đạm lên hàm lượng một số chất có hoạt tính sinh học có trong cây thuốc dòi

Kết quả trình bày ở Bảng 4 cho thấy trong các mẫu cây thuốc dòi khô với các mức độ phân đạm bón khác nhau chứa hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau. Trong đó, nhiều nhất là polyphenol với hàm lượng từ 7,32 - 15,54 mg/g nguyên liệu khô (DM); kế đến là tannin từ 5,68 - 10,05 mg/g DM; flavonoid từ 3,36 - 5,03 mg/g DM; và thấp nhất là anthocyanin từ 0,251 - 0,296 mg/g DM. Kết quả phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt rõ ràng giữa mẫu ở mức độ bón N3 (20 kg

urea/1000 m<sup>2</sup>) với các mẫu có mức đạm còn lại ở hàm lượng polyphenol và tannin, còn hàm lượng anthocyanin và flavonoid thì chưa có sự khác biệt thống kê giữa các mức đạm N1 - N3. Hàm lượng các hợp chất thu được cao nhất là ở mẫu N3; kế đến là N1 và N2; thấp nhất là N4. Như vậy, trong điều canh tác của thí nghiệm nếu bón với mức phân đạm cao 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup> sẽ làm giảm hàm lượng những chất có hoạt tính sinh học trong cây thuốc dòi.

Hàm lượng phenol tổng và hoạt động chống oxy hóa trong quả ớt (*Capsicum chinense*) không bị ảnh hưởng bởi liều lượng phân đạm sử dụng, chỉ có hàm lượng acid tổng tăng lên gấp hai lần khi sử dụng phân đạm ở liều cao (Fidel & ctv., 2011). Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Bénard & ctv. (2009) cho thấy khi bón phân đạm ở mức giới hạn có sự gia tăng hàm lượng polyphenol trong quả cà chua. Nghiên cứu của Uher & ctv. (2013) thì cho thấy khi tăng hàm lượng nitrogen có sự gia tăng đáng kể các hợp chất sinh học như vitamin C, E và beta carotene trong bông cải (*Brassica oleracea* var.); và nghiên cứu của Zhang & ctv. (2016) trên cây cà chua cũng cho thấy hàm lượng acid cafeic trong quả tăng cao khi tăng lượng phân đạm còn hàm lượng rutin không khác biệt. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Osuagwu & Edeoga (2012) cho thấy khi tăng lượng phân bón vô cơ NPK có sự gia tăng đáng kể hàm lượng phenol và steroid trong lá cây hương nhu trắng (*Ocimum gratissimum*) và một loại cây rau gia vị ở Nigeria (*Gongronema latifolium*), không có sự ảnh hưởng khác biệt lên hàm lượng flavonoid trong lá của cây (*Ocimum gratissimum*) nhưng có sự gia tăng đáng kể flavonoid trong lá cây (*Gongronema latifolium*).

#### 4. Kết Luận

Trong điều kiện thí nghiệm nhận thấy các mức độ bón phân đạm khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt lên màu sắc lá, năng suất và hàm lượng các hợp chất sinh học của cây thuốc dòi. Kết quả nghiên cứu cho thấy với lượng bón 20 kg urea/1000 m<sup>2</sup> thì cây thuốc dòi khi thu hoạch có hàm lượng anthocyanin, flavonoid, polyphenol và tannin cao nhất, lần lượt là 0,296 mg CE/g nguyên liệu khô (DM), 5,03 mg QE/g DM, 15,54 mg GAE/g DM và 10,05 mg TAE/g DM; lá có màu tím đỏ với giá trị a\* đo được là 8,06; chỉ số diệp lục tố SPAD là 38,36; năng suất 1,64 tấn/1000 m<sup>2</sup>. Tuy nhiên, với lượng phân đạm bón tăng lên 25 kg urea/1000 m<sup>2</sup> thì hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh

học, màu tím đỏ của lá cây thuốc dòi và năng suất đều giảm.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Ahmed, J. K., Salih, H. A. M., & Hadi, A. G. (2013). Anthocyanin in red beet juice act as scavenger for heavy metals ions such as lead and cadmium. *International Journal of Science and Technology* 2(3), 269-273.
- Bénard, C. H., Gautier, F., Bourgaud, D., Grasselly, V., Navez, C., CarizVeyrat, M. W., & Genard, M. (2009). Effects of low nitrogen supply on tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit yield and quality with special emphasis on sugars, acids, ascorbate, carotenoids and phenolic compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 57(10), 4112-4123.
- Biesiada, A., & Kus, A. (2010). The effect of nitrogen fertilization and irrigation on yielding and nutritional status of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum, hortorum cultus* 9(2), 3-12.
- Bojović, B., & Marković, A. (2009). Correlation between nitrogen and chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Kragujevac Journal of Science* 31, 69-74.
- Chu, T. T., Pham, L. T., & Nguyen, T. V. (2006). *Medicinal plant cultivation techniques*. Ha Noi, Vietnam: Labor and Social Publisher.
- Do, R. T. T. (1999). *A textbook of soil fertility and fertilizer*. Can Tho, Vietnam: Can Tho University Publishing House.
- Eswari, M. L., Bharathi, R. V., & Jayshree, N. (2013). Preliminary phytochemical screening and heavy metal analysis of leaf extracts of *Ziziphus oenophia* (L) Mill. Gard. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 5(1), 38-40.
- Fidel, N. R., Daniel, G. M., Onésimo, G. J., & Lourdes, C. D. (2011). Nitrogen fertilization effect on antioxidants compounds in fruits of habanero chili pepper (*Capsicum chinense*). *International Journal of Agriculture & Biology* 13(5), 827-830.
- Hassanpouraghdam, M. B., Tabatabaie, S. J., Nazemiyeh, H., & Aflatuni, A. (2008). N and K nutrition levels affect growth and essential oil content of costmary (*Tanacetum balsamita* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment* 6(2), 145-149.
- Hossain, M. A., Raqmi, K. A. S., Mijizy, Z. H., Weli, A. M., & Riyami, Q. (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(9), 705-710.
- Laitonjam, W. S., Yumnam, R., Asem, S. D., & Wangkheirakpam, S. D. (2013). Evaluative and comparative study of biochemical, trace elements and antioxidant activity of *Phlogacanthus pubinervius* T. Anderson and *Phlogacanthus jenkincii* C. B. Clarke leaves. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 4(1), 67-72.

- Le, T. T. (2007). *Investigation of chemical composition of Avicennia*. (Unpublished master' thesis). University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Mandal, S., Patra, A., Samanta, A., Roy, S., Mandal, A., Mahapatra, T. D., Pradhan, S., Das, K., & Nandi, D. K. (2013). Analysis of phytochemical profile of *Terminalia arjuna* bark extract with antioxidative and antimicrobial properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(12), 960-966.
- Ngo, H. N. (2005). Reference scale for evaluation of some soil physical and chemical properties. College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Osuagwu, G. G. E., & Edeoga, H. O. (2012). Effects of inorganic fertilizer application on the flavonoid, phenol and steroid content of the leaves of *Ocimum gratissimum* (L) and *Gongronema latifolium* (Benth). *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2(2), 254-262.
- Paul, S., & Saha, D. (2012). *In vitro* screening of cytotoxic activities of ethanolic extract of *Pouzolzia Zeylanica* (L.) Benn. *International Journal of Pharmaceutical Innovations* 2(1), 52-55.
- Santos, D. T., Cavalcanti, R. N., Rostagno, M. A., Queiroga, C. L., Eberlin, M. N., & Meireles, M. A. A. (2013). Extraction of polyphenols and anthocyanins from the Jambul (*Syzygium cumini*) fruit peels. *Food and Public Health* 3(1), 12-20.
- Sifola, M. I., & Barbieri, G. (2006). Growth, yield, and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulturae* 108(4), 408-413.
- Truong, N. T. (1994). *A textbook of soil fertility*. Can Tho, Vietnam: Can Tho University Publishing House.
- Uher, A., Slosar, M., & Valsikova, M. (2013). Fertilisation impact on the content of selected bioactive compounds in Cauliflower. *Journal of Central European Agriculture* 14(1), 261-269.
- Vo, C. V. (2012). *Dictionary of Vietnamese medicinal plants*. Ha Noi, Vietnam: Medical Publishing House.
- WHO (World Health Organization). (2003). WHO guidelines on good agricultural and collection practices for medicinal plants. Retrived September 1, 2018, from [https://lhu.edu.vn/Data/News/602/files/3\\_GACPW\\_HO\\_Vietnamese\\_2dkpy.doc](https://lhu.edu.vn/Data/News/602/files/3_GACPW_HO_Vietnamese_2dkpy.doc).
- Yasemin, S., Ozkaya, A., Koksall, E., Gok, B. (2017). The effects of nitrogen on growth and physiological features of lavender. *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants* 10-12, 746-754.
- Yassen, M., Ram, P., Yadav, A., & Singh, K. (2003). Response of Indian basil (*Ocimum basilicum*) to irrigation and nitrogen schedule in Central Uttar Pradesh. *Annals of Plant Physiology* 17(2), 177-181.
- Zhang, E., Duan, Y., Tan, F., & Zhang, S. (2016). Effects of long-term nitrogen and organic fertilization on antioxidants content of tomato fruits. *Journal of Horticulture* 3(1), 1-5.

## Effects of lime and sawdust on arsenic reduction in corn planted on the inside of the dyke at Quoc Thai commune, An Phu district, An Giang province

Chinh T. Nguyen\*, & Chuong V. Nguyen

Faculty of Agriculture and Natural Resources, An Giang University, An Giang, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: January 17, 2019

Revised: March 25, 2019

Accepted: April 16, 2019

#### Keywords

Arsenic (As)

Lime

Maize

Quoc Thai commune soil

Sawdust

#### \*Corresponding author

Nguyen Trung Chinh

Email: trungchinhch2khct@gmail.com

### ABSTRACT

Previous research has shown that soil and crops in Quoc Thai commune, An Phu district, An Giang province are severely contaminated with arsenic. The objectives of the experiment were (1) to evaluate effects of lime and sawdust on water pH and arsenic content in soil and 2) to determine effects of lime and sawdust on arsenic uptake by corn. The experiment was carried out in the field on the inside of the dyke with 4 treatments and 4 replications. The results showed that the treatment of lime combined with sawdust increased water pH and arsenic content in soil. The arsenic content in stems and leaves (95.3 mg/kg) and in seeds (6.33 mg/kg) of the maize was lower than that of the control by 31.9% and 49.4%, respectively. In brief, the use of lime in combination with sawdust to fertilize plants increased the water pH and arsenic content in the soil, while reducing the arsenic content in plants.

**Cited as:** Nguyen, C. T., & Nguyen, C. V. (2019). Effects of lime and sawdust on arsenic reduction in corn planted on the inside of the dyke at Quoc Thai commune, An Phu district, An Giang province. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 19-25.

## Ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa đến sự giảm thiểu asen trên cây bắp trồng trong đê bao tại xã Quốc Thái – An Phú – An Giang

Nguyễn Trung Chính\* & Nguyễn Văn Chương

Khoa Nông Nghiệp Và Tài nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại Học An Giang, An Giang

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 17/01/2019

Ngày chỉnh sửa: 25/03/2019

Ngày chấp nhận: 16/04/2019

#### Từ khóa

Asen (As)

Cây bắp

Đất trồng ở xã Quốc Thái

Mùn cưa

Vôi

#### \*Tác giả liên hệ

Nguyễn Trung Chính

Email: trungchinhch2khct@gmail.com

### TÓM TẮT

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy đất và cây trồng tại xã Quốc Thái - huyện An Phú - tỉnh An Giang bị nhiễm asen (As) nghiêm trọng. Mục tiêu của thí nghiệm là 1) đánh giá ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa đến pH nước và hàm lượng As trong đất và 2) xác định ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa lên sự hút thu As trên cây bắp. Thí nghiệm được thực hiện tại đồng ruộng trong đê bao với 4 nghiệm thức và 4 lần lặp lại. Kết quả cho thấy, nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa làm tăng pH nước và hàm lượng As trong đất. Hàm lượng As trong thân lá (95,3 mg/kg) và hạt (6,33 mg/kg) thấp hơn nghiệm thức đối chứng lần lượt là 31,9% và 49,4%. Tóm lại, sử dụng vôi kết hợp mùn cưa để bón cho cây đã làm tăng pH nước và hàm lượng As trong đất, đồng thời giúp giảm hàm lượng As trong cây trồng.

### 1. Đặt Vấn Đề

Ngày nay, khi nguồn nước mặt càng ô nhiễm, nước giếng khoan được coi là nguồn nước đóng vai trò quan trọng cho sự phát triển con người cũng như sự phát triển kinh tế xã hội của mỗi quốc gia. Việc khai thác và sử dụng nước giếng khoan cho các mục đích sinh hoạt, sản xuất, trồng trọt, chăn nuôi,... làm cho tình trạng ô nhiễm nước giếng khoan ngày càng trầm trọng hơn.

Từ năm 2003 đến 2005, chương trình United Nations Children's Fund (UNICEF) đã khảo sát nồng độ asen (As) trong các giếng khoan ở 4 tỉnh đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) là An Giang, Đồng Tháp, Long An và Kiên Giang đã cho thấy nguồn nước giếng khoan của các tỉnh vùng đầu nguồn sông Cửu Long như An Giang, Đồng Tháp đều bị nhiễm As rất cao, tỷ lệ các giếng có nồng độ As từ 10  $\mu\text{g/L}$  đến 50  $\mu\text{g/L}$ . Ở ĐBSCL, nồng độ As cao trên 10  $\mu\text{g/L}$  chủ yếu tập trung ở vùng ven sông Tiền, sông Hậu và Đồng Tháp Mười. Tại

An Giang, trong số 2.966 mẫu nghiên cứu có 40% số giếng bị nhiễm trên 50  $\mu\text{g/L}$ , 16% nhiễm dưới 50  $\mu\text{g/L}$ . Riêng huyện An Phú, tỉnh An Giang có 97,3% số giếng điều tra bị nhiễm As với hàm lượng cao hơn 100  $\mu\text{g/L}$  (253 mẫu trên tổng số 260 mẫu khảo sát) (UNICEF & IPH, 2006).

Sự hiện diện của As trong nước thủy lợi, trong đất ở mức cao có thể cản trở sự phát triển bình thường của cây trồng với các triệu chứng ngộ độc như "ức chế sự nảy mầm, giảm chiều cao cây, năng suất ngũ cốc thấp hơn" (Tsutsumi, 1980; Frans & ctv., 1988; Marin & ctv., 1992), "héo và hoại tử phiến lá" (Frans & ctv., 1988), "giảm diện tích lá và khả năng quang hợp" (Knauer & ctv., 1999).

Hiện nay, đất nông nghiệp tại huyện An Phú, An Giang được bao đê khép kín, đã làm hạn chế việc sử dụng nguồn nước sông, người nông dân phải sử dụng nước giếng khoan bị nhiễm As để tưới cho cây trồng. Kết quả làm cho 82,1% mẫu đất có hàm lượng trung bình As trong đất trồng là 7,89 mg/kg (Nguyen & Ngo, 2011). Từ đó, cây

trồng ở đây bị nhiễm As rất nghiêm trọng. Chính vì vậy, việc tìm ra các biện pháp bón phân giảm thiểu As trên cây bắp trồng tại An Phú, An Giang là cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của vôi và mùn cưa đến sự hút thu As lên cây bắp.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đất trồng bố trí thí nghiệm tại xã Quốc Thái, huyện An Phú, tỉnh An Giang là đất phù sa ngọt trong đê bao, có thành phần cơ giới nhẹ, tơi xốp, thoát nước tốt, thích hợp với nhiều loại cây trồng như ngô, đậu, rau màu.

Giống bắp sử dụng trong thí nghiệm là giống NK4300 Bt/GT biến đổi gen của công ty Syngenta Việt Nam, được biết tới với đặc tính nổi trội là kháng sâu đục thân và thuốc trừ cỏ gốc glyphosate.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu được bố trí thí nghiệm cho cây bắp theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Thí nghiệm được bố trí gồm 4 nghiệm thức với 4 lần lặp lại: Nghiệm thức 1 (NT1) là đối chứng (Không bón vôi và mùn cưa); Nghiệm thức 2 (NT2): bón vôi (Liều lượng 02 tấn CaO/ha); Nghiệm thức 3 (NT3): bón mùn cưa (Liều lượng 02 tấn/ha); Nghiệm thức 4 (NT4): bón vôi kết hợp mùn cưa (Liều lượng 02 tấn/ha theo tỉ lệ 1:1). Chia làm 03 giai đoạn bón: Làm đất (50% lượng vôi; mùn cưa; vôi kết hợp mùn cưa); 15 ngày sau gieo (25% lượng vôi; mùn cưa; vôi kết hợp mùn cưa) và 30 ngày sau gieo (25% lượng vôi; mùn cưa; vôi kết hợp mùn cưa).

Diện tích mỗi lần lặp lại của mỗi nghiệm thức là 18 m<sup>2</sup> (4 m × 4,5 m). Trồng theo hàng đơn với khoảng cách cây với nhau là 20 cm (gieo 01 cây/hốc), hàng cách nhau 1 m.

Chế độ nước tưới: Tưới nước giếng khoan có hàm lượng As trung bình là 557 µg/L (Do, 2017). Tưới đủ ẩm cho cây (từ 1 - 10 ngày sau gieo tưới 1 lần/ngày; giai đoạn sau đó tưới 2 - 3 lần/ngày).

Phân bón: Công thức phân bón (NPK kg/ha) 250 - 90 - 60, chia thành 04 đợt bón như sau: Bón lót: Toàn bộ lượng phân lân; bón thúc 1: Cây bắp đạt 3 - 4 lá, bón 40% đạm và 50% kali; bón thúc

2: Cây bắp đạt 9 - 10 lá, bón 30% đạm và 50% kali; bón thúc 3: Cây bắp trước khi trổ cờ 5 - 7 ngày, bón 30% đạm còn lại.

#### 2.2.2. Phân tích mẫu

Đất: Kiểm tra pH nước và As trong đất trước thí nghiệm và sau thí nghiệm. Thu mẫu đất: Mẫu đất được thu ở độ sâu 0 - 20 cm. Trong mỗi mẫu thu 05 điểm theo đường chéo góc, sau đó trộn chung lấy mẫu đại diện. Mẫu sau khi thu được chứa trong các túi nhựa được ký hiệu và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được phơi ở nhiệt độ phòng đến khi khô, sau đó được nghiền và qua rây có mắt lưới 0,5 mm. Tiến hành đo pH nước (đất/nước tỉ lệ 1:2,5) và phân tích As trong đất.

Phân tích hàm lượng As tổng số (tính theo hàm lượng chất khô - đơn vị tính là mg/kg) trong thân lá và hạt: Sau khi thu hoạch, thu mẫu thân lá và hạt, chứa trong các túi nhựa được ký hiệu và vận chuyển về phòng thí nghiệm. Mẫu được phơi ở nhiệt độ phòng đến khi khô, sau đó được nghiền và qua rây có mắt lưới 0,5 mm. Tiến hành phân tích As.

Quy trình phân tích As trong đất, thân lá và hạt (Nguyen, 2014):

Cân 1 g mẫu khô chuyển vào bình vô cơ. Thêm 10 mL HNO<sub>3</sub> tỉ lệ 1:1, lắc kỹ và đun lại bằng vật liệu có thể hoàn lưu hơi. Đun nóng đến 95°C và để 10 - 15 phút không cần để sôi. Làm nguội mẫu, thêm 5 mL HNO<sub>3</sub> đậm đặc, đun lại và reflux 30 phút. Nếu có khói màu nâu bốc ra, lặp lại sự oxy hóa bởi việc thêm 5 mL HNO<sub>3</sub> đậm đặc cho đến khi không còn khói màu nâu là mẫu đã hoàn thành phản ứng với HNO<sub>3</sub>. Dùng loại thủy tinh trong suốt hoặc hệ thống hoàn lưu hơi, cho dung dịch bay hơi chính xác 5 mL nhưng không được sôi hoặc là đun nóng đến 95°C không sôi trong 2 giờ. Luôn giữ cho sự che đầy dung dịch ở đáy bình.

Sau bước trên hoàn thành và làm nguội mẫu, thêm 2 mL nước và 3 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Cẩn thận không làm mất mẫu khi sự sủi bọt mãnh liệt quá mức. Đun nóng đến khi sự sủi bọt dịu xuống và làm nguội bình. Tiếp tục cho thêm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% với việc làm ấm cho đến khi sự sủi bọt thấp nhất hoặc thấy mẫu không biến đổi nữa. (Chú ý: Không được cho quá 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%).

Đậy mẫu và tiếp tục đun cho đến khi thể tích mẫu giảm đến chính xác 5 mL hoặc đun ở 95°C nhưng không để sôi trong 2 giờ. Luôn luôn đậy

bình vô cơ trong lúc đun.

Sau khi làm nguội, hòa loãng lên 100 mL bằng nước. Ly tâm hoặc để lắng cặn và lọc mẫu để loại bỏ chất cặn. Mẫu này được đem phân tích bởi phương pháp GF-AAS.

Thang đánh giá tham khảo hàm lượng As trong đất và nông sản: Theo QCVN 03:2008/BTNMT của MONRE (2008) về giới hạn hàm lượng As trong đất nông nghiệp là 12,0 mg/kg đất khô. Theo QCVN 01-12:2009/ BNNPTNT của MARD (2009) về giới hạn hàm lượng As tối đa trong nông sản là 2,0 mg/kg chất khô.

### 2.2.3. Phân tích thống kê

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XV để thống kê sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện trong vụ Đông Xuân năm 2017 tại xã Quốc Thái, huyện An Phú, tỉnh An Giang.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa đến pH và hàm lượng As trong đất

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của chế độ bón vôi và mùn cưa đến pH nước trung bình trong đất

Kết quả phân tích ở Bảng 1 thể hiện đất trước thí nghiệm không có sự khác biệt về pH nước trung bình trong đất giữa 4 nghiệm thức, dao động từ 7,28 - 7,33. Sau thí nghiệm, độ pH nước trung bình trong đất có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%, dao động từ 7,10 - 7,45. Nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa có độ pH nước trung bình trong đất cao nhất (7,45), kế đến là nghiệm thức bón vôi (7,40), nghiệm thức bón mùn cưa (7,32), nghiệm thức đối chứng là có độ pH nước trung bình trong đất thấp nhất (7,10). Nghiệm thức đối chứng có pH nước trung bình trong đất giảm (từ 7,30 xuống 7,10). Các nghiệm thức bón vôi, bón mùn cưa, bón vôi kết hợp mùn cưa có độ pH nước trung bình trong đất sau thí nghiệm đều tăng, tăng nhiều nhất là ở nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa (từ 7,33 lên 7,45). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Tat & ctv. (2016) rằng, pH tăng ở các nghiệm thức

bón vôi và phân hữu cơ, khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng (không bón vôi và phân hữu cơ). Theo Vo & ctv. (2008), phân hữu cơ góp phần giúp tăng pH đất. Bên cạnh đó, vôi cung cấp thêm  $\text{Ca}^{2+}$  cao giúp tăng pH đất, đồng thời  $\text{Ca}^{2+}$  thay thế  $\text{Na}^+$  trao đổi trên phức hệ hấp thu, đưa  $\text{Na}^+$  đưa ra ngoài dung dịch đất, dễ dàng rửa trôi khỏi môi trường đất (Makoi & Verplancke, 2010). Qua đó cho thấy việc bón vôi và mùn cưa đã ảnh hưởng đến sự thay đổi pH nước trong đất.

#### 3.1.2. Ảnh hưởng của chế độ bón vôi và mùn cưa đến hàm lượng As trong đất

Kết quả phân tích trình bày trong Bảng 2 cho thấy khác biệt ý nghĩa thống kê 5% giữa các nghiệm thức về hàm lượng As trung bình trong đất trước thí nghiệm, trong đó hàm lượng As trung bình trong đất cao nhất là 33,6 mg/kg và thấp nhất là 31,6 mg/kg. Qua đó thấy được nguồn đất trồng tại xã Quốc Thái, huyện An Phú bị nhiễm As nghiêm trọng. Bên cạnh đó, hàm lượng As trung bình trong đất sau thí nghiệm có sự khác biệt ý nghĩa thống kê 5%, đạt giá trị cao nhất là 46,6 mg/kg (tăng 13,0 mg/kg so với đất trước thí nghiệm) ở nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa và thấp nhất là nghiệm thức đối chứng đạt 34,7 mg/kg (tăng 3,1 mg/kg so với đất trước thí nghiệm), nghiệm thức bón vôi đạt 44,5 mg/kg (tăng 11,0 mg/kg so với đất trước thí nghiệm), nghiệm thức bón mùn cưa đạt 37,1 mg/kg (tăng 4,2 mg/kg so với đất trước thí nghiệm). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Huq & ctv. (2011) rằng, hàm lượng As được ghi nhận cao hơn trong đất có bón phân cân đối so với đất không được bón phân. Qua đây cho thấy đất trồng ở đây bị nhiễm As rất nghiêm trọng do sử dụng nước giếng khoan bị nhiễm As để canh tác, vượt quá QCVN 03:2008/BTNMT (12 mg/kg). Từ đó, việc bón vôi kết hợp mùn cưa có hiệu quả hơn trong việc cố định As trong đất trồng.

### 3.2. Ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa lên sự hấp thu As trên cây bắp tại xã Quốc Thái, huyện An Phú, tỉnh An Giang

Bảng 3 cho thấy các nghiệm thức của thân lá và hạt có khác biệt ý nghĩa thống kê 5% trong thí nghiệm. Hàm lượng As trung bình trong thân lá cao hơn trong hạt ở tất cả các nghiệm thức, hàm lượng As trung bình trong thân lá đạt 95,3 - 140 mg/kg, còn trong hạt trung bình đạt 6,33

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của bón vôi và mùn cưa đến pH nước trong đất (Tháng 11/2017)

| Nghiệm thức             | Độ pH nước trung bình trong đất |                   |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------|
|                         | Trước thí nghiệm                | Sau thí nghiệm    |
| Đối chứng               | 7,30                            | 7,10 <sup>d</sup> |
| Bón vôi                 | 7,31                            | 7,40 <sup>b</sup> |
| Bón mùn cưa             | 7,28                            | 7,32 <sup>c</sup> |
| Bón vôi kết hợp mùn cưa | 7,33                            | 7,45 <sup>a</sup> |
| F                       | ns                              | *                 |
| CV%                     | 0,28                            | 2,11              |

<sup>a-d</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (\*); ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê.

**Bảng 2.** Hàm lượng As trung bình trong đất trước và sau thí nghiệm (Tháng 11/2017)

| Nghiệm thức             | Hàm lượng As trung bình trong đất (mg/kg) |                   |
|-------------------------|-------------------------------------------|-------------------|
|                         | Trước thí nghiệm                          | Sau thí nghiệm    |
| Đối chứng               | 31,6 <sup>c</sup>                         | 34,7 <sup>d</sup> |
| Bón vôi                 | 33,5 <sup>a</sup>                         | 44,5 <sup>b</sup> |
| Bón mùn cưa             | 32,9 <sup>b</sup>                         | 37,1 <sup>c</sup> |
| Bón vôi kết hợp mùn cưa | 33,6 <sup>a</sup>                         | 46,6 <sup>a</sup> |
| F                       | *                                         | *                 |
| CV%                     | 2,78                                      | 14,0              |

<sup>a-d</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (\*).

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của chế độ bón vôi và mùn cưa lên hàm lượng As trung bình trong các bộ phận của cây (Tháng 11/2017)

| Nghiệm thức             | Hàm lượng As trong các bộ phận (mg/kg) |                   |
|-------------------------|----------------------------------------|-------------------|
|                         | Thân lá                                | Hạt               |
| Đối chứng               | 140 <sup>a</sup>                       | 12,5 <sup>a</sup> |
| Bón vôi                 | 107 <sup>c</sup>                       | 8,4 <sup>c</sup>  |
| Bón mùn cưa             | 114 <sup>b</sup>                       | 11,0 <sup>b</sup> |
| Bón vôi kết hợp mùn cưa | 95,3 <sup>d</sup>                      | 6,33 <sup>d</sup> |
| F                       | *                                      | *                 |
| CV%                     | 16,6                                   | 28,7              |

<sup>a-d</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% (\*).

- 12,5 mg/kg, đều vượt ngưỡng cho phép là 2,0 mg/kg của QCVN 01-12:2009/ BNNPTNT. Nếu sử dụng hạt làm thực phẩm lâu dài thì As sẽ tích tụ ngày càng nhiều, gây hại cho cơ thể (Scragg, 2006). Để khắc phục hạn chế này, cần có những nghiên cứu tiếp tục để tìm ra loại phân bón, cách bón và hàm lượng phân bón cho phù hợp; hoặc có những biện pháp chế biến bắp cho phù hợp như: rửa kỹ bắp trước khi nấu, rồi hấp chín bằng

hơi nước, cách làm này giống như cách loại bỏ As trong gạo đã được nghiên cứu bởi Sengupta & ctv. (2006). Ngoài ra, theo Nam (2018) có những phương pháp để thải As ra khỏi cơ thể bằng chế độ ăn uống và bổ sung các thực phẩm như: ăn rau quả giàu Vitamin C, rau lá xanh đậm, thảo mộc (ngò, húng, quế, gừng, hương thảo, hành, tỏi), quả óc chó, quả chia, tảo Chlorella, nước xương, nước lọc.

Hàm lượng As trung bình trong hạt có sự khác biệt rõ rệt, đặc biệt là ở nghiệm thức đối chứng với hàm lượng As trong hạt trung bình là 12,5 mg/kg và thấp nhất là nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa trung bình đạt 6,33 mg/kg, nhỏ hơn gần 2 lần so với nghiệm thức đối chứng. Nếu chỉ bón vôi hoặc mùn cưa thì hiệu quả thấp hơn so với bón kết hợp vôi và mùn cưa với hàm lượng As trong hạt trung bình đạt 8,4 mg/kg và 11,0 mg/kg.

Đối với hàm lượng As trung bình trong thân lá thì các nghiệm thức cũng có sự khác biệt với nhau, cụ thể là ở nghiệm thức bón vôi kết hợp mùn cưa, hàm lượng As có giá trị trung bình thấp nhất đạt 95,3 mg/kg và cao nhất ở nghiệm thức đối chứng đạt 140 mg/kg. Hàm lượng As trung bình trong thân lá ở nghiệm thức bón vôi là 107 mg/kg, còn ở nghiệm thức bón mùn cưa là 114 mg/kg. Nhìn chung, hàm lượng As trung bình trong thân lá ở cả 4 nghiệm thức là rất cao.

Các nghiệm thức có bón phân (vôi và mùn cưa) đã giúp làm giảm sự hấp thu và tích lũy As trong thân lá và hạt của cây bắp. Trong đó hiệu quả nhất là nghiệm thức bón vôi kết hợp với mùn cưa, bởi vì vôi cố định As lại trong đất và mùn cưa giữ As lại trên mặt đất. Chính vì vậy, hàm lượng As trong đất ở nghiệm thức bón vôi kết hợp với mùn cưa là cao nhất, còn hàm lượng As trong cây ở nghiệm thức này là thấp nhất. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Tan & ctv. (2011) rằng, bón vôi cho đất trồng nhiễm As làm giảm sự hấp thu kim loại này vào cây trồng trung bình từ 40% - 50% và tối đa là 70%. Sự giảm thiểu hấp thu As là do sự bất động của chúng trong đất. Bên cạnh đó, theo kết quả nghiên cứu của Nguyen (2014) sử dụng vôi và mùn cưa làm giảm sự tích lũy kim loại nặng trên rau xà lách và rau cải xanh cho thấy tác động khá rõ đến sinh trưởng của cây và làm giảm đáng kể sự tích lũy kim loại nặng trong rau cải xanh cũng như rau xà lách. So với mùn cưa, bón vôi có tác động làm giảm tích lũy kim loại nặng trong rau màu thể hiện rõ rệt hơn. Theo Huq & ctv. (2008) báo cáo rằng, ứng dụng chất hữu cơ đã có thể giảm tích lũy As khoảng 75% trong các bộ phận trên cây trồng. Tương tự như vậy, sự ứng dụng kết hợp các loại phân hữu cơ có thể giảm hàm lượng As là 33,47% và 36,87% trong ngũ cốc nguyên hạt và xay hạt tương ứng so với đất đối chứng không sử dụng phân hữu cơ.

Vì vậy, khi trồng bắp ở đất nhiễm As như xã Quốc Thái, An Phú nên bón vôi kết hợp mùn cưa để giảm sự hút thu As vào cây trồng.

## 4. Kết Luận và Kiến Nghị

### 4.1. Kết luận

Độ pH nước và hàm lượng As trong đất tăng khi bón vôi và mùn cưa vào đất, tăng nhiều nhất là nghiệm thức có bón vôi kết hợp mùn cưa.

Việc bón vôi và mùn cưa làm cho hàm lượng As trong thân lá và hạt của cây bắp giảm hơn so với trồng không bón vôi và mùn cưa.

Đối với nghiệm thức bón vôi kết hợp với mùn cưa (02 tấn/ha) cho thấy hiệu quả tốt nhất, mức độ giảm sự hút thu As từ môi trường đất vào trong thân lá và hạt là thấp nhất, kể đến là nghiệm thức bón vôi, bón mùn cưa vẫn cho kết quả có hàm lượng As trong thân lá và hạt thấp hơn đối chứng lần lượt là 18,6% đến 31,9% và 12,0% đến 49,4%.

Như vậy, khi cây trồng có bón thêm vôi kết hợp mùn cưa (02 tấn/ha) đã làm tăng pH nước và hàm lượng As trong đất, đồng thời giúp giảm hàm lượng As trong cây trồng.

### 4.2. Kiến nghị

Điều chỉnh phù hợp lượng vôi kết hợp mùn cưa bón cho cây trồng ở điều kiện đồng ruộng, đặc biệt đối với cây bắp để giảm hút thu As và đạt dưới ngưỡng cho phép.

Cần có những biện pháp lâu dài để góp phần làm giảm hấp thu hàm lượng As vào cây trồng như cải tạo hệ thống thủy lợi để có thể cung cấp nước sông tưới cho cây trồng đồng thời sử dụng phân bón đạt chất lượng để làm giảm hàm lượng tích lũy As trong đất và trong cây trồng.

## Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Do, L. T. V. (2017). *Analytical results*. Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Frans, R., Horton, D., & Burdette, L. (1988). Influence of MSMA on straighthead, arsenic uptake and growth response in rice (*Oryza sativa*). *Report Series-Arkansas Agricultural Experiment Station* 30, 1-12.
- Huq, S. M. I., & Joardar, J. C. (2008). Effect of balanced fertilization on arsenic and other heavy metals uptake in rice and other crops. *Bangladesh Journal of Agriculture and Environment* 4, 177-191.
- Huq, S. M. I., Sultana, S., Chakraborty, G., & Chowdhury, M. T. A. (2011). A mitigation approach to alleviate arsenic accumulation in rice through balanced fertilization. *Applied and Environmental Soil Science* 2011, 1-8.

- Knauer, K., Behra, R., & Hemond, H. (1999). Toxicity of inorganic and methylated arsenic to algal communities from lakes along an arsenic contamination gradient. *Aquatic Toxicology* 46(3-4), 221-230.
- Makoi, J. H., & Verplancke, H. (2010). Effect of Gypsum placement on the physical chemical properties of a saline sandy loam soil. *Australian Journal of Crop Science* 4(7), 556-563.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2009). *Livestock feeds – Maximum allowable levels of antibiotics, pharmaceuticals, microorganisms, and heavy metals in complete feeds for pigs*. Ha Noi, Vietnam: MARD Office.
- Marin, A. R., Masscheleyn, P. H., & Patrick, W. H. (1992). The influence of chemical form and concentration of arsenic on rice growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil* 139(2), 175-183.
- MONRE (Ministry of Natural Resources and Environment). (2008). *National technical regulations on permissible heavy metals in soil*. Ha Noi, Vietnam: MONRE Office.
- Nam, P. (2018). Detoxicity of heavy metals. Retrieved March 23, 2018, from <https://coachnamphuong.com/posts/thai-doc-kim-loai-nang/>.
- Nguyen, C. V., & Ngo, H. N. (2011). Evaluation of arsenic and cadmium accumulation in soil and corn in An Phu district, An Giang province. *Can Tho University Journal of Science* 38, 106-109.
- Nguyen, T. T. T. (2014). *Evaluation of Cu, Pb and Zn absorption and use of fertilizer to reduce their accumulation in broccoli and lettuce*. (Unpublished master's thesis). Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Scragg, A. (2006). *Environmental Biotechnology* (22<sup>nd</sup> ed.). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Sengupta, M. K., Hossain, M. A., Mukherjee, A., Ahamed, S., Das, B., Nayak, B., Pal, A., & Chakraborti, D. (2006). Arsenic burden of cooked rice: Traditional and modern methods. *Food and chemical toxicology* 44(11), 1823-1829.
- Tan, W. N., Li, Z. A., Qiu, J., Zou, B., Li, N. Y., Zhuang, P., & Wang, G. (2011). Lime and phosphate could reduce cadmium uptake by five vegetables commonly grown in South China. *Pedosphere* 21(2), 223-229.
- Tat, T. A., Le, D. V., Vo, G. T., Nguyen, T. T. B., Trang, C. N. L., & Dao, D. L. K. (2016). Effects of compost amendment and lime on the improvement of rice yield and adverse properties of saline soil in greenhouse conditions. *Can Tho University Journal of Science Agriculture* 4, 84-93.
- Tsutsumi, M. (1980). Intensification of arsenic toxicity to paddy rice by hydrogen sulfide and ferrous iron. I. Induction of bronzing and iron accumulation in rice by arsenic. *Soil Science and Plant Nutrition* 26(4), 561-569.
- UNICEF & IPH (UNICEF & Institute Public Health Ho Chi Minh City). (2006). Arsenic issue in Mekong, Red river deltas and arsenic mitigation. Ho Chi Minh City, Vietnam: Unicef & IPH office.
- Vo, G. T., Duong, V. M., Nguyen, H. M., Nguyen, D. M., Nguyen, P. T. M., Tran, L. B., Pham, T. N. M., & Phan, B. T. (2008). *A final report on production of composting organic fertilizer*. Can Tho University, Can Tho, Vietnam.

## Modification of Cellulose from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for nanocomposite materials

Hien V. Nguyen\*, Thuy T. T. Le, & Duy Q. Tran

<sup>1</sup>Faculty of Science, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Chemical Engineering, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: November 23, 2018

Revised: April 10, 2019

Accepted: April 22, 2019

#### Keywords

Cellulose acetate

Nanocomposite materials

Water hyacinth

#### \*Corresponding author

Nguyen Van Hien

Email: nvhien@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

The effects of temperature, time, alkalinity and solid/liquid ratio on separation of lignin, hemicellulose to obtain cellulose from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) were investigated. Microcrystalline cellulose fibers were examined by microscope and infrared spectroscopy IR. The results showed that lignin and hemicellulose were removed by alkaline treatment. The obtained cellulose fibers were modified by esterification reaction with acetic anhydride in acetic acid, sulfuric acid with the aid of ultrasound. The cellulose acetate was investigated using transmission electron microscopy (TEM) and IR spectra. The synthesized nano fibers were in the diameter range of 50 - 100 nm from the TEM with even arrangement. The IR spectrum also showed that the -OH group was replaced by the -OCOCH<sub>3</sub> group, thus, reducing the polarization and hygroscopic ability of cellulose, suitable for using as the reinforcing phase in biodegradable composite materials.

**Cited as:** Nguyen, H. V., Le, T. T. T., & Tran, D. Q. (2019). Modification of Cellulose from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for nanocomposite materials. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 26-32.

## Nghiên cứu biến tính Cellulose từ lục bình định hướng làm pha gia cường cho vật liệu nanocomposite

Nguyễn Văn Hiền\*, Lê Thị Thanh Thủy & Trần Quang Duy

Bộ Môn Công Nghệ Hóa Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 23/11/2018

Ngày chỉnh sửa: 10/04/2019

Ngày chấp nhận: 22/04/2019

#### Từ khóa

Cellulose acetate

Lục bình

Vật liệu nanocomposite

#### \*Tác giả liên hệ

Nguyễn Văn Hiền

Email: nvhien@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Quá trình tách lignin, hemicellulose để thu được cellulose từ lục bình (*Eichhornia crassipes*) bằng phương pháp xử lý kiềm dưới ảnh hưởng của các yếu tố: nhiệt độ, thời gian, nồng độ kiềm và tỉ lệ rắn/lỏng. Vi sợi cellulose được khảo sát cấu trúc bằng kính hiển vi và phổ hồng ngoại IR. Kết quả thu được cho thấy chỉ cần qua một bước xử lý kiềm đã hoàn toàn loại bỏ được lignin và hemicellulose. Sợi cellulose tiếp tục được thử nghiệm biến tính bằng phản ứng ester hóa với tác nhân anhydride acetic trong dung môi acid acetic, xúc tác H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc, có sự hỗ trợ của sóng siêu âm. Sản phẩm cellulose acetate được đánh giá kích thước, hình thái và tính chất bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM), phổ hồng ngoại (IR). Kết quả cho thấy vi sợi cellulose acetate có kích thước khoảng 50 nm, phân bố khá đồng đều. Đồng thời trên phổ IR cho thấy nhóm -OH đã được thay thế bằng nhóm -OCOCH<sub>3</sub>, từ đó làm giảm độ phân cực và tính hút ẩm của cellulose, phù hợp định hướng làm pha gia cường cho vật liệu composite phân hủy sinh học.

### 1. Đặt Vấn Đề

Sự phát triển mạnh mẽ của công nghiệp hiện đại dẫn đến nhu cầu ngày càng lớn về việc nghiên cứu, chế tạo các loại vật liệu mới. Vật liệu nanocomposite là sự kết hợp của hai hay nhiều vật liệu khác nhau, mỗi thành phần vẫn giữ được những tính chất cơ, lý, hóa riêng biệt của nó. Đồng thời vật liệu nanocomposite có những tính chất tốt hơn so với từng vật liệu ban đầu. Gần đây, các nghiên cứu mới nỗ lực phát triển vật liệu nanocomposite từ nguồn gốc tự nhiên có khả năng phân hủy sinh học, nhằm giảm thiểu tối đa tác hại đối với môi trường (Oka, 2010). Sợi nano cellulose có tiềm năng lớn để làm pha gia cường cho các vật liệu composite sinh học như khả năng phân tán cao, đồng đều, không độc và có khả năng phân hủy sinh học. Tuy nhiên trong cấu trúc của cellulose có nhiều nhóm -OH nên có tính phân cực, do đó dễ tăng độ phân tán và tương thích trong nền polymer cần biến tính các nhóm -OH, để làm giảm tính phân cực của cellulose (Wang & Lawrence, 2012). Acetyl hóa là một

phương pháp đầy hứa hẹn, trong đó một số nhóm -OH phản ứng với tác nhân anhydride acetic để tạo thành sản phẩm cellulose acetate (CA) có độ phân cực kém hơn cellulose, giúp giảm tính hút ẩm của cellulose và phân tán tốt hơn trong nền polymer (Abdulkhani & ctv., 2014).

Lục bình (*Eichhornia crassipes*) là một loài thực vật thủy sinh sống trôi nổi, hay cắm rễ xuống bùn, rễ chùm, sinh trưởng rất nhanh, khó kiểm soát, ảnh hưởng không chỉ đến tính đa dạng sinh học mà còn ảnh hưởng đến các hoạt động kinh tế - xã hội. Xuất phát từ vùng Amazon, Nam Mỹ, đến nay lục bình đã phát triển trên 50 quốc gia vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới (Abdulkhani & ctv., 2014). Ở Việt Nam, trong những năm qua, sự xuất hiện của lục bình trên các kênh rạch thuộc các khu vực sông ngày càng nhiều và dày đặc. Cụ thể tại thành phố Hồ Chí Minh, đã có khoảng 200 km thuộc 180 kênh rạch bị xâm chiếm bởi lục bình. Nó không những cản trở dòng chảy, gây khó khăn cho giao thông đường thủy, lục bình còn gây ô nhiễm, ảnh hưởng đến nguồn nước phục vụ tưới tiêu đồng ruộng cũng như nuôi trồng thủy

sản tại một số nơi. Hiện nay có nhiều giải pháp được đưa ra để giải quyết sự ô nhiễm của lục bình, nhưng hiệu quả vẫn còn chưa cao. Do lục bình có hàm lượng cellulose cao (trên 200 g/1 kg) nên cũng có thể tận dụng nguồn cellulose từ loại thực vật này (Istirokhatun & ctv., 2015). Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là tách lấy cellulose từ lục bình, biến tính tạo cellulose acetate định hướng làm pha gia cường trong tổng hợp vật liệu nanocomposite phân hủy sinh học.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu

Lục bình được thu gom từ ao, hồ khu vực quận Thủ Đức, TP.HCM, với kích thước thân cây trên 0,5 mét.

Toluene, Etanol 96%, Acid acetic, Natri hydroxid 96%, Acid chlorhidric 36%, Sodium hypochlorite (NaClO) có nguồn gốc Trung Quốc và Anhydride acetic từ Tây Ban Nha.

### 2.2. Phương pháp

Xử lý lignin và hemicellulose từ lục bình: Lục bình tươi được rửa sạch, cắt nhỏ, nghiền và sấy khô, sau đó ngâm dầm trong dung môi Toluene/Ethanol trong 24 giờ, nhằm loại bỏ các chất nhựa và các chất mang màu. Sau bước xử lý bằng dung môi, mẫu lục bình được cho vào bình phản ứng chứa dung dịch NaOH (nồng độ và tỉ lệ sẽ được khảo sát), đun hồi lưu với nhiệt độ và thời gian thích hợp. Sau đó rửa lại bằng dung dịch HCl 0,5 M rồi tách dịch lọc, bã được rửa bằng nước cất rồi đem đi sấy khô. Mẫu khô được tiếp tục được tẩy lignin bằng phản ứng với dung dịch NaClO. Hỗn hợp sau phản ứng được rửa nhiều lần bằng nước cất, sau đó tách dịch lọc. Bã sau khi lọc được sấy khô ở 60°C và cân lại khối lượng để tính hiệu suất của các phản ứng trên. Cellulose thu được sau khi sấy khô được kiểm tra tính chất bằng phổ hồng ngoại IR (Trung tâm INOMAR, Đại học Quốc gia TP.HCM).

Tổng hợp cellulose acetate: Cần chính xác 0,5 g bột cellulose cho vào bình cầu 50 mL, thêm 10 mL acid acetic và siêu âm 10 phút để cellulose phân tán đều trong dung môi. Tiếp tục thêm anhydride acetic (5, 7, 10, 13 mL) và acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc vào hỗn hợp phản ứng, siêu âm trong 30 phút – 3 giờ. Sau thời gian phản ứng, tiến hành kết tủa và thu vi sợi cellulose acetate. Sản phẩm được kiểm tra tính chất bằng phương pháp

kính hiển vi điện tử truyền qua TEM (Phòng thí nghiệm Trọng điểm Polymer và Composite, Trường Đại học Bách Khoa TP.HCM) và phổ hồng ngoại IR (Trung tâm INOMAR, Đại học Quốc gia TP.HCM).

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Tách cellulose từ lục bình

#### 3.1.1. Kết quả tách cellulose từ lục bình

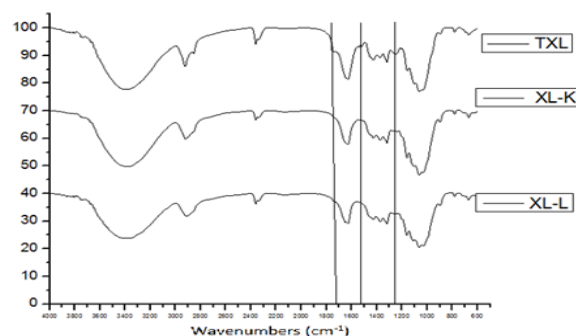
Quá trình tách sợi cellulose từ lục bình khô được thực hiện qua 2 bước: xử lý hemicellulose (0,5 g lục bình khô trong dung dịch NaOH 0,25 M, phản ứng trong 3 giờ) và xử lý lignin (0,2 g mẫu sau bước 1 với dung dịch NaClO 2%, phản ứng trong 2 giờ). Tỷ lệ phần trăm hao hụt về khối lượng sau các quá trình xử lý được thể hiện trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Hiệu suất sau các quá trình xử lý

| Bước xử lý                          | Tỷ lệ hao hụt |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. Xử lý dung môi (Toluene/Ethanol) | 10,2%         |
| 2. Xử lý hemicellulose              | 38,5%         |
| 3. Xử lý lignin                     | 3,7%          |
| Tổng                                | 52,4%         |

Như vậy, sau quá trình xử lý dung môi, xử lý hemicelluloses và lignin, tổng khối lượng các chất được loại bỏ bằng 52,4% so với tổng khối lượng lục bình khô ban đầu.

Mẫu cellulose thu được sau khi sấy khô ở 60°C được phân tích phổ hồng ngoại IR, kết quả được thể hiện trong Hình 1.



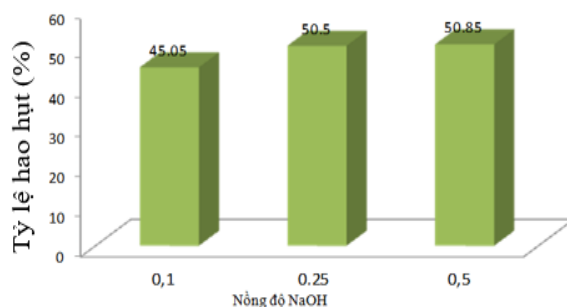
**Hình 1.** Giản đồ phổ IR qua các bước xử lý mẫu. (TXL: Tiền xử lý, XL-K: Xử lý kiềm, XL-L: Xử lý lignin).

Kết quả phân tích hồng ngoại cho phép đánh giá sự có mặt của các nhóm chức cũng như khẳng định phần nào cấu trúc phân tử của chúng. Giải đồ phổ IR cho thấy so với mẫu tiền xử lý, các mẫu đã xử lý hemicellulose và lignin có vài điểm khác biệt (chứng tỏ quá trình xử lý đạt hiệu quả): peak nhỏ ở số sóng 1734/cm đặc trưng cho dao động nhóm cacbonyl trong các nhóm acetyl và este đã biến mất trong các mẫu đã xử lý, 2 nhóm chức này đặc trưng cho sự có mặt của hemicellulose và lignin. Peak ở số sóng 1519/cm và peak ở số sóng 1253/cm đặc trưng cho dao động liên kết C-C trong vòng thơm (chỉ có ở cấu trúc lignin) cũng biến mất trong 2 mẫu đã xử lý (Nguyễn & ctv., 2017). Các kết quả trên cho thấy quá trình xử lý đã đạt được hiệu quả như mong muốn, các thành phần như hemicellulose và lignin (đặc biệt là lignin) đã bị loại bỏ, cấu trúc cellulose được giữ lại (thể hiện qua các peak ở số sóng 2800 - 2900/cm và 3300 - 3500/cm đặc trưng cho liên kết C-H và O-H trong cấu trúc cellulose được giữ nguyên) (Nguyễn & ctv., 2017).

Ngoài ra, khi so sánh phổ IR của 2 quá trình xử lý hemicellulose và lignin sẽ không thấy sự khác biệt. Điều này có thể cho thấy dung dịch kiềm có thể cho hiệu quả ở cả 2 quá trình xử lý hemicellulose và lignin. Từ đó nhóm nghiên cứu đề xuất chỉ sử dụng dung dịch kiềm cho cả 2 quá trình xử lý (xử lý 1 bước).

### 3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ NaOH đến quá trình xử lý hemicellulose và lignin

Quá trình xử lý kiềm làm phá vỡ thành tế bào và liên kết  $\alpha$ -ete, ester giữa lignin, hemicellulose, và các acid khác. Do đó nồng độ NaOH là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất quá trình xử lý.

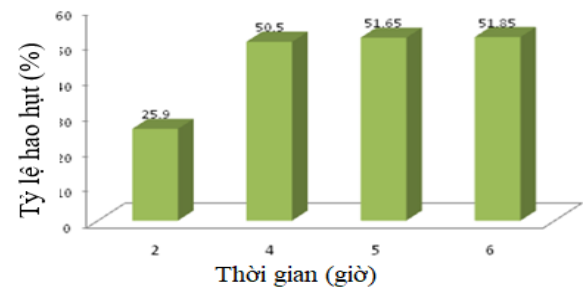


**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ NaOH đến phần trăm hao hụt khối lượng sau khi xử lý hemicellulose và lignin từ lục bình.

Dựa vào biểu đồ Hình 2 thấy được khi tăng nồng độ NaOH từ 0,1 lên 0,25 M thì tỷ lệ hao hụt khối lượng tăng lên đáng kể, từ 45,05% lên 50,5%. Tuy nhiên khi tăng nồng độ NaOH lên 0,5 M thì hiệu suất gần như không đổi. Như vậy hàm lượng hemicellulose và lignin trong lục bình chỉ bị hòa tan trong một nồng độ kiềm phù hợp nhất định. Để tiết kiệm năng lượng và chi phí dựa vào biểu đồ ta chọn nồng độ dung dịch kiềm NaOH 0,25 M làm điều kiện thích hợp cho quá trình xử lý hemicellulose và lignin.

### 3.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian đến quá trình xử lý hemicellulose và lignin

Từ biểu đồ Hình 3 thấy được thời gian có ảnh hưởng đến quá trình xử lý hemicellulose và lignin. Tỷ lệ khối lượng bị hao hụt sau quá trình xử lý có xu hướng tăng cao khi tăng thời gian từ 2 giờ (25,9%) đến 4 giờ (50,5%). Tuy nhiên khi tăng thời gian từ 4 giờ đến 6 giờ thì tỷ lệ này tỷ lệ này thay đổi không đáng kể, cụ thể lần lượt là 50,5%, 51,65% và 51,85%. Từ kết quả trên cho thấy thời gian 5 giờ là phù hợp cho quá trình xử lý hemicellulose và lignin tại nồng độ NaOH là 0,25 M.



**Hình 3.** Ảnh hưởng của thời gian đến tỷ lệ hao hụt khối lượng sau khi xử lý hemicellulose và lignin từ lục bình.

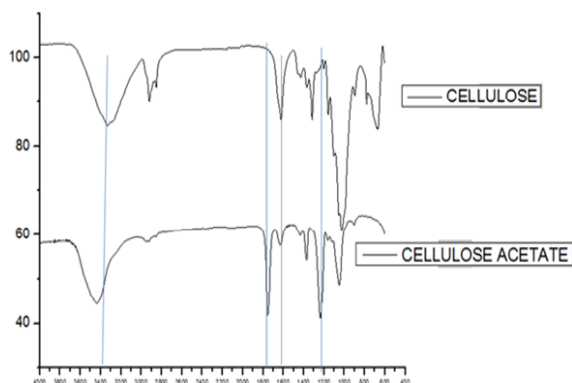
Như vậy, điều kiện phù hợp cho quá trình xử lý hemicellulose và lignin trong lục bình là: 0,5 g lục bình khô trong 25 mL dung dịch NaOH 0,25 M, thời gian 5 giờ.

## 3.2. Biến tính cellulose bằng phản ứng ester hóa

### 3.2.1. Kết quả biến tính cellulose bằng phản ứng ester hóa

Cellulose thu được sau quá trình xử lý hemicellulose và lignin từ lục bình, được tiến hành phản

ứng ester hóa bằng anhydride acetic trong dung môi acid acetic và xúc tác acid sulfuric đặc. Sản phẩm được kiểm tra bằng phương pháp IR. Kết quả phân tích được thể hiện như Hình 4.

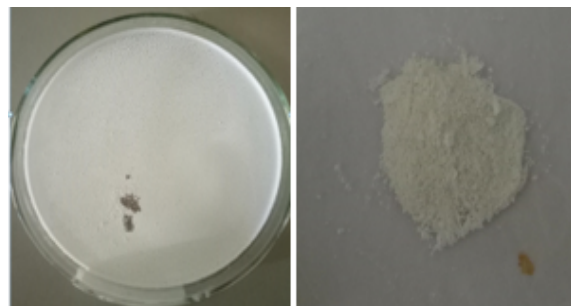


**Hình 4.** Giảm đồ phổ IR trước và sau khi acetate hóa.

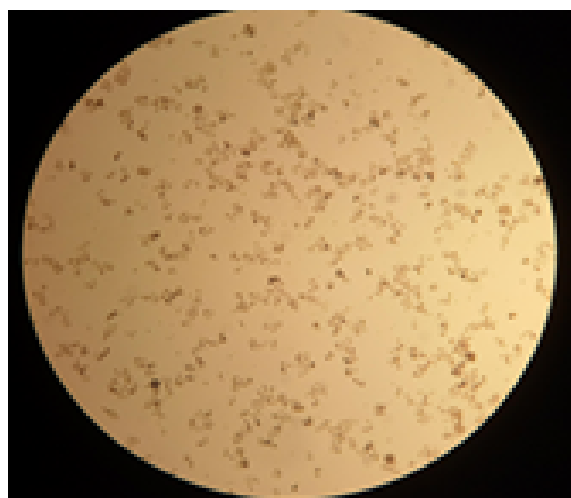
Qua hai giản đồ IR của cellulose và cellulose acetate ta có nhận thấy: peak O-H ở số sóng 3300 - 3500/cm cường độ giảm, chứng tỏ một phần nhóm -OH đã bị acetate hóa. Ngoài ra peak này có hình dạng nhọn hơn là do cường độ liên kết hydro giữa các nhóm -OH giảm, cũng cho thấy rằng một số nhóm -OH trong cấu trúc cellulose đã bị thay thế. So với cellulose, trên giản đồ IR của cellulose acetate xuất hiện 2 peak mới ở 1730 và 1247/cm tương ứng với dao động của các liên kết C=O và C-O trong nhóm ester, chứng tỏ quá trình acetate hóa đạt hiệu quả. Ngoài ra, peak ở 1600 - 1650/cm thường đặc trưng cho việc hấp thụ hơi nước của các chất, peak này ở mẫu cellulose acetate có cường độ giảm đáng kể so với mẫu cellulose, cho thấy sản phẩm sau khi acetate hóa có độ phân cực giảm. Điều này có thể được giải thích là do quá trình acetate hóa cellulose, một số nhóm -OH được thay bằng các nhóm -OCOCH<sub>3</sub> làm giảm độ phân cực, việc hấp thụ nước cũng giảm so với cellulose. Việc làm giảm độ phân cực của cellulose đạt được mục đích đề ra ban đầu trong việc định hướng làm pha gia cường trong tổng hợp composite (vì pha gia cường kém phân cực mới tương thích với các nền polymer kém phân cực). Mặt khác sự vắng mặt của các peak trong phạm vi số sóng từ 1760 đến 1840/cm chứng tỏ anhydride acetic và acid acetic đã được loại bỏ hoàn toàn.

Mẫu cellulose acetate thu được sau khi acetate hóa trắng và có độ mịn cao (Hình 5). Có thể dự đoán trong quá trình acetate hóa đồng thời

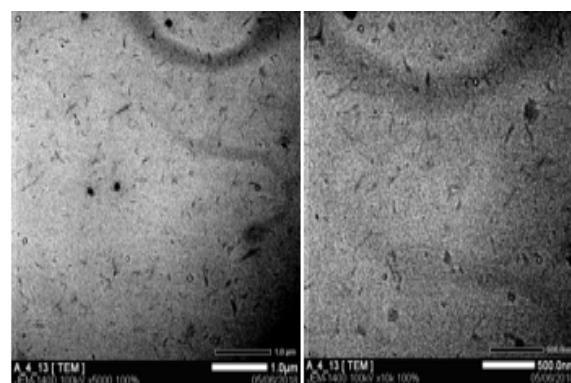
đã làm giảm kích thước sợi cellulose. Điều này sẽ được kiểm tra bằng phương pháp kính hiển vi (Hình 6) và kính hiển vi điện tử truyền qua TEM (Hình 7) để đánh giá kích thước sợi cellulose acetate.



**Hình 5.** Mẫu cellulose sau khi acetate hóa.



**Hình 6.** Mẫu được chụp qua kính hiển vi sau khi acetate hóa (độ phóng đại 1000).

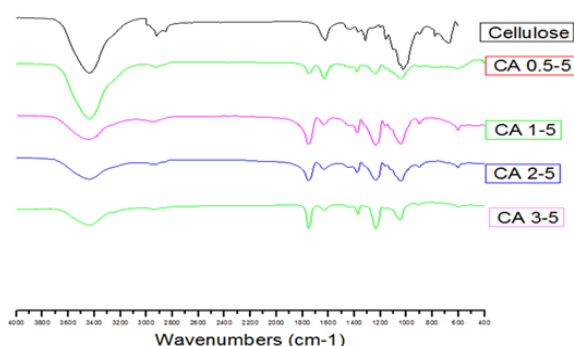


**Hình 7.** Mẫu được chụp bằng phương pháp đo TEM.

Kết quả trên cho thấy chỉ sau 1 quá trình acetate hóa cellulose đã đồng thời làm giảm độ phân cực và giảm đáng kể kích thước của sợi cellulose. Từ đó có thể đưa ra dự đoán về khả năng tương thích tốt của sợi cellulose đã biến tính trong nền polymer - phù hợp với định hướng làm pha gia cường trong tổng hợp vật liệu composite phân hủy sinh học.

### 3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian siêu âm đến phản ứng acetate hóa cellulose

Các mẫu cellulose acetate sau phản ứng được rửa lại nhiều lần với nước cất để loại bỏ tác chất còn dư (anhydride acetic) và dung môi (acid acetic). Sản phẩm sau khi sấy khô được phân tích bằng phương pháp phổ IR, kết quả thể hiện trong Hình 8.



**Hình 8.** Kết quả phổ IR các mẫu khảo sát ảnh hưởng thời gian siêu âm: Cellulose, CA 0,5 - 5 (0,5 giờ), CA 1 - 5 (1 giờ), CA 2 - 5 (2 giờ), CA 3 - 5 (3 giờ).

Phản ứng acetate hóa cellulose được xác nhận rõ ràng thông qua sự xuất hiện peak tại số sóng 1750/cm đặc trưng cho tần số dao động của liên kết C=O của nhóm acetyl  $\text{CH}_3\text{COO}-$ . Kết quả cho thấy tỷ lệ cường độ peak này so với cường độ peak 3300 - 3500/cm của nhóm -OH tăng mạnh khi tăng thời gian siêu âm từ 0,5 giờ lên 1 giờ, tuy nhiên tiếp tục tăng thời gian siêu âm lên 2 giờ, 3 giờ thì tỷ lệ này không tăng thêm nữa. Điều này cho thấy sau 1 giờ, quá trình đã đạt trạng thái cân bằng, do đó thời gian siêu âm 1 giờ là phù hợp, kết quả này được chọn cho khảo sát tiếp theo.

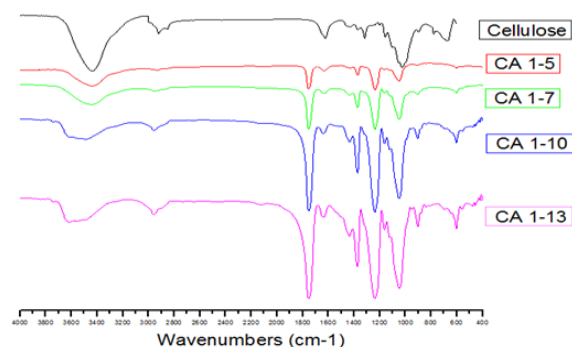
### 3.2.3. Ảnh hưởng của thể tích anhydride acetic đến phản ứng acetate hóa cellulose

Các mẫu cellulose acetate của quá trình khảo sát ảnh hưởng của anhydride acetic được phân

tích bằng phương pháp phổ IR, kết quả thể hiện trong Hình 9.

Dựa vào Hình 9 nhận thấy tăng thể tích anhydride acetic từ 5 lên 10 mL, tỷ lệ cường độ peak tại số sóng 1750/cm so với peak 3300 - 3500/cm tăng mạnh, điều này chứng tỏ hiệu suất quá trình acetate hóa cellulose tăng. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng thể tích anhydride acetic từ 10 lên 13 mL thì tỷ lệ này không tăng thêm nữa, điều này cho thấy 10ml anhydride acetic là phù hợp cho phản ứng.

Quá trình biến tính cellulose bằng anhydride acetic để acetate hóa một số nhóm -OH đã bước đầu đạt hiệu quả, điều kiện phù hợp cho quá trình này là: 0,5 g bột cellulose, 10 mL anhydride acetic trong dung môi acid acetic, xúc tác  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đặc và siêu âm trong 1 giờ.



**Hình 9.** Kết quả phổ IR các mẫu khảo sát ảnh hưởng thể tích anhydride acetic: Cellulose, CA 1 - 5 (5 mL), CA 1 - 7 (7 mL), CA 1 - 10 (10 mL), CA 1 - 13 (13 mL).

## 4. Kết Luận

Nghiên cứu đã rút ngắn được quy trình xử lý: có thể thu được cellulose chỉ qua một bước xử lý NaOH, hemicelluloses và lignin trong lục bình đã được loại bỏ. Điều kiện thích hợp cho quá trình này là: 0,5 g lục bình khô trong 25 mL dung dịch NaOH 0,25 M, thời gian 5 giờ và nhiệt độ được duy trì 80°C. Cellulose được biến tính bằng anhydride acetic nhằm làm giảm độ phân cực của cellulose, điều kiện phù hợp cho phản ứng là: 0,5 g bột cellulose, 10 mL anhydride acetic và siêu âm trong 1 giờ bằng máy siêu âm Elmasonic S 100 H cường độ 500 W. Kết quả thu được vi sợi cellulose acetate kích thước khoảng 50 nm, độ phân cực giảm mạnh so với cellulose ban đầu, phù hợp làm pha gia cường cho vật liệu nanocomposite phân hủy sinh học.

## Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi đề tài cơ sở Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Mã số: CS-CB17-KH-04.

## Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abdulkhani, A., Hosseinzadeh, J., Ashori, A., Dadashi, S., & Takzare, Z. (2014). Preparation and characterization of modified cellulose nanofibers reinforced polylactic acid nanocomposite. *Polymer Testing* 35, 73-79.
- Istirokhatun, T., Rokhati, N., Rachmawaty, R., Meriyani, M., Priyanto, S., & Susanto, H. (2015). Cellulose isolation from tropical water hyacinth for membrane preparation. *Procedia Environmental Sciences* 23, 274-281.
- Nguyen, T. B. T., Luong, T. H. V., Tran, L. N. P., Nguyen, T. T. D., & Yi-Hsu, J. (2017) Comparison of some pretreatment methods on cellulose recovery from water hyacinth (*Eichhornia Crassipe*). *Journal of Clean Energy Technologies* 5(4), 274-279.
- Oka, M. A. (2010). *PLA and cellulose based degradable polymer composites*. (Doctoral dissertation). Georgia Institute of Technology, Georgia, USA.
- Wang, T., & Drzal, L. T. (2012). Cellulose-nanofiber-reinforced poly (lactic acid) composites prepared by a water-based Approach. *ACS Applied Materials & Interfaces* 4(10), 5079-5085.

## Utilization of knife fish bone (*Chitala chitala*) as a material for fish protein and mineral powder production by enzyme hydrolysis

Thuy T. M. Le<sup>1\*</sup>, & Truc T. Tran<sup>2</sup>

<sup>1</sup>College of Aquaculture and Fisheries, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

<sup>1</sup>College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: February 26, 2019

Revised: May 15, 2019

Accepted: July 22, 2019

#### Keywords

Enzyme hydrolysis

Knife fish bone

Mineral powder

Protein powder

#### \*Corresponding author

Le Thi Minh Thuy

Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

### ABSTRACT

Utilization of knife fish bone as new materials to produce fish protein and mineral powder to increase the value of by-products is necessary. The objective of this study was to investigate effects of Tegalase enzyme concentration, heating time, and drying condition on the quality of hydrolyzed knife fish bone. The results showed that the sample hydrolyzed at 50°C with the Tegalase enzyme concentration of 0.3% resulted in the highest peptide formation and amino acid content in protein solution (3602 peptide bonding and 16.4 g/L, respectively) as well as the highest mineral content (38.8%) in the bone sample. After hydrolysis, the sample was filtered to separate the bone and protein solution. The protein solution heated up to 90 - 100°C for 2 min showed the highest amino acid content (18.1 g/L). The moisture content, protein yield and recovery yield of the fish protein were 9.11%, 68.1%, and 2.19%, respectively when dried at 60°C for 24 h. After hydrolysis, the bone was dried at the temperature of 60°C for 3 h to get mineral powder with 11.4% moisture, 78.9% minerals and 21.9% calcium.

**Cited as:** Le, T. T. M., & Tran, T. T. (2019). Utilization of knife fish bone (*Chitala chitala*) as a material for fish protein and mineral powder production by enzyme hydrolysis. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 33-41.

## Nghiên cứu tận dụng xương cá thác lác còm (*Chitala chitala*) để sản xuất bột đậm và bột khoáng bằng phương pháp thủy phân enzyme

Lê Thị Minh Thủy<sup>1\*</sup> & Trần Thanh Trúc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 26/02/2019

Ngày chỉnh sửa: 15/05/2019

Ngày chấp nhận: 22/07/2019

#### Từ khóa

Bột đậm

Bột khoáng

Thủy phân enzyme

Xương cá thác lác còm

#### \*Tác giả liên hệ

Lê Thị Minh Thủy

Email: ltmthuy@ctu.edu.vn

### TÓM TẮT

Tận dụng xương cá thác lác như nguồn nguyên liệu mới để sản xuất bột đậm và bột khoáng nhằm nâng cao giá trị nguồn phụ phẩm này là cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme Tegalase, thời gian nâng nhiệt và quá trình sấy đến chất lượng sản phẩm. Kết quả cho thấy khi thủy phân mẫu ở nhiệt độ 50°C trong 24 giờ ở nồng độ enzyme Tegalase 0,3% thì tạo ra dịch đậm có sự hình thành peptit (3602 liên kết peptit) và hàm lượng axit amin (16,4 g/L) nhiều nhất cùng như hàm lượng khoáng trong xương (38,8%) cao nhất. Mẫu sau khi thủy phân được lọc để thu phần xương và dịch đậm. Dịch đậm được nâng nhiệt ở nhiệt độ 90 - 100°C trong khoảng 2 phút cho hàm lượng axit amin là cao nhất (18,1 g/L)). Sau đó, dịch đậm được sấy ở 60°C trong 24 giờ thu được bột đậm với độ ẩm là 9,11%, hàm lượng protein là 68,1% và hiệu suất thu hồi là 2,19%. Bột khoáng thu được có độ ẩm thích hợp là 11,4%, hàm lượng khoáng là 78,9%, hàm lượng canxi đạt 21,9% khi sấy mẫu xương sau thủy phân ở 60°C trong 3 giờ.

### 1. Đặt Vấn Đề

Những năm gần đây, cá thác lác còm được nhân giống và nuôi rộng rãi ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long như An Giang, Cần Thơ, đặc biệt là Hậu Giang vừa mang lại hiệu quả kinh tế cao vừa đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Tuy nhiên, sau khi tách thịt thì lượng phụ phẩm thải ra môi trường rất lớn chiếm từ 50 - 75% (Tran, 2014). Vì thế, nếu xử lý không triệt để sẽ dễ gây ô nhiễm môi trường do tính chất thủy sản mauươn thối, gây mùi khó chịu. Về hướng xử lý phụ phẩm, có thể dùng chế biến bột cá trong chăn nuôi, dầu cá giàu dinh dưỡng,... Tuy nhiên, các hướng xử lý này vẫn chưa tận dụng phế phẩm một cách hiệu quả. Xương cá là nguồn tiềm năng cung cấp canxi - một nguyên tố rất cần cho sức khỏe con người và chiếm từ 34 - 36% tổng hàm lượng khoáng có trong xương (Hamada & ctv., 1995), đồng thời khai thác triệt để lượng thịt vụn còn sót lại khá cao trên xương tạo ra nguồn đậm có tính

ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghệ thực phẩm. Phương pháp thủy phân thịt hay xương cá bằng enzyme đang được lựa chọn nhiều nhất do mang lại hiệu quả thủy phân cao, tạo ra sản phẩm giá trị dinh dưỡng cao, cho hiệu suất thu hồi tốt (Kristinsson & Rasco, 2000; Gao & ctv., 2006) và là bước tiến mới của ngành thủy sản nước ta nhằm tạo ra sản phẩm đảm bảo chất lượng dinh dưỡng, đáp ứng yêu cầu con người hiện đại. Nhiều loại enzyme được nghiên cứu rộng rãi để thủy phân nguồn protein từ cá như Alcalase, Neutrase, Protamex, Flavourzyme cho hiệu quả thủy phân tốt (Kristinsson & Rasco, 2000; Liaset & ctv., 2002; Muzaifa & ctv., 2012). Tuy nhiên, các nghiên cứu ứng dụng enzyme Tegalase để thủy phân protein còn khá hạn chế và gần như chưa có công bố nào về khả năng thủy phân của loại enzyme này. Chính vì những lý do trên, nghiên cứu thủy phân xương cá thác lác còm (*Chitala chitala*) để sản xuất bột đậm và bột khoáng bằng enzyme Tegalase đã được thực hiện.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Chuẩn bị mẫu

Nguyên liệu là xương cá thối lác còm thu tại công ty cổ phần thực phẩm Phạm Nghĩa, Cần Thơ được vận chuyển về phòng thí nghiệm bộ môn Chế biến Thủy sản, khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Nguyên liệu được rửa sạch loại bỏ tạp chất, để ráo và cắt nhỏ khoảng 2 - 3 cm. Sau đó, mẫu được đóng gói trong túi PE, khối lượng mỗi mẫu là 500 g và bảo quản trong tủ đông (nhiệt độ  $\leq -18^{\circ}\text{C}$ ) để đảm bảo chất lượng cho đến khi tiến hành các thí nghiệm. Enzyme Tegalase (Tegaferm Holding GmBh, Áo) thủy phân protein thành axit amin có pH tối thích là 7,8 - 8,8 và hoạt động trong miền nhiệt độ 50 - 60 $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến chất lượng dịch đậm và hàm lượng khoáng trong xương cá thối lác còm

Mẫu xương cá thối lác còm đã chuẩn bị trước đó được rửa đông, tiến hành thủy phân xương cá bằng enzyme Tegalase với các nồng độ khác nhau lần lượt là 0,1; 0,2 và 0,3% so với nguyên liệu (v/w), enzyme được trộn chung với nước cất và lắc đều trước khi cho dung dịch enzyme này vào mẫu thí nghiệm nhằm tạo điều kiện cho enzyme tiếp xúc đều với cơ chất, nước cất được sử dụng bằng 10% so với khối lượng mẫu xương. Giữ nhiệt độ ổn định trong suốt quá trình thủy phân là 50 $^{\circ}\text{C}$ . Thời gian thủy phân là 24 giờ. Kết thúc quá trình thủy phân tiến hành lọc để phân thành hai phần là dịch đậm và xương. Phân tích độ ẩm, hàm lượng đạm và khoáng trên mẫu xương; phân tích hàm lượng axit amin và số liên kết peptit tạo thành trên mẫu dịch đậm nhằm tìm ra nồng độ enzyme thích hợp để hiệu quả thủy phân là tốt nhất. Thí nghiệm được khảo sát thông qua một nhân tố (nồng độ enzyme Tegalase) với khối lượng mỗi mẫu là 200 g/ngiệm thức. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nghiệm thức.

### 2.3. Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian nâng nhiệt đến quá trình thủy phân protein thành axit amin

Mẫu sau khi thủy phân với nồng độ enzyme Tegalase thích hợp (kết quả thí nghiệm 1). Phần dịch đậm được nâng nhiệt bằng incubate lên nhiệt độ 90 - 100 $^{\circ}\text{C}$  và giữ nhiệt ở nhiệt độ này trong

các mốc thời gian lần lượt là 2, 4 và 6 phút. Sau khi nâng nhiệt xong, mẫu được kiểm tra pH bằng giấy quỳ, nếu pH môi trường axit thì dùng NaOH 3% để trung hòa đến môi trường trung tính. Sau đó, mẫu được phân tích hàm lượng axit amin nhằm chọn được thời gian nâng nhiệt thích hợp để quá trình thủy phân protein thành axit amin là tốt nhất. Thí nghiệm được khảo sát thông qua một nhân tố (thời gian nâng nhiệt) với khối lượng mỗi mẫu là 200 g/ngiệm thức. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nghiệm thức.

### 2.4. Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian sấy đến ẩm độ, hàm lượng đạm và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột đậm

Mẫu dịch đậm sau khi nâng nhiệt ở thí nghiệm 2 sẽ tiếp tục được phân ly để thu hồi phần đậm cho thí nghiệm sấy. Mẫu được sấy bằng thiết bị sấy không khí nóng (Tủ sấy đối lưu tự nhiên ED 400 Binder, Đức) với các mốc thời gian là 24, 48 và 72 giờ ở nhiệt độ 60 $^{\circ}\text{C}$ . Sau khi sấy, tiến hành phân tích ẩm độ, hàm lượng đạm và hiệu suất thu hồi nhằm tìm ra thời gian sấy thích hợp để bột đậm có hàm lượng protein cao, độ ẩm thích hợp và hiệu suất thu hồi cao. Thí nghiệm được khảo sát thông qua một nhân tố (thời gian sấy) với khối lượng mỗi mẫu là 200 g/ngiệm thức. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nghiệm thức.

### 2.5. Khảo sát sự ảnh hưởng của thời gian thời gian sấy đến ẩm độ, độ hòa tan và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột khoáng

Mẫu xương sau khi thủy phân với nồng độ enzyme Tegalase thích hợp (kết quả thí nghiệm 1) được sấy ở 60 $^{\circ}\text{C}$  bằng thiết bị sấy đối lưu tự nhiên ED 400 Binder (Đức) trong các mốc thời gian 2, 3 và 4 giờ. Kết thúc quá trình sấy tiến hành phân tích lại độ ẩm, độ hòa tan và hiệu suất thu hồi nhằm tìm ra chế độ sấy thích hợp nhất để sản phẩm bột khoáng đạt chất lượng tốt nhất, có khả năng hòa tan tốt, hiệu suất thu hồi cao và đạt ẩm độ theo yêu cầu. Thí nghiệm được khảo sát thông qua một nhân tố (thời gian sấy) với khối lượng mỗi mẫu là 200 g/ngiệm thức. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần ở mỗi nghiệm thức.

### 2.6. Phương pháp phân tích

Xác định tổng vi sinh vật hiếu khí có trong mẫu bằng phương pháp đổ đĩa (AOAC, 990.12), hàm lượng ẩm bằng phương pháp sấy (AOAC

934.01, 2000), hàm lượng khoáng bằng phương pháp nung (923.03, 2000), hàm lượng đạm tổng số bằng phương pháp Kjeldal, hàm lượng lipid bằng phương pháp Soxhlet (AOAC 920.39, 2000). Thành phần hóa học (ẩm, khoáng, protein, lipid) của mẫu nguyên liệu đầu vào được phân tích dựa trên căn bản khô (vật chất khô), còn đối với sự biến đổi thành phần của mẫu trong các bố trí thí nghiệm được phân tích dựa trên căn bản ướt.

Xác định hàm lượng axit amin bằng phương pháp Nitơ formol được mô tả theo tiêu chuẩn TCVN 3708-1990.

Xác định số liên kết peptid theo phương pháp Hultmann & ctv. (2012). Cho 1,2 mL dung dịch đệm ở mức pH (5,5 hoặc 7,5) (acid citric 0,1 M và natri hydrophosphate 0,2 M) vào ống nghiệm 15 mL, tiếp tục cho vào 0,1 mL mẫu lắc đều. Sau đó thêm 2 mL trichloroacetic acid (TCA 5%) vào để làm kết tủa protein, lắc đều và để yên 30 phút. Sau đó tiến hành lọc để bỏ kết tủa, thu phần dịch lọc. Hút 0,5 mL dung dịch vừa lọc được cho vào ống nghiệm, sau đó thêm vào 2,5 mL dung dịch D (1 mL dung dịch  $\text{CuSO}_4$  1% + 1 mL Potassium Sodium Tartrate 2% + 100 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% trong 0,1 M NaOH), lắc đều và để yên 10 phút, cuối cùng thêm 0,25 mL Folin (pha loãng với nước tỷ lệ 1folin: 2 nước, v:v) lắc đều, để yên sau 30 phút tiến hành đo màu quang phổ với bước sóng 750 nm. Mẫu dùng cho cài đặt máy quang phổ cũng được chuẩn bị bằng cách cho 0,5 mL nước cất và 2,5 mL dung dịch, lắc đều và để yên 10 phút cuối cùng thêm 0,25 mL Folin (1:2) lắc đều, để yên 30 phút dùng làm mẫu trắng so màu với mẫu thí nghiệm.

Xác định độ hòa tan bằng phương pháp lọc theo phương pháp của Hemung (2013). Xác định độ hòa tan của sản phẩm theo công thức  $T = ((D - C) \times 100)/D$ . Trong đó: T là độ hòa tan của sản phẩm, D là khối lượng bột cá ban đầu và C là khối lượng bột cá không tan. Cân 1 g bột cá (D) hòa tan với 10 mL nước cất. Sau đó, khuấy đều trong 12 giờ, nhiệt độ phòng. Lọc dung dịch qua giấy lọc, sau đó sấy giấy lọc và mẫu đến khối lượng không đổi, cân để xác định khối lượng mẫu còn lại (C).

Xác định hàm lượng canxi theo AOAC 2013.06 (2016).

Xác định hiệu suất thu hồi bằng phương pháp kiểm tra khối lượng sản phẩm theo công thức:

$$H = \frac{Y}{X} \times 100\%$$

Trong đó:

H (%): Hiệu suất thu hồi của sản phẩm.

Y (g): Khối lượng bột cá hoặc bột canxi thu được sau sấy.

X (g): Khối lượng mẫu đem đi thủy phân.

## 2.7. Xử lý số liệu

Kết quả được tính toán trung bình, độ lệch chuẩn bằng chương trình Microsoft Excel 2013. Xử lý thống kê One Way ANOVA với mức ý nghĩa 95% bằng chương trình SPSS 16.0. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức trong cùng một thí nghiệm bằng phép thử Duncan.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Thành phần hóa học của nguyên liệu xương cá thát lát còm

Kết quả phân tích thành phần hóa học của xương cá thát lát còm được thể hiện trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Thành phần hóa học xương cá thát lát còm (tính theo vật chất khô)

| Chỉ tiêu | Hàm lượng (%) <sup>1</sup> |
|----------|----------------------------|
| Khoáng   | 43,6 ± 0,87                |
| Protein  | 36,3 ± 0,01                |
| Lipid    | 8,92 ± 1,70                |

<sup>1</sup>Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn, n = 3.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy thành phần hóa học chủ yếu của xương cá thát lát còm là khoáng và đạm chiếm hàm lượng cao lần lượt là 43,6 và 36,3%. Với hàm lượng cao khoáng và đạm, xương cá thát lát là nguồn nguyên liệu thích hợp để tận dụng sản xuất bột đạm và bột khoáng có chất lượng cao.

### 3.2. Xác định nồng độ enzyme Tegalase thích hợp để đạt được hiệu quả thủy phân cao nhất

Chất lượng dịch đạm thu được từ công đoạn thủy phân xương cá thát lát còm tương ứng với các nồng độ enzyme Tegalase khác nhau được trình bày ở Bảng 2.

Kết quả thủy phân được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy ở các nồng độ enzyme khác nhau thì hiệu quả thủy phân cũng khác nhau. Đối với mẫu

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme Tegalase đến chất lượng dịch đậm

| Mẫu       | Tỷ lệ enzyme (%) | Số liên kết peptit (liên kết) | Hàm lượng axit amin(g/L)  |
|-----------|------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Đối chứng | 0                | 1234 ± 9,87 <sup>a</sup>      | 8,05 ± 0,099 <sup>a</sup> |
| 1         | 0,1              | 2986 ± 16,8 <sup>b</sup>      | 11,9 ± 0,297 <sup>b</sup> |
| 2         | 0,2              | 3752 ± 9,51 <sup>c</sup>      | 13,6 ± 0,001 <sup>c</sup> |
| 3         | 0,3              | 3602 ± 5,43 <sup>c</sup>      | 16,4 ± 0,001 <sup>d</sup> |

<sup>a-d</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

đối chứng chưa bổ sung enzyme thì quá trình thủy phân vẫn diễn ra dưới tác dụng của hệ enzyme protease nội tại, nhưng số liên kết peptit tạo thành thấp (1234 liên kết). Khi tăng tỷ lệ enzyme Tegalase bổ sung vào mẫu từ 0,1 đến 0,3% thì khả năng thủy phân protein tạo thành liên kết peptit cũng tăng dần từ 2986 đến 3602 liên kết. Đồng thời, khi tăng tỷ lệ enzyme thì hàm lượng axit amin trong dịch đậm tăng từ 11,9 đến 16,4 g/L. Nguyên nhân là dưới tác dụng của enzyme, protein bị thủy phân, nghĩa là phân tử protein bị phân cắt tại các liên kết peptit tạo thành các chuỗi peptit mạch ngắn, sau đó các mạch peptit tiếp tục được phân cắt tạo thành các axit amin và làm tăng hàm lượng axit amin và số liên kết peptit tạo thành cũng tăng khi tăng tỷ lệ enzyme bổ sung (Nguyen, 2004; Dang, 2008). Tuy nhiên, sự có mặt của các chuỗi peptit mạch ngắn mới được sinh ra cũng làm ức chế phần nào tác dụng thủy phân của enzyme (Guérard & ctv., 2002; Ogawa & Shimizu, 2002) và có thể đóng vai trò là đối thủ cạnh tranh cơ chất hiệu quả đối với các protein chưa được thủy phân hoặc thủy phân một phần (Nguyen & ctv., 2011). Kết quả nghiên cứu của Nguyen & ctv. (2013) thì với tỷ lệ enzyme Alcalase là 0,382%, nhiệt độ thủy phân là 62°C và thời gian thủy phân là 2 giờ sẽ cho hàm lượng đậm hòa tan cao (18,5 g/L) từ quá trình thủy phân đầu tôm thẻ chân trắng. Ở nghiên cứu của Do & ctv. (2013) cũng cho kết quả thủy phân tốt khi bổ sung enzyme Flavourzyme ở nồng độ 0,5% so với khối lượng nguyên liệu, nhiệt độ 50°C và thủy phân trong 6 giờ sẽ cho ra sản phẩm thủy phân protein từ đầu cá chêm chứa hàm lượng axit amin cao (44,02 g/100 g chất khô) và tỉ lệ axit amin không thay thế cao (47,71%). Một kết quả khác của tác giả Vu (2004) đã nghiên cứu quá trình thủy phân protein cá mòi (*Saurida Tumbil*) để thu hồi bột đậm bằng protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* và cho thấy hệ enzyme này đã thực hiện tốt quá trình thủy phân cơ thịt cá mòi với nồng độ 0,3% ở 50°C. Ấm độ, hàm lượng khoáng và protein của xương cá sau khi thủy phân bằng

enzyme ở các nồng độ khác nhau thể hiện trong Bảng 3.

Bên cạnh đó, khi thủy phân mẫu xương với tỷ lệ enzyme tăng từ 0,1 đến 0,3% thì hàm lượng ẩm, khoáng và protein cũng thay đổi đáng kể. Cụ thể, khi tỷ lệ enzyme tăng dần thì hàm lượng ẩm giảm dần từ 41,2 còn 35,1%, hàm lượng protein trong xương cũng giảm dần từ 10,6 còn 8,93% đồng thời hàm lượng khoáng tăng dần từ 35,6 đến 38,8%. Nguyên nhân chủ yếu là do trong quá trình thủy phân phần thịt vụn trên xương bị phân cắt mạch thành các chuỗi peptit mạch ngắn và axit amin cùng với lượng nước tự do trong nguyên liệu cũng được thoát ra một phần làm hàm lượng đậm trên xương giảm đáng kể và hàm lượng khoáng tăng (Le, 2002). Trước đây vẫn chưa có nhiều nghiên cứu sử dụng enzyme để thủy phân loại protein ra khỏi xương mà chủ yếu là sử dụng phương pháp truyền thống, dùng nhiệt độ cao trong nồi áp suất và sử dụng hóa chất để loại protein trong mẫu xương. Nghiên cứu của Techochatchawal & ctv. (2009) đã đề xuất xương cá rô phi (*Tilapia nilotica*) được xử lý bằng NaOH 0,8%, tỉ lệ 1:5 (w/v), sau đó xương được gia nhiệt ở 121°C trong 90 phút, 1,02 atm cho chất lượng bột canxi tốt nhất với hàm lượng canxi là 25,01%, còn đối với xương cá hồi và cá tuyết sản xuất bột canxi (Bubel & ctv., 2015) sử dụng NaOH 2 M với thời gian lần lượt là 12 và 24 giờ làm protein giảm từ 18,0 xuống 10,8% (đối với xương cá hồi), 15,3 xuống 14,2% (đối với xương cá tuyết). Nghiên cứu được công bố bởi Nemati & ctv. (2017) cũng xử lý xương cá ngừ (*Thunnus albacares*) bằng dung dịch NaOH 2% trong 30 phút ở nhiệt độ sôi với tỉ lệ 1:3 (w/v). Vì thế, so với phương pháp cũ thì phương pháp sử dụng enzyme bổ sung để thủy phân xương cá là một bước tiến mới góp phần tiết kiệm thời gian chi phí cũng như mang lại hiệu quả khử protein cao và hạn chế ô nhiễm môi trường. Như vậy, kết hợp với chất lượng dịch đậm sau thủy phân ở Bảng 2 thì nồng độ bổ sung enzyme Tegalase 0,3% là thông số thích hợp để bố trí thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme Tegalase đến thành phần hoá học của xương cá thác lác sau quá trình thủy phân (tính theo căn bản ướt)

| Mẫu       | Tỷ lệ enzyme (%) | Ẩm độ (%)                 | Khoáng (%)                | Protein (%)               |
|-----------|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Đối chứng | 0,0              | 58,1 ± 2,29 <sup>b</sup>  | 12,4 ± 0,053 <sup>a</sup> | 14,2 ± 0,233 <sup>a</sup> |
| 1         | 0,1              | 41,2 ± 0,893 <sup>a</sup> | 35,6 ± 1,55 <sup>b</sup>  | 10,6 ± 0,158 <sup>b</sup> |
| 2         | 0,2              | 41,1 ± 3,24 <sup>a</sup>  | 36,0 ± 3,55 <sup>b</sup>  | 10,1 ± 0,631 <sup>b</sup> |
| 3         | 0,3              | 35,1 ± 6,39 <sup>a</sup>  | 38,8 ± 3,06 <sup>b</sup>  | 8,93 ± 0,149 <sup>c</sup> |

<sup>a-c</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian nâng nhiệt đến quá trình thủy phân protein thành axit amin

Hàm lượng đạm amin trong mẫu dịch đậm sau khi nâng nhiệt được trình bày trong Bảng 4.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của thời gian nâng nhiệt đến sự thủy phân dịch đậm thành các axit amin

| Mẫu       | Thời gian nâng nhiệt (phút) | Axit amin (g/L)           |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|
| Đối chứng | 0                           | 16,4 ± 0,001 <sup>a</sup> |
| 1         | 2                           | 18,1 ± 0,001 <sup>d</sup> |
| 2         | 4                           | 17,3 ± 0,099 <sup>c</sup> |
| 3         | 6                           | 16,6 ± 0,049 <sup>b</sup> |

<sup>a-d</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy rằng khi tăng thời gian nâng nhiệt lên 2 phút thì hàm lượng axit amin trong mẫu dịch đậm tăng từ 16,4 đến 18,1 g/L. Tuy nhiên khi tiếp tục nâng nhiệt đến 4 và 6 phút thì hàm lượng axit amin thu được lại có khuynh hướng giảm. Nguyên nhân chủ yếu của sự thay đổi này là trong quá trình thủy phân có thể chưa đủ điều kiện thích hợp để cắt mạch protein hoàn toàn thành axit amin nên trong thời gian nâng nhiệt 2 phút sẽ là điều kiện bắt buộc để protein bị cắt mạch hoàn toàn, khi tiếp tục tăng thời gian nâng nhiệt thì axit amin có trong mẫu bắt đầu biến tính sinh ra các sản phẩm cấp thấp làm hao hụt hàm lượng amino axit. Điều này cho thấy nhiệt độ càng cao và thời gian nâng nhiệt càng dài thì hàm lượng axit amin càng giảm. Nguyên nhân là do enzyme có bản chất là protein nên bị biến tính bởi nhiệt độ cao (Nguyen, 2009). Tuy nhiên, mục đích của công đoạn nâng nhiệt là làm đông vón protein, phá vỡ cấu trúc của dầu, làm protein tách ra dễ dàng, giảm bớt mùi và làm mất hoạt tính của enzyme, tạo thuận lợi cho công đoạn sấy sản phẩm vì vậy hạn chế được sự hư hỏng và tạo mùi đặc trưng cho sản phẩm (Le, 2014). Dựa vào

kết quả xử lý thống kê ở thời gian từ 0 đến 6 phút thì ở các mốc thời gian đều khác biệt có ý nghĩa thống kê và ở mốc thời gian 2 phút cho hàm lượng axit amin cao nhất (18,1 g/L) nên chọn 2 phút để nâng nhiệt vừa đạt yêu cầu đặt ra của thí nghiệm vừa rút ngắn thời gian và có lợi về mặt kinh tế.

### 3.4. Ảnh hưởng của thời gian sấy đến chất lượng bột đậm

Độ ẩm, hàm lượng đạm và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột đậm ở các mốc thời gian sấy khác nhau được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả cho thấy, sấy mẫu ở cùng một nhiệt độ 60°C khi tăng thời gian sấy từ 2 đến 4 ngày thì hàm lượng ẩm trong nguyên liệu giảm dần từ 12,2 còn 6,36%, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu, hiệu suất thu hồi giảm từ 2,25 còn 2,14% và hàm lượng đạm tăng từ 66,3 đến 78,2%. Nguyên nhân chủ yếu do sấy ở nhiệt độ cao trong một thời gian dài, dưới tác dụng của nhiệt thì nước tự do trong mẫu sẽ dễ dàng bay hơi làm ẩm độ giảm nhanh chóng và hàm lượng chất khô (hàm lượng protein) trong mẫu đậm sẽ tăng lên, tuy nhiên nếu tiếp tục sấy thì nước còn lại trong nguyên liệu chủ yếu là nước liên kết nên rất khó thoát ra ngoài (Nguyen, 1990). Theo Le (2014) độ ẩm thích hợp của sản phẩm bột cá là dưới 10 - 12%, ở độ ẩm này thích hợp cho quá trình bảo quản, chất lượng sản phẩm bột cá ít bị biến đổi cũng như tránh sự hút ẩm trở lại gây vón cục, hư hỏng. Vậy thông số thích hợp để sản xuất bột đậm từ thịt vụn trên xương cá thác lác có độ ẩm phù hợp, hàm lượng đạm và hiệu suất thu hồi cao là sấy 2 ngày ở nhiệt độ 60°C.

### 3.5. Ảnh hưởng thời gian sấy đến chất lượng bột canxi

Độ ẩm, độ hòa tan và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột canxi ở các mốc thời gian sấy khác nhau được thể hiện ở Bảng 6.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của thời gian sấy đến độ ẩm, hàm lượng protein và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột đậm

| Mẫu | Thời gian sấy (ngày) | Độ ẩm (%)                 | Hàm lượng protein (%)     | Hiệu suất thu hồi (%)     |
|-----|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1   | 1                    | 12,2 ± 0,773 <sup>c</sup> | 66,3 ± 0,127 <sup>a</sup> | 2,25 ± 0,013 <sup>a</sup> |
| 2   | 2                    | 9,11 ± 1,01 <sup>b</sup>  | 68,1 ± 0,989 <sup>a</sup> | 2,19 ± 0,102 <sup>a</sup> |
| 3   | 3                    | 6,36 ± 0,006 <sup>a</sup> | 78,2 ± 1,421 <sup>b</sup> | 2,14 ± 0,006 <sup>a</sup> |

<sup>a-c</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của thời gian sấy đến độ ẩm, độ hòa tan và hiệu suất thu hồi của sản phẩm bột canxi

| Mẫu | Thời gian sấy (giờ) | Độ ẩm (%)                 | Độ hòa tan (%)            | Hiệu suất thu hồi (%)     |
|-----|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1   | 2                   | 15,2 ± 0,027 <sup>c</sup> | 10,6 ± 2,09 <sup>a</sup>  | 21,3 ± 0,058 <sup>c</sup> |
| 2   | 3                   | 11,4 ± 1,40 <sup>b</sup>  | 13,2 ± 2,02 <sup>ab</sup> | 18,6 ± 0,038 <sup>b</sup> |
| 3   | 4                   | 7,76 ± 0,086 <sup>a</sup> | 17,4 ± 2,08 <sup>b</sup>  | 15,1 ± 0,077 <sup>a</sup> |

<sup>a-c</sup>Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau khác nhau thì có khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

**Bảng 7.** Thành phần hóa học và vi sinh của bột đậm và bột khoáng (theo khối lượng khô)

| Chỉ tiêu phân tích  | Bột đậm                | Bột khoáng             |
|---------------------|------------------------|------------------------|
| Hàm lượng canxi (%) | KTH                    | 21,9                   |
| Vi sinh (cfu/g)     | 2,83 × 10 <sup>4</sup> | 1,49 × 10 <sup>3</sup> |
| Ẩm độ (%)           | 9,11 ± 1,01            | 11,4 ± 1,40            |
| Khoáng (%)          | 3,42 ± 0,027           | 77,6 ± 0,141           |
| Protein (%)         | 68,1 ± 0,989           | 7,33 ± 0,011           |
| Lipid (%)           | 12,4 ± 0,424           | 2,44 ± 0,056           |

KTH: không thực hiện.

Từ Bảng 6 cho thấy, sấy mẫu xương cá ở 60<sup>0</sup>C khi tăng thời gian từ 2 đến 4 giờ thì hàm lượng ẩm giảm từ 15,2 còn 7,76%, hiệu suất thu hồi giảm từ 21,3 còn 15,1%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu. Do tác dụng nhiệt độ cao, càng tăng thời gian sấy thì nước tự do trong sản phẩm sẽ thoát ra càng nhiều vì vậy độ ẩm càng giảm và hiệu suất thu hồi càng thấp (Nguyen, 1990). Độ hòa tan tăng theo thời gian sấy từ 10,6 đến 17,4% vì sấy càng lâu độ ẩm càng thấp, bột sẽ càng mịn giúp dễ dàng hòa tan trong nước hơn. So với kết quả của Hemung (2013) thì độ hòa tan của bột canxi từ xương cá rô phi là 9,38% và thấp hơn so với xương cá thát lát còm trong nghiên cứu này. Độ ẩm thích hợp để bảo quản bột canxi là dưới 10 - 12% (Le, 2014). Độ ẩm thấp cũng cho phép bột xương cá chống lại sự phát triển của vi sinh vật (Hemung, 2013). Vì vậy, thời gian sấy thích hợp là 3 giờ ở 60<sup>0</sup>C cho bột khoáng với chất lượng tốt nhất có độ ẩm, độ hòa tan và hiệu suất thu hồi thích hợp lần lượt là 11,4; 13,2 và 18,6%.

### 3.6. Thành phần hóa học của bột đậm và bột khoáng

Chất lượng bột đậm và bột khoáng từ xương cá thát lát được thể hiện ở Bảng 7.

Sản phẩm bột đậm tạo ra có hàm lượng ẩm thấp (9,11%) đạt yêu cầu về độ ẩm nhỏ hơn 10%, đây là cơ sở giúp tránh được các hiện tượng hư hỏng khi bảo quản và hạn chế tốc độ phát triển của vi sinh vật gây hỏng do sản phẩm có hoạt độ nước thấp ở độ ẩm này, tạo môi trường không thuận lợi cho vi sinh vật phát triển. Đồng thời, hàm lượng đạm của sản phẩm đạt tương đối cao (68,1%), tuy nhiên vẫn chưa đạt yêu cầu của bột cá thực phẩm (hàm lượng đạm lớn hơn 70%). Đối với sản phẩm bột khoáng từ xương cá thát lát có hàm lượng ẩm là 11,4% phù hợp để bảo quản trong thời gian dài và hàm lượng canxi có trong sản phẩm cũng tương đối cao (21,9%) (Bảng 7). Cả bột đậm và bột khoáng từ xương cá thát lát đều có tổng vi sinh vật hiếu khí phù

hợp, không vượt quá 106 cfu/g theo quy định của MOH (2007) thích hợp để bổ sung vào thức ăn chăn nuôi, riêng bột khoáng có thể bổ sung vào nguồn thực phẩm, tuy nhiên nếu muốn bổ sung vào thực phẩm thì cần nghiên cứu kỹ về khả năng hấp thụ của cơ thể để có chế độ bổ sung tốt nhất.

#### 4. Kết Luận

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy rằng khi thủy phân xương cá thác lác còm bằng enzyme Tegalase ở nồng độ 0,3% trong 24 giờ ở 50°C cho khả năng thủy phân cao nhất. Dịch thủy phân được nâng nhiệt trong thời gian 2 phút có hàm lượng đạm amin cao nhất là 18,1%. Sản phẩm bột đạm thu được đạt độ ẩm thích hợp khi sấy ở 60°C trong thời gian là 48 giờ và cùng điều kiện sấy 60°C trong thời gian 3 giờ sẽ thu được bột khoáng với ẩm độ dưới 12%.

#### Lời Cảm Ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (20<sup>th</sup> ed.). Maryland, USA: AOAC International.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2000). *Official methods of Analysis of AOAC International* (17<sup>th</sup> ed). Maryland, USA: AOAC International.
- Bubel, F., Dobrzański, Z., Bykowski, P. J., Chojnacka, K., Opaliński, S., & Trziszka, T. (2015). Production of calcium preparations by technology of saltwater fish by product processing. *De Gruyter Open* 13(1), 1333-1340.
- Dang, H. T. (2008). *Evaluation of using protease enzyme in chitin - chitosan production process*. (Unpublished master's thesis). Nha Trang University, Nha Trang, Vietnam.
- Do, S. T., Nguyen, D. X., & Nguyen, H. T. M. (2013). Study on hydrolysis of the seabass head (*Lates calcarifer*) by flavourzyme. *Journal of Fisheries Science and Technology* 1, 138-144.
- Gao, M. T., Hirata, M., Toorisaka, E., & Hano, T. (2006). Acid hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology* 97(18), 2414-2420.
- Guérard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, 489-498.
- Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H., & Saeki, K. (1995). Inorganic constituents of bone of fish. *Fisheries Science* 61(3), 517-520.
- Hemung, B. O. (2013). Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* 3(4), 306-309.
- Hultmann, L., Phu, T. M., Tobiassen, T., Aas-Hansen, Ø., & Rustad, T. (2012). Effects of pre-slaughter stress on proteolytic enzyme activities and muscle quality of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Food chemistry* 134(3), 1399-1408.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48(3), 657-666.
- Le, T. N. (2002). *Industrial biochemistry*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.
- Le, T. T. M. (2014). *Lectures: fishmeal oil and medicinal herb processing technology*. Faculty of Fisheries, Can Tho University, Can Tho, Vietnam.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex<sup>TM</sup> protease. *Process Biochemistry* 37, 1263-1269.
- MOH (Ministry of Health). (2007). *Decision No. 46/2007/QĐ-BYT dated 19/12/2007 on promulgation "Regulation of maximum level of biological and chemical pollution in food"*. Retrieved February 2, 2018, from <http://www.fsi.org.vn/pic/files/462007qdbyt.pdf>.
- Muzaifa, M., Safriani, N., & Zakaria, F. (2012). Production of protein hydrolysates from fish byproduct prepared by enzymatic hydrolysis. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation - International Journal of the Bioflux Society* 5(1), 36-39.
- Nemati, M., Huda, N., & Ariffin, F. (2017). Development of calcium supplement from fish bone wastes of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and characterization of nutritional quality. *International Food Research Journal* 24(6), 2419-2426.
- Nguyen, C. T. (1990). *Technology of aquatic food processing vol. 2*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Nguyen, H. L. (2009). Hydrolysis of fish processing discard using enzyme from head of black tiger shrimp *Penaeus monodon* and process optimization. *Journal of Fisheries Science and Technology* 1, 10-18.
- Nguyen, H. T. M., Sylla, K. S. B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno, C., Moreau, J., Tran, L. T., & Bergé, J. P. (2011). Enzymatic hydrolysis of yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) by-products using protamex protease. *Food Technology and Biotechnology* 49(1), 48-55.

- Nguyen, H. T. N., Ngo, D. T. H., & Ngo, N. D. (2013). Optimization of protein hydrolysis from white shrimps head (*Penaeus vannamei*) by alcalase adopting response surface methodology. *Journal of Fisheries Science and Technology* 2, 129-134.
- Nguyen, L. D. (2004). *Enzyme technology*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Ho Chi Minh City Vietnam National University Publishing House.
- Ogawa, J., & Shimizu, S. (2002). Industrial microbial enzymes: the discovery by screening and use in large scale production of useful chemicals in Japan. *Current Opinion in Biotechnology* 13(4), 367-375.
- TCVN (Vietnamese National Standards). (2018). *TCVN 3708-1990: Fisheries – Methods for determination of amino acid nitrogen content*. Retrieved April 23, 2018, from <https://vanbanphapluat.co/tcvn-3708-1990-thuy-san-phuong-phap-xac-dinh-ham-luong-nito-axit-amin>.
- Techochatchawal, K., Therdthai, N., & Khotavivattana, S. (2009). Development of calcium supplement from the bone of Nile Tilapia (*Tilapia nilotica*). *Asian Journal of Food and Agro - Industry* 2(4), 539-546.
- Tran, D. (2014). *Utilization of by-products from seafood processing*. Retrieved July 25, 2017, from <http://tomvang.com/tin-tuc/tan-dung-phu-pham-tu-che-bien-thuy-san>.
- Vu, B. N. (2004). *Protein hydrolysis by protease enzyme from Bacillus subtilis S5*. (Unpublished doctoral dissertation). University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam.

## Effects of types and quantity of live food on growth performance and survival rate of cobia larvae (*Rachycentron canadum*)

Luong T. Le\*, Nhan T. Dinh, Hoa T. B. Nguyen, Quyen T. T. Nguyen,  
Trang T. N. Pham, & Phu T. N. Nguyen

Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: January 11, 2019

Revised: April 16, 2019

Accepted: June 06, 2019

#### Keywords

Cobia

Cobia larvae

Live food

*Rachycentron canadum*

#### \*Corresponding author

Le The Luong

Email: luong.lethe@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate effects of 3 different diets and 3 different live food stocking densities on cobia fingerling rearing in composite tanks system in the Ninh Thuan 1<sup>st</sup> grade Seafood Breeding Center from 6 - 25 days old. The experiment was performed as a 3 × 3 factorial design [live food types: 100% Copepoda (Cop), 100% Nauplius of Artemia (Art), and 50% Copepoda + 50% Artemia; live food stocking densities: 5 - 10 individuals/mL, 10 - 15 individuals/mL, and 15 - 20 individuals/mL]. Each treatment had 5 replicates.

After the nursery phase, the results showed that environmental parameters in all treatments were in normal ranges for cobia larvae growth. There was no difference in total length when cobia larvae were fed different feed densities ( $P < 0.05$ ). The 100% Art live food and the live food density of 15 - 20 individuals/mL gave the highest growth rate, whereas the 100% Cop live food and the live food density of 5 - 10 individuals/mL resulted in the lowest weight of larvae. There was no difference in weight gain when simultaneously changing the types and live food density ( $P < 0.05$ ). The survival rate of cobia larvae was highest for the 100% Cop live food and the live food density of 15 - 20 individuals/mL and lowest for the 100% Art live food and the live food density of 5 - 10 individuals/mL. However, there was no difference in the survival rate of cobia larvae when simultaneously changing the types and live food density ( $P < 0.05$ ).

**Cited as:** Le, L. T., Dinh, N. T., Nguyen, H. T. B., Nguyen, Q. T. T., Pham, T. N., & Nguyen, P. T. N. (2019). Effects of types and quantity of live food on growth performance and survival rate of cobia larvae (*Rachycentron canadum*). *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 42-50.

## Nghiên cứu ảnh hưởng của loại và lượng thức ăn sống lên tốc độ sinh trưởng và tỷ lệ sống của ấu trùng cá bớp (*Rachycentron canadum*)

Lê Thế Lương\*, Đinh Thế Nhân, Nguyễn Thị Bích Hòa, Nguyễn Thị Thu Quyên, Phạm Thị Ngọc Trang & Nguyễn Thị Ngọc Phú

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 11/01/2019

Ngày chỉnh sửa: 16/04/2019

Ngày chấp nhận: 06/06/2019

#### Từ khóa

Ấu trùng cá bớp

Cá bớp

*Rachycentron canadum*

Thức ăn sống

#### \*Tác giả liên hệ

Lê Thế Lương

Email: luong.lethe@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của 3 loại thức ăn và 3 mật độ thức ăn khác nhau đến việc ương ấu trùng cá bớp trong hệ thống bể composite tại Trung tâm Giống hải sản cấp I Ninh Thuận giai đoạn từ 6 - 25 ngày tuổi. Thí nghiệm được thực hiện theo kiểu 2 nhân tố  $3 \times 3$  [loại thức ăn: 100% Copepoda (Cop), 100% Nauplius của Artemia (Art) và 50% Copepoda + 50% Nauplius của Artemia; mật độ thức ăn: 5 - 10 con/mL, 10 - 15 con/mL và 15 - 20 con/mL]. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần.

Kết quả sau đợt ương cho thấy các chỉ tiêu về môi trường trong các nghiệm thức đều được giữ ổn định trong khoảng thích hợp cho sự phát triển của ấu trùng cá bớp. Không có sự khác biệt tăng trưởng về chiều dài khi ấu trùng cá bớp ăn các loại thức ăn với các mật độ thức ăn khác nhau ( $P < 0,05$ ). Loại thức ăn 100% Art và lượng thức ăn 15 - 20 con/mL cho tăng trưởng cao nhất, trong khi loại thức ăn 100% Cop và lượng thức ăn 5 - 10 con/mL cho trọng lượng thấp nhất. Không có sự khác biệt tăng trưởng về trọng lượng khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn ( $P < 0,05$ ). Tỷ lệ sống ấu trùng cá bớp cao nhất ở loại thức ăn 100% Cop và lượng thức ăn 15 - 20 con/mL và thấp nhất ở loại thức ăn 100% Art và lượng thức ăn 5 - 10 con/mL. Tuy nhiên, khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn sống thì không có sự khác biệt về tỷ lệ sống ( $P < 0,05$ ).

## 1. Đặt Vấn Đề

Cá bớp (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) là một trong những loài cá biển có sự phân bố rộng (Liao & ctv., 2004; Holt & ctv., 2007; Nguyen & ctv., 2008), có giá trị về kinh tế và có thị trường tiêu thụ rộng lớn. Tuy nhiên, lượng cá khai thác trong tự nhiên ngày càng ít dần đi (Nguyen, 2016). Do đó, để đáp ứng nhu cầu tiêu dùng, người ta đã tiến hành nuôi thương phẩm loài cá này với quy mô lớn. Giống là một khâu rất quan trọng trong chuỗi sản xuất, có ý nghĩa rất lớn quyết định sự thành công của vụ nuôi. Trước đây, giống cá giò chủ yếu là khai thác ngoài tự nhiên, do đó có số lượng ít, kích thước cá không đồng đều, thường bị xây xát do đánh bắt dẫn đến chất lượng giống không đảm bảo cũng như việc thả giống không chủ động (Dang, 2017). Do đó, việc nghiên cứu sản xuất giống cá bớp nhân

tạo trên thế giới (Nancy & ctv., 2001) nói chung và ở Việt Nam nói riêng được quan tâm từ rất sớm. Ở Việt Nam hiện có một số cơ sở đang sản xuất ấu trùng cá bớp, tuy nhiên tỷ lệ sống của cá còn thấp (khoảng 3 - 5%) vì chưa có qui trình và chế độ cho ăn thích hợp (Nguyen, 2016). Chính vì vậy, việc thử nghiệm các khẩu phần thức ăn sống khác nhau trong qui trình ương nuôi để tìm ra khẩu phần và chế độ cho ăn tối ưu là rất cần thiết để góp phần nâng cao tỷ lệ sống, giảm chi phí sản xuất cũng như tăng tính ổn định, đáp ứng nhu cầu về con giống.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cá bớp (*Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766) giai đoạn từ 6 đến 25 ngày tuổi.

## 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Giống hải sản cấp I Ninh Thuận, xã An Hải, huyện Ninh Phước, tỉnh Ninh Thuận, từ tháng 4 đến tháng 9 năm 2016.

## 2.3. Nguồn cá thí nghiệm

Cá được chọn từ cùng một đợt đẻ của một cặp cá bố mẹ, sau khi nở 2 ngày tuổi, noãn hoàn tiêu biến, cá được cho ăn bằng thức ăn có thành phần 50% Cop + 50% Rotifer (Rot) với mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL cho đến khi cá đạt 5 ngày tuổi. Tiếp tục sử dụng nguồn cá này để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

## 2.4. Nguồn nước thí nghiệm

Nước mặn được bơm trực tiếp từ biển vào hệ thống bể lọc thô qua tầng lọc ngược xuống bể chứa lắng. Tại đây xử lý chlorine với nồng độ 30 ppm sục khí mạnh trong vòng 48 giờ. Sau đó tiến hành kiểm tra nước có còn dư lượng chlorine không. Nếu không còn dư lượng chlorine thì được sử dụng cho các công đoạn tiếp theo.

Nguồn nước ngọt: Lấy từ nước máy và nước giếng ngầm. Lắng lọc qua lắng lọc của trại.

Nguồn nước lợ (32‰- 33‰) bố trí thí nghiệm được pha từ hai nguồn nước trên.

## 2.5. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm xác định sự ảnh hưởng của 2 nhân tố loại và lượng thức ăn được thực hiện với 9 nghiệm thức là tổ hợp của 3 loại thức ăn (100% Cop, 100% Art và 50% Cop + 50% Art) và 3 mật độ thức ăn khác nhau (5 - 10 con/mL, 10 - 15 con/mL và 15 - 20 con/mL). Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 5 lần lặp lại tại cùng thời điểm, tổng cộng có 45 lô thí nghiệm. Thể tích mỗi bể là 100 L. Cá bóp trong các nghiệm thức thí nghiệm được thả với mật độ 5 con/L.

## 2.6. Quá trình chăm sóc cá

Cá thí nghiệm được cho ăn 4 lần/ngày vào lúc 6, 10, 14, và 17 giờ. Trước khi cho ấu trùng cá ăn thì làm giàu luân trùng 100 ppm (Dùng 10 g Selco S.parkle  $\approx$  100 ppm cho vào máy xay sinh tố, xay nhuyễn rồi cho vào thùng chứa 100 lít nước) trước 6 - 12 giờ. Siphon thức ăn thừa, vệ sinh dây sục khí, bổ sung nước vào hệ thống thí

nghiệm để bù lượng nước thất thoát do siphon, hằng ngày kiểm tra cá, vớt bọt.

Thay nước: Thay 20% lượng nước mới mỗi ngày.

Môi trường: Các yếu tố môi trường như độ mặn, pH, nhiệt độ, lượng oxy hòa tan được theo dõi hàng ngày và duy trì ổn định trong suốt quá trình thí nghiệm.

## 2.7. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

### 2.7.1. Các thông số môi trường trong hệ thống thí nghiệm

Các yếu tố môi trường trong hệ thống thí nghiệm được đo đặc hàng ngày và duy trì trong phạm vi thích hợp với sự tăng trưởng và phát triển của ấu trùng cá bóp (Nguyễn, 1998; Nguyễn, 2002; Liao & ctv., 2003) với tần suất 2 lần/ngày vào lúc 9 giờ sáng và 3 giờ chiều bằng cách đo nhiệt độ nước bằng nhiệt kế thủy ngân, hàm lượng oxy hòa tan bằng máy đo DO và pH bằng máy đo pH. Riêng hai chỉ tiêu hàm lượng N-NH<sub>3</sub> (đo bằng test kit) và độ mặn (đo bằng khúc xạ kế 0 - 100‰) được đo với tần suất 1 lần/tuần.

### 2.7.2. Phương pháp xác định các chỉ tiêu sinh trưởng

Cá trong các nghiệm thức thí nghiệm được cân, đo, đếm mỗi tuần một lần, sau khi cân đo thì cá được thả lại bể ương. Các chỉ tiêu được xác định như sau:

Xác định tốc độ tăng trưởng tương đối: Dùng vợt vớt cá cho lên lam kính, sau đó dùng giấy thấm nước cho cá khô rồi sử dụng dụng cụ gấp cá cho vào cân điện tử 4 số lẻ để cân cá.

Xác định tốc độ tăng trưởng tuyệt đối về chiều dài: Dùng vợt vớt cá cho lên lam kính, sau đó dùng kính hiển vi có thước vi thị kính, và có kết nối với máy tính chuyên dụng cho phòng thí nghiệm để đo chiều dài cá.

### 2.7.3. Xác định các thông số và công thức tính

Cá trong các lô thí nghiệm được kiểm tra tình trạng sức khỏe hàng ngày, định kỳ cân, đo cá 1 tuần/lần, xác định tỉ lệ sống, tăng trưởng về chiều dài tổng và trọng lượng của cá ở các lô thí nghiệm. Các chỉ tiêu nghiên cứu đều được xác định theo phương pháp thường quy thường sử dụng trong nghiên cứu nuôi trồng thủy sản. Cụ thể:

Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối (g/ngày):

$$GR = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1}$$

Tốc độ tăng trưởng tương đối (%/ ngày):

$$SGR = \frac{LnW_2 - LnW_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

W<sub>1</sub>: Khối lượng cá ở thời điểm t<sub>1</sub>

W<sub>2</sub>: Khối lượng cá ở thời điểm t<sub>2</sub>

Tốc độ tăng trưởng tuyệt đối về chiều dài:

$$TL = \frac{L_1 - L_0}{t_1 - t_0}$$

L<sub>0</sub>: Chiều dài thân đo ở thời điểm T<sub>0</sub>

L<sub>1</sub>: Chiều dài thân đo ở thời điểm T<sub>1</sub>

Tỉ lệ sống (%) được tính theo công thức:

$$TLS = \frac{X}{Y} \times 100$$

X: Số cá tại thời điểm kết thúc thí nghiệm

Y: Số cá thả ban đầu

2.7.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý dựa trên 2 nhân tố là loại và lượng thức ăn bằng cách sử dụng phần mềm MS Excel nhập và xử lý số liệu. Trước khi tiến hành phân tích thống kê, số liệu phần trăm (%) tỷ lệ sống được chuyển dạng bằng arcsin. Phân tích thống kê bằng phương sai hai yếu tố mẫu đo lường lặp lại (repeated ANOVA) với các nghiệm thức (loại và lượng thức ăn) là yếu tố chính và thời gian (đợt thu mẫu) là yếu tố đo lường lặp lại. Kiểm định khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa (least significant difference, LSD) được dùng để so sánh sự khác biệt giữa các mức của yếu tố thí nghiệm. Mức xác suất *P* < 0,05 được chấp nhận như tiêu chuẩn đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện bằng phần mềm IBM SPSS Statistics version 19.0.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Giá trị các yếu tố môi trường trong quá trình thí nghiệm

Trong quá trình thí nghiệm, các chỉ tiêu về môi trường được duy trì một cách tối ưu cho điều kiện sống của ấu trùng cá bớp (Nguyen, 1998; Nguyen,

Bảng 1. Giá trị các yếu tố môi trường

|                      | Loại thức ăn  |               |               |               |
|----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                      | 50% + 50% Cop | 100% Cop      | 50% + 50% Art | 100% Art      |
| Độ mặn               | 32,51 ± 0,019 | 32,53 ± 0,027 | 32,52 ± 0,026 | 32,51 ± 0,025 |
| pH sáng              | 8,23 ± 0,022  | 8,23 ± 0,021  | 8,24 ± 0,015  | 8,24 ± 0,030  |
| pH chiều             | 8,45 ± 0,028  | 8,44 ± 0,024  | 8,45 ± 0,021  | 8,45 ± 0,018  |
| T <sup>0</sup> sáng  | 28,08 ± 0,051 | 28,09 ± 0,035 | 28,08 ± 0,043 | 28,07 ± 0,020 |
| T <sup>0</sup> chiều | 28,38 ± 0,048 | 28,38 ± 0,045 | 28,38 ± 0,045 | 28,38 ± 0,048 |
| DO sáng              | 4,54 ± 0,023  | 4,54 ± 0,025  | 4,54 ± 0,022  | 4,54 ± 0,024  |
| DO chiều             | 4,86 ± 0,024  | 4,86 ± 0,023  | 4,86 ± 0,020  | 4,86 ± 0,023  |
| N-NH <sub>3</sub>    | 0             | 0             | 0             | 0             |

50% + 50%: Loại thức ăn 50% Cop + 50% Art.

2002; Liao & ctv., 2003). Giá trị cụ thể các thông số môi trường và kết quả phân tích phương sai của chúng được thể hiện qua Bảng 1.

Qua Bảng 1 ta thấy, giá trị các yếu tố môi trường chỉ dao động trong một khoảng rất nhỏ và chênh nhau không nhiều giữa các lần đo sáng và chiều. Độ mặn trung bình chỉ dao động trong khoảng 32,47 - 32,58‰. Lượng oxy hòa tan trung bình dao động từ 4,52 - 4,57 mg/L vào buổi sáng và 4,84 - 4,89 mg/L vào buổi chiều. Nhiệt độ trung bình dao động trong khoảng 28,03 - 28,43°C và pH dao động trong khoảng 8,22 - 8,47, mức dao động pH giữa sáng và chiều chỉ đạt tối đa 0,13 và tối thiểu là 0,02. Riêng chỉ tiêu N-NH<sub>3</sub> đo được trong giai đoạn này có giá trị bằng không, nghĩa là trong giai đoạn này trong bể ương chưa tồn tại N-NH<sub>3</sub>. Sự thay đổi của các yếu tố môi trường này đều phù hợp với điều kiện sinh trưởng và phát triển bình thường của ấu trùng cá bớp.

### 3.2. Tăng trưởng về chiều dài của ấu trùng cá bớp

Tăng trưởng về chiều dài của ấu trùng cá bớp giai đoạn 6 - 25 ngày tuổi được định kì đo đạc, xử lý và phân tích số liệu. Tăng trưởng về khối lượng ấu trùng cá bớp ở các nghiệm thức thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 2.

Trong 2 tuần đầu thí nghiệm, giai đoạn này ấu trùng cá bớp tăng trưởng chậm, ở cả 3 loại thức ăn và 3 mật độ thức ăn đều có mức tăng trưởng tương đương về chiều dài. Bắt đầu từ tuần thứ 3 trở đi, ấu trùng cá bớp tăng trưởng nhanh ở tất cả các nghiệm thức thí nghiệm (Hình 1). Ở tuần thứ 3, ở mật độ thức ăn 10 - 15 con/mL, loại thức ăn có thành phần 100% Cop cho mức tăng trưởng về chiều dài cao hơn so với loại thức ăn 100% Art và 50% Cop + 50% Art. Ở mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL, loại thức ăn có thành phần 100% Cop cho mức tăng trưởng về chiều dài cao nhất, loại thức ăn 50% Cop + 50% Art cho mức tăng trưởng trung bình, và loại thức ăn 100% Art cho mức tăng trưởng thấp nhất. Tuy nhiên, sự khác biệt về chiều dài tổng khi cho ấu trùng cá bớp ăn 3 loại thức ăn khác nhau với 3 mật độ thức ăn khác nhau không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn sống thì sự tác động đồng thời lên tăng trưởng về chiều dài ấu trùng cá bớp không khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 2.** Tăng trưởng về chiều dài của ấu trùng cá bớp

|         | Lượng thức ăn (con/mL) |                  |                  |                  | Loại thức ăn     |                  |       | ANOVA <sup>1</sup> |           |
|---------|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------|--------------------|-----------|
|         | 5 - 10                 | 10 - 15          | 15 - 20          | 100% Cop         | 50% + 50%        | 100% Art         | Lượng | Loại               | Tương tác |
| L1 (cm) | 0,4893 ± 0,00011       | 0,4900 ± 0,00013 | 0,4903 ± 0,00020 | 0,4903 ± 0,00021 | 0,4896 ± 0,00015 | 0,4897 ± 0,00011 | S     | S                  | S         |
| L2 (cm) | 3,8415 ± 0,00013       | 3,8509 ± 0,00798 | 3,8447 ± 0,00143 | 3,8426 ± 0,00015 | 3,8521 ± 0,00800 | 3,8424 ± 0,00071 | NS    | NS                 | NS        |
| TL      | 0,1764 ± 0,00001       | 0,1769 ± 0,00042 | 0,1766 ± 0,00007 | 0,1764 ± 0,00001 | 0,1770 ± 0,00042 | 0,1765 ± 0,00003 | NS    | NS                 | NS        |

<sup>1</sup> ANOVA: Kết quả phân tích phương sai. S: Có ý nghĩa về mặt thống kê. NS: Không có ý nghĩa về mặt thống kê. Lượng thức ăn. Loại: loại thức ăn. Tương tác: Tương tác giữa loại và lượng thức ăn. 50% + 50%: Loại thức ăn 50% Cop + 50% Art.

### 3.3. Tăng trưởng về trọng lượng của ấu trùng cá bớp

Tương tự như tăng trưởng về chiều dài, trọng lượng ấu trùng cá bớp trong hai tuần đầu thí nghiệm tăng trưởng rất chậm. Kể từ tuần thứ 3, trọng lượng của ấu trùng cá bớp tăng lên rất nhanh. Tăng trưởng về trọng lượng ấu trùng cá bớp được thể hiện qua Bảng 3.

Qua Bảng 3 ta thấy, trong 3 loại thức ăn, ấu trùng cá bớp có mức tăng trưởng về trọng lượng cao nhất ở nghiệm thức thức ăn 100% Art với trọng lượng cuối đạt  $0,1559 \pm 0,00128$  g, tăng trưởng tuyệt đối bằng  $0,0065 \pm 0,00007$  g/ngày và tăng trưởng chuyên biệt ngày đạt  $8,2007 \pm 0,04031\%$  và thấp nhất ở nghiệm thức thức ăn 100% Cop với trọng lượng cuối  $0,1528 \pm 0,00004$  g, tăng trưởng tuyệt đối bằng  $0,0063 \pm 0,00000$  g/ngày và tăng trưởng chuyên biệt ngày đạt  $8,0494 \pm 0,01506\%$ . Sự khác nhau về trọng lượng ấu trùng cá ở các loại thức ăn khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

Với 3 mật độ thức ăn, mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL cho mức tăng trưởng về trọng lượng cao nhất với trọng lượng cuối là  $0,1555 \pm 0,00116$  g, tăng trưởng tuyệt đối bằng  $0,0064 \pm 0,00006$  gam/ngày và tăng trưởng chuyên biệt ngày đạt  $8,1488 \pm 0,04177\%$  và thấp nhất ở nghiệm thức mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL với trọng lượng cuối là  $0,1525 \pm 0,00005$  g, tăng trưởng tuyệt đối bằng  $0,0063 \pm 0,00000$  g/ngày và tăng trưởng chuyên biệt ngày đạt  $8,1071 \pm 0,00604\%$ . Sự khác nhau về trọng lượng ấu trùng cá ở các mật độ thức ăn khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

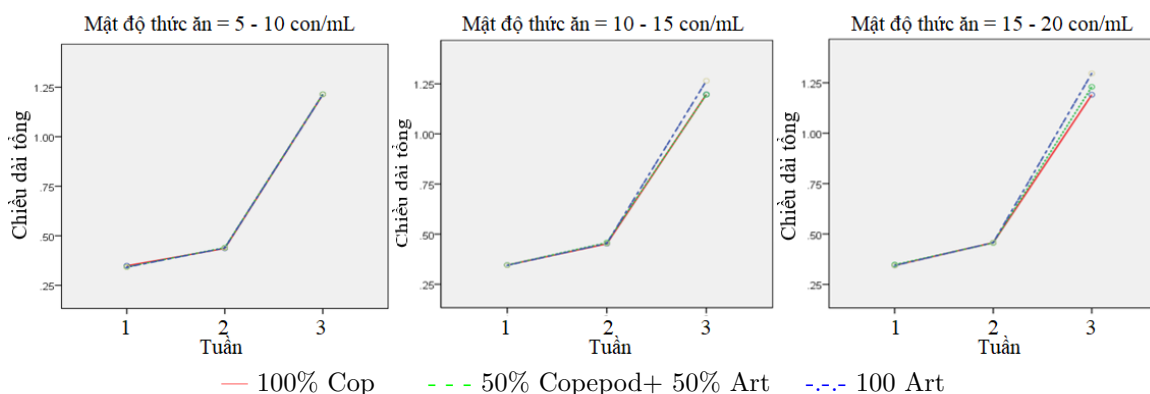
Trong 3 tuần thí nghiệm, ở mật độ thức ăn 10 - 15 con/mL, loại thức ăn có thành phần 100% Cop cho mức tăng trưởng về chiều dài cao hơn so với loại thức ăn 100% Art và 50% Cop + 50% Art. Ở mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL, loại thức ăn có thành phần 100% Cop cho mức tăng trưởng về chiều dài cao nhất, loại thức ăn 50% Cop + 50% Art cho mức tăng trưởng trung bình, và loại thức ăn 100% Art và cho mức tăng trưởng thấp nhất về chiều dài. Mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL cho mức tăng trưởng tương đương nhau ở cả 3 loại thức ăn (Hình 2). Tuy nhiên, khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn thì không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê về trọng lượng ấu trùng cá bớp ( $P < 0,05$ ).

Sự khác nhau về lượng thức ăn đối với mức tăng trưởng tuyệt đối và sự phát triển chuyên

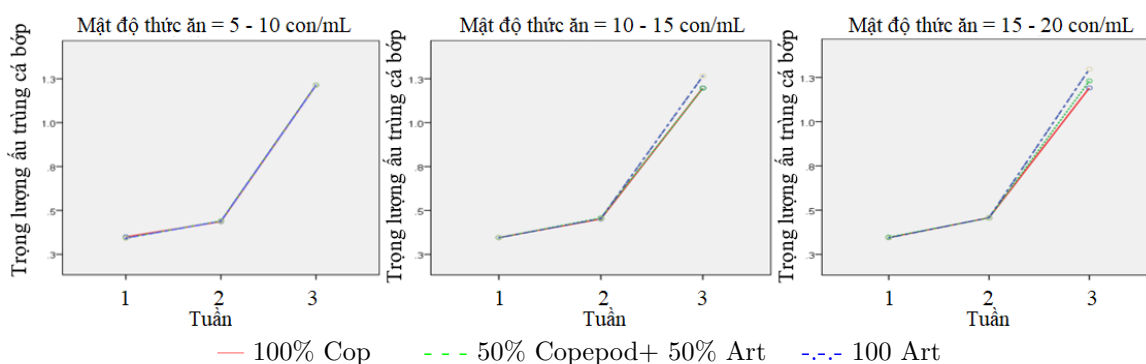
**Bảng 3.** Tăng trưởng về trọng lượng của ấu trùng cá bớp

|         | Loại thức ăn           |                      |                      |                      |                      | ANOVA <sup>1</sup>   |           |
|---------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------|
|         | Lượng thức ăn (con/mL) |                      |                      |                      |                      | Lượng                | Tương tác |
|         | 5 - 10                 | 10 - 15              | 15 - 20              | 100% Cop             | 50% + 50% Art        | 100% Art             | Loại      |
| W1 (g)  | $0,0327 \pm 0,00004$   | $0,0329 \pm 0,00006$ | $0,0331 \pm 0,00011$ | $0,0331 \pm 0,00010$ | $0,0328 \pm 0,00006$ | $0,0328 \pm 0,00005$ | S S       |
| W2 (g)  | $0,1525 \pm 0,00005$   | $0,1541 \pm 0,00089$ | $0,1555 \pm 0,00116$ | $0,1528 \pm 0,00004$ | $0,1534 \pm 0,00068$ | $0,1559 \pm 0,00128$ | S S       |
| SGR (%) | $8,1071 \pm 0,00604$   | $8,1192 \pm 0,03384$ | $8,1488 \pm 0,04177$ | $8,0494 \pm 0,01506$ | $8,1251 \pm 0,01797$ | $8,2007 \pm 0,04031$ | S S       |
| GR      | $0,0063 \pm 0,00000$   | $0,0064 \pm 0,00005$ | $0,0064 \pm 0,00006$ | $0,0063 \pm 0,00000$ | $0,0063 \pm 0,00003$ | $0,0065 \pm 0,00007$ | NS S      |

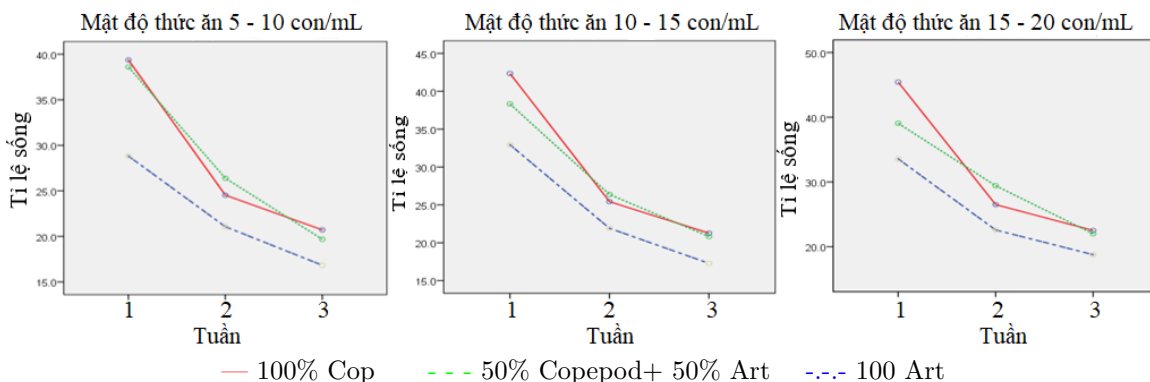
<sup>1</sup> ANOVA: Kết quả phân tích phương sai. S: Có ý nghĩa về mặt thống kê. NS: Không có ý nghĩa về mặt thống kê. Lượng: Lượng thức ăn. Loại: loại thức ăn. Tương tác: Tương tác giữa loại và lượng thức ăn.



**Hình 1.** Chiều dài tổng của ấu trùng cá bóp qua các tuần thí nghiệm.



**Hình 2.** Trọng lượng của ấu trùng cá bóp qua các tuần thí nghiệm.



**Hình 3.** Tỉ lệ sống của ấu trùng cá bóp qua các tuần thí nghiệm.

biệt ngày không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Sự khác nhau giữa các loại thức ăn có ảnh hưởng đến tăng trưởng tương đối và tăng trưởng chuyên biệt ngày có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Nếu thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn thì có ảnh hưởng đến tăng trưởng chuyên biệt ngày có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên, thay đổi đồng thời loại và

lượng thức ăn thì sự ảnh hưởng đến tăng trưởng tuyệt đối không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

Điều đó cho thấy, khi ấu trùng cá bóp có sự tăng trưởng về khối lượng thì cần lượng thức ăn nhiều hơn. Nói cách khác, cho ấu trùng cá bóp ăn đầy đủ hơn sẽ cho mức tăng trưởng tốt hơn.

So sánh kết quả về ảnh hưởng của loại và lượng thức ăn tươi sống đến tăng trưởng của ấu trùng cá bóp giai đoạn 6 - 25 ngày tuổi trong nghiên cứu này với nghiên cứu của Đặng Văn Hiệp & ctv. (2017), ta thấy hai nghiên cứu có kết quả tương tự nhau và phù hợp với thực tiễn sản xuất thực tế tại Trung tâm giống Hải sản cấp I Ninh Thuận cũng như tại các trại sản xuất ương nuôi cá bóp tại địa phương.

### 3.4. Tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp

Nhìn chung, trong suốt quá trình thí nghiệm, dù sử dụng loại thức ăn nào và cho ăn với lượng thức ăn như thế nào thì tỷ lệ sống đều có xu hướng giảm dần theo thời gian. Tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp được thể hiện qua Bảng 4.

Tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp có sự khác nhau rõ rệt khi cho ấu trùng cá ăn các loại thức ăn khác nhau. Trong 3 loại thức ăn, ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 100% Cop có tỷ lệ sống giảm nhiều nhất nhưng vẫn đạt mức cao nhất với  $13,5 \pm 0,34\%$ , 2 nghiệm thức thức ăn còn lại (100% Art và 50% Cop + 50% Art) có tỷ lệ sống tương đương nhau. Sự khác nhau về tỷ lệ sống khi cho ấu trùng cá bóp ăn các loại thức ăn khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

Trong các mật độ thức ăn, mật độ 15 - 20 con/mL cho tỷ lệ sống cao nhất với  $14,7 \pm 0,58\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 50% Cop + 50% Art;  $14,0 \pm 0,20\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 100% Cop và  $10,4 \pm 0,25\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 100% Art. Mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL cho tỷ lệ sống thấp nhất với tỷ lệ sống là  $8,4 \pm 0,38\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 100% Art;  $11,4 \pm 0,35\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 100% Cop và  $12,5 \pm 0,38\%$  khi cho ấu trùng cá ăn thức ăn có thành phần 50% Cop + 50% Art. Mật độ thức ăn 10 - 15 con/mL cho tỷ lệ sống ở mức trung bình (Hình 3). Sự khác nhau về tỷ lệ sống khi cho ấu trùng cá bóp ăn các lượng thức ăn khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ). Tuy nhiên, khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn thì sự tác động lên tỷ lệ sống ấu trùng cá bóp không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P < 0,05$ ).

Như vậy, dù cho ăn loại thức ăn tươi sống nào đi nữa thì mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL vẫn có tỷ lệ sống cao nhất và mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL có tỷ lệ sống thấp nhất. Nghiệm thức thức ăn 10 - 15 con/mL cho tỷ lệ sống ở mức trung bình so với

**Bảng 4.** Tỷ lệ sống (%) của ấu trùng cá bóp ở các nghiệm thức

| ANOVA <sup>1</sup> | Loại thức ăn           |             |             |             |               |            |
|--------------------|------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|------------|
|                    | Lượng thức ăn (con/mL) |             |             |             |               |            |
|                    | 5 - 10                 | 10 - 15     | 15 - 20     | 100% Cop    | 50% + 50% Art | 100% Art   |
| TLS                | 10,8 ± 0,50            | 11,5 ± 0,55 | 13,0 ± 0,55 | 13,5 ± 0,34 | 12,7 ± 0,34   | 9,2 ± 0,29 |
|                    | S                      | S           | S           | S           | S             | NS         |

<sup>1</sup>ANOVA: Kết quả phân tích phương sai. S: Có ý nghĩa về mặt thống kê. NS: Không có ý nghĩa về mặt thống kê. Lượng: Lượng thức ăn. Loại: loại thức ăn. Tương tác: Tương tác giữa loại và lượng thức ăn. TLS: Tỷ lệ sống, 50% + 50%; Loại thức ăn 50% Cop + 50% Art.

<sup>1</sup>ANOVA: Kết quả phân tích phương sai. S: Có ý nghĩa về mặt thống kê. NS: Không có ý nghĩa về mặt thống kê. Lượng: Lượng thức ăn. Loại: loại thức ăn. Tương tác: Tương tác giữa loại và lượng thức ăn. TLS: Tỷ lệ sống. 50% + 50%: Loại thức ăn 50% Cop + 50% Art.

2 nghiệm thức còn lại. Kết quả tỷ lệ sống của cá đạt được trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Dang (2017) và Tran & ctv. (2013).

#### 4. Kết Luận

Không có sự khác biệt tăng trưởng về chiều dài khi cho ấu trùng cá bóp giai đoạn 6 - 25 ngày tuổi ăn các loại thức ăn với các mật độ thức ăn khác nhau. Các loại và lượng thức ăn khác nhau cho sự tăng trưởng khác nhau về trọng lượng, loại thức ăn có thành phần 100% Art và mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL cho mức tăng trưởng cao nhất về trọng lượng và loại thức ăn 100% Cop và lượng thức ăn 5 - 10 con/mL cho mức tăng trưởng về trọng lượng thấp nhất. Tuy nhiên, khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn sống thì không có sự khác biệt về tăng trưởng về trọng lượng.

Loại và lượng thức ăn sống có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp giai đoạn 6 - 25 ngày tuổi. Tỷ lệ sống của ấu trùng cá bóp cao nhất ở mật độ 15 - 20 con/mL và thấp nhất ở mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL. Ấu trùng cá bóp ăn các loại thức ăn khác nhau có tỷ lệ sống khác nhau. Loại thức ăn 100% Cop cho tỷ lệ sống cao nhất và 100% Art cho tỷ lệ sống thấp nhất. Tuy nhiên, khi thay đổi đồng thời loại và lượng thức ăn sống thì không có sự khác biệt về tỷ lệ sống của chúng.

Do vậy, mật độ thức ăn 15 - 20 con/mL là tốt nhất và mật độ thức ăn 5 - 10 con/mL là kém nhất cho sự phát triển của ấu trùng cá bóp. Trong các loại thức ăn, loại thức ăn có thành phần 100% Art cho kết quả cao nhất và loại thức ăn có thành phần 100% Cop cho kết quả kém nhất về sự phát triển của ấu trùng cá bóp giai đoạn 6 - 25 ngày tuổi. Tuy nhiên, cần tính toán chi phí và cách thức cho ăn hợp lý cho từng giai đoạn phát triển của ấu trùng cá để đạt hiệu quả cao nhất.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

Dang, H. V. (2017). *Effects of live food types on growth performance and survivability of cobia *Rachycentron Canadum* (Linnaeus, 1766) from 2 to 25 days of age in Ninh Thuan*. (Unpublished master's thesis). Nha Trang University, Nha Trang, Vietnam.

Holt, G. J., Faulk, C. K., & Schwarz, M. H. (2007). A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture* 268(1-4), 181-187.

Liao, I. C., Huang, T. S., Tsai, W. S., Hsueh, C. M., & Chang, S. L. (2004). Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture* 237(1-4), 155-165.

Liao, I. C., Su, H. M., & Chang, E. Y. (2001). Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200(1-2), 1-31.

Nancy, J. B., Robin, M. O., Jeffrey, M. L., James, S. F., & Karen, M. B. (2001). Reproductive biology of cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States. *Fishery Bulletin* 99(1), 15-28.

Nguyen, C., Nguyen, C. V., Nguyen, D. H., Dao, H. T., Nguyen, P. H., Dao, S. M., Nguyen, T. C., Pham, N. T., Nguyen, T. T. X., & Pham, T. (2002). List of marine and brackish water species in Vietnam. Ha Noi, Vietnam: DANIDA- Ministry of Fisheries (SUMA Project).

Nguyen, L. M. (2016). *Current status of hatchery production and copia farming in Vietnam*. (Unpublished master's thesis). Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.

Nguyen, M. D. (1998). *Biological basis of some economic fish species in coastal areas in the South Central Coast serving for the protection and development of resources*. (Unpublished doctoral dissertation). Institute of Oceanography, Nha Trang, Vietnam.

Nguyen, Q. H., Sveier, H., Bui, V. H., Le, A. T., Nhu, V. C., Tran, M. T., & Svennevig, N. (2008). Growth performance of cobia, *Rachycentron canadum*, in sea cages using extruded fish feed or trash fish. In: Yang, Y., Vu, X. Z., & Zhou, Y. Q. (Eds.). *Cage Aquaculture in Asia: Proceedings of The Second International Symposium on Cage Aquaculture in Asia* (42-47). Asian Fishery Society/Zhejiang University, Manila/China.

Tran, H. N., Dang, H. K., Tran, K. D., & Le, V. Q. (2013). Rearing cobia (*Rachycentron canadum*) larvae with different diets. *Can Tho University Journal of Science* 25, 43-49.

## Isolation and selection of microorganisms in cocoa fermentation

Phong X. Huynh\*, Thuy H. T. P. Ho, & Thanh N. Nguyen

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: November 22, 2018

Revised: February 08, 2019

Accepted: March 04, 2019

#### Keywords

Cocoa

Cocoa fermentation

Microflora of fermenting cocoa  
*Theobroma cacao*

#### \*Corresponding author

Huynh Xuan Phong

Email: hxphong@ctu.edu.vn

### ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the change of microorganisms involved in cocoa (*Theobroma cacao*) fermentation and then to isolate, characterize and select the important microorganisms in cocoa fermentation. The results showed that microbial quantities continuously changed during cocoa fermentation and the highest quantity of dominant microorganisms at different stages of fermentation process as 8.03 log cfu/g of yeast, 6.34 log cfu/g of mold, 7.77 log cfu/g of lactic acid bacteria, 7.87 log cfu/g of acetic acid bacteria, 7.25 log cfu/g of *Bacillus*, and 10.93 log cfu/g of the total aerobic bacteria. There were nine yeast isolates belonging 5 genera of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Candida* and *Cystofilobasidium*; 9 mould isolates belonging to 2 genera of *Rhizopus* and *Aspergillus*; 11 acetic acid bacteria isolates belonging to *Acetobacter*; and 13 spore-forming bacterial isolates belonging to *Bacillus* isolates. Three isolates of yeast (CY-1a, CY-1b, CY-2a) belonging to *Kluyveromyces* possessed the high fermentative capacity and 4 *Acetobacter* isolates (CAAB-1d, CAAB-1a, CAAB-1e and CAAB-2d) produced high amounts of acetic acid.

**Cited as:** Huynh, P. X., Ho. T. H. T. P., & Nguyen, T. N. (2019). Isolation and selection of microorganisms in cocoa fermentation. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 51-61.

## Phân lập và tuyển chọn vi sinh vật trong lên men cacao

Huỳnh Xuân Phong\*, Hồ Huỳnh Thị Phương Thúy, & Nguyễn Ngọc Thanh

Viện Nghiên Cứu và Phát Triển Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 22/11/2018

Ngày chỉnh sửa: 08/02/2019

Ngày chấp nhận: 04/03/2019

#### Từ khóa

Ca cao

Lên men ca cao

*Theobroma cacao*

Vi sinh lên men ca cao

#### \*Tác giả liên hệ

Huỳnh Xuân Phong

Email: hxphong@ctu.edu.vn

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định sự thay đổi của vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao (*Theobroma cacao*) thông qua việc xác định, phân lập, nhận diện và tuyển chọn vi sinh vật hữu ích trong lên men ca cao. Kết quả cho thấy mật số vi sinh vật thay đổi trong quá trình lên men và chiếm ưu thế ở các giai đoạn lên men khác nhau, bao gồm nấm men (8,03 log cfu/g), nấm mốc (6,34 log cfu/g), vi khuẩn lactic (7,77 log cfu/g), vi khuẩn acetic (7,87 log cfu/g), vi khuẩn *Bacillus* (7,25 log cfu/g) và tổng số vi khuẩn hiếu khí (10,93 log cfu/g). Phân lập được 9 dòng nấm men thuộc 5 chi *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Candida* và *Cystofilobasidium*; 9 dòng nấm mốc thuộc hai chi *Rhizopus* và *Aspergillus*; 11 dòng vi khuẩn *Acetobacter* và 13 dòng vi khuẩn có khả năng hình thành bào tử thuộc chi *Bacillus*. Tuyển chọn được 3 dòng nấm men CY-1a, CY-1b, CY-2a thuộc chi *Kluyveromyces* có khả năng lên men mạnh và 4 dòng vi khuẩn *Acetobacter* CAAB-1d, CAAB-1a, CAAB-1e và CAAB-2d tạo ra lượng acid acetic cao.

## 1. Đặt Vấn Đề

Cây ca cao (*Theobroma cacao*) có nguồn gốc từ các khu rừng nhiệt đới rậm rạp ở vùng Amazon (thuộc Nam Mỹ), thường phát triển ở những nơi có bóng râm và ẩm độ cao, nhưng các giống ca cao hoang dại cũng thấy xuất hiện từ Mexico đến Peru. Người thổ dân Mayas (thuộc Yacatan) và người Aztec (thuộc Mexico) đã trồng cây ca cao trong một thời gian dài trước khi được đưa đến Châu Âu (Wood & Lass, 2001). Cây ca cao chỉ phát triển ở một số vùng địa lý giới hạn, ở khoảng vĩ độ 20 về cực Bắc và Nam tính từ đường xích đạo. Khoảng 70% diện tích trồng ca cao trên thế giới là ở khu vực Tây Phi với khoảng 72% tổng sản lượng, trong đó chủ yếu là các nước như Cote d'Ivoire, Ghana và Nigeria. Khu vực Châu Á Thái Bình Dương chiếm khoảng 15%, khu vực Trung và Nam Mỹ chiếm khoảng 13%. Tổng sản lượng niên vụ 2014 - 2015 đạt 4,24 triệu tấn (ICCO, 2017). Sản lượng ca cao trên thế giới gia tăng hàng năm bình quân khoảng 3,5% trong năm thập kỷ gần đây và dự kiến trong những năm tới

mức gia tăng này khoảng 1,5 - 3,5%/năm (Anon, 1998).

Chất lượng hạt ca cao phụ thuộc vào nhiều điều kiện khác nhau như giống, mùa vụ, kỹ thuật trồng, thu hoạch, sơ chế, lên men, sấy. Trong đó, lên men là một công đoạn rất quan trọng để có thể sản xuất được hạt ca cao lên men đạt chất lượng cao. Chất nhầy bao quanh hạt ca cao là môi trường giàu dinh dưỡng cho sự phát triển cho vi sinh vật. Chất nhầy chiếm khoảng 82 - 87% nước, 10 - 15% đường, 2 - 3% pentose, 1 - 3% acid citric và 1 - 1,5% pectin. Ngoài ra còn có protein, amino acid, vitamin (nhiều nhất là vitamin C) và chất khoáng. Ở các vùng khác nhau như Ivory Coast, Nigeria, Malaysia có sự khác biệt về hàm lượng nước, citrate, hemicellulose, lignin, peptin trong thịt quả hạt ca cao (Schwan & Wheals, 2004).

Trong quá trình lên men, các vi sinh vật sẽ sử dụng phần thịt quả bao quanh hạt để lên men hình thành rượu, các loại acid hữu cơ và các phức hợp hữu cơ khác đồng thời sinh nhiệt. Nấm men có vai trò quan trọng trong quá trình lên men ở 24 - 30 giờ đầu và suy giảm dần. Nấm men chuyển

hóa các chất nhầy có chứa đường của phần thịt quả thành ethanol ( $C_2H_5OH$ ) và phóng thích khí carbonic ( $CO_2$ ). Sự lên men rượu làm tăng nhiệt độ và vi khuẩn acid lactic bắt đầu phát triển. Tế bào của thịt quả cao bị phá vỡ làm nước thoát hết ra khỏi tế bào, oxy dễ dàng xâm nhập vào bên trong hạt và khi ấy các vi khuẩn acetic bắt đầu hoạt động và phát triển mạnh, oxy hóa ethanol thành acid acetic ( $CH_3COOH$ ), làm tăng nhiệt độ khối hạt cao. Nhiệt và acid làm cho các phản ứng sinh hóa bên trong hạt bắt đầu xảy ra. Sau đó có thể xuất hiện một số bào tử và nấm mốc hình sợi trên bề mặt hạt do sự xâm nhiễm từ môi trường điều này có thể gây hư hỏng hoặc mùi hôi thối cho khối hạt. Vai trò sinh lý của vi sinh vật trong lên men hạt cao chưa được báo cáo đầy đủ, nhưng rõ ràng sự chuyển đổi về sinh hóa trong khối hạt có sự đóng góp của nấm men, các vi khuẩn lên men acid lactic và acid acetic. Trong đó, nấm men giữ vai trò quan trọng để chuyển hóa đường thành ethanol và sau đó vi khuẩn acetic chịu trách nhiệm chuyển hóa ethanol cũng như các hợp chất hữu cơ khác thành  $CO_2$  và nước góp phần làm giảm pH của sản phẩm cao lên men (Ardhana & Fleet, 2003; Gálvez & ctv., 2007; Sandhya & ctv., 2016).

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm xác định sự thay đổi vi sinh vật (vi sinh vật tổng số, nấm men, nấm mốc và vi khuẩn) trong quá trình lên men hạt cao cũng như phân lập và tuyển chọn các vi sinh vật hữu ích trong lên men cao. Kết quả nghiên cứu nhằm cung cấp thông tin khoa học về sự tham gia của vi sinh vật trong quá trình lên men cao cũng như định hướng ứng dụng các chủng vi sinh vật hữu ích trong lên men để cải tiến chất lượng hạt cao lên men.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Nguyên vật liệu và môi trường

Mẫu cao được thu thập tại nông hộ Lâm Thế Cường và các nông hộ thuộc huyện Phong Điền, Thành phố Cần Thơ.

Các hóa chất sử dụng bao gồm: hóa chất nhuộm Gram (crystal violet, dung dịch iod, dung dịch khử màu (ethanol và acetone theo tỷ lệ 1:1), fushin), hóa chất nhuộm bào tử (dung dịch xanh methylen 1% và đỏ trung tính 0,5%), thuốc thử catalase  $H_2O_2$  3%, thuốc thử oxidase (Nam Khoa Biotek) và thuốc thử indole, hóa chất phân tích và nuôi cấy vi sinh vật (NaOH 0,1 N, penicilline, oxytetracycline, peptone, phenol, agar, yeast ex-

tract, D-glucose,  $CaCO_3$ ,  $FeCl_3$ , ethanol 96%, glycerol, natamycin). Các môi trường nuôi cấy vi sinh vật: Plate Count Agar (PCA), Oxytetracycline D-Glucose Yeast Extract Agar (OGYEA), Czapek-Dox Agar, MRS Agar, Nutrient Agar, YPGD (D-glucose 5 g/L, yeast extract 5 g/L, glycerol 5 g/L và polypeptone 5 g/L, bổ sung ethanol 4% và  $CaCO_3$  0,5%).

### 2.2. Khảo sát sự thay đổi mật số của vi sinh vật trong quá trình lên men cao

Nhằm xác định sự thay đổi về mật số của vi sinh vật (vi sinh vật tổng số, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn) trong quá trình lên men cao. Cao sau khi thu hoạch, tách hạt và được ủ trong điều kiện tự nhiên, mẫu được thu thập trong quá trình ủ tại các thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 7 ngày. Sau đó, vi sinh vật trong mẫu được phân tích trên môi trường chuyên biệt ở nồng độ pha loãng thích hợp, bao gồm tổng số vi khuẩn hiếu khí (PCA), nấm men (OGYEA), nấm mốc (Czapek-Dox Agar), vi khuẩn lactic (MRS Agar), vi khuẩn acetic (YPGD) và vi khuẩn *Bacillus* (Nutrient Agar). Thí nghiệm được lặp lại hai lần.

Đối với vi khuẩn lactic: đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch MRS sau khi ủ vi hiếu khí ở  $30^\circ C$  trong 48 giờ. Xác định số khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn lactic ở từng nồng độ pha loãng. Thực hiện nhuộm Gram, thử nghiệm catalase và thử nghiệm khả năng lên men acid lactic bằng thuốc thử Ufermen (Tran, 2008). Tiêu chuẩn xác định là vi khuẩn acid lactic: Gram dương, hình trực khuẩn, cầu khuẩn hoặc liên cầu khuẩn, catalase âm tính.

Đối với vi khuẩn acetic: đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường thạch YPGD sau khi ủ vi hiếu khí ở nhiệt độ  $37^\circ C$  trong 48 giờ. Tiêu chuẩn xác định là vi khuẩn acetic: vi khuẩn acid acetic dễ dàng nhận thấy trên môi trường YPGD (do môi trường chứa 4% ethanol và 0,5%  $CaCO_3$ ), sử dụng ethanol tạo ra acid acetic, acid hữu cơ tác dụng với  $CaCO_3$  tạo vùng sáng khuẩn lạc, Gram âm và catalase dương tính.

Đối với vi khuẩn *Bacillus*: Đếm số khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường thạch Nutrient agar sau khi ủ vi hiếu khí ở nhiệt độ  $37^\circ C$  trong 48 giờ. Xác định số khuẩn lạc nghi ngờ là vi khuẩn *Bacillus* ở từng nồng độ pha loãng. Sau đó, nhận diện vi khuẩn *Bacillus* thông qua việc xác định Gram và thử nghiệm catalase (Gram dương và catalase dương tính).

### 2.3. Phân lập vi sinh vật trong lên men ca cao

Mục đích nhằm phân lập và định danh các dòng thuần nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acetic và *Bacillus* hiện diện trong quá trình lên men ca cao. Thí nghiệm được thực hiện đồng thời với thí nghiệm trên, sử dụng môi trường chuyên biệt để nuôi cấy nấm men, nấm mốc, vi khuẩn acetic và *Bacillus*.

Tùy theo cách phát triển của từng nhóm vi sinh vật trên môi trường chuyên biệt mà khuẩn lạc có hình dạng, dạng bìa, độ nổi, màu sắc, kích thước khác nhau. Chọn các khuẩn lạc rời và cấy chuyển nhiều lần trên môi trường chuyên biệt để làm thuần. Quan sát tế bào vi sinh vật dưới kính hiển vi, nếu các tế bào vi sinh vật được quan sát đồng nhất thì có thể xác định đã thu được các dòng thuần chủng.

### 2.4. Định danh sơ bộ vi sinh vật trong lên men ca cao

Mục đích nhằm nhận diện và xác định các nhóm vi sinh vật khác nhau trong lên men ca cao để có định hướng nghiên cứu và ứng dụng các chủng vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao. Các đặc điểm đặc trưng của từng nhóm vi sinh vật được dùng để phân loại, nấm men được phân loại dựa trên các đặc điểm hình thái, kích thước tế bào nấm men, hình dạng, số lượng bào tử trong túi bào tử, cách nảy chồi và các hình thức sinh sản (Luong, 2009; Kurtzman & ctv., 2011); đối với nấm mốc, dựa trên các đặc điểm của sợi nấm (màu sắc, có vách ngăn hay không), các đặc điểm của cơ quan sinh sản (hình dạng, cách sắp xếp các bộ phận của cơ quan sinh sản và các đặc điểm về hình dạng, cấu tạo, cách sắp xếp của bào tử) (Hesseltine, 1991; Samson & ctv., 2004); đối với vi khuẩn, dựa trên các đặc điểm về hình dạng tế bào, hình dạng khuẩn lạc, nhuộm Gram, thử nghiệm catalase, khả năng sinh khí khi lên men đường, pH phát triển, hình dạng và vị trí nội bào tử, hiếu khí hay yếm khí, môi trường phát triển (Holt & ctv., 1994; Nguyen & ctv., 2012).

### 2.5. Tuyển chọn vi sinh vật hữu ích trong quá trình lên men ca cao

Nhằm tuyển chọn các vi sinh vật có ảnh hưởng tích cực đến quá trình lên men hạt ca cao, các môi trường chuyên biệt nuôi cấy nấm men và vi khuẩn acetic được sử dụng. Dựa trên các thử nghiệm chuyên biệt để tuyển chọn các vi sinh vật tham

gia trong quá trình lên men ca cao. Đối với nấm men, đánh giá khả năng lên men ethanol bằng cách lên men dung dịch đường glucose 2% (w/v) trong ống nghiệm có chứa ống Durham, xác định chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> trong ống Durham (chiều cao 3 cm) sau mỗi 2 giờ ở 30°C. Đối với vi khuẩn acetic, đánh giá khả năng lên men tạo acid acetic bằng phương pháp khuếch tán trên giềng thạch và đo kích thước vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> trên môi trường YPGD có bổ sung CaCO<sub>3</sub> sau 24 giờ nuôi cấy ở 30°C. Thí nghiệm được lặp lại ba lần và nấm men *Saccharomyces cerevisiae* No. 2.1 (LU 1250, CY-V) được sử dụng như đối chứng.

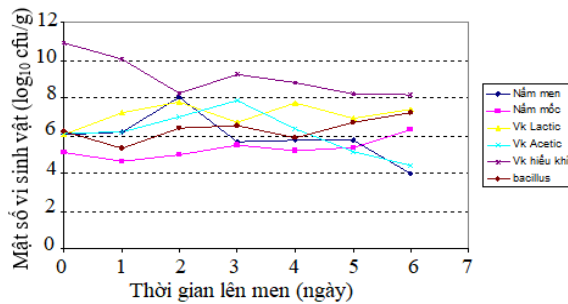
### 2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Phần mềm Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai và kiểm định LSD các trung bình nghiệm thức.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Sự thay đổi mật số vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao

Sự thay đổi mật số vi sinh vật trong quá trình lên men ở quy mô nông hộ (khối lượng hạt lên men là 64,24 kg thu từ 250 kg trái ca cao) được trình bày ở Hình 1. Kết quả cho thấy sự hiện diện của hệ vi sinh vật rất đa dạng và mật số vi sinh vật luôn thay đổi trong suốt quá trình lên men, điều này tương đồng với những công bố trước đây của Gálvez & ctv. (2007), Ngo & ctv. (2013), Miguel & ctv. (2017). Thịt quả ca cao chứa hàm lượng đường cao và pH ban đầu thích hợp cho sự phát triển của nấm men. Ngoài ra, nấm men còn có thể sử dụng carbohydrate từ cơm hạt trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí. Mật số nấm men đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 2 sau ủ (8,03 log cfu/g) và có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê mức 5% so với ở các ngày còn lại. Tương tự, Ardhana & Fleet (2003) đã công bố trong lên men ca cao ở Indonesia nấm men hiện diện với mật số cao nhất 7 - 8 log cfu/g trong suốt 24 - 36 giờ đầu lên men. Mật số này giảm nhanh ở ngày thứ 3 (5,67 log cfu/g) và hầu như không thay đổi nhiều ở ngày thứ 4 và thứ 5 (duy trì ở 5,78 log cfu/g) và sau đó giảm mạnh (chỉ còn khoảng 4,0 log cfu/g), khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% vào ngày thứ 6. Sự thay đổi mật số nấm men trong quá trình lên men là do



**Hình 1.** Sự thay đổi mật số vi sinh vật trong quá trình lên men ca cao.

trong điều kiện hiếu khí nấm men sinh sản gia tăng số lượng và trong điều kiện yếm khí nấm men chuyển hóa carbohydrate thành rượu và tỏa nhiệt làm ức chế trở lại hoạt động của nấm men. Đồng thời quá trình lên men còn làm pH khối ủ giảm và khối ủ trở nên thông thoáng hơn, do một số dòng nấm men có khả năng sinh ra enzyme phân giải pectin, phá vỡ lớp kết dính vách tế bào cơm hạt. Nhu mô của khối tế bào trong phần cơm hạt bị enzyme phân giải và tạo thành những khoảng không do sự xâm nhập của không khí. Do đó, điều kiện trong khối ủ không còn thích hợp cho sự phát triển của nấm men.

Vi khuẩn lactic (LAB) hiện diện trong khối ủ ngay từ khi bắt đầu đến khi kết thúc quá trình lên men và khi điều kiện thích hợp LAB gia tăng nhanh mật số. LAB đạt mật số cao nhất trong khoảng ngày thứ hai sau khi bắt đầu lên men (7,77 log cfu/g). Kết quả này thấp hơn khi so với mật số LAB trong lên men ca cao ở Indonesia (Ardhana & Fleet, 2003) đạt cao nhất ở 8 - 9 log cfu/g trong 36 giờ đầu lên men. Nhưng mật số này được duy trì trong thời gian rất ngắn, sau đó giảm xuống còn khoảng 6,71 log cfu/g vào ngày thứ 3 và tăng trở lại vào ngày thứ 4 (đạt 7,74 log cfu/g) và ổn định đến cuối quá trình lên men (7,4 log cfu/g). Nhìn chung, trong quá trình lên men ca cao, mật số LAB thay đổi không có ý nghĩa về mặt thống kê mức 5% giữa các ngày lên men. Vi khuẩn lactic có thể tồn tại lâu và mật số cao trong suốt quá trình lên men là do khả năng tăng trưởng trong điều kiện kỵ khí tùy nghi và nguồn dinh dưỡng đa dạng, vi khuẩn lactic có thể sử dụng cả acid citric và acid malic. Điều này làm cho tính acid giảm và giá trị pH tăng. Tuy nhiên, LAB trong quá trình sinh trưởng tạo ra acid lactic, là một chất khó bay hơi, do đó có thể duy trì tính acid trong khối ủ giai đoạn cuối quá trình lên men.

Kết quả trên cho thấy có sự liên tiếp nhau chiếm ưu thế của các vi sinh vật trong suốt quá trình lên men ca cao. Khi điều kiện khối ủ trở nên thoáng khí hơn tạo điều kiện thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn acetic (AAB). Mật số AAB đạt cao nhất vào khoảng ngày thứ 3 (7,87 log cfu/g) trong quá trình lên men ca cao, tương tự với công bố của Vương & Ha (2006), mật số AAB cũng đạt cao nhất vào ngày thứ 3 (7,0 log cfu/g). Sau đó, AAB trong khối ủ giảm dần và đạt mức 4,44 log cfu/g vào ngày thứ 6. Vi khuẩn acetic oxy hóa rượu (sản phẩm của quá trình lên men kỵ khí của nấm men) thành acid acetic và có thể chuyển hóa tiếp acid acetic thành  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O}$ . Phản ứng này tỏa nhiệt và đưa nhiệt độ khối ủ lên men lên cao.

Tổng số vi khuẩn hiếu khí trong khối ủ biến thiên theo từng ngày, mật số ban đầu cao nhất (10,93 log cfu/g) và giảm mạnh, có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê mức 5% ở ngày thứ 2, còn 8,28 log cfu/g. Đến ngày thứ 3, mật số vi khuẩn hiếu khí gia tăng đến 9,25 log cfu/g và lại giảm cho đến cuối quá trình lên men, ở mức 8,15 log cfu/g. Sự biến thiên này được giải thích bởi là do lúc đầu lượng thịt quả còn khá nhiều ngăn cản quá trình xâm nhập của oxy vào trong khối ủ nên các vi khuẩn hiếu khí khó phát triển, sau đó, nấm men đã phân hủy lớp cơm hạt tạo điều kiện thoáng khí hơn thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn hiếu khí dẫn đến vi khuẩn hiếu khí gia tăng mật số và đạt mật số cao rồi giảm dần theo đường cong sinh trưởng.

Vào cuối giai đoạn lên men, mật số vi sinh vật có ích giảm dần, sự thông thoáng khí, pH và nhiệt độ khối ủ gia tăng, cùng với sự phát triển của chi *Bacillus* (đạt mật số cao nhất vào ngày thứ sáu 7,25 log cfu/g). Ngoài ra, điều kiện thông thoáng khí cũng thuận lợi cho sự phát triển của nấm mốc. Mật số nấm mốc từ 5,10 log cfu/g ở ngày đầu tiên và giảm sau một ngày lên men (4,64 log cfu/g), sau đó gia tăng đến ngày thứ 3 (5,52 log cfu/g) và lại tiếp tục giảm khi nhiệt độ khối ủ quá cao và môi trường có pH quá thấp vào ngày thứ 4 (5,22 log cfu/g) và gia tăng trở lại vào cuối giai đoạn lên men (6,34 log cfu/g) khi điều kiện thuận lợi hơn.

### 3.2. Phân lập và định danh vi sinh vật tham gia trong quá trình lên men ca cao

Trong quá trình lên men hạt ca cao, đã phân lập được 9 dòng nấm men, 9 dòng nấm mốc, 11 dòng vi khuẩn acetic và 13 dòng *Bacillus*. Dựa

vào các đặc điểm về hình thái khuẩn lạc và tế bào cùng các phản ứng sinh hóa, các dòng vi sinh vật phân lập được phân loại và xếp vào từng nhóm, trong đó các dòng có đặc điểm giống nhau được xếp cùng một nhóm. Đối với nấm men, theo phân loại của Luong (2009) và Kurtzman & ctv. (2011), các dòng phân lập được xếp thành 5 chi bao gồm *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Brettanomyces* và *Cystofilobasidium*, được mô tả chi tiết ở Bảng 1 và Hình 2. Dựa theo mô tả của Samson & ctv. (2004), các dòng nấm mốc bao gồm 2 chi là *Rhizopus* và *Aspergillus* (Bảng 2 và Hình 3). Đối với vi khuẩn acetic, theo phân loại của Holt & ctv. (1994), đã chọn được 2 nhóm khác nhau và đều thuộc chi *Acetobacter* (Bảng 3 và Hình 4). Theo phân loại vi khuẩn của và Nguyen & ctv. (2012) đã chọn được 4 nhóm *Bacillus* khác nhau (Bảng 4 và Hình 5).

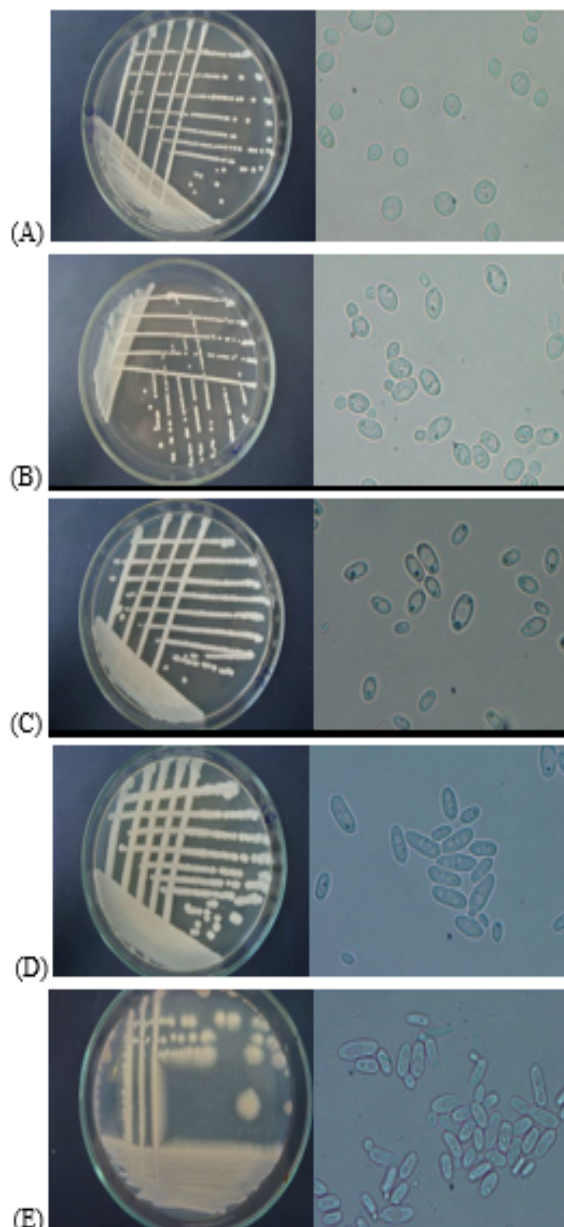
### 3.3. Tuyển chọn vi sinh vật hữu ích trong lên men ca cao

Nấm men và vi khuẩn acetic là 2 nhóm vi sinh vật có tác động tích cực đến chất lượng hạt ca cao (Schwan, 1998; Ho & ctv., 2014), trong khi đó vi khuẩn lactic được chứng minh không có ảnh hưởng đến sự lên men (Ho & ctv., 2015). Chính vì vậy, nghiên cứu chỉ tập trung khảo sát đặc tính lên men của nấm men và vi khuẩn acetic.

Hoạt lực lên men của nấm men được đánh giá thông qua lượng khí CO<sub>2</sub> được sinh ra trong ống Durham khi lên men đường glucose trong ống nghiệm (Nguyễn & ctv., 2003). Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> được đo ở các thời điểm khác nhau trong quá trình lên men của 9 dòng nấm men phân lập từ hạt ca cao và chủng *Saccharomyces cerevisiae* No. 2.1 (CY-V) làm đối chứng được trình bày ở Bảng 5. Kết quả cho thấy 3 dòng nấm men kí hiệu là CY-1a, CY-1b và CY-2a thuộc chi *Kluyveromyces* có xuất hiện khí trong ống Durham sớm nhất và tương đương nhau (16 giờ). Tuy nhiên, kết quả cho thấy khả năng lên men kém hơn so với dòng nấm men CY-V (12 giờ). Dòng nấm men CY-3a và CY-3b hoàn toàn không lên men, đây có thể là *Candida* sp., nấm men này tồn tại rất lâu trong suốt quá trình lên men, dù không có khả năng lên men tạo ethanol nhưng lại có khả năng đồng hóa acid lactic (Gálvez & ctv., 2007). Như vậy, qua thử nghiệm này đã sơ tuyển được 3 dòng nấm men có hoạt tính lên men cao là CY-1a, CY-1b và CY-2a với thời gian làm đầy cột khí CO<sub>2</sub> trong 16 giờ lên men.

Vi khuẩn acetic sử dụng ethanol tạo ra acid

acetic làm tan CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch và hình thành những vùng sáng xung quanh khuẩn lạc. Sau 24 giờ ủ, tất cả 11 dòng vi khuẩn acetic đều có khả năng sinh acid, trong đó dòng CAAB-1d có khả năng sinh acid cao nhất (tương ứng với đường kính vùng phân giải trung bình là 3,58 cm) (Hình 6). Các dòng CAAB-1a, CAAB-1e và CAAB-2d cũng tạo ra lượng acid acetic khá cao, đường kính vùng phân giải trong khoảng 3,03 - 3,17 cm (Hình 7).



**Hình 2.** Khuẩn lạc và tế bào các dòng nấm men dưới kính hiển vi ở X100. Các dòng nấm men gồm (A) CY-1, (B) CY-2, (C) CY-3, (D) CY-4 và (E) CY-5.

**Bảng 1.** Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng nấm men phân lập

| STT | Tên mẫu | Đặc điểm tế bào                                                                               | Mô tả khuẩn lạc                                                                                                                                                                     | Phân loại                                                                                                            |
|-----|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | CY-1    | Tế bào hình cầu, sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi                                          | Đường kính từ 0,3 - 0,35 cm; chiều dày 0,1 mm; độ nổi của khuẩn lạc: lồi lén; bề mặt khuẩn lạc trơn, bìa nguyên; khuẩn lạc có màu trắng sữa                                         | Ngành: Nấm nang (Ascomycotina); Lớp: Ascomycetes; Bộ: Endomycetes; Họ: Saccharomycetaceae; Chi: <i>Saccharomyces</i> |
| 2   | CY-2    | Tế bào hình ovan (hình trứng), sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi, có chứa bào tử trong nang | Đường kính từ 0,2 - 0,25 cm; chiều dày 0,1 mm; độ nổi của khuẩn lạc: lồi lén; bề mặt khuẩn lạc trơn, bìa nguyên; khuẩn lạc có màu trắng sữa                                         | Ngành: Nấm nang (Ascomycotina); Lớp: Ascomycetes; Bộ: Endomycetes; Họ: Saccharomycetaceae; Chi: <i>Kluyveromyces</i> |
| 3   | CY-3    | Tế bào nấm men hình ellip, tế bào có đầu nhọn, sinh sản bằng cách nảy chồi ở một đầu          | Đường kính từ 0,2 - 0,25 cm; chiều dày 0,1 mm; độ nổi của khuẩn lạc: bằng phẳng; bề mặt khuẩn lạc có màu trắng sữa                                                                  | Ngành: Nấm nang (Ascomycotina); Lớp: Ascomycetes; Bộ: Endomycetes; Họ: Saccharomycetaceae; Chi: <i>Candida</i>       |
| 4   | CY-4    | Tế bào hình ovan kéo dài ra, nảy chồi ở cả hai đầu                                            | Đường kính từ 0,4 - 0,45 cm; chiều dày 0,1 mm; độ nổi của khuẩn lạc: mô; bề mặt khuẩn lạc xù xì, bìa chia thùy; khuẩn lạc có màu trắng sữa                                          | Ngành: Nấm nang (Ascomycotina); Lớp: Ascomycetes; Bộ: Endomycetes; Họ: Pichiaceae; Chi: <i>Brettanomyces</i>         |
| 5   | CY-5    | Tế bào hình ovan kéo dài ra, nảy chồi đa cực                                                  | Đường kính từ 0,3 - 0,4 cm; chiều dày 0,1 mm; độ nổi của khuẩn lạc: lồi lén; bề mặt khuẩn lạc có lông, bìa có tia phóng xạ; trên khuẩn lạc có những vòng đồng tâm, có màu vàng nhạt | Ngành: Basidiomycota; Lớp: Tremellomycetes; Bộ: Tremellales; Họ: Cystofilobasidiaceae; Chi: <i>Cystofilobasidium</i> |

**Bảng 2.** Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng nấm mốc phân lập

| STT | Tên mẫu | Đặc điểm tế bào                                                                                                                                                                                                              | Mô tả khuẩn lạc                                                                                                                                       | Phân loại                                                                                                                                          |
|-----|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | CF-1    | Khuẩn ty có màu trắng, không có vách ngăn, khuẩn ty phát triển thành khuẩn cần và khuẩn ngang. Sinh sản vô tính với bào tử trong bọc, cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty mọc thẳng lên và mang túi bào tử, bào tử có màu đen | Dạng mặt: nhung mướt, dạng mép khuẩn lạc: mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu đen (màu của bào tử), mặt dưới có màu trắng (màu của khuẩn ty)  | Ngành: Nấm tiếp hợp ( <i>Zygomycotina</i> );<br>Lớp: <i>Zygomycetes</i> ; Bộ: <i>Mucorales</i> ; Họ: <i>Mucoraceae</i> ; Chi: <i>Rhizopus</i>      |
| 2   | CF-2    | Khuẩn ty có màu trắng, phân nhánh và có vách ngăn. Cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty và mang bào tử đính, bào tử có màu đen                                                                                                 | Dạng mặt: nhung mướt, dạng mép khuẩn lạc: mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu đen (màu của bào tử), mặt dưới có màu trắng (màu của khuẩn ty)  | Ngành: Nấm nang ( <i>Ascomycotina</i> )<br>Lớp: <i>Plectomycetes</i><br>Bộ: <i>Eurotiales</i><br>Họ: <i>Eurotiaceae</i><br>Chi: <i>Aspergillus</i> |
| 3   | CF-3    | Khuẩn ty phân nhánh và có vách ngăn. Cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty và mang bào tử đính, bào tử có màu đen                                                                                                               | Dạng mặt: nhung mướt, dạng mép khuẩn lạc: mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu đen (màu của bào tử), mặt dưới có màu trắng (màu của khuẩn ty)  |                                                                                                                                                    |
| 4   | CF-4    | Khuẩn ty phân nhánh và có vách ngăn. Cộng bào tử phát triển từ khuẩn ty và mang bào tử đính, bào tử có màu xanh                                                                                                              | Dạng mặt: nhung mướt, dạng mép khuẩn lạc: mỏng, bìa rễ cây; mặt trên khuẩn lạc có màu xanh (màu của bào tử), mặt dưới có màu trắng (màu của khuẩn ty) |                                                                                                                                                    |

**Bảng 3.** Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn acetic phân lập

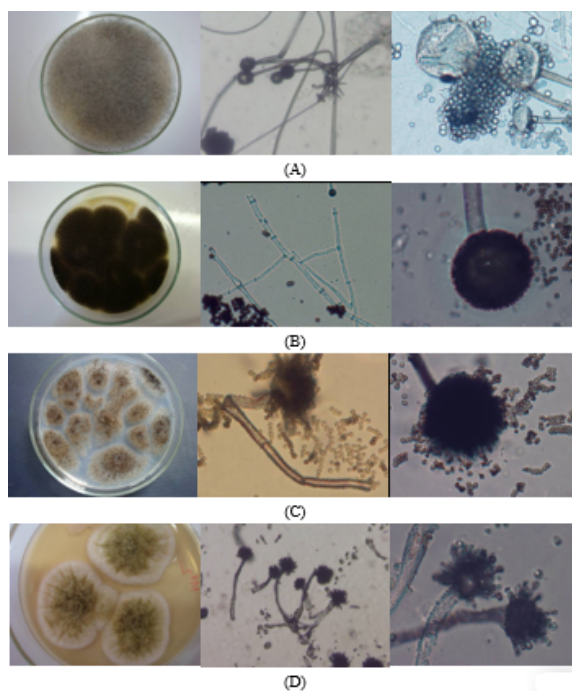
| STT | Tên mẫu | Đặc điểm tế bào                                                              | Mô tả khuẩn lạc                                                                                                                                | Phân loại                                                                                                                     |
|-----|---------|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | CAAB-1  | Tế bào vi khuẩn hình cầu; 2, 3 tế bào liên kết với nhau tạo thành chuỗi ngắn | Đường kính từ 0,2 - 0,25 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn bằng phẳng; bề mặt khuẩn lạc trơn, bìa nguyên; khuẩn lạc có màu vàng           | Ngành: Proteobacteria<br>Lớp: Alpha Proteobacteria<br>Bộ: Rhodospirillales<br>Họ: Acetobacteraceae<br>Chi: <i>Acetobacter</i> |
| 2   | CAAB-2  | Tế bào vi khuẩn hình que, thường 2,3 tế bào liên kết với nhau                | Đường kính từ 0,15 - 0,2 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn bằng phẳng hoặc hơi mô lồi; bìa nguyên; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu vàng |                                                                                                                               |

**Bảng 4.** Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập

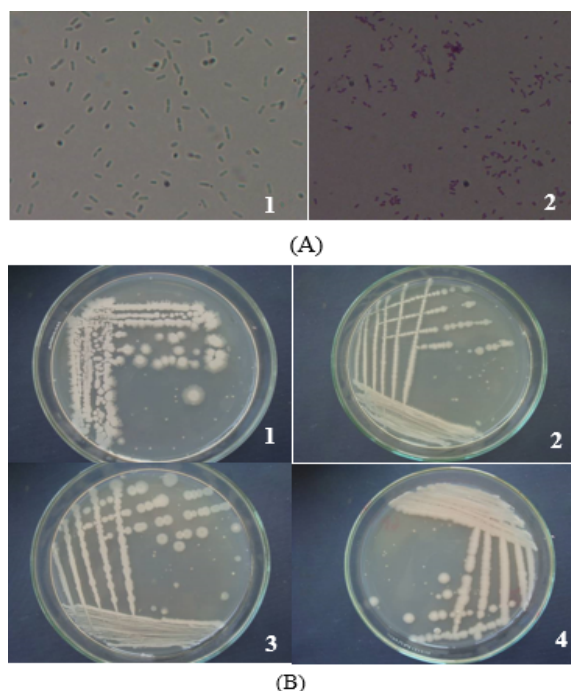
| STT | Tên mẫu | Đặc điểm tế bào                       | Mô tả khuẩn lạc                                                                                                                        | Phân loại                                                                                      |
|-----|---------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | CB-1    |                                       | Đường kính từ 0,65 - 0,75 cm; chiều dày 0,15 - 0,25 mm; bề mặt khuẩn lạc trơn phẳng, bìa rễ cây, khuẩn lạc có màu trắng đục            |                                                                                                |
| 2   | CB-2    |                                       | Đường kính từ 0,35 - 0,5 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; bề mặt khuẩn lạc trơn phẳng; bìa chia thùy, khuẩn lạc có màu trắng đục            | Ngành: Firmicutes<br>Lớp: Bacilli<br>Bộ: Bacillales<br>Họ: Bacillaceae<br>Chi: <i>Bacillus</i> |
| 3   | CB-3    | Tế bào vi khuẩn hình que đơn hoặc đôi | Đường kính từ 0,4 - 0,55 cm; chiều dày 0,1 mm; giữa khuẩn lồi xuống; bìa răng cưa; bề mặt khuẩn xù xì, khuẩn lạc có màu trắng đục      |                                                                                                |
| 4   | CB-4    |                                       | Đường kính từ 0,4 - 0,55 cm; chiều dày 0,1 - 0,2 mm; giữa khuẩn lồi lên; bìa nguyên; bề mặt khuẩn lạc trơn, khuẩn lạc có màu trắng đục |                                                                                                |

**Bảng 5.** Chiều cao cột khí CO<sub>2</sub> (cm) trong ống Durham

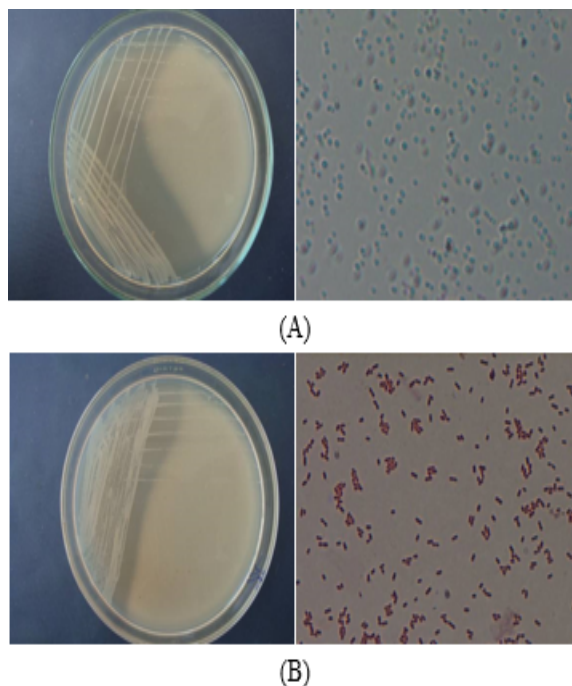
| Giờ | Dòng nấm men |       |       |       |       |       |       |       |      |      |
|-----|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
|     | CY-1a        | CY-1b | CY-2a | CY-2b | CY-3a | CY-3b | CY-4a | CY-4b | CY-5 | CY-V |
| 4   | 0,17         | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0    | 0,1  |
| 6   | 0,50         | 0,47  | 0,40  | 0,27  | 0     | 0     | 0,03  | 0     | 0    | 0,6  |
| 8   | 1,07         | 1,10  | 0,97  | 0,77  | 0     | 0     | 0,10  | 0,10  | 0,10 | 1,5  |
| 10  | 1,83         | 2,20  | 1,87  | 1,43  | 0     | 0     | 0,37  | 0,17  | 0,20 | 2,5  |
| 12  | 2,53         | 2,63  | 2,43  | 2,03  | 0     | 0     | 0,50  | 0,30  | 0,27 | 3    |
| 14  | 2,77         | 2,77  | 2,83  | 2,57  | 0     | 0     | 0,80  | 0,50  | 0,30 | > 3  |
| 16  | 3            | 3     | 3     | 2,77  | 0     | 0     | 1,03  | 0,67  | 0,37 | > 3  |
| 18  | > 3          | > 3   | > 3   | 2,77  | 0     | 0     | 1,33  | 0,97  | 0,50 | > 3  |
| 20  | > 3          | > 3   | > 3   | 2,83  | 0     | 0     | 1,83  | 1,20  | 0,57 | > 3  |
| 22  | > 3          | > 3   | > 3   | 2,93  | 0     | 0     | 2,00  | 1,50  | 0,73 | > 3  |
| 24  | > 3          | > 3   | > 3   | 3     | 0     | 0     | 2,03  | 1,73  | 0,73 | > 3  |



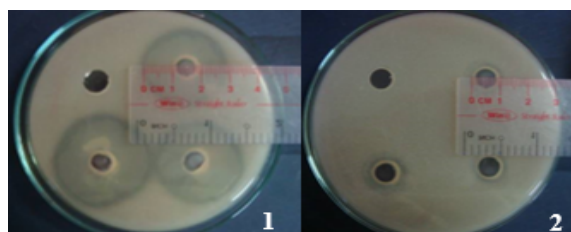
**Hình 3.** Khuẩn lạc, sợi nấm và bào tử dưới kính hiển vi ở X40. Các dòng nấm mốc gồm (A) CF-1, (B) CF-2, (C) CF-3 và (D) CF-4.



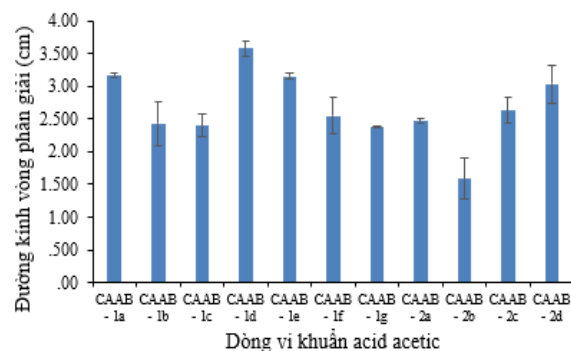
**Hình 5.** (A) Tế bào (1) và Gram (2) của các dòng *Bacillus*. (B) Khuẩn lạc của các dòng *Bacillus* gồm CB-1 (1), CB-2 (2), CB-3 (3) và CB-4 (4).



**Hình 4.** Khuẩn lạc và tế bào (nhiộm Gram) vi khuẩn acid acetic dưới kính hiển vi ở X100. Các dòng vi khuẩn acid acetic gồm (A) CAAB-1 và (B) CAAB-2.



**Hình 6.** Đường kính vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  của CAAB-1d (1) và CAAB-2b (2).



**Hình 7.** Khả năng phân giải  $\text{CaCO}_3$  của các dòng vi khuẩn acid acetic.

#### 4. Kết Luận

Mật số vi sinh vật tham gia trong lên men cao được xác định với mật số cao nhất lần lượt: nấm men (8,03 log cfu/g), nấm mốc (6,34 log cfu/g), vi khuẩn lactic (7,77 log cfu/g), vi khuẩn acetic (7,87 log cfu/g), vi khuẩn *Bacillus* (7,25 log cfu/g) và tổng số vi khuẩn hiếu khí (10,93 log cfu/g). Phân lập được 42 dòng vi sinh vật bao gồm 9 dòng nấm men, 9 dòng nấm mốc, 11 dòng vi khuẩn acetic và 13 dòng *Bacillus* thuần chủng từ 2 mẻ cao lên men ở quy mô nông hộ tại thành phố Cần Thơ. Chín chủng nấm men thuộc 5 chi *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*, *Candida* và *Cystofilobasidium*; 9 dòng nấm mốc thuộc hai chi *Rhizopus* và *Aspergillus*; 11 dòng vi khuẩn *Acetobacter* và 13 dòng vi khuẩn *Bacillus*. Tuyển chọn được 3 dòng nấm men CY-1a, CY-1b, CY-2a thuộc chi *Kluyveromyces* có khả năng lên men cao và 4 dòng vi khuẩn *Acetobacter* CAAB-1d, CAAB-1a, CAAB-1e và CAAB-2d tạo ra lượng acid acetic mạnh.

#### Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở Trường Đại học Cần Thơ.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Anon (1998). *Review of annual forecast of world production and consumption*. London, UK: International Cocoa Organization, ICC/57/5, ICCO.
- Ardhana, M., & Fleet, H. G. (2003). The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology* 86, 87-99.
- ICCO (International Cocoa Organization). (2017). *ICCO Annual Report 2014/2015*. Abidjan, Republic of Côte d'Ivoire: International Cocoa Organization.
- Gálvez, L. S., Gérard, L., Jose, L. P., Michel, B., & Joseph-Pierre, G. (2007). Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology* 114(1), 124-130.
- Hesseltine, C. W. (1991). Zygomycetes in food fermentations. *Mycologist* 5, 152-169.
- Ho, V. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 205, 54-67.
- Ho, V. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 174, 72-87.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9<sup>th</sup> ed.) Philadelphia, America: Lippincott Williams & Wilkins.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (5<sup>th</sup> ed., 87-110). *The Yeasts, a Taxonomic Study*. San Diego, America: Elsevier B.V.
- Luong, P. D. (2009). *Yeast industry*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.
- Miguel, G. C. P. M., Reis, L. V. C., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., & Schwan, R. F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS, and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT - Food Science and Technology* 77, 362-369.
- Ngo, D. T. P., Nguyen, T. N., & Huynh, P. X. (2013). Microflora composition and isolation of micro-organisms in cocoa fermentation. *Can Tho University Journal of Science* 25, 271-280.
- Nguyen, L. D., Phan, H. T., & Nguyen, T. A. (2003). *Biotechnology laboratory manual- Part II Microbiological laboratory*. Ho Chi Minh city, Vietnam: Viet Nam National University.
- Nguyen, D. L., Nguyen, Q. D., & Pham, T. V. (2012). *Microbiology*. Ha Noi, Vietnam: Vietnam Education Publishing House.
- Samson, A. R., Hoekstra, S. E., & Frisvad, C. J. (2004). *Introduction to Food and Airborne Fungi*. (6<sup>th</sup> ed.). Virginia, America: ASM Press.
- Sandhya, M. V. S., Yallappa, B. S., Varadaraj, M. C., Puranaika, J., Rao, J. L., Janardhan, P., & Murthy, S. P. (2016). Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Science and Technology* 65, 731-738.
- Schwan, F. R. (1998). Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4), 1477-1483.
- Schwan, F. R., & Wheals, E. A. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 44(4), 205-221.
- Tran, T. L. (2008). *Microbiological analysis*. Ha Noi, Vietnam: Vietnam Education Publishing House.
- Vuong, T. T., & Ha, T. T. (2006). Effects of fermented conditions on cocoa bean quality. *Can Tho University Journal of Science* 5, 149-157.
- Wood, G. A. R., & Lass R.A. (2001). *Cocoa* (4<sup>th</sup> ed.). New Jersey, America: Wiley-Blackwell.

## Construction of artificial microRNA expression vectors for inhibition of *Minc16281* gene in root-knot nematode *Meloidogyne incognita*

Phong V. Nguyen\*, Loan T. N. Nguyen, Thang B. Tran, & Linh B. Ton

Department of Biotechnology, Nong Lam University, Ho Chi Minh city, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: January 01, 2019

Revised: February 15, 2019

Accepted: February 22, 2019

#### Keywords

Effector

Gene silencing

*Meloidogyne*

MicroRNA

Plant-parasitic nematode

#### \*Corresponding author

Nguyen Vu Phong

Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

Effectors have been identified to play a very important role in the parasitism of plant-parasitic nematode. To cope with this type of pathogen, many approaches of silencing genes encoding for effectors have been studied and promise to be an effective tool to create plant varieties resistant to plant-parasitic nematodes. In this study, the *Minc16281* gene encoding a pioneer effector with unknown function was determined and cloned from a *Meloidogyne incognita* population isolated from soybean field (ID: MH315945.1). The nucleotide sequence of this gene showed 97% identity to its homolog in GenBank (ID: JK287445.1) used as the control strain in our research. To generate host-induced gene silencing constructs which can potentially silence the expression of *Minc16281* gene, two artificial microRNAs were synthesized based on the miR319a structure of *Arabidopsis thaliana* and inserted into an expression vector in soybean. These microRNAs can be introduced into soybean to investigate the function of MINC16281 on parasitism of root-knot nematode.

**Cited as:** Nguyen, P. V., Nguyen, L. T. N., Tran, T. B. & Ton, L. B. (2019). Construction of artificial microRNA expression vectors for inhibition of *Minc16281* gene in root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 62-69.

## Tổng hợp vector mang cấu trúc microRNA nhân tạo sử dụng ức chế sự biểu hiện gene *Minc16281* của tuyến trùng sùng rế *Meloidogyne incognita*

Nguyễn Vũ Phong\*, Nguyễn Thị Ngọc Loan, Trần Bảo Thắng & Tôn Bảo Linh

Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 01/01/2019

Ngày chỉnh sửa: 15/02/2019

Ngày chấp nhận: 22/02/2019

#### Từ khóa

Câm lặng gene

Effector

*Meloidogyne*

MicroRNA

Tuyến trùng ký sinh thực vật

#### \*Tác giả liên hệ

Nguyễn Vũ Phong

Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Các effector được nhận định có vai trò rất quan trọng trong quá trình ký sinh của tuyến trùng sùng rế gây hại cây trồng. Để kiểm soát sinh vật gây hại này, nhiều phương pháp kìm hãm sự biểu hiện các gene mã hóa effector được tập trung nghiên cứu và có tiềm năng trở thành công cụ hữu hiệu tạo ra giống cây trồng kháng tuyến trùng ký sinh thực vật. Trong nghiên cứu này, gene *Minc16281* mã hóa cho một effector chưa hiểu rõ chức năng được phân lập từ loài tuyến trùng *Meloidogyne incognita* ký sinh cây đậu nành ở Việt Nam (ID: MH315945.1). Trình tự của gene này tương đồng 97% với trình tự hiện diện trên GenBank (ID: JK287445.1). Từ trình tự cDNA của gene này, hai cấu trúc microRNA nhân tạo có khả năng làm câm lặng gene này được tổng hợp nhờ phân tử tiền thân miR319a của cây *Arabidopsis thaliana*. Các miRNA nhân tạo được chèn vào vector biểu hiện ở cây đậu nành để nghiên cứu vai trò và chức năng của effector MINC16281 của tuyến trùng sùng rế.

## 1. Đặt Vấn Đề

Tuyến trùng sùng rế *Meloidogyne* sp. là loài tuyến trùng ký sinh gây thiệt hại kinh tế lớn nhất trên cây trồng ở vùng ôn đới và nhiệt đới (Trudgill & Block, 2001). Loài tuyến trùng này có khả năng ký sinh hơn 5.500 loài thực vật, ký chủ ưa thích là rau cải, cây họ đậu, cây lấy sợi, cây ăn quả và cây trồng đồn điền. Đến nay, *Meloidogyne* được biết có trên 100 loài, trong đó 4 loài *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* là ký sinh gây hại nghiêm trọng (Hunt & Handoo, 2009). Tuyến trùng sùng rế có tính ký sinh chuyên tính cao, khả năng tiềm sinh lâu trong đất. Do đó mức độ ảnh hưởng của tuyến trùng rất lớn đến năng suất và chất lượng sản phẩm cũng như trong vấn đề tái sản xuất nông nghiệp.

Trong nghiên cứu này, gene *Minc16281* mã hóa cho một effector chưa biết chức năng được tạo dòng từ mẫu tuyến trùng *M. incognita* tạo dữ liệu cho tổng hợp các microRNA nhân tạo có khả

năng bất hoạt gene này. Các cấu trúc RNAi này được gắn vào vector biểu hiện ở cây đậu nành nhằm tìm hiểu vai trò của effector MINC16281 trong tiến trình ký sinh thực vật của tuyến trùng sùng rế thông qua con đường làm câm lặng gene bởi cây chủ.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu

Dòng tuyến trùng sùng rế *Meloidogyne incognita* phân lập từ rễ cây đậu nành được định danh dựa vào hình thái vân sinh môn con cái (perineal pattern) (Eisenback & Triantaphyllou, 1991) và chỉ thị SCAR (Meng & ctv., 2004). Dòng tuyến trùng được lưu giữ và nhân dòng trên cây đậu nành giống Nam Vang.

Vector pRS300 chứa ath-miR319a precursor được cung cấp bởi Detlef Weigel, Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for De-

velopmental Biology, Đức (Schwab & ctv., 2006). Vector pSM103 chứa các gene *hptII* (kháng hygromycin), gene *aadA* (kháng kanamycin), cassette 35SP-erGFP7INT-NOS, đoạn miR319a của *Arabidopsis* chịu điều khiển bởi promoter GmU-biIII giúp biểu hiện đoạn microRNA ở cây đậu nành được cung cấp bởi Andrew F. Bent, University of Wisconsin-Madison, Mỹ (Melito & ctv. 2010).

## 2.2. Tạo dòng gene *Minc16281* của tuyến trùng *M. incognita*

RNA tổng số của tuyến trùng được tách chiết bởi GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ), tiếp đến tổng hợp cDNA bằng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Đoạn trình tự mã hóa protein được khuếch đại bằng PCR với cặp primer Minc16281F (5'- ATGAATCCACAAA-GAATGCTCTTCTCT - 3') và Minc16281R (5'-TTAAAGAAATGCTGCCATTGGGCGA - 3'). Nhiệt độ bắt cặp được khảo sát ở 52°C, 54°C, 56°C và 58°C. Chu kỳ nhiệt gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, Ta/30 giây, 72°C/45 giây (35 chu kỳ). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Mỹ) và được nối với vector pJET1.2/blunt (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific). Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt (Sambrook & Russell, 2001). Các khuẩn lạc chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp primer pJET1.2. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Mỹ) và gene tạo dòng được giải trình tự theo phương pháp Sanger.

## 2.3. Lựa chọn và tạo dòng cấu trúc miRNA nhân tạo

Dựa vào trình tự gene *Minc16281* được tạo dòng, các microRNA nhân tạo (amiRNA) có khả năng làm câm lặng biểu hiện gene mục tiêu được thiết kế nhờ công cụ Designer của trang web WMD3 (<http://wmd3.weigelworld.org>). Từ danh sách các amiRNA nhân tạo gợi ý được đưa ra bởi WMD3, kiểm tra và lựa chọn amiRNA theo tiêu chí được đề xuất bởi Schwab & ctv. (2006) gồm (1) bất hoạt gene mục tiêu ở tuyến trùng mà không bất hoạt các gene của đậu nành nhờ công cụ Target Search của WMD3 trên hai database *Glycine max* v1.0 (JGI) và

*Glycine max* v109 (Phytozome); (2) vị trí gắn của miRNA nhân tạo với mRNA mục tiêu nằm ở vùng 3'; (3) năng lượng liên kết giữa amiRNA với mRNA mục tiêu từ -35 đến -40 kcal/mol, không cao quá -30 kcal/mol; (4) không bắt cặp sai từ vị trí 2 - 12 của amiRNA đối với đoạn mục tiêu. Công cụ Oligo của WMD3 được sử dụng thiết kế các primer để thay thế đoạn 20 nu của precursor *ath-mi319a* bởi đoạn miRNA 21 nu mới nhờ kỹ thuật PCR overlapping theo Schwab & ctv. (2006) (<http://wmd3.weigelworld.org>) (Bảng 1). Cấu trúc amiRNA mới được chèn trình tự nhận biết của hai enzyme *PstI* và *BamHI* ở hai đầu với primer At319a-F (5'-cccCTGCAGccccaacacacgc-3') và At319a-R (5'-cccGGATCCcccctggcgatg-3') và nhân dòng bởi hệ thống vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, Mỹ). Trình tự microRNA nhân tạo được kiểm tra nhằm đảm bảo tính chính xác trước khi gắn vào vector biểu hiện pSM103.

## 2.4. Chèn cấu trúc miRNA nhân tạo vào vector biểu hiện

Đoạn miR319a trong plasmid pSM103 được thay thế bằng đoạn trình tự amiRNA tổng hợp. Plasmid pSM103 và đoạn amiRNA được xử lý bằng enzyme cắt *BamHI* và *PstI* (Thermo Scientific, Mỹ) và nối với nhau nhờ T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Mỹ) để tạo plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp pSM103-amiRNA được tạo dòng trong tế bào *E. coli* TOP10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Trình tự và hướng chèn của amiRNA trong vector pSM103 được kiểm tra trước khi biến nạp plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 để chuyển cấu trúc amiRNA vào cây chủ.

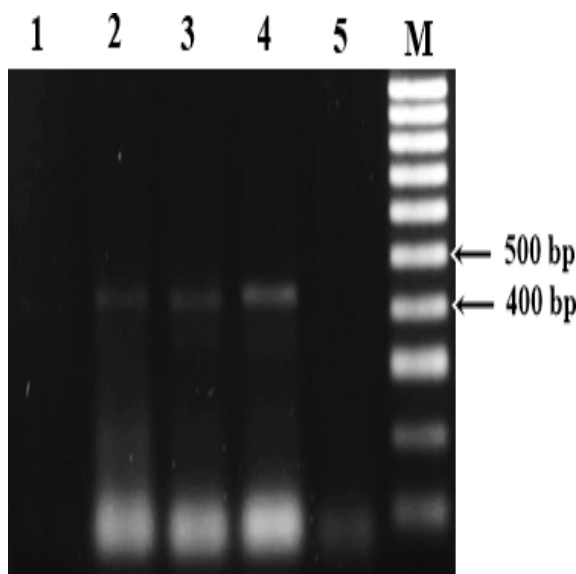
## 2.5. Kiểm tra trình tự các đoạn polynucleotide

Phân tích trình tự nucleotide bằng phần mềm BioEdit, công cụ BLAST (NCBI), Clustal Omega được phát triển bởi EMBL - EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) và so dòng bằng ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>).

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Tạo dòng gene *Minc16281*

Từ cDNA tổng số của dòng tuyến trùng phân lập đã khuếch đại được sản phẩm có kích thước



**Hình 1.** Kết quả PCR khuếch đại gene *Minc16281* với nhiệt độ bắt cặp khác nhau.  
(M) ladder 100 bp; (1 – 4): 52°C, 54°C, 56°C, 58°C; (5) đối chứng âm.

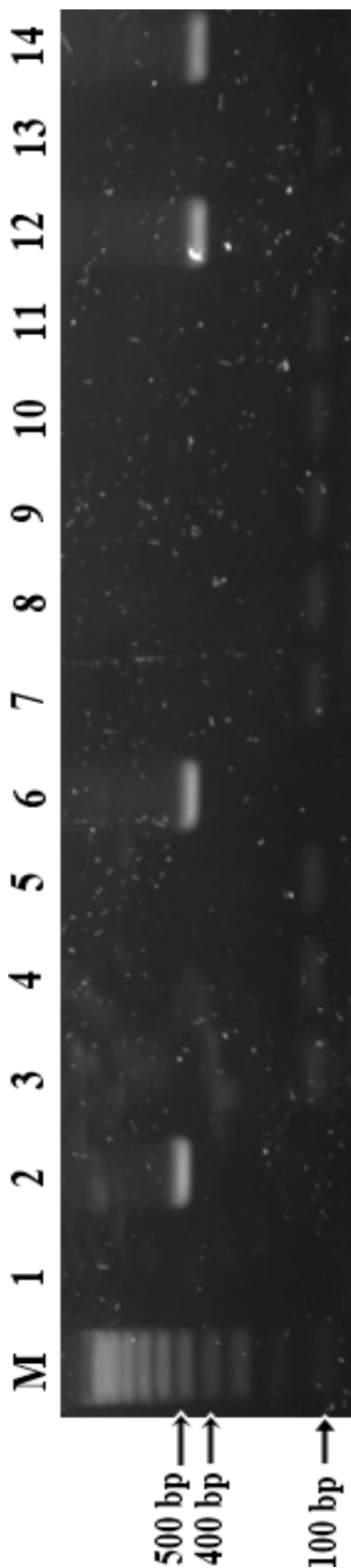
khoảng 400 bp tương ứng với kích thước gene mục tiêu (Hình 1).

Trình tự đoạn cDNA khuếch đại từ dòng tuyển trùng thu thập được tạo dòng trong vi khuẩn *E. coli* TOP10 sử dụng vector pJET1.2/blunt (Hình 2). Trình tự đoạn cDNA mục tiêu được giải trình tự và so sánh với dữ liệu bộ gene của tuyển trùng sừng rể *Meloidogyne* (Abad & ctv., 2008; [https://www6.inra.fr/meloidogyne\\_incognita](https://www6.inra.fr/meloidogyne_incognita)) và NCBI. Kết quả cho thấy có sự tương đồng đến 97% với cDNA của 3 loài tuyển trùng *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*. Trình tự cDNA của gene *Minc16281* đã được đăng ký vào GenBank (ID: MH315945.1) và sử dụng làm khuôn để thiết kế các miRNA nhân tạo.

### 3.2. Chọn lọc và tổng hợp miRNA nhân tạo

Trình tự đoạn gene *Minc16281* của dòng tuyển trùng *Meloidogyne incognita* Mi-PN03 (ID: MH315945.1) được sử dụng để chọn lựa các miRNA nhân tạo nhờ phần mềm WMD3. Từ danh sách các amiRNA gợi ý tiến hành kiểm tra và chọn hai amiR ứng viên ký hiệu là amiR16281.1 và amiR16281.2 (Bảng 2).

Các đoạn amiRNA được tổng hợp bằng phương pháp PCR overlapping theo quy trình miêu tả bởi Schwab & ctv. (2006). Do quy trình thực hiện tổng hợp hai microRNA là tương tự nhau nên kết



**Hình 2.** Kết quả PCR khuôn lọc chọn dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp.  
(M) ladder 100 bp; (1) đối chứng âm; (2 – 14) các dòng vi khuẩn sau biến nạp.

**Bảng 1.** Các primer sử dụng tổng hợp amiR16281

| amiRNA      | Primer    | Trình tự (5' 3')                         |
|-------------|-----------|------------------------------------------|
| amiR16281.1 | I miR     | gaTACTAACAGGCAAATACGCACtctctctttgtattcc  |
|             | II miR    | gaGTGCGTATTTGCCTGTTAGTAtcaaagagaatcaatga |
|             | III miR*s | gaGTACGTATTTGCCAGTTAGTTtcacaggtcgtgatatg |
|             | IV miR*a  | gaAACTAACTGGCAAATACGTACtctacatatattctct  |
| amiR16281.2 | I miR     | gaTAAATACACACTACGCGTCCAtctctctttgtattcc  |
|             | II miR    | gaTGGACGCGTAGTGTGTATTTAtcaaagagaatcaatga |
|             | III miR*s | gaTGAACGCGTAGTGAGTATTTTtcacaggtcgtgatatg |
|             | IV miR*a  | gaAAAATACTCACTACGCGTTCActctacatatattctct |

**Bảng 2.** Trình tự hai microRNA nhân tạo lựa chọn

| Tên         | Trình tự               | Năng lượng liên kết (kcal/mol) | % GC | Vị trí bắt cặp với mRNA mục tiêu |
|-------------|------------------------|--------------------------------|------|----------------------------------|
| amiR16281.1 | UACUAAACAGGCAAAUACGCAC | -38,92                         | 42   | 65 - 74                          |
| amiR16281.2 | UAAAUACACACUACGCGUCCA  | -40,20                         | 42   | 51 - 70                          |

quả tổng hợp amiR16281.2 được trình bày trong phần này.

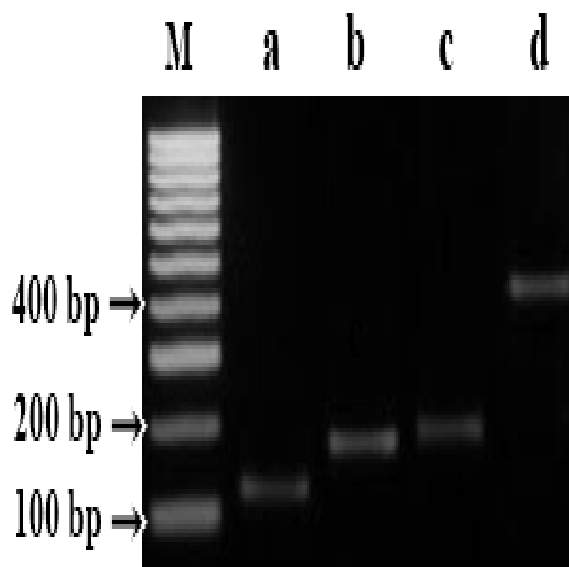
Sau khi xác định nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho các primer và thời gian kéo dài thích hợp của từng phản ứng thành phần (a, b, c) đã thu được được sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 119 bp, 176 bp, 182 bp. Các sản phẩm này dùng làm khuôn cho PCR overlapping (d) tổng hợp đoạn precursor mang đoạn amiRNA kích thước lớn hơn 400 bp tương đương kích thước lý thuyết mong đợi (Hình 3).

Cấu trúc precursor ath-mi319a mang amiR16281.2 được tạo dòng nhờ vector pJET1.2/blunt. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* TOP10 để chọn dòng mang vector tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ 12 khuẩn lạc cho thấy có 10 dòng tạo sản phẩm tương đương kích thước dự kiến 546 bp (Hình 4).

Plasmid tái tổ hợp của ba dòng vi khuẩn được tách chiết và giải trình tự. Kết quả cho thấy cấu trúc amiR16281.2 tạo dòng có chiều dài và trình tự đúng với dự tính (Hình 5). Cấu trúc này được thu nhận và nối với backbone của vector biểu hiện pSM103.

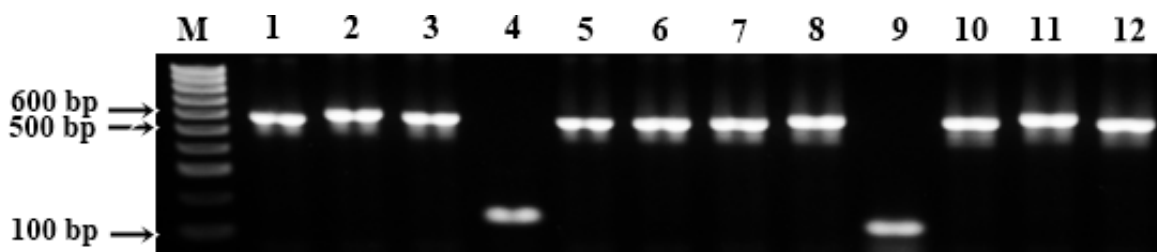
### 3.3. Tạo vector biểu hiện cấu trúc amiRNA

Vector pSM103 và vector pJET1.2-amiRNA16281.2 được xử lý bằng enzyme cắt *Bam*HI và *Pst*I (Thermo Scientific, Mỹ). Theo lý thuyết phản ứng cắt vector pSM103 tạo ra hai đoạn có kích thước 412 bp và 12 kb,

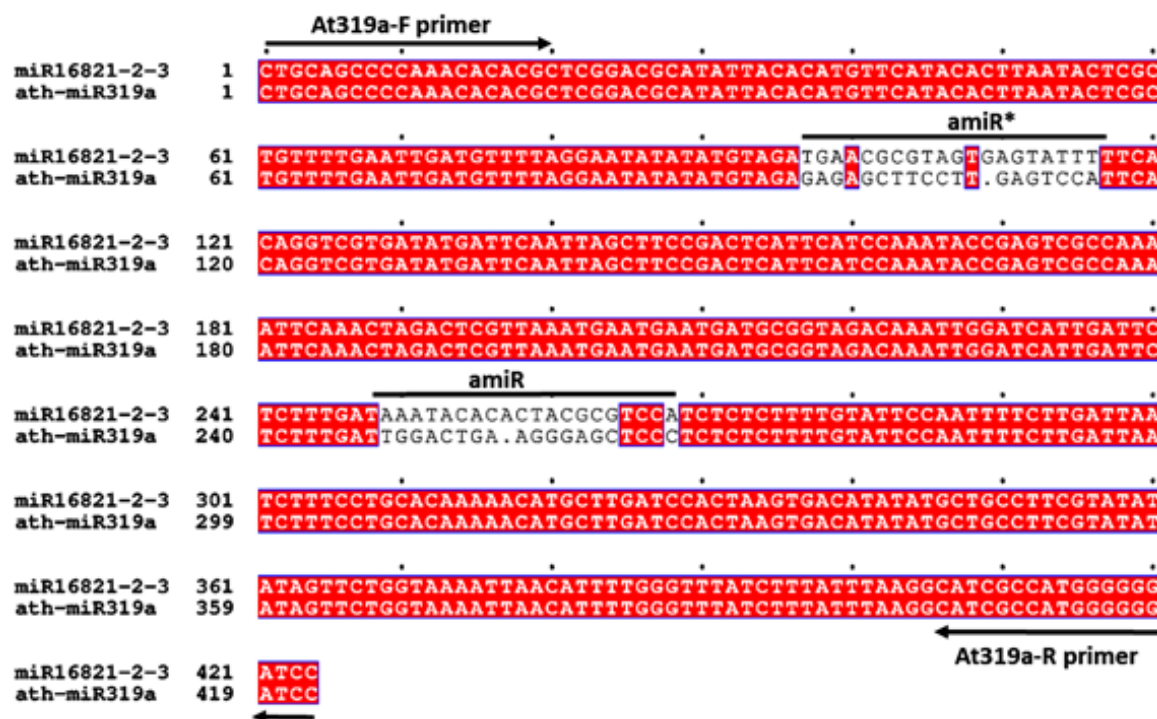
**Hình 3.** Kết quả PCR tổng hợp đoạn amiR16281.2. (M) ladder 100 bp; (a, b, c, d) các phản ứng thành phần.

vector pJET1.2-amiRNA16281.2 khi bị cắt bằng sẽ tạo ra hai đoạn có kích thước 428 bp và 2974 bp. Thực tế, kết quả điện di sản phẩm cắt vector pSM103 thu được một băng có kích thước lớn hơn 10 kb và một băng lớn hơn 400 bp (Hình 6a), vector pJET1.2-amiRNA16281.2 cho một băng có kích thước gần 3 kb và một băng lớn hơn 400 bp (Hình 6b).

Sản phẩm mục tiêu được thu hồi từ gel agarose và nối với nhau bằng enzyme T4 ligase tạo vec-



**Hình 4.** Kết quả PCR kiểm tra dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp.  
(M) ladder 100bp, (1-12) các khuẩn lạc.



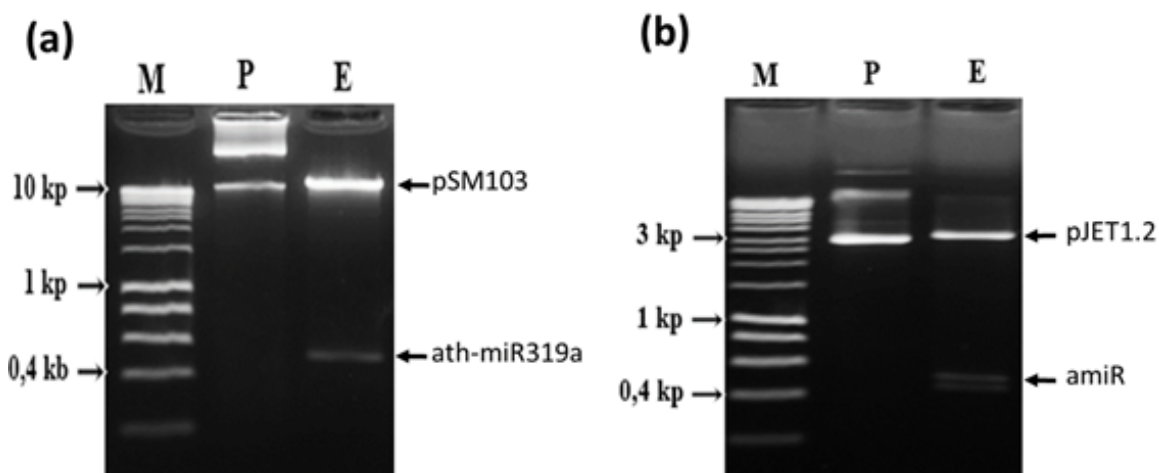
**Hình 5.** Trình tự 21 nu amiR16281-2 thay thế vào trình tự 20 nu của precursor ath-miR319a.

tor tái tổ hợp pSM103-amiR16281.2. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng vi khuẩn chứa vector tái tổ hợp được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc (Hình 7). Kết quả kiểm tra bằng enzyme cắt và giải trình tự cho thấy amiR16281.2 được chèn thành công vào vector biểu hiện pSM103 (Hình 8).

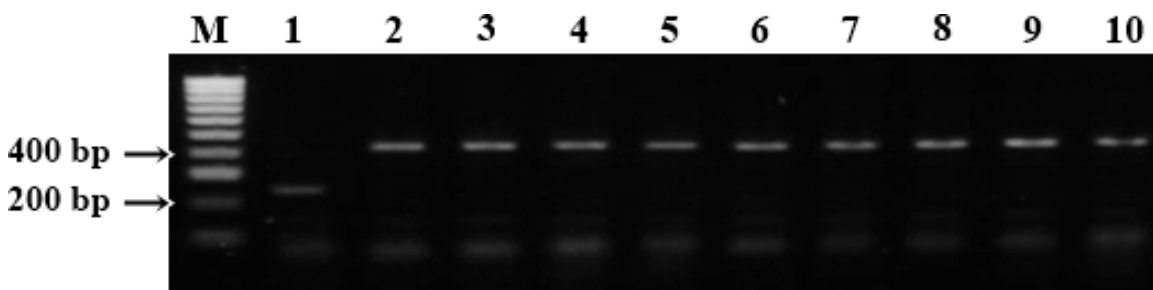
Kết quả cho thấy đã tạo dòng thành công hai vector chứa cấu trúc amiRNA16281 nhân tạo trong vi khuẩn *E. coli*. Các cấu trúc này được thu nhận và tiếp tục biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 bằng phương pháp sốc

nhiệt. Dòng vi khuẩn chứa vector tái tổ hợp đã được chọn lọc trên môi trường chứa kháng sinh kanamycin và sẽ được chuyển vào cây đậu nành trong nghiên cứu tiếp theo.

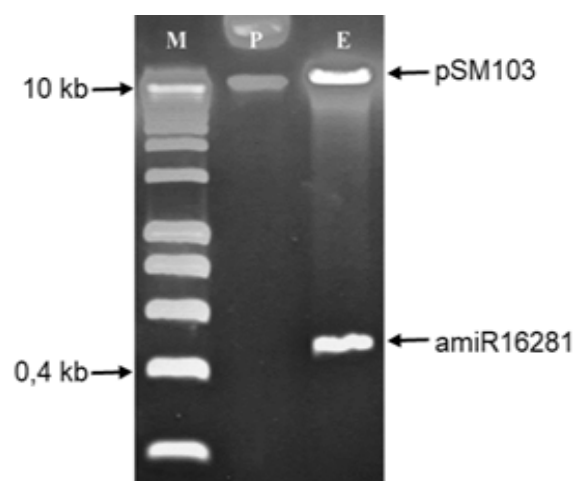
*Minc16281* là gene mã hóa một effector chưa biết chức năng của tuyến trùng *M. incognita*. Effector này chứa một đoạn peptide tín hiệu (signal peptide) ở đầu N-terminal và trình tự xuyên màng (transmembrane domain). Kết quả thực nghiệm cho thấy khi xử lý tuyến trùng với siRNA chuyên biệt cho mRNA bằng phương pháp soaking đã làm giảm hơn 50% độc tính của tuyến trùng (dữ liệu chưa công bố). Trong nghiên cứu



**Hình 6.** Kết quả cắt vector (a) pSM103 và (b) pJET1.2-amiR16281.2.  
(M): Ladder 1kb; (P): plasmid; (E): cắt bằng *Bam*HI và *Pst*I.



**Hình 7.** Kết quả PCR sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp.  
(M) ladder 100bp; (1) đối chứng 261 bp; (2 – 10) các khuẩn lạc.



**Hình 8.** Kết quả cắt vector pSM103-amiR16281.2.  
(M): Ladder 1kb; (P): không cắt; (E): *Bam*HI và *Pst*I.

này, trình tự gene Minc16281 của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* PN03 ký sinh đậu nành phân lập ở Việt Nam đã được xác định tương đồng 97% với trình tự homolog của *M. incognita* race 1, EST (expressed sequence tag) của *M. javanica* và *M. arenaria*. Điều này rất thú vị, có thể giúp ức chế sự biểu hiện của gene mã hóa effector của nhiều loài *Meloidogyne* bởi một cấu trúc microRNA nhân tạo. Để tìm hiểu chức năng liên quan đến độc tính của effector này ở tuyến trùng, hai cấu trúc miRNA nhân tạo đã được tổng hợp nhằm kiểm tra mức độ biểu hiện của effector tuyến trùng thông qua cây ký chủ (HIGS). Công việc tạo cây đậu nành biến đổi gene và thử nghiệm sinh học cần tiếp tục thực hiện để làm sáng tỏ vai trò của effector, cung cấp thêm dữ liệu cho lựa chọn phương thức kiểm soát tuyến trùng sùng rế ở cây trồng.

#### 4. Kết Luận

Trình tự mã hóa gene *Minc16281* đã được tạo dòng từ dòng tuyển trùng *M. incognita* Mi-PN03. Dựa vào trình tự mã hóa amino acid của đoạn gene này đã thiết kế và tổng hợp hai vector chứa cấu trúc miRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt sự biểu hiện của gene *Minc16281*. Hai vector này đã được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 phục vụ tạo cây đậu nành biến đổi gene nhằm làm sáng tỏ vai trò của effector tương ứng liên quan đến khả năng ký sinh của tuyến trùng *Meloidogyne incognita* thông qua phương pháp cấy lặn gene cảm ứng bởi cây ký chủ (HIGS).

#### Lời Cảm Ơn

Cảm ơn Lê Thị Phương Duy và Huỳnh Thị Mỹ Liên đã hỗ trợ công việc kỹ thuật. Nghiên cứu thuộc đề tài mã số 58/2017/HD-SKHCN được tài trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V. C., Caillaud, M. C., Coutinho, P. M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J. V., Hamamouch, N., Hewezi, T., Jaillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T.R., Markov, G. V., McVeigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Ségurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T. J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E. L., Ewbank, J. J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J. T., Laudet, V., Maule, A. G., Quesneville, H., Rosso, M. N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J., Wincker, P. (2008). Genome sequence of the Metazoan Plant-Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology* 26(8), 909-915.
- Bellafore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., & Briggs, S. P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens* 4(10), e1000192.
- Davis, E., Hussey, R. S., & Baum, T. J. (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology* 20(3), 134-141.
- Eisenback, D. E., & Triantaphyllou, H. H. (1991). Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In Nickle, W. R. (Ed.). *Manual of Agricultural Nematology* (191-274). New York, America: Marcel Dekker Inc.
- Hunt, D. J., & Handoo, Z. A. (2009). Taxonomy, identification and principal species. In Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes* (55-88). Oxfordshire, England: CABI Publishing.
- Melito, S., Heuberger, A. L., Cook, D., Diers, B. W., MacGuidwin, A. E., & Bent, A. F. (2010). A nematode demographictv assay in transgenic roots reveals no significant impacts of the *Rhg1* locus LRR-Kinase on soybean cyst nematode resistance. *BMC Plant Biology* 10(1), 104-117.
- Meng, Q. P., Long, H., & Xu, J. H. (2004). PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathologica Sinica* 34, 204-210.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual - Volume 1*. New York, America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riestter, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1121-1133.
- Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: Exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39, 53-77.

## Effect of coconut oil, milk powder on the viscosity and hardness of mixtures of cocoa powder and cocoa butter

Uyen N. H. Truong, Giang T. Tran, & Bach T. Nguyen\*

Faculty of Food Technology, Nha Trang University, Nha Trang, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: July 18, 2018

Revised: March 02, 2019

Accepted: April 02, 2019

#### Keywords

Cocoa powder/cocoa butter

Coconut oil

Hardness

Milk powder

Viscosity

#### \*Corresponding author

Nguyen Trong Bach

Email: [ntbachnt@ntu.edu.vn](mailto:ntbachnt@ntu.edu.vn)

### ABSTRACT

The effects of changing in composition and adding of coconut oil and milk powder on physical states and rheological properties of cocoa powder/cocoa butter mixtures were investigated. The aim of this study is to keep the product quality at the right temperature and then consumer's acceptance. The viscosity, hardness and the solidification temperature of cocoa powder/cocoa butter mixtures reduced when cocoa butter content increased or cocoa butter was replaced by coconut oil, or cocoa powder was replaced by milk powder. The viscosity (at 31<sup>0</sup>C and 50<sup>0</sup>C) significantly decreased in accordance with an increase in cocoa butter (from 40 to 50%), addition of coconut oils (from 10 to 20%) and replacement of cocoa powder by milk powder (from 5 to 10%) by weight. The cutting and breaking hardness of mixtures (at 10<sup>0</sup>C and 20<sup>0</sup>C) decreased sharply when the cocoa butter content was more than 50% of the mixture by weight. The solidification temperature of mixtures decreased from 24<sup>0</sup>C to 20<sup>0</sup>C when the coconut oil ratio increased from 20% to 40% of mixture weight.

**Cited as:** Truong, U. N. H., Tran, G. T., & Nguyen, B. T. (2019). Effect of coconut oil, milk powder on the viscosity and hardness of mixtures of cocoa powder and cocoa butter. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 70-80.

## Ảnh hưởng của dầu dừa, sữa bột đến độ nhớt và độ cứng của hỗn hợp bột cacao/bơ cacao

Trương Nữ Hạ Uyên, Trần Thanh Giang & Nguyễn Trọng Bách\*

Khoa Công nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Nha Trang, Nha Trang

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 18/07/2018

Ngày chỉnh sửa: 02/03/2019

Ngày chấp nhận: 02/04/2019

#### Từ khóa

Bột cacao/bơ cacao

Dầu dừa

Độ cứng

Độ nhớt

Sữa bột

#### \*Tác giả liên hệ

Nguyễn Trọng Bách

Email: ntbachnt@ntu.edu.vn

### TÓM TẮT

Trạng thái và tính chất lưu biến của hỗn hợp bột cacao/bơ cacao được khảo sát khi thay đổi thành phần và tỉ lệ của hỗn hợp bằng cách bổ sung dầu dừa hoặc sữa bột vào hỗn hợp làm cơ sở cho việc chọn tỉ lệ dầu dừa hoặc sữa bột bổ sung vào sản phẩm sôcôla, hướng đến việc giữ chất lượng sản phẩm ở điều kiện nhiệt độ phù hợp, đem sản phẩm đến gần với người tiêu dùng hơn. Độ nhớt, độ cứng và nhiệt độ kết tinh hóa rắn của hỗn hợp bột cacao/bơ cacao giảm khi tăng tỉ lệ bơ cacao hoặc dùng dầu dừa thay thế bơ cacao hoặc dùng sữa bột thay thế bột cacao. Độ nhớt (ở 31<sup>0</sup>C và 50<sup>0</sup>C) giảm mạnh khi tỉ lệ bơ cacao tăng từ 40% đến 50% khối lượng hỗn hợp, hoặc khi dùng dầu dừa từ 10% đến 20% khối lượng hỗn hợp hoặc dùng sữa bột từ 5% đến 10% khối lượng hỗn hợp. Độ cứng cắt và độ cứng vỡ của hỗn hợp (ở 10<sup>0</sup>C và 20<sup>0</sup>C) giảm mạnh khi tỉ lệ bơ cacao tăng hơn 50% khối lượng hỗn hợp. Nếu thay thế quá nhiều bột cacao bằng sữa bột (40 - 60% khối lượng hỗn hợp) sẽ làm cấu trúc của sôcôla không chặt chẽ, khi cắt hoặc làm vỡ xuất hiện nhiều vụn nhỏ do chất rắn không được áo ngoài tốt bởi bơ cacao. Nhiệt độ kết tinh hóa rắn của hỗn hợp giảm từ 24<sup>0</sup>C xuống 20<sup>0</sup>C khi tăng tỷ lệ dầu dừa từ 20% đến 40% khối lượng hỗn hợp.

### 1. Đặt Vấn Đề

Sôcôla là một trong số những sản phẩm có giá trị lớn từ cây cacao, được nhiều người ưa chuộng và sử dụng ngày càng nhiều. Tuy nhiên giá thành sôcôla còn khá cao và khi bảo quản ngoài thị trường vẫn còn khá khó khăn, cần phải được bảo quản ở nhiệt độ thấp, nếu không rất dễ tan chảy. Thành phần chính của sôcôla bao gồm bơ cacao và bột cacao (Afoakwa & ctv., 2007), việc nghiên cứu tính chất của hỗn hợp các nguyên liệu sẽ giúp hiểu rõ về cấu trúc, mức độ chảy thông qua độ nhớt hỗn hợp sôcôla lỏng để thiết kế quá trình bơm đẩy, vận chuyển, rót khuôn,...; đồng thời tỷ lệ các thành phần cũng ảnh hưởng đến độ cứng của khối sôcôla sau kết tinh. Trong hai thành phần chính của sôcôla thì bơ cacao là một trong những loại có giá trị nhất trong số các loại chất béo nhiệt đới (Afoakwa & ctv., 2007). Tuy nhiên trong những năm gần đây, sản lượng bơ cacao bị hạn chế bởi điều kiện canh tác khó khăn và

sâu bệnh trong khi nhu cầu bơ cacao tăng cao ở các nước đang phát triển và giá cacao thế giới ngày càng tăng (Afoakwa & ctv., 2007). Vì lý do đó, việc nghiên cứu thành phần thay thế bơ cacao giúp nhà sản xuất giảm được chi phí nguyên liệu chính, tăng giá trị dinh dưỡng, hài hòa lợi ích kinh tế nhưng vẫn đáp ứng được các điều kiện bảo quản, sử dụng sản phẩm trong thực tế là điều cần thiết.

Trên thế giới đã có những nghiên cứu về sự ảnh hưởng của một số loại dầu như dầu cọ, dầu dừa (Limbarido & ctv., 2017) đến nhiệt độ tan chảy của hỗn hợp bơ cacao và dầu dừa; sự ảnh hưởng của nguồn chất béo trong sôcôla (Timms, 1980; Full & ctv., 1996; Gabriele & ctv., 2008); ảnh hưởng của loại sữa bột (Liang & Hartel, 2004; Ačkar & ctv., 2015) hay tính chất của sôcôla đen/trắng và sôcôla sữa (Briggs & Wang, 2004; Afoakwa & ctv., 2008; Ardakani & ctv., 2014) cũng được nghiên cứu. Tuy nhiên, ở Việt Nam chưa có những nghiên cứu chuyên sâu nào được

công bố về sự hình thành trạng thái, tính chất lưu biến của hỗn hợp bột cacao/bơ cacao có nguồn gốc tại Việt Nam hay hỗn hợp của chúng khi có bổ sung dầu dừa hoặc sữa bột. Trong nghiên cứu này, dầu dừa được khảo sát thay thế bơ cacao do dầu dừa là một chất béo được sản xuất trong nước có sản lượng lớn. Bên cạnh đó, việc khảo sát bổ sung sữa bột thay thế một phần bột cacao giúp sản phẩm sôcôla tăng giá trị dinh dưỡng. Kết quả nghiên cứu sẽ làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để tối ưu các thành phần trong sản xuất sôcôla như lượng dầu dừa và sữa bột, việc hiểu được các tính chất đặc trưng của sôcôla mà từ đó nhà sản xuất tìm được qui trình sản xuất tạo sản phẩm tối ưu, phù hợp với từng vùng địa lý khác nhau cho các loại sản phẩm sôcôla đồng thời định hướng người tiêu dùng sử dụng, bao quản sản phẩm hợp lý hơn.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Vật liệu

Bột cacao, bơ ca cao là sản phẩm của Công ty TNHH Cacao Nam Trường Sơn, Đắklăk. Lô sản phẩm sử dụng được sản xuất ngày 16/01/2017 và có hạn sử dụng ngày 16/07/2018.

Dầu dừa được sản xuất ngày 13/03/2017 tại Công ty Cổ phần dầu thực vật Tường An và có hạn sử dụng ngày 13/03/2019. Sữa bột nguyên kem Dutch Lady (19% protein; 22,8% chất béo; 48,4% cacbonhydrat; 3,5% nước và 6,3% thành phần khác) của Công ty TNHH Friesland Campina, thuộc lô sản xuất ngày 03/10/2016 và có hạn sử dụng ngày 03/04/2018.

### 2.2. Chuẩn bị mẫu

Có 03 nhóm mẫu được khảo sát: Nhóm mẫu nguyên chất (M, gồm có bơ cacao và bột cacao); mẫu nghiên cứu ảnh hưởng của dầu dừa (MCO, cố định bột cacao 50%, 50% còn lại là chất béo bao gồm bơ cacao và dầu dừa); và mẫu nghiên cứu ảnh hưởng của sữa bột (MMP, cố định lượng bơ cacao 30%, 70% còn lại là bột cacao và sữa bột).

Chuẩn bị 100 g mỗi mẫu với tỉ lệ các thành phần theo Bảng 1. Khuấy trộn đều hỗn hợp, gia nhiệt ở  $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$  trong 15 phút và đồng hóa bằng thiết bị khuấy trộn Philips blender HR2115 (thực hiện 5 lần, mỗi lần 30 giây). Sau đó rót vào các ống nghiệm nắp kín (đường kính 1,5 cm, cao 12 cm), đặt trong bể ổn nhiệt TC-502 (Brookfield,

Hoa Kỳ) tại các nhiệt độ khác nhau để tiến hành quan sát trạng thái lỏng-rắn của từng mẫu.

**Bảng 1.** Tỷ lệ % khối lượng các thành phần trong hỗn hợp

| Bơ cacao/<br>bột cacao<br>(M) | Bơ cacao/<br>dầu dừa/<br>bột cacao<br>(MCO) | Bơ cacao/<br>bột cacao/<br>sữa bột<br>(MMP) |
|-------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 30/70                         | 50/0/50                                     | 30/65/5                                     |
| 40/60                         | 40/10/50                                    | 30/60/10                                    |
| 50/50                         | 30/20/50                                    | 30/50/20                                    |
| 60/40                         | 20/30/50                                    | 30/40/30                                    |
| 70/30                         | 10/40/50                                    | 30/30/40                                    |
| 80/20                         | 0/50/50                                     | 30/20/50                                    |
| -                             | -                                           | 30/10/60                                    |

Đối với việc xác định độ nhớt của hỗn hợp: Sau khi quan sát trạng thái, tiến hành đo độ nhớt các mẫu M, MCO, MMP ở nhiệt độ tan chảy ( $50^{\circ}\text{C}$ ) và nhiệt độ rót khuôn ( $31^{\circ}\text{C}$ ).

Đối với việc khảo sát sự thay đổi độ cứng cắt và độ cứng vỡ của mẫu M, MCO, MMP: Tiến hành rót khuôn (dài  $\times$  rộng =  $30 \times 20$  mm) hỗn hợp sau đồng hóa với độ dày 5 mm rồi giữ lạnh ở các nhiệt độ ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ) trong 15 giờ. Mẫu sau khi được ổn định trạng thái nhanh chóng được đo độ cứng vỡ/độ cứng cắt ở nhiệt độ phòng ổn định tại  $25^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu và xử lý số liệu

#### 2.3.1. Phương pháp quan sát

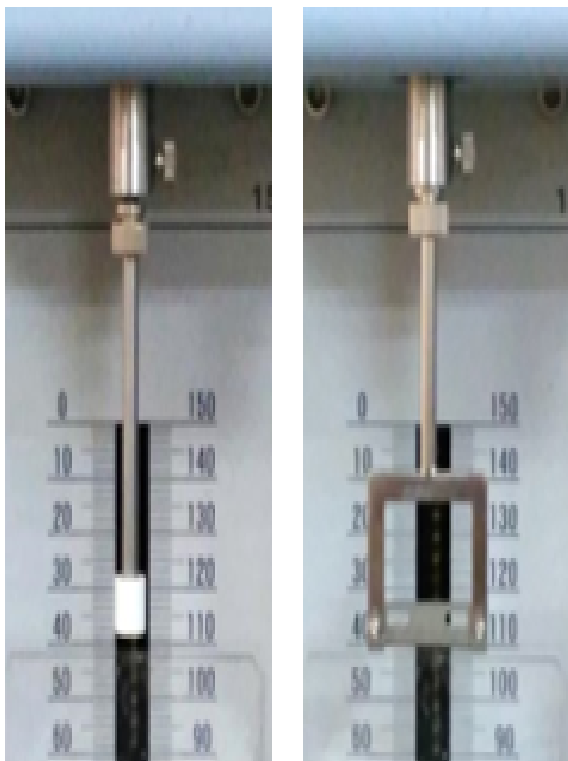
Hỗn hợp sau đồng hóa được rót vào trong ống nghiệm đầy kín nắp để tiến hành quan sát. Mẫu được đặt trong bể ổn nhiệt TC-502 (Brookfield, Hoa Kỳ) ở  $50^{\circ}\text{C}$ , sau đó tiến hành giảm dần nhiệt độ xuống  $5^{\circ}\text{C}$  theo từng nấc nhiệt độ ( $40^{\circ}\text{C}$ ,  $35^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $20^{\circ}\text{C}$ ,  $15^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ), tại mỗi nhiệt độ giữ nhiệt trong 45 phút để ổn định cấu trúc rồi quan sát. Lấy ống đựng mẫu ra và nghiêng ống nếu không thấy mẫu chảy thì coi đó là trạng thái đã kết tinh hóa rắn. Ghi nhận trạng thái, nhiệt độ hóa rắn kết tinh của hỗn hợp.

#### 2.3.2. Phương pháp phân tích lưu biến

Đo độ nhớt: Xác định bằng máy đo độ nhớt Brookfield Viscometer LVDV I – Prime (Hoa Kỳ). Mẫu lỏng sau khi được đồng hóa được rót vào ống chứa mẫu, đặt vào bể ổn nhiệt của máy

Brookfield tại nhiệt độ đo ( $50^{\circ}\text{C}$  hoặc  $31^{\circ}\text{C}$ ) trong 20 phút, khi nhiệt độ mẫu ổn định tiến hành đo mẫu với các đầu đo thích hợp (số 63 hoặc 64) ở tốc độ đo 100 vòng/phút.

**Đo độ cứng:** Độ cứng vỡ (Fracturability) và độ cứng cắt (Hardness) là lực mà khi nén ép tại đó làm cho mẫu rắn bị vỡ ra hay lực lớn nhất cần thiết để cắt đứt mẫu rắn (Mochizuki, 2001). Độ cứng vỡ và độ cứng cắt của mẫu rắn ( $30 \times 20 \text{ mm}$ ) có chiều dày 5 mm được xác định bằng thiết bị đo lưu biến Sun Scientific Rheometer CR-500DX (Nhật Bản) với các đầu đo tương ứng là đầu đo số 3 (đường kính 10 mm, xem Hình 1 (trái)) và đầu đo số 10 (dạng phẳng, xem Hình 1 (phải)). Mẫu sau khi được giữ để cố định cấu trúc ở 5, 10 hay  $20^{\circ}$  (15 giờ) sẽ được đem đo nhanh tại nhiệt độ phòng bằng chế độ nén (compression test) có tốc độ di chuyển của đầu đo khi nén là 1 mm/giây.



**Hình 1.** Đầu đo số 3 (trái) và số 10 (phải).

### 2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện 3 lần, kết quả thu được là giá trị trung bình của các lần đo. Xử lý số liệu và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Origin 8.5.1 (bản quyền được cung cấp bởi phòng thí nghiệm PCI thuộc viện IMMM, Cộng hòa Pháp).

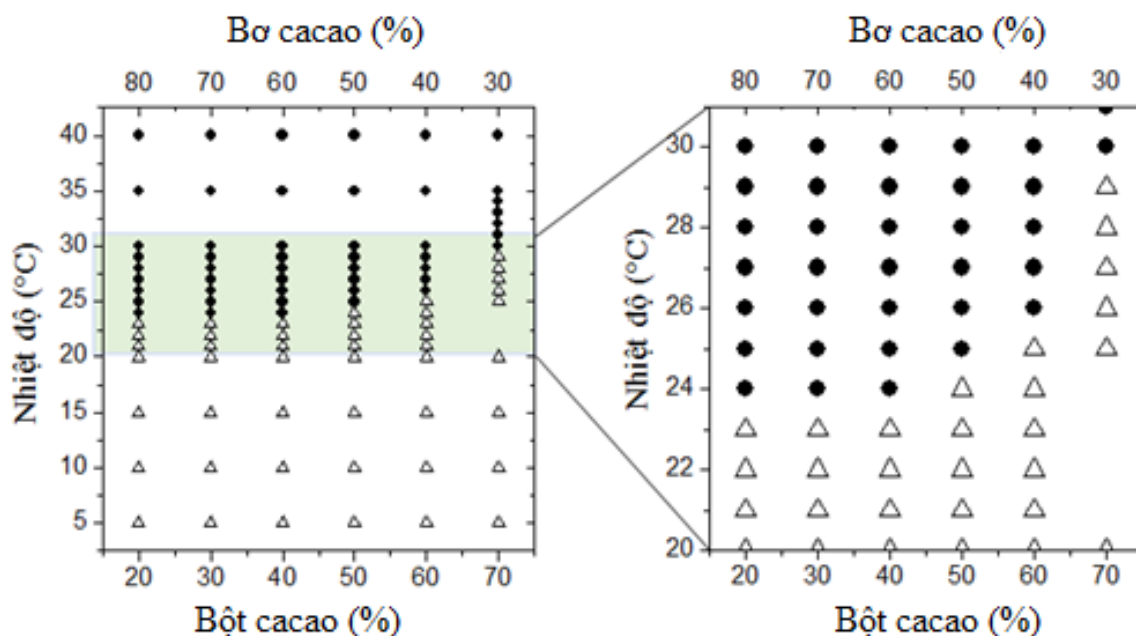
## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ bơ cacao/bột cacao đến trạng thái, độ nhớt và độ cứng của hỗn hợp

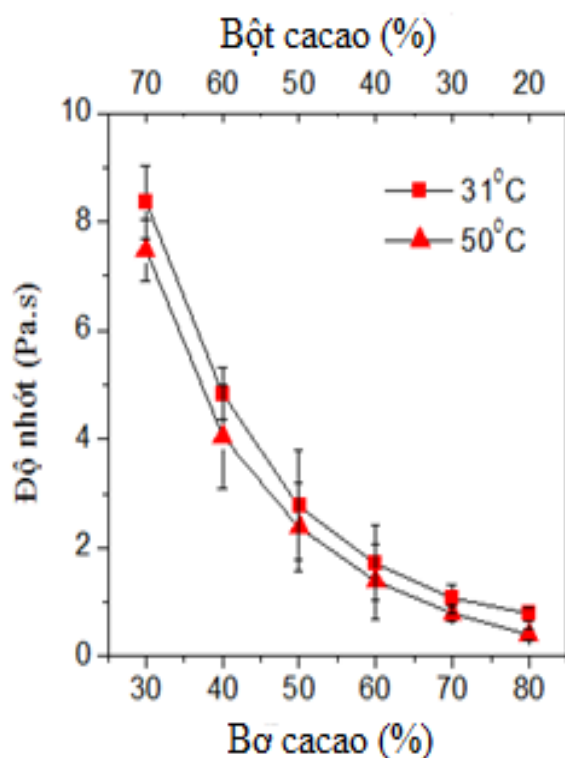
Trạng thái của hỗn hợp bơ cacao và bột cacao (M) với các tỷ lệ khác nhau tại các nhiệt độ được biểu diễn ở Hình 2. Sự kết tinh hóa rắn của hỗn hợp được quyết định bởi sự có mặt của bơ cacao (Limbarido & ctv., 2017), nhiệt độ kết tinh có xu hướng tăng dần với các mẫu có tỷ lệ bơ cacao thấp ( $\leq 50\%$ ), khoảng từ  $24^{\circ}\text{C}$  đến  $29^{\circ}\text{C}$ . Hỗn hợp (M) khi đồng hóa sẽ xảy ra hiện tượng bơ cacao tan chảy và bao phủ ngoài các hạt bột cacao. Vì vậy khi hàm lượng bơ cacao càng thấp thì lớp áo phủ ngoài các hạt bột cacao càng mỏng và chúng nhanh chóng kết tinh và sớm hình thành các tương tác giữa các hạt bột cacao (Glicerina & ctv., 2016) khi nhiệt độ giảm. Hàm lượng bột cacao dưới 50% thì nhiệt độ kết tinh của hỗn hợp ổn định ở  $23^{\circ}\text{C}$  do tại những tỷ lệ này lượng bơ cacao đã bao phủ kín và bão hòa nên nhiệt độ kết tinh chỉ phụ thuộc vào sự có mặt của chất béo (bơ cacao) mà không phụ thuộc vào các hạt bột cacao nữa.

Độ nhớt của mẫu có tỷ lệ bơ cacao/bột cacao khác nhau ở  $50^{\circ}\text{C}$  và  $31^{\circ}\text{C}$  được trình bày tại Hình 3. Khi tăng tỷ lệ bơ cacao thì độ nhớt giảm, điều này là do bột cacao được bao phủ bởi lớp bơ cacao càng nhiều và chúng phân tán trong pha chất béo do đó giảm khả năng kháng dòng chảy, hỗn hợp sẽ lỏng hơn và độ nhớt giảm (Chevalley, 1975; Afoakwa & ctv., 2009; Glicerina & ctv., 2016). Đồng thời, theo quan hệ giữa độ nhớt và nhiệt độ của Arrhenius thì nhiệt độ càng tăng độ nhớt càng giảm (Gao & ctv., 2015), do đó độ nhớt của hỗn hợp ở nhiệt độ  $31^{\circ}\text{C}$  cao hơn so với ở nhiệt độ  $50^{\circ}\text{C}$ . Mặt khác, theo thuyết chuyển động nhiệt Brown, nhiệt độ càng tăng thì động năng các phân tử càng lớn và vận tốc chuyển động của phân tử càng cao. Vì vậy, ở  $31^{\circ}\text{C}$  động năng của các phân tử trong hỗn hợp thấp hơn, tốc độ chảy chậm hơn và độ nhớt trung bình cao hơn so với hỗn hợp ở  $50^{\circ}\text{C}$ , tuy nhiên sự khác biệt giá trị độ nhớt giữa hai nhiệt độ này không có ý nghĩa thống kê (kiểm định giá trị trung bình hai mẫu độc lập T-test trong mềm SPSS, phiên bản 17.0).

Hình 4a và 4b biểu diễn độ cứng cắt và độ cứng vỡ của mẫu có chiều dày 5 mm với tỷ lệ các thành phần khác nhau tại nhiệt độ làm lạnh  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $10^{\circ}\text{C}$  và  $20^{\circ}\text{C}$ . Độ cứng cắt và độ cứng vỡ giảm khi tăng



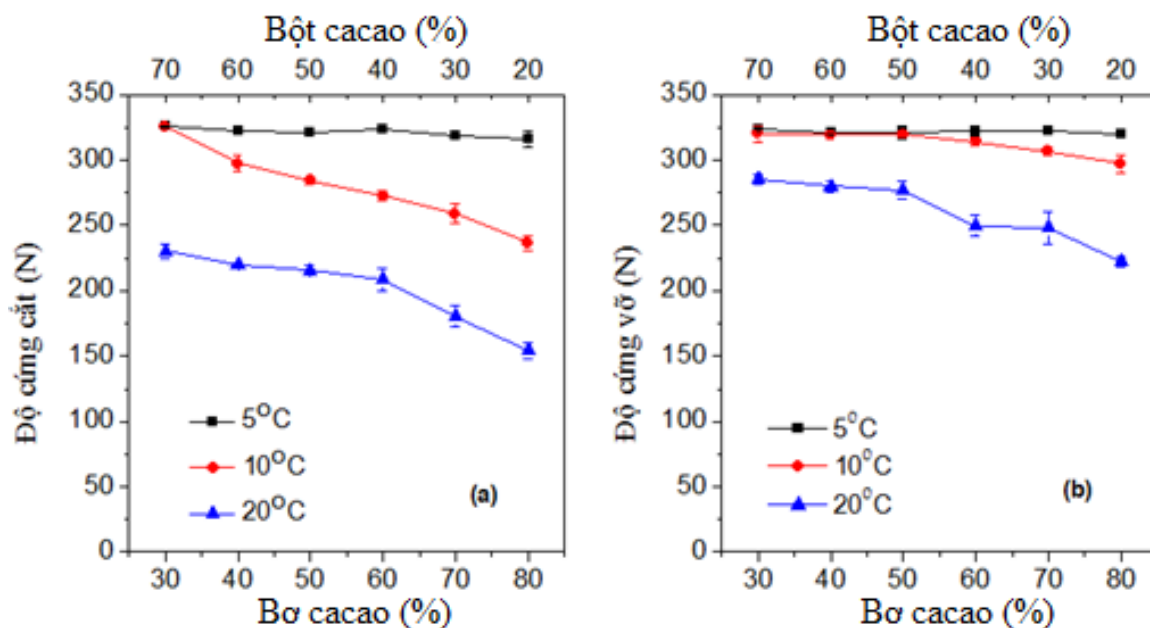
Hình 2. Trạng thái lỏng (●) – rắn (Δ) của hỗn hợp bơ cacao/bột cacao theo nhiệt độ.



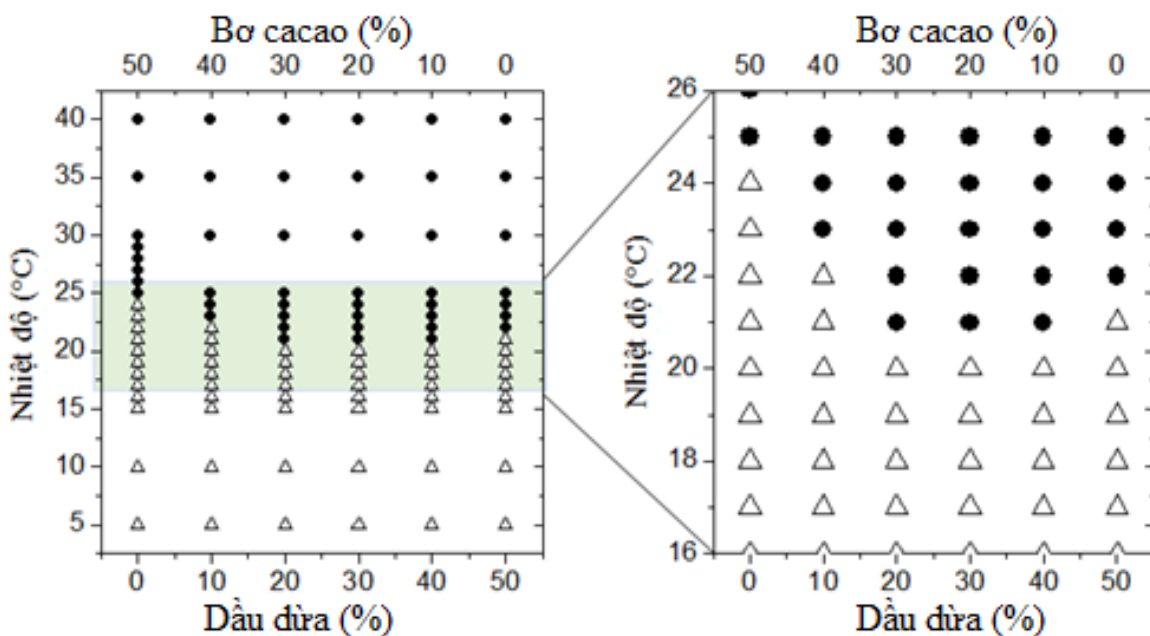
Hình 3. Ảnh hưởng của lệ bơ cacao/bột cacao đến độ nhớt.

tỷ lệ bơ cacao trong khối mẫu hay tăng nhiệt độ làm lạnh. Hỗn hợp có tỷ lệ bơ cacao lớn, bơ sẽ bao phủ bột cacao nhiều hơn, tương tác giữa các hạt cacao với nhau sẽ giảm (Glicerina & ctv., 2016) nên khi đưa ra môi trường không khí bên ngoài hỗn hợp sẽ nhanh tan chảy hơn, có độ cứng khi đo lực cắt và lực ép vỡ thấp hơn các mẫu có tỷ lệ bơ cacao thấp hơn.

Từ kết quả thể hiện trên Hình 4, mẫu được kết tinh ở nhiệt độ càng thấp thì cần lực phá vỡ cấu trúc càng lớn. Tại nhiệt độ làm lạnh 10°C và 20°C, độ cứng cắt và độ cứng vỡ của mẫu phụ thuộc vào tỷ lệ các thành phần phối trộn: độ cứng cắt giảm mạnh khi hàm lượng bơ cacao lớn hơn 60% và độ cứng vỡ giảm mạnh khi hàm lượng bơ cacao lớn hơn 50%. Tuy nhiên ở 5°C, độ cứng ít thay đổi khi thay đổi tỷ lệ các thành phần, điều này chứng tỏ khi nhiệt độ càng thấp thì bơ cacao càng nhanh kết tinh, các mầm tinh thể xuất hiện nhanh hơn và nhiều hơn tạo khối ổn định và vững chắc (Awad & Marangoni, 2006). Ở nhiệt độ cao hơn, ảnh hưởng của tỷ lệ các thành phần rõ ràng hơn đặc biệt tại 20°C, các tinh thể kết tinh nhỏ hơn có năng lượng tự do thấp hơn nên có sự dịch chuyển về hướng có tinh thể kết tinh lớn hơn (Awad & Marangoni, 2006), vì vậy lực cắt giảm và độ cứng vỡ thấp vì khi đó mật độ tinh thể chất béo giảm, các không gian mỡ sẽ



Hình 4. Độ cứng - cắt (a) và độ cứng - vỡ (b) của mẫu (M) dày 5 mm.



Hình 5. Trạng thái lỏng (●) – rắn (Δ) của hỗn hợp bơ cacao/bột cacao có bổ sung dầu dừa.

được điền đầy bởi bơ cacao nên mẫu dễ bị làm mềm khi tăng nhiệt độ (Afoakwa & ctv., 2009). Đồng thời như giải thích trên thì ảnh hưởng của mật độ bột cacao đóng vai trò quan trọng, nên khi tăng hàm lượng bơ cacao tương tác giữa các hạt

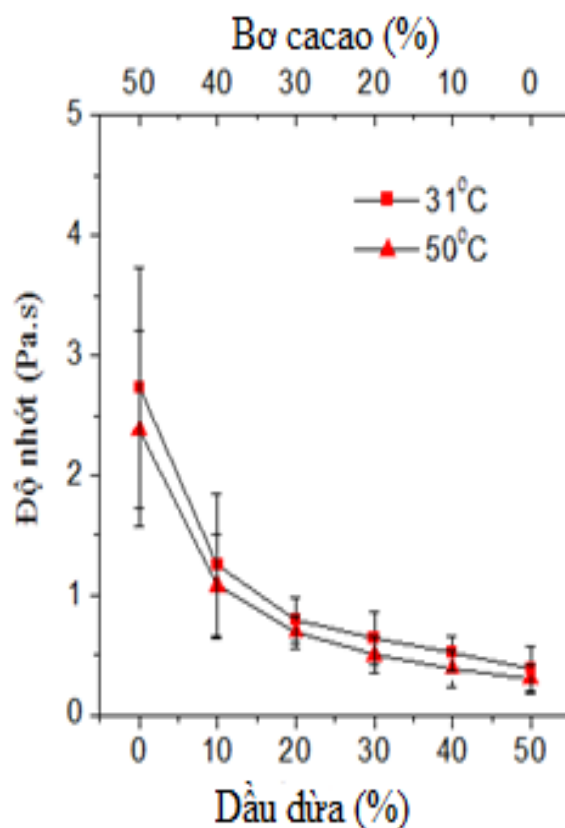
bột cacao với nhau sẽ yếu đi (Glicerina & ctv., 2016) dẫn đến độ cứng cắt và độ cứng vỡ giảm. Sự ảnh hưởng của chiều dày mẫu cũng được khảo sát và kết quả cho thấy với chiều dày 10 mm, ảnh hưởng của tỷ lệ các thành phần, nhiệt độ cũng có

xu hướng biến đổi tương tự như mẫu có chiều dày 5 mm (kết quả không được trình bày).

### 3.2. Ảnh hưởng của dầu dừa đến trạng thái, độ nhớt và độ cứng của hỗn hợp

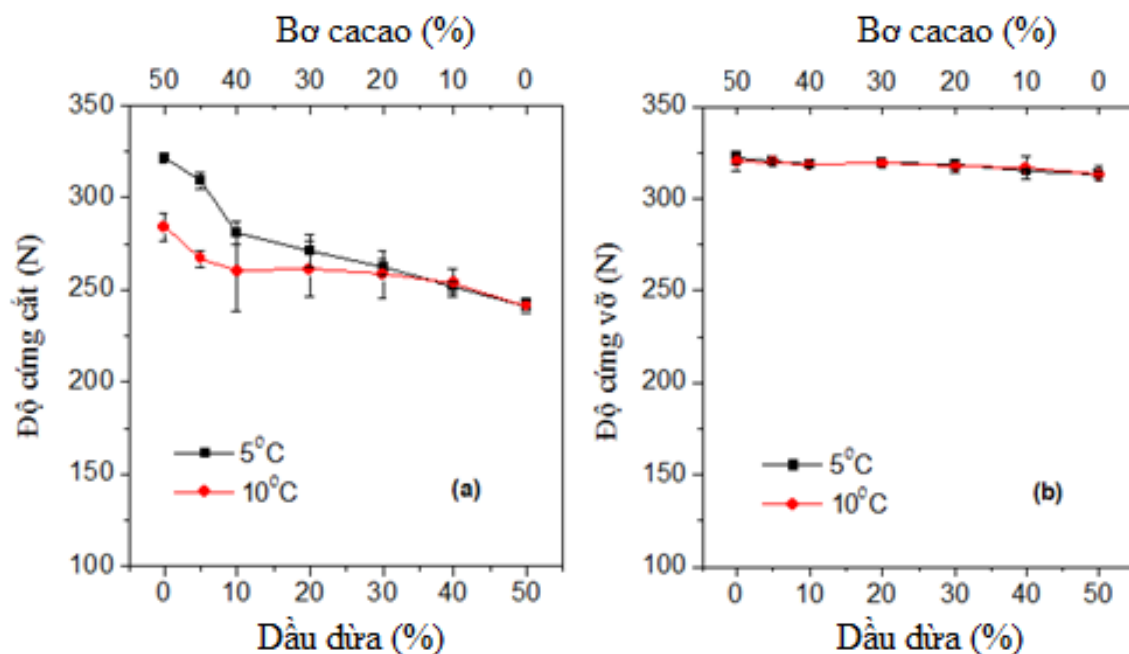
Trạng thái của mẫu (MCO) có chứa dầu dừa thay thế một phần bơ cacao tại các nhiệt độ được thể hiện ở Hình 5. Khi thay thế bơ cacao bằng dầu dừa từ 0 - 100% tổng lượng chất béo trong hỗn hợp (50%), nhiệt độ kết tinh hóa rắn giảm dần từ 24°C đến 20°C và ổn định ở nhiệt độ này khi tăng tỷ lệ dầu dừa hơn 20% khối lượng hỗn hợp.

Điều này có thể được giải thích dựa trên hiệu ứng "eutecti". Hỗn hợp "eutecti" được định nghĩa là một hỗn hợp của hai hoặc nhiều thành phần thường không tương tác để tạo thành một hỗn hợp mới, nhưng theo một tỷ lệ nào đó, ức chế quá trình kết tinh của nhau dẫn đến một hệ có điểm nóng chảy thấp hơn một trong hai thành phần (Gala & ctv., 2013). Mặc dù hai thành phần bơ cacao và dầu dừa có tính chất tương tự nhưng khi phối trộn với nhau chúng không tương thích (Afoakwa & ctv., 2007) đã tạo nên một hỗn hợp "eutecti" làm nhiệt độ kết tinh giảm xuống so với hỗn hợp chỉ có bơ cacao. Chất béo bão hòa trong hỗn hợp sẽ quyết định đến nhiệt độ tan chảy, hay kết tinh của hỗn hợp, tỷ lệ axit béo bão hòa càng lớn thì nhiệt độ chuyển trạng thái càng cao và ngược lại (Limbarido & ctv., 2017). Vì vậy khi thay thế bơ cacao bằng dầu dừa, axit béo không bão hòa tăng lên dẫn đến nhiệt độ chuyển trạng thái giảm dần. Khi ở trạng thái lỏng tại nhiệt độ 31°C hay 50°C, độ nhớt của các hỗn hợp giảm mạnh khi thay thế bơ cacao bằng dầu dừa dưới 20% tổng lượng chất béo, sau đó có xu hướng giảm ít hơn khi tỷ lệ dầu dừa thay thế tăng lên (Hình 6). Sức căng bề mặt của dầu dừa là 33,6 mN/m (25°C) cao hơn của bơ cacao là 14,2 mN/m (Rodrigo & ctv., 2005), nên khi sức căng bề mặt càng lớn thì khả năng bao phủ bề mặt hạt cacao càng kém, dẫn đến khả năng bao phủ để làm bền hệ của dầu dừa kém hơn bơ cacao (giảm khả năng tương tác giữa các hạt bơ cacao). Do đó cấu trúc hỗn hợp hình thành lỏng lẻo, mất khả năng kháng dòng chảy nên độ nhớt giảm. Tương tự như mẫu (M), kết quả cũng cho thấy rằng độ nhớt của hỗn hợp (MCO) ở nhiệt độ 31°C cao hơn so với độ nhớt ở nhiệt độ 50°C, tuy nhiên không có sự khác biệt lớn do tại những nhiệt độ này tinh thể chất béo hình thành những dạng cấu trúc chung.

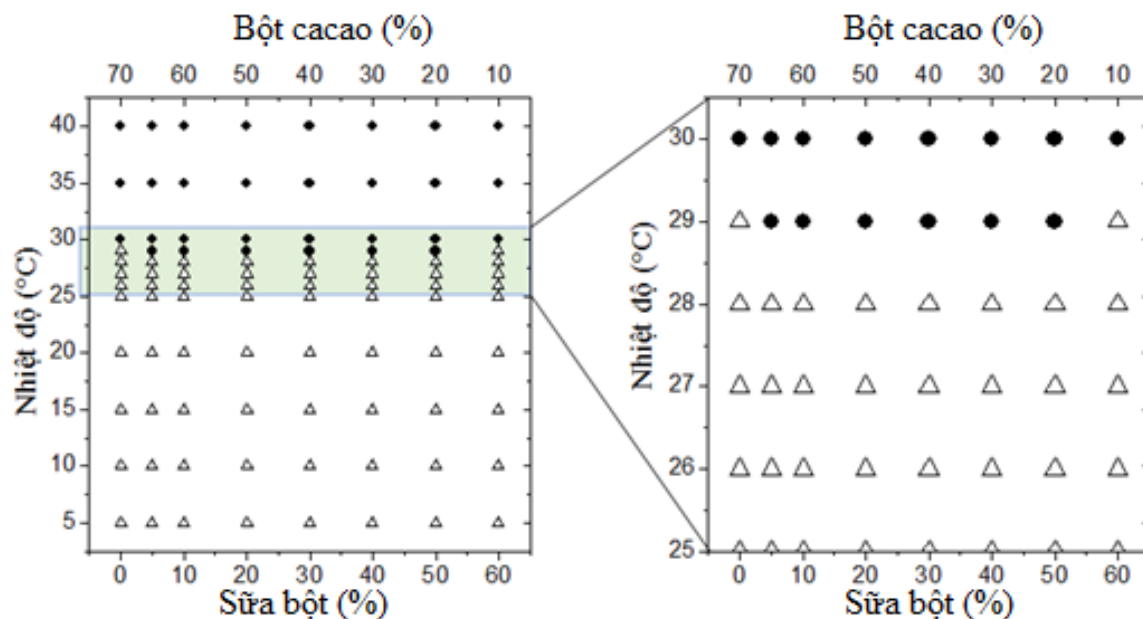


**Hình 6.** Ảnh hưởng của tỷ lệ bơ cacao/bột cacao/dầu dừa đến độ nhớt.

Trong khi đó, ở trạng thái rắn sự nóng chảy, độ cứng của hỗn hợp mẫu (MCO) có sự phụ thuộc đáng kể của dầu dừa. Tại 5°C, mẫu có độ cứng cắt giảm từ 324 N (mẫu không có dầu dừa) xuống 230 N khi thay hoàn toàn bơ cacao bằng dầu dừa (mẫu 50% dầu dừa) (Hình 7a). Tương tự, sự thay đổi ảnh hưởng của dầu dừa đến độ cứng cắt cũng ít hơn tại 10°C, sự khác biệt giữa hai nhiệt độ này chủ yếu xảy ra tại những hỗn hợp có tỷ lệ bơ cacao cao hơn dầu dừa. Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do ảnh hưởng đồng thời của nhiệt độ cũng như tương tác giữa các hạt cacao (Do & ctv., 2007). Ở nhiệt độ thấp hơn, lúc này mạng lưới cấu trúc vững chắc được hình thành làm tăng lực khi cắt. Tuy nhiên khi tỷ lệ chất béo (dầu dừa) tăng thì khả năng bao phủ hạt cacao kém hơn do sức căng bề mặt thấp làm ảnh hưởng đến tương tác giữa các hạt cacao. Trong trường hợp này do lượng chất béo đủ lớn (50%) làm cho các hạt cacao bị phân tán trong lớp chất béo kết tinh hóa rắn, điều này lý giải tại sao không có sự khác biệt về độ cứng khi ép nén khi thay thế bơ



Hình 7. Độ cứng - cắt (a) và độ cứng - vỡ (b) của mẫu (MCO) dày 5 mm.



Hình 8. Trạng thái lỏng (●) – rắn (Δ) của hỗn hợp bơ cacao/bột cacao có bổ sung sữa bột.

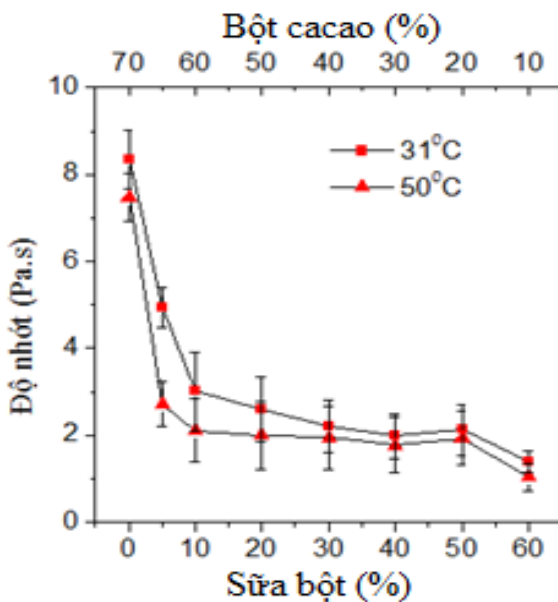
cacao bằng dầu dừa là do chúng đã hóa rắn hoàn toàn tại nhiệt độ 5°C và 10°C (Hình 7a,b).

Ảnh hưởng của chiều dày mẫu cũng được khảo sát và kết quả cho thấy với chiều dày 10 mm, ảnh

hưởng của tỷ lệ các thành phần chất béo, nhiệt độ cũng có xu hướng biến đổi tương tự như mẫu có chiều dày 5 mm (kết quả không được trình bày).

### 3.3. Ảnh hưởng của sữa bột đến trạng thái, độ nhớt và độ cứng của hỗn hợp

Kết quả khảo sát trạng thái mẫu (MMP) cố định 30% bơ cacao và 70% còn lại thay đổi tỷ lệ giữa bột cacao và sữa bột theo nhiệt độ được thể hiện trong Hình 8. Nhiệt độ kết tinh hóa rắn của các mẫu thêm sữa bột (28°C) thấp hơn mẫu (M) (29°C) do tạo thành hỗn hợp "eutectic" làm giảm nhiệt độ kết tinh (Awad & Marangoni, 2006) vì khi bổ sung sữa sẽ làm tăng lượng chất béo trong hỗn hợp, chất béo trong sữa không chỉ bảo vệ sự kết tinh của cacao mà còn là tác nhân gây ra sự chuyển đổi cấu trúc dạng V sang dạng VI của bơ cacao, do đó nó làm thay đổi nhiệt độ kết tinh hóa rắn hay tan chảy của hỗn hợp (Rios & ctv., 2014).



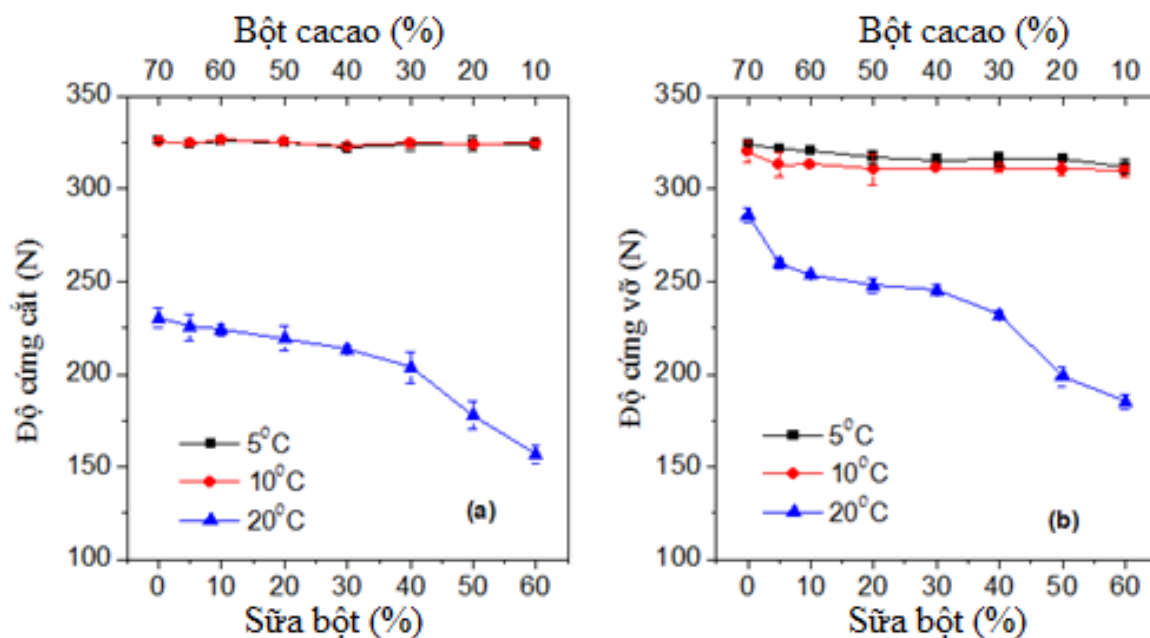
**Hình 9.** Ảnh hưởng của tỷ lệ bơ cacao/bột cacao/sữa bột đến độ nhớt.

Khi phối trộn sữa bột vào hỗn hợp bơ cacao/bột cacao, sữa bột sẽ tương tác với bơ cacao tạo nên một hỗn hợp chất béo không tương thích hoàn toàn (Chevalley, 1975), hàm lượng chất béo tăng và xảy ra hiệu ứng "eutectic", hình thành một hệ có điểm nóng chảy thấp. Sữa bột bổ sung sẽ làm giảm mạnh độ nhớt hỗn hợp khi hàm lượng sữa bột thêm vào khoảng 10% và dần ổn định khi hàm lượng sữa bột tăng lên (Hình 9). Theo Glicerina & ctv., (2016), khi thêm sữa thì hàm lượng chất béo tăng sẽ tăng sự tương tác chất béo – chất béo và làm giảm các thông số lưu biến

như độ nhớt, độ cứng (Chevalley, 1975; Awad & Marangoni, 2006; Glicerina & ctv., 2016). Hàm lượng sữa bột tăng đồng nghĩa với hàm lượng chất béo tổng số của hỗn hợp tăng trong khi hàm lượng bơ cacao không đổi, dẫn đến lượng chất béo tổng để bao phủ các hạt cacao và sữa tăng, do đó khả năng chống lại dòng chảy giảm - đó là lý do làm cho độ nhớt của hỗn hợp giảm (Glicerina & ctv., 2016). Mặt khác, do kích thước sữa bột lớn hơn hạt bột cacao, khi đó diện tích bề mặt tiếp xúc giữa các hạt với phần tử chất béo giảm xuống làm độ nhớt giảm (Sokmen & Gunes, 2006). Từ đó dẫn đến độ nhớt của hỗn hợp (MMP) giảm một cách rõ rệt, càng bổ sung sữa bột thì độ nhớt càng giảm. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Ardakani & ctv. (2014) đã tìm hiểu về dòng chảy mao dẫn của sôcôla sữa. Ardakani đã cho thấy rằng có sự giảm dần độ nhớt ở nhiệt độ 30°C. Sự giảm dần độ nhớt của sôcôla sữa có thể được giải thích bởi sự gia tăng hàm lượng chất béo do một phần tan chảy của bơ cacao (Ardakani & ctv., 2014). Tương tự hai mẫu (M) và (MCO), độ nhớt mẫu (MMP) cũng bị tác động bởi nhiệt độ. Theo Briggs & ctv. (2014) độ nhớt tăng lên đáng kể ở 31°C vì sự hình thành của cấu trúc tinh thể trong quá trình tạo mầm kết tinh (tempering).

Kết quả đo cho thấy độ cứng cắt và vỡ của mẫu dày 5 mm làm lạnh ở 5°C và 10°C tương đương nhau (Hình 10a,b). Mẫu dày 10 mm cũng được nghiên cứu tương tự, tuy nhiên mẫu này làm lạnh ở 5°C và 10°C đều không thể thực hiện được phép đo độ vỡ vì mẫu quá cứng, lực sử dụng trong quá trình đo không đủ để phá vỡ khối mẫu (kết quả không được trình bày). Khi nhiệt độ làm lạnh hỗn hợp ở 20°C, ảnh hưởng của sữa bột tỷ lệ nghịch với độ cứng của mẫu.

Ở 20°C, độ cứng của mẫu giảm khi tăng tỷ lệ sữa bột thay thế bột cacao. Điều này được lý giải là do tỷ lệ chất béo tăng lên bởi lượng chất béo từ sữa bổ sung, đồng thời tỷ lệ các hạt chất rắn giảm đi, dẫn đến các tương tác giữa các chất rắn với nhau yếu đi, khả năng chảy của chất béo tăng lên ở nhiệt độ cao (Glicerina & ctv., 2016). Cũng theo Glicerina & ctv. (2016), khi tăng tỷ lệ sữa cũng có nghĩa là giảm lượng năng lượng cần thiết để bắt đầu quá trình chảy của chất béo tại một nhiệt độ đủ lớn. Lúc này cấu trúc của hỗn hợp sẽ lỏng lẻo hơn khi mà lượng sữa bột thay thế bột cacao càng tăng. Ngoài ra, hiệu ứng "eutectic" giữa các chất béo của sữa và bơ cacao cũng là nguyên nhân làm mềm mẫu rắn, độ cứng kém hơn so với mẫu không bổ sung sữa bột.



Hình 10. Độ cứng - cắt (a) và độ cứng - vỡ (b) của mẫu (MMP) dày 5 mm.

#### 4. Kết Luận

Hỗn hợp bột cacao và bơ cacao có nhiệt độ kết tinh hóa rắn giảm từ 24°C xuống 20°C khi tăng tỷ lệ dầu dừa thay thế bơ cacao, đặc biệt xảy ra điểm "eutectic" giữa hai chất béo bơ cacao/dầu dừa làm nhiệt độ kết tinh thấp hơn khi thay thế trên 10% bơ cacao bằng dầu dừa. Đồng thời hỗn hợp có độ nhớt và độ cứng giảm, sản phẩm có kết cấu mềm mại hơn so với mẫu không bổ sung dầu dừa.

Khi bổ sung sữa bột để thay thế bột cacao, sự kết hợp chất béo của sữa bột và bơ cacao làm nhiệt độ kết tinh giảm nhẹ so với mẫu không có sữa bột. Ở trạng thái lỏng, hỗn hợp có độ nhớt thấp hơn. Độ cứng của khối mẫu bổ sung sữa bột cũng giảm đi, nếu thay thế quá nhiều bột cacao bằng sữa bột sẽ làm cấu trúc của sôcôla không chặt chẽ, khi cắt hoặc làm vỡ xuất hiện nhiều vụn nhỏ do chất rắn không được áo ngoài tốt bởi bơ cacao.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Aćkar, D., Škrabal, S., Šubarić, D., Babić, J., Miličević, B., & Jozinović, A. (2015). Rheological properties of milk chocolates as influenced by milk powder type, emulsifier, and cocoa butter equivalent additions. *International Journal of Food Properties* 18(7), 1568-1574.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends in Food Science and Technology* 18(6), 290-298.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2009). Microstructure and mechanical properties related to particle size distribution and composition in dark chocolate. *International Journal of Food Science and Technology* 44, 111-119.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., & Vieira, J. (2008). Characterization of melting properties in dark chocolates from varying particle size distribution and composition using differential scanning calorimetry. *Food Research International* 41(7), 751-757.
- Ardakani, H. A., Mitsoulis, E., & Hatzikiriakos, S. G. (2014). Capillary flow of milk chocolate. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* 210, 56-65.
- Awad, T. S., & Marangoni, A. G. (2006). Ingredient Interactions Affecting Texture and Microstructure of Confectionery Chocolate. In Gaonkar, A. G., & McPherson, A. (2<sup>nd</sup> ed., 423-476). *Ingredient interactions: Effects on Food Quality*. Florida, America: CRC Press.
- Briggs, J. L., & Wang, T. (2004). Influence of shearing and time on the rheological properties of milk chocolate during tempering. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81(2), 117-121.
- Chevalley, J. (1975). Rheology of chocolate. *Journal of Texture Studies* 6, 177-196.

- Do, T. A. L., Hargreaves, J. M., Wolf, B., Hort, J., & Mitchell, J. R. (2007). Impact of particle size distribution on rheological and textural properties of chocolate models with reduced fat content. *Journal of Food Science* 72(9), E541-E552.
- Full, N. A., Reddy, S. Y., Dimick, P. S., & Ziegler, G. R. (1996). Physical and sensory properties of milk chocolate formulated with anhydrous milk fat fractions. *Journal of Food Science* 61(5), 1068-1073.
- Gabriele, D., Migliori, M., Baldino, N., & De Cindio, B. (2008). Influence of fat content on chocolate rheology. *AIP Conference Proceedings* 1027. Maryland, America: American Institute of Physics.
- Gala, U., Pham, H., & Harsh, C. (2013). Pharmaceutical applications of eutectic mixtures. *Journal of Developing Drugs* 2(3), e130. doi:10.4172/2329-6631.1000e130.
- Gao, X., Guo, T., Han, F., Tian, Y., & Zhang, Z. (2015). Rheological and sensory properties of four kinds of dark chocolates. *American Journal of Analytical Chemistry* 6(13), 1010-1018.
- Glicerina, V., Balestra, F., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2016). Microstructural and rheological characteristics of dark, milk and white chocolate: A comparative study. *Journal of Food Engineering* 169, 165-171.
- Mochizuki, Y. (2001). Texture Profile Analysis. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 00(1), H2.3.1-H2.3.7.
- Liang, B., & Hartel, R. W. (2004). Effects of milk powders in milk chocolate. *Journal of Dairy Science* 87(1), 20-31.
- Limbarido, R. P., Santoso, H., & Witono, J. R. (2017). The effect of coconut oil and palm oil as substituted oils to cocoa butter on chocolate bar texture and melting point. *AIP Conference Proceedings* 1840 (060001-1-060001-12). Maryland, America: American Institute of Physics.
- Rios, R. V., Pessanha, M. D. F., Almeida, P. F. de, Viana, C. L., & Lannes, S. C. da S. (2014). Application of fats in some food products. *Food Science and Technology (Campinas)* 34(1), 3-15.
- Rodrigo, B., Anikumar, G. G., Antonio, B., Ignacio, G. L., David, P., & Manuel M. (2005). Production of cocoa butter microcapsules using an electrospray process. *Journal of Food Science* 70(8), 492-497.
- Sokmen, A., & Gunes, G. (2006). Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate. *LWT - Food Science and Technology* 39(10), 1053-1058.
- Timms, R. E. (1980). The phase behaviour of mixtures of cocoa butter and milk fat. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 13(2), 61-65.

## Production of sprouted garlic powder

Thanh T. Le<sup>1\*</sup>, Phong N. Le<sup>2</sup>, Phuoc H. Le<sup>2</sup>, Tri M. T. Le<sup>2</sup>, & Trang T. T. Nguyen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Food Science and Technology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Food Science and Technology, Nong Lam University, Ninh Thuan, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: November 02, 2018

Revised: February 26, 2019

Accepted: March 05, 2019

#### Keywords

*Colletotrichum gloeosporioides*

Garlic powder

Heat-pump drying

Sprouted garlic

#### \*Corresponding author

Le Thi Thanh

Email: lethanh@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

Sprouting garlic is considered as a high phytochemical product that exerts health benefit. This study aimed to develop sprouting garlic powder from Phan Rang garlic. Three sprouting methods, including growing in the soil, water immersion under ambient temperature and incubating at 10°C were investigated. The results showed that sprouting on the soil was the best method, characterizing sprouting garlic with the sprouting length of 39.6 mm, total soluble solids of 17.1°Bx, total acidity of 0.56%, moisture content 74.51%, and recovery rate 28.2%. The inhibitory ability against *Colletotrichum gloeosporioides* of fresh garlic sprouted in the soil had been evaluated. The results showed that the extract at the concentration of 5.5% was the most effective, indicated by completely inhibiting *Colletotrichum gloeosporioides*. To produce sprouted garlic powder, three drying methods, including heat-pump drying, air drying and freeze-drying, were examined. The freeze-drying method was the most appropriate method to produce sprouted garlic powder with high nutritional value and the least changes of physicochemical properties. The powder obtained from this method showed a high inhibitory ability against *Colletotrichum gloeosporioides* (88% and 100% inhibition at 1.5 and 2% sprouted garlic, respectively)

**Cited as:** Le, T. T., Le, P. N., Le, P. H., Le, T. T. M., & Nguyen, T. T. T. (2019). Production of sprouted garlic powder. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 81-89.

## Nghiên cứu quy trình chế biến bột mầm tỏi từ tỏi Phan Rang

Lê Thị Thanh<sup>1\*</sup>, Lê Nhã Phong<sup>2</sup>, Lê Hồng Phước<sup>2</sup>,  
Lê Trần Minh Trí<sup>2</sup> & Nguyễn Thị Thanh Trang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Khoa Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, Ninh Thuận

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 02/11/2018

Ngày chỉnh sửa: 26/02/2019

Ngày chấp nhận: 05/03/2019

#### Từ khóa

*Colletotrichum gloeosporioides*

Bột tỏi

Mầm tỏi

Sấy bơm nhiệt

#### \*Tác giả liên hệ

Lê Thị Thanh

Email: lethanh@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm đa dạng hóa sản phẩm và nâng cao giá trị sử dụng của tỏi Phan Rang. Đầu tiên, ba phương pháp làm mầm tỏi là trồng trên đất, ngâm nước và ủ ở nhiệt độ 10<sup>0</sup>C đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy phương pháp trồng trên đất tốt hơn hai phương pháp còn lại với chiều dài mầm tỏi 39,6 ± 2,4 mm, tổng hàm lượng chất rắn hòa tan 17,1 ± 0,8<sup>0</sup>Bx, axit tổng 0,56 ± 0,06%, ẩm độ 74,51 ± 3,51% và tỉ lệ thu hồi mầm đạt 28,2 ± 1,1%. Tiếp theo, hiệu lực kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của mầm tỏi tươi trong điều kiện in vitro đã được khảo sát; kết quả cho thấy chiết xuất tỏi tươi nảy mầm ở nồng độ 5,5% ức chế hoàn toàn nấm *C. gloeosporioides*. Để tạo bột mầm tỏi, ba phương pháp sấy là bơm nhiệt, sấy nóng và sấy thăng hoa đã được khảo sát; kết quả cho thấy sấy thăng hoa là phương pháp thích hợp nhất, tạo sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao hơn, thành phần hóa lý trong tỏi nảy mầm giảm ít nhất trong ba phương pháp sấy. Cuối cùng, việc đánh giá hiệu lực kháng nấm *C. gloeosporioides* của bột mầm tỏi cho thấy nồng độ bột mầm tỏi 1,5% trở lên có khả năng kháng nấm cao với tỉ lệ là 88%, từ nồng độ 2% trở lên kháng nấm 100%.

### 1. Đặt Vấn Đề

Tỏi là một trong những loại cây vừa làm gia vị vừa làm vị thuốc. Tỏi cùng với ớt và hạt tiêu giữ vai trò chính trong mặt hàng gia vị xuất khẩu của Việt Nam. Theo Hiệp hội rau hoa quả Việt Nam, hàng năm, tổng sản lượng tỏi xuất khẩu của cả nước khoảng 2000 tấn/năm, chủ yếu từ các vùng trồng tỏi nổi tiếng là Lý Sơn – Quảng Ngãi, Ninh Hải – Ninh Thuận, Hải Dương, Vĩnh Phúc và Bắc Ninh. Trong đó tỏi Phan Rang trồng ở Ninh Hải – Ninh Thuận nổi tiếng được nhiều người biết đến, với hương vị thơm cay nồng vô cùng đặc trưng hơn so với các nơi trồng khác.

Với khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa ở Việt Nam, độ ẩm không khí cao là điều kiện cho tỏi dễ mọc mầm. Không giống như khoai tây khi nảy mầm sẽ sinh ra độc tố, tỏi khi nảy mầm sẽ gia tăng một số hợp chất có lợi cho sức khỏe con người. Theo Zakarova & ctv. (2014), tỏi đã mọc mầm năm ngày có hoạt tính chống oxy hóa mạnh và hàm

lượng allicin cao hơn tỏi tươi. Quá trình nảy mầm của tỏi làm tăng khá nhiều các hợp chất có lợi để bảo vệ mầm chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường, đặc biệt là hợp chất chống oxy hóa hay các kháng sinh tự nhiên (Zakarova & ctv., 2014). Với việc gia tăng các hợp chất chống oxy hóa và kháng sinh tự nhiên, tỏi mọc mầm mang lại nhiều lợi ích đối với sức khỏe con người như chống lão hóa, tăng cường sức đề kháng, bảo vệ tim mạch và ngăn ngừa đột quỵ.

Không chỉ có lợi về mặt sức khỏe, tỏi còn được sử dụng để tiêu diệt nhiều loài côn trùng gây hại, nấm bệnh trên cây trồng. Theo Hayat & ctv. (2016), nghiên cứu về khả năng kháng nấm của dịch chiết tỏi cho thấy tỏi có tiềm năng kháng nấm trên phổ rộng và phytoalexin allicin là một trong những thành phần kháng nấm chính trong tỏi. Khi nảy mầm, tỏi sẽ sản sinh ra nhiều hợp chất phytoalexin để bảo vệ mầm tỏi khỏi côn trùng. Phytoalexin trong tỏi nảy mầm gây độc cho côn trùng nhưng lại có lợi cho sức khỏe con

người. Với việc gia tăng các hoạt chất kháng khuẩn, tiêu diệt côn trùng, tỏi nảy mầm cho thấy tiềm năng trong việc ứng dụng trong bảo quản nông sản. Đề tài nhằm mục đích đa dạng hóa sản phẩm, nâng cao giá trị sử dụng, tạo ra sản phẩm bột tỏi có chất lượng cao và tốt cho sức khỏe.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

Tỏi Phan Rang là giống tỏi ta, trồng tại Ninh Hải – Ninh Thuận, được mua tại chợ tỏi Ninh Hải, Ninh Thuận.

Nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được mua từ Viện Cây Ăn Quả Miền Nam.

Môi trường nuôi cấy vi sinh: potato dextrose agar (PDA) (Himedia - Ấn Độ).

Một số phương pháp phân tích: Ẩm độ được đo bằng máy sấy ẩm độ hồng ngoại (A&D MX50 – Nhật); tổng hàm lượng chất rắn hòa tan ( $^0\text{Bx}$ ) được đo bằng khúc xạ kế (Atago – Nhật) với thang đo 0 – 33 $^0\text{B}$ ; hàm lượng axit tổng được xác định bằng cách chuẩn độ với NaOH 0,1 N (Tran & ctv., 2004); hàm lượng polyphenol tổng được xác định bằng phương pháp Folin – Ciocalteu (Singleton & ctv., 1999); chiều dài mầm được đo bằng thước kẹp kỹ thuật số (CD-6, Nhật), 02 số lẻ; khối lượng mầm được xác định bằng cân kỹ thuật số (Ohaus – Mỹ), 2 số lẻ; tỉ lệ ức chế nấm được tính bằng cách đo đường kính tản nấm (Noori & Saud, 2012); màu sắc được đo bằng máy đo màu Minolta Chroma Meter (CR400, Nhật).

### 2.1. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp làm mầm tỏi đến chất lượng của tỏi nảy mầm

Tỏi được tách rời ra thành từng tép đơn, chọn kích cỡ đồng đều, loại bỏ những tép nhỏ lép. Ba phương pháp làm mầm tỏi là trồng đất, ngâm nước và ủ ở nhiệt độ 10 $^0\text{C}$  đã được nghiên cứu, mỗi phương pháp lặp lại 3 lần, mỗi lần 1 kg tỏi tép đơn. Đối với phương pháp trồng đất, các tép tỏi được trồng trong thùng xốp, tưới nước 2 lần/ngày. Đối với phương pháp ngâm nước, các tép tỏi được xếp vào khay nhựa, đổ nước ngập một nửa tép tỏi và thay nước mỗi ngày. Đối với phương pháp ủ ở nhiệt độ mát, các tép tỏi được bóc vỏ, để vào rổ nhựa và đặt vào tủ lạnh có nhiệt độ 10 $^0\text{C}$ . Sau 3 ngày, tỏi nảy mầm được thu hoạch và tiến hành đánh giá các chỉ tiêu: ẩm độ, tổng hàm lượng chất rắn hòa tan, hàm lượng axit tổng, hàm lượng polyphenol tổng, chiều dài mầm, và khối lượng mầm để chọn ra phương pháp

làm mầm tỏi tốt nhất.

### 2.2. Khảo sát khả năng ức chế sinh trưởng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của tỏi tươi nảy mầm

Theo Baghalian & ctv. (2005), hàm lượng allicin trong tỏi là 0,16 – 13 mg/g và nồng độ allicin tối thiểu để kháng nấm từ 7  $\mu\text{g/mL}$  (Hughes & ctv., 1991). Như vậy lượng allicin cần có trong 50 mL môi trường để đạt nồng độ allicin kháng nấm tối thiểu là 0,35 mg allicin. Dựa trên cách pha nước chiết tỏi của Hayat & ctv. (2016): Nước chiết tỏi ban đầu có nồng độ 100%, là mỗi 10 g tỏi được đồng nhất với 10 g nước cất (1 mL dịch tỏi tương đương 1 g tỏi) và lượng allicin tối thiểu có trong dịch tỏi nồng độ 100% là 0,16 mg/mL. Dựa vào công thức tính nồng độ kháng nấm, ta tính được nồng độ kháng nấm tối thiểu là 4,02%. Từ cơ sở này, chúng tôi tiến hành pha và bổ sung dịch tỏi nảy mầm với các nồng độ 0% (đối chứng), 1,5%, 3,5%, 5,5% và 7,5% vào môi trường PDA. Sau đó lấy các khoanh nấm 7 ngày tuổi có đường kính 4,81 mm cấy vào trung tâm đĩa môi trường trên, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ phòng. Theo dõi và ghi nhận đường kính khuẩn lạc nấm *Colletotrichum gloeosporioides* bằng cách đo đường kính của tản nấm hàng ngày, bắt đầu sau khi cấy 1 ngày đến khi tản nấm mọc đầy đĩa đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại. Khả năng kháng nấm được xác định như sau:

$$\text{Tỉ lệ ức chế sinh trưởng (\%)} = \frac{\text{DK}_{\text{DC}} - \text{DK}_{\text{TN}}}{\text{DK}_{\text{DC}}} \times 100\%$$

Với:

$\text{DK}_{\text{DC}}$ : Đường kính trung bình của tản nấm ở các đĩa đối chứng.

$\text{DK}_{\text{TN}}$ : Đường kính trung bình của tản nấm ở các đĩa thí nghiệm.

### 2.3. Khảo sát các phương pháp sấy ảnh hưởng đến chất lượng bột tỏi nảy mầm

Tỏi nảy mầm được rửa sạch, lột vỏ, cắt rễ và xếp vào khay sấy. Ba phương pháp sấy: sấy nóng (40 $^0\text{C}$ , 50 $^0\text{C}$ , 55 $^0\text{C}$ ), sấy bơm nhiệt (30 $^0\text{C}$ , 35 $^0\text{C}$ , 40 $^0\text{C}$ ) và sấy thăng hoa (14 giờ) đã được nghiên cứu. Mỗi phương pháp được thực hiện với 3 lần lặp lại, mỗi lần 1 kg tỏi nảy mầm. Tỏi sau khi sấy khô đạt ẩm độ < 6% sẽ được nghiền nhuyễn tạo bột tỏi nảy mầm. Đánh giá các chỉ tiêu tỉ lệ thu hồi, ẩm độ, polyphenol tổng, axit tổng và màu sắc.

Tỉ lệ thu hồi sản phẩm được tính bằng phần trăm (%) của khối lượng sản phẩm sau khi sấy so với khối lượng ban đầu theo công thức:

$$H = \frac{m}{m_0} \times 100\%$$

Với:

$m_0$ : Khối lượng ban đầu (g).

$m$ : Khối lượng sau khi sấy (g).

## 2.4. Khảo sát khả năng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của bột tỏi nảy mầm

Tương tự cách tính nồng độ kháng nấm của dịch tỏi tươi, dựa trên tỉ lệ thu hồi bột tỏi sấy thăng hoa là 22,51% và tính được hàm lượng allicin tối thiểu của bột tỏi sấy thăng hoa là 0,71 mg/g. Như vậy lượng bột tỏi cần cho vào môi trường để đạt nồng độ kháng nấm tối thiểu là 0,49mg và dựa vào công thức tính nồng độ kháng nấm, ta tính được nồng độ kháng nấm tối thiểu là 0,9%. Bột tỏi nảy mầm sẽ được ngâm với nước cất theo tỉ lệ 1:4, lọc lấy phần dịch. Bổ sung dịch bột tỏi nảy mầm vào môi trường nuôi PDA để đạt các nồng độ 1%, 1,5% và 2% và đổ đĩa. Các khoanh nấm 7 ngày tuổi có đường kính 6,86 mm được cấy vào trung tâm đĩa môi trường, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ phòng. Theo dõi và ghi nhận đường kính khuẩn lạc nấm *Colletotrichum gloeosporioides* bằng cách đo đường kính của tản nấm hàng ngày, bắt đầu sau khi cấy 1 ngày đến khi tản nấm mọc đầy đĩa đối chứng. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần lặp lại. Khả năng kháng nấm của bột mầm tỏi được xác định qua tỉ lệ ức chế sinh trưởng (%) tương tự như dịch tỏi tươi nảy mầm.

## 2.5. Phương pháp phân tích xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và tổng hợp bằng phần mềm Excel 2016, xử lý thống kê và phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm JMP 10.0.

## 3. Kết Quả và Thảo Luận

### 3.1. Ảnh hưởng phương pháp làm mầm tỏi đến chất lượng của tỏi nảy mầm

Tỏi là loại gia vị có ẩm độ thương phẩm từ 64 - 66%. Trong quá trình bảo quản, tỏi dễ mọc mầm khi gặp điều kiện ẩm ướt. Do đó, qua khảo sát sơ bộ sàng lọc các điều kiện để mọc mầm của

tỏi, chúng tôi đã chọn và tiến hành thử nghiệm 3 phương pháp làm mầm tỏi; đó là trồng trong đất, ngâm nước và ủ trong tủ lạnh ở 10°C. Chất lượng mầm tỏi đã được đánh giá và kết quả được trình bày trong Bảng 1.

Qua Bảng 1 và xử lý thống kê, chúng tôi nhận thấy tổng hàm lượng chất rắn hòa tan, axit tổng và ẩm độ giữa 3 phương pháp làm mầm không có sự khác biệt ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ( $P > 0,05$ ). Điều này cho thấy phương pháp làm mầm không có ảnh hưởng đến hàm lượng chất khô hòa tan, xit tổng và ẩm độ của mầm tỏi. Chiều dài mầm ở 3 phương pháp có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Trong đó, chiều dài mầm của phương pháp trồng đất và phương pháp ngâm nước không có sự khác biệt nhau ( $P > 0,05$ ). Chiều dài mầm của phương pháp để tủ lạnh so với 2 phương pháp trồng đất và ngâm nước có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Điều này cho thấy phương pháp nảy mầm có ảnh hưởng đến tốc độ nảy mầm của tỏi. Sau 3 ngày lên mầm, tỏi được lên mầm theo phương pháp trồng đất và phương pháp ngâm nước có mầm dài và có xu hướng mọc lá, còn tỏi được lên mầm theo phương pháp để tủ lạnh lên mầm chậm hơn và có mầm ngắn hơn.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy chiều dài tổng, axit tổng, ẩm độ, polyphenol và khối lượng mầm của 3 phương pháp không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95%. Tuy không có sự khác biệt nhưng hàm lượng polyphenol của tỏi nảy mầm ở phương pháp trồng đất cao hơn so với 2 phương pháp còn lại, đạt 2,65 mg/g. Lượng polyphenol có trong tỏi tươi nguyên liệu ban đầu đạt 2,32 (mg/g) ít hơn so với lượng polyphenol có trong tỏi nảy mầm theo phương pháp trồng đất là 2,65 (mg/g). Qua đó, cho thấy quá trình nảy mầm của tỏi làm tăng lượng polyphenol có trong tỏi. Về tổng hàm lượng chất rắn hòa tan, phương pháp trồng đất và ngâm nước cho tỏi có tổng hàm lượng chất rắn hòa tan thấp hơn phương pháp để tủ lạnh, điều này cho thấy trong quá trình mọc mầm, tỏi ở hai phương pháp này hấp thụ nhiều nước hơn, dẫn tới hàm lượng chất khô hòa tan trong tỏi giảm xuống. Đồng thời, trong quá trình tiến hành thí nghiệm, tỏi được nảy mầm bằng phương pháp ngâm nước dễ bị nhiễm mốc đen, làm giảm khối lượng thu được do phải loại bỏ phần tỏi bị mốc. Như vậy, từ các kết quả khảo sát, chúng tôi chọn phương pháp làm mầm tỏi là phương pháp trồng đất. Phương pháp này cho tốc độ lên mầm nhanh và khối lượng mầm thu

**Bảng 1.** Thành phần hóa lý của mầm tỏi sau khi lên mầm bằng 3 phương pháp

| Chỉ tiêu                            | Trồng đất                 | Ngâm nước                 | Đẻ tủ lạnh 10 <sup>0</sup> C |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Chiều dài mầm (mm)                  | 39,62 <sup>a</sup> ± 2,39 | 38,29 <sup>a</sup> ± 4,07 | 23,55 <sup>b</sup> ± 7,17    |
| Tổng hàm lượng chất rắn hòa tan (%) | 8,78 <sup>a</sup> ± 0,84  | 8,67 <sup>a</sup> ± 0,67  | 8,67 <sup>a</sup> ± 1,15     |
| Axit tổng (%)                       | 0,53 <sup>a</sup> ± 0,11  | 0,56 <sup>a</sup> ± 0,21  | 0,63 <sup>a</sup> ± 0,24     |
| Ẩm độ (%)                           | 88,10 <sup>a</sup> ± 1,55 | 87,29 <sup>a</sup> ± 2,71 | 87,13 <sup>a</sup> ± 1,83    |

<sup>a-b</sup>Trong cùng 1 hàng, các số có cùng ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% ( $P > 0,05$ ).

**Bảng 2.** Thành phần hóa lý của tỏi nảy mầm sau khi lên mầm bằng 3 phương pháp

| Chỉ tiêu           | Trồng đất                   | Ngâm nước                   | Ủ ở 10 <sup>0</sup> C       |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Chiều dài mầm (mm) | 72,33 <sup>a</sup> ± 7,67   | 66,22 <sup>a</sup> ± 10,63  | 46,93 <sup>a</sup> ± 20,46  |
| Độ Brix (%)        | 17,6 <sup>a</sup> ± 0,74    | 17,4 <sup>a</sup> ± 0,20    | 21,9 <sup>b</sup> ± 0,19    |
| Axit tổng (%)      | 0,56 <sup>a</sup> ± 0,06    | 0,56 <sup>a</sup> ± 0,05    | 0,63 <sup>a</sup> ± 0,03    |
| Ẩm độ (%)          | 74,51 <sup>a</sup> ± 3,51   | 72,84 <sup>a</sup> ± 3,25   | 72,67 <sup>a</sup> ± 3,23   |
| Polyphenol (mg/g)  | 2,65 <sup>a</sup> ± 0,11    | 2,59 <sup>a</sup> ± 0,05    | 2,29 <sup>a</sup> ± 0,37    |
| Khối lượng mầm (g) | 283,33 <sup>a</sup> ± 34,14 | 241,77 <sup>a</sup> ± 34,84 | 249,47 <sup>a</sup> ± 18,76 |

<sup>a-b</sup>Trong cùng 1 hàng, các số có cùng ký tự giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở độ tin cậy 95% ( $P > 0,05$ ).

hồi tốt hơn hai phương pháp còn lại.

### 3.2. Khả năng ức chế sinh trưởng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của tỏi nảy mầm

Qua kết quả Hình 1 và 2 cho thấy, nồng độ 1,5% hoàn toàn không có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides*, tốc độ tản nấm phát triển gần như tương đương với nghiệm thức đối chứng (0% dịch tỏi nảy mầm). Các nồng độ 3,5%, 5,5% và 7,5% đều có khả năng ức chế sinh trưởng của nấm *Colletotrichum gloeosporioides*, nhưng với tỷ lệ ức chế ở mức độ khác nhau, trong đó nồng độ dịch tỏi 5,5% và 7,5% có khả năng ức chế cao nhất đạt tỷ lệ 100%, trong khi nồng độ 3,5% chỉ ức chế cao nhất là 34,4%. Khi nồng độ dịch tỏi càng cao, các hợp chất polyphenol, allicin càng cao do đó khả năng ức chế nấm càng cao. Như vậy, qua kết quả khảo sát giữa các nồng độ 1,5%, 3,5%, 5,5%, 7,5% và mẫu đối chứng cho thấy với nồng độ dịch tỏi nảy mầm từ 5,5% trở lên có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên xoài.

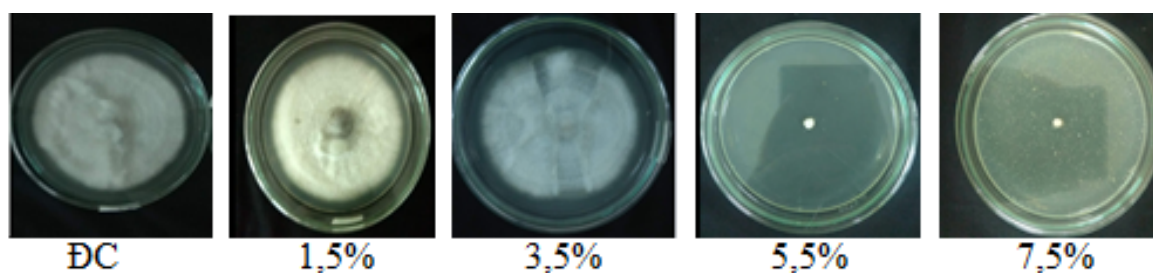
### 3.3. Ảnh hưởng của phương pháp sấy đến chất lượng bột tỏi nảy mầm

#### 3.3.1. Thành phần hóa lý

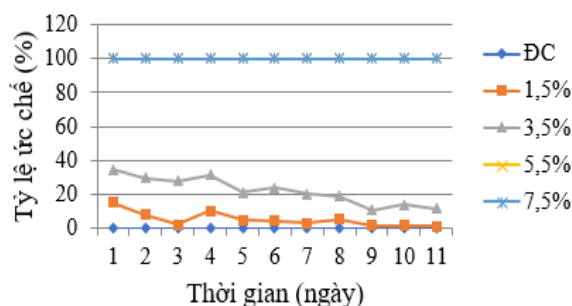
Thành phần hóa lý của sản phẩm bị ảnh hưởng rất nhiều bởi điều kiện sấy. Do đó, để tìm ra được

phương pháp sấy thích hợp, thành phần hóa lý của bột tỏi nảy mầm sau khi sấy bằng ba phương pháp (sấy không khí nóng, sấy bơm nhiệt, sấy thăng hoa) đã được phân tích và kết quả được thể hiện qua Bảng 3.

Qua Bảng 3 và kết quả xử lý thống kê cho thấy, các chỉ tiêu hóa lý về ẩm độ, acid tổng, tỉ lệ thu hồi và hàm lượng polyphenol ở 3 phương pháp sấy nóng, sấy bơm nhiệt và sấy thăng hoa đều khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (với  $P < 0,05$ ), chứng tỏ phương pháp sấy rất ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Đối với ẩm độ, tỏi được sấy bằng phương pháp sấy khí nóng có ẩm độ khoảng 11%. Tỏi được sấy bằng phương pháp sấy bơm nhiệt có ẩm độ đạt khoảng 20 - 21%. Tỏi được sấy bằng phương pháp sấy thăng hoa có ẩm độ thấp nhất, đạt 6,92%. Với việc đạt ẩm độ thấp hơn, tỏi sấy thăng hoa dễ dàng nghiền mịn hơn so với 2 phương pháp còn lại. Đối với tỉ lệ thu hồi, vì đạt ẩm độ thấp nhất trong các phương pháp sấy nên tỉ lệ thu hồi của phương pháp sấy thăng hoa cũng thấp nhất. Phương pháp sấy bơm nhiệt có tỉ lệ thu hồi cao nhất, dao động trong khoảng 30% vì tỏi được sấy bằng phương pháp này có ẩm độ cao nhất. Về axit tổng, tỏi sấy bằng phương pháp sấy thăng hoa giữ lại được hàm lượng axit cao nhất là 2%, tiếp theo là phương pháp sấy bơm nhiệt 40<sup>0</sup>C với hàm lượng axit đạt 1,22%. Tỏi sấy bằng phương pháp sấy không khí nóng 40<sup>0</sup>C, sấy bơm nhiệt ở 30<sup>0</sup>C và 35<sup>0</sup>C có hàm lượng axit thấp nhất, dao động trong khoảng 0,9%. Điều



**Hình 1.** Tảo nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của các nghiệm thức sau 11 ngày.



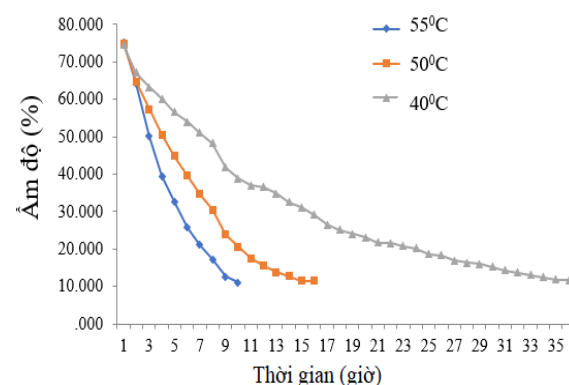
**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ dịch tỏi nảy mầm đến tỷ lệ ức chế nấm theo thời gian.

này cho thấy, đối với phương pháp sấy không khí nóng và sấy bơm nhiệt, thời gian sấy càng dài thì lượng acid mất đi càng nhiều. Về polyphenol, tỏi sấy bằng phương pháp sấy thăng hoa có hàm lượng polyphenol cao nhất, đạt 2,84 mg/g. Trong khi đó, tỏi sấy bằng phương pháp sấy bơm nhiệt có hàm lượng polyphenol thấp nhất, dao động trong khoảng 0,95 - 1,61 mg/g. Điều này cho thấy, phương pháp sấy thăng hoa rất tối ưu trong việc giữ lại thành phần polyphenol của tỏi.

### 3.3.2. Quá trình giảm ẩm độ của phương pháp sấy khí nóng

Với ẩm độ ban đầu của tỏi nảy mầm là 74,51%, khi sấy bằng phương pháp sấy không khí nóng, ẩm độ giảm còn khoảng 11%. Qua kết quả Hình 3 cho thấy sự tương quan tỉ lệ thuận giữa nhiệt độ và thời gian sấy, nhiệt độ càng cao thì thời gian sấy càng ngắn, cụ thể khi sấy ở 55°C mất 10 giờ ẩm độ đạt 11,06% trong khi sấy ở 40°C mất 36 giờ ẩm độ đạt 11,65%. Khi nhiệt độ sấy thấp, tốc độ làm khô chậm, độ ẩm trong sản phẩm cao, enzyme cũng bị giảm hoạt tính do quá trình tự thủy phân theo thời gian. Khi sấy ở nhiệt độ quá cao, protein bị biến tính, nếu sấy ở nhiệt độ cao

hơn nữa sẽ xảy ra các phản ứng Maillard, làm giảm chất lượng sản phẩm. Với ẩm độ dao động trong khoảng 11%, tỏi sau quá trình sấy khi xay thành dạng bột mịn, các hạt bột tỏi dễ kết dính với nhau, làm cho sản phẩm không đồng nhất.



**Hình 3.** Quá trình giảm ẩm của tỏi bằng phương pháp sấy không khí nóng.

### 3.3.3. Quá trình giảm ẩm độ của phương pháp sấy khí nóng

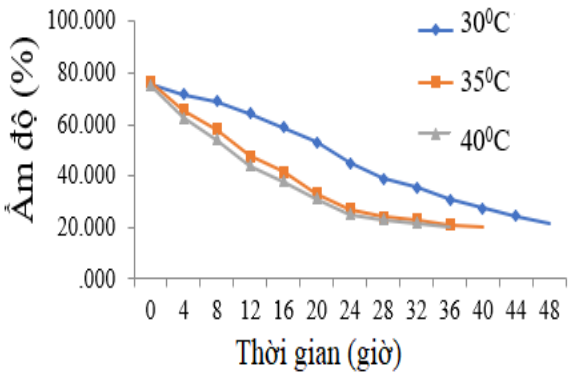
Sấy ở nhiệt độ càng thấp thì hàm ẩm trong nguyên liệu giảm chậm do sự chênh lệch áp suất hơi nước trên bề mặt nguyên liệu và áp suất riêng phần trong không khí nhỏ nên tốc độ thoát ẩm chậm làm kéo dài thời gian sấy, do đó trên Hình 4 cho thấy ẩm độ của sản phẩm giảm dần từ khoảng 75% xuống đến khoảng 21%. Nhiệt độ sấy thấp nên thời gian sấy kéo dài, cụ thể là ở nhiệt độ 30°C phải mất hơn 48 giờ mới đạt độ ẩm 21,79%. Khi tăng nhiệt độ sấy lên thì tốc độ làm khô cũng tăng lên do lúc này nguyên liệu được nâng nhiệt, quá trình khuếch tán ẩm ra bên ngoài tăng nên khi sấy ở nhiệt độ 40°C thì mất tới 36 giờ mới thu được sản phẩm đạt độ ẩm ở mức 20,13%. Phương pháp sấy bơm nhiệt này cho sản phẩm bột tỏi còn

**Bảng 3.** Kết quả thành phần hóa lý của bột tỏi nảy mầm qua 3 phương pháp sấy

| Chỉ tiêu          | Sấy không khí nóng        |                            |                           | Sấy bơm nhiệt              |                            |                           | Sấy thăng hoa             |
|-------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                   | 40°C                      | 50°C                       | 55°C                      | 30°C                       | 35°C                       | 40°C                      | 14 giờ                    |
| Ẩm độ (%)         | 11,71 <sup>c</sup> ± 0,28 | 11,55 <sup>c</sup> ± 0,31  | 11,15 <sup>c</sup> ± 0,14 | 21,79 <sup>a</sup> ± 0,65  | 20,34 <sup>b</sup> ± 0,64  | 20,13 <sup>b</sup> ± 0,07 | 6,92 <sup>d</sup> ± 0,04  |
| Axit tổng (%)     | 0,85 <sup>d</sup> ± 0,04  | 1,04 <sup>c</sup> ± 0,04   | 1,04 <sup>c</sup> ± 0,04  | 0,9 <sup>d</sup> ± 0,07    | 0,87 <sup>d</sup> ± 0,08   | 1,22 <sup>b</sup> ± 0,07  | 2,00 <sup>a</sup> ± 0,04  |
| Polyphenol (mg/g) | 1,77 <sup>c</sup> ± 0,05  | 1,48 <sup>e</sup> ± 0,01   | 2,2 <sup>b</sup> ± 0,05   | 1,61 <sup>d</sup> ± 0,01   | 0,95 <sup>f</sup> ± 0,03   | 1,48 <sup>e</sup> ± 0,02  | 2,84 <sup>a</sup> ± 0,01  |
| Tỉ lệ thu hồi (%) | 28,54 <sup>c</sup> ± 0,31 | 28,25 <sup>cd</sup> ± 0,25 | 27,77 <sup>d</sup> ± 0,31 | 30,43 <sup>ab</sup> ± 0,46 | 30,08 <sup>ab</sup> ± 0,47 | 30,84 <sup>a</sup> ± 0,5  | 22,51 <sup>e</sup> ± 0,09 |

a-b-Trong cùng 1 hàng, các số có cùng ký tự thì khác nhau không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

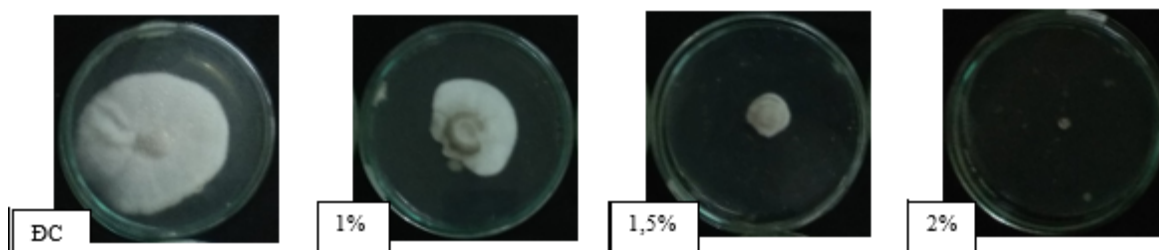
độ ẩm rất cao, không đạt độ ẩm của sản phẩm bột củ (5 - 12%) mà chúng tôi mong muốn. Như vậy, qua kết quả các chỉ tiêu hóa lý khảo sát giữa các phương pháp sấy cho thấy phương pháp sấy thăng hoa là tối ưu nhất, thời gian sấy khoảng 14 giờ, bột tỏi nảy mầm có ẩm độ thấp (6,92%) tốt cho quá trình nghiền tạo bột và bảo quản, bên cạnh đó độ màu sắc sáng nhất, giữ được lượng axit tổng cao, phần trăm hàm lượng polyphenol bị hao hụt ít hơn so với 2 phương pháp sấy khí nóng và sấy bơm nhiệt.



**Hình 4.** Quá trình giảm ẩm của tỏi với phương pháp sấy bơm nhiệt.

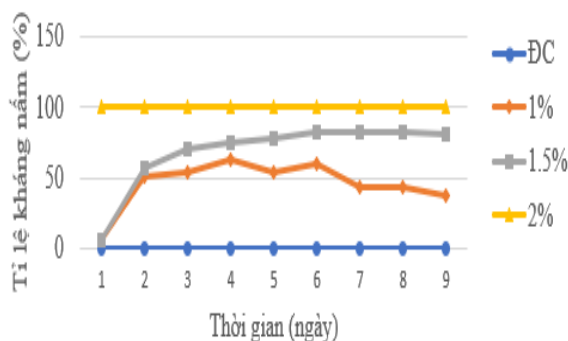
**3.3.4. Khả năng kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của bột tỏi nảy mầm**

Qua kết quả Hình 5 và 6 cho thấy 3 nồng độ bổ sung bột tỏi là 1%, 1,5% và 2% đều có khả năng ức chế sinh trưởng của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* nhưng với tỉ lệ ức chế khác nhau và khả năng ức chế có xu hướng càng tăng khi nồng độ bột tỏi càng tăng. Trong đó nồng độ 2% có khả năng ức chế 100% nấm *Colletotrichum gloeosporioides*, nồng độ 1% chỉ ức chế cao nhất là 63,1% và nồng độ 1,5% có khả năng ức chế cao nhất là 83,15%. Khi xét tỉ lệ ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của từng nồng độ dịch bột tỏi theo thời gian cho thấy có sự khác biệt nhau qua từng ngày. Trong 09 ngày theo dõi, kết quả cho thấy nồng độ 1,5% và 2% có khả năng ức chế nấm mạnh từ ngày thứ 3 trở đi, tỉ lệ ức chế tăng qua từng ngày cho đến ngày thứ 9. Đối với nồng độ 1% có khả năng ức chế nấm mạnh vào giai đoạn từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 và mạnh nhất vào ngày thứ 5, sau đó tỉ lệ ức chế có sự chậm lại và giảm dần. Như vậy, qua tỷ lệ ức chế sinh trưởng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* sau 09 ngày theo dõi, chúng tôi nhận thấy



**Hình 5.** Tảo nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của các nghiệm thức sau 09 ngày.

nồng độ dịch bột tỏi nảy mầm từ 2% ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* hoàn toàn.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của nồng độ dịch bột tỏi đến sinh trưởng của nấm *Colletotrichum gloeosporioides*.

### 3.3.5. Quy trình chế biến

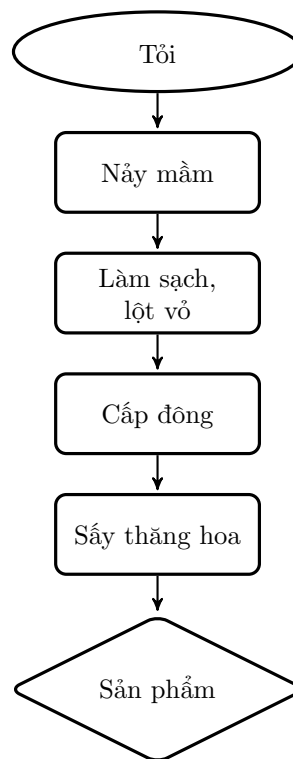
Quy trình chế biến bột tỏi nảy mầm thể hiện ở Hình 7.

Tỏi Phan Rang đã phơi khô, không bị mốc, bị óp, được tách rời từng tép và trồng trong đất ẩm. Tỏi được trồng với mật độ là các tép tỏi cách nhau 2 cm và vùi dưới đất 5 cm. Tỏi mọc mầm sau 3 ngày sẽ được rửa sạch, chọn lọc tỏi mầm kích thước đồng đều, tách lớp vỏ ngoài, cắt rễ và rửa sạch lại lần nữa trước khi cấp đông, xử lý cho quá trình sấy thăng hoa. Tỏi cấp đông sấy thăng hoa trong thời gian 14 giờ, đạt ẩm độ khoảng 6% và nghiền tạo bột tỏi.

## 4. Kết Luận và Kiến Nghị

### 4.1. Kết luận

Sau khi tiến hành các thí nghiệm, chúng tôi có kết luận như sau: Phương pháp trồng đất là phương pháp làm mầm tỏi tối ưu nhất. Dịch



**Hình 7.** Quy trình chế biến bột tỏi nảy mầm.

tỏi nảy mầm tươi từ phương pháp trồng đất có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Colletotrichum gloeosporioides* ở nồng độ từ 5,5%. Trong các phương pháp sấy tỏi đã tiến hành, phương pháp sấy thăng hoa là phương pháp tối ưu nhất và bột tỏi nảy mầm sau sấy có khả năng ức chế hoàn toàn nấm *Colletotrichum gloeosporioides* ở nồng độ từ 2%.

### 4.2. Kiến nghị

Xác định hàm lượng allicin trong tỏi nảy mầm và khả năng kháng vi sinh vật khác của tỏi nảy

mầm và bột tỏi nảy mầm.

### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Baghalian, K., Ziai, S. A., Naghavi, M. R., Badi, H. N., & Khalighi, A. (2005). Evaluation of Allicin Content and Botanical Traits on Iranian Garlic (*Allium sativum* L.) Ecotypes. *Scientia Horticulturae* 103, 155-166.
- Hughes, B. G., & Lawson, L. D. (1991). Antimicrobial effects of *Allium sativum* L. (garlic), *Allium ampeloprasum* L. (elephant garlic) and *Allium cepa* L. (onion), garlic compounds and commercial garlic supplement products. *Phytotherapy Research* 5, 154-158.
- Noori, M. S. S., & Saud, H. M. (2012). Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *Journal of Plants Pathology and Microbiology* 3(2), 1-4.
- Hayat, S., Cheng, Z., Ahmad, H., Ali, M., Chen, X., & Wang, M. (2016). Garlic, from remedy to stimulant: Evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin allicin content among garlic cultivars; allicin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in cucumber. *Frontier in Plant Science* 7, 1-15.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Tran, L. B., Ton, N. N. M., & Dinh, N. T. T. (2004). *Food chemistry laboratory*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Vietnam National University-Ho Chi Minh City Publishing House.
- Zakárova, A., Seo, J. Y., Kim, H. Y., Kim, J. H., Shin, J. H., Cho, K. M., Lee, C. H., & Kim, J. S. (2014). Garlic sprouting is associated with increased antioxidant activity and concomitant changes in the metabolite profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62(8), 1875-1880.

## Optimization of drying the semi-dried lamb meat product (jerky)

Trinh A. Nguyen\*, Thao T. T. Nguyen, & Linh T. Le

Faculty of Food Science and Technology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: December 17, 2018

Revised: May 27, 2019

Accepted: July 22, 2019

#### Keywords

Lamb jerky

Lamb meat

Semi-dried food

Semi-dried lamb meat

#### \*Corresponding author

Nguyen Anh Trinh

Email: natrinh@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

Convection drying was used to investigate the drying process of semi-dried lamb. The drying conditions were carried in combination of adding sorbitol and glycerin and salt. The results showed that the most appropriate drying conditions were at temperature of 56°C, drying time of 210 min and wind speed of 0.24 m/s. The addition of sorbitol, glycerin, common salt in product was 4.37%, 1.93%, and 3.4%, respectively which were suitable for maintaining the aw of the product at 0.67 g.

**Cited as:** Nguyen, T. A., Nguyen, T. T. T., & Le, L. T. (2019). Optimization of drying the semi-dried lamb meat product (jerky). *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 90-98.

## Tối ưu hóa quá trình sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo

Nguyễn Anh Trinh\*, Nguyễn Thị Thanh Thảo & Lê Trúc Linh

Khoa Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 17/12/2018

Ngày chỉnh sửa: 27/05/2019

Ngày chấp nhận: 22/07/2019

#### Từ khóa

Jerky cừu

Thịt cừu

Thịt cừu sấy dẻo

Thực phẩm sấy dẻo

#### \*Tác giả liên hệ

Nguyễn Anh Trinh

Email: natrinh@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Máy sấy khay theo nguyên tắc đối lưu là dùng tác nhân sấy làm ẩm trong sản phẩm bay hơi và thoát ra ngoài. Mỗi sản phẩm thực phẩm có thành phần nguyên vật liệu, cấu trúc,... khác nhau nên phải có chế độ sấy phù hợp. Ngoài ra, sorbitol, glycerin và muối ăn là những thành phần ngoài tính chất tạo vị, còn có khả năng giữ ẩm cho sản phẩm. Bổ sung sorbitol, glycerin và muối ăn trong các sản phẩm sấy có vai trò quan trọng trong việc hạ hoạt độ nước ( $a_w$ ) của sản phẩm, rút ngắn được thời gian sấy. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm xác định thông số kỹ thuật tối ưu của quá trình sấy cho qui trình sản xuất sản phẩm thịt cừu sấy dẻo (jerky). Kết quả nghiên cứu đã xác định được chế độ sấy tối ưu ở nhiệt độ  $56^{\circ}\text{C}$  trong 210 phút với tốc độ gió là  $0,24\text{ m/giây}$ . Tỷ lệ tối ưu của sorbitol, glycerin, muối ăn trong sản phẩm là 4,37% sorbitol, 1,93% glycerin và 3,4% muối ăn, sản phẩm có  $a_w$  là 0,67.

### 1. Đặt Vấn Đề

Sấy là một trong những phương pháp dùng để bảo quản thực phẩm, được thực hiện từ lâu đời, là phương pháp dùng nhiệt làm giảm độ ẩm của sản phẩm đến một mức độ an toàn cho việc lưu trữ và vận chuyển, làm bất hoạt các hoạt động của vi sinh vật (Law & ctv., 2014). Sấy đối lưu là phương pháp dùng luồng không khí sấy với nhiệt độ, độ ẩm và tốc độ gió phù hợp, sẽ làm ẩm trong sản phẩm bay hơi và thoát ra ngoài, là quá trình khuếch tán do chênh lệch ẩm ở bề mặt và bên trong vật liệu hay do chênh lệch áp suất hơi riêng phần ở bề mặt vật liệu và môi trường xung quanh (Nindo & Tang, 2007). Tốc độ gió là nhân tố ảnh hưởng lớn đến quá trình làm khô. Tốc độ chuyển động của không khí quá lớn sẽ khó giữ được nhiệt lượng trên nguyên liệu sấy, còn tốc độ chuyển động của không khí quá nhỏ sẽ làm chậm quá trình làm khô của nguyên liệu dẫn đến hư hỏng sản phẩm (Aranda & ctv., 2010).

Mỗi sản phẩm thực phẩm có thành phần nguyên vật liệu, cấu trúc, ... khác nhau nên phải

có chế độ sấy phù hợp. Sorbitol, glycerin và muối ăn là những thành phần ngoài vai trò tạo vị còn có khả năng giữ ẩm cho sản phẩm, nhờ vào khả năng liên kết với nước và từ đó có ảnh hưởng đến hoạt độ nước ( $a_w$ ) (Nguyen & Tran, 2016), sự hiện diện của NaCl ảnh hưởng đến kết cấu, khả năng giữ nước, điểm đẳng điện và chức năng protein (Gallart-Jornet & ctv., 2007).

Việc bổ sung sorbitol, glycerin và muối ăn trong các sản phẩm sấy có vai trò quan trọng trong việc rút ngắn được thời gian sấy nhờ vào khả năng làm biến tính protein, tạo cấu trúc chặt chẽ hơn và làm giảm lượng nước tự do trong sản phẩm. Tuy nhiên, việc sử dụng sorbitol, glycerin và muối ăn trong thực phẩm có giá trị giới hạn, việc bổ sung ở nồng độ quá cao thường làm thay đổi vị, ảnh hưởng đến giá trị cảm quan của sản phẩm, (Nguyen & Tran, 2016). Kết hợp các thành phần chất tan khác nhau nhằm hạ giá trị  $a_w$  của sản phẩm đến mức mong muốn cần được quan tâm. Mức độ giảm  $a_w$  của sản phẩm còn phụ thuộc vào đặc tính tan, khả năng liên kết tối đa của chất tan và nước trong thực phẩm, chính vì thế, đối

với từng loại sản phẩm, việc khảo sát nhằm tìm ra hàm lượng bổ sung phù hợp nhằm hạ hoạt độ nước của sản phẩm đến mức mong muốn hay giá trị thấp nhất cần phải được khảo sát.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

Nguyên liệu thịt cừu được cung cấp bởi cơ sở sản xuất thịt dê cừu Triệu Tín - quốc lộ 1A, ngã 3 Phước Khánh, Ninh Phước, Ninh Thuận. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm và xác định được tỉ lệ nguyên vật liệu, thành phần gia vị cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo qui trình chế biến dự kiến. Kết quả này được giữ cố định cho tất cả các nghiệm thức của thí nghiệm tối ưu hóa quá trình sấy.

Chúng tôi sử dụng máy sấy khay có các khay sấy được đặt vào giá cố định bên trong buồng sấy, đóng kín buồng sấy và đưa luồng không khí sấy vào để tiếp xúc với sản phẩm sấy. Dòng không khí sấy song song với mặt phẳng của các khay sấy (ngang khay). Sau một thời gian sấy, độ ẩm của sản phẩm được giảm đến độ ẩm yêu cầu thì dừng hoạt động, mở cửa buồng và lấy tất cả các khay với sản phẩm sấy ra ngoài.

### 2.1. Thí nghiệm tối ưu hóa chế độ sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo

#### 2.1.1. Thí nghiệm xác định phạm vi giới hạn của nhiệt độ sấy và thời gian sấy

Tiến hành sấy sản phẩm ở 3 nhiệt độ 50°C, 55°C và 60°C (Flath & Diana, 1985). Sau mỗi 30 phút sấy, phân tích ẩm độ và đánh giá cảm quan sản phẩm để sơ bộ xác định nhiệt độ và thời gian sấy thích hợp cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo. Kết quả ghi nhận là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

#### 2.1.2. Xác định phạm vi giới hạn của tốc độ gió khi sấy

Tham khảo tài liệu (Aranda & ctv., 2010), chúng tôi xác định phạm vi giới hạn của tốc độ gió để sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo.

#### 2.1.3. Thí nghiệm xác định chế độ sấy tối ưu tối ưu

Chúng tôi đã thực hiện bố trí thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Design), Box- Behnken (BDD) với 3 yếu tố khảo sát là nhiệt độ sấy  $x_1$ , tốc độ gió  $x_2$  và thời gian

sấy  $x_3$ . Trên cơ sở xác định  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  xây dựng phương trình hồi quy thực nghiệm để mô tả sự phụ thuộc của 3 yếu tố khảo sát lên các chỉ tiêu theo dõi. Từ đó chọn ra các mức thích hợp của các yếu tố khảo sát cho quá trình sấy. Phương trình bậc 2 có dạng:  $Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + b_1x_1x_2 + b_2x_1x_3 + b_3x_2x_3 + c_1x_1^2 + c_2x_2^2 + c_3x_3^2$  với  $y$  là độ ẩm sản phẩm (%).

### 2.2. Thí nghiệm tối ưu hóa tỷ lệ sorbitol, glycerin, muối ăn

#### 2.2.1. Thí nghiệm xác định phạm vi giới hạn tỷ lệ sorbitol

Tiến hành chế biến sản phẩm thịt cừu sấy dẻo với tỷ lệ sorbitol khác nhau (0%, 3%, 4%, 5%) (Nguyen & Tran, 2016). Sau mỗi 30 phút sấy, phân tích ẩm độ và đánh giá cảm quan sản phẩm để sơ bộ xác định giới hạn của tỷ lệ sorbitol thích hợp cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo.

#### 2.2.2. Xác định phạm vi giới hạn của tỷ lệ glycerin

Tiến hành chế biến sản phẩm thịt cừu sấy dẻo với tỷ lệ glycerin khác nhau (0%, 1%, 2%, 3%) (Nguyen & Tran, 2016). Sau mỗi 30 phút sấy, phân tích ẩm độ và đánh giá cảm quan sản phẩm để sơ bộ xác định giới hạn của tỷ lệ glycerin thích hợp cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo.

#### 2.2.3. Xác định phạm vi giới hạn của tỷ lệ muối ăn

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm xác định thành phần gia vị cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo qui trình chế biến dự kiến để xác định giới hạn của tỷ lệ muối ăn thích hợp cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo.

#### 2.2.4. Thí nghiệm tối ưu hóa tỷ lệ sorbitol, glycerin, muối ăn

Chúng tôi đã thực hiện bố trí thí nghiệm theo phương pháp bề mặt đáp ứng (Response Surface Design), Box- Behnken (BDD) với 3 yếu tố khảo sát là tỷ lệ sorbitol  $x_1$ , tỷ lệ glycerin  $x_2$  và tỷ lệ muối ăn  $x_3$ . Trên cơ sở xác định  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  xây dựng phương trình hồi quy thực nghiệm để mô tả sự phụ thuộc của 3 yếu tố khảo sát lên các chỉ tiêu theo dõi. Từ đó chọn ra các mức thích hợp của các yếu tố khảo sát cho quá trình sấy. Phương trình bậc 2 có dạng:  $Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + b_1x_1x_2 + b_2x_1x_3 + b_3x_2x_3 + c_1x_1^2 + c_2x_2^2 + c_3x_3^2$  với  $y$  là độ ẩm sản phẩm (%).

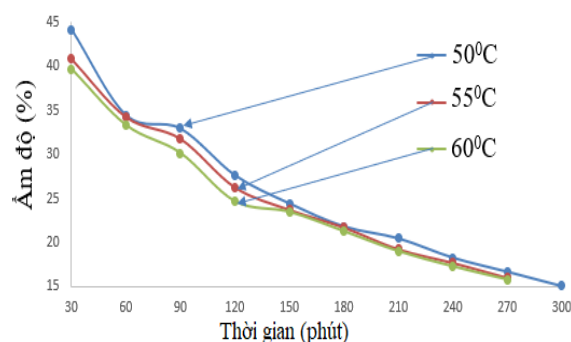
### 3. Kết quả và Thảo luận

Theo kết quả của thí nghiệm, chúng tôi có được thành phần và tỷ lệ của nguyên vật liệu, gia vị, phụ gia cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo được giữ cố định cho tất cả các nghiệm thức của thí nghiệm tối ưu hóa quá trình sấy là thịt cừu, mỡ heo, bột hương liệu, tinh bột, gia vị,...

#### 3.1. Thí nghiệm tối ưu hóa chế độ sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo

##### 3.1.1. Thí nghiệm xác định phạm vi giới hạn của nhiệt độ sấy và thời gian sấy

Biến thiên ẩm độ của sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo thời gian sấy ứng với nhiệt độ sấy khác nhau được thể hiện ở Hình 1.



**Hình 1.** Ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian sấy đến thay đổi ẩm độ của sản phẩm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở cùng tốc độ gió thì nhiệt độ sấy càng cao thì thời gian sấy càng ngắn, điều này cũng được kết luận trong các nghiên cứu của các tác giả Prachayawarakorn & ctv. (2002); Djendoubi & ctv. (2009). Quá trình sấy làm độ ẩm của sản phẩm giảm do nước trong nguyên liệu di chuyển từ trong ra ngoài, ở nhiệt độ càng cao nước trong nguyên liệu thoát ra càng nhanh (Ortiz & ctv., 2013). Nhiệt độ sấy gây biến tính các protein đã được nghiên cứu từ 40 đến 80°C (Ofstad & ctv., 1996), trong khoảng nhiệt độ sấy này, sản phẩm bị giảm độ ẩm, từ đó gây ra biến tính của protein sợi cơ và sự mất nước trong sản phẩm.

Kết quả khảo sát cho thấy trong thời gian sấy từ 180 đến 240 phút ứng với phạm vi nhiệt độ 50°C đến 60°C, ẩm độ của sản phẩm dao động trong khoảng 20% và kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm cừu sấy dẻo cho thấy những mẫu trong phạm vi sấy 180 đến 240 phút cho sản phẩm được

không người ưa thích, có cấu trúc mềm dẻo, màu đẹp.

Theo kết quả trên, chúng tôi chọn phạm vi giới hạn nhiệt độ sấy từ 50°C đến 60°C và thời gian sấy từ 180 phút đến 240 phút để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa.

##### 3.1.2. Xác định phạm vi giới hạn của tốc độ gió khi sấy

Qua một số thí nghiệm nghiên cứu của chúng tôi liên quan đến tốc độ gió khi sấy trên nguyên liệu thịt heo, thịt bò và thủy sản, kết hợp tham khảo tài liệu (Aranda & ctv., 2010), chúng tôi chọn tốc độ gió để sấy sản phẩm thịt cừu sấy dẻo là 0,21 m/giây, 0,24 m/giây và 0,27 m/giây.

##### 3.1.3. Thí nghiệm xác định chế độ sấy tối ưu

Từ các thí nghiệm xác định phạm vi ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm, giá trị mã hóa và ma trận của thí nghiệm tối ưu chế độ sấy được thể hiện trong Bảng 1 và 2.

**Bảng 1.** Giá trị mã hóa các thông số thí nghiệm tối ưu quá trình sấy

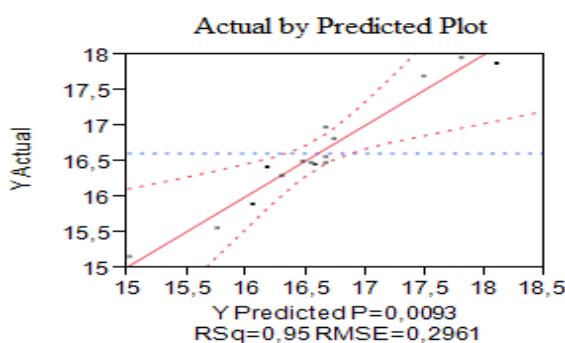
| Biến độc lập                                | Giá trị mã hóa |      |      |
|---------------------------------------------|----------------|------|------|
|                                             | -1             | 0    | 1    |
| $x_1$ : Nhiệt độ sấy ( $^{\circ}\text{C}$ ) | 50             | 55   | 60   |
| $x_2$ : Tốc độ gió (m/giây)                 | 0,21           | 0,24 | 0,27 |
| $x_3$ : Thời gian sấy (phút)                | 180            | 210  | 240  |

Kết quả thu được từ 15 thí nghiệm đã được xử lý bằng phần mềm thống kê JMP, từ đó xác định được mối tương quan giữa các yếu tố nhiệt độ sấy, tốc độ gió, thời gian sấy với độ ẩm của sản phẩm, đồng thời xây dựng được phương trình hồi quy và dự đoán các thông số của các yếu tố cho độ ẩm tối ưu. Sự tương quan giữa độ ẩm mô hình và độ ẩm thực tế được thể hiện trong Hình 2.

Giá trị  $R^2$  của mô hình là 0,95; cho thấy độ ẩm thực tế và độ ẩm mô hình có sự tương quan với nhau. Chúng tôi kết luận là phương trình hồi quy có mức độ tương thích khá cao, ở độ tin cậy 95%. Qua xử lý thống kê, cho thấy tác động của nhiệt độ, thời gian có ảnh hưởng quan trọng đến độ ẩm của sản phẩm có và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Sau khi loại bỏ những yếu tố không có ảnh hưởng quan trọng, chúng tôi có được phương trình hồi quy:  $y = 16,663 - 0,87x_1 - 0,6675x_1x_3$ . Trong đó  $y$  là độ ẩm của sản phẩm (%),  $x_1$  (nhiệt độ sấy) và  $x_3$  (thời gian sấy).

**Bảng 2.** Ma trận của thí nghiệm tối ưu quá trình sấy

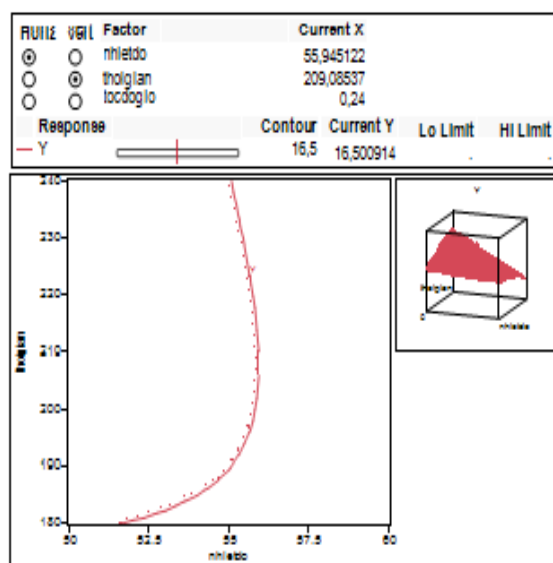
| TT | Ma trận | Nhiệt độ sấy ( $^{\circ}\text{C}$ ) | Tốc độ gió (m/giây) | Thời gian sấy (phút) | Độ ẩm (%) |
|----|---------|-------------------------------------|---------------------|----------------------|-----------|
| 1  | 0- -    | 55                                  | 0,21                | 180                  | 16,28     |
| 2  | 0+-     | 55                                  | 0,21                | 240                  | 16,81     |
| 3  | 0-+     | 55                                  | 0,27                | 180                  | 16,46     |
| 4  | 0       | 60                                  | 0,24                | 240                  | 15,15     |
| 5  | -0-     | 50                                  | 0,21                | 210                  | 17,95     |
| 6  | - -0    | 50                                  | 0,24                | 180                  | 16,45     |
| 7  | 0       | 55                                  | 0,24                | 210                  | 16,47     |
| 8  | + -0    | 60                                  | 0,24                | 180                  | 16,41     |
| 9  | +0-     | 60                                  | 0,21                | 210                  | 15,54     |
| 10 | -+0     | 50                                  | 0,24                | 240                  | 17,86     |
| 11 | -0+     | 50                                  | 0,27                | 210                  | 17,69     |
| 12 | 0       | 55                                  | 0,24                | 210                  | 16,55     |
| 13 | +0+     | 60                                  | 0,27                | 210                  | 15,89     |
| 14 | 0++     | 55                                  | 0,27                | 240                  | 16,49     |
| 15 | 0       | 55                                  | 0,24                | 210                  | 16,97     |

**Hình 2.** Biểu đồ thể hiện sự tương quan giữa độ ẩm mô hình và độ ẩm thực tế.

Mô hình xác định được cho thấy độ ẩm của sản phẩm nghịch biến với nhiệt độ sấy, với tương tác giữa nhiệt độ sấy và thời gian sấy, điều này được giải thích khi sấy càng lâu sẽ làm ức chế sự khô của sản phẩm do hình thành của một lớp vỏ protein trên bề mặt gây ra sự khô cứng bề mặt dẫn đến càng sấy ở nhiệt độ cao và thời gian sấy lâu sẽ làm nước trong sản phẩm thoát ra chậm hơn ban đầu (Jittinandana & ctv., 2002).

Dự đoán giá trị tối ưu của các yếu tố thí nghiệm: Sự tương tác của các yếu tố khảo sát của chế độ sấy được biểu diễn qua đường đồng mức được thể hiện ở Hình 3. Chúng tôi chọn được các thông số sấy tối ưu: nhiệt độ sấy  $56^{\circ}\text{C}$ , tốc độ gió 0,24 m/giây và thời gian sấy 209 phút thì độ ẩm của sản phẩm là 16,5%.

Kiểm chứng giá trị tối ưu từ mô hình thực nghiệm: Từ các thông số tối ưu của chế độ sấy

**Hình 3.** Đường đồng mức biểu diễn tương quan giữa độ ẩm và chế độ sấy.

sản phẩm thịt cừu sấy dẻo được xác định bằng phương trình của mô hình bề mặt đáp ứng, chúng tôi tiến hành thực nghiệm để kiểm chứng lại các thông số tối ưu, chứng minh tính xác thực của mô hình. Chúng tôi thực nghiệm trên các thông số tối ưu với 3 lần lặp lại, lấy giá trị trung bình, kết quả được trình bày ở Bảng 3 và 4.

Kết quả cho thấy độ ẩm sản phẩm thịt cừu sấy dẻo có sự khác biệt giữa mô hình và thực tế là 1,19% nhỏ hơn 5%, nên mô hình có giá trị thực tiễn và có thể áp dụng vào thực tế sản xuất.

**Bảng 3.** Kết quả kiểm chứng giá trị độ ẩm thực nghiệm của quá trình sấy thịt cừu

| Tham số thống kê | Độ ẩm sản phẩm thực tế (%) |
|------------------|----------------------------|
| 1                | 16,49                      |
| 2                | 16,17                      |
| 3                | 16,25                      |
| Độ ẩm trung bình | 16,30                      |
| SD               | 0,17                       |

**Bảng 4.** Kiểm chứng giá trị tối ưu từ mô hình bằng thực nghiệm

| Tham số thống kê   | Điều kiện |         |
|--------------------|-----------|---------|
|                    | Mô hình   | Thực tế |
| Độ ẩm sản phẩm (%) | 16,50     | 16,30   |
| Độ lệch chuẩn (SD) | 0         | 0,17    |

Chúng tôi chọn chế độ sấy áp dụng vào sản xuất là: nhiệt độ sấy  $56^{\circ}\text{C}$ , thời gian sấy 210 phút, tốc độ gió 0,24 m/giây.

### 3.2. Thí nghiệm tối ưu hóa tỷ lệ sorbitol, glycerin, muối ăn

#### 3.2.1. Thí nghiệm xác định phạm vi giới hạn tỷ lệ sorbitol

Biến thiên ẩm độ của sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo thời gian sấy ứng với tỷ lệ sorbitol khác nhau được thể hiện ở Hình 4.

Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm ứng với mỗi 30 phút sấy cho thấy đa số mẫu trong phạm vi tỷ lệ sorbitol 4% cho sản phẩm được nhiều người ưa thích, có cấu trúc mềm dẻo.

Theo kết quả trên, chúng tôi chọn phạm vi giới hạn tỷ lệ sorbitol từ 3,5% đến 4,5% để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa.

#### 3.2.2. Xác định phạm vi giới hạn của tỷ lệ glycerin

Biến thiên ẩm độ của sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo thời gian sấy ứng với tỷ lệ glycerin khác nhau được thể hiện ở Hình 5.

Kết quả đánh giá cảm quan sản phẩm ứng với mỗi 30 phút sấy cho thấy đa số mẫu trong phạm vi tỷ lệ glycerin 2% cho sản phẩm được nhiều người ưa thích, có cấu trúc mềm dẻo.

Theo kết quả trên, chúng tôi chọn phạm vi giới hạn tỷ lệ glycerin từ 1,5% đến 2,5% để thực hiện thí nghiệm tối ưu hóa.

#### 3.2.3. Xác định phạm vi giới hạn của tỷ lệ muối ăn

Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm xác định thành phần gia vị cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo theo qui trình chế biến dự kiến và sơ bộ xác định giới hạn của tỷ lệ muối ăn thích hợp cho sản phẩm thịt cừu sấy dẻo là 3,2% đến 3,6%.

#### 3.2.4. Thí nghiệm tối ưu hóa tỷ lệ sorbitol, glycerin, muối ăn

Từ các thí nghiệm xác định phạm vi ảnh hưởng của các yếu tố thí nghiệm, giá trị mã hóa và ma trận của thí nghiệm tối ưu tỷ lệ sorbitol, glycerin và muối ăn được thể hiện trong Bảng 5 và 6.

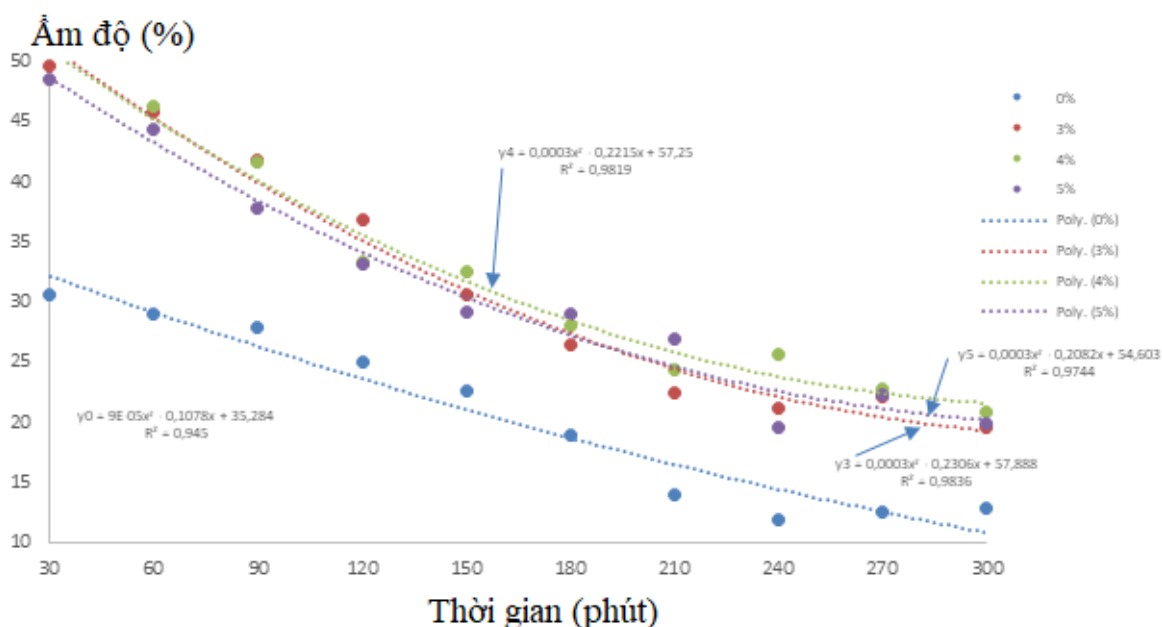
**Bảng 5.** Giá trị mã hóa các thông số thí nghiệm tối ưu tỷ lệ sorbitol, glycerin và muối ăn

| Biến độc lập               | Giá trị mã hóa |     |     |
|----------------------------|----------------|-----|-----|
|                            | -1             | 0   | 1   |
| $x_1$ : Tỷ lệ sorbitol (%) | 3,5            | 4   | 4,5 |
| $x_2$ : Tỷ lệ glycerol (%) | 1,5            | 2   | 2,5 |
| $x_3$ : Tỷ lệ muối ăn (%)  | 3,2            | 3,4 | 3,6 |

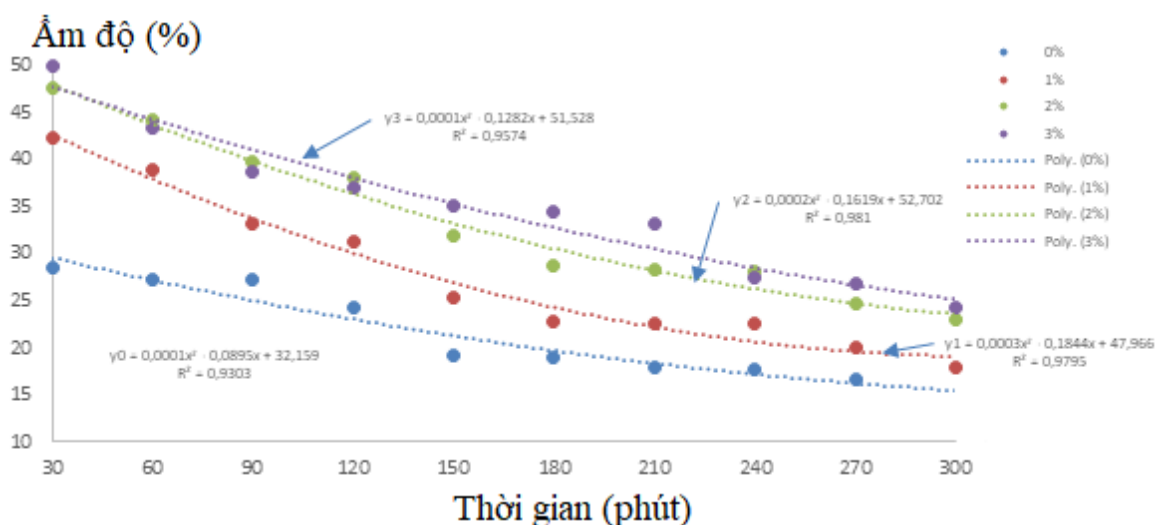
Kết quả thu được từ 15 thí nghiệm đã được xử lý bằng phần mềm thống kê JMP, từ đó xác định được mối tương quan giữa các yếu tố tỷ lệ sorbitol, glycerin và muối ăn với hoạt độ nước của sản phẩm, đồng thời xây dựng được phương trình hồi quy và dự đoán các thông số của các yếu tố cho hoạt độ nước của sản phẩm thịt cừu sấy dẻo là tối ưu. Sự tương quan giữa hoạt độ nước sản phẩm của mô hình và thực tế được thể hiện trong Hình 6.

Giá trị  $R^2$  của mô hình là 0,98; cho thấy hoạt độ nước sản phẩm thực tế và mô hình có sự tương quan với nhau. Chúng tôi kết luận là phương trình hồi quy có mức độ tương thích khá cao, ở độ tin cậy 95%. Qua xử lý thống kê, cho thấy tác động của tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn có ảnh hưởng quan trọng đến độ ẩm của sản phẩm có và có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Sau khi loại bỏ những yếu tố không có ảnh hưởng quan trọng, chúng tôi có được phương trình hồi quy:  $y = 0,691 - 0,039x_1 + 0,0135x_2 + 0,0125x_3 - 0,02675x_1x_2 - 0,01775x_2x_3 + 0,013875x_1^2 - 0,028125x_2^2 + 0,012375x_3^2$ . Trong đó:  $y$  là hoạt độ nước (aw) của thịt cừu sấy dẻo (%),  $x_1$  (tỷ lệ sorbitol),  $x_2$  (tỷ lệ glycerin) và  $x_3$  (tỷ lệ muối ăn).

Mô hình xác định được cho thấy hoạt độ nước của sản phẩm phụ thuộc, bị ảnh hưởng nhiều vào



Hình 4. Biến thiên ẩm độ của sản phẩm theo thời gian sấy ứng với tỷ lệ sorbitol khác nhau.



Hình 5. Biến thiên ẩm độ của sản phẩm theo thời gian sấy ứng với tỷ lệ glycerin khác nhau.

tỷ lệ sorbitol, glycerin, muối ăn, đúng với nhận định của Sikorski & ctv. (1976); Shenouda (1980), muối ăn là một yếu tố ảnh hưởng đến hoạt độ nước của sản phẩm trong quá trình sấy, muối làm protein biến tính tạo thuận lợi cho sự khuếch tán của độ ẩm từ nguyên liệu trong quá trình sấy (Nketsia-Tabiri & Sefa-Dedeh, 1995).

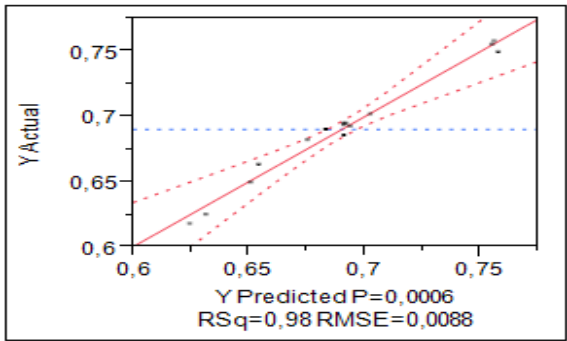
Dự đoán giá trị tối ưu của các yếu tố thí

nghiệm: Sự tương tác của các yếu tố khảo sát (tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn) được biểu diễn qua đường đồng mức được thể hiện ở Hình 7. Chúng tôi chọn được các tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn tối ưu cho quá trình sấy là 4,37% sorbitol, 1,93% glycerol và 3,4% muối ăn, sản phẩm có hoạt độ nước là 0,67.

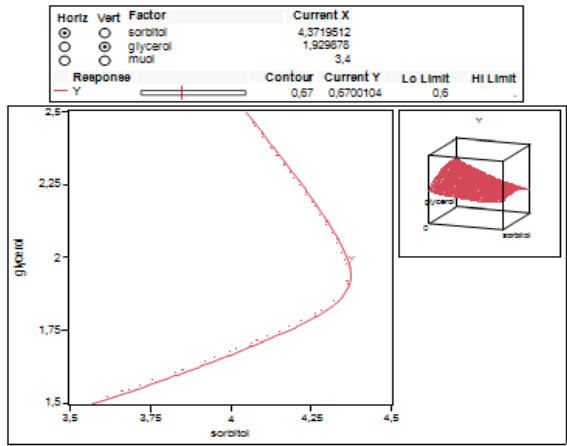
Kiểm chứng giá trị tối ưu từ mô hình thực

**Bảng 6.** Ma trận của thí nghiệm tối ưu tỷ lệ sorbitol, glycerin và muối ăn

| TT | Ma trận | Sorbitol (%) | Glycerol (%) | Muối (%) | aw    |
|----|---------|--------------|--------------|----------|-------|
| 1  | 0       | 4            | 2            | 3,4      | 0,685 |
| 2  | 0       | 4            | 2            | 3,4      | 0,693 |
| 3  | +0-     | 4,5          | 2            | 3,2      | 0,663 |
| 4  | 0-+     | 4            | 1,5          | 3,6      | 0,694 |
| 5  | 0++     | 4            | 2,5          | 3,6      | 0,69  |
| 6  | 0+-     | 4            | 2,5          | 3,2      | 0,692 |
| 7  | -0+     | 3,5          | 2            | 3,6      | 0,749 |
| 8  | +0+     | 4,5          | 2            | 3,6      | 0,702 |
| 9  | 0       | 4            | 2            | 3,4      | 0,695 |
| 10 | - -0    | 3,5          | 1,5          | 3,4      | 0,682 |
| 11 | -+0     | 3,5          | 2,5          | 3,4      | 0,758 |
| 12 | 0- -    | 4            | 1,5          | 3,2      | 0,625 |
| 13 | 0       | 4,5          | 2,5          | 3,4      | 0,618 |
| 14 | -0-     | 3,5          | 2            | 3,2      | 0,755 |
| 15 | + -0    | 4,5          | 1,5          | 3,4      | 0,649 |



**Hình 6.** Biểu đồ tương quan giữa hoạt độ nước sản phẩm ứng với mô hình và thực tế.



**Hình 7.** Đường đồng mức biểu diễn tương quan giữa hoạt độ nước thịt cừu sấy dẻo và tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn.

thực nghiệm: Từ các tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn tối ưu của sản phẩm thịt cừu sấy dẻo được xác định bằng phương trình của mô hình bề mặt đáp ứng, chúng tôi tiến hành thực nghiệm để kiểm chứng lại các thông số tối ưu, chứng minh tính xác thực của mô hình. Chúng tôi thực nghiệm trên các thông số tối ưu với 3 lần lặp lại, lấy giá trị trung bình, kết quả được trình bày ở Bảng 7 và 8.

**Bảng 7.** Kết quả kiểm chứng giá trị độ ẩm thực nghiệm của quá trình sấy thịt cừu

| Tham số thống kê | Hoạt độ nước sản phẩm thực tế |
|------------------|-------------------------------|
| 1                | 0,655                         |
| 2                | 0,638                         |
| 3                | 0,649                         |
| Hoạt độ nước     | 0,647                         |
| SD               | 0,009                         |

**Bảng 8.** Kiểm chứng giá trị tối ưu từ mô hình bằng thực nghiệm

| Biến độc lập               | Điều kiện |         |
|----------------------------|-----------|---------|
|                            | Mô hình   | Thực tế |
| Hoạt độ nước sản phẩm (aw) | 0,670     | 0,647   |
| Độ lệch chuẩn (SD)         | 0         | 0,009   |

Kết quả cho thấy hoạt độ sản phẩm thịt cừu sấy dẻo có sự khác biệt giữa mô hình và thực tế là 3,38% nhỏ hơn 5%, nên mô hình có giá trị thực tiễn và có thể áp dụng vào thực tế sản xuất.

#### 4. Kết Luận

Thịt cừu sấy dẻo là một sản phẩm mới, các thông số kỹ thuật của qui trình sản xuất cần được nghiên cứu, trong đó quá trình sấy quyết định quan trọng đến chất lượng của sản phẩm. Kết quả nghiên cứu đã xác định được quá trình sấy tối ưu để áp dụng trong thực tế sản xuất, đó là:

Chế độ sấy tối ưu đưa vào sản xuất với nhiệt độ sấy 56°C, thời gian sấy 210 phút ở tốc độ gió 0,24 m/giây.

Tỷ lệ sorbitol, glycerol, muối ăn tối ưu cho quá trình sấy là 4,37% sorbitol, 1,93% glycerol và 3,4% muối ăn.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Aranda, I. D., Casas, E. V., Peralta, E. K., & Elauria, J. C. (2010). Drying janitor fish for feeds in Laguna lake to mitigate pollution potentials. *Journal of Environmental Science and Management* 13(2), 27-43.
- Djendoubi, N., Boudhrioua, N., Bonazzi, C., & Kechaou, N. (2009). Drying of sardine muscles: Experimental and mathematical investigations. *Food and Bioprocess Technology* 87, 115-123.
- Flath, L. E., & Diana, J. S. (1985). Seasonal energy dynamics of the alewife in Southeastern Lake Michigan. *Transactions of the American Fisheries Society* 114, 328-337.
- Gallart-Jornet, L., Barat, J. M., Rustad, T., Erikson, U., Escriche, I., & Fito, P. (2007). Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *Journal of Food Engineering* 80, 267-275.
- Jittinandana, S., Kenney, P. B., Slider, S. D., & Kiser, R. A. (2002). Effect of brine concentration and brining time on quality of smoked rainbow trout fillet. *Journal of Food Science* 67(6), 2095-2099.
- Law, C. L., Chen, H. H. H., & Mujumdar, A. S. (2014). Foods, materials, technologies and risks. *Encyclopedia of Food Safety* (156-167) - Vol. 3. Massachusetts, USA: Academic Press.
- Nguyen, M. V., & Tran, T. T. (2016). Effects of the control of water activity on dried fish made from snake-head fish farmed in Dong Thap province. *Can Tho University Journal of Science* 1, 92-97.
- Nindo, C. I., & Tang, J. (2007). Refractance window dehydration technology: A novel contact drying method. *Drying Technology* 25, 37-48.
- Nketsia-Tabiri, J., & Sefa-Dedeh, S. (1995). Optimization of process, conditions and quality of salted dried tilapia (*Oreochromis niloticus*) using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69(1), 117-127.
- Ofstad, R., Kidman S., & Hermansson, A. M. (1996). Ultramicroscopical structures and liquid loss in heated cod (*Gadus morhua*) and salmon (*Salmo salar*) muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72(3), 337-347.
- Ortiz, J., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Puente-Díaz, L., Zura-Bravo, L., & Aubourg, S. (2013). Influence of air-drying temperature on drying kinetics, colour, firmness and biochemical characteristics of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Chemistry* 139, 162 - 169.
- Prachayawarakorn, S., Soponronnarit, S., Wetchacama, S., & Jaisut, D. (2002). Desorption isotherms and drying characteristics of shrimp in superheated steam and hot air. *Drying Technology* 20, 669-684.

## Chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf

Cang H. Mai\*, Nguyen H. Nguyen, Giao T. Huynh, & Y T. N. Le

Department of Chemical Engineering, Nong Lam University, Ho Chi Minh city, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: July 19, 2018

Revised: December 22, 2018

Accepted: February 28, 2019

#### Keywords

Chlorophyll

*Egyptian Luffa*

*Egyptian Luffa* leaf

#### \*Corresponding author

Mai Huynh Cang

Email: maihuynhcang@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

This study examined factors affecting on chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf for using as food colorant. Optimal conditions for chlorophyll extraction were ethanol 96% for 97 minutes at 49°C and extraction speed at 123 rpm. The quality of extracts was investigated for microorganisms, heavy metals and antioxidant activity by using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method. The free radical scavenging activities of extract presented by the IC<sub>50</sub> value was 261,7 µg/mL.

**Cited as:** Mai, C. H., Nguyen, N. H., Huynh, G. T., & Le, Y. T. N. (2019). Chlorophyll extraction from *Egyptian Luffa* leaf. *The Journal of Agriculture and Development* 18(4), 99-107.

## Nghiên cứu tách chiết Chlorophyll từ lá mướp (*Egyptian Luffa*)

Mai Huỳnh Cang\*, Nguyễn Hồng Nguyên, Huỳnh Thị Giao & Lê Thị Như Ý

Bộ Môn Công Nghệ Hóa Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 19/07/2018

Ngày chỉnh sửa: 22/12/2018

Ngày chấp nhận: 28/02/2019

#### Từ khóa

Chlorophyll  
*Egyptian Luffa*  
Lá mướp

#### \*Tác giả liên hệ

Mai Huỳnh Cang  
Email: maihuynhcang@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết chlorophyll từ lá mướp nhằm ứng dụng tạo màu trong thực phẩm. Điều kiện tối ưu để tách chiết chlorophyll trong lá mướp là chiết ngâm đậm với ethanol 96%, thời gian chiết là 97 phút, nhiệt độ chiết là 49°C, tốc độ khuấy là 123 vòng/phút. Chế phẩm màu được xác định chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng và khả năng kháng oxi hóa bằng phương pháp DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Khả năng bắt gốc tự do của chlorophyll thể hiện qua giá trị IC<sub>50</sub> là 261,7 µg/mL.

### 1. Đặt Vấn Đề

Cây mướp hương (*Egyptian Luffa*) là một loại cây thảo dạng dây leo sống ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, lá đơn dạng mọc cách, phiến lá hình trái xoan, đáy hình tim, mép lá có răng cưa (Nguyen, 2016). Lá mướp khi già được sử dụng để tạo các thực phẩm có màu xanh tương tự như lá dứa, ngoài ra lá mướp còn được sử dụng như một loại thảo dược do chúng có chứa các chất có hoạt tính sinh học, đặc biệt là khả năng kháng khuẩn và kháng oxi hóa. Theo Nguyen (2016), lá mướp có khả năng kháng các loại vi khuẩn như *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Samonela Typhi* do có chứa saponin, alkaloid và glycoside. Thành phần hóa lý trong lá mướp tươi trình bày Bảng 1 (Nguyen, 2016). Chất diệp lục (chlorophyll) là một sắc tố màu xanh lá cây được tìm thấy trong hầu hết tất cả các thực vật, tảo và vi khuẩn *Cyanobacteria*. Chất diệp lục là một sắc tố màu xanh lá cây bao gồm vòng tetrapyrrole với một ion magiê ở trung tâm, nó có một đầu kỵ nước dài là chuỗi phytol trong cấu trúc phân tử (Rajalakshmi & Banu,

2015). Có hai loại chất diệp lục chính là chlorophyll a và chlorophyll b (Hosikian & ctv., 2010). Sự khác biệt giữa hai chất diệp lục này là một nhóm methyl trong chlorophyll a được thay thế bởi một nhóm formyl trong chlorophyll b (Rajalakshmi & Banu, 2015).

Chlorophyll a là sắc tố chính trong thực vật, chúng chuyển đổi năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học thông qua quá trình quang hợp (Costache & ctv., 2012). Vì chlorophyll là các sắc tố xanh có chứa một vòng porphyrin xung quanh các electron tự do nên chúng có thể nhận hoặc cho electron dễ dàng. Vì vậy, sau khi hấp thụ năng lượng của ánh sáng, chlorophyll sẽ cung cấp các electron năng lượng tới một bộ tế bào để bắt đầu quá trình quang hợp (Ridwan & ctv., 2017). Quang hợp là một quá trình sử dụng năng lượng ánh sáng cùng với nước và carbon đioxit để tạo ra oxy và carbohydrate cung cấp cho sự sống trên trái đất (Hosikian & ctv., 2010).

Tính chất lý học quan trọng nhất là chlorophyll có khả năng hấp thụ năng lượng ánh sáng chọn lọc. Quang phổ hấp thụ cực đại của chlorophyll vùng tia xanh ( $\lambda$ : 430 - 460 nm) và vùng ánh

**Bảng 1.** Thành phần hóa lý trong lá mướp tươi<sup>1</sup>

| Trong 100 g lá mướp tươi |                      |                 |                 |                |            |                 |                   |
|--------------------------|----------------------|-----------------|-----------------|----------------|------------|-----------------|-------------------|
| Nước<br>(g)              | Năng lượng<br>(kcal) | Chất đạm<br>(g) | Chất béo<br>(g) | Chất xơ<br>(g) | Tro<br>(g) | Calcium<br>(mg) | Phosphate<br>(mg) |
| 94                       | 14                   | 1,6             | 0,1             | 2,7            | 1,6        | 330             | 33                |

Nguồn: Nguyen (2016).

sáng đỏ ( $\lambda$ : 620 - 700 nm). Chlorophyll dễ bị biến đổi thành pheophytin (có màu olive) trong môi trường acid và nhiệt độ cao do hydro thay vào vị trí nhân Mg (Ngo, 2012).

Hiện nay, chlorophyll được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực như: chất màu tự nhiên trong thực phẩm (Putra & ctv., 2017); tổng hợp trong ngành hóa học và vật lý cho các ứng dụng khác nhau là điện tử, photo-physics, quang điện, điện hóa (Rajalakshmi & Banu, 2015); cung cấp các lợi ích sức khỏe như chống đột biến và chống oxy hóa có vai trò tích cực trong việc phòng - tránh bệnh ung thư (Putra & ctv., 2017). Đặc biệt, với bản chất không độc hại của chlorophyll, tính chất kháng khuẩn và khử mùi nên chlorophyll là một sản phẩm chủ chốt trong điều trị nhiễm trùng miệng, loét mô, khối u, ung thư (Hosikian & ctv., 2010).

Mục tiêu của nghiên cứu là khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách chiết chlorophyll từ lá mướp nhằm mục đích tạo chế phẩm màu tự nhiên dùng trong chế biến biến thực phẩm.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu chính được sử dụng là lá mướp hương (*Egyptian Luffa*) trồng tại Long An. Lá tươi (từ 4 đến 5 tháng, kích thước lá dài 8 - 16 cm, rộng 7 - 20 cm) rửa sạch, sấy khô tại 53°C, xay nhỏ (kích thước 0,5 mm < d < 1 mm), bảo quản trong túi zip ở nhiệt độ phòng (có silicagel hút ẩm).

Hóa chất sử dụng: Ethanol 99%, KI 99,9%, I<sub>2</sub> 99,9%, 1- $\alpha$  naphthol 99,9%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, acid acetic 99%, FeCl<sub>3</sub> 99,9%, NaOH 20%, HCl 36,5%, chloroform 99% có nguồn gốc từ Trung Quốc, được mua tại Công ty TNHH Hóa Chất Bách Khoa, TP. Hồ Chí Minh.

Thiết bị sử dụng: Máy sấy khay (Bộ môn Công nghệ hóa, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh), máy cô quay chân không Stuart RE 300B (Mỹ), máy quang phổ UV-VIS Genesys 20 (Mỹ), cân

điện tử 3 số (Mỹ), bể điều nhiệt Memmert WNB (Đức).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Khảo sát thành phần hóa lý của nguyên liệu lá mướp

Xác định chỉ tiêu hóa lý: độ ẩm (sấy, cân không đổi), hàm lượng tro tổng (TCVN-5253-90), đo màu (máy so màu Lab, Chroma meter CR-400).

#### 2.2.2. Định tính thành phần hóa học nguyên liệu (Chakraborty & ctv., 2017)

Alkaloid: 0,5 mL mẫu + 4 - 5 giọt dung dịch (2 g KI + 1,27 g I<sub>2</sub> + 100 mL H<sub>2</sub>O). Dung dịch phản ứng có màu đỏ nâu.

Carbohydrates: Hòa tan 3,75 g 1- $\alpha$  naphthol + 25 mL ethanol 99% + 2 mL mẫu + 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vào ống nghiệm sau đó trộn dung dịch, để yên 2-3 phút. Dung dịch phản ứng tách thành 2 màu đỏ và tím.

Glycoside: 5 mL mẫu + 2 mL acid acetic + 1 giọt FeCl<sub>3</sub> sau đó thêm từ từ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc. Dung dịch phản ứng có vùng màu nâu bề mặt.

Flavanoid: 2 mL mẫu + vài giọt NaOH 20%. Dung dịch phản ứng có màu vàng và bị mất màu khi thêm HCl loãng.

Phenol: 1 phần mẫu + dung dịch FeCl<sub>3</sub> 5%. Dung dịch phản ứng có màu xanh đậm hoặc đen.

Tannins: 2 mL mẫu + 1 mL HCl 1%. Sau phản ứng có kết tủa đỏ.

Saponin: 2 mL mẫu + 6 mL H<sub>2</sub>O lắc mạnh dung dịch. Xuất hiện dịch khoảng 5 phút.

Terpenoids: 1 mL Chloroform + 2 mL mẫu + vài giọt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc. Sau phản ứng có kết tủa nâu hơi đỏ.

#### 2.2.3. Khảo sát quá trình tách chiết chlorophyll trong lá mướp

Chiết chlorophyll trong lá mướp bằng phương pháp ngâm dầm, nguyên liệu khô có kích thước

từ 0,5 mm < d < 1 mm. Tỷ lệ nguyên liệu/dung môi là 1/30. Khảo sát hàm lượng chiết chlorophyll khi thay đổi các yếu tố độ ẩm nguyên liệu (sau thời gian sấy 3 giờ, 5 giờ, 7 giờ và 8 giờ), nồng độ dung môi (ethanol 99,5, 96, 80 và 70%, v/v), nhiệt độ chiết (nhiệt độ phòng, 40 và 50°C), tốc độ khuấy (50, 100, 300 và 500 vòng/phút) và thời gian khuấy (30, 60, 90 và 120 phút).

Dùng phương pháp trắc quang UV – VIS để xác định hàm lượng chlorophyll trong dịch chiết. Sau khi cô quay chân không để đuổi dung môi, chất khô sẽ được đem pha loãng để tiến hành đo quang. Lấy 2,5 ml dịch chiết pha loãng cho vào cuvet có kích thước 12,5 × 12,5 × 45 mm. Hệ số A nếu không vượt quá 2 sẽ được chấp nhận. Hàm lượng chlorophyll được tính theo phương pháp đo quang phổ kế UV-Vis.

#### 2.2.4. Phương pháp bề mặt đáp ứng (response surface methodology) – kiểu quay tâm

Ba thông số của quá trình chiết: Thời gian khuấy ( $X_1$ ), nhiệt độ khuấy ( $X_2$ ) và tốc độ khuấy ( $X_3$ ). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu trục tâm quay (Rotatable Central Composite Design) với 15 thí nghiệm để xác định ảnh hưởng của các yếu tố và tối ưu hóa quá trình chiết chlorophyll a.

Phương trình tổng quát:  $Y = aX_1^2 + bX_2^2 + cX_3^2 + abX_1X_2 + acX_1X_3 + bcX_2X_3$ .

Trong đó: a, b, c lần lượt là hệ số của các thông số  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ; Y là hàm lượng chlorophyll.

#### 2.2.5. Xác định các chỉ tiêu vi sinh vật, kim loại nặng của màu chlorophyll

Chế phẩm chlorophyll được đem đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật (*E. Coli*, *Salmonella*), kim loại nặng (Pb, Hg), vi sinh vật hiếu khí theo tiêu chuẩn 46/2007 QĐ-BYT.

#### 2.2.6. Khảo sát khả năng kháng oxi hóa của chlorophyll theo phương pháp DPPH

Theo cơ chế bắt gốc tự do sẽ chuyển gốc tự do DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) từ màu tím sang vàng nhạt. Xác định khả năng bắt gốc tự do của chất nghiên cứu bằng phương pháp đo độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng  $\lambda = 517$  nm. Ascorbic acid được sử dụng làm chất đối chiếu.

Phần trăm bắt gốc tự do DPPH của chất nghiên cứu được tính theo công thức sau:

$$Q(\%) = \left(1 - \frac{A - A_c}{A_0 - A_c}\right) \times 100$$

Trong đó:

A là độ hấp thụ của dung dịch chứa mẫu thử

$A_0$  là độ hấp thụ của DPPH khi không có mẫu

$A_c$  là độ hấp thụ của dung dịch chứa chất đối chiếu

Giá trị  $IC_{50}$  được tính bằng phần mềm Graph-Pad Prism thông qua đường chuẩn phần trăm ức chế (đường chuẩn được xây dựng từ 6 nồng độ khác nhau).

#### 2.2.7. Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán bằng phần mềm thống kê Statgraphics centurion XV để xác định độ ảnh hưởng của các yếu tố lên hàm lượng chlorophyll ở độ tin cậy 95%, sự khác biệt giữa các nghiệm thức thông qua bảng LSD. Sau khi thực hiện tất cả các thí nghiệm sơ bộ, tiến hành bố trí thí nghiệm tối ưu trục tâm quay Rotatable Central Composite Design để chọn ra điều kiện chiết chlorophyll phù hợp nhất.

### 3. Kết Quả và Thảo Luận

#### 3.1. Định tính thành phần hóa học nguyên liệu

Kết quả trong Bảng 2 cho thấy trong dịch chiết lá mướp có chứa alkaloid, glycoside và saponin. Alkaloid và glycoside là những thành phần tạo vị đắng cho lá mướp, saponin là thành phần được lý có hoạt tính sinh học giúp tạo nên được tính cho lá mướp. Hàm lượng tro tổng trong lá mướp nguyên liệu khoảng 2.5%. Độ ẩm theo cơ sở ướt là 79,9% (Bảng 3)

**Bảng 2.** Định tính thành phần hóa học trong dịch chiết lá mướp

| Thành phần    | Có | Không |
|---------------|----|-------|
| Alkaloid      | X  |       |
| Carbohydrates |    | X     |
| Glycoside     | X  |       |
| Flavanoid     |    | X     |
| Phenol        |    | X     |
| Tannins       |    | X     |
| Saponin       | X  |       |
| Terpenoids    |    | X     |
| Quinones      |    | X     |
| Oxalate       |    | X     |

**Bảng 3.** Các thành phần khác trong lá mướp tươi

| Thành phần khác    |          | Hàm lượng         |              |             |
|--------------------|----------|-------------------|--------------|-------------|
| Hàm lượng tro tổng |          | 2,598% $\pm$ 0.55 |              |             |
| Độ ẩm (wb)         |          | 79,9% $\pm$ 2.85  |              |             |
| Đo màu             | Mặt đậm  | L* = 37,297       | a* = -10,077 | b* = 15,137 |
|                    | Mặt nhạt | L* = 48,467       | a* = -11,077 | b* = 18,580 |

**Bảng 4.** Hàm lượng chlorophyll trong lá mướp so với các nguyên liệu giàu chlorophyll phổ biến khác

| Nguyên liệu                        | Lượng chlorophyll (mg/g) |
|------------------------------------|--------------------------|
| Lá mướp                            | 4,31                     |
| Lá dứa (Le, 2000)                  | 4,91                     |
| Súp lơ xanh (Garcia & ctv., 2000)  | 2,95                     |
| Tảo Spirulina (Duong & ctv., 2010) | 1,0                      |
| Rau bina (Le, 2014)                | 6,98                     |

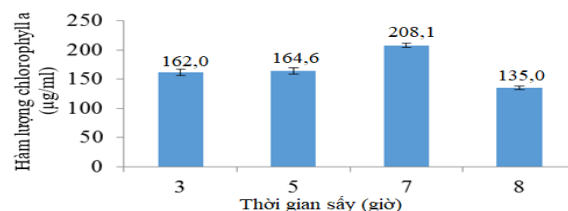
**Bảng 5.** Kết quả độ ẩm lá mướp sau khi sấy

| Thời gian sấy (giờ) | 3                | 5                | 7                | 8                | 9                |
|---------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Độ ẩm (%)           | 35,08 $\pm$ 1,05 | 30,92 $\pm$ 1,22 | 24,23 $\pm$ 0,95 | 20,12 $\pm$ 1,06 | 20,01 $\pm$ 0,85 |

Bảng 4 cho thấy, hàm lượng chlorophyll trong lá mướp là khoảng 4,31 mg/g, tương đương với lá dứa (là loại lá có hàm lượng chlorophyll cao phổ biến, thường được dùng để tạo màu trong chế biến thực phẩm). Hiện nay xu hướng chiết chlorophyll từ tảo biển khá phổ biến do lượng chlorophyll chiết được cao đồng thời không qua giai đoạn tinh sạch phức tạp, tuy nhiên việc dùng lá mướp chiết chlorophyll có thể tận dụng nguồn nguyên liệu rẻ tiền sẵn có giúp nâng cao hiệu quả kinh tế của cây mướp hương.

Hình 1 & Bảng 5 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo thời gian sấy và độ ẩm nguyên liệu. Thời gian sấy 8h (độ ẩm khoảng 20,12%), hàm lượng chlorophyll bắt đầu giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy thời gian sấy ảnh hưởng có ý nghĩa lên hàm lượng chlorophyll ở độ tin cậy 95%. Hàm lượng chlorophyll cao nhất ở thời gian sấy 7 giờ và khác biệt có ý nghĩa so với các thời gian sấy khác ( $P < 0,05$ ). Chọn thời gian sấy 7 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo. Nếu tiếp tục sấy lên 8 giờ thì hàm lượng chlorophyll a bắt đầu giảm vì chlorophyll dễ bị phân hủy ở nhiệt độ trên 50°C khi sấy trong thời gian dài và hàm lượng acid có trong dịch bào của lá kết hợp với nhiệt độ cao làm chlorophyll chuyển hóa thành pheophytin (có màu xanh olive). Ngược lại, với thời gian sấy thấp hơn 7 giờ thì độ ẩm của nguyên liệu còn cao làm giảm hiệu suất tách chlorophyll; đồng thời, độ ẩm cao còn là nguyên nhân góp

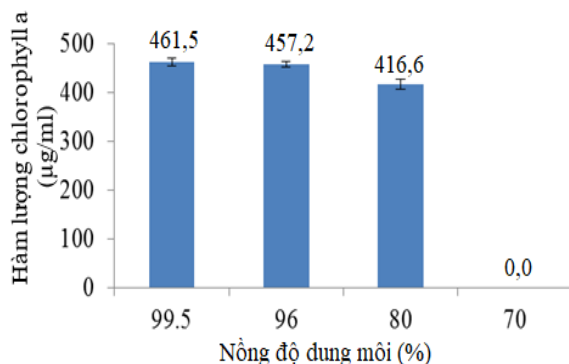
phần đẩy nhanh quá trình oxy hóa chlorophyll trong nguyên liệu (Putra & ctv., 2017).


**Hình 1.** Ảnh hưởng của thời gian sấy đến hàm lượng chlorophyll a.

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ dung môi tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 2 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo nồng độ dung môi và ở nồng độ ethanol 96% thì hàm lượng chlorophyll bắt đầu giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của nồng độ dung môi lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ( $P < 0,05$ ), hàm lượng chlorophyll ở nồng độ 99,5% là cao nhất nhưng do khác biệt không ý nghĩa với nồng độ 96% ở độ tin cậy 95% nên chọn ethanol 96% làm dung môi cho các thí nghiệm sau. Nồng độ ethanol càng cao, lượng nước trong dung môi ít, độ phân cực của dung môi giảm nên chlorophyll dễ dàng ra khỏi nguyên liệu. Ethanol 70% có hàm lượng nước khá

cao (chiếm 42% thể tích) nên mẫu bị oxi hóa do oxi trong nước sẽ phản ứng với chlorophyll khi tiếp xúc trong thời gian dài sẽ làm mẫu chiết có màu ngả sang vàng nên không tiến hành xác định hàm lượng chlorophyll.



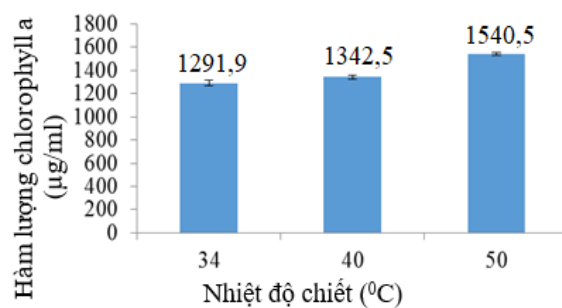
**Hình 2.** Ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến hàm lượng chlorophyll a.

### 3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết tới hàm lượng chlorophyll a thu được

Hình 3 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo nhiệt độ và tăng ở nhiệt độ 50°C. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của nhiệt độ lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ( $P < 0,05$ ), hàm lượng chlorophyll ở 50°C là cao nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Ở 60°C thì chlorophyll bắt đầu chuyển sang màu vàng do chlorophyll chuyển thành pheophytin, nên thí nghiệm chỉ dừng lại ở nhiệt độ 50°C để đảm bảo chlorophyll không bị biến đổi. Nhiệt độ tăng, quá trình thẩm thấu dung môi vào thành tế bào và hòa tan chlorophyll vào dung môi diễn ra nhanh hơn, đồng thời quá trình khuếch tán chlorophyll ra khỏi vách tế bào sẽ diễn ra nhanh hơn làm cho lượng chlorophyll thu được càng nhiều.

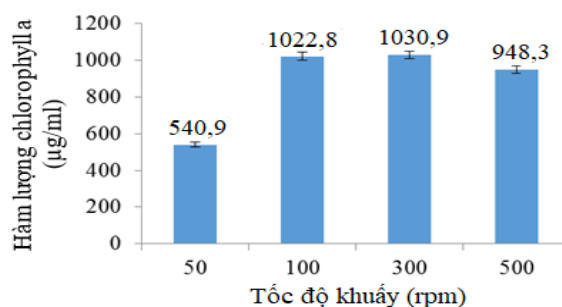
### 3.4. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 4 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo tốc độ khuấy và ở tốc độ khuấy 500 vòng/phút hàm lượng chlorophyll giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của tốc độ khuấy lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ( $P < 0,05$ ), hàm lượng chlorophyll ở tốc độ khuấy 300 rpm là cao nhất nhưng



**Hình 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ chiết đến hàm lượng chlorophyll a.

do khác biệt không có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% với tốc độ khuấy 100 rpm nên chọn 100 rpm cho các thí nghiệm tiếp theo. Tốc độ khuấy càng tăng hàm lượng chlorophyll thu được càng cao do nhiệt độ cao thì các phân tử hạt di chuyển nhanh hơn làm tăng khả năng thẩm thấu qua thành tế bào. Khi tăng tốc độ khuấy lên 500 rpm thì lượng chlorophyll bắt đầu giảm do tốc độ khuấy cao 1 phần chlorophyll sẽ bị oxi hóa, 1 phần do độ nhớt của dịch tăng làm giảm hiệu quả chiết màu.



**Hình 4.** Ảnh hưởng của tốc độ khuấy đến hàm lượng chlorophyll a.

### 3.5. Ảnh hưởng của thời gian khuấy tới hàm lượng chlorophyll thu được

Hình 5 cho thấy hàm lượng chlorophyll thay đổi theo thời gian khuấy và ở thời gian khuấy 120 phút thì hàm lượng chlorophyll giảm. Kết quả phân tích ANOVA cho thấy ảnh hưởng của thời gian khuấy lên hàm lượng chlorophyll là có ý nghĩa ở độ tin cậy 95% ( $P < 0,05$ ), hàm lượng chlorophyll ở 90 phút là cao nhất và khác biệt ý nghĩa ở độ tin cậy 95%. Thời gian khuấy càng lâu sẽ làm tăng thời gian tiếp xúc giữa nguyên liệu và dung môi nên hàm lượng chlorophyll thu được

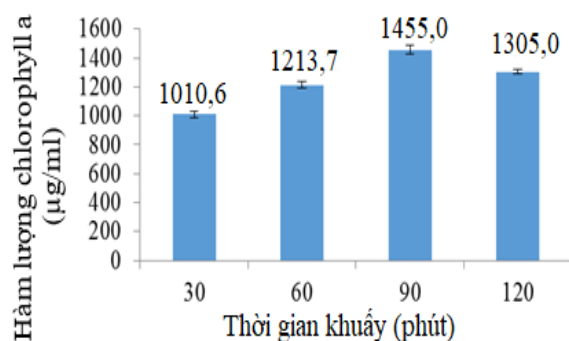
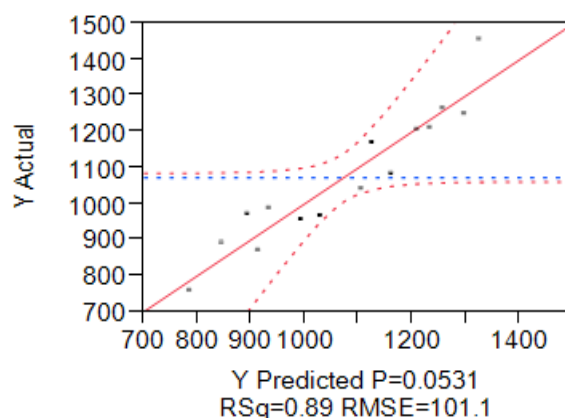
**Bảng 6.** Sự ảnh hưởng của các yếu tố tối ưu lên hàm lượng chlorophyll

| Term                            | Estimate  | Std Error | t Ratio | Prob >  t |
|---------------------------------|-----------|-----------|---------|-----------|
| Intercept                       | 1.322,191 | 54,339    | 24,33   | < ,0001*  |
| Thời gian khuấy (60, 120)       | 325,835   | 3.197,027 | 1,02    | 0,3549    |
| Nhiệt độ khuấy (45, 55)         | -485,252  | 3.197,027 | -1,52   | 0,1895    |
| Tốc độ khuấy (0, 200)           | 90,1415   | 3.197,027 | 2,82    | 0,0371*   |
| Thời gian khuấy*Nhiệt độ khuấy  | 983,225   | 3.574,384 | 0,28    | 0,7943    |
| Thời gian khuấy*Tốc độ khuấy    | -118,745  | 3.574,384 | -0,33   | 0,7532    |
| Nhiệt độ khuấy*Tốc độ khuấy     | -28,388   | 3.574,384 | -0,79   | 0,4631    |
| Thời gian khuấy*Thời gian khuấy | 5.741,772 | 6.304,622 | -0,91   | 0,4042    |
| Nhiệt độ khuấy*Nhiệt độ khuấy   | 1.130,852 | 6.304,622 | -1,79   | 0,1328    |
| Tốc độ khuấy*Tốc độ khuấy       | 203,7637  | 6.304,622 | -3,23   | 0,0232*   |

**Bảng 7.** Kết quả tối ưu

| Yếu tố                      | Giá trị đề xuất   | Giá trị làm tròn |
|-----------------------------|-------------------|------------------|
| Thời gian khuấy (60,120)    | 97,198794         | 97               |
| Nhiệt độ khuấy (45,55)      | 48,834786         | 49               |
| Tốc độ khuấy (0,200)        | 123,04329         | 123              |
| Giá trị chlorophyll dự đoán | 1342,1403         |                  |
| Giá trị chlorophyll thực    | 1294,229 ± 14,305 |                  |

càng cao.

**Hình 5.** Ảnh hưởng của thời gian khuấy đến hàm lượng chlorophyll a.**Hình 6.** Phương trình hồi quy.

$$Y = 1.322,191 + 90,1415X_3 - 203,7637X_3^2$$

### 3.6. Tối ưu hóa điều kiện chiết chlorophyll a

Phương trình hồi quy giữa hiệu suất tách chiết chlorophyll với thời gian khuấy, nhiệt độ khuấy và tốc độ khuấy với hệ số tương quan  $R^2 = 0,89$  cho thấy chúng có tương quan chặt chẽ (Hình 6).

Bảng 6 cho ta thấy tốc độ khuấy ( $X_3$ ) ảnh hưởng có ý nghĩa tới hàm lượng chlorophyll, thời gian khuấy và nhiệt độ khuấy ảnh hưởng không có ý nghĩa. Phương trình đáp ứng hàm lượng chlorophyll như sau:

Hàm lượng chlorophyll sau khi tiến hành thí nghiệm thực tế có độ chênh lệch 3,57% (không vượt quá 5%) so với hàm lượng chlorophyll dự đoán (Bảng 7). Vì vậy các giá trị thời gian, nhiệt độ và tốc độ khuấy tối ưu để đạt hàm lượng chlorophyll cao nhất lần lượt là 97 phút, 49°C và 123 vòng/phút.

### 3.7. Khảo sát thành phần hóa lý thành phẩm

Bảng 8 cho thấy thành phẩm có màu xanh nhạt và tốt hơn lá tươi. Quá trình chiết và cô quay loại

**Bảng 8.** Kết quả đo màu Lab của thành phẩm

|                       |          | L*     | a*      | b*     |
|-----------------------|----------|--------|---------|--------|
| Cao chiết chlorophyll |          | 36,97  | 0,28    | 1,52   |
| Lá tươi               | Mặt đậm  | 37,297 | -10,077 | 15,137 |
|                       | Mặt nhạt | 48,467 | -11,077 | 18,58  |

**Bảng 9.** Định tính thành phần hóa học trong dịch chiết lá mướp

| Thành phần                                 | Kết quả               |
|--------------------------------------------|-----------------------|
| Glycoside                                  | Không                 |
| Saponin, Alkaloid                          | Có                    |
| Độ ẩm                                      | 74,47% $\pm$ 2,55     |
| Hàm lượng chlorophyll ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 1423,069 $\pm$ 22,422 |

**Bảng 10.** Kết quả đo hàm lượng vi sinh vật và kim loại nặng

| TT | Chỉ tiêu                        | Đơn vị   | Kết quả                 | Phương pháp thử nghiệm | Giới hạn cho phép |
|----|---------------------------------|----------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| 1  | Chì (Pb)                        | mg/kg    | Âm tính<br>(LOD = 0,01) | AOAC<br>999.11(*)      | 2,0<br>mg/kg      |
| 2  | Thủy ngân (Hg)                  | mg/kg    | Âm tính<br>(LOD = 0,01) | AOAC<br>971.21         | 0,05<br>mg/kg     |
| 3  | Tổng số vi khuẩn hiếu khí       | CFU/g    | $2,1 \times 10^4$       | ISO<br>4833-1:2013     | $10^4$ /g         |
| 4  | Escherichia Coli                | CFU/g    | Âm tính                 | ISO<br>16649-2:2001    | 3/g               |
| 5  | Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc | CFU/g    | Âm tính                 | ISO<br>21527-2:2008    | $10^2$ /g         |
| 6  | Salmonella                      | CFU/25 g | Âm tính<br>(LOD = 0,01) | ISO<br>6579-1:2017     | Không<br>có       |

dung môi làm cho chlorophyll bị oxy hóa và biến đổi một phần thành pheophytin nên thành phẩm sẽ có màu vàng chiếm ưu thế hơn màu xanh.

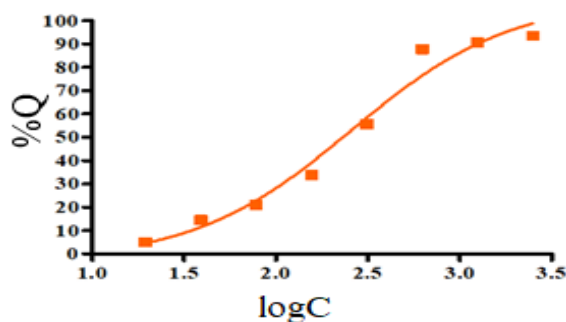
Bảng 9 cho thấy sau quá trình cô quay thì trong thành phẩm chỉ còn lại saponin và alkaloid, glycoside mất đi trong quá trình cô quay dựa trên phương pháp định tính màu (Chakraborty & ctv., 2017). Độ ẩm thành phẩm xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ sấy là  $53^{\circ}\text{C}$ , cân khối lượng không đổi và giá trị độ ẩm là  $74,47\% \pm 2,55$ . Hàm lượng chlorophyll trong thành phẩm xác định bằng phương pháp UV-VIS, nhận thấy hàm lượng chlorophyll là  $1423,069 \pm 22,422 \mu\text{g/mL}$ .

Bảng 10 cho thấy trong thành phẩm không phát hiện Hg, Pb, E.Coli, Salmonella, nấm men, nấm mốc. Tổng số vi khuẩn hiếu khí phát hiện nằm trong giới hạn cho phép theo QĐ 46/2007 – BYT.

### 3.8. Xác định khả năng kháng oxi hóa của mẫu theo phương pháp DPPH

Mẫu Chlorophyll :  $\text{IC}_{50} = 261,7 \pm 2,108 \mu\text{g/mL}$ ;  
Vitamin C :  $\text{IC}_{50} = 16,37 \pm 1,458 \mu\text{g/mL}$

$\text{IC}_{50}$  là nồng độ của dịch chiết khử được 50% gốc tự do DPPH ở điều kiện xác định. Giá trị  $\text{IC}_{50}$  càng thấp thì hoạt tính khử gốc tự do DPPH càng cao. Khả năng kháng oxi hóa của sản phẩm chlorophyll ( $\text{IC}_{50} = 261,7 \mu\text{g/mL} = 0,262 \text{ mg/mL}$ ) thấp hơn gần 16 lần so với vitamin C ( $\text{IC}_{50} = 0,0164 \text{ mg/mL}$ ), cao hơn so với lá chùm ngây ( $\text{IC}_{50} = 0,537 \text{ mg/mL}$ ) (Phan & Nguyen, 2016). Biểu đồ phần trăm bất gốc tự do DPPH theo nồng độ chlorophyll thể hiện ở Hình 7.



**Hình 7.** Biểu đồ phần trăm bắt gốc tự do DPPH theo nồng độ chlorophyll.

#### 4. Kết Luận

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chiết chlorophyll từ lá mướp bao gồm: ngâm chiết bằng ethanol 96%, tốc độ khuấy là 123 vòng/phút, thời gian chiết là 97 phút, nhiệt độ chiết ở 49°C là phù hợp nhất. Màu xanh chlorophyll thành phẩm có độ ẩm khoảng 74,47%. Các nghiên cứu tiếp theo cần làm giảm độ ẩm của cao chlorophyll và theo dõi chất lượng sản phẩm theo thời gian bảo quản. Kết quả đánh giá các chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại nặng ta nhận thấy chế phẩm màu xanh chlorophyll đạt các chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại nặng (Pb, Hg) theo quyết định của Bộ Y tế 46/2007 QĐ – BHYT. Ngoài ra nghiên cứu cũng khảo sát khả năng kháng oxy hóa của màu xanh chlorophyll từ lá mướp với giá trị  $IC_{50} = 261,7 \mu\text{g/mL}$

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Chakraborty, S., Sahoo, S., Anjana, B., & Dixit, S. (2017). Studies on antimicrobial activity, phytochemical screening tests, biochemical evaluation of *Clitoria ternatea* linn. *Plant extracts* 5(10), 197-208.
- Costache, A. M., Campeanu, G., & Neata, G. (2012). Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables. *Romanian Biotechnological Letters* 17, 7702-7708.
- Duong, L. T., Le, H. T., & Vu, T. T. (2010). Functional food - sustainable health, Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.
- Garcia, C., Martinez, T., & Lopez A. (2000). Measurement of chlorophyll contents in broccoli using spectrophotometer. *Journal of Science and Food Agriculture* 45(2), 456-460.
- Hosikian, A., Lim, S., Halim, R., & Danquah, M. K. (2010). Chlorophyll extraction from microalgae: A Review on the process engineering aspects. *International Journal of Chemical Engineering* 39, 32-44.
- Le, H. M. (2014). *Canned food technology*. (Unpublished master's thesis). University of Science, Ha Noi, Vietnam.
- Le, N. T. V. (2000). *Procedures for collection of Chlorophyll from pandan leaves*. (Unpublished master's thesis). HUTECH University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Nguyen, V. T. (2016). *Herbal garden: luffa aegyptiaca*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Tre Publishing House.
- Phan, T. T. B., & Nguyen, M. T. D. (2006). Study of antioxidant activity on leaves and stem of *Moringa oleifera*. *Can Tho University Journal of Science* 3, 179-184.
- Putra, M. D., Darmawan, A., Wahdini, I., & Abasaeed, E. A. (2017). Extraction of chlorophyll from pandan leaves using ethanol and mass transfer study. *Journal of the Serbian Chemical Society* 82, 921-931.
- Rajalakshmi, K., & Banu, N. (2015). Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *International Journal of Science and Research* 4, 209-212.
- Ridwan, A. M., Noor E., Rusli S. M., & Akhiruddin M. (2017). Introductory Study towards the extraction of chlorophyll pigment from *Sargassum*. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 35, 211-221.