

BAN BIÊN TẬP TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

STT	Họ tên	Đơn vị	Nhiệm vụ
I Thành viên trong nước			
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 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 Tại 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
II Thành viên nước ngoài			
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 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, Pháp	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	Phạm Thị Kim Ngân	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 Isolation and identification of lactic acid bacteria from vegetable-growing soils in Da Lat, Lam Dong
Vuong V. Le, Hai T. Pham, Nguyen T. T. Nguyen, Mai T. N. Dang, Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien
- Phân lập và xác định vi khuẩn lactic từ đất trồng rau tại Đà Lạt, Lâm Đồng
Lê Văn Vương, Phạm Thiên Hải, Nguyễn Thị Thảo Nguyễn, Đặng Thị Ngọc Mai, Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh
- 10 Effect of nitrogen levels on growth and development of three Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) cultivars pot-planted in Ho Chi Minh City
Duong T. T. Pham, Duong H. A. Pham, Huong T. K. Nguyen, Lieu T. Nguyen, & Bao D. Nguyen
- Ảnh hưởng của lượng đạm đến sinh trưởng và phát triển ba giống hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) trồng chậu tại Thành phố Hồ Chí Minh
Phạm Thị Thùy Dương, Phạm Hoàng Ánh Dương, Nguyễn Thị Kim Hương, Nguyễn Thị Liễu & Nguyễn Đức Bảo
- 18 Effects of phosphorus fertilizer on growth, yield and quality of coconut at early reproductive stage under saline intrusion condition in Mekong Delta
Tri D. H. Nguyen, Nong C. Le, Thu N. Q. Thai, Thang Q. Luu, & Chuong D. X. Nguyen
- Ảnh hưởng của phân lân đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng dừa ở đầu giai đoạn kinh doanh trong điều kiện xâm nhập mặn tại đồng bằng sông Cửu Long
Nguyễn Đoàn Hữu Trí, Lê Công Nông, Thái Nguyễn Quỳnh Thư, Lưu Quốc Thắng & Nguyễn Đức Xuân Chương
- Công nghệ sinh học (Biotechnology)**
- 28 Phytochemical analysis of *Ardisia silvestris* leaf extracts and their antioxidant and antibacterial activities
Biet V. Huynh, Phuong N. T. Nguyen, Nga T. T. Nguyen, Toan Q. Truong, & Hong C. V. Phung
- Phân tích thành phần hóa thực vật và xác định khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết từ lá của cây khô nhung (*Ardisia silvestris* Pitard)
Huỳnh Văn Biết, Nguyễn Thị Ngọc Phương, Nguyễn Thị Thanh Nga, Trương Quang Toàn & Phùng Võ Cẩm Hồng

- 36 Synthesis and transfer of RNAi construct for potential knock-down of gene expression of root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) to rice (*Oryza sativa* L.)
Phong V. Nguyen, Phuong T. Nguyen, Nhi T. Y. Le, & Loan T. N. Nguyen

Tổng hợp và chuyển cấu trúc RNAi có khả năng bất hoạt gene tuyến trùng sùng rễ (*Meloidogyne graminicola*) vào cây lúa (*Oryza sativa* L.)
Nguyễn Vũ Phong, Nguyễn Thế Phương, Lê Thị Yến Nhi & Nguyễn Thị Ngọc Loan

Môi trường và Tài nguyên (Environmental and Natural Resources)

- 45 Assessment of salinity intrusion in coastal districts of Ben Tre province using Landsat 8 image
Lam N. Le, Trung V. Le, & Thinh V. Tran

Ứng dụng ảnh Landsat 8 đánh giá xâm nhập mặn các huyện ven biển thuộc tỉnh Bến Tre
Lê Ngọc Lâm, Lê Văn Trung & Trần Văn Thịnh

Công nghệ thực phẩm (Food Science and Technology)

- 56 Alcoholic fermentation of red flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*)
Binh Q. Hoang, & Diep T. N. Duong

Nghiên cứu lên men rượu thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*)
Hoàng Quang Bình & Dương Thị Ngọc Diệp

- 64 Antimicrobial activity of essential oils on food pathogens
Ngoc T. A. Tong, Tu C. Nguyen, & Ha C. Nguyen

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu đối với một số loại vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm
Tống Thị Ánh Ngọc, Nguyễn Cẩm Tú & Nguyễn Công Hà

- 73 Screening of factors influencing the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme as a catalyst
Cuong V. Bui, Kim Chi T. Nguyen, & Dong X. Bui

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex
Bùi Việt Cường, Nguyễn Thị Kim Chi & Bùi Xuân Đông

- 80 Microencapsulation of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil in Ca-Alginate bead produced through Jetcutter
Vinh Truong, Phuong N. M. Ta, & Phuong T. Nguyen

Vi bọc dầu gấc (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) trong hạt Ca-Alginate sản xuất từ thiết bị tia cắt
Trương Vinh, Tạ Ngọc Minh Phương & Nguyễn Thanh Phương

Isolation and identification of lactic acid bacteria from vegetable-growing soils in Da Lat, Lam Dong

Vuong V. Le, Hai T. Pham, Nguyen T. T. Nguyen, Mai T. N. Dang,
Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien*

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

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: December 20, 2019

Revised: May 12, 2020

Accepted: June 25, 2020

Keywords

Antibacterial

Antifungi

Isolation

Lactic acid bacteria

Vegetable-growing soil

*Corresponding author

Bien Thi Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have been used for decades in agriculture to improve soils, control disease and promote plant growth. LAB have been isolated from fermented food, milks and plants, however, a few studies of LAB from soils have been reported. This study aimed to isolate, screen and identify LAB from vegetable-growing soils collected from Da Lat (Lam Dong province). From 33 soil samples, 25 LAB isolates were selected on MRS agar supplemented with 1% CaCO₃. The LAB isolates formed small, creamy white, convex, entire margin colonies, and were Gram-positive, catalase-negative and rod-shaped bacteria. Based on the acid-producing capacity, five LAB isolates (DT2, CT3, CC2, XL7 and S2) that produced clear zones around colonies due to the solubilization of CaCO₃ with diameters ranged from 1.03 – 1.33 cm, and 11.8 – 14.3 mg/mL acid after 2-day incubation at 30°C. All selected LAB isolates showed the capacity to inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* at level 1 (inhibitory rates in range of 10.66 – 19.96%), and *Phytophthora* sp. at level 3 (inhibitory rates in range of 50.86 – 57.44%) after 3 days. The isolates did not inhibit against *E. coli* and *Staphylococcus* but inhibit the growth of *Bacillus spizizenii* and *Salmonella typhi* with average inhibition diameters in range of 3.33 – 4.90 mm and 2.43 – 3.37 mm, respectively, after 1-day incubation. The five LAB isolates were molecularly determined to be *Lactobacillus plantarum* with 97 – 100% similarities.

Cited as: Le, V. V., Pham, H. T., Nguyen, N. T. T., Dang, M. T. N., Nguyen, P. V., & Bien, T. T. L. (2020). Isolation and identification of lactic acid bacteria from vegetable-growing soils in Da Lat, Lam Dong. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 1-9.

Phân lập và xác định vi khuẩn lactic từ đất trồng rau tại Đà Lạt, Lâm Đồng

Lê Văn Vương, Phạm Thiên Hải, Nguyễn Thị Thảo Nguyên, Đặng Thị Ngọc Mai,
Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh*

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: 20/12/2019

Ngày chỉnh sửa: 12/5/2019

Ngày chấp nhận: 25/06/2020

Từ khóa

Đất trồng rau
Kháng khuẩn
Kháng nấm
Phân lập
Vi khuẩn lactic

*Tác giả liên hệ

Biện Thị Lan Thanh
Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic (lactic acid bacteria, LAB) được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, có tác dụng trong việc cải tạo đất, kiểm soát sinh học, phòng trừ bệnh và kích thích tăng trưởng cây trồng. LAB đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như trên thực vật và các sản phẩm lên men chua truyền thống. Tuy nhiên, các nghiên cứu về LAB trong đất còn hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng LAB có hoạt tính sinh học cao từ mẫu đất trồng rau có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học góp phần phát triển nền nông nghiệp bền vững. Từ 33 mẫu đất trồng rau thu thập tại thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng) đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn lactic. Các chủng phân lập có khuẩn lạc nhỏ, tròn, lồi, màu trắng đục, bờ đều, tế bào hình que ngắn kết đôi hoặc xếp chuỗi, Gram dương, catalase âm tính. Dựa vào khả năng sinh acid lactic, đã chọn được 05 chủng LAB (kí hiệu DT2, CT3, CC2, XL7 và S2) có khả năng sinh acid mạnh với đường kính vòng phân giải CaCO_3 trên đĩa thạch MRS từ 1,03 – 1,33 cm và sinh 11,8 – 14,3 mg/mL acid sau 2 ngày ủ ở 30°C. Tất cả các dòng LAB tuyển chọn có khả năng kháng *Fusarium oxysporum* ở mức độ 1 với tỉ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96% và kháng *Phytophthora* sp. ở mức độ 3 với tỉ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44% sau 3 ngày. Các dòng LAB không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *Staphylococcus aureus*, nhưng kháng với *Bacillus spizizenii* và *Salmonella typhi* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt 3,33 – 4,90 mm và 2,43 – 3,37 mm sau 1 ngày ủ. Các dòng LAB tuyển chọn có trình tự 16S rRNA tương đồng 97 – 100% với *Lactobacillus plantarum*.

1. Đặt Vấn Đề

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria, LAB) có mặt khắp nơi trong tự nhiên, có nhiều ứng dụng trong cải thiện sức khỏe con người và vật nuôi, và được xem là an toàn (generally recognized as safe, GRAS) (Stiles, 1996). Nhiều loài LAB đã được chứng minh là có khả năng sản xuất các hợp chất chống lại các vi sinh vật gây bệnh (Chaurasia & ctv., 2005). LAB trong môi trường tự nhiên được xem như là tác nhân kiểm soát sinh học, cải tạo

đất, cung cấp dinh dưỡng, chống lại các vi khuẩn và nấm gây bệnh cây trồng, kích thích nảy mầm hoặc tăng trưởng cây trồng và làm giảm stress do các yếu tố phi sinh học (abiotic stress) (Lamont & ctv., 2017). Việc sử dụng LAB trong cải tạo đất, kiểm soát bệnh hại, tăng trưởng cây trồng, tăng năng suất, bảo quản nông sản thực phẩm sau thu hoạch là xu hướng tiềm năng để làm giảm hoặc thay thế các loại phân bón, thuốc trừ sâu và các chất bảo quản hóa học ảnh hưởng sức khỏe con người và vật nuôi. Trong các nghiên cứu trước

đây, rất nhiều dòng LAB đã được phân lập từ sữa và các sản phẩm lên men chua truyền thống. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập vi khuẩn trong đất còn rất hạn chế, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu chứng minh có sự tồn tại của LAB trong đất (Suzuki & Yamasato 1994; Yanagida & ctv., 1997; Chen & ctv., 2005).

Đề tài được tiến hành nhằm tuyển chọn các dòng LAB trong đất trồng rau có hoạt tính đối kháng đối với vi khuẩn và nấm gây bệnh gây trồng. Kết quả nghiên cứu có thể được ứng dụng để kiểm soát bệnh hại trên rau và bảo quản rau an toàn sau thu hoạch.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thu mẫu và phân lập LAB

Đất xung quanh vùng rễ cây rau được thu như sau: dùng muỗng sạch loại bỏ lớp đất mặt (khoảng 5 cm) và lấy khoảng 100 g đất, mỗi luống lấy đất ở 5 điểm khác nhau rồi trộn đều và lấy khoảng 100 g cho vào túi zip sạch và được tính là một mẫu. Ghi rõ thời gian, địa điểm và loại rau khi thu mẫu. Mẫu đất được trữ trong thùng lạnh (< 10°C, có đá gel), vận chuyển về phòng thí nghiệm và được phân tích trong vòng 2 ngày.

Vi khuẩn lactic được phân lập trên môi trường MRS agar có chứa 1% CaCO₃, ủ ở 30°C trong 3 ngày. Các khuẩn lạc nghi ngờ là LAB được chọn lọc dựa vào vòng phân giải CaCO₃ trên đĩa môi trường.

2.2. Kiểm tra khả năng sinh acid lactic của các chủng LAB phân lập

2.2.1. Khả năng phân giải CaCO₃ trên đĩa thạch

Khả năng sinh acid của các chủng LAB phân lập được sàng lọc dựa vào sự phân giải CaCO₃ trên đĩa thạch được thực hiện theo mô tả của Xiao & ctv. (2015). Các chủng LAB thuần được nuôi cấy trong 5 mL môi trường MRS broth ở 30°C trong 24 giờ. Hút khoảng 40 µL dung dịch vi khuẩn nhỏ vào giếng đã được tạo sẵn trên đĩa môi trường MRS agar + 1% CaCO₃, mỗi đĩa 3 giếng, và ủ ở 30°C trong 2 ngày. Đo đường kính vòng phân giải CaCO₃ trên đĩa thạch. Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức: $Df = \frac{(D1 + D2 + D3) - 3d}{3}$, trong đó, D là đường kính vòng CaCO₃ bị phân giải trên đĩa, d là đường kính giếng, Df là vòng phân giải (cm).

Các chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải lớn được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Định lượng khả năng sinh acid lactic của các chủng LAB tuyển chọn

Lượng acid sinh ra bởi các chủng LAB tuyển chọn được xác định theo phương pháp chuẩn độ bằng NaOH. Các chủng LAB được nuôi trong 15 mL môi trường MRS broth ở 30°C trong 48 giờ, lắc 150 vòng/phút. Ly tâm thu 10 mL dịch nổi, bổ sung 20 mL nước cất vô trùng và 1 – 2 giọt phenolphthalein 1%. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền. Ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ. Lượng acid được tính theo công thức: acid lactic (mg/mL) = $(V_{NaOH} \times 0,1 \times 90,08) / \text{thể tích mẫu}$ (Wakil & Ajayi, 2013).

2.3. Khảo sát hoạt tính đối kháng của LAB tuyển chọn với vi khuẩn và nấm gây bệnh

Khả năng đối kháng của các dòng LAB chọn lọc được khảo sát với các loài nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium oxysporum* và *Phytophthora* sp. và các vi khuẩn gây bệnh như *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus spizizenii* và *Staphylococcus aureus*.

Xác định khả năng đối kháng nấm bệnh của LAB: cấy nấm (*F. oxysporum* và *Phytophthora* sp.) vào giữa đĩa môi trường PDA, vi khuẩn lactic (mọc trên môi trường MRS agar sau 2 ngày) được cấy thành hai đường thẳng dài khoảng 2 cm ở hai bên rìa đĩa, sau đó ủ ở 30°C trong 3 ngày. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm, không cấy vi khuẩn. Khả năng ức chế sự tăng trưởng của nấm bệnh (%) của vi khuẩn lactic được tính theo công thức của Whipps (1987): $[(R1 - R2) / R1] \times 100$, trong đó, R1 là bán kính (cm) tăng trưởng của nấm đo ngược hướng không có vi khuẩn và R2 là bán kính tăng trưởng của nấm đo theo hướng có vi khuẩn. Sự ức chế tăng trưởng (growth inhibition, GI) được tính theo thang từ 0 đến 3 (Korsten & ctv., 1995): 0 = không ức chế, 1 = 1 đến 25% GI, 2 = 26 đến 50% GI và 3 = 51 đến 75% GI.

Xác định khả năng kháng khuẩn của LAB: vi khuẩn gây bệnh (*E. coli*, *S. typhi*, *B. spizizenii* và *S. aureus*) được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C qua đêm. 0,1 mL dịch vi khuẩn (khoảng 10⁷ tế bào/mL) được trải đều trên đĩa môi trường LB agar, sau đó tạo 3 giếng trên mỗi đĩa thạch. LAB được nuôi cấy trong môi trường MRS broth ở 30°C trong 48 giờ, sau đó ly tâm

thu dịch nổi. 50 µL dịch nổi được đặt vào giếng đã tạo ở trên. Đĩa đối chứng làm tương tự nhưng thay dịch vi khuẩn LAB bằng nước cất vô trùng. Ủ các đĩa ở 30°C trong 24 giờ và đo đường kính vòng vô khuẩn.

2.4. Định danh các chủng vi khuẩn lactic chọn lọc bằng sinh học phân tử

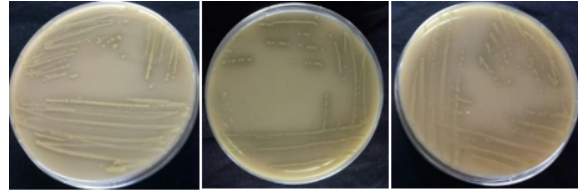
DNA tổng số của các dòng LAB tuyển chọn được ly trích với DNA Genome Extraction kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và được dùng làm khuôn mẫu để khuếch đại vùng gen 16S rRNA với universal primer: 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'GGTTACCTTGTACGACTT-3') (Lane, 1991). Thành phần cho 50 µL phản ứng gồm 5 µL 10 × NH₄ reaction buffer, 3 µL MgCl₂, 0,5 µL dNTP mix, BIOTAQ DNA polymerase 1 µL, 0,5 µM forward primer, 0,5 µM reverse primer, 0,5 ng genomic DNA và nước vừa đủ 50 µL. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: tiền biến tính ở 95°C trong 3 phút, thực hiện 35 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây, và giai đoạn hậu kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 0,5 X ở 100 V trong 30 phút và đọc kết quả dưới tia UV. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, sau đó được gửi giải trình tự tại công ty CP Kỹ thuật và Sinh học ứng dụng Việt Nam. Trình tự 16S rDNA của các chủng LAB phân lập được so sánh trên ngân hàng gene (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Kết quả phân lập LAB từ mẫu đất trồng rau

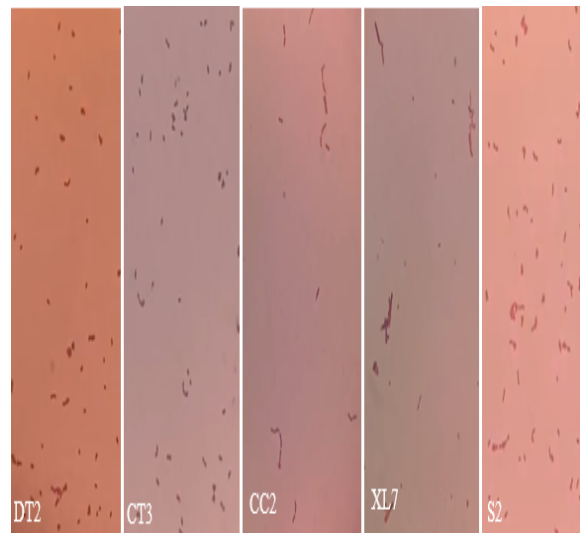
Vi khuẩn lactic (LAB) có mặt khắp nơi trong tự nhiên như đất, nước, thực vật, sữa, trong đường ruột của người và động vật. Nhiều loài LAB được phát hiện đầu tiên trên thực vật (Mundt, 1970). Đà Lạt có khí hậu miền núi ôn hòa và dịu mát quanh năm, là vùng nông nghiệp trừ phú đặc biệt với những sản phẩm rau và hoa, là nơi cung cấp rau cho các khu vực phía Nam và cả nước. Do đó, các vùng đất trồng rau ở Đà Lạt có thể có hệ LAB đa dạng và phong phú.

Mẫu đất được thu thập từ các vườn trồng rau xà lách, cải thảo, súp-lơ, súp, dâu tây, cải canh,



Hình 1. Khuẩn lạc một số dòng vi khuẩn lactic được phân lập từ mẫu đất trồng rau.

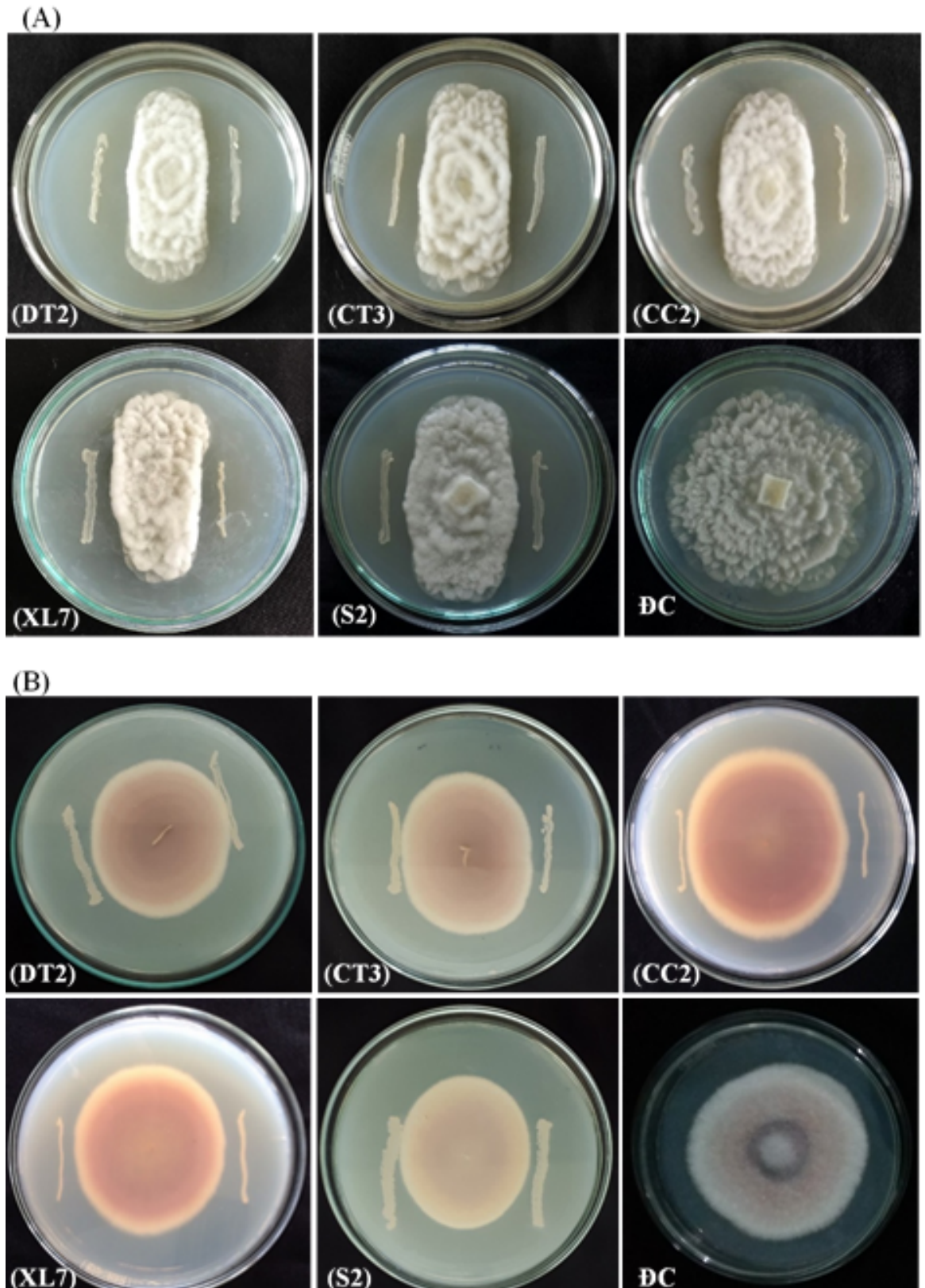
tần ô, bó xôi ở phường 5, 7, 10 và 11, thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng). Từ 33 mẫu đất đã phân lập được 25 khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO₃ xung quanh nghi ngờ là LAB (Hình 1). Các dòng LAB được tuyển chọn có khuẩn lạc nhỏ, tròn, lồi, màu trắng đục, bờ đều, đều là vi khuẩn Gram dương và cho kết quả catalase âm tính. Tế bào nhỏ, hình que, đứng thành đôi, cụm, hoặc thành chuỗi (Hình 2). Các dòng LAB phân lập có các đặc điểm tương tự với vi khuẩn lactic đã được mô tả trước đây (Chen & ctv., 2005; Ekundayo, 2014).



Hình 2. Hình dạng tế bào một số dòng vi khuẩn lactic phân lập.

3.2. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh acid lactic

Quá trình lên men của LAB là quá trình chuyển hóa carbohydrate tạo thành acid lactic như là sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men (Abdel-Rahman & ctv., 2013). Acid lactic từ LAB đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt, trong nông nghiệp acid lactic giúp đối kháng



Hình 3. Hoạt tính kháng nấm bệnh của các dòng vi khuẩn lactic tuyển chọn. (A) *Phytophthora* sp., (B) *Fusarium oxysporum*. DC: đối chứng.

Bảng 1. Khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn

Dòng LAB	Vòng phân giải CaCO ₃ (cm)	Acid lactic (mg/mL)
DT2	1,03	11,8
CT3	1,33	14,3
CC2	1,20	13,8
XL7	1,27	13,8
S2	1,07	12,0

Bảng 2. Tỷ lệ ức chế nấm bệnh của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn

Dòng LAB	<i>F. oxysporum</i>		<i>Phytophthora</i> sp.	
	Tỷ lệ ức chế (%)	Mức độ ức chế	Tỷ lệ ức chế (%)	Mức độ ức chế
DT2	10,66	1	57,44	3
CT3	19,96	1	56,51	3
CC2	15,13	1	54,62	3
XL7	10,91	1	50,86	3
S2	11,73	1	56,52	3

với các mầm bệnh, cải tạo đất, giảm mùi hôi, do đó làm tăng giá trị nông nghiệp (Andreev & ctv., 2018).

Khả năng sinh acid lactic của các dòng LAB tuyển chọn được xác định dựa vào vòng phân giải CaCO₃ trên đĩa thạch và được định lượng dựa theo phương pháp chuẩn độ NaOH. Vòng phân giải CaCO₃ của các dòng LAB sau 2 ngày dao động từ 0,87 – 1,33 cm, tương ứng với hàm lượng acid sinh ra từ 11,4 – 14,3 mg/mL. Trong đó, 5 chủng có khả năng sinh acid cao nhất (Bảng 1) được tuyển chọn cho các thí nghiệm sau.

3.3. Kết quả khảo sát tính kháng của LAB đối với nấm và vi khuẩn gây bệnh

Hoạt tính kháng nấm của các dòng LAB tuyển chọn được khảo sát với *Phytophthora* sp. và *Fusarium oxysporum*, tính kháng khuẩn được khảo sát với vi khuẩn Gram âm gồm *E. coli* và *Salmonella typhi* và vi khuẩn Gram dương gồm *Bacillus spizizenii* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả khảo sát tính kháng nấm được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 3, và tính kháng khuẩn thể hiện ở Bảng 3. Các LAB tuyển chọn thể hiện tính kháng *F. oxysporum* (với tỷ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96%, mức độ 1) thấp hơn so với *Phytophthora* sp. (với tỷ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44%, mức độ 3).

Nhờ khả năng sản xuất các acid hữu cơ (như acid lactic hoặc probionic) và các hợp chất kháng sinh (như bacteriocin), LAB được sử dụng như là tác nhân kiểm soát mầm bệnh trên cây trồng (Daranas & ctv., 2019), mầm bệnh trong đất (Lutz & ctv., 2012) và kiểm soát các bệnh sau

Bảng 3. Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) phân lập

Dòng LAB	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>B. spizizenii</i>	<i>S. typhi</i>
DT2	4,90	2,43
CT3	-	3,37
CC2	3,67	3,00
XL7	3,50	3,23
S2	3,33	3,17

--: không có vòng vô khuẩn.

thu hoạch (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Trước đó, Wang & ctv. (2012) đã thu nhận được hai hợp chất kháng nấm (Benzeneacetic acid và 2-propenyl ester) từ *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 có hoạt tính phổ rộng kháng *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulate*, *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum* và *Fusarium oxysporum*. Zeboudj & ctv. (2014) đã báo cáo rằng, 4 dòng LAB gồm *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* và *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* biovar. *dextranicum* có khả năng ức chế tăng trưởng của *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* từ 13,51 – 40,29% trên môi trường PDA. Năm 2018, Juodeikiene & ctv. đã chứng minh các dòng LAB *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, và *Pediococcus pentosaceus* có khả năng làm giảm độc tố của *Fusarium* trong quá trình nảy mầm của hạt lúa mì lên đến 73%, đồng thời các dòng LAB này còn thể hiện tính

Bảng 4. Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn trên ngân hàng gene

STT	Dòng LAB	Loài tương đồng (%)	Số hiệu
1	DT2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain T17 (100%)	MG739432.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (100%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (100%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (100%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (100%)	MT538969.1
2	CT3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (99%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (99%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (99%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (99%)	MT538969.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8194 (99%)	MT538940.1
3	CC2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E011 (97%)	MG754687.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E01 (97%)	MG754679.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E9 (97%)	MG754548.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain RK37 (97%)	KF225698.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain FQ011 (97%)	KF418818.1
4	XL7	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (100%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (100%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (100%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (100%)	MT538969.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8194 (100%)	MT538940.1
5	S2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IDK 120 (99%)	MT211513.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain R12 (99%)	MG841152.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (99%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (99%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (99%)	MT539056.1

kháng nấm phổ rộng, đặc biệt là với *F. culmorum* và *F. poae*.

Các dòng LAB khảo sát không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *S. aureus*, nhưng kháng với *B. spizizenii* và *S. typhi* với đường kính vòng vô khuẩn trung bình lần lượt là 3,33 – 4,90 mm và 2,43 – 3,37 mm được quan sát thông qua vòng vô khuẩn trên đĩa thạch sau 24 giờ, trong đó có dòng CC2 không thể hiện tính kháng với *B. spizizenii* (Bảng 3).

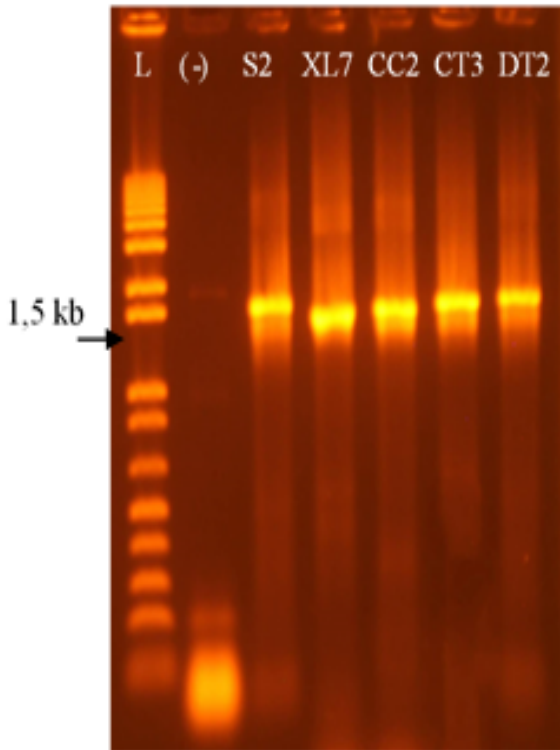
3.4. Kết quả định danh các dòng LAB được tuyển chọn

Các dòng LAB tuyển chọn được định danh bằng cách giải trình tự vùng gene 16S rRNA sau khi được khuếch đại với cặp universal primer 27F và 1492R bằng PCR (Hình 4). Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của các chủng LAB tuyển chọn được thể hiện ở Bảng 4.

Theo kết quả so sánh trên ngân hàng gen, cả năm mẫu LAB tuyển chọn đều có trình tự 16S

rDNA tương đồng với loài *Lactobacillus plantarum* từ 97 đến 100%. Kết quả này tương đồng với các đặc điểm về hình thái học của các chủng LAB tuyển chọn, là các vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ dạng điểm (punctiform), lồi (convex), bờ đều (entire margin), màu trắng đục (opaque) (Hình 1); bắt màu Gram dương, tế bào hình que, xếp thành từng cặp, từng cụm, hoặc thành chuỗi có chiều dài khác nhau (Hình 2). Đặc điểm hình dạng và tế bào của các chủng LAB tuyển chọn trong nghiên cứu này cũng phù hợp với mô tả về vi khuẩn *L. plantarum* của Qian & ctv. (2018) và Talashi & Sharma (2019). Trước đó, Yanagida & ctv. (2006) cũng đã phân lập được 3 chủng *L. plantarum* trong 42 mẫu vi khuẩn từ các mẫu đất có khả năng sinh acid bao gồm *L. plantarum* C072201; *L. plantarum* C101904; *L. plantarum* C121204. Một nghiên cứu khác của tác giả Ekundayo (2014) đã phân lập 11 dòng *Lactobacillus* từ đất xung quanh vùng rễ cây ổi và bắp, trong đó có 3 dòng là *L. plantarum*. *L. plantarum* thường được tìm thấy trong tự nhiên, có tầm quan trọng công nghiệp như là một yếu tố quan trọng của các

chất lên men được sử dụng trong các sản phẩm thực phẩm lên men chứa men vi sinh, được tiêu thụ trên toàn thế giới.



Hình 4. Kết quả khuếch đại vùng gene 16S rRNA của các dòng vi khuẩn lactic tuyển chọn. L: thang DNA, (-) đối chứng âm.

4. Kết Luận

Từ 33 mẫu đất từ các vườn rau tại Đà Lạt đã tuyển được 5 dòng LAB (DT2, CT3, CC2, XL7, và S2) có khả năng kháng *Fusarium oxysporum* với tỉ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96% và kháng *Phytophthora* sp. với tỉ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44%. Các dòng LAB không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *Staphylococcus*, nhưng kháng đồng thời *Bacillus spizizenii* (trừ dòng CC2) và *Salmonella typhi*. Các dòng LAB này có trình tự 16S rDNA tương đồng với chủng *Lactobacillus plantarum* từ 97 – 100%.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV18-CNSH-03 được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances* 31, 877-902.
- Andreev, N., Ronteltap, M., Boincean, B., & Lens, P. N. L. (2018). Lactic acid fermentation of human excreta for agricultural application. *Journal of Environmental Management* 206, 890-900.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.
- Chaurasia, B., Pandey, M., & Palni, M. (2005). Diddisable and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiology Research* 160, 75-81.
- Chen, Y. S., Yanagida, F., & Shinohara, T. (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology* 40, 195-200.
- Daranas, N., Roselló, G., Cabrefiga, J., Donati, I., Francés, J., Badosa, E., Spinelli, F., Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2019). Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology* 174, 92-105.
- Ekundayo, F. O. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soils of three fruit trees, fish and ogi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(3), 991-998.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., & Bartkevicius, V. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT* 89, 307-314.
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegard, M., & Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 1-9.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E., & Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (115-175). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Lutz, M. P., Michel, V., Martinez, C., & Camps, C. (2012). Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin* 78, 285-288.
- Korsten, L., De Jager, E. S., De Villiers, E. E., Lourens, A., & Wehner, F. C. (1995). Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease* 79, 1149-1156.

- Mundt, J. O. (1970). Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 550-553.
- Qian, Y., Long, X., Pan, Y., Li, G., & Zhao, X. (2018). Isolation and identification of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* YS2) from yak yogurt and its probiotic properties. *Biomedical Research* 29(4), 815-820.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- Suzuki, T., & Yamasato, K. (1994). Phylogeny of spore-forming LAB based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 115, 13-17.
- Talashi, S., & Sharma N. (2019). Isolation of *Lactobacillus plantarum* from human breast milk with probiotic and medical attributes. *Acta Scientific Microbiology* 2(6), 163-171.
- Wakil, S. M., & Ajayi, O. O. (2013). Production of lactic acid from starchy-based food substrates. *Journal of Applied Biosciences* 71, 5673-5681.
- Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., & Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS One* 7(1) e29452.
- Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist* 107, 127-142.
- Xiao, P., Huang, Y., Yang, W., Zhang, B., & Quan, X. (2015). Screening lactic acid bacteria with high yielding-acid capacity from pickled tea for their potential uses of inoculating to ferment tea products. *Journal of Food Science and Technology* 52(10), 6727-6734.
- Yanagida, F., Chen, Y., & Shinohara, T. (2006). Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *The Journal of General and Applied Microbiology* 52, 21-28.
- Yanagida, F., Suzuki, K., Kozaki, M. & Komagata, K. (1997). Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 499-504.
- Zebboudj, N., Yezli, W., Hamini-Kadar, N., Kihal, M., & Henni, J. E. (2014). Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. *International Journal of Biosciences* 5, 99-106.

Effect of nitrogen levels on growth and development of three Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) cultivars pot-planted in Ho Chi Minh City

Duong T. T. Pham*, Duong H. A. Pham, Huong T. K. Nguyen,
Lieu T. Nguyen, & Bao D. Nguyen

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

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 02, 2020

Revised: April 15, 2020

Accepted: May 18, 2020

Keywords

Cultivars

Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn

Lisianthus

Nitrogen

Pot-planted

*Corresponding author

Pham Thi Thuy Duong

Email: pttduong@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) is favored in decoration because of its long-lasting and colorful flowers. The objective of the experiment was to evaluate the effects of different levels of nitrogen on the growth and development of three Lisianthus cultivars pot-planted in Ho Chi Minh City. The experiment was laid out in split - plot design (SPD) with four levels of nitrogen (3; 4; 5; 6 g/pot) being the main factor and three lisianthus cultivars (Pink; Yellow; White/Purple) being the subordinate factor. Each pot was planted with one plantlet. The results indicated that plants applied with 4.0 g nitrogen per pot gave the best performance in plant height (18.41 cm) and number of leaves (24.08 leaves/plant) at 60 days after planted (DAP). The Pink cultivar reached the highest plant height (19.92 cm), number of leaves (43.53 leaves/plant) as well as number of flowers buds (12.31 buds/plant). The Pink cultivar, when applied with 4.0 g nitrogen/pot, gave the highest plant height (21.38 cm) at 60 DAP.

Cited as: Pham, D. T. T., Pham, D. H. A., Nguyen, H. T. K., Nguyen, L. T., & Nguyen, B. D. (2020). Effect of nitrogen levels on growth and development of three Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) cultivars pot-planted in Ho Chi Minh City. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 10-17.

Ảnh hưởng của lượng đạm đến sinh trưởng và phát triển ba giống hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) trồng chậu tại Thành phố Hồ Chí Minh

Phạm Thị Thùy Dương*, Phạm Hoàng Ánh Dương, Nguyễn Thị Kim Hương,
Nguyễn Thị Liễu & Nguyễn Đức Bảo

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

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 02/03/2020

Ngày chỉnh sửa: 15/04/2020

Ngày chấp nhận: 18/05/2020

Từ khóa

Cây hoa cát tường

Đạm

Giống

Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn

Trồng chậu

*Tác giả liên hệ

Phạm Thị Thùy Dương

Email: pttduong@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) được ưa chuộng trong trang trí bởi hoa bền đẹp và có màu sắc đa dạng. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm đánh giá được ảnh hưởng của các lượng đạm khác nhau đến sinh trưởng và phát triển của ba giống hoa cát tường trồng chậu tại Thành phố Hồ Chí Minh. Thí nghiệm hai yếu tố được bố trí theo kiểu lô phụ với lượng đạm (3; 4; 5; 6 g/chậu) là yếu tố chính và giống (màu hồng, màu vàng, màu trắng viền tím) là yếu tố phụ. Cây hoa cát tường khi được bón lượng đạm 4 g/chậu cho kết quả tốt nhất về chiều cao cây (18,41 cm) và số lá (24,08 lá/cây) tại thời điểm 60 ngày sau trồng (NST). Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao cây trung bình (19,92 cm), số lá (43,53 lá/cây), số nụ (12,31 nụ/cây) cao nhất so với các giống khác trong thí nghiệm. Giống hoa cát tường màu hồng được bón lượng đạm 4 g/chậu cho kết quả tốt nhất về chiều cao cây (21,38 cm) tại thời điểm 60 NST.

1. Đặt Vấn Đề

Cây hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn) thuộc họ Gentianaceae, có nguồn gốc từ các vùng phía Nam Hoa Kỳ (Popa & ctv., 2004; Jafari & ctv., 2017). Hoa cát tường được thị trường ưa chuộng vì đa dạng về màu sắc, hình dạng và kích cỡ; đặc biệt vào các dịp lễ Tết, nhu cầu sử dụng hoa cát tường trong trang trí thường tăng cao (Nguyen & ctv., 2019). Cây hoa cát tường có thể được sử dụng làm hoa cắt cành hoặc trồng chậu với nhiều màu sắc khác nhau như hồng, vàng, trắng, tím hoặc pha trộn nhiều màu (Asen & ctv., 1986; Kunitake & ctv., 1995).

Cây hoa cát tường là loại cây trồng ôn đới,

thích hợp với nhiệt độ và cường độ ánh sáng thấp (Nguyen & ctv., 2019). Hiện nay, cây hoa cát tường được trồng nhiều ở Lâm Đồng và một số tỉnh miền Bắc nước ta. Thành phố Hồ Chí Minh là địa phương có nhu cầu rất lớn về hoa kiểng, mặc dù sản lượng hoa trồng chậu (bao gồm cây hoa cát tường) ước tính đạt 6,7 triệu chậu/năm nhưng vẫn chưa đáp ứng đủ nhu cầu về cây trồng chậu của thành phố (HCMCPC, 2016). Cây hoa cát tường được trồng trên địa bàn thành phố là cơ hội thuận lợi để người trồng hoa nâng cao hiệu quả sản xuất nhờ tiết kiệm được chi phí vận chuyển.

Đối với sản xuất hoa kiểng, việc trồng ra chậu hoa đẹp đáp ứng thị hiếu của người tiêu dùng

là điều cần thiết. Trong đó, đạm là yếu tố dinh dưỡng đa lượng thiết yếu và không thể thay thế đối với đời sống của thực vật, bao gồm cây hoa cát tường. Nhu cầu đạm của hầu hết cây trồng rất cao (Mengel & ctv., 2001; Le, 2006). Cây trồng thiếu đạm trở nên còi cọc, vàng lá, sinh trưởng chậm. Trong khi đó, cây thừa đạm lại dễ bị vong, đổ ngã và nhạy cảm với sâu, bệnh hại. Đối với cây hoa cát tường được trồng trong chậu thì bộ rễ bị giới hạn ở một thể tích nhất định, do đó cần thiết phải lượng đạm thích hợp để cung cấp cho cây, giúp chậu cây trở nên cân đối. Ủy ban nhân dân tỉnh Lâm Đồng khuyến cáo bón 310 kg N/ha cho cây hoa cát tường cắt cành được trồng ở mật độ 30.000 đến 32.000 cây/ha được thu hoạch hai lần (LDPPC, 2012), tương đương khoảng 5 g N/cây ở mỗi lần thu hoạch. Tuy nhiên, nghiên cứu về nhu cầu dinh dưỡng đạm cho cây hoa cát tường trồng chậu hiện nay còn rất hạn chế.

Bên cạnh dinh dưỡng, giống là một trong những yếu tố quan trọng đối với sản xuất nông nghiệp. Giống hoa cát tường rất đa dạng về màu sắc, hình dạng, có trên 200 giống hoa cát tường được bán phổ biến ở Hoa Kỳ và nhiều quốc gia khác (Harbaugh & ctv., 2000). Mỗi giống cây trồng thường có những đặc điểm khác nhau về sinh trưởng, phát triển cũng như nhu cầu về dinh dưỡng. Việc nghiên cứu để tìm ra lượng đạm thích hợp cho một số giống hoa cát tường để giúp cây sinh trưởng, phát triển tốt, đồng thời tiết kiệm chi phí sản xuất là điều cần thiết.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thời gian và địa điểm

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 10/2019 đến 02/2020 tại Trại thực nghiệm Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Cây giống: Cây giống hoa cát tường được gieo từ hạt có đủ 6 lá thật, chiều cao 3,30 đến 3,75 cm không có triệu chứng của sâu, bệnh gây hại. Cây giống do công ty TNHH Đà Lạt Hasfarm cung cấp.

Giá thể: Giá thể bao gồm phân bò, mụn dừa, tro trấu và đất mặt được trộn theo công thức 30% phân bò + 40% mụn dừa + 20% tro trấu + 10% đất mặt (tính chất giá thể được trình bày ở

Bảng 1). Lượng giá thể được cho vào chậu tương ứng 1,2 kg/chậu. Phân bón gốc: Urea (46,3% N); Super lân Long Thành (16,0% P₂O₅); Kali clorua (60% K₂O).

Chậu trồng: Có đường kính mặt x đường kính đáy x chiều cao = 18 x 12 x 18 cm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm hai yếu tố được bố trí theo kiểu lô phụ (SPD), gồm 12 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Yếu tố chính gồm 4 lượng phân đạm: 3; 4; 5 (Đối chứng - ĐC) và 6 g N/chậu. Yếu tố phụ gồm ba giống hoa cát tường: giống màu hồng, giống màu vàng và giống màu trắng viền tím.

Tổng số ô cơ sở: 36 ô; Số chậu trên mỗi ô cơ sở: 20 chậu/ô; Tổng số chậu thí nghiệm: 720 chậu; Số cây trên mỗi chậu: 1 cây/chậu; Diện tích thí nghiệm: 109,3 m². Lượng phân nền: 3,0 g P₂O₅ + 3,5 g K₂O/chậu. Toàn bộ lượng lân bón vào giá thể trước khi trồng 15 ngày. Lượng đạm và kali được chia đều thành 10 lần bón, bón 7 ngày/lần và bắt đầu vào thời điểm 15 NST.

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm:

Chiều cao cây (cm): đo từ vết sẹo cặp lá dưới cùng đến đỉnh sinh trưởng của chồi cao nhất trên cây, định kỳ 15 ngày/lần cho đến khi cây bắt đầu ra nụ.

Số lá (lá/cây): đếm tất cả số lá thật trên cây, định kỳ 15 ngày/lần đến khi cây bắt đầu ra nụ. Lá thật được tính khi nhìn thấy rõ gốc lá và phiến lá.

Số nụ trên cây (nụ/cây): đếm tất cả các nụ hoa trên cây. Ghi nhận số liệu 1 lần ở thời điểm xuất vườn (85 NST).

Số hoa trên cây (hoa/cây): đếm tất cả các hoa đã nở hoàn toàn trên cây. Hoa nở hoàn toàn được tính khi toàn bộ cánh hoa xòe ra và nhìn thấy rõ nhị hoa. Ghi nhận số liệu 1 lần ở thời điểm xuất vườn (85 NST).

Số liệu thu thập được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel; phân tích ANOVA, xếp hạng Duncan ở mức $\alpha = 0,05$ bằng chương trình SAS 9.1.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Kết quả phân tích giá thể trồng ba giống hoa cát tường trong thí nghiệm

Kết quả phân tích đất ở Bảng 1 cho thấy giá thể được sử dụng để trồng cây hoa cát tường có

Bảng 1. Kết quả phân tích giá thể trồng ba giống hoa cát tường trong thí nghiệm

Chỉ tiêu	Đơn vị	Kết quả phân tích	Phương pháp
pH _{KCl} (1:5)	6,94	pH	meter
EC (1:5)	mS/cm	3,05	EC meter
C hữu cơ	%	14,227	Tiurin
N tổng số	%	0,391	Kjeldalh
C/N		36,386	
P ₂ O ₅ tổng số	%	0,375	So màu
K ₂ O tổng số	%	0,412	Quang kế ngọn lửa
CEC	meq/100g	8,063	Amoni axetat
Dung trọng	g/cm ³	0,612	Ổng đong kim loại
Tỉ trọng	g/cm ³	1,403	Piknometer
Độ xốp	%	56,379	
Ẩm độ	%	44,085	Phương pháp sấy

độ chua ở mức trung tính và không bị nhiễm mặn (Slavich & Petterson, 1993). Giá thể sau khi ủ có hàm lượng C hữu cơ tổng số (14,227%) và C/N (36,386%) cao cho thấy giá thể đang trong giai đoạn phân hủy. Các chất dinh dưỡng đạm, lân và kali tổng số đều ở mức cao. Trong khi đó, khả năng trao đổi cation CEC (8,063 meq/100 g) của giá thể ở mức thấp (Rayment & Lyons, 2011), có thể do các chất dinh dưỡng được giải phóng ở dạng dễ tiêu trong giá thể không cao, vì vậy cần thiết phải bổ sung thêm các chất dinh dưỡng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây hoa cát tường. Giá thể có độ xốp (56,379%) và ẩm độ (44,085%) ở mức trung bình.

3.2. Ảnh hưởng của lượng đạm đến chiều cao cây của ba giống hoa cát tường

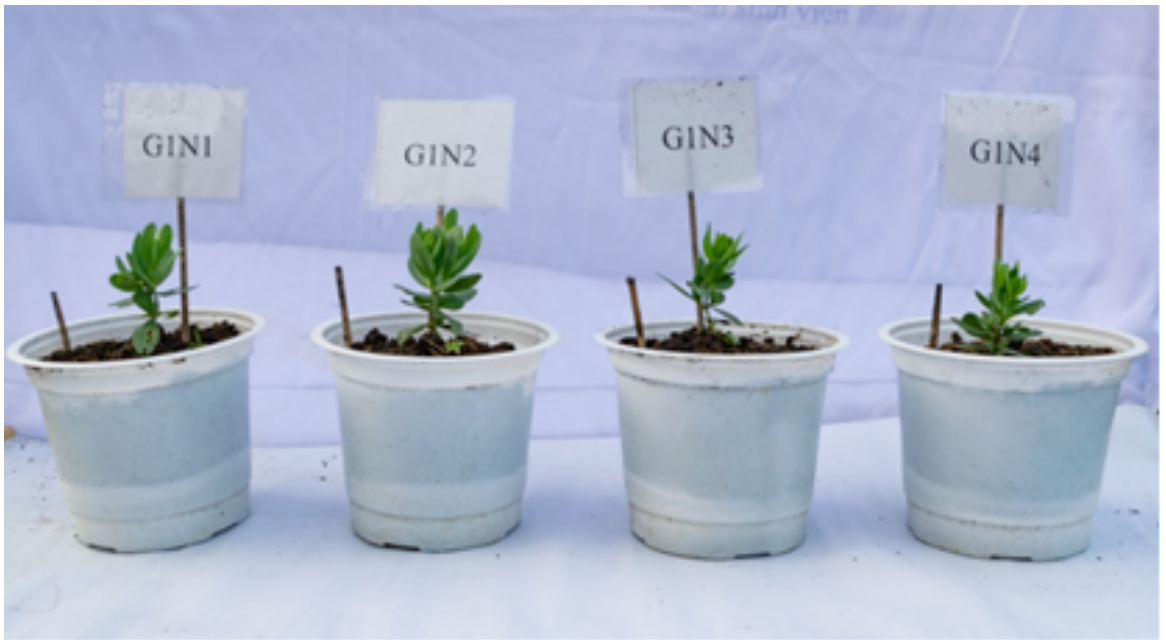
Kết quả ở Bảng 2 cho thấy chiều cao cây của ba giống hoa cát tường khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở thời điểm 15 NST. Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao cây (5,27 cm) tốt nhất nhưng không khác biệt thống kê so với giống màu vàng; giống màu trắng viền tím có chiều cao cây (4,34 cm) thấp nhất. Tại thời điểm này, chiều cao của cây hoa cát tường khác biệt chủ yếu do đặc điểm của giống và không bị tác động bởi lượng phân đạm.

Ở thời điểm 30 NST, chiều cao cây hoa cát tường chịu ảnh hưởng bởi yếu tố lượng đạm và giống. Khi bón các lượng đạm 3; 4 và 5 g/chậu cho cây hoa cát tường, chiều cao cây không khác biệt thống kê và cao hơn so với bón lượng đạm 6 g/chậu. Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao cây tốt nhất, đạt 6,76 cm; trong khi giống màu vàng và màu trắng viền tím có chiều cao

cây thấp nhất, lần lượt là 5,63 và 4,97 cm. Tương tác giữa lượng đạm và giống không ảnh hưởng đến chiều cao cây hoa cát tường ở thời điểm này.

Tương tự, ở thời điểm 45 NST, lượng đạm và giống ảnh hưởng rõ rệt đến chiều cao cây hoa cát tường. Cây hoa cát tường được bón lượng đạm 5 g/chậu cho chiều cao cây (11,10 cm) tốt nhất nhưng không khác biệt thống kê so với bón lượng đạm 4 g/chậu (10,56 cm), tuy nhiên khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với bón lượng đạm 3 và 6 g/chậu (lần lượt là 9,44 và 8,86 cm). Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao tốt nhất, đạt 12,09 cm cao hơn so với hai giống còn lại trong thí nghiệm. Chiều cao của cây hoa cát tường ở thời điểm này không bị ảnh hưởng bởi tương tác giữa yếu tố lượng đạm và giống.

Ở thời điểm 60 NST, chiều cao cây hoa cát tường chịu ảnh hưởng của lượng đạm, giống và tương tác giữa hai yếu tố này. Chiều cao cây hoa cát tường khác biệt rất có ý nghĩa thống kê khi được bón các lượng đạm khác nhau. Lượng đạm 5 g/chậu cho kết quả chiều cao cây (18,83 cm) tốt nhất nhưng không khác biệt so với bón các lượng đạm 3 và 4 g/chậu (lần lượt là 18,41 và 18,16 cm), tuy nhiên khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với bón 6 g/chậu (13,89 cm). Điều này cho thấy việc bón lượng đạm cao hơn nhu cầu có thể gây độc cho cây. Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao cây tốt nhất, đạt 19,92 cm và giống màu trắng viền tím có chiều cao cây thấp nhất (14,04 cm). Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Nguyen & ctv. (2019) trên giống hoa cát tường màu hồng khi cho biết chiều cao cây dao động từ 20,87 đến 36,57 cm ở thời điểm 55 NST. Giống hoa cát tường màu hồng khi được bón lượng đạm



Hình 1. Số lá trên cây của giống hoa cát tường màu hồng được bón các lượng đạm khác nhau ở thời điểm 30 NST.

5 g/chậu cho chiều cao cây tốt nhất đạt 23,07 cm nhưng không khác biệt thống kê so với bón lượng đạm 4 g/chậu, đạt 21,38 cm. Như vậy, xét về hiệu quả kinh tế, việc bón lượng đạm 4 g/chậu có ưu thế hơn.

Nhìn chung, cây hoa cát tường được trồng chậu trong thí nghiệm có chiều cao cây thấp hơn rất nhiều so với cây hoa cát tường cắt cành được trồng ở các vùng có khí hậu mát mẻ (94 đến 126 cm) (Harbaugh & ctv., 2000). Tuy nhiên, chiều cao cây hoa cát tường trong thí nghiệm cân đối so với kích thước chậu trồng.

3.3. Ảnh hưởng của lượng đạm đến số lá của ba giống hoa cát tường

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, số lá trên cây của ba giống hoa cát tường khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm theo dõi. Trong khi đó, lượng đạm chỉ tác động đến số lá trên cây hoa cát tường bắt đầu từ thời điểm 30 NST. Nhìn chung, tương tác giữa lượng đạm và giống không ảnh hưởng đến chỉ tiêu này.

Ở thời điểm 15 NST, số lá trên cây hoa cát tường khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở ba giống khác nhau. Giống hoa cát tường màu hồng có số lá trên cây (9,50 lá/cây) nhiều nhất nhưng

không khác biệt thống kê so với giống màu vàng (8,60 lá/cây); giống màu trắng viền tím có số lá trên cây ít nhất (7,43 lá/cây).

Ở thời điểm 30 NST, yếu tố lượng đạm và giống tác động rõ rệt đến số lá trên cây hoa cát tường. Khi được bón lượng đạm 4 g/chậu, cây hoa cát tường có số lá trên cây nhiều nhất, đạt 16,40 lá/cây nhưng không khác biệt thống kê so với bón lượng đạm 3 và 5 g/chậu, tuy nhiên cao hơn so với bón lượng đạm 6 g/chậu (10,62 cm) (Hình 1). Điều này chứng tỏ nhu cầu đạm của cây hoa cát tường không vượt quá 6 g/chậu, nếu bón quá nhiều đạm cây có thể sinh trưởng chậm. Giống hoa cát tường màu hồng có số lá trên cây nhiều nhất, đạt 17,75 lá/cây, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với hai giống còn lại trong thí nghiệm.

Ở thời điểm 45 NST, cây hoa cát tường được bón lượng đạm 4 g/chậu có số lá trên cây (24,08 lá/cây) nhiều nhất nhưng không khác biệt thống kê so với bón 3 và 5 g/chậu, tuy nhiên khác biệt so với bón lượng đạm 6 g/chậu (17,60 lá/cây). Giống hoa cát tường màu hồng có số lá trên cây (25,78 lá/cây) nhiều nhất nhưng không khác biệt thống kê so với giống màu vàng; giống trắng viền tím có số lá trên cây (18,43 lá/cây) thấp nhất.

Ở thời điểm 60 NST, số lá trên cây hoa cát

Bảng 2. Ảnh hưởng của lượng đạm đến chiều cao cây (cm) của ba giống hoa cát tường

Thời điểm NST	Lượng N (g/chậu)	Giống (G)			TB (N)
		Hồng	Vàng	Trắng viền tím	
15	3	5,04	4,38	4,27	4,56
	4	5,46	5,08	4,15	4,90
	5 (ĐC)	5,53	5,01	4,22	4,92
	6	5,06	4,60	4,73	4,80
	TB (G)	5,27 ^a	4,77 ^{ab}	4,34 ^b	
CV (%) = 9,69; FN = 1,11 ^{ns} ; FG = 12,08 ^{**} ; FN*G = 1,18 ^{ns}					
30	3	6,43	5,65	5,27	5,78 ^{ab}
	4	7,03	6,21	5,23	6,16 ^a
	5 (ĐC)	7,29	5,96	5,20	6,15 ^a
	6	6,29	4,70	3,97	4,99 ^b
	TB (G)	6,76 ^a	5,63 ^b	4,97 ^b	
CV (%) = 13,01 ; FN = 4,85* ; FG = 18,39 ^{**} ; FN*G = 0,41 ^{ns}					
45	3	13,68	11,91	8,98	9,44 ^{bc}
	4	15,25	11,84	8,40	10,56 ^{ab}
	5 (ĐC)	14,73	11,92	9,32	11,10 ^a
	6	11,14	8,67	6,22	8,86 ^c
	TB (G)	12,09 ^a	9,89 ^b	7,98 ^c	
CV (%) = 13,57; FN = 6,01* ; FG = 27,67 ^{**} ; FN*G = 0,85 ^{ns}					
CV (%) = 13,01 ; FN = 4,85* ; FG = 18,39 ^{**} ; FN*G = 0,41 ^{ns}					
60	3	18,69 ^{bcd}	19,93 ^{bc}	15,87 ^{ef}	18,16 ^a
	4	21,38 ^{ab}	19,12 ^{bcd}	14,71 ^f	18,41 ^a
	5 (ĐC)	23,07 ^a	18,51 ^{cde}	14,93 ^f	18,83 ^a
	6	16,52 ^{def}	14,53 ^f	10,63 ^g	13,89 ^b
	TB (G)	19,92 ^a	18,02 ^b	14,04 ^c	
CV (%) = 6,16; FN = 41,87 ^{**} ; FG = 10,72 ^{**} ; FN*G = 4,76 [*]					

^{a-f}Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê; ns: không có khác biệt thống kê.

*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$, **: khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

tường chịu ảnh hưởng của yếu tố lượng đạm và giống. Cây hoa cát tường được bón lượng đạm 4 g/chậu có số lá trên cây nhiều nhất, đạt 40,54 lá/cây nhưng không khác biệt thống kê so với bón lượng đạm 3 và 5 g/chậu. Cây hoa cát tường được bón lượng đạm 6 g/chậu có số lá trên cây ít nhất, đạt 31,70 lá/cây. Giống hoa cát tường màu hồng có số lá trên cây nhiều nhất, đạt 43,53 lá/cây và ít nhất là giống màu trắng viền tím, đạt 29,92 lá/cây, chênh lệch 13,61 lá/cây. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu của Ahmad & ctv. (2017) và Nguyen & ctv. (2019).

3.4. Ảnh hưởng của lượng đạm đến số nụ và số hoa của ba giống hoa cát tường

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, số nụ trên cây của ba giống hoa cát tường khác nhau trong thí nghiệm thì khác biệt rất có ý nghĩa thống kê. Giống hoa cát tường màu hồng có số nụ trên cây

(12,31 nụ/cây) nhiều nhất, nhưng không khác biệt so với giống màu vàng (10,84 nụ/cây) và cao hơn so với giống màu trắng viền tím (10,00 nụ/cây). Yếu tố lượng đạm, tương tác giữa lượng đạm và giống không ảnh hưởng đến chỉ tiêu số nụ trên cây.

Kết quả ở Bảng 4 cũng cho thấy, sự khác biệt về số hoa của ba giống hoa cát tường dưới ảnh hưởng của bốn lượng đạm khác nhau trong thí nghiệm thì không có ý nghĩa thống kê. Số hoa trên cây dao động từ 4,43 đến 7,10 hoa/cây. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu của Nguyen & ctv. (2019) khi cho biết số hoa trên cây hoa cát tường dao động trong khoảng 4,39 đến 7,53 hoa/cây. Điều này cho thấy, lượng phân đạm trong thí nghiệm không tác động đến quá trình hình thành nụ và nở hoa của ba giống cát tường trong thí nghiệm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của lượng đạm đến số lá (lá/cây) của ba giống hoa cát tường

Thời điểm NST	Lượng N (g/chậu)	Giống (G)			TB (N)
		Hồng	Vàng	Trắng viền tím	
15	3	9,98	6,83	7,73	8,36
	4	9,17	8,30	7,13	8,20
	5 (ĐC)	9,17	7,73	7,07	7,99
	6	9,52	11,54	7,78	9,61
	TB (G)	9,50 ^a	8,60 ^{ab}	7,43 ^b	
	CV (%) = 16,40 ; FN = 2,66 ^{ns} ; FG = 6,27 ^{**} ; FN*G = 2,11 ^{ns}				
30	3	17,20	13,93	15,47	15,53 ^a
	4	18,87	16,33	14,00	16,40 ^a
	5 (ĐC)	17,97	15,43	13,87	15,76 ^a
	6	16,97	7,57	7,33	10,62 ^b
	TB (G)	17,75 ^a	13,32 ^b	12,67 ^b	
	CV (%) = 19,45 ; FN = 7,94 ^{**} ; FG = 11,43 ^{**} ; FN*G = 1,55 ^{ns}				
45	3	25,03	21,97	20,37	22,46 ^a
	4	26,57	25,13	20,53	24,08 ^a
	5 (ĐC)	26,83	22,97	19,00	22,93 ^a
	6	24,70	14,30	13,80	17,60 ^b
	6	16,97	7,57	7,33	10,62 ^b
	TB (G)	25,78 ^a	21,09 ^{ab}	18,43 ^b	
CV (%) = 19,82 ; FN = 3,96 ^{**} ; FG = 8,96 ^{**} ; FN*G = 0,71 ^{ns}					
60	3	38,93	36,13	30,70	35,26 ^{ab}
	4	49,33	40,37	31,93	40,54 ^a
	5 (ĐC)	48,00	41,03	30,97	40,00 ^a
	6	37,83	31,20	26,07	31,70 ^b
	TB (G)	43,53 ^a	37,18 ^b	29,92 ^c	
	CV (%) = 14,28 ; FN = 15,57 ^{**} ; FG = 20,08 ^{**} ; FN*G = 0,57 ^{ns}				

^{a-c}Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

^{ns}: Không có khác biệt thống kê, ^{**}: khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

Bảng 4. Ảnh hưởng của lượng đạm đến số nụ (nụ/cây) và số hoa (hoa/cây) của ba giống hoa cát tường

Chỉ tiêu theo dõi	Lượng N (g/chậu)	Giống (G)			TB (N)
		Hồng	Vàng	Trắng viền tím	
Số nụ (nụ/cây)	3	12,10	11,07	10,23	11,13
	4	14,47	11,43	10,63	12,18
	5 (ĐC)	12,77	11,43	10,23	11,48
	6	9,90	9,43	8,90	9,41
	TB (G)	12,31 ^a	10,84 ^{ab}	10,00 ^b	
	CV (%) = 17,33 ; FN = 1,15 ^{ns} ; FG = 4,47 [*] ; FN*G = 0,37 ^{ns}				
Số hoa (hoa/cây)	3	4,43	5,23	5,53	5,40
	4	7,10	6,10	5,90	6,37
	5 (ĐC)	6,47	5,77	5,43	5,89
	6	5,77	5,43	5,33	5,51
	TB (G)	6,19	5,63	5,55	
	CV (%) = 14,90 ; FN = 0,89 ^{ns} ; FG = 1,96 ^{ns} ; FN*G = 0,38 ^{ns}				

^{a-b}Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

^{ns}: không có khác biệt thống kê, ^{*}: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$.

4. Kết Luận

Ba giống hoa cát tường khi được bón lượng đậm 4 g/chậu cho kết quả tốt nhất về chiều cao cây (18,41 cm) và số lá (24,08 lá/cây) tại thời điểm 60 NST. Giống hoa cát tường màu hồng có chiều cao cây trung bình (19,92 cm), số lá (43,53 lá/cây), số nụ (12,31 nụ/cây) cao nhất so với các giống khác trong thí nghiệm. Giống hoa cát tường màu hồng được bón lượng đậm 4 g/chậu cho kết quả tốt nhất về chiều cao cây (21,38 cm) tại thời điểm 60 NST.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Ahmad, H., Rahul, S., Mahbuba, S., Jahan, M. R., & Uddin, A. F. M. J. (2017). Evaluation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) lines for commercial production in Bangladesh. *International Journal of Business, Social And Scientific Research* 5, 156-167.
- Asen, S., Griesbach, R. J., Norris, C., & Leonhardt, B. (1986). Flavonoids from Eustoma flower petals. *Phytochem* 25, 2509-2513.
- Harbaugh, B. K., Bell, M. L., & Liang, R. (2000). Evaluation of forty-seven cultivars of Lisianthus as cut flowers. *Hort Technology* 10, 812-815.
- HCMCPC (Ho Chi Minh City People's Committee) (2016). *Decision No. 536/QD-UBND February 5, 2016 on approving the flower growing program in the city in the period of 2016 - 2020*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Ho Chi Minh City People's Committee.
- Jafari, R., Moieni, A., Karimzadeh, G., & Movahedi, Z. (2017). In Vitro Propagation of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Journal of Plant Physiology and Breeding* 7, 53-65.
- Kunitake, H., Nakashima, T., Mori, K., Tanaka, M., & Mii, M. (1995). Plant regeneration from mesophyll protoplasts of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) by adding activated charcoal into protoplast culture medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43, 59-65.
- LDPPC (Lam Dong Province People's Committee) (2012). *Decision No. 1251/QD-SNN dated December 13, 2012 on temporarily cultivation procedures for some local crops in Lam Dong Province*. Lam Dong Province, Vietnam: Lam Dong Province People's Committee.
- Le, V. D. (2006). *Curriculum for soil fertility and fertilizer*. Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). *Principles of plant nutrition*. New York, America: Springer Nature Switzerland AG.
- Nguyen, C. C., Bui, T. C., Nguyen, L. D., & Le, T. L. (2019). Effect of substrates and floria fertilizer on growth and development of Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) pot-planted in Ho Chi Minh City. Report on scientific research topics, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Popa, G., Balan, V., & Plocon, C. (2004). Studies on the in-vitro culture of *Lisianthus russellianus* Hook. *Buletinul Universitatii de Stiinta Agricole si Medicina Veterinara Cluj Napoca Seria Zootehnie si Biotehnologii* 60, 319-322.
- Rayment, G. E., & Lyons, D. J. (2011). *Soil chemical methods - Australasia*. Victoria, Australia: SCIRO Publishing.
- Slavich, P. G., & Petterson, G.H. (1993). Estimating the critical conductivity of saturated paste extracts from 1:5 soil:water suspensions and texture. *Australian Journal of Soil Research* 31, 73-81.

Effects of phosphorus fertilizer on growth, yield and quality of coconut at early reproductive stage under saline intrusion condition in Mekong Delta

Tri D. H. Nguyen^{1*}, Nong C. Le¹, Thu N. Q. Thai¹, Thang Q. Luu¹, & Chuong D. X. Nguyen²

¹Research Institute for Oil and Oil Plants, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: July 26, 2020

Revised: August 17, 2020

Accepted: August 26, 2020

Keywords

Coconut tree

Mekong Delta

Phosphorus fertilizer

Saline intrusion

*Corresponding author

Nguyen Doan Huu Tri

Email: huutri1207@gmail.com

ABSTRACT

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is one of the most important oil crops in the tropics. The tree is able to grow well under saline intrusion condition. However, in the case of high level of salinity for a long period, the coconut tree is severely affected, resulting in poor growth and yield. Therefore, providing balance and sufficient nutrients would help plants tolerate better to unsuitable environment including salinity. Among plant macronutrients, phosphorus is considered to help coconut tree have more roots and leaves, stimulating flowers formation and fruit setting which lead to improve yields. The aim of this work was to determine effects of the amount of phosphorus fertilizer and the frequency of application on growth, yield and quality of coconut tree at early reproductive stage under saline intrusion condition. Two two-factor experiments were conducted in Binh Dai district, Ben Tre province and Tan Phu Dong district, Tien Giang province where the highest salinity in the dry season reached 13.8‰ and 6.3‰, respectively. The treatments of experiments were arranged in split-plot design (SPD) with three replications. The main plot factor was the frequency of phosphorus fertilizer application (2 and 4 times per year) and the sub-plot factor was the amount of phosphorus fertilizer (30, 45, 60 and 75 kg P₂O₅/ha/year). The results showed that coconut trees grew best with the treatment of four applications of 60 kg P₂O₅/ha/year, corresponding to 0.3 kg P₂O₅/tree/year. The trees in this treatment had more leaves, fruit setting, nut number per tree and higher yield than other treatments under saline intrusion condition.

Cited as: Nguyen, T. D. H., Le, N. C., Thai, T. N. Q., Luu, T. Q., & Nguyen, C. D. X. (2020). Effects of phosphorus fertilizer on growth, yield and quality of coconut at early reproductive stage under saline intrusion condition in Mekong Delta. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 18-27.

Ảnh hưởng của phân lân đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng dừa ở đầu giai đoạn kinh doanh trong điều kiện xâm nhập mặn tại đồng bằng sông Cửu Long

Nguyễn Đoàn Hữu Trí^{1*}, Lê Công Nông¹, Thái Nguyễn Quỳnh Thư¹,
Lưu Quốc Thắng¹ & Nguyễn Đức Xuân Chương²

¹Viện Nghiên Cứu Dầu và Cây Có Dầu, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 26/07/2020

Ngày chỉnh sửa: 17/08/2020

Ngày chấp nhận: 26/08/2020

Từ khóa

Cây dừa
Đồng bằng sông Cửu Long
Phân lân
Xâm nhập mặn

*Tác giả liên hệ

Nguyễn Đoàn Hữu Trí
Email: huutri1207@gmail.com

TÓM TẮT

Cây dừa (*Cocos nucifera* L.) là một trong những cây trồng lấy dầu quan trọng ở các vùng nhiệt đới. Cây dừa có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện xâm nhập mặn. Tuy nhiên, nếu xâm nhập mặn cao và kéo dài, cây dừa sẽ bị ảnh hưởng nghiêm trọng, sinh trưởng chậm và cho năng suất kém. Vì thế, cung cấp cân bằng và đầy đủ chất dinh dưỡng sẽ giúp cây dừa tăng khả năng chống chịu ở các điều kiện bất lợi, trong đó có xâm nhập mặn. Trong các loại dinh dưỡng đa lượng, lân giúp cho cây dừa ra rễ tốt và tăng trưởng số lá, kích thích ra hoa và tăng tỉ lệ đậu trái, qua đó cải thiện năng suất. Vì vậy, nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định số lần bón và liều lượng phân lân đến sinh trưởng, năng suất cây dừa và chất lượng trái dừa ở giai đoạn đầu kinh doanh trong điều kiện xâm nhập mặn. Hai thí nghiệm hai yếu tố được thực hiện tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre và huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang, có độ mặn cao nhất vào mùa khô lần lượt là 13,8‰ và 6,3‰. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu lô phụ với 3 lần lặp lại. Yếu tố chính là số lần bón (2 và 4 lần/năm) và yếu tố phụ là liều lượng phân lân (30, 45, 60 và 75 kg P₂O₅/ha/năm). Kết quả cho thấy cây dừa sinh trưởng tốt nhất ở nghiệm thức bón 4 lần/năm với 60 kg P₂O₅/ha/năm, tương ứng với 0,3 kg P₂O₅/cây/năm. Cây dừa ở nghiệm thức này có số lá mọc thêm, tỉ lệ đậu trái, số trái/cây và năng suất cao hơn so với các nghiệm thức còn lại trong điều kiện xâm nhập mặn.

1. Đặt Vấn Đề

Cây dừa (*Cocos nucifera* L.) là loại cây lấy dầu được trồng phổ biến ở vùng nhiệt đới trên thế giới (Nguyen & ctv., 2005). Với nhiều giá trị dinh dưỡng và công dụng, cây dừa có vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng của các nước khu vực nhiệt đới. Tính đến cuối năm 2018, tổng diện tích trồng dừa trên toàn thế giới là 12.303.924 ha, đạt sản lượng 60.773.435 tấn (FAO, 2020). Nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm tươi đến chế biến từ cây dừa được dự báo sẽ tăng cao trong tương lai. Cây dừa có nhiều giá trị kinh tế, tuy không cao so với các

cây ăn trái hay công nghiệp lâu năm khác nhưng có tính ổn định về thị trường và bền vững về môi trường sinh thái (Cheng, 2011). Tuy nhiên, trong tình hình biến đổi khí hậu, khả năng nhiễm mặn được dự báo ngày càng cao, ảnh hưởng nghiêm trọng tới sản xuất cây trồng nói chung và canh tác cây dừa nói riêng. Theo Thai & ctv. (2018), cây dừa có khả năng chịu mặn cao lên đến 10‰, nhưng thực tế cho thấy tại đồng bằng sông Cửu Long xâm nhập mặn ở mức cao và kéo dài dẫn đến khả năng sinh trưởng và năng suất của cây dừa giảm đi, trong đó ảnh hưởng nhiều nhất tại một số vùng điển hình như Bình Đại, Thạnh Phú,

tỉnh Bến Tre và Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang. Theo BTSO (2018), sản lượng dừa của Bến Tre năm 2018 giảm từ 50 đến 60% so với năm 2017 do ảnh hưởng của xâm nhập mặn.

Cây dừa có đặc tính sinh trưởng liên tục và ra hoa đậu trái quanh năm, do đó nếu được bón phân nhiều lần trong năm cây sẽ sinh trưởng tốt, ra hoa liên tục, tăng số phát hoa và cải thiện năng suất. Cùng một lượng phân bón, nếu được chia bón nhiều lần sẽ giúp cây hấp thụ hiệu quả hơn và tránh được sự thất thoát (Tran & Nguyen, 2011). Trong các loại phân bón, phân lân tác động nhiều đến quá trình kích thích ra rễ, thúc đẩy sinh trưởng và phân hóa mầm hoa, qua đó giúp cây dừa tăng số phát hoa, số hoa cái, tỉ lệ thụ phấn thụ tinh, sự hình thành và nâng cao chất lượng trái. Theo Nguyen & ctv. (2005), phân lân giúp bộ rễ của cây dừa phát triển mạnh, cây hấp thu các chất dinh dưỡng trong đất tốt hơn và tạo điều kiện cho cây dừa ra hoa sớm ở thời kỳ đầu giai đoạn kinh doanh. Các nghiên cứu cho thấy, trên vùng đất nhiễm mặn, liều lượng phân lân thích hợp cho cây dừa Ta ở thời kỳ đầu giai đoạn kinh doanh từ 30 đến 40 kg P₂O₅/ha/năm (Nguyen & ctv., 2005; Pham & ctv., 2010; Thai & ctv., 2015). Tại đồng bằng sông Cửu Long, liều lượng phân lân bón cho cây dừa của nông dân ở mức 48 kg P₂O₅/ha/năm trong thời kỳ cho trái ở mô hình chuyên canh dừa Ta theo kết quả điều tra của Tran & Trieu (2011). Phân lân có vai trò quan trọng đối với cây dừa, nếu bị thiếu hụt có thể làm giảm sự sinh trưởng và năng suất cây đáng kể nhưng nếu thừa lân sẽ dẫn đến trái dừa chín sinh lý chậm và khối lượng cơm dừa khô giảm (Ton, 1974). Vì vậy, nghiên cứu này đã được thực hiện nhằm xác định số lần bón và liều lượng phân lân thích hợp cho sinh trưởng, năng suất và chất lượng cây dừa trồng tại vùng đất nhiễm mặn tại Bến Tre và Tiền Giang.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Giống dừa Ta được Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu tuyển chọn trong điều kiện nhiễm mặn. Vườn dừa thí nghiệm có 5 năm tuổi, đang bắt đầu cho trái và các cây thí nghiệm có độ đồng đều. Phân bón sử dụng là phân lân nung chảy Ninh Bình, gồm có 15% P₂O₅, 28% CaO, 14% MgO, 0,0012% Cd và có độ ẩm là 1%.

2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu lô phụ (SPD) gồm có 08 nghiệm thức và 03 lần lặp lại, yếu tố lô chính là số lần bón (2 và 4 lần/năm), yếu tố lô phụ là liều lượng phân lân (30, 45, 60 và 75 kg P₂O₅/ha/năm) trên nền phân bón 320 kg Komix + 90 kg N + 130 kg K₂O cho ha/năm.

Thí nghiệm được thực hiện tại xã Bình Thới, huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre và xã Tân Phú, huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang từ tháng 3/2019 đến 6/2020, trên hai vùng đất có hàm lượng dinh dưỡng thấp (Bảng 1) và độ mặn cao nhất của nước trong mương vườn dừa vào mùa khô tại Bến Tre là 13,8‰ và 6,3‰ tại Tiền Giang (Hình 1).

Hàm lượng dinh dưỡng trong đất và trong lá dừa trước khi thí nghiệm trình bày ở Bảng 1 và Bảng 2.

Theo phương pháp của Santos & ctv. (1996) và IRHO (1992) với các chỉ tiêu theo dõi sau:

- Sinh trưởng: tổng số lá mọc thêm (lá) và chiều dài phần mang lá của lá chức năng (cm). Lá chức năng được xác định từ lá chưa mở đến lá vị trí thứ 14 từ trên xuống theo hình xoay ốc.

- Năng suất: tỉ lệ đậu trái (%), số trái/buồng (trái) và năng suất thực thu (trái/7 tháng) tính đến thời điểm kết thúc thí nghiệm.

- Chất lượng trái: khối lượng trái (g), khối lượng cơm (g) và hàm lượng dầu (%) (xác định hàm lượng dầu theo phương pháp thử AOCS Aa4-38).

- Hàm lượng dinh dưỡng và chất hữu cơ trong đất trước và sau thí nghiệm: N dễ tiêu (phương pháp thử TCVN 5255:2009), P dễ tiêu (phương pháp thử TCVN 5256:2009), K trao đổi (phương pháp thử TCVN 8662:2011) và chất hữu cơ (phương pháp thử TCVN 8941:2011).

- Hàm lượng dinh dưỡng trong lá chức năng trước và sau thí nghiệm: nitơ (phương pháp thử 10 TCN 451:2001), photpho (phương pháp thử 10 TCN 453:2001) và kali (phương pháp thử 10 TCN 454:2001).

- Đo pH và Ec của mẫu đất các nghiệm thức sau khi kết thúc thí nghiệm bằng máy đo Hanna HI 2550.

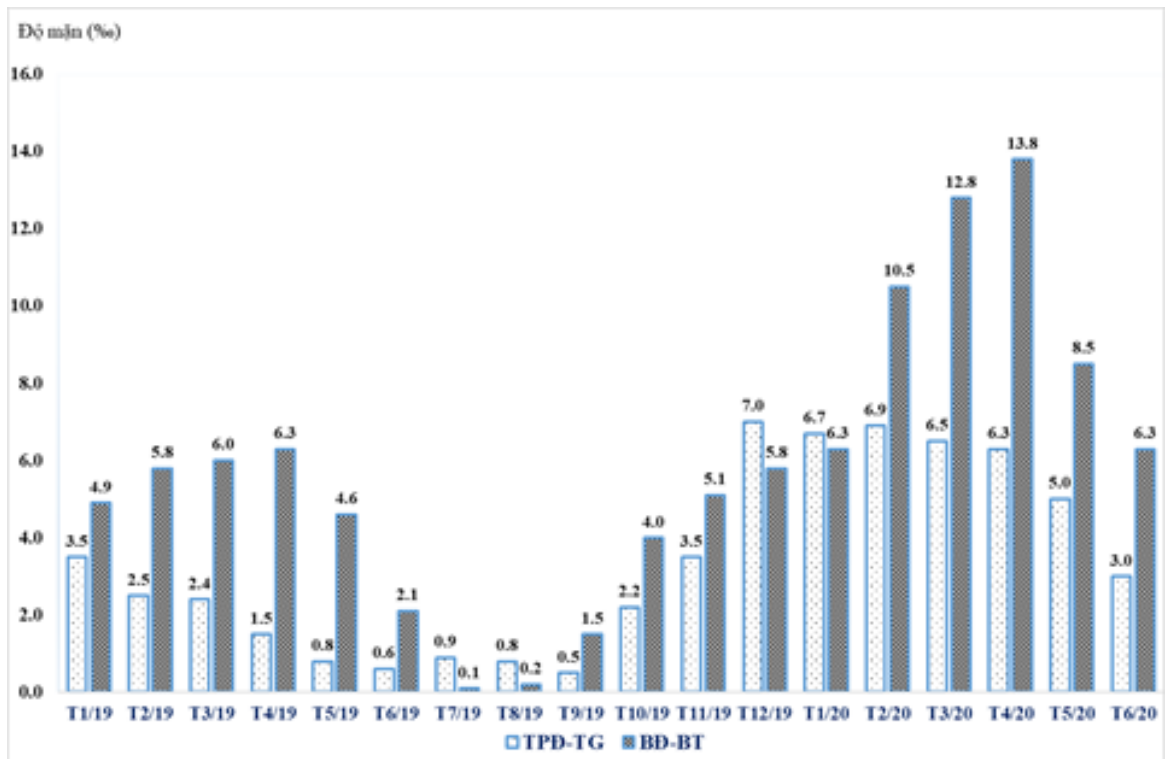
Xử lý số liệu: số liệu thu thập, tổng hợp bằng phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm SAS 9.1.

Bảng 1. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất trước thí nghiệm tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre và huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang

Chỉ tiêu	Đơn vị	Bình Đại	Tân Phú Đông
N dễ tiêu	mg/100 g đất	1,40	1,90
P dễ tiêu	mg/100 g đất	9,10	9,50
K trao đổi	mg/100 g đất	31,30	33,90
Chất hữu cơ	%	1,90	3,40
pH	-	4,7	4,5
Ec	mS/cm	0,42	0,18

Bảng 2. Hàm lượng dinh dưỡng trong lá dừa trước thí nghiệm tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre và huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang

Chỉ tiêu	Đơn vị	Bình Đại	Tân Phú Đông
N tổng	%	1,50	1,60
P tổng	%	0,08	0,09
K tổng	%	0,80	0,97



Hình 1. Diễn biến độ mặn tại Bến Tre và Tiền Giang từ tháng 1/2019 đến 6/2020.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất và trong lá dừa sau thí nghiệm

Bảng 3 và 4 cho thấy hàm lượng dinh dưỡng trong đất sau thí nghiệm tại Bến Tre và Tiền

Giang đều tăng lên, trong đó với cùng một lượng phân lân, hàm lượng lân ở các nghiệm thức bón 4 lần/năm cao hơn các nghiệm thức bón 2 lần/năm, điều này cho thấy khi số lần bón tăng lên, phân bón ít bị rửa trôi và hiệu suất sử dụng phân bón cao hơn. Qua đó, độ pH của các nghiệm thức được cải thiện, tăng từ đến 0,48 đến 0,52 tại Bến

Bảng 3. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất sau thí nghiệm tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre

Chỉ tiêu	Đơn vị	Nghiệm thức (số lần bón/liều lượng phân lân) ^(#)							
		2/30	2/45	2/60	2/75	4/30	4/45	4/60	4/75
N dễ tiêu	mg/100 g đất	3,2	3,5	3,9	3,8	3,7	3,9	4,1	4,2
P dễ tiêu	mg/100 g đất	12,1	12,3	12,5	12,7	12,6	12,8	13,5	14,1
K trao đổi	mg/100 g đất	32,6	32,1	32,4	32,8	32,8	33,2	33,1	34,2
Hữu cơ	%	2,2	2,1	2,1	2,1	2,3	2,3	2,3	2,4
pH	–	5,2	5,1	5,2	5,2	5,2	5,1	5,2	5,1
Ec	mS/cm	0,82	0,83	0,82	0,81	0,80	0,83	0,82	0,83

^(#)Số lần bón: lần/năm; liều lượng phân lân: kg P₂O₅/ha/năm.

Bảng 4. Hàm lượng dinh dưỡng trong đất sau thí nghiệm tại huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang

Chỉ tiêu	Đơn vị	Nghiệm thức (số lần bón/liều lượng phân lân) ^(#)							
		2/30	2/45	2/60	2/75	4/30	4/45	4/60	4/75
N dễ tiêu	mg/100 g đất	5,4	5,5	5,3	5,3	6,0	5,8	5,4	5,5
P dễ tiêu	mg/100 g đất	11,3	11,5	13,8	14,5	12,1	12,4	14,2	14,7
K trao đổi	mg/100 g đất	35,2	36,6	35,4	36,1	38,1	37,9	36,8	38,1
Hữu cơ	%	3,5	3,7	3,9	3,6	3,6	4,1	4,2	4,3
pH	–	5,0	5,0	5,0	4,9	4,9	4,9	5,0	4,9
Ec	mS/cm	0,63	0,60	0,62	0,62	0,61	0,63	0,63	0,62

^(#)Số lần bón: lần/năm; liều lượng phân lân: kg P₂O₅/ha/năm.

Bảng 5. Hàm lượng dinh dưỡng trong lá sau thí nghiệm tại huyện Bình Đại, tỉnh Bến Tre

Chỉ tiêu	Đơn vị	Nghiệm thức (số lần bón/liều lượng phân lân) ^(#)							
		2/30	2/45	2/60	2/75	4/30	4/45	4/60	4/75
N	%	1,59	1,6	1,63	1,64	1,6	1,66	1,75	1,73
P	mg/kg	805	815	842	835	820	830	858	847
K	%	0,85	0,86	0,91	0,90	0,86	0,93	1,00	0,94

^(#)Số lần bón: lần/năm; liều lượng phân lân: kg P₂O₅/ha/năm.

Bảng 6. Hàm lượng dinh dưỡng trong lá sau thí nghiệm tại huyện Tân Phú Đông, tỉnh Tiền Giang

Chỉ tiêu	Đơn vị	Nghiệm thức (số lần bón/liều lượng phân lân) ^(#)							
		2/30	2/45	2/60	2/75	4/30	4/45	4/60	4/75
N	%	1,65	1,7	1,76	1,71	1,7	1,77	1,83	1,74
P	mg/kg	1.204	1.239	1.269	1.260	1.248	1.275	1.293	1.270
K	%	0,98	1,03	1,04	1,00	1,06	1,13	1,13	1,01

^(#)Số lần bón: lần/năm; liều lượng phân lân: kg P₂O₅/ha/năm.

Tre và 0,47 đến 0,50 tại Tiền Giang. Bên cạnh đó, Ec trong dung dịch đất tăng lên so với trước thí nghiệm cho thấy tổng nồng độ ion hòa tan trong dung dịch đất được cải thiện, tạo điều kiện cho cây dừa hấp thụ các chất dinh dưỡng được dễ dàng, đồng thời giúp cho cây tăng khả năng chống chịu trong điều kiện xâm nhập mặn.

Sau thí nghiệm, hàm lượng dinh dưỡng trong lá được trình bày ở Bảng 5 và Bảng 6.

Sự gia tăng hàm lượng dinh dưỡng trong đất

tác động đến sự hấp thụ dinh dưỡng của lá và hàm lượng dinh dưỡng trong lá đều tăng hơn so với trước thí nghiệm (Bảng 5 và Bảng 6). Các nghiệm thức tại Bến Tre dao động từ 805 đến 858 mg/kg, tại Tiền Giang từ 1.204 đến 1.293 mg/kg. Theo Nampoothiri & ctv. (2018), hàm lượng lân tối ưu trong lá dừa là 1.200 đến 1.300 mg/kg mới đáp ứng nhu cầu của cây dừa, vì thế tại Bến Tre chưa đáp ứng đủ được ngưỡng tối ưu. Điều này thể hiện rõ trong điều kiện độ mặn cao ảnh hưởng

Bảng 7. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến tổng số lá mọc thêm (lá/cây) sau 12 tháng thí nghiệm của cây dứa Ta 6 năm tuổi tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	12,8 ^b	12,7 ^{bc}	12,7 ^{c'}	12,9 ^c	13,5 ^{bc}	13,2 ^{b'}
45	12,8 ^{bc}	13,3 ^b	13,0 ^{b'}	13,5 ^{bc}	14,0 ^b	13,7 ^{a'b'}
60	13,1 ^b	14,7 ^a	13,9 ^{a'}	13,1 ^c	14,8 ^a	14,0 ^{a'}
75	12,7 ^c	13,4 ^b	13,1 ^{b'}	11,8 ^d	13,5 ^{bc}	12,6 ^{b'}
TB	12,8 ^b	13,5 ^a		12,8 ^b	13,9 ^a	
CV _b (%) = 4,10 F _A = 13,42 ^{**}			CV _b (%) = 3,35 F _A = 19,22 [*]			
F _B = 7,72 ^{**} F _{AB} = 3,49 [*]			F _B = 10,31 ^{**} F _{AB} = 3,51 [*]			

^{a-d}, ^{a'-b'}/Trong cùng một hàng hoặc một cột, các trung bình mang các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); NS: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.
*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

Bảng 8. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến chiều dài phần mang lá của lá chức năng (cm) của cây dứa Ta 6 năm tuổi tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	327,5	315,5	321,5	345,2	349,3	345,6
45	315,8	316,2	316,0	330,7	331,8	331,3
60	313,7	322,3	318,0	329,0	348,5	338,8
75	303,2	326,3	314,8	326,2	348,8	337,5
TB	315,5	320,0		332,8	343,8	
CV _b (%) = 4,63 F _A = 1,51 ^{NS}			CV _b (%) = 4,38 F _A = 3,31 ^{NS}			
F _B = 0,24 ^{NS} F _{AB} = 1,51 ^{NS}			F _B = 0,94 ^{NS} F _{AB} = 0,94 ^{NS}			

NS: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

đáng kể đến sự sinh trưởng và khả năng hấp thu các chất dinh dưỡng của cây dứa (Remison & ctv., 1988). Trong đó hàm lượng lân trong lá cao nhất ở nghiệm thức bón 4 lần/năm với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha/năm, điều này cho thấy nghiệm thức bón 60 kg P₂O₅/ha là phù hợp vì khi tăng lên 75 kg P₂O₅/ha thì lượng lân trong lá không tăng lên ở cả hai số lần bón dẫn đến hiệu quả sử dụng phân bón thấp hơn.

3.2. Ảnh hưởng của phân lân đến quá trình sinh trưởng của cây dứa

Theo dõi quá trình sinh trưởng của cây dứa trong thí nghiệm, kết quả phân tích các chỉ tiêu: số lá mọc thêm/cây, chiều dài phần mang lá của lá chức năng được trình bày ở Bảng 7 và Bảng 8.

Bảng 7 cho thấy số lá mọc thêm của cây dứa khác biệt có ý nghĩa, trung bình đạt từ 12,7 đến 14,7 lá tại Bến Tre và 11,8 đến 14,8 lá tại Tiền Giang. Tại hai địa điểm cho thấy bón phân 4

lần/năm có số lá mọc thêm cao hơn so với bón 2 lần/năm, liều lượng phân lân ở mức 60 kg P₂O₅/ha có số lá mọc thêm trung bình cao hơn các liều lượng còn lại. Vì vậy, sự tương tác giữa số lần bón với liều lượng phân lân thể hiện cao nhất ở nghiệm thức bón 4 lần/năm ứng với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha.

Chiều dài phần mang lá của lá chức năng của cây dứa cả hai địa điểm khác biệt không có ý nghĩa, trung bình đạt 317,6 cm/lá tại Bến Tre và 338,7 cm/lá tại Tiền Giang (Bảng 8).

3.3. Ảnh hưởng của phân lân đến tỉ lệ đậu trái và năng suất cây dứa

Bảng 9 cho thấy tỉ lệ đậu trái của các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa. Trong đó Bến Tre tỉ lệ đậu cao nhất ở nghiệm thức bón phân 4 lần/năm ứng với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha đạt 56,4%, khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại, thấp nhất là nghiệm thức bón 2 lần/năm với liều

Bảng 9. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến tỉ lệ đậu trái (%) của cây dứa Ta 6 năm tuổi tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	46,5 ^e	52,4 ^{bc}	49,5 ^{b'}	49,7 ^{bc}	50,6 ^b	50,1 ^{b'}
45	49,7 ^d	53,5 ^b	51,6 ^{a'}	49,4 ^c	54,2 ^a	51,8 ^{a'b'}
60	50,0 ^d	56,4 ^a	53,1 ^{a'}	50,2 ^b	56,6 ^a	53,4 ^{a'}
75	50,7 ^{cd}	53,3 ^b	52,0 ^{a'}	50,6 ^b	50,3 ^b	50,4 ^{a'}
TB	49,2 ^b	53,9 ^a		50,0 ^b	52,9 ^a	
	CV _b (%) = 2,19 F _A = 61,6* F _B = 11,19** F _{AB} = 3,90*			CV _b (%) = 3,18 F _A = 34,85* F _B = 5,01* F _{AB} = 5,65*		

a-d, a'-b' Trong cùng một hàng hoặc một cột, các trung bình mang các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); NS: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

Bảng 10. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến số trái/buồng của cây dứa Ta 6 năm tuổi tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	3,9 ^d	4,8 ^c	4,3 ^{b'}	4,1 ^d	4,7 ^{bc}	4,4 ^{b'}
45	4,1 ^{cd}	4,8 ^b	4,5 ^{b'}	4,3 ^{cd}	4,8 ^b	4,6 ^{a'b'}
60	4,3 ^c	5,6 ^a	4,9 ^{a'}	4,4 ^{bcd}	5,4 ^a	4,9 ^{a'}
75	4,4 ^c	4,9 ^b	4,7 ^{a'b'}	4,5 ^{bc}	4,7 ^{bc}	4,6 ^{a'b'}
TB	4,2 ^b	5,0 ^a		4,3 ^b	4,9 ^a	
	CV _b (%) = 4,07 F _A = 37,5** F _B = 13,2** F _{AB} = 4,00*			CV _b (%) = 4,46 F _A = 20,69* F _B = 6,65** F _{AB} = 4,51*		

a-d, a'-b' Trong cùng một hàng hoặc một cột, các trung bình mang các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); NS: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

lượng 30 kg P₂O₅/ha. Tại Tiền Giang, tỉ lệ đậu trái tương đối cao hơn, cao nhất cũng ở nghiệm thức bón phân 4 lần/năm ứng với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha đạt 56,6%, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bón 2 lần/năm ứng với 30 kg P₂O₅/ha là 49,7% (Bảng 9).

Về năng suất, bón phân lân cũng đã cho hiệu quả rõ rệt đến số trái/buồng và số trái/7 tháng.

Bảng 10 cho thấy Bến Tre và Tiền Giang, số trái/buồng đạt cao nhất lần lượt là 5,6 trái và 5,4 trái của nghiệm thức bón phân 4 lần/năm ứng với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha, khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Do ảnh hưởng của độ mặn trong nước cao từ cuối năm 2019 đến giữa năm 2020 (Hình 1) nên số trái/buồng thấp hơn so với cây dứa trong điều kiện bình thường ở năm thứ 6 là khoảng 6 - 7 trái/buồng (Pham & ctv., 2010).

Năng suất cây dứa khác biệt có ý nghĩa thống

kê giữa số lần bón/năm, liều lượng phân lân/năm và các nghiệm thức phối hợp tại Bến Tre và Tiền Giang. Trong đó, cao nhất là nghiệm thức bón phân 4 lần/năm ứng với liều lượng 60 kg P₂O₅/ha, đạt 35,0 trái tại Bến Tre và 36,8 trái tại Tiền Giang (Bảng 11). Trong điều kiện độ mặn cao ảnh hưởng đến quá trình hình thành phát hoa, thụ phấn và thụ tinh nên có số trái thấp hơn so với điều kiện tối ưu (Thai & ctv., 2018). Tuy nhiên, bón phân cân đối và cung cấp đủ hàm lượng dinh dưỡng cho cây dứa giúp cải thiện được số trái và năng suất, đồng thời tăng khả năng chống chịu của cây dứa đối với điều kiện bất lợi (Thai & ctv., 2020). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Loganathan & Balakrishnamurti (1980) cho thấy tỉ lệ đậu trái, số trái/buồng và năng suất được cải thiện khi bón phân lân ở mức 2 kg super lân/cây/năm (tương ứng 57,6 kg P₂O₅/ha).

Bảng 11. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến năng suất thực thu (trái/7 tháng) của cây dứa Ta 6 năm tuổi tính đến thời điểm kết thúc thí nghiệm tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	28,7 ^d	33,3 ^{ab}	31,0 ^{b'}	27,2 ^d	34,8 ^{ad}	31,0 ^{b'}
45	30,3 ^{cd}	31,7 ^{bc}	31,0 ^{b'}	28,4 ^d	32,3 ^{ab}	30,7 ^{b'}
60	31,3 ^{bc}	35,0 ^a	33,2 ^{a'}	29,3 ^{cd}	36,8 ^a	33,1 ^{a'}
75	30,7 ^{cd}	30,7 ^{cd}	30,7 ^{b'}	32,5 ^{bc}	33,3 ^b	32,9 ^{a'}
TB	30,3 ^b	32,7 ^a		29,4 ^b	34,5 ^a	
CV _b (%) = 4,26 F _A = 68,73*			CV _b (%) = 4,20 F _A = 18,74*			
F _B = 4,31* F _{AB} = 3,63*			F _B = 5,07* F _{AB} = 8,57**			

^{a-d}, ^{a'-b'} Trong cùng một hàng hoặc một cột, các trung bình mang các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); NS: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.
*: Khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,05$; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $\alpha = 0,01$.

Bảng 12. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến khối lượng trái dứa (g/trái) tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	1.223,3	1.222,0	1.222,7	1.211,7	1.233,3	1.222,5
45	1.216,7	1.172,0	1.194,3	1.183,3	1.196,7	1.190,0
60	1.210,0	1.230,0	1.220,0	1.208,3	1.241,7	1.225,0
75	1.196,0	1.120,0	1.158,0	1.208,3	1.233,3	1.220,8
TB	1.211,5	1.186,0		1.202,9	1.226,3	
CV _b (%) = 5,55 F _A = 1,58 ^{NS}			CV _b (%) = 5,61 F _A = 7,14 ^{NS}			
F _B = 1,22 ^{NS} F _{AB} = 0,63 ^{NS}			F _B = 0,35 ^{NS} F _{AB} = 0,02 ^{NS}			

NS: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 13. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến khối lượng cơm dứa (g/trái) tại Bến Tre và Tiền Giang

Liều lượng (kg P ₂ O ₅ /ha) (B)	Bến Tre			Tiền Giang		
	Số lần bón/năm (A)		TB	Số lần bón/năm (A)		TB
	2	4		2	4	
30	225,0	223,3	224,2	245,0	250,3	248,8
45	217,0	223,5	220,3	240,0	254,7	247,3
60	229,0	233,3	227,5	231,2	253,3	242,5
75	226,7	215,0	220,8	235,0	243,3	239,2
TB	222,6	223,8		237,9	251,0	
CV _b (%) = 8,29 F _A = 0,03 ^{NS}			CV _b (%) = 6,27 F _A = 4,37 ^{NS}			
F _B = 0,20 ^{NS} F _{AB} = 0,46 ^{NS}			F _B = 0,50 ^{NS} F _{AB} = 0,27 ^{NS}			

NS: Khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

3.4. Ảnh hưởng của phân lân đến chất lượng trái dứa

Chất lượng trái dứa được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: khối lượng trái, khối lượng cơm dứa/trái và hàm lượng dầu. Các số liệu được trình

bày ở Bảng 12, Bảng 13 và Bảng 14.

Chưa thấy có sự sai khác về khối lượng trái, khối lượng cơm và hàm lượng dầu giữa các nghiệm thức riêng lẻ và phối hợp, qua đó cho thấy ảnh hưởng của phân lân đến chất lượng trái dứa chưa đáng kể, trong đó tại Bến Tre có khối

Bảng 14. Ảnh hưởng của số lần bón và liều lượng phân lân đến hàm lượng dầu dừa (%) tại Bến Tre và Tiền Giang

Nghiệm thức(#)	Bến Tre		Tiền Giang	
	Hàm lượng dầu (%)	Độ ẩm (%)	Hàm lượng dầu (%)	Độ ẩm (%)
2/30	64,3	58,3	59,8	59,4
2/45	64,1	58,2	59,6	59,4
2/60	64,4	57,5	59,7	60,7
2/75	64,4	57,8	59,8	59,3
4/30	64,5	58,4	59,8	61,4
4/45	64,6	58,6	59,8	60,0
4/60	64,8	58,9	59,9	61,8
4/75	64,6	57,0	59,8	60,0

(#) Số lần bón: lần/năm; liều lượng phân lân: kg P₂O₅/ha/năm.

lượng trái dao động từ 1.172,0 đến 1.230,0 g/trái và khối lượng cơm dao động từ 215,0 đến 233,3 g/trái, tương ứng tại Tiền Giang là 1.183,3 đến 1.233,3 g/trái và 231,0 đến 254,7 g/trái. Độ mặn cao tác động đến sự hình thành trái nên ở vùng nhiễm mặn, khối lượng trái và khối lượng cơm thấp hơn so với điều kiện bình thường (Thai & ctv., 2015). Hàm lượng dầu của trái dừa Ta tại Bến Tre dao động từ 64,1% đến 64,8% và tại Tiền Giang từ 59,6% đến 59,9%, điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây cho thấy hàm lượng dầu biến động tùy theo giống, điều kiện sinh thái và chế độ chăm sóc (Pham & ctv., 2010).

4. Kết Luận

Trong điều kiện xâm nhập mặn cao nhất vào mùa khô với độ mặn của nước trong mương vườn dừa là 13,8‰ tại Bến Tre và 6,3‰ tại Tiền Giang, bón phân lân 4 lần/năm với mức 60 kg P₂O₅/ha có hàm lượng lân dễ tiêu trong đất tăng lên tác động đến sự hấp thu dinh dưỡng của cây, cải thiện hàm lượng dinh dưỡng trong lá, thúc đẩy sinh trưởng và phát triển của cây dừa. Cây dừa ở nghiệm thức bón phân 4 lần/năm với mức 60 kg P₂O₅/ha có tổng số lá mọc thêm, tỉ lệ đậu trái, số trái/buồng và năng suất trái cao hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu đã được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của Bộ Công Thương trong phạm vi đề tài “Nghiên cứu chọn tạo giống dừa cho các tỉnh phía Nam” giai đoạn 2019 – 2023 do Viện Nghiên Cứu Dầu và Cây Có Dầu chủ trì.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- BTSO (Ben Tre Statistic Office). (2018). *Report for social and economic situation in the first ten months in 2018 in Ben Tre province. Report No. 588BC-CTK dated October 25, 2018*. Ben Tre, Vietnam: BTSO.
- Cheng-Xu, S., Hong xing, C., Hong bo, S., Xin tao, L., & Yong, X. (2011). Growth and physiological response to water and nutrient stress in oil palm. *African Journal of Biotechnology* 10(51), 10465-10471.
- FAO (The Food and Agriculture Organization). (2020). *Area harvested and production quantity of coconut*. Retrieved August 1, 2020, from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- IRHO (Research Institute for Oil and Oil Plants). (1992). *Coconut – Study of yield factors*. Paris, France: IRHO.
- Loganathan, P., & Balakrishnamurti, T. (1980). Effects of NPK fertilizers on young coconut (*Cocos nucifera* L.) in Sri Lanka. *Experimental Agriculture* 16(1), 41-48.
- Nampoothiri, K. U. K., Krishnakumar, V., Thampan, P. K., & Nair, M. A. (2018). *The coconut palm (Cocos nucifera L.) - Research and development perspectives*. Singapore: Springer.
- Nguyen, V. B., Tran, H. V., & Le, P. T. (2005). *Perennial crops, part II industrial crops*. Can Tho, Vietnam: Can Tho University Publishing House.
- Pham, L. T., Vo, L. V., Nguyen, H. T. B., Luu, T. Q., & Pham, T. P. (2010). *The perfect research on scientific data of four indigenous coconut varieties to apply for seed recognition*. Ho Chi Minh City, Vietnam: Research Institute for Oil and Oil Plants.
- Remison, U. S., Iremiren, G. O., & Thomas, G. O. (1988). Effect of salinity on nutrient content of the leaves of coconut seedlings. *Plant and Soil* 109(1), 135-138.
- Santos, G. A., Batugal, P. A., Othman, A., Baudouin, L., & Labouisse, J. P. (1996). *Manual on standardized research techniques in coconut breeding*. Singapore: International Coconut Genetic Resources Network.

- Thai, T. N. Q., Luu, T. Q., Pham, T. P., Nguyen, P. T. M., Nguyen, H. T. B., Nguyen, T. D. H., & Ngo, D. T. K. (2018). *The adaptive studies of coconut to saline intrusion conditions* (2016 – 2018). Ho Chi Minh City, Vietnam: Research Institute for Oil and Oil Plants.
- Thai, T. N. Q., Luu, T. Q., Pham, T. P., Nguyen, P. T. M., Nguyen, T. D. H., & Nguyen, H. T. B. (2020). Effects of fertilizer on growth, development and yield of coconut under saline intrusion conditions in the Mekong Delta. *Vietnam Trade and Industry Review*, 38-40.
- Thai, T. N. Q., Ngo, D. T. K., Nguyen, H. T. B., Luu, T. Q., Pham, T. P., & Nguyen, P. T. M. (2015). *The adaptive studies of coconut to saline intrusion conditions* (2013 – 2015). Ho Chi Minh City, Vietnam: Research Institute for Oil and Oil Plants.
- Ton, T. T. (1974). *Improving the coconut industry in Vietnam*. Ha Noi, Vietnam: The Agricultural Publishing House.
- Tran, H. V., & Nguyen, L. C. (2011). Investigating flowering characteristics of some tall coconut cultivars (*Cocos nucifera* L.) in Giong Trom district, Ben Tre province. *Can Tho University Journal of Science* 17(a), 210-218.
- Tran, H. V., & Trieu, Q. D. (2011). Survey of factors in relation to yield, 'fruitless phenomenon' and cultivation method testing on 'Ta Xanh' coconut in Ben Tre province. *Can Tho University Journal of Science* 17(b), 272-281.

Phytochemical analysis of *Ardisia silvestris* leaf extracts and their antioxidant and antibacterial activities

Biet V. Huynh^{1*}, Phuong N. T. Nguyen², Nga T. T. Nguyen^{3,4},
Toan Q. Truong¹, & Hong C. V. Phung¹

¹Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Applied Science, Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Department of Biotechnology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Faculty of Agriculture, Vietnam National University of Forestry (Dong Nai Campus), Dong Nai, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: December 16, 2019

Revised: February 10, 2020

Accepted: May 13, 2020

Keywords

Antibacterial activities

Antioxidant

Ardisia silvestris

Phytochemical analysis

*Corresponding author

Huynh Van Biet

Email: hvbiet@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The phytochemical analysis and antibacterial and antioxidant activity of *Ardisia silvestris* extracts were carried out. The bioactive compounds of *Ardisia silvestris* leaves were extracted with petroleum ether, ethyl acetate, ethanol and water by immersion and microwave method. The DPPH method was used to determine the antioxidant activity of *Ardisia silvestris* extracts. The antibacterial properties of *Ardisia silvestris* tested against of *Staphylococcus aureus*, *Samonella* sp., and *Escherichia coli* were determined by using agar diffusion method. The agar diffusion method was used to determine the antibacterial effects of both plant extracts on the test organisms. The results showed that *Ardisia silvestris* leaves contained compounds such as essential oils, fats, alkaloids, flavonoids, coumarins, tannins, anthocyanoids, carotenoids, organic acids, reducing agents, proanthocyanidins, saponins and anthraquinones. *Ardisia silvestris* leaves had a total polyphenol content of 0.26% dry matter, tannin of 8.8%, and a total flavonoid of 1.44 mg/g. The ethyl acetate extract and water extract of the leaves had the antioxidant activity and were 4.2 and 4.4 times lower than ascorbic acid, respectively. The ethyl acetate extract of *Ardisia silvestris* had the highest oxidative activity. The zone of inhibition of the plant extract diameters at the concentration of 100 µl/ml ranged between 9.67mm and 20.67mm for ethyl acetate and ethanol extracts, respectively on E.coli. Similarly, the zones of inhibition of ethyl acetate and ethanol extracts diameters were 14.67 and 15.33 mm, respectively on *Samonella* sp., however, it was not shown for *Staphylococcus aureus*.

Cited as: Huynh, B. V., Nguyen, P. N. T., Nguyen, N. T. T., Truong, T. Q., & Phung, H. C. V. (2020). Phytochemical analysis of *Ardisia silvestris* leaf extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 28-35.

Phân tích thành phần hóa thực vật và xác định khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết từ lá của cây khôi nhung (*Ardisia silvestris* Pitard)

Huỳnh Văn Biết^{1*}, Nguyễn Thị Ngọc Phương², Nguyễn Thị Thanh Nga^{3,4},
Trương Quang Toàn¹ & Phùng Võ Cẩm Hồng¹

¹Viện Nghiên Cứu Công Nghệ Sinh Học Và Môi Trường, Trường Đại Học Nông Lâm TP. HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Khoa Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Tôn Đức Thắng, TP. Hồ Chí Minh

³Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

⁴Khoa Nông Học, Trường Đại Học Lâm Nghiệp - Phân Hiệu Đồng Nai, Đồng Nai

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 16/12/2019

Ngày chỉnh sửa: 10/02/2020

Ngày chấp nhận: 13/05/2020

Từ khóa

Cây khôi nhung *Ardisia silvestris*

Chống oxy hoá

Kháng khuẩn

Phân tích hoá thực vật

*Tác giả liên hệ

Huỳnh Văn Biết

Email: hvbiet@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Khảo sát sơ bộ thành phần hóa thực vật, định lượng một số hợp chất và xác định khả năng kháng khuẩn, khả năng chống oxy hóa từ lá cây khôi nhung (*Ardisia silvestris*) đã được thực hiện. Các hợp chất của lá cây khôi nhung được ly trích với dung môi petroleum ether, ethylacetate, ethanol và nước bằng phương pháp ngâm dầm và đánh vi sóng. Khả năng chống oxy hoá của các dịch chiết lá cây khôi nhung được xác định bằng phương pháp DPPH. Khả năng kháng khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. và *Escherichia coli* của các cao chiết lá cây khôi nhung được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Các dung môi petroleum ether, ethyl acetate, ethanol và nước được dùng cho ly trích. Kết quả cho thấy lá cây khôi nhung có chứa các hợp chất như tinh dầu, chất béo, alkaloid, flavonoid, coumarin, tanin, anthocyanoid, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử, proanthocyanidin, saponin và anthraquinon. Hàm lượng polyphenol có trong lá cây khôi nhung là 0,26% chất khô. Hàm lượng tanin của lá cây khôi là 8,80%. Hàm lượng Flavonoid của lá cây khôi nhung là 1,442 mg/g. Dịch chiết ethyl acetate và dịch chiết nước của lá cây khôi nhung có khả năng kháng oxy hóa, nhưng thấp hơn so với acid ascorbic lần lượt là 4,2 và 4,4 lần. Dịch chiết ethyl acetate của lá khôi nhung có hoạt tính oxy hóa cao nhất. Các dịch chiết ethyl acetate và dịch chiết ethanol thể hiện rõ tính kháng vi khuẩn thông qua đường kính vòng vô khuẩn, đối với vi khuẩn *E.coli* lần lượt từ 9,67 mm đến 20,67 mm và *Salmonella* sp. là 14,67 mm và 15,33 mm, tuy nhiên không thể hiện đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*.

1. Đặt Vấn Đề

Do có điều kiện tự nhiên đa dạng nên Việt Nam có một hệ sinh thái phong phú và tiềm năng to lớn về tài nguyên cây dược liệu. Chính vì vậy, ở nước ta, từ lâu đời, trong dân gian với trí thức sử dụng các loài dược liệu, nhiều bài thuốc quý có giá trị chữa bệnh hữu hiệu đã được lưu truyền (Do, 2004). Tuy nhiên, để đáp ứng xu hướng hiện nay về sự “Trở về với thiên nhiên” với việc sử dụng thảo dược làm thuốc ngày càng nâng cao ở trong nước và trên thế giới thì cần có các nghiên chuyên

sâu và khoa học.

Cây khôi nhung (*Ardisia silvestris* Pitard) là loài thuộc chi *Ardisia*, họ *Myrsinaceae*, có nhiều hoạt tính sinh học đáng quý như hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng viêm giảm đau, chống oxy hóa, chống đái tháo đường, chống loãng xương, bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan và nhất là hoạt tính chống ung thư rất tốt (Do, 2004). Kobayashi & de Mejía (2005) đã nhận định: Chi *Ardisia* – một nguồn mới cung cấp các hợp chất tăng cường sức khỏe và dược phẩm có nguồn gốc thiên nhiên quý giá. Một số nghiên cứu cho thấy

rằng trong cây khô nhưng *Ardisia silvestris* có sự hiện diện của tannin, glucoside, saponin, alkaloid, chất béo, carotene, flavonoid (Nguyen, 1999; Tran, 2002). Tuy nhiên, ở Việt Nam dù đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh trong dân gian nhưng chưa có nhiều các nghiên cứu về thành phần hóa học cũng như hoạt tính sinh học của các loài thực vật trong chi *Ardisia* nói chung và cây khô nhưng *Ardisia silvestris* riêng. Chính vì vậy, nghiên cứu sơ bộ thành phần hóa thực vật, định lượng một số hợp chất và xác định khả năng kháng khuẩn, khả năng kháng oxy hóa từ lá cây khô nhưng được thực hiện nhằm củng cố, và cung cấp thêm các thông tin khoa học có giá trị và tin cậy về hoạt tính sinh học của cây khô nhưng, từ đó giúp cho việc khai thác sử dụng cây khô nhưng làm nguồn dược liệu trong thực tế có hiệu quả hơn.

2. Vật liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Cây khô nhưng (*Ardisia silvestris* Pitard) được thu thập tại Khu bảo tồn Thiên nhiên và Văn hóa Đông Nai, Vườn quốc gia Cát Tiên và tiếp tục nuôi trồng tại nhà lưới Viện nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường (RIBE), Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu lá được rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 50°C, sau đó được đem xay và đạt kích thước qua rây 2 mm được sử dụng làm nguyên liệu thí nghiệm. Vi khuẩn thử nghiệm: Các chủng vi khuẩn *Samonella* sp. và *Escherichia coli* ATCC 2592 gây bệnh tiêu chảy, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 gây nhiễm trùng da, được cung cấp bởi Phòng vi sinh của Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định độ ẩm của dược liệu: theo phương pháp cân, sấy ở nhiệt độ 105°C, đánh giá theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV (MOH, 2010), độ ẩm của dược liệu không được quá 13%.

Xác định độ tro toàn phần: phương pháp cân và nung dược liệu ở 550°C, chỉ tiêu được đánh giá theo Dược điển Việt Nam IV (MOH, 2010), độ tro toàn phần không quá 12%.

Tách chiết cao dược liệu: Tách chiết cao tổng bằng phương pháp ngâm dầm kết hợp đánh sóng siêu âm. Ngâm bột nguyên liệu (100 g) trong bình

chứa bằng thủy tinh với 500 mL dung môi, đánh sóng siêu âm 30 phút ở 30°C và để yên nhiệt độ phòng qua đêm.

Các chỉ tiêu phân tích hóa thực vật: Chuẩn bị dịch chiết với bốn dung môi petroleum ether, ethyl acetate, ethanol và nước lần lượt nhau: Chiết 10 g bột nguyên liệu (hoặc bã xác nguyên liệu đã được trích ly với dung môi trước) trong bình thủy tinh bằng dung môi (petroleum ether, ethyl acetate, ethanol hoặc nước) trong bồn siêu âm 30 phút (riêng đối với dung môi là nước thì được đun cất thủy nóng trên lò). Chiết cho đến khi dịch dung môi bốc hơi không còn vết mờ trên giấy thấm. Gộp dịch chiết lại đem cô quay còn khoảng 50 mL dịch chiết (Nguyen, 2007). Các cao chiết này được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Định tính các nhóm chất: tinh dầu, chất béo, alkaloid, flavonoid, coumarin, tanin, anthocyanoid, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử, proanthocyanidin, saponin và anthraquinon (Nguyen, 2007).

Xác định hàm lượng polyphenol: Dùng thuốc thử Folin - Ciocalteu (FC) để xác định các polyphenol trong dịch chiết nước của lá cây khô, acid gallic được làm chất hiệu chuẩn, kết quả trung bình của 3 lần lặp lại (Fu & ctv., 2011).

Xác định hàm lượng tannin: Tanin bị $KMnO_4$ oxy hóa ở môi trường acid. Điểm kết thúc định lượng được xác định bằng chỉ thị màu sulfo indigo. Từ lượng $KMnO_4$ tiêu thụ, tính ra lượng chất bị oxy hóa trong dược liệu dựa trên chất tanin chuẩn, quá trình chuẩn độ kết thúc khi dung dịch thử chuyển sang màu vàng, kết quả trung bình của 3 lần lặp lại (Le & ctv., 2005).

Xác định hàm lượng flavonoid: với đường chuẩn Rutin, kết quả trung bình của 3 lần lặp lại (Chang & ctv., 2002).

Đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa - phương pháp thử nghiệm DPPH: với Acid ascorbic (Merck, Germany) được sử dụng làm chất chuẩn đối chiếu.

Đánh giá khả năng kháng khuẩn: Xác định khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết lá khô nhưng đối với vi khuẩn *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. và *Staphylococcus aureus* với mật số là 10⁶ cfu/mL và đánh giá khả năng kháng khuẩn theo phương pháp cấy trang trên bề mặt thạch có đục lỗ (đường kính 5 mm, chứa 100 μ L dịch chiết mẫu) của từng nghiệm thức. Đo đường kính vòng vô khuẩn đánh giá mức độ kháng khuẩn của dịch chiết lá cây khô nhưng.

Bảng 1. Kết quả độ ẩm và tro toàn phần của mẫu nguyên liệu lá khô

Chỉ tiêu	Tỷ lệ (%)	Tiêu chuẩn dược liệu (%)	Đánh giá
Độ ẩm mẫu nguyên liệu	5,54 ± 0,22	< 13	Đạt
Độ tro toàn phần	10,73 ± 0,75	< 12	Đạt

Xử lý số liệu: các số liệu được phân tích ANOVA và trắc nghiệm phân hạng Tukey.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Đánh giá độ ẩm và tro toàn phần của mẫu nguyên liệu

Độ ẩm và tro toàn phần của mẫu cao chiết cây khô nhưng được trình bày trong Bảng 1. Kết quả cho thấy độ ẩm mẫu cao chiết lá khô nhưng khô đạt trung bình là 5,54 ± 0,22% và độ tro toàn phần là 10,73 ± 0,75%. Kết quả này phù hợp với tiêu chuẩn cao chiết theo quy chuẩn của Dược điển Việt Nam IV (MOH, 2010).

3.2. Định tính sơ bộ thành phần hóa học của nguyên liệu

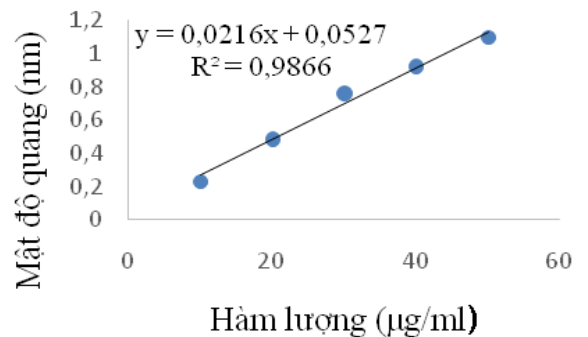
Lá cây khô nhưng sau khi xay nhuyễn được chiết với các hệ dung môi khác nhau theo độ phân cực tăng dần kết hợp đánh sóng siêu âm. Các loại dịch chiết petroleum ether, dịch chiết ethyl acetate, dịch chiết ethanol, dịch chiết nước được dùng để thử nghiệm định tính các hợp chất. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả khảo sát sơ bộ hóa thực vật của lá cây khô nhưng cho thấy sự xuất hiện của các hợp chất như tinh dầu, chất béo, alkaloid, flavonoid, coumarin, tanin, anthocyanoid, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử, proanthocyanidin, saponin và anthraquinon. Ngoài một số hợp chất tương tự đã được công bố trước đây như tanin, saponin, alkaloid, đường khử, chất béo, carotene, flavonoid (Nguyễn, 1999), kết quả nghiên cứu này đã cho thấy rằng trong cây khô nhưng còn có các hợp chất khác như anthocyanoid, proanthocyanidin, anthraquinon. Trong dịch chiết với nước, phần lớn có sự hiện diện của các hợp chất khảo sát ngoại trừ chất béo và coumarin. Khảo sát thành phần hóa học của các hợp chất trong thực vật có ý nghĩa quan trọng trong xác định các nhóm chất và tác dụng của các chất này, giúp cho quá trình xác định cấu trúc, chức năng và việc tách chiết từng chất dễ dàng và ít tốn kém thời gian, chi phí và đồng thời qua việc xác định sự hiện diện của các hợp chất trong lá cây khô nhưng cũng

góp phần nâng cao giá trị sử dụng nhờ những hợp chất có trong lá cây khô nhưng nói riêng, cây dược liệu nói chung.

3.3. Định lượng hàm lượng polyphenol, tanin, flavonoid trong dịch chiết lá cây khô nhưng

Hàm lượng polyphenol trong lá cây khô được xác định dựa trên đường chuẩn acid gallic (Hình 1)) với dãy nồng độ 10; 20; 30; 40; 50 µg/mL với phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0216x + 0,0527$; với $R^2 = 0,9866$. Kết quả hàm lượng polyphenol trong lá cây khô được trình bày ở Bảng 3. Hàm lượng flavonoid tổng số của mẫu được xác định dựa vào đường chuẩn rutin (Hình 2) với các thể tích 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4 mL, xác định được phương trình hồi quy tuyến tính $y = 0,0143x + 0,0177$; với $R^2 = 0,9904$. Kết quả về hàm lượng flavonoid tổng số của mẫu được thể hiện ở Bảng 3. Hàm lượng tannin được xác định bằng phương pháp oxy hóa. Một mL dung dịch $KMnO_4$ 0,1 N tương ứng với 0,004157 g tanin tinh khiết. Kết quả về hàm lượng tanin có trong mẫu lá cây khô được trình bày ở Bảng 3.

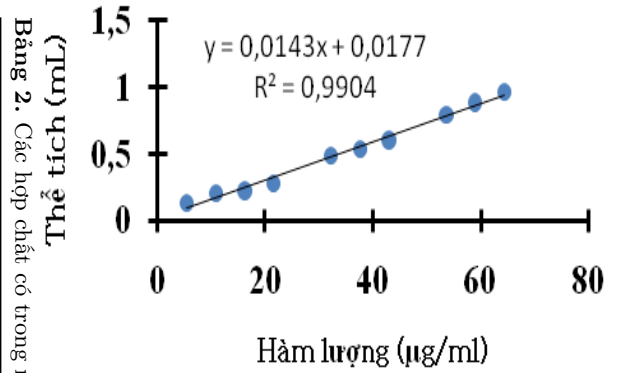


Hình 1. Đường chuẩn acid gallic.

Lá cây khô nhưng có hàm lượng polyphenol tổng số là 0,26% chất khô, tanin là 8,8%, và flavonoid tổng số là 1,44 mg/g chất khô (Bảng 3).

Một số nghiên cứu cho thấy polyphenol là một trong những hợp chất thứ cấp chính của nhiều loài thực vật, tham gia vào một số chức năng

Nhóm hợp chất	Thuốc thử	Phản ứng dương tính	Dịch chiết petroleum ether	Dịch chiết ethyl acetate	Dịch chiết cồn	Dịch chiết nước
Chất béo	Nhỏ dd lên giấy H ₂ SO ₄	Vết trong mờ	+	+	-	-
Carotenoid	Bốc hơi tới cạn	Xanh dương hay xanh đậm	-	+	+	+
Tinh dầu	Phát quang trong kiềm KOH 10%	Có mùi thơm	+	+	+	+
Coumarin	HCl	Có hiện tượng vẩn đục	+	+	-	-
Anthraquinon	HCl	Đỏ	-	+	-	+
Anthocyanosid	HCl/nhiệt độ	Đỏ	-	+	-	+
Proanthocyanidin	dd FeCl ₃	Xanh nâu hay xanh đen	+	+	+	+
Tannin	Lắc mạnh dd	Bột bèn	+	-	-	+
Saponin	Na ₂ CO ₃	Sủi bọt	+	-	-	+
Acid hữu cơ	Pha loãng với cồn 90%	Tủa bông trắng - vàng nâu	+	-	+	+
Hợp chất polymeric	TT Dragendorff	Tủa đỏ cam	-	+	+	+
Akaloid	Mg/HCl đậm đặc	Dung dịch có màu đỏ hồng	-	-	+	+
Flavonoid	TT Fehling	Màu đỏ gạch ở đáy	-	-	+	+
Chất khử						+



Hình 2. Đường chuẩn rutin.

Bảng 2. Các hợp chất có trong mẫu lá cây khô nhưng

sinh lý như kháng oxy hóa (Bhattacharyya & ctv., 2014) và có tác dụng mạnh mẽ trong hoạt tính kháng oxy hóa (Kikuzaki & ctv., 2002), kháng viêm, kháng khuẩn, kháng dị ứng, kháng lão hóa và một số bệnh liên quan tới ung thư (Dai & Mumper, 2010). Phần lớn các hợp chất polyphenol bị ảnh hưởng bởi một số yếu tố tác động như UV, nhiệt độ, thành phần dưỡng chất và yếu tố di truyền (Ling & Subramaniam, 2007). Hàm lượng polyphenol phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng hay độ non già của nguyên liệu. Nguyên liệu càng non, hàm lượng polyphenol càng lớn và ngược lại. Hàm lượng polyphenol trong lá cây khô nhưng trong nghiên cứu này thấp hơn so với thí nghiệm được thực hiện trên nguyên liệu lá chè từ non đến già là 14,63% đến 26,60% chất khô (mẫu được sấy ở 70°C) (Giang & ctv., 2011).

Tương tự, tannin có tính kháng khuẩn được dùng trong điều trị các bệnh viêm ruột, tiêu chảy. Tannin thường có nhiều trong búp sim, búp ổi, vỏ ổi và vỏ măng cụt, vì vậy đây là những nguồn dược liệu tiêu biểu đã được dân gian sử dụng trong việc điều trị các bệnh này. Phối hợp với tính làm săn se, tannin còn được dùng để làm thuốc súc miệng khi niêm mạc miệng, họng bị viêm loét hoặc chữa vết loét do người bệnh nằm lâu. Theo dược liệu Việt Nam hàm lượng tannin có trong lá ổi từ 7 - 10%. Như vậy, hàm lượng tannin của lá khô nhưng đạt 8,8% (Bảng 3) tương đương với hàm lượng tannin trong lá ổi.

Một trong những hợp chất khá phổ biến và có nhiều chức năng trong nhiều loài thực vật đó là flavonoid. Trong thực vật bậc cao, flavonoids tham gia vào lọc tia cực tím (UV), cộng sinh cố định đạm và sắc tố của hoa (Grotewold, 2007). Flavonoids có thể hoạt động như một chất chuyển hoá hóa học hoặc điều chỉnh sinh lý, và cũng có

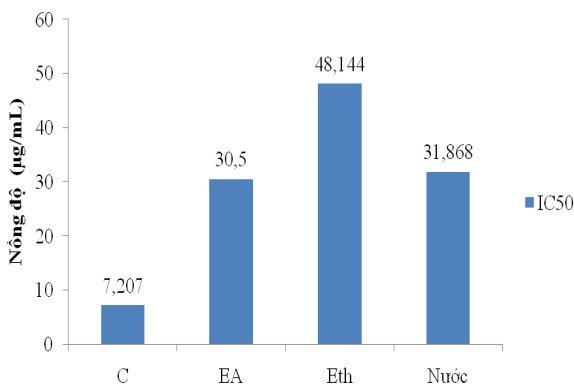
Bảng 3. Kết quả định lượng hợp chất polyphenol, flavonoid và tanin có trong lá cây khô

Loại	Polyphenol (% chất khô)	Tanin (% w/w chất khô)	Flavonoid tổng số (mg/g chất khô)
Mẫu lá khô (n = 3)	0,26 ± 0,05	8,80 ± 0,4	1,44 ± 0,19

thể hoạt động như các chất ức chế chu kỳ tế bào. Trong nghiên cứu này, hàm lượng flavonoid trung bình của dịch chiết từ lá cây khô nhưng đạt 1,442 ± 0,19 (mg/g) (Bảng 3) thấp hơn so với kết quả nghiên cứu hàm lượng flavonoid từ lá cây rau sam (*P. oleraceal.*) (1,76 mg/g) (Zhu & ctv., 2009).

3.4. Khả năng kháng oxy hóa của dịch chiết lá cây khô nhưng

Các dịch chiết được dùng thử nghiệm đều có hoạt tính sinh học khác nhau. Giá trị IC₅₀ của vitamin C (acid ascorbic) là 7,207 µg/mL. Tiếp theo là ethyl acetate (EA) và nước lần lượt là 30,51 µg/mL và 31,868 µg/mL. Cao nhất là ethanol (Eth) là 48,144 µg/mL. Giá trị IC càng cao thể hiện khả năng kháng oxy hóa càng thấp. Theo đồ thị ở Hình 3 dựa vào giá trị IC₅₀ thấy được dung môi ethyl acetate và nước có khả năng kháng oxy hóa thấp hơn lần lượt 4,2 lần và 4,4 lần so với acid ascorbic. Ethanol (Eth) có khả năng kháng oxy hóa thấp nhất, thấp hơn IC₅₀ của acid ascorbic là 6,7 lần. Dịch chiết với Petroleum ether không cho kết quả kháng oxy hóa.



Hình 3. Đồ thị thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa của các dịch chiết thông qua giá trị IC₅₀. C: Acid ascorbic, EA: dịch chiết với dung môi Ethyl acetate, Eth: dịch chiết với dung môi ethanol, Nước: dịch chiết với nước.

Các dịch chiết được dùng thử nghiệm đều có hoạt tính sinh học khác nhau. Giá trị IC₅₀ của vitamin C (acid ascorbic) là 7,207 µg/mL. Tiếp theo là ethyl acetate (EA) và nước lần lượt là 30,51

µg/mL và 31,868 µg/mL. Cao nhất là ethanol (Eth) là 48,144 µg/mL. Giá trị IC càng cao thể hiện khả năng kháng oxy hóa càng thấp. Theo đồ thị ở Hình 3 dựa vào giá trị IC₅₀ thấy được dung môi ethyl acetate và nước có khả năng kháng oxy hóa thấp hơn lần lượt 4,2 lần và 4,4 lần so với acid ascorbic. Ethanol (Eth) có khả năng kháng oxy hóa thấp nhất, thấp hơn IC₅₀ của acid ascorbic là 6,7 lần. Dịch chiết với Petroleum ether không cho kết quả kháng oxy hóa.

3.5. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của dịch chiết lá cây khô nhưng

Bốn loại dịch chiết lá cây khô với các dung môi petroleum ether, ethyl acetate, ethanol được đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*, *Samonella sp.*, *S. aureus*. Kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, đối với vi khuẩn *E. coli* các dịch chiết đều có khả năng ức chế ngoại trừ dịch chiết petroleum ether không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Trong đó, đường kính trung bình vòng vô khuẩn của dịch chiết ethyl acetate là lớn nhất, tiếp đến là của dịch chiết ethanol và sau đó là của dịch chiết nước lần lượt tương ứng là 20,67; 9,67 và 6,67 mm.

Tương tự, đối với vi khuẩn *Samonella sp.*, đường kính vòng vô khuẩn của các dịch chiết rất khác nhau (Bảng 4), từ nhỏ đến lớn lần lượt là 0; 7,67; 14,67; 15,33 mm tương ứng của dịch chiết petroleum ether, nước, ethanol và ethyl acetate. Trong đó, đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết ethanol và ethyl acetate không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Hai dịch chiết này có tính kháng mạnh đối với vi khuẩn *Samonella sp.*

Trong khi đó, cả bốn dịch chiết lá cây khô nhưng trong nghiên cứu này đều không có khả năng ức chế đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus* điều này có thể do nồng độ các hoạt chất có trong dịch chiết thấp. Trong nghiên cứu trước đây, kết quả cho thấy dịch chiết của cây *Ardisia elliptica* không có khả năng kháng khuẩn đối với *E. coli* và *Staphylococcus aureus* (Al-Abd & ctv., 2017).

Bảng 4. Khả năng kháng khuẩn của các dịch chiết với các dung môi khác nhau

Vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)			
	Dịch chiết petroleum ether	Dịch chiết ethyl acetate	Dịch chiết ethanol	Dịch chiết nước
<i>E. coli</i>	-	20,67 ^a ± 0,94	9,67 ^b ± 0,47	6,67 ^c ± 0,47
<i>Salmonella</i> sp.	-	15,33 ^a ± 0,47	14,67 ^a ± 0,48	7,67 ^b ± 0,49
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-

"-": không có giá trị.

^{a-b}Trong cùng một hàng, các giá trị có các ký tự khác nhau thì có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

4. Kết Luận

Lá cây khô nhưng *Ardisia silvestris* Pitard có độ ẩm và độ tro toàn phần đạt tiêu chuẩn dược liệu. Trong lá cây khô nhưng có chứa các hợp chất tinh dầu, chất béo, alkaloid, flavonoid, coumarin, tanin, anthocyanoid, carotenoid, các acid hữu cơ, chất khử, proanthocyanidin, saponin và anthraquinon. Trong lá cây khô nhưng, hàm lượng polyphenol tổng số là 0,26% chất khô, tanin là 8,8%, và flavonoid tổng số là 1,44 mg/g. Dịch chiết ethyl acetate và dịch chiết nước của lá cây khô nhưng có khả năng kháng oxy hóa thấp hơn so với acid ascorbic lần lượt 4,2 lần và 4,4 lần. Dịch chiết ethyl acetate và dịch chiết ethanol thể hiện vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn *E. coli* (từ 9,67 mm đến 20,67 mm) và *Salmonella* sp. (từ 14,67 mm đến 15,33 mm), tuy nhiên không thể hiện đối với vi khuẩn *Staphylococcus aureus*. Việc cô lập các đơn chất trong lá cây khô nhưng đang được thực hiện và cần được nghiên cứu đánh giá sâu hơn hoạt tính sinh học của các đơn chất này.

Lời Cảm Ơn

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã cấp kinh phí cho nghiên cứu này; cảm ơn Ban Lãnh đạo, Cán bộ công tác tại Khu bảo tồn Thiên nhiên và Văn hóa Đồng Nai, Vườn quốc gia Cát Tiên đã hỗ trợ trong việc thu thập mẫu cây khô nhưng.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

Al-Abd, N. M., Nor, Z. M., Mansor, M., Zajmi, A., Hasan, M. S., Azhar, F., & Kassim, M. (2017). Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7(6), 569-576.

Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Diengdoh, R., & Tandon, P. (2014). Genetic stability and phytochemical analysis of the invitro regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid. *Meta Gene* 2, 489-504.

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chen, J. (2002). Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3), 178-182.

Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15, 7313-7352.

Do, T. L. (2004). *Vietnamese medicinal plants and herbs*. Ha Noi, Vietnam: Medical Publishing House.

Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q., & Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry* 129(2), 345-350.

Giang, K. T., Nguyen, M. T., Pham, H. V., Pham, D. T. H., & Duez, P. (2011). Effect of quality of material on polyphenol content and antibacterial activity of pH tea varieties. *Journal of Science and Development* 9(2), 258-264.

Grotenow, E. (2007). *The science of flavonoids*. New York, USA: Springer Publishing House.

Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. (2002). Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2161-2168.

Kobayashi, H., & de Mejia, E. (2005). The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology* 96(3), 347-354.

Le, T. M., Nguyen, T. H., Pham, T. T., Nguyen T. H., & Le, T. L. C. (2005). *Methods of analysis for fermentation technology*. Hanoi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.

Ling, L. F., & Subramaniam, S. (2007). Biochemical analyses of *Phalaenopsis violacea* orchid. *Asian Journal of Biochemistry* 2, 237-246.

MOH (Ministry of Health) (2010). *Vietnam pharmacopoeia IV*. Ha Noi, Vietnam: Medical Publishing House.

Nguyen, P. K. T. (2007). *Methods of isolation of organic compounds*. Ho Chi Minh City, Vietnam: National University Publishing House.

Nguyen, T. P. (1999). *Handbook for searching and identifying families of angiosperms in Vietnam*. Ha Noi, Vietnam: Agricultural Publishing House.

- Tran, L. T. K (2002). *Study on chemical composition and biological activity of some Ardisia species of Myrsinaceae family in Vietnam* (Unpublished Doctoral dissertation). Vietnam Academy of Science and Technology, Ha Noi, Vietnam.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., & Tang, T. (2009). Analysis of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV-Vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. *Food Analytical Methods* 3(2), 90-97.

Synthesis and transfer of RNAi construct for potential knock-down of gene expression of root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) to rice (*Oryza sativa* L.)

Phong V. Nguyen*, Phuong T. Nguyen, Nhi T. Y. Le, & Loan T. N. Nguyen

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

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: April 01, 2020

Revised: May 28, 2020

Accepted: July 01, 2020

Keywords

Agrobacterium

Effector

Gene silencing

MicroRNA

Rice root-knot nematode

*Corresponding author

Nguyen Vu Phong

Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Effectors play key roles in the parasitism of the plant-parasitic nematode. Silencing the effector-coding genes was applied to study the function and role of nematode effectors. In this study, the *Mgra16281* gene (ID: MK322955.1) encoding an effector with the unknown function was cloned from the rice root-knot nematode *Meloidogyne graminicola* isolated in Long An province. To knock-down the expression of this gene, an artificial microRNA was synthesized based on the Osa-MIR528 precursor and inserted into an expression vector. This microRNA can be expressed in rice to investigate the function of *MGRA16281* of root-knot nematode via host-induced gene silencing approach (HIGS).

Cited as: Nguyen, P. V., Nguyen, P. T., Le, N. T. Y., & Nguyen, L. T. N. (2020). Synthesis and transfer of RNAi construct for potential knock-down of gene expression of root-knot nematode (*Meloidogyne graminicola*) to rice (*Oryza sativa* L.). *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 36-44.

Tổng hợp và chuyển cấu trúc RNAi có khả năng bất hoạt gene tuyến trùng sừng rế (*Meloidogyne graminicola*) vào cây lúa (*Oryza sativa* L.)

Nguyễn Vũ Phong*, Nguyễn Thế Phương, Lê Thị Yến Nhi & Nguyễn Thị Ngọc Loan

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: 01/04/2020
 Ngày chỉnh sửa: 28/05/2020
 Ngày chấp nhận: 01/07/2020

Từ khóa

Agrobacterium
 Câm lặng gene
 Effector
 MicroRNA
 Tuyến trùng sừng rế lúa

***Tác giả liên hệ**

Nguyễn Vũ Phong
 Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Các effector có vai trò quan trọng trong quá trình ký sinh của tuyến trùng gây hại thực vật. Phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa effector đang được áp dụng để nghiên cứu chức năng và vai trò của effector tuyến trùng. Trong nghiên cứu này, gene *Mgra16281* (ID: MK322955.1) mã hóa một effector chưa rõ chức năng được tạo dòng từ tuyến trùng *Meloidogyne graminicola* ký sinh cây lúa. Từ đó, cấu trúc microRNA nhân tạo có khả năng bất hoạt chuyên biệt gene này được tổng hợp nhờ vào precursor Osa-miR528 của cây lúa. Cấu trúc miRNA nhân tạo được gắn vào vector biểu hiện và chuyển vào cây lúa nhằm tìm hiểu vai trò của effector *Mgra16281* thông qua con đường làm câm lặng gene bởi cây chủ (HIGS).

1. Đặt Vấn Đề

Tuyến trùng ký sinh thực vật (plant-parasitic nematode) là sinh vật gây hại trực tiếp lên hầu hết các bộ phận của cây và gián tiếp mở đường tạo điều kiện cho các tác nhân gây hại khác như vi khuẩn, virus xâm nhập vào cây trồng gây hại nặng thêm. Các triệu chứng gây hại do tuyến trùng gây ra khó phân biệt với triệu chứng do các tác nhân phi sinh học như thời tiết bất lợi hay thiếu dinh dưỡng gây ra. Hằng năm, tuyến trùng ký sinh thực vật chịu trách nhiệm cho hơn 80 tỷ USD thiệt hại nông nghiệp trên toàn thế giới (Nicol & ctv., 2011). Tuyến trùng sừng rế *Meloidogyne* là một trong những loài tuyến trùng ký sinh thực vật gây thiệt hại về kinh tế lớn nhất 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. Riêng cây lúa, sản lượng đã bị giảm từ 10 - 25% (Gregory & ctv., 2017). *Meloidogyne* có trên 60 loài, trong đó 4 loài *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. hapla* là ký sinh gây hại nghiêm trọng (Eisenback & Triantaphyllou, 1991). *Meloidogyne graminicola* - một trong những loài tuyến trùng phổ biến gây hại trên lúa và được xem là đe dọa lớn đối với nền nông nghiệp lúa gạo, đặc biệt ở châu Á (Dutta & ctv., 2012). Về mặt kinh tế, *M. graminicola* ước tính gây thiệt hại khoảng 17 - 32% sản lượng lúa (Kyndt & ctv., 2014). Ở Việt Nam, loài này ký sinh tương đối phổ biến trên lúa cạn (giai đoạn lúa non, khi chưa ngập nước) tại đồng bằng sông Cửu Long (Gao & Liu, 2010).

Effector là các protein tuyến trùng tiết vào trong tế bào thực vật, đóng vai trò tác động và thay đổi phản ứng của cây chủ (Hogenhout &

ctv., 2009), tạo thuận lợi cho quá trình ký sinh. Thông qua kim chích, effector được chuyển vào tế bào nhằm sửa đổi, ngăn chặn hoặc chống lại phản ứng phòng vệ, từ đó tạo điều kiện xâm nhập hoặc di trú của tuyến trùng trong rễ cây. Ngoài ra, các effector bắt đầu hoặc duy trì sự phát triển của các vị trí dinh dưỡng, hỗ trợ cho sự tăng trưởng và phát triển của tuyến trùng (Goverse & Smant, 2014). Sử dụng phương pháp làm câm lặng các gene mã hóa các protein độc tính này đang được quan tâm nghiên cứu và hứa hẹn là công cụ hữu hiệu tạo giống cây trồng kháng tuyến trùng sùng rễ.

Nghiên cứu này trình bày kết quả tổng hợp amiRNA (artificial miRNA) có khả năng bất hoạt gene *Mgra16281*, mã hóa cho một effector chưa biết chức năng, tạo dòng từ mẫu tuyến trùng sùng rễ *M. graminicola*. Cấu trúc amiRNA được chuyển vào cây lúa nhằm bước đầu tìm hiểu vai trò của effector này trong quá trình ký sinh thực vật của tuyến trùng sùng rễ.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vector pNW55 chứa Osa-miR528 precursor (AN: MI0003201) được cung cấp bởi Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, Đức.

Vector pC5300OE được thiết kế bằng cách chèn cassette attP1-ccdB-attP2 GatewayR vào vùng multiple cloning sites của vector pCambia1300intA.Ubi-tnos (còn có tên IRS154) giữa maize ubiquitin promoter/first exon/first intron sequence và trình tự NOS polyadenylation (JC Breitler, chưa công bố) được cung cấp bởi CIRAD Montpellier, Pháp.

Vi khuẩn *E. coli* TOP10 và *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 từ Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Thu thập tuyến trùng *Meloidogyne graminicola*

Tuyến trùng *Meloidogyne* được phân lập từ ruộng lúa ở huyện Thạnh Hóa, tỉnh Long An. Nguồn tuyến trùng được lưu giữ trong nhà lưới bằng cách lây nhiễm tất cả ấu trùng cảm nhiễm tuổi 2 (J2s) nở từ một bọ trứng lên cây lúa IR64 15 ngày tuổi. Sau 60 ngày, dòng tuyến trùng

sùng rễ được nhận diện nhờ đặc điểm vân sinh môn con cái theo Golden & Birchfield (1965) và SCAR-PCR với primer chuyên biệt tuyến trùng *M. graminicola* Mg-F (GGG GAA GAC ATT TAA TTG ATG ATC AAC) và Mg-R (GGT ACC GAA ACT TAG GGA AAG) theo Bellafiore & ctv. (2015). Sản phẩm PCR được giải trình tự và so sánh với trình tự hiện diện trên Genbank.

2.3. Tạo dòng gene *Mgra16281*

RNA tổng số của J2s 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) sử dụng primer oligo dT. Đoạn trình tự mã hóa protein được tổng hợp bằng PCR với primer Mg16281-F (ATG TTT TTT CTA AAA TAT TTC CCA ATT TCA) và Mg16281-R (TTA ATT CTT CTT TGA AGA CAA ATT ACA G). Chu kỳ nhiệt của phản ứng gồm 35 chu kỳ 94°C/30 giây, 50°C/30 giây, 72°C/1 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng GenJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và nối vào vector pJET1.2/blunt (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 nhờ kháng sinh và PCR colony. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết bằng GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) và gene tạo dòng được giải trình tự bởi First Base (Malaysia).

2.4. Thiết kế và tổng hợp miRNA nhân tạo

Dựa vào trình tự gene *Mgra16281* 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 miRNA nhân tạo gợi ý được đưa ra bởi WMD3, kiểm tra và lựa chọn 01 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 cây lúa (bao gồm hai nhóm indica và japonica) nhờ công cụ Target Search của WMD3 trên hai database *Oryza sativa* Indica Group PUT v183 (PGDP) và *Oryza sativa* Japonica Group PUT v183 (PGDP); (2) vị trí gắn của miRNA nhân tạo với mRNA mục tiêu nằm ở vùng 3'; (3) năng lượng liên kết giữa

Bảng 1. Các primer sử dụng tổng hợp các microRNA nhân tạo bằng PCR overlapping

Primer	Trình tự (5' → 3')
I miR	agTTTCGTTTCAGAACGGAACGAcaggagattcagtttga
II miR	tgTCGTTCCGTTCTGAAACGAAActgctgctgctacagcc
III miR*s	ctTCGTTGCGTACTGAAACGAAAttctctgctgctaggetg
IV miR*a	aaTTTCGTTTCAGTACGCAACGAagagaggcaaaagtga

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 21 nu của precursor Osa-MIR528 bởi đoạn miRNA 21 nu mới nhờ kỹ thuật PCR overlapping theo Warthmann & ctv. (2008) (Bảng 1).

Cấu trúc amiRNA mới được 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 pC5300OE.

2.5. Gắn cấu trúc amiRNA vào vector biểu hiện

Đoạn MIR528 trong plasmid pC5300OE được thay thế bằng đoạn trình tự amiRNA tổng hợp. Plasmid pC5300OE và đoạn amiRNA được xử lý bằng enzyme cắt *Bam*HI và *Pst*I (Thermo Scientific) và nối với nhau nhờ T4 DNA ligase (Thermo Scientific) để tạo plasmid tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp pC5300OE-amiRNA được biến nạp vào trong tế bào *E. coli* TOP10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Trình tự và hướng chèn của amiRNA trong vector pC5300OE được kiểm tra trước khi biến nạp plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 để chuyển cấu trúc amiRNA vào cây chủ.

2.6. Tạo cây lúa mang cấu trúc miRNA nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Giống lúa IR64 được sử dụng chuyển gene theo quy trình của Sahoo & ctv. (2011) với một số biến đổi. Hạt lúa chín được bóc vỏ trấu không làm tổn thương đến phôi hạt. Tiếp theo hạt được khử trùng bằng khí chlorine trong 2 giờ, ngâm trong cồn 70° trong 1 phút và nước javel 15% trong 20 phút, sau đó được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng. Hạt được thấm khô và đặt vào môi trường cảm ứng tạo mô sẹo (MCI, môi trường khoáng MS cơ bản chứa tất cả các vitamin bổ sung 30 g/L

maltose, casein hydrolysate 0,3 g/L, 0,6 g/L L-proline, 3,0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0,25 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP), điều chỉnh pH đến 5,8 trước khi hấp khử trùng). Mẫu đặt trong tối ở nhiệt độ 27°C ± 1°C trong 3 tuần.

Khuẩn lạc *A. tumefaciens* EHA105 được tăng sinh trong 5 mL môi trường YEP lỏng bổ sung 10 mg/L rifampicin, 50 mg/L kanamycin. Dịch khuẩn được ủ ở nhiệt độ 28°C, lắc 200 vòng/phút trong 16 giờ. Sau đó chuyển 400 µL dịch khuẩn sang 100 mL môi trường YEP bổ sung kháng sinh và nuôi cấy với điều kiện tương tự. Khi OD₆₀₀ đạt 1,0 sinh khối vi khuẩn được thu nhận bởi ly tâm 3.200 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C và được pha loãng trong môi trường MCI chứa 150 µM acetosyringone.

Mô sẹo phôi hóa được lấy nhiễm với dịch khuẩn OD₆₀₀ từ 0,1 - 0,3 trong 10, 20, 30 phút kết hợp lắc 50 vòng/phút và làm khô với giấy thấm vô trùng trong 5 phút. Sau đó, mô sẹo được đặt trên môi trường đồng nuôi cấy (MCI chứa 10 g/L glucose; pH 5,2; 150 µM acetosyringone) và ủ ở 27°C ± 1°C trong tối. Sau 48 giờ đồng nuôi cấy, mô sẹo được ngâm và rửa với cefotaxime 250 mg/L nhiều lần, thấm khô với giấy thấm vô trùng. Tiếp theo, mẫu được đặt trên môi trường chọn lọc (MSM, MCI bổ sung 250 mg/L cefotaxime và 50 mg/L hygromycin) nuôi ở 27 ± 1°C trong tối 12 ngày. Sau lần chọn lọc đầu tiên, chỉ những mô sẹo chắc sáng được chuyển sang môi trường MSM cho lần chọn lọc thứ hai và ủ ở 27 ± 1°C trong tối 10 ngày. Tiếp đến, mô sẹo tiếp tục được chuyển sang môi trường MSM cho lần chọn lọc thứ ba ở 27 ± 1°C trong tối 5 ngày. Sau 3 lần chọn lọc, những mô sẹo phôi hóa được chuyển sang môi trường tiên tái sinh MSRMa (MS bổ sung 30 g/L maltose, 2 mg/L kinetin, 0,2 mg/L naphthalene acetic acid (NAA), pH 5,8; 250 mg/L cefotaxime và 30 mg/L hygromycin) ở 27 ± 1°C trong tối 7 ngày. Sau đó, chuyển mẫu sang môi trường MSRMB (MS, 30 g/L maltose, 2,7 mg/L BAP, 1,2 mg/L kinetin, 0,5 mg/L NAA, pH 5,8; 250 mg/L cefotaxime

và 30 mg/L hygromycin) nuôi ở điều kiện sáng (4.000 lux) trong 4 ngày để tiếp tục tái sinh.

Để tạo rễ, chồi được chuyển sang môi trường tạo rễ MROM (1/2 MS, 30 g/L sucrose, 3,0 g/L phytagel, pH 5,8; 250 mg/L cefotaxime và 30 mg/L hygromycin) và duy trì ở $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ở điều kiện sáng như trên trong 1 tuần. Cây lúa sau khi được tạo rễ hoàn chỉnh sẽ chuyển trồng trong nhà lưới.

2.7. Kiểm tra sự hiện diện của gen chuyển

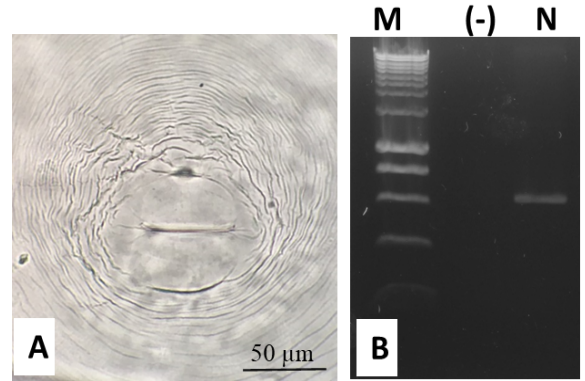
Dựa vào sự hiện diện của gene *hptII* kháng hygromycin trong đoạn T-DNA, DNA tổng số của mẫu chồi giả định chuyển gene được ly trích bằng GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit và thực hiện phản ứng PCR với cặp primer chuyên biệt *hptII-F* (5'-AGC TGC GCC GAT GGT TTC TAC AA-3') và *hptII-R* (5'-ATC GCC TCG CTC CAG TCA ATG-3'). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR là $94^\circ\text{C}/5$ phút, 35 chu kỳ ($94^\circ\text{C}/30$ giây, $64^\circ\text{C}/30$ giây, $72^\circ\text{C}/60$ giây), $72^\circ\text{C}/10$ phút. Kiểm tra kết quả PCR bằng điện di trên gel agarose 1%, 80V, trong 30 phút.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Thu thập tuyến trùng *Meloidogyne graminicola*

Từ mẫu rễ lúa thu thập đã phân lập dòng tuyến trùng sùng rễ ký sinh. Để định danh tuyến trùng, hình dạng vân sinh môn của năm con cái trưởng thành từ dòng tuyến trùng được quan sát ghi nhận. Vân sinh môn có hình bầu dục, không có đường bên, có sự hội tụ của các đường cong ở lớp biểu bì và hội tụ tại đường vân cuối cùng. Đối chiếu với mô tả của Golden & Birchfield (1965) có thể xác định dòng tuyến trùng phân lập là tuyến trùng *M. graminicola* (Hình 1A). Để củng cố kết quả định danh bằng hình thái, SCAR-PCR với primer chuyên biệt loài *M. graminicola* đã được áp dụng theo Bellafiore & ctv. (2015). Kết quả điện di cho thấy đã khuếch đại một đoạn DNA duy nhất kích thước tương đương 640 bp từ DNA tổng số của con cái (Hình 1B).

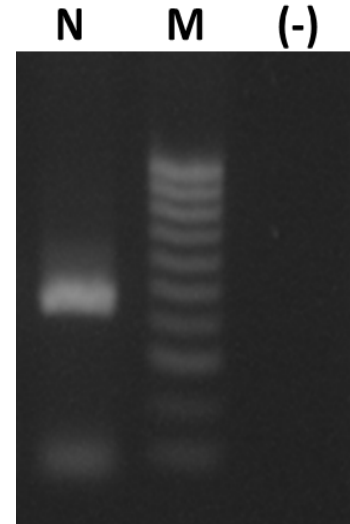
Kết quả BLAST cho thấy trình tự sản phẩm tương đồng từ 99 - 100% với sản phẩm của *M. graminicola* phân lập từ Việt Nam và Trung Quốc. Từ kết quả định danh hình thái và phân tử, dòng tuyến trùng sùng rễ lúa phân lập từ Long An được xác định là tuyến trùng *Meloidogyne graminicola*.



Hình 1. Vân sinh môn con cái (A) và sản phẩm Mg-SCAR-PCR (B) tuyến trùng. (M) DNA ladder 1 kb; (-) Đối chứng âm; (N) Tuyến trùng.

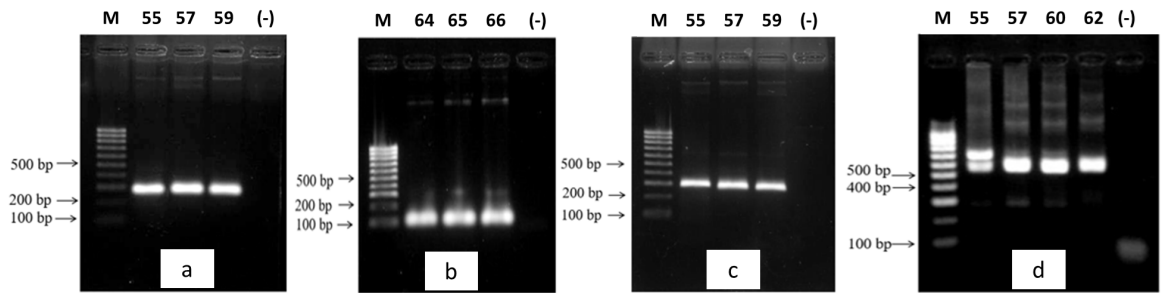
3.2. Tạo dòng gene *Mgra16281*

Từ cDNA tổng số của dòng tuyến trùng phân lập đã khuếch đại được sản phẩm có kích thước lớn hơn 400 bp tương ứng với kích thước gene mục tiêu (420 bp) (Hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại đoạn mã hóa gene. (M) DNA marker 100 bp; (-) Đối chứng âm; (N) Tuyến trùng.

Kết quả tạo dòng gene trong vi khuẩn *E. coli* TOP10 sử dụng vector pJET1.2/blunt cũng cho thấy đã tạo được vector tái tổ hợp mang đoạn gene mục tiêu. Trình tự đoạn gene khuếch đại được hiệu chỉnh và tương đồng 97% với trình tự gene *Mgra16281* trong dữ liệu bộ gene của



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR tổng hợp miR16281-111.

(M): DNA marker 100 bp; (-) Đối chứng âm; (a, b, c, d): Các phản ứng PCR thành phần.

M. graminicola (Somvanshi & ctv., 2018) và 80% với *Minc16281* của *M. incognita* (MH315945.10). Trình tự đoạn gene *Mgra16281* của dòng tuyến trùng *M. graminicola* được đăng ký trên Genbank (MK322955.1) và sử dụng làm khuôn để thiết kế các miRNA nhân tạo.

3.3. Thiết kế và tổng hợp miRNA nhân tạo

Trình tự đoạn gene *Mgra16281* của dòng tuyến trùng *M. graminicola* được sử dụng để thiết kế các miRNA nhân tạo nhờ phần mềm WMD3. Sau khi tối ưu nhiệt độ bắt cặp và thời gian kéo dài của từng phản ứng thành phần (a, b, c) đã thu được sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 257 bp, 87 bp, 259 bp. Các sản phẩm này dùng làm khuôn cho PCR overlapping (d) tổng hợp đoạn precursor mang đoạn amiRNA kích thước khoảng 554 bp đúng bằng kích thước lý thuyết mong đợi (Hình 3).

Cấu trúc precursor mang miR16281-111 được nhân dòng nhờ vector pJET1.2/blunt trong tế bào *E. coli* TOP10 và sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp bằng PCR colony. Kết quả điện di cho băng DNA sáng, rõ và đúng kích thước dự kiến vào khoảng 672 bp. Plasmid tái tổ hợp của 3 dòng vi khuẩn được tách chiết và gửi giải trình tự hai chiều. Kết quả sau hiệu đính cho thấy cấu trúc amiR16281-111 có chiều dài 549 nu và trình tự đúng với dự tính (Hình 4).

3.4. Gắn cấu trúc amiRNA vào vector biểu hiện tạo vector chuyển gene

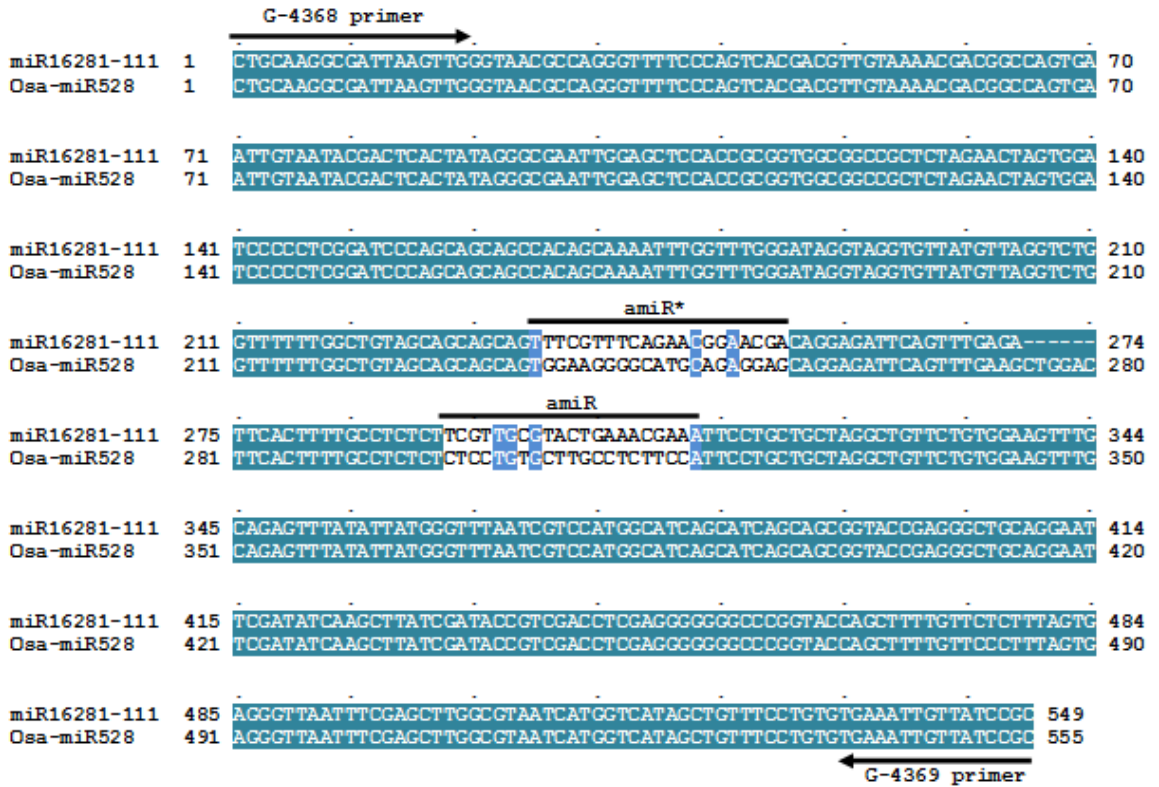
Vector pC5300OE được sử dụng làm vector biểu hiện cấu trúc amiRNA trong cây lúa. Hai cấu trúc pC5300OE và pJET2.1-miR16281-111 được xử lý bằng enzyme cắt *Pst*I và *Bam*HI. Plasmid

pC5300OE sau khi được cắt tạo sản phẩm có gồm hai phân đoạn kích thước khoảng 400 bp và 10 kb (Hình 5A). pJET2.1-miR16281-111 sau khi cắt thu được ba băng có kích thước khoảng 250 bp, 500 bp và 2 kb (Hình 5B).

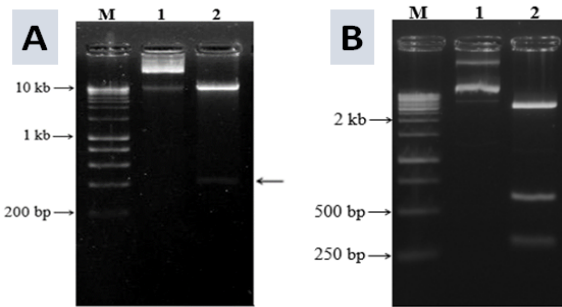
Sản phẩm bao gồm pC5300OE mở vòng và amiR16281-111 được thu hồi từ gel nối bằng enzyme T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp. Plasmid pC5300OE-16281-111 tiếp tục được nhân dòng trong hệ thống tế bào *E. coli* TOP10 và biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105 Việc sàng lọc tế bào mang vector tái tổ hợp được thực hiện nhờ phản ứng PCR với cặp primer IV (miRNA reverse) và I (miRNA* forward) xác định sự hiện diện của miR16281-111. Kết quả PCR 7 khuẩn lạc tạo băng sáng rõ, kích thước tương đương 87 bp chứng tỏ amiR16281-111 đã được nối thành công vào vector pC5300 (Hình 6).

3.5. Tạo cây lúa mang cấu trúc miRNA

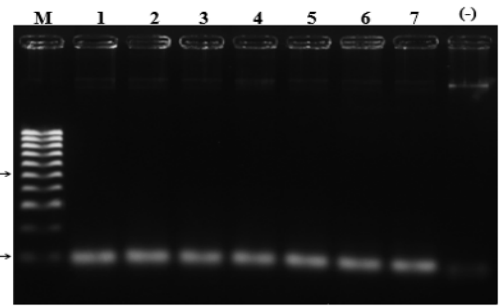
Mô sẹo 18 ngày tuổi có màu trắng ngà (Hình 7a) được lây nhiễm với dịch vi khuẩn *A. tumefaciens*, sau đó cấy lên môi trường đồng nuôi cấy, ủ trong tối ở 28°C. Các mô sẹo hóa nâu sau 5 ngày nuôi trên môi trường chọn lọc lần I (Hình 7b) có thể mô sẹo chưa có biểu hiện tính kháng kháng sinh hoặc do lớp tế bào bề mặt của mô sẹo không tiếp xúc với môi trường nuôi cấy nên hóa nâu và chết. Sau 10 ngày xuất hiện các khối mô sẹo trắng ngà phát triển từ các mẫu mô hóa nâu (Hình 7c). Sau 12 ngày mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc lần II trong 10 ngày và môi trường chọn lọc lần III trong 7 ngày. Không có hiện tượng tái nhiễm vi khuẩn sau giai đoạn đồng nuôi cấy, mô sẹo sống sót tăng sinh chậm. Mô sẹo được cấy sang môi trường tạo chồi, để trong tối 7 ngày, sau đó chuyển ra ánh sáng. Sau



Hình 4. Trình tự 21 nu amiR16281-111 thay thế vào trình tự 21 nu của precursor Osa-miR528.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm cắt pC5300OE (A) và pJET2.1-miR16281-111 (B). (M) DNA ladder 1 kb; (1) Không enzyme; (2) BamHI và PstI.

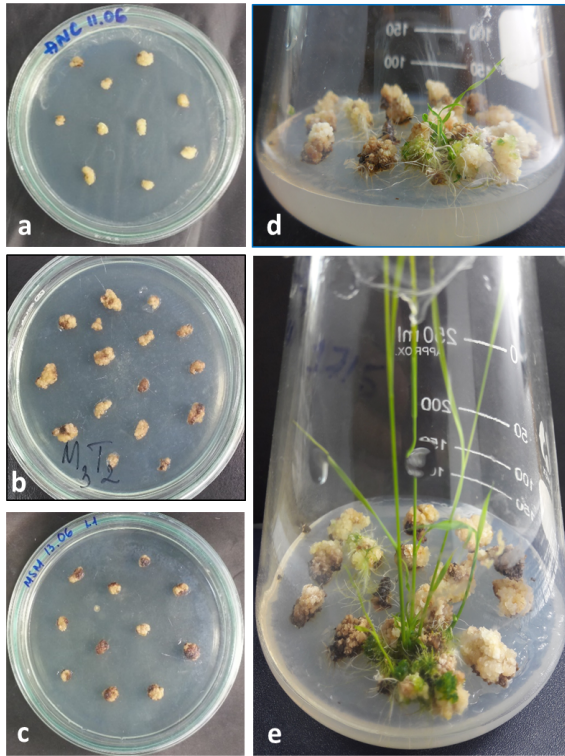


Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR sàng lọc dòng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp. (M): DNA ladder 100 bp; (-) Đối chứng âm; (1-7): Các khuẩn lạc.

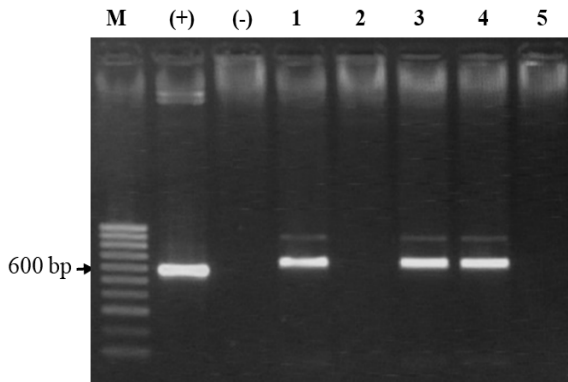
7 ngày một số mô sẹo hình thành chồi (Hình 7de). Sau 15 ngày, các chồi phát triển tốt được tách chuyển sang môi trường tạo rễ và cây được trồng trong nhà lưới để thu hạt.

DNA của 5 chồi giả định chuyển gene được tách chiết và tiến hành phản ứng PCR phát hiện sự hiện diện của gene *hptIII*. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ DNA 5 chồi giả định chuyển gene

xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với kích thước đoạn gene *hptIII* dự kiến được khuếch đại là 508 bp ở 3 chồi chuyển gene (Hình 8). Do đó, bước đầu đã thu nhận được chồi chuyển gene thế hệ T0. Các chồi được tiếp tục nuôi tạo rễ hoàn chỉnh và trồng ở nhà lưới nhằm thu nhận hạt phục vụ cho các phân tích tiếp theo trên cây T1.



Hình 7. Tạo cây lúa mang cấu trúc amiR nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. (a) Mỡ seo phơi hóa được lây nhiễm vi khuẩn; (b, c) Mỡ seo trên môi trường chọn lọc sau 5 ngày và 10 ngày; (d, e) Chồi tạo thành sau 40 và 50 ngày.



Hình 8. Sự hiện diện của gene *hptII* trong chồi giả định chuyển gene. (1) DNA ladder 100 bp; (+) Đối chứng dương; (-) Đối chứng âm; (1-5) DNA chồi giả định chuyển gene.

Mgra16281 là gene mã hóa một effector chưa biết chức năng của tuyến trùng *Meloidogyne graminicola*. Effector này chứa một đoạn peptide tín hiệu (signal peptide) ở đầu N-terminal và dự đoán có khả năng định vị bên trong tế bào chất

của tế bào chủ. Các kết quả thực nghiệm cho thấy khi xử lý tuyến trùng với siRNA chuyên biệt cho mRNA bằng phương pháp soaking đã làm giảm khả năng ký sinh của tuyến trùng. Trong nghiên cứu này, trình tự gene *Mgra16281* của dòng tuyến trùng *M. graminicola* ký sinh lúa đã được xác định tương đồng 97% so với trình tự của *M. graminicola* từ Ấn Độ (Somvanshi & ctv., 2018) và 80% so với *M. incognita* phân lập từ cây đậu nành ở Việt Nam (Nguyễn & ctv., 2019). Điều này làm rõ thêm nhận định về mức độ đa hình của các effector trong cùng một loài và liên loài *Meloidogyne* sp. (Bellafiore & Briggs, 2010). Để tìm hiểu chức năng liên quan đến độc tính của effector này ở tuyến trùng, cấu trúc miRNA nhân tạo đã được tổng hợp và chuyển vào trong cây lúa IR64 nhằm giảm mức độ biểu hiện của effector thông qua cây ký chủ (HIGS). Sự biểu hiện của miRNA trong cây lúa và thử nghiệm đánh giá mức độ giảm khả năng ký sinh của tuyến trùng trên cây lúa sẽ được tiếp tục thực hiện để làm sáng tỏ vai trò của effector cung cấp thêm dữ liệu cho lựa chọn phương thức chọn tạo giống và kiểm soát tuyến trùng sưng rễ ở cây trồng.

4. Kết Luận

Trình tự gene *Mgra16281* mã hóa một effector chưa biết chức năng của tuyến trùng *Meloidogyne graminicola* đã được xác định trình tự. Dựa vào trình tự của đoạn gene này đã thiết kế và tổng hợp cấu trúc amiRNA có khả năng bất hoạt sự biểu hiện của gene 16281 của tuyến trùng sưng rễ. Cấu trúc này đã được chuyển vào cây lúa nhờ vào vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 nhằm nghiên cứu vai trò của effector 16281 trong quá trình ký sinh cây lúa của tuyến trùng *M. graminicola*.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.03-2015.86.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

Bellafiore, S., & Briggs, S. P. (2010). Nematode effectors and plant responses to infection. *Current Opinion in Plant Biology* 13(4), 442-448.

Bellafiore, S., Jouglu, C., Chapuis, É., Besnard, G., Suong, M., Nguyen, V. P., De Waele, D., Gantet, P., & Ngo, T. X. (2015). Intraspecific variability of the facultative meiotic parthenogenetic root-knot nematode

- (*Meloidogyne graminicola*) from rice fields in Vietnam. *Comptes Rendus Biologies* 338(7), 471-483.
- Dutta, T. K., Ganguly, A. K., & Gaur, H. S. (2012). Global status of rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. *African Journal of Microbiology Research* 6(31), 6016-6021.
- Eisenback, J. D., & Triantaphyllou, H. H. (1991) Root-knot Nematodes: *Meloidogyne* species and races. In W. R. Nickle (Ed). *Manual of agricultural nematology* (191-274). New York, USA: Marcel Dekker.
- Gao, L., & Liu, X. Z. (2010). Sporulation of several biocontrol fungi as affected by carbon and nitrogen sources in a two-stage cultivation system. *The Journal of Microbiology* 48(6), 767-770.
- Golden, A. M., & Birchfield, W. (1965). *Meloidogyne graminicola* (Heteroderidae), a new species of root-knot nematode from grass. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 32(2), 228-231.
- Goverse, A., & Smant, G. (2014). The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 243-265.
- Gregory, C. B., Marceline, E., & Conrad, B. (2017). The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. In: Shah, M. M. (Ed.). *Nematology: Concepts, diagnosis and control* (121-151). London, UK: IntechOpen.
- Hogenhout, S. A., Van der Hoorn, R. A., Terauchi, R., & Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant Microbe Interaction* 22, 115-122.
- Kyndt, T., Fernandez, D., & Gheysse, G. (2014). Plant-parasitic nematode infections in rice: Molecular and cellular insights. *Annual Review of Phytopathology* 52(1), 135-153.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., den Nijs, L., Hockland, S., & Tahna Maafi, Z. (2011). Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J. T., Gheysen, G., and Fenoll, C. (Eds.). *Genomic and molecular genetic of plant nematode interactions* (21-43). London, UK: Springer.
- 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.
- Sahoo, K. K., Tripathi, A. K., Pareek, A., Sopory, K. S., & Singla-Pareek, S. L. (2011). An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods* 7(1), 49.
- Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 2, 3rd ed.). New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., & Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(5), 1121-1133.
- Somvanshi, V. S., Tathode, M., Shukla, R. N., & Rao, U. (2018). Nematode genome announcement: A draft genome for rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology* 50(2), 111-116.
- Trudgill, D. L., & Block, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 39(1), 53-77.
- Warthmann, N., Chen, H., Ossowski, S., Weigel, D., & Hervé, P. (2008). Highly specific gene silencing by artificial miRNAs in rice. *PLoS ONE* 3(3), e1829.

Assessment of salinity intrusion in coastal districts of Ben Tre province using Landsat 8 image

Lam N. Le^{1*}, Trung V. Le², & Thinh V. Tran³

¹Faculty of Land Management and Real Estate, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Environment and Natural Resources, Ho Chi Minh City University of Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 01, 2020

Revised: July 30, 2020

Accepted: August 21, 2020

Keywords

Climate change

Electrical conductivity (EC)

Landsat 8 OLI

Salinity

Remote sensing

*Corresponding author

Le Ngoc Lam

Email: lengoclam@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Monitoring and evaluation of saline water intrusion is an important task, especially for agricultural production in Ben Tre province. The paper introduces a new solution in the application of Landsat 8 satellite imagery and field survey data to determine the soil electrical conductivity (EC) for soil salinity assessment through the distribution of EC indice value. Analyzing and establishing the correlation between reflectance value, salinity indices and EC allow selecting a suitable model for the creation of a soil salinity map in 4 levels corresponding to EC values: no salinity (0 - 4), mild (4 - 8), moderate (8 - 16), very salinity (> 16). Research results in 2019 showed that most of the coastal districts of Ben Tre province were salty with EC values ranging from 8 to 16. The salinity decreased gradually from the East Sea to the mainland with the distance from 15 to 25 km. In brief, the study proposed solutions for rapid monitoring and evaluation of soil salinity based on the easy access of Landsat 8 images to calculate the necessary indices in the establishment of soil salinity maps for the local and regional scale.

Cited as: Le, L. N., Le, T. V., & Tran, T. V. (2020). Assessment of salinity intrusion in coastal districts of Ben Tre province using Landsat 8 image. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 45-55.

Ứng dụng ảnh Landsat 8 đánh giá xâm nhập mặn các huyện ven biển thuộc tỉnh Bến Tre

Lê Ngọc Lâm^{1*}, Lê Văn Trung² & Trần Văn Thịnh³

¹Khoa Quản Lý Đất Đai và Bất Động Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Môi Trường và Tài Nguyên, Đại Học Bách Khoa TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 01/06/2020

Ngày chỉnh sửa: 30/07/2020

Ngày chấp nhận: 21/08/2020

Từ khóa

Biến đổi khí hậu

Độ dẫn điện (EC)

Landsat 8 OLI

Nhiễm mặn

Viễn thám

*Tác giả liên hệ

Lê Ngọc Lâm

Email: lengoclam@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Giám sát và đánh giá xâm nhập mặn là nhiệm vụ quan trọng, đặc biệt đối với sản xuất nông nghiệp trên địa bàn tỉnh Bến Tre. Bài báo giới thiệu giải pháp mới trong ứng dụng ảnh vệ tinh Landsat 8 và dữ liệu điều tra thực địa để xác định độ dẫn điện của đất (electrical conductivity - EC) nhằm đánh giá nhiễm mặn trong đất thông qua sự phân bố của EC. Phân tích thiết lập sự tương quan giữa giá trị phản xạ và các chỉ số độ mặn với EC cho phép chọn mô hình phù hợp trong thành lập bản đồ độ mặn của đất theo 4 cấp độ tương ứng với giá trị EC: không nhiễm mặn (0 - 4), nhẹ (4 - 8), vừa (8 - 16), rất mặn (> 16). Kết quả nghiên cứu năm 2019 cho thấy hầu hết các huyện Thạnh Phú, Ba Tri và Bình Đại đều bị nhiễm mặn với giá trị EC từ 8 - 16. Độ mặn giảm dần theo hướng từ biển đông vào đất liền với khoảng cách từ 15 đến 25 km. Tóm lại, nghiên cứu đã đề xuất các giải pháp trong giám sát và đánh giá nhanh nhiễm mặn trong đất dựa trên khả năng truy cập dễ dàng của ảnh Landsat 8 để tính các chỉ số cần thiết trong thành lập bản đồ độ mặn đất cho cấp vùng và cấp khu vực.

1. Đặt Vấn Đề

Cùng với hiện tượng nước biển dâng, xâm nhập mặn là một trong những hậu quả nghiêm trọng nhất của biến đổi khí hậu, ảnh hưởng đáng kể đến các hoạt động nông nghiệp và sinh kế người dân ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là khu vực ven biển. Hiện tượng này ngày càng trở nên nghiêm trọng và thường xuyên xảy ra ở đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam, là một trong những nước chịu tác động mạnh bởi biến đổi khí hậu. Trong đó, Bến Tre với chiều dài 65 km tiếp giáp Biển Đông và có hệ thống sông ngòi chằng chịt, trên 90% diện tích đất có cao độ địa hình từ 1-2 m so mực nước biển, nên nhiều vùng thấp ven sông, biển thường xuyên bị ngập khi triều cường. Do đặc thù điều kiện tự nhiên, Bến Tre được nhận định là một trong những tỉnh bị ảnh hưởng nặng nề của biến đổi khí hậu và nước biển dâng đặc

biệt là xâm nhập mặn.

Đất nhiễm mặn từ quan điểm nông nghiệp, là đất đó có tồn tại các loại muối hòa tan ở một nồng độ cao hơn bình thường, gây ảnh hưởng xấu đến cây trồng. Ở những vùng ven biển, đất thường dễ bị mặn hoặc nhiễm mặn thông qua các cơ chế trong tự nhiên như triều cường, nước ngầm thẩm thấu, hoặc do tác nhân thông qua quá trình sử dụng đất như làm muối, nuôi trồng thủy sản. Như vậy, để xây dựng một hệ thống phân loại xâm nhập mặn nói chung và đất nhiễm mặn nói riêng trên cơ sở tích hợp dữ liệu điều tra với tư liệu viễn thám đòi hỏi có những nghiên cứu, kiểm chứng thực địa cụ thể.

Hiện nay, dữ liệu viễn thám đã được sử dụng ngày càng nhiều trong các nghiên cứu về độ mặn của đất, do khả năng cung cấp thông tin nhanh hơn và hữu ích trong việc đưa ra dự đoán thực tế (Shrestha, 2006). Ngoài ra, ảnh vệ tinh đa thời

gian còn cho phép xác định sự thay đổi độ mặn ở quy mô khu vực, cũng như việc kết hợp các chỉ số thực vật như chỉ số thực vật tăng cường (Enhanced Vegetation Index - EVI) và các chỉ số độ mặn (Salinity Index - SI) tạo khả năng đánh giá xu hướng độ mặn của đất trong thảm thực vật và đất trống tương ứng do độ nhạy cảm với các đặc điểm muối (Widad & ctv., 2018). Ưu thế của việc ứng dụng ảnh Landsat đã được minh chứng trong nghiên cứu đánh giá việc phát hiện các sự cố tràn nước muối ở Hạt Bottineau, Bắc Dakota, Ấn Độ. Trong đó, chỉ số độ mặn phản ứng Canopy (Canopy Response Salinity Index - CRSI) được trích xuất từ các kênh hồng ngoại và hồng ngoại nhiệt của ảnh Landsat (Neha, 2019).

Xu thế mới trong khai thác ảnh Landsat-8 với dữ liệu cảm biến Operative Land Imager (OLI) để giám sát và thành lập bản đồ độ mặn của đất phân bố theo không gian dựa trên các chỉ số độ mặn của đất (Soil Salinity Index - SSI) đã minh chứng tính hiệu quả của giải pháp. Trong đó, hồi quy tuyến tính đa biến (Multi Linear Regression - MLR) đã được áp dụng để xác định mối tương quan giữa các giá trị phản xạ phổ và số liệu của các phép đo mặt đất về độ dẫn điện (electrical conductivity - EC) để đánh giá độ mặn của đất. Kết quả cho thấy mối tương quan cao giữa SSI và EC để dự đoán độ mặn của đất (Watheq & ctv., 2018). Một nghiên cứu khác được thực hiện ở khu vực Garmsar Plain ở phía Đông của Tehran, với 288 mẫu đất được phân tích để xác định mối quan hệ giữa độ phản xạ phổ và độ dẫn điện EC như là chỉ số độ mặn. Phân tích hồi quy được sử dụng để kiểm tra mối quan hệ giữa EC và các chỉ số độ mặn để tạo ra một số mô hình (Ali & ctv., 2012).

Nhìn chung, ảnh Landsat 8 OLI được sử dụng khá phổ biến để tính toán các chỉ số đánh giá độ mặn của đất bao gồm: Chỉ số độ mặn đất thực vật (Vegetation Soil Salinity Index - VSSI), chỉ số thực vật có hiệu chỉnh phản xạ mặt đất (Soil Adjusted Vegetation Index - SAVI), chỉ số thực vật chuẩn hóa (Normalize Difference Vegetation Index - NDVI) và chỉ số khác biệt độ mặn đất (Normalize Difference Salinity Index - NDSI). Trong đó, nhiều kết quả chỉ ra rằng, giá trị phổ của dải cận hồng ngoại (Near Infra Red - NIR) và VSSI có mối tương quan cao với EC ($r = 0,7779$ và $r = 0,6957$, tương ứng) so với các chỉ số khác. Kết quả so sánh cũng cho thấy độ mặn của đất được giải đoán từ ảnh Landsat 8 khá phù hợp với dữ liệu thực tế. Các nghiên cứu này đã minh chứng việc sử dụng ảnh Landsat 8 OLI có khả năng ứng

dụng cao trong việc giám sát không gian độ mặn của lớp đất trên cùng khu vực (Nguyen & ctv., 2020).

Từ các nghiên cứu trên cho thấy việc ứng dụng ảnh viễn thám trong đánh giá độ mặn đất EC thường sử dụng phân tích hồi quy để xác định mối tương quan giữa EC với chỉ số phát triển thực vật NDVI, chỉ số thực vật có hiệu chỉnh phản xạ mặt đất SAVI và nhóm chỉ số độ mặn đất bao gồm: chỉ số độ mặn SI (Salinity Index) từ 1 đến 7, chỉ số khác biệt độ mặn đất NDSI, chỉ số độ mặn đất thực vật VSSI, chỉ số tỷ lệ mặn SR (Salinity Ratio), chỉ số độ mặn và độ mặn đất SSSI. Tuy nhiên, phương pháp thu thập dữ liệu thực địa và độ chính xác phân tích mẫu là các yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến độ chính xác mô hình hồi quy giữa giá trị phản xạ phổ của ảnh Landsat với giá trị EC để tính toán chỉ số độ mặn. Bài báo giới thiệu kết quả thử nghiệm việc trích xuất các thông tin từ bộ cảm biến OLI của ảnh Landsat 8 để tính toán độ mặn đất thông qua chỉ số dẫn điện trong đất (EC), từ đó thành lập bản đồ độ mặn của đất phân bố theo không gian khu vực các huyện duyên hải của tỉnh Bến tre.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Ảnh Landsat: Ảnh vệ tinh Landsat có 8 bands với độ phân giải từ 15 - 60 m ghi lại phản xạ của các đối tượng có bước sóng từ vùng nhìn thấy (0,4 đến 0,7 μm) đến vùng hồng ngoại nhiệt (12,5 μm) được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu. Vệ tinh thế hệ thứ 8 - Landsat 8 đã được Mỹ phóng thành công lên quỹ đạo vào ngày 11/02/2013 với tên gọi gốc Landsat Data Continuity Mission (LDCM). Landsat sẽ tiếp tục cung cấp các ảnh có độ phân giải trung bình (từ 15 - 100 m).

Bản đồ chuyên đề: bao gồm bản đồ hành chính tỉnh Bến Tre, Bản đồ hiện trạng sử dụng đất tỷ lệ 1/25.000 thành lập năm 2019, được biên tập và xử lý trên phần mềm Mapinfo 12.0 cùng hệ tọa độ với ảnh Landsat 8 OLI và cắt theo ranh giới vùng nghiên cứu là ba huyện Ba Tri, Bình Đại và Thạnh Phú để phục vụ cho việc chồng xếp kiểm tra đánh giá kết quả. Ngoài ra, bản đồ chuyên đề còn được sử dụng để thành lập bản đồ phân bố điểm mẫu với các thông tin thuộc tính như Tọa độ X,Y, mã khoanh đất, giá trị EC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xử lý ảnh và phân tích hồi quy là hai phương pháp chính được sử dụng trong nghiên cứu. Trong đó, việc thu thập dữ liệu thực địa của 28 điểm mẫu (Hình 1) được lấy trong thời gian từ 15/01/2019 đến 20/01/2019 bằng thiết bị đo cảm ứng điện tử EM31-MK2. Khi đo ngoài thực địa các thông số nhiệt độ, độ ẩm được cài đặt đồng bộ. Các điểm mẫu sau đó được nội suy xử lý đồng bộ các đặc điểm môi trường và tổng quát hóa về tầng dày mặt đất với độ sâu trong khoảng từ 0 – 20 cm. Các điểm mẫu sau đó được đánh giá và khảo sát tương quan giữa giá trị độ mặn đất (EC) với các giá trị phản xạ kênh phổ (từ kênh 2 đến kênh 5 ảnh Landsat 8 OLI). Các chỉ số độ mặn đất sau khi được chiết tính từ ảnh Landsat sẽ được sử dụng trong xây dựng mô hình hồi quy phù hợp nhất, để thành lập bản đồ độ mặn đất (EC) cho khu vực nghiên cứu.



Hình 1. Sơ đồ vị trí điểm mẫu.

Giá trị phản xạ (Reflectance value) các kênh ảnh Landsat 8 OLI được sử dụng để trích xuất các chỉ số độ mặn: SAVI, NDSI, VSSI, SI1, SI2, SI3, SI4, SI5 dựa theo công thức cho ở Bảng 1. Trong đó, red, green, blue là các giá trị tương ứng

kênh khả kiến (2,3,4) và NIR (Near Infra Red) là giá trị tương ứng kênh hồng ngoại gần (kênh 5).

Các điểm mẫu sau khi được phân tích để xác định giá trị EC tiến hành phân tích tương quan với các chỉ số độ mặn được trích xuất từ ảnh vệ tinh Landsat 8 OLI. Kết quả hồi quy từ 28 điểm mẫu được sử dụng để chạy mô hình lan truyền mặn theo giá trị EC để thành lập bản đồ xâm nhập mặn năm 2019 các huyện ven biển tỉnh Bến Tre theo 4 cấp độ tương ứng với giá trị EC: không nhiễm mặn (0 - 4), nhẹ (4 - 8), vừa (8 - 16), rất mặn (> 16). Quy trình thực hiện được thể hiện bởi Hình 2.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Xác định phạm vi nghiên cứu

Tỉnh Bến Tre nằm ở hạ lưu sông Mê Kông, có diện tích khoảng 2.394 km² với hệ thống sông rạch chằng chịt và tiếp giáp Biển Đông với chiều dài bờ biển gần 65 km. Địa hình thấp với 90% diện tích đất tự nhiên của tỉnh có độ cao trung bình từ 1 - 2 m so với mực nước biển. Trong đó, các vùng đất thấp ven sông phân bố ở các huyện ven biển như huyện Bình Đại, Ba Tri và Thạnh Phú (độ cao dưới 1 m) thường xuyên bị ngập khi triều cường (MFF, 2014) được chọn làm địa bàn nghiên cứu (Hình 3).

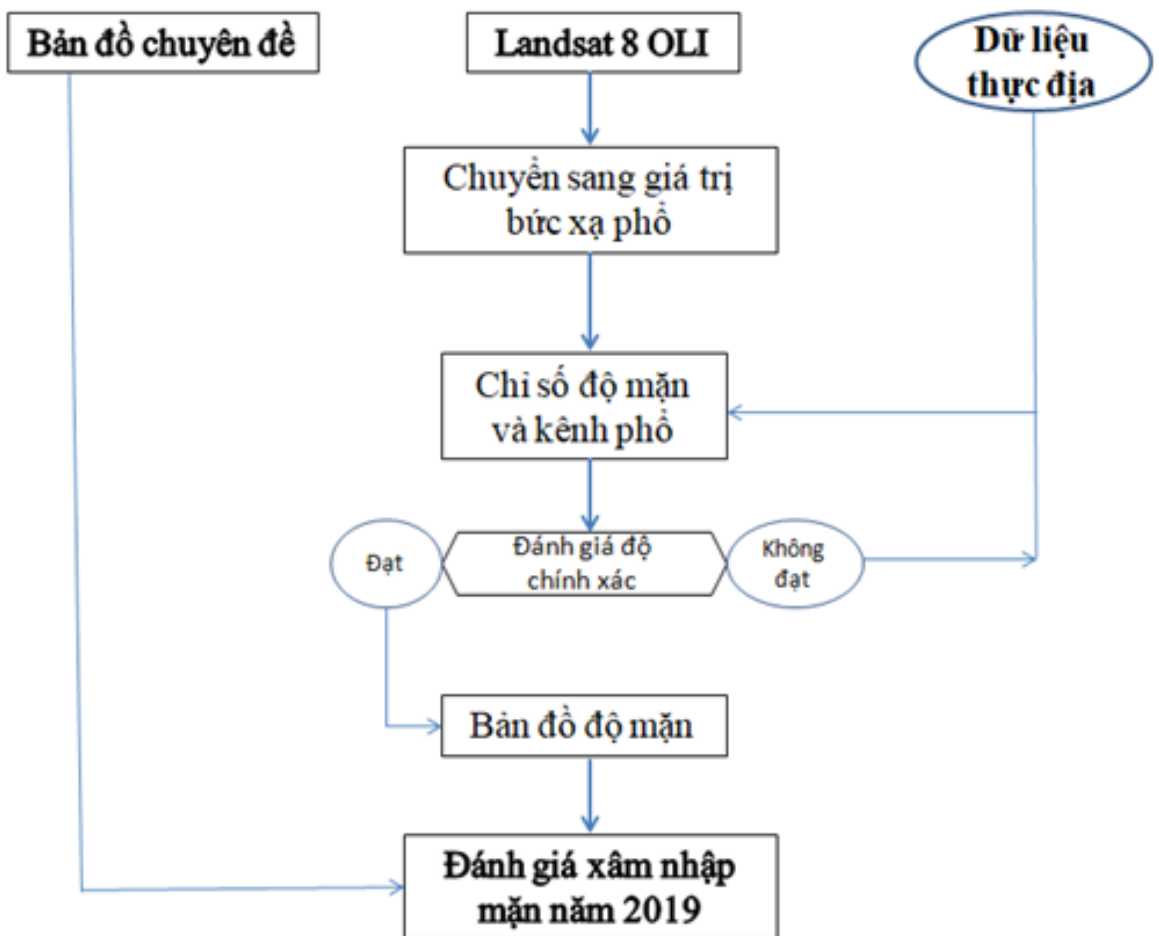
3.2. Phân tích tương quan giữa giá trị EC và phản xạ phổ của ảnh Landsat

Kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả cho thấy, đặc trưng phổ của ảnh Landsat 8 với các thành phần muối ứng với các dải bước sóng khác nhau. Các loại muối sodium sulfate, halite, gypsum, calcium carbonate, sodium bicarbonate đều phản xạ mạnh (hơn 80%) trong dải bước sóng từ 0,4 đến 1,4 μm (từ kênh khả kiến đến cận hồng ngoại) (Le & ctv., 2019). Kết quả khảo sát từ bộ dữ liệu mẫu tại tỉnh Bến Tre thể hiện mối tương quan thực tế giữa giá trị độ mặn EC với giá trị phổ của ảnh Landsat 8 thể hiện như sau: kênh blue (Hình 4.a), green (Hình 4.b) và kênh red (Hình 4.c) có hệ số tương quan rất thấp ($r < 0,1$), chứng tỏ không có mối tương quan với giá trị độ mặn EC. Trong khi đó, kênh NIR (Hình 4.d) có mối tương quan khá cao ($r = 0,791$). Do đó, các giá trị pixel trên kênh NIR của ảnh Landsat 8 được sử dụng để phát triển mô hình giám sát độ mặn trong đất.

Bảng 2 thể hiện mô hình hồi quy với biến phụ

Bảng 1. Công thức tính các chỉ số độ mặn dựa trên các kênh phổ ảnh Landsat 8 OLI

STT	Chỉ số	Công thức	Nguồn
1	Salinity Index 1 (SI1)	$SI1 = \sqrt{Green^2 + Red^2}$	Douaoui & ctv., 2006
2	Salinity Index 2 (SI2)	$SI2 = \sqrt{Red + Green}$	Douaoui & ctv., 2006
3	Salinity Index 3 (SI3)	$SI3 = Blue * Red$	Khan & ctv., 2001
4	Salinity Index 4 (SI4)	$SI4 = \frac{Red * NIR}{Green}$	Abbas & Khan, 2007
5	Salinity Index 5 (SI5)	$SI5 = \frac{Blue}{Red}$	Abbas & Khan, 2007
6	Soil Adjusted Vegetation Index (SAVI)	$SAVI = 1.5 * \frac{NIR - Red}{NIR + Red + 0.5}$	USGS (2006)
7	Normalize Difference Salinity Index (NDSI)	$NDSI = \frac{Red - NIR}{NIR + Red}$	Khan & ctv., 2001
8	Vegetation Soil Salinity Index (VSSI)	$VSSI = 2 * Green - 5 * (Red + NIR)$	Dehni & Lounis, 2012



Hình 2. Quy trình đánh giá xâm nhập mặn năm 2019.

thuộc là EC (tại 28 điểm mẫu) và biến độc lập lần lượt là các kênh phổ red, green, blue. Mô hình giám sát độ mặn trong đất sử dụng kênh NIR có

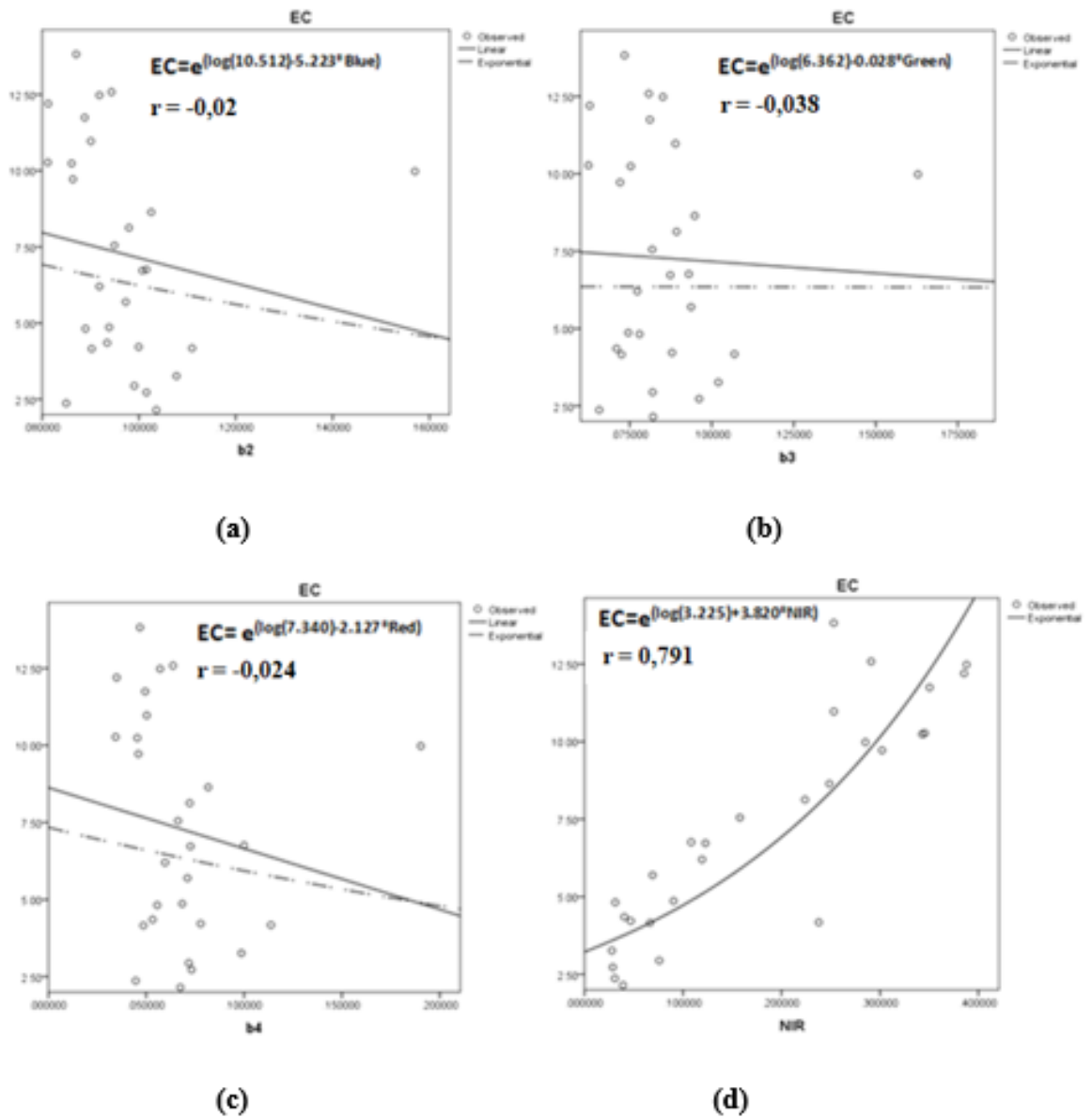
$r = 0,791$ được chọn trong nghiên cứu thể hiện bởi: $EC = e^{[\log(3.225) + 3.820 * NIR]}$

Bảng 2. Tương quan phản xạ phổ với giá trị độ dẫn điện (EC) trong thiết lập mô hình

STT	Kênh phổ	Mô hình hồi quy	Tương quan (r)
1	Blue	$EC = e^{[\log(10.512)-5.223*Blue]}$	-0,020
2	Green	$EC = e^{[\log(6.362)-0.028*Green]}$	-0,038
3	Red	$EC = e^{[\log(7.340)-2.127*Red]}$	-0,024
4	NIR	$EC = e^{[\log(3.225)+3.820*NIR]}$	0,791

**Hình 3.** Vị trí vùng nghiên cứu.**Bảng 3.** Tương quan giữa các chỉ số độ mặn và độ dẫn điện (EC)

STT	Chỉ số	Mô hình hồi quy	Tương quan (r)	Độ lệch chuẩn của EC
1	NDSI	$EC = e^{[\log(4,668)-1,155*NDSI]}$	0,756	1,773
2	SAVI	$EC = e^{[\log(4,316)+2,081*SAVI]}$	0,740	1,637
3	VSSI	$EC = e^{[\log(2,868)-0,751*VSSI]}$	0,703	1,855
4	SI1	$EC = e^{[\log(8,477)-10,934*SI1]}$	-0,27	3,664
5	SI2	$EC = e^{[\log(8,779)-19,798*SI2]}$	-0,19	3,629
6	SI3	$EC = e^{[\log(7,456)-28,179*SI3]}$	-0,037	3,660
7	SI4	$EC = e^{[\log(3,370)+4,825*SI4]}$	0,587	2,313
8	SI5	$EC = e^{[\log(3,187)+0,445*SI5]}$	0,103	3,406



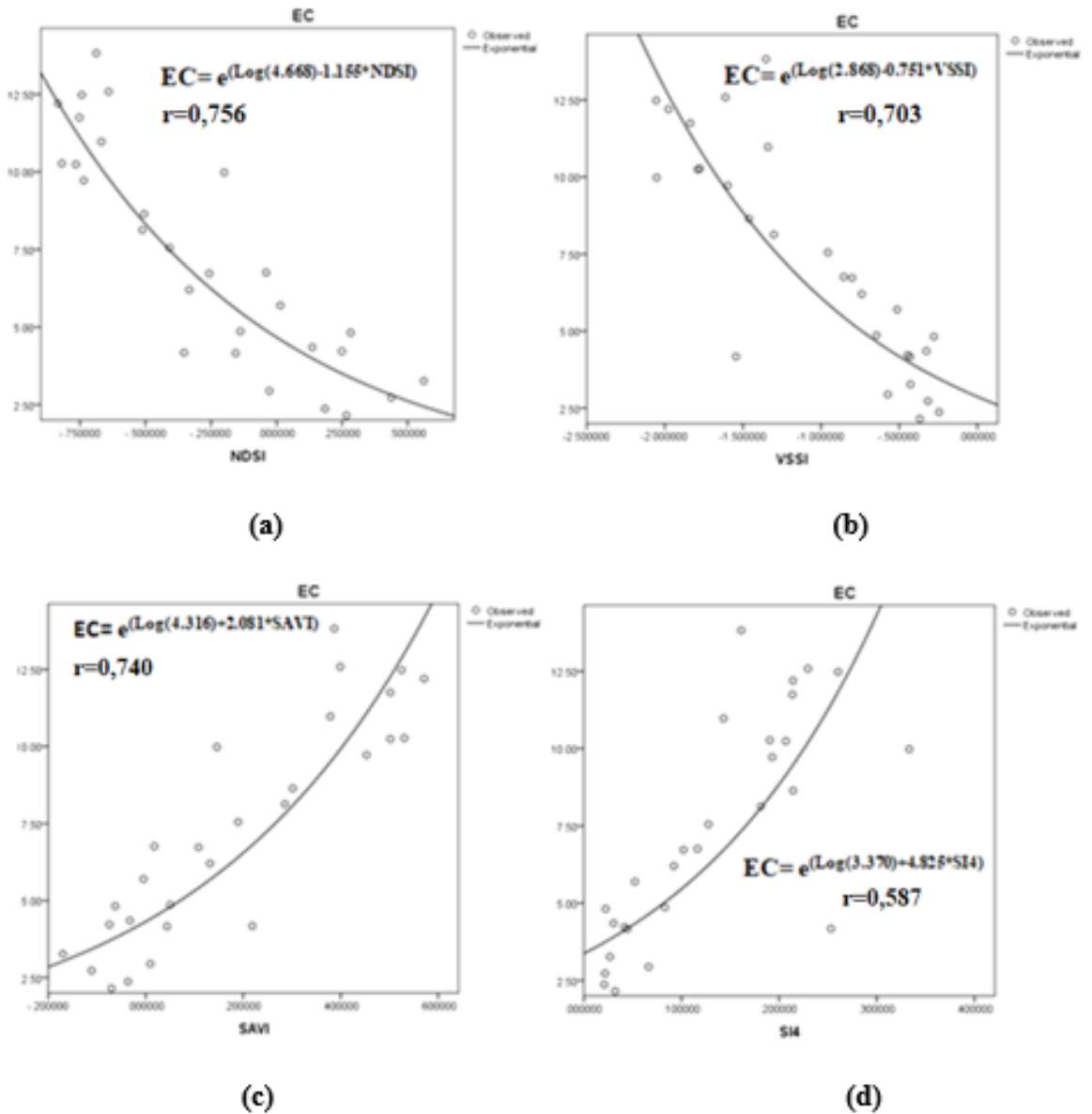
Hình 4. Đồ thị phân bố điểm mẫu tương ứng với các kênh phổ.
 (a) - Kênh blue; (b) - Kênh green; (c) - Kênh red; (d) - Kênh NIR

3.3. Sự tương quan giữa giá trị EC và các chỉ số độ mặn

Các chỉ số độ mặn được trích xuất từ ảnh Landsat bao gồm 8 chỉ số: NDSI, SAVI, VSSI, SI1, SI2, SI3, SI4, SI5. Sử dụng phần mềm ENVI để tạo các ảnh chỉ số tương ứng và phần mềm SPSS trong phân tích tương quan giữa từng chỉ số với EC. Từ đó, chọn chỉ số có hệ số tương quan cao nhất.

Từ kết quả tính toán các chỉ số độ mặn tiến

hành trích xuất các thông tin và phân tích tương quan với giá trị EC thực địa, kết quả thể hiện ở Bảng 3, Trong đó, 4 chỉ số có giá trị tương quan nhỏ hơn 0,50 đã bị loại (bao gồm SI1, SI2, SI3, SI5), Nghiên cứu cho thấy các chỉ số NDSI, SAVI, VSSI, SI4 có độ tương quan cao với EC, đặc biệt là chỉ số SAVI có độ lệch chuẩn nhỏ nhất (1,637) tương ứng với độ tương quan $r = 0,740$. Do đó, việc sử dụng kênh phổ hồng ngoại gần (kênh NIR) rất khả thi trong thành lập bản đồ độ mặn của



Hình 5. Đồ thị phân bố điểm mẫu tương ứng với các chỉ số độ mặn.

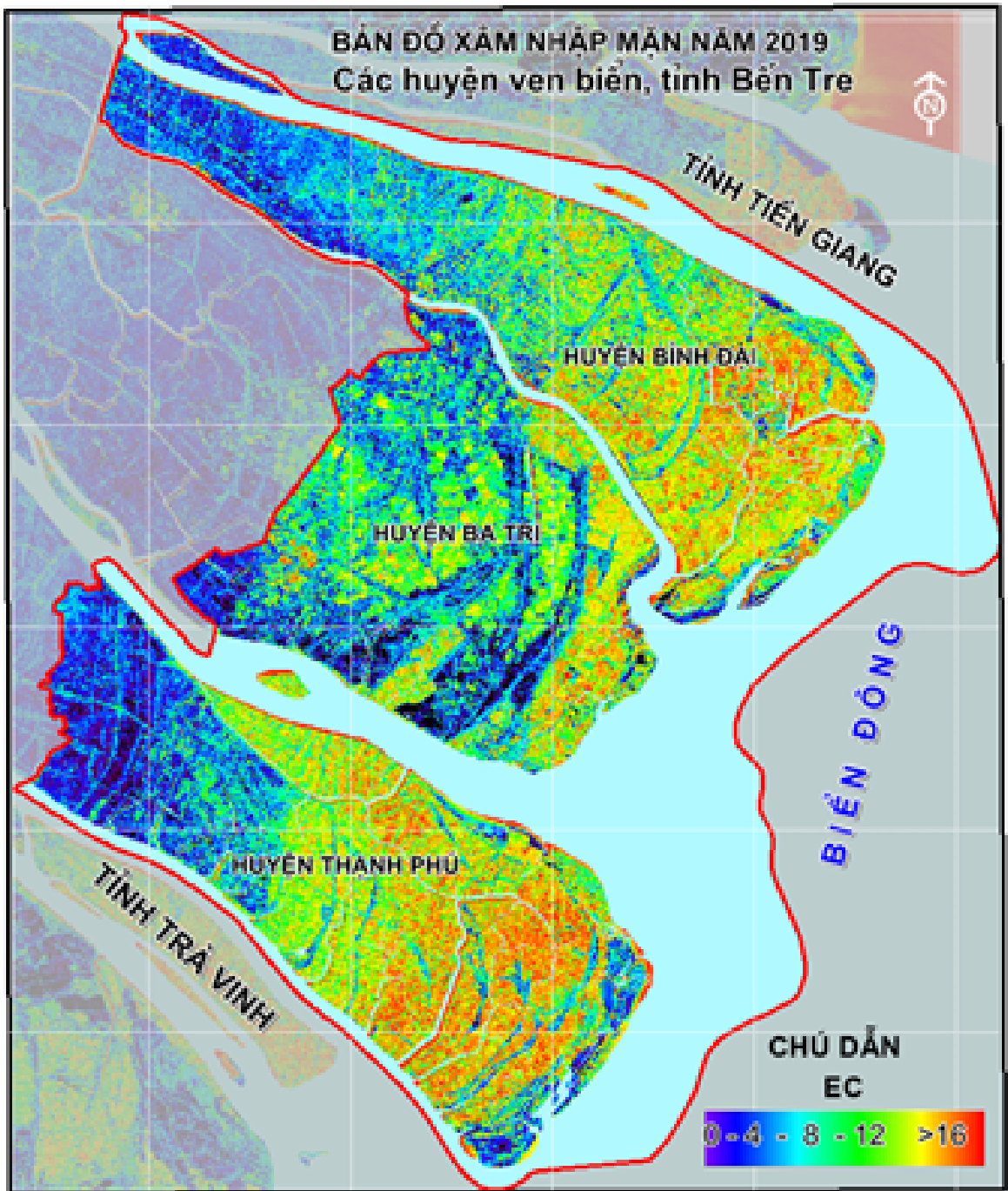
(a) - NDSI; (b) - VSSI; (c) - SAVI; (d) - SI4

đất.

3.4. Tạo bản đồ độ mặn của đất

Sử dụng mô hình hồi quy để tính giá trị EC từ kênh NIR, từ đó tạo ảnh phân bố độ mặn đất EC cho vùng nghiên cứu. Hình 5 thể hiện bản đồ độ mặn được thành lập theo EC với 4 cấp độ tương ứng: 0 – 4 (không mặn); 4 – 8 (mặn nhẹ); 8 – 16 (mặn vừa) và EC > 16 (mặn nặng).

Phân bố độ mặn trên địa bàn nghiên cứu cho thấy hầu hết huyện Thạnh Phú đều bị nhiễm mặn với độ mặn EC từ 4 – 16 xâm nhập sâu từ cửa biển vào đất liền khoảng 26 km (Hình 6). Xâm nhập mặn tại huyện Ba Tri theo hai hướng từ biển vào 5 km với độ mặn từ 8 – 16 và hướng sông Ba Lai từ cửa Ba Lai vào 15 km và từ sông Ba Lai vào đất liền 1,5 – 2 km, Huyện Bình Đại xâm nhập mặn theo hướng từ Cửa Đại và Cửa Ba Lai sâu 25 km vào đất liền.

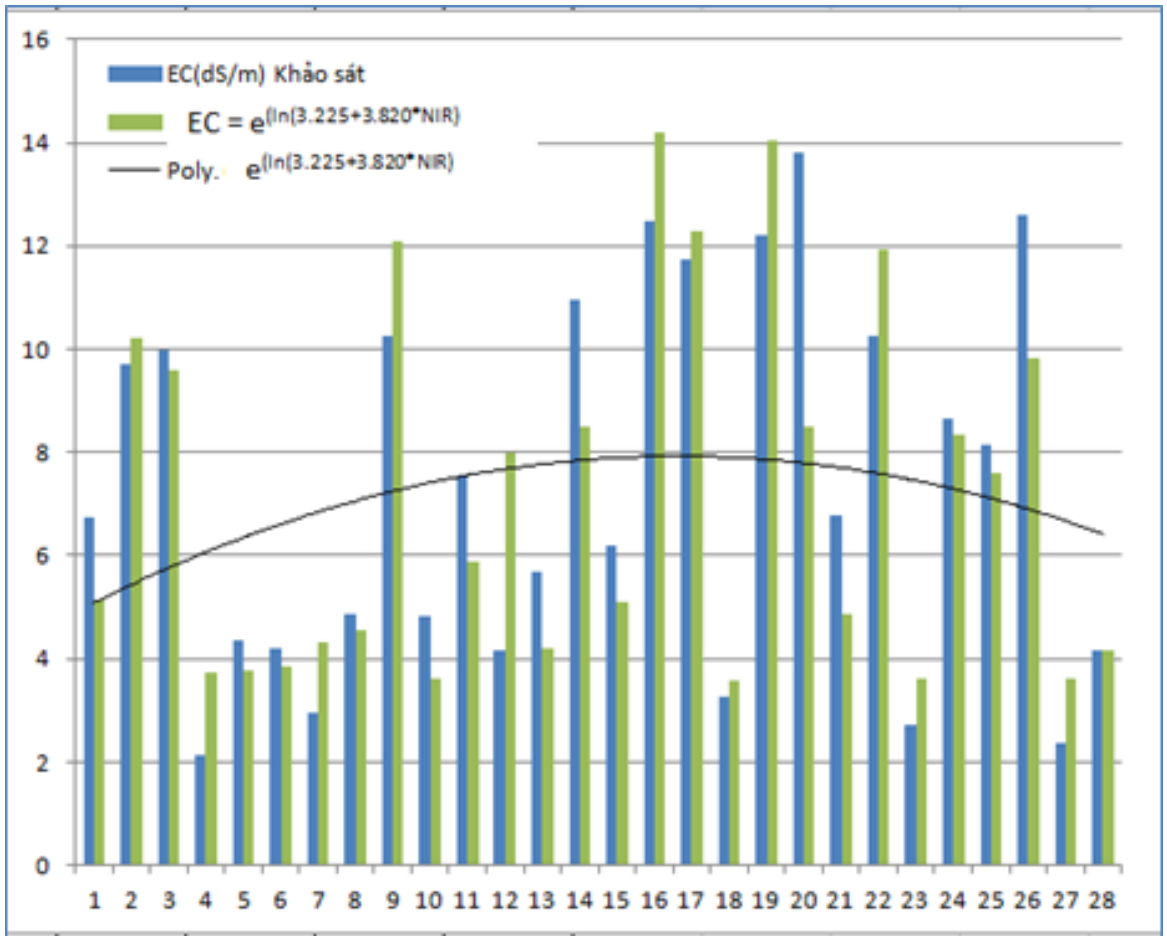


Hình 6. Bản đồ phân bố độ mặn của đất (EC).

Để đánh giá độ chính xác tiến hành phân tích sai lệch giữa các chỉ số độ mặn được trích xuất từ ảnh với các chỉ số EC thu được từ khảo sát thực tế (bộ dữ liệu mẫu).

Hình 7 cho thấy đồ thị phân bố độ mặn trên

địa bàn nghiên cứu dựa vào việc trích xuất giá trị EC từ ảnh Landsat 8 OLI khá tương đồng với số liệu đo thực tế. Giải pháp đề xuất đã mở ra cơ sở khoa học trong thành lập bản đồ đánh giá độ mặn đất từ kênh NIR khá hiệu quả và tin cậy



Hình 7. So sánh kết quả trích xuất giá trị độ dẫn điện (EC) từ mô hình và giá trị khảo sát.

cao ($r = 0,791$). Ngoài ra, các kênh phổ khác của ảnh Landsat 8 còn ý nghĩa trong việc xác định các chỉ số độ mặn như chỉ số NDSI ($r = 0,756$), SAVI ($r = 0,740$), VSSI ($r = 0,703$) và SI4 ($r = 0,587$).

4. Kết Luận

Bản đồ độ mặn đất (EC) các huyện ven biển tỉnh Bến Tre được thành lập từ phương pháp viễn thám với ảnh Landsat 8 OLI kênh cận hồng ngoại (NIR) đã cho kết quả khả quan, đáng tin cậy ($r = 0,791$) cho thấy tiềm năng lớn của ảnh Landsat trong đánh giá ảnh hưởng của xâm nhập mặn đến sản xuất nông nghiệp nói riêng và các hoạt động kinh tế - xã hội nói chung. Ảnh Landsat 8 OLI được truy cập dễ dàng, miễn phí và có thể được sử dụng để tính các chỉ số thông qua giá trị phản xạ các kênh phổ phục vụ phân tích tương quan

với các chỉ số độ mặn đất và các chỉ số khác trong đất.

Kết quả nghiên cứu năm 2019 cho thấy hầu hết các huyện Thạnh Phú, Ba Tri và Bình Đại đều bị nhiễm mặn với giá trị EC từ 8 – 16. Độ mặn giảm dần theo hướng từ biển đông vào đất liền với khoảng cách từ 15 đến 25 km. Giải pháp đề xuất đã mở ra hướng mới rất khả thi trong giám sát và đánh giá nhanh lan truyền mặn trong đất và thành lập bản đồ độ mặn đất cấp vùng và các tỉnh thuộc đồng bằng sông Cửu Long.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abbas, A., & Khan, S. (2007). Using remote sensing techniques for appraisal of irrigated soil salinity. In Oxley, L., and Kulasiri, D. (Eds.), *MODSIM 2007 International Congress: Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand* (2632-2638). Christchurch, New Zealand:

- Modelling and Simulation Society of Australia and New Zealand. Retrieved March 20, 2020, from <https://researchoutput.csu.edu.au/en/publications/using-remote-sensing-techniques-for-appraisal-of-irrigated-soil-s>.
- Ali, A. N., Mehdi, H., & Abbas, F. (2012). Models to the identification of soil salinity: A case study from Garmsar Plain, Iran. *International Journal of Environmental Physiology and Toxicology* 9(1), 59-74.
- Dehni, A., & Lounis, M. (2012). Remote sensing techniques for salt affected soil mapping: Application to the oran region of Algeria. *Procedia Engineering* 33, 188-198.
- Douaoui, E. K., Nicolas, H., & Walter, C. (2006). Detecting salinity hazards within a semiarid context by means of combining soil and remote-sensing data. *Geoderma*, 134(1-2), 217-230.
- Khan, N. M., Rastoskuev, V. V., Shalina, E. V., & Sato, Y. (2001). Mapping salt-affected soils using remote sensing indicators - A simple approach with the use of GIS IDRISI. *Proceedings of the 22nd Asian Conference on Remote Sensing* (5-9). Singapore: Centre for Remote Imaging, Sensing and Processing (CRISP), National University of Singapore.
- Le, T. V., Tran, V. T., & Vo, V. N. (2019). Solution of integrating remote sensing and GIS in monitoring saline intrusion of Mekong river. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* 61(3), 22-26.
- MFF (Mangroves for the Future). (2014). *Assessment of land use changes using SPOT5 multi-time remote sensing images in project areas of Ben Tre and Tra Vinh provinces*. Tra Vinh, Vietnam. Retrieved June 11, 2019 from <https://www.mangrovesforthefuture.org/>.
- Neha, P. (2019). *Use of Landsat satellite imagery to identify the salitization of soil due to brine spills in North-western North Dakota* (Unpublished master's thesis). University of North Dakota, North Dakota, USA.
- Nguyen, A. K., Liou, Y. A., Tran, H. P., Hoang, P. P., & Nguyen, T. H. (2020). *Soil salinity assessment by using near-infrared channel and vegetation soil salinity index derived from Landsat 8 OLI data: A case study in the Tra Vinh province, Mekong Delta, Vietnam*. Retrieved March 15, 2020, from <https://link.springer.com/article/10.1186/s40645-019-0311-0#article-info>.
- Shrestha, R. (2006). Relating soil electrical conductivity to remote sensing and other soil properties for assessing soil salinity in northeast Thailand. *Land Degradation and Development* 17(8), 677-689.
- USGS (United States Geological Survey). (2006). *Landsat surface reflectance-derived spectral indices*. Retrieved March 15, 2020, from <https://www.usgs.gov/core-science-systems/nli/landsat/landsat-soil-adjusted-vegetation-index>.
- Watheq, S., Ebtihal, T. A. K., & Sa'ad, R. Y. (2018). Using Landsat 8 OLI data to predict and mapping soil salinity for part of An-Najaf governorate. *Ecology, Environment and Conservation Paper* 24(2), 572-578.

Alcoholic fermentation of red flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*)

Binh Q. Hoang*, & Diep T. N. Duong

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

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 16, 2020

Revised: April 17, 2020

Accepted: May 19, 2020

Keywords

Alcoholic fermentation

Red flesh dragon fruit

*Corresponding author

Hoang Quang Binh

Email: qbinh93@gmail.com

ABSTRACT

The experiment was conducted to determine effects of sodium metabisulfite content, flesh and water mixing ratio, total soluble solids content, percentage of additional yeast and fermentation time on alcoholic fermentation of red flesh dragon fruit. The results showed that all factors influenced the fermentation. The most appropriate fermentation conditions were use of juice without water mixing, addition sodium metabisulfite content of 80 ppm, the total soluble solid content of 22 °Brix, 5% of yeast solution and 13-d fermentation.

Cited as: Hoang, B. Q., & Duong, D. T. N. (2020). Alcoholic fermentation of red flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 56-63.

Nghiên cứu lên men rượu thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*)

Hoàng Quang Bình* & Dương Thị Ngọc Diệp

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: 16/03/2020

Ngày chỉnh sửa: 17/04/2020

Ngày chấp nhận: 19/05/2020

Từ khóa

Lên men rượu
Thanh long ruột đỏ

*Tác giả liên hệ

Hoàng Quang Bình
Email: qbinh93@gmail.com

TÓM TẮT

Thí nghiệm này đã được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của hàm lượng natri metabisulfit, tỷ lệ phối trộn thịt quả và nước, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan, tỷ lệ nấm men bổ sung và thời gian lên men đến quá trình lên men rượu thanh long ruột đỏ. Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các yếu tố khảo sát đều có ảnh hưởng đến lên men rượu thanh long. Thông số thích hợp cho lên men rượu thanh long là sử dụng dịch quả không thêm nước, hàm lượng natri metabisulfit bổ sung 80 ppm, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan 22 °Brix, tỷ lệ dịch nấm men bổ sung 5% và lên men trong 13 ngày.

1. Đặt Vấn Đề

Tại Việt Nam, thanh long có sản lượng trồng lớn tại các tỉnh Bình Thuận, Long An và Tiền Giang. Tuy nhiên hiện nay, một số kỹ thuật mới về tạo giống và chăm sóc giúp ra quả sớm hoặc trái vụ đang giúp cây thanh long có thể cho thu hoạch quanh năm; cùng với diện tích trồng ngày càng tăng đã làm cho sản lượng quả tăng nhanh, dẫn đến tình trạng dư thừa, bị ép giá, thải bỏ đặc biệt nghiêm trọng vào lúc chính vụ. Song song với việc tìm ra phương pháp bảo quản thanh long sau thu hoạch hiệu quả; nghiên cứu chế biến các sản phẩm từ thanh long giúp góp phần đa dạng hóa sản phẩm trên thị trường và nâng cao giá trị kinh tế cho cây thanh long là điều cần thiết. Giống thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) được trồng phổ biến ở nước ta, có nhiều tiềm năng để chế biến thành sản phẩm. Các khâu xử lý nhiệt độ cao như chần, gia nhiệt và thanh trùng thường được vận dụng trong các quy trình chế biến là tác nhân ảnh hưởng lớn đến sự ổn định của hợp chất betacyanin (Liaotrakoon, 2013; Wong & Siow, 2015); điều này dẫn đến làm giảm độ bền màu của nguyên liệu, làm giảm giá

trị sản phẩm sau chế biến do betacyanin là hợp chất chủ yếu tạo nên màu đỏ cho thịt quả thanh long. Ứng dụng quy trình ít chế biến xử lý nhiệt là lợi thế của chế biến rượu trái cây. Quá trình lên men rượu đạt hiệu quả cao nếu điều kiện lên men (chúng khởi động, hàm lượng chất rắn hòa tan tổng số, thời gian lên men...) được kiểm soát chặt chẽ (Luong, 2006). Hiện nay, trên thị trường Việt Nam đã xuất hiện rượu lên men từ thanh long ruột đỏ; tuy nhiên sản phẩm khi sử dụng vẫn còn có vị hậu chua khó chịu. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước tuy đã có nghiên cứu về rượu thanh long (Tran, 2018; Pham & ctv., 2019; Jiang & ctv., 2020), nhưng hiện các nghiên cứu này mới chỉ đề cập đến ảnh hưởng của chủng giống khởi động, hàm lượng enzyme đến quá trình lên men rượu. Ngoài ra, một số quy trình chế biến đề cập trong các nghiên cứu này sử dụng giống thanh long ruột trắng (*Hylocereus undatus*) hoặc giống thanh long ruột đỏ (*Hylocereus costaricensis*). Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố: hàm lượng natri metabisulfit, tỷ lệ phối trộn thịt quả và nước, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan, tỷ lệ nấm men bổ sung và thời gian lên men đến quá trình lên men

rượu thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*).

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất và thiết bị

Nguyên liệu: Thanh long ruột đỏ (*Hylocereus polyrhizus*) có khối lượng 487 ± 75 g được mua tại chợ đầu mối nông sản Thủ Đức, TP.HCM không nấm bệnh, hư dập. Thịt quả có hàm lượng tổng chất rắn hòa tan 11-12 °Brix, pH 4,5-5,0, hàm lượng betacyanin $14,20 \pm 1,76$ mg/100 g, L* $30,73 \pm 0,97$ a* $41,93 \pm 1,88$ và b* $6,17 \pm 0,87$. Thanh long sau khi mua được rửa sạch, bỏ vỏ. Thịt trái được đựng trong bao polyetylen và bảo quản lạnh $< -18^{\circ}\text{C}$. Thanh long được lựa chọn là các trái có khiếm khuyết về ngoại hình không phù hợp cho xuất khẩu như gãy tai hoặc đuôi trái; vết xước, đốm trên vỏ. Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được phân lập từ chế phẩm nấm men thương mại RV100 được cung cấp bởi công ty Angel (Trung Quốc).

Hóa chất: 3, 5-dinitrosalicylic acid (Xilong, Trung Quốc), phenol sodium sulfite (Xilong, Trung Quốc), sodium hydroxide (Xilong, Trung Quốc), potassium sodium tartrate (Xilong, Trung Quốc), glucose ($> 99,5\%$, Xilong, Trung Quốc).

Thiết bị: máy đo UV – Vis UV-730 (JASCO, Nhật Bản), khúc xạ kế (Atago Hand Refractometer 0 – 32%, Nhật Bản.), kính hiển vi (Olympus, Nhật), buồng đếm hồng cầu Thoma (Marien Field, Đức), cồn kế 0 – 35% (Alla-Pháp), máy pH (Hanna, Mỹ), máy đo màu (Chroma mater CR – 400, Konica Minolta, Nhật Bản).

2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.1. Ảnh hưởng của hàm lượng natri metabisulfite bổ sung đến quá trình lên men rượu

Thịt trái sau rửa đông được phối trộn với nước theo tỷ lệ 50:50 và xay nhuyễn. Mẫu được thủy phân với enzyme Pectinex Ultra SP-L với tỷ lệ bổ sung enzyme là 0,1%, nhiệt độ 40°C trong 120 phút. Dịch lọc thu được sau thủy phân được bổ sung thêm đường saccharose sao cho đạt hàm lượng chất rắn hòa tan là 22°Brix . Mẫu tiếp theo được thêm natri metabisulfite với các hàm lượng khác nhau: 80, 100 và 120 ppm. Sau 2 giờ, 5% dịch nấm men (mL/100 mL dịch quả) có mật độ 7 (log tế bào/mL) được bổ sung vào trong dịch quả. Quá trình lên men diễn ra tại điều kiện phòng ($30 - 31^{\circ}\text{C}$), pH tự nhiên của dịch quả (4,5 - 5,0) trong

10 ngày. Trong quá trình lên men, các chỉ số bao gồm mật độ nấm men, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan, pH, hàm lượng đường khử, độ cồn được đánh giá. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn thịt quả và nước đến quá trình lên men rượu

Thí nghiệm khảo sát 1 yếu tố là tỷ lệ phối trộn giữa thịt quả và nước, bao gồm ba mức khác nhau: 100:0, 75:25 và 50:50 (g/g). Hàm lượng natri metabisulfite bổ sung là kết quả mục 2.2.1. Rượu được lên men và phân tích các chỉ tiêu theo dõi tương tự như trong mục 2.2.1. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.2.3. Ảnh hưởng của tổng hàm lượng tổng chất rắn hòa tan trong dịch quả trước lên men đến quá trình lên men rượu

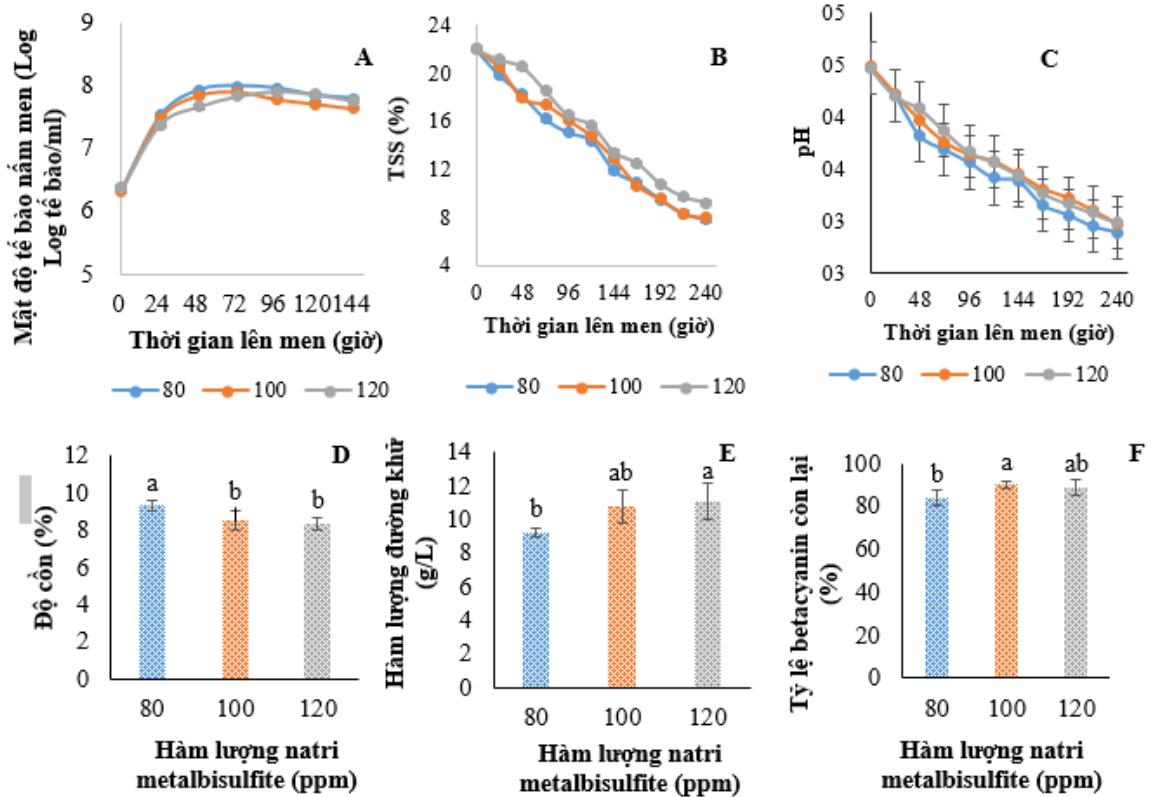
Thí nghiệm khảo sát 1 yếu tố là hàm lượng tổng chất rắn hòa tan trong dịch thanh long trước lên men, bao gồm ba mức khác nhau: 20, 22 và 24°Brix . Hàm lượng natri metabisulfite bổ sung là kết quả mục 2.2.1, tỷ lệ phối trộn thịt quả nước kết quả mục 2.2.2. Rượu được lên men và phân tích các chỉ tiêu theo dõi tương tự như trong mục 2.2.1. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.2.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men bổ sung và thời gian lên men đến quá trình lên men rượu

Thí nghiệm khảo sát 2 yếu tố là tỷ lệ dịch nấm men bổ sung, bao gồm bốn tỷ lệ (3, 5, 7, 9% (mL/100 mL dịch quả)) và thời gian lên men, bao gồm bốn mức (168, 240, 321, 384 giờ). Hàm lượng natri metabisulfite bổ sung là kết quả mục 2.2.1, tỷ lệ phối trộn thịt quả nước là kết quả mục 2.2.2, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan là kết quả mục 2.2.3. Rượu được lên men và phân tích các chỉ tiêu theo dõi tương tự như trong mục 2.2.1. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.3. Phương pháp phân tích các chỉ tiêu

Nồng độ chất rắn hòa tan (TSS): Sử dụng khúc xạ kế Atago (0 - 33%). pH sử dụng máy đo pH. Mật độ nấm men xác định bằng cách sử dụng buồng đếm hồng cầu (Nguyen, 2012). Độ cồn: phương pháp chưng cất cồn (Le & ctv., 2009). Hàm lượng đường khử phân tích bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang phổ tại bước sóng 550 nm (Miller, 1959). Hàm lượng betacyanin được



Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng natri metabisulfite đến biến đổi mật độ nấm men (A), TSS (B), pH (C), độ cồn (D), hàm lượng đường khử (E), tỷ lệ betacyanin còn lại (F).

phân tích bằng phương pháp đo độ hấp thụ quang phổ tại bước sóng 538 nm (Liaotrakoon, 2013). Tỷ lệ betacyanin còn lại được xác định bằng cách lấy hàm lượng betacyanin sau lên men chia cho hàm lượng betacyanin trước lên men.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

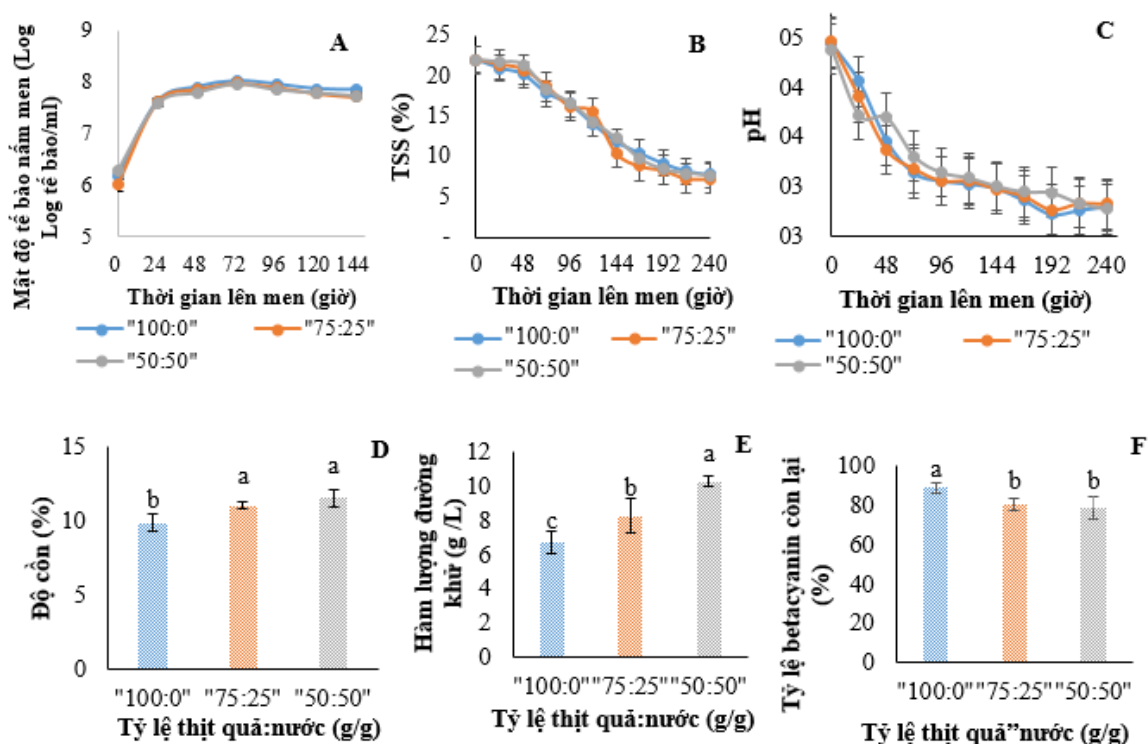
Các số liệu thu thập được xử lý thống kê bằng phần mềm JMP 13.0 và tính toán, vẽ đồ thị bằng Excel 2013.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng natri metabisulfite bổ sung đến quá trình lên men rượu

Hình 1 thể hiện sự biến đổi các thông số sinh hóa của quá trình lên men rượu thanh long dưới các hàm lượng natri metabisulfite bổ sung khác nhau. Hàm lượng natri metabisulfite trong nước

thanh long tăng làm hạn chế sự phát triển của nấm men. Sau 72 giờ lên men đã ghi nhận được nấm men phát triển cực đại 7,91 - 8,00 log tế bào/mL ở hàm lượng natri metabisulfite bổ sung là 80 ppm và 100 ppm,; trong khi đó hàm lượng 120 ppm cần 96 giờ lên men để đạt được log tế 7,91 log tế bào/mL. Natri metabisulfite là chất có khả năng kháng vi sinh vật, khi sử dụng ở hàm lượng trên 100 ppm, sau quá trình xử lý tiêu diệt vi sinh vật không mong muốn sẵn có trong dịch quả, có thể hợp chất này còn dư dẫn đến giảm khả năng phát triển của nấm men khởi động. Hàm lượng tổng chất rắn hòa tan và pH của các mẫu đều giảm dần theo thời gian lên men và có đường biểu diễn tương tự nhau. Sau 240 giờ, cả ba nghiệm thức đều có hàm lượng tổng chất rắn hòa tan 7,80 - 9,20 °Bx và pH 3,31 - 3,39. Mẫu có độ cồn càng cao và hàm lượng đường khử càng thấp khi hàm lượng natri metabisulfite bổ sung giảm dần từ 120 đến 80 ppm. Khác biệt thống kê ($P < 0,05$) về độ cồn và hàm lượng đường khử



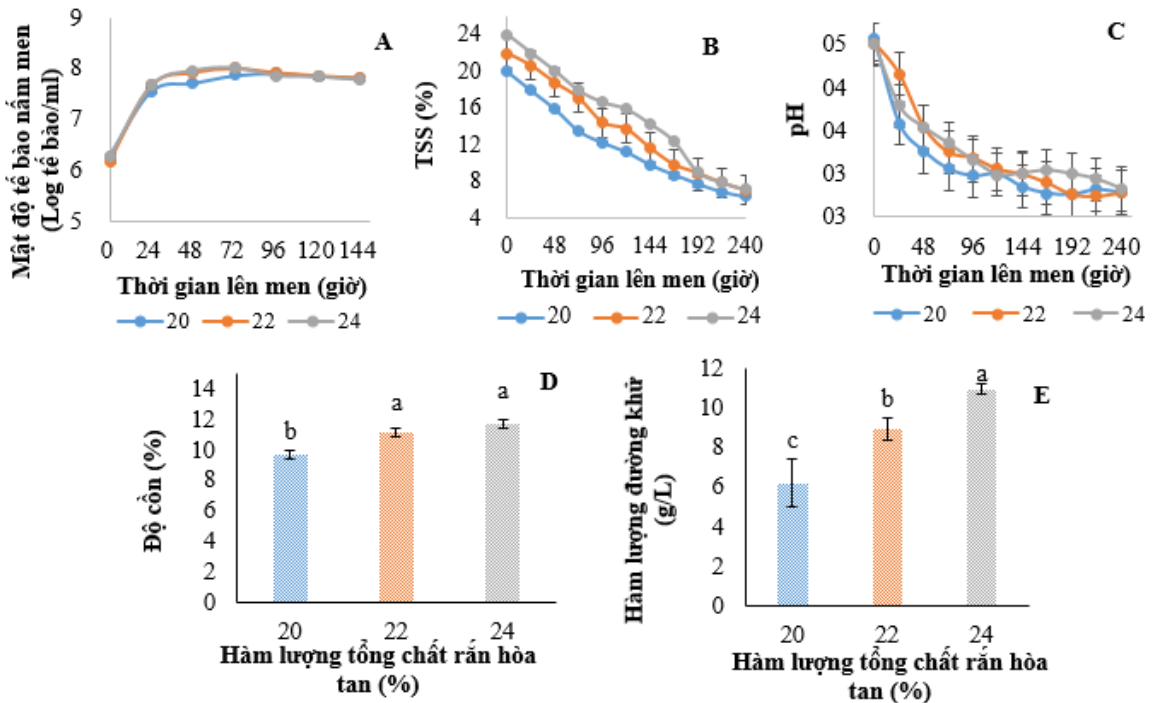
Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn thịt quả: nước đến biến đổi mật độ nấm men (A), TSS (B), pH (C), độ cồn (D), hàm lượng đường khử (E), tỷ lệ betacyanin còn lại (F).

giữa các mẫu khảo sát; mẫu 80 ppm có độ cồn (9,3%) cao nhất và hàm lượng đường khử thấp nhất (9,25 g/L). Điều này có thể do nấm men khởi động tại mức xử lý này phát triển thuận lợi hơn, quá trình lên men diễn ra tốt hơn. Natri metabisulfite có khả năng chống oxy hóa tốt; do đó khi tăng hàm lượng bổ sung hợp chất này vào trong nước thanh long đã làm tăng tỷ lệ betacyanin còn lại; tuy nhiên giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt rõ về thống kê ($P > 0,05$). Hàm lượng natri metabisulfite bổ sung 80 ppm tạo sự thuận lợi cho nấm men phát triển, rượu tạo thành có hàm lượng đường sót thấp, độ cồn cao cũng như giúp duy trì tốt hàm lượng betacyanin của sản phẩm.

3.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn thịt quả: nước đến quá trình lên men rượu

Sự biến đổi của quá trình lên men rượu dưới tác động của các tỷ lệ phối trộn thịt quả thanh long; nước khác nhau được thể hiện trong Hình 2. Đường biểu diễn sự phát triển của nấm men

ở ba nghiệm thức là tương tự nhau, mật độ nấm men đạt cực đại 7,95 - 8,01 log tế bào/mL sau 72 giờ lên men. Từ lúc bắt đầu lên men cho đến khi kết thúc quá trình lên men chính, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan và pH của các mẫu đều giảm và có đường biểu diễn tương tự nhau. Sau 240 giờ, cả ba nghiệm thức đều có hàm lượng tổng chất rắn hòa tan 7,23 - 7,77 °Bx, pH 3,22- 3,26. Có sự khác biệt về thống kê đối với độ cồn ($P < 0,05$) và hàm lượng đường khử ($P < 0,05$) giữa các mẫu thí nghiệm. Độ cồn tăng dần khi tăng tỷ lệ phối trộn nước vào thịt quả, giá trị cao nhất tại tỷ lệ 50:50 (11,50%) và thấp nhất tại tỷ lệ 100:0 (9,83%); các mẫu thí nghiệm đều đạt yêu cầu về độ cồn theo tiêu chuẩn Việt Nam 7045:2013 dành cho rượu vang ($> 8,5\%$). Khi phối trộn thêm nước vào trong thịt quả đã dẫn đến làm giảm hàm lượng tổng chất hòa tan trong dịch thanh long; do đó để đạt được cùng nồng độ tổng chất rắn hòa tan mẫu pha thêm nước cần bổ sung đường nhiều hơn mẫu không pha, điều này có thể đã dẫn đến tăng hàm lượng cơ chất cho quá trình chuyển hóa tạo rượu. Hàm lượng đường khử giảm dần khi giảm tỷ



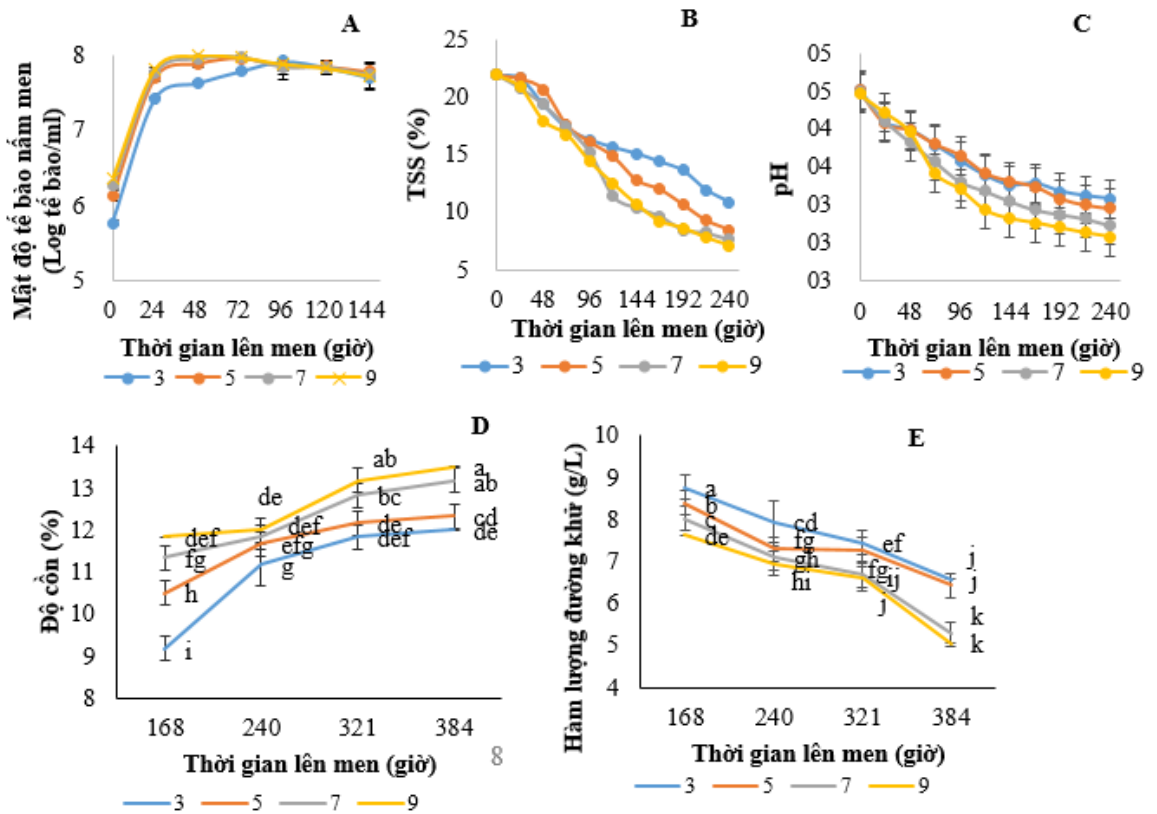
Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ phối trộn thịt quả:nước đến biến đổi mật độ nấm men (A), TSS (B), pH (C), độ cồn (D), hàm lượng đường khử (E).

lệ nước bổ sung, mẫu 100:0 có hàm lượng đường khử thấp nhất (6,67 g/L). Rượu lên men từ nước thanh long nguyên chất có tỷ lệ betacyanin còn lại cao và màu đỏ đẹp hơn so với hai mẫu còn lại (khác biệt thống kê $P < 0,05$). Dịch thanh long không pha nước cho rượu có độ cồn phù hợp với tiêu chuẩn chất lượng, hàm lượng đường sót thấp và tỷ lệ betacyanin còn lại cao.

3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng tổng chất rắn hòa tan đến quá trình lên men rượu

Biến đổi của quá trình lên men rượu thanh long dưới tác động của các hàm lượng tổng chất rắn hòa tan khác nhau được thể hiện trong Hình 3. Sự khác biệt về hàm lượng tổng chất rắn hòa tan ban đầu đã ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của nấm men; mẫu 22 °Bx và 24 °Bx đều đạt mật độ nấm men cực đại 8,0 log tế bào/mL sau 72 giờ lên men; mẫu 20 °Bx cần 96 giờ lên men để đạt 7,91 log tế bào/mL. Hàm lượng đường được bổ sung vào mẫu 20 °Bx ít hơn so với hai mẫu còn lại có thể đã dẫn đến nấm men có ít hơn chất dinh dưỡng để phát triển. Hàm lượng tổng chất rắn

hòa tan của các mẫu khảo sát đều giảm dần theo thời gian lên men, tuy nhiên có sự khác biệt về độ biến thiên hàm lượng tổng chất rắn hòa tan sau 240 giờ lên men. Kết quả ghi nhận được lần lượt là 13,60; 14,90 và 16,80 tương ứng lần lượt với các mẫu khảo sát là 20, 22 và 24 °Bx. pH của các mẫu khảo sát đều giảm dần theo thời gian lên men, giá trị này không có sự khác biệt nhiều ở ba mẫu khảo sát sau 240 giờ lên men đạt pH 3,23-3,26. Độ cồn và hàm lượng đường khử của rượu là khác nhau với hàm lượng tổng chất rắn hòa tan khác nhau. Kết quả phân tích thống kê cho thấy thay đổi hàm lượng tổng chất rắn hòa tan trước lên men đã làm thay đổi độ cồn và hàm lượng đường khử giữa các mẫu ($P < 0,05$). Mẫu 20 °Brix, 22 °Brix và 24 °Brix có độ cồn lần lượt là 9,67%, 11,17%, 11,17% và hàm lượng đường khử lần lượt là 6,21 g/L, 8,94 g/L, 10,96 g/L. Bổ sung đường vào trong dịch quả đã giúp tăng hàm lượng cơ chất cho nấm men sử dụng để chuyển hóa thành cồn, do đó mẫu có hàm lượng tổng chất rắn hòa tan cao hơn cho rượu có độ cồn cao hơn. Một số kết quả nghiên cứu khác về rượu vang cũng cho thấy dịch quả có hàm lượng chất



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch nấm men bổ sung và thời gian lên men đến biến đổi mật độ nấm men (A), TSS (B), pH (C), độ cồn (D), hàm lượng đường khử (E).

rắn hòa tan khoảng 22 oBrix cho rượu lên men tốt (Nguyen & ctv., 2013; Tong & ctv., 2018). Mẫu 22 °Brix tạo sự thuận lợi cho quá trình phát triển của nấm men, rượu tạo thành có độ cồn cao và hàm lượng đường sót thấp.

3.4. Ảnh hưởng của tỷ lệ nấm men bổ sung và thời gian lên men đến quá trình lên men rượu

Sự biến đổi của quá trình lên men rượu thanh long là khác nhau ứng với tỷ lệ nấm men bổ sung và thời gian lên men khác nhau, kết quả thể hiện trong Hình 4. Nấm men được sử dụng ở hàm lượng thấp dẫn đến khả năng nảy chồi và thời gian đạt được định mức là rất dài, điều này ảnh hưởng đến hoạt động và trao đổi chất của nấm men (Luong, 2006). Nghiệm thức bổ sung 3% nấm men có tốc độ phát triển chậm hơn so với các tỷ lệ còn lại, tỷ lệ này cần 96 giờ để đạt mật độ cực đại 7,91 log tế bào/mL; trong khi đó các tỷ lệ men còn lại cần 72 giờ để đạt 7,96

log tế bào/mL. Hàm lượng tổng chất rắn hòa tan và pH giảm theo thời gian lên men; tuy nhiên ở tỷ lệ bổ sung 7% và 9% đã dẫn đến hàm lượng nấm men trong dịch quả nhiều hơn so với mẫu 5% và 7%; do đó nấm men sử dụng nhiều đường để tăng sinh tạo ra cồn, acid hữu cơ từ đó làm giảm nhanh hàm lượng tổng chất rắn hòa tan và pH. Sau 240 giờ lên men mẫu 3% có 10,87 °Bx và pH 3,47; các mẫu còn lại có 8,07 và 7,07 °Bx và pH 3,07 - 3,36. Tỷ lệ nấm men bổ sung tăng làm rút ngắn thời gian lên men tạo cồn trong rượu, đề cập đạt độ cồn khoảng 12%, mẫu có tỷ lệ nấm men bổ sung 3%, 5%, 7% và 9% cần thời gian lên men lần lượt là 384 giờ, 321 giờ, 321 giờ và 240 giờ. Khi hàm lượng nấm men khởi động tăng, đường và các chất dinh dưỡng khác trong dịch quả có thể đã được sử dụng nhiều hơn để tạo thành cồn. Nghiên cứu về rượu sim (Nguyen & ctv., 2014), rượu khóm (Nguyen & ctv., 2013) cũng cho thấy độ cồn trong rượu tăng khi tăng hàm lượng nấm men khởi động tăng. Hàm lượng nấm men bổ sung càng tăng, hàm lượng đường

khử trong rượu càng giảm. Hàm lượng đường khử sau 16 ngày lên men đạt 6,58; 6,43; 5,27 và 5,05 tương ứng lần lượt với tỷ lệ nấm men bổ sung là 3%, 5%, 7% và 9%.

Trong cùng một tỷ lệ nấm men bổ sung, thời gian lên men càng tăng độ cồn trong rượu càng cao và hàm lượng đường khử càng giảm. Các mẫu khảo sát có độ cồn dao động 9 - 11% sau 240 giờ (10 ngày) lên men và đạt 12-13% sau 384 giờ (16 ngày) lên men. Hàm lượng đường khử trong rượu dao động 7 - 8 g/L sau 240 giờ lên men và đạt 5 - 6 g/L sau 384 giờ lên men. Thời gian lên men tăng giúp nấm men sử dụng được nhiều hơn đường trong dịch quả tạo thành rượu. Tỷ lệ nấm men bổ sung 5% và thời gian lên men 321 giờ (13 ngày) phù hợp cho lên men rượu thanh long rượu tạo thành có độ cồn cao và hàm lượng đường sót thấp, tiết kiệm thời gian lên men cũng như lượng nấm men bổ sung.

4. Kết Luận

Các yếu tố hàm lượng natri metabisulfite, tỷ lệ phối trộn thịt quả và nước, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan, tỷ lệ nấm men và thời gian lên men có ảnh hưởng đến quá trình lên men rượu, độ cồn và hàm lượng đường khử của sản phẩm. Rượu lên men từ thanh long ruột đỏ đạt kết quả tốt khi được lên men ở điều kiện xử lý dịch quả với natri metabisulfite 80 ppm, 100% dịch quả, hàm lượng tổng chất rắn hòa tan trước lên men là 22 °Bx, tỷ lệ nấm men bổ sung 5% và lên men trong 13 ngày. Kết quả này có thể được ứng dụng là cơ sở để thực hiện cho quá trình lên men rượu từ thanh long ruột trắng. Sản phẩm rượu thanh long ruột đỏ được hoàn thiện hơn cần tiếp tục nghiên cứu thêm về quá trình lên men phụ và tổ chức đánh giá cảm quan với hội đồng chuyên gia.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

Jiang, X., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Effects of different yeasts on physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans*. *Microorganisms* 8(3), 315.

Le, T. M., Nguyen, T. H., Pham, T. T., Nguyen, T. H., & Le, T. L. C. (2009). *Analysis methods of fermentation technology*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.

Liaotrakoon, W. (2013). *Characterization of dragon fruit (Hylocereus spp.) components with valorization potential* (Unpublished Doctoral dissertation). Ghent University, Ghent, Belgium.

Luong, D. P. (2006). *Industrial yeast*. Ha Noi, Vietnam: Science and Technics Publishing House.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3), 426-428.

Nguyen, N. H. (2012). *Practice: Microbiological research*. Ha Noi, Vietnam: Labour Publishing House.

Nguyen, M. T., Nguyen, P. C., Nguyen, T. M. T., & Dinh, C. D. (2014). Effects of yeast strains, pH and fermentation temperature on wine made from *Rhodomyrtus tomentosa* fruit (Mang den, kontum province). *Journal of Science and Development* 12, 89-97.

Nguyen, V. T., Nguyen, M. T., Tran, T. Q., Nguyen, T. M. T., Nguyen, P. C., & Huynh, T. T. (2013). Fermentation wine from pineapple (*Ananas comosus*) Cau Duc (Hau Giang) by isolated and purified yeast. *Can Tho University Journal of Science* 27, 56-63.

Pham, T. T. T., Nguyen, N. A. T., Le, T. D., Nguyen, N. T., Bui, H. D. L., & Huynh, X. P. (2019). Isolation and selection of yeast capable of fermenting red flesh dragon fruit wine (*Hylocereus polyrhizus*). *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* 61(8), 54-59.

Tong, T. A. N., Bui, T. A. N., Nguyen, T. M. N., & Ngo, M. Q. (2018). Effect of pH and total soluble solid to wine fermentation made from jackfruit fiber of Thailand varieties. *Can Tho University Journal of Science* 54, 211-218.

Tran, M. T. (2018). Production of wine from dragon fruit. *Van Lang University Journal of Science* 12(11), 13-19.

Wong, Y. M., & Siow, L. F. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology* 52(5), 3086-3092.

Antimicrobial activity of essential oils on food pathogens

Ngoc T. A. Tong*, Tu C. Nguyen, & Ha C. Nguyen

Department of Food Technology, College of Agriculture, Can Tho University, Can Tho, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: February 19, 2020

Revised: July 15, 2020

Accepted: August 13, 2020

Keywords

Antimicrobial

Bacteria

Disk-diffusion

Essential oils

MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

Pathogens

*Corresponding author

Tong Thi Anh Ngoc

Email: ttangoc@ctu.edu.vn

ABSTRACT

The study aimed to screen the antibacterial activity of seven types of essential oils against 5 bacteria and 4 strains of *E. coli* using disk diffusion and MIC method. The essential oils were more effective against Gram-positive bacteria as compared to Gram-negative species. Thyme and cinnamon essential oils showed strong antimicrobial activity against all microorganisms tested. Especially, the tested essential oils inhibited the growth of multi-antibiotics resistant bacteria isolated from food processing chains, indicating the possibility of their potential use in reality. The MIC values of cinnamon and thyme essential oils against *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *P. aeruginosa* were 512-1024 µg/mL and 1024-4096 µg/mL, respectively. The present study provided useful information and showed the potential use of cinnamon and thyme essential oils in food storage as natural antimicrobial preservatives.

Cited as: Tong, N. T. A., Nguyen, T. C., & Nguyen, H. C. (2020). Antimicrobial activity of essential oils on food pathogens. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 64-72.

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu đối với một số loại vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm

Tổng Thị Ánh Ngọc*, Nguyễn Cẩm Tú & Nguyễn Công Hà

Bộ Môn Công Nghệ Thực Phẩm, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ, Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 19/02/2020

Ngày chỉnh sửa: 15/07/2020

Ngày chấp nhận: 13/08/2020

Từ khóa

Kháng khuẩn

Khuếch tán đĩa

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Tinh dầu

Vi khuẩn gây bệnh

*Tác giả liên hệ

Tổng Thị Ánh Ngọc

Email: ttangoc@ctu.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định khả năng kháng khuẩn của 7 loại tinh dầu: tinh dầu tần (*Plectranthus amboinicus*), quế (*Cinnamom zeylanicum*), sả (*Cymbopogon citratus*), hương nhu (*Ocimum gratissimum*), bạc hà (*Mentha arvensis*), chanh (*Citrus hystrix*) và rau om (*Limnophila aromatica*) đối với 8 chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* (ATCC 25922, *E. coli* 92E, *E. coli* 82E, *E. coli* 74E); *S. typhimurium*; *P. aeruginosa*; *S. aureus* và *L. monocytogenes* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả nghiên cứu cho thấy vi khuẩn gram dương nhạy cảm với tinh dầu hơn so với vi khuẩn gram âm. Tinh dầu tần và quế có khả năng kháng tốt đối với 8 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đặc biệt, tinh dầu cũng có hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng vi khuẩn *E. coli* đa kháng với thuốc kháng sinh phân lập từ chuỗi chế biến cá Tra nên rất có tiềm năng ứng dụng thực tế. Đồng thời, nghiên cứu cũng xác định nồng độ ức chế tối thiểu MIC (Minimum Inhibitory Concentration) của tinh dầu lên các chủng vi khuẩn. Giá trị MIC của tinh dầu quế dao động từ 512-1024 µg/mL và tinh dầu tần dao động từ 1024-4096 µg/mL đối với các chủng vi khuẩn: *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* và *P. aeruginosa*. Nghiên cứu cung cấp một số thông tin hữu ích về khả năng kháng khuẩn của tinh dầu đối với một số loại vi khuẩn gây bệnh truyền qua thực phẩm và cũng cho thấy tiềm năng của tinh dầu tần và tinh dầu quế trong việc ứng dụng làm chất bảo quản thực phẩm.

1. Đặt Vấn Đề

Việt Nam là một trong những nước có nguồn tài nguyên thực vật phong phú và đa dạng. Những nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn từ các cây được liệu đang được quan tâm (Vu & Nguyen, 2015). Thành phần của tinh dầu đã được chứng minh là có tính chất kháng khuẩn, kháng nấm, chống côn trùng và chống oxy hóa (Burt, 2004; Kordali et al., 2005). Nhiều nghiên cứu về hiệu quả của tinh dầu kháng lại các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm qua thực phẩm và chống lại vi khuẩn gây hư hỏng các sản phẩm thực phẩm đã được thực hiện trước đây (Melo & ctv., 2015; Desam & ctv., 2017; da Silva & ctv., 2018).

Hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu phụ thuộc vào thành phần hoạt động của các nhóm chức có mặt trong tinh dầu và sự tương tác giữa chúng (Dorman & Deans, 2000). Tinh dầu chứa

các thành phần như: carvacrol, eugenol, thymol, cyclohexane, limonene, β -pinene,... có hoạt tính kháng lại các vi khuẩn gây bệnh thực phẩm (Srisukh & ctv., 2012; Chouhan & ctv., 2017). Cơ chế trong hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu có thể tác động lên màng tế bào chất, làm gián đoạn lực đẩy proton, ức chế hô hấp, làm kết tủa các chất trong tế bào... (Cetin & ctv., 2011; La Storia & ctv., 2011; Magi & ctv., 2015).

Chính hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu nên tinh dầu đang trở thành lựa chọn tiềm năng để thay thế các chất bảo quản tổng hợp. Các loại tinh dầu còn được xem là chất tự nhiên để bảo quản nhằm kéo dài hạn sử dụng của các sản phẩm thực phẩm. Vì vậy, việc nghiên cứu chi tiết về khả năng kháng khuẩn của tinh dầu để ứng dụng làm chất bảo quản thực phẩm rất được quan tâm. Mục đích của nghiên cứu này là xác định các loại tinh dầu có khả năng kháng tốt với các chủng

vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm. Đồng thời nghiên cứu cũng xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu đối với một số loại vi khuẩn thử nghiệm. Nghiên cứu cung cấp một số thông tin hữu ích và làm cơ sở cho việc chọn lựa tinh dầu trong ứng dụng làm chất bảo quản tự nhiên, có thể giúp kéo dài hạn sử dụng của một số sản phẩm thực phẩm.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu thí nghiệm

2.1.1. Tinh dầu

Các loại tinh dầu như: tinh dầu tần (*Plectranthus amboinicus*), quế (*Cinnamom zeylanicum*), sả (*Cymbopogon citratus*), hương nhu (*Ocimum gratissium*), bạc hà (*Mentha arvensis*), chanh (*Citrus hystrix*) và rau om (*Limnophila aromatica*) được sử dụng trong nghiên cứu dưới dạng nguyên chất (Công ty TNHH Tinh dầu thiên nhiên Y Lang, Việt Nam).

2.1.2. Chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu như: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* và *Listeria monocytogenes* (Trường Đại học Cần Thơ). Ngoài ra, các chủng vi khuẩn như: *Escherichia coli* 92E (đề kháng với 8 loại kháng sinh: ampicillin, cefotaxime, sulfamethoxalole, streptomycin, nalidixic acid, tetracycline, chloramphenicol và ciprofloxacin), *Escherichia coli* 80E (đề kháng với 4 loại kháng sinh: ampicillin, ciprofloxacin, chloramphenicol và nalidixic acid), *Escherichia coli* 74E (đề kháng với 2 loại kháng sinh: tetracycline và streptomycin) được phân lập từ nước cất tiệt, bề mặt tiếp xúc và cá Tra tại công đoạn chỉnh hình trong qui trình chế biến cá Tra phi lê đông lạnh.

2.1.3. Môi trường, hoá chất

Tryptone Soya Broth (TSB, Merck, Đức sản xuất)

Meuller-Hinton Agar (MHA, Merck, Đức sản xuất)

Brain Heart Infusion (BHI, Merck, Đức sản xuất)

Máu cừu (Merck, Đức sản xuất)

Tăm bông vô trùng (Cotton swaps, Anh sản xuất)

Độ đục chuẩn McFarland 0,5 (Nam Khoa, Việt Nam sản xuất)

Tween 80 (Đức sản xuất)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn thuần chủng trữ lạnh đông ở -80°C được tăng sinh trong Tryptone Soya Broth, sau khi ủ ở 37°C trong 24 giờ sẽ có được huyền phù vi khuẩn sử dụng trong thí nghiệm.

2.2.2. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu

Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu được thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán đĩa (Nguyen & ctv., 2015; CLSI, 2019). Dùng tăm bông vô trùng thấm đều huyền dịch vi khuẩn có mật số 10^8 CFU/mL (tương đương với độ đục của McFarland 0,5) và quét đều trên mặt thạch Meuller-Hinton Agar (đường kính đĩa petri 9 cm) đến khi khô bề mặt. Riêng đối với chủng *L. monocytogenes*, môi trường MHA được bổ sung 5% máu cừu. Đĩa giấy vô trùng (đường kính đĩa giấy 6 mm) chứa 10 μL tinh dầu sau đó được đặt lên mặt thạch MHA đã quét vi khuẩn. Mẫu đối chứng là đĩa giấy không chứa tinh dầu được đặt trên mặt thạch. Tiếp theo, các đĩa petri được giữ mát trong 4 giờ để tinh dầu khuếch tán ra mặt thạch trước khi ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, đường kính vòng vô khuẩn (D-d) được xác định bằng hiệu của đường kính vòng kháng ngoài (D, mm) và đường kính đĩa giấy (d = 6 mm), khi D-d > 0 mm thì tinh dầu được xem là có tính kháng khuẩn. Kết quả ghi nhận D là trung bình của 3 lần đo lặp lại trên cùng một đơn vị thí nghiệm.

2.2.3. Nồng độ ức chế tối thiểu

Dựa vào khả năng kháng khuẩn của các loại tinh dầu, nồng độ ức chế tối thiểu (MIC- Minimum Inhibitory Concentrations) của tinh dầu đối với các loại vi khuẩn nhạy cảm cũng được xác định theo phương pháp của Nguyen & ctv. (2015) với một số điều chỉnh nhỏ. Pha tinh dầu thành dãy nồng độ cần thử (dãy nồng độ tinh dầu từ 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096 và 8192 $\mu\text{g/mL}$) trong dung dịch Brain Heart Infusion chứa 0,5% Tween 80. Bổ sung huyền dịch vi khuẩn sao cho mật độ vi khuẩn cuối trong ống nghiệm

là 10^4 CFU/mL và thể tích cuối là 10 mL. Mẫu đối chứng là mẫu chứa tinh dầu nhưng không chứa vi khuẩn (ứng với mỗi nồng độ tinh dầu thử nghiệm sẽ có một mẫu đối chứng âm). Ngoài ra, mẫu chỉ chứa vi khuẩn (không chứa tinh dầu) cũng được chuẩn bị để đối chứng với sự phát triển từng chủng vi khuẩn thử nghiệm. Sau khi ủ mẫu ở 37°C trong 24 giờ, so sánh độ đục của ống mẫu so với ống đối chứng và ghi nhận kết quả. MIC của tinh dầu ứng với từng loại vi khuẩn được xác định là nồng độ tinh dầu thấp nhất mà ở đó không quan sát thấy sự phát triển của vi khuẩn so với các mẫu đối chứng.

2.3. Xử lí số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần độc lập. Đường kính vòng vô khuẩn (mm) được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Khả năng kháng khuẩn của một số loại tinh dầu đối với các dòng vi khuẩn thử nghiệm

Nghiên cứu tiến hành xác định khả năng kháng khuẩn của 7 loại tinh dầu: tần, quế, sả, hương nhu, bạc hà, chúc và rau om trên 8 chủng vi khuẩn là: *Escherichia coli* (ATCC 25922, *E. coli* 92E, *E. coli* 82E, *E. coli* 74E); *S. typhimurium*; *P. aeruginosa*; *S. aureus* và *L. monocytogenes*. Kết quả thể hiện ở Bảng 1 và Hình 1 cho thấy tinh dầu tần có tác dụng kháng khuẩn rất tốt với tất cả các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Nhìn chung, tinh dầu tần có tác dụng ức chế tốt trên vi khuẩn Gram dương hơn là vi khuẩn Gram âm. Đặc biệt, tinh dầu tần có tác dụng ức chế hoàn toàn đối với *L. monocytogenes* vì vi khuẩn không mọc trên toàn đĩa thạch, kể đến là chủng *S. aureus* với đường kính vòng vô khuẩn là $26 \pm 1,0$ mm. Trong số các chủng vi khuẩn Gram âm được thử nghiệm, tinh dầu tần có tác dụng kháng khuẩn mạnh nhất đối với *E. coli* ATCC 25922 ($20 \pm 1,2$ mm) và yếu nhất đối với *P. aeruginosa* ($7,3 \pm 0,6$ mm). Ngoài ra, tinh dầu tần cũng cho thấy tác dụng kháng khuẩn tốt đối với các chủng *E. coli* đa kháng thuốc, đường kính vòng vô khuẩn đối với các chủng vi khuẩn này dao động từ 10,7 - 19,7 mm và giảm dần đối với các chủng *E. coli* đa kháng với nhiều loại kháng sinh hơn.

Kết quả của nghiên cứu trước đây cũng cho

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm) của tinh dầu đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Vi khuẩn (Gram -/+)	Tinh dầu						
	Tần	Quế	Sả	Hương nhu	Bạc hà	Chúc	Rau om
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (-)	$20 \pm 1,2^1$	$19 \pm 1,0$	$1,8 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0$	$2,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 0,6$	$1,7 \pm 1,5$
<i>E. coli</i> 92E (-)	$10,7 \pm 1,2$	$19,3 \pm 1,2$	0	Vết	$1,0 \pm 0,9$	Vết	0
<i>E. coli</i> 80E (-)	$18,7 \pm 0,6$	19 ± 0	Vết	Vết	$1,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0$	0
<i>E. coli</i> 74E (-)	$19,7 \pm 0,6$	$19 \pm 1,0$	$1,3 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0$	$2,0 \pm 0$	$1,0 \pm 0$	0
<i>S. typhimurium</i> (-)	$9,3 \pm 2,5$	$17,3 \pm 1,5$	Vết	Vết	$2,5 \pm 1,3$	$1,0 \pm 0,5$	Vết
<i>P. aeruginosa</i> (-)	$7,3 \pm 0,6$	$8,3 \pm 0,6$	0	0	0	Vết	0
<i>S. aureus</i> (+)	$26 \pm 1,0$	$27 \pm 1,7$	$7,7 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,6$	$2,7 \pm 1,2$	Vết	$1,2 \pm 0,8$
<i>L. monocytogenes</i> (+)	*	$18,7 \pm 1,5$	$3,3 \pm 0,6$	$1,2 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0$	$1,5 \pm 0,9$	0

¹Giá trị trung bình \pm stdev của 3 lần lặp lại.
*Vi khuẩn không mọc trên toàn đĩa thạch.

thấy khả năng ức chế của tinh dầu tần mạnh hơn đối với *Staphylococcus* spp., so với *Escherichia coli* và *Pseudomonas* spp. (Hassani & ctv., 2012; Ajitha & ctv., 2014). Do trong tinh dầu tần có cavacrol có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nên rất có tiềm năng sử dụng tinh dầu tần để ức chế sự phát triển của các vi khuẩn nhằm kéo dài thời hạn bảo quản thực phẩm (Baydar & ctv., 2004; Mith & ctv., 2014).

Tương tự với tinh dầu tần, tinh dầu quế có tác dụng kháng khuẩn tốt đối với tất cả các chủng vi khuẩn thử nghiệm và có tác dụng ức chế mạnh đối với vi khuẩn Gram dương hơn là vi khuẩn Gram âm; kết quả này cũng phù hợp với các báo cáo trước đây (Burt, 2004; Trombetta & ctv., 2005; Shan & ctv., 2007). Vi khuẩn Gram âm có cấu tạo màng tế bào dày và phức tạp hơn vi khuẩn Gram dương, điều này tạo ra một số rào cản đối với sự khuếch tán của các đại phân tử, vì thế cho phép vi khuẩn Gram âm có khả năng kháng lại tốt hơn đối với các hợp chất kháng khuẩn có trong tinh dầu (Nikaido, 2003).

Tinh dầu quế có tác dụng ức chế hiệu quả nhất đối với vi khuẩn *S. aureus* và yếu nhất đối với vi khuẩn *P. aeruginosa* (đường kính vòng vô khuẩn tương ứng là $27 \pm 1,7$ và $8,3 \pm 0,6$ mm). Khác với tinh dầu tần, hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu quế có tác dụng giống nhau đối với các chủng *E. coli* đa kháng thuốc (đường kính vòng vô khuẩn dao động từ 19-19,3 mm). Theo các công bố trước đây, tinh dầu quế có khả năng ức chế đối với các chủng vi khuẩn gây bệnh như: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 và *S. typhimurium* (Oussalah & ctv., 2007; Kumar & Kumari, 2019). Kết quả nghiên cứu của Keskin & Toroglu (2011) cho thấy tinh dầu quế có tác dụng chống lại *P. aeruginosa* ATCC 27895, *S. aureus* 6538 P và *E. coli* ATCC 8739 với đường kính vùng ức chế dao động từ 7-18 mm. Hoạt tính kháng khuẩn mạnh của tinh dầu quế có thể được giải thích do thành phần chủ yếu của *trans*-cinnamaldehyde có trong tinh dầu quế (Shan & ctv., 2007; Castilho & ctv., 2012; Mith & ctv., 2014).

Bảng 1 cũng cho thấy các loại tinh dầu khác như: sả, hương nhu, bạc hà, chúc và rau om có tác dụng kháng khuẩn yếu đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Trong nghiên cứu này, tinh dầu sả, hương nhu, bạc hà và rau om không có tác dụng kháng khuẩn đối với vi khuẩn *P. aeruginosa*. Kết quả này tương tự các nghiên cứu trước đây kết luận chung là tinh dầu sả không có tác

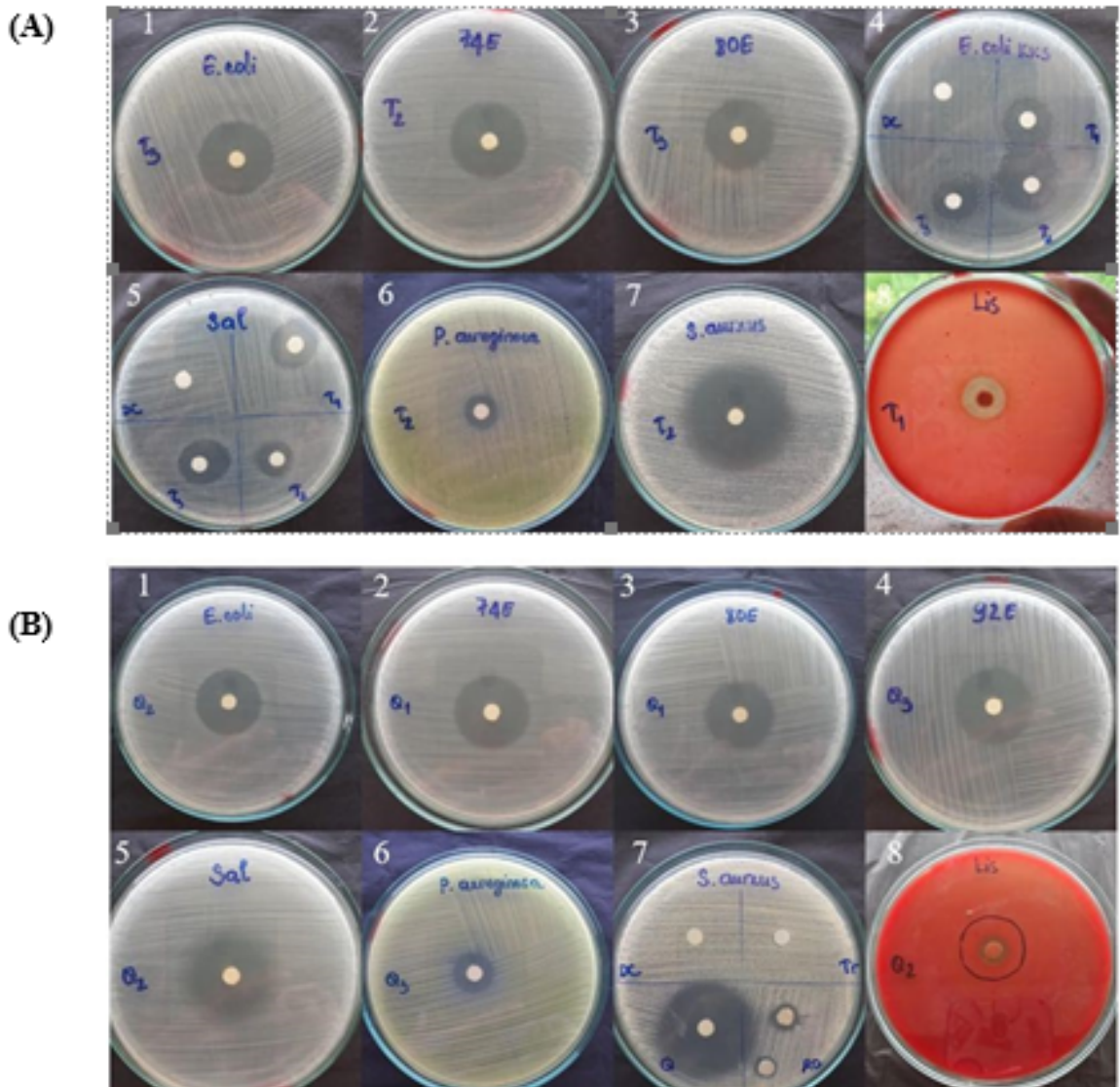
dụng ức chế đối với chủng *P. aeruginosa* (Marta War & ctv., 2004; Pereira & ctv., 2004). Ngược lại, nghiên cứu của Subramaniam & ctv. (2020) cho thấy tinh dầu sả có tác dụng ức chế tốt đối với chủng *P. aeruginosa*. Trong khi đó, nghiên cứu của Kin & ctv. (2018) cho thấy tinh dầu hương nhu có hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. coli*, tuy nhiên không có tác dụng kháng khuẩn đối với *Salmonella* spp.

3.2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu đối với các chủng vi khuẩn nhạy cảm

Kết quả khảo sát nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của tinh dầu đối với một số loại vi khuẩn thử nghiệm có đường kính vòng vô khuẩn: ≥ 4 mm và ≤ 4 mm được thể hiện ở Bảng 2. Đối với tinh dầu tần, MIC của vi khuẩn Gram âm cao hơn so với vi khuẩn Gram dương. MIC của tinh dầu tần đối với tất cả các chủng vi khuẩn *E. coli*, *S. typhimurium* và *P. aeruginosa* (Gram âm) là 4096 $\mu\text{g/mL}$. MIC của tinh dầu tần đối với *S. aureus* và *L. monocytogenes* (Gram dương) lần lượt là 1024 và 2048 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu trước đây của Judith & ctv. (2013) cho thấy tinh dầu tần có hoạt động kháng khuẩn chống lại các vi khuẩn đường ruột như *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* và *Vibrio* spp. với giá trị MIC thấp nhất là 10 $\mu\text{g/mL}$, thấp hơn so với trong nghiên cứu này. Có thể là do sự khác nhau giữa đặc tính hóa lý của tinh dầu sử dụng và sự khác biệt trong đặc tính của các chủng vi khuẩn (Matasyoh & ctv., 2008).

Tinh dầu quế có MIC thấp nhất trong các loại tinh dầu khảo sát, với MIC là 512 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 2.) ngoại trừ chủng *P. aeruginosa* có MIC là 1024 $\mu\text{g/mL}$, điều này khẳng định thêm hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu quế mạnh nhất trong các loại tinh dầu khảo sát. Theo Al-Mariri & Safi (2014), tinh dầu quế có hoạt động kháng khuẩn mạnh chống lại vi khuẩn *E. coli* O157:H7 với giá trị MIC rất thấp (12,5 $\mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên, nghiên cứu khác của Tayel & ctv. (2012) cũng cho thấy tinh dầu quế có hoạt động kháng khuẩn như *S. typhimurium* và *S. aureus* với MIC là 350 $\mu\text{g/mL}$.

Một điểm đáng chú ý của nghiên cứu này là mặc dù tinh dầu sả, hương nhu và bạc hà có tác dụng kháng khuẩn kém hơn so với tinh dầu tần và quế; tuy nhiên MIC thu được của ba loại tinh dầu này có thể thấp hơn (Bảng 2). Cụ thể, đối với *L. monocytogenes*, tinh dầu sả có MIC là 1024 $\mu\text{g/mL}$ trong khi tinh dầu tần có MIC là 2048 $\mu\text{g/mL}$. Điều này có thể được giải thích một phần

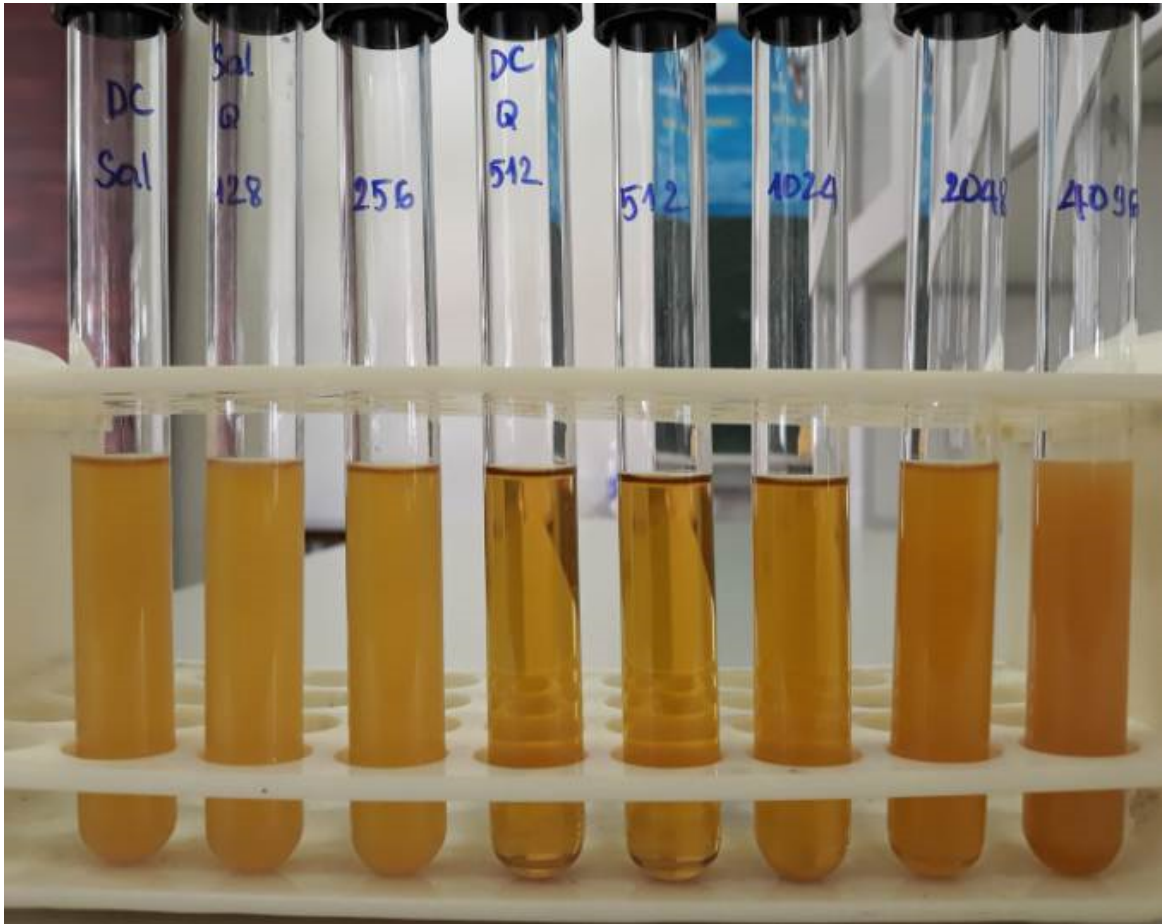


Hình 1. Khả năng kháng khuẩn của tinh dầu tần (A) và quế (B) đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm. 1 - *E. coli* ATCC 25922; 2 - *E. coli* 74E; 3 - *E. coli* 80E; 4 - *E. coli* 92E; 5 - *S. typhimurium*; 6 - *P. aeruginosa*; 7 - *S. aureus*; 8 - *L. monocytogenes*.

Bảng 2. MIC của tinh dầu ($\mu\text{g/mL}$) đối với các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Vi khuẩn		Tinh dầu				
		Tần	Quế	Sả	Hương nhu	Bạc hà
Vi khuẩn Gram âm	<i>E. coli</i> ATCC 25922	4096**	512**	4096*	-	2048*
	<i>S. typhimurium</i>	4096**	512**	8192*	-	8192*
	<i>P. aeruginosa</i>	4096**	1024**	-	-	-
Vi khuẩn Gram dương	<i>L. monocytogenes</i>	2048**	512**	1024*	-	1024*
	<i>S. aureus</i>	1024**	512**	2048**	4096**	1024*

*Đường kính vòng vô khuẩn: ≤ 4 mm; **Đường kính vòng vô khuẩn: ≥ 4 mm; "-" không thử nghiệm.



Hình 2. MIC (= 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$) của tinh dầu quế đối với vi khuẩn *S. typhimurium*. Ở các nồng độ tinh dầu cao: 2048 và 4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sẽ gây đục ống nghiệm.

do hoạt động kháng khuẩn của tinh dầu bị ảnh hưởng chủ yếu bởi phương pháp thực hiện, dung môi, cách xác định MIC, nồng độ tinh dầu và loại vi khuẩn (Van de Vel & ctv., 2019; Kalemba & Synowiec, 2020).

4. Kết Luận

Tinh dầu tần và quế có khả năng kháng tốt đối với 8 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Đặc biệt, tinh dầu cũng có hoạt tính kháng lại các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc được phân lập từ chuỗi chế biến cá Tra nên rất có tiềm năng ứng dụng thực tế. Tinh dầu tần có khả năng kháng tốt nhất đối với *L. monocytogenes* trong khi tinh dầu quế có khả năng kháng tốt nhất đối với *S. aureus*. Đối với các chủng *E. coli* ATCC 25922, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* và *P. aeruginosa*,

giá trị MIC của tinh dầu quế dao động từ 512-1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và tinh dầu tần dao động từ 1024-4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Trong khi đó, tinh dầu sả và bạc hà có MIC chung là 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ đối với *L. monocytogenes*.

Lời Cam Đoan

Nghiên cứu này không tồn tại bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu 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 (Project No: A-16).

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., & Reddy, P. S. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Plectranthus amboinicus* leaf extract and its anti-microbial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 128, 257-262.
- Al-Mariri, A., & Safi, M. (2014). *In vitro* antibacterial activity of several plant extracts and oils against some gram-negative bacteria. *Iranian Journal of Medical Sciences* 39, 36.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control* 15(3), 169-172.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253.
- Castilho, P. C., Savluchinske-Feio, S., Weinhold, T. S., & Gouveia, S. C. (2012). Evaluation of the antimicrobial and anti-oxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. *Food Control* 23, 552-558.
- Cetin, B., Cakmakci, S., & Cakmakci, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35, 145-154.
- Chouhan, S., Sharma, K., & Guleria, S. (2017). Antimicrobial activity of some essential oils - present status and future perspectives. *Medicines* 4, 58.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2019). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard (29th ed.)* CLSI document M02-A11. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- da Silva, F. T., da Cunha, K. F., Fonseca, L. M., Antunes, M. D., El Halal, S. L. M., Fiorentini, A. M., da Rosa Zavareze, E., & Dias, A. R. G. (2018). Action of ginger essential oil (*Zingiber officinale*) encapsulated in proteins ultrafine fibers on the antimicrobial control in situ. *International Journal of Biological Macromolecules* 118, 107-115.
- Desam, N. R., Al-Rajab, A. J., Sharma, M., Mylabathula, M. M., Gowkanapalli, R. R., & Albratty, M. (2017). Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha × Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University-Science*.
- Dorman, H., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- Hassani, M. S., Zainati, I., Zrira, S., Mahdi, S., & Oukessou, M. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spring. Essential oil from archipelago of Comoros. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 15, 637-644.
- Judith, V., Luis, B. R., Tulia, D. & Alfredo, U. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* Lour., against enteric pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 12(4), 453-461.
- Kalembe, D., & Synowiec, A. (2020). Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: *Mentha piperita* and *mentha arvensis*. *Molecules* 25(1), 59.
- Keskin, D., & Toroglu, S. (2011). Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *Journal of Environmental Biology* 32, 251-256.
- Kin, A., Yaki, L. M., Abubakar, I., Olusola, L. F., & Zubairu, R. (2018). Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* (scent leaf) on some pathogenic gastrointestinal bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 12, 923-929.
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., & Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the anti-fungal and anti-bacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9452-9458.
- Kumar, S., & Kumari, R. (2019). *Cinnamomum*: Review article of essential oil compounds, ethnobotany, anti-fungal and antibacterial effects. *Open Access Journal of Science* 3(1), 13-16.
- La Stora, A., Ercolini, D., Marinello, F., Di Pasqua, R., Villani, F., & Mauriello, G. (2011). Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. *Research in microbiology* 162, 164-172.
- Magi, G., Marini, E., & Facinelli, B. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Frontiers in microbiology* 6, 165.
- Marta War, O., Rodriguez, M., Garcia, G., & CeliaLierene, R. (2004). Antimicrobial activity of the essential oil and cream of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf. *Revcubana Plt Med* 2, 44-47.
- Matasyoh, L. G., Matasyoh, J. C., Wachira, F. N., Kinyua, M. G., Muigai, A. W. T., & Mukiama, T. K. (2008). Anti-microbial activity of essential oils of *Ocimum gratissimum* L. from different populations of Kenya. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 5, 187-193.
- Melo, A. D. B., Amaral, A. F., Schaefer, G., Luciano, F. B., de Andrade, C., Costa, L. B., & Rostagno, M. H. (2015). Anti-microbial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Canadian Journal of Veterinary Research* 79, 285-289.
- Mith, H., Dure, R., Delcenserie, V., Zhiri, A., Daube, G., & Clinquart, A. (2014). Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science & Nutrition* 2, 403-416.

- Nguyen, L. T. H., Bui, T. Q., Le, T. D., & Nguyen, D. T. N. (2015). Study on the Anti-bacterial Activity of Essential Oils from Perilla Leaves. *Journal of Science and Development* 13, 245-250.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 593-656.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5), 414-420.
- Pereira, R. S., Sumita, T. C., Furlan, M. R., Jorge, A. O. C., & Ueno, M. (2004). Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Revista de Saude Publica* 38, 326-328.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 5484-5490.
- Srisukh, V., Tribuddharat, C., Nukoolkarn, V., Bunyapraphatsara, N., Chokephaibulkit, K., Phoomniyom, S., Chuanphung, S., & Srifuengfung, S. (2012). Antibacterial activity of essential oils from *Citrus hystrix* (makrut lime) against respiratory tract pathogens. *Science Asia* 38, 212-217.
- Subramaniam, G., Yew, X. Y., & Sivasamugham, L. A. (2020). Antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* against clinically important bacteria. *South African Journal of Chemical Engineering* 34, 26-30.
- Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S. H., & El-Sabbagh, S. M. (2012). Surface decontamination and quality enhancement in meat steaks using plant extracts as natural biopreservatives. *Foodborne Pathogens and Disease* 9(8), 755-761.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(6), 2474-2478.
- Van de Vel, E., Sampers, I., & Raes, K. (2019). A review on influencing factors on the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59, 357-378.
- Vu, T. T., & Nguyen, H. T. (2015). Inhibitions of *Staphylococcus aureus* by using the combination of Vietnamese essential oils. *Vietnam Journal of Science and Technology* 53(4), 417-424.

Screening of factors influencing the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme as a catalyst

Cuong V. Bui^{1*}, Kim Chi T. Nguyen¹, & Dong X. Bui²

¹Department of Food Technology, Faculty of Chemical Engineering, University of Science and Technology, The University of Da Nang, Da Nang, Vietnam

²Department of Bio-Technology, Faculty of Chemical Engineering, University of Science and Technology, The University of Da Nang, Da Nang, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: May 29, 2020

Revised: July 10, 2020

Accepted: August 21, 2020

Keywords

Amino acid yield
Chicken cartilage
Hydrolysis reaction
Hydrolysis yield
Protamex enzyme

*Corresponding author

Bui Viet Cuong
Email: bvcuong@dut.udn.vn

ABSTRACT

The objective of this research was to use Protamex enzyme as a catalyst to hydrolyze chicken leg cartilage for production of amino acid hydrolysate. The proximate composition of chicken cartilage was analyzed. The results indicated that the major components in the dry matter of chicken leg cartilage were lipid ($19.72 \pm 0.05\%$) and protein ($13.34 \pm 0.08\%$). The main parameters affecting the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme were selected for investigation: reaction temperature ($^{\circ}\text{C}$), pH, enzyme ratio (%), based on the weight of substrate), reaction time (min), and the ratio of reaction volume (v/v). The significant difference was analyzed by ANOVA One-Way to identify the optimal point of each parameter toward amino acid yield. The results revealed that the hydrolysis degree and amino acid yield reached the maximal values of $22.93 \pm 4.01\%$ and $30.25 \pm 1.86\%$, respectively, when the reaction temperature, pH, enzyme ratio, reaction time, and ratio of reaction volume (v/v) were 40°C , 4, 0.52%, 40 min, and 1/18, respectively.

Cited as: Bui, C. V., Nguyen, K. C. T., & Bui, D. X. (2020). Screening of factors influencing the hydrolysis reaction of chicken leg cartilage with Protamex enzyme as a catalyst. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 73-79.

Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex

Bùi Viết Cường^{1*}, Nguyễn Thị Kim Chi¹ & Bùi Xuân Đông²

¹Bộ Môn Công Nghệ Thực Phẩm, Khoa Hóa, Trường Đại Học Bách khoa, Đại Học Đà Nẵng, Đà Nẵng

²Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Khoa Hóa, Trường Đại Học Bách Khoa, Đại Học Đà Nẵng, Đà Nẵng

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 29/05/2020

Ngày chỉnh sửa: 10/07/2020

Ngày chấp nhận: 21/08/2020

Từ khóa

Enzyme Protamex

Hiệu suất thủy phân

Hiệu suất thu nhận axit amin

Phản ứng thủy phân

Sụn khớp chân gà

*Tác giả liên hệ

Bùi Viết Cường

Email: bvcuong@dut.udn.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex nhằm thu axit amin. Thành phần hóa học của sụn khớp chân gà được phân tích, kết quả phân tích cho thấy hai thành phần chính trong chất khô của sụn khớp chân gà là lipid ($19,72 \pm 0,05\%$) và protein ($13,34 \pm 0,08\%$). Các yếu tố chính ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex được lựa chọn để khảo sát: Nhiệt độ phản ứng ($^{\circ}\text{C}$), pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme (% dựa trên cơ chất), thời gian phản ứng (phút) và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng (v/v). Phân tích sự khác biệt có ý nghĩa được tiến hành với phương pháp ANOVA One-Way nhằm lựa chọn điều kiện tốt nhất cho phản ứng thủy phân. Hiệu suất thủy phân và hiệu suất thu nhận axit amin đạt giá trị lớn nhất lần lượt là $22,93 \pm 4,01\%$ và $30,25 \pm 1,86\%$ khi nhiệt độ phản ứng; pH môi trường phản ứng; tỉ lệ enzyme; thời gian phản ứng và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng thích hợp lần lượt là 40°C ; 4; 0,52%; 40 phút và 1/18 (v/v).

1. Đặt Vấn Đề

Xử lý và chế biến phụ phẩm giết mổ gia cầm thành các sản phẩm có giá trị cao nhằm nâng cao hiệu quả kinh tế và giảm lượng chất thải rắn là thách thức lớn và thu hút sự quan tâm nghiên cứu của cộng đồng khoa học (Meeker, 2006). Đặc biệt trong bối cảnh hiện nay, nhu cầu về thịt gia cầm đang tăng lên trên thế giới và Việt Nam. Sản lượng thịt gà toàn cầu đã tăng 2% vào năm 2019; tương ứng với 97,8 triệu tấn; và xuất khẩu thịt gà toàn cầu tăng mạnh 4% vào năm 2019; tương ứng với 11,6 triệu tấn (Mangino, 2019). Công nghiệp giết mổ gia cầm đã thải ra môi trường một lượng lớn phụ phẩm hữu cơ: nội tạng, chân, đầu,.... Xử lý hiệu quả phụ phẩm giết mổ gia cầm sẽ có tác động tích cực đối với kinh tế và môi trường (Jay-

athilakan & ctv., 2012).

Sụn khớp chân gà có thành phần protein khá cao ($11,78 \pm 0,21\%$) (Araújo & ctv., 2018) nhưng chỉ được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, phân bón hóa học hoặc các ngành công nghiệp hóa chất khác tại các nước phát triển. Tuy nhiên, tại các nước châu Á nói chung và Việt Nam nói riêng sụn khớp chân gà được sử dụng làm thực phẩm cho con người vì có giá trị dinh dưỡng lớn (Meeker, 2006). Đặc biệt sụn khớp chân gà có chứa nhiều thành phần có hoạt tính sinh học (collagen) cao và tốt cho sức khỏe xương khớp, có tác dụng xóa nếp nhăn trên da, làm mượt da và chống lão hóa (Nakano & ctv., 1995; Luo & ctv., 2002). Tuy nhiên, collagen phải được phân giải thành peptides hoặc axit amin để có thể hấp thụ được trong hệ thống tiêu hóa của con người và động vật do

đó khả năng hấp thụ của protein (collagen) sẽ thấp hơn so với axit amin. Ngoài ra, trong một vài trường hợp protein không có khả năng tiêu hóa và hấp thụ hoàn toàn, phần còn sót lại sau quá trình tiêu hóa sẽ bị phân hủy và hình thành độc tố: amoniac, phenol, benzpyrol,... trong khi đó các axit amin có thể được hấp thụ hoàn toàn (Thureen, 2012).

Phản ứng thủy phân với xúc tác enzyme có nhiều ưu điểm hơn so với xúc tác phi enzyme như điều kiện phản ứng “nhẹ nhàng” hơn, giá trị dinh dưỡng của sản phẩm thủy phân cao hơn, enzyme có tính đặc hiệu do đó mức độ tinh khiết của sản phẩm thủy phân cao hơn vì không hình thành sản phẩm phụ (Wisuthiphaet & ctv., 2016; Bui & ctv., 2017). Enzyme Protamex được phép sử dụng trong thực phẩm theo qui định của FAO và WHO về phụ gia thực phẩm (JEFTA) và Bộ luật hóa chất thực phẩm (FCC) (Nguyen & ctv., 2011; Bui & ctv., 2017). Do đó, enzyme Protamex được sử dụng trong nghiên cứu này để thủy phân sụn khớp chân gà với mục đích thu nhận axit amin.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Sụn khớp chân gà

Sụn khớp chân gà được cung cấp bởi Công ty TNHH TM & DV Hoàng Phát – Đà Nẵng ở dạng đông lạnh, 1 kg/1 block. Sụn khớp chân gà được vận chuyển trong thùng xốp có khả năng giữ nhiệt và được bảo quản ở -20°C sau khi vận chuyển về phòng thí nghiệm. Sụn khớp chân gà được rã đông bằng không khí tới 0°C , rửa sạch và xay nhỏ bằng máy xay (ATS TS-102AL, Đà Loan), lựa chọn bằng sàng có kích thước 6 mm. Nguyên liệu qua lưới sàng được chia nhỏ thành từng khối đựng trong các túi nilon kín có khối lượng 100 g, được bảo quản ở -20°C cho những lần thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Enzyme và hóa chất

Enzyme Protamex được cung cấp bởi công ty TNHH XNK vật tư khoa học quốc tế STECH International. Hoạt độ protease của enzyme Protamex là 38994,3 UI/g. Điều kiện tối ưu của enzyme Protamex là pH= 5,5 - 7,5; nhiệt độ từ 35 - 60°C (Liaset & ctv., 2003). Nhiệt độ bảo quản tốt nhất của Protamex là 0 - 5°C . Các hóa chất được sử dụng cho nghiên cứu có mức độ tinh khiết dùng cho phân tích.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quá trình thủy phân sụn khớp chân gà

Sụn khớp chân gà (5 g) được trộn đều với xúc tác enzyme Protamex và 50 mL nước cất trong bình phản ứng Erlenmeyer kín. Nhiệt độ của phản ứng thủy phân được kiểm soát bằng tủ sấy Keton (Trung Quốc). Enzyme Protamex bị vô hoạt bằng cách đun cách thủy ở nhiệt độ 90°C trong 10 phút sau khi kết thúc phản ứng thủy phân. Lọc hút chân không Buchner với giấy lọc Whatman. No.1 được sử dụng để tách chất rắn không hòa tan và dịch lỏng. Lượng chất rắn còn lại trên giấy lọc được sấy khô đến khối lượng không đổi ở 100°C dùng để xác định hiệu suất thủy phân. Dịch lỏng qua giấy lọc được bảo quản ở 4°C dùng cho các phân tích tiếp theo.

2.3.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex nhằm thu dịch axit amin

Các yếu tố có ảnh hưởng lớn đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex được lựa chọn để khảo sát dựa trên nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự (Bui & ctv., 2018; 2019): nhiệt độ phản ứng ($^{\circ}\text{C}$), pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme (%), so với cơ chất), thời gian phản ứng (phút) và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng (v/v). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng ($^{\circ}\text{C}$): Nhiệt độ phản ứng được lựa chọn để khảo sát từ 30 - 80°C (khoảng cách giữa hai điểm khảo sát là 10°C); pH môi trường phản ứng là pH tự nhiên của hỗn hợp sụn khớp chân gà và nước cất; tỉ lệ enzyme: 0,32%; thời gian phản ứng: 20 phút; tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: 1/10 (v/v).

Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng: Khoảng pH môi trường phản ứng được lựa chọn để khảo sát từ 3 - 8 (khoảng cách giữa hai điểm khảo sát là 1). Nhiệt độ phản ứng thích hợp được lựa chọn từ khảo sát trên, tỉ lệ enzyme: 0,32%; thời gian phản ứng: 20 phút; tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: 1/10 (v/v).

Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme: Nhiệt độ phản ứng và pH môi trường phản ứng thích hợp từ các khảo sát trên được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà. Tỉ lệ enzyme từ 0,02 - 0,82% (chênh lệch tỉ lệ enzyme giữa hai thí nghiệm: 0,1%); thời gian

phản ứng: 20 phút; tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: 1/10 (v/v).

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng: Thời gian phản ứng: 10 – 80 phút được lựa chọn để khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng (khoảng cách giữa hai khảo sát là 10 phút). Nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme thích hợp được lựa chọn từ các khảo sát trên, tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: 1/10 (v/v).

Ảnh hưởng tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng: Nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme, thời gian phản ứng thích hợp ở các khảo sát trên được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng (v/v). Tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng được lựa chọn để khảo sát từ 1/6 (v/v) đến 1/30 (v/v) (chênh lệch thể tích môi trường phản ứng giữa hai khảo sát là 10 mL).

2.3.3. Các phương pháp phân tích

Phân tích thành phần hóa học: Thành phần hóa học của sụn khớp chân gà (độ ẩm, lipid, protein và tro) được phân tích theo phương pháp chuẩn của cộng đồng phân tích (AOAC) (Horwitz, 2010).

Xác định hiệu suất thủy phân (Nguyễn & ctv., 2011; Bui & ctv., 2017; Bui & ctv., 2019): Hiệu suất thủy phân được xác định theo công thức $H_h = \left(\frac{M_i - M_r}{M_i} \right) \times 100\%$. Trong đó, M_i là lượng chất khô có trong sụn khớp chân gà (g), M_r là lượng chất rắn còn lại sau phản ứng thủy phân (g) và H_h là hiệu suất thủy phân (%).

Xác định hiệu suất thu nhận nitơ axit amin: Nitơ axit amin của sản phẩm thô được xác định bằng phương pháp đồng được xây dựng bởi Pope và Stevens (Pope & Stevens, 1939). Hiệu suất thu nhận nitơ axit amin được tính theo công thức $H_{N-aa} = \frac{M_{N-aa}}{M_{pm}} \times 100\%$. Trong đó, M_{N-aa} là lượng nitơ axit amin có trong sản phẩm thô thu được sau phản ứng thủy phân (g), M_{pm} là lượng nitơ protein có trong sụn khớp chân gà (g) và H_{N-aa} là hiệu suất thu nhận nitơ axit amin (%).

Phương pháp xử lý số liệu: Phần mềm Minitab (Version 18, Minitab Inc, Pennsylvania State, USA) được sử dụng để phân tích phương sai ANOVA One-Way với mức độ tin cậy 95% cho sự khác biệt có ý nghĩa nhằm lựa chọn điều kiện tốt nhất cho từng yếu tố ảnh hưởng.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Thành phần hóa học của sụn khớp chân gà

Trong thành phần hóa học của sụn khớp chân gà, độ ẩm chiếm phần trăm khá lớn ($62,12 \pm 1,39\%$) và chất khô chiếm khoảng 1/3 khối lượng. Thành phần hóa học của sụn khớp chân gà được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần hóa học của sụn khớp chân gà

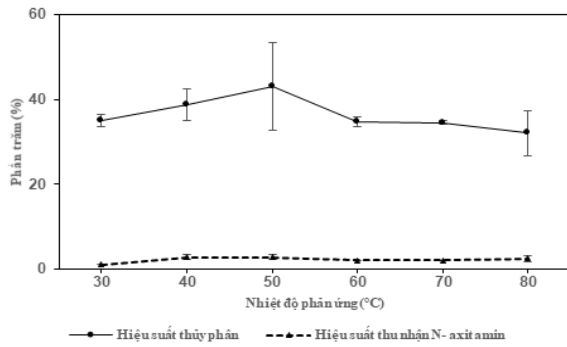
Thành phần	Phần trăm (%)
Độ ẩm	$62,12 \pm 1,39$
Lipid	$19,72 \pm 0,05$
Protein	$13,34 \pm 0,08$
Tro	$0,81 \pm 0,01$
Thành phần khác	$4,01 \pm 1,50$

Trong chất khô của sụn khớp chân gà, lipid chiếm phần trăm cao nhất ($19,72 \pm 0,05\%$); tiếp theo là protein với $13,34 \pm 0,08\%$ và tro và các thành phần khác chiếm tỉ lệ thấp. Kết quả phân tích thành phần hóa học của sụn khớp chân gà trong nghiên cứu này có sự khác biệt so với nghiên cứu của Seyer và cộng sự (Seyer & ctv., 1974). Ở nghiên cứu của Seyer và các cộng sự, độ ẩm chiếm rất cao ($82,85 \pm 1,42\%$), lipid chiếm tỉ lệ rất thấp ($0,29 \pm 0,72\%$), protein chiếm khá lớn ($11,78 \pm 0,28\%$) trong tổng khối lượng chất khô. Sự khác nhau về nguồn gốc nguyên liệu và phương pháp phân tích dẫn đến sự khác nhau về thành phần hóa học của sụn khớp chân gà trong nghiên cứu này so với nghiên cứu của Seyer và cộng sự. Sụn khớp chân gà trong nghiên cứu này có hàm lượng protein tương đối cao, là nguyên liệu thích hợp để thủy phân thu nhận axit amin.

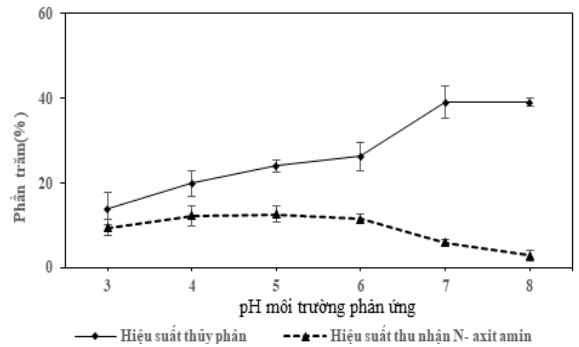
3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Nhiệt độ phản ứng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ phản ứng thủy phân với xúc tác enzyme. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến H_h và H_{N-aa} amin được trình bày ở Hình 1.

Nhiệt độ phản ứng trong khoảng khảo sát ($30 - 80^\circ\text{C}$) có ảnh hưởng đáng kể đến H_h tuy nhiên không ảnh hưởng lớn đến H_{N-aa} . H_h tăng trong khoảng nhiệt độ phản ứng từ 30°C đến 50°C và đạt giá trị cực đại ($43,06 \pm 10,46\%$) ở nhiệt độ 50°C , tuy nhiên, nếu tăng nhiệt độ phản ứng H_h



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến H_h và H_{N-aa} .



Hình 2. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng đến H_h và H_{N-aa} .

giảm do protein bị biến tính đồng tụ làm cho khối lượng chất rắn còn lại sau quá trình thủy phân tăng. H_{N-aa} có cùng xu hướng với hiệu suất thủy phân dưới ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng. Enzyme Protamex có nhiệt độ tối thích 35 - 60°C (Liaset & ctv., 2003) do đó nhiệt độ phản ứng thấp hơn 35°C hoặc cao hơn 60°C sẽ làm cho H_h và H_{N-aa} giảm.

Phân tích sự khác biệt có ý nghĩa đối với H_{N-aa} với sự ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng cho thấy ở nhiệt độ phản ứng 40°C có H_{N-aa} cao nhất ($2,80 \pm 0,60\%$) và có sự khác biệt hoàn toàn so với H_{N-aa} ở các nhiệt độ phản ứng khác. Vì vậy, nhiệt độ phản ứng 40°C được lựa chọn là nhiệt độ tốt nhất cho các khảo sát tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng

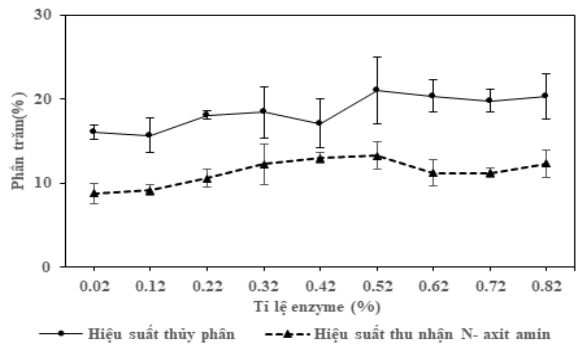
Hoạt độ của enzyme sẽ thay đổi cùng với sự thay đổi pH của môi trường do đó pH môi trường phản ứng có ảnh hưởng đáng kể đến H_h , H_h tăng khi pH môi trường phản ứng tăng trong khoảng khảo sát 3 - 8. Ảnh hưởng của pH môi trường phản ứng đến H_h và H_{N-aa} được trình bày ở Hình 2.

H_h tăng đều trong khoảng pH môi trường phản ứng từ 3 đến 6, tăng mạnh trong khoảng pH môi trường phản ứng từ 6 đến 7 và đạt giá trị lớn nhất ($39,10 \pm 0,97\%$) tại pH 8. H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất tại pH 4 với giá trị $19,84 \pm 3,07\%$ và giảm nếu tiếp tục tăng pH của môi trường phản ứng. Điều này được giải thích do enzyme Protamex có pH tối thích đối với cơ chất sụn khớp chân gà là 4. H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất ở pH 4 với giá trị $12,23 \pm 2,43\%$ và có sự khác biệt hoàn toàn so với H_{N-aa} ở các pH môi trường phản ứng khác sau khi phân tích sự khác biệt có ý nghĩa. Giá trị

pH 4 được chọn cho khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme.

3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme

Trong điều kiện nồng độ cơ chất thích hợp thì vận tốc phản ứng thủy phân tỉ lệ thuận với nồng độ enzyme. Hình 3 trình bày ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme đối với H_h và H_{N-aa} .



Hình 3. Ảnh hưởng của tỉ lệ enzyme (%) đối với H_h và H_{N-aa} .

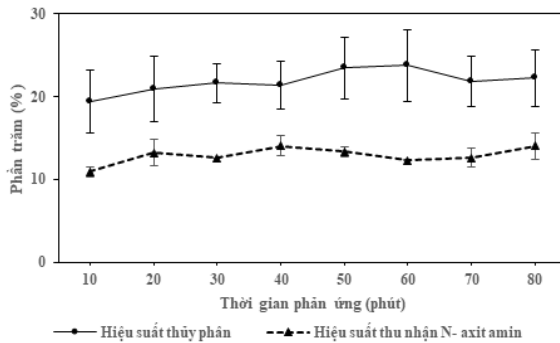
Khi thủy phân sụn khớp chân gà với tỉ lệ enzyme Protamex từ 0,02 đến 0,82% thì H_h và H_{N-aa} . Giá trị của H_h tăng từ $15,68 \pm 2,10\%$ tại tỉ lệ enzyme 0,12% đến $20,95 \pm 3,99\%$ tại tỉ lệ enzyme 0,52%. Khi tỉ lệ enzyme lớn hơn 0,52% thì cả H_h và H_{N-aa} không còn thay đổi đáng kể.

H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất ($13,23 \pm 1,63\%$) ở tỉ lệ enzyme 0,52% và có sự khác biệt hoàn toàn so với các tỉ lệ enzyme khác, dựa trên kết quả phân tích sự khác biệt có ý nghĩa. Điều này được giải thích là tỉ lệ enzyme 0,52% là tỉ lệ enzyme tối thích ở các điều kiện khảo sát đã xác định để thủy phân sụn khớp chân gà. Do đó, giá trị 0,52%

được chọn là tỉ lệ enzyme Protamex tốt nhất đối với phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà.

3.5. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Trong sản xuất công nghiệp việc xác định được thời gian phản ứng hợp lý có ý nghĩa quan trọng về mặt kỹ thuật lẫn tính kinh tế. Thời gian phản ứng không có ảnh hưởng lớn đến phản ứng thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme Protamex. Sự thay đổi của H_h và H_{N-aa} khi tăng thời gian phản ứng được trình bày ở Hình 4.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đối với H_h và H_{N-aa} .

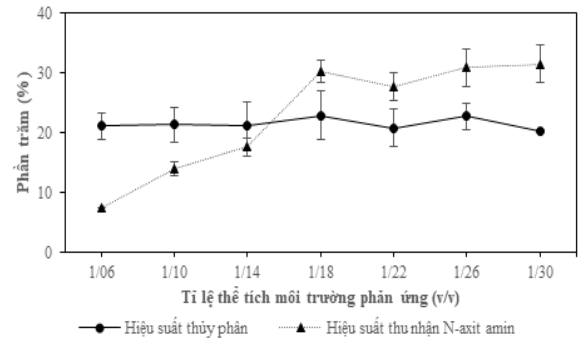
H_h đạt giá trị lớn nhất ($23,80 \pm 4,34\%$) tại thời gian phản ứng là 60 phút và H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất ($14,04 \pm 1,24\%$) ở thời gian 40 phút và không có sự thay đổi đáng kể khi tăng thời gian phản ứng. Có thể khi thời gian phản ứng tăng đến 60 phút, phản ứng thủy phân đã đạt được trạng thái cân bằng. Do đó, khi thời gian phản ứng lớn hơn 60 phút, H_h và H_{N-aa} không tăng. Bùi Viết Cường và cộng sự (Bui & ctv., 2020) xác định H_h và H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất $49,89\%$ và $67,62 \pm 1,30\%$ với nhiệt độ phản ứng 60°C ; tỉ lệ enzyme 3% và thời gian phản ứng 60 phút khi tiến hành thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme papain nhằm thu axit amin. Sự khác nhau về H_h và H_{N-aa} trong nghiên cứu này so với nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự là do sự khác nhau về nguyên liệu, xúc tác enzyme, phương pháp xác định nitơ axit amin và các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân được lựa chọn để tiến hành khảo sát.

Kết quả phân tích sự khác biệt có ý nghĩa ảnh hưởng của thời gian phản ứng đối với H_{N-aa} cho thấy H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất tại thời gian phản ứng 40 phút với giá trị $14,04 \pm 1,24\%$ và có sự khác biệt hoàn toàn với H_{N-aa} ở các thời gian

phản ứng khác. Thời gian 40 phút được chọn cho khảo sát tiếp theo.

3.6. Ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng

Nhìn chung, tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng có ảnh hưởng lớn đến phản ứng thủy phân. H_h và H_{N-aa} tăng đáng kể khi tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng tăng. Ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng đối với H_h và H_{N-aa} được trình bày ở Hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng đối với H_h và H_{N-aa} .

H_h và H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất lần lượt là $22,76 \pm 2,26\%$ và $31,56 \pm 0,09\%$ tại tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng lần lượt là 1/18 (v/v) và 1/26 (v/v). H_h có sự thay đổi không đáng kể đối với ảnh hưởng của tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng, H_{N-aa} tăng từ $7,58 \pm 0,001\%$ đến $30,25 \pm 1,86\%$ tương ứng với tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng tăng từ 1/6 (v/v) đến 1/8 (v/v). Khi tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng lớn hơn 1/18 (v/v) thì H_{N-aa} không có sự thay đổi đáng kể có thể là do phản ứng thủy phân đã đạt trạng thái cân bằng. Bùi Viết Cường và cộng sự (Bui & ctv., 2019) xác định H_h và H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất $25,97 \pm 0,71\%$ và $40,9 \pm 0,89\%$ với nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme và thời gian phản ứng thích hợp lần lượt là 50°C ; 5; 0,72%; 20 phút khi thủy phân sụn khớp chân gà với xúc tác enzyme flavourzyme nhằm thu axit amin. Sự khác nhau về H_h và H_{N-aa} cùng với điều kiện tốt nhất cho phản ứng thủy phân trong nghiên cứu này so với nghiên cứu của Bùi Viết Cường và cộng sự là do sự khác nhau về xúc tác enzyme được sử dụng và các yếu tố ảnh hưởng được lựa chọn để tiến hành khảo sát.

Phân tích sự khác biệt ý nghĩa cho thấy H_{N-aa}

tại tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng 1/18 (v/v) có sự khác biệt hoàn toàn so với các tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng khác và đạt giá trị lớn nhất ($30,25 \pm 1,86\%$). Do đó, 1/18 (v/v) được lựa chọn là tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng tốt nhất.

4. Kết Luận

Trong nghiên cứu này, thành phần hóa học của sụn khớp chân gà được phân tích dựa trên phương pháp chuẩn của cộng đồng quốc tế (AOAC). Protein chiếm phần trăm khá cao trong chất khô của sụn khớp chân gà ($13,34 \pm 0,08\%$), do đó sụn khớp chân gà là nguyên liệu thích hợp để thủy phân thu nhận axit amin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, H_h và H_{N-aa} đạt giá trị lớn nhất lần lượt $22,93 \pm 4,01\%$ và $30,254 \pm 1,86\%$ khi nhiệt độ phản ứng, pH môi trường phản ứng, tỉ lệ enzyme, thời gian phản ứng, và tỉ lệ thể tích môi trường phản ứng lần lượt là 40°C ; 4; 0,52%; 40 phút và 1/18 (v/v). Các đặc tính sinh học của dịch axit amin (kháng oxy hóa, kháng khuẩn,...), thành phần của dịch axit amin, khối lượng phân tử của các peptides sẽ là đối tượng nghiên cứu tiếp theo nhằm định hướng sản xuất thực phẩm cho con người và động vật.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Araújo, Í. B. D. S., Bezerra, T. K. A., Nascimento, E. S. D., Gadelha, C. A. D. A., anti-Gadelha, T., & Madruga, M. S. (2018). Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Science and Technology* 38, 167-173.
- Bui, C. V., Nguyen, M. N. T., Bui, D. X., & Tran, T. V. T. (2018). Screening for optimal parameters of hydrolysis reaction of red meat of *Sadar Orientalis* with NaOH as a catalyst to obtain protein hydrolysis solution. *Journal of Fisheries Science and Technology* 2, 16-23.
- Bui, C. V., Bui, X. D., & Dang, M. N. (2020). Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using enzyme papain. *Vietnam Trade and Industry Review* 41, 29-32.
- Bui, C. V., Nguyen, M. N. T., Nguyen, Q. V., Bui, D. X., & Pham, M. T. (2019). Study on hydrolysis reaction of chicken cartilage using Favalourzyme. *UED - Journal of Social Sciences, Humanities Education* 9(4), 1-6.
- Bui, D. X., Bui, C. V., Ngo, N. B. T., Pham, T. V., & Pham, M. T. (2017). Research on the suitable parameters for hydrolysis reaction of red meat of striped tuna (*Sarda orientalis*) by using commercial protamex. *Vietnam Journal of Science and Technology* 55(5A), 108-115.
- Horwitz, W. (2010). *Official methods of analysis of AOAC International. Agricultural chemicals, contaminants, drugs* (Volume I). Maryland, USA: AOAC International.
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology* 49(3), 278-293.
- Liaset, B., Julshamn, K., & Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymatic hydrolysis of salmon frames with ProtamexTM. *Process Biochemistry* 38(12), 1747-1759.
- Luo, X. M., Fosmire, G. J., & Leach Jr, R. M. (2002). Chicken keel cartilage as a source of chondroitin sulfate. *Poultry Science* 81(7), 1086-1089.
- Mangino, E. (2019). *AS/Canada projects slightly slower growth in Canadian chicken meat production for 2020. GAIN Report Number: CA19029*. Retrieved April 1, 2020, from https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Poultry%20and%20Poultry%20Annual_Ottawa_Canada_8-29-2019.pdf.
- Meeker, D. L. (2006). *Essential Rendering - All about the animal by-products industry*. Virginia, USA: National Renderers Association.
- Nakano, T., & Sim, J. S. (1995). A study of the chemical composition of the proximal tibial articular cartilage and growth plate of broiler chickens. *Poultry Science* 74(3), 538-550.
- 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.
- Pope, C. G., & Stevens, M. Fr. (1939). The determination of amino-nitrogen using a copper method. *Biochemical Journal* 33(7), 1070-1077.
- Seyer, J. M., Brickley, D. M., & Glimcher, M. J. (1974). The identification of two types of collagen in the articular cartilage of postnatal chickens. *Calcified Tissue Research* 17(1), 43-55.
- Thureen, P. J. (2012). *Neonatal nutrition and metabolism*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., & Kongruang, S. (2016). Fish protein hydrolysate production by acid and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Applied Science and Technology* 9(4), 261-270.

Microencapsulation of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil in Ca-Alginate bead produced through Jetcutter

Vinh Truong*, Phuong N. M. Ta, & Phuong T. Nguyen

Department of Chemical Engineering and Processing, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 07, 2020

Revised: July 22, 2020

Accepted: August 14, 2020

Keywords

Alginate

Gac fruit oil

Jetcutter

Microencapsulation

Momordica cochinchinensis Spreng.

*Corresponding author

Truong Vinh

Email: tv@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil was microencapsulated in Ca-Alginate bead by Jetcutter equipment. Experiments showed that the effects of emulsion preparation and equipment parameters were significant on particle size, microencapsulation yield, loading capacity and solids recovery efficiency of the device. At alginate concentration of 2.5%, the bead had a spherical size of 1.07 - 1.18 mm when the fluid flow was 14 mL/min and the rotation of the cutting disc was 400 - 800 rpm. Samples stored for 2 h after homogenization showed better microencapsulation yield (83 - 84%) and bead size (1.07 mm) than those stored for 24 h after homogenization (79% and 1.18 mm). When the loading capacity increased from 20% to 40%, the mole ratio (CaCl₂-alginate) in the bead was reduced from 1.55 to 0.86. This mole ratio data can be considered to control and adjust CaCl₂ concentration during the continuous operation of the Jetcutter.

Cited as: Truong, V., Ta, P. N. M., & Nguyen, P. T. (2020). Microencapsulation of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) fruit oil in Ca-Alginate bead produced through Jetcutter. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 80-89.

Vi bọc dầu gấc (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) trong hạt Ca-Alginate sản xuất từ thiết bị tia cắt

Trương Vĩnh*, Tạ Ngọc Minh Phương & Nguyễn Thanh Phương

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: 07/06/2020

Ngày chỉnh sửa: 22/07/2020

Ngày chấp nhận: 14/08/2020

Từ khóa

Alginate

Dầu Gấc

Momordica cochinchinensis Spreng.

Thiết bị tia cắt

Vi bọc

*Tác giả liên hệ

Trương Vĩnh

Email: tv@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Dầu gấc (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) được vi bọc trong hạt Ca-Alginate bằng thiết bị tia cắt. Các thí nghiệm cho thấy cách chuẩn bị như tương và các thông số thiết bị ảnh hưởng có ý nghĩa đến kích thước hạt, hiệu suất vi bọc, năng suất tải và hiệu suất thu hồi của thiết bị. Ở nồng độ 2.5% alginate, hạt có dạng cầu với kích thước 1,07 - 1,18 mm khi lưu lượng dịch 14 mL/p và tốc độ đĩa cắt 400 - 800 v/p. Mẫu trữ 2 giờ sau đồng hóa cho hiệu suất vi bọc (83 - 84%) và kích thước hạt (1,07 mm) tốt hơn mẫu trữ 24 giờ sau đồng hóa (79% và 1,18 mm). Khi tăng năng suất tải 20 - 40%, tỉ lệ mole (CaCl₂-alginate) trong hạt vi bọc giảm từ 1,55 xuống 0,86. Số liệu tỉ lệ mole này có thể tham khảo để kiểm soát và điều chỉnh nồng độ CaCl₂ trong quá trình hoạt động liên tục của thiết bị tia cắt.

1. Đặt Vấn Đề

Công nghệ vi bọc hoạt chất được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực dược phẩm để kiểm soát tốc độ phóng thích thuốc, làm giàu dưỡng chất cho thực phẩm, để tránh oxy hóa hoạt chất trong mỹ phẩm. Vi bọc theo phương pháp ion-gel (ionotropic gelation) được thực hiện bằng cách hòa tan hay khuếch tán hoạt chất trong polymer điện tích âm và nhỏ giọt vào bể chứa ion dương của kim loại kiềm để tạo hạt có liên kết ion. Vì hạt Alginate-Ca²⁺ có bề mặt nhẵn, độ đồng đều cao (Fundeanu & ctv., 1999) nên alginate là polymer được ứng dụng rộng rãi.

Nguyên lý tạo hạt kiểu nhỏ giọt (dropping methods) có thể được thực hiện bằng tạo từng giọt dùng vòi tiêm, tĩnh điện (electrostatic), rung dao động (vibrational jet-breakup) và thiết bị tia cắt (jet-cutter). Phương pháp nhỏ giọt dùng vòi tiêm cho kích thước hạt 1,5 mm (Truong & ctv., 2020) hoặc 2 - 3 mm (Chan & ctv., 2009) tùy

theo cấu trúc của alginate, ít dùng trong công nghiệp do năng suất thấp và chỉ áp dụng cho dịch có độ nhớt dưới 200 mPas (Prüße & ctv., 2002). Phương pháp tĩnh điện cho hạt kích thước 0,3 - 5 mm và cũng có khuyết điểm như kiểu vòi tiêm (Prüße & ctv., 2002; Martins & ctv., 2010). Rung dao động là phương pháp tĩnh vi nhất của nguyên lý nhỏ giọt (Prüße & ctv., 2002) nhưng khó sử dụng cho dịch nhớt trên 200 mPas vì hạt có hình thái xấu (Prüße & ctv., 2008) và thiết bị phức tạp, giá thành cao.

Kích thước hạt lớn và năng suất thấp là những hạn chế của phương pháp nhỏ giọt (Xiao & ctv., 2013). Để giải quyết hạn chế này, thiết bị tia cắt đã được Prüße & ctv. (2000) phát triển, cho kích thước hạt từ 0,15 - 3 mm, tỉ lệ tốc độ bơm/tốc độ cắt và góc nghiêng vòi phun ảnh hưởng đến chất lượng và thu hồi hạt. So với các loại tạo giọt khác, năng suất kiểu tia cắt gấp 12 lần kiểu đĩa quay và 8 lần kiểu rung. Paulo & ctv. (2017) so sánh thiết bị nhỏ giọt và tia cắt cho thấy muốn

hạt nhỏ thì phải dùng loại tia cắt, khi tăng từ 200 đến 900 v/p kích thước hạt giảm từ 5,2 mm đến 1,1 mm.

Tuy nhiên, các nghiên cứu của Prüße & ctv. (2000, 2008) và Paulo & ctv. (2017) chủ yếu khảo sát ảnh hưởng của thông số thiết bị đến kích thước, hình dáng hạt và hiệu suất thu hồi. Chưa thấy báo cáo về ảnh hưởng của quá trình chuẩn bị nhũ tương cùng với các thông số của thiết bị lên chất lượng vi bọc và hiệu suất thu hồi. Do vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của phương pháp xử lý trước khi tạo hạt như thời gian làm lạnh mẫu sau đồng hóa, tỉ lệ của hoạt chất trong dịch, phương pháp đồng hóa và tốc độ quay của đĩa cắt lên chất lượng vi bọc và hiệu suất thu hồi của thiết bị tia cắt, với dầu gấc là hoạt chất vi bọc.

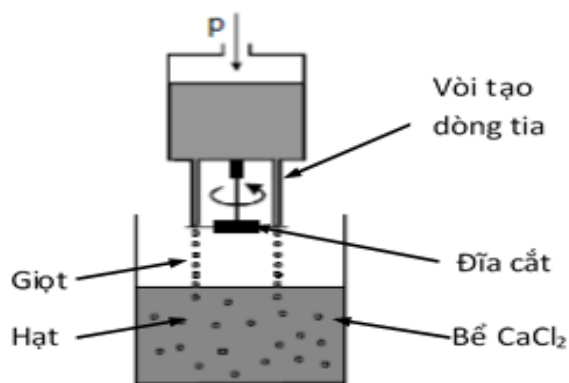
2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu

Dầu gấc của công ty Gacviet Fruit, Việt nam. Sodium Alginate, Sodium citrate, CaCl_2 và hexan của Trung Quốc, trong đó Sodium Alginate (Yantai Zhouji) có 2,4% protein và ít tạp chất đã được kiểm tra trong nghiên cứu trước (Truong & ctv., 2020).

2.2. Thiết bị

Thiết bị tia cắt bao gồm bơm dịch Alginate từ thùng chứa qua vòi (một hoặc nhiều vòi) tạo dòng tia chảy xuống (Hình 1). Một đĩa cắt gồm roto và các dây cắt quay quanh trục để cắt dòng tia thành những giọt nhỏ rơi xuống bể chứa CaCl_2 . Phản ứng giữa Alginate và CaCl_2 sẽ tạo hạt vi bọc.



Hình 1. Thiết bị tia cắt.

2.3. Phương pháp thí nghiệm

2.3.1. Tạo nhũ tương

Áp dụng phương pháp Soliman & ctv. (2013) có cải biến. Pha 100 mL Alginate nồng độ 2.5% trong nước cất và trữ 24 giờ ở 17°C. Cho dầu Gấc từ từ vào bình alginate (có hòa tan Tween 80 theo 1% dầu Gấc), khuấy từ 300 v/p. Lượng dầu cho vào (m_0) được thay đổi theo nồng độ tỉ lệ với lượng alginate mA để có năng suất tải pha chế NST₀ cho trước theo (1):

$$\text{NST}_0\% = m_0 / (m_0 + mA) * 100 \quad (1)$$

Hệ nhũ tương được đồng hóa 13500 v/p bằng máy khuấy cơ học 3 phút hoặc siêu âm 5 phút ở công suất 45W. Mẫu sau đồng hóa được trữ lạnh qua đêm (17°C) gọi là mẫu lạnh; không để qua đêm gọi là mẫu không lạnh, trước khi vi bọc sẽ đưa nhiệt độ mẫu về 26°C.

2.3.2. Tạo hạt vi bọc

Bơm nhũ tương Alginate-dầu Gấc qua kim tiêm bằng thiết bị tia cắt với lưu lượng 14 mL/p tạo ra dòng tia và được đĩa cắt thành các giọt rơi vào bình chứa CaCl_2 0,5% (15 mM). Khuấy từ dịch CaCl_2 liên tục, thời gian phản ứng 25 phút. Cho hạt ra vớt để trên giấy thấm 10 phút để xác định kích thước, hiệu suất vi bọc, năng suất tải thực tế (NST), hiệu suất thu hồi chất rắn, năng suất tải riêng LCR. Mẫu đối chứng thực hiện tương tự nhưng không có đĩa cắt.

2.3.3. Đo kích thước hạt vi bọc

Đo kích thước hạt bằng phương pháp hình ảnh và xử lý bằng phần mềm ImageJ-1.52r. Đường kính tương đương từng hạt di được xác định bằng phần mềm và đường kính trung bình Sauter $d_{3,2}$ từ 30 hạt được tính theo công thức (2) (Mohsenin, 1970)

$$d_{3,2} = \frac{d_1^3 + d_2^3 + \dots + d_n^3}{d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2} \quad (2)$$

2.3.4. Phân tích dầu Gấc bằng quang phổ

Pha dầu Gấc trong hexan theo các nồng độ khác nhau. Để tìm bước sóng cho độ hấp thụ cực đại, mẫu pha 0,02 mL dầu/10 mL hexan được quét ở bước 340 - 600 nm. Thiết bị sử dụng là máy quang phổ Hewlett Packard UV-Vis. Dụng

đường chuẩn hấp thu dầu Gấc ở bước sóng hấp thu cực đại.

2.3.5. Xác định hiệu suất vi bọc MEY

Cân 1 gram hạt tươi (khoảng 0,5 g), cho vào 5 mL dịch citrate 0,055 M, vortex đến tan, cho 5 mL hexan vào và vortex trong 3 phút. Ly tâm 6000 v/p trong 10 phút tách lớp, lấy hexan ở trên đo quang phổ, tính được lượng dầu vi bọc m_0 dựa vào đường chuẩn. Hiệu suất vi bọc tính theo công thức sau, với m_1 là lượng dầu ban đầu trong nhũ tương Alginate-CaCl₂.

$$MEY(\%) = m_0/m_1 \times 100 \quad (3)$$

2.3.6. Hiệu suất thu hồi chất rắn YR

$$Y_R(\%) = \frac{\text{khối lượng hạt thu được} \times 100}{\text{khối lượng nguyên liệu ban đầu}} \quad (4)$$

2.3.7. Năng suất tải thực tế NST

Năng suất tải thực tế NST là tỉ số giữa lượng dầu vi bọc và khối lượng chất khô của hạt, tính theo công thức (5), W là ẩm độ hạt (căn bản ướt).

$$NST = m_0 / (1 - W) m_1 \quad (5)$$

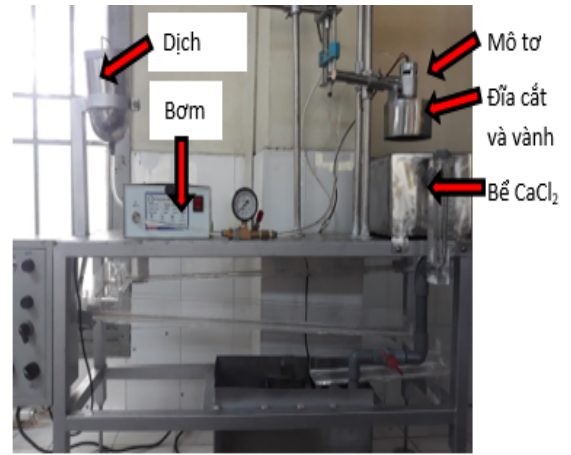
2.3.8. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm bố trí theo Bảng 1. Trong đó, LCR là tỉ số giữa NST và năng suất tải pha chế NST₀. Ký hiệu L là “mẫu lạnh”, KL là mẫu “không lạnh”, C là “đồng hóa cơ học” và SA là đồng hóa siêu âm. Ví dụ, mẫu 30LC400 có NST₀ = 30%, mẫu lạnh (L), đồng hóa cơ (C), số vòng quay đĩa 400 v/p. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion v15.1 và Excel.

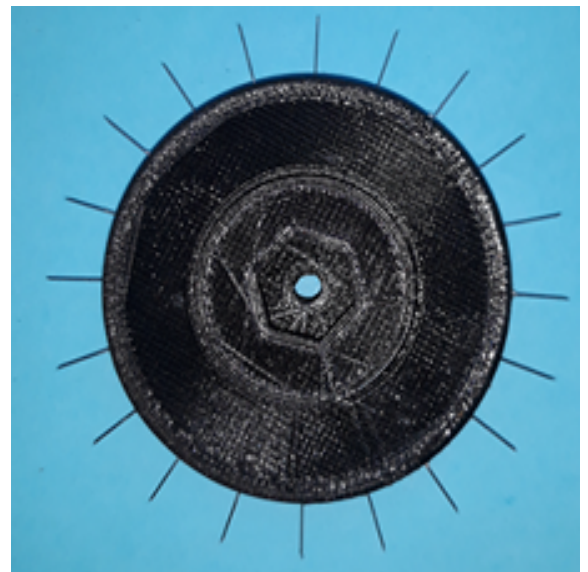
3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Chế tạo thiết bị

Thiết bị tia cắt được thiết kế, chế tạo sử dụng trong nghiên cứu là một phần đề tài cấp Bộ B2018-NLS13 cho trên Hình 2 và 3 (Truong, 2020). Số vòng quay đĩa cắt có thể điều chỉnh vô cấp tối đa 10000 v/p. Bơm dịch có áp suất tối đa 3 kgf/cm², lưu lượng điều chỉnh vô cấp. Trong nghiên cứu này dùng kim phun đường kính 0,26 mm.



Hình 2. Thiết bị tia cắt (đề tài cấp Bộ B2018 - NLS13).



Hình 3. Cấu tạo đĩa cắt, gồm roto và 24 dây cắt $d_w = 0,31$ mm.

3.2. Kết quả thí nghiệm

Chọn bước sóng và dựng đường chuẩn: độ hấp thu dầu gấc trong hexan ở các bước sóng khác nhau cho trên Hình 4. Độ hấp thu cực đại tại 447 nm, thể hiện sự hấp thu của beta-carotene ở 448 nm của nhiều tác giả (Tan & Soderstrom, 1989; Mercadante & Amaya, 1998), và ở 450 nm (Abdul-Hammed, 2013). Lycopene thể hiện peak không rõ ở bước 470 – 472 nm do hàm lượng trong mẫu ít. Trong nghiên cứu này, bước 447 nm được chọn để phân tích dầu gấc trong các mẫu hạt vi bọc.

Bảng 1. Thiết kế thí nghiệm

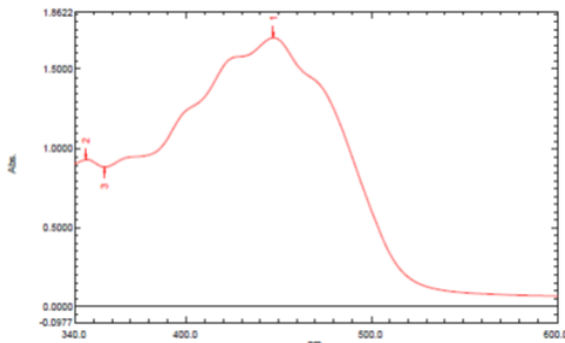
Mẫu	NST ₀ %	Xử lý	Đồng hóa	Số vòng quay đĩa (v/p)
20LC400	20,0	Lạnh	Cơ	400
30LC400	30,0	Lạnh	Cơ	400
40LC400	40,0	Lạnh	Cơ	400
30LC600	30,0	Lạnh	Cơ	600
30LC800	30,0	Lạnh	Cơ	800
30KLC400	30,0	Không lạnh	Cơ	400
30KLC600	30,0	Không lạnh	Cơ	400
30KLSA400	30,0	Không lạnh	Siêu âm	400

Bảng 2. Kết quả thí nghiệm

Mẫu	NST ₀ %	MEY,%	Y _R ,%	NST,%	LC _R
20LC400	20,0	77,3 ± 1,96 ^c	54,3 ± 0,78 ^c	10,9 ^a ± 0,25	0,55 ^a ± 0,04
30LC400	30,0	79,0 ± 0,42 ^c	56,6 ± 0,93 ^c	19,1 ^b ± 0,10	0,64 ^b ± 0,03
40LC400	40,0	79,2 ± 0,66 ^c	54,6 ± 1,71 ^c	29,9 ^c ± 0,25	0,75 ^c ± 0,04
30LC600	30,0	76,8 ± 1,63 ^b	38,2 ± 1,09 ^b	19,6 ^b ± 0,45	0,65 ^b ± 0,06
30LC800	30,0	72,5 ± 0,50 ^a	8,4 ± 0,93 ^a	18,9 ^b ± 0,65	0,63 ^b ± 0,07
30KLC400	30,0	83,6 ± 0,04 ^e	54,6 ± 0,60 ^c	21,3 ^b ± 0,23	0,71 ^b ± 0,04
30KLC600	30,0	84,5 ± 1,15 ^e	55,9 ± 1,10 ^c	20,4 ^b ± 0,31	0,68 ^b ± 0,05
30KLSA400	30,0	82,9 ± 1,33 ^d	58,0 ± 0,80 ^d	21,1 ^b ± 0,26	0,70 ^b ± 0,04

^{a-e}Các số trung bình trên một cột có chỉ số khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Số liệu thực nghiệm: Các kết quả theo thiết kế cho trên Bảng 2.



Hình 4. Phổ hấp thụ dầu gấc ở các bước sóng khác nhau. Cực đại ở peak 1 (447 nm) thể hiện sự hấp thụ của beta-carotene. Peak 2 là isomer của beta-carotene.

3.3. Thảo luận

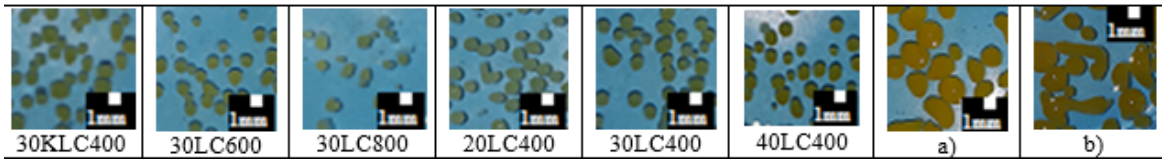
3.3.1. Ảnh hưởng phương pháp tạo hạt lên hình thái và kích thước hạt

Hình thái hạt các mẫu alginate 2,5% làm từ thiết bị đĩa cắt, có dạng cầu khá đều và giống nhau. Không có khác biệt về hình thái giữa lạnh và không lạnh, và giữa các số vòng quay từ 400

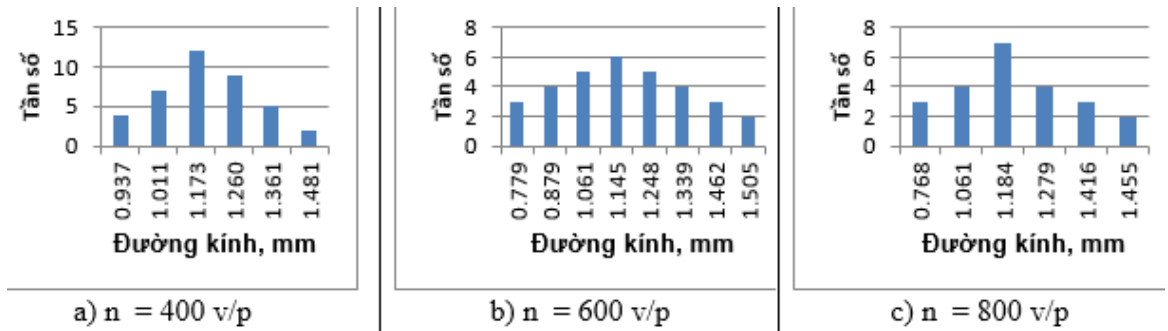
- 800 v/p (Hình 5). Phân bố kích thước hạt có dạng hình chuông ở các số vòng quay $n = 400$ v/p - 800 v/p (Hình 6).

Ở lưu lượng 14 mL/p, khi tăng n từ 400 v/p lên 800 v/p thì kích thước trung bình hạt không đổi (1,178 - 1,156 mm, $P > 0,05$, Bảng 3). Theo Paulo & ctv. (2017), số vòng quay có ảnh hưởng đến kích thước hạt, cụ thể ở $n = 300$ v/p, 600 v/p và 900 v/p thì kích thước hạt lần lượt 3,8 mm, 1,5 mm và 1,1 mm. Ở trong nghiên cứu này, tăng số vòng quay chỉ thấy rõ sự giảm độ đồng đều hạt thể hiện qua sự tăng số span. Mẫu lạnh ở 400 v/p có độ đồng đều hạt cao nhất với span là 0,343 so với 800 v/p (span = 0,556).

Ở 30% dầu Gấc, mẫu không lạnh có kích thước 1,07 mm thấp hơn so với mẫu lạnh là 1,18 mm ($P < 0,05$). Có thể giải thích là thời gian xử lý mẫu lạnh dài nên bài khí triệt để dẫn đến độ nhớt cao khó cắt đứt làm cho kích thước hạt lớn hơn mẫu không lạnh. Thiết bị tia cắt chế tạo trong đề tài này cho hạt kích thước (1,07 mm) đã giảm hơn so với nhỏ giọt là 1,5 mm (Truong & ctv., 2020) hoặc 2 mm (Chan & ctv., 2009). Khi tăng số dây cắt và số vòng quay lên, tần số cắt cao làm giảm kích thước hạt. Ví dụ từ thiết bị có $Z = 48$ dây cắt, $n = 4500$ v/p (Prüße & ctv., 2002, 2008) kích thước hạt trung bình 0,77 mm và phân bố



Hình 5. Hình thái hạt của các mẫu đồng hóa cơ học, làm từ thiết bị đĩa cắt lưu lượng 14 mL/p. Mẫu đối chứng a) và b) làm từ kiểu dòng tia không có đĩa cắt, NST₀= 30%, lưu lượng 4 mL/p và 14 mL/p, theo thứ tự.



Hình 6. Phân bố kích thước hạt mẫu lạnh, đồng hóa cơ học, năng suất tải 30%.

Bảng 3. Thiết kế thí nghiệm

Mẫu	d _p (mm)	Span	d _{pmin} (mm)	d _{pmax} (mm)
20LC400	1,180 ^a ± 0,014	0,30	0,918 ^c ± 0,011	1,33 ^a ± 0,014
30LC400	1,178 ^a ± 0,019	0,34	0,848 ^b ± 0,017	1,54 ^b ± 0,018
40LC400	1,157 ^a ± 0,020	0,44	0,605 ^a ± 0,020	1,43 ^{ab} ± 0,019
30LC600	1,160 ^a ± 0,023	0,57	0,71 ^{ab} ± 0,021	1,51 ^b ± 0,021
30LC800	1,156 ^a ± 0,024	0,56	0,69 ^{ab} ± 0,020	1,46 ^{ab} ± 0,023
30KLC400	1,082 ^b ± 0,018	0,41	0,77 ^{ab} ± 0,022	1,30 ^a ± 0,017
30KLC600	1,078 ^b ± 0,019	0,51	0,76 ^{ab} ± 0,021	1,33 ^a ± 0,018
30KLSA400	1,091 ^b ± 0,017	0,21	0,75 ^{ab} ± 0,018	1,35 ^a ± 0,016

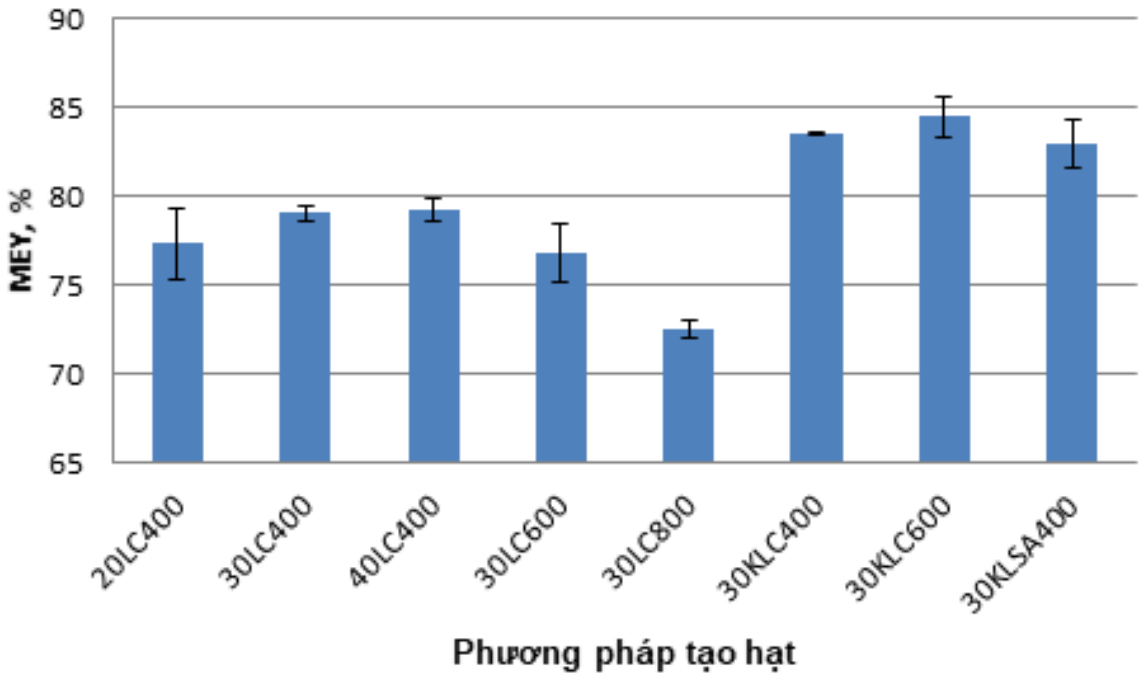
^{a-c}Giá trị trung bình có ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (*P* < 0,05).

hạt từ 0,3 mm đến 2 mm. Ở trong đề tài này, phân bố hạt làm từ thiết bị đĩa cắt là 0,71 - 1,54 mm (Bảng 3).

Năng suất tải ảnh hưởng đáng kể đến kích thước nhỏ nhất (d_{pmin}) và lớn nhất (d_{pmax}). Ở 400 v/p, khi tăng năng suất tải từ 20% lên 40% thì kích thước trung bình 1,16 - 1,18 mm nhưng kích thước d_{pmin} giảm từ 0,92 mm xuống 0,61 mm (*P* < 0,05). Với mẫu không lạnh, kích thước hạt chế độ đồng hóa cơ học (1,076 mm) và siêu âm (1,096 mm) tương đương nhau nhưng mẫu siêu âm có phân bố hạt (span = 0,207) đồng đều hơn đồng hóa cơ (span = 0,414, Bảng 3). Sự giảm kích thước trung bình của mẫu không lạnh so với mẫu lạnh (n = 400 v/p và 600 v/p) chủ yếu là

do giảm kích thước d_{pmax}. Kích thước hạt càng nhỏ thì hạt vi bọc càng dễ ứng dụng do phân phối hoạt chất đồng đều hơn (Chan, 2011; Prüße & ctv., 2000).

Phương pháp dòng tia không đĩa cắt ở lưu lượng 4 mL/p cho hạt 3 - 4 mm (Hình 4a), khi tăng lưu lượng lên 14 mL/p (Hình 4b) tạo ra những sợi dài, hình dạng không ổn định. Theo Prüße & ctv. (2008), phương pháp rung dòng tia (ví dụ thiết bị B-390 của hãng BUCHI) không thể tạo hạt trên 2% alginate. Điều này nói lên ưu điểm của phương pháp đĩa cắt so với các phương pháp khác là kích thước hạt nhỏ, năng suất cao với hình thái hạt tròn dù ở nồng độ alginate trên 2%.



Hình 7. Hiệu suất vi bọc dầu gấc của các phương pháp tạo hạt khác nhau (kết quả thống kê ở Bảng 2).

3.3.2. Ảnh hưởng phương pháp tạo hạt lên MEY > 0,05).

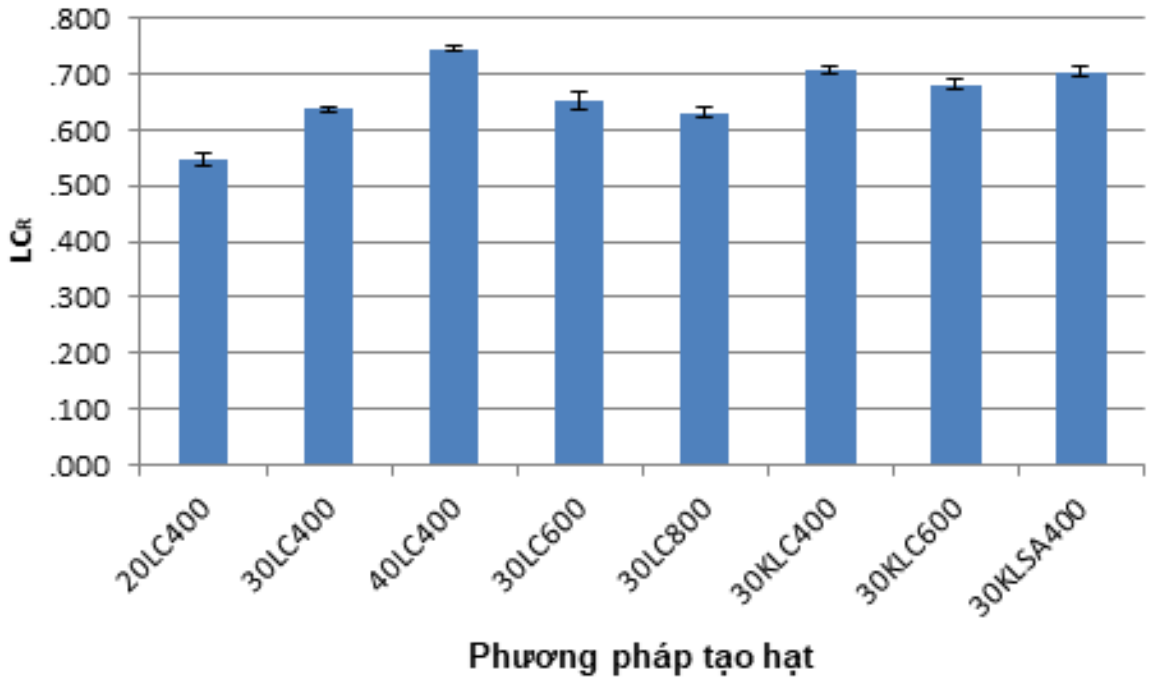
Đối với mẫu lạnh hiệu suất vi bọc MEY (77,3-79,25%) không bị ảnh hưởng khi tăng nồng độ dầu gấc từ 20% đến 40% ($P > 0,05$), nhưng bị giảm khi tăng số vòng quay ($P < 0,05$). MEY cao nhất ở 400 v/p (79%) và thấp nhất ở 800 v/p (72,5%, Bảng 2 và Hình 7). Điều này cũng tương tự thu hồi và năng suất tải ($P < 0,05$). Năng suất tải và MEY giảm khi tăng số vòng quay có lẽ do lực cắt lớn làm hao tổn dầu gấc. Ngoài ra, mẫu không lạnh ở năng suất tải 30% cho hiệu suất vi bọc (83,6 - 84,5%) cao hơn mẫu lạnh. Trong quá trình đồng hóa tạo hệ nhũ tương o/w trong đó các giọt dầu gấc được bọc trong chất hoạt động bề mặt Tween 80. Sau khi đồng hóa mẫu trữ lạnh 24 giờ có lẽ một phần dầu gấc đã thoát ra khỏi lớp bọc Tween nên khi nhỏ giọt vào bể CaCl_2 thì lượng dầu gấc này dễ thất thoát giải thích tại sao mẫu trữ lạnh qua đêm cho hiệu suất vi bọc thấp hơn mẫu không trữ lạnh. Có sự tương tác giữa phương pháp xử lý mẫu trước khi tạo hạt và số vòng quay khi xem xét đáp ứng MEY và YR. Ở nghiệm thức không lạnh-600 v/p cho MEY cao nhất (84,5%) và ở nghiệm thức lạnh-600 v/p cho YR thấp nhất (38,2%). Không có sự khác biệt giữa siêu âm và cơ học trên các chỉ tiêu MEY (P

3.3.3. Ảnh hưởng phương pháp tạo hạt lên NST và LC_R

Bảng 2 và Hình 8 cho thấy, phương pháp xử lý lạnh và không lạnh có LC_R xấp xỉ nhau, (0,64 - 0,69). Ở cùng NST_0 là 30%, khi tăng số vòng quay từ 400 v/p lên 800 v/p không ảnh hưởng đến NST ($P > 0,05$). Khi tăng năng suất tải pha chế NST_0 từ 20 - 40%, tỉ số LC_R tăng 0,55 - 0,75 ($P < 0,05$). Năng suất tải pha chế (NST_0) là tỉ số giữa dầu gấc và (Alginate+ dầu). Còn Năng suất tải thực tế (NST) là tỉ số giữa dầu gấc và (alginate + dầu + Tween + CaCl_2). Như vậy khi LC_R cao tức hàm lượng Tween và CaCl_2 trong hạt vi bọc giảm tương đối. Nghĩa là số mole Ca^{2+} tham gia liên kết với Alginate giảm. Tuy nhiên, chỉ dựa vào LC_R vẫn chưa đủ để giải thích mối liên kết Ca^{2+} và Alginate. Ta có thể tính toán tỉ lệ mol liên kết giữa Ca^{2+} và Alginate như sau:

Vì $\text{NST} = m_0 / (m_0 + m_A + m_T + m_{\text{Ca}})$, trong đó mẫu số là chất khô hạt ở công thức (4), với m_T và m_{Ca} là lượng Tween 80 và Ca^{2+} tham gia liên kết, theo thứ tự, tính được m_{Ca} theo (6)

$$m_{\text{Ca}} = m_0(1/\text{NST} - 1/\text{NST}_0) - m_T \quad (6)$$



Hình 8. Hiệu quả năng suất tải của các phương pháp tạo hạt khác nhau (kết quả thống kê ở Bảng 2).

Bảng 4. Tính toán tỉ lệ liên kết mole giữa Calcium và Alginate

Mẫu	Mol Ca	Mol Ca/Mol Alg	Mol CaCl ₂ /Mol Alg
20LC400	0,050	4,303	1,551
30LC400	0,040	3,458	1,246
40LC400	0,028	2,390	0,861
30LC600	0,036	3,147	1,134
30LC800	0,038	3,245	1,169
30KLC400	0,030	2,626	0,946
30KLC600	0,035	3,031	1,092
30KLSA400	0,031	2,699	0,972

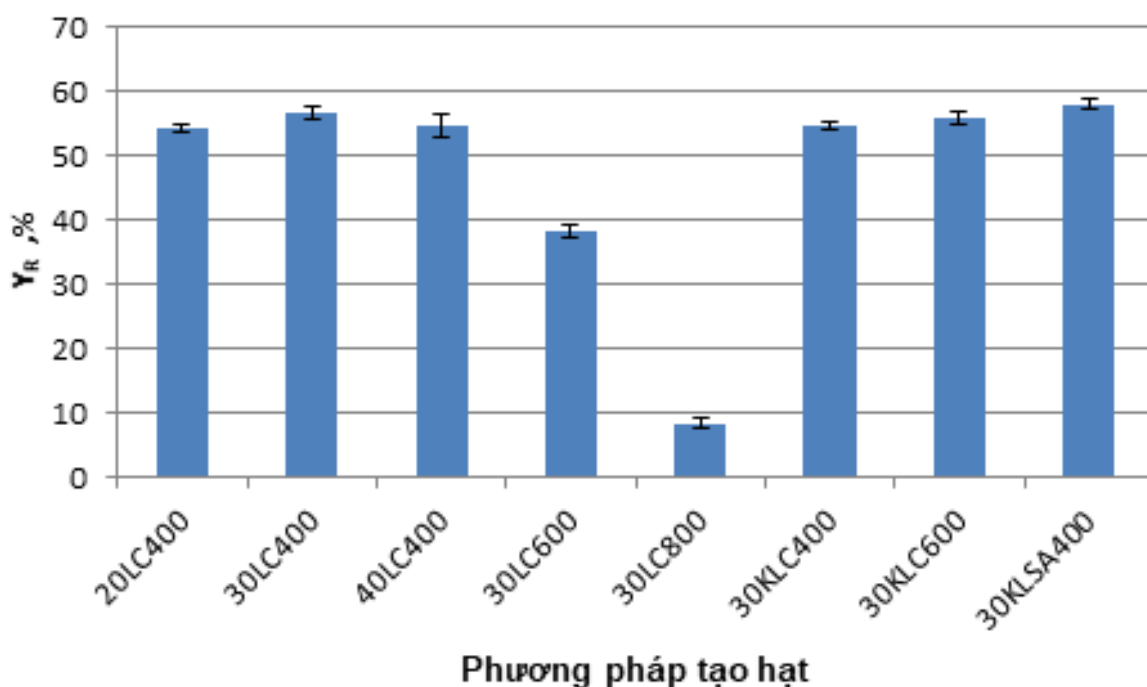
Bảng 4 cho thấy số vòng quay và phương pháp đồng hóa không ảnh hưởng đến tỉ lệ mol liên kết. Tuy nhiên, khi tăng NST₀ thì tỉ lệ mol Ca/mol Alginate giảm dần, phù hợp với sự tăng LCR cho trên Hình 8.

Trong kết luận dựa vào LCR ở trên (Hình 8) cho thấy mẫu lạnh và không lạnh có LCR không thay đổi, nhưng dựa vào số liệu tỉ lệ mol (Bảng 4), ở 400 v/p và tải 30%, tỉ lệ mol(Ca)/mol(Alginate) giảm từ 3,458 (mẫu lạnh) xuống 2,626 (mẫu không lạnh). Bảng 4 còn giúp tính toán số mol CaCl₂ tham gia liên kết, đặc biệt quan trọng với hệ thống tạo hạt liên tục, giúp kiểm soát và điều chỉnh nồng độ CaCl₂ trong bể CaCl₂ khi dòng giọt alginate liên tục chảy xuống. Đây là một

thông tin ít thấy công bố trên thế giới và trong nước.

3.3.4. Ảnh hưởng phương pháp tạo hạt lên Y_R

Ở RPM400 và NST₀ 30%, thu hồi không thay đổi giữa lạnh (56,6%) và không lạnh (54,6%, Bảng 2 và Hình 9). Phân tích ANOVA cho thấy có sự tương tác giữa phương pháp xử lý mẫu trước khi tạo hạt và RPM khi xem xét đáp ứng Y_R. Phương pháp đồng hóa mẫu không lạnh cho thấy siêu âm làm tăng Y_R (58%) so với cơ học (54,6%) ($P < 0,05$). Khi tăng nồng độ dầu gấc từ 20% đến 40%, thu hồi Y_R (54,3 - 56,6%) không bị ảnh hưởng ($P > 0,05$). Với phương pháp đồng hóa cơ học, thu



Hình 9. Tỷ lệ thu hồi chất rắn của các phương pháp tạo hạt khác nhau (kết quả thống kê ở Bảng 2).

hồi cao nhất ở RPM400 (56,6%) và thấp nhất ở RPM800 (8,4%). Tổn thất còn cao (trên 53%) do hạt bị lực cắt mạnh đẩy văng ra xa vùng hứng hạt (bể CaCl_2). Khi tăng số vòng quay, thu hồi càng thấp do lực cắt mạnh hơn. Tổn thất thấp nhất của thiết bị hiện tại là 43,4%. Tổn thất này có thể cải thiện bằng cách điều chỉnh bể hứng hạt.

4. Kết Luận

Thiết bị đĩa cắt (Jetcutter) đã hoạt động ổn định tạo được hạt vi bọc dầu gấc ở nồng độ 2,5% alginate có kích thước (1,07mm) nhỏ hơn kiểu dòng tia không đĩa cắt (dripping method, $d = 3 - 4$ mm), nhỏ hơn kiểu nhỏ giọt (dropping method, $d \geq 1,5$ mm), và có năng suất vượt trội. Các mẫu không lạnh ở nồng độ alginate 2,5% với $n = 400 - 600$ v/p có MEY cao nhất, NST cao nhất, thu hồi hạt Y_R cao nhất, kích thước hạt bé nhất, độ đồng đều kích thước cao nhất nên là mẫu tốt nhất của thiết bị khảo sát. Thiết bị tia cắt ở nồng độ alginate cao trên 2% có ưu điểm so với các dạng tạo hạt khác về năng suất và hình thái hạt. Việc tính toán xấp xỉ tỉ lệ mole của CaCl_2 và Alginate theo thông số tạo hạt định hướng cho việc điều

chỉnh nồng độ CaCl_2 trong thiết kế thiết bị vi bọc tia cắt hoạt động ở chế độ liên tục.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abdul-Hammed, M., Bello, I. D., & Oladoye, S. O. (2013). Simultaneous spectrophotometric determination of lycopene and beta-carotene concentrations in carotenoid mixtures of the extract of tomatoes, papaya and orange juice. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 56(2), 90-97.
- Chan, E. S. (2011). Preparation of Ca-Alginate beads contain-ing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbo-hydrate Polymers* 84(4), 1267-1275.
- Chan, E. S., Lee, B.-B., Ravindra, P., & Poncelet, D. (2009). Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. *Journal of Colloid and Interface Science* 338, 63-72.
- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carpov, A., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (1999). Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* 20(15), 1427-1435.
- Martins, I. M., Maria, F. B., Manuel, C., & Alírio, E. R. (2014). Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal* 245, 191-200.

- Mercadante, A. Z., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1998). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46, 128-130.
- Mohsenin, N. N. (1970). *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. London, England: Gordon and Breach Science Publishers.
- Paulo, B. B., Ramos, F. de M., & Prata, A. S. (2017). An investigation of operational parameters of jet cutting method on the size of Ca-alginate beads. *Journal of Food Process Engineering* 40(6), 1-8.
- Prüße, U., Luca, B., Marek, B., Branko, B., Jozef, B., Peter, G., Dorota, L., Verica, M., Benjamin, M., Claudio, N., Viktor, N., Poncelet, D., Swen, S., Lucien, T., Azzurra, T., Alica V., & Klaus-Dieter V. (2008). Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers* 62(4), 364-374.
- Prüße, U., Jörg, D., Jürgen, B., & Klaus-Dieter, V. (2000). Production of spherical beads by JetCutting. *Chemical Engineering Technology* 23(12), 1105-1110.
- Prüße, U., Ulrich, J., Peter, W., Jürgen, B., & Klaus-Dieter, V. (2002). Bead production with JetCutting and rotating disc/nozzle technologies. *Landbau-forschung Volkenrode Sonderheft* 241, 1-10.
- Soliman, E. A., El-Moghazy, A. Y., Mohy El -Din, M. S., & Massoud, M. A. (2013). Microencapsulation of essential oil within alginate: Formulation and *in vitro* evaluation of antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences* 3, 48-55.
- Tan, B., & Soderstrom, D. N. (1989). Qualitative aspects of UV-vis spectrophotometry of beta-carotene and lycopene. *Journal of Chemical Education* 66(3), 258.
- Truong, V., Nguyen, P. T., Ta, P. N. M., Nguyen, P. T., & Pham, N. T. C. (2020). Effects of type and concentration of alginate on microencapsulation characteristics of lime essential oil (*Citrus aurantifolia*) produced by extrusion-dripping methods. *The Journal of Agriculture and Development* 19(1), 65-76.
- Truong, V. (2020). Report of Project B2018-NLS13 funded by Ministry of Education and Training of Vietnam. Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Xiao, Z., Wanlong, L., Guangyong, Z., Rujun, Z., & Yunwei, N. (2013). A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94, 1482-1494.