

# NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH GIỐNG THỰC DƯỢC TDL - 05 BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Trịnh Khắc Quang<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào được áp dụng để nhân giống thực dược TDL-05 tại Viện Nghiên cứu Rau Quả. Đỉnh sinh trưởng và mô thân được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho nuôi cấy. Khử trùng bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở nồng độ 20% trong 5 phút cho mô đỉnh sinh trưởng hoặc 7 phút cho mô thân là thời gian khử trùng tối ưu để đạt được kết quả hài hòa giữa tỉ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh của khối mô nuôi cấy. Cả hai loại cytokinin, BAP và kinetin đều có thể sử dụng cho nhân nhanh *in vitro* giống TDL-05. Tuy nhiên, BAP biểu hiện hiệu quả cao hơn kinetin. Nền môi trường MS, BAP ở nồng độ tối ưu (0,5 mg/l) cho hệ số nhân chồi là 3,9/4 tuần, trong khi đó nồng độ tối ưu của kinetin (1 mg/l) cho hệ số nhân 3,23/4 tuần. Chồi *in vitro* có khả năng ra rễ rất tốt ở môi trường MS không cần bổ sung auxin. Ở giai đoạn vườn ươm, sử dụng giá thể đất + trấu hun tỷ lệ 1:1 vừa đảm bảo tỉ lệ sống cao vừa thuận lợi cho cây *in vitro* của giống TDL-05 sinh trưởng, phát triển.

**Từ khóa:** TDL-05, nhân nhanh, *in vitro*, môi trường, BAP, kinetin.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa thực dược (*Dahlia variabilis* Desh) có nguồn gốc từ Mehico nhập nội vào Tây Ban Nha năm 1789, phát triển ở châu Âu, qua Pháp rồi vào Việt Nam. Tên địa phương gốc là Chichipathi hay Aeocothi (Nguyễn Nghĩa Thìn, 2004). Hoa thực dược là một trong những loài hoa đẹp, có nhiều màu sắc, dễ trồng và ra hoa đúng vào dịp tết nguyên đán nên có giá trị kinh tế cao (Hai Quang sưu tầm). Hoa thực dược ngày càng được trồng rộng rãi ở Việt Nam. Tuy nhiên, việc mở rộng quy mô sản xuất cũng như việc đầu tư phát triển cây hoa thực dược thành mặt hàng có giá trị đang gặp phải khó khăn: Chất lượng các giống hoa thực dược hiện có tại Việt Nam chưa cao. Nguyên nhân chính là do nhân giống vô tính liên tục, không được phục tráng định kỳ đã làm giảm chất lượng sản phẩm (bông hoa nhỏ, cành ngắn và nhỏ,...) nên chưa đáp ứng được yêu cầu ngày càng cao về chất lượng hoa của thị trường. Các giống hoa thực dược ở nước ta được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp truyền thống là giâm cành nên hệ số nhân giống thấp. Thêm vào đó, phương pháp nhân giống này còn phụ thuộc nhiều vào điều kiện thời tiết, đặc biệt trong mùa mưa điều kiện nóng ẩm gây khó khăn cho việc nhân giống cũng như lưu giữ giống trong điều kiện đồng ruộng. Hiện tại, một số giống hoa thực dược mới nhập nội có chất lượng tốt, ví dụ như giống thực dược TDL-05; giống này mới

lạ, đẹp hơn so với các giống hiện có nhưng do mới nhập nội nên số lượng cây giống còn ít. Xuất phát từ thực tế trên, việc nghiên cứu nhân nhanh giống này để phục vụ cho khảo nghiệm sản xuất và phát triển giống vào sản xuất là việc làm cần thiết. Dưới đây là kết quả nghiên cứu nhân nhanh giống hoa thực dược TDL-05 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào do Viện Nghiên cứu Rau quả tiến hành từ tháng 11 năm 2010 đến tháng 8 năm 2011.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu

Đỉnh sinh trưởng và đoạn thân của mầm giống hoa thực dược TDL-05 được chọn làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm. Giống hoa thực dược TDL-05 do Viện Nghiên cứu Rau quả tuyển chọn từ bộ giống hoa nhập nội. Kết quả khảo nghiệm ở Hưng Yên, Thái Bình và Nam Định cho thấy: giống có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt (tỷ lệ sống > 90%, thời gian ra hoa 90 ngày), khả năng bật mầm và ra hoa cao (8-9 hoa/cây), hoa có màu sắc đỏ tươi, được thị trường ưa chuộng.

Chất khử trùng và các chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, BAP, kinetin và  $\alpha$ NAA.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy mô tế bào được thực hiện qua các bước sau: Khử trùng mẫu, nuôi cấy khởi động, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và giai đoạn vườn ươm.

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Sử dụng môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962), bổ sung đường sacaroza 3% và một số chất điều tiết sinh trưởng với nồng độ khác nhau tùy theo từng thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ trong phòng 25-27°C, độ ẩm 70%, cường độ chiếu sáng 2500-3000 lux, thời gian chiếu sáng bảo đảm đủ 16 giờ sáng/8 giờ tối; cây con sau khi có rễ hoàn chỉnh được ra ngôi, ương trong nhà lưới có mái che.

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình IRRISTAT. Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Nuôi cấy mô tế bào thực vật và Nhà lưới của Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Rau quả từ tháng 11 năm 2010 đến tháng 8 năm 2011.

### III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 1. Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu sạch ban đầu

**Bảng 1. Kết quả tác động của chất khử trùng (sau 2 tuần)**

Thời gian khử trùng	Mô đỉnh sinh trưởng			Mô thân		
	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%)
5 phút	35,6	13,4	51,0	40,0	0,0	60,0
7 phút	7,6	41,8	50,6	8,3	5,0	86,7
10 phút	0	58,0	42,0	5,0	18,0	77,0

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: Thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng thấp, nhưng tỷ lệ mẫu chết càng cao đối với cả 2 loại mẫu cấy. Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh ở mẫu mô đỉnh đạt 51,0% trong thời gian khử trùng 5 phút và ở mẫu mô thân đạt 86,7% trong thời gian 7 phút; khử trùng mẫu cấy bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 20%, thời gian khử trùng 5 phút đối với mô đỉnh sinh trưởng và 7 phút đối với mô thân là thích hợp.

#### 2. Nghiên cứu nhân nhanh

Các thí nghiệm ở giai đoạn này nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho quá trình nhân nhanh chồi

Đây là bước khởi đầu quan trọng trong quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào. Ở giai đoạn này, đối tượng nuôi cấy được đưa từ điều kiện tự nhiên vào điều kiện vô trùng để tạo ra lượng mẫu sạch phục vụ cho các giai đoạn tiếp theo của quá trình nhân nhanh. Vì vậy, đối với tất cả các loại cây trồng thì việc xác định phương pháp khử trùng thích hợp mang ý nghĩa quyết định cho sự thành công của cả quá trình vi nhân giống (Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray, 2000). Mục đích của giai đoạn này là tạo ra được lượng mẫu có tỷ lệ nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao, mô phân hóa và sinh trưởng tốt. Do đó, để tạo nguồn vật liệu sạch ban đầu cho quá trình nhân nhanh giống hoa thuộc được TDL-05 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đã tiến hành nghiên cứu phương pháp khử trùng đối với mô đỉnh sinh trưởng và mô thân mang mắt ngủ bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 20% với các mức thời gian (5 phút, 7 phút, 10 phút).

của giống hoa thuộc được TDL - 05. Đây là giai đoạn mang tính then chốt trong toàn bộ quá trình nhân, yêu cầu của giai đoạn này là: Tạo ra hệ số nhân giống cao; các chồi tạo ra phải đồng nhất về mặt di truyền, có sức sống tốt, tỷ lệ biến dị thấp.

Xuất phát từ những yêu cầu trên, để nhân nhanh giống hoa thuộc được TDL-05, đã sử dụng phương thức tạo và nhân nhanh cụm chồi từ các chồi sạch thu được ở thí nghiệm 1. Ở giai đoạn này đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nhằm xác định môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến hệ số nhân chồi (sau 4 tuần)**

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
1	MS (Đ/C)	100	1,00	4,4	10,5	++
2	MS + 0,5 mg/l BAP	100	3,90	3,4	8,4	+++
3	MS + 1,0 mg/l BAP	100	3,66	3,2	7,3	+++
4	MS + 1,5 mg/l BAP	100	3,53	3,0	6,5	++
5	MS + 2,0 mg/l BAP	100	3,30	2,7	6,1	+
	CV (%)		7,5			
	LSD (5%)		0,42			

Ghi chú: + Chất lượng chồi kém; ++ Chất lượng chồi trung bình; +++ Chất lượng chồi tốt

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Khi bổ sung BAP vào môi trường cho quá trình nhân nhanh của chồi thực được theo đường hướng tạo cụm chồi, thì BAP đã có tác động tốt đến quá trình tạo chồi của giống hoa

thực được TDL-05, thể hiện ở chỉ tiêu hệ số nhân và chất lượng chồi. Nồng độ BAP thích hợp để bổ sung vào môi trường nhân là 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,9 lần/4 tuần).

**Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin đến hệ số nhân chồi (sau 4 tuần)**

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
1	MS (Đ/C)	100	1,00	4,7	12,0	++
2	MS + 0,5 mg/l K	100	2,72	4,5	10,7	+++
3	MS + 1,0 mg/l K	100	3,23	4,5	9,6	+++
4	MS + 1,5 mg/l K	100	2,69	3,8	8,7	++
5	MS + 2,0 mg/l K	100	2,36	3,5	7,4	+
	<i>CV (%)</i>		<i>3,2</i>			
	<i>LSD (5%)</i>		<i>0,167</i>			

*Ghi chú: + Chất lượng chồi kém; ++ Chất lượng chồi trung bình; +++ Chất lượng chồi tốt*

Qua kết quả ở bảng 3: so với BAP thì kinetin cũng có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi, tuy nhiên hiệu quả của kinetin tỏ ra kém hơn so với BAP. Nồng độ kinetin thích hợp để bổ sung vào môi trường nhân là 1 mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,23 lần/4 tuần).

### 3. Giai đoạn tạo cây in vitro hoàn chỉnh

Việc tạo cây hoàn chỉnh là một giai đoạn rất cần thiết trong quá trình nhân nhanh. Sau khi chồi được tạo ra với số lượng lớn trong giai đoạn nhân nhanh thì hầu như chúng chưa có rễ, do đó chồi phải được tạo rễ. Giai đoạn này làm nhiệm vụ tái tạo cây con hoàn chỉnh để chúng có thể sống và sinh trưởng tốt khi đưa cây ra vườn ươm cũng như khi đưa ra vườn sản xuất.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của  $\alpha$ NAA đến khả năng ra rễ và sinh trưởng của chồi thực được (sau 2 tuần)**

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
1	MS (Đ/C)	100	6,33	4,10	4,51	10,7
2	MS+0,25 mg/l $\alpha$ NAA	100	5,10	3,30	4,30	10,2
3	MS+0,5 mg/l $\alpha$ NAA	88,9	4,60	3,30	3,75	9,5
	<i>CV (%)</i>		<i>8,10</i>	<i>7,10</i>		
	<i>LSD (5%)</i>		<i>0,86</i>	<i>0,50</i>		

Kết quả ở bảng 4 cho thấy: Sự ra rễ của chồi bất định khá thuận lợi trong các môi trường nghiên cứu, cây thực được có khả năng tự ra rễ rất tốt; ngay cả trên môi trường không bổ sung  $\alpha$ NAA tỷ lệ ra rễ đạt 100%, cũng như chất lượng rễ rất tốt thể hiện qua chỉ tiêu số rễ (6,33 rễ/cây) và chiều dài rễ (4,1 cm), trong khi đó ở công thức có bổ sung  $\alpha$ NAA tỷ lệ ra rễ 100% nhưng chỉ tiêu số rễ (5,1 rễ/cây) và chiều dài rễ (3,3 cm) thấp hơn so với công thức không bổ sung  $\alpha$ NAA.

Vì vậy, để tạo rễ cho chồi thực được chỉ cần chuyển chúng từ môi trường nhân sang môi trường dinh dưỡng MS không cần phải bổ sung auxin cũng đã là môi trường thích hợp cho sự ra rễ của chồi giống hoa thực được TDL-05.

### 4. Giai đoạn vườn ươm

**Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây thực được in vitro (sau 4 tuần)**

STT	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây
1	Cát	26,3	4,83	9,5
2	Trấu hun	65,8	5,07	10,4
3	Đất	43,7	5,02	10,4
4	Cát + trấu hun (1:1)	76,3	5,13	12,0
5	Đất + trấu hun (1:1)	91,4	5,15	12,1

Khi đưa cây ra khỏi ống nghiệm, có nhiều yếu tố biến động (nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng...) tác động. Chính vì sự thay đổi điều kiện sống đột ngột gây

không ít khó khăn cho việc ra ngôi cây *in vitro*, nên việc chuyển cây *in vitro* qua giai đoạn vườn ươm là bắt buộc để hạn chế tác nhân bất lợi và tạo cho cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. Ngoài ra, mỗi loại cây cần một loại giá thể thích hợp để sống, sinh trưởng và phát triển. Kết quả ở bảng 5 cho thấy: Giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống, chiều cao cây và số lá/cây thực được TDL-05 *in vitro*. Các giá thể có phối trộn cùng trấu hun tỏ ra thích hợp để ra ngôi cây *in vitro*, với các giá thể này tỷ lệ sống của cây cao (76,3-91,4%), cây sinh trưởng tốt hơn (thể hiện ở chỉ tiêu về chiều cao cây và số lá/cây). Giá thể cát không thích hợp cho việc ra ngôi cây thực được *in vitro*, có tỷ lệ cây sống thấp nhất.

#### **IV. KẾT LUẬN**

Kết quả nghiên cứu đã bổ sung cơ sở dữ liệu cho việc xây dựng quy trình nhân giống thực được lùn bằng nuôi cấy mô tế bào như sau: Chế độ khử trùng thích hợp cho mô đỉnh sinh trưởng bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng

độ 20% trong 5 phút và ở mẫu mô thân trong thời gian 7 phút; môi trường nhân nhanh thích hợp là môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi là 3,9 lần/4 tuần; môi trường ra rễ thích hợp cho chồi thực được lùn là môi trường MS không bổ sung auxin; giá thể cho tỷ lệ sống cao và tốt cho sinh trưởng, phát triển của cây thực được *in vitro* là đất + trấu hun tỷ lệ 1:1

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Thị Sỹ (2004). Hệ thống thực vật. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray, 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press LLC, p. 75-85.
3. <http://caimon.org/CaytraicM/KythuatCT/H TThuocduoc.htm> (Hai Quang sưu tầm).
4. <http://agriviet.com/nd/1082-cay-hoa-thuoc-duoc/>

### **IN VITRO MULTIPLICATION OF DAHLIA TDL – 05 VARIETY BY TISSUE CULTURE**

**Trinh Khắc Quang**

#### **Summary**

Tissue culture technique was applied to propagate for a new *Dahlia* variety named TDL-05. Two types of tissues, shoot tip and stem tissues, were used as initiation materials for culture. Sterilization by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentration of 20% for 5 min or 7 min (shoot tip and stem tissues respectively) were the best period time to result in good ratio of cleaned tissues as well as the regeneration capacity of the cleaned tissues. Both of experimented cytokinins, BAP and kinetin, could be used for *in vitro* shoot multiplication of TDL-05 variety. However, BAP seemed to be more effective than kinetin. In MS medium containing the best concentration of BAP, at 0.5 mg/l, multiplication coefficient of *in vitro* shoot reached at 3.9/4 weeks; while it was 3.23/4 weeks in the best concentration, at 1 mg/l, of kinetin. All of *in vitro* shoots could induce multi-root in the MS medium without phytohormon. In nursery, a substrate containing fired rice husk and soil at the 1:1 ratio was suitable for survival as well as growth of *in vitro* plants of the *Dahlia* TDL-05 variety.

**Key word:** TDL-05, multiplication, *in vitro*, media, BAP, kinetin.

**Người phản biện:** GS.TS. Hoàng Minh Tấn

**Ngày nhận bài:** 4/5/2012

**Ngày thông qua phản biện:** 5/6/2012

**Ngày duyệt đăng:** 11/6/2012

# NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG LÁ DÂU TẦM VIỆT NAM TRONG SẢN XUẤT TRÀ TÚI LỌC

Hoàng Thị Lệ Hằng<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Hoa<sup>2</sup>,  
Nguyễn Minh Châu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phương Thảo<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Dâu tằm là loại cây được trồng phổ biến ở Việt Nam, trong thành phần có chứa DNJ (1-deoxynojirimycin) là hợp chất có hoạt tính sinh học, có tác dụng hạ đường máu, hỗ trợ trong việc điều trị bệnh tiểu đường. Do đó, việc tạo ra sản phẩm trà túi lọc từ lá dâu tằm ngoài tác dụng là sản phẩm đồ uống còn có tác dụng hỗ trợ điều trị căn bệnh tiểu đường – một căn bệnh đang ngày càng gia tăng ở trên thế giới nói chung và ở Việt Nam nói riêng – từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước là vấn đề rất cần thiết. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu sử dụng lá dâu tằm để chế biến trà túi lọc, đã xác định được quy trình chế biến trà túi lọc từ lá dâu tằm Việt Nam với các thông số kỹ thuật của các công đoạn chính như sau: tỷ lệ lá dâu khô/dịch cô đặc = 1/2 (dịch cô đặc có hàm lượng chất khô hòa tan là 35<sup>o</sup>Bx); để tạo ra sản phẩm có hương vị hấp dẫn đã sử dụng cỏ ngọt khô với nồng độ 0,015% và hương dâu 0,25%; sử dụng giấy lọc có độ dày 0,074 mm trong công đoạn đóng túi lọc; với mục đích kéo dài thời gian bảo quản trên 6 tháng các túi trà được đóng trong bao bì túi thiếc.

**Từ khóa:** Trà túi lọc, lá dâu tằm, DNJ.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dâu tằm có tên khoa học là *Morus alba alba*, là loại cây được trồng phổ biến ở Việt Nam, đây là loại cây dễ trồng và có thể thích nghi được ở nhiều vùng khí hậu. Trong thành phần lá dâu tằm có chứa DNJ (1-deoxynojirimycin), là hợp chất có hoạt tính sinh học, có tác dụng hạ đường máu, hỗ trợ trong việc điều trị bệnh tiểu đường – một căn bệnh đang là một vấn đề mà cả thế giới quan tâm. Bệnh đái tháo đường ở Việt Nam phát triển nhanh và ngày càng gia tăng cả về tỷ lệ, biến chứng và đối tượng mắc bệnh.

Chính vì vậy việc nghiên cứu tạo ra sản phẩm trà túi lọc từ chính nguồn nguyên liệu dồi dào trong nước, góp phần đa dạng hóa các sản phẩm chức năng cho người tiểu đường trên thị trường Việt Nam - một thị trường đang được đánh giá là bị bỏ ngỏ; đồng thời sử dụng nguồn nguyên liệu dồi dào sẵn có trong nước sẽ góp phần tạo đầu ra cho sản phẩm lá dâu, tạo công ăn việc làm cho người lao động, kích thích ngành trồng dâu phát triển; bên cạnh đó còn cung cấp các sản phẩm góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng, giảm gánh nặng cho xã hội về chi phí y tế, thuốc men. Từ các lý do trên cho thấy, đây là một vấn đề mang tính khoa học và thực tiễn cao.

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu xác định các thông số kỹ thuật chính của từng công đoạn chế biến trà túi lọc từ nguyên liệu lá dâu tằm để từ đó thiết lập

được quy trình công nghệ sản xuất trà túi lọc, tạo ra sản phẩm đồ uống có chất lượng phù hợp với thị hiếu người tiêu dùng, vừa là sản phẩm “thuốc” dùng trong việc phòng và hỗ trợ điều trị căn bệnh tiểu đường.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu: Lá dâu thuộc giống dâu Quế, có độ già thành thực được trồng tại Việt Nam đã được sấy khô đến độ ẩm 10±1%.

Nguyên liệu phụ: cỏ ngọt, túi giấy lọc.

Thí nghiệm được bố trí tại phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Bảo quản Chế biến - Viện Nghiên cứu Rau quả - Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp hoá lý

- Xác định màu sắc của lá dâu và bột lá dâu bằng máy đo màu Minota, Nhật.

- Xác định hàm lượng chất khô hòa tan theo TCVN 5613- 1999.

- Xác định hàm lượng DNJ có trong lá dâu bằng phương pháp tạo dẫn xuất với 9-fluorenylmethyl cloroformat (FMOC - CL) trên hệ thống HPLC pha ngược.

- Xác định độ ẩm của bán thành phẩm và thành phẩm theo phương pháp cân đến khối lượng không đổi.

- Phương pháp phân tích cảm quan

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Rau quả

<sup>2</sup> Viện CNSH&CNTP – ĐH Bách khoa Hà Nội

Chất lượng cảm quan của sản phẩm được đánh giá bằng phương pháp cho điểm thị hiếu.

- *Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu.*

Các thí nghiệm được bố trí theo phương pháp yếu tố ngẫu nhiên hoàn toàn và kiểm tra giả thiết thống kê theo ANOVA.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**1. Nghiên cứu xác định các thông số thích hợp trong công đoạn tạo nguyên liệu có hàm lượng DNJ cao**

Từ các kết quả nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng cho thấy, để sản phẩm có tác dụng ổn định đường huyết theo khuyến cáo nhằm hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường thì hàm lượng DNJ có trong sản phẩm trà túi lọc phải  $\geq 0,25\%$ . Trong khi đó hàm lượng DNJ có trong lá dâu khô  $\leq 0,19\%$ , chính vì vậy để tạo ra nguyên liệu lá dâu có chứa hàm lượng DNJ  $> 0,25\%$  (làm nguyên liệu chính để chế biến trà túi lọc), đã tiến hành bổ sung thêm vào lá dâu một lượng DNJ từ dịch trích ly lá dâu (đã được cô đặc) bằng cách ngâm lá dâu khô trong dịch trích ly lá dâu đã được cô đặc. Dịch trích ly lá dâu được chiết xuất từ giống lá dâu Quế độ già thành thực, trồng tại tỉnh Thái Bình.

Lá dâu được phơi khô đến độ ẩm  $10 \pm 1\%$ , ở nhiệt độ  $30^{\circ}\text{C}$ ; sau đó được xay nhỏ, sàng qua rây có  $\Phi = 1 \text{ mm}$ . Bột lá dâu sau xay được trích ly bằng phương pháp ngâm trong dung môi (dung môi cồn  $30^{\circ}\text{C}$  axit hóa bằng axit axetic  $1\%$ , tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu  $15/1$  trong thời gian trích ly 26 giờ ở nhiệt độ ở  $43^{\circ}\text{C}$ ), dịch trích ly được cô đến các nồng độ chất khô khác nhau ( $T^{\circ}$  cô =  $60^{\circ}\text{C}$ ).

*a. Nghiên cứu xác định nồng độ dịch cao thích hợp*

Lá dâu khô được ngâm trong dịch cao lá dâu ở các độ Bx<sup>0</sup> khác nhau 30, 35, 40 °Bx (dịch trích ly lá dâu được cô đặc đến các nồng độ chất khô hòa tan khác nhau 30, 35, 40°Bx trong máy cô chân không) sau đó phối trộn với bột lá dâu khô với cùng tỷ lệ 1:1 và sấy đến độ ẩm 5-6% rồi được xay nhỏ và đóng vào túi giấy lọc. Kết quả đánh giá chất lượng cảm quan của dịch trà thu được ở các mẫu được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy khi ngâm lá dâu khô trong dịch cao có nồng độ  $30^{\circ}\text{Bx}$  và  $35^{\circ}\text{Bx}$  đều cho dịch trích ly có chất lượng cảm quan tốt và hàm lượng DNJ trong bột  $> 0,23\%$ , ở mẫu được ngâm trong dịch cao có nồng độ cao hơn  $40^{\circ}\text{Bx}$ ; tuy hàm

lượng DNJ có cao hơn các mẫu trên nhưng chất lượng cảm quan của dịch trà lại giảm đi. Điều này là do chính dịch cao ở nồng độ  $40^{\circ}\text{Bx}$  có màu sắc và trạng thái không tốt (màu vàng nâu và lắng cặn) nên đã ảnh hưởng đến chất lượng của dịch trà.

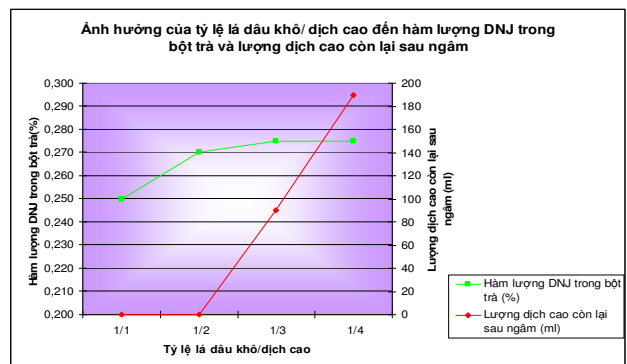
**Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ dịch cao tới cảm quan trong dịch trích ly trà**

Nồng độ cao lá dâu ( <sup>0</sup> Bx)	Hàm lượng DNJ (%) bột trà	Nhận xét cảm quan dịch trà		
		Màu sắc	Mùi vị	Trạng thái
ĐC	0,230	Màu vàng nâu	Không phát hiện hương, vị hơi chát	Không lắng cặn
30	0,236	Màu vàng nâu	Thơm nhẹ, vị chát dịu	Không lắng cặn
35	0,255	Màu vàng nâu	Thơm nhẹ, vị chát dịu	Không lắng cặn
40	0,270	Màu nâu vàng	Hơi nồng, vị chát .	Hơi lắng cặn

Hơn nữa, để tạo ra sản phẩm trà túi lọc có chất lượng cảm quan tốt, trong thành phần bột trà cần phải phối chế thêm một số phụ gia và chất điều vị nhằm tăng hương vị cho sản phẩm, đáp ứng thị hiếu người tiêu dùng. Do đó để đảm bảo hàm lượng DNJ theo yêu cầu đã chọn dịch cao có độ Brix là  $35^{\circ} \text{ Bx}$  để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

*b. Nghiên cứu xác định tỷ lệ lá dâu/dịch cao thích hợp*

Kết quả xác định hàm lượng DNJ có trong bột lá dâu từ các mẫu lá dâu khô khi ngâm trong dịch cao lá dâu có nồng độ  $35^{\circ}\text{Bx}$  với các tỷ lệ khác nhau được biểu diễn qua đồ thị sau:



Kết quả thu được cho thấy ở các mẫu có tỷ lệ lá dâu/dịch cao là 1/1 và 1/2 thì lượng dịch cao đã được ngâm hết vào lá nhưng khi tỷ lệ này tăng lên thì lượng dịch cao còn dư khá nhiều (lần lượt là 90 ml và 190 ml ở các tỷ lệ 1/3 và 1/4). Bên cạnh đó, sự tăng

lên của hàm lượng DNJ ở mẫu được ngâm ở tỷ lệ 1/3, 1/4 so với mẫu có tỷ lệ 1/2 là không đáng kể. Chính vì vậy, đã chọn tỷ lệ ngâm của lá dâu khô/ dịch cao là 1/2. Sử dụng kết quả này cho các thí nghiệm tiếp theo.

**2. Nghiên cứu xác định độ ẩm thích hợp cho sản phẩm**

Lá dâu khô sau khi được ngâm trong dịch trích ly cô đặc, được sấy đến các độ ẩm từ 5 - 11%, nghiền và đóng trong bao bì bảo quản, sau 1 tháng các mẫu được đem ra để đánh giá chất lượng; kết quả được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của độ ẩm bột trà đến chất lượng trà túi lọc sau 1 tháng bảo quản**

Độ ẩm	% DNJ trong bột trà	% DNJ sau 1 tháng	Cảm quan
5%	0,273	0,271	Màu sáng, thơm nhẹ, không vón cục
7%	0,271	0,270	Màu sáng, thơm nhẹ, không vón cục
9%	0,268	0,267	Màu tối hơn, không thơm, vón cục
11%	0,259	0,258	Màu tối hơn, không thơm, vón cục

Qua bảng trên đã nhận thấy các mẫu có độ ẩm từ 9 - 11% có sự giảm chất lượng rõ rệt: bột trà bị vón, biến đổi màu tối hơn, hàm lượng DNJ cũng giảm, hương thơm kém sau 1 tháng bảo quản, hơn nữa do có độ ẩm cao nên lá dâu còn dai, quá trình xay nghiền khó khăn hơn. Ngược lại, ở các mẫu được sấy ở độ ẩm 5 - 7% chất lượng bột trà hầu như khá ổn định, mặt khác khi sấy đến độ ẩm 5 - 7%, lá giòn dễ xay nhỏ hơn. Tuy nhiên khi xét đến hiệu quả kinh tế trong sản xuất lớn đã chọn chế độ sấy đến độ ẩm 7% trong quá trình sản xuất trà túi lọc.

**3. Nghiên cứu xác định tỷ lệ phối chế nhằm tạo ra sản phẩm trà túi lọc có chất lượng cao, có chứa hàm lượng DNJ  $\geq 0,25\%$**

*a. Nghiên cứu tỉ lệ phối chế chất điều hương*

Do đây là sản phẩm sử dụng cho người bệnh tiểu đường nên tiêu chí lựa chọn các chất điều vị bổ sung phải là các chất cho phép sử dụng đối với người bệnh tiểu đường. Hiện nay, đường cỏ ngọt đã và đang được sử dụng để bổ sung vào một số thực phẩm chức năng như: Trà nấm linh Chi, trà actiso - stevis... với tác dụng vừa là dược liệu, vừa là một chất tạo vị ngọt tự nhiên cho sản phẩm.

Kết quả thu được khi tiến hành bổ sung đường cỏ ngọt với các tỷ lệ từ 0,01% - 0,02% cho thấy mẫu có bổ sung hàm lượng cỏ ngọt 0,015% có điểm chấp nhận cao nhất (đặc biệt là chỉ tiêu về vị). Ở các mẫu có tỷ lệ đường cỏ ngọt cao hơn ( $\geq 0,015\%$ ) hoặc thấp hơn ( $\leq 0,014\%$ ) tạo cho dịch trà có vị quá ngọt hoặc nhạt không hài hòa. Vì vậy, đã chọn tỷ lệ cỏ ngọt bổ sung là 0,015% so với khối lượng bột trà.

*b. Nghiên cứu tỉ lệ phối chế chất điều hương*

Để tạo cho sản phẩm có hương thơm hấp dẫn và đặc trưng, đã sử dụng hương dâu dạng khô để bổ sung vào bột trà trước khi đóng gói ở các nồng độ khác nhau từ 0 - 0,3%. Trên cơ sở đánh giá chất lượng của các mẫu thông qua chất lượng của dịch pha trà (bằng nhận xét và cho điểm) cho thấy: Khi nồng độ hương dâu tăng dần từ 0 - 0,3% càng cảm nhận rõ mùi thơm trong dịch trà, điều này chứng tỏ bổ sung thêm hương dâu đã làm tăng giá trị cảm quan của sản phẩm. Nồng độ hương bổ sung là 0,25% cho hương thơm đặc trưng, hấp dẫn và điểm phân tích cảm quan là cao hơn cả so với các mẫu còn lại. Do đó đã chọn nồng độ hương dâu thích hợp nhằm nâng cao giá trị cảm quan cho sản phẩm trà túi lọc là 0,25%.

**4. Nghiên cứu xác định loại giấy lọc thích hợp cho sản phẩm trà túi lọc**

Tiến hành khảo sát đối với 3 loại giấy lọc đang được lưu hành phổ biến trên thị trường với các độ dày khác nhau: 0,07 mm, 0,074 mm, 0,078 mm. Kết quả phân tích các chỉ tiêu chất lượng của dịch pha trà khi được đóng gói ở các loại giấy lọc khác nhau (pha với 150 ml nước sôi trong cùng thời gian 5 phút) được trình bày ở bảng 3.

Qua kết quả ở bảng 3 cho thấy độ dày của giấy lọc có ảnh hưởng khá rõ rệt đến chất lượng của dịch pha trà. Với loại giấy lọc có độ dày thấp (0,07 mm), tốc độ khuếch tán các chất hòa tan ra dịch trà nhanh hơn nên trong cùng thời gian pha 5 phút dịch trà có hàm lượng chất khô hòa tan và DNJ cao nhất; màu sắc của dịch trà đậm nhất, nhưng trạng thái của dịch trà bị vẩn đục. Ngược lại, mẫu được đóng trong loại giấy lọc có độ dày cao nhất (0,078 mm) cho dịch trà có màu nhạt nhất, hàm lượng DNJ thấp nhất trong cùng một khoảng thời gian pha, điều này cho thấy độ dày này đã ngăn cản sự quá trình khuếch tán các chất hòa tan ra dịch pha (thể hiện ở hàm lượng chất khô hòa tan và thành phần DNJ thấp nhất). Với mẫu

giấy lọc có độ dày 0,074 mm dịch trà thu được có hàm lượng DNJ thấp hơn không đáng kể so với độ dày 0,070 mm nhưng lại cho chất lượng cảm quan

của dịch trà tốt. Do vậy đã chọn loại giấy lọc có độ dày 0,074 mm cho sản phẩm trà túi lọc.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của các loại giấy lọc tới chất lượng của dịch pha trà**

Độ dày giấy lọc (mm)	DNJ trong dịch trà (%)	Hàm lượng chất khô hòa tan ( <sup>0</sup> Bx) trong dịch trà	Màu sắc	Hương vị	Trạng thái
0,070	0,253	1,4	Màu nâu vàng đậm	Thơm đặc trưng, chất dịu, ngọt nhẹ	Dịch vẩn đục
0,074	0,250	1,1	Màu nâu vàng	Thơm nhẹ, chất dịu, ngọt nhẹ	Dịch trong
0,078	0,242	0,7	Màu vàng nâu nhạt	Thơm nhẹ, chất dịu, ngọt nhẹ	Dịch trong

**5. Nghiên cứu loại bao bì bảo quản thích hợp**

Do bột lá dâu có hàm lượng ẩm khá thấp (7%), hơn nữa sản phẩm ở dạng bột cũng là một loại hình thái có khả năng hút ẩm nhanh, vì vậy để kéo dài tính thương phẩm của sản phẩm phục vụ cho việc tiêu thụ, lưu thông và sử dụng thì việc nghiên cứu bao bì

bảo quản là cần thiết. Kết quả khảo sát sự thay đổi chất lượng của sản phẩm trà túi lọc (độ ẩm, màu sắc, trạng thái, mùi, vị) khi bảo quản bằng các loại bao bì PE, giấy, PE/ Giấy, tráng thiếc trong thời gian bảo quản 6 tháng được thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của các loại bao bì tới chất lượng của trà túi lọc sau 6 tháng bảo quản**

Loại bao bì	Hàm lượng DNJ trong bột trà (%)	Độ ẩm %	Hương vị	Trạng thái	Trạng thái nước trà
PE	0,237	8,5	Thơm nhẹ, vị chất dịu, ngọt nhẹ	Hơi vón cục	Màu nâu vàng, sánh
Giấy	0,236	10,0	Thơm rất nhẹ, vị chất dịu, ngọt nhẹ	Vón cục	Màu nâu vàng, sánh
PE/giấy	0,265	7,5	Thơm nhẹ, vị chất dịu, ngọt nhẹ	Bột tơi, không bị vón	Màu nâu vàng, sánh
Tráng thiếc	0,269	7,5	Thơm nhẹ, vị chất dịu, ngọt nhẹ	Bột tơi, không bị vón	Màu nâu vàng, sánh

Qua kết quả thu được cho thấy, hàm lượng DNJ trong trà được bao gói bằng túi PE, giấy giảm dần theo thời gian, điều này là do túi bảo quản vẫn bị thấm khí dẫn theo hơi ẩm làm cho sản phẩm bị nhiễm ẩm, từ đó ảnh hưởng tới chất lượng của trà. Sản phẩm được bao gói trong túi tráng thiếc và PE/giấy có hàm lượng DNJ hầu như không bị biến đổi, trong khi độ ẩm của sản phẩm tăng không nhiều ( $\leq 7\%$ ). Tuy nhiên, do giá thành của bao bì tráng thiếc cao hơn nhiều so với bao bì PE/giấy, chính vì vậy để đảm bảo hiệu quả kinh tế đã lựa chọn bao bì PE/giấy để bảo quản sản phẩm trà túi lọc.

**6. Xây dựng quy trình công nghệ sản xuất trà túi lọc**

Trên cơ sở các thông số công nghệ thu được từ các thí nghiệm trên, đã đưa ra quy trình công nghệ

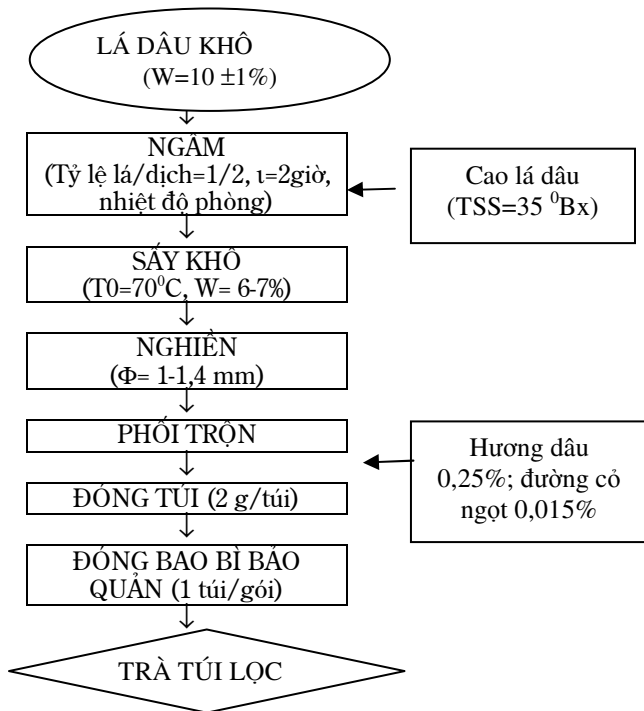
sản xuất trà túi lọc như sau:

**Thuyết minh quy trình:**

Lá dâu khô được ngâm trong dịch cao lá dâu có nồng độ 35<sup>0</sup>Bx (tương đương hàm lượng DNJ trong bột trà = 0,27) theo tỷ lệ 1:2 ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 h. Sau thời gian ngâm, lá dâu ngâm được sấy ở nhiệt độ 70<sup>0</sup>C đến khi lá đạt độ ẩm 6-7%. Lá sau sấy được đem xay tới kích thước 1,4 mm (với tỷ lệ bụi lọt sàng 0,35 mm không vượt quá 10% khối lượng).

Bột lá được phối chế thêm đường cỏ ngọt với tỷ lệ 0,015% , bột hương dâu 0,25%, đóng trong túi giấy lọc có độ dày 0,074 mm với định lượng 2 g/túi. Từng túi trà được bao gói trong bao bì 2 lớp (PE/giấy). Sản phẩm có thời hạn sử dụng trên 6 tháng.





#### IV. KẾT LUẬN

Đã xác định được quy trình chế biến trà túi lọc từ lá dâu tằm Việt Nam với các thông số kỹ thuật của các công đoạn chính như sau:

- Để tạo ra nguyên liệu có hàm lượng DNJ cao cần bổ sung lượng DNJ từ dịch cao lá dâu có nồng độ 35<sup>0</sup>Bx với tỷ lệ lá/dịch cao là 1:2
- Độ ẩm của lá dâu khô thích hợp cho chế biến trà túi lọc là 6-7%.
- Để tạo cho sản phẩm có chất lượng cảm quan tốt cần bổ sung hương dâu và đường cỏ ngọt với các tỷ lệ tương ứng là: 0,25 và 0,015%, sau đó được đóng gói bằng loại giấy lọc có độ dày 0,074 mm.

#### RESEARCH ON USING MULBERRY LEAVES OF VIET NAM TO PRODUCE FILTER BAG TEA PRODUCT

Hoang Thi Le Hang, Nguyen Ngoc Hoa,  
Nguyen Minh Chau, Nguyen Thi Phuong Thao

#### Summary

Mulberry trees are widely planted in Vietnam, in the composition of the leaves of mulberry have compound biologically active 1-deoxynojirimycin which has hypoglycemia effect, support for diabetes treatment. Therefore, production tea filter bags from mulberry leaves will not be only beveraged products but also supported in the treatment for diabetes that is increasing in Viet Nam and the world- from materials inside the country, that is very essential issue. Based on results of the study, the procedure manufacturing for tea of filter bags from mulberry Vietnamese leaves have been identified with the specifications of the main stages as follows: the rate of dried leaves mulberry/ condensed solution = 1/2 (condensed solution have <sup>0</sup>Bx= 35); the rate of sweet grass has in tea powder = 0.015%, strawberry flavor concentrations = 0.25%. Using filter paper thickness 0.074 mm in order to packed; then products are packaged in PE/ paper bags; preservation time of products more than 6 months.

**Key words:** *Filter-bag tea, mulberry leaves, DNJ.*

**Người phản biện:** PGS.TS. Trịnh Văn Loan

**Ngày nhận bài:** 12/3/2012

**Ngày thông qua phản biện:** 13/4/2012

**Ngày duyệt đăng:** 20/4/2012

- Để kéo dài thời gian thương phẩm và ổn định chất lượng của sản phẩm từng túi chè cần được đóng trong bao bì 2 lớp PE/Giấy.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2002). Dược điển Việt Nam, Hà Nội: Dâu (lá).
2. Nguyễn Quang Trung (2007). Đánh giá tác dụng bột chiết lá dâu trên các chỉ số lipid và trạng thái chống oxy hóa trong máu ở chuột nhắt trắng gây rối loạn lipid máu và đái tháo đường thực nghiệm. Tạp chí Y học Thực hành. Số 10.
3. Bondada Andalulua N. Ch. (2003). Antioxidant role of mulberry leaves in streptozotocin-diabetic rats. Elsevier, Clinica Chimica Acta.
4. Cockram C. S., T. Van Binh, Gaela G. (2007). Diabetes prevention and control in Viet Nam: Demonstration project in two provinces. Global Report.
5. Kimura T., Nagakawa K., Kubota H., Kojima Y. Goto, Y. (2007). Food grade mulberry powder enriched with 1-Deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. Journal of Agricultural and Food chemistry. 55, 5869-5874.
6. Nuengchamnong N., Ingkaninan K., Kaewruang W., Wongareonwanakij S., Hongthongdaeng B. (2007). Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44, 853-858.
7. Venkatesh Kumar R., Seema C. (2008). Mulberry: Life enhancer. Journal of Medicinal Plants Research, 2(10), 271-278.