



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003309

(51) A61K 9/14
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00516

(22) 15/10/2020

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/01/2021 394

(73) Trung tâm Phát triển công nghệ cao, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)

18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Lê Đăng Quang (VN); Trần Đại Lâm (VN); Nguyễn Văn Thao (VN); Vũ Đình Hoàng (VN); Lê Thế Tâm (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM NANO TINH DẦU NGHỆ KHÁNG NẤM

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm kháng nấm trên cơ sở nano hóa các hoạt chất chính từ dầu nghệ để phòng trừ bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra trên một số đối tượng cây trồng ở Việt Nam (trong giải pháp này là bệnh thán thư trên cây vải), trong đó quy trình này bao gồm các công đoạn: a) thu cao chiết từ bột nghệ (*Curcuma longa* L.); b) thu dầu nghệ từ cao chiết; và c) nano hóa các hoạt chất tạo dung dịch nano dầu nghệ để thu chế phẩm kháng nấm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sản xuất chế phẩm kháng nấm bảo vệ cây trồng, và thân thiện với môi trường, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình ổn định tạo ra chế phẩm mới trên cơ sở nano hóa các hoạt chất chính của dầu nghệ để phòng trừ bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* spp. gây ra trên một số đối tượng cây trồng ở Việt Nam (trong giải pháp này là bệnh thán thư trên cây vải).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp

Trên thế giới, cùng với sự phát triển của ngành nông nghiệp, tình hình sâu, bệnh phá hoại mùa màng và các côn trùng gây bệnh cho người, gia súc ngày càng trở lên trầm trọng, gây tổn thất lớn về người và vật chất. Sử dụng các hóa chất phòng trừ dịch hại nhằm hạn chế các tổn thất trên là biện pháp không thể thiếu, đặc biệt vào những thời điểm dịch hại xảy ra.

Hiện nay các loại thuốc bảo vệ thực vật cũ thường là hỗn hợp hóa học các chất có độc tính cao, do vậy mặt trái của thuốc bảo vệ thực vật là rất độc hại với sức khỏe cộng đồng và là một đối tượng có nguy cơ cao gây ô nhiễm môi trường sinh thái nếu không được quản lý chặt chẽ và sử dụng đúng cách. Dư lượng thuốc bảo vệ thực vật quá giới hạn cho phép trong nông sản, thực phẩm là mối đe dọa đối với sức khỏe con người. Vì vậy, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để bảo vệ sản xuất nông nghiệp cùng với việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng và môi trường là hai vấn đề đối nghịch cần được quan tâm do dư lượng các loại thuốc bảo vệ thực vật của các loại thuốc BVTV có nguồn gốc thực vật không ảnh hưởng tới sức khỏe và môi trường sống của con người. Để giảm thiểu tác động xấu của thuốc BVTV tới môi trường và con người, một trong những xu hướng hiện nay là tìm kiếm và sử dụng các sản phẩm chọn lọc, ít độc đối với người sử dụng, phân hủy nhanh, ít để lại dư lượng trong nông phẩm và môi trường - những sản phẩm thân thiện với môi trường, thay thế các sản phẩm độc hại trước đây. Trước thực trạng trên, một giải pháp đang được ngành nông nghiệp Việt Nam cũng như cả thế giới quan tâm đó là: phát triển các chế phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học nhằm giảm thiểu ảnh hưởng tới sức khỏe con người và tác

động tới môi trường.

Hiện nay trên thế giới đã tạo thành được một dòng các sản phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học, chủ yếu là trừ sâu, trừ nấm bệnh như khuẩn *Bacillus thuringiensis*, nấm *Trichoderma*, hoạt chất Azadirachtin từ cây xoan đào, Karanjin - chiết xuất từ cây hoa đào Ấn Độ, Matrine - chiết xuất từ cây khổ sâm, Saponin - bã trà... Các dòng sản phẩm này có cơ chế hết sức đa dạng như gây độc hệ thần kinh, gây rối loạn tiêu hóa, hay cản trở quá trình lột xác của sâu bọ... có hiệu quả trên hầu hết các loại sâu bọ trên đồng ruộng.

Đối với dòng sản phẩm sinh học có tác dụng diệt trừ bệnh thán thư, trên thị trường thuốc bảo vệ thực vật Việt Nam có xuất hiện một nhóm thuốc có chất kháng sinh Ningnanmycin gồm Cosmos 2SL, Kozuma 5WP, Datacin 8L nhưng chúng đều là những chế phẩm nhập từ nước ngoài.

Cây nghệ (*Curcuma longa* L.) được sử dụng trong y học cổ truyền như một vị thuốc. Cây nghệ rất giàu các hợp chất chống viêm và chống ôxy hóa. Ngày nay, nghệ được công nhận là một liệu pháp thay thế cho chứng ợ nóng, viêm và loét dạ dày. Quá trình tách chiết, phân lập từ cây nghệ thu được phần dầu nghệ (turmeric oil, dạng lỏng, gồm nhiều chất ít phân cực) và nhóm các hợp chất rắn (chứa các chất phân cực và phân cực trung bình). Phần dầu nghệ có màu vàng nhạt và có mùi thơm, chứa các cấu tử chính như: α -pinen, p-cumene, ar-tumerone, α -turmerone, β -turmerone, α -terpineol, atlantone, zingiberene và chiếm khoảng 1-5% trong cây nghệ. Phần chất rắn chủ yếu các curcuminoid, gồm curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin và chiếm khoảng 0,3-0,7% trong nghệ. Tinh dầu nghệ nằm ở các bộ phận khác nhau của cây sẽ có thành phần khác. Trong dầu của hoa nghệ có các thành phần chính như p-cymen (26%), terpinolene (7,4%) và 1,8-cineole (4,1%), trong dầu lá có các thành phần α -phellandrene (32,6%), terpinolene (26%), 1,8-cineole (6,5%) và p-cymene (5,9%). Trong tinh dầu rễ nghệ người ta đã phân lập được 43 chất, trong đó có 24 hợp chất chiếm 68,8% là dầu. Thành phần chủ yếu là ar-turmerone (46,8%), ar-curcumin (7%) và curcumin (4,3%). Tinh dầu từ thân củ có chứa 47 chất (70% là dầu), trong đó bao gồm ar-tumerone (31,1%), turmerone (10%), curlone (10,6%) và ar-curcumin (6,3%).

Hầu hết các nghiên cứu về loại dược liệu này đang sử dụng các chất chiết

xuất từ cây nghệ mà thành phần chủ yếu là curcumin. Các sáng chế (patent) đã công bố đều tập trung vào đưa ra quy trình chế tạo nano curcumin với mục đích nano hóa các hợp chất thiên nhiên có hoạt tính cao để tăng tính tan và tính sinh khả dụng của nó. Một số patent có thể kể đến:

Tác giả Anitha Kri và đồng sự trong patent US 2011/0229532A1 đã nêu quy trình chế tạo hệ vi nhũ tương của hợp chất thuộc nhóm polyphenol thân dầu bằng cách sử dụng siêu âm với chất hoạt động bề mặt không phân cực và một dung môi không phân cực để tăng khả năng hòa tan trong nước.

Tác giả Bakulesh Mafatlal Khamar và đồng sự trong patent US 2013/0225689 A1 nêu lên quy trình chế tạo nano curcumin ở dạng lỏng, dạng muối được dùng và các dẫn xuất của curcumin.

Tác giả C. Moorthi và K. Kathiresan trong một nghiên cứu curcumin-Piperin/curcumin-Quercetin/Curcumin-Silibinin dual drug-loaded nanoparticulate combination therapy: A novel approach to target and treat multidrug resistant cancer cũng chỉ tập trung nghiên cứu chỉ ra sự kết hợp curcumin và quercetin làm tăng cường rõ rệt các hoạt tính và tác dụng dược lý của các chất này khi sử dụng riêng rẽ.

Patent US 2010/0168248A1 mô tả quy trình sản xuất các phân đoạn làm giàu của tetrahydroxycurcumin và tetrahydrotetrahydroxy-curcumin từ chiết xuất của cây nghệ (*Curcuma longa* L.).

Patent KR20120055120A mô tả phương pháp lên men cho curcuma longa, trong đó đề cập đến phương pháp lên men nghệ, bằng cách lên men với *lactobacillus* để tăng cường hoạt động sinh lý của nghệ và đồng thời để loại bỏ vị đắng và mùi khó chịu chỉ có ở nghệ để cải thiện sự ưa thích của người tiêu dùng.

Patent US5861415A mô tả phương pháp sử dụng, quy trình chiết xuất curcuminoids và thành phần chất bảo vệ sinh học cơ thể. Sáng chế hướng đến các chế phẩm có chứa ba curcuminoid, gồm curcumin, demethoxy curcumin và bis demethoxy curcumin, được chiết xuất từ rễ của cây nghệ (*Curcuma longa* L.). Các chế phẩm này đã được xác định có hoạt tính trong các cơ chế ngăn ngừa và can thiệp chống oxy hóa trong cơ thể.

Patent WO1996003999A1 mô tả phương pháp để thu được chất chiết xuất

phân cực và không phân cực của cây nghệ (*Curcuma longa* L.) và các ứng dụng của chúng. Quy trình để thu được chiết xuất từ cây rệp muối bao gồm: (a) chiết xuất thân rễ bằng dung môi hữu cơ; (b) lọc và làm bay hơi đến khô dịch chiết; (c) hòa tan dầu thu được trong điều kiện nóng, tạo kết tủa trong khi để nguội và lọc chất rắn; (d) làm khô và kết tinh lại chất rắn để thu được sản phẩm có độ tinh khiết của curcuminoid cao hơn 90%. Thu được dịch chiết phân cực bao gồm: (a) chiết xuất thân rễ bằng nước ở 50-70 °C và (b) lọc và làm bay hơi nước. Ứng dụng trong việc chế tạo các chế phẩm và chế phẩm hữu ích như chất bắt giữ các gốc tự do và chất chống đông, cũng như chất khử để làm giảm nồng độ lipid peroxid trong huyết tương ở người.

Gần đây các nghiên cứu về các hợp chất có trong cây nghệ (*Curcuma longa* L.) và các cây họ Gừng đều thấy có hiệu quả kháng vi sinh vật như nấm và vi khuẩn hại cây trồng. Các hợp chất curcuminoid từ nghệ đã được phát triển thành chế phẩm BVTV sinh học ở Hàn Quốc. Dhingra và cộng sự (2007) đã nghiên cứu và cho biết tinh dầu nghệ (*Curcuma longa* L.) độc đối với 7 loại nấm hại nông sản trong kho. Behura và cộng sự cũng cho biết trong 5 nguồn bệnh nấm lúa được xử lý với tinh dầu nghệ, *Rhizotonia solani* mẫn cảm nhất và *F. moniliforme* kháng mạnh nhất với sự phát triển bị giảm 81% và 2,5%, tương ứng. Tương tự, Saju và cộng sự báo cáo ở nồng độ 1-5% tinh dầu nghệ, sự phát triển của *C. gloeosporioides*, *Sphaceloma caradmoni* và *Pestlotiopsis palmarum* hoàn toàn bị ức chế, trong khi đó *F. solani* chỉ bị ức chế 79%.

Nghiên cứu về hoạt tính tinh dầu nghệ, Hoi-Seon Lee và cộng sự (2003) đã nghiên cứu hoạt tính kháng nấm của ar-Turmerone đối với 6 loại nấm trên cây: *Magnaporthe grisea* (bệnh đạo ôn), *Rhizoctonia solani* (bệnh bạc lá lúa), *Botrytis cinerea* (bệnh đui chùm), *Phytophthora infestans* (mốc sương cà chua), *Erysiphe graminis* (nấm mốc lúa mạch) và *Puccinia recondita* (rỉ lá lúa mì) bằng cách ngâm chiết bột nghệ để thu được cao nghệ. Cao nghệ này được chiết phân bố với n-hexan, chloroform, etylacetat, nước sau đó đem thử nghiệm với 6 loại nấm trên. Kết quả cho thấy phân đoạn dịch chiết n-hexan có hoạt tính kháng nấm cao với vi khuẩn *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* và có khả năng diệt 100% đối với hai chủng nấm *Phytophthora infestans* và *Erysiphe graminis*. Dịch chiết chloroform có khả năng diệt nấm *Phytophthora infestans* gây mốc sương cà

chua lên tới khoảng 80%.

Năm 2006, Kim Jin Cheol và các đồng sự đã tiến hành nghiên cứu, khảo sát hoạt tính kháng nấm của các hợp chất đã phân lập được và dịch chiết các phân đoạn của cây nghệ vàng, kết quả cho thấy dịch chiết của thân rễ cây nghệ vàng có khả năng ức chế sự phát triển nấm *Magnaporthe grisea* gây bệnh đạo ôn và nấm *Phytophthora infestan* gây bệnh rụng lá cây cà chua. Ba hợp chất phân lập được từ phần curcuminoid là curcumin, demethoxycurcumin và bisdemethoxycurcumin đều có hoạt tính kháng nấm gây bạc lá lúa (*Corticium sasakii*), xám màu cà chua (*Botrytis cinerea*), rỉ sắt lúa mì (*Puccinia recondita*) và gây phấn trắng trên lúa mạch (*Blumeria graminis*), mốc sương cà chua (*Phytophthora infestan*) và bệnh đạo ôn (*Magnaporthe grisea*).

Bảng 1: Hoạt tính cao metanol và nước từ cây nghệ vàng với nấm *Colletotrichum coccodes*

Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng ức chế (%) ^b
Cao metanol	3000	88 $\pm$ 5
	1000	50 $\pm$ 4,3
	333,3	25 $\pm$ 13
Cao nước	3000	25 $\pm$ 10
	1000	5 $\pm$ 11
	333,3	0
Dithianon	50	98 $\pm$ 0,8
	10	58 $\pm$ 8,7

Bảng 2: Hoạt tính kháng nấm của 4 phân đoạn từ dịch chiết metanol của cây nghệ vàng đối với nấm *Colletotrichum coccodes*

Phân đoạn	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng ức chế (%) ^b
n-Hexan	2000	5 $\pm$ 4,6
Etylaxetat	2000	92 $\pm$ 2,4
Butanol	2000	50 $\pm$ 7,3
Cao nước	2000	0
Dithianon	50	94 $\pm$ 1,2
	10	55 $\pm$ 9,3

Kim Jin Cheol (2006) khi thử nghiệm hoạt tính kháng chủng nấm *Colletotrichum* spp. của các phân đoạn dịch chiết từ nghệ vàng và thu được kết quả rất khả quan (bảng 1 và bảng 2), và đã tiến hành nghiên cứu sản xuất ra chế phẩm

diệt nấm thán thư *Colletotrichum* spp. với hoạt chất chính là các curcuminoids từ cây nghệ (*Curcuma longa*). Ngoài nấm gây thán thư, dịch chiết etyl axetat từ cây nghệ còn có hoạt tính diệt các nấm *Botrytis cineria*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, và *Rhizoctonia solani*. Phần hỗn hợp chất không phân cực từ cây nghệ gồm cả phần tinh dầu được thử nghiệm hoạt tính diệt côn trùng. Ar-Turmerone từ phần tinh dầu nghệ có hoạt tính chất diệt rầy nâu *Nilaparvata lugens*, diệt sâu tơ *Plutella xylostella* với tỷ lệ 64-100% ở nồng độ 500 và 1000 µg/ml.

Gần đây, khoa học và công nghệ nano đã trở thành một lĩnh vực nghiên cứu hấp dẫn và nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học. Các phân tử kích thước nhỏ đang ngày một được sử dụng rộng rãi trong nhiều ngành khác nhau. Trong số các ứng dụng, người ta chú ý nhiều hơn đến việc sử dụng các hạt nano trong các ngành y sinh và nông nghiệp. Trong nông nghiệp, năng suất của cây trồng được cải thiện đáng kể bằng cách sử dụng các chất dinh dưỡng vĩ mô và vi lượng thiết yếu dưới dạng phân bón nano.

Những nghiên cứu gần đây về hoạt chất dạng nano hóa như nano chitosan và nano bạc giúp kiểm soát hiệu quả bệnh hại cây trồng theo một cơ chế đặc hiệu riêng và có hàm lượng hoạt chất thấp từ đó giảm thiểu được ảnh hưởng của hóa chất đối với con người và môi trường.

Theo nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Bích Ngọc và cộng sự (2018). Khi đánh giá khả năng ức chế của nano bạc và nano đồng trên nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư hại cam và nấm *Phytophthora* spp. gây rụng quả cam. Nano bạc có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* spp. đạt 100% ở nồng độ 10 ppm và ức chế nấm *Phytophthora* spp. đạt hiệu quả 100% ở nồng độ 5 ppm trong điều kiện *in vitro*. Nano đồng có khả năng ức chế nấm kém hơn nano bạc. Với nấm *Colletotrichum* spp., khả năng ức chế của nano đồng đạt 77,36% ở nồng độ 200 ppm và ức chế nấm *Phytophthora* spp. đạt 100% ở nồng độ 100 ppm trong điều kiện *in vitro*. Kết hợp nano bạc 20 ppm và nano đồng 200 ppm với 0,1 % tween 20 cho hiệu quả ức chế nấm cao nhất đạt 84,27% với nấm *Colletotrichum* spp. và 64,01% với nấm *Phytophthora* spp. trong điều kiện *in vivo*.

Các tác giả Võ Văn Quốc Bảo, Trương Ngọc Đăng (2018), đã đánh giá khả năng kháng nấm của chế phẩm nano bạc - TBS đối với nấm *Macrophoma theicola* gây hại trên quả quýt. Nghiên cứu đã tiến hành sử dụng nano bạc - TBS để ức chế nấm *Macrophoma theicola*. Trên môi trường PDA, sự nảy mầm của bào tử và phát triển của tản nấm bắt đầu bị ức chế ở nồng độ 10 ppm và ức chế hoàn toàn từ 30 ppm trong điều kiện *in vitro*. Ở điều kiện *in vivo*, với 2 lần phun chế phẩm ở nồng độ 10 đến 90 ppm, nano bạc – TBS có tác dụng tăng khả năng kháng bệnh từ 24,4% đến 100%.

Dương Hoa Xô và cộng sự (2017) đã nghiên cứu hiệu ứng phòng bệnh chết nhanh do nấm *Phytophthora capsici* gây ra trên cây hồ tiêu của chế phẩm nano bạc chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ. Bạc nano ở các kích thước 5, 10 và 15 nm đã được chế tạo thành công bằng phương pháp chiếu xạ tia γ -Co-60 sử dụng chất ổn định chitosan. Bạc nano chế tạo được cho thấy hoạt tính kháng nấm rất mạnh đối với *P. capsici* trong điều kiện *in vitro*. Bên cạnh đó, bạc nano còn có khả năng giảm thiểu thiệt hại gây ra do bệnh thối rễ chết nhanh (do nấm *P. capsici*) trên cây tiêu, ngay cả khi cây đã bị xâm nhiễm bởi nấm bệnh. Việc xử lý với bạc nano ngay cả ở nồng độ thấp (chỉ khoảng 3 ppm) trước khi cây bị xâm nhiễm bởi nấm bệnh *P. capsici* cũng cho thấy khả năng kháng bệnh, tăng trưởng và phát triển rất tốt, đồng thời giúp giảm chi phí trị bệnh khoảng 10 lần.

Nghiên cứu khả năng kháng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* gây bệnh bạc lá lúa của chế phẩm nano đồng-bạc/chitosan oligosaccharide của các tác giả (Nguyễn Thu Thủy và Nguyễn Tiến Long, 2018) cho thấy, trong điều kiện *in vitro*, nano đồng-bạc/chitosan oligosaccharide ở nồng độ 50, 70 và 100 ppm có hiệu lực ức chế vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* cao nhất sau nuôi cấy 2 ngày và 3 ngày với hiệu lực đạt 100%. Trong điều kiện nhà lưới, xử lý nano đồng-bạc/chitosan oligosaccharide với nồng độ 70 ppm và 100 ppm ở thời điểm 1 ngày trước khi lây bệnh nhân tạo có tác dụng làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh bạc lá đáng kể. Ở điều kiện ngoài đồng ruộng sử dụng nano đồng-bạc/chitosan oligosaccharide ở nồng độ 70 ppm có khả năng hạn chế bệnh bạc lá phát triển tương đương với thuốc hoá học Kasumin 2L. Một số thuốc chứa hoạt chất nano bạc như MIFUM 0,6DD và Nano Kito 2.6 SL đã được nghiên cứu và phát triển gần đây, đồng thời đã được đăng ký thương mại hóa tại Việt Nam.

Tuy nhiên, các nghiên cứu nano hóa các hoạt chất chính trong dầu nghệ (từ cây Nghệ vàng) cho các ứng dụng trong nông nghiệp còn rất mới mẻ, và chưa có các đánh giá tác dụng của chúng đối với cây trồng và vi sinh vật hại cây trồng. Do đó, có nhu cầu cao về một quy trình công nghệ tạo ra một chế phẩm mới trên cơ sở nano hóa các hoạt chất chính từ dầu nghệ (cây nghệ Vàng) để phòng trừ bệnh, nhờ đó giúp người nông dân giảm đi việc sử dụng thuốc BVTV trong quá trình chăm sóc cây.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp

Bệnh thán thư là bệnh hại trên cây trồng, có thể gây hại trên các bộ phận từ lá, cành, chồi non, quả non. Bệnh gây ảnh hưởng nghiêm trọng tới năng suất, chất lượng cây trồng, cá biệt có trường hợp năng suất cây trồng giảm tới 100%. Bệnh được gây ra bởi tác nhân *Colletotrichum gloeosporioides*. Các nấm *Colletotrichum* spp. đứng thứ 8 trong số 10 loại nấm gây bệnh thực vật quan trọng nhất trên cấp độ khoa học và kinh tế, đặc biệt ảnh hưởng đến các cây trồng có tầm quan trọng kinh tế như hoa quả và cây cảnh. Bệnh do nấm xâm nhập và gây hại đến cả thân, lá, quả khiến lá khô rụng, cành héo úa, quả thối hỏng gây thiệt hại nặng nề đến năng suất cây trồng.

Đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng thuốc trừ nấm để trừ loại bệnh này, từ những loại thuốc trừ nấm gốc vô cơ tới những loại tổng hợp nhưng đều chưa có hiệu quả rõ rệt, lại gây ô nhiễm môi trường và sức khỏe con người. Các nghiên cứu gần đây về chế phẩm diệt nấm thán thư *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum gloeosporioides* và *Colletotrichum acutatum* với hoạt chất chính là các curcuminoids từ củ nghệ *Curcuma longa* đã được nghiên cứu và phát triển bởi nhóm nghiên cứu của TS. Kim Jin Cheol tại Hàn Quốc. Sản phẩm này đã được thương mại hóa và sử dụng trong bảo vệ cây trồng tại Hàn Quốc. Ngoài 3 loại nấm gây thán thư trên, dịch chiết etyl axetat từ củ nghệ còn có hoạt tính diệt các nấm *Botrytis cineria*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, và *Rhizoctonia solani*. Phần hỗn hợp chất không phân cực từ củ Nghệ gồm cả phần tinh dầu được thử nghiệm hoạt tính diệt côn trùng. Ar-Turmerone từ phần tinh dầu nghệ có hoạt tính chất diệt rầy nâu *Nilaparvata lugens*, diệt sâu tơ *Plutella xylostella*. Ngoài ra hoạt chất này còn có hoạt tính kháng nấm mốc sương *P. infestans* với thử nghiệm trên cây. Dịch chiết etyl axetat từ củ nghệ còn thể hiện hoạt tính với một thóc đỏ *Tribolium*

castaneum. Dịch chiết từ phần dầu của nghệ sau khi tách curcuminoid vẫn chưa được nghiên cứu về các hoạt tính phòng trừ dịch hại như kháng nấm và diệt côn trùng.

Dây chuyền sản xuất curcumin từ củ Nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) ở Việt Nam triển khai bước đầu đã đem lại hiệu quả kinh tế nhất định. Sản phẩm phụ là dầu sau kết tinh, tách curcuminoid sản sinh ra tính cho tới thời điểm hiện tại là rất lớn (khoảng gần 100 tấn, trong đó phần tinh dầu chiếm vào khoảng 5-10%). Phần nhựa keo có chứa curcuminoid chưa kết tủa hết và các dẫn xuất khác vẫn chưa được thử nghiệm hoạt tính trừ sâu sinh học.

Mục đích của giải pháp là đề xuất quy trình cho phép tạo ra một loại chế phẩm mới, bằng cách nano hóa các hoạt chất chính trong dầu nghệ, sử dụng các chất hoạt động bề mặt và polyme thân nước để vi bọc giữ các hoạt chất ở kích thước bé (kích thước nano). Quá trình vi bọc giữ các hoạt chất ở kích thước bé giúp tăng độ tan trong nước của các hoạt chất, tăng khả năng phân tán và giúp sự thẩm thấu thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào nấm, vi khuẩn, từ đó tăng hoạt lực ức chế nấm, vi khuẩn gây bệnh.

Mục đích của giải pháp là làm tăng hoạt lực của các hoạt chất trong tinh dầu nghệ. Để đạt được mục đích này, chúng tôi đã đề xuất quy trình chế tạo hệ vi nhũ tương nano hoạt chất trong tinh dầu nghệ phân tán tốt trong nước bằng cách tạo ra các hạt tiêu phân nano như curcuminoid, ar-turmerone có kích thước bé, đồng đều và có khả năng hòa tan tốt trong nước.

Theo một phương án, giải pháp đề xuất quy trình tạo ra chế phẩm nano thảo mộc từ dầu nghệ, bao gồm các công đoạn sau:

a) Thu cao chiết, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: bột nghệ (*Curcuma longa* L.), dung môi etanol,
- nạp bột nghệ vào bình cầu,
- nạp dung môi etanol 95% vào bình cầu,
- chiết hồi lưu bột nghệ với dung môi theo tỉ lệ và thời gian quy định,
- lọc tách bã thu được dịch chiết lần 1,

- bã chiết được tiến hành chiết 2 lần tiếp theo với dung môi và điều kiện tương tự như trên,

- lọc tách bã chiết thu được dịch chiết lần 2, lần 3 tương ứng,
- gộp dịch chiết ở lần 1, lần 2 và lần 3 thu được dịch A,
- cô quay đuổi dung môi thu được cao chiết B,

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ bột nghệ và dung môi chiết hồi lưu nằm trong khoảng 1/5 đến 1/3 (g/ml).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian chiết hồi lưu mỗi lần nằm trong khoảng 5 đến 7 giờ.

b) Tách curcuminoid và chiết phân bố dầu nghệ từ cao chiết, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: cao nghệ và dung môi kết tinh,

- nạp cao chiết B vào bình cầu,
- nạp từ từ dung môi kết tinh vào bình cầu,
- đun nóng bình cầu,
- lọc tách thu được tinh thể kết tinh lần 1 và phần dầu lần 1,
- cô cạn dung môi dầu lần 1 thu được phần rắn,
- phần rắn này tiếp tục được kết tinh hai lần liên tiếp theo với điều kiện như lần 1,

- lọc tách thu được tinh thể kết tinh lần 2, lần 3 tương ứng,

- gộp tinh thể kết tinh lần 1, lần 2 và lần 3 thu được sản phẩm C (chứa curcuminoid),

- phần dầu sau kết tinh lần 3 chứa dầu nghệ (turmeric oil) được nạp vào bình cầu cùng với n-hexan và metanol,

- tiến hành cô quay đuổi hết dung môi n-hexan thu được sản phẩm D (chứa dầu nghệ),

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, dung môi kết tinh là hỗn hợp n-

hexan và etyl axetat (H/E) với tỉ lệ là 77/23 (thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ dung môi kết tinh và cao chiết là 0,6/1 (thể tích/khối lượng).

c) Phối trộn tạo nano dầu nghệ, bao gồm các bước

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: dầu nghệ, dung môi etanol, polyetylen glycol (PEG), etylen glycol (EG), nước và chất nhũ hóa Acrysol K-140 (dầu thầu dầu đã hydro hóa poly oxyl 40 hay còn gọi là dầu thầu dầu PEG-40),

- nạp dầu nghệ (chứa hoạt chất curcuminoid và ar-turmerone) vào bình cầu,

- nạp dung môi etanol vào bình cầu,

- phân tán dầu nghệ trong dung môi etanol bằng máy khuấy từ, kết hợp với gia nhiệt ở nhiệt độ và thời gian quy định thu được dung dịch E,

- phân tán hỗn hợp chất mang PEG/EG trong nước bằng máy khuấy từ với tỉ lệ và thời gian quy định thu được dung dịch F,

- nạp dung dịch E và dung dịch F vào bình chứa chất nhũ hóa Acrysol K-140 với tỉ lệ quy định thu được hỗn hợp dịch G,

- đồng hóa hỗn hợp dịch G bằng thiết bị tạo nhũ siêu âm cao tần trong thời gian quy định thu được dung dịch đồng nhất H,

- để qua đêm dung dịch H,

- ly tâm dung dịch H ở tốc độ và thời gian quy định thu được sản phẩm hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ phân tán tốt trong nước,

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỉ lệ dầu nghệ và dung môi etanol nằm trong khoảng 40 ml/100 ml đến 80 ml/ 100 ml (thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, nhiệt độ cho quá trình phân tán dầu nghệ trong etanol là 40 °C đến 50 °C.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian phân tán dầu nghệ trong etanol là 4 đến 6 giờ.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, tỷ lệ PEG/EG/nước là

5,5g/20ml/10/ml (khối lượng/thể tích/thể tích).

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian tạo hỗn hợp chất mang là 1 đến 2 giờ.

Theo một phương án của giải pháp hữu ích, thời gian đồng hóa là 3 đến 5 giờ.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm của giải pháp sẽ trở nên rõ ràng hơn qua phần mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ cùng với hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là sơ đồ khối quy trình tách curcuminoid và chiết phân bố dầu nghệ từ cao chiết.

Hình 2 là hình minh họa sự phân bố kích thước hạt (a) và (b) thế zeta của hệ nhũ tương nano thảo mộc (từ dầu nghệ).

Hình 3 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM: Transmission Electron Microscopy) của mẫu nano.

Hình 4 là đồ thị thể hiện hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum acutatum* gây bệnh thán thư tại các nồng độ của chế phẩm nano dầu nghệ.

Hình 5 là đồ thị thể hiện hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư tại các nồng độ của chế phẩm nano dầu nghệ.

Hình 6 là đồ thị thể hiện hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum orbiculare* gây bệnh thán thư tại các nồng độ của chế phẩm nano dầu nghệ.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp sẽ được mô tả cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó các phương án làm ví dụ của giải pháp được thể hiện.

Theo một khía cạnh của giải pháp, chế phẩm thu được theo quy trình từ giải pháp được sử dụng để kháng nấm gây bệnh hại thán thư cây trồng, trong đó chế phẩm này chứa các hoạt chất curcuminoid và ar-turmerone dạng nano.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình tạo ra chế phẩm chế phẩm nano thảo mộc từ dầu nghệ, bao gồm các công đoạn sau:

Công đoạn a) là công đoạn thu cao chiết nghệ. Lượng bột nghệ được chiết hồi lưu với dung môi etanol 95% theo tỉ lệ bột nghệ và dung môi chiết hồi lưu nằm trong khoảng 1/5 đến 1/3 (g/ml). Thời gian chiết kéo dài từ 5 đến 7 giờ và sau đó lọc tách bã với dịch chiết. Bã chiết được tiến hành chiết 2 lần tiếp theo với dung môi và điều kiện tương tự như lần 1. Dịch chiết 3 lần được gộp lại và cô quay đuổi dung môi để thu cao chiết và thu hồi lại dung môi. Dung môi thu hồi của 3 lần được gộp lại và có thể tái chế, dùng làm dung môi ngâm chiết cho mẻ chiết sau. Cao chiết thu được sau khi gộp được tiến hành kết tinh curcuminoid và tách dầu nghệ để xác định lượng chất và hiệu quả chiết thu được.

Công đoạn b) là công đoạn tách curcuminoid và chiết phân bố dầu nghệ từ cao chiết. Các curcuminoid được tiến hành kết tinh theo quy trình sau: Cao chiết được đun nóng với dung môi kết tinh là n-hexan/etyl axetat(H/E) với tỉ lệ 77/23 về thể tích được bổ sung vào từng lượng nhỏ đến khi đạt cân bằng tới điểm hình thành tinh thể. Lượng dung môi sử dụng tương đương 0,6/1 về thể tích với khối lượng cao chiết. Sau khi lọc tách tinh thể phần dầu được cô cạn dung môi và kết tinh lại lần thứ 2 và 3. Lượng tinh thể của 3 lần kết tinh được gộp và sấy để cân khối lượng sản phẩm.

Phần dầu sau kết tinh chứa 30-40% dầu nghệ (turmeric oil) được tách riêng theo quy trình chiết phân bố với sự có mặt của dung môi bổ sung hexan và metanol. Lấy 500g cao dầu nghệ từ quá trình sản xuất curcuminoid, hòa tan hoàn toàn trong 200ml H₂O và 500ml metanol, sau đó cho thêm 500ml n-hexan. Cho toàn bộ hỗn hợp vào trong phễu chiết 2 lít, lắc đều, sau một thời gian hỗn hợp phân thành 2 lớp. Tách lấy lớp dung môi và phần ít phân cực ở lớp trên. Quá trình chiết lặp lại cho đến khi dịch chiết bên trên nhạt màu (3 lần). Các dịch chiết của pha n-hexan được gộp lại, rồi tiến hành cất loại dung môi n-hexan bằng cô quay tới kiệt thu turmeric oil (dầu nghệ). Dung môi hexan và metanol sau khi thu hồi có thể dùng để chiết phân bố trong các mẻ sau.

Công đoạn c) là công đoạn phối trộn tạo hệ nhũ tương chứa các hạt nano dầu nghệ, gồm các bước sau:

(i) chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho tinh dầu nghệ đã làm giàu hoạt chất curcuminoid và ar-turmerone trong dung môi etanol với tỷ lệ 40 ml/100ml và 80 ml/100ml (thể tích/thể tích) bằng máy khuấy từ với tốc độ khuấy 500 vòng/phút và

kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 40 - 50 °C trong thời gian 6 tiếng để tạo thành dung dịch đồng nhất.

Các hoạt chất curcuminoid, ar-turmerone trong dầu nghệ khó hòa tan trong nước. Với mục đích tạo ra các hạt tiểu phân chứa curcuminoid, ar-turmerone có kích thước nano và ổn định, nên cần phải sử dụng loại dung môi có độ hòa tan cao curcuminoid, ar-turmerone. Chúng tôi đã lựa chọn dung môi etanol để hòa tan các hoạt chất chính trong dầu nghệ. Bởi vì, etanol là dung môi có khả năng hòa tan được nhiều curcuminoid và có độ an toàn cao. Độ hòa tan của curcuminoid (curcumin) trong etanol là 10mg/ml, độ hòa tan trong nước <0,1 mg/ml, độ tan trong dầu khoảng 0,5 mg/ml,... Ngoài ra, việc sử dụng dung môi etanol có tính thân nước (có trị số HLB =15), nên có tác dụng ổn định cấu trúc hệ vi nhũ tương dầu trong nước do có gốc hydroxyl (OH-) tạo liên kết với nước. Tỷ lệ dầu nghệ/etanol ảnh hưởng đến độ hòa tan các hoạt chất, cũng như tạo độ đồng nhất của dung dịch thu được. Vì thế nếu lượng dầu nghệ càng lớn thì khả năng đồng nhất càng khó, đồng thời lượng etanol không đủ để hòa tan hết các hoạt chất chính trong dầu nghệ.

(ii) tạo hỗn hợp chất mang PEG/EG bằng cách phân tán đều hỗn hợp PG/EG trong nước với tỷ lệ PEG/EG/nước là 5,5g/20ml/10ml (khối lượng/thể tích/thể tích) trên máy rung siêu âm trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Bởi vì hệ vi nhũ tương theo nghiên cứu được sử dụng trong ngành nông nghiệp bền vững, thân thiện môi trường và con người, nên các chất được lựa chọn sử dụng phải có độ an toàn cao, không có độc tính và ít tác dụng phụ. Trong nội dung giải pháp này, chúng tôi đã lựa chọn các chất PEG và EG trong hỗn hợp chất mang, bởi vì hai chất này có độ an toàn cao, không có độc tính, ít tác dụng phụ và thường được sử dụng làm tá dược trong lĩnh vực dược phẩm.

Hơn nữa hỗn hợp chất mang PEG/EG này là các polyme thân nước (PEG có trị số HLB là 13-18 và EG có trị số HLB là khoảng 11-11,5), nên tăng khả năng thân nước của các hạt tiểu phân chứa nano curcuminoid, ar-turmerone, từ đó tăng độ hòa tan của các hạt tiểu phân chứa nano curcuminoid, ar-turmerone trong nước.

(iii) trộn pha phân tán và hỗn hợp chất mang PEG/EG trong thiết bị tạo nhũ có chứa chất nhũ hóa Acrysol K-140 với tỷ lệ tinh dầu nghệ/etanol/PEG/EG/nước/Acrysol K-140 là 80ml/100ml/5,5g/20ml/10ml/10ml

(thể tích/thể tích/khối lượng/thể tích/thể tích) trong thời gian 3 đến 5 giờ ở nhiệt độ phòng; sản phẩm thu được để qua đêm và được đem đi ly tâm 6 lần, ở tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 15 phút thu được sản phẩm cuối cùng dạng lỏng là dung dịch nano dầu nghệ chứa curcuminoid, ar-turmerone có cỡ hạt trong khoảng từ 70 đến 120 nm, trong đó hàm lượng curcuminoid từ 2% đến 3%, hàm lượng ar-turmerone từ 8% đến 12%.

Khi trộn pha phân tán và hỗn hợp chất mang PEG/EG trong thiết bị tạo nhũ có chứa chất nhũ hóa Acrysol K-140 thu được hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ chứa các hoạt chất curcuminoid, ar-turmerone. Bằng các nghiên cứu lý thuyết và thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy rằng để chế tạo hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ tan tốt trong nước, thì hệ nhũ tương này ở dạng nhũ tương dầu trong nước. Việc lựa chọn chất nhũ hóa để tăng tính bền của hệ vi nhũ tương dựa vào đặc điểm của hệ vi nhũ tương (dạng hệ vi nhũ tương dầu trong nước, dạng hệ vi nhũ tương nước trong dầu,...). Vì vậy, để chế tạo hệ vi nhũ tương dầu trong nước, chúng tôi đã lựa chọn chất nhũ hóa là Acrysol K-140, vì Acrysol K-140 là chất thân nước. Ngoài ra, hệ vi nhũ tương chế tạo trong nghiên cứu này được dung trong nông nghiệp hữu cơ (organic), bền vững, nên chúng tôi lựa chọn chất nhũ hóa Acrysol K-140 là vì Acrysol K-140 không có độc tính, độ an toàn cao và đặc biệt Acrysol K-140 có giá thành rẻ hơn so với một chất nhũ hóa thường dung là lexithin, do đó sẽ thuận lợi trong sản xuất quy mô công nghiệp ứng dụng trong nông nghiệp.

Do chất nhũ hóa Acrysol K-140 là phân tử có 2 phần riêng biệt, phần thân dầu và phần thân nước, nên có khả năng tạo liên kết với curcuminoid, ar-turmerone và hỗn hợp chất mang PEG/EG bằng cách phần thân dầu của Acrysol K-140 tạo liên kết với curcuminoid, ar-turmerone và phần thân nước của Acrysol K-140 tạo liên kết với phần thân nước của hỗn hợp chất mang PEG/EG tạo ra các hạt tiểu phân chứa nano dầu nghệ và với cấu trúc này các hạt tiểu phân đã bảo vệ tốt hoạt tính của các hoạt chất curcuminoid, ar-turmerone.

Hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ chứa các hoạt chất curcuminoid, ar-turmerone thu được có HLB trong khoảng từ 13-18 là hệ vi nhũ tương thân nước và hệ vi nhũ tương này thu được theo quy trình trên có các hạt tiểu phân curcuminoid, ar-turmerone ổn định có cỡ hạt nằm trong khoảng 70-120 nm, nên tăng độ hòa tan

trong nước và có thể thâm nhập dễ dàng qua màng tế bào nấm, vi khuẩn, từ đó tăng hoạt lực ức chế nấm, vi khuẩn gây bệnh.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được minh họa rõ hơn qua các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này không dùng làm giới hạn mục đích và phạm vi của giải pháp.

Ví dụ 1: Quy trình tạo hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ

Chuẩn bị pha phân tán bằng cách cho 40 ml dầu nghệ hòa tan trong 100 ml dung môi etanol 96° bằng máy khuấy từ có tốc độ 400 vòng/phút, kết hợp gia nhiệt ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 6 giờ để tạo thành dung dịch đồng nhất.

Tạo hỗn hợp chất mang PEG/EG bằng cách phân tán đều 5,5 g PEG 1000 và 20 ml EG trong 10 ml nước trên máy rung siêu âm trong thời gian 2 giờ ở nhiệt độ phòng.

Trộn pha phân tán và hỗn hợp chất mang trong thiết bị tạo nhũ LSP-500 với tần số là 20 kHz có 10 ml chất nhũ hóa Acrysol K-140 trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng, sản phẩm thu được để qua đêm và được cho vào máy Z206A của hãng Hermle (Đức) để ly tâm 6 lần ở tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 15 phút với mục đích loại bỏ lượng các hoạt chất dư không tạo thành hạt tiểu phân nano và thành phần tạp chất khác, thu được hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ chứa các hoạt chất curcuminoid, ar-turmerone phân tán tốt trong nước. Sau khi thu được hệ vi nhũ tương nano dầu nghệ phân tán tốt trong nước, ta tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích hiện đại thì cho được kết quả như sau:

Kết quả phân tích DLS cho 1 đỉnh duy nhất (tương ứng với kích thước 241 nm) như được thể hiện ở hình 2a, hoàn toàn không có sự kết khối, tạo ra các tập hợp hạt ở vùng kích thước hẹp, kích thước hạt tập trung trong khoảng 120-270 nm. Điều này khẳng định các tiểu phân nano phân tán đồng đều.

Trong hệ vi nhũ tương thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá cho sự ổn định. Do với thế zeta trong khoảng ± 30 mV, các hạt sẽ có xu hướng kết tụ (lực đẩy giữa các hạt không đủ lớn), trong khi nếu zeta ngoài khoảng ± 40 mV tập hợp hạt cũng mất sự ổn định của tập hợp hạt do khoảng cách quá xa giữa các hạt. Thế zeta đo được của mẫu đạt -31,6 mV (hình 2b). Như vậy, với kết

quả đo được thì thế zeta đạt được là khá tối ưu và khẳng định tính bền vững và ổn định của hệ.

Ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM-Transmission Electron Microscopy) của mẫu nano như được thể hiện ở hình 3 cho thấy các tiểu phân được nano hóa có cỡ hạt khoảng 70-120 nm hoàn toàn phù hợp với kết quả DLS phía trên. Kết quả kích thước thu được từ ảnh TEM nhỏ hơn so với kết quả thu được từ kết quả phân tích DLS là hoàn toàn phù hợp, vì kết quả phân tích DLS (phương pháp tán xạ ánh sáng động) là kích thước động, thu được từ một tập hợp hạt rất lớn, trong khi ảnh TEM chỉ quan sát một vùng nhỏ, số lượng hạt được quan sát bé, kích thước thu được là kích thước tĩnh.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về hoạt tính kháng nấm gây bệnh thán thư của chế phẩm nano dầu nghệ

Đối tượng nghiên cứu

Các chủng nấm gây bệnh thán thư được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *Colletotrichum orbiculare* (COK) và *Colletotrichum acutatum* (CA). Trong đó, *C. orbiculare* và *C. acutatum* được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu Triển khai các Hoạt chất Sinh học, Viện Hóa học Công nghiệp Việt Nam. Nấm *C. gloeosporioides* được phân lập từ quả thu hoạch từ xã Lục Ngạn, tỉnh Bắc Giang.

Môi trường phân lập và nuôi cấy được sử dụng trong nghiên cứu là môi trường WA (water agar) và PDA (Potato Dextrose Agar). Thành phần môi trường PDA gồm: khoai tây 250 g; đường glucose 15 g; agar 15 g ở điều kiện pH: 6,8-7,0.

Đánh giá hiệu quả kháng nấm của của nano dạng nhũ tương dầu nghệ (CRTO nano-elmulsion) trong điều kiện phòng thí nghiệm (*in vitro*): sử dụng phương pháp food-poisoned technique. Hoạt tính kháng nấm được thử trên các đĩa thạch petri với môi trường PDA. Các chủng nấm sau khi được phân lập và làm thuần, dùng dụng cụ đục lỗ có đường kính 4 mm tiến hành đục vành ngoài đường kính tán nấm sau đó đặt lên môi trường PDA đã trộn với mẫu thử. Mẫu thử là dầu nghệ được hòa tan bằng tween 0,05% và methanol 2% hoặc DMSO 2% ở các nồng độ khác nhau (0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; và 5 mg/mL) sau đó trộn vào môi trường PDA nóng chảy ở 50°C, đã khử

trùng và để nguội. Mỗi nồng độ khác nhau sẽ được thử nhắc lại 3 lần trên môi trường PDA. Đĩa petri sau khi được đưa nấm lên trên thạch đã được nuôi cấy ở nhiệt độ phòng. Theo dõi sự phát triển của nấm trong thời gian 2-4 ngày. Sau mỗi 2 ngày, quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và đo đường kính tản nấm. Hiệu quả ức chế được tính theo công thức:

$$C_v (\%) = 100 \times \frac{D_c - D_t}{D_c - 4}$$

Trong đó: D_c : đường kính tản nấm trên đĩa petri đối chứng; 4: đường kính khoanh agar-nấm, mm; D_t : đường kính tản nấm trên đĩa petri trộn mẫu thí nghiệm, mm.

Tỉ lệ phát triển của sợi nấm được tính theo công thức:

$$RGR (\text{mm/ngày}) = \frac{D_4 - D_2}{2}$$

Trong đó: D_4 : đường kính tản nấm trên đĩa petri trộn mẫu thí nghiệm ở ngày nuôi cấy thứ 4, mm; D_2 : đường kính tản nấm trên đĩa trộn mẫu thí nghiệm ở ngày nuôi cấy thứ 2, mm.

Bảng 3: Hiệu lực ức chế (Inhibition) và sự phát triển nấm (mycelial growth rate - MGR) của nano dạng nhũ tương dầu nghệ (CRTO nano-elmulsion)

Nồng độ(mg/mL)	C-A		C-G		COK	
	Hiệu lực ức chế (%)	Sự phát triển (mm/d)	Hiệu lực ức chế (%)	Sự phát triển (mm/d)	Hiệu lực ức chế (%)	Sự phát triển (mm/d)
0,3125	41,89 ± 0,81	6,40 ± 0,21	61,32 ± 1,40	3,28 ± 0,20	54,73 ± 1,74	3,58 ± 0,26
0,625	33,01 ± 0,58	8,86 ± 0,09	64,7 ± 1,49	3,21 ± 0,26	59,97 ± 1,93	3,15 ± 0,20
1,25	59,48 ± 0,59	3,96 ± 0,37	66,35 ± 1,05	3,05 ± 0,29	62,89 ± 1,45	2,76 ± 0,21
2,5	61,78 ± 0,48	3,74 ± 0,17	66,98 ± 2,36	3,28 ± 0,39	62,71 ± 0,70	2,96 ± 0,18
5	53,41 ± 1,03	5,90 ± 0,25	72,01 ± 2,40	2,79 ± 0,21	65,46 ± 1,55	2,96 ± 0,14
Đối chứng	0	11,11 ± 0,18	0	9,68 ± 0,47	0	8,20 ± 0,18

Kết quả nghiên cứu cho thấy nano nghệ thể hiện hoạt tính ức chế với cả ba nấm sử dụng trong thí nghiệm sau 4 ngày nuôi cấy (Hình 4 đến hình 6), tại nồng độ 1,25 mg/mL nano nghệ ức chế từ 50% sự phát triển của cả ba nấm, tốc độ phát triển ở các sợi nấm đều nhỏ hơn 4 mm/ngày. Nano nghệ ức chế rất tốt hai nấm *C. gloeosporioides* và *C. orbiculare* ở tất cả các nồng độ thử nghiệm, hiệu quả ức chế luôn đạt trên 50% và tốc độ phát triển đường kính tản nấm đều nhỏ hơn 3,6 mm/ngày (Hình 5 và Hình 6). Trong số ba nấm nghiên cứu, nano nghệ thể hiện hoạt tính ức

chế mạnh nhất đối với nấm *C. gloeosporioides*, hiệu quả ức chế đạt 72,01% tại nồng độ 5 mg/mL và 61,32% tại nồng độ thử nghiệm thấp nhất 0,3125 mg/mL (Hình 5b). Tương ứng với đó là tốc độ phát triển của nấm *C. gloeosporioides* tại hai nồng độ 5 và 0,3125 mg/mL nói trên là 2,79 và 3,28 mm/ngày (Hình 5a). Theo sau đó là khả năng ức chế *C. orbiculare* với hiệu quả ức chế ở nồng độ 5 mg/mL là 65,46% và 54,73% ở nồng độ 0,3125 mg/mL, tốc độ tản nấm tương ứng với hai nồng độ trên lần lượt là 2,96 và 3,58 mm/ngày (Hình 6). Nano nghệ có hoạt tính ức chế yếu nhất đối với nấm *C. acutatum* với 53,41% hiệu quả ức chế tại nồng độ thử nghiệm cao nhất là 5 mg/mL tương ứng với tốc độ phát triển đường kính tản nấm là 5,9 mm/ngày (Hình 4).

Lợi ích đạt được của giải pháp hữu ích

Như đã mô tả ở trên, sản phẩm tạo ra là chế phẩm BVTV nano thảo mộc thân thiện môi trường và có hiệu lực trừ nấm bệnh trên cây vải. Các đối tượng phòng trừ là nấm gây bệnh thán thư, loại bệnh gây hại cây vải thường gặp khi cây bắt đầu ra hoa và quả non. Bệnh gây hại nặng nề đối với chất lượng quả vải vì vậy làm giảm giá thành vải thành phẩm khi tiêu thụ cũng như xuất khẩu. Việc tạo ra sản phẩm mới thay thế phần nào thuốc hóa học độc hại khi sử dụng và giảm dư lượng thuốc hóa học trên sản phẩm góp phần tăng giá trị cho quả vải thành phẩm tạo ra chuỗi giá trị vải sạch và an toàn cho khu vực tỉnh Bắc Giang.

Ngoài ra, chế phẩm nano thảo mộc (dầu nghệ) tạo ra theo giải pháp có thể mở rộng kết hợp với một số hoạt chất khác như anthraquinon, nano bạc, hoặc nano chitosan sẽ giúp tăng hiệu quả trị bệnh và tính chống chịu cho cây. Đây là điểm độc đáo trong sản phẩm của giải pháp.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Ước tính sử dụng thuốc BVTV từ 2-3 triệu đồng/ha/vụ cây trồng vải. Như vậy nhu cầu sử dụng thuốc BVTV là hiện hữu. Số lượng thuốc BVTV sinh học hiện nay chỉ chiếm 19% tổng số thuốc BVTV được sử dụng. Chính vì vậy thị trường cho phát triển thuốc BVTV thảo mộc, nano cho cây vải còn rất nhiều cơ hội và thị phần sẵn có. Yêu cầu đặt ra đó là chất lượng sản phẩm và giá hợp lý với phân khúc thị trường cho cây vải, khi đó sản phẩm sẽ cho sức sống và có thể lan rộng ra các tỉnh lân cận.

Sản phẩm của giải pháp sẽ tiếp tục được thử nghiệm và ứng dụng làm thuốc BVTV trừ bệnh thán thư gây hại cây vải trên địa bàn các huyện Lục Ngạn, Tân Yên tại Bắc Giang. Ngoài ra có thể nhân rộng thử nghiệm ra các tỉnh trồng vải lân cận hoặc áp dụng cho các vùng chuyên canh rau, cây trồng (có bệnh thán thư) theo tiêu chuẩn Việt GAP, sản xuất rau hữu cơ. Ngoài ra có thể sử dụng đối với các vùng trồng dược liệu sạch hoặc hoa lan, hoa cây cảnh cao cấp.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm nano dầu nghệ kháng nấm, trong đó quy trình này bao gồm các công đoạn:

a) thu cao chiết bằng cách:

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: bột nghệ (*Curcuma longa* L.), dung môi etanol,

- nạp bột nghệ vào bình cầu,

- nạp dung môi vào bình cầu,

- chiết hồi lưu bột nghệ với dung môi theo tỉ lệ bột nghệ và dung môi chiết hồi lưu nằm trong khoảng 1/5 đến 1/3 (g/ml), trong thời gian từ 5 đến 7 giờ,

- lọc tách bã thu được dịch chiết lần 1,

- bã chiết được tiến hành chiết 2 lần tiếp theo với dung môi và điều kiện tương tự như lần 1,

- lọc tách bã chiết thu được dịch chiết lần 2, lần 3 tương ứng,

- gộp dịch chiết ở lần 1, lần 2 và lần 3 thu được dịch A,

- cô quay đuổi dung môi thu được cao chiết B,

b) thu dầu nghệ từ cao chiết bằng cách:

- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: cao nghệ và dung môi kết tinh,

- nạp cao chiết B vào bình cầu,

- nạp từ từ dung môi kết tinh là n-hexan/etyl axetat (H/E) với tỉ lệ 77/23 về thể tích vào bình cầu,

- đun nóng bình cầu với tỉ lệ dung môi và cao chiết là 0,6/1 (thể tích ml/khối lượng gam),

- lọc tách thu được tinh thể kết tinh lần 1 và phần dầu lần 1,

- cô cạn dung môi dầu lần 1 thu được phần rắn,
 - phần rắn này tiếp tục được kết tinh hai lần liên tiếp theo với điều kiện như lần 1,
 - lọc tách thu được tinh thể kết tinh lần 2, lần 3 tương ứng,
 - gộp tinh thể kết tinh lần 1, lần 2 và lần 3 thu được sản phẩm C (chứa curcuminoid),
 - phần dầu sau kết tinh lần 3 chứa dầu nghệ (turmeric oil) được hòa tan hoàn toàn trong hỗn hợp nước và metanol theo tỉ lệ là 500g cao dầu/200 ml nước/500 ml metanol thu được hỗn dịch C, nạp vào bình cầu cùng với n-hexan và metanol,
 - nạp hỗn dịch C vào phễu chiết,
 - nạp từ từ n-hexan vào phễu chiết theo tỉ lệ thể tích metanol và n-hexan là 1/1, lắc đều trong thời gian 2 giờ, sau đó để yên đến khi phân thành 2 lớp,
 - thu lấy phần dịch chiết phía trên, tiến hành chiết lần 2, lần 3 với điều kiện tương tự như chiết lần 1 thu được dịch chiết D,
 - tiến hành cô quay dịch chiết D để đuổi hết dung môi n-hexan thu được sản phẩm E (chứa dầu nghệ),
- c) nano hóa các hoạt chất tạo dung dịch nano dầu nghệ để thu chế phẩm kháng nấm bằng cách:
- định lượng các thành phần cần thiết dùng cho công đoạn này, cụ thể là: dầu nghệ, dung môi etanol, polyetylen glycol (PEG), etylen glycol (EG), nước và chất nhũ hóa Acrysol K-140 (dầu thầu dầu đã hydro hóa poly oxyl 40 hay còn gọi là dầu thầu dầu PEG-40),
 - nạp dầu nghệ (chứa hoạt chất curcuminoid và ar-turmerone) vào bình cầu,
 - nạp dung môi etanol vào bình cầu, trong đó tỉ lệ dầu nghệ và etanol nằm trong khoảng từ 40 ml/100 ml đến 80 ml/100 ml,
 - phân tán dầu nghệ trong dung môi etanol bằng máy khuấy từ, kết hợp với gia nhiệt ở nhiệt độ 40 đến 50 °C trong thời gian 6 giờ thu được dung dịch đồng nhất F,
 - phân tán hỗn hợp chất mang PEG/EG trong nước bằng máy khuấy từ với tỉ lệ

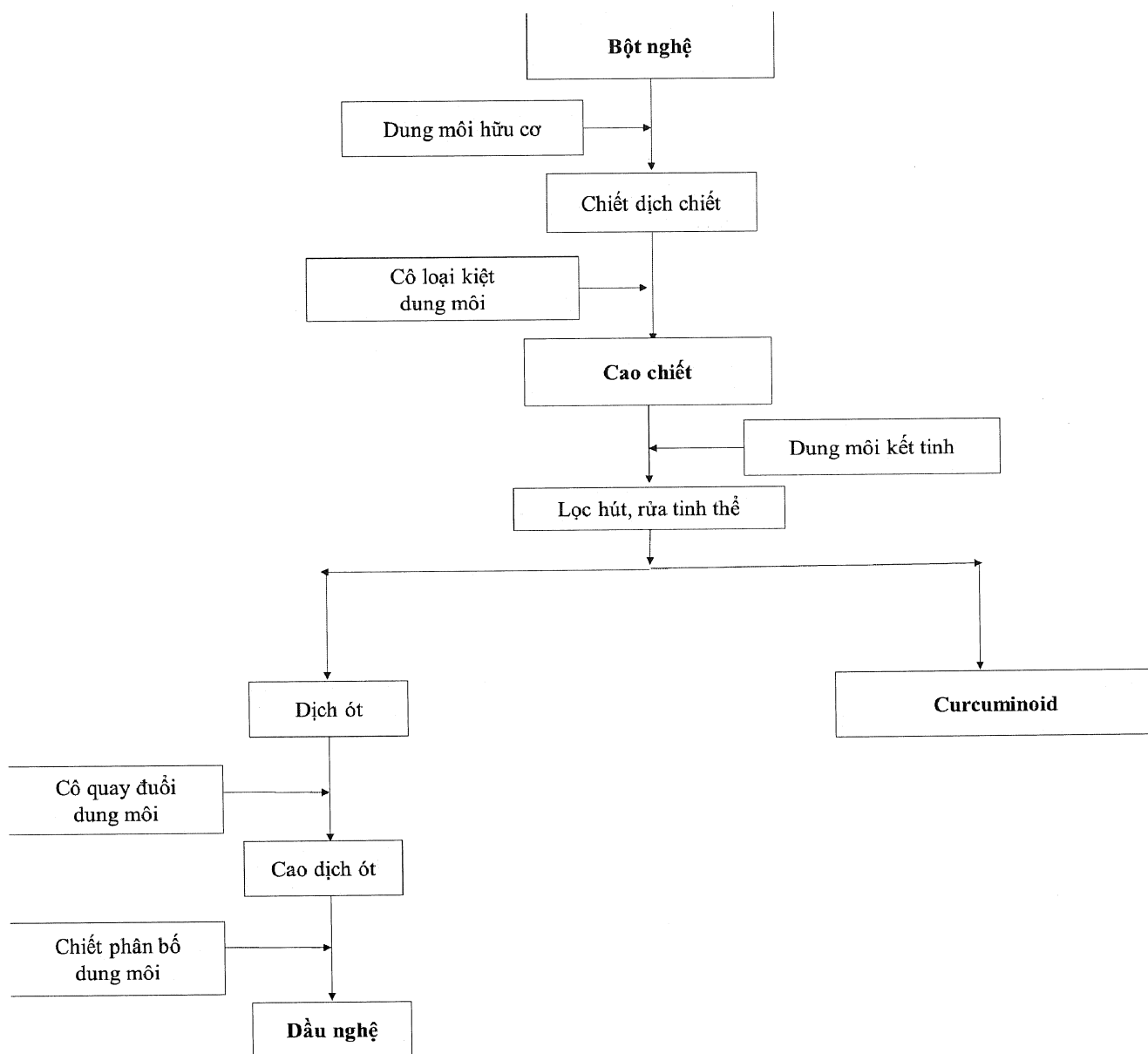
PEG/EG/nước là 5,5g/20ml/10ml (khối lượng/thể tích/thể tích) trong thời gian 2 giờ thu được dung dịch G,

- nạp dung dịch F và dung dịch G vào bình chứa chất nhũ hóa Acrysol K-140 với tỉ lệ dầu nghệ/etanol/PEG/EG/nước/Acrysol K-140 là 80ml/100ml/5,5g/20ml/10ml/10ml (thể tích/thể tích/khối lượng/thể tích/thể tích) trong thời gian 3 đến 5 giờ ở nhiệt độ phòng thu được hỗn hợp dịch H,

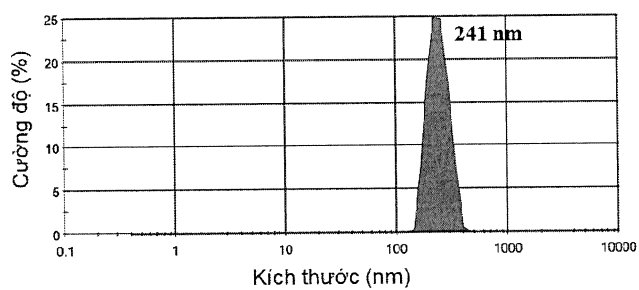
- đồng hóa hỗn hợp dịch H bằng thiết bị tạo nhũ trong thời gian 3 đến 5 giờ thu được dung dịch đồng nhất I,

- để qua đêm dung dịch I,

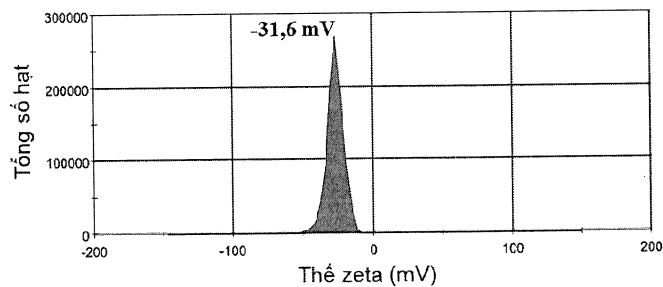
- ly tâm dung dịch I ở tốc độ 6000 vòng/phút trong thời gian 15 phút thu được sản phẩm dạng lỏng là chế phẩm kháng nấm, trong đó chứa curcuminoid, ar-turmerone có cỡ hạt trong khoảng từ 70 đến 120 nm.



Hình 1

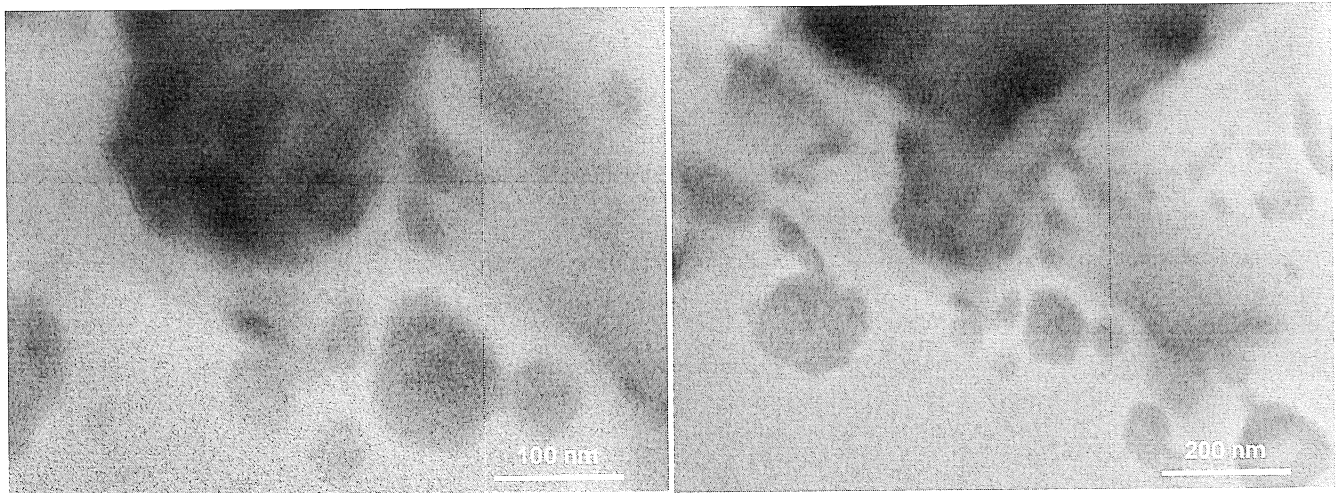


(a)

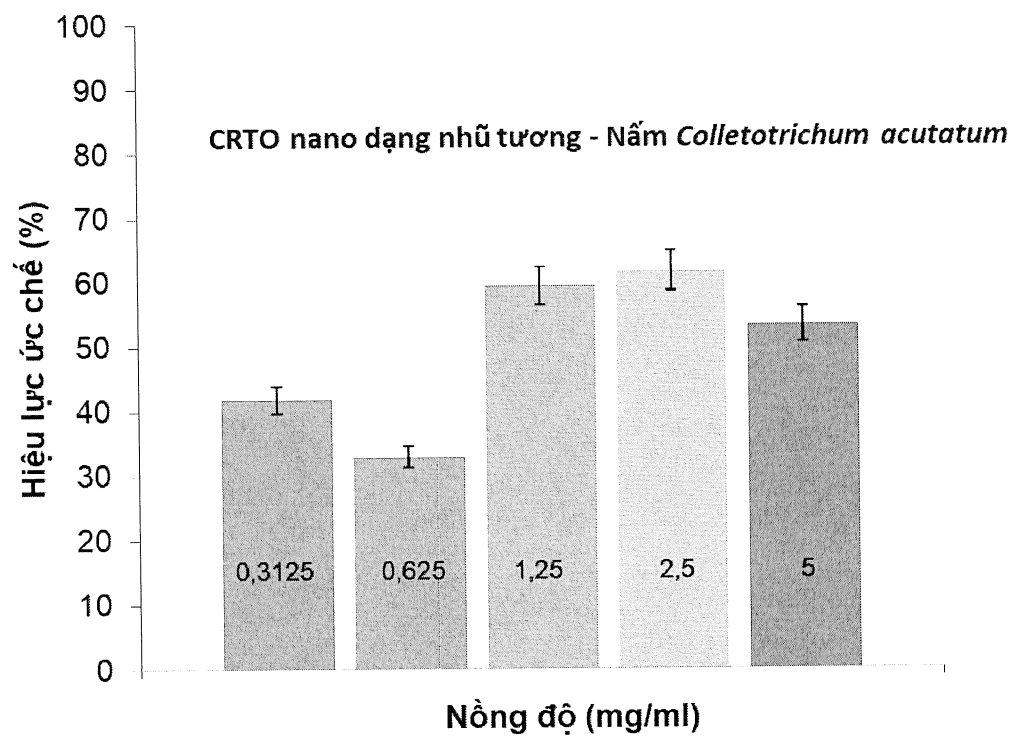


(b)

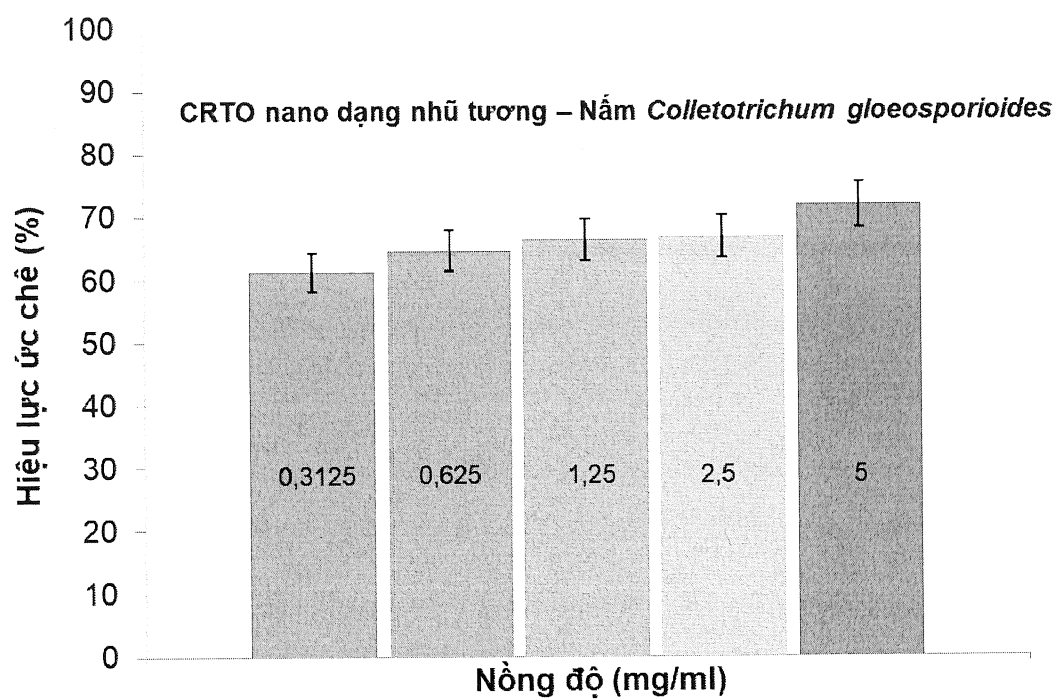
Hình 2



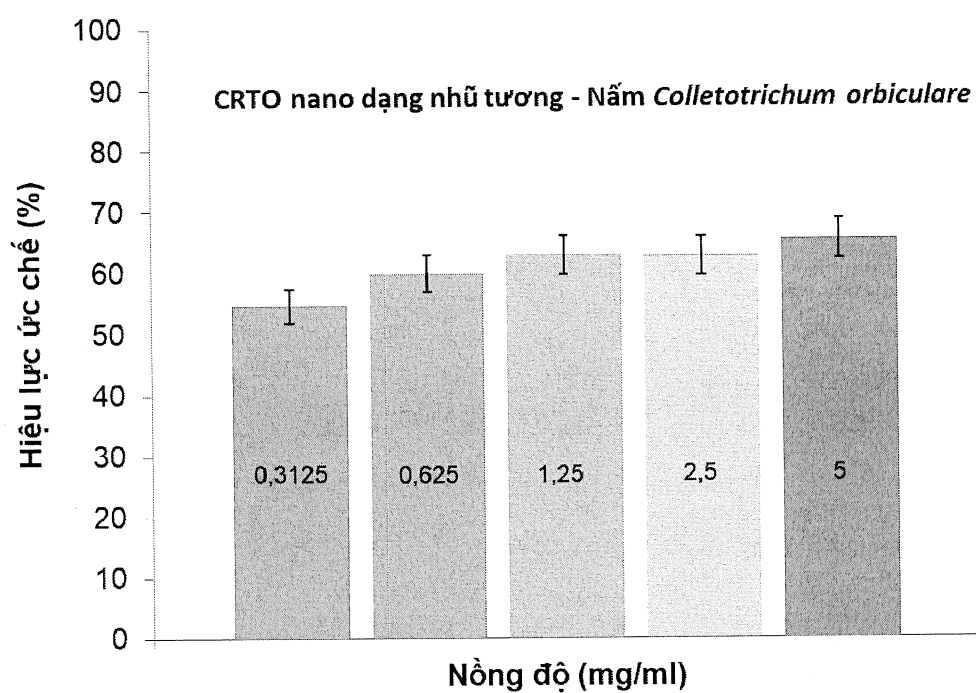
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6