

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN QUÁ TRÌNH SINH TRƯỞNG VÀ SINH PROTEASE NGOẠI BÀO CỦA CHỦNG *Bacillus subtilis* NT20

Ngô Đức Quốc, Hồ Thị Diệu Hiền, Đinh Thị Hòa, Phùng Thị Bích Hòa*

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Phần lớn các chủng *Bacillus subtilis* biểu hiện protease cũng như lượng enzyme tiết ra thay đổi tùy thuộc vào chủng và điều kiện môi trường được sử dụng. Nghiên cứu này nhằm lựa chọn một số điều kiện nuôi cấy tối ưu cho sự sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp protease ngoại bào của chủng *Bacillus subtilis* NT20. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng được đánh giá dựa trên mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy đo ở bước sóng 600 nm bằng máy đo màu quang phổ và hoạt độ protease được đánh giá dựa trên sự thủy phân casein. Các điều kiện nuôi cấy được lựa chọn bao gồm nguồn carbon, nguồn nitrogen, pH và độ thoáng khí của môi trường LB cơ bản. Chủng *B. subtilis* NT20 đạt năng suất sinh khối cao nhất là OD₆₀₀ 2,0 với hoạt độ protease đạt 235,6 U/mL trong điều kiện nuôi cấy sử dụng 2,0% (w/v) glucose là nguồn carbon chính, 2,5% (w/v) peptone là nguồn nitrogen chính, pH 8, độ thoáng khí 92%, nhiệt độ 37°C và lắc 200 rpm sau 24 giờ.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, điều kiện nuôi cấy, mật độ tế bào, protease, vi khuẩn.

MỞ ĐẦU

Protease là một trong những enzyme công nghiệp quan trọng nhất, chiếm gần 60% tổng sản lượng enzyme trên toàn thế giới (Kalisz *et al.*, 2006). Protease có trong động vật, thực vật và vi sinh vật (Sharma *et al.*, 2017). Protease được sử dụng rộng rãi trong chất tẩy rửa, ngành công nghiệp da, chẩn đoán y tế, phim X-quang, trong ngành công nghiệp dệt, thực phẩm và thức ăn chăn nuôi. Do đó, nhiều công ty đã bắt đầu sản xuất protease thương mại (Keshapaga *et al.*, 2023).

Khi phân lập enzyme protease ở quy mô công nghiệp cho mục đích thương mại, tối ưu hóa chi phí là vấn đề được quan tâm. Vì vậy, protease vi khuẩn là một trong những lựa chọn tốt nhất. Ở vi khuẩn, protease chủ yếu được sản xuất ngoại bào, có hiệu suất cao, chịu được nhiệt độ cao và hoạt động trong phạm vi pH rộng nên phù hợp hơn cho các ứng dụng công nghiệp (Adrio, Demain, 2014).

Chi *Bacillus* là nguồn vi khuẩn quan trọng nhất trong sản xuất protease ngoại bào và có khả năng sản xuất ra nhiều enzyme phân giải protein trung tính và kiềm với các đặc tính đáng chú ý, như độ ổn định cao đối với nhiệt độ khắc nghiệt, độ pH, dung môi hữu cơ, chất tẩy rửa và hợp chất oxy hóa. *B. subtilis* được sử dụng rộng rãi như một nhà máy "tế bào" sản xuất các enzyme, hợp chất kháng vi sinh vật cho ngành hóa công nghiệp, nông nghiệp và y học (Zhang *et al.*, 2023). Mỗi vi sinh vật hoặc chủng có các điều kiện cụ thể để sản xuất enzyme tối đa (Sharma *et al.*, 2017). Do đó, đã có một số nghiên cứu để sản xuất protease từ chi *Bacillus* có hiệu quả về mặt chi phí, bao gồm xác định các điều kiện nuôi cấy và điều kiện sản xuất enzyme (Işık *et al.*, 2024).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định các điều kiện nuôi cấy tối ưu của chủng *B. subtilis* NT20 để cải thiện khả năng sinh protease kiềm ngoại bào.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* NT20 được phân lập từ cỏ khô và được lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Di truyền và Vi sinh, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế.

Chủng được giữ trong glycerol 30% (v/v) ở -80°C. Trước khi sử dụng, chủng được hoạt hóa trên môi trường LB (Luria-Bertani) rắn và giữ ở 4°C. Môi trường LB cơ bản (w/v) gồm: 1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl.

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy

Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng *B. subtilis* NT20 được nghiên cứu độc lập với nhau bằng cách thay đổi các yếu tố khảo sát trong môi trường LB cơ bản. Kết quả của thí nghiệm trước sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Các yếu tố của môi trường cơ bản không thay đổi trong quá trình khảo sát bao gồm: nhiệt độ 30°C, nuôi lắc 200 vòng/phút (rpm), thời gian nuôi 24 giờ.

Ảnh hưởng của nồng độ đường glucose

Nguồn carbon được bổ sung vào môi trường LB cơ bản là glucose (w/v) với nồng độ khảo sát 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Ảnh hưởng của nồng độ nitrogen

Nguồn nitrogen được bổ sung để thay thế nguồn nitrogen trong môi trường LB cơ bản là peptone với nồng độ khảo sát 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 và 3%.

Ảnh hưởng của pH

Tiến hành lên men chủng *B. subtilis* NT20 trong các nghiệm thức chứa môi trường LB với các giá trị pH lần lượt là 6; 6,5; 7; 7,5; 8 và 8,5.

Ảnh hưởng của độ thoáng khí

Độ thoáng khí được tính bằng tỉ lệ thể tích bình trống (không chứa môi trường) trên thể tích toàn bình, độ thoáng khí càng cao thì nồng độ oxy hòa tan vào môi trường càng lớn. Chủng *B. subtilis* NT20 được lên men trong các bình 250 mL chứa môi trường với thể tích lần lượt 10; 20; 30; 40; 50 và 60 mL.

Xác định mật độ vi khuẩn

Dịch nuôi cấy của chủng *B. subtilis* NT20 sau 24 giờ nuôi cấy lỏng với tốc độ lắc 200 rpm ở 30°C ở các điều kiện khảo sát khác nhau được pha loãng 40 lần với nước cất 2 lần và được đo bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm (OD₆₀₀) để xác định mật độ vi khuẩn (Li *et al.*, 2023). Đối chứng là môi trường LB cơ bản.

Thu nhận protease

Song song với việc xác định mật độ vi khuẩn, tiến hành thu protease thô từ canh trường nuôi cấy bằng cách ly tâm 14000 rpm trong 10 phút ở 4°C. Dịch enzyme thô được bảo quản ở 4°C và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo (Shad *et al.*, 2024).

Xác định hoạt độ protease

Hoạt độ protease trong dịch enzyme thô được xác định dựa trên sự thủy phân protein bằng protease (Chandrasekaran *et al.*, 2015), sử dụng casein làm chất nền. Dung dịch casein (0,65%) được chuẩn bị trong đệm Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5). 5 mL dung dịch casein 0,65% được cho vào các ống nghiệm, ủ ở 37°C trong 5-10 phút. 1 mL enzyme thô được thêm vào mỗi ống nghiệm, lắc nhẹ và ủ ở 37°C trong 30 phút. Phản ứng được dừng lại bằng cách thêm 10% (w/v) Trichloroacetic acid lạnh (TCA). Các ống nghiệm được ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó mẫu được ly tâm ở 4°C, 14000 rpm trong 10 phút. Sau đó, 2 mL dịch nổi được cho vào ống nghiệm mới, thêm vào đó 5 mL Na₂CO₃ 0,5 M và 1 mL thuốc thử Folin's Ciocalteus 1 N. Hỗn hợp này được khuấy nhẹ, ủ trong 30 phút ở 37°C đến khi xuất hiện màu xanh lam. Độ hấp thụ màu xanh lam được ghi nhận ở bước sóng 660 nm so với mẫu thuốc thử trắng (môi trường LB cơ bản) bằng máy quang phổ.

Sau đó, dựa vào đồ thị chuẩn của tyrosin để tính lượng sản phẩm do enzyme xúc tác tạo nên. Đồ thị đường chuẩn tyrosin và hoạt độ enzyme được xác định theo mô tả bởi Lowry và đồng tác giả (1951) có cải tiến.

Nồng độ tyrosine được tính toán bằng phương trình hồi quy từ đường cong tyrosine chuẩn. Hoạt độ của enzyme (U/mL) được tính toán bằng công thức được đưa ra bởi Tunga và đồng tác giả (2003).

$$\text{Hoạt độ protease (U/mL)} = \frac{T \times V1}{t \times V2 \times V3}$$

Trong đó:

T: μ M tyrosine giải phóng

V1: Tổng thể tích hỗn hợp phản ứng (mL)

t: Thời gian phản ứng (phút)

V2: Thể tích enzyme dùng cho phản ứng (mL)

V3: Thể tích dùng để đo cường độ quang sau khi phản ứng với thuốc thử Folin (mL)

Một đơn vị hoạt độ protease được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để thủy phân casein giải phóng 1 μ M tyrosine trong một phút ở điều kiện thử nghiệm chuẩn về pH và nhiệt độ.

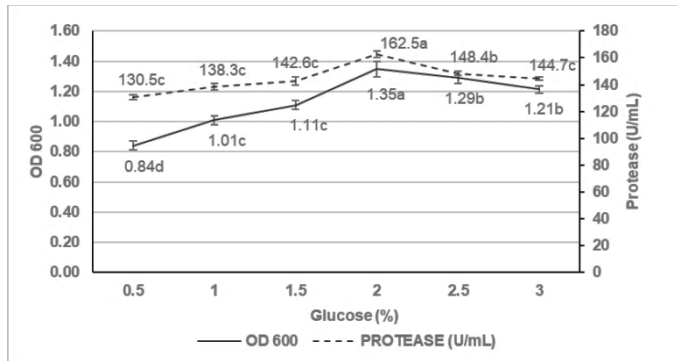
Xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Số liệu thu thập được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học bằng chương trình thống kê trong Excel 2010 và dữ liệu được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình của ba lần lặp lại \pm sai số chuẩn trong one-way ANOVA với Duncan's test ($p < 0,05$) bằng chương trình SPSS (ver. 20.0).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ carbon đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

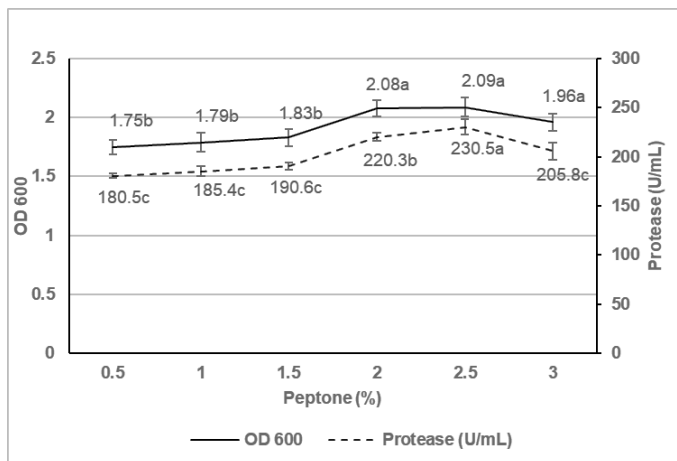
Nguồn carbon là glucose cho thấy, mật độ chủng *B. subtilis* NT20 đạt giá trị cao nhất là 1,35 ở nồng độ 2% (Hình 1). Khi nồng độ glucose thấp hơn (từ 0,5% đến 1,5%), mật độ vi khuẩn đạt từ 0,84 đến 1,11, quá thấp không đủ để kích thích quá trình sinh tổng hợp protease mạnh. Ngược lại, khi bổ sung nồng độ glucose cao từ 2,5% đến 3%, mật độ vi khuẩn giảm dần từ 1,29 còn 1,21. Đồng thời với xác định mật độ vi khuẩn trong các nồng độ glucose khảo sát, chúng tôi tiến hành xác định hoạt độ của protease ngoại bào, kết quả cho thấy hoạt độ protease tỉ lệ thuận với mật độ vi khuẩn. Hoạt độ protease ở glucose 2% đạt cao nhất (162,5 U/mL). Trên cơ sở đó, glucose 2% được chọn là nguồn carbon cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Protease từ *Bacillus* phần lớn được sản xuất trong pha tĩnh và do đó, việc điều chỉnh hàm lượng carbon ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn và khả năng sinh protease ngoại bào của vi khuẩn. Quá trình sản xuất protease tiêu tốn nhiều năng lượng. Khi nguồn glucose dồi dào, vi khuẩn sẽ tiết kiệm năng lượng bằng cách giảm tổng hợp các protein không cần thiết, bao gồm cả protease để tối đa hóa hiệu quả tăng trưởng (Adeniyi, 2023). Hàm lượng glucose cao cũng có thể làm thay đổi quá trình chuyển hóa bên trong tế bào, dẫn đến sự thay đổi các con đường chuyển hóa glucose có lợi cho tế bào thay vì tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp như protease (Liu *et al.*, 2024).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

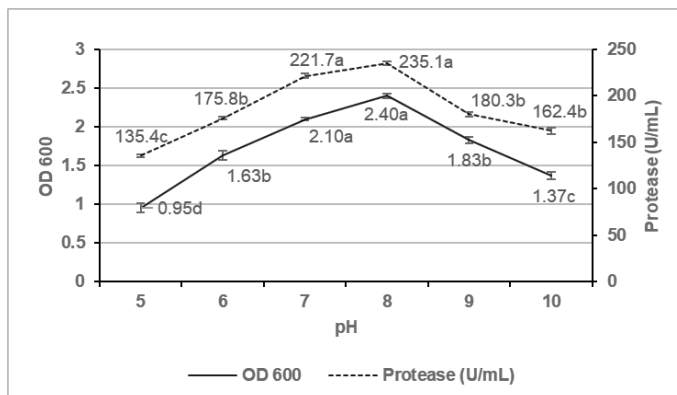
Kết quả Hình 2 cho thấy, với nồng độ 2,5% peptone trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng của chủng *B. subtilis* NT20 với mật độ đạt cao nhất là 2,98. Khi nồng độ peptone thấp hơn (từ 0,5% đến 2,0%), mật độ vi khuẩn đo được từ 1,75 đến 2,08. Ngược lại khi bổ sung nồng độ peptone cao trên 2,5% mật độ vi khuẩn giảm dần từ 2,09 còn 1,96. Đồng thời với sự tăng mật độ vi khuẩn ở nồng độ peptone từ 2-2,5%, hoạt độ protease cũng đạt cao nhất ở peptone 2,5% (230,5 U/mL). Do đó, peptone nồng độ 2,5% được chọn là nguồn peptone cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Nguồn nitrogen và nồng độ của nó trong môi trường nuôi cấy là những yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protease (Zhang *et al.*, 2023). Mỗi loài vi khuẩn khác nhau sẽ thích hợp với tỉ lệ carbon/nitrogen trong môi trường sống nhất định (Carvalho *et al.*, 2010). Nguồn nitrogen đóng vai trò cung cấp cơ chất để vi khuẩn tổng hợp nên các hợp chất chứa nitrogen cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của chúng. Do đó nguồn nitrogen bổ sung vào môi trường cần phải cân đối với nguồn carbon mà vi khuẩn đang sử dụng.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ peptone đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

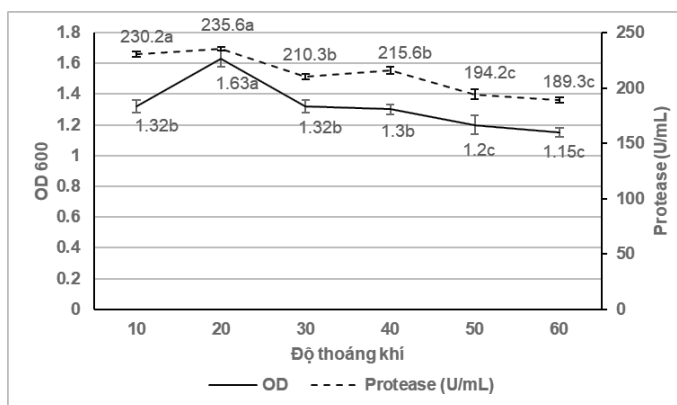
pH ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng của vi sinh vật. Kết quả cho thấy (Hình 3), mật độ chủng *B. subtilis* NT20 khi nuôi cấy trong môi trường pH 8,0 đạt hiệu quả cao nhất là 2,40, đồng thời hoạt độ protease của dịch enzyme thô cũng thu được với kết quả cao nhất, đạt 235 U/mL, sau đó hoạt độ protease giảm dần ở pH 9-10. Ở pH acid (pH 5-6) cũng làm giảm sự sinh trưởng của vi khuẩn và khả năng sản xuất enzyme (Pan *et al.*, 2023). Vì vậy, pH 8 được chọn là pH môi trường trong các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả pH của chủng *B. subtilis* NT20 trong nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu khác. Theo nghiên cứu của Anandharaj và đồng tác giả (2016) cho thấy, pH 8,0 là thích hợp nhất để thu protease có hoạt tính cao nhất từ *B. alkalitelluris* TW13. Kết quả nghiên cứu của Sun và đồng tác giả (2023) cũng cho thấy pH 8,0 tạo ra hoạt độ của protease kiềm tối đa (640 U/mL).



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến sinh khối và khả năng sinh protease ngoại bào của *B. subtilis* NT20

Các loài *Bacillus* là vi khuẩn kỵ khí tùy ý, và chúng có thể phát triển trong điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí (Carlso *et al.*, 2020). Tuy nhiên, dưới sự hiện diện của oxy, các loài này phát triển tốt hơn so với các điều kiện mà oxy bị hạn chế hoặc không có. Thông thường, đối với các vi khuẩn hiếu khí nồng độ oxy cao làm tăng khả năng sinh trưởng, rút ngắn pha tiềm phát. Nồng độ oxy thấp có thể ức chế, làm suy giảm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (Zhang *et al.*, 2023).



Hình 4. Ảnh hưởng của độ thoáng khí đến mật độ vi khuẩn và hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20

Kết quả ở Hình 4 cho thấy, mật độ vi khuẩn tỷ lệ thuận với độ thoáng khí trong bình nuôi cấy. Mật độ vi khuẩn đạt cao nhất 1,63 khi nuôi cấy trong môi trường có độ thoáng khí 92% với thể tích môi trường nuôi cấy là 20 mL dịch môi trường nuôi cấy/thể tích bình nuôi cấy 250 mL, mật độ vi khuẩn giảm dần khi tăng lượng môi trường nuôi cấy. Hoạt độ protease của *B. subtilis* NT20 cao nhất ở môi trường có độ thoáng khí 92%. Lượng môi trường nuôi cấy ban đầu tối ưu là điều cần thiết cho quá trình sản xuất protease. Nếu lượng môi trường nuôi cấy quá ít, số lượng vi khuẩn không đủ, từ đó sẽ kéo dài thời gian lên men và làm giảm sản lượng sản phẩm mục tiêu tạo ra; ngược lại, lượng môi trường nuôi cấy quá lớn cũng sẽ gây ra tình trạng thiếu oxy hòa tan và ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp sản phẩm mục tiêu. Việc tìm ra độ thoáng khí tối ưu là rất quan trọng trong quá trình lên men (Zhang *et al.*, 2023). Điều này phù hợp với nghiên cứu của Suttikul và đồng tác giả (2022) ở chủng *B. subtilis* GD5 tạo ra nồng độ 2,3-BD cao nhất (7,28 g/L) ở điều kiện hiếu khí. Hoạt động của enzyme protease tăng khi dịch nuôi cấy tăng và đạt tối đa ở mức 5%. Khi dịch nuôi cấy tiếp tục tăng, hoạt động của enzyme protease có xu hướng giảm.

KẾT LUẬN

Chủng *B. subtilis* NT20 trong nghiên cứu này cho thấy khả năng sinh trưởng và sinh protease ngoại bào cao nhất (OD_{600} 2,0; 235,6 U/mL) khi nuôi cấy trong môi trường tối ưu chứa nguồn carbon là glucose với nồng độ 2%, nitrogen là peptone với nồng độ 2,5%, pH 8,0 và độ thoáng khí 92% (20/250 mL) ở nhiệt độ 30°C, nuôi lắc 200 rpm và thời gian nuôi 24 giờ.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ từ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp Trường với mã số T.24.TN.106.10.

Tài liệu tham khảo

- Adeniyi AT (2023). *Development of Bioprocessing for Biological Ammonia Production* (Master's thesis, North Dakota State University).
- Adrio J, Demain AL (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomol*, 4(1): 117-139.
- Carlson HK, Lui LM, Price MN, Kazakov AE, Carr AV, Kuehl JV, Owens TK, Nielsen T, Arkin AP, Deutschbauer AM (2020). Selective carbon sources influence the end products of microbial nitrate respiration. *ISME J*, 14(8): 2034-2045.
- Carvalho ALUD, Oliveira FHPCD, Mariano RDLR, Gouveia ER, Souto-Maior AM (2010). Growth, sporulation and production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* R14. *Braz Arch Biol Technol*, 53: 643-652.
- Chandrasekaran S, Kumaresan SSP, Manavalan M (2015). Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvavur District Tamilnadu. *J Appl Biol Biotechnol*, 3(6): 66-69.
- Işık K, Yirtıcı Ü, Güldeste B, Ergene A (2024). Molecular identification of protease producer ORSK-4 strain and determination of optimum enzyme production conditions. *Eurasian J Bio Chem Sci*, 7(1): 26-40.
- Kalisz HM (2006). Microbial proteinases. *Enzyme studies*, 1-65.
- Keshapaga UR, Jathoth K, Singh SS, Gogada R, Burgula S (2023). Characterization of high-yield *Bacillus subtilis* cysteine protease for diverse industrial applications. *Braz J Microbiol*, 54(2): 739-752.
- Li J, Yang J, Xin W, Wu S, Wang X, Wang C, Zhang Z (2023). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by a combination of high-pressure thermal treatment and potassium sorbate. *Food Microbiol*, 115: 104345.
- Liu Y, Sun G, Li J, Cheng P, Song Q, Lv W, Wang C (2024). Starter molds and multi-enzyme catalysis in koji fermentation of soy sauce brewing: A review. *Food Res Int*, 114273.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A L, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1): 265-275.
- Pan I, Nanjundan K, Achuthan A, Issac P K, Rajagopal R, Chang SW, Bhat SA, Ravindran B (2023). Exploration of compost soil for the production of thermo-stable *Bacillus* protease to synthesize bioactive compounds through soy protein hydrolysis. *Agronomy*, 13(4): 1019.
- Sharma KM, Kumar R, Panwar S, Kumar A (2017). Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *J Genet Eng Biotechnol*, 15(1): 115-126.
- Sun B, Zou K, Zhao Y, Tang Y, Zhang F, Chen W, Tang X, Chang C, Zheng Y (2023). The fermentation optimization for alkaline protease production by *Bacillus subtilis* BS-QR-052. *Front Microbio*, 14: 1301065.
- Suttikul S, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A (2022). Biotechnological production of optically pure 2, 3-butanediol by *Bacillus subtilis* based on dissolved oxygen control Strategy. *Fermentation*, 9(1): 15.
- Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem*, 38(11): 1553-1558.
- Zhang Y, Hu J, Zhang Q, Cai D, Chen S, Wang Y (2023). Enhancement of alkaline protease production in recombinant *Bacillus licheniformis* by response surface methodology. *Bioresour Bioprocess*, 10(1): 27.

EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON GROWTH AND EXTRACELLULAR PROTEASE PRODUCTION FROM *Bacillus subtilis* NT20

Ngô Duc Quoc, Hồ Thị Diệu Hiền, Đinh Thị Hoa, Phùng Thị Bích Hoa*

University of Education, Hue University

SUMMARY

This study aims to select the optimal culture conditions for the growth and improvement of extracellular protease production of the *Bacillus subtilis* NT20 strain. The effect of culture conditions on extracellular protease production was evaluated by measuring the biomass in the culture medium at 600 nm using a spectrophotometer and assessing the resulting protease activity. The selected culture conditions included carbon source, nitrogen source, pH and aeration in basal LB (Luria-Bertani) broth medium. The highest biomass and protease activity of *B. subtilis* NT20 strain (OD₆₀₀ 2.0; 235.6 U/mL, respectively) were found in the culture conditions using 2.0% (w/v) glucose as the main carbon source, peptone concentration of 2.5% (w/v), pH 8 of liquid culture, 92% breathability, 37°C of incubation and shaking 200 rpm, 24 hours of culture time.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation condition, cell biomass, protease, microorganism.

* Author for correspondence: Tel: 0905197959; Email: ptbhoa@hueuni.edu.vn