

TUYỂN CHỌN VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP MANGANESE PEROXIDASE (MnP) CỦA CHỦNG NẤM LỚN, ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG PHÂN HỦY LIGNIN

Trình Đình Khả^{1,2}, Phạm Như Quỳnh², Nguyễn Thị Quỳnh¹, Nguyễn Thị Thúy Hiền¹,
Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thị Thu Huyền²

¹ Trường Đại học Thủy lợi

² Trường Đại học Khoa học Thái Nguyên

TÓM TẮT

Manganese peroxidase (MnP) là enzyme có khả năng phân hủy lignin và một số hợp chất hữu cơ độc hại. MnP được sinh tổng hợp bởi nấm, vi khuẩn và xạ khuẩn. Trong nghiên cứu này trình bày kết quả tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP và nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng nấm được tuyển chọn. Kết quả nghiên cứu đã tuyển chọn được chủng nấm *Pleurotus* sp. PL3 có hoạt tính MnP mạnh nhất trong số 8 chủng nấm khảo sát. Hoạt tính sinh tổng hợp MnP của chủng *Pleurotus* sp. PL3 đạt 2,03 U/mL ở điều kiện môi trường PDA có bổ sung NH₄NO₃ 0,5%, glucose 3%, pH 7,0, nhiệt độ 30°C trong 9 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu này là cơ sở để sản xuất enzyme MnP ứng dụng phân hủy lignin trong công nghiệp chế biến gỗ.

Từ khóa: Manganese peroxidase, phân hủy lignin, *Pleurotus* sp. PL3, sinh tổng hợp, tuyển chọn

SELECTION AND STUDYING OF THE BIOSYNTHETIC ABILITY OF MANGANESE PEROXIDASE (MNP) OF MUSHROOM STRAINS, ORIENTING THE APPLICATION TO DEGRADE LIGNIN

Trình Đình Kha^{1,2}, Phạm Như Quỳnh², Nguyễn Thị Quỳnh¹, Nguyễn Thị Thúy Hiền¹,
Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thị Thu Huyền²

¹ Thuyloi University

² Thainguyen University of Sciences

SUMMARY

Manganese peroxidase (MnP) is an enzyme that is able to degrade lignin and some toxic organic compounds. MnP is biosynthesized by fungi, bacteria and actinomycetes. In this study, the result of the selection of MnP biosynthetic fungal strains and their MnP biosynthetic potential are presented. Research results have selected the fungal strain *Pleurotus* sp. PL3 with the strongest MnP activity among the 8 investigated strains. MnP biosynthetic activity of *Pleurotus* sp. PL3 strain reached 2.03 U/mL in PDA medium supplemented with 0.5% NH₄NO₃, 3% glucose, pH 7.0, temperature culture 30°C for 9 days culture. This research is the basis for the production of MnP enzyme to degrade lignin in the wood processing industry.

Keywords: Degrading lignin, increasing production, Manganese peroxidase, *Pleurotus* sp. PL3, selection

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Manganese peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) là một glycoprotein peroxidase phụ thuộc H_2O_2 . Enzyme MnP được tìm thấy ở hầu hết các loại nấm thối trắng và một số vi khuẩn (Qin *et al.*, 2017). Trong tự nhiên, enzyme MnP xúc tác quá trình depolyme hóa lignin thực vật và là thành phần của phức hợp enzyme phân hủy lignin gồm manganese peroxidase, lignin peroxidase và laccase. MnP có thể phân hủy lignin dạng phổ biến, cũng như hemicellulose, cellulose và lignin trong nông nghiệp (Torres và Ayala, 2010). MnP có thể được sử dụng trong nhiều ứng dụng công nghiệp, bao gồm công nghiệp bột giấy, xử lý nước thải, sản xuất nhiên liệu sinh học, loại bỏ thuốc nhuộm, tạo bột sinh học, tẩy trắng sinh học và làm trong chiết xuất nước trái cây (Kumar và Kumar Arora, 2022).

Lignin chiếm tỷ lệ cao trong sinh khối thực vật với hàm lượng khoảng 10 - 30%. Lignin là hợp chất dị vòng cao phân tử, khó loại bỏ trong quá trình sản xuất giấy và chế biến gỗ (Gonzalo *et al.*, 2016). Hiện nay, trong quá trình sản xuất đã áp dụng một số phương pháp để giảm thiểu hàm lượng lignin. Trong đó, phân hủy lignin bằng enzyme đang là giải pháp có nhiều ưu việt trong công nghiệp (Kumar và Kumar Arora, 2022).

Nghiên cứu này trình bày kết quả tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP và nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng nấm được tuyển chọn là cơ sở sản xuất enzyme MnP ứng dụng phân hủy lignin trong công nghiệp chế biến gỗ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng giống nấm: Tám chủng nấm (nấm sò trắng - *Pleurotus* sp. PL1, nấm sò nâu -

Pleurotus sp. PL2, nấm sò Thái - *Pleurotus* sp. PL3, nấm linh chi - *Ganoderma lucidum*, nấm mỡ - *Agaricus bisporus*, nấm rom - *Volvariella volvacea*, mộc nhĩ - *Auricularia auricula* và đông trùng hạ thảo - *Cordyceps militaris*) được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nấm - Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Hóa chất, thiết bị: Guaiacol, $MnSO_4$, H_2O_2 , Sodium acetate, Acetic acid được cung cấp bởi hãng Merck. Máy quang phổ tử ngoại khả kiến UV - VIS Evolution 350, Thermo Scientific, Mỹ được sử dụng cho phân tích.

Môi trường: Môi trường nuôi cấy PDA (200 g khoai tây gọt vỏ, thái hạt lựu và đun sôi 10 phút với 1000 mL nước. Sau đó lọc qua lớp vải mỏng, thu được dịch chiết khoai tây, 20 g glucoza, 20 g agar); Môi trường cơ bản lên men sinh tổng hợp MnP (môi trường PDA dịch thể không bổ sung agar). Môi trường thử hoạt tính MnP (0,56 g $MnSO_4$, 240 μ L H_2O_2 , 2 mL guaiacol, 20 g agar, thêm H_2O đủ 1.000 mL).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP

Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA trong đĩa petri ở 30°C đến khi phát triển kín đĩa. Dùng khoan khoan khối thạch đặt lên đĩa có chứa môi trường thử hoạt tính MnP, ở 30°C trong 5 ngày xác định vùng chuyển màu cơ chất. Chủng có hoạt tính MnP sẽ chuyển cơ chất xung quanh khối thạch thành màu đỏ nâu. Hoạt tính MnP tỷ lệ thuận với đường kính vùng chuyển màu cơ chất. Dựa vào đường kính vùng chuyển màu cơ chất tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP.

2.2.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp MnP

05 khoan thạch giống chủng nấm có đường kính 0,8 cm nuôi trong 25 mL môi trường cơ bản trong bình tam giác có thể tích 100 mL, lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Dịch canh trường nuôi cấy được thu vào các thời gian từ 5 đến 15 ngày để xác định hoạt tính MnP.

2.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ glucose đến khả năng sinh tổng hợp MnP

05 khoan thạch giống chủng nấm có đường kính 0,8 cm nuôi trong 25 mL môi trường cơ bản có bổ sung nồng độ glucose khác nhau từ 1 - 5% trong bình tam giác có thể tích 100 mL, lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Dịch canh trường nuôi cấy được thu sau 9 ngày nuôi cấy để xác định hoạt tính MnP.

2.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ NH₄NO₃ đến khả năng sinh tổng hợp MnP

Giống chủng nấm (05 khoan thạch có đường kính 0,8 cm) được nuôi trong 25 mL môi trường cơ bản có bổ sung 3% glucose và nồng độ NH₄NO₃ khác nhau từ 0,1 - 5,0 g/L trong bình tam giác có thể tích 100 mL, lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Dịch canh trường nuôi cấy được thu sau 9 ngày nuôi cấy để xác định hoạt tính MnP.

2.2.5. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu đến khả năng sinh tổng hợp MnP

Giống chủng nấm (05 khoan thạch có đường kính 0,8 cm) được nuôi trong 25 mL môi trường cơ bản có bổ sung 3% glucose, 5 g/L NH₄NO₃, pH môi trường khác nhau từ 5 - 9, trong bình tam giác có thể tích 100 mL, lắc 150 vòng/phút ở 30°C. Dịch canh trường nuôi cấy được thu sau 9 ngày nuôi cấy để xác định hoạt tính MnP.

2.2.6. Xác định hoạt độ enzyme MnP

Hoạt độ MnP được thực hiện bằng đo quang phổ sử dụng guaiacol làm cơ chất, ở λ = 470 nm theo phương pháp mô tả của Yuan và Jiang (2003). Một đơn vị hoạt độ (U) là lượng enzyme làm chuyển hóa cơ chất thành sản phẩm biến đổi 1 độ hấp thụ ở bước sóng 470 nm ở 1 phút trong điều kiện thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP

Tám chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa PDA và tiến hành tuyển chọn chủng nấm sinh tổng hợp MnP theo phương pháp đã mô tả. Kết quả được thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

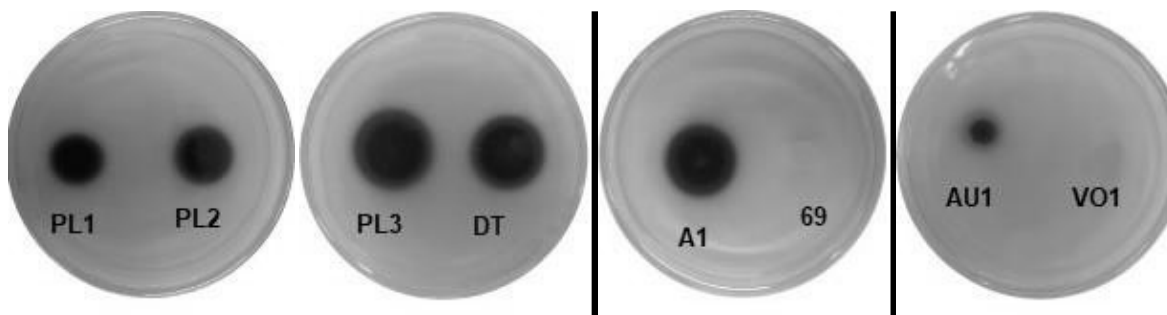
Bảng 1. Hoạt tính MnP của các chủng nấm nghiên cứu

Chủng nấm	PL1	PL2	PL3	DT	AU1	A1	VO1	69
Hoạt tính MnP (D vùng chuyển màu cơ chất, mm)	1,3 ± 0,02	1,6 ± 0,01	2,3 ± 0,01	2,0 ± 0,01	1,0 ± 0,01	2,0 ± 0,01	0	0
Hoạt độ MnP (U/mL)	0,2 ± 0,05	0,4 ± 0,07	1,5 ± 0,04	0,9 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,05	0	0

PL1: *Pleurotus* sp. PL1; PL2: *Pleurotus* sp. PL2; PL3: *Pleurotus* sp. PL3; DT: *Ganoderma lucidum*; A1: *Agaricus bisporus*; VO1: *Volvariella volvacea*; AU1: *Auricularia auricula*; 69: *Cordyceps militaris*.

Kết quả bảng 1 và hình 1 cho thấy, trong số 8 chủng nấm sưu tập được có 06 chủng có hoạt tính MnP là các chủng PL1, PL2, PL3, DT, AU1 và A1; 02 chủng không có hoạt tính là 69

và VO1. Chủng có hoạt tính MnP mạnh nhất là PL3 với vòng chuyển hóa cơ chất đạt 2,3 mm và hoạt độ MnP đạt 1,5 ± 0,04 U/mL.



Hình 1. Hoạt tính MnP của các chủng nấm tuyển chọn

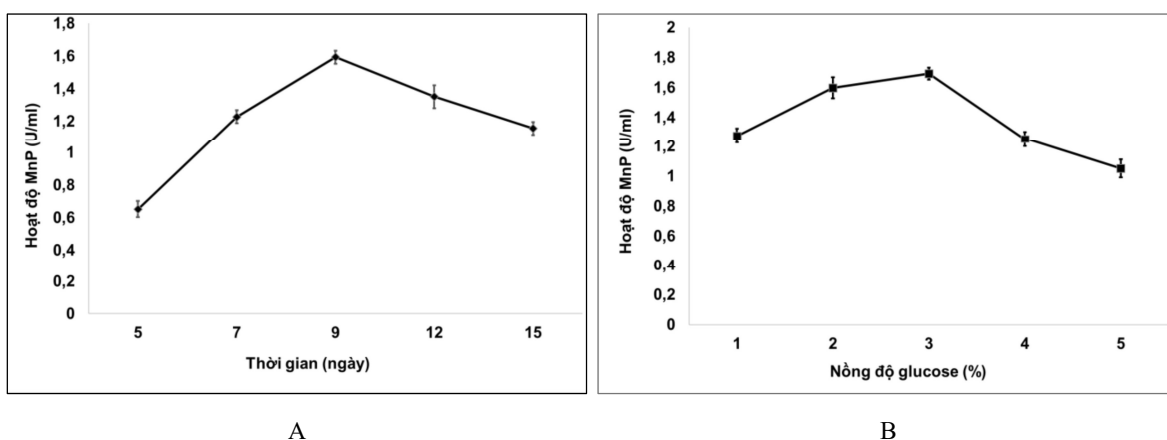
PL1: *Pleurotus* sp. PL1; PL2: *Pleurotus* sp. PL2; PL3: *Pleurotus* sp. PL3; DT: *Ganoderma lucidum*;
A1: *Agaricus bisporus*; VO1: *Volvariella volvacea*; AU1: *Auricularia auricula* và 69: *Cordyceps militaris*;

Theo nghiên cứu của Nguyen và đồng tác giả (2017), hoạt tính Manganese peroxidase cao nhất của chủng nấm *Fusarium* sp. trên môi trường rơm rạ và trên dăm gỗ lần lượt là 1,76 U/mL vào ngày 9 và 1,91 U/mL vào ngày 12. Chủng *Irpex lacteus* F17 sinh tổng hợp MnP mạnh nhất đạt 0,95 U/mL sau 84h (Zhao *et al.*, 2015). Hoạt tính MnP của chủng *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 đột biến đạt 0,218 U/mL và 0,273 U/mL khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung cám mì và cám gạo (Arunkumar *et al.*, 2015). Chủng *Aspergillus fumigatus* VkJ2.4.5 có hoạt tính MnP đạt 1,34 U/mL sau 6 ngày nuôi cấy (Vivekanand *et al.*, 2011). Chủng

Phanerochaete chrysosporium BKM-F-1767 đạt 1,3 U/mL sau 7 ngày nuôi cấy (Moldes *et al.*, 2003). Như vậy, hoạt tính MnP của chủng PL3 bằng hoặc cao hơn một số chủng nấm đã công bố.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Tiến hành khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp đến khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng PL3 từ 5 ngày đến 15 ngày. Kết quả cho thấy khả năng sinh tổng hợp MnP tăng dần theo thời gian nuôi cấy và đạt cao nhất sau 9 ngày với hoạt tính MnP đạt 1,59 U/mL (Hình 2a).



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy (A) và nồng độ glucose đến khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng *Pleurotus* sp. PL3

Thời gian sinh tổng hợp MnP của chủng *Fusarium* sp. trên môi trường rơm rạ là 9 ngày,

trên môi trường dăm gỗ là 12 ngày (Nguyen *et al.*, 2017). Chủng *Aspergillus fumigatus* VkJ2.4.5

có khả năng sinh tổng hợp MnP mạnh sau 6 ngày nuôi cấy (Vivekanand *et al.*, 2011). Chủng *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 sau 7 ngày nuôi cấy (Moldes *et al.*, 2003). Như vậy, thời gian sinh tổng hợp MnP của chủng *Pleurotus* sp. PL3 tương đương chủng *Fusarium* sp. trên môi trường rơm rạ và dài hơn so với một số chủng nấm đã công bố.

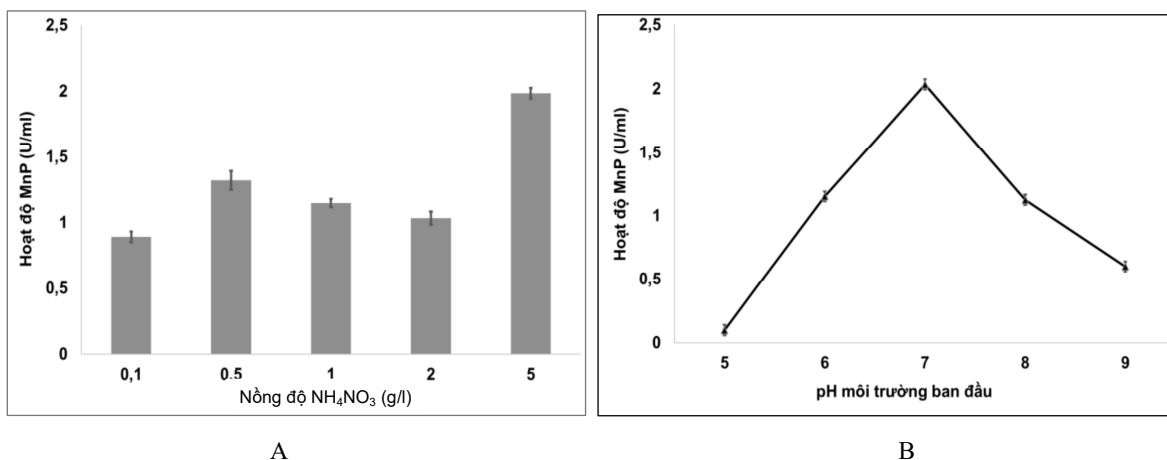
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ glucose

Trong sự sinh trưởng của vi sinh vật, glucose là nguồn carbon thường được chọn để bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Do đó, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ glucose lên sự sinh tổng hợp MnP của chủng nấm với nồng độ kéo dài từ 1%, 2%, 3%, 4% đến 5%. Kết quả hình 2B cho thấy nồng độ glucose 3% cho hoạt tính MnP cao nhất đạt giá trị là 1,693 U/mL. Khi nồng độ glucose càng giảm (nhỏ hơn 2%) thì hoạt tính MnP càng giảm, ở nồng độ 1% thì

hoạt tính MnP giảm 24,57%, ở nồng độ 2% giảm 0,05% so với ở nồng độ 3%. Khi nồng độ glucose càng tăng (lớn hơn 4%) thì hoạt tính MnP cũng càng giảm, ở nồng độ 4%, hoạt tính MnP giảm 26,04%, ở 5% giảm 37,86% so với ở nồng độ 3%. Theo kết quả của khảo sát này, nồng độ glucose thích hợp cho sự sinh tổng hợp MnP của chủng PL3 là 2 - 3%.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ NH₄NO₃

Theo những nghiên cứu trước, nguồn nitrogen có khả năng làm tăng khả năng sinh tổng hợp hệ enzyme lignin của các chủng nấm đấm (Abdel-Hamid *et al.*, 2013; Ginterová *et al.*, 1980). Vì vậy, tiến hành khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NH₄NO₃ (0,1; 0,5; 1; 2; 5 g/L) trong môi trường nuôi cấy. Mẫu được thu sau 9 ngày nuôi để phân tích hoạt tính MnP. Ảnh hưởng của NH₄NO₃ lên quá trình sinh tổng hợp MnP được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NH₄NO₃ (A) và pH môi trường ban đầu (B) đến khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng *Pleurotus* sp. PL3

Kết quả từ hình 3A cho thấy xu hướng tăng lên của hoạt tính MnP khi nồng độ NH₄NO₃ tăng từ 0,1 đến 5 g/L, hoạt tính đạt giá trị cao nhất ở nồng độ NH₄NO₃ 5 g/L là 1,983 U/mL. Như vậy, nồng độ NH₄NO₃ tốt nhất cho sự sinh tổng hợp MnP của chủng PL3 trong nghiên cứu này là 5 g/L.

3.5. Ảnh hưởng của pH môi trường ban đầu

pH môi trường ban đầu ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp enzyme của các chủng vi sinh vật. Kết quả từ hình 3B cho thấy hoạt tính MnP khi pH môi trường ban đầu bằng 7 là cao nhất đạt giá trị là 2,035 U/mL. Khi pH giảm (dưới pH 6) hoặc tăng

(trên pH 8), hoạt tính enzyme MnP có xu hướng giảm, ở pH 6 giảm 43%, ở pH 5 giảm 95,18%, ở pH 8 giảm 44,71%, ở pH 9 giảm 70% so với hoạt tính enzyme ở pH 7. pH môi trường ban đầu bằng 7 thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp MnP của chủng PL3.

Trong ngành công nghiệp giấy và bột giấy, việc sử dụng MnP dẫn đến giảm tiêu thụ năng lượng trong nghiền cơ học (Hofrichter *et al.*, 1999). Enzyme MnP được coi là một enzyme quan trọng trong quá trình phân hủy sinh học lignin do khả năng xúc tác trực tiếp quá trình oxy hóa các hợp chất có thể oxy hóa khử cao. Một trong những ứng dụng công nghiệp quan trọng nhất của MnP là trong quá trình lọc sinh học trong ngành công nghiệp giấy và bột giấy để thay thế chất độc hại không thân thiện với môi trường do hóa chất clo hóa để tiết kiệm chi phí năng lượng nghiền cơ học (Hakala *et al.*, 2005). Những lợi ích tiềm năng của công nghiệp chế biến giấy nghiền bằng MnP bao gồm giảm hàm lượng lignin của bột giấy, giảm thời gian nghiền bột, giảm tiêu thụ hóa chất tẩy

trắng và cải thiện độ bền, đặc tính độ bền của bột giấy và đặc tính độ bền của giấy (Sellami *et al.*, 2022). Như vậy, MnP sản xuất từ chủng *Pleurotus* sp. PL3 có tiềm năng lớn ứng dụng trong công nghiệp chế biến giấy và bột giấy tại Việt Nam.

IV. KẾT LUẬN

Đã tuyển chọn được chủng nấm sò *Pleurotus* sp. PL3 có khả năng sinh tổng hợp enzyme MnP mạnh. Chủng *Pleurotus* sp. PL3 sinh tổng hợp MnP mạnh trong một số điều kiện môi trường PDA có bổ sung NH_4NO_3 0,5%, glucose 3%, pH 7,0, nhiệt độ 30°C trong 9 ngày nuôi cấy. Điều kiện lên men và thành phần môi trường có thể được sử dụng để lên men sản xuất enzyme MnP ứng dụng phân hủy lignin từ chủng nấm sò *Pleurotus* sp. PL3.

Lời cảm ơn:

Kết quả nghiên cứu này được tài trợ kinh phí từ đề tài KH&CN cấp Bộ GD&ĐT, mã số đề tài: B2020-TNA-14

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdel-Hamid A.M., Solbiati J.O., Cann I.K., 2013. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*, 82: Elsevier; 1-28.
2. Kumar A. and Kumar Arora P., 2022, Biotechnological applications of Manganese peroxidases for sustainable management, *Front. Environ. Sci.*, 10(26), <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.875157>.
3. Arunkumar M., Sheik A., Shahul H, 2014. Hyper-production of manganese peroxidase by mutant *Pleurotus ostreatus* MTCC 142 and its applications in biodegradation of textile azo dyes. *Desalination Water Treat* 56(2): 509-520.
4. Qin, X., Zhang, J., Zhang, X., and Yang, Y., 2014. Induction, purification and characterization of a novel manganese peroxidase from *Irpex Lacteus* CD2 and its application in the decolorization of different types of dye. *PLoS One* 9, e113282. doi:10.1371/journal.pone.0113282
5. Torres E. and Ayala M., 2010. Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts. Springer Berlin, Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7>
6. Ginterová A., Polster M. & Janotková O., 1980. The relationship between *Pleurotus ostreatus* and *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin. *Folia Microbiologica*, 25: 332-336
7. Gonzalo de G., Colpa D.I., Habib M.H.M., Fraaije M.W., 2016. Bacterial enzyme involved in lignin degradation. *Journal of Biotechnology* 236: 110-119.
8. Moldes D., Couto S.R., Cameselle C., Sanromán M.A., 2003. Study of the degradation of dyes by MnP of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a fixed-bed bioreactor. *Chemosphere* 51: 295-303.

9. Vivekanand V., Dwivedi P., Pareek N., Singh R.P., 2011. Banana peel: a potential substrate for laccase production by *Aspergillus fumigatus* VkJ2.4.5 in solid-state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165: 204-220.
10. Yuan Z. Y. & Jiang T. J., 2003. Horseradish peroxidase, in: J. R. Whitaker, A. Voragen, D. W. S. Wong (Eds.). *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 403-411.
11. Nguyen D.H., Nguyen T.T.H., Le T.H., Hoang T.Q., Truong Q.T., Nguyen N.L., and Park S.M., 2017. Screening and Production of Manganese Peroxidase from *Fusarium* sp. on Residue Materials. *Mycobiology.* 45(1): 52-56.
12. Zhao X., Huang X., Yao J., Zhou Y., and Jia R., 2015. Fungal growth and Manganese peroxidase production in a deep tray solid-state bioreactor, and in vitro decolorization of poly R-478 by MnP. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(6): 803-813.
13. Hofrichter M., Lundell T., and hatakka A., 1999. Conversion of Milled Pine Wood by Manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10): 4588-4593.
14. Hakala K., Lundell T., Galkin S., Majjala P., Kalkkinen N., Hatakka A., 2005. Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme and Microbial Technol.*, 36 (4): 461-468.
15. Sellami K., Couvert A., Nasrallah N., Maachi R., Abouseoud M., 2022. Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review. *Science of the Total Environment*, 806, pp.150500. [ff10.1016/j.scitotenv.2021.150500](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150500). [ffhal-03464657](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150500)

Email tác giả liên hệ: trinhdingkha@tlu.edu.vn

Ngày nhận bài: 10/07/2023

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 15/07/2023

Ngày duyệt đăng: 18/07/2023