

Đánh giá vi cấu trúc màng vỏ trứng bằng kính hiển vi điện tử quét kết hợp phân tích hình ảnh số ứng dụng trong y sinh học và dược học

Lê Thị Thanh Lan¹, Nguyễn Minh Tiến¹, Hà Thúc Chí Nhân^{2,3}, Lê Việt Hoàng^{2,3,*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Thành phố Hồ Chí Minh

³Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*lvhoang@hcmus.edu.vn

Tóm tắt

Ngành Dược đang theo hướng số hóa và phát triển bền vững, việc tận dụng phụ phẩm nông nghiệp nhằm phát triển vật liệu y sinh ngày càng được quan tâm. Màng vỏ trứng là nguyên liệu giàu collagen và carbohydrate tự nhiên, phù hợp cho các ứng dụng che phủ vết thương và tái tạo mô mềm. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của hỗn hợp acid acetic-citric đối với vi cấu trúc ESM được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét và phân tích hình ảnh số hóa; các mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid với nhiều tỷ lệ khác nhau và phân tích bằng Fiji/ImageJ. Kết quả cho thấy, độ rỗng tăng từ $(36,09 \pm 3,02) \%$ lên đến $(42,76 \pm 3,91) \%$, đường kính lỗ tương đương tăng từ $(22,00 \pm 14,41) \mu\text{m}$ lên $(27,12 \pm 18,09) \mu\text{m}$, trong khi mật độ lỗ giảm từ $(280 \pm 17) \text{lỗ/trường nhìn xuống}$ còn $(216 \pm 12) \text{lỗ/trường nhìn}$. Những thay đổi này phản ánh sự tái tổ chức mạng sợi của ESM dưới tác động của hỗn hợp acid acetic-citric, ảnh hưởng đến khả năng trao đổi khí và giữ ẩm của vật liệu. Cách tiếp cận dựa trên hình ảnh số hóa đã xây dựng được bộ dữ liệu định lượng có giá trị, góp phần hỗ trợ tối ưu hóa vật liệu y sinh theo định hướng đổi mới và phát triển bền vững của ngành dược.

Nhận 06/12/2025

Được duyệt 17/01/2026

Công bố 28/01/2026

Từ khóa

hình thái vi mô,
kính hiển vi điện tử quét,
màng vỏ trứng,
phân tích hình ảnh số,
vật liệu y sinh

© 2026 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Trong bối cảnh phát triển bền vững và kinh tế tuần hoàn, các nghiên cứu khai thác tận dụng nguồn phụ phẩm, phế phẩm hướng đến ứng dụng trong y sinh học và dược học ngày càng được chú trọng. Một số nghiên cứu đã khẳng định, phụ phẩm nông nghiệp và phụ phẩm thực phẩm đều là nguồn nguyên liệu tiềm năng có thể được biến đổi cấu trúc phù hợp cho nhiều ứng dụng trong y sinh học và dược học, trong đó có màng vỏ

trứng (eggshell membrane – ESM) [1, 2]. Với lợi thế có thể được thu nhận với số lượng không giới hạn, ESM đã trở thành nguồn cung ứng vật liệu y sinh có nguồn gốc tự nhiên, hướng đến phát triển bền vững, đồng thời ít gặp phải các trở ngại về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

Về cấu trúc, ESM là lớp màng mỏng, bám ở mặt trong vỏ trứng, được hình thành từ mạng sợi giàu protein dạng collagen và các thành phần carbohydrate, tạo nên một cấu trúc sợi đan xen nhiều lớp, có tính xốp nhất

định [3, 4]. Về chức năng sinh học, ESM bảo vệ và ổn định vi môi trường xung quanh phôi, góp phần điều hòa trao đổi khí và độ ẩm. Với các đặc trưng như tính tương thích sinh học, khả năng phân hủy tự nhiên và cấu trúc sợi giàu collagen, ESM hoàn toàn phù hợp cho nhiều ứng dụng trong y sinh học và dược học, đơn cử như giá thể mang hoạt chất, khung nâng đỡ, hay màng phủ vết thương [5-7]. Tuy nhiên, phần lớn các ứng dụng này mới chỉ dừng lại ở mức độ tiềm năng, trong khi mối liên hệ chi tiết giữa vi cấu trúc ESM và các chức năng quan trọng vẫn chưa được mô tả có hệ thống.

Hướng tiếp cận quan trọng nhằm khai thác các đặc tính sẵn có của ESM là biến tính có kiểm soát bằng các tác nhân hóa học, qua đó cấu trúc vi mô của mạng sợi ESM có thể được điều biến. Các acid hữu cơ nhẹ như acid acetic, acid citric và sự phối hợp hai acid này được chú trọng nhờ có khả năng tác động lên các liên kết hydro và tương tác nội phân tử trong mạng collagen – protein mà không gây biến tính quá mức như acid mạnh [4, 8]. Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu tập trung vào phương pháp tách màng, làm sạch hoặc hòa tan ESM, chưa chú trọng về phân tích đặc tính hình thái vi cấu trúc của ESM ở trạng thái tươi, cũng như ở trạng thái sau khi được xử lý bằng acid nhẹ.

Số hóa hình ảnh hiển vi đang dần trở thành công cụ quan trọng trong nghiên cứu và thiết kế vật liệu y sinh dạng xốp. Bên cạnh vai trò cung cấp hình ảnh bề mặt vật liệu ở độ phóng đại cao, kính hiển vi điện tử quét (SEM) khi kết hợp với các bộ công cụ phân tích ảnh như Fiji/ImageJ cho phép mô phỏng định lượng một số đặc tính hình học của cấu trúc vật liệu, đơn cử như độ rỗng, đường kính lỗ tương đương, độ tròn lỗ, mật độ lỗ [9-11]. Nhiều nghiên cứu về vật liệu y sinh dạng xốp đã cho thấy, phân tích hình ảnh là giai đoạn then chốt nhằm chuyển đổi thông tin trực quan từ hình ảnh SEM sang dữ liệu số có thể lập lại, qua đó cho phép so sánh hiệu quả giữa các nghiệm thức xử lý và suy luận mối liên kết giữa hình thái vi cấu trúc và các tính chất cơ – sinh học của vật liệu [12]. Tuy nhiên, đa phần các ứng dụng này tập trung vào đối tượng khung nâng đỡ tế bào được thiết kế và chế tạo có chủ đích, trong khi ESM, với bản chất là một khung sợi tự nhiên, lại chưa được tiếp cận về mô phỏng hình ảnh định lượng.

Từ các nhận định kể trên, khoảng trống nghiên cứu được xác định là sự thiếu hụt về khảo sát kết nối giữa

điều kiện xử lý hóa học, biến đổi hình thái vi cấu trúc và dữ liệu định lượng dựa trên phân tích hình ảnh đối với ESM. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của hỗn hợp acid acetic-citric đến hình thái vi cấu trúc của màng vô trùng, thông qua kết hợp quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét với phân tích hình ảnh số hóa. Các mẫu ESM được xử lý với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ khác nhau, được mô phỏng định lượng theo bốn chỉ tiêu hình thái, bao gồm độ rỗng, đường kính lỗ tương đương, độ tròn lỗ và mật độ lỗ. Bộ dữ liệu thu thập được có thể làm sáng tỏ quá trình tái tổ chức mạng sợi của ESM dưới tác động của hỗn hợp acid hữu cơ nhẹ, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu khai thác phụ phẩm này như một vật liệu y sinh tiềm năng, phù hợp định hướng số hóa và phát triển bền vững.

2 Phương pháp nghiên cứu

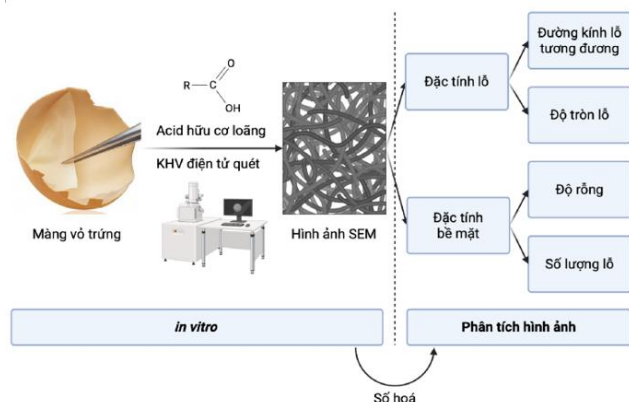
2.1 Chuẩn bị và xử lý mẫu

ESM được thu gom từ vỏ trứng thương phẩm trong ngày, tách khỏi vỏ và rửa nhiều lần bằng nước khử ion. Hỗn hợp acid acetic-citric (Thermo Fisher Scientific) được pha theo ba tỷ lệ 1:6, 1:8 và 1:10 (ký hiệu 106, 108 và 110). ESM được ngâm trong hỗn hợp acid acetic-citric tương ứng, sau đó được rửa sạch và đông khô trước khi chụp SEM (Hình 1).

Các tỷ lệ acid acetic-citric (1:6, 1:8 và 1:10) được lựa chọn dựa trên tổng hợp tài liệu cho thấy các acid hữu cơ nhẹ, đặc biệt là acetic acid và citric acid, có khả năng làm suy yếu các liên kết hydro và tương tác nội phân tử trong mạng collagen – protein mà không gây biến tính mạnh như các acid vô cơ. Bên cạnh đó, các tỷ lệ này được xác định thông qua khảo sát tiền nghiên cứu nhằm đảm bảo màng vô trùng vẫn duy trì được hình thái tổng thể sau xử lý, đồng thời thể hiện mức độ biến đổi vi cấu trúc đủ rõ để phân tích định lượng.

2.2 Ghi nhận và phân tích hình ảnh hiển vi điện tử quét
Mẫu sau đông khô được ghi nhận bằng hình ảnh hiển vi điện tử quét với $n \geq 100$ trường nhìn ngẫu nhiên cho mỗi nghiệm thức. Các ảnh không đạt yêu cầu kỹ thuật được loại khỏi tập dữ liệu. Hình ảnh SEM được phân tích bằng Fiji/ImageJ thông qua các bước chuẩn hóa, ngưỡng hóa, phân đoạn và phân tích hình thái học. Bốn chỉ tiêu được trích xuất bao gồm độ rỗng, đường kính lỗ tương đương, độ tròn lỗ và mật độ lỗ. Tất cả thao tác

phân tích ảnh được thực hiện lặp lại ít nhất ba lần độc lập (Hình 1).



Hình 1 Sơ đồ mô tả quy trình thu nhận, xử lý acid, chuẩn bị mẫu và phân tích hình thái cấu trúc vi mô của ESM bằng SEM và Fiji/ImageJ

2.3 Phân tích dữ liệu

Dữ liệu được áp dụng phép kiểm định nhằm so sánh sự khác biệt giữa các nhóm, với mức ý nghĩa thiết lập ở $p < 0,05$. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn, với kích thước mẫu tổng hợp $n \geq 100$ cho mỗi nghiệm thức.

3 Kết quả và thảo luận

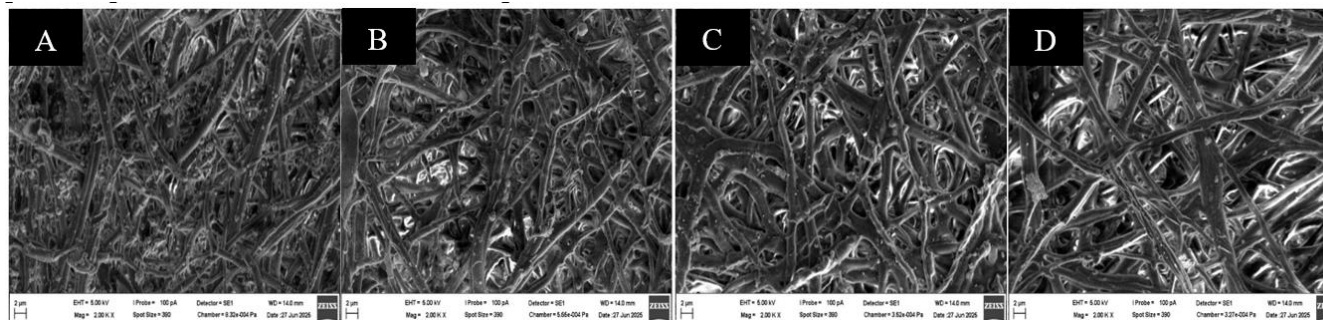
Kết quả thực nghiệm được trình bày theo thứ tự từ mô tả hình thái vi cấu trúc đến phân tích định lượng bằng mô phỏng số, qua đó sự biến đổi hình thái vi cấu trúc của màng vỏ trứng dưới các điều kiện tác động khác nhau được làm sáng tỏ. Phần 3.1 dưới đây tập trung mô tả hình thái vi mô đã được ghi nhận thực nghiệm bằng kính hiển vi điện tử quét. Kết quả này là nguồn cơ sở dữ liệu trực quan nhằm thiết lập nền tảng cho các phân tích số hóa. Từ các hình ảnh trực quan này, các phân tích tiếp theo mô phỏng bốn đặc tính hình học quan trọng

của vật liệu y sinh, bao gồm độ rỗng, đường kính lỗ tương đương, độ tròn của lỗ và mật độ lỗ. Các kết quả định lượng được đối chiếu trực tiếp với đặc điểm hình thái vi cấu trúc nhằm kiểm chứng sự phù hợp của hình ảnh định tính. Sự kết hợp mô tả đặc điểm hình thái vi cấu trúc và dữ liệu định lượng số hóa cho thấy bản chất sự biến đổi của vật liệu y sinh dưới các điều kiện tác động khác nhau.

3.1 Đặc tính hình thái vi cấu trúc

Hình thái vi cấu trúc của màng vỏ trứng được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét nhằm đánh giá sự thay đổi của mạng sợi collagen-keratin dưới tác động của hỗn hợp acid acetic-citric. Chuỗi hình ảnh thu được cho phép mô tả quá trình tái tổ chức cấu trúc ở cấp độ vi mô, từ trạng thái tươi chưa xử lý đến các nghiệm thức chịu tác động của hỗn hợp acid acetic-citric với xu hướng tăng dần tỷ lệ acid citric. Đây là nguồn dữ liệu trực quan cho phép diễn giải kết quả mô phỏng định lượng ở các phần sau.

Đối với mẫu tươi (Hình 2A), ESM thể hiện cấu trúc đặc trưng của màng sinh học tự nhiên giàu protein sợi. Các bó collagen và keratin phân bố thành nhiều lớp xếp chồng, liên kết chặt chẽ thông qua mạng lưới các liên kết hydro và tương tác tĩnh điện nội sinh. Mạng lưới sợi dày đặc và liên tục tạo nên bề mặt kín, với các lỗ xỏ nhỏ, rời rạc và phân bố không đồng đều. Biên dạng các lỗ mờ, khó xác định ở mức độ phóng đại trung bình do bị che phủ bởi nhiều lớp sợi phía trên. Cấu trúc này phản ánh chức năng sinh học của ESM – một màng bảo vệ có khả năng giảm thất thoát hơi nước, hạn chế sự xâm nhập của vi sinh vật và duy trì độ ẩm phôi thai. Mức độ thông thoáng thấp và bề mặt thô ráp nhẹ là các đặc điểm phù hợp với bản chất của vật liệu ESM ở trạng thái tươi.



Hình 2 Ảnh hiển vi điện tử quét mô tả tiến trình tái tổ chức hình thái vi cấu trúc của ESM khi xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric

Hình 2 cho thấy, (A) mẫu tươi: mạng collagen – keratin dày đặc, lỗ nhỏ, phân bố rời rạc và khó nhận diện do bị che phủ bởi các lớp sợi (B) mẫu 106, ESM được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6: các bó sợi bắt đầu tách, xuất hiện các khe hở mới và các hốc nhỏ – trung bình do vách ngăn mỏng suy yếu (C) mẫu 108, ESM được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:8: cấu trúc xốp mở hơn, nhiều lỗ nhỏ hơn nhất thành hốc lớn hơn, biên dạng lỗ tròn và rõ hơn (D) mẫu 110, ESM được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:10: mức xốp hóa cực đại, mạng sợi phân tán mạnh, nhiều sợi nhỏ bị kéo giãn hoặc đứt đoạn, các lỗ lớn liên thông chiếm ưu thế.

Khi ESM được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric, sự thay đổi vi cấu trúc bắt đầu xuất hiện. Đối với nghiệm thức 106 (Hình 2B), tương ứng với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6, các bó sợi trong cấu trúc tươi bắt đầu tách nhẹ, thể hiện qua việc hình thành các khe hở mới và mở rộng các khoảng trống nhỏ vốn tồn tại giữa các lớp sợi. Ranh giới lỗ xốp trở nên rõ hơn, cho thấy bề mặt sợi đã bị bào mòn lớp protein – khoáng ngoài cùng. Một số vách phân chia rất mỏng giữa các khe nhỏ bị suy yếu, dẫn đến sự hình thành các hốc có kích thước nhỏ từ nhỏ đến trung bình. Mặc dù vậy, mạng sợi vẫn duy trì sự liên tục và mức độ nâng đỡ cơ học, cho thấy đây là giai đoạn khởi đầu của quá trình tái tổ chức, khi các liên kết yếu bị phá vỡ nhưng cấu trúc tổng thể chưa bị ảnh hưởng mạnh.

Sự biến đổi rõ rệt hơn ở nghiệm thức 108 (Hình 2C), tương ứng với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:8. Các bó sợi phân tán xa hơn, tạo nên hệ lỗ xốp có kích thước từ trung bình đến lớn phân bố rộng khắp trường nhìn. Nhiều lỗ nhỏ hợp lại thành các hốc lớn do vách ngăn mỏng bị phân giải hoặc mất hoàn toàn. Các biên dạng lỗ trở nên mềm, tròn và đồng nhất hơn, phản ánh sự bào mòn đều và sâu hơn trên bề mặt sợi. Mạng sợi giai đoạn này vẫn giữ được vai trò nâng đỡ nhờ các bó collagen lớn chưa bị phá vỡ nhưng mật độ đã giảm so với mẫu tươi. Đây là trạng thái vi mô ổn định, nơi cấu trúc xốp hóa được biểu hiện rõ nhưng chưa bị phân hủy nhiều.

Đối với nghiệm thức 110 (Hình 2D), tương ứng với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:10, sự thay đổi cấu trúc vi mô đã thể hiện rõ. Mạng sợi phân bố rời rạc, nhiều sợi nhỏ bị kéo giãn hoặc đứt đoạn. Các lỗ xốp lớn chiếm

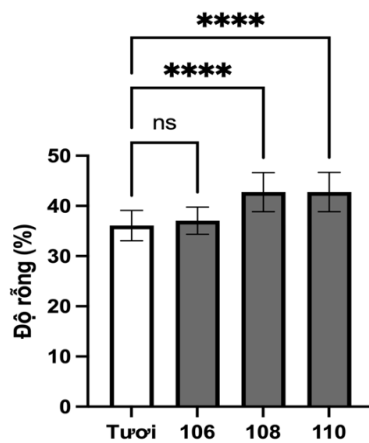
ưu thế, xuất hiện liên tục trên bề mặt và nhiều khu vực thể hiện sự liên thông giữa các lỗ, cho thấy hệ vách ngăn tự nhiên đã bị phá vỡ nhiều. Cấu trúc tổng thể trở nên thưa và mở, với mức độ thông thoáng cao nhất trong tất cả các nghiệm thức. Đây là hình thái đại diện cho sự tái tổ chức vi mô cực đại dưới tác động của hỗn hợp acid acetic-citric.

Khi xem xét sự thay đổi vi cấu trúc qua các trạng thái bao gồm mẫu tươi, mẫu được xử lý với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6, 1:8 và 1:10, một chuỗi biến đổi hình thái mang tính liên tục đã được thể hiện. Mật độ sợi giảm dần theo xu hướng tăng dần tỷ lệ acid citric, các khoảng trống được mở rộng, nhiều lỗ nhỏ hợp nhất thành các lỗ lớn hơn, biên dạng lỗ trở nên tròn và rõ ràng hơn, đồng thời mức độ liên thông giữa các lỗ cũng tăng dần. Những thay đổi này phản ánh cơ chế suy yếu đặc trưng của mạng collagen dưới tác động của hỗn hợp acid: Khởi sự là các liên kết bề mặt bị phá vỡ, kế đến các bó sợi bị phân tách, và cuối cùng là các vách ngăn tự nhiên bị đứt gãy hoặc mất đi hoàn toàn. Chuỗi biến đổi này tương đồng với xu hướng định lượng bao gồm độ rỗng tăng, đường kính lỗ lớn hơn, mật độ lỗ giảm và độ tròn lỗ được cải thiện.

Về phương pháp, hình ảnh vi cấu trúc đóng vai trò trung tâm trong đánh giá mức độ phù hợp của toàn bộ quy trình phân tích hình ảnh, đồng thời cung cấp khung tham chiếu cần thiết để diễn giải các biến đổi định lượng của vật liệu. Các mẫu tươi, với hệ lỗ nhỏ có ranh giới mờ và mức độ tương phản thấp giữa sợi và nền, tạo ra thách thức bước phân đoạn, đòi hỏi thuật toán nhận diện biên phải có độ nhạy cao và khả năng phân biệt các đặc tính yếu của cấu trúc. Ở chiều ngược lại, các mẫu chịu tác động acid xuất hiện các lỗ lớn đa hình học và các vùng chuyển tiếp phức tạp, dẫn đến thách thức trong xác định ranh giới do sự thay đổi liên tục của đường biên và sự liên thông giữa các lỗ.

3.2 Mô phỏng định lượng độ rỗng

Độ rỗng của ESM được định lượng từ hình ảnh hiển vi điện tử quét phân đoạn, cho thấy sự thay đổi giữa mẫu tươi và ba nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric (Hình 3). Mức độ khác biệt thống kê giữa từng mẫu tươi và từng nghiệm thức cũng đã được ghi nhận.



Hình 3 Biểu đồ cột thể hiện độ rỗng của màng vỏ trứng (ESM) ở mẫu tươi và các mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

Các cột biểu diễn giá trị trung bình $\pm$ sai số. Mức ý nghĩa thống kê được ký hiệu trên biểu đồ: ns (không khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$) giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:6; *** ($p < 0,001$) giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:8 và giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:10. Kết quả mô phỏng cho thấy độ rỗng chỉ khác biệt có ý nghĩa thống kê khi hỗn hợp acid acetic-citric có tỷ lệ từ 1:8 trở lên.

Mẫu tươi có độ rỗng ($36,09 \pm 3,02$) %, đại diện cho trạng thái cấu trúc kín, ít khoảng trống. Khi xử lý với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6, độ rỗng tăng lên ($38,70 \pm 2,70$)%. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê, cho thấy tác động của hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6 chưa đủ tạo ra thay đổi trong diện tích vùng rỗng.

Đối với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:8, độ rỗng tăng lên ($42,75 \pm 3,91$) %. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê so với mẫu tươi, cho thấy hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:8 đã biến đổi độ rỗng của bề mặt ESM vượt ngưỡng thay đổi hình thái, sự biến đổi này đủ lớn để tách biệt rõ ràng với trạng thái ban đầu. Đối với hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:10, độ rỗng đạt ($42,76 \pm 3,91$) %, tiếp tục khác biệt có ý nghĩa thống kê so với mẫu tươi, cho thấy hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ từ 1:8 trở lên đạt ngưỡng mở rộng cấu trúc ESM.

Đối chiếu số liệu độ rỗng (Hình 3) và hình thái cấu trúc vi mô của ESM (Hình 2), sự tương quan giữa mức độ mở của cấu trúc và giá trị định lượng đã được thể hiện rõ ràng. Đối với mẫu tươi (Hình 2A), mạng collagen – keratin dày đặc và lỗ nhỏ rời rạc, tương đương độ rỗng

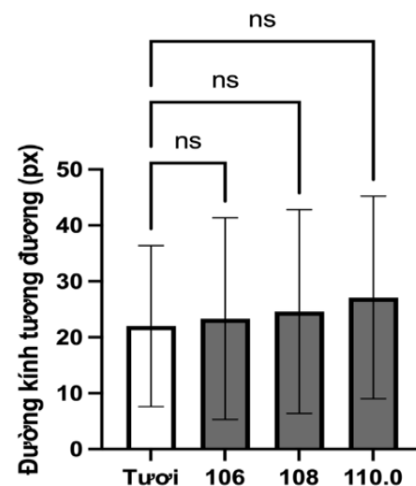
thấp. Đối với nghiệm thức 1:6 (Hình 2B), mặc dù các bó sợi bắt đầu tách nhẹ và xuất hiện thêm khe hở, nhưng nhiều vách ngăn nhỏ vẫn còn tồn tại, dẫn đến mức tăng độ rỗng không đủ lớn để đạt ý nghĩa thống kê.

Đối với nghiệm thức 1:8 (Hình 2C), sự hợp nhất lỗ nhỏ thành lỗ lớn, sự phân giải vách ngăn và biên dạng lỗ rõ ràng hơn, dẫn đến diện tích vùng trống được mở rộng, tương đương số liệu đã mô phỏng được. Đối với nghiệm thức 1:10 (Hình 2D), nhiều lỗ lớn liên thông xuất hiện và mạng sợi phân tán mạnh.

Sự tương thích giữa xu hướng (Hình 3) và hình thái cấu trúc vi mô (Hình 2) cho thấy pipeline xử lý hình ảnh hiển vi điện tử quét có khả năng tái hiện mức độ mở rộng cấu trúc của ESM và nhận diện đúng ranh giới lỗ ngay cả khi kích thước và hình dạng lỗ thay đổi. Điều này chứng minh độ nhạy của phương pháp phân đoạn, trong cả hai trường hợp: lỗ nhỏ mờ đối với mẫu tươi và lỗ lớn đa hình học đối với mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

Sự gia tăng độ rỗng từ khoảng 36 % lên hơn 42 % có thể tạo điều kiện thuận lợi về mặt hình thái cho quá trình trao đổi khí và duy trì độ ẩm, những yếu tố thường được xem xét trong thiết kế vật liệu che phủ vết thương, thay vì phản ánh trực tiếp chức năng sinh học.

3.3 Mô phỏng định lượng đường kính lỗ tương đương



Hình 4 Biểu đồ cột thể hiện đường kính lỗ tương đương của màng vỏ trứng (ESM) ở mẫu tươi và các mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

Đường kính lỗ tương đương được trích xuất từ hình ảnh hiển vi điện tử quét phân đoạn, cho phép đánh giá mức độ biến đổi kích thước hiệu dụng của các lỗ xấp xỉ trong mạng sợi ESM khi xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric

(Hình 4). Đối với mẫu tươi, đường kính lỗ trung bình đạt $(22,00 \pm 14,41)$ px, phản ánh đặc trưng lỗ nhỏ – phân bố rộng của cấu trúc nguyên trạng. Khi xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric tỷ lệ 1:6, đường kính lỗ tương đương tăng nhẹ lên $(23,33 \pm 18,03)$ px, tiếp tục tăng khi thay đổi tỷ lệ thành 1:8 với $(24,60 \pm 18,20)$ px, và đạt mức cao nhất ở tỷ lệ 1:10 với $(27,12 \pm 18,09)$ px. Tuy nhiên, sự gia tăng này không có ý nghĩa thống kê (ns) giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức, cho thấy kích thước hiệu dụng của lỗ là chỉ tiêu không thay đổi có hệ thống theo nồng độ acid acetic-citric.

Các cột biểu diễn giá trị trung bình $\pm$ sai số. Mức ý nghĩa thống kê được ký hiệu trên biểu đồ: ns (không khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$) giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức (1:6, 1:8 và 1:10). Kết quả mô phỏng cho thấy đường kính lỗ tương đương thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

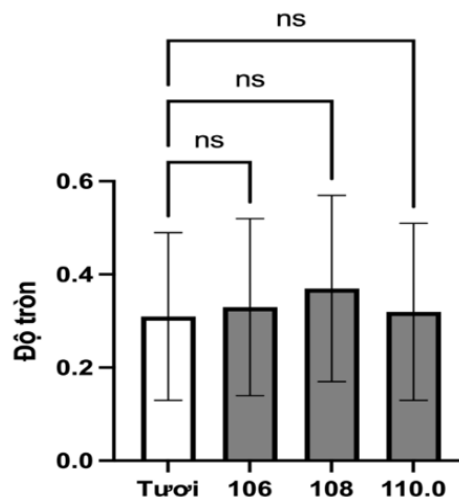
Khi đối chiếu với hình thái cấu trúc vi mô được ghi nhận (Hình 2), đối với nghiệm thức 1:6, các bó sợi tách nhẹ và tạo thêm khe hở, nhưng nhiều vùng vẫn giữ nguyên cấu trúc ban đầu, dẫn đến sự tăng kích thước lỗ chỉ xuất hiện rải rác. Đối với nghiệm thức 1:8, các lỗ nhỏ bắt đầu hợp nhất, nhưng quá trình này diễn ra không đồng đều, một số vùng hình thành hốc lớn, trong khi nhiều vùng khác vẫn giữ lỗ nhỏ, làm phân bố kích thước lỗ trở nên rộng mà không làm dịch chuyển mạnh giá trị trung bình. Đối với nghiệm thức 1:10, dù sự phân giải vách ngăn tạo ra nhiều lỗ lớn liên thông, sự tồn tại của các vùng có lỗ nhỏ và vách sợi chưa bị phá vỡ khiến biến thiên nội tại vẫn rất lớn.

Chính sự không đồng nhất theo vùng (đặc trưng của màng collagen – keratin), khiến đường kính lỗ tăng nhưng không đạt được sự thay đổi mang tính hệ thống. Điều này giải thích tại sao tham số này ít nhạy hơn độ rỗng trong nhận diện tác động của acid, vốn phản ánh diện tích vùng trống tổng thể thay vì sự thay đổi kích thước của từng lỗ đơn lẻ.

Xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric dẫn đến mở rộng cấu trúc ESM chủ yếu thông qua hợp nhất lỗ và phá vách, hơn là tăng kích thước từng lỗ một cách đồng đều. Vì vậy, đường kính lỗ tương đương đóng vai trò bổ sung cho phân tích hình thái, nhưng không phải chỉ tiêu quyết định trong mô tả mức độ xốp hóa của ESM.

3.4 Mô phỏng định lượng độ tròn của lỗ

Độ tròn của lỗ là tham số hình học phản ánh mức độ đồng nhất của biên dạng lỗ và khả năng sắp xếp của các bó sợi trong mạng collagen – keratin (Hình 5). Giá trị độ tròn của mẫu tươi đạt $0,32 \pm 0,18$, trong khi các nghiệm thức xử lý acid có giá trị lần lượt là $0,33 \pm 0,19$ (1:6), $0,37 \pm 0,20$ (1:8) và $0,32 \pm 0,19$ (1:10). Mặc dù nghiệm thức 1:8 thể hiện xu hướng tăng nhẹ, sự khác biệt giữa mẫu tươi và tất cả các nghiệm thức đều không có ý nghĩa thống kê (ns), cho thấy xử lý acid acetic-citric không dẫn đến thay đổi có hệ thống về hình dạng lỗ của ESM.



Hình 5 Biểu đồ cột thể hiện độ tròn của lỗ trên màng vô trùng (ESM) ở mẫu tươi và các mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

Các cột biểu diễn giá trị trung bình $\pm$ sai số. Mức ý nghĩa thống kê được ký hiệu trên biểu đồ: ns (không khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p > 0,05$) giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức (1:6, 1:8 và 1:10). Kết quả mô phỏng cho thấy độ tròn của lỗ thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp acid acetic-citric.

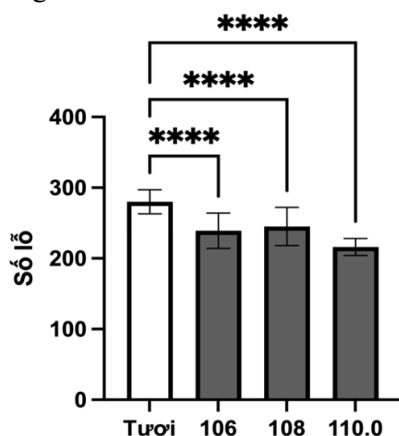
Ở mẫu tươi, các lỗ nhỏ bị che bởi nhiều lớp sợi, làm ranh giới mờ và khó nhận diện (Hình 2A). Khi xử lý ở tỷ lệ 1:6 (Hình 2B), các lỗ trở nên rõ biên hơn nhưng vẫn mang hình dạng kéo giãn không đều, do mạng sợi chỉ mới bắt đầu tách lớp. Đối với nghiệm thức 1:8 (Hình 2C), sự phân giải vách ngăn làm nhiều lỗ nhỏ hợp nhất, dẫn đến một số lỗ có biên dạng tròn hơn; tuy nhiên, sự không đồng nhất trên toàn bề mặt, vùng có lỗ tròn xen kẽ vùng có lỗ méo, khiến trung bình độ tròn tăng nhưng không đủ mạnh để đạt ý nghĩa thống kê. Ở mẫu 1:10 (Hình 2D), mặc dù cấu trúc xốp hóa mạnh,

các hốc lớn hình thành lại có biên dạng bất quy tắc do sự kéo giãn hoặc đứt đoạn không đồng đều của các sợi, làm giá trị độ tròn quay về mức tương đương mẫu tươi. Những quan sát trên cho thấy độ tròn là chỉ tiêu ít nhạy với tác động của acid. Sự thay đổi hình dạng lỗ chủ yếu mang tính cục bộ, phụ thuộc vị trí và hướng sợi, trong khi đặc tính tổng thể của ESM vẫn duy trì bản chất hình học không đồng nhất. Điều này phản ánh đúng đặc điểm tự nhiên của màng collagen – keratin: sự tái tổ chức xảy ra mạnh ở cấp độ diện tích vùng trống (độ rỗng) và số lượng lỗ (mật độ lỗ), nhưng chỉ tạo biến thiên giới hạn ở cấp độ hình dạng lỗ.

Thuật toán phân đoạn ảnh có độ ổn định tốt: dù hình dạng lỗ khác nhau giữa các nghiệm thức, việc nhận diện và đo lường lỗ vẫn chính xác, tạo dữ liệu nhất quán. Về ứng dụng vật liệu, sự ổn định về độ tròn cho thấy hình dạng lỗ không phải chỉ tiêu chi phối các đặc tính chức năng của ESM, mà đóng vai trò hỗ trợ trong mô tả tổng thể cấu trúc xốp.

3.5 Mô phỏng định lượng mật độ lỗ

Mật độ lỗ là chỉ tiêu phản ánh trực tiếp số lượng lỗ xuất hiện trên mỗi trường nhìn, từ đó cho thấy mức độ phân chia không gian của mạng sợi trong cấu trúc ESM (Hình 6). Mẫu tươi có mật độ lỗ (280 ± 17) lỗ, phù hợp với cấu trúc nguyên trạng gồm nhiều lỗ nhỏ, phân bố rời rạc. Khi xử lý bằng hỗn hợp acid acetic–citric, mật độ lỗ giảm xuống 239 ± 25 ở nghiệm thức 1:6, 245 ± 27 ở nghiệm thức 1:8 và 216 ± 12 ở nghiệm thức 1:10. Các sự giảm này lần lượt đạt mức ý nghĩa thống kê, cho thấy tác động acid làm giảm số lượng lỗ một cách rõ rệt và có hệ thống.



Hình 6 Biểu đồ cột thể hiện mật độ lỗ của màng vỏ trứng (ESM) ở mẫu tươi và các mẫu được xử lý bằng hỗn hợp acid acetic–citric.

Các cột biểu diễn giá trị trung bình $\pm$ sai số. Mức ý nghĩa thống kê được ký hiệu trên biểu đồ: *** ($p < 0,001$) giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:6, ** ($p < 0,01$) giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:8, **** ($p < 0,0001$) giữa mẫu tươi và nghiệm thức 1:10. Kết quả mô phỏng cho thấy mật độ lỗ thay đổi không có ý nghĩa thống kê giữa mẫu tươi và từng nghiệm thức xử lý bằng hỗn hợp acid acetic–citric.

Ở nghiệm thức 1:6 (Hình 2B), các vách ngăn mỏng giữa những lỗ nhỏ bắt đầu suy yếu, khiến một số lỗ sáp nhập tạo thành các hốc lớn hơn, làm giảm tổng số lỗ nhận diện được. Đến nghiệm thức 1:8 (Hình 2C), sự phân giải vách ngăn xảy ra sâu và rộng hơn, tạo ra nhiều vùng lỗ lớn có ranh giới rõ nhưng ít lỗ nhỏ xung quanh, khiến mật độ lỗ giảm mạnh. Ở nghiệm thức 1:10 (Hình 2D), quá trình xốp hóa đạt mức cao nhất: nhiều lỗ nhỏ biến mất hoàn toàn do hợp nhất, trong khi một số vùng xuất hiện các hốc liên thông chiếm phần lớn diện tích trường nhìn. Hiện tượng này dẫn đến mật độ lỗ giảm sâu nhất, tương ứng đúng với dữ liệu định lượng.

Sự giảm mật độ lỗ khi tăng tỷ lệ acid phản ánh một quá trình tái tổ chức vi cấu trúc theo hướng giảm số lượng lỗ nhỏ – tăng sự hiện diện của lỗ lớn hoặc hốc liên thông, phù hợp với cơ chế phá vỡ liên kết giữa các bó sợi collagen – keratin. Đây là chỉ tiêu có độ nhạy cao trong nhận diện mức độ xốp hóa và thay đổi cấu trúc vi mô, đặc biệt khi so sánh với độ tròn và đường kính lỗ, vốn chịu ảnh hưởng lớn bởi tính không đồng nhất nội tại của ESM.

Sự phù hợp giữa biến thiên mật độ lỗ và đặc điểm hình thái cho thấy phương pháp phân đoạn đủ độ chính xác để nhận diện các lỗ trong nhiều trạng thái hình học khác nhau, kể cả khi cấu trúc chuyển từ dạng nhiều lỗ nhỏ sang dạng hốc liên thông lớn. Về mặt cấu trúc, sự giảm mật độ lỗ phản ánh xu hướng hợp nhất các lỗ nhỏ thành các hốc lớn hơn, từ đó tạo ra hình thái thông thoáng hơn, một đặc điểm liên quan đến các yêu cầu về khuếch tán khí trong vật liệu y sinh dạng xốp.

Quan sát từ các ảnh hiển vi điện tử quét cho thấy màng vỏ trứng nguyên trạng mang hình thái đặc trưng của một mạng sợi protein đan xen dày đặc. Các bó sợi collagen và keratin sắp xếp thành nhiều lớp, chồng lên nhau tạo nên bề mặt tương đối kín, chỉ thỉnh thoảng xuất hiện những khe hở nhỏ giữa các sợi. Ở mức phóng đại cao, bề mặt các sợi cho thấy cấu trúc thô ráp nhẹ,

phản ánh sự pha trộn giữa các thành phần protein và phần khoáng còn sót lại trong quá trình tách màng. Những lỗ xốp ban đầu thường nhỏ, hình dạng không rõ ràng và bị che khuất một phần bởi các sợi lớp trên.

Khi màng được xử lý theo các điều kiện khác nhau, hình thái bề mặt bắt đầu thay đổi rõ nét hơn. Các bó sợi vốn nằm sát nhau có xu hướng tách nhẹ, tạo thành những khoảng trống mở rộng hơn; bề mặt trở nên to và ít đặc hơn. Ở các điều kiện xử lý rõ rệt hơn, sự thay đổi càng dễ thấy: các lớp sợi có xu hướng tách xa nhau, một số vách mỏng giữa các khe nhỏ ban đầu biến mất, tạo thành những hốc lớn hơn; một số sợi nhỏ ở vùng rìa xuất hiện dấu hiệu mềm, tưa hoặc đứt đoạn. Những biến đổi này không chỉ thể hiện sự khác biệt về hình thái vật liệu mà còn tạo ra phổ cấu trúc đủ đa dạng để đánh giá độ nhạy và tính ổn định của toàn bộ quy trình phân tích hình ảnh phía sau.

Từ góc độ phương pháp, ảnh SEM trong nghiên cứu này giữ vai trò như đầu vào quyết định của pipeline phân tích. Độ tương phản giữa nền và sợi, mức nhiễu, đường biên của lỗ, và độ đồng nhất của vùng quan sát đều ảnh hưởng trực tiếp tới giai đoạn tiền xử lý và phân đoạn ảnh. Do vậy, việc lựa chọn độ phóng đại, điều kiện chụp và vị trí trường nhìn được thực hiện theo hướng tối ưu hóa cho xử lý ảnh số, chứ không chỉ nhằm mục đích minh họa cấu trúc. Nói cách khác, phần quan sát SEM không chỉ cho biết màng thay đổi ra sao, mà còn xác nhận rằng ảnh thu được có chất lượng phù hợp để chuyển hóa thành dữ liệu số hóa đáng tin cậy.

4. Kết luận và kiến nghị

Nghiên cứu này đã làm rõ sự biến đổi vi cấu trúc của màng vỏ trứng (eggshell membrane – ESM) dưới tác động của hỗn hợp acid acetic–citric thông qua việc kết hợp quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét và phân tích hình ảnh số hóa. Các kết quả định lượng cho thấy mạng collagen – keratin của ESM trải qua một tiến trình tái tổ chức mang tính liên tục khi tỷ lệ acid citric trong hỗn

hợp tăng dần, trong đó độ rỗng và mật độ lỗ là hai chỉ tiêu hình thái nhạy, phản ánh rõ mức độ mở rộng cấu trúc của vật liệu. Sự tương thích chặt chẽ giữa dữ liệu định lượng và đặc điểm hình thái quan sát được trên ảnh SEM khẳng định tính tin cậy của quy trình phân tích hình ảnh cũng như khả năng nhận diện chính xác ranh giới lỗ của thuật toán trong bối cảnh cấu trúc vi mô biến thiên mạnh.

Nghiên cứu này vẫn tồn tại một số hạn chế. Các phân tích chủ yếu tập trung vào đặc tính hình thái vi cấu trúc dựa trên ảnh SEM và mô phỏng hình ảnh số, trong khi chưa bao gồm các đánh giá cơ học hoặc sinh học trực tiếp. Ngoài ra, các kết quả thu được phản ánh xu hướng biến đổi vi mô trong điều kiện in vitro. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo là cần thiết để hoàn thiện mối liên hệ giữa cấu trúc, tính chất cơ học và đáp ứng sinh học của vật liệu sau xử lý.

Từ góc độ ứng dụng, các kết quả của nghiên cứu này cho thấy hỗn hợp acid acetic–citric, đặc biệt ở tỷ lệ 1:8, có tiềm năng được sử dụng như một điều kiện xử lý nhằm điều chỉnh vi cấu trúc của ESM theo hướng tăng độ thông thoáng nhưng vẫn duy trì tính liên tục của mạng sợi. Những đặc điểm hình thái này có thể tạo nền tảng thuận lợi cho các nghiên cứu phát triển vật liệu y sinh dạng xốp dựa trên ESM trong giai đoạn tiền ứng dụng. Trong các nghiên cứu tiếp theo, việc mở rộng khảo sát sang các điều kiện xử lý khác (thời gian ngâm, nhiệt độ, pH hoặc các tác nhân sinh học nhẹ), đồng thời bổ sung các phép thử cơ học, đánh giá tương thích sinh học và khả năng hỗ trợ tăng sinh tế bào sẽ giúp hoàn thiện bức tranh chức năng của vật liệu và nâng cao giá trị ứng dụng thực tiễn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Trường Đại học Nguyễn Tất Thành trong khuôn khổ đề tài mã số 2026.01.42/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. P. Roy *et al.* (2023). A review on the challenges and choices for food waste valorization: Environmental and economic impacts. *ACS Environmental Au*, Vol. 3, No. 2, pp. 5-75.
2. B. Mishra *et al.* (2023). Valorization of agro-industrial biowaste to biomaterials: An innovative circular bioeconomy approach. *Circ. Econ.*, Vol. 2, No. 3, Art. No. 100050.
3. Y. Shi *et al.* (2021). Avian eggshell membrane as a novel biomaterial: A review. *Foods*, Vol. 10, No. 9, Art. No. 2178.

4. C. Han *et al.* (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. *Frontiers in Veterinary Science* Vol. 10, Art. No. 1116126.
5. M. Baláž. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomater.*, Vol. 10, No. 9, pp. 3827-3843.
6. A. Torres-Mansilla *et al.* (2023). Eggshell membrane as a biomaterial for bone regeneration. *Polymers*, Vol. 15, No. 6, Art. No. 1342.
7. M. E. Torres Gouveia *et al.* (2025). Eggshell-based unconventional biomaterials for medical applications. *Advanced NanoBiomed Research*, Vol. 5, No. 2, Art. No. 2400120.
8. Y.-C. Lien *et al.* (2022). High-efficiency decomposition of eggshell membrane by a keratinase from *Meiothermus taiwanensis*. *Scientific Reports*, Vol. 12, No. 1, Art. No. 14684.
9. D. Jenkins *et al.* (2022). PoreScript: Semi-automated pore size algorithm for scaffold characterization. *Bioactive Materials*, Vol. 13, pp. 1-8.
10. N. Hojat *et al.* (2023). Automatic pore size measurements from scanning electron microscopy images of porous scaffolds. *Journal of Porous Materials*, Vol. 30, No. 1, pp. 93-101.
11. M. Haeri and M. Haeri. (2015). ImageJ plugin for analysis of porous scaffolds used in tissue engineering. *Journal of Open Research Software.*, Vol. 3, No. 1, Art. No. e1.
12. N. Rossberg *et al.* (2025). Automated analysis of pore structures in biomaterials. *Journal of Materials Chemistry B*, Vol. 13, No. 31, pp. 9377-9391.

Microstructural Evaluation of Eggshell Membrane Using Scanning Electron Microscopy Combined with Digital Image Analysis for Biomedical and Pharmaceutical Applications

Le Thi Thanh Lan¹, Nguyen Minh Tien¹, Ha Thuc Chi Nhan^{2,3}, Le Viet Hoang^{2,3,*}

¹Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City, Viet Nam

²Laboratory of Tissue Engineering and Biomedical Materials, University of Science, Ho Chi Minh City, Viet Nam

³Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Viet Nam

*lvhoang@hcmus.edu.vn

Abstract In the context of pharmaceutical innovation driven by digitalization and sustainable development, the valorization of agricultural by-products for biomedical material development has attracted increasing attention. Eggshell membrane (ESM) is a collagen – and carbohydrate-rich natural material, making it suitable for wound dressing and soft tissue regeneration applications. This study evaluates the effects of an acetic-citric acid mixture on the microstructure of ESM through scanning electron microscopy (SEM) observation and digital image analysis. ESM samples were treated with acid mixtures at different ratios and analyzed using Fiji/ImageJ software. The results showed that porosity increased from $(36.09 \pm 3.02) \%$ to $(42.76 \pm 3.91) \%$, while the equivalent pore diameter increased from $(22.00 \pm 14.41) \text{ px}$ to $(27.12 \pm 18.09) \text{ px}$. Whereas pore density decreased from (280 ± 17) to (216 ± 12) pores per field of view. These structural changes reflect the reorganization of the ESM fibrous network under the influence of the acetic-citric acid treatment, thereby affecting the material's gas exchange and moisture retention properties. The digital image-based approach established a valuable quantitative dataset, contributing to the optimization of biomedical materials in line with innovation and sustainable development trends in the pharmaceutical industry in the digital era.

Keywords Microstructure, scanning electron microscopy, eggshell membrane, digital image analysis, biomedical materials.

