

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

NGUYỄN THỊ THĂNG LONG

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ TẠO BỘT INULIN TỪ CỎ
ĐẰNG SÂM (*CODONOPSIS JAVANICA*) TỰ NHIÊN MỌC TẠI
LẠC DƯƠNG - LÂM ĐỒNG**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA – 2021

**BỘ GIÁO VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

NGUYỄN THỊ THĂNG LONG

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ TẠO BỘT INULIN TỪ CỎ
ĐẰNG SÂM (*CODONOPSIS JAVANICA*) TỰ NHIÊN MỘC TẠI
LẠC DƯƠNG - LÂM ĐỒNG**

**Chuyên ngành : Công nghệ Sau thu hoạch
Mã số : 9540104**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

1.PGS. TS. Vũ Ngọc Bội

2.PGS. TS. Đào Xuân Vinh

KHÁNH HÒA – 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan mọi kết quả của đề tài: “***Nghiên cứu tạo bột inulin từ củ đấng sâm (Codonopsis javnica) tự nhiên mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng***” là công trình nghiên cứu của cá nhân tôi và chưa từng được công bố trong bất cứ công trình khoa học nào khác cho tới thời điểm này.

Các kết quả, số liệu nêu trong luận án là trung thực. Kết quả trong luận án này được tài trợ kinh phí từ Đề tài cấp Bộ GD-ĐT “***Nghiên cứu thành phần hóa học của Đấng sâm (Codonopsis javnica) tại Lâm Đồng và ứng dụng tạo thực phẩm chức năng***”. Mã số: ***B2018-DLA-01*** mà tôi là chủ nhiệm đề tài.

Khánh Hòa, ngày 15 tháng 10 năm 2021

NCS. Nguyễn Thị Thăng Long

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành Luận án này

Trước hết tôi xin gửi tới Ban Giám hiệu, Lãnh đạo phòng Đào tạo Sau đại học và Ban Chủ nhiệm Khoa Công nghệ Thực phẩm sự kính trọng, niềm tự hào được học tập và nghiên cứu tại Trường trong những năm qua.

Sự biết ơn sâu sắc nhất tôi xin được gửi đến PGS.TS. Vũ Ngọc Bội - Trưởng Khoa Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Nha Trang và PGS. TS. Đặng Xuân Vinh - Nguyên Giám đốc Viện Vaccin Đà Lạt đã hết lòng hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện Luận án.

Xin chân thành cảm ơn các thầy cô phản biện đã góp ý và cho những lời khuyên quý báu để Luận án hoàn thành với chất lượng cao.

Xin cảm ơn Lãnh đạo Trường Đại học Đà Lạt đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi được đi học và hoàn thành Luận án này.

Xin cảm ơn các thành viên tham gia đề tài cấp Bộ đã cùng tôi thực hiện đề tài để kết quả luận án chất lượng hơn.

Xin gửi lời cảm ơn các thầy cô giáo trong Khoa Công nghệ Thực phẩm đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập tại trường.

Đặc biệt, xin ghi nhớ và tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến gia đình, người thân và bạn bè đã quan tâm, chia sẻ khó khăn và động viên tôi để tôi hoàn thành Luận án này.

Khánh Hòa, ngày 15 tháng 10 năm 2021

NCS. Nguyễn Thị Thăng Long

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	x
DANH MỤC CÁC HÌNH	xii
TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN	xv
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY CỦ ĐẰNG SÂM.....	4
1.1.1. Phân loại và đặc điểm sinh học của cây đẳng sâm	4
1.1.2. Thành phần các chất cơ bản của các loài trong chi Codonopsis	5
1.1.3. Thời gian thu hái.....	6
1.2. XÁC ĐỊNH LOÀI VÀ ĐỘ TUỔI THẢO DƯỢC	7
1.2.1. Phương pháp truyền thống (nhận dạng macro)	7
1.2.2. Phương pháp hiện đại (nhận dạng micro)	8
1.3. FRUCTAN VÀ MỘT SỐ LOẠI THỰC VẬT CÓ INULIN	9
1.3.1. Giới thiệu về fructan.....	9
1.3.2. Một số loại thực vật giàu inulin.....	10
1.4. INULIN VÀ FOS	11
1.4.1. Cấu trúc và tính chất hóa học của inulin và FOS	11
1.4.2. Tác dụng sinh lý và ứng dụng Inulin/FOS	15
1.4.2.1. Tác dụng sinh lý	15
1.4.2.2. Ứng dụng của inulin/FOS.....	18
1.4.3. Kỹ thuật tách chiết và tinh sạch Inulin/FOS.....	19
1.4.3.1. Kỹ thuật tách chiết.....	19
1.4.3.2. Kỹ thuật tinh sạch inulin/FOS	21
1.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH INULIN/FRUCTAN.....	22
1.6. ỨNG DỤNG SẤY PHUN TRONG TẠO BỘT INULIN/FOS	23
1.6.1. Các chất mang	23
1.6.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sấy phun.....	25

1.7. PREBIOTIC.....	25
1.8. PROBIOTIC	27
1.8.1. Vi khuẩn Bifidobacterium	28
1.8.2. Vi khuẩn Lactobacillus	29
1.9. SYNBIOTIC.....	30
1.10. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CÁC LOÀI TRONG CHI CODONOPSIS TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.....	30
CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	33
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU	33
2.1.1. Củ đảng sâm nguyên liệu	33
2.1.2. Chất mang.....	33
2.1.3. Giống vi sinh vật	33
2.1.4. Chuột dùng trong thử nghiệm.....	34
2.2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM	34
2.2.1. Phương pháp thu, lấy mẫu và xử lý mẫu	34
2.2.2. Bố trí thí nghiệm tổng quát.....	35
2.2.3. Bố trí thí nghiệm xác định một số công đoạn chính.....	37
2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH.....	41
2.3.1. Phương pháp phân tích hình thái và cấu trúc mô củ đảng sâm	41
2.3.2. Các phương pháp định tính một số nhóm chất trong đảng sâm	42
2.3.3. Các phương pháp định lượng hóa học.....	42
2.3.4. Phương pháp tinh sạch inulin	43
2.3.5. Các phương pháp phân tích khối lượng phân tử và cấu trúc inulin	43
2.3.6. Phương pháp đánh giá chất lượng bột thành phẩm	44
2.3.7. Phương pháp định lượng vi sinh vật.....	45
2.3.8. Đánh giá hoạt tính prebiotic	45
2.3.9. Phương pháp thử nghiệm chế phẩm synbiotic trên chuột thí nghiệm	46
2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU	50
2.5. THIẾT BỊ, HÓA CHẤT VÀ VẬT TƯ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU.....	51
2.5.1. Thiết bị.....	51
2.5.2. Hóa chất.....	51
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	52

3.1. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THỜI GIAN THU HOẠCH NGUYÊN LIỆU CỦ ĐẰNG SÂM TỰ NHIÊN MỘC TẠI LẠC DƯƠNG - LÂM ĐỒNG	52
3.1.1. Ảnh hưởng của độ tuổi đến hình thái và cấu trúc mô của củ đặng sâm.....	52
3.1.2. Ảnh hưởng của độ tuổi đến thành phần các chất của củ đặng sâm.....	57
3.1.3. Đánh giá chất lượng của củ đặng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng	68
3.2. NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT INULIN TỪ CỦ ĐẰNG SÂM TỰ NHIÊN MỘC TẠI LẠC DƯƠNG LÂM ĐỒNG	69
3.2.1. Xác định thông số biên cho quá trình tối ưu hóa công đoạn chiết inulin từ đặng sâm.....	69
3.2.2. Tối ưu hóa công đoạn chiết inulin từ củ đặng sâm theo phương pháp Box-Benken	72
3.2.3. Đề xuất qui trình chiết inulin từ củ đặng sâm	79
3.3. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÔNG SỐ THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH KẾT TỦA INULIN TỪ DỊCH CHIẾT CỦ ĐẰNG SÂM	80
3.3.1. Xác định dung môi và nồng độ dung môi kết tủa inulin	80
3.3.2. Xác định nồng độ ethanol.....	83
3.3.3. Xác định nhiệt độ cô đặc dịch chiết inulin từ đặng sâm.....	85
3.3.4. Xác định nhiệt độ kết tủa inulin từ dịch chiết	88
3.4. NGHIÊN CỨU TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC PHÂN TỬ CỦA PHÂN TỬ INULIN	90
3.4.1. Nghiên cứu tinh sạch inulin.....	90
3.4.2. Đề xuất quy trình tinh sạch inulin từ củ đặng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng	92
3.4.3. Xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin.....	94
3.5. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT INULIN CỦ ĐẰNG SÂM	99
3.5.1. Xác định chất mang và tỷ lệ chất mang.....	99
3.5.2. Xác định nhiệt độ khí đầu vào	109
3.5.3. Đề xuất quy trình sấy phun tạo bột inulin củ đặng sâm và sản xuất thử	111
3.6. THỬ NGHIỆM SỬ DỤNG INULIN CỦ ĐẰNG SÂM TẠO BỘT SYMBIOTIC ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM	115
3.6.1. Ảnh hưởng của bột inulin củ đặng sâm sấy phun đến sự phát triển của một số loại vi probiotic.....	115

3.6.2. Tối ưu hóa công đoạn phối trộn bột inulin củ đắng sâm với sinh khối vi khuẩn tạo chế phẩm synbiotic	116
3.7. THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM SYNBIOTIC TRÊN CHUỘT THÍ NGHIỆM.....	124
3.7.1. Thử nghiệm độc tính cấp	124
3.7.2. Tác động điều trị tiêu chảy cấp của chế phẩm synbiotic.....	125
3.7.3. Tác động kích thích miễn dịch của chế phẩm synbiotic.....	127
3.7.4. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic	130
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	141
TÀI LIỆU THAM KHẢO	0
PHỤ LỤC	PL-1

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Giải nghĩa
CFU	: Colon form unit - Đơn vị khuẩn lạc
CoA	: Coenzyme A
CV	: Coefficient of variation - Hệ số biến thiên
Da	: Dalton - Đơn vị đo khối lượng phân tử một chất
DĐVN	: Dược Điển Việt Nam
DE	: Design Expert - Thiết kế chuyên nghiệp
ĐK	: Đường kính
DM/NL	: Dung Môi/Nguyên Liệu
DP _{av}	: DP _{average} - Mức độ polymer trung bình
DP _n	: Degree polymer - Mức độ polymer hóa
ĐS	: Đẳng sâm
FDA	: Food and Drug Administration - Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc (USA)
FOS	: Fructo-oligosaccharide - Inulin mạch ngắn
FT-IR	: Fourier transformation infrared spectroscopy - Quang phổ hồng ngoại
GA	: Gum Arabic - Một loại phụ gia thực phẩm
GALT	: Gut associated lymphoid tissue - Mô bạch huyết liên quan đến ruột
GAP	: Good agricultural practice - Thực hành nông nghiệp tốt
GC	: Gas chromatography- Sắc ký khí
GC-MS	: Gas chromatography-Mass spectrometry- sắc ký khí ghép nối đầu dò khối phổ
GF _n	: α -D-Glucopyranosyl-[β -D-Fructofuranosyl](n-1)- β -D-fructopyranosis- Tên gọi inulin dạng GF _n
GIT	: Gastrointestinal tract - Đường tiêu hóa
GLP	: Glucagon low peptide - Peptide đơn giản
GLP	: Glucagon
GPCR	: G - protein
HDACs	: Histone deacetylase - Một loại enzyme
HMT	: Hàm mục tiêu

HPLC	: High performance liquid chromatography - Sắc ký lỏng hiệu năng cao
IBD	: Inflammatory bowel diseases – Bệnh dị ứng
IF γ	: Interferon gamma- Tên một loại kháng thể
IgA	: Immunoglobulin A - Kháng thể IgA
IL	: Interleukin
IMO	: Isomalto - Oligosaccharide
IN/OF	: inulin/oligofructose
KPH	: Không phát hiện
LAB	: Lactobacillus
LC	: Liquid chromatography - Sắc ký lỏng
MALDI-MS	: Matrix assisted laser desorption ionization time of flight-Mass Spectrometry
MD	: Maltodextrin-Một loại phụ gia thực phẩm
mPa.s	: Centi Poise (cP = mPa.s) - Đơn vị đo độ nhớt thường dùng
MPN	: Most probable number - Đếm số khuẩn lạc
MS	: Mass spectrometry - Khối phổ
NDOs	: Nondigestible oligosaccharide - Xơ không tiêu hóa được dạng mạch ngắn
NK	: Natural kill - Tế bào giết tự nhiên
NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy - Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
PS	: Polysaccharide
PTN	: Phòng thí nghiệm
PU'	: Phản ứng
QĐ	: Quyết định
QĐ-ATTP	: Quyết định - An toàn thực phẩm
QTLC	: Quality thin layer chromatography - Chất lượng sắc ký lớp mỏng
RH	: Rate humidity - Độ ẩm
RI	: Refractive Index detector - Đầu dò chiết xuất (trong máy chuyên dụng)
rpm	: Revolutions per minute - Số vòng quay trong một phút
SCFA	: Short chain fatty acid - Acid béo chuỗi ngắn/ mạch ngắn
SK	: Sinh khối

SOS	: Soy bean oligosaccharide - Oligosaccharide nguồn gốc đậu tương
Std	: Standard deviation - Độ lệch chuẩn trong thống kê
TCVN	: Tiêu chuẩn Việt Nam
TH	: T Helper - Tế bào T giúp
TL	: Tỷ lệ
TLC	: Thin Layer Chromatography - Sắc ký lớp mỏng
TLPT	: Trọng lượng phân tử
TPCN	: Thực phẩm chức năng
TT	: Thuốc thử
UBND	: Ủy ban nhân dân
USDA	: US Food and Drug Administration - Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ
UV-VIS	: Ultraviolet - Ultraviolet spectroscopy
v/p	: Vòng/phút
v	Volume - Thể tích
VN	: Việt Nam
VSV	: Vi sinh vật
VSVHK	: Vi sinh vật hiếu khí
w	: Weight - Khối lượng
WHO	: World Health Organization - Tổ chức Y tế Thế giới
XS	: Xác suất
SK	: Sinh khối

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Một số dạng fructan tìm thấy ở một số loài sinh vật	9
Bảng 1.2. Một số loài thực vật giàu Inulin.....	10
Bảng 1.3. Hàm lượng inulin của một số loại thực vật.....	11
Bảng 1. 1. Các dung dịch glucose chuẩn.....	13
Bảng 1. 2. Tổ hợp thực nghiệm tối ưu hóa.....	15
Bảng 2.1. Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu.....	34
Bảng 2.2. Mã hóa các biến độc lập đầu vào.....	38
Bảng 2.3. Các biến độc lập đầu vào và mức độ được sử dụng trong thiết kế.....	39
Bảng 2.4. Xác định độ hòa tan	45
Bảng 2.5. Thang điểm đánh giá tiêu chảy ở chuột	47
Bảng 2.6. Phân lô thử nghiệm độc tính bán trường diễn.....	49
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của độ tuổi đến kích thước đường kính củ đẳng sâm	55
Bảng 3.2. Kết quả phân tích giải phẫu mô của củ đẳng sâm dưới kính hiển vi	56
Bảng 3.3. Kết quả phân tích định tính một số các nhóm chất hữu cơ có trong củ đẳng sâm 3 năm tuổi.....	58
Bảng 3.4. Hàm lượng một số kim loại nặng và tạp chất vô cơ của củ đẳng sâm ở các độ tuổi khác nhau	63
Bảng 3.5. Hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết củ đẳng sâm ở các độ tuổi khác nhau.....	63
Bảng 3.6. Hàm lượng các chất của củ đẳng sâm theo năm tuổi.....	68
Bảng 3.7. Biến mã và các biến thực trong thí nghiệm tối ưu hóa	72
Bảng 3.8. Thiết kế thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken và kết quả	72
Bảng 3.9. Mật độ xác suất của các hàm mục tiêu	74
Bảng 3.10. Kết quả dự đoán các thông số tối ưu.....	76
Bảng 3.11. Ảnh hưởng của dung môi và nồng độ dung môi đến hàm lượng saccharide toàn phần, inulin và fructan thu được sau kết tủa	81
Bảng 3.12. Kết quả kết tủa inulin và fuctan ở các nhiệt độ khác nhau	89
Bảng 3.13. Hiệu suất thu hồi inulin củ đẳng sâm qua các giai đoạn tái kết tủa	90
Bảng 3.14. Kết quả tính toán chỉ số R_f của inulin củ đẳng sâm tinh sạch trên sắc ký bản mỏng silicagel	91
Bảng 3.15. Kết quả phân tích khối lượng phân tử của các thành phần polysachride của củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng.....	94
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của inulin tinh sạch từ củ đẳng sâm.....	98

Bảng 3.17. Kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau.....	101
Bảng 3.18. Tính chất nhiệt của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau	101
Bảng 3.19. Hàm lượng Inulin và tính chất cảm quan của các loại bột sấy phun	102
Bảng 3.20. Kích thước hạt và PDI của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với nồng độ maltodextrin khác nhau.....	106
Bảng 3.21. Kích thước hạt và PDI của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với nhiệt độ khí đầu vào khác nhau.....	110
Bảng 3.22. Kết quả phân tích một số thành phần và đặc tính của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun thành phẩm.....	113
Bảng 3.23. Kết quả nuôi tăng sinh khối vi khuẩn trong môi trường bổ sung bột inulin củ đẳng sâm sấy phun	115
Bảng 3.24. Tổ hợp phối trộn prebiotic và probiotic	118
Bảng 3.25. Kết quả phân tích Anova các hàm mục tiêu Y_i	119
Bảng 3.26. Mật độ xác suất của các hàm mục tiêu	121
Bảng 3.27. Kết quả dự đoán các thông số tối ưu.....	122
Bảng 3.28. Kết quả kiểm tra lại một số tổ hợp có mật độ khuẩn lạc cao nhất.....	123
Bảng 3.29. Kết quả cân trọng lượng chuột thử nghiệm độc tính cấp.....	124
Bảng 3.30. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột thử nghiệm tiêu chảy cấp	125
Bảng 3.31. Kết quả phân tích công thức máu của chuột trước thử nghiệm	127
Bảng 3.32. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột ở các lô thử nghiệm.....	127
Bảng 3.33. Trọng lượng tương đối của một số cơ quan miễn dịch ở chuột.....	128
Bảng 3.34. Sự thay đổi về số lượng và công thức bạch cầu (BC) của chuột ở các lô thử nghiệm.....	128
Bảng 3.35. Kết quả phân tích công thức máu của chuột thử nghiệm.....	128
Bảng 3.36. Kết quả phân tích công thức máu và chức năng gan, thận của chuột dùng trong thí nghiệm.....	131
Bảng 3.37. Cân nặng trung bình của chuột theo thời gian ở các lô thí nghiệm	131
Bảng 3.38. Kết quả phân tích huyết học của chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm.....	132
Bảng 3.39. Chỉ số chức năng gan ở chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm.....	133
Bảng 3.40. Chỉ số chức năng thận ở chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm.....	134
Bảng 3.41. Kết quả phân tích vi thể cấu trúc tế bào gan của các lô thử nghiệm.....	138
Bảng 3.42. Kết quả phân tích vi thể cấu trúc tế bào thận của các lô thử nghiệm.....	140

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Ảnh về cây, củ và hoa đẳng sâm (<i>C. javanica</i>) (Ảnh do luận án chụp).....	4
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của sucrose và fructan	12
Hình 1.3. Phản ứng tạo màu với Resorcinol của inulin/FOS và các chất khác	23
Hình 1.4. Phân tử gum từ <i>Acacia senegal</i>	24
Hình 1.1. Sơ đồ phân loại đẳng sâm theo năm tăng trưởng	1
Hình 1.2. Sơ đồ tối ưu hóa quá trình chiết	15
Hình 1.3. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của dung môi.....	16
Hình 1.4. Sơ đồ xác định nồng độ dung môi thích hợp.....	16
Hình 1.5. Sơ đồ xác định nhiệt độ thích hợp khi cô đặc chân không	17
Hình 1.6. Sơ đồ khảo sát và xác định nhiệt độ kết tủa inulin.....	18
Hình 1.7. Sơ đồ khảo sát lựa chọn chất mang	19
Hình 1.8. Sơ đồ khảo sát chế độ sấy.....	19
Hình 1.9. Sơ đồ đánh giá chất lượng bột đẳng sâm thành phẩm.....	20
Hình 1.10. Sơ đồ đánh giá hoạt tính Prebiotic	21
Hình 2.1. Mẫu củ đẳng sâm.....	33
Hình 2.2. Vị trí thu mẫu.....	33
Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát.....	36
Hình 2.4. Mô hình tối ưu hóa	38
Hình 2.5. Mô hình tối ưu hóa	40
Hình 2.6. Các đặc điểm nhận dạng mô củ đẳng sâm	41
Hình 2.7. Sơ đồ phương pháp trái đĩa.....	46
Hình 3.1. Hình dạng và màu sắc bên ngoài của củ đẳng sâm theo năm tuổi	52
Hình 3.2. Hình ảnh về vết sẹo hàng năm trên cổ củ đẳng sâm.....	52
Hình 3.3. Hình ảnh bề mặt lát cắt của củ đẳng sâm tươi và khô	52
Hình 3.4. Hình ảnh bề mặt lát cắt ngang nhuộm màu của củ đẳng sâm tươi.....	52
Hình 3.5. Hình ảnh vòng tăng trưởng của củ đẳng sâm	53
Hình 3.6. Hình ảnh bột củ đẳng sâm (a), tinh thể inulin (b) và hình ảnh vi phẫu của củ đẳng sâm dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 1.25.....	53
Hình 3.7. Sự thay đổi về tỷ lệ giữa xylem và phloem của củ đẳng sâm	57
Hình 3.8. Sắc ký đồ bản mỏng silicagel dịch chiết inulin củ đẳng sâm 1, 2 và 3 năm tuổi với hệ dung môi chloroform: acid axetic: nước theo tỉ lệ 7:6:1.....	59

Hình 3.9. Sự thay đổi của hàm lượng đường tổng số ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi.....	60
Hình 3.10. Sự thay đổi của tổng chất chiết hòa tan ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi.....	60
Hình 3.11. Sự thay đổi của hàm lượng tro tổng số ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi.....	61
Hình 3.12. Mô hình tương quan và hồi quy của đường (a), chất chiết hòa tan (b) và hàm lượng tro chất (c) ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương-Lâm Đồng theo độ tuổi.....	61
Hình 3.13. Sự thay đổi của hàm lượng inulin ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi	62
Hình 3.14. Mối tương quan giữa hàm lượng inulin (a), polyphenol (b) và Flavonoid (c) theo độ tuổi.....	62
Hình 3.15. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng inulin chiết.....	69
Hình 3.16. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng inulin trong dịch chiết.....	70
Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến hàm lượng inulin chiết từ củ.....	71
Hình 3.18. Mô hình 2D, 3D bề mặt đáp ứng tiên đoán điểm tối ưu của các hàm mục tiêu dưới tác động của các yếu tố đầu vào	75
Hình 3.19. Kết quả trùng lặp các mặt đáp ứng.....	76
Hình 3.20. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng Inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan của dịch chiết đẳng sâm.....	78
Hình 3.21. Quy trình chiết inulin từ củ đẳng sâm tự nhiên	79
Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến sự thay đổi hàm lượng saccharide thu được sau kết tủa.....	84
Hình 3.23. Ảnh hưởng của nhiệt độ cô đến hàm lượng inulin của dịch cô đặc	86
Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ cô đến hàm lượng Fructan của dịch cô đặc	87
Hình 3.25. Hình ảnh sắc ký bản mỏng trên silicagel chế phẩm inulin tinh sạch với hệ dung môi chloroform: acetic acid: nước là 7:6:1	91
Hình 3. 26. Qui trình tinh sạch inulin từ dịch chiết đẳng sâm.....	92
Hình 3.27. Sắc ký đồ chế phẩm polysacchride tinh sạch trên sắc ký rây phân tử hiệu năng cao (sắc ký lọc gel).....	94
Hình 3.28. Phổ IR của inulin thương mại (Chicory Inulin - OrafitR GR)	95
Hình 3.29. Phổ FT-IR của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	95
Hình 3.30. Phổ ^{13}C -NMR (D_2O , 125 MHz) của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	96

Hình 3.31. Phổ DEPT của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	96
Hình 3.32. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 500 MHz) của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	96
Hình 3.33. Phổ HSQC của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	97
Hình 3.34. Phổ HMBC của inulin củ đẳng sâm tinh sạch.....	98
Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của inulin củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng.....	99
Hình 3.36. Giảm đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột	100
Hình 3.37. Giảm đồ phân tích nhiệt vi sai bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau	101
Hình 3.38. Giảm đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với nồng độ maltodextrin khác nhau.....	105
Hình 3.39. Giảm đồ phân tích nhiệt của mẫu inulin đẳng sâm sấy phun với tỷ lệ maltodextrin khác nhau	106
Hình 3.40. Sự thay đổi hàm lượng inulin và fructan của các mẫu bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với tỷ lệ maltodextrin sử dụng khác nhau	108
Hình 3.41. Giảm đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với nhiệt độ khí đầu vào khác nhau	109
Hình 3.42. Quy trình sấy phun tạo bột inulin củ đẳng sâm.....	111
Hình 3.43. Phổ FT- IR của bột inulin củ đẳng sâm tinh sạch và sấy phun	112
Hình 3.44. Mô hình 2D, 3D của các hàm mục tiêu Y_i dưới tác động của các yếu tố đầu vào	120
Hình 3.45. Kết quả trùng lặp các mặt đáp ứng.....	122
Hình 3.46. Hình ảnh về tình trạng phân bình thường và phân chuột bị tiêu chảy	125
Hình 3.47. Sự thay đổi tổng điểm tiêu chảy ở các lô chuột thử nghiệm theo thời gian thí nghiệm.....	126
Hình 3.48. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô sinh lý sau 28 ngày.....	137
Hình 3.49. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô uống Synbiotic liều 1,2 g/kg sau 28 ngày	137
Hình 3.50. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô uống Synbiotic liều 2,4 g/kg sau 28 ngày	137
Hình 3.51. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô sinh lý sau 28 ngày.....	139
Hình 3.52. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô uống Synbiotic liều 1,2 g/kg sau 28 ngày	139
Hình 3.53. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô uống Synbiotic liều 2,4 g/kg sau 28 ngày	140

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: Nghiên cứu thu nhận và tạo bột inulin từ củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) tự nhiên mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng

Chuyên ngành: Công nghệ Sau thu hoạch

Mã số: 9540104

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Thăng Long

Khóa: 2015-2019

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

2. PGS.TS. Đào Xuân Vinh

Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Nha Trang

Nội dung:

Luận án đã thu được một số kết quả mới bổ sung vào lĩnh vực nghiên cứu, sấy phun tạo bột củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) và tạo chế phẩm synbiotic từ bột củ đấng sâm định hướng ứng dụng trong thực phẩm chức năng:

1) Luận án đã xác định được các đặc điểm hình thái và cấu trúc mô củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng làm cơ sở phân biệt độ tuổi và thời gian thu hoạch củ đấng sâm. Mặt khác, luận án cũng xác định được củ đấng sâm 3 năm tuổi có thành phần các chất đạt tiêu chuẩn DĐVN V, (2017): Hàm lượng đường tổng số: $(10,08 \pm 0,88)^\circ\text{Bx}$, hàm lượng chất chiết tổng số: $(58,2 \pm 1,57) \%$; hàm lượng tro tổng số: $(5,50 \pm 0,17) \%$, không chứa tạp chất vô cơ và kim loại nặng.

2) Luận án đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình chiết inulin từ Củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng: dung môi chiết là nước cất hai lần, nhiệt độ chiết 71°C , thời gian chiết 36 phút và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 47ml/g với hiệu suất chiết inulin củ đấng sâm đạt 23,93%, fructan 26,96% và tổng chất chiết hòa tan đạt 61,35%. Luận án cũng xác định được các yếu tố thích hợp cho quá trình kết tủa thu inulin: nhiệt độ thích hợp để cô đặc dịch chiết trước khi kết tủa đến 16°Bx là 55°C , tác nhân kết tủa thích hợp là ethanol, nồng độ ethanol thích hợp cho quá trình kết tủa inulin là 80% và nồng độ ethanol thích hợp cho quá trình kết tủa fructan là 90%, nhiệt độ thích hợp để lắng kết tủa inulin là $(6 \pm 1)^\circ\text{C}$ với hiệu suất kết tủa trung bình đạt 95,53%.

3) Luận án lần đầu tiên tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc của phân tử inulin của củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể tinh sạch inulin từ dịch chiết thô bằng phương pháp kết tủa lại nhiều lần (6 lần) bằng ethanol ở nồng độ gây kết tủa 80% với hiệu suất thu inulin tinh sạch là $(75,85 \pm 0,84) \%$. Inulin tinh sạch thu nhận từ củ đấng sâm (*Codonopsis javanica*) mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng gồm 2 phân tử fructose polysaccharid: một phân tử có

khối lượng 3.193 Da, có 19-23 đơn phân, chiếm 96,448% và một phân tử có khối lượng phân tử 1.112.892 Da, chiếm 3,552%.

4) Luận án lần đầu tiên xác định được một số thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột inulin củ đắng sâm (*Codonopsis javanica*): chất trợ sấy là maltodextrin, với tỷ lệ maltodextrin bổ sung thích hợp là 10%, nhiệt độ khi đầu vào 185°C và nhiệt độ không khí buồng sấy là 85°C, áp suất khí nén 3 atm, tốc độ bơm nhập liệu 10 ml/p, tương ứng với tốc độ đĩa phun 16.000 v/p. Bột inulin củ đắng sâm sấy phun có hàm lượng inulin đạt $(445,90 \pm 2,79)$ mg/g; hàm lượng Fructan đạt $(469,40 \pm 1,61)$ mg/g, pH $(5,18 \pm 0,01)$, hàm lượng tro $(4,82 \pm 0,07)$ %. Độ hòa tan: 1/9,5 $\pm$ 0,5/15 (g/ml/phút; Độ ẩm $(6,06 \pm 0,27)$ % và không chứa tạp chất vô cơ và kim loại nặng. Bột inulin củ đắng sâm có kích thước hạt $(882,2 \pm 101,4)$ nm, mật độ hạt 100 %, độ phân tán 0,497 DPI, nhiệt độ nóng chảy trên 600°C. Bột inulin củ đắng sâm đạt tiêu chuẩn ATVSTP theo qui định hiện hành của Bộ Y tế đối với thực phẩm chức năng.

5) Luận án lần đầu tiên tiến hành sử dụng bột inulin củ đắng sâm tạo chế phẩm synbiotic để định hướng ứng dụng trong thực phẩm và thu được một số kết quả: Bột inulin củ đắng sâm có đặc tính prebiotic mạnh với liều sử dụng 4% (tương đương 1,8-2% tính theo lượng inulin) có thể kích tăng sinh tế bào (CFU) của 8 chủng (2 chủng *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. lactic*, *Enterococcus faecalis*) từ 1,4÷11,5 lần, trong đó *L. acidophilus* đạt mức tăng sinh cao nhất là $2,3 \times 10^{11}$ CFU/g và vi khuẩn *Enterococcus faecalis* đạt mức tăng sinh thấp nhất là 7×10^6 CFU/g.

6) Luận án xác định được công thức phối trộn tạo bột synbiotic: Bột inulin củ đắng sâm 0,514 g/g, sinh khối *L. acidophilus* (5×10^{10} CFU/g) 0,22 g/g; sinh khối *L. plantarum* (2×10^{11} CFU/g) 0,128 g/g; sinh khối *B. longum* (8×10^{10} CFU/g) 0,033 g/g và sinh khối *B. lactis* (10^{11} CFU/g) 0,1g/g.

7) Kết quả thử nghiệm chế phẩm synbiotic trên chuột nhắt cho thấy chế phẩm synbiotic với liều sử dụng liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày không độc, không ảnh hưởng đến chức năng của gan, thận ở chuột thử nghiệm và chế phẩm synbiotic có khả năng kích thích miễn dịch cũng như có khả năng điều trị tiêu chảy ở chuột nhắt.

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

PGS.TS. Vũ Ngọc Bội

PGS.TS. Đào Xuân Vinh

Nguyễn Thị Thăng Long

THE SUMMARY OF NEW CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Thesis topic: Research on receiving and creating inulin powder from *Codonopsis javanica* naturally grown in Lac Duong Dist-Lam Dong province.

Major: Post-Harvest Technology

Code: 9540104

The Student of Ph.D. Nguyen Thi Thang Long. Course: 2015-2019

Instructors:

1. Assoc.Prof.Dr. Vu Ngoc Boi

2. Assoc.Prof.Dr. Dao Xuan Vinh

Training institution: Nha Trang University

Contents:

*The thesis has obtained some new results added to the field of research, spray drying to create inulin powder from Dangshen (*Codonopsis javanica*) and making synbiotic preparations from inulin for application in functional foods:*

*1)The thesis has researched and determined for the first time the morphological and structural features of the isotropic root tissue (*Codonopsis javanica*) that grows naturally in Lac Duong - Lam Dong as the basis for age discrimination and timing. Harvesting Dangshen roots. On the other hand, the thesis also determined that 3-year-old Dangshen root has ingredients that meet Vietnamese pharmacopeia standards in 2017: Total sugar content: $(10.08 \pm 0.88)^\circ\text{Bx}$, Total extract content: $(58.2 \pm 1.57) \text{ g/100g}$; Total mineral content: $(5.50 \pm 0.17) \%$, containing inorganic impurities and heavy metals.*

*2)The thesis has first time researched and optimized the inulin extraction process from *Codonopsis javanica* that naturally grows in Lac Duong Lam Dong: the extraction solvent is distilled water, extraction temperature 71°C , extraction time, 36 minutes, and the ratio of solvents / raw materials is 47ml/g with 23.93% inulin extract, 26.96 % fructan, and 61.35 % of total dissolved extracts. The thesis also identifies the right factors for inulin precipitation: the appropriate temperature to concentrate the extraction before precipitating to 16°Bx is under 55°C , the suitable precipitation agent is ethanol, the concentration of ethanol is fit. The content for inulin precipitation is 80%, and ethanol concentration for fructan precipitation is 90%, temperature for inulin precipitation is $(6 \pm 1)^\circ\text{C}$ with average precipitation efficiency of 95.53%.*

*3) The thesis studies for the first time on purification and determination of the molecular structure characteristics of inulin obtained. The study results showed that it is possible to purify inulin from crude extracts by recrystallization six times, and the purified inulin collection efficiency is $(75.85 \pm 0.84) \%$. The purified inulin obtained from *Codonopsis javanica* naturally grows in Lac Duong - Lam Dong province includes two molecules of Fructose polysaccharide: a molecular with a mass of 3,193 Da, about 19-23 monomers, depict at*

96,448%, and the other molecular has a molecular weight of 1,112,892 Da, accounting for 3,552%.

4) The dissertation identifies for the first time some parameters suitable for the spray Dangshen powdered in *Codonopsis javanica*. The drying aid is maltodextrin, with the appropriate additional maltodextrin ratio of 10 %. The inlet temperature is 185°C, and the drying chamber air temperature is 85°C; The compressed air pressure is 3 atm, the input pump speed is 10ml/p, which corresponds to the injector speed of 16,000 rpm. The powder obtained had an inulin content of (445.90 ± 2.79) mg/g; Fructan content reached (469.40 ± 1.61) mg/g, pH (5.18 ± 0.01) , mineral content (4.82 ± 0.07) %. Solubility: 1/ 9.5 ± 0.5 / 15 (g / ml/ min; Humidity (6.06 ± 0.27) % and free of inorganic impurities and heavy metals. particle size (882.2 ± 101.4) nm, particle density 100%, dispersion 0.497 DPI, melting temperature over 600°C. The powder meets food safety standards according to current regulations of the Ministry of Health for functional food.

5) The thesis has done for the first time by using powder from Dangshen to make synbiotic products to apply in food and obtained some results: Dangshen spray-powder containing Inulin has strong prebiotic properties with a dose of 4% (w/w- equivalent to 1.8-2% based on inulin content) can stimulate cell proliferation (CFU) of 6 strains (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. lactic*, *Enterococcus faecalis*) from $1.4 \div 11.5$ times, in which, *L. acidophilus* had the highest fertility rate of 2.3×10^{11} CFU/ g and *Enterococcus faecalis* had the lowest fertility rate of 7×10^6 CFU/ g.

6) The thesis first has identified the synbiotic mixing formula for the first time: dangshen powder 0.514 g/g mixed with *L. acidophilus* biomass 0.33 g/g (density 5×10^{10} CFU/ g); 0.128 g/ g *L. plantarum* biomass (density 2×10^{11} CFU/ g); 0.033 g/g *B. longum* (density 8×10^{10} CFU / g) and 0.1 g/ g of *B. lactis* biomass (density 10^{11} CFU/ g).

7) The thesis tests synbiotic products for the first time in mice. Results, synbiotic's doses of 1.2 g/ kg and 2.4 g/ kg using for 14 or 28 days were not acute toxicity, semi-chronic toxicity to the liver's function, and to the kidney in test rats. Synbiotic has immunostimulating properties as well as the ability to treat diarrhea in mice.

CÁN BỘ HƯỚNG DẪN

NGHIÊN CỨU SINH

Assoc.Prof.Dr. Vũ Ngọc Bội Assoc.Prof.Dr.Đào Xuân Vinh Nguyễn Thị Thăng Long

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Việt Nam có khoảng 3948 loài thực vật, 408 loài động vật, 75 loại tro vật và trên 50 loại thảo mộc có khả năng làm thuốc và thực phẩm chức năng [11]. Theo Bộ Y tế, Việt Nam có nền y học cổ truyền lâu đời, phong phú. Y học cổ truyền Việt Nam có nhiều đóng góp to lớn trong bảo vệ và nâng cao sức khỏe nhân dân cũng như phòng và chữa bệnh. Cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ tiên tiến, y dược cổ truyền Việt Nam đã luôn luôn được Nhà nước chú trọng theo hướng vừa kế thừa, chọn lọc và ứng dụng các tiến bộ hiện đại để nghiên cứu tách chiết và sử dụng các chất tự nhiên từ thực vật trong việc huy giá trị truyền thống trong chăm sóc sức khỏe nhân dân. Theo định hướng này, ngày 30/10/2013, Thủ tướng đã ra Quyết định 1976/QĐ-TTg về “Tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030”, trong đó tập trung đầu tư nghiên cứu 28 loại dược liệu bản địa trong đó có củ đằng sâm (*Codonopsis javanica*) phục vụ cho sản xuất thuốc và chế biến thực phẩm chức năng. Lâm Đồng với điều kiện tự nhiên ưu nên được coi như là thủ phủ của cây thuốc Việt Nam với 1664 loài thuộc 237 họ thực vật, chiếm gần 50% số lượng cây thuốc trong cả nước [12]. Do vậy, Lâm Đồng được coi là là một trong 5 vùng trọng điểm được qui hoạch, khai thác, trồng và nghiên cứu các loại cây dược liệu để tạo thành sản phẩm hàng hóa [4]. Tỉnh Lâm Đồng được quy hoạch trồng 12 loài dược liệu bản địa trong đó củ đằng sâm [20].

Các chất chiết từ thảo dược có nguồn gốc tự nhiên với đặc điểm nổi bật là không có tính độc, không có tác dụng phụ [88], đa tác dụng [147, 170] nên được sử dụng làm thực phẩm chức năng để duy trì sức khỏe, chống lại nhiều loại bệnh khác nhau và dần dần thay thế cho thuốc [80]. Vì thế, các chất chiết từ thực vật được ứng dụng rộng rãi trong đời sống và là nguyên liệu của nhiều ngành công nghiệp như dược phẩm, sản xuất các loại thuốc đông y, thực phẩm và mỹ phẩm [83]. Các loại thuốc thảo dược truyền thống thường được làm từ lá, rễ, vỏ cây và hoa của thực vật tự nhiên, trong đó chứa chủ yếu một số chất có hoạt tính sinh học như alkaloids, flavonoid, polysaccharide và các hoạt chất sinh học khác [51]. Thành phần hoạt chất, tác dụng và sự hiện diện của các chất trên phụ thuộc vào một số yếu tố bao gồm kiểu gene, thời gian và mùa thu hoạch, tuổi của thực vật, quá trình sấy khô và bảo quản cũng như điều kiện thu nhận chất xuất [88, 170]. Tuy vậy, cách sử dụng thực phẩm truyền thống có nhược điểm do việc sử dụng nguyên nguồn nguyên liệu tự nhiên đó là khối lượng đưa vào có thể lớn và quá

trình hấp thu sẽ khó khăn nên thời gian phải sử dụng dài ngày. Do vậy, việc nghiên cứu, thu nhận các chất dưới dạng tinh khiết từ thực vật để nâng cao hiệu lực ứng dụng các chất này trong đó có các chất từ củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lâm Đồng là cần thiết.

Từ những lý do nêu trên và trên cơ sở của kinh phí từ đề tài cấp Bộ (mã số B2018-DLA-01), tôi thực hiện luận án “*Nghiên cứu thu nhận và tạo bột inulin từ củ đẳng sâm (Codonopsis javanica) tự nhiên mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng*”.

Mục tiêu của luận án: xác định được độ tuổi thu hoạch và thu nhận được inulin từ củ đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng. Trên cơ sở đó, thử nghiệm sử dụng inulin từ củ đẳng sâm tạo ra chế phẩm synbiotic hướng tới phục vụ, chăm sóc sức khỏe cộng đồng.

Nội dung của luận án

1) *Nghiên cứu xác định thời gian thu hoạch củ đẳng sâm tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng.*

2) *Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết inulin từ củ đẳng sâm tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng.*

3) *Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin thu nhận được.*

4) *Nghiên cứu sấy phun tạo bột inulin.*

5) *Thử nghiệm sử dụng inulin từ củ đẳng sâm tạo bột synbiotic định hướng ứng dụng trong thực phẩm.*

Ý nghĩa khoa học

Các kết quả nghiên cứu của luận án là nguồn dữ liệu khoa học mới về inulin của củ đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng. Các dữ liệu khoa học này là nguồn tài liệu phục vụ cho giảng dạy, nghiên cứu về các chất tự nhiên ở thực vật.

Ngoài ra, nghiên cứu của luận án còn giúp tạo ra các cơ sở dữ liệu về hình thái và mô học giúp phân biệt nguyên liệu Củ đẳng sâm với hàng giả, phân biệt được nguyên liệu đạt tiêu chuẩn theo năm tuổi cũng như giúp xác định thời gian thu hoạch thích hợp nguyên liệu củ đẳng sâm tự nhiên.

Ý nghĩa thực tiễn

Các kết quả nghiên cứu của luận án cơ sở để cơ quan quản lý Nhà nước tỉnh Lâm Đồng sử dụng để định hướng phát triển và ứng dụng củ đẳng sâm trong thực tế. Mặt khác, các kết quả nghiên cứu của luận án góp phần tích cực trong việc nâng cao hiệu quả khai thác và sử dụng nguồn tài nguyên củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lâm Đồng cũng như là cơ sở để doanh nghiệp phát triển thương mại các sản phẩm thực phẩm chức năng từ củ đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CÂY CỦ ĐẰNG SÂM

1.1.1. Phân loại và đặc điểm sinh học của cây đẳng sâm

Cây đẳng sâm có tên tiếng Anh là Dangshen, tên tiếng Việt là đẳng sâm hoặc phòng đẳng sâm hoặc sâm leo hoặc sâm nam [161], thuộc Giới: Thực vật (Plantae), ngành: Magnoliophyta, lớp: Magnoliopsida, bộ: Asterales, họ: Campanulaceae, chi: *Codonopsis*. Tên khoa học của cây đẳng sâm: *Codonopsis javanica* (Blume) Hook.f. Các tên khoa học đồng danh của cây đẳng sâm là *Campanumoea javanica* Blume (1826), *Campanumoea cordata* Miq. (1862), *Campanumoea maximowiczii* Honda (1936). *Codonopsis javanica* [91].

Hiện nay có 47 loài thuộc chi *Codonopsis*, phân bố chủ yếu ở Trung, Đông và Nam Á. Trong đó, Trung Quốc có 40 loài [72]. Tại Việt Nam chỉ có 02 loài [6], tại Lâm Đồng chỉ có 01 loài *C. javanica* [12]. Loài *C. javanica* có ở đông Ấn Độ, Myanmar, miền Nam Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Thái Lan, đảo Sumatra và Java và Việt Nam [2, 91]. Tại Việt nam, loài *C. javanica* phân bố ở độ cao 800-2000m, tập trung ở các tỉnh miền núi phía Bắc, Tây Nguyên có ở Kon Tum (Đắk Tô, Đắk Glei: Ngọc Linh), Lâm Đồng (Đà Lạt, Lạc Dương) [2].

Các loài *C. pilosula*, *C. tangshen* và *C. lanceolata* là những loài phổ biến, củ tươi hoặc khô được sử dụng rộng rãi trong Y học dân gian qua nhiều thế kỷ [87]. Theo Dược Điển Trung Quốc, Radix Codonopsis là tên gọi củ khô của các loài *C. pilosula*, *C. pilosula* var. *modesta*, *C. tangshen* và *C. lanceolata* [72].

Đẳng sâm (*C. javanica*) là loài thảo mộc sống nhiều năm, thân leo, dài 2-3 m, phân nhánh nhiều, lá đơn, mọc đối, hình trứng hoặc hình tim, mỏng, mềm, màu xanh lá mạ, mặt dưới có lông nhung trắng, mé nguyên hoặc có răng cưa tù, cuống lá dài 3-7 cm, hoa mọc đơn độc ở kẽ lá, hình chuông, màu trắng hoặc hơi vàng, họng có vân tím [2] (Hình 1.1).



Cây đẳng sâm



Củ đẳng sâm



Hoa đẳng sâm

Hình 1.1. Ảnh về cây, củ và hoa đẳng sâm (*C. javanica*) (Ảnh do luận án chụp)

Củ đẳng sâm có rễ chính hình trụ có khi phân nhánh, nạc, màu vàng nhạt, đường kính $0,5 \div 2$ cm, dài $6 \div 15$ cm, đầu trên phát triển to, có nhiều sẹo của thân. Mặt ngoài rễ màu vàng nâu nhạt, trên có những rãnh dọc và ngang, chia rễ thành những đường lồi lõm, thớ chất chắc, dễ bẻ, vết bẻ không phẳng, không mịn, có mùi thơm, vị ngọt nhẹ [6]. Giải phẫu vi phẫu củ đẳng sâm cho thấy lớp vỏ gồm $4 \div 5$ hàng tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn thành hàng đồng tâm và dãy xuyên tâm, có nhiều chỗ bị nứt rách. Mô mềm vỏ cấu tạo bởi tế bào nhiều cạnh, hơi dài dẹt, tế bào libe nhỏ xếp xít nhau, mạch gỗ xếp thành hàng tạo thành hệ thống hình nan quạt tỏa ra từ tâm. Tia ruột có tế bào thành mỏng [6].

Loài *C. javanica* nằm trong danh mục của Sách Đỏ Việt Nam (2000), xếp loại cấp "V-sẽ nguy cấp" (Vulnerable) và nằm trong Danh mục thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý hiếm (nhóm 2) theo Nghị định số 32/2006/NĐ-CP ngày 30/3/2006 và là loài đặc trưng của Lâm Đồng [12] nhưng chưa được nghiên cứu sâu và đánh giá tiềm năng ứng dụng của nó. Gần đây, loài này được đưa vào danh mục cây thảo dược cần phát triển trên diện rộng thành nguyên liệu hàng hóa (Quyết định 1976/QĐ-TTg, ngày 30/10/2013; QĐ số 179/QĐ-BYT, 2015 và QĐ số 1976/QĐ-TTg (206/QĐ-BYT, ngày 22/1/2015).

Ở Việt Nam, củ đẳng sâm (*C. javanica*) được coi là cây thuốc quý dùng làm thuốc bổ, chữa cơ thể suy nhược, thiếu máu, vàng da, ăn uống khó tiêu, chống dị ứng, viêm gan, tăng cường miễn dịch, giảm tiêu chảy, giảm mỡ máu, tiểu đường, béo phì và ung thư ruột, tăng sức dẻo dai, ích huyết, chống mệt mỏi, yếu sức, háo khát, làm sáng mắt [2, 6, 8]. Việt Nam được coi như nhân sâm của người nghèo [6, 90] vì đôi khi được sử dụng thay thế cho nhân sâm (*Panax ginseng*).

1.1.2. Thành phần các chất cơ bản của các loài trong chi *Codonopsis*

Các hợp chất hữu cơ cơ bản của củ đẳng sâm *C. javanica* giống như các loài thực vật khác [55] và có một số chất cụ thể như sau:

* Carbohydrate

Monosaccharide, oligosaccharide và polysaccharide đã được tìm thấy trong các loài thuộc chi *Codonopsis*. Các monosaccharide bao gồm fructose, glucose, mannose... Các oligosaccharide bao gồm sucrose, synanthrin, raffinose. Polysaccharide (PS) là thành phần chính của carbohydrate trong chi *Codonopsis* và hầu hết là heteropolysaccharide [63]. Các polysaccharide tan trong nước, được tạo thành từ đơn phân như fructose, mannose, xylose và galactose với tỷ lệ khác nhau tùy loại. Polysaccharide có tính acid chủ yếu chứa acid

galacturonic và glucuronic acid. Polysaccharide trung tính thường chứa các thành phần: arabinose, glucose, galactose và rhamnose, ... Các polysaccharide dạng không hòa tan gồm cellulose, hemicellulose [165].

*** Acid amin**

C. javanica có các acid amin chủ yếu bao gồm threonine, lysine, methionine, phenylalanine, leucine, isoleucine, avline, tryptophan, aspartic acid, histidine, arginine, glycine, cystine, tyrosine, serine, glutamic acid, proline và alanine. Trong củ đẳng sâm có 8 loại là acid amin thiết yếu [13, 63].

*** Tro**

Trong củ đẳng sâm *C. javanica* có một số loại nguyên tố vi lượng như Ca, Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, K, P, Na, Ni, Cd, Mo, Co, Se [13, 62, 72]. Theo DĐVN V, (2017) qui định cho củ đẳng sâm nguyên liệu phải có các thành phần sau : phản ứng định tính tạo vòng màu tím : Dương tính. Độ ẩm $\leq 15\%$. Chất chiết $\geq 35\%$. Tro toàn phần $\leq 6,0\%$. Tro không tan trong acid $\leq 2,0\%$. Tạp chất vô cơ $\leq 1\%$. Kim loại nặng : Pb ≤ 1 ppm ; Cd $\leq 0,2$ ppm ; Hg $\leq 0,1$ ppm As $\leq 1,5$ ppm. (PL 9.4.8 và PL 9.8. DĐVN V. Tập 2).

*** Một số chất có hoạt tính sinh học**

Củ của các loài *Codonopsis* có chứa các alkaloid, phenylpropanoid triterpenoid, polyacetylene, flavone, acid hữu cơ, polysaccharide, saponin [62, 72]. Trong số đó có 5 nhóm hoạt chất: polysaccharide, polyacetylene, phenylpropanoid alkaloid và triterpenoid được coi là thành phần chính, có hoạt tính sinh học [72, 87]. Các loài *Codonopsis* có thành phần hóa học khác nhau nên cũng có các chất có hoạt tính sinh học khác nhau [125]. Một số hợp chất thuộc 5 nhóm chất nói trên đã được đánh giá hoạt tính sinh học và cơ chế dược lý tiềm năng. Tuy vậy, cơ chế dược lý của một chất có hoạt tính sinh học đã được nghiên cứu ở các loài *Codonopsis* thực chất chỉ là những nghiên cứu bước đầu và vẫn cần được tiếp tục nghiên cứu một cách chuyên sâu để từ đó có thể định hướng khai thác và ứng dụng trong đời sống. Ngoài ra, các nghiên cứu về độc tính của các chất thu nhận từ *Codonopsis* cho thấy chúng không có độc tính [87].

1.1.3. Thời gian thu hái

Thời gian thu hái *Codonopsis* chưa được nghiên cứu đầy đủ. Các nghiên cứu về thời gian thu hoạch loài này chủ yếu của nước ngoài và cũng rất khác nhau. Kết quả nghiên cứu của Ju li Yuan (2011) cho thấy củ hai tuổi và ba tuổi của loài *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) khá khác nhau về hàm lượng polysaccharide và Saponin tổng số [78].

Dựa vào hàm lượng polysaccharide thì thời gian thu hoạch *C. pilosula* Nannf. var. *modesta* tốt nhất là từ tháng 9 đến tháng 11 của năm thứ ba. Tuy vậy, khi thu hoạch củ của *C. pilosula* vào các tháng khác nhau thì hàm lượng polysaccharide cũng khác nhau [6, 78]. Các nghiên cứu chiết polysaccharide bằng kỹ thuật chiết có hỗ trợ siêu âm từ củ *C. pilosula* nuôi trồng theo kỹ thuật GAP cho thấy hàm lượng polysaccharide dao động trong khoảng $25 \div 42,27\%$ [110].

Từ các phân tích ở trên cho thấy ở Việt Nam hiện chưa có các nghiên cứu về thời gian thu hái và thành phần các chất ở củ đẳng sâm. Do vậy, cần phải nghiên cứu về thời gian thu hái, thành phần các chất làm cơ sở cho quá trình thu hoạch nguyên liệu củ đẳng sâm dùng trong nghiên cứu và sản xuất.

1.2. XÁC ĐỊNH LOÀI VÀ ĐỘ TUỔI THẢO DƯỢC

Độ tuổi và đặc tính của các loài thực vật nói chung và thảo dược nói riêng rất khác nhau và luôn thay đổi phụ thuộc vào các yếu tố như thời kỳ sinh trưởng, môi trường, điều kiện sinh lý, thời gian thu hoạch, điều kiện bảo quản và xử lý [88]. Mặt khác, thành phần các chất và hoạt tính của nó trong dược liệu cũng bị ảnh hưởng bởi thời gian thu hoạch, môi trường sống ... Hiện nay, phân tích DNA là một công cụ phổ biến chính xác để phân loại loài thực vật [87] nhưng kỹ thuật này đòi hỏi phải đầu tư lớn và phải thực hiện tại phòng thí nghiệm. Do vậy, việc nghiên cứu về hình thái (nhận diện macro) và cấu trúc mô (nhận diện micro) thường được các nhà khoa học ưu tiên sử dụng trong xác định danh tính và độ tuổi của các loại dược liệu. Do vậy, luận án định hướng sử dụng đặc điểm hình thái và cấu trúc mô để phân loại độ tuổi của củ đẳng sâm.

1.2.1. Phương pháp truyền thống (nhận dạng macro)

Phương pháp truyền thống để xác định độ tuổi dược liệu là dựa vào đặc điểm hình thái và cấu trúc mô. Đây là một cách xác định đơn giản, nhanh và dễ thực hiện [158]. Việc nhận dạng macro dược liệu dựa trên củ bao gồm hình dạng bên ngoài, màu, mùi, vị, phân nhánh của rễ, kết cấu bề mặt cắt (bề mặt bị nứt, bề mặt mặt phẳng, mịn), thông qua bề mặt cắt của dược liệu có thể giúp phân biệt một số loài khác nhau [174]. Các đặc điểm macro thường được phối hợp với cấu trúc giải phẫu và thành phần hóa học bên trong để việc xác định độ tuổi chính xác hơn [158]. Màu sắc, hương vị của một số dược liệu thường có mối quan hệ chặt chẽ với chất lượng và thành phần hóa học. Chẳng hạn, nhân sâm (*P. ginseng*) có vị hơi ngọt và hơi đắng vì chứa cả saccharide và saponin [174].

1.2.2. Phương pháp hiện đại (nhận dạng micro)

Nhận dạng vi mô là một công cụ hữu ích để xác định tính xác thực và thậm chí đánh giá chất lượng của dược liệu. Phương pháp nhận dạng vi mô thường dựa vào :

*** Cấu trúc giải phẫu:** Tiến hành kiểm tra vi mô bằng kính hiển vi quang học là tiêu chí không thể thiếu, như một thử nghiệm sàng lọc ban đầu để nhận dạng vật liệu bị cắt hoặc bột hoặc vật liệu được xử lý bằng chất hóa học đặc hiệu [59, 174]. Việc soi vi mô dưới kính hiển vi tuy không thể cung cấp nhận dạng đầy đủ nhưng khi phối hợp với các phương pháp phân tích khác có thể cung cấp khả năng hỗ trợ vô giá cho việc định danh loài và xác định độ tuổi [158, 174]. Người ta có thể sử dụng các vòng tăng trưởng hàng năm để xác định tuổi [140]. Hình dạng vòng tăng trưởng hàng năm sẽ khác nhau tùy theo chi hoặc loài [51]. Độ tuổi của dược liệu sẽ được xem xét dựa vào vòng tăng trưởng hàng năm phối hợp với các kỹ thuật phân tích về hình thức tăng trưởng, cốt vĩnh viễn hay xác định gene. Việc xác định độ tuổi của dược liệu dựa vào cách phân tích hình thức tăng trưởng không chỉ thực hiện ở các loài thân gỗ mà còn được tiến hành ở các loài không phải thân gỗ [140].

*** Dựa vào các thành phần hóa học:** Hương vị, mùi và đặc tính macro cùng với thành phần hóa học bên trong là cơ sở quan trọng cho việc phân loại độ tuổi [174].

Polysaccharide, polyacetylene, alkaloid và Saponin là thành phần chính có hoạt tính sinh học của *Codonopsis* [72]. Do đó, người ta có thể phân tích định lượng các thành phần trên để đánh giá chất lượng của loài thuộc chi *Codonopsis* và đánh giá độ tuổi. Người ta có thể sử dụng các phương pháp phân tích hiện đại HPLC, UV-VIS và cộng hưởng từ hạt nhân NMR, ... để phân tích thành phần các chất làm cơ sở đánh giá chất lượng, xác định độ tuổi, tính đồng nhất và đánh giá tiềm năng của nguyên liệu thực vật [56, 88, 174]. Ngoài ra, có thể dùng sắc ký lớp mỏng để định tính và xác định mức độ tinh khiết của một loại chất. Kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (TLC) khá hiệu quả và dễ thực hiện với chi phí không cao nên thường được sử dụng để đánh giá dược liệu và các chế phẩm của chúng [158].

Hiện tại củ đẳng sâm chủ yếu được người dân khai thác tự nhiên tại Lâm Đồng và một số tỉnh phía Bắc bán ra thị trường ở nhiều độ tuổi khác nhau. Củ đẳng sâm cũng bắt đầu được người dân trồng trọt từ nguồn giống tự nhiên. Người tiêu dùng mua củ đẳng sâm không chỉ để ngâm rượu mà củ non còn được sử dụng như một món ăn bổ dưỡng dưới dạng nấu súp hoặc cháo. Theo Đỗ Tất Lợi nên thu hoạch củ đẳng sâm sau 3 năm tuổi [9]. Tuy vậy, Đỗ Tất Lợi không đưa ra các đặc điểm đặc trưng để nhận biết củ đẳng sâm sau 3 năm tuổi. Các tài liệu như Dược điển Việt Nam hoặc Sách Đỏ Việt Nam hoặc Những cây thuốc

và vị thuốc Việt Nam có mô tả nhận diện nguyên liệu củ đẳng sâm [6], [2] [9] nhưng không mô tả nhận diện cụ thể về độ tuổi đẳng sâm.

Từ các phân tích ở trên cho thấy Việt Nam hiện chưa có nghiên cứu nhận diện độ tuổi của củ đẳng sâm thông qua đặc điểm hình thái và cấu trúc mô cũng như có nghiên cứu về mối tương quan giữa hoạt chất sinh học và độ tuổi của củ đẳng sâm làm cơ sở xác định thời gian thu hoạch. Vì vậy, việc luận án định hướng nghiên cứu các đặc điểm hình thái và giải phẫu mô làm cơ sở xác định độ tuổi thu hoạch củ đẳng sâm là cần thiết.

1.3. FRUCTAN VÀ MỘT SỐ LOẠI THỰC VẬT CÓ INULIN

1.3.1. Giới thiệu về fructan

Fructan là một thuật ngữ chung để gọi carbohydrate có chứa một hoặc nhiều phân tử β -D fructose (liên kết fructosid của fructose) trong cấu trúc hóa học của nó [101, 108, 111, 132, 154, 178, 181]. Các fructan thường có hai liên kết glycosid khác nhau: liên kết β (2 $\rightarrow$ 1) có trong inulin và FOS (fructose oligosaccharide); liên kết β (2 $\rightarrow$ 6) có trong levan và graminan bao gồm cả β (2 $\rightarrow$ 1) và β (2 $\rightarrow$ 6) (1&6 ketotetrose) [34, 129]. Fructan là nguồn carbohydrate dự trữ [133], có trong ít nhất 10 họ thực vật bậc cao [31, 130] và trong hơn 30.000 loài thực vật [34] (Bảng 1.1).

Bảng 1.1. Một số dạng fructan tìm thấy ở một số loài sinh vật

Tên	Liên kết (Fructosid)	Cấu trúc hóa học	Nguồn tự nhiên
Inulin	β (2, 1)	Mạch thẳng	Thực vật
		Mạch nhánh	Vi khuẩn
		Mạch vòng	Nấm
Levan	β (2, 6)	Mạch thẳng	Thực vật
		Mạch nhánh	Vi khuẩn, Nấm
Phlein	β (2, 6)	Mạch thẳng Mạch nhánh	Thực vật
Graminan	β (2, 1) và β (2, 6)	Mạch thẳng Mạch nhánh	Thực vật
Kestoses	β (2, 1) và β (2, 6)	Mạch thẳng Mạch nhánh	Thực vật

Fructan có thể tồn tại ở dạng hòa tan trong không bào, lá (lưu trữ trong thời gian ngắn), hoặc có trong rễ, thân, củ hoặc hạt và thường được tìm thấy trong rễ hoặc thân rễ [130]. Fructan có cấu trúc và chiều dài khác nhau tùy thuộc loài và cơ quan thực vật. Ngoài ra,

fructan cũng có mặt trong các loại nấm và vi khuẩn [130], chẳng hạn như có ở vi khuẩn *Streptococcus mutans* hay một số loài nấm đặc biệt thuộc họ *Aspergillus* [53].

Hầu hết các loài thực vật tổng hợp và lưu trữ fructan thì sẽ không lưu trữ carbohydrate khác như tinh bột [34]. Fructan được cho là có vai trò quan trọng trong quá trình thẩm thấu, hoạt động như là chất bảo vệ chống lại sự mất nước ở thực vật do hạn hán hoặc đóng băng và có liên quan đến sự chịu đựng stress ở thực vật [34].

1.3.2. Một số loại thực vật giàu inulin

Fructan là một polysaccharide mạch thẳng, hòa tan trong nước nóng [111] và là nguồn carbohydrate dự trữ chủ yếu ở một số loại thực vật [31, 74, 156]. FOS là đoạn ngắn của Inulin. Inulin và FOS đều là saccharide thuộc loại fructan. Một số loài thực vật có hàm lượng inulin cao (>15%) được trình bày ở bảng 1.2 [31, 156].

Bảng 1.2. Một số loài thực vật giàu Inulin

STT	Loài thực vật	STT	Loài thực vật
1	Agave (<i>Agave spp</i>)	11	Garlic (<i>Allium sativum</i>)
2	Asparagus (<i>Asparagus spp</i>)	12	Globe artichoke (<i>Cynara scolymus</i>)
3	Banana/plantain (<i>Musaceae spp</i>)	13	Jerusalem artichoke (<i>Helianthus tuberosus</i>)
4	Burdock (<i>Arctium lappa</i>)	14	Jicama (<i>Pachyrhizus erosus</i>)
5	Camas (<i>Camassia spp</i>)	15	Leopard's-bane (<i>Arnica montana</i>)
6	Chicory (<i>Cichorium intybus</i>)	16	Mugwort root (<i>Artemisia vulgaris</i>)
7	Coneflower (<i>Echinacea spp</i>)	17	Onion (<i>Allium cepa</i>)
8	Costus (<i>Saussurea lappa</i>)	18	Wild yam (<i>Dioscorea spp.</i>)
9	Dandelion (<i>Taraxacum officinale</i>)	19	Yacón (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)
10	Elecampane (<i>Inula helenium</i>)		

Trong công nghiệp, inulin được thu nhận chủ yếu từ rau diếp xoăn (*Cichorium intybus*), là nguồn carbohydrate dự trữ trong nhu mô rễ và chiếm khoảng 70 - 80% trọng lượng khô [70]. Ngoài ra, người ta có thể thu nhận inulin từ một số loài vi khuẩn [130] hay từ một số loài thảo dược [108]. Inulin là loại fructan có trong tất cả các cây hai lá mầm (*Dicotyledons*) nhưng chỉ có ở một số loại cây một lá mầm (*Conocotyledons*). Bảng 1.3 [33].

Bảng 1.3. Hàm lượng inulin của một số loại thực vật

Tên loài thảo dược (Tiếng Việt-Tiếng Anh)	Phần ăn được	Vật chất khô (%)	Hàm lượng inulin (% trọng lượng tươi)
Hành tây-Onion	Củ	6 -12	2-6
Jerusalem artichoke	Bông hoa	19-25	14-19
Diếp xoăn-Chicory	Rễ củ	20-25	15-20
Tỏi tây-Leek	Củ	15-20*	3-10
Tỏi-Garlic	Củ	40-45*	9-16
Artichoke heart	Lá sấy khô	14-16	3-10
Chuối-Banana	Fruit	24-26	0.3- 0.7
Lúa mạch đen-Rye	Trái cây	88- 90	0.5- 1*
Lúa mạch-Barley	Ngũ cốc	NA	0.5 - 1.5*
Bồ công anh -Dandelion	Ngũ cốc	50-55*	12-15
Cây ngưu bàng-Burdock	Lá	21-25	3.5- 4.0
Camas	Rễ củ	31- 50	12-22
Murnong	Củ	25- 28	8-13
Củ quì-Yacon	Rễ củ	13-31	3-19
Cây củ hạ -Salsify	Rễ củ	20-22	4-11

Ghi chú: *Giá trị ước tính.

1.4. INULIN VÀ FOS

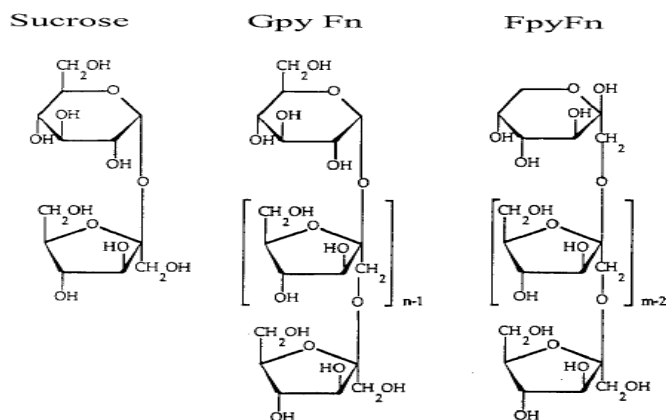
1.4.1. Cấu trúc và tính chất hóa học của inulin và FOS

* Cấu trúc

Đầu những năm 1800, Valentine Rose (Đức) đã phát hiện ra một loại carbohydrate có trong rễ cây *Inula helenium* và Thomson đặt tên là inulin vào năm 1817. Năm 1864, người ta phát hiện ra fructan khi kết tủa dịch chiết củ *D. pinnata*, *H. tuberosus*, *I. helenium* bằng ethanol và quan sát kết tủa dưới kính hiển vi [34].

Inulin là một polysaccharide dự trữ tự nhiên ở thực vật và là loại duy nhất có chứa 95% fructose [34]. Inulin là loại fructan mạch thẳng có các liên kết β -D (2,1) fructose [133], là saccharide chỉ có liên kết fructosid và phân tử glucose ở vị trí cuối chuỗi GF_n nhưng không phải tất cả các trường hợp [130]. Một phần nhỏ (<1%) của inulin tự nhiên hoàn toàn không chứa bất kỳ đơn vị glucose nào [53]. Khi phân tử inulin không có phân tử glucose tận cùng được gọi là β -D-fructose furanosid -[D-fructose furanosid](n-1) β -D-fructose furanose (Fm) và khi có đường glucose tận cùng được gọi là các α -D-glucose pyranosid-[β -D-fructose furanosid](n-1) β -D-fructose furanose (GF_n) [130]. Ở dạng

chuỗi dài có các đơn phân (Degree polymer - DP) từ 11÷65 xấp xỉ 70 đơn vị Fructose được gọi là Inulin ($10 \leq n \leq 70$) và ở dạng chuỗi ngắn được gọi là FOS (fructose oligosaccharide) ($3 \leq n \leq 10$) [34, 46, 117, 124]. Inulin và FOS chỉ khác nhau về số lượng đơn vị fructose [105, 152, 155]. Cả hai hợp chất GpyFn và FpyFn được coi là cùng danh pháp [53, 64, 169].



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học của sucrose và fructan

FOS chủ yếu bao gồm ketose (GF2) ở 2 dạng: Neo-ketose F-G-F và dạng 1-ketose (G-F-F), nystose (GF3) và fructose furanosylnystose (GF4), trong đó các đơn vị fructose (F) bị ràng buộc bởi liên kết tại vị trí β của sucrose tương ứng [77, 169]. Inulin và FOS có thể có phân tử đường tận cùng là fructose (Fpy) nhưng cũng có thể có phân tử đường tận cùng là glucose (Gpy) liên kết vào mạch saccharide bằng liên kết α (2 $\rightarrow$ 1) (1,1 ketotetrose) tương tự như trong cấu tạo của sucrose. Inulin và FOS có thể được coi là dẫn xuất của sucrose (Hình 1.5). Roberfroi (2017) cho rằng inulin tự nhiên có mức độ phân nhánh rất nhỏ (1-2%) [130]. Do vậy, khi thủy phân inulin bằng enzyme endoinulinase (EC 3.2.1.7) sẽ tạo ra một polyme mạch thẳng có từ 11-70 đơn phân và chuỗi ngắn (FOS- Fructose oligosacharid) có từ 2 đến 10 đơn phân, trung bình là 5 [70]. Chiều dài mạch và mức độ phân nhánh có ảnh hưởng đến chức năng của inulin. Inulin thực vật có số lượng đơn phân tối đa < 200, trong khi đó inulin của vi khuẩn có số lượng đơn phân nhiều hơn, trung bình từ 10.000 đến trên 100.000 đơn phân và mức độ phân nhánh cũng nhiều hơn 15% so với inulin thực vật [108].

Độ dài chuỗi và số lượng đơn phân của inulin phụ thuộc vào loài thực vật, khí hậu và điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hoạch, độ tuổi, thời gian và điều kiện bảo quản sau thu hoạch [53, 81, 108, 175]. Người ta cho rằng, chiều dài chuỗi inulin có thể liên quan đến tính chống chịu điều kiện khắc nghiệt của thực vật như bảo vệ thực vật chống

lại khô hạn hay chống lại khí hậu lạnh [130].

Inulin có trọng lượng phân tử thay đổi từ 3500 đến 5500 Da. Chẳng hạn, inulin ở *Jerusalem artichoke* có trọng lượng phân tử 3400 ± 150 Da và inulin ở loài *Cichorium intybus* có trọng lượng phân tử 6200 ± 200 Da [35]. Khối lượng phân tử trung bình của inulin (loại fructan) từ $5,0 \times 10^2$ ÷ $1,3 \times 10^4$ Da và khối lượng phân tử trung bình của Levan (loại fructan mạch nhánh) từ 1×10^4 - 1×10^8 Da [101]. Inulin có thể bị thủy phân bởi cả endo và exoinulinase. Các exoinulinase phân cắt phân tử fructose cuối cùng từ đầu chuỗi không khử, trong khi endoinulinase thủy phân các liên kết bên trong phân tử inulin [34].

Inulin được phân chia thành 4 dạng: α -inulin (bột trắng vô định hình) thu được khi kết tủa inulin trong nước lạnh, β -inulin (tinh thể không màu) thu được khi kết tủa inulin bằng ethanol, γ -inulin và δ -inulin thu được khi chiết với nước ở nhiệt độ cao. Dạng δ -inulin không hòa tan ở nhiệt độ dưới 40°C, đây là một đặc điểm quan trọng để phân biệt với các inulin khác [120]. Những khác biệt này là do khối lượng phân tử, mức độ trùng hợp, phương pháp thu nhận ... [120].

*** Tính chất vật lý, hóa học:** Inulin có một số tính chất sau:

+ **Không bị tiêu hoá:** Đây là đặc tính nổi bật của inulin do cấu trúc phân tử của nó quyết định [151]. Inulin có liên kết β ở vị trí C₂ của fructose và kết thúc mạch là một phân tử glucose được liên kết bằng liên kết α (1-2) [46, 111] nên inulin không bị thủy phân bởi enzyme α -glucosidase, maltase, isomaltase, sucrase có trong đường tiêu hóa người và động vật [64, 70]. Khi sử dụng với liều lượng 10g hoặc 17g hoặc 30g thì khoảng 86-88% inulin và oligofructose sẽ khó tiêu hóa trong ruột non của người, 12-14% còn lại thất thoát do bị lên men ở hồi tràng bởi quần thể vi khuẩn *Lactobacillus ssp* ở ruột non [70]. Một số nghiên cứu cho rằng fructan có trọng lượng phân tử thấp có thể bị thủy phân bởi acid hoặc enzyme có trong dạ dày người và động vật do nó nhạy cảm với acid dạ dày và enzyme có trong ruột non hơn so với loại inulin có trọng lượng phân tử cao hơn [70]. Do vậy, các fructan được xếp vào nhóm chất xơ hòa tan không tiêu hóa được (NDO - nondigestible oligosaccharide) [111] và có tính chất prebiotic [151]. Cơ quan Quản lý Thực phẩm (FDA) và Dược phẩm Mỹ (USDA) đã xác định inulin và fructose oligosaccharide là chất xơ hòa tan và được chấp nhận làm chất xơ thực phẩm. Hiện nay inulin và fructose oligosaccharide đã được 12 quốc gia tiên tiến trên thế giới chấp nhận là chất xơ thực phẩm [124].

+ **Tạo gel thẩm thấu:** Inulin có khả năng tạo gel. Nồng độ inulin, nhiệt độ, pH, kích thước hạt có ảnh hưởng đến mức độ hình thành gel inulin [42]. Tính chất gel của inulin phụ thuộc vào chiều dài chuỗi (DPn). Inulin có trọng lượng phân tử cao tạo gel mạnh hơn và có thể tạo thành gel ở nồng độ thấp [101]. Các nhóm hydroxyl (-OH) trong cấu trúc phân tử inulin có khả năng tương tác với nước, điều này làm cho inulin có một số đặc tính bề mặt và có thể tạo thành gel ổn định với nước ở nồng độ 13÷50 % [151]. Gel inulin dựa trên sự tương tác xảy ra giữa các chuỗi inulin hòa tan nhưng có thể chứa các vi tinh thể chưa hòa tan, những vi tinh thể này có thể kết nối với nhau tạo thành một mạng lưới hoặc có thể tương tác nước và các hạt inulin khác từ đó làm tăng cường độ gel [101]. Gel inulin có các đặc điểm gần giống như chất béo nên được sử dụng để thay thế chất béo do khi ăn có cảm giác béo trong miệng [151].

+ **Đặc tính prebiotic và bifidogen**

Inulin không bị tiêu tiêu hóa ở ruột non [77, 105, 151], khi đến ruột già inulin bị vi khuẩn có ích *Bifidobacterium ssp* lên men [151] tạo ra các acid béo mạch ngắn (chuỗi ngắn) như acetic, propionic, butyric (SCFA), những acid này đóng vai trò quan trọng trong việc chống lại một số loại vi khuẩn gây bệnh ở đường ruột người và động vật. Do vậy, inulin và FOS được xem là các prebiotic [130, 151]. Inulin cũng kích thích cơ thể sản xuất ra glucagon (GLP - một peptide giống hormone), một chất kích thích nội sinh quan trọng, kích thích bài tiết insulin và ức chế sự thèm ăn nên có tác dụng ức chế béo phì.

+ **Inulin dễ hút ẩm, dễ kết tủa trong ethanol và hòa tan trong nước nóng**

Inulin dễ hút ẩm và mức độ hút ẩm tùy thuộc vào trọng lượng phân tử. Ở nhiệt độ 20°C và khi độ ẩm > 56% hoặc >75% inulin có thể hấp thụ lượng nước, tương ứng 12-15g/100g inulin khô [101]. Inulin dễ dàng hòa tan trong nước nóng [81] và cứng lại trong nước lạnh [34], kết tủa bằng ethanol trong vài phút [164] và dễ dàng bị thủy phân thành fructose trong môi trường acid (pH<5) ở nhiệt độ cao 70÷80°C [156].

+ **Khả năng hòa tan và tạo vi tinh thể:** Inulin mạch dài khó tan trong nước hơn loại mạch ngắn. Ở 50°C, inulin hòa tan kém trong nước, khả năng hòa tan của inulin tăng dần lên 35% ở 90°C và inulin không hòa tan trong nước ở nhiệt độ phòng. Tất cả inulin đều tăng độ hòa tan ở nhiệt độ cao [101, 103]. Inulin có thể tạo dạng vi tinh thể trong nước và tinh thể inulin có dạng hình kim, có chiều dài 1-20 μm [101]. Các vi tinh thể inulin không có vị riêng nhưng có thể tạo thành dạng mịn như kem khi ăn có cảm

giác béo trong miệng. Do vậy, inulin và FOS được dùng như thực phẩm hoặc phụ gia thực phẩm và không có giá trị dinh dưỡng. Năng lượng giải phóng ra khi chuyển hóa inulin từ $2,1 \div 2,8$ kcal/g [153]. FOS có vị ngọt nhưng inulin khi có chiều dài mạch lớn thì không có vị nhưng tạo cảm giác mềm trong miệng và hoạt động như một chất làm thay đổi cấu trúc của nhiều loại thực phẩm [117].

+ Đặc tính lưu biến và điểm nóng chảy của inulin

Inulin có đặc tính tạo độ nhớt khi hòa tan trong nước, độ nhớt của inulin tăng khi inulin có trọng lượng phân tử lớn và nhiệt độ tăng làm giảm độ nhớt của inulin [101]. Nhiệt độ nóng chảy của inulin thay đổi tùy thuộc vào cấu hình inulin, đối với inulin ở dạng vô định hình có nhiệt độ nóng chảy từ $155 \div 160^{\circ}\text{C}$ và inulin dạng tinh thể có nhiệt độ nóng chảy từ $170 \div 180^{\circ}\text{C}$, dao động trong khoảng $165 \div 183^{\circ}\text{C}$ [42].

1.4.2. Tác dụng sinh lý và ứng dụng Inulin/FOS

1.4.2.1. Tác dụng sinh lý

Inulin đã được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học có giá trị: khả năng điều hòa miễn dịch, tăng cường miễn dịch [108, 120], tác nhân chống thư [44, 116, 151, 154], đặc biệt inulin có chức năng tăng cường sự sinh trưởng phát triển của quần thể vi khuẩn probiotic đường ruột [79] nên có vai trò như là một prebiotic [64, 79, 154]. Inulin còn có hoạt tính chống nhiễm trùng đường ruột, điều trị bệnh ruột kích thích, chống ung thư ruột kết và bệnh viêm loét đại tràng IBD (Inflammatory bowel diseases - viêm loét đại tràng và bệnh Crohn's) [108], tăng sự bài tiết của các cytokine chống viêm [130]. Do vậy, inulin rất thích hợp làm nguồn bổ sung vào sản xuất thực phẩm chức năng nói chung và synbiotic nói riêng [34, 64, 101]. Ngoài ra, inulin còn có khả năng ngăn ngừa bệnh tăng huyết áp (Anti-hypertensive), giảm triglycerides trong máu, ngăn ngừa bệnh tim mạch, ngăn chặn bệnh tiểu đường, chống béo phì [116, 130, 154]. Thêm vào đó, inulin còn được sử dụng làm tá dược cho vaccin, tăng sự hấp thụ canxi và tro hóa xương ở người trẻ khỏe mạnh nên có tác dụng hỗ trợ chống loãng xương [130, 138].

Khi ăn lượng lớn chất xơ không hòa tan (đặc biệt là chất xơ có chứa phytate) sẽ làm mất cân bằng về khoáng chất và canxi. Tuy nhiên, inulin và FOS không chứa phytate nên không gây ra tình trạng trên. Hơn nữa, inulin và FOS còn có tác dụng tăng cường hấp thụ canxi, magie trong khi không ảnh hưởng đến sự cân bằng của các khoáng khác [64].

*** Hiệu ứng prebiotic**

Vì khuẩn thuộc nhóm *Lactobacilli* có enzyme inulinase trong khi nhóm *Bifidobacteria* có enzyme thủy phân β - fructofuranosidase nên chúng có khả năng lên men Inulin/FOS thành các acid hữu cơ mạch ngắn SCFA (Short chain fatty acid) như acid acetic, acid butyric và acid propionic [128]. Các SCFA sẽ làm giảm pH manh tràng và tăng kích thước của bề manh tràng. Hầu hết SCFA sẽ được hấp thụ ở đại tràng. Acid butyric ở nồng độ cao gia tăng kích thước bề manh tràng dẫn đến tăng sản sinh niêm mạc ruột và tăng độ dày thành ruột ở cả ruột non và manh tràng kèm theo sự gia tăng lưu lượng máu [70]. Ngoài ra, các SCFA còn có tác dụng trong việc làm rỗng dạ dày và làm tăng nhu động ruột [77], làm tăng tính thấm thấu nước, gia tăng thể tích phân đầy nhanh quá trình đào thải phân hạn chế táo bón. Acid butyric được coi là nhiên liệu cho lớp màng nhày trong khi các acid acetic và propionic ảnh hưởng lên các chuyển hóa carbohydrate và lipid [103]. Khi có mặt mầm bệnh *Clostridium difficile* trong đại tràng, inulin kích thích giảm sản xuất amoniac, *p*-cresol và iso-SCFA [103].

Inulin/FOS kích hoạt *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* làm giảm hoạt động của β -glucuronidase và nitroreductase, đây là những enzyme góp phần hạn chế ung thư ruột kết [31]. Mặt khác *Bifidobacteria* làm thay đổi môi trường đại tràng theo hướng ức chế vi khuẩn gây hại thông qua sự cạnh tranh bằng cách tăng tiết các chất nền hoặc vị trí bám dính trên biểu mô ruột và kích thích hệ thống miễn dịch ruột. Inulin và oligofructose cũng giúp hấp thu một số ion nhất định và tổng hợp vitamin B [70]. Bổ sung inulin liều thấp vào sữa tách béo làm tăng đáng kể sự tăng trưởng và tính ổn định của *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* và *Bifidobacterium lactis* trong lên men sữa [108]. Một số nghiên cứu cho thấy bổ sung inulin ở dạng chế phẩm Orafit®Synergy1 (inulin giàu oligo-fructose) với liều 0,8g/ngày vào sữa cho trẻ sơ sinh giúp thúc đẩy hệ vi khuẩn đường ruột tương đương với trẻ được nuôi bằng sữa mẹ [108].

Tất cả các tác dụng sinh lý của inulin và FOS đều được thực hiện thông qua vai trò trung gian của acid béo mạch ngắn như acetate, propionate, butyrate. SCFA có ảnh hưởng sâu sắc đến mô chủ [70, 103, 128]. Tuy vậy, cơ chế prebiotic có liên quan đến SCFA vẫn chưa được khẳng định. Tuy vậy, nhiều nghiên cứu cho thấy bổ sung inulin có thể làm tăng nồng độ SCFA, tăng bài tiết acid mật ở ruột [103] đẩy nhanh quá trình tiêu hóa mỡ, hấp thụ acid mật ở ruột, làm giảm cholesterol tại gan và từ đó làm giảm cholesterol, phospholipid, triglycerid huyết thanh, từ đó làm giảm xơ vữa mạch vành [77].

*** Cơ chế tác dụng của Inulin/FOS lên hệ thống miễn dịch**

Polysaccharide, proteoglycan và Flavonoid đóng vai trò chính trong việc ngăn ngừa hoặc kiểm soát nhiễm khuẩn [146]. Các polysaccharide tự nhiên như heteroglycan và proteoglycan có trọng lượng phân tử và cấu trúc nhất định có đặc tính điều hòa miễn dịch. Hoạt động điều hòa miễn dịch bao gồm kích hoạt đại thực bào (Macrophages), bạch cầu đơn nhân (Monocytes), tế bào giết tự nhiên (NK), kích hoạt tế bào lympho bào (Lymphocyt killer cells), tế bào đuôi gai (Dendritic cells) [44].

Quá trình lên men của FOS trong đại tràng có thể góp phần ngăn ngừa ung thư ruột kết theo nhiều cách: tăng cường miễn dịch và điều chỉnh nồng độ mucin. Bổ sung inulin vào thức ăn nuôi chuột với liều dùng 50-80 g/kg và liều dùng 100 g/kg sẽ thúc đẩy đại thực bào (Macrophase) và đại tràng của chuột tăng sản sinh IL-10 (Interleukin-10) và interferon gamma ($IF\gamma$). Acid butyric sẽ ức chế tăng sinh tế bào lympho, làm giảm biểu hiện cytokine và tăng cường sản xuất IL-10 ở chuột [103]. *Bifidobacteria* có khả năng kích thích sản xuất cytokine (Yếu tố hoại tử khối u), IL-6 và các phân tử phản ứng (NO , H_2O_2) bởi đại thực bào trong ống nghiệm. Tiêu thụ inulin làm tăng khả năng thực bào của đại thực bào và sản xuất immunoglobulin A (IgA) đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ GIT (Gastrointestinal tract) [31].

*** Cơ chế tác dụng sinh lý của Inulin/FOS đối với hấp thu khoáng**

Ở người, inulin là loại fructan không có tác dụng trực tiếp đến khả năng hấp thu khoáng chất ở ruột non. Tác dụng của inulin đối với việc làm tăng hấp thu Ca^{2+} và Mg^{2+} ở đường ruột có thể là do làm tăng hoạt động của hệ vi sinh vật đường ruột từ đó làm tăng hấp thu khoáng Ca^{2+} , Mg^{2+} và Zn^{2+} ở manh tràng [130].

*** Cơ chế tác dụng của inulin/FOS trên đường huyết/insulin máu**

Giống như các chất xơ khác, inulin/FOS có ảnh hưởng đến sự hấp thụ các chất dinh dưỡng đa lượng, đặc biệt là carbohydrate bằng cách làm chậm quá trình chuyển hóa ở dạ dày. Tác dụng của inulin/FOS đến đường huyết/insulin máu là làm giảm sự hình thành glycogen ở gan qua trung gian các acid carboxylic chuỗi ngắn, đặc biệt là propionate. Propionate ức chế quá trình glycogenesis trong các tế bào gan thông qua quá trình chuyển hóa thành methylmalonylCoA và succinylCoA, cả hai đều là chất ức chế đặc hiệu của enzyme pyruvate carboxylase. Ngoài ra, acid propionic còn kích thích chuyển hóa glucose bằng cách làm cạn kiệt citrate ở gan, citrate là một chất ức chế allosteric của enzyme phosphofructokinase. Propionate cũng có thể gián tiếp ảnh hưởng đến chuyển hóa glucose bằng cách làm giảm nồng độ mỡ trong huyết tương-một yếu tố

có liên quan chặt chẽ đến quá trình glycogenesis ở gan [70]. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của inulin tới lượng đường huyết sau bữa ăn cho thấy inulin làm tăng đáng kể nồng độ peptide-1 tương tự như glucagon (GLP) (một peptide giống hormone), một chất kích thích nội sinh quan trọng thúc đẩy quá trình bài tiết insulin trong huyết tương [130, 151].

1.4.2.2. Ứng dụng của inulin/FOS

Inulin được ứng dụng trong một số lĩnh vực sau:

* **Trong dược phẩm và y học:** δ -inulin được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc làm tăng khả năng miễn dịch trong sản xuất vaccin. Do vậy, δ -inulin được sử dụng làm tá dược hoặc chất ổn định trong sản xuất các loại thuốc và vaccin, chẳng hạn δ -inulin được sử dụng làm tá dược trong sản xuất vaccin viêm gan siêu vi B và vaccin cúm [120, 151].

* **Trong thực phẩm:** Inulin được coi là một chất xơ hòa tan có khả năng kích thích vi khuẩn Bifidus phát triển [34, 64, 79, 101, 108, 130]. Mặt khác, khả năng sinh năng lượng của inulin không cao, chỉ vào khoảng 1,5 kcal/g hoặc 6,3 kJ/g [108], bằng 1/4 khả năng sinh năng lượng của đường nên inulin được cho là nguồn polysaccharide phù hợp với bệnh nhân tiểu đường. Inulin có vị béo, mùi hương trung tính và không có bất kỳ dư vị nào khác nên inulin giúp cải thiện cảm giác ngon miệng. Mặt khác, inulin còn được coi là một chất lý tưởng thay thế cho chất béo trong sản xuất kem [53, 101, 102] và trong chế biến sữa mà không ảnh hưởng đến cảm quan của người tiêu dùng [108].

* **Liều lượng sử dụng inulin**

Liều lượng sử dụng inulin và oligofructose đối với người trung bình từ 1-4g/người/ngày, tối đa là 20g/người/ngày và khi sử dụng liều cao trên 30g/ngày có thể gây đi cầu lỏng. Tại Mỹ, người ta khuyến nghị liều dùng inulin và oligofructose cho người trung bình là 1- 4 g/người/ngày và tại châu Âu là 3-11g/người/ngày [70, 101, 103]. Tại Nhật Bản, liều dùng FOS được chấp nhận với liều 0,8g/kg/ ngày [77] và được đề xuất bổ sung trong nhiều loại thực phẩm với liều dùng từ 2÷100 g% đối với inulin và 2÷50 g% đối với FOS [61]. Mức liều dùng của FOS trong khoảng 2–50% (w/w) được khuyến nghị cho các công thức thực phẩm khác nhau, sữa chua đậu nành được chấp nhận bổ sung FOS trên 70% [106].

1.4.3. Kỹ thuật tách chiết và tinh sạch Inulin/FOS

1.4.3.1. Kỹ thuật tách chiết

Chiết là bước đầu tiên trong nghiên cứu cây thuốc và đóng vai trò quan trọng đối với quá trình nghiên cứu [36]. Hiện có nhiều phương pháp chiết inulin từ thảo dược đã được nghiên cứu, nhưng cơ bản trên nguyên lý của chiết lỏng - lỏng và rắn - lỏng [29].

Hiện người ta đã sử dụng kỹ thuật chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm (Ultrasound assisted extraction) [97, 105, 110, 118] hay chiết trong lò vi sóng (Microwave assisted extraction) [149], chiết bằng điều nhiệt [75, 113, 135, 144, 179], chiết bằng kỹ thuật sử dụng CO₂ siêu tới hạn (Supercritical fluid extraction) [99] hay chiết bằng kỹ thuật sử dụng enzyme (Enzyme assisted extraction), ... Hiện người ta đang tìm cách ứng dụng trường xung điện (Pulsed electric field) hay chiết lỏng áp lực cao (Pressurized liquid extraction) trong chiết inulin để nâng cao năng suất tinh thu nhận inulin [36].

Kỹ thuật chiết truyền thống, phổ biến nhất là chiết gia nhiệt và hồi lưu nhưng có nhược điểm là nguyên liệu tươi cần được sấy khô. Tuy vậy, kỹ thuật chiết này có thể ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chất chiết và thể tích chiết nhỏ nên chi phí cao [36, 145].

Gần đây, người ta sử dụng kỹ thuật chiết có hỗ trợ siêu âm để chiết các chất từ thực vật [57, 110], đây được xem là kỹ thuật chiết hiệu quả với hợp chất có hoạt tính sinh học từ thảo dược [36]. Chiết có hỗ trợ siêu âm là kỹ thuật thích hợp ở qui mô công nghiệp và trong phòng thí nghiệm [97] để chiết các chất hóa học, tần số siêu âm thường từ 20 kHz -100MHz [36]. Lợi thế của chiết hỗ trợ siêu âm là giảm thời gian chiết và năng lượng tuy vậy hiệu suất chiết phụ thuộc vào bước sóng, công suất thiết bị phát sóng, thời gian chiết và dung môi sử dụng [29, 36, 105]. Chiết có hỗ trợ siêu âm có thể rút ngắn thời gian chỉ còn 5-15 phút so với phương pháp ngâm chiết phải mất hàng giờ. Thời gian chiết được rút ngắn là do làm nóng tại chỗ, làm tăng diện tích giữa hai pha bằng cách làm tăng phân tán chúng ra môi trường và phá vỡ cấu trúc màng tế bào. Hiệu suất chiết có hỗ trợ của sóng siêu âm cao còn do làm tăng khả năng thẩm thấu của dung môi qua thành tế bào, tạo ra các lỗ bằng cách hình thành các bọt bong bóng trong dung môi và tạo ra áp lực cơ học mạnh làm tăng khả năng di chuyển của các chất [29].

Kỹ thuật chiết sử dụng lò vi sóng: Sóng siêu âm có tác dụng làm tăng nhiệt độ của môi trường chiết. Nhiệt sinh ra theo hai cơ chế dẫn truyền ion và quay lưỡng cực. Hai

cơ chế này làm sinh nhiệt trong lòng khối vật chất làm cho gia nhiệt nhanh và hiệu quả hơn. Những chất càng phân cực đặc biệt là nước thì nhanh bị nâng nhiệt dưới tác dụng của vi sóng. Trong chiết xuất sử dụng vi sóng, các phân tử dung môi và các chất phân cực sẽ dao động và tăng quá trình khuếch tán làm tăng khả năng hòa tan các chất vào dung môi.

Kỹ thuật thủy phân bằng enzyme: Kỹ thuật này có thể được sử dụng trong chiết các chất ở qui mô lớn [145]. Việc sử dụng enzyme với dung môi nước cũng sẽ ngăn chặn tạo ra các sản phẩm chất thải công nghiệp có hại do đó làm giảm tổng chi phí của quá trình. Một bất lợi của việc sử dụng các enzyme là giá thành cao. Tuy nhiên, các enzyme thương mại ngày nay rẻ và có nhiều loại [145].

Tùy thuộc vào điều kiện chiết và loại nguyên liệu được sử dụng mà người ta có thể thu được chuỗi ngắn (FOS) hoặc chuỗi dài (inulin). Chuỗi dài thường ít phân hủy sinh học so với chuỗi ngắn. Sự kết hợp của chuỗi ngắn và chuỗi dài làm cho hoạt động sinh lý tốt hơn một loại chuỗi riêng lẻ [116].

*** Dung môi và nhiệt độ chiết**

Dung môi có vai trò hết sức quan trọng trong quá trình chiết và nếu lựa chọn dung môi không tốt sẽ chiết ra cả các chất không mong muốn [29]. Khi nhiệt độ tăng và hệ số khuếch tán lớn, quá trình chiết sẽ thuận lợi hơn. Nếu tăng nhiệt độ chiết quá cao có thể làm giảm khả năng chiết do ở nhiệt độ cao độ hòa tan của một số chất giảm so với độ hòa tan ở nhiệt độ thấp (Conduragin), đa phần do ở nhiệt độ cao nguyên liệu chuyển sang thể keo, ngăn cản quá trình chiết [29]. Do vậy, chiết xuất inulin/FOS bằng nước nóng, sau đó kết tủa bằng ethanol cũng đã được thực hiện từ nhiều loài thực vật [85, 94, 109, 110, 118, 169].

Hầu hết các phương pháp chiết inulin đều dùng nước nóng làm dung môi, chỉ khác nhau một ít về nhiệt độ và thời gian chiết [75, 118]. Ví dụ, chiết inulin từ rễ rau diếp xoăn khô bằng nước ở nhiệt độ $(80 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ trong 1 giờ và khuấy liên tục; chiết inulin từ nụ hoa atisô ở (80°C) và pH 6,8 [132] và chiết inulin từ *H. tuberosus* bằng nước ở 85°C trong 1 giờ [34]. Inulin tan khá tốt trong nước nóng nên khả năng khuếch tán tốt, ít tan trong nước lạnh, ngay cả trong nước ấm 55°C thì inulin chỉ hòa tan 5% [156]. Độ hòa tan của inulin tăng đáng kể khi tăng nhiệt độ, ở 25°C inulin gần như không hòa tan trong nước lạnh [34, 152].

Dịch chiết thảo dược trong nước thường chứa đường (mono, di và oligosaccharide

nhỏ) cần được loại bỏ bằng ethanol 80% [118]. Thông thường, chiết xuất được thực hiện bằng cách đun sôi rễ dược liệu đã làm sạch và cắt hoặc nghiền nát trong nước.

*** Dung môi và nhiệt độ kết tủa**

Inulin không hòa tan trong nước lạnh và chúng bị kết tủa nhanh chóng trong ethanol [101] [164]. Các dung môi như methanol, ethanol và acetone có thể được sử dụng để kết tủa chọn lọc chuỗi dài (DPn 25 - 40) [104]. Kết tủa Inulin trong ethanol là một trong những phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để điều chế polysaccharide tự nhiên [104, 164]. Nồng độ ethanol thường được sử dụng là 70-80% và kết tủa thường được thực hiện ở khoảng nhiệt độ 4°C [104]. Do kích thước phân tử mà Inulin kết tủa ở nồng độ cồn 80% và fructan (gồm cả inulin và FOS) ở nồng độ cồn 90%. Đặc điểm cấu trúc và kích thước phân tử khác nhau là yếu tố quyết định đến việc bị kết tủa trong ethanol của polysaccharide (PS) tự nhiên. Đặc tính này giúp người ta loại các đường đơn, chất màu, các polysaccharide trọng lượng phân tử nhỏ, acid amin ra khỏi các polysaccharide trọng lượng lớn [118].

*** pH và thời gian chiết**

pH là yếu tố ảnh hưởng đến sự thủy phân inulin/FOS. Khi $\text{pH} < 4$, tính ổn định hóa học của inulin giảm. Trong môi trường trung tính và kiềm, inulin ổn định về mặt hóa học. Vì vậy Inulin/FOS bị hạn chế trong thực phẩm có tính acid (pH 4), đặc biệt là đun nóng ở nhiệt độ trên 60°C. Sự thoái hóa inulin không diễn ra trong các sản phẩm có $\text{pH} \geq 5$ và nóng lên đến 100°C [67]. Đun nóng trên 80°C và trong môi trường acid ($\text{pH} < 3$) sẽ thủy phân đáng kể inulin và giảm sự hình thành gel [101, 128].

Như vậy, tùy theo loại thảo dược mà có sự khác nhau về chế độ chiết. Mỗi phương pháp chiết có những ưu và nhược điểm khác nhau. Dựa vào đặc tính của inulin, luận án định hướng lựa chọn kỹ thuật chiết có hỗ trợ siêu âm để chiết inulin từ củ đẳng sâm.

1.4.3.2. Kỹ thuật tinh sạch inulin/FOS

Năm 1804, inulin được tinh chế từ dịch chiết trong nước nóng của cây cúc nút (*Inula helenium*) và được đặt tên là inulin [120]. Quá trình tách inulin về cơ bản bao gồm ba bước: (1) chiết xuất các thành phần hòa tan trong nước bao gồm cả inulin; (2) loại bỏ tạp chất, inulins DP thấp và (3) sấy khô. Trong quy trình tinh chế cổ điển, sau khi thu hoạch, dược liệu được rửa sạch, thái lát, xay nát và được chiết trong nước nóng ở 80°C/1 giờ và khuấy liên tục. Dịch chiết được cô đặc chân không ở 70°C đến 24°Bx,

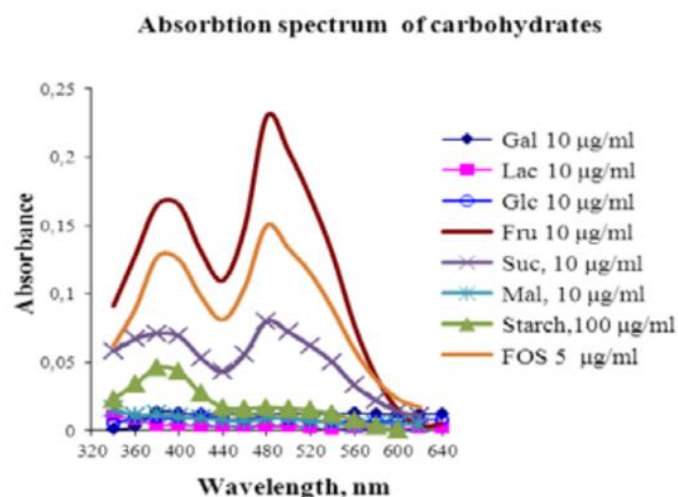
sau đó được làm lạnh hoặc làm đông dịch cô đặc để thu kết tủa inulin, lọc thu tủa và sấy khô thu bột inulin thô. Để thu inulin tinh sạch, các tạp chất bị loại ra khỏi dịch chiết được thực hiện bằng các bước khác nhau (sơ chế, thêm vôi và cacbonat) ở nhiệt độ tương đối cao (80-90°C) [71, 84, 108, 118].

1.5. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH INULIN/FUCTAN

Hiện có nhiều phương pháp phân tích inulin. Định tính inulin bằng phản ứng tạo màu nâu đỏ với dung dịch 1- Naphton và acid sulfuric (1760 g/l) [158], hoặc sắc ký lớp mỏng TLC để định tính và định lượng inulin trong thực phẩm như chocular, yoghurt. Định lượng bằng phương pháp quang phổ UV- VIS [114, 126, 167], phương pháp enzyme khối lượng [153], phương pháp sắc ký HPLC với đầu dò RID (Refractive index detector) để xác định inulin và FOS trong thực phẩm [141]. Hầu hết các phương pháp quang phổ so màu để xác định inulin đều dựa trên phản ứng Selivanoff của ketose với resorcinol. Để xác định inulin trong máu, nước tiểu hoặc khả năng lọc cầu thận của thận, người ta đo phức hợp màu hình thành sau khi ngưng tụ hoặc tương tác của inulin với resorcinol, vanillin hoặc indole -3 - acetate trong môi trường acid [92, 112, 117]. Các phương pháp điều chỉnh với các thuốc thử này được áp dụng để xác định inulin tách chiết từ cây thực dược, cúc nút và diếp xoăn hoặc trong chiết xuất thảo dược [116].

Khi định lượng fructan/inulin/FOS bằng phương pháp quang phổ so màu UV-VIS sử dụng hỗn hợp thuốc thử có resorcinol, phụ thuộc vào sự thủy phân inulin thành fructose trong môi trường acid mạnh. Thời gian và nhiệt độ ủ được coi là rất quan trọng, điều kiện tối ưu cho sự hình thành màu cam đỏ bao gồm acid chlohydric 17% trong hỗn hợp phản ứng, ủ 80°C trong 10 - 25 phút, cường độ màu được đọc ở bước sóng 480 -540 nm [118, 139]. Inulin trong môi trường acid bị thủy phân thành fructose được chuyển thành furfural 5-hydroxymethyl. Resorcinol phản ứng với nó để tạo ra một hợp chất màu cam đỏ có độ hấp thụ được đo ở bước sóng thích hợp (480 - 540 nm) [100].

Để kiểm tra khả năng nhiễu của cabohydrat khác và tính đặc hiệu của phương pháp resorcinol-thiure, các chuẩn fructose, glucose, galactose, sucrose, lactose, maltose, FOS, tất cả ở nồng độ 10 µg/ml và tinh bột (với nồng độ 100g/ml) được phân tích bằng phương pháp đo quang phổ ở phạm vi bước sóng 340-620 nm. Kết quả chỉ có fructose, sucrose và FOS hình thành hợp chất màu cam đỏ với hỗn hợp resorcinol-thiure trong môi trường acid với độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 480 nm, những carbohydrate khác không hình thành hợp màu cam đỏ với dung dịch hiện màu resorcinol [115] (Hình 1.6).



Hình 1.3. Phản ứng tạo màu với Resorcinol của inulin/FOS và các chất khác

Để xác định cấu trúc, phương pháp phổ FT- IR và cộng hưởng từ hạt nhân NMR đã được sử dụng [101, 117, 141]. Phương pháp sắc ký trao đổi anion hiệu suất cao (HPAEC-PAD) đã được sử dụng để xác định hàm lượng và DP của Inulin. Các phương pháp khác như MALDI-MS, MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry), GC-MS (Gas chromatography-Mass spectrometry) và ESI-MS (quang phổ khối ion hóa Electrospray) được sử dụng cho dự đoán cấu trúc FOS tinh khiết [37, 39],[33, 56, 86, 115, 139, 141, 154, 178].

1.6. ỨNG DỤNG SẤY PHUN TRONG TẠO BỘT INULIN/FOS

Sấy phun là phương pháp sản xuất bột khô từ chất lỏng hoặc syrup bằng cách làm khô nhanh bằng không khí nóng, đây là phương pháp sấy thích hợp với nhiều vật liệu nhạy cảm với nhiệt như thực phẩm và dược phẩm [98].

1.61. Các chất mang

Chất mang (chất trợ sấy) là một yếu tố quan trọng đối với sấy phun [68]. Bản thân inulin cũng là một chất trợ sấy [52]. Đối với inulin, sấy phun là công nghệ thuận tiện nhất để tạo thành sản phẩm ổn định và thương mại [53]. Phụ gia được sử dụng trong sấy phun là maltodextrine, glucose lỏng và methylcellulose [122], gum arabic, dextrin và tinh bột biến tính [52].

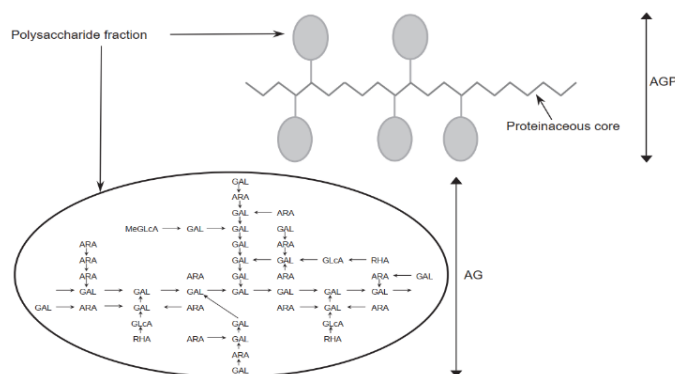
* Maltodextrin ($C_{6n}H_{(10n+2)}O_{(5n+1)}$)

Maltodextrin là sự kết hợp của ba đến mười bảy đơn vị D-glucose được liên kết chủ yếu với các liên kết glycosidic α (1 $\rightarrow$ 4). Maltodextrin là một polysaccharide được sản xuất bằng cách thủy phân một phần tinh bột bằng acid hoặc enzyme [52]. Maltodextrin có giá thành rẻ, mùi thơm và hương vị trung tính, độ nhớt thấp ở nồng độ

* **Dextrin ($C_6H_{10}O_5$)_n**

Dextrin là một carbohydrate trọng lượng phân tử thấp được tạo ra bởi quá trình thủy phân tinh bột hoặc glycogen. Dextrin tương đương với maltodextrin là 3 và 20. Dextrin được hình thành bởi D-glucose kết hợp chủ yếu được liên kết với các liên kết glycosidic α (1→4) hoặc α - (1→6). Đây là sự khác biệt chính giữa dextrin và maltodextrin. Dextrin là chất xơ hòa tan, bột trắng, vàng hoặc nâu, tan trong nước, độ nhớt thấp. Dextrin có thể đáp ứng nhu cầu của bệnh nhân tiểu đường, cải thiện chức năng của miệng và răng và cũng làm giảm cholesterol, ngăn ngừa các bệnh tim mạch.

Gum arabic là nhựa khô từ thân và cành của cây *Acacia senegal* L. Willd, là một polysaccharit có KLPT vào khoảng 250.000 -750.000 đvC [121]. Cấu trúc phân tử phức tạp, bao gồm: D-galactose 44%, L-arabinose 27%, D-Acid glucuronic 14,5%, L-rhamnose 13%, 4-O-methyl - acid O-glucuronic 15% và tro 3,93%. Trạng thái tinh chế thông dụng nhất là dạng bột màu trắng hoặc màu trắng ngà, hòa tan được trong nước lạnh với nồng độ có thể lên đến 40-50%, không tan trong chất béo [150]. Về mặt hóa học GA là một arabinogalactan protein. Hình 1.4 [150].



Nhóm arabinogalactan phân nhánh cao làm cho Gum arabic có độ nhớt thấp và một phần protein ở trung tâm (AGP - arabinogalactoprotein) làm cho GA có tính nhũ hóa tốt. Độ nhớt của GA phụ thuộc vào pH và nồng độ muối. Ở nồng độ cao GA là chất keo kết hợp với các quá trình sấy sản phẩm rất hiệu quả. GA rất ổn định trong môi trường acid, vì vậy GA sử dụng rất tốt cho việc ổn định mùi của nước quả. Khi thêm acid hoặc

kiềm có thể làm thay đổi độ nhớt và diện tích tiếp xúc của dịch keo, pH thấp thì độ nhớt thấp và ngược lại, độ nhớt đạt tối đa ở pH 5,5. GA là một trong những chất mang phổ biến nhất được sử dụng trong quá trình tạo vi nang bằng cách sấy phun nhưng chi phí cao và nguồn cung hạn chế [52].

1.6.2. Các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sấy phun

Các thông số của quá trình sấy phun có ảnh hưởng đến các tính chất hóa lý của bột [98]. Tính chất của bột sấy khô như kích thước hạt, độ ẩm, thời gian thấm ướt trung bình, ... phụ thuộc vào tốc độ dòng cấp liệu, tốc độ phun và nhiệt độ không khí đầu vào [68, 122]. Sự gia tăng nhiệt độ không khí đầu vào thường tạo nên màng da cứng không cho hơi ẩm thoát ra, hậu quả là kích thước hạt tăng lên [122], tăng chất rắn không hòa tan và làm giảm mật độ khối và độ ẩm của bột [122]. Tốc độ phun cao dẫn đến kích thước hạt nhỏ hơn và khô nhanh hơn do diện tích bề mặt lớn hơn do đó sẽ ngăn chặn các giọt nước trên lớp da bề mặt. Tăng tốc độ phun, khối lượng chất rắn thu được bị giảm nhưng độ hòa tan của bột được cải thiện; giảm thời gian thấm ướt trung bình, giảm kích thước hạt và độ ẩm [82]. Một số thông số như tốc độ nạp liệu và nhiệt độ khí đầu vào trong quá trình sấy phun cũng ảnh hưởng đến bột sấy phun [101].

Như vậy, có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới quá trình sấy phun tạo bột và tính chất của bột. Vì vậy, trong quá trình sấy phun phải quan tâm tới các yếu tố này.

1.7. PREBIOTIC

Prebiotic, theo định nghĩa, là “chất nền được sử dụng có chọn lọc bởi các vi sinh vật chủ mang lại lợi ích cho sức khỏe” [65]. Prebiotic còn được định nghĩa là những chất xơ khó tiêu hóa bởi enzyme trong đường tiêu hóa nhưng có khả năng nuôi dưỡng có chọn lọc vi khuẩn *Bifidobacterium*, *Lactobacilli* [130] có lợi bên trong ruột già, thúc đẩy chúng phát triển [66], ức chế sự phát triển của vi khuẩn có hại (*Clostridium difficile*, *Salmonella spp*, *E.coli*) và nấm *Candida albicans* đường ruột [154] giúp cải thiện các bất lợi về sức khỏe của con người hoặc động vật [41, 177]. Prebiotic là đối tác cộng sinh tiềm năng của probiotic [160]. Các nguồn prebiotic đặc biệt tồn tại trong tự nhiên như ở thực vật, hoa, quả, hạt và rễ, rong biển, ... [41]. Các prebiotic chủ yếu là các carbohydrate hòa tan trong nước. Tuy nhiên, không phải các carbohydrate nào cũng là prebiotic. Để được xem là prebiotic, chúng phải có đủ 3 tiêu chuẩn :

- Kháng tiêu hóa nghĩa là chống chịu được môi trường acid của dạ dày, không bị

phân giải bởi enzyme động vật và không bị hấp thu ở ruột

- Có khả năng lên men bởi các vi khuẩn đường ruột
- Có tính lên men chọn lọc: Kích thích có chọn lọc sự phát triển và/ hoặc hoạt hóa các vi khuẩn có lợi cho sức khỏe [160].

*** Các loại prebiotic**

Prebiotic được phân loại dựa trên nguồn gốc, loại, thành phần, cấu trúc, ứng dụng, lợi ích sức khỏe [111].

Prebiotic loại fructan như Inulin/FOS ;IMO (isomalto-oligosaccharide), arabinoxyloligosaccharide (AXOS) ; xylooligosaccharide (XOS) ; SOS (soy bean oligosaccharide) và lactulose là những carbohydrate - prebiotic được sử dụng phổ biến nhất [138], chúng đều có cấu trúc của các loại đường fructose hoặc sucrose [31, 56, 79]. Ngoài ra còn có raffinose và stachyose, arabinoxylan, polydextrose, lactosucrose, lactilol, chitin và polysaccharide từ nấm [31, 45, 127].

Các prebiotic không phải dạng fructan như dextrans, maltodextrans, cyclodextrin và pirodextrin chiết từ khoai tây hoặc tinh bột ngô (pirodextrin) [31]. Công nghệ sản xuất prebiotic được thực hiện bằng nhiều phương pháp : Phương pháp thủy phân bằng enzyme ; phương pháp chiết từ thực vật ; phương pháp thủy phân bằng acid, phản ứng chuyển hóa và thủy nhiệt. Quá trình thủy phân inulin thu được hỗn hợp FOS là một prebiotic có nhiều ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm [41]. Hỗn hợp inulin chuỗi ngắn và chuỗi dài sẽ thay đổi các đặc tính cảm quan, đặc biệt là hương vị và kết cấu thực phẩm. Sự thay đổi cảm giác phụ thuộc vào tỷ lệ pha trộn inulin và FOS [128]. Prebiotic thường được sử dụng để che dấu mùi vị và cải thiện tính chất cảm quan trong các công thức dinh dưỡng [41].

Ngoài việc giảm chất béo, inulin/FOS còn điều hòa hệ vi khuẩn đường ruột, vì vậy, nó được coi như là một prebiotic [70]. Ngoài ra còn chống tiêu chảy liên quan đến kháng sinh, bệnh viêm ruột (IBD), bệnh tiểu đường, bệnh gan nhiễm mỡ, viêm và ung thư đại tràng, táo bón, gan, bệnh não, giảm cholesterol máu, viêm khớp [111]; chống viêm, cải thiện sự tiêu hóa và hấp thu, kiểm soát lipid và glucose trong máu [31].

*** Chuyển hóa prebiotic**

Sau khi đi qua ruột non, Inulin/FOS được lên men yếm khí chủ yếu bởi *Bifidobacterium* trong ruột già tạo các acid béo mạch ngắn (SCFA). Sản phẩm chính của

quá trình lên men inulin là các acid butyric, trong khi sản phẩm chính của quá trình lên men của FOS là acetic và lactic [128]. Chuỗi ngắn được lên men ở manh tràng và chuỗi dài được lên men ở trực tràng do DP_n của inulin thường dao động từ 20-60 làm cho quá trình lên men của các loài *Lactobacillus* gặp khó khăn. Một số *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* sử dụng có chọn lọc fructan khác nhau theo chiều dài chuỗi, đặc biệt là các chuỗi nhỏ. Các chất vận chuyển FOS đã được xác định trên *Lactobacillus paracasei* và *L. acidophilus* [128]. Hỗn hợp chuỗi ngắn và chuỗi dài với tỷ lệ 50 : 50 làm giảm lượng khí (H_2 , CO_2 và CH_4) được tạo ra trong khi tăng cường hoặc duy trì hiệu ứng prebiotic. H_2 và CO_2 là các khí chính được tạo ra trong quá trình lên men fructan loại inulin [32, 128]. Hiệu quả prebiotic không chỉ phụ thuộc vào mức độ trùng hợp, ổn định về mặt hóa học mà còn phụ thuộc vào liều lượng, chế độ ăn uống [128]. Nếu prebiotic bị biến chất hoặc biến đổi hóa học nó không có ích cho sự trao đổi chất của vi khuẩn. Các điều kiện chế biến thực phẩm như nhiệt độ cao, pH thấp và phản ứng Maillard là cơ sở để dự đoán ảnh hưởng của các điều kiện chế biến đến hoạt động của prebiotic, lựa chọn và sử dụng chúng làm thực phẩm thương mại trị liệu [41]. Bổ sung inulin khi nuôi cấy vi khuẩn chủ yếu giúp tăng tốc độ tăng trưởng và rút ngắn thời gian sinh trưởng của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus acidophilus* [41]. Hầu hết dịch chiết thảo dược có chứa inulin/FOS đều kích thích tăng trưởng vi khuẩn *Lactobacilli* và *Bifidobacteria* [76].

1.8. PROBIOTIC

Probiotic là các vi sinh vật sống có thể mang lại lợi ích cho sức khỏe con người khi được sử dụng với lượng thích hợp [160]. Một probiotic tốt yêu cầu không được gây bệnh, không độc hại, kháng acid dạ dày, bám vào biểu mô ruột và sản xuất các chất kháng khuẩn [143]. Hệ vi sinh vật đường ruột được chia thành ba loại dựa trên tác dụng của chúng. Loại có lợi *Lactobacilli* và *Bifidobacteria*; Loại gây bệnh tiềm tàng như các loài *Clostridia spp*; Loại trung gian như *Bacteroides* có thể có cả tích cực và tiêu cực [21, 103].

Một số loài được sử dụng làm chế phẩm sinh học trong nhóm *Lactobacilli*: *Lactobacillus casei*; *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii subsp. L.bulgaricus*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. johnsonii*, *L. gallinarum*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. oris* [32, 128]. Một số loài trong nhóm *Bifidobacteria* như: *B. bifidum*; *B. breve*; *B. infatis*; *B. longum*. *B. adolescentis*;

B. lactis; *B. bifidus*, *B. adolescentis* [21, 32].

Probiotic điều trị và hỗ trợ điều trị tiêu chảy, viêm dạ dày ruột, hội chứng ruột kích thích, bệnh viêm ruột, ung thư, chức năng miễn dịch trầm cảm, dị ứng ở trẻ sơ sinh, tăng lipid máu, bệnh gan, nhiễm trùng *Helicobacter pylori*. sản xuất vitamin và acid amin, giảm chuyển đổi muối mật chính đến muối mật thứ cấp [32].

Cơ chế hoạt động của probiotic là cạnh tranh thụ thể, ảnh hưởng đến mucin bài tiết và điều hòa miễn dịch của mô bạch huyết liên quan đến ruột, tăng ức chế miễn dịch và giảm các chất trung gian gây viêm [79, 103, 154], thông qua hành động chống lại sự xâm nhập của vi khuẩn, sản xuất các chất chống vi trùng, ức chế sự bám dính mầm bệnh, suy thoái chất độc, kích thích miễn dịch tại chỗ và ngoại biên, kích thích hoạt động của enzyme viền bàn chải, kích thích tiết IgA và ngăn chặn sự dịch chuyển của vi khuẩn gây bệnh [32].

Trong hệ vi sinh vật (VSV) đường ruột, *Bifidobacteria* chiếm 90% tổng số lợi khuẩn [103]. Khi *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* chiếm ưu thế sẽ có khả năng làm thay đổi thành phần và/hoặc hoạt động của hệ VSV vật chủ với điều kiện là chúng đủ số lượng và sống sót qua pH đường tiêu hóa [138].

1.8.1. Vi khuẩn *Bifidobacterium*

Nhóm *Bifidobacterium* là vi khuẩn Gr⁺, không sinh bào tử, không di động, nhiệt độ phát triển tối ưu 37°C và yêu cầu một môi trường nuôi cấy kỵ khí với thành phần dinh dưỡng phức tạp. Môi trường nuôi cấy thường sử dụng là TPY, Cys-MRS, RCA, BHI, BL, mCol, TOS. pH tối ưu cho vi khuẩn *Bifidobacterium* từ 5,5-6,5, ít hoặc không tăng trưởng dưới pH từ 4,5-5,0 hoặc trên 8,0-8,5 [154, 156].

Bifidobacterium có khả năng phân hủy chuỗi inulin dài nhất nhưng không có tính chọn lọc nghiêm ngặt dựa trên DP và nó cũng có thể sinh enzyme hydrolase phân hủy các oligosaccharide [128]. Ngoài ra, enzyme β -fructofuranosidase của *Bifidobacterium* có khả năng thủy phân các phân tử fructose ở đầu cuối, vị trí β -2,1 và góp phần thủy phân fructan [128]. Kết quả nghiên cứu nuôi *Bifidobacterium* có bổ sung FOS và inulin cho thấy *B. longum*, *B. tenulatum* và *B. lactis* phát triển tốt nhất trên FOS, tốc độ tăng trưởng ở môi trường bổ sung inulin thấp hơn nhiều. FOS tăng sức đề kháng muối mật cho *Bifidobacterium* [127]. Inulin là một chất nền tốt cho hầu hết các loài *Bacteroides* và *Bifidobacterium*, ngoại trừ *B.bifidum* và một số chủng *B. longum* [154].

Chiều dài chuỗi là một yếu tố quan trọng đối với hoạt động của vi sinh vật [154]. Inulin từ diệp xoăn (DP 10) cho phép *B. infantis*, *B. pseudolongum* và *B. angulatum* phát triển nhanh hơn so với môi trường có glucose. Inulin (DP 10) đã được chứng minh là ngăn chặn đáng kể sự tăng trưởng của cả *E. coli* và *C. perfringens*. Khi bổ sung Inulin có $15 < DP < 22$ thì tốc độ tăng trưởng của *B. infantis* chậm hơn bổ sung glucose hoặc lactose [134, 154].

So sánh sự phát triển của 55 vi khuẩn Bifidobacterium trên môi trường bán tổng hợp (SM) có sự khác nhau về nguồn cung năng lượng là glucose, FOS (DP 5) và inulin (DP 25), với lượng 10g/lít [134]. Sau 24 giờ nuôi cấy, kết quả không có sự khác biệt với số lượng khuẩn lạc trong môi trường có bổ sung Inulin và FOS ($p < 0,05$). Tuy nhiên, FOS và inulin ảnh hưởng mạnh đến các sản phẩm của quá trình lên men; các loại và số lượng SCFA khác nhau đã được sản xuất. Acid butyric là sản phẩm lên men chính trong quá trình tăng trưởng inulin, trong khi acid axetic và acid lactic được tạo ra trong môi trường bổ sung FOS [134].

1.8.2. Vi khuẩn *Lactobacillus*

Lactobacillus là một trong những nhóm vi khuẩn lactic có lợi và an toàn đối với con người. Ở dạ đường dày-ruột người, *Lactobacillus* là một trong những nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế, có khả năng chịu đựng môi trường acid trong dạ dày. *Lactobacillus* là những vi khuẩn Gram⁺ không hình thành bào tử và hiếm khi di động. *Lactobacillus* có một số đặc tính sinh hóa đặc trưng như: Phản ứng catalase âm tính, khử nitrate âm tính (đôi khi dương tính với pH > 6), có khả năng lên men glucose...

Dựa trên các sản phẩm của quá trình biến dưỡng để phân chia các loài *Lactobacillus* thành 2 nhóm: lên men đồng hình và lên men dị hình. Các loài thuộc nhóm lên men đồng hình tạo ra 85% acid lactic từ glucose, trong khi các loài lên men dị hình chỉ tạo ra 50 % acid lactic và một lượng đáng kể carbone dioxide, acetic và ethanol. Các loài *Lactobacillus* lên men đồng hình gồm: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, ... và các loài lên men dị hình gồm: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. fermentum*... Mặc dù tất cả các loài *Lactobacillus* đều tạo ra acid lactic nhưng các loài khác nhau có thể tạo ra các acid lactic khác nhau về đồng phân hóa học [14] [101]. *L. plantarum*, *L. rhamnosus* có khả năng chuyển hóa các đoạn trisaccharide và tetrasaccharit.

Các loài trong chi *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* chủ yếu lên men carbohydrate sản xuất các acid béo chuỗi ngắn (SCFA) trong khi các nhóm *Bacteroides* và *Clostridia* chủ yếu lên men proteolytic và acid amin. Các thành phần và hoạt động của VSV đường ruột đặc trưng cho mỗi cá nhân và bị ảnh hưởng bởi một số các yếu tố bên ngoài như chế độ ăn uống, nhiễm trùng; Thuốc; Di truyền; Lão hóa; Stress [103]. Số lượng lợi khuẩn *Bifidus* trong đại tràng của người trưởng thành là 10^{10} - 10^{11} CFU/g nhưng con số này giảm dần theo tuổi tác. Ở trẻ sơ sinh lượng *Bifidus* rất cao (99%) nhưng ở người già giảm xuống rất thấp, chỉ còn 1% [32] và giảm đáng kể sau 55 tuổi [127].

Lên men fructan và inulin dẫn đến kích thích chọn lọc sự tăng trưởng của quần thể *Bifidobacteria*. Khuyến cáo liều bổ sung inulin 2-10 g/ngày/người [79]. Cả *L. casei* và *B. lactis* đều có thể phát triển trong một môi trường cơ bản có bổ sung FOS hoặc inulin. Nồng độ khác nhau của inulin không ảnh hưởng đến khả năng sống của probiotic trong quá trình bảo quản [89]. Liều sử dụng: Tùy vào tình trạng cơ địa người/động vật mà thời gian và lượng sinh khối (CFU - Colony forming unit) *Bifidobacterium* được sử dụng khác nhau.

1.9. SYNBIOTIC

Synbiotic là sự kết hợp của một prebiotic và probiotic [138, 154, 156]. Synbiotic có tác dụng hiệp đồng vì ngoài việc thúc đẩy sự phát triển của các chủng vi khuẩn có lợi trong đại tràng, nó còn cải thiện sự sống sót, cấy ghép và sự tăng trưởng của các chủng vi khuẩn sinh học mới được thêm vào [32]. Ưu thế của synbiotic còn vượt trội hơn nếu trong thành phần của nó ngoài prebiotic, probiotic còn có sự hiện diện thêm một số loại chất sinh học khác (antioxydant) [69], tuy nhiên tùy thuộc vào cách phối hợp giữa prebiotic và probiotic [32].

1.10. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CÁC LOÀI TRONG CHI CODONOPSIS TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM

*** Trên thế giới**

Đã có rất nhiều nghiên cứu về đặc tính, tác dụng, cấu trúc của inulin, FOS trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau [13, 42-44, 60, 70, 73, 89, 103, 115, 119, 128, 129, 133, 139, 144, 163, 175]. Kết quả cho thấy hàm lượng inulin và DP thay đổi theo mùa vụ, thu hoạch, bảo quản, chế biến. Cách chiết xuất cũng ảnh hưởng đến hàm lượng, DP và thành phần hoạt chất trên từng đối tượng cụ thể là rất khác nhau.

Nghiên cứu về các loài trong chi *Codonopsis* chủ yếu tập trung ở Trung Quốc. Nhiều loài thuộc chi *Codonopsis* như *C. lanceolata*, *C. pilosula*, *C. ussuriensis*, *C. tangshen*, *C. subglobosa*, đã được nghiên cứu chiết xuất và phân tích cấu trúc các hợp chất carbohydrate, terpene, steroid, amino acid, alkaloid, polysaccharide và tác dụng của chúng [72, 168] [50], [58], [172], [173].

Kết quả nghiên cứu ở Đài Loan cho thấy sử dụng cao chiết rễ loài *C. javanica* đã làm giảm chứng tăng insulin máu và quá trình oxy hóa lipid trên chuột kháng insulin gây ra do chế độ ăn fructose [47]. Tại Indonesia, người ta đã tiến hành nghiên cứu điều tra về khả năng sử dụng loài *C. javanica* như một loại thuốc bổ [157].

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về cấu trúc, tính chất lý hóa và tác dụng prebiotic của inulin/FOS từ một số loài thực vật. Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng, cấu trúc, tính chất của inulin/FOS từ một số thực vật thay đổi theo mùa vụ thu hoạch cũng như cách chiết xuất. Vì vậy trên mỗi đối tượng cần phải có phương pháp chiết phù hợp.

*** Tại Việt Nam**

Ở Việt Nam hiện có một số nghiên cứu về đẳng sâm:

Năm 2015, Trương Hoàng Duy và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu “Tối ưu hóa trích ly thu nhận dịch Saponin thô từ củ đẳng sâm (*C. javanica*) bằng enzyme α -amylase”. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi tiến hành trích ly bằng enzyme α -amylase với pH 5,5, ở 85°C trong thời gian tối ưu 1,9 giờ, hàm lượng enzyme sử dụng là 0,47% thì hàm lượng Saponin tổng thu được là 1557,23 mg/100 g cao hơn 1,5 lần khi không sử dụng enzyme [28].

Hoàng Minh Trung và cộng sự (2002) đã tiến hành nghiên cứu về loài *C. javanica* ở Việt Nam cho thấy trong củ *C. javanica* có chứa 17 acid amin, $(3,12 \pm 0,8) \%$ saponin (theo phương pháp cân) và đường khử. Ngoài ra, bước đầu đã phân lập được ba hợp chất bằng phổ MS và NMR. Kết quả đã xác định được cấu trúc hóa học của chúng là: β -sitosterol; 2'-hydroxy-N-(E, 2R)-1,2,4-trihydroxyoctadec-8-en-2-yl) hexacosanamid và α -spinasterol 3-O- β -D-glucopyranosid [5].

Đỗ Huy Bích và cộng sự (2015) nhận thấy trong củ đẳng sâm (*C. javanica*) có đường, chất béo, không có Saponin. Tuy nhiên các nghiên cứu trên mới chỉ mang tính chất định tính sơ bộ những nhóm chất có trong củ đẳng sâm [1].

Trần Thanh Hà và cộng sự (2014) đã tiến hành thu nhận các hợp chất β -sitosterol và 2'-hydroxy-N-((E, 2R)-1,3,4-tridroxyoctadec-8-en-2-yl) hexacosanamid từ căn n-hexan, α -spinasterol-3-O- β -D-glucopyranosid từ căn chiết ethyl acetal của củ *C. javanica* thu tại Sơn La. Sau đó, bằng sử dụng dung môi n-butanol Trần Thanh Hà và cộng sự đã tách được ampelopsin; adenosine; hesperidin, β -D-fructofuranose (2 $\rightarrow$ 1) β -D-fructofuranose (2 $\rightarrow$ 1) α -D-fructofuranose (2 $\rightarrow$ 1) α -D-glucopyranose (4 $\leftarrow$ 1) α -L-(6-acetyl-rhamnopyranose) [27].

Ngoài ra có một số nghiên cứu ban đầu về củ đẳng sâm (*C. javanica*) như nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy invitro [15] và kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật đến việc nhân giống nhằm tạo ra nguồn giống ban đầu [25] cũng như đánh giá đa dạng di truyền một số loài trong chi Codonopsis [17].

Từ những phân tích ở trên cho thấy củ đẳng sâm là một loại dược liệu mới được bắt đầu nghiên cứu tại Việt Nam. Các nghiên cứu về loài này chỉ là các nghiên cứu bước đầu và mới chỉ dừng ở xác định thành phần của một số chất hóa học có trong củ đẳng sâm hay nuôi cấy mô phục vụ cho việc phát triển trồng đẳng sâm. Hiện ở Việt Nam chưa có nghiên cứu về inulin/fructan của củ đẳng sâm mọc hoang dại tại Việt Nam. Do vậy, việc tiến hành nghiên cứu thu nhận inulin/fructan của củ đẳng sâm mọc hoang dại tại Việt Nam và đặc biệt là tại Lạc Dương - Lâm Đồng là hướng nghiên cứu mới và cần thiết.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU

2.1.1. Củ đẳng sâm nguyên liệu

Củ đẳng sâm (*Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f.) nguyên liệu mọc hoang dại tại 3 xã Đa Sa, Đa Nhím và Đa Chais, huyện Lạc Dương, Lâm Đồng (Hình 2.1 và 2.2). Sau khi thu mẫu, vận chuyển ngay về phòng thí nghiệm để xử lý mẫu tươi và sử dụng làm nguyên liệu trong quá trình nghiên cứu.



Hình 2.1. Mẫu củ đẳng sâm



Hình 2.2. Vị trí thu mẫu

Tại phòng thí nghiệm, củ đẳng sâm được rửa sạch, phân loại, xử lý, sấy khô và đóng bao bì PA hút chân không 100% để dùng làm nguyên liệu trong suốt quá trình nghiên cứu. Quá trình phân loại củ đẳng sâm được hỗ trợ trực tiếp của các chuyên gia phân loại thực vật thuộc Trung tâm nghiên cứu và Phát triển Tài nguyên Thực vật, trường Đại học Đà Lạt.

2.1.2. Chất mang

Các chất chất mang (chất trợ sấy, chất phụ gia): Maltodextrin DE 15-18, Dextrin DE 10-12, Gum Arabic là các phụ gia thực phẩm tinh khiết do Pháp sản xuất và Công ty TNHH Nam Giang TP. HCM nhập khẩu và phân phối tại Việt Nam.

2.1.3. Giống vi sinh vật

Đề tài sử dụng 8 chủng vi khuẩn lactic nằm trong danh mục các loài vi khuẩn probiotic theo TCVN 9633:2013. Nguồn gốc của các chủng vi sinh vật được trình bày trong bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

STT	Ký hiệu	Tên chủng	Nguồn gốc
1	M1	<i>Enterococcus faecalis</i>	Công ty TNHH CN Sinh học Việt-Úc. TP. Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa.
2	M2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
3	M3	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Công ty TNHH Legend BIO, Hà Nội.
4	M4	<i>Enterococcus faecalis</i>	
5	M6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
6	M7	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bảo tàng giống VSV Việt Nam (VTTC).
7	M8	<i>Bifidobacterium longum</i>	Bộ lưu trữ giống - Phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt.
8	M9	<i>Bifidobacterium lactis</i>	

2.1.4. Chuột dùng trong thử nghiệm

Chuột nhắt đực và cái, chủng *Swiss albino*, 6-7 tuần tuổi, 20-25 g do Viện Vaccin và Sinh phẩm Y tế Nha Trang cung cấp. Sử dụng chuột khỏe mạnh, không có biểu hiện bất thường, nuôi ổn định trong môi trường thí nghiệm 5 ngày. Chuột được nuôi trong lồng 25 x 35 x 15 cm, cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ.

2.2. PHƯƠNG PHÁP BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM**2.2.1. Phương pháp thu, lấy mẫu và xử lý mẫu**

Củ đắng sâm tươi tự nhiên được thu mẫu vào các tháng 5, 6 trong các năm 2016 ÷ 2019 tại khu vực Đa Nhim, Đa Chais, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng. Củ tươi được rửa sạch, để ráo nước và sử dụng ngay cho nghiên cứu. Quá trình lấy mẫu đại diện được thực hiện theo quy định của WHO (1992). Mẫu tươi dùng trực tiếp cho việc nghiên cứu phân loại và đánh giá độ tuổi của nguyên liệu dựa vào phân tích hình thái và soi cấu trúc mô. Mẫu tươi để dùng cho các thí nghiệm được bao gói bằng bao bì PA (Polyethylen) với kích thước (20 x 30 cm), mỗi gói 0,5 kg, đục 4 lỗ, bảo quản lạnh ở nhiệt độ $(6 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ sử dụng trong 2 ngày và bảo quản lạnh đông ở nhiệt độ $- 52^{\circ}\text{C}$ để dùng cho quá trình nghiên cứu lâu hơn.

- Sấy khô: tiến hành cắt lát củ đắng sâm thành các lát mỏng, dày 2 mm [158] và sấy khô ở nhiệt độ $\leq 60^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt độ ẩm $< 10\%$ [6] thì dừng quá trình sấy. Củ đắng sâm sấy khô có màu trắng ngà và có mùi thơm đặc trưng, được bao gói bằng bao

bì PA, hút chân không 100% và bảo quản trong thùng xốp dán kín mép, lưu giữ ở nhiệt độ phòng (25°C) nơi khô ráo, thoáng mát.

- Mẫu dùng cho đánh giá chất lượng: mẫu đảng sâm khô được xay nhỏ bằng máy xay sinh tố, kích thước dưới sàng rây số 125 [158]. Loại chất béo trong mẫu đảng sâm bằng kỹ thuật chiết Soxhlet sử dụng *n*-hexan chiết trong 6 giờ [136]. Sau đó, sấy khô mẫu đã xử lý và bao gói bằng bao bì PA hút chân không 100%.

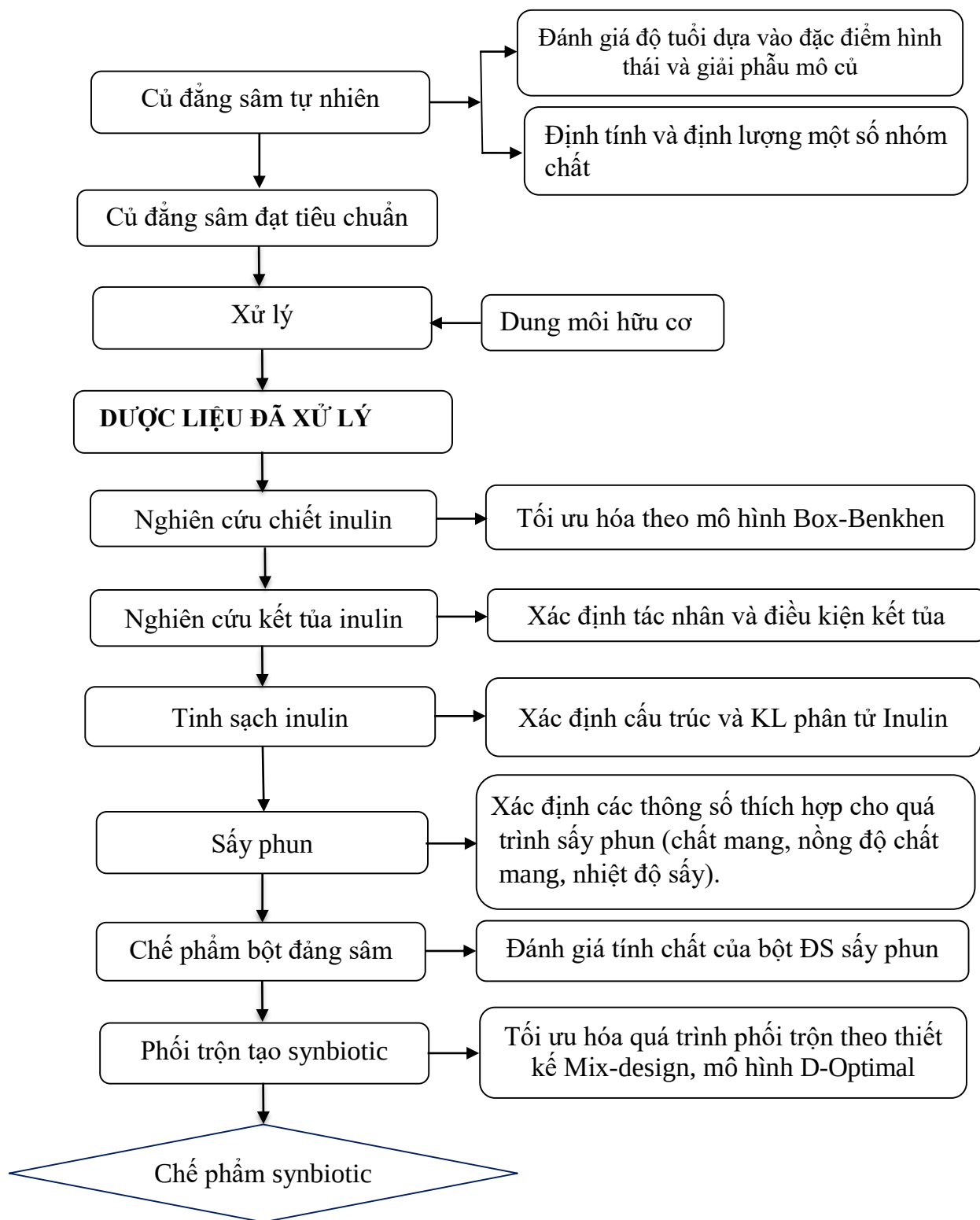
- Mẫu dùng cho phân tích và nghiên cứu thu nhận inulin: mẫu sau khi loại chất béo, loại chất màu và đường đơn bằng kỹ thuật chiết hồi lưu (Soxhlet) sử dụng dung môi ethanol nồng độ 90 % với tỉ lệ nguyên liệu so với ethanol là 1:4 (w/v) trong thời gian 15 phút. Sau đó, thu mẫu và sấy khô ở nhiệt độ $\leq 60^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt độ ẩm $< 10\%$ thì dừng quá trình sấy, bao gói mẫu bằng bao bì PA hút chân không 100% và bảo quản lạnh âm sâu ($- 52^{\circ}\text{C}$) để dùng cho quá trình nghiên cứu thu nhận inulin.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm tổng quát

Cách tiếp cận các nội dung nghiên cứu được trình bày ở hình 2.3.

Trước tiên, củ đảng sâm (*C. javanica*) ở dạng hỗn hợp nguyên liệu ở nhiều giai đoạn sinh trưởng khác nhau, được thu mẫu tại 3 xã Dạ Sa, Dạ Nhim và Dạ Chais, huyện Lạc Dương, tỉnh Lâm Đồng vào tháng 5, 6 hàng năm trong giai đoạn 2016÷2019. Sau khi thu mẫu tiến hành phân loại và đánh giá độ tuổi. Để có thể phân loại chính xác độ tuổi nguyên liệu, luận án tiến hành phân tích các đặc điểm hình thái và cấu trúc mô để tìm ra quy luật và mối liên quan giữa đặc điểm hình thái và giải phẫu mô củ. Đồng thời, luận án tiến hành đánh giá thành phần các chất có trong củ đảng sâm và đối chiếu với tiêu chuẩn dược liệu theo DĐVN, V (2017) để xác định được thời gian thu hoạch củ đảng sâm tự nhiên có chất lượng đạt chuẩn để sử dụng trong nghiên cứu. Sau đó, luận án sẽ thu mẫu theo độ tuổi đã lựa chọn và tiến hành xử lý, cắt lát, sấy khô đóng bao bì PA hút chân không 100% để dùng làm nguyên liệu trong suốt quá trình nghiên cứu.

Trong các loại củ thực vật thường được bao phủ bên ngoài bằng lớp sáp, chính lớp chất béo này sẽ ngăn cản quá trình chiết các chất. Do vậy, luận án tiến hành xử lý loại chất béo ra khỏi mẫu khô bằng dung môi hữu cơ (*n*-hexan), sau đó xử lý loại đường tự do và các chất màu trong nguyên liệu bằng cách ngâm hồi lưu nguyên liệu bằng ethanol 90%. Phần dược liệu đã xử lý sẽ được sấy khô để dùng cho nghiên cứu chiết inulin.



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Quá trình chiết inulin sẽ được tối ưu hóa theo hàm mục tiêu hàm lượng inulin, fructan và chất chiết hòa tan cao nhất. Kết quả tối ưu hóa là cơ sở để xác định các thông số tối ưu cho quá trình chiết inulin (nhiệt độ chiết, thời gian chiết; tỉ lệ dung môi và nguyên liệu (DM/NL) làm cơ sở đề xuất quy trình chiết inulin từ đẳng sâm.

Tiếp theo, tiến hành chiết inulin từ đẳng sâm theo quy trình đề xuất và nghiên cứu

xác định tác nhân kết tủa inulin, nồng độ tác nhân kết tủa để thu được inulin với hàm lượng cao nhất. Sau đó, luận án tiến hành nghiên cứu tinh sạch inulin và xác định khối lượng phân tử inulin. Trên cơ sở kết quả khảo sát sơ bộ và tổng quan tài liệu nghiên cứu về các phương pháp tinh sạch cho thấy phương pháp tinh sạch inulin bằng cách kết tinh lại inulin nhiều lần trong dung môi ethanol là kỹ thuật phù hợp với quá trình tinh sạch inulin. Do vậy, luận án ứng dụng phương pháp kết tinh lại nhiều lần để tinh sạch Inulin.

Trong quá trình tinh sạch trước tiên dịch chiết inulin được cô đặc chân không đến 16°Bx. Sau đó, dịch cô đặc được sử dụng để kết tủa thu hồi bột saccharide thô và sử dụng bột saccharide thô để tinh sạch inulin bằng phương pháp kết tinh lại inulin nhiều lần trong dung môi ethanol. Inulin tinh sạch thu được sẽ được dùng để xác định khối lượng phân tử và cấu trúc dựa trên phân tích khối phổ FT-IR, MNR, HSQC, HMBC.

Đồng thời, luận án sẽ tiến hành nghiên cứu xác định thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột củ đắng sâm như loại chất mang, nồng độ chất mang, nhiệt độ sấy.

Luận án tiếp tục tiến hành đánh giá các đặc tính của bột củ đắng sâm và khảo sát hoạt tính prebiotic của bột củ đắng sâm làm cơ sở cho việc ứng dụng bột inulin củ đắng sâm trong sản xuất synbiotic. Sau đó, luận án tiếp tục tiến hành nghiên cứu tối ưu hoá quá trình phối trộn bột đắng sâm với sinh khối vi khuẩn lactic tạo ra sản phẩm synbiotic. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu ở trên, luận án sẽ tiến hành đề xuất quy trình tạo sản phẩm synbiotic.

Bột synbiotic thành phẩm được sử dụng để thử nghiệm độc tính cấp, độc tính bán trường diễn trên chuột thí nghiệm để xác định tính an toàn, đặc tính hỗ trợ điều trị tiêu chảy và đặc tính tăng cường miễn dịch làm cơ sở định hướng ứng dụng cho con người sau này.

2.2.3. Bố trí thí nghiệm xác định một số công đoạn chính

2.2.3.1. Tối ưu hóa quá trình chiết

Mục đích của thí nghiệm này là tìm các thông số tối ưu cho quá trình chiết inulin từ củ đắng sâm bằng kỹ thuật chiết có hỗ trợ sóng siêu âm. Để xác định được các thông số tối ưu (Nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ NL/DM) ảnh hưởng đến quá trình chiết inulin, Luận án tiến hành tối ưu hóa quá trình chiết inulin bằng phương pháp mặt đáp ứng với thiết kế có tâm (CCD - Central Composis Design) theo mô hình Box - Benkehn. Trong đó, thời gian chiết (X_1), nhiệt độ (X_2), tỷ lệ nguyên liệu/dung môi chiết (NL/DM, X_3) là các biến độc lập được

chọn để tối ưu hóa với mục tiêu hàm lượng inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan thu được nhiều nhất. Phạm vi các biến độc lập và mức độ của chúng được trình bày ở bảng 2.2. Hiệu suất chiết (Y_i) là đáp ứng của sự kết hợp của các biến độc lập. Thử nghiệm được chọn ngẫu nhiên để giảm thiểu ảnh hưởng của sự biến đổi bất ngờ.

Bảng 2.2. Mã hóa các biến độc lập đầu vào

Biến độc lập đầu vào	Mức biến mã		
	-1	0	1
Nhiệt độ (X_2) (°C)	-1	0	1
Thời gian (X_1) (phút)	-1	0	1
Tỉ lệ NL/DM (X_3) (g/ml)	-1	0	1

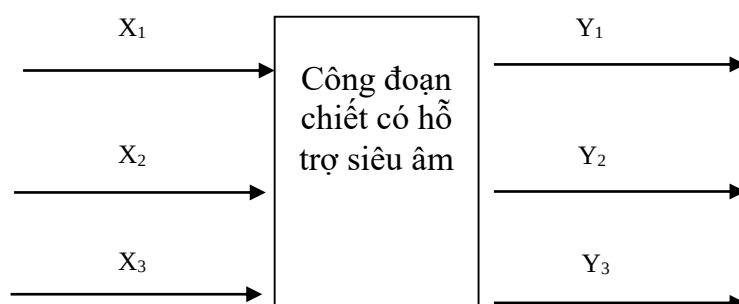
Mối tương quan giữa các giá trị mã hóa và giá trị thực (Y_i) được biểu diễn:

$$X_i = \frac{(X_i - X_o)}{\Delta X}$$

X là biến mã, X_i là mã thực, X_o là biến tại thí nghiệm trung tâm và ΔX là hiệu số giữa giá trị tuyệt đối cực đại của biến thực và giá trị X_o . Phương trình hồi quy phi tuyến tính có dạng bậc 2: $Y_i = f(x_{ij})$

$$f(x) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_{ij} + \sum_1^3 \beta_{ii} X_{ii}^2 + \varepsilon$$

Trong đó Y_i là biến phụ thuộc, β_0 là hệ số tự do và β_i , β_{ii} và β_{ij} là các hệ số ước tính theo mô hình. Chúng đại diện cho đường tuyến tính, bậc hai và các hiệu ứng chéo của các yếu tố X_1 , X_2 và X_3 trên đáp ứng tương ứng. X_{ii} , X_j là cấp của các biến độc lập. ε là sai số. Sau khi xác định phạm vi ban đầu của các biến thông qua thử nghiệm một yếu tố, phương pháp mặt đáp ứng (RSM), thiết kế BBD (Box Behnken Design) trong phần mềm Expert Design (12.0) được thực hiện để tối ưu hóa (Hình 2.4).



Hình 2.4. Mô hình tối ưu hóa

Yêu cầu các hàm mục tiêu (HMT)

Y_1 : Hàm lượng Inulin (mg/g): Tối đa

Y_2 : Hàm lượng Fructan (mg/g): Tối đa

Y_3 : Hàm lượng tổng chất chiết hòa tan (TCCHT): Tối đa

Mô hình chỉ có ý nghĩa và được sử dụng sau khi thỏa mãn các tiêu chuẩn thống kê.

Quy hoạch trực giao đối xứng có tâm, bảng ma trận thực nghiệm gồm 17 nghiệm thức và 3 hàm mục tiêu (Y_1, Y_2, Y_3). Phân tích các yếu tố ảnh hưởng, mỗi yếu tố tiến hành tại 3 mức (-1,0,+1). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi đơn vị nghiệm thức. Phân tích thiết kế thử nghiệm và tính toán dữ liệu dự đoán để ước tính phản ứng của các biến độc lập.

2.2.3.2. Tối ưu hóa quá trình phối trộn tạo chế phẩm synbiotic

Để có thể xác định tỷ lệ phối trộn thích hợp của bột củ đậu sẫm sảy phun và vi khuẩn trong chế phẩm synbiotic, luận án tiến hành khảo sát các tỉ lệ phối trộn bằng phương pháp thiết kế Mixture –Design, mô hình D-Optimal.

Bột củ đậu sẫm (bột prebiotic), các chủng vi khuẩn *L. plantarum* (M6), *L. acidophilus* (M7), *B. longum* (YK₁), *B. lactiCs* (YK₂) là các biến độc lập được chọn để tối ưu hóa cho việc phối trộn tạo synbiotic. Phạm vi các biến độc lập và mức độ của chúng được trình bày trong bảng 2.4. Y_i là đáp ứng của sự kết hợp của các biến độc lập. Thử nghiệm được chọn ngẫu nhiên để giảm thiểu ảnh hưởng của sự biến đổi bất ngờ.

Bảng 2.3. Các biến độc lập đầu vào và mức độ được sử dụng trong thiết kế

Mixture –Design

Biến độc lập đầu vào	Mức biến mã		
Bột prebiotic (X_1) (mg)	-1	0	1
<i>L. acidophilus</i> (X_2) (mg)	-1	0	1
<i>L. plantarum</i> (X_3) (mg)	-1	0	1
<i>B. longum</i> (X_4) (mg)	-1	0	1
<i>B. lactiCs</i> (X_5) (mg)	-1	0	1

Điều kiện tổ hợp:

$$\left\{ \begin{array}{l} X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5 = 3 \\ 0,1 \leq X_1 \leq 2,6 \\ 0,1 \leq X_2 + X_3 + X_4 + X_5 \leq 2,9 \\ 0,1 \leq X_2 \leq 0,9 \\ 0,1 \leq X_3 \leq 0,9 \\ 0,1 \leq X_4 \leq 0,9 \\ 0,1 \leq X_5 \leq 0,9 \end{array} \right.$$

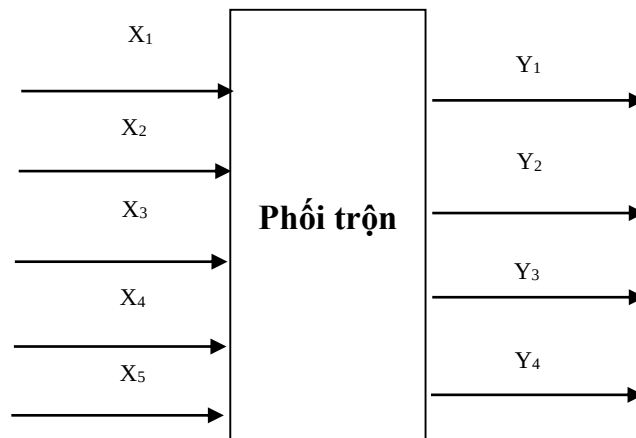
Mối tương quan giữa các giá trị mã hóa và giá trị thực (Y_i) được biểu diễn như sau:

$$X_i = \frac{(X_i - X_o)}{\Delta X}$$

X là biến mã, X_i là mã thực, X_o là biến tại thí nghiệm trung tâm và ΔX là hiệu số giữa giá trị tuyệt đối cực đại của biến thực và giá trị X_o . Phương trình hồi quy trình hồi quy tuyến tính có dạng: $Y_i = f(x_{ij})$

$$Y = f(x) = \beta_{ii} \sum_{n=1}^5 X_i + \beta_{ij} \sum_{n=1}^5 X_{ij} + \varepsilon$$

Trong đó Y_i là biến phụ thuộc, β_i , β_{ii} và β_{ij} là các hệ số ước tính theo mô hình, chúng đại diện cho đường tuyến tính bậc một và các hiệu ứng chéo của các yếu tố X_1 , X_2 và X_3 trên đáp ứng tương ứng. X_{ii} , X_j là cặp của các biến độc lập. ε là sai số.



Hình 2.5. Mô hình tối ưu hóa

Sau khi xác định phạm vi ban đầu của các biến, thiết kế tối ưu hóa được thực hiện (Hình 2.5). Yêu cầu các hàm mục tiêu (HMT): Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 có giá trị cực đại. Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 là số lượng khuẩn lạc vi khuẩn (CFU/g) lần lượt của các chủng vi khuẩn *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. lactiCs*. Mô hình chỉ có ý nghĩa và được sử dụng sau khi thỏa mãn các tiêu chuẩn thống kê.

Bảng ma trận thực nghiệm gồm 25 nghiệm thức và 4 hàm mục tiêu (Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4). Phân tích các yếu tố ảnh hưởng, mỗi yếu tố tiến hành tại 3 mức (-1, 0, +1). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần đối với mỗi đơn vị nghiệm thức. Phân tích thiết kế thử nghiệm và tính toán dữ liệu dự đoán để ước tính phản ứng của các biến độc lập.

2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH

2.3.1. Phương pháp phân tích hình thái và cấu trúc mô củ đẳng sâm

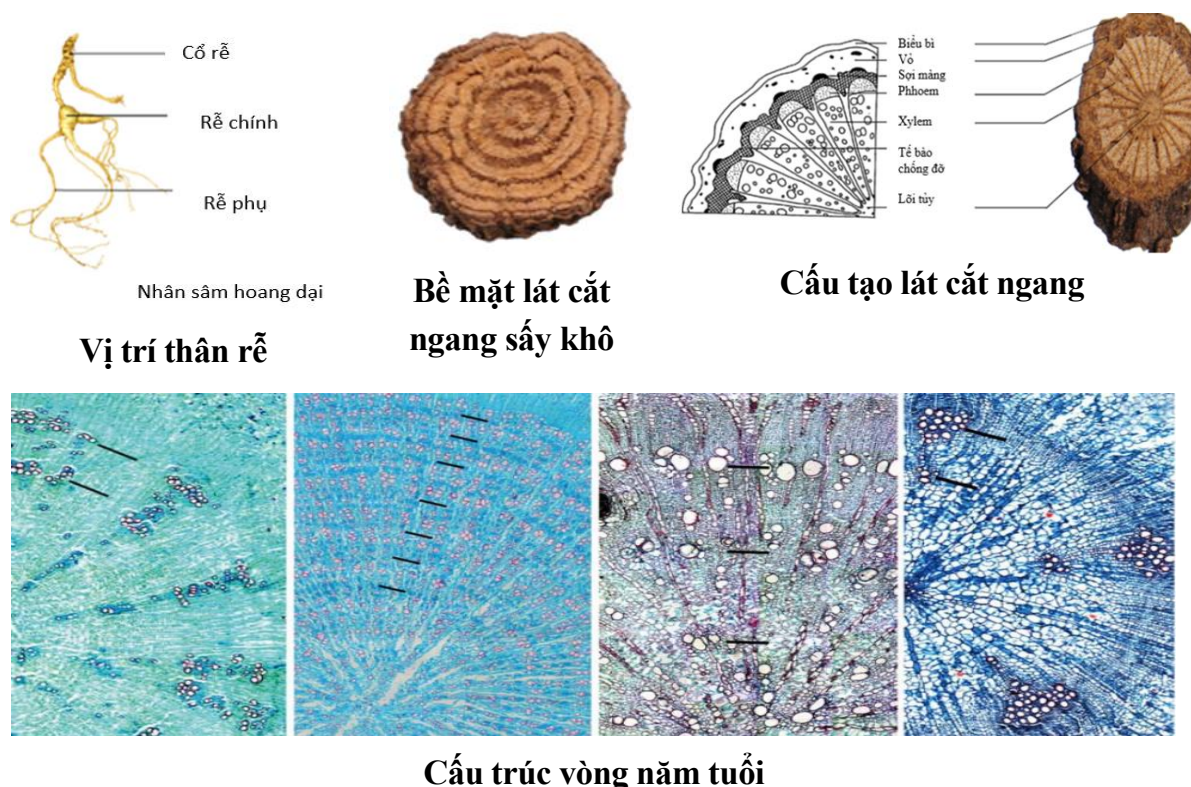
2.3.1.1. Phương pháp phân tích hình thái

* **Phương pháp phân tích hình thái:** Phân tích các đặc điểm hình thái bên ngoài (Màu, mùi, vị, lát cắt tươi, khô) theo ĐĐVN V (2017) và theo Zhang (2017) [6, 171]. Các đặc điểm nhận dạng chính: số vòng năm trên cổ rễ và sự phân nhánh của rễ chính, mặt lát cắt tươi và khô [174].

* **Đo kích thước đường kính củ:** Đường kính trung bình của củ đẳng sâm ở chỗ phình to nhất tính bằng mm và được đo bằng thước kẹp lòng tròn với độ chính xác 0,1mm.

2.3.1.2. Phương pháp phân tích mô học

* **Soi mẫu tiêu bản hiển vi:** Dùng dao lam cắt lát mỏng vuông góc với thân rễ, cách cổ rễ $1,5 \div 2$ cm và mỗi củ đẳng sâm chỉ cắt 01 lát. Sau đó, cố định hình dạng lát cắt bằng ethanol 70% và nhuộm màu lát cắt bằng Carmin lục - Iode [26].



Hình 2.6. Các đặc điểm nhận dạng mô củ đẳng sâm

* **Xác định năm tuổi:** Độ tuổi của củ đẳng sâm tính theo năm được xác định thông qua vòng tăng trưởng hàng năm theo Schweingruber và Cs (2005) [140] (Hình 2.6). Đường kính xylem (μm) được đo tại điểm tiếp giáp với phloem (nhu mô) từ bên này xuyên tâm qua điểm tiếp giáp với phloem bên kia bằng thước đo trong kính hiển vi.

2.3.2. Các phương pháp định tính một số nhóm chất trong đẳng sâm

2.3.2.1. Định tính thành phần các chất trong dịch chiết *n*-hexan

- Định tính Carotenoid và phytosterol theo Sawant và Cs (2013) [137].

2.3.2.2. Định tính các thành phần trong dịch chiết ethanol

- Định tính alkaloid, polyphenol, Flavonoid, Coumarin, Saponin, acid amin, đường tự do, acid hữu cơ theo Sawant và Cs (2013) [137].

2.3.2.3. Định tính các nhóm chất khác

- Định tính Tanin theo WHO (1992) [158].
- Định tính tinh dầu, anthranoid (Phản ứng Borntraeger) theo Nguyễn Thị Kim Phụng (2007) [16].

2.3.2.3. Các phương pháp định tính inulin

- Định tính inulin và fructan bằng phương pháp soi bột [158].
- Định tính inulin bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng TLC theo Yevtifieieva và cộng sự (2016) [167].

2.3.3. Các phương pháp định lượng hóa học

* **Xác định độ ẩm:** theo phương pháp của WHO (1992) [158] và sử dụng thiết bị đo độ ẩm tự động bằng hồng ngoại (Moisture, AF 50, Nhật).

* **Định lượng đường tổng số:** hàm lượng đường tổng số được xác định theo TCVN 7771:2007 (ISO 2173:2003) [24].

* **Xác định hàm lượng chất khô:** xác định hàm lượng chất khô (VCK) theo phương pháp sấy khô đến trọng lượng không đổi ở 105°C và cân khối lượng theo WHO (1992) [158].

* **Xác định hàm lượng tổng chất chiết hòa tan:** Hàm lượng tổng chất chiết hòa tan được xác định bằng phương pháp chiết và sấy khô dịch chiết đến trọng lượng không đổi ở 105°C trong 3 giờ và cân khối lượng theo WHO (1992) [158].

* **Xác định hàm lượng tro tổng số và tro không tan trong acid:** Hàm lượng tro tổng số được xác định bằng phương pháp nung đến khối lượng không đổi theo WHO (1992) và tính hàm lượng tro tổng số bằng mg/g vật liệu khô [158]. Tro không tan trong acid xác định bằng phương pháp nung thành tro trắng sau đó thêm dung dịch acid chlohydric TS (Test Solution) (~70 g/lít) theo WHO (1992) và tính hàm lượng tro không tan trong acid tính bằng mg/g vật liệu khô.

* **Xác định hàm lượng kim loại nặng và tạp chất vô cơ:** Hàm lượng kim loại nặng Hg, As, Cd và Pb được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử theo TCVN 7602:2007/(AOAC 972.25) [3]

* **Xác định thành phần nguyên liệu củ đắng sâm:** xác định các thành phần của củ đắng sâm nguyên liệu theo DĐVN V (2017) [6]

* **Các phương pháp phân tích định lượng Polyphenol và Flavonoid**

+ **Xác định hàm lượng polyphenol:** xác định hàm lượng polyphenol theo Singleton và Cs (1999) [142].

+ **Xác định hàm lượng Flavonoid:** hàm lượng Flavonoid được xác định theo phương pháp của Woisky và Cs [162].

* **Các phương pháp xác định hoạt tính chống oxy hóa**

+ **Hoạt tính chống oxy hóa tổng (TAC):** được xác định theo phương pháp của Prieto và Cs (1999) [123]:

+ **Hoạt tính khử Fe (RP- Reducing Power):** được xác định theo Zhu và Cs (2002) [176].

+ **Xác định hoạt tính khử ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid):** Xác định hoạt tính khử ABTS theo Roberta và cộng sự (1999) [131]

* **Các phương pháp định lượng fructan và inulin:** định lượng fructan và inulin theo phương pháp quang phổ so màu UV-VIS của Pencheva và Cs (2012) [114], sử dụng phức hợp hiện màu Resorcinol-Thiure và fructose được dùng làm chất chuẩn. Phương pháp này được định lượng cho cả Fructan và inulin.

* **Xác định hàm lượng saccharide toàn phần:** hàm lượng saccharide toàn phần (ScTP) trong dịch chiết được xác định bằng phương pháp đo quang phổ - Phenol acid theo Chen và Cs (2011) [49].

2.3.4. Phương pháp tinh sạch inulin

Tinh sạch inulin theo kỹ thuật tái kết tủa nhiều lần trong ethanol 80%. Các bước của quá trình kết tinh bao gồm việc hòa tan nóng và lọc, để kết tinh lạnh, lọc hút tinh thể và làm khô.

2.3.5. Các phương pháp phân tích khối lượng phân tử và cấu trúc inulin

* **Xác định trọng lượng phân tử của Inulin tinh sạch:** bằng phương pháp sắc ký rây phân tử hiệu năng cao (sắc ký gel).

Bộ chất chuẩn: Shodex Standard P-82:

Tên chuẩn	Khối lượng phân tử
STD P-800	642.000
STD P-400	337.000
STD P-200	194.000
STD P-100	107.000
STD P-50	47.100
STD P-20	21.100
STD P-10	9.600
STD P-5	6.100

Chuẩn bị mẫu: Lấy 10,0 mg polysaccharide thô, hòa tan trong 5 ml nước khử ion thu được dung dịch tiêm sắc ký.

Điều kiện sắc ký:

- Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HP Hewlett Packard Series 1050.
- Cột: SHODEX OHpak KB – 804 (8.0 x 300 mm).
- Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng
- Dung môi pha động: 100% nước khử ion
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Đầu dò: ELSD. Điều kiện đầu dò: nhiệt độ 75°C, tốc độ dòng khí nitơ 1,8 L/phút.

* **Xác định cấu trúc hóa học của inulin:** xác định cấu trúc hóa học của Inulin dựa trên việc phân tích khối phổ bao gồm phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^1H -NMR, ^{13}C -NMR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (HSQC, HMBC), phổ hồng ngoại (FT-IR).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo ở 70°C với dung môi D_2O , với kỹ thuật đo khử tín hiệu của H_2O trên máy 500MHz Bruker Avance tại Viện Hóa học-Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

Phổ hồng ngoại của inulin được đo trên máy Thermo Fisher Scientific của Trường Đại học Đà Lạt và trên máy Bruker Avance của Viện Hóa học-Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

2.3.6. Phương pháp đánh giá chất lượng bột thành phẩm

* **Đánh giá tính chất vật lý của bột:** kích thước hạt (Kích thước tiểu phân nano), mật độ phân bố (% intensity) và chỉ số phân bố kích thước (PDI- Polydispersity Index) được xác định theo phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering-DLS) theo tiêu chuẩn ISO 22412 (2008) [148]. Sử dụng hệ thống phân tích kích thước Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Anh). Nhiệt nóng chảy được đo bằng thiết bị đo nhiệt tự động C-60

(USA). Quá trình phân tích mẫu được thực hiện tại TT phân tích, Viện Hạt nhân Đà Lạt.

* **Đánh giá tính chất hóa học của bột:** giá trị pH của mẫu bột đẳng sâm được đo bằng thiết bị đo pH. Hàm lượng inulin, fructan trong mẫu bột sấy phun xác định theo phương pháp của Pencheva và Cs (2012) [114].

* **Độ hòa tan của bột:** được đánh giá theo QCVN ngày 3/7/2019. Cân 1g bột củ đẳng sâm và cho vào dung môi thử ở nhiệt độ (25±2) °C trong 30 giây, cứ cách 5 phút lại lắc 30 giây. Độ tan được biểu thị như sau (Bảng 2.4).

Bảng 2.4. Xác định độ hòa tan

Độ tan	Số ml dung môi hòa tan 1 g chất thử
Rất tan	Dưới 1
Dễ tan	1-10
Tan	10-30
Hơi tan	30-100
Khó tan	100-1 000
Rất khó tan	1 000-10 000
Thực tế không tan	Trên 10 000

* **Xác định chỉ tiêu vi sinh vật:** chỉ tiêu vi sinh vật của bột củ đẳng sâm được xác định theo QĐ số 46/2007/QĐ-BYT. Ngày 19/12/2007*.

2.3.7. Phương pháp định lượng vi sinh vật

* Xác định số lượng tế bào vi sinh vật bằng phương pháp đếm khuẩn lạc MPN (Most Probable Number) theo QĐ số 929/QĐ-ATTP ngày 08/11/2017.

* Xác định tổng số vi khuẩn hiếu khí (CFU/g): theo TCVN 4884-1:2005.

* Xác định tổng số vi khuẩn *E. coli* (CFU/g): theo TCVN 7924-2:2008.

* Xác định *C. perfringens* (CFU/g): theo TCVN 4991:2005.

* Xác định *Salmonella spp* (có hoặc KPH/25g) theo TCVN 4829:2005.

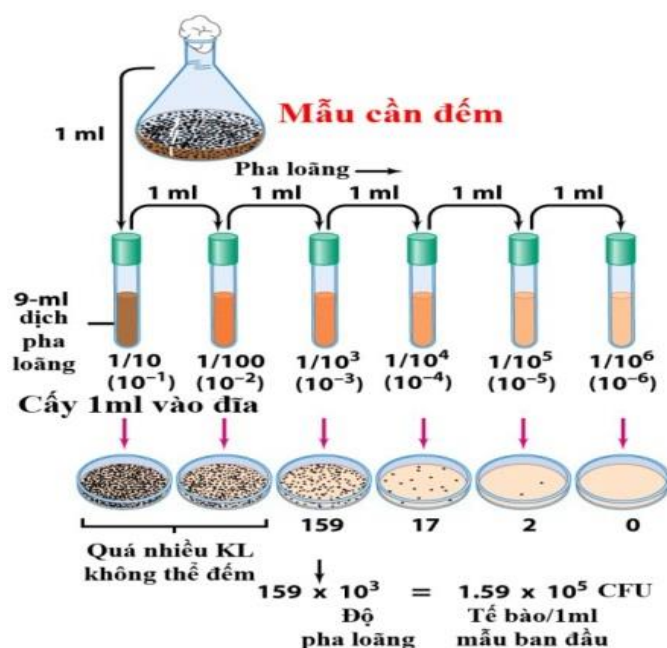
* Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc (CFU/g) theo TCVN 8275-1 & 2:2010.

2.3.8. Đánh giá hoạt tính prebiotic

+ Kiểm tra mật độ vi sinh vật của dịch nuôi cấy vi khuẩn có bổ sung bột đẳng sâm sấy phun bằng phương pháp pha loãng mẫu theo TCVN 9635:2013/ ISO 29981:2010.

+ Định lượng vi khuẩn *Bifidus* giả định theo kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37°C [22].

+ Kiểm tra đặc tính prebiotic thông qua đếm tổng số lượng khuẩn lạc vi khuẩn thử nghiệm bằng phương pháp trải đĩa.



Hình 2.7. Sơ đồ phương pháp trải đĩa

Tổng số vi khuẩn trong mẫu (CFU/g hay CFU/ml)

Mật độ tổng số vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu được tính theo công thức sau:

$$A \text{ (CFU/g hay CFU/ml)} = \frac{N}{n_1 \cdot V \cdot f_1 + \dots + n_i \cdot V \cdot f_i}$$

Trong đó:

A – Số tế bào (đơn vị hình thành khuẩn lạc) vi khuẩn trong 1g hay 1ml mẫu.

N – Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn.

n_i – Số lượng đĩa cấy tại độ pha loãng thứ i .

V – Thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong mỗi đĩa.

f_i – Độ pha loãng tương ứng.

Sinh khối của 8 chủng vi khuẩn lactic trong danh sách các loài vi khuẩn probiotic theo TCVN 9633:2013: Giống vi khuẩn khởi động-Tiêu chuẩn nhận dạng được thử nghiệm [23].

2.3.9. Phương pháp thử nghiệm chế phẩm synbiotic trên chuột thí nghiệm

2.3.9.1. Khảo sát độc tính cấp

Nguyên tắc: cho chuột thử nghiệm dùng synbiotic qua đường uống trong cùng điều kiện như nhau và quan sát các phản ứng xảy ra trong vòng 72 giờ.

Thực hiện: thử nghiệm trên 10 chuột (50% đực, 50% cái), nhịn đói ít nhất 12 giờ trước khi cho uống mẫu thử liều duy nhất tối đa qua đường uống với thể tích tối đa 50 ml/kg. Theo dõi và ghi nhận cử động tổng quát, biểu hiện về hành vi, trạng thái lông, ăn uống, bài tiết nước tiểu và số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ. Nếu sau 72 giờ, chuột không có dấu hiệu bất thường hoặc chết, tiếp tục theo dõi trong vòng 14 ngày [7, 10].

2.3.9.2. Khảo sát tác động điều trị tiêu chảy cấp của chế phẩm synbiotic

Khảo sát tác động điều trị tiêu chảy cấp của chế phẩm synbiotic trên mô hình chuột nhất gây tiêu chảy do kháng sinh: Chuột đực khỏe mạnh, bình thường, được chia ngẫu nhiên vào các lô (8 chuột/lô): chứng sinh lý (lô 1: SL), chứng bệnh (lô 2: CB), đối chiếu Bioflora (lô 3: ĐC) và lô mẫu thử (lô 4: Thử). Chuột ở lô 2, 3 và 4 được gây tiêu chảy bằng cách cho uống hỗn hợp kháng sinh streptomycin liều 2 g/kg và lincomycin liều 3 g/kg, 2 lần mỗi ngày trong 4 ngày liên tục, thể tích cho uống 10 ml/kg. Sau 4 ngày, toàn bộ chuột thử nghiệm được cho uống hỗn hợp kháng sinh đều có triệu chứng tiêu chảy: phân mềm/lỏng, số lần đại tiện tăng, có thể có tình trạng bị dính bần ở hậu môn. Từ ngày 5, chuột lô đối chiếu được cho uống Bioflora liều 0,067 viên/kg/ngày; lô mẫu thử được cho uống synbiotic liều 1,2 g/kg/ngày; chuột lô chứng bệnh được cho uống nước cất trong 7 ngày liên tục, 2 lần mỗi ngày. Trong 7 ngày điều trị, lô 2 đến lô 4 tiếp tục được cho uống hỗn hợp kháng sinh với liều bằng $\frac{1}{4}$ liều ban đầu để hạn chế sự tự hồi phục. Lô chứng sinh lý được cho uống nước muối sinh lý trong suốt thử nghiệm. Ghi nhận trọng lượng cơ thể và đánh giá tình trạng tiêu chảy của chuột thử nghiệm hàng ngày theo tiêu chuẩn trong bảng 2.5 [30, 95, 166].

Bảng 2.5. Thang điểm đánh giá tiêu chảy ở chuột

Thang điểm	Tình trạng tiêu chảy
0	Bình thường
1	Phân mềm và không có tình trạng dính bần ở hậu môn.
2	Phân mềm/lỏng, màu nhạt, có tình trạng dính bần ở hậu môn.

2.3.9.3. Khảo sát khả năng kích thích miễn dịch của chế phẩm synbiotic

Khảo sát khả năng kích thích miễn dịch (tăng cường miễn dịch) của chế phẩm synbiotic trên mô hình chuột nhất gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid [18, 19]. Chuột đực, khỏe mạnh, được chia ngẫu nhiên thành 5 lô, mỗi lô 8 chuột:

- Lô trước thử nghiệm: lấy máu tim, gửi mẫu xác định công thức bạch cầu tại phòng khám Đa khoa Medlatec.

- Lô 1 (sinh lý): cho chuột uống nước cất; Lô 2 (chứng bệnh): cho chuột uống nước cất; Lô 3 (đối chiếu): chuột được tiêm phúc mạc Filgrastim liều 50 µg/kg; Lô 4 (mẫu thử): cho chuột uống synbiotic với liều dùng 1,2 g/kg/ngày, 2 lần mỗi ngày.

Lô 1 (sinh lý) được tiêm phúc mạc NaCl 0,9%, thể tích 10 ml/kg. Chuột từ lô 2 đến lô 4 được tiêm phúc mạc bằng dung dịch cyclophosphamid (CYP) pha trong NaCl 0,9% với liều duy nhất 150 mg/kg vào ngày 1, thể tích tiêm 10 ml/kg. Chuột ở lô 3 được tiêm phúc mạc bằng filgrastim (pha trong glucose 5%), liều 50 µg/kg, hàng ngày từ ngày 2 đến ngày 5, liều đầu tiên cách 24 giờ sau khi tiêm CYP. Chuột ở lô 4 được cho uống mẫu synbiotic hàng ngày từ ngày 1 đến ngày 5. Chuột ở các lô thử nghiệm được ghi nhận trọng lượng hàng ngày trước khi uống mẫu thử. Vào ngày 5, sau khi tiêm filgrastim hoặc uống mẫu thử 1 giờ, gây mê chuột bằng đá CO₂, lấy máu tim để xác định công thức bạch cầu tại phòng khám Medlatec; tách lấy lách, tuyến ức, gan và tuyến thượng thận, rửa bằng NaCl 0,9% lạnh, thấm khô cân và ghi nhận trọng lượng, xác định khối lượng tương đối của các cơ quan theo công thức:

$$g\% = \frac{P_{cq}}{P_{ct}} * 100$$

Trong đó: P_{cq}: trọng lượng cơ quan (g)

P_{ct}: trọng lượng cơ thể (g)

2.3.9.4. Khảo sát độc tính bán trường diễn

Nguyên tắc: Đánh giá độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic trên chuột nhắt bằng cách cho chuột thử nghiệm uống liều dự kiến dùng cho người và liều cao gấp 2 lần liều dùng cho người (liều dự kiến sẽ quan sát được biểu hiện ngộ độc trên cơ quan của động vật thử nghiệm) trong khoảng thời gian 14 và 28 ngày. Thử nghiệm được tiến hành song song với 1 nhóm chứng sinh lý trong cùng điều kiện [7, 10].

Thực hiện: chuột (50% đực, 50% cái) mua về, được nuôi ở điều kiện thí nghiệm trong 5 ngày, sau đó chia ngẫu nhiên thành 7 lô, mỗi lô 10 con (5 đực, 5 cái) nuôi riêng lẻ đực, cái trong 2 bocal nhựa.

Bảng 2.6. Phân lô thử nghiệm độc tính bán trường diễn

TT	Tên lô	Số chuột	Thực nghiệm
1	Sinh lý trước thí nghiệm	10 (5 đực, 5 cái)	Nuôi ổn định 5 ngày, giết mổ, khảo sát các chỉ số của chuột trước thử nghiệm
2	Sinh lý sau 14 ngày (SLa)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống nước cất với liều 0,1 ml/10g/ngày trong 14 ngày liên tục
3	Mẫu thử liều 1,2 g/kg sau 14 ngày (Thử 1a)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg/ngày, 2 lần/ngày (tương đương với liều điều trị dự kiến ở người) trong 14 ngày liên tục
4	Mẫu thử liều 2,4 g/kg sau 14 ngày (Thử 2a)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg/ngày, 2 lần/ngày (gấp 2 lần liều điều trị dự kiến ở người) trong 14 ngày liên tục
5	Sinh lý sau 28 ngày (SLb)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống nước cất với liều 0,1 ml/10g/ngày trong 28 ngày liên tục
6	Mẫu thử liều 1,2 g/kg sau 28 ngày (Thử 1b)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg/ngày, 2 lần/ngày (tương đương với liều điều trị dự kiến ở người) trong 28 ngày liên tục
7	Mẫu thử liều 2,4 g/kg sau 28 ngày (Thử 2b)	10 (5 đực, 5 cái)	Cho uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg/ngày, 2 lần/ngày (gấp 2 lần liều điều trị dự kiến ở người) trong 28 ngày liên tục

Cho chuột uống nước cất hoặc mẫu thử mỗi ngày, 02 lần/ngày vào buổi sáng (khoảng 9 giờ - 10 giờ) và buổi chiều (khoảng 15 giờ - 16 giờ) liên tục trong 14 ngày (lô SLa, Thử 1a, Thử 2a) hoặc 28 ngày (lô SLb, Thử 1b, Thử 2b), thể tích cho uống 10 ml/kg. Theo dõi chuột trong quá trình thử nghiệm về: hành vi (tăng đi lại, giảm đi lại, nằm im, run rẩy, co giật...); lông (mượt, rụng đứng, rụng...) và các cơ quan: mắt, mũi...; tình trạng ăn, uống; tính chất phân, nước tiểu, thể trọng. Sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột được ghi nhận bằng cách cân chuột 1 lần/tuần vào ngày thứ 2.

Sau 14 hoặc 28 ngày, chuột được gây mê bằng đá CO₂, mổ nhanh để lấy máu tim để thực hiện xét nghiệm các chỉ số huyết học như số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC), tiểu cầu (PLT), huyết sắc tố hemoglobin (HGB), dung tích hồng cầu hematocrit (HCT), thể tích trung bình một hồng cầu (MCV), số lượng hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (MCH), nồng độ hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (MCHC) và

khoảng phân bố hồng cầu (R khô) (kiểm tra chức năng tạo máu), sinh hóa: aspartat aminotransferase (AST) và alanin aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN), creatinin, kiểm tra chức năng gan, thận bằng máy xét nghiệm sinh hóa tự động RX Daytona (Randox, Vương quốc Anh) tại Bộ môn Sinh hóa, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh.

Vào ngày 28, tách lấy gan và thận, rửa sạch bằng nước muối sinh lý lạnh. Thăm khô. Quan sát đại thể, ghi nhận màu sắc, tình trạng bề mặt, tổn thương. Sau đó, ngâm gan, thận trong dung dịch formol 10 % và lấy ngẫu nhiên 6 mẫu gan, thận trong 1 lô thí nghiệm để làm xét nghiệm vi thể sau khi nhuộm hematoxylin-eosin (HE) và quan sát trên kính hiển vi quang học (Labomed, Hoa Kỳ) tại Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Quận 2, Tp. Hồ Chí Minh.

Nếu trong quá trình thử nghiệm có chuột tử vong thì xem xét tình trạng của cơ quan nội tạng qua giải phẫu (đại thể và nhuộm tiêu bản HE, phân tích vi thể).

2.4. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ SỐ LIỆU

Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 3 lần lặp lại. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ SD. So sánh sự khác biệt giữa các nhóm được xử lý bằng phần mềm Minitab 18.0. Phân tích ANOVA để đánh giá sự khác nhau của giá trị ở mức có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Thiết kế thí nghiệm tối ưu bằng phần mềm DE. 12.0 (Mỹ). Mô hình Box – Benkhen dùng trong tối ưu hóa thu nhận dịch chiết và Mix-Design dùng trong phối trộn probiotic với probiotic.

Riêng đối với phần thử nghiệm chế phẩm synbiotic. Kết quả phân tích được xử lý, phân tích thống kê và trình bày ở dạng giá trị trung bình $\pm$ SEM (Standard error of mean - sai số chuẩn của số trung bình). Sự khác biệt giữa các lô được phân tích bằng phép kiểm One-way ANOVA, paired sample T-test, Kruskal-Wallis và Mann-Whitney với phần mềm SPSS 22.0. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

2.5. THIẾT BỊ, HÓA CHẤT VÀ VẬT TƯ SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.5.1. Thiết bị

Sử dụng các thiết bị hiện có tại phòng thí nghiệm đa năng và phòng thí nghiệm hóa học - Trường Đại học Đà Lạt (PL-2).

2.5.2. Hóa chất

+**Xuất xứ Merck (độ tinh khiết 99,9%)**: Folin-Ciocalteu's reagent (FCR), Iron sulfate (FeSO_4); Ascorbic acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$); Acid Gallic ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$); Vanillin($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$); Sodium hydrophosphate (Na_2HPO_4), NaH_2PO_4 , Potassium acetate (CH_3COOK). Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Sucrose. Môi trường MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) tổng hợp.

+**Xuất xứ các nước khác (độ tinh khiết 99,9%)**: Inulin (Sigma- Đức); Fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Himedia, India); ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-acid); Quercetin (Himedia, India); Potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Nhật). Re sorcinol($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) (Mỹ); Thiure ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) (Mỹ).

+**Xuất xứ Trung Quốc**: Ferric chloride (FeCl_3), Sodium carbonate (Na_2CO_3 99,2%); Aluminum chloride (AlCl_3 99%); Phenol 99,8%, H_2SO_4 98%, HCl 38%, Ethanol 99,7%; FeCl_3 97%; $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6$ 99%. Trichloroacetic acid (CCl_3COOH).

CHƯƠNG III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH THỜI GIAN THU HOẠCH NGUYÊN LIỆU CỦ ĐĂNG SÂM TỰ NHIÊN MỘC TẠI LẠC DƯƠNG - LÂM ĐỒNG

3.1.1. Ảnh hưởng của độ tuổi đến hình thái và cấu trúc mô của củ đăng sâm

3.1.1.1. Ảnh hưởng của độ tuổi đến hình thái và cấu trúc mô của củ đăng sâm

Tiến hành thu mẫu củ đăng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương-Lâm Đồng vào khoảng tháng 5÷6 trong các năm 2016÷2019. Sau khi thu mẫu, rửa sạch và sử dụng để nghiên cứu đánh giá các đặc điểm hình thái và mô học để làm cơ sở cho việc tìm ra quy luật để đánh giá độ tuổi của đăng sâm. Đối với mẫu để đánh giá cấu trúc mô, mỗi củ cắt duy nhất 01 lát cắt ngang cách cổ rễ 1,5-2 cm. Kết quả đánh giá đặc điểm hình thái và mô học được trình bày các hình 3.1 ÷ 3.6.



Năm thứ nhất



Năm thứ hai

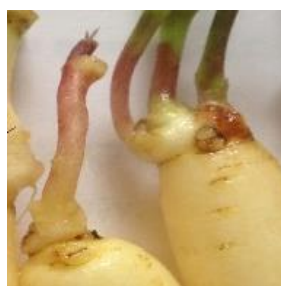


Năm thứ ba



Năm thứ tư

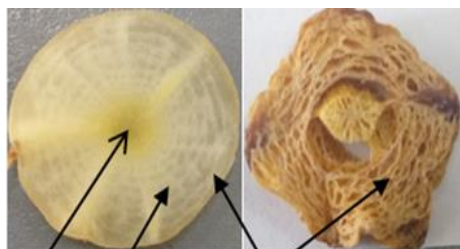
Hình 3.1. Hình dạng và màu sắc bên ngoài của củ đăng sâm theo năm tuổi



Vết
sẹo
hàng
năm

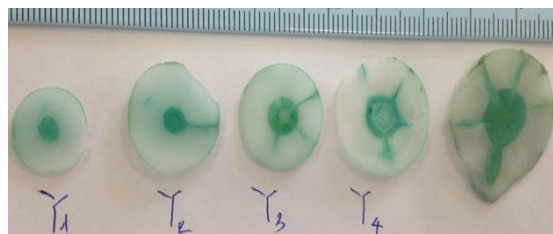


Hình 3.2. Hình ảnh về vết sẹo hàng năm trên củ củ đăng sâm

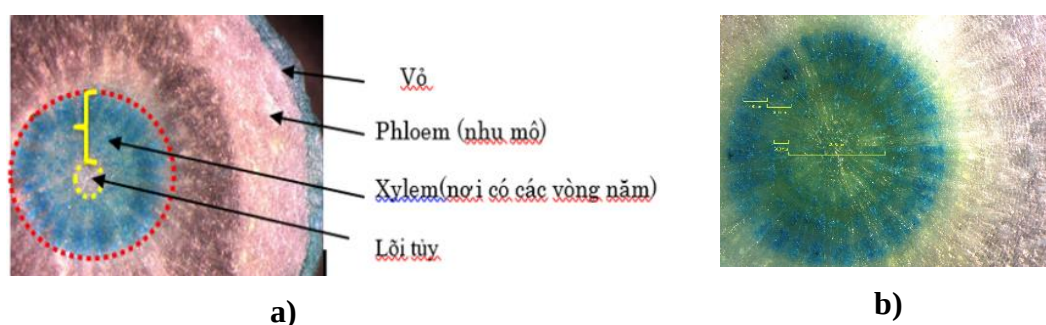


Xylem Tia gỗ Nhu mô vỏ

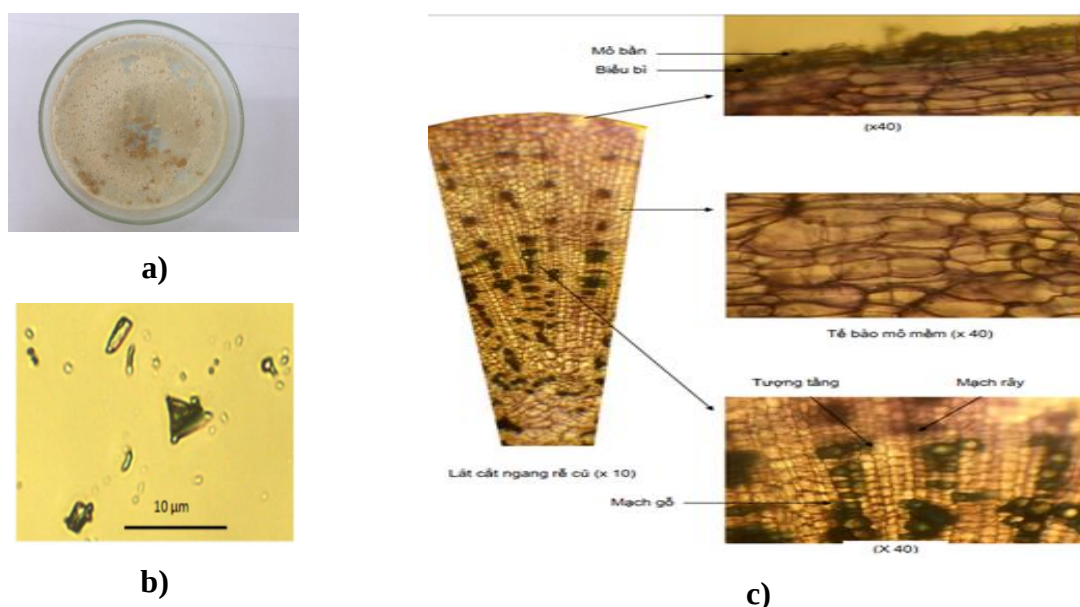
Hình 3.3. Hình ảnh bề mặt lát cắt của củ đăng sâm tươi và khô



Hình 3.4. Hình ảnh bề mặt lát cắt ngang nhuộm màu của củ đăng sâm tươi



Hình 3.5. Hình ảnh vòng tăng trưởng của củ đẳng sâm



Hình 3.6. Hình ảnh bột củ đẳng sâm (a), tinh thể inulin (b) và hình ảnh vi phẫu của củ đẳng sâm dưới kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại 1.25

Từ các kết quả đánh giá ở các hình 3.1 ÷ 3.6 cho thấy:

*** Về hình dạng và màu sắc bên ngoài:** Quá trình phân tích hình thái bên ngoài cho thấy: Củ đẳng sâm có dạng hình trụ, thuôn dài, đầu trên to, đầu dưới nhỏ, có thể phân nhánh hoặc không và khi cầm có cảm giác chắc tay. Củ đẳng sâm tươi có màu sắc thay đổi từ màu vàng nhạt sáng đến màu hơi nâu vàng. Củ đẳng sâm một năm tuổi thường có vỏ rất mỏng, nhìn mọng nước và củ càng nhiều năm tuổi phần vỏ càng dày và càng xù xì (Hình 3.1). Mặt khác, củ đẳng sâm thường có mùi thơm đặc trưng và củ có vị ngọt. Củ năm thứ nhất có vị ngọt nhẹ và càng nhiều năm vị ngọt càng giảm dần.

*** Về vết sẹo hàng năm trên cổ rễ:** quá trình theo dõi sự phát triển của củ đẳng sâm tự nhiên cho thấy hàng năm cây củ đẳng sâm tự tàn lụi vào mùa khô (từ tháng 11 ÷ 4 năm sau) và khi cây tàn lụi sẽ để lại vết sẹo trên cổ rễ. Chồi cây mới sẽ được hình thành trên cổ rễ phía trên của phần sẹo đã hình thành. Cây càng nhiều năm thì số lượng vòng sẹo cổ rễ càng nhiều (Hình 3.2). Đoạn cổ rễ của củ đẳng sâm to hay nhỏ, dài hay

ngắn tùy thuộc năm tuổi và sẹo trên vỏ rễ sẽ xuất hiện ở củ từ 2 năm tuổi trở lên. Sẹo vỏ rễ thường ở dạng đối diện, so le nhau và không theo qui luật. Trên mỗi vết sẹo có từ 3-5 sẹo chấm nhỏ là vết tích của chồi mọc năm trước lại tàn để lại và không theo qui luật.

*** Về bề mặt lát cắt ngang:** quan sát lát cắt củ đẳng sâm dưới kính hiển vi cho thấy bề mặt lát cắt ngang củ đẳng sâm tươi có các tia gỗ hình nan quạt (Hình 3.3), lõi giữa vàng đậm, phần nhu mô vàng nhạt. Phần trụ giữa (xylem) có hình tròn ở những năm đầu tiên, sau đó càng nhiều năm lõi giữa càng biến dạng, dần méo mó thành hình lục giác. Bề mặt lát cắt sấy khô có dạng nhẵn, có rãnh vòng tròn đồng tâm.

*** Về vòng tăng trưởng hàng năm:** Quan sát bằng kính hiển vi cho thấy vòng tăng trưởng hàng năm của củ đẳng sâm bao gồm các vòng màu đậm xen kẽ với những vòng màu sáng, xếp đồng tâm (Hình 3.5.b), một năm tuổi tương đương với một vòng sáng và một vòng màu tối. Vòng tăng trưởng nằm trong phần xylem không phải lúc nào cũng hình tròn mà hình dạng xylem biến đổi theo thời gian tăng trưởng (Hình 3.4).

*** Về kết quả soi bột và vi phẫu:** bột củ đẳng sâm có màu vàng nâu (hình 3.6.a), có mùi thơm và vị ngọt. Khi soi bột củ đẳng sâm có thể thấy các khối inulin dạng tinh thể (Hình 3.6.b). Hình ảnh vi phẫu củ đẳng sâm có các mảnh mô mềm, mạch cây, khối nhựa màu và mảnh bản (Hình 3.6.c).

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với một số mô tả hình thái chung chung của củ đẳng sâm Việt Nam được ghi trong ĐĐVN, V (2017) và trong Sách Đỏ Việt Nam (2007).

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy giữa đặc tính hình thái và cấu trúc mô có liên quan mật thiết với độ tuổi của củ đẳng sâm. Cụ thể:

- *Giai đoạn một năm tuổi: củ đẳng sâm chưa có vết sẹo trên vỏ rễ, vỏ rễ ngắn, màu trắng ngà, vỏ mỏng, nhìn trong mọng nước, củ chưa phân nhánh và có vị ngọt nhẹ. Khi giải phẫu mô thì phần xylem của củ đẳng sâm có dạng tròn, tia gỗ hình nan quạt chưa rõ.*

- *Giai đoạn hai năm tuổi: củ đẳng sâm có 2 vòng sẹo trên vỏ rễ, vỏ rễ ngắn, màu trắng ngà, vỏ hơi dày, nhìn không mọng nước, củ phân 2 phân nhánh và có vị ngọt nhẹ. Khi giải phẫu mô thì phần xylem của củ đẳng sâm có dạng tròn, tia gỗ hình nan quạt chưa đều, có 1 đến 2 tia gỗ ăn lan ra phần nhu mô vỏ.*

- Giai đoạn ba năm tuổi: củ đẳng sâm có 3 vòng sẹo trên cổ rễ, cổ rễ dài, màu trắng ngà, vỏ dày, cầm chắc tay, củ phân 3 phân nhánh. Hình dạng xylem bắt đầu méo lục giác, tia gỗ hình nan quạt thấy rõ, có 2-3 tia gỗ ăn lan ra phần nhu mô vỏ.

- Giai đoạn bốn năm tuổi: củ đẳng sâm có từ 4 vòng sẹo trên cổ rễ, cổ rễ dài, màu trắng ngà, vỏ dày, xù xì, cầm chắc tay, củ phân 4 phân nhánh. Hình dạng xylem méo lục giác, tia gỗ hình nan quạt thấy rõ, có 3-4 tia gỗ ăn lan ra phần ngoài nhu mô vỏ.

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy có thể dựa vào các đặc tính hình thái và mô học của củ đẳng sâm để xác định độ tuổi làm cơ sở cho việc thu mẫu củ đẳng sâm dùng làm nguyên liệu nghiên cứu.

3.1.1.2. Ảnh hưởng của độ tuổi đến kích thước đường kính của củ đẳng sâm

Lấy 1842 củ đẳng sâm với các độ tuổi khác nhau để đo kích thước đường kính củ nhằm đánh giá mức độ tương quan giữa độ tuổi và kích thước đường kính củ làm cơ sở cho quá trình xác định nhanh độ tuổi của củ đẳng sâm khi thu mẫu mọc tự nhiên. Kết quả đánh giá kích thước đường kính của 1842 củ đẳng sâm thuộc 4 độ tuổi khác nhau trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của độ tuổi đến kích thước đường kính củ đẳng sâm

STT	Năm tuổi (năm)	Số lượng mẫu đo (củ)	Đường kính trung bình (cm)
1	1	523	$0,64^d \pm 0,29$
2	2	548	$1,09^c \pm 0,19$
3	3	609	$1,66^b \pm 0,23$
4	4	162	$2,24^a \pm 0,30$

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau thì khác nhau ($p < 0,05$)

Từ kết quả ở bảng 3.1 cho thấy đường kính củ đẳng sâm có mối tương quan tỉ lệ thuận với số năm tuổi, đường kính củ càng lớn thì củ đẳng sâm càng nhiều năm tuổi. Kết quả đánh giá cũng cho thấy đường kính củ đẳng sâm tăng tỉ lệ thuận theo thời gian tăng trưởng. Cụ thể, củ một năm tuổi có đường kính nhỏ nhất, trung bình ($0,64 \pm 0,29$) cm, củ hai năm tuổi có đường kính trung bình là ($1,09 \pm 0,19$) cm, lớn gấp 1,70 lần củ một năm tuổi, củ năm thứ 3 có đường kính trung bình là: ($1,66 \pm 0,23$) cm, lớn gấp 2,59 lần củ một năm tuổi và lớn gấp 1,52 lần củ hai năm tuổi. Củ đẳng sâm 4 năm tuổi có kích cỡ lớn nhất và đạt mức: ($2,24 \pm 0,30$) cm, lớn gấp 3,50 lần củ một năm tuổi, lớn gấp 2,06 lần củ hai năm tuổi và lớn gấp 1,34 lần củ ba năm tuổi. Như vậy, đường kính

củ đẵn sâm gia tăng theo năm tuổi do quá trình sinh trưởng, tích lũy dưỡng chất. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về đường kính củ trung bình giữa các năm tuổi của củ đẵn sâm là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy giữa đường kính củ đẵn sâm và độ tuổi có mối liên quan với nhau và có thể dựa vào kích cỡ củ đẵn sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng để đánh giá độ tuổi của chúng khi thu mẫu.

3.1.1.3. Ảnh hưởng của độ tuổi đến tỉ lệ giữa đường kính xylem và phloem

Các nghiên cứu về giải phẫu mô thực vật dưới kính hiển vi quang học sẽ giúp hỗ trợ nhận dạng chính xác về độ tuổi của thực vật [158, 174]. Do vậy, luận án tiến hành cắt lát và phân tích cấu trúc của 783 lát cắt củ đẵn sâm ở các lứa tuổi từ 1- 4 năm (mỗi củ chỉ cắt một lát mỏng). Kết quả xác định tỷ lệ đường kính xylem/phloem được trình bày trong bảng 3.2.

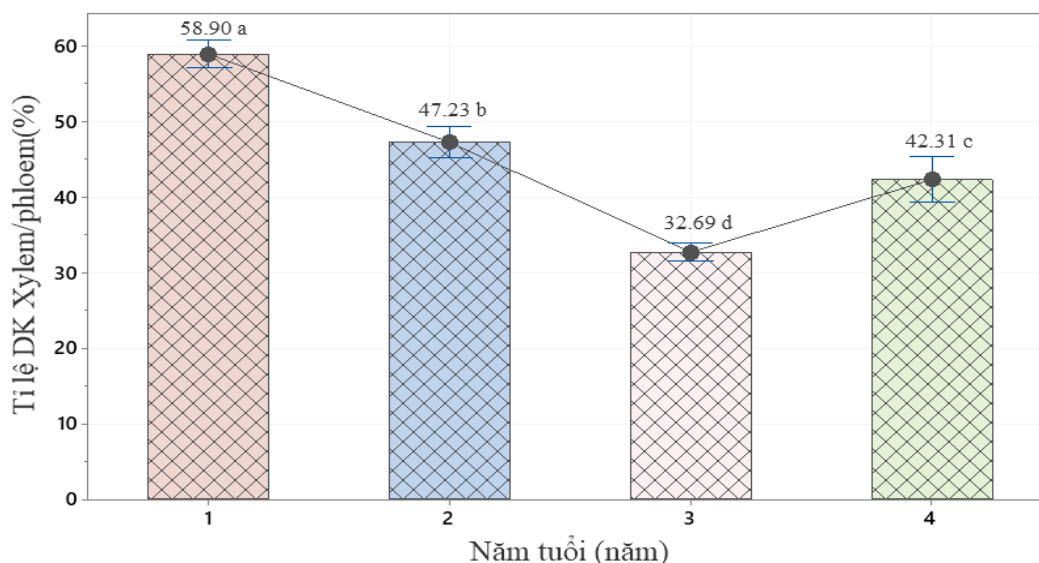
Bảng 3.2. Kết quả phân tích giải phẫu mô của củ đẵn sâm dưới kính hiển vi

STT	Năm tuổi (năm)	Số lát cắt (lát)	Đường kính xylem (mm)	Đường kính phloem (mm)	Tỉ lệ đường kính xylem/phloem (%)
1	1	251	2,7 ^d ±0,5	4,65 ^d ±0,74	58,90 ^a
2	2	220	3,6 ^c ±0,7	8,09 ^c ±2,14	47,23 ^b
3	3	198	5,0 ^b ±1,1	15,64 ^b ±2,60	32,69 ^d
4	4	114	7,7 ^a ±2,6	17,39 ^a ±2,56	42,31 ^c

Ghi chú: các chữ cái trong cùng cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Kết quả phân tích trình bày ở bảng 3.2 cho thấy đường kính xylem cũng thay đổi theo độ tuổi. Cụ thể, củ một năm tuổi có đường kính xylem trung bình nhỏ nhất và trong khoảng (2,7±0,5) mm. Khi củ được 2 năm tuổi thì đường kính xylem tăng lên (3,6±0,7) mm, lớn gấp 1,33 lần so với đường kính xylem của củ đẵn sâm một năm tuổi. Tới năm thứ 3 và năm thứ 4, đường kính xylem của củ đẵn sâm tăng lên và đạt mức trung bình (7,7±2,6) mm. Như vậy, phần xơ lõi (xylem) của củ đẵn sâm ngày càng gia tăng theo năm sinh trưởng. Tuy nhiên, khi đánh giá tỉ lệ xylem/phloem của củ đẵn sâm lại cho thấy tỉ lệ xylem/phloem của củ đẵn sâm không tuân theo qui luật tăng liên tục theo năm tuổi như trên. Cụ thể, vào năm thứ nhất, đường kính xylem chiếm 58,90% so với phần phloem, sang năm thứ hai đường kính xylem giảm xuống còn 47,23% so với phần phloem và đến năm thứ 3, đường kính xylem giảm xuống thấp nhất và chỉ bằng 32,69% so với phần phloem. Sau đó, vào năm thứ 4, đường kính xylem của củ đẵn sâm lại tăng

lên không nhiều và chiếm tới 42,31% so với phần phloem ($p < 0,05$). Kết quả này chứng tỏ vào năm thứ 3 phần xơ lõi (xylem) của củ đẳng sâm là ít nhất (Hình 3.7).



Hình 3.7. Sự thay đổi về tỷ lệ giữa xylem và phloem của củ đẳng sâm theo năm tuổi

Nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với lý thuyết về giải phẫu thực vật. Kundu và Brahma (2016) cho rằng giá trị phần trăm đường kính xylem so với phloem có thể khác nhau ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cây [87]. Chu và Cs (2018) cho rằng có thể giải phẫu mô củ của dược liệu và sử dụng các vòng sinh trưởng của củ để phát hiện độ tuổi của dược liệu. Tuy vậy, không phải tất cả các loại dược liệu đều có mô củ với vòng tăng trưởng rõ ràng (một số có thể có bó mạch bất thường hoặc vòng tăng trưởng không rõ ràng). Tác giả Chu (2018) cũng cho rằng năm tăng trưởng của các dược liệu thường có ảnh hưởng đến chất lượng của các hợp chất có giá trị sinh học có trong củ và chủ yếu ảnh hưởng đến hàm lượng của một số thành phần hoạt chất sử dụng làm dược liệu do có mối quan hệ giữa việc tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp và năm tăng trưởng của dược liệu [51].

Từ kết quả giải phẫu mô củ đẳng sâm cho thấy mẫu củ có các vòng tăng trưởng và có thể dựa vào cấu trúc giải phẫu mô củ để phân biệt độ tuổi của đẳng sâm.

3.1.2. Ảnh hưởng của độ tuổi đến thành phần các chất của củ đẳng sâm

Tiến hành phân tích định tính và định lượng một số nhóm chất hữu cơ có trong củ đẳng sâm 3 năm tuổi. Kết quả được trình bày ở bảng 3.3 và hình 3.8.

**Bảng 3.3. Kết quả phân tích định tính một số các nhóm chất hữu cơ có trong củ
đăng sâm 3 năm tuổi**

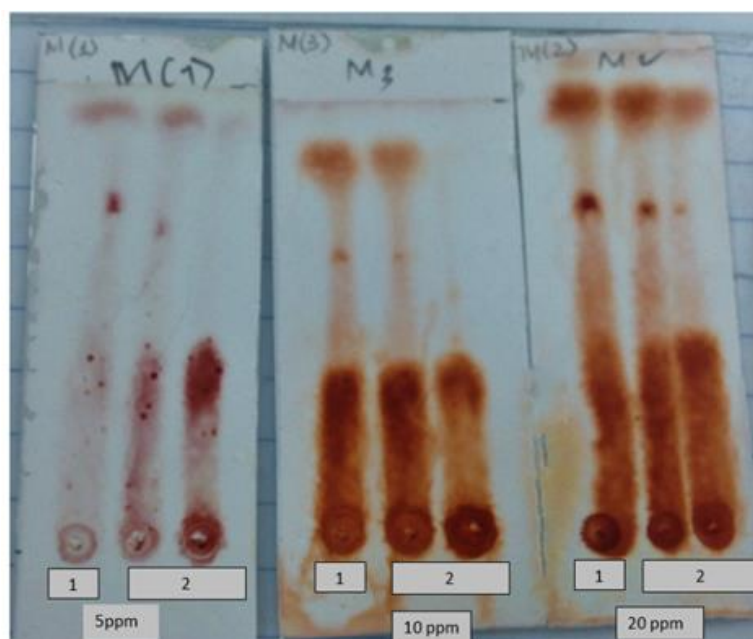
STT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận sơ bộ
1	Chất béo	Đề vết mờ trên giấy lọc	+	Có chất béo
2	Tinh dầu	Có mùi thơm	+	Có tinh dầu
3	Phytosterol	Phản ứng Salkowski	+	Có phytosterol
4	Carotenoid	H ₂ SO ₄ đặc	-	Không phát hiện có Carotenoid
5	Polyphenol	Phản ứng Ferric Chloride Test	+++	Có
6	Flavonoid	Phản ứng với kiềm NaOH 10%	++	Có Flavonoid
7	Coumarin	Phản ứng mở và đóng vòng lacton	++	Có Coumarin
		Soi huỳnh quang dưới đèn tử ngoại	+	
8	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	-	Chưa phát hiện có saponin
9	Acid hữu cơ	Na ₂ CO ₃	+	Có acid hữu cơ
		Đổi màu giấy quỳ	+++	
10	Acid amin	Thuốc thử Ninhydrin	+++	Có acid amin
11	Đường tự do	Thuốc thử Fehling	+	Có đường khử
12	Polysaccharide	Thuốc thử lugol	+++	Có polysaccharide
13	Inulin, fructan	Thuốc thử Resorcinol – Thiure	+++	Có Inulin, fructan R _f ngang với chuẩn Inulin (Merck).
		Lớp mỏng TLC	+++	
14	Alkaloid	Thuốc thử Mayer	++	Có alkaloid
		Thuốc thử Bouchardat	+++	
		Thuốc thử Dragendorff	++	
15	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	+	Có anthranoid
16	Tannin	Phản ứng với FeCl ₃	-	Chưa phát hiện có tannin

Ghi chú: - : phản ứng âm tính

+: phản ứng dương tính

++: phản ứng dương tính rõ

+++: phản ứng dương tính rất rõ

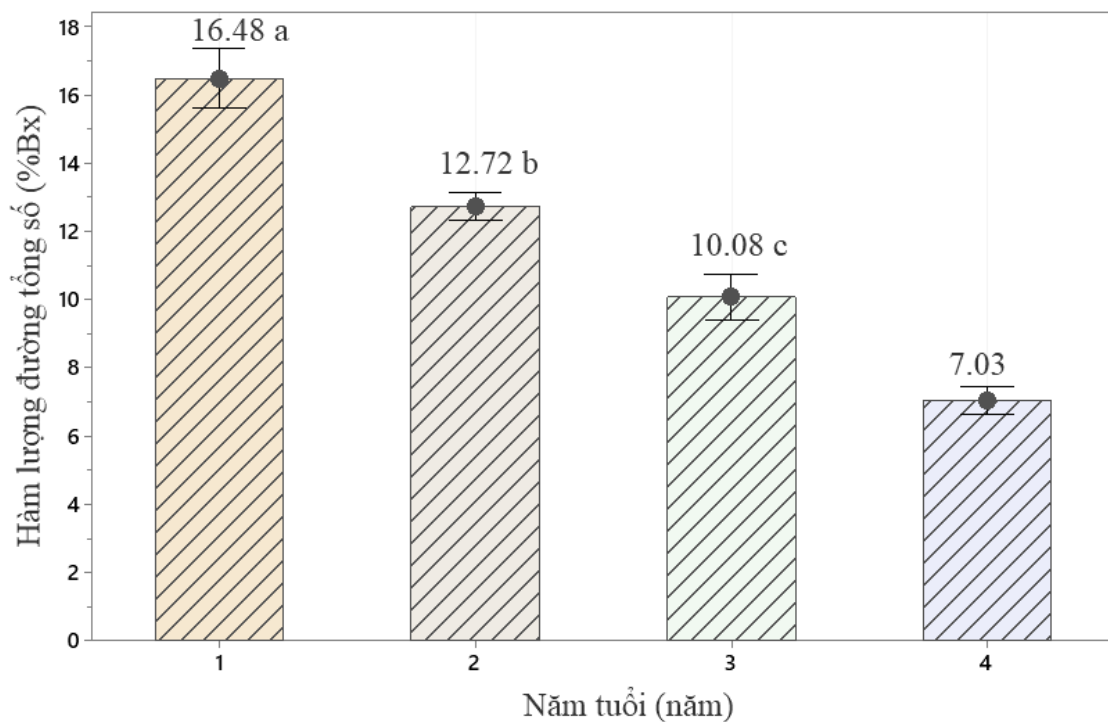


1. Inulin chuẩn của Merck ($R_f = 0,415$);
2. Mẫu bột củ đẳng sâm thô ở các nồng độ 5, 10, 20 ppm ($R_f = 0,411$).

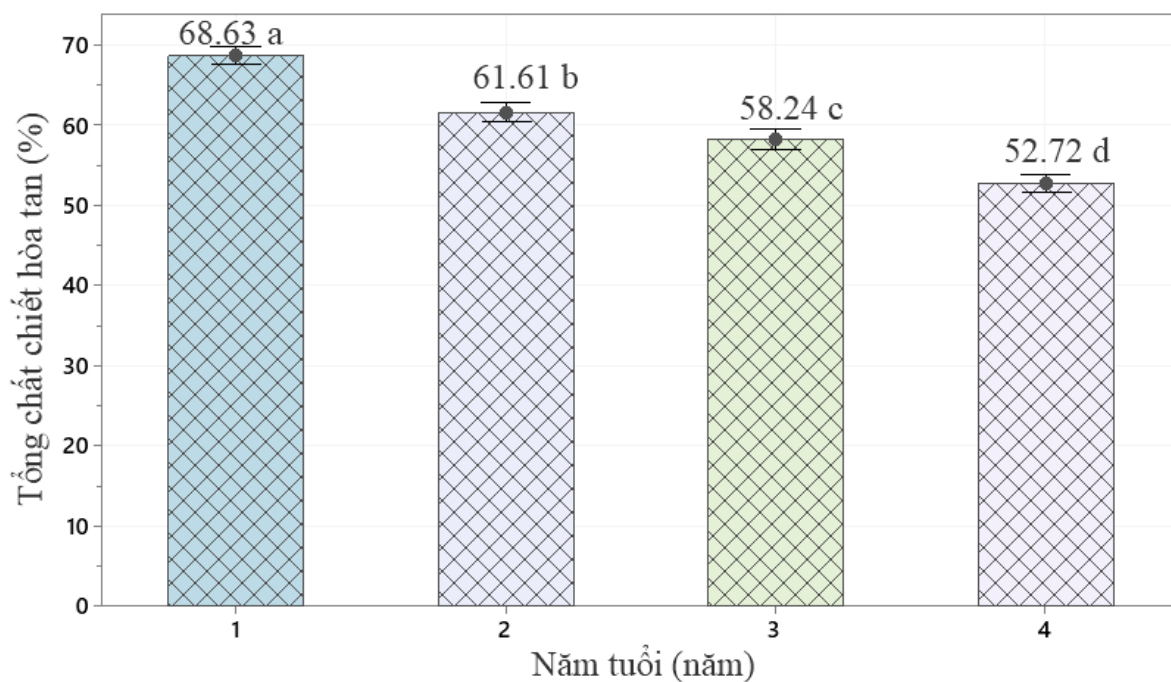
Hình 3.8. Sắc ký đồ bản mỏng silicagel dịch chiết inulin củ đẳng sâm 1, 2 và 3 năm tuổi với hệ dung môi chloroform: acid axetic: nước theo tỉ lệ 7:6:1

Từ kết quả định tính sơ bộ các nhóm chất có trong củ đẳng sâm bằng các phản ứng hoá học đặc trưng cho thấy củ đẳng sâm có chứa các nhóm chất flavonoid, acid hữu cơ, acid amin, polysaccharide alkaloid, tinh dầu, phytosterol, chất béo, coumarin, anthranoid, đường khử, ... Trong các nhóm chất có phản ứng định tính thì nhóm chất cho phản ứng rõ rệt nhất là polysaccharide, fructan, inulin và acid amin. Mặt khác, kết quả phản ứng định tính cũng cho thấy củ đẳng sâm chưa phát hiện có Carotenoid, saponin và tannin.

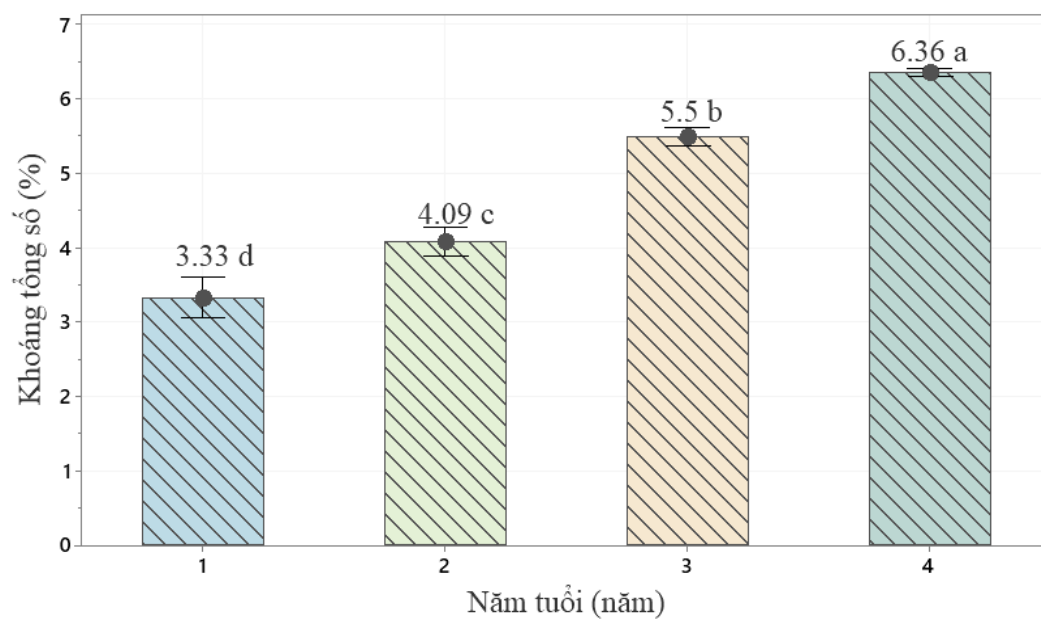
Kết quả định tính inulin trong củ đẳng sâm cho phản ứng màu vàng cam. Kết quả định tính inulin trong kết tủa thô bằng bản mỏng F₂₅₄ (Merck) (kích thước 3x7cm) trình bày ở hình 3.8 cho thấy có sự hiện diện inulin trong mẫu bột thô, hệ số R_f vạch inulin của mẫu bột thô tương đương với vạch chất chuẩn inulin (Merck). Kết quả này chứng tỏ trong củ đẳng sâm có chứa inulin. Theo qui định của WHO (1992), để quản lý chất lượng thảo dược, một số chỉ tiêu bắt buộc phải được xác định. Trên cơ sở định tính, luận án tiến hành lấy mẫu củ đẳng sâm các năm tuổi khác nhau để đánh giá một số thành phần có phản ứng định tính rõ rệt ở củ đẳng sâm như hàm lượng đường tổng số, hàm lượng inulin... Kết quả được trình bày ở các hình 3.9 ÷ 3.14 và các bảng 3.4 ÷ 3.5.



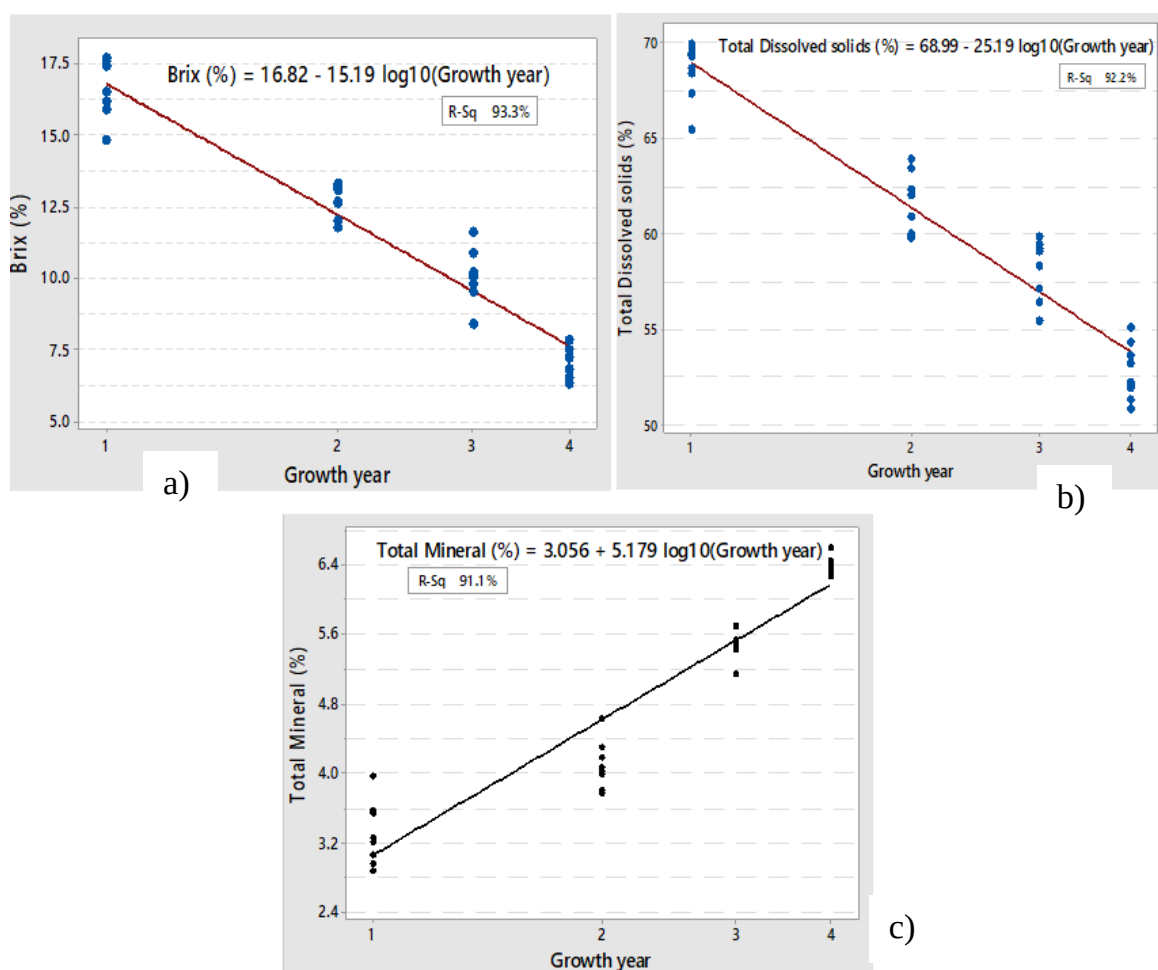
Hình 3.9. Sự thay đổi của hàm lượng đường tổng số ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi



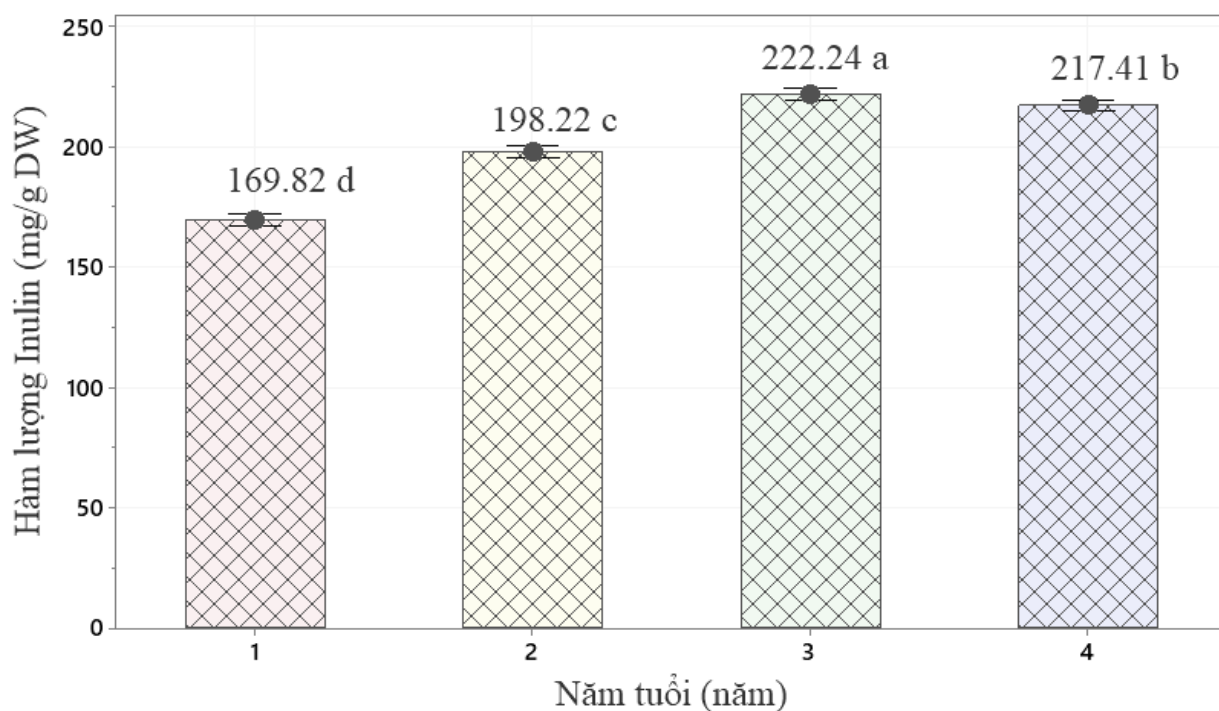
Hình 3.10. Sự thay đổi của tổng chất chiết hòa tan ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi



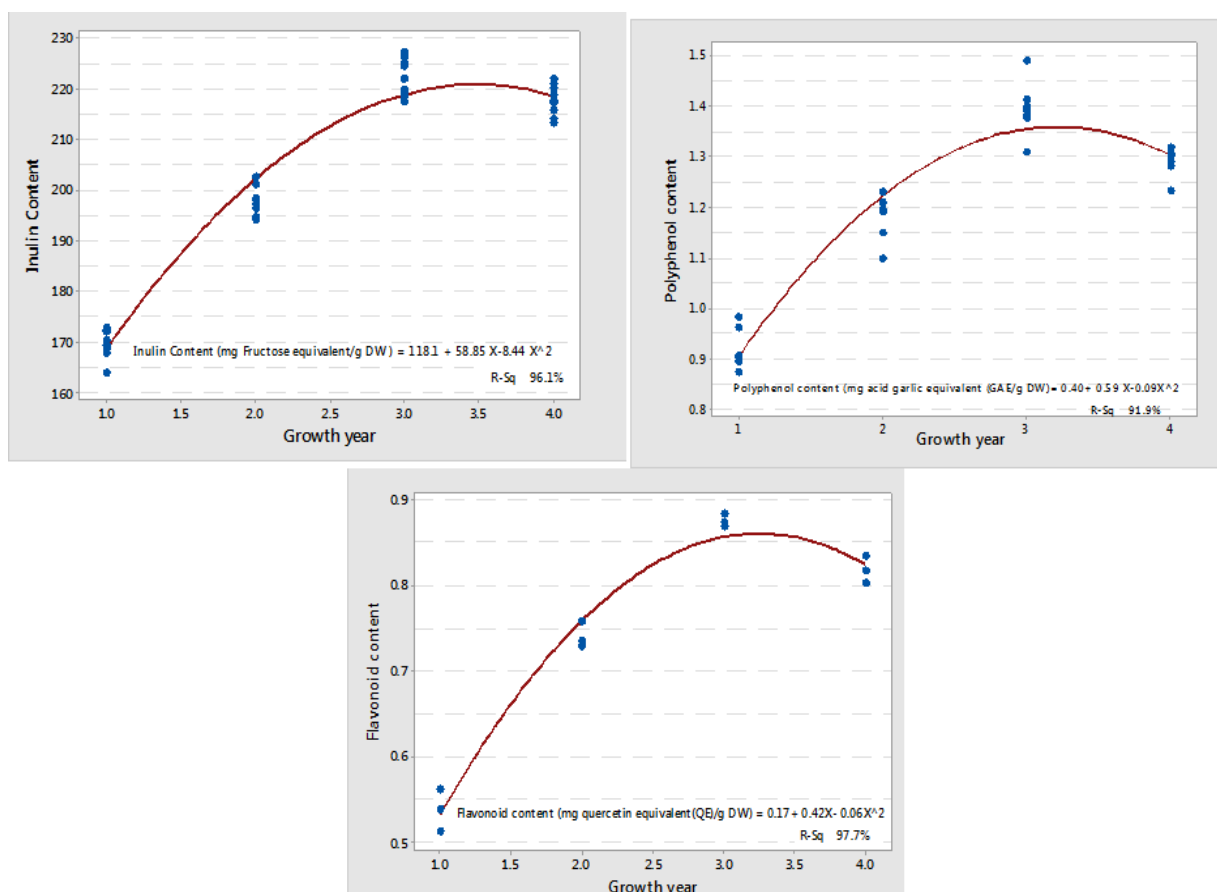
Hình 3.11. Sự thay đổi của hàm lượng tro tổng số ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi



Hình 3.12. Mô hình tương quan và hồi quy của đường (a), chất chiết hòa tan (b) và hàm lượng tro (c) ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi



Hình 3.13. Sự thay đổi của hàm lượng inulin ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng theo độ tuổi



ình 3.14. Mối tương quan giữa hàm lượng inulin (a), polyphenol (b) và flavonoid (c) theo độ tuổi

Bảng 3.4. Hàm lượng một số kim loại nặng và tạp chất vô cơ của củ đẳng sâm ở các độ tuổi khác nhau

STT	Chỉ tiêu	Năm tuổi			
		1	2	3	4
1	Tạp chất vô cơ (%)	KPH	KPH	KPH	KPH
2	Hàm lượng Pb (ppm)	KPH	KPH	KPH	KPH
3	Hàm lượng Cd (ppm)	KPH	KPH	KPH	KPH
4	Hàm lượng Hg (ppm)	KPH	KPH	KPH	KPH
5	Hàm lượng As (ppm)	KPH	KPH	KPH	KPH

Ghi chú: KPH: Không phát hiện

Bảng 3.5. Hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết củ đẳng sâm ở các độ tuổi khác nhau

Thành phần hoạt chất	Kết quả phân tích			
	Củ 1 tuổi	Củ 2 tuổi	Củ 3 tuổi	Củ 4 tuổi
Hàm lượng polyphenol (mg gallic acid /g khô)	09,2 ^d ± 0,04	1,18 ^c ± 0,05	1,39 ^a ± 0,055	1,29 ^b ±0,03
Hàm lượng flavanoide (mg quercetin /g khô)	0,54 ^d ± 0,02	0,74 ^c ± 0,015	0,87 ^a ± 0,007	0,82 ^b ±0,016
Hoạt tính khử ABTS (%)	4,62 ^c ± 0,26	10,78 ^b ± 0,93	15,65 ^a ± 1,98	9,7 ^b ± 0,45
Hoạt tính khử sắt (mg FeSO ₄ /g khô)	10,36 ^d ± 0,88	12,74 ^c ± 0,32	15,39 ^a ± 0,53	14,17 ^b ±0,34
Hoạt tính chống oxy hóa tổng (mg ascorbic acid/g khô)	10,99 ^d ± 0,95	15,76 ^c ± 0,85	23,64 ^a ± 0,57	18,93 ^b ± 0,1

Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa (p <0,05)

Từ các kết quả phân tích trình bày ở các bảng 3.4÷3.5 và các hình 3.9÷3.14 cho thấy:

*** Về hàm lượng đường tổng số**

Kết quả đánh giá hàm lượng đường tổng số của củ đẳng sâm trình bày ở hình 3.9 cho thấy hàm lượng đường tổng số của củ đẳng sâm xu hướng giảm dần theo thời gian tăng trưởng (p <0,05). Cụ thể, củ đẳng sâm một năm tuổi có hàm lượng đường tổng số là (16,48 ± 1,15) %. Trong khi đó, hàm lượng đường tổng số của củ đẳng sâm 2 năm tuổi là (12,72 ± 0,529) %, giảm 30 % so với năm thứ nhất. Hàm lượng đường tổng số của củ đẳng sâm 3 và 4 năm tuổi tương ứng là (10,08 ± 0,88) % và (7,03 ± 0,53)

%, giảm tương ứng 39% và 58% so với hàm lượng đường tổng số của củ đẳng sâm một năm tuổi.

Sự thay đổi của tổng lượng đường là một mô hình tuyến tính với đỉnh cực đại trong năm tăng trưởng đầu tiên ($R^2 > 0,9$). Tổng lượng đường và độ tuổi củ đẳng sâm (*C. javanica*) có mối tương quan tỷ lệ nghịch với nhau. Kết quả này do đặc tính sinh lý củ củ đẳng sâm, theo thời gian sinh trưởng quá trình già hóa dẫn đến quá trình hóa gỗ của xylem khi tỷ lệ cellulose trong cấu trúc củ tăng thì hàm lượng đường tổng số sẽ giảm. Đây chính là đặc điểm khác biệt của củ đẳng sâm so với nhân sâm (*Panax ginseng*).

*** Về hàm lượng chất chiết hòa tan**

Độ tuổi của củ đẳng sâm *C. javanica* cũng ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng chất chiết hòa tan có trong củ đẳng sâm ($p < 0,05$) với tương quan cao ($R^2 > 0,9$) (Hình 3.10) và cũng tuân theo quy luật tương tự như hàm lượng đường tổng số, nhưng mức độ giảm chậm hơn. Trong năm thứ nhất, năm thứ 2, năm thứ 3 và năm thứ 4, hàm lượng chất chiết hòa tan của củ đẳng sâm tương ứng là $(68,63 \pm 1,43)$ g/100g khô $(61,61 \pm 1,54)$ g/100g khô; $(58,24 \pm 1,57)$ g/100g khô và $(52,72 \pm 1,42)$ g/100g khô. Như vậy, năm thứ 2, 3 và 4, hàm lượng chất chiết hòa tan của củ đẳng sâm giảm tương ứng so với năm thứ nhất là 10,23 %, 15,14 % và 23,18 %. Hàm lượng chất chiết hòa tan là một tiêu chí đánh giá chất lượng của *C. javanica* [159] và theo quy định của Dược Điển VN,V (2017), để sử dụng làm thuốc hàm lượng chất chiết hòa tan của củ đẳng sâm không được thấp hơn 35 % trọng lượng khô [6].

*** Về hàm lượng tro tổng số**

Hàm lượng tro tổng số cũng bị ảnh hưởng bởi thời gian sinh trưởng của củ đẳng sâm *C. javanica* ($p < 0,05$) và hàm lượng tro có mối tương quan rất cao với thời gian sinh trưởng của củ đẳng sâm *C. javanica* ($R^2 > 0,9$) (Hình 3.11). Hàm lượng tro tích lũy ở củ đẳng sâm tăng theo độ tuổi. Cụ thể, năm đầu tiên của thời kỳ tăng trưởng, hàm lượng tro của củ đẳng sâm đạt được $(3,33 \pm 0,36)$ %, ở năm thứ 2, 3 và 4, hàm lượng tro của củ đẳng sâm đạt tương ứng $(4,09 \pm 0,26)$ %, $(5,50 \pm 0,17)$ % và $(6,36 \pm 0,09)$ %.

Theo qui định Dược Điển VN V, 2017 về hàm lượng tro tổng số của nguyên liệu củ đẳng sâm *Codonopsis javanica* không vượt quá 6% và tro không tan trong acid phải dưới 2,5%. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy hàm lượng tro của củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng từ năm thứ nhất đến năm thứ 3 đều có hàm lượng tro của củ dưới 6% nhưng đến năm thứ 4 thì hàm lượng tro tổng số của củ vượt

ngưỡng 6%. Như vậy nếu xét theo khía cạnh này thì củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng 4 năm tuổi không đạt quy định dùng làm nguyên liệu sản xuất dược. Kết quả phân tích cũng cho thấy củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng ở các độ tuổi đều không chứa tro không tan trong acid.

*** Về hàm lượng kim loại nặng và tạp chất vô cơ**

Kết quả phân tích kim loại nặng ở củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương, Lâm Đồng bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS (Bảng 3.4) cho thấy củ đẳng sâm không chứa các kim loại nặng (Hg; Pb; As; Cd) và tạp chất vô cơ.

*** Về hàm lượng inulin và fructan**

Kết quả phân tích hàm lượng inulin ở củ đẳng sâm (Hình 3.13) cho thấy trong khoảng từ 1÷3 năm tuổi, hàm lượng inulin của củ đẳng sâm tăng theo độ tuổi và đạt mức cao nhất ($222,24 \pm 3,54$) mg fructose tương đương/g khô khi củ đẳng sâm đạt 3 năm tuổi. Hàm lượng inulin của củ đẳng sâm thấp nhất khi củ 1 năm tuổi và chỉ đạt ($169,82 \pm 3,01$) mg fructose tương đương/g khô, bằng 76,41% hàm lượng inulin của củ đẳng sâm 3 năm tuổi. Khi củ đẳng sâm 4 năm tuổi hàm lượng inulin củ củ đẳng sâm giảm so với cực đại và chỉ đạt ($217,41 \pm 2,94$) mg fructose tương đương/g khô, chỉ bằng 97,83% hàm lượng inulin của củ đẳng sâm 3 năm tuổi. Phân tích mối tương quan giữa hàm lượng inulin và thời gian tăng trưởng của *C. javanica* cho thấy giữa hàm lượng inulin và thời gian tăng trưởng có mối tương quan chặt chẽ ($R^2 > 0,9$) và thay đổi theo mô hình cấp 2 với hàm lượng inulin đạt mức cực đại ở giai đoạn củ đẳng sâm đạt 3 năm tuổi (Hình 3.14 a) và tuân theo phương trình:

$$\text{Hàm lượng Inulin (mg fructose/g khô)} = 118,1 + 58,85X - 8,44X^2 \quad (R^2 0,96)$$

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với quy luận phát triển của thực vật đã được nhiều tác giả đề cập. Chẳng hạn, Lammers (2007) cho rằng thời gian tăng trưởng ảnh hưởng nhiều đến thành phần các chất của thực vật đặc biệt carbohydrate dự trữ (mà inulin là một carbohydrate dự trữ). Trong họ hoa chuông (*Campanulaceae*) inulin là nguồn dự trữ năng lượng thay thế cho tinh bột và sự tích lũy của chúng trong rễ các cây thuộc họ hoa chuông phụ thuộc vào thời gian sinh trưởng [90].

Khi so sánh về hàm lượng inulin của củ đẳng sâm với một số nguyên liệu khác được cho là giàu inulin như tỏi, măng tây, ... thì hàm lượng inulin trong củ đẳng sâm tự nhiên mọc ở Lạc Dương - Lâm Đồng cao hơn hẳn. Cụ thể, hàm lượng inulin trong tỏi (*Allium sativum*) là $9,0 \div 16,0$ g/100g; Củ hành tây (*Allium cepa*) là $1,1 \div 7,5$ g/100g;

Măng tây (*Asparagus officinalis*) là $2,0 \div 3,0$ g/100g. Tuy nhiên, hàm lượng inulin trong củ đấng sâm thấp hơn so với inulin trong củ diếp xoăn (*C. intybus*) là $35,7 \div 47,6$ (g/100g) tính trên 100g nguyên liệu thô [180].

Từ các phân tích ở trên cho thấy củ đấng sâm có thể coi là nguồn nguyên liệu tiềm năng giàu inulin và dựa vào hàm lượng inulin thì chỉ nên thu hoạch củ đấng sâm giai đoạn 3 năm tuổi.

*** Về hàm lượng polyphenol và Flavonoid**

Thời gian sinh trưởng của *C. javanica* cũng ảnh hưởng mạnh đến hàm lượng polyphenol trong củ đấng sâm ($p < 0,05$) và có xu hướng tăng theo thời gian sinh trưởng, đạt giá trị cao nhất trong giai đoạn củ đấng sâm được 3 năm tuổi, đạt $(1,39 \pm 0,06)$ mg acid gallic tương đương/g khô. Giai đoạn một năm tuổi, hàm lượng polyphenol trong củ đấng sâm đạt giá trị thấp nhất $(0,92 \pm 0,04)$ mg acid gallic tương đương/g khô. Trong năm tăng trưởng thứ 2 và thứ 4, hàm lượng polyphenol tương ứng đạt $(1,18 \pm 0,05)$ mg acid gallic tương đương /g khô và $(1,29 \pm 0,03)$ mg acid gallic tương đương /g khô (Bảng 3.5). Sự thay đổi hàm lượng polyphenol của củ đấng sâm theo độ tuổi tuân theo mô hình bậc 2 và đạt đỉnh cao nhất trong năm thứ 3. Mối tương quan giữa hàm lượng polyphenol và thời gian tăng trưởng ở củ đấng sâm ($R^2 > 0,90$) (Hình 3.14 b) được thể hiện bằng phương trình hồi qui sau đây:

$$\text{Hàm lượng Polyphenol (mg GAE/g khô)} = 0,4 + 0,59X - 0,09X^2 \quad (R^2 \ 0,92)$$

Tương tự như vậy, hàm lượng Flavonoid của củ đấng sâm cũng đạt giá trị cao nhất $(0,87 \pm 0,007)$ mg quercetin tương đương/g khô) khi củ đấng sâm 3 năm tuổi. Hàm lượng Flavonoid của củ đấng sâm 4, 2 và 1 năm tuổi chỉ bằng tương ứng 94,25%, 85,06% và 62,07% hàm lượng Flavonoid của củ đấng sâm 3 năm tuổi (Bảng 3.5). Sự thay đổi hàm lượng Flavonoid của củ đấng sâm cũng tuân theo mô hình bậc 2 và đạt đỉnh cao nhất trong năm thứ 3. Mối tương quan giữa hàm lượng Flavonoid và thời gian tăng trưởng (X: Năm tuổi) ở củ đấng sâm ($R^2 > 0,90$) (Hình 3.14 c) được thể hiện bằng phương trình hồi qui sau đây:

$$\text{Hàm lượng Flavonoid (mg QE/g khô)} = 0,17 + 0,42X - 0,06X^2 \quad (R^2 \ 0,98)$$

*** Về hoạt tính chống oxy hóa**

+ Hoạt tính chống oxy hóa tổng (TAC)

Hoạt tính chống oxy hóa tổng của dịch chiết củ đấng sâm *C. javanica* đạt mức cao

nhất ($23,64 \pm 0,57$) mg acid ascorbic tương đương/g khô khi củ đắng sâm 3 năm tuổi và giá trị thấp nhất ($10,99 \pm 0,95$) mg acid ascorbic tương đương/g khô khi củ đắng sâm một năm tuổi. Trong khi củ đắng sâm 2 và 4 năm tuổi thì hoạt tính chống oxy hóa tổng số chỉ bằng 80,76 % và 66,67 % so với hoạt tính chống oxy hóa tổng số của củ đắng sâm 3 năm tuổi (Bảng 3.5). Kết quả này được lý giải là các hoạt chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa như polyphenol và Flavonoid của củ đắng sâm đều đạt cao nhất khi củ đắng sâm được 3 năm tuổi. Vì thế hoạt tính chống oxy hóa tổng của củ đắng sâm cũng đạt giá trị cao nhất vào giai đoạn này.

+ Hoạt tính khử sắt (FR)

Tương tự như vậy, hoạt tính khử sắt của dịch chiết củ đắng sâm *C. javanica* cũng đạt mức cao nhất ($15,39 \pm 0,53$) mg FeSO₄ tương đương /g khô khi củ đắng sâm 3 năm tuổi. Hoạt tính khử sắt của dịch chiết củ đắng sâm *C. javanica* 1, 2 và 4 năm tuổi đều thấp hơn so với 3 năm tuổi và đạt tương ứng là ($10,36 \pm 0,88$) mg FeSO₄ tương đương /g khô tương đương, ($12,74 \pm 0,32$) mg FeSO₄ tương đương/g khô và ($14,17 \pm 0,34$) mg FeSO₄ tương đương/g khô (Bảng 3.5).

+ Hoạt tính khử ABTS

Tương tự như hoạt tính khử sắt, hoạt tính khử ABTS của dịch chiết củ đắng sâm *C. javanica* cũng đạt cực đại ($15,65 \pm 1,98$) % khi củ đắng sâm 3 năm tuổi. Hoạt tính khử ABTS của dịch chiết củ đắng sâm 1, 2 và 4 năm tuổi đều thấp hơn hoạt tính khử ABTS của dịch chiết củ đắng sâm 3 năm tuổi. Cụ thể, hoạt tính khử ABTS của dịch chiết củ đắng sâm 1, 2 và 4 năm tuổi đạt tương ứng ($4,62 \pm 0,26$) %, ($10,78 \pm 0,93$) % và ($9,7 \pm 0,45$) % (Bảng 3.5).

Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy thời gian tăng trưởng của củ đắng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng có ảnh hưởng mạnh đến sự tích lũy hàm lượng inulin, polyphenol, Flavonoid, đường tổng số và tro, cũng như hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính khử ABTS có trong dịch chiết của củ đắng sâm. Kết quả phân tích cũng cho thấy củ đắng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng có hàm lượng inulin, polyphenol, flavonoid, đường tổng số, hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính khử ABTS cao nhất khi củ đạt 3 năm tuổi. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy, củ đắng sâm mọc ở Lạc Dương không chứa kim loại nặng. Do vậy, luận án quyết định chọn củ đắng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng giai đoạn 3 năm

tuổi làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.

3.1.3. Đánh giá chất lượng của củ đẳng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng

Kết quả phân tích các chỉ tiêu được qui định cho nguyên liệu củ đẳng sâm theo Dược điển Việt Nam được trình bày qua bảng 3.6.

Bảng 3.6. Hàm lượng các chất của củ đẳng sâm theo năm tuổi

Chỉ tiêu	Quy định của dược điển VN	Độ tuổi (năm)			
		1	2	3	4
Độ ẩm (%)	<15	< 5	< 5	< 5	< 5
Tổng chất chiết hòa tan (%)	> 35	68,63 ^a ± 1,43	61,61 ^b ± 1,54	58,24 ^c ± 1,57	52,72 ^d ± 1,42
Tro toàn phần (%)	< 6	3,33 ^d ± 0,36	4,09 ^c ± 0,26	5,50 ^b ± 0,17	6,36 ^a ± 0,09
Hàm lượng inulin (mg/g)	Không qui định	169,82 ^d ± 3,01	198,22 ^c ± 3,19	222,24 ^a ± 3,54	217,41 ^b ± 2,94
Hàm lượng Polyphenol (mg/g)	Không qui định	0,92 ^d ± 0,04	1,18 ^c ± 0,05	1,39 ^a ± 0,055	1,29 ^b ± 0,03
Tro không tan trong acid (%)	< 2	-	-	-	-
Tạp chất vô cơ (%)	< 1	-	-	-	-
Hàm lượng kim loại nặng (ppm): Pb; Cd; Hg và As	< 20/10 ⁶	KPH	KPH	KPH	KPH

Các chữ cái khác nhau trong cùng một hàng thể hiện sự khác biệt đáng kể, $p < 0,05$

Ghi chú: * [6]; KPH: Không phát hiện; (+) Dương tính; (-) Âm tính

Từ kết quả phân tích ở bảng 3.6 cho thấy củ đẳng sâm 4 năm tuổi có hàm lượng tro tổng số là 6,36 % - vượt quy định (> 6 %) của Dược điển VN V (2017). Kết quả phân tích cũng cho thấy củ đẳng sâm ở các độ tuổi 1, 2 và 3 đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V, (2017). Kết quả phân tích giúp củng cố thêm khẳng định củ đẳng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng có hàm lượng inulin, polyphenol, flavonoid cao nhất khi củ đạt 3 năm tuổi. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy, củ đẳng sâm mọc ở Lạc Dương không chứa kim loại nặng.

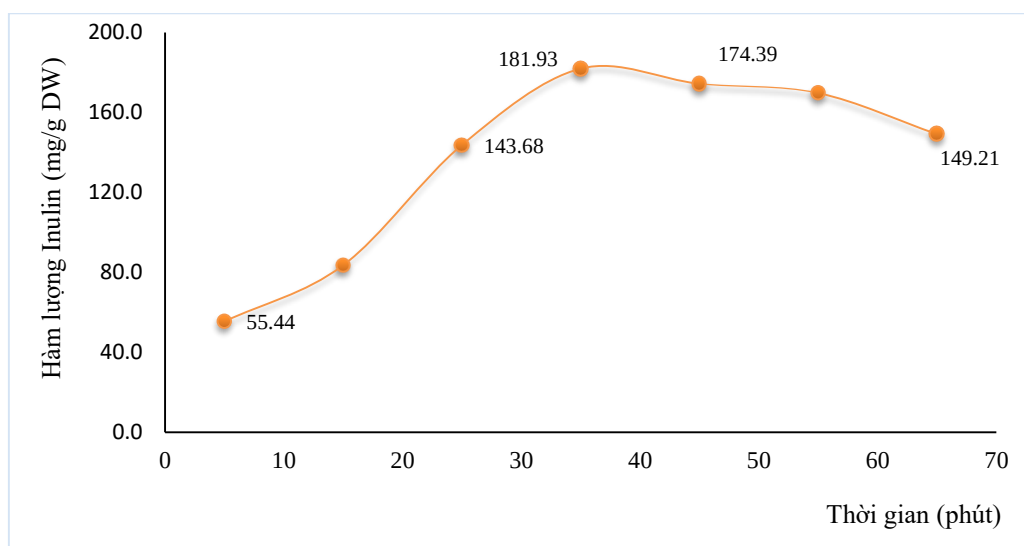
Do vậy, việc luận án quyết định chọn củ đẳng sâm mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng giai đoạn 3 năm tuổi làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu là hoàn toàn chính xác.

3.2. NGHIÊN CỨU TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT INULIN TỪ CỦ ĐẰNG SÂM TỰ NHIÊN MỘC TẠI LẠC DƯƠNG LÂM ĐỒNG

3.2.1. Xác định thông số biên cho quá trình tối ưu hóa công đoạn chiết inulin từ củ đặng sâm

3.2.1.1. Xác định khoảng thời gian chiết

Thời gian cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng quan trọng đến hàm lượng inulin chiết từ củ đặng sâm. Do vậy, luận án tiến hành chiết inulin từ củ đặng sâm với thời gian chiết thay đổi trong khoảng 5 ÷ 65 phút, tỉ lệ dung môi/nguyên liệu được cố định ở 40 ml/g và nhiệt độ chiết là 60°C. Kết thúc quá trình chiết, đánh giá hàm lượng inulin của dịch chiết. Kết quả trình bày ở hình 3.15.



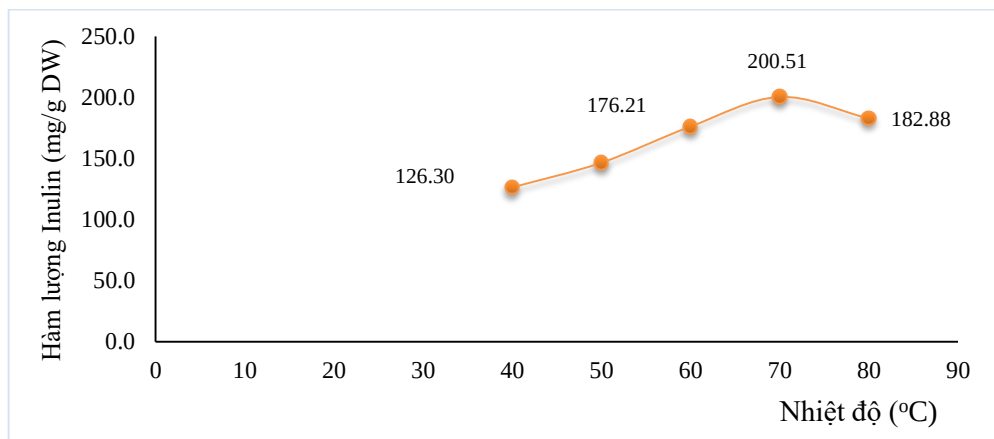
Hình 3.15. Ảnh hưởng của thời gian chiết đến hàm lượng inulin chiết từ củ đặng sâm

Phân tích trình bày ở hình 3.15 cho thấy trong khoảng thời gian chiết từ 5 phút đến 40 phút thì càng tăng thời gian chiết, hàm lượng inulin chiết từ củ đặng sâm cũng tăng theo và đạt mức cao nhất 181,93 mg/g khô khi thời gian chiết là 40 phút. Nếu tiếp tục tăng thời gian chiết lên 45 và 70 phút thì hàm lượng inulin thu được là 174,39 mg/g khô và 149,21mg/g khô, chỉ bằng tương ứng 95,86% và 82,02% so với hàm lượng inulin chiết từ củ đặng sâm trong thời gian chiết 40 phút. Như vậy, khi tăng thời gian trích ly inulin từ củ đặng sâm hơn 40 phút thì hàm lượng inulin chiết từ củ đặng sâm không tăng.

Từ các phân tích ở trên cho thấy khoảng thời gian thích hợp cho quá trình chiết inulin từ củ đặng sâm là 30÷50 phút và thời gian thích hợp cho quá trình chiết inulin từ củ đặng sâm là 40 phút.

3.2.1.2. Xác định khoảng nhiệt độ chiết

Tiến hành chiết inulin từ *C. javanica* nước cất 2 lần trong thời gian 40 phút với tỷ lệ thể tích nguyên liệu/dung môi là 1g/40 ml trong khoảng nhiệt độ 40÷70°C. Kết thúc thời gian chiết, xác định hàm lượng inulin. Kết quả trình bày ở hình 3.16.



Hình 3.16. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng inulin trong dịch chiết đẳng sâm

Kết quả phân tích ở hình 3.16 cho thấy nhiệt độ chiết có ảnh hưởng khá lớn đến hàm lượng inulin trong dịch chiết thu nhận từ củ đẳng sâm. Cụ thể, trong khoảng nhiệt độ chiết từ 40 ÷ 70°C, càng tăng nhiệt độ chiết thì hàm lượng inulin thu nhận càng tăng và đạt cực đại, đạt 200,51mg/g khô khi nhiệt độ chiết là 70°C. Hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi nhiệt độ 70°C cao gấp 1,59 lần hàm lượng inulin thu nhận được khi chiết ở nhiệt độ 30°C. Sau đó khi tăng nhiệt độ chiết trên 70°C thì hàm lượng inulin thu nhận có xu thế giảm và hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi nhiệt độ 80°C giảm chỉ bằng 91,21% hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi chiết ở nhiệt độ 70°C. Trong khi đó, hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi nhiệt độ 60°C bằng 87,88 % hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi chiết ở nhiệt độ 70°C và gần tương đương với hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi nhiệt độ 80°C. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự chênh lệch về hàm lượng inulin thu nhận từ củ đẳng sâm khi chiết ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng 40÷80°C là sự sai khác mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này có thể lý giải như sau: khi tăng nhiệt độ sẽ làm tăng hệ số khuếch tán dẫn đến chất tan dễ khuếch tán từ nguyên liệu vào dung môi làm cho quá trình chiết chất tan sẽ dễ dàng hơn. Tuy vậy, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ thì các chất tan thuộc nhóm inulin sẽ bị keo hóa làm giảm khả năng khuếch tán, từ đó làm giảm khả năng chiết inulin. Do vậy, khi tăng nhiệt độ chiết trong khoảng 40°C ÷ 70°C thì hàm

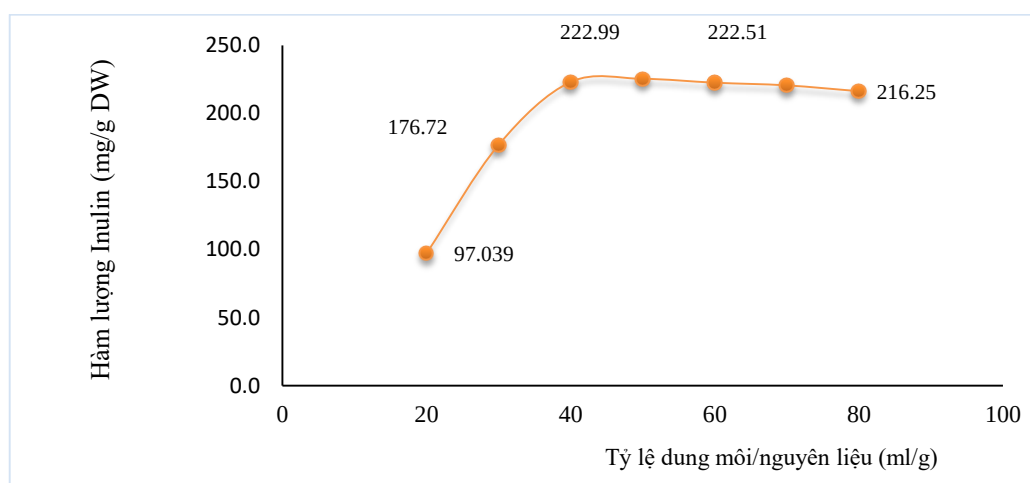
lượng inulin thu nhận từ củ đấng sâm sẽ tăng theo chiều tăng nhiệt độ nhưng khi nhiệt độ chiết trên 70°C thì hàm lượng inulin thu nhận từ củ đấng sâm sẽ giảm.

Từ các phân tích ở trên cho thấy khoảng nhiệt độ chiết thích hợp cho quá trình chiết inulin từ củ đấng sâm là 60°C ÷ 80°C và nhiệt độ thích hợp cho quá trình chiết inulin là 70°C.

3.2.1.3. Xác định khoảng tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu

Tiến hành chiết inulin từ củ đấng sâm 3 năm tuổi ở nhiệt độ chiết ở 70°C, trong thời gian 40 phút, tỉ lệ dung môi /nguyên liệu thay đổi trong khoảng 20÷80 ml/g. Đánh giá hàm lượng inulin của dịch chiết. Kết quả trình bày ở hình 3.17.

Kết quả phân tích hình 3.17 cho thấy khi tăng tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu trong khoảng 20 ml/g ÷ 40 ml/g thì hàm lượng inulin chiết từ củ đấng sâm cũng tăng theo chiều tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu và đạt cực đại 222,99 mg fructose tương đương khi tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 40 ml/g. Sau đó nếu tiếp tục tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu hơn 40 ml/g thì hàm lượng inulin chiết từ củ đấng sâm không tăng mà có xu hướng giảm. Ở tỉ lệ dung môi/nguyên liệu là 60 ml/g và 80 ml/g thì hàm lượng inulin chiết từ củ đấng sâm giảm, chỉ còn tương ứng 99,79% và 96,98% so với hàm lượng inulin cực đại chiết từ củ đấng sâm. Như vậy, trong quá trình chiết inulin từ củ đấng sâm, tăng tỷ lệ dung môi/nguyên liệu cao hơn 40 ml/g thì không làm tăng hàm lượng inulin thu nhận được.



Hình 3.17. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi đến hàm lượng inulin chiết từ củ đấng sâm

Từ các phân tích ở trên cho thấy khoảng tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp cho quá trình chiết inulin từ củ đấng sâm là 30÷60 ml/g và tỉ lệ dung môi/nguyên liệu thích hợp nhất cho quá trình chiết inulin là 40 ml/g.

3.2.2. Tối ưu hóa công đoạn chiết inulin từ củ đẳng sâm theo phương pháp Box-Benken

Luận án tiến hành nghiên cứu tối ưu hóa công đoạn chiết inulin từ củ đẳng sâm với mục tiêu để thu được đồng thời hàm lượng inulin, hàm lượng fructan và hàm lượng tổng chất chiết hòa tan cao nhất. Miền nghiên cứu của các yếu tố đầu vào quá trình chiết (nhiệt độ: X_1 , thời gian: X_2 và tỷ lệ DM/NL: X_3) xoay quanh điều kiện chiết phù hợp để tìm điều kiện chiết tối ưu với các hàm mục tiêu [hàm lượng inulin: Y_1 (mg fructose tương đương/g khô), hàm lượng fructan: Y_2 (mg fructose tương đương/g khô) và tổng hàm lượng chất chiết hòa tan: Y_3 (g/100 g khô)] đã được bố trí và thí nghiệm. Biến mã, biến thực và kết quả khảo sát thông số biến được thể hiện trong bảng 3.8 ÷ 3.9.

Bảng 3.7. Biến mã và các biến thực trong thí nghiệm tối ưu hóa

Biến độc lập đầu vào	Mức biến mã			Mức biến thực		
	-1	0	+1	-1	0	+1
Nhiệt độ (X_2) (°C)	-1	0	1	60	70	80
Thời gian (X_1) (phút)	-1	0	1	20	35	50
Tỉ lệ NL/DM (X_3) (g/ml)	-1	0	1	20	40	60

Bảng 3.8. Thiết kế thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken và kết quả

Ru n	X_1 (°C)	X_2 (phút)	X_3 (ml/g)	Y_1 (mg/g)		Y_2 (mg/g)		Y_3 (g/100g)	
				Thực nghiệm	Ước đoán	Thực nghiệm	Ước đoán	Thực nghiệm	Ước đoán
1	0	0	0	234,36	234,87	269,73	267,42	56,74	57,46
2	0	-1	1	184,22	184,73	197,17	197,82	48,92	50,02
3	0	0	0	234,15	234,87	269,83	267,42	57,50	57,46
4	-1	0	1	156,80	156,74	182,48	184,54	46,78	45,67
5	1	0	1	137,24	136,93	147,93	146,03	57,01	56,70
6	0	0	0	235,67	234,87	267,73	267,42	56,80	57,46
7	0	-1	-1	114,63	114,78	122,79	123,60	32,92	32,60
8	0	1	1	188,45	188,30	205,96	205,15	47,13	47,45
9	0	0	0	236,78	234,87	266,99	267,42	57,69	57,46
10	0	0	0	233,41	234,87	262,80	267,42	58,58	57,46

11	-1	0	-1	87,89	88,20	106,21	108,11	38,43	38,75
12	-1	1	0	118,15	118,35	146,99	145,75	41,37	42,16
13	0	1	-1	147,63	147,12	165,95	165,30	45,13	44,03
14	1	0	-1	94,28	94,34	110,44	108,38	41,67	42,78
15	1	1	0	107,85	108,30	103,85	106,56	54,82	54,82
16	-1	-1	0	97,64	97,18	103,88	101,17	42,86	42,86
17	1	-1	0	93,76	93,56	100,88	102,12	46,05	45,26

Dựa trên các thông số được tính toán, mối tương quan giữa các hàm mục tiêu, phân tích giá trị hồi qui của các dữ liệu thực nghiệm. Phương pháp đáp ứng bề mặt đưa ra kết quả phân tích ANOVA và phương trình hồi qui bậc 2 như sau:

+ Về hàm lượng inulin

Phân tích kết quả ở bảng 3.9. cho thấy quá trình tổ hợp các biến độc lập và dữ liệu thực nghiệm so với kết quả dự đoán thì hàm lượng Inulin chiết từ củ đẳng sâm dao động trong khoảng 87,89 mg/g đến 236,78 mg/g, với độ lệch chuẩn Std 1,10. Hệ số hồi qui của phương trình Y_1 có R^2 0,999 chỉ ra rằng chỉ có 0,01% tổng số biến thể không được mô hình giải thích. Giá trị của hệ số hồi qui điều chỉnh ($Adj-R^2$) 0,999 xác nhận rằng mô hình này rất có ý nghĩa ($p < 0,01$), đồng thời, giá trị của hệ số biến thể C_v (%) rất thấp (0,69 %) cho thấy mức độ chính xác và độ tin cậy của các giá trị thí nghiệm rất cao. Mô hình đủ để dự đoán trong phạm vi các biến thử nghiệm.

Phương trình hồi qui biểu diễn hàm lượng Inulin:

$$Y_1 = 234,87 - 3,42X_1 + 8,98X_2 + 27,78X_3 - 1,61X_1X_2 - 6,49X_1X_3 - 7,19X_2X_3 - 85,10X_1^2 - 45,42X_2^2 - 30,72X_3^2 \quad (1)$$

+ Về hàm lượng fructan

Hàm lượng fructan dao động trong khoảng từ 100,88 mg/g đến 269,83 mg/g, trung bình 178,33mg/g (Bảng 3.9); Giá trị Std 3,13 và CV 1,75 %. Hệ số hồi qui của phương trình Y_2 có R^2 0,999, giá trị hệ số hồi qui điều chỉnh (Adj - square) 0,997; xác nhận rằng mô hình này rất có ý nghĩa ($p < 0,01$), chỉ có 0,01% tổng số biến thể không được mô hình giải thích. Dữ liệu phân tích cũng chỉ ra hàm lượng fructan chiết được tuân theo mô hình bậc 2, phụ thuộc rất mạnh vào các yếu tố của quá trình chiết với xác suất ($p < 0,01$) và sự tương quan giữa các biến trong hàm mục tiêu có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Phương trình hồi qui biểu diễn hàm lượng fructan:

$$Y_2 = 267.42 - 9.56X_1 + 12.25X_2 + 28.52X_3 - 10.04X_1X_2 - 9.70X_1X_3 - 8.59X_2X_3 - 94.86X_1^2 - 58.66X_2^2 - 35.79X_3^2 \quad (2)$$

+ Về tổng chất chiết hòa tan

Kết quả quy hoạch thực nghiệm cho thấy tổng chất chiết hòa tan chiết từ củ đắng sâm dao động trong khoảng từ 32,92 g/100g đến 58,58 g/100g với Std 1,12; CV 2,30%. Phương trình Y_3 có R^2 0,991, giá trị của hệ số hồi qui điều chỉnh (Adj- R^2) 0,98. Điều này chứng minh rằng mô hình dự đoán phù hợp với thực nghiệm ($p < 0,01$) và sự tương quan rất mạnh giữa các biến độc lập của quá trình chiết (nhiệt độ, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu) với xác suất $p < 0,05$. Kết quả này chứng tỏ mức độ phân tán dữ liệu tập trung quanh đường chuẩn của các chất chiết được là rất cao.

Phương trình hồi qui biểu diễn hàm lượng tổng chất chiết hòa tan:

$$Y_3 = 57.46 + 3.76X_1 + 2.21X_2 + 5.21X_3 + 2.56X_1X_2 + 1.75X_1X_3 - 3.50X_2X_3 - 4.37X_1^2 - 6.82X_2^2 - 7.12X_3^2 \quad (3)$$

Các giá trị P được sử dụng như một công cụ để kiểm tra tầm quan trọng của từng hệ số tương quan, từ đó có thể chỉ ra sự các tương tác giữa các biến trong mô hình. Giá trị P càng nhỏ hệ số tương ứng càng có ý nghĩa. Kết quả trình bày ở bảng 3.10 cho thấy hàm lượng Inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan trong dịch chiết biến đổi theo mô hình bậc 2 và có sự tương tác mạnh giữa các thông số của quá trình chiết (nhiệt độ, thời gian chiết, tỷ lệ dung môi/nguyên liệu). Các hệ số tuyến tính (X_1 , X_2 , X_3), hệ số bậc hai (X_1^2 , X_2^2 , X_3^2) có ý nghĩa với giá trị p rất nhỏ ($p < 0,05$).

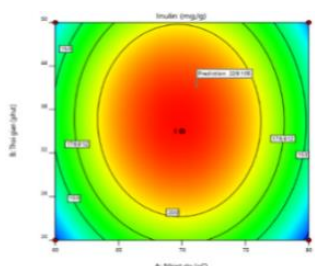
Bảng 3.9. Mật độ xác suất của các hàm mục tiêu

Mô hình	Hàm lượng Inulin (mg/g)		Hàm lượng fructan (mg/g)		Hàm lượng chất chiết hòa tan (g/100g)	
	F	P		P	F	P
	5009,12	< 0,0001	827,97	< 0,0001	88,50	< 0,0001
A	77,44	< 0,0001	74,77	< 0,0001	90,16	< 0,0001
B	534,37	< 0,0001	122,91	< 0,0001	31,16	0,0008
C	5116,70	< 0,0001	665,78	< 0,0001	172,85	< 0,0001
AB	8,54	0,0223	41,22	0,0004	20,94	0,0026

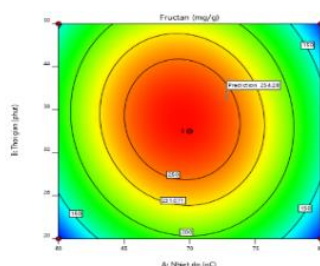
AC	139,41	$< 0,0001$	38,47	$0,0004$	9,72	$0,0169$
BC	171,42	$< 0,0001$	30,22	$0,0009$	38,98	$0,0004$
A ²	25264,66	$< 0,0001$	3876,79	$< 0,0001$	63,96	$< 0,0001$
B ²	7197,60	$< 0,0001$	1482,34	$< 0,0001$	155,68	$< 0,0001$
C ²	3291,30	$< 0,0001$	551,92	$< 0,0001$	169,81	$< 0,0001$

Như vậy, mô hình bậc 2 hoàn toàn phù hợp với lý thuyết và thực nghiệm với $p < 0,0001 < 0,05$ (Bảng 3.10). Các hệ số của mô hình có $p < 0,05$ nên chúng hoàn toàn có ý nghĩa về mặt thống kê và phù hợp với mô hình.

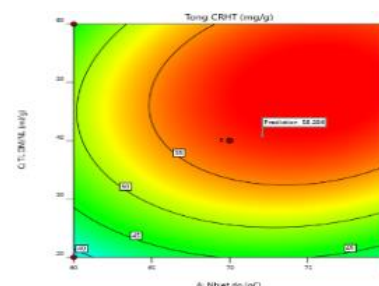
Mô hình hóa dưới dạng bề mặt đáp ứng 3D (Hình 3.19.) có bề mặt tương tác giữa các yếu tố nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đối với các hàm mục tiêu của quá trình chiết Y_1 , Y_2 , Y_3 thể hiện ở dạng bán cầu với đỉnh cực đại nằm trong miền nghiên cứu các yếu tố tác động. Thông qua mô hình 2D, 3D của 3 bề mặt đáp ứng cho thấy rằng có sự khác biệt rất nhiều giữa điểm tối ưu với các điểm khác trên mô hình nghiên cứu.



Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hiệu quả chiết Inulin.

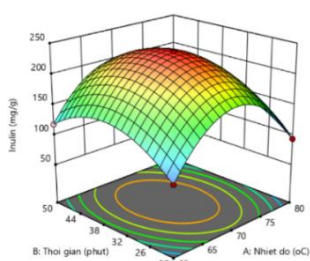


Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của thời gian và nhiệt độ đến hiệu quả chiết Fructan.

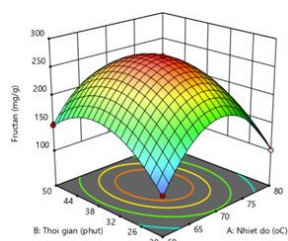


Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của nhiệt độ và tỉ lệ DM/NL đến hiệu quả chiết tổng chất chiết hòa tan.

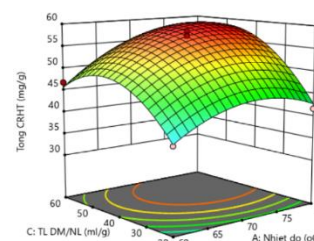
A. Mô hình 2D



Bề mặt đáp ứng của hàm lượng Inulin



Bề mặt đáp ứng của hàm lượng fructan



Bề mặt đáp ứng của hàm lượng tổng chất chiết hòa tan

B. Mô hình 3D

Hình 3. 18. Mô hình 2D, 3D bề mặt đáp ứng tiên đoán điểm tối ưu của các hàm mục tiêu dưới tác động của các yếu tố đầu vào

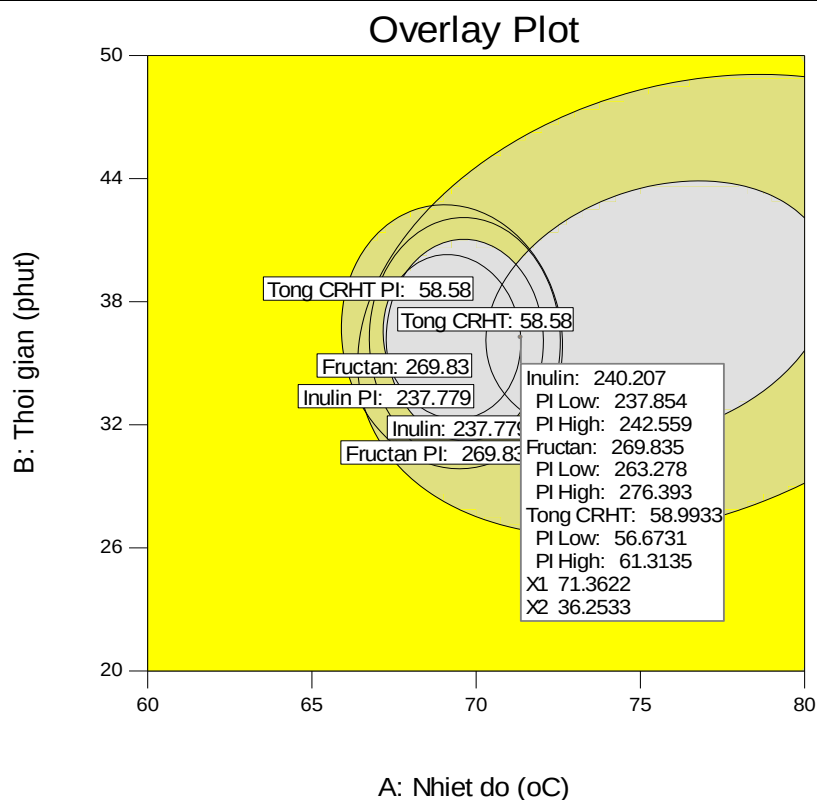
Không có yếu tố có điểm tối ưu ở điểm biên nghiên cứu. Đối với 3 bề mặt đáp ứng và các yếu tố như nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu đều có xu hướng đạt được điểm tối ưu ở gần điểm trung tâm (Hình 3.19).

* Phân tích tối ưu và trùng lặp bề mặt đáp ứng các hàm mục tiêu

Khi phân tích và tiến hành trùng lặp 3 bề mặt đáp ứng cho thấy mô hình đưa ra sự chọn lựa thích hợp nhất về các thông số tối ưu. Bảng 3.11 cho thấy giá trị ước đoán 97,7% và một lựa chọn thích hợp nhất.

Bảng 3.10. Kết quả dự đoán các thông số tối ưu

S T T	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ DM/NL (ml/g)	Hàm lượng inulin (mg/g)	Hàm lượng fructan (mg/g)	Tổng chất chiết hòa tan (g/100g)	Desirability	
1	<u>71,34</u>	<u>36,23</u>	<u>47,30</u>	<u>238,81</u>	<u>269,83</u>	<u>58,99</u>	<u>0,977</u>	Selected
2	71,35	36,12	47,37	238,82	269,83	58,99	0,977	
3	71,34	36,27	47,14	238,78	269,83	58,99	0,977	



Hình 3.19. Kết quả trùng lặp các mặt đáp ứng

Khi tiến hành trùng lặp bề mặt đáp ứng các hàm mục tiêu. Hình 3.20 cho biết hàm lượng inulin tối ưu của dịch chiết được dự đoán là 240,207mg/g khô và dao động trong

khoảng 237,85 mg/g khô ÷ 242,559 mg/g khô; Hàm lượng fructan của dịch chiết *C. javanica* tối ưu tương ứng 269,835 mg/g khô và dao động trong khoảng 263,278 mg/g khô ÷ 276,39 mg/g khô; Hàm lượng chất rắn hòa tan tối ưu 58,99g/100 g và dao động trong khoảng 56,67 g/100 ÷ 61,31 g/100 khô. Thông số tối ưu của công đoạn chiết được dự đoán ở nhiệt độ 71,36°C, thời gian chiết 36,25 phút và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 47,30ml/g (Hình 3.19÷ 3.20).

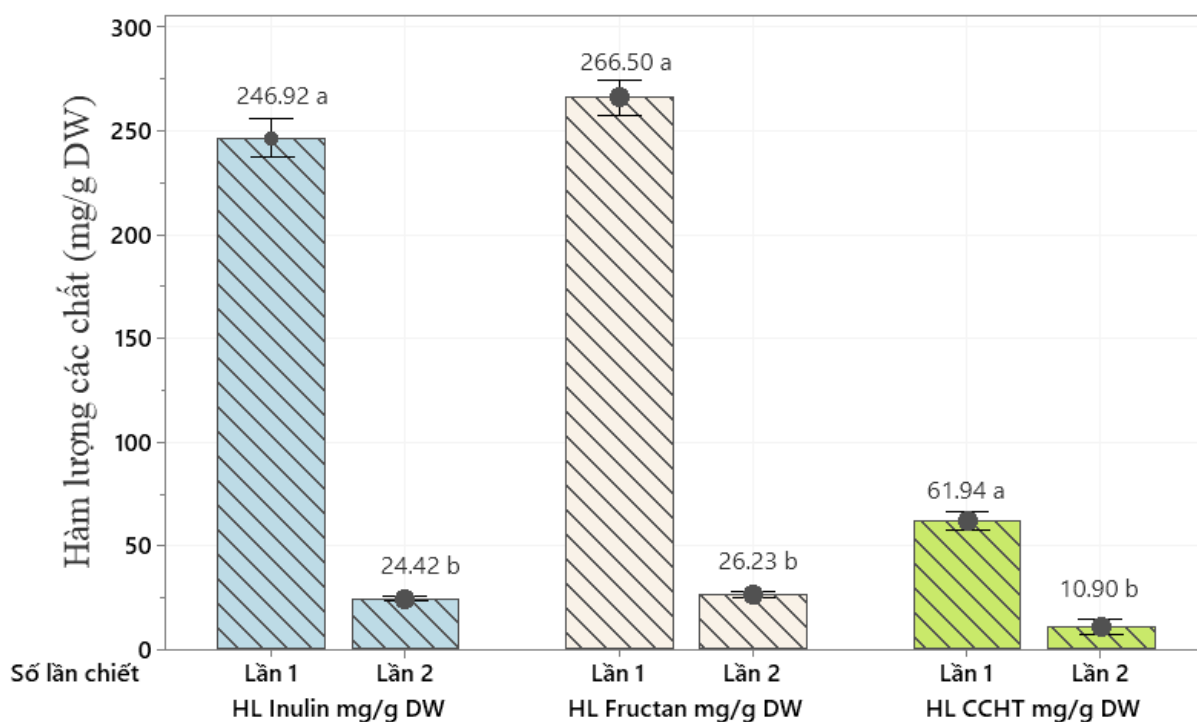
Thực nghiệm tại các điểm tối ưu cho thấy hàm lượng inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan cho kết quả thực nghiệm hoàn toàn phù hợp với những phân tích dự báo bằng phần mềm DE 12.0.

Kết quả thực nghiệm tại điểm tối ưu chỉ ra hàm lượng inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan của dịch chiết đạt tương ứng là (239,29±3,78) mg/g; (269,59±1,99) mg/g và (61,35 ±1,95) g/100g. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng có nét tương đồng với một số nghiên cứu chiết các chất polysaccharide ở dược thảo trước đây. Một số nghiên cứu trước đây cũng chỉ ra rằng nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu có ảnh hưởng lớn tới hàm lượng của dịch chiết thu được. Mỗi nguồn nguyên liệu khác nhau thì nhiệt độ, thời gian và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu chiết khác nhau. Ví dụ, thời gian chiết các polysaccharide từ *Codonopsis pilosula* là 44 phút, tỉ lệ nước/nguyên liệu là 56 ml/g và năng lượng cho siêu âm là 320W [96].

Từ các phân tích ở trên cho thấy điều kiện tối ưu cho công đoạn chiết inulin lần 1, fructan và các chất chiết hòa tan từ củ đấng sâm (C. javanica) là ở nhiệt độ 71°C, thời gian chiết 36 phút và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 47ml/g. Hiệu suất chiết inulin từ củ đấng sâm lần thứ nhất đạt 23,93%, fructan 26,96% và tổng chất chiết hòa tan đạt 61,35%.

***Xác định số lần chiết**

Tiến hành 3 mẫu thí nghiệm chiết Inulin từ củ đấng sâm *C. javanica* bằng nước cất ở điều kiện tối ưu để kiểm chứng quá trình tối ưu hóa. Các mẫu thí nghiệm chiết đều lặp lại 3 lần. Sau khi chiết thu dịch sẽ xác định hàm lượng inulin, fructan, tổng chất chiết hòa tan. Kết quả được trình bày ở hình 3.20.



Hình 3.20. Ảnh hưởng của số lần chiết đến hàm lượng Inulin, fructan và tổng chất chiết hòa tan của dịch chiết đẳng sâm

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.21 cho thấy khi chiết lần thứ nhất hàm lượng inulin chiết từ củ đẳng sâm đạt mức ($246,91 \pm 3,73$) mg fructose/g khô và khi chiết lại lần thứ 2 thì hàm lượng Inulin thu được chỉ là ($24,42 \pm 0,41$) mg fructose/g khô. So sánh với tổng hàm lượng Inulin thu được trong 2 lần chiết thì lần chiết thứ 1, hàm lượng Inulin chiếm 91% và lần chiết thứ 2 là 9%. Kết quả phân tích ở hình 3.21 cũng cho thấy hàm lượng fructan thu được trong lần chiết thứ nhất chiếm 91,2% và lần chiết thứ 2 chỉ chiếm 8,8%. Như vậy, lần chiết thứ nhất hàm lượng fructan cao gấp 10,34 lần hàm lượng fructan thu được trong lần chiết thứ 2 với $p < 0,05$.

Tương tự như trên, tổng hàm lượng chất chiết hòa tan trong cả 2 lần chiết là 71,84 mg/g khô trong đó lần thứ nhất là ($61,94 \pm 1,11$) mg/g khô chiếm 86,2 % cao gấp 6,25 lần hàm lượng chất chiết hòa tan chiết lần 2 từ củ đẳng sâm và lần thứ hai hàm lượng chất chiết hòa tan chiết được là ($9,9 \pm 1,42$) mg/g khô chiếm 13,8%. Sự khác biệt giữa 2 lần chiết rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Từ những phân tích ở trên cho thấy hàm lượng inulin, fructan, tổng chất chiết hòa tan của dịch chiết thu được lần 2 không đáng kể so với hàm lượng các chất trong dịch chiết lần 1. Do vậy, để đảm bảo tính kinh tế, luận án quyết định chỉ chiết các chất từ củ đẳng sâm 01 lần.

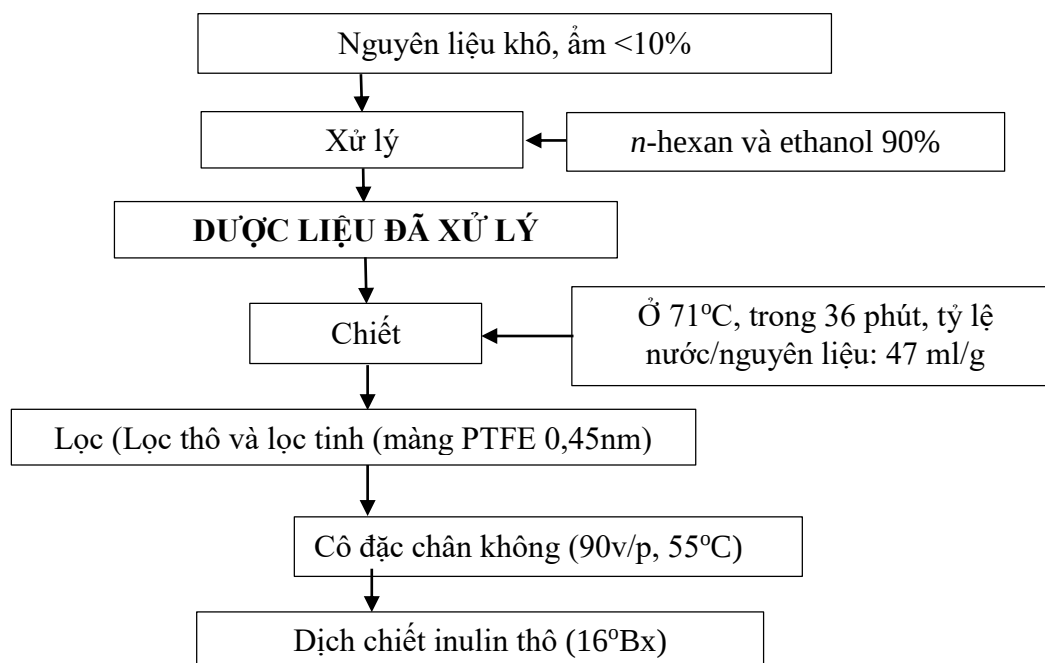
3.2.3. Đề xuất quy trình chiết inulin từ củ đẳng sâm

Từ các quá trình nghiên cứu ở trên cho phép đề xuất quy trình chiết inulin từ củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương, Lâm Đồng trình bày ở hình 3.18.

* Thuyết minh qui trình

+ **Nguyên liệu:** củ đẳng sâm tươi mọc tự nhiên tại Lạc Dương, Lâm Đồng. Sau thu hoạch, tiến hành phân loại và thu nhận củ đẳng sâm ba năm tuổi. Sau đó, củ đẳng sâm 3 năm tuổi được rửa sạch tạp chất, thái lát mỏng (1mm), sấy khô ở nhiệt độ $\leq 60^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt ẩm độ $<10\%$ và bao gói bằng bao bì PA hút chân không 100%, bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh để dùng làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.

+ **Xử lý nguyên liệu:** Mẫu dùng cho nghiên cứu được nghiền nhỏ $<1,25\text{mm}$ (dưới sàng rây) và tiến hành loại chất béo bằng *n*-hexan. Sau đó nguyên liệu tiếp tục được sấy khô ở nhiệt độ $<60^{\circ}\text{C}$ và xử lý bằng Ethanol 90% trong 15 phút theo hình thức chưng cất hồi lưu để loại các loại đường tự do, các chất màu, các acid amin và các chất tan trong cồn 90%. Các chất tan trong dung môi Ethanol 90% được dùng cho các nghiên cứu khác. Nguyên liệu sau khi xử lý sơ bộ được sấy khô ở nhiệt độ $\leq 60^{\circ}\text{C}$ và dùng làm nguyên liệu chiết inulin, fructan.



Hình 3.21. Quy trình chiết inulin từ củ đẳng sâm tự nhiên

+ **Chiết:** Quá trình chiết inulin và fructan được thực hiện bằng nước cất hai lần trong điều kiện có sự hỗ trợ của sóng siêu âm với tần số 37 KHz, ở nhiệt độ 71°C với tỉ lệ dung môi so với nguyên liệu 47 ml/gam trong 36 phút.

+ **Lọc:** Kết thúc quá trình chiết, tiến hành lọc thu dịch chiết bằng vải lọc, sau đó lọc bằng lưới lọc với kích cỡ 0,1mm và lọc qua màng siêu lọc PTFE 0,45nm để thu dịch lọc inulin, fructan.

+ **Cô đặc:** Cô đặc dịch lọc trong thiết bị cô quay chân không với tốc độ quay 90 vòng/phút ở 55°C cho đến dịch cô đặc đạt 16 °Bx thì dừng quá trình cô và thu dịch cô đặc để dùng cho quá trình tinh sạch inulin.

3.3. XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÔNG SỐ THÍCH HỢP CHO QUÁ TRÌNH KẾT TỦA INULIN TỪ DỊCH CHIẾT CỦ ĐẰNG SÂM

3.3.1. Xác định dung môi và nồng độ dung môi kết tủa inulin

Inulin và FOS (fructose oligosaccharide) là saccharide thuộc nhóm fructan. Inulin là dạng polyme, mạch thẳng có từ 11÷70 phân tử fructose và FOS là dạng oligosaccharide (fructose oligosaccharide), có 3÷10 phân tử fructose. Do vậy, để đánh giá xem dịch chiết củ đặng sâm ngoài inulin còn có các thành phần khác hay không, luận án tiến hành chiết inulin từ củ đặng sâm 3 năm tuổi theo quy trình đã đề xuất. Sau khi chiết, tiến hành kết tủa inulin bằng các dung môi khác nhau: acetone, ethanol, *n*-butanol, ethyl acetate, *n*-hexan ở hai nồng độ gây kết tủa là 80% và 90%. Để lắng kết tủa trong 24h ở nhiệt độ lạnh (6 ± 1)°C và tiến hành ly tâm lạnh 16°C, 13000 vòng/phút trong 16 phút để thu kết tủa inulin. Sấy khô kết tủa và đánh giá hàm lượng saccharide (HLSc) toàn phần (Gọi là saccharide toàn phần do FOS là oligosaccharide chứ không phải là polysaccharide), hàm lượng inulin và fructan (bao gồm inulin và FOS). Kết quả trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của dung môi và nồng độ dung môi đến hàm lượng saccharide toàn phần, inulin và fructan thu được sau kết tủa

Dung môi	Nồng độ 80%			Nồng độ 90%		
	Hàm lượng saccharide toàn phần (mg/g khô)	Hàm lượng inulin (mg/g khô)	Hiệu suất kết tủa Inulin (%)	Hàm lượng saccharide toàn phần (mg/g khô)	Hàm lượng fructan (mg/g khô)	Hiệu suất kết tủa fructan (%)
Aceton	244,92 ^a ± 5,28	232,92 ^a ± 5,02	95,10	312,43 ^a ± 12,73	301,81 ^a ± 12,30	96,60
Ethanol	233,07 ^a ± 4,97	222,66 ^a ± 5,09	95,53	294,08 ^a ± 6,51	278,90 ^b ± 2,16	94,84
Ethyl acetate	57,58 ^b ± 6,20	46,50 ^b ± 3,87	80,75	118,08 ^b ± 5,44	98,65 ^c ± 5,41	83,54
<i>n</i> -butanol	25,58 ^c ± 3,79	21,54 ^c ± 2,84	84,19	44,83 ^c ± 2,84	36,99 ^d ± 2,39	82,51
<i>n</i> -hexan	17,92 ^c ± 0,58	12,32 ^c ± 1,92	72,42	33,33 ^c ± 2,92	24,25 ^d ± 2,61	72,75

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì khác nhau (p<0,05)

Từ kết quả phân tích bảng 3.7 cho thấy:

*** Về hàm lượng saccharide tổng số**

Kết quả sử dụng các dung môi khác nhau ở nồng độ 80% và 90% để gây kết tủa saccharide từ dịch chiết nước củ gừng sâm cho thấy hàm lượng saccharide tổng số thu được phụ thuộc vào loại dung môi kết tủa và nồng độ dung môi sử dụng. Trong số các dung môi đã sử dụng ở nồng độ 80% thì aceton và ethanol là 2 dung môi cho phép kết tủa thu saccharide tổng số với hàm lượng cao nhất, đạt tương ứng là (244,92 ± 5,28) g/mg khô và (233,07 ± 4,97) mg/g khô. Kết quả thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng saccharide tổng số khi kết tủa bằng aceton và ethanol ở nồng độ 80% không có ý nghĩa thống kê (p<0,05), tức hàm lượng saccharide tổng số khi kết tủa bằng aceton và ethanol ở nồng độ 80% tương đương nhau. Trong khi đó, các dung môi có *n*-butanol, *n*-hexan và ethyl-acetate ở nồng độ 80% chỉ gây kết tủa saccharide trong dung dịch chiết củ gừng sâm với hàm lượng thấp hơn rất nhiều so với khi kết tủa bằng aceton và ethanol ở nồng độ 80%.

Khi kết tủa saccharide từ củ gừng sâm bằng dung môi hữu cơ ở nồng độ gây kết tủa 90% thì ngoài polysaccharide còn thu được các oligosaccharide nên hàm lượng saccharide tổng số tăng so với khi kết tủa ở nồng độ 80%. Kết quả kết tủa ở nồng độ 90% cũng cho thấy aceton và ethanol là 2 dung môi kết tủa saccharide với hàm lượng

cao nhất và tương đương nhau. Các dung môi *n*-butanol, *n*-hexan và ethyl-acetate ở nồng độ 90% gây kết tủa saccharide với hàm lượng thấp hơn rất nhiều so với khi kết tủa bằng acetone và ethanol ở nồng độ 90%. Như vậy nếu xét theo khía cạnh kết tủa thu saccharide thì các dung môi *n*-butanol, *n*-hexan và ethyl acetate không thích hợp cho mục tiêu kết tủa thu saccharide với hàm lượng cao.

*** Về hàm lượng inulin và fructan**

Kết quả kết tủa các chất chiết có trong dịch chiết củ đấng sâm trong nước bằng acetone và ethanol cho thấy ở nồng độ 80% acetone và ethanol sẽ gây kết tủa inulin với hàm lượng đạt mức cao nhất, tương ứng là $(232,92 \pm 5,02)$ mg/g khô và $(222,66 \pm 5,09)$ mg/g khô. Tuy vậy, kết quả đánh giá cũng cho thấy không có sự khác biệt về hàm lượng inulin kết tủa bằng acetone và ethanol ở nồng độ 80% ($p < 0,05$). Tương tự như trên, hàm lượng inulin thu được khi kết tủa bằng các dung môi có độ phân cực thấp như ethyl acetate, *n*-butanol và *n*-hexan ở nồng độ 80% rất thấp và thấp hơn rất nhiều hàm lượng inulin thu được khi kết tủa bằng acetone và ethanol ở nồng độ 80%.

Khi kết tủa dịch chiết củ đấng sâm bằng các dung môi khác nhau ở nồng độ 90% thì ngoài inulin còn thu được oligosaccharide - FOS (nên gọi chung là hàm lượng fructan tổng số). Kết quả kết tủa cho thấy ở nồng độ 90%, acetone và ethanol kết tủa fructan với hàm lượng lớn nhất, tương ứng với tác nhân acetone là $(301,81 \pm 12,30)$ mg/g khô và tác nhân ethanol là $(278,90 \pm 2,16)$ mg/g khô. Các dung môi *n*-butanol, *n*-hexan và ethyl acetate ở nồng độ 90% gây kết tủa fructan với hàm lượng thấp hơn rất nhiều so với hàm lượng fructan thu được khi kết tủa bằng acetone và ethanol ở nồng độ 90% ($p < 0,05$). Như vậy nếu xét theo khía cạnh kết tủa thu inulin và fructan với hàm lượng cao thì các dung môi *n*-butanol, *n*-hexan và ethyl acetate không thích hợp cho mục tiêu này.

*** Về hiệu suất kết tủa inulin và fructan**

Kết quả sử dụng các dung môi hữu cơ để kết tủa các chất có trong dịch chiết củ đấng sâm trong nước cho thấy inulin sẽ bị kết tủa ở nồng độ 80% và hiệu suất kết tủa đạt cao nhất 95,53% khi sử dụng ethanol và 95,10% khi sử dụng acetone. Các dung môi ethyl acetate, *n*-butanol và *n*-hexan khi sử dụng ở nồng độ gây kết tủa 80% thì hiệu suất kết tủa inulin chỉ đạt tương ứng 80,75 %, 84,19 % và 72,42 %. Như vậy, sử dụng các dung môi ethyl acetate, *n*-butanol và *n*-hexan ở nồng độ 80% để kết tủa inulin thì hiệu suất inulin của các dung môi hữu cơ trên luôn thấp hơn khi sử dụng ethanol và acetone.

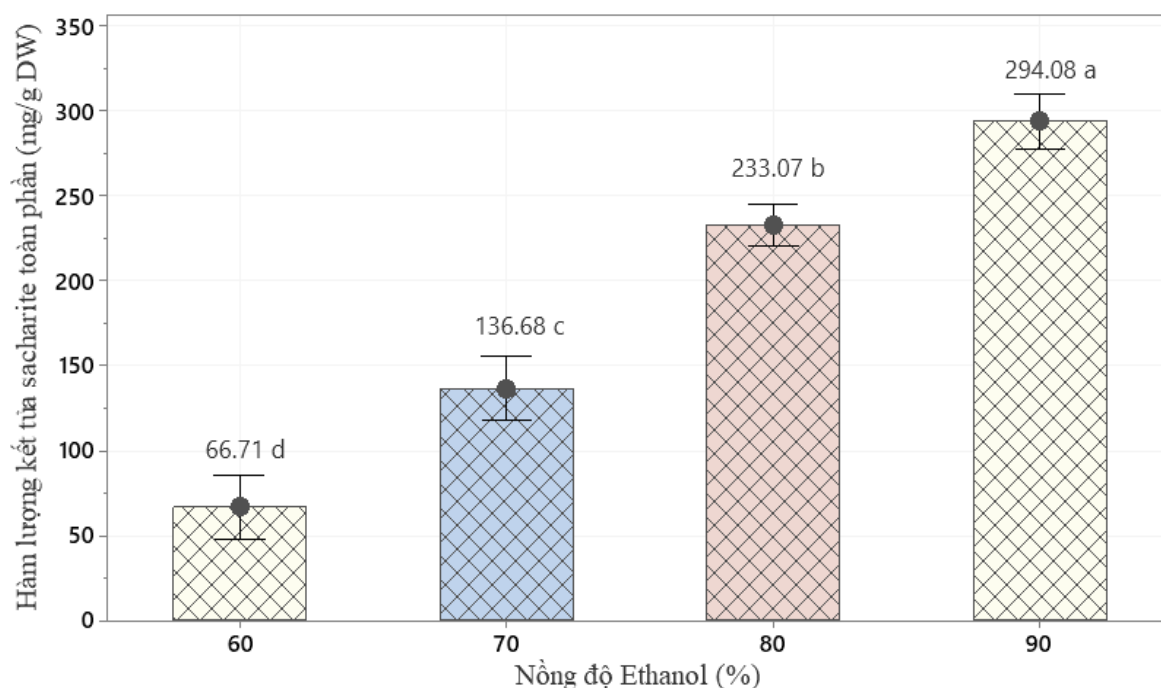
Trong khi đó, kết quả sử dụng dung môi hữu cơ để gây kết tủa các chất chiết từ củ đấng sâm trong nước cho thấy ở nồng độ 90 % sẽ thu được fructan (bao gồm inulin và FOS) với hiệu suất kết tủa đạt cao nhất, 96,60 % khi tác nhân kết tủa là aceton và 94,84 % khi tác nhân kết tủa là ethanol. Trái lại, ở nồng độ 90% các tác nhân kết tủa ethyl acetate, *n*-butanol và *n*-hexan gây kết tủa fructan với hiệu suất thấp hơn và chỉ đạt tương ứng 83,54 %, 82,51 % và 72,75 %. Như vậy, *n*-hexan tác nhân kết tủa fructan kém nhất.

Từ các phân tích ở trên cho thấy ethanol và aceton là 2 tác nhân gây kết tủa inulin, fructan và saccharide tổng số với hàm lượng cao nhất và tương đương nhau. Tuy vậy, aceton là dung môi độc và có giá thành cao hơn ethanol. Do vậy luận án quyết định chọn ethanol làm dung môi kết tủa inulin và fructan trong quá trình nghiên cứu sau này.

3.3.2. Xác định nồng độ ethanol

Saccharide có khối lượng phân tử khác nhau sẽ bị kết tủa bởi ethanol với nồng độ khác nhau. Vì vậy, luận án tiến hành kết tủa saccharide ra khỏi dịch chiết củ đấng sâm trong nước bằng ethanol với nồng độ thay đổi trong khoảng 60÷90%. Kết quả trình bày ở hình 3.22.

Kết quả phân tích trình bày ở hình 3.22 cho thấy nồng độ ethanol có ảnh hưởng khá lớn đến hàm lượng saccharide thu được sau kết tủa và nồng độ ethanol gây kết tủa càng cao thì hàm lượng saccharide thu được sau kết tủa càng lớn. Cụ thể, hàm lượng saccharide thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 80% và 90% tương ứng là 233,07 mg/g và 294,08 mg/khô. Như vậy, hàm lượng saccharide toàn phần thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 80% chỉ bằng 79,25% so với khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 90%. Trong khi đó, hàm lượng saccharide thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 70% là 136,68 mg/g, 46,48% so với hàm lượng saccharide thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 80% và 90%.



Hình 3.22. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến sự thay đổi hàm lượng saccharide thu được sau kết tủa

Hàm lượng saccharide thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 60% là 66,71 mg/g, bằng tương ứng 28,62% và 22,68% so với hàm lượng saccharide thu được khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 80% và 90%. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng kết tủa saccharide là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) có nghĩa là khi tăng nồng độ ethanol gây kết tủa thì hàm lượng saccharide thu được cũng tăng.

Kết quả trên có thể lý giải là do dung môi hữu cơ có hằng số điện môi thấp hơn nước nên khi cho dung môi hữu cơ vào các dung dịch chứa chất tan có bản chất saccharide thì dung môi hữu cơ sẽ làm giảm hằng số điện môi của dung dịch và cạnh tranh nước với chất tan. Vì thế, nồng độ dung môi hữu cơ càng lớn thì chất tan bị kết tủa càng nhiều. Các chất tan có trọng lượng phân tử lớn sẽ bị kết tủa trước và trong lượng phân tử nhỏ sẽ bị kết tủa sau. Theo Michell (2009) và Petkova (2015) thì các dung môi như methanol, ethanol và acetone có thể được sử dụng để kết tủa phân đoạn theo trọng lượng phân tử của các phân tử polyme [104]. Petkova (2015) cho rằng nồng độ ethanol là yếu tố quan trọng nhất quyết định hiệu suất kết tủa và thường người ta sử dụng ethanol ở nồng độ trong khoảng 70-80% để gây kết tủa saccharide. Mỗi loại saccharide sẽ bị kết tủa hoàn toàn bằng ethanol ở một nồng độ nhất định. Đặc điểm cấu trúc và kích thước phân tử khác nhau của saccharide cũng là yếu tố có ảnh hưởng quyết

định đến hàm lượng saccharide kết tủa bằng ethanol. Thông thường các saccharide có trọng lượng phân tử lớn như inulin sẽ bị kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 70÷80% và saccharide có trọng lượng phân tử nhỏ như FOS sẽ bị kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 90%. Do vậy, người ta có thể dựa vào đặc tính này để loại đường tự do, các chất màu, các saccharide có trọng lượng phân tử thấp, acid amin ra khỏi các saccharide tự nhiên và kết tủa phân đoạn thu riêng từng loại saccharide [118].

Từ những phân tích ở trên cho thấy ethanol nồng độ 80% và 90% là thích hợp cho kết tủa inulin và fructan

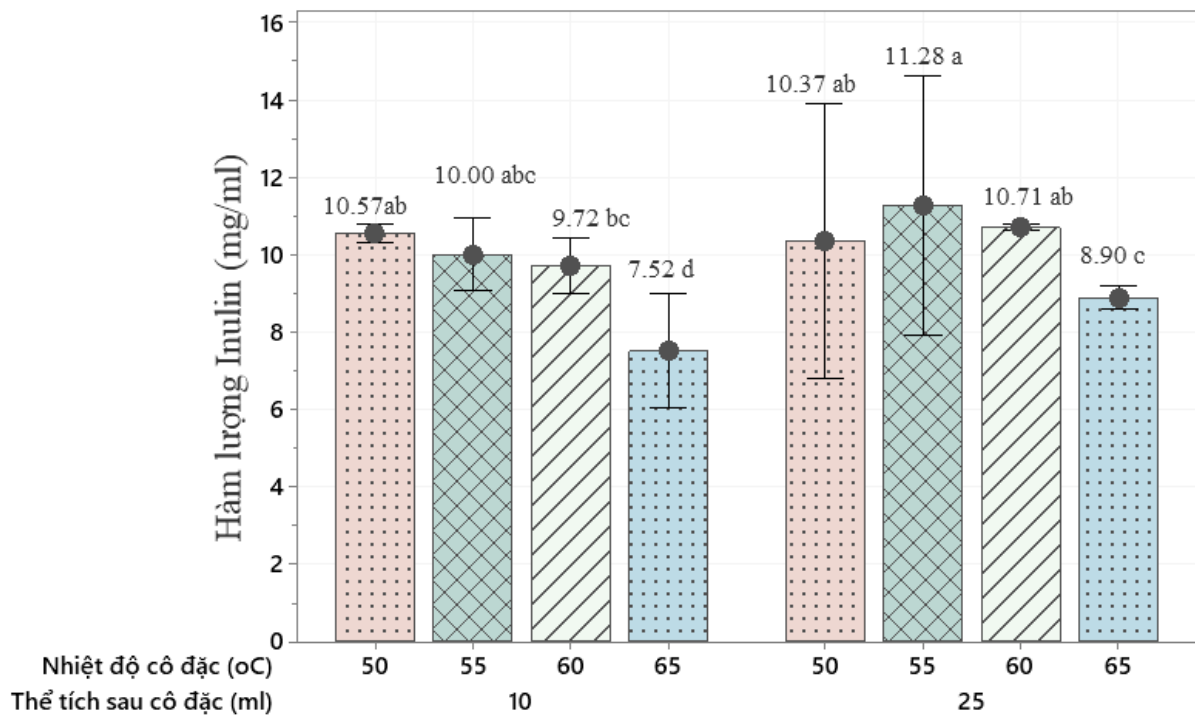
3.3.3. Xác định nhiệt độ cô đặc dịch chiết inulin từ đẳng sâm

Luận án tiến hành cô đặc dịch chiết inulin từ củ đẳng sâm nhằm giúp tiết kiệm dung môi kết tủa và tăng hiệu suất kết tủa. Quá trình cô đặc dịch chiết inulin thực hiện trong điều kiện cô quay chân không, ở tốc độ quay 90 vòng/phút với nhiệt độ cô khác nhau từ 50÷65°C. Sau khi cô đặc đánh giá hàm lượng inulin và fructan. Kết quả trình bày ở hình 3.23÷3.24.

Kết quả phân tích ở hình 3.23÷3.24 cho thấy:

*** Về hàm lượng inulin**

Kết quả phân tích ở hình 3.23 cho thấy nhiệt độ cô đặc có ảnh hưởng tới hàm lượng inulin có trong dịch cô đặc. Cụ thể, thực hiện quá trình cô 125 ml dịch chiết inulin xuống còn 25 ml trong khoảng thời gian 25 phút, ở nhiệt độ 50°C thì dịch cô đặc có hàm lượng inulin là $(10,37 \pm 1,4)$ mg/ml. Khi tăng nhiệt độ cô lên 55°C thì dịch cô đặc thu được có hàm lượng inulin đạt mức cao nhất, tương ứng là $(11,28 \pm 1,3)$ mg/ml. Tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 60°C thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc lại có xu thế giảm xuống chút ít và chỉ là $(10,71 \pm 0,03)$ mg/ml. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 65°C thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc có xu hướng giảm thấp nhất và chỉ còn $(8,90 \pm 0,12)$ mg/ml. Tuy vậy, kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt về hàm lượng inulin của dịch cô đặc ở nhiệt độ 55°C, 60°C và 65°C là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) tức nhiệt độ cô 55°C, 60°C và 65°C có ảnh hưởng tới hàm lượng inulin của dịch cô đặc khi cô từ 125ml thành 25ml. Mặt khác, kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng inulin của dịch cô đặc ở nhiệt độ 50°C và 55°C là sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa là cô đặc dịch chiết inulin từ củ đẳng sâm từ 125 ml thành 25 ml ở nhiệt độ 50°C và 55°C không làm thay đổi hàm lượng inulin của dịch cô đặc.



Hình 3.23. Ảnh hưởng của nhiệt độ cô đến hàm lượng inulin của dịch cô đặc

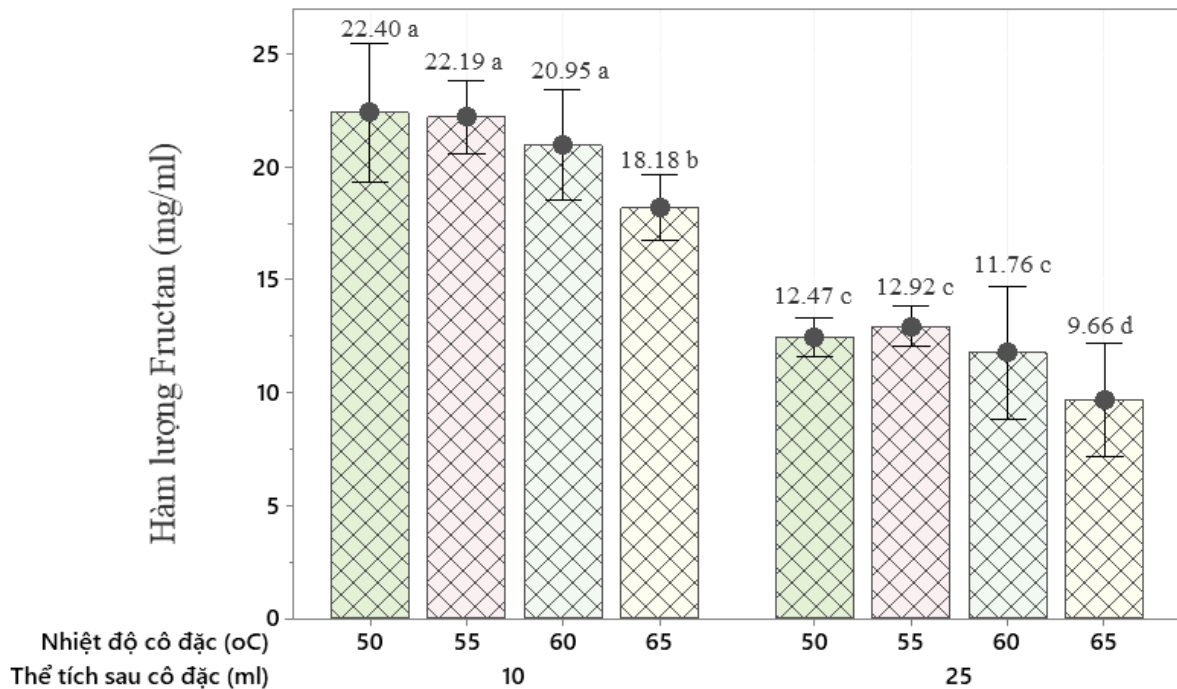
Từ các phân tích ở trên cho thấy khi cô đặc dịch chiết inulin củ đắng sâm từ 125ml xuống còn 25ml ở nhiệt độ 55°C thì hàm lượng inulin có trong dịch cô đặc cao hơn khi cô đặc ở nhiệt độ >55°C. Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình cô đặc dịch chiết inulin củ đắng sâm từ 125ml thành 25ml là 55°C.

Khi nghiên cứu cô đặc dịch chiết inulin từ 125ml thành 10ml trong thời gian 35 phút ở nhiệt độ cô trong khoảng 50°C÷65°C cho thấy khi tăng nhiệt độ cô từ 50°C lên 55°C thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc tăng và đạt cao nhất khi nhiệt độ cô là 55°C. Sau đó nếu tiếp tục tăng nhiệt độ cô trên 55°C thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc giảm theo chiều tăng của nhiệt độ và đạt mức thấp nhất ($7,52 \pm 0,6$) mg/ml khi nhiệt độ cô là 65°C. Tuy vậy, kết quả đánh giá thống kê lại cho thấy sự khác biệt về hàm lượng inulin của dịch cô đặc khi cô ở các nhiệt độ 50°C, 55°C và 60°C là sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê có nghĩa là khi cô dịch chiết inulin từ 125ml thành 10ml ở các nhiệt độ cô 50°C, 55°C và 60°C không ảnh hưởng tới hàm lượng inulin của dịch cô đặc. Kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng inulin của dịch cô đặc khi cô ở nhiệt độ 60°C và 65°C là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, có nghĩa là khi tăng nhiệt độ cô lên 65°C thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc sẽ giảm so với khi cô ở 60°C.

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy khi cô đặc dịch chiết inulin củ đắng sâm trong điều kiện chân không ở nhiệt độ $\leq 55^\circ\text{C}$ thì hàm lượng inulin của dịch cô đặc đạt

giá cao nhất. Do vậy, nhiệt độ này được lựa chọn để cô đặc dịch chiết inulin.

*** Về hàm lượng fructan**



Hình 3.24. Ảnh hưởng của nhiệt độ cô đến hàm lượng Fructan của dịch cô đặc

Kết quả phân tích ở hình 3.24 cho thấy cho thấy nhiệt độ cô đặc cũng có ảnh hưởng tới hàm lượng fructan có trong dịch cô đặc. Cụ thể, khi thực hiện quá trình cô 125 ml dịch chiết inulin thành 10 ml, ở nhiệt độ 50°C thì dịch cô đặc có hàm lượng fructan là $(22,40 \pm 1,24)$ mg/ml và khi tăng nhiệt độ cô lên 55°C thì dịch cô đặc thu được có hàm lượng fructan đạt mức $(22,19 \pm 0,56)$ mg/ml, gần tương ứng với hàm lượng fructan của dịch cô đặc ở 50°C. Tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 60°C thì hàm lượng fructan của dịch cô đặc giảm xuống chút ít và chỉ còn $(20,95 \pm 0,1)$ mg/ml. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 65°C thì hàm lượng fructan của dịch cô đặc có xu hướng giảm mạnh và chỉ còn $(18,18 \pm 0,59)$ mg/ml. Kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt về hàm lượng fructan của dịch cô đặc ở nhiệt độ 50°C và 55°C là sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê và không ảnh hưởng tới hàm lượng fructan của dịch cô đặc khi cô từ 125ml thành 10ml. Mặt khác, kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng fructan của dịch cô đặc ở nhiệt độ 55°C, 60°C và 65°C là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa là cô đặc dịch chiết fructan từ 125 ml thành 10 ml ở các nhiệt độ 55°C, 60°C và 65°C sẽ làm thay đổi hàm lượng fructan của dịch cô đặc.

Từ các phân tích ở trên cho thấy khi cô đặc dịch chiết fructan củ đắng sâm từ 125ml thành 10ml ở nhiệt độ 50°C và 55°C thì hàm lượng fructan có trong dịch cô đặc

cao hơn khi cô đặc ở nhiệt độ $> 55^{\circ}\text{C}$. Như vậy, nhiệt độ thích hợp cho quá trình cô đặc dịch chiết fructan củ đắng sâm từ 125ml thành 10ml là 55°C .

Kết quả phân tích còn cho thấy khi thực hiện quá trình cô 125 ml dịch chiết fructan thành 25 ml ở nhiệt độ 50°C thì dịch cô đặc có hàm lượng fructan là 12,4 mg/ml và khi tăng nhiệt độ cô lên 55°C thì dịch cô đặc thu được có hàm lượng fructan đạt mức cao nhất, tương ứng là 12,92mg/ml. Tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 60°C thì hàm lượng fructan của dịch cô đặc lại có xu thế giảm xuống chút ít và chỉ là 11,76 mg/ml. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ cô lên 65°C thì hàm lượng fructan của dịch cô đặc có xu hướng giảm thấp nhất và chỉ còn 9,66 mg/ml. Tuy vậy, kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt về hàm lượng fructan của dịch cô đặc ở nhiệt 55°C , 60°C và 65°C là sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) tức nhiệt độ cô 55°C , 60°C và 65°C có ảnh hưởng tới hàm lượng fructan của dịch cô đặc khi cô từ 125ml thành 25ml. Mặt khác kết quả phân tích thống kê cũng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng fructan của dịch cô đặc ở nhiệt độ 50°C và 55°C là sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này có nghĩa là cô đặc dịch chiết fructan củ đắng sâm từ 125ml thành 25ml ở nhiệt độ 50°C và 55°C không làm thay đổi hàm lượng fructan của dịch cô đặc.

Các phân tích ở trên cho thấy nhiệt độ cô đặc để bảo tồn hàm lượng inulin và fructan tốt nhất là ở 55°C và được chọn lựa để cô đặc dịch chiết cho những nghiên cứu tiếp theo.

3.3.4. Xác định nhiệt độ kết tủa inulin từ dịch chiết

Do bản chất inulin là chất tan trong nước nóng và bị kết tủa ở nhiệt độ thấp nên khi để dịch chiết chứa inulin và fructan ở nhiệt độ thấp, inulin và fructan có thể tự kết tủa trong nước. Để xác định nhiệt độ kết tủa, luận án tiến hành 3 mẫu thí nghiệm kết tủa inulin và fructan có trong dịch chiết bằng ethanol ở nồng độ gây kết tủa 80% và 90% và tự kết tủa saccharide ở nhiệt độ thấp. Quá trình kết tủa được thực hiện ở nhiệt độ $(6 \pm 1)^{\circ}\text{C}$; $-(11 \pm 1)^{\circ}\text{C}$; $-(17 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Kết quả trình bày qua bảng 3.12.

Kết quả bảng 3.12 cho thấy khi để dịch chiết ở nhiệt độ càng thấp thì hàm lượng saccharide kết tủa càng nhiều. Cụ thể, ở $-(17 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ hàm lượng saccharide thu đạt mức cao nhất $(86,23 \pm 1,66)$ mg/g. Trong khi đó, nếu để dịch chiết ở nhiệt độ $-(11 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ và $(6 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ thì hàm lượng saccharide tự kết tủa thu được giảm xuống và chỉ còn tương ứng là $(36,98 \pm 2,43)$ mg/g và $(22,33 \pm 2,04)$ mg/g. Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy khi để tự kết tủa trong lạnh thì hàm lượng saccharide thu được thấp hơn rất nhiều khi kết tủa bằng ethanol ở nồng độ 80% và 90%.

Bảng 3.12. Kết quả kết tủa inulin và fructan ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ (°C)	Mẫu tự kết tủa	Nồng độ dung môi Ethanol			
		80%		90%	
	Hàm lượng saccharide (mg/g khô)	Hàm lượng inulin (mg/g khô)	Hiệu suất (%)	Hàm lượng fructan (mg/g khô)	Hiệu suất (%)
(6±1)	22,33 ^c ±2,04	222,66 ^a ± 5,09	95,53	278,90 ^a ±2,16	94,84
- (11±1)	36,98 ^b ±2,43	224,19 ^a ± 8,71	96,19	279,67 ^a ± 4,80	95,10
- (17±1)	86,23 ^a ±1,66	224,21 ^a ± 5,38	96,20	279,73 ^a ±6.16	95,12

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thì khác nhau ($p < 0,05$)

Mặt khác, kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi kết tủa inulin bằng cồn ở nồng độ gây kết tủa 80% thì hàm lượng thu inulin thu được ở cả 3 ngưỡng nhiệt độ $-(17 \pm 1)^\circ\text{C}$, $-(11 \pm 1)^\circ\text{C}$ và $(6 \pm 1)^\circ\text{C}$ không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê, tức nhiệt độ không ảnh hưởng tới hàm lượng kết tủa và hàm lượng inulin kết tủa thu được trong khoảng $(222,66 \div 224,21)$ mg/g khô với hiệu suất kết tủa khoảng $(95,53 \div 96,20)$ %. Trong khi đó, kết tủa fructan bằng cồn ở nồng độ gây kết tủa 90% thì hàm lượng fructan thu được ở cả 3 ngưỡng nhiệt không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê và hàm lượng fructan kết tủa thu được trong khoảng $278,90 \div 279,73$ mg/g khô với hiệu suất kết tủa vào khoảng $(94,84 \div 95,12)$ %.

Như vậy, quá trình kết tủa inulin và fructan bằng ethanol thì nhiệt độ không có ảnh hưởng tới hàm lượng inulin và fructan thu được sau kết tủa. Do vậy, để tiết kiệm chi phí nên kết tủa inulin và fructan bằng ethanol ở nhiệt độ $(6 \pm 1)^\circ\text{C}$. Mặt khác, khi kết tủa bằng ethanol thì hàm lượng inulin và fructan thu được cao gấp từ $2,6 \div 10$ lần so với tự kết tủa trong nước lạnh. Do vậy, chỉ nên sử dụng ethanol để kết tủa inulin và fructan.

Từ tất cả các kết quả phân tích ở trên phép chọn ethanol ở nồng độ 80% và 90% để kết tủa inulin và fructan; nhiệt độ lưu trữ trong quá trình kết tủa là $(6 \pm 1)^\circ\text{C}$ và nhiệt độ cô đặc 55°C .

3.4. NGHIÊN CỨU TINH SẠCH VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC ĐIỂM CẤU TRÚC PHÂN TỬ CỦA PHÂN TỬ INULIN

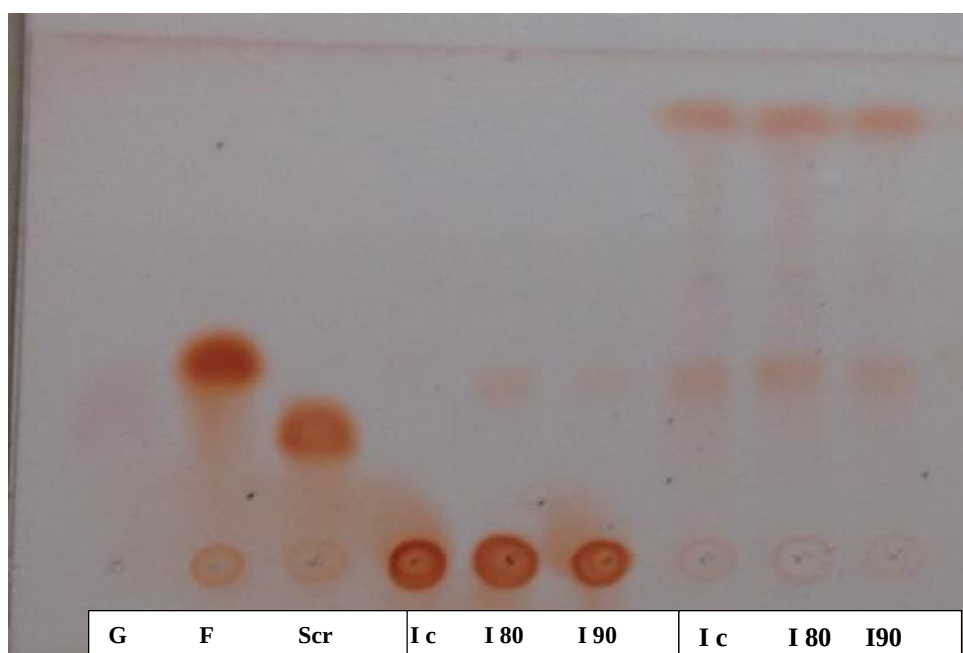
3.4.1. Nghiên cứu tinh sạch inulin

Để có thể thu nhận inulin củ đắng sâm tinh sạch, luận án tiến hành thu nhận bột saccharide thô từ củ đắng sâm theo cách thức sau: chiết dịch chiết inulin từ củ đắng sâm theo quy trình đã đề xuất ở trên, cô đặc dịch chiết đến 16°Bx, kết tủa saccharide thô bằng Ethanol ở nồng độ 90% để gây kết tủa và giữ hỗn hợp kết tủa ở nhiệt độ lạnh (6 ± 1) °C trong 24 h. Sau đó, ly tâm lạnh thu kết tủa với tốc độ 13000 vòng/phút ở nhiệt độ 16°C trong 16 phút. Kết tủa tiếp tục được sấy khô ở 55°C đến trọng lượng không đổi tạo thành bột saccharide thô và sử dụng bột này để tái kết tủa phân đoạn thu inulin tinh khiết. Bột saccharide thô được pha thành dung dịch 10000 ppm và tiến hành tái kết tinh 6 lần bằng Ethanol ở nồng độ 80% gây kết tủa để thu inulin tinh sạch. Sau đó, tiến hành sử dụng inulin tinh sạch (màu trắng ngà) để chạy sắc ký bản mỏng silicagel với chất chuẩn là inulin (Merck) có Mw (Molecular weight) là 3190 Da. Kết quả sắc ký tinh sạch và chạy sắc ký được trình bày ở các bảng 3.13, 3.14 và hình 3.25.

Bảng 3.13. Hiệu suất thu hồi inulin củ đắng sâm qua các giai đoạn tái kết tủa

Lần kết tinh thứ	Hàm lượng saccharide trước khi kết tủa	Hàm lượng inulin tinh sạch (mg/g bột)	Hiệu suất thu hồi (%)
4	816,67 ^a ±28,27	730,61 ^a ±4,02	89,46 ^c ±0,89
5	730,61 ^a ±4,02	663,95 ^b ±29,63	90,88 ^b ±4,99
6	663,95 ^b ±29,63	613,07 ^c ±17,52	92,34 ^a ±0,84

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)



Hình 3.25. Hình ảnh sắc ký bản mỏng trên silicagel chế phẩm inulin tinh sạch với hệ dung môi chloroform: acetic acid: nước là 7:6:1

Bảng 3.14. Kết quả tính toán chỉ số R_f của inulin củ đẳng sâm tinh sạch trên sắc ký bản mỏng silicagel

STT	Thông số	Inulin chuẩn của Merck	Inulin củ đẳng sâm tinh sạch
1	a (cm)	2,2	2,2
2	b (cm)	5,3	5,1
3	$R_f = a/b$	0,415	0,411

Từ các kết quả trình bày ở các bảng 3.13, 3.14 và hình 3.25 cho thấy:

*** Về hiệu suất thu nhận inulin củ đẳng sâm tinh khiết:** Kết quả cho thấy sau mỗi lần tái kết tinh bằng ethanol ở nồng độ 80% thì hàm lượng inulin thu được cũng khác nhau. Cụ thể sau các lần kết tinh thứ 4, 5 và thứ 6 tái kết tinh bằng Ethanol ở nồng độ 80%, hiệu suất thu Inulin tinh sạch tương ứng là: 75,07%, 84,76% và 97,85%. Chúng tôi sau mỗi lần tái kết tinh, tạp chất dần bị loại bỏ và kết tinh dần chỉ còn inulin.

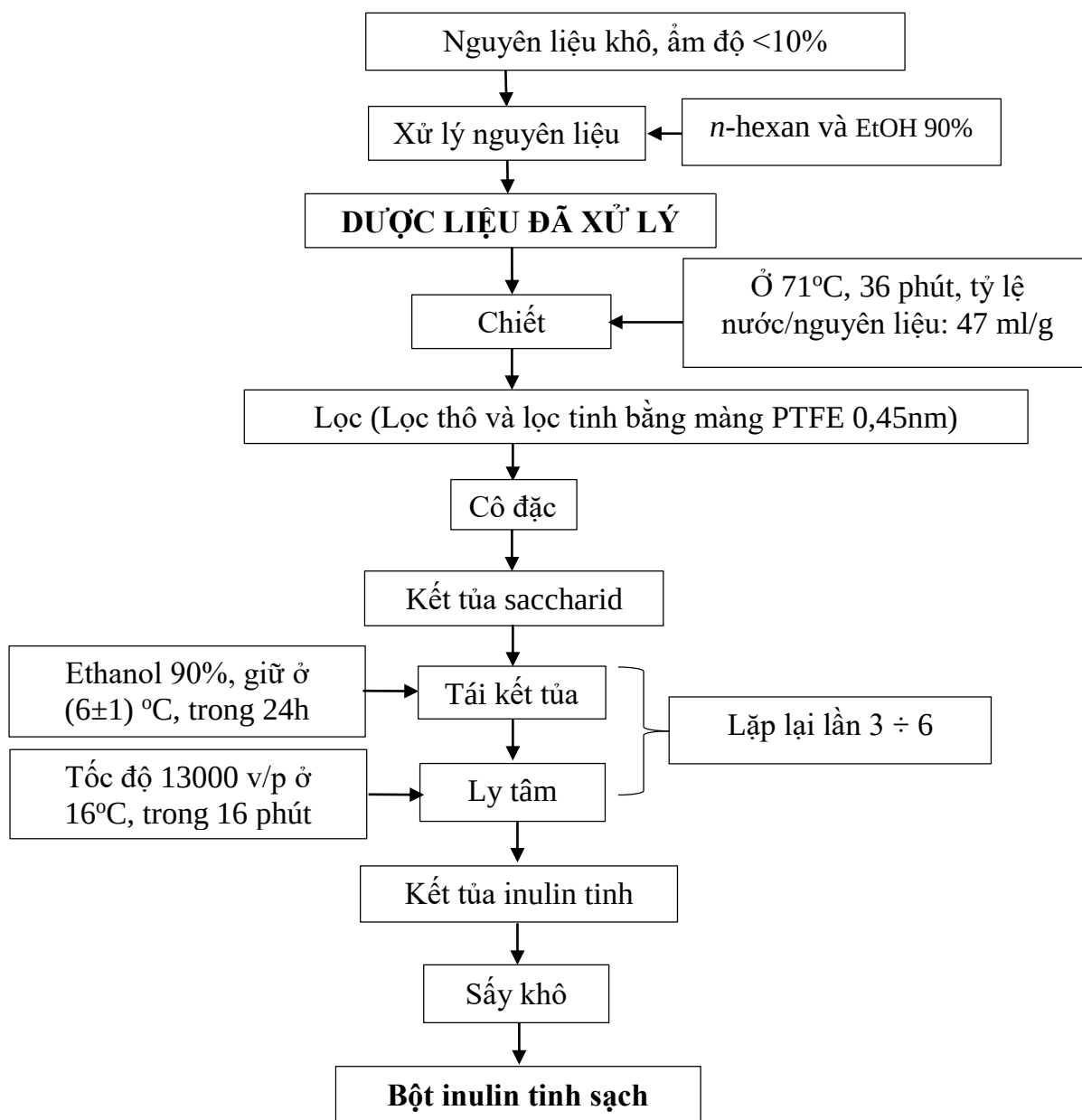
*** Đánh giá độ tinh sạch của inulin**

Kết quả sắc ký bản mỏng silicagel trình bày ở hình 3.25 và bảng 3.14 cho thấy trên bản sắc ký bản mỏng, mẫu inulin tinh sạch phân tách thành 2 vệt, trong đó có vệt có chỉ số R_f tương ứng với mẫu chuẩn inulin của Merck (M_w 3.190). Như vậy, vệt này chính là inulin có M_w 3.193 Da.

Từ các phân tích ở trên cho thấy sau khi kết tinh lại nhiều lần có thể thu được inulin tinh sạch.

3.4.2. Đề xuất quy trình tinh sạch inulin từ củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng

Từ các nghiên cứu ở trên, cho phép đề xuất quy trình tinh sạch inulin từ bột saccharide củ đẳng sâm trình bày ở hình 3.26.



Hình 3. 26. Qui trình tinh sạch inulin từ dịch chiết đẳng sâm

* Thuyết minh qui trình

+ **Nguyên liệu:** củ đẳng sâm tươi mọc tại Lạc Dương - Lâm Đồng. Sau khi thu hoạch, tiến hành phân loại và thu củ tươi đạt ba năm tuổi.

Củ tươi 3 năm tuổi được xử lý, rửa sạch tạp chất, thái nhỏ mỏng (1 mm) và sấy

khô ở nhiệt độ $<60^{\circ}\text{C}$ cho đến khi đạt ẩm độ $<10\%$ thì bao gói bằng bao bì PA hút chân không 100% và bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh để dùng làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.

+ **Xử lý nguyên liệu:** Mẫu dùng cho nghiên cứu được nghiền nhỏ $<125\text{mm}$ (dưới sàng rây) và tiến hành loại chất béo bằng n-hexan. Sau đó nguyên liệu tiếp tục được sấy khô ở nhiệt độ $<60^{\circ}\text{C}$ và xử lý bằng Ethanol 90 % trong 15 phút theo hình thức chưng cất hồi lưu để loại các loại đường tự do, các chất màu, các acid amin và các chất tan trong nồng độ Ethanol 90%. Các chất tan trong dung môi còn Ethanol 90 % được dùng cho các nghiên cứu khác. Nguyên liệu sau khi xử lý sơ bộ được sấy khô ở nhiệt độ $\leq 55^{\circ}\text{C}$ và dùng làm nguyên liệu chiết inulin, fructan.

+ **Chiết:** quá trình chiết inulin và fructan bằng nước cất hai lần trong điều kiện có hỗ trợ của sóng siêu âm với tần số 37 KHz, ở nhiệt độ 71°C , tỉ lệ dung môi so với nguyên liệu 47 ml/gam, siêu âm trong 36 phút.

+ **Lọc:** Lọc thu dịch chiết bằng vải lọc, sau đó lọc lại bằng lưới lọc với kích cỡ 0,1mm và tiếp tục lọc qua màng siêu lọc PTFE 0,45 μm để thu dịch lọc inulin, fructan.

+ **Cô đặc:** Dịch lọc được cô đặc bằng thiết bị cô quay chân không với tốc độ quay 90 v/p ở $\leq 55^{\circ}\text{C}$ cho đến khi dịch cô đặc đạt 16°Bx thì ngừng quá trình cô đặc và thu dịch cô đặc để dùng cho quá trình kết tủa saccharide.

+ **Kết tủa saccharide thô:** tiến hành kết tủa saccharide thô trong dịch cô đặc bằng Ethanol 99,7% ở nồng độ gây kết tủa 90% và giữ hỗn hợp ở nhiệt độ lạnh (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ (ngăn mát tủ lạnh) trong 24h để lắng kết tủa. Sau đó tiến hành ly tâm lạnh ở 16°C với tốc độ 13000 v/p, trong 16 phút để thu kết tủa saccharide thô. Thu kết tủa và sấy khô kết tủa ở nhiệt độ $\leq 55^{\circ}\text{C}$ để dùng cho quá trình nghiên cứu tinh chế inulin theo kỹ thuật tái kết tủa nhiều lần.

+ **Tái kết tủa:** tiến hành tinh chế inulin theo kỹ thuật tái kết tủa nhiều lần:

- **Tái kết tủa saccharide lần thứ nhất:** Hòa tan kết tủa trong nước cất hai lần thành dung dịch có nồng độ 10000 ppm và tiến hành kết tủa bằng Ethanol 99,7% ở nồng độ gây kết tủa 80%. Để lắng kết tủa ở nhiệt độ (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ trong 24 h và tiến hành ly tâm lạnh ở nhiệt độ 16°C với tốc độ 13000 vòng/phút trong 16 phút để thu kết tủa. Kết tủa được sấy khô ở $\leq 55^{\circ}\text{C}$ đến trọng lượng không đổi.

- **Tái kết tủa saccharide lần thứ hai:** hòa tan kết tủa trong nước cất 2 lần và kết tủa bằng Ethanol 99,7% ở nồng độ gây kết tủa 80%. Để lắng kết tủa ở nhiệt độ (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ trong 24 h và ly tâm lạnh thu kết tủa ở nhiệt độ 16°C với tốc độ 13000 vòng/phút

trong 16 phút. Kết tủa được sấy khô ở nhiệt độ $\leq 55^{\circ}\text{C}$ đến trọng lượng không đổi.

Quá trình tái kết tủa được lặp lại đến lần thứ 5 và thứ 6. Trong quá trình tái kết tủa, tiến hành đánh giá hàm lượng inulin thu được sau mỗi lần tinh sạch và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu tái kết tủa lần cuối cùng bằng sắc ký bản mỏng trên silicagel với hệ dung môi chloroform: acetic acid: nước là 7: 6:1 và dùng mẫu inulin tinh sạch này để xác định đặc điểm cấu trúc phân tử.

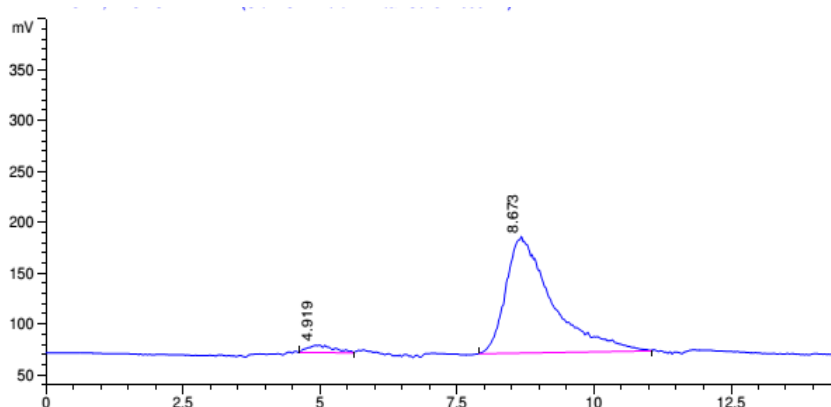
3.4.3. Xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin

3.4.3.1. Trọng lượng phân tử của inulin

Sử dụng phương pháp sắc ký sàng lọc phân tử để xác định trọng lượng phân tử của inulin tinh khiết thu nhận từ củ đắng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng (Hình 3.27 và bảng 3.15). Kết quả sắc ký sàng lọc phân tử cho thấy Fructose polysachride của củ đắng sâm tinh sạch là một hỗn hợp gồm 2 phân tử có khối lượng phân tử khác nhau: một phân tử có trọng lượng phân tử 3.193 Da, chiếm 96,448 % hỗn hợp và một phân tử có khối lượng phân tử khoảng 1.112.892 Da, chiếm 3,552 % của hỗn hợp.

Bảng 3.15. Kết quả phân tích khối lượng phân tử của các thành phần polysachride của củ đắng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng

STT	Rt (min)	Diện tích pic	Tỷ lệ diện tích pic (%)	Khối lượng phân tử (Da)
1	4,919	247,161	3,552	1.112.892
2	8,673	6711, 200	96,448	3.193

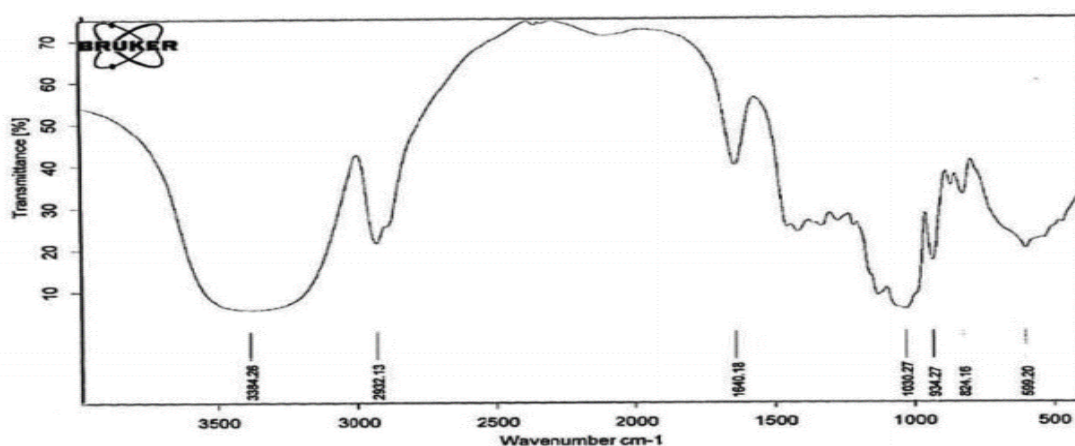


Hình 3.27. Sắc ký đồ chế phẩm polysacchride tinh sạch trên sắc ký rây phân tử hiệu năng cao (sắc ký lọc gel)

Từ những kết quả phân tích sắc ký lọc gel ở trên cho thấy polysacchride của củ đắng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng là một hỗn hợp gồm 2 phân tử: một phân tử có khối lượng khoảng 3193 Da, chiếm 96,448% và một phân tử có khối lượng khoảng 1.112.892 Da, chiếm 3,552%.

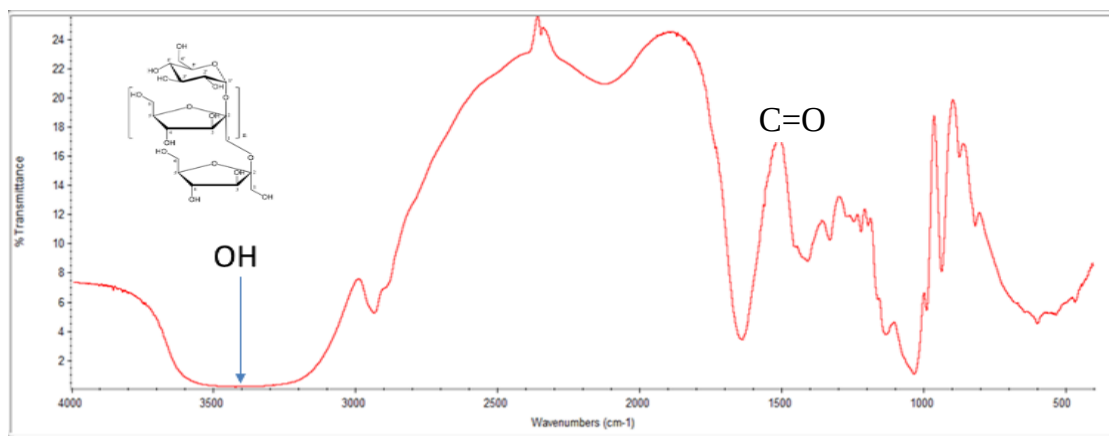
3.4.3.2. Xác định cấu trúc phân tử Inulin

Tiến hành phân tích phổ FT- IR của inulin củ đắng sâm (Hình 3.28÷3.29) cho thấy có một peak tròn rộng OH của đường kéo dài ở vùng $3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, C=O tại vùng $1631\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ và CH tại $2927\text{--}2932\text{ cm}^{-1}$ đã chỉ ra cấu trúc hóa học giống nhau. Thêm vào đó các peak tại vùng 943 cm^{-1} chỉ ra sự hiện diện của phân tử Fructose furanose. So sánh với phổ FT-IR của inulin trong cây diếp xoăn (Chicory) do Mudannayake và cộng sự (2015) phân tích [107] cho thấy: phổ FT- IR của inulin tinh sạch từ củ đắng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng (Hình 3.29) và FT-IR của Inulin Chicory thương mại (Hình 3.28) không có sự khác biệt.

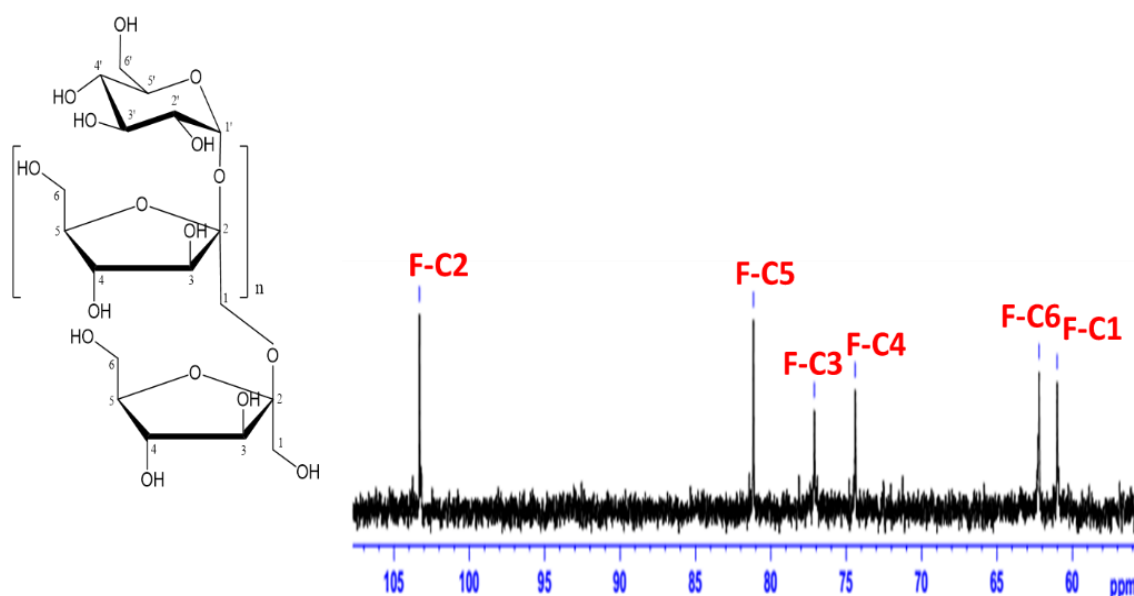


Hình 3.28. Phổ IR của inulin thương mại (Chicory Inulin - OraftiR GR)

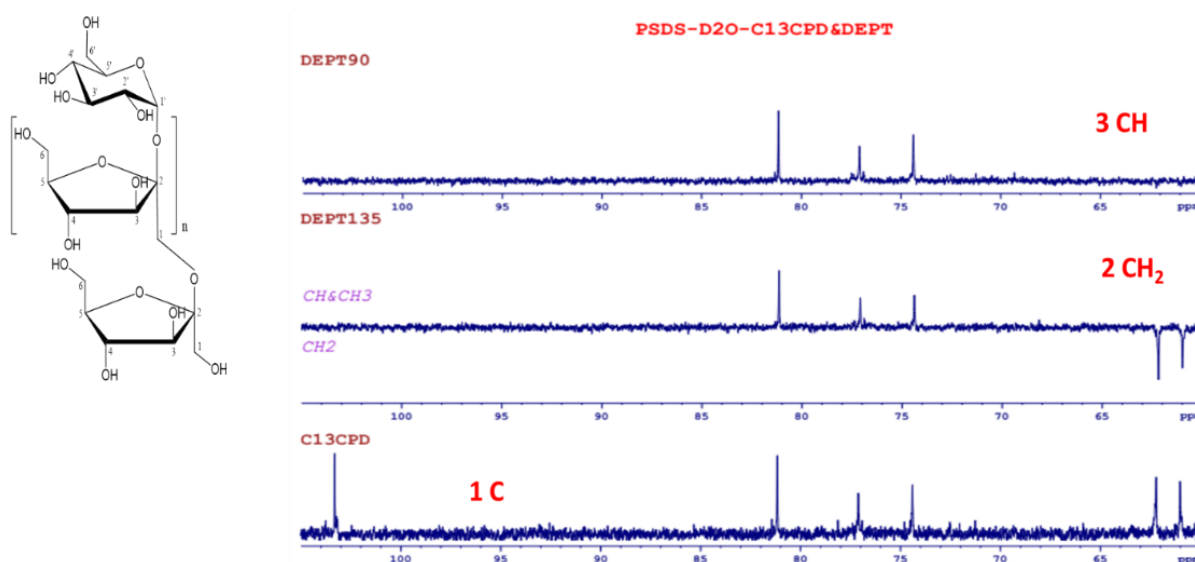
[107]



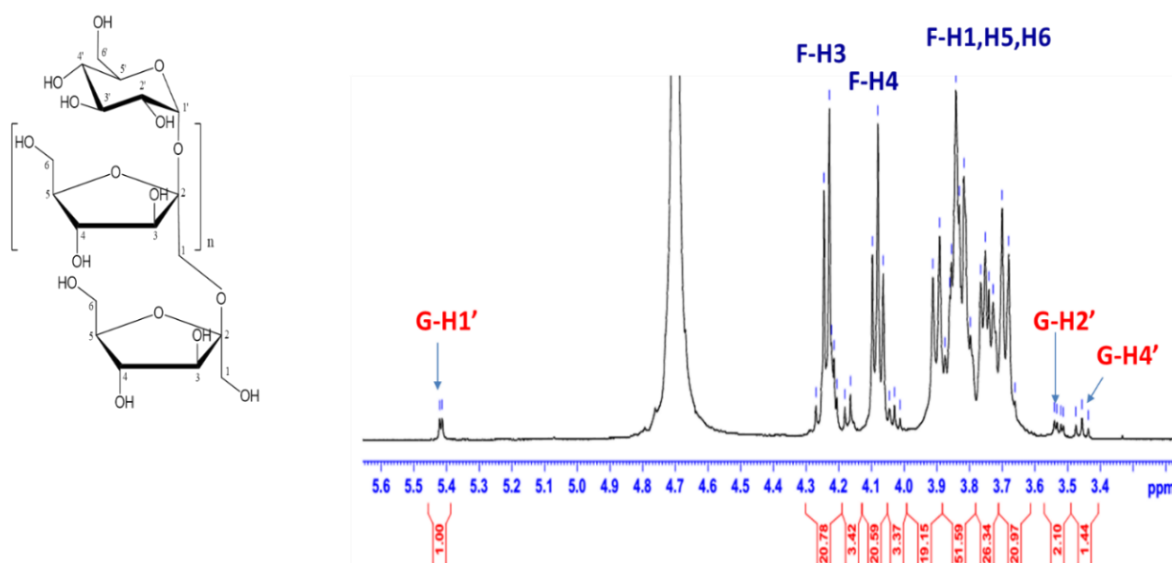
Hình 3.29. Phổ FT-IR của inulin tinh sạch từ củ đắng sâm



Hình 3.30. Phổ ^{13}C -NMR (D₂O, 125 MHz) của inulin tinh sạch từ củ đấng sâm



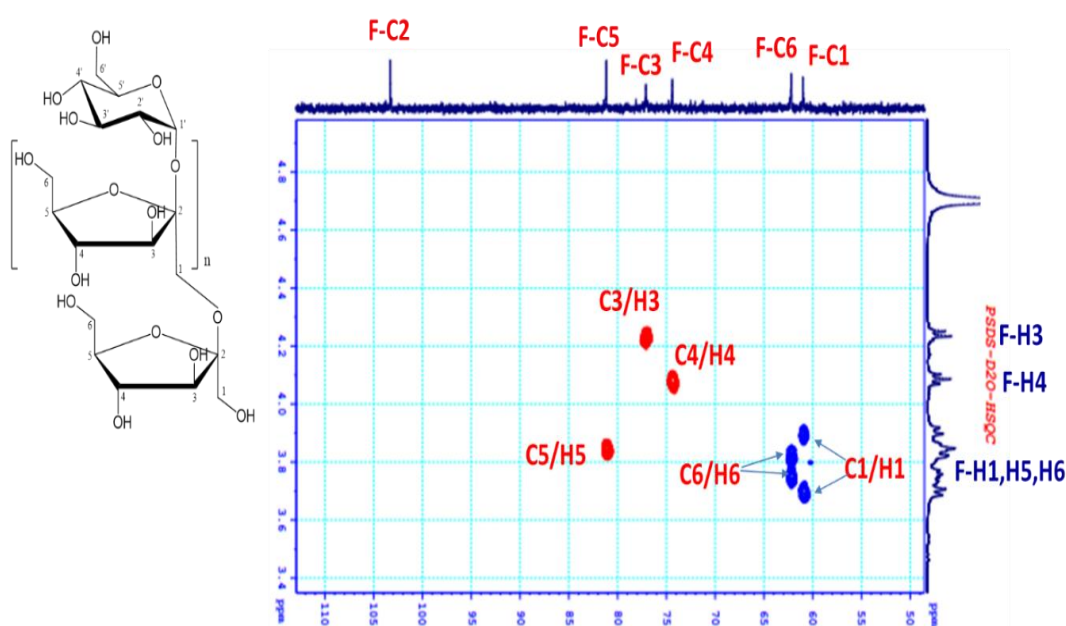
Hình 3.31. Phổ DEPT của inulin tinh sạch từ củ đấng sâm



Hình 3.32. Phổ ^1H -NMR (D₂O, 500 MHz) của inulin tinh sạch từ củ đấng sâm

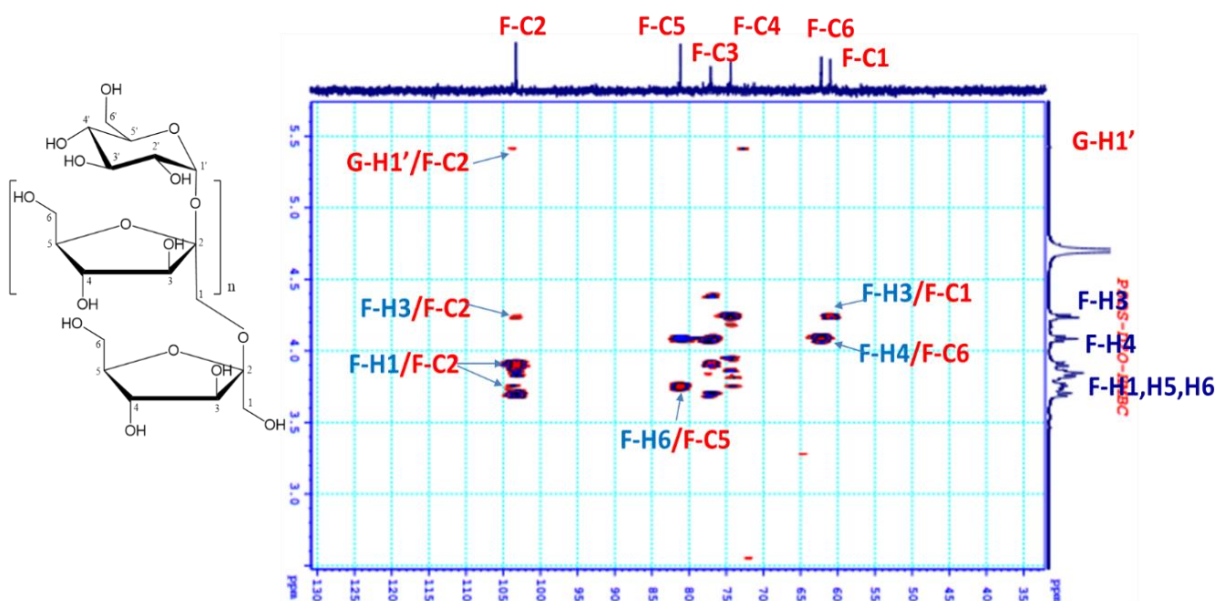
Kết quả phân tích phổ ^1H -NMR (Hình 3.32) và ^{13}C -NMR (Hình 3.30) của inulin củ đắng sâm có dạng phổ đặc trưng cho một fructose polysaccharide với các tín hiệu cộng hưởng mạnh của các đơn vị đường β -D-fructose furanose và tín hiệu yếu của đơn vị đường α -D-glucose pyranose cuối mạch.

Kết quả phân tích phổ ^{13}C -NMR (Hình 3.30) và phổ DEPT (Hình 3.31) của inulin củ đắng sâm cho tín hiệu cộng hưởng của 6C, bao gồm một C không liên kết với hydro tại δ_{C} 103,31 ppm, 3 nhóm CH tại δ_{C} 74,41; 77,11 và 81,16 ppm, 2 nhóm CH_2 tại δ_{C} 61,01 và 62,21 ppm. Các tín hiệu này hoàn toàn phù hợp với các số liệu phân tích phổ phân tử β -D-fructose furanose trong mạch fructose polysaccharide [54].



Hình 3.33. Phổ HSQC của inulin tinh sạch từ củ đắng sâm

Kết quả phân tích phổ ^1H -NMR (Hình 3.32) của inulin củ đắng sâm còn cho thấy tín hiệu 7 proton của đơn vị đường β -D-fructose furanose, bao gồm 2 proton tại δ_{H} 4,23 (m, 1H); 4,08 ppm (m, 1H) và 5 proton trong vùng δ_{H} 3,68 – 3,92 ppm. Ngoài ra, trên phổ này còn xuất hiện các tín hiệu với cường độ thấp của đơn vị đường α -D-glucose pyranose: proton anomeric cộng hưởng tại δ_{H} 5,41 ppm (d, $J = 4,0$ Hz, H-1') và 2 tín hiệu cộng hưởng tại δ_{H} 3,53 ppm (dd, $J = 4,0; 10,0$ Hz, H-2') và 3,46 ppm (t, $J = 9,5$ Hz, H-4'). Tỷ lệ cường độ tích phân giữa H-1' của đơn vị đường α -D-glucose pyranose và H-3, H-4 của đơn vị đường β -D-fructose furanose cho phép dự đoán các đơn phân (DP: Degree of polymerization) của inulin vào khoảng 19-23 đơn vị β -D-fructose furanose.



Hình 3.34. Phổ HMBC của inulin tinh sạch từ củ đẳng sâm

Kết quả phân tích phổ HSQC và HMBC (Hình 3.33; 3.34) của inulin củ đẳng sâm giúp khẳng định chính xác độ dịch chuyển hóa học của carbon và hydro trong phân tử inulin. Tương tác HMBC giữa H-1' của đơn vị đường α -D-glucose pyranose và C-2 của đơn vị đường β -D-fructose furanose khẳng định chắc chắn liên kết giữa đơn vị glucose cuối mạch với đơn vị fructose tiếp theo trong mạch là liên kết 1 $\rightarrow$ 2. Tương tác HMBC mạnh giữa H-1/C-2 và sự vắng mặt của H-6/C-2 khẳng định giữa các đơn vị đường β -D-fructose furanose chỉ có các liên kết 1 $\rightarrow$ 2 trong cấu trúc của inulin.

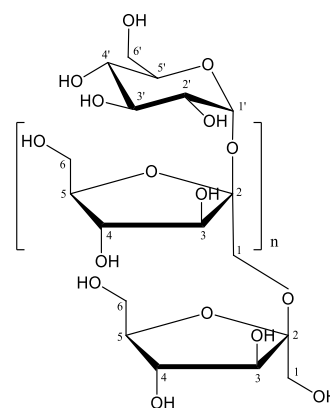
Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của inulin tinh sạch từ củ đẳng sâm

C	* δ_C (ppm)	^{a,b} δ_C (ppm)	DEPT	^{a,c} δ_H (ppm) (J, Hz)	Các tương tác HMBC quan trọng (H $\rightarrow$ C)
$\rightarrow$ 1)- β -D-Fructose furanosid-(2 $\rightarrow$					
1	61,42	61,01	CH ₂	3,90 (d, J = 10,0 Hz, 1H) 3,69 (d, J = 10,0 Hz, 1H)	C-2, C-3
2	103,39	103,31	C	-	
3	77,58	77,11	CH	4,23 (m, 1H)	C-1, C-2, C-4
4	74,93	74,41	CH	4,08 (m, 1H)	C-3, C-5, C-6
5	81,43	81,16	CH	3,85 (m, 1H)	C-4, C-3
6	62,48	62,21	CH ₂	3,83 (m, 1H)	C-4, C-5

				3,75 (m, 1H)	
α -D-Glucose pyranosid-(1 $\rightarrow$					
1'	92,73	kth		5,41 (d, $J = 4,0$ Hz)	C-2
2'	70,75	kth		3,53 (dd, $J = 4,0; 10,0$ Hz)	
3'	73,04	kth		3,82 (m)	
4'	69,78	kth		3,46 (t, $J = 9,5$ Hz)	
5'	71,64	kth		3,82 (m)	
6'	60,75	60,5		3,79 (m)	

Ghi chú: ^a Đo trong D₂O, ^b 125MHz, ^c 500MHz; kth- không rõ tín hiệu, *theo De Oliveira và cộng sự [54].

Từ các kết quả phân tích phổ ở trên và số liệu (bảng 3.16) cho phép khẳng định phân tử polysaccharide trong củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng là một inulin dạng fructose polysaccharide có khoảng 19-23 đơn phân với cấu trúc trình bày ở hình 3.35.



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của inulin củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng

Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy inulin củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng bao gồm 2 loại fructose polysaccharide có trọng lượng phân tử khác nhau: 1 loại có khối lượng phân tử khoảng 3.193 Da, chiếm tỷ lệ 96,448% và một có khối lượng phân tử khoảng 1.112.892 Da, loại chiếm 3,552%.

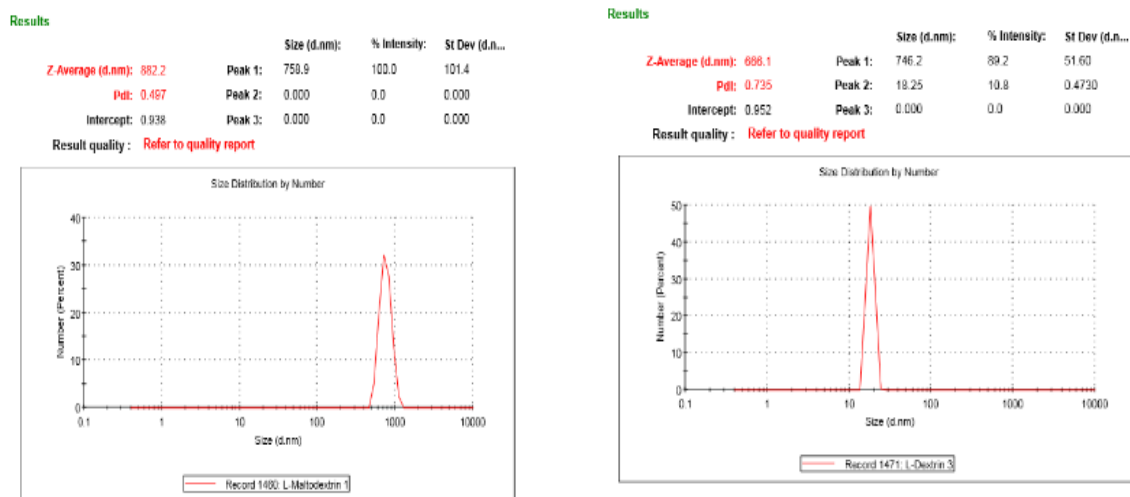
3.5. NGHIÊN CỨU SẤY PHUN TẠO BỘT INULIN CỦ ĐẲNG SÂM

3.5.1. Xác định chất mang và tỷ lệ chất mang

3.5.1.1. Xác định chất mang

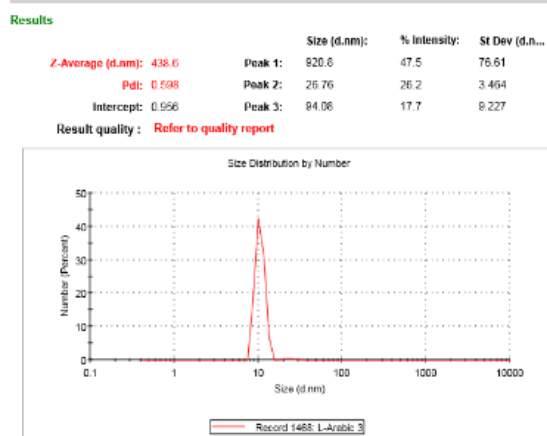
Tiến hành 4 mẫu sấy phun dung dịch inulin củ đẳng sâm có độ đặc 16°Bx với chất mang sử dụng khác nhau: Mẫu 1: mẫu đối chứng không có chất mang, mẫu 2: bổ sung dextrin, mẫu 3: bổ sung maltodextrin và mẫu 4: bổ sung gum arabic. Các mẫu đều sử dụng mang với nồng độ 10%, nhiệt độ không khí đầu vào/ra 180/85°C, áp suất khí nén (ASKN) 3 atm, tốc độ đĩa phun (TĐDP) 16000 vòng/phút tương đương tốc độ bơm nhu

động nhập liệu (TĐ BNĐ) là 10 ml/phút. Sau khi sấy phun đánh giá kích thước hạt (Z-average) và độ phân tán của chất mang (chỉ số phân bố kích thước (PDI- Polydispersion Index hay chỉ số đa phân tán), tính chất nhiệt bằng thiết bị quét vi sai bù năng lượng DC-60 (Mỹ), hàm lượng inulin của bột thu được. Kết quả được trình bày ở các hình 3.36, 3.37 và các bảng 3.17 ÷ 3.19.



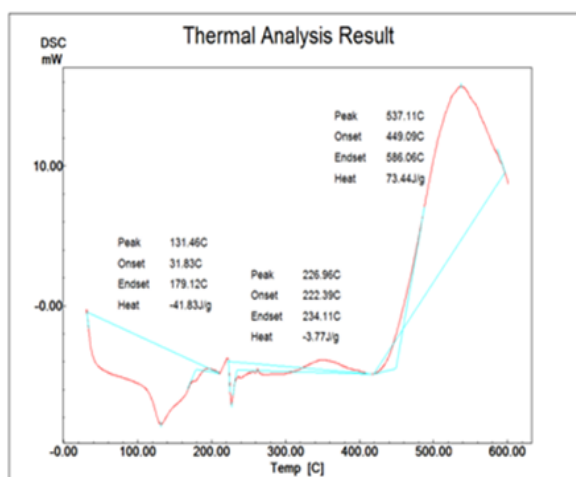
Sử dụng maltodextrin

Sử dụng dextrin

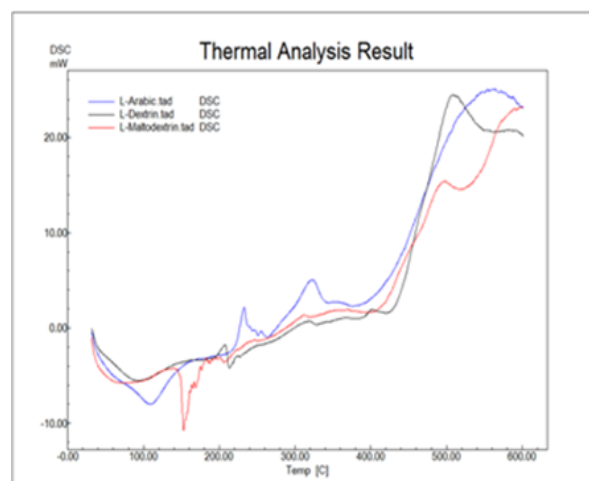


Sử dụng gum arabic

Hình 3.36. Giảm đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau



Bột inulin tinh sạch



Bột inulin đẳng sâm sấy phun với các chất mang

Hình 3.37. Giảm đồ phân tích nhiệt vi sai bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau

Bảng 3.17. Kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau

STT	Loại chất mang	Z-average (d.nm)	Mật độ (%)	PDI
1	Đối chứng	Không thu được bột sấy phun		
2	Dextrin	666,1 ^b ±51,60	89,2 ^b	0,735
3	Maltodextrin	882,2 ^a ±101,4	100,0 ^a	0,497
4	Gum Arabic	438,6 ^c ±76,61	47,5 ^c	0,598

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau thì khác nhau $p < 0,05$

Bảng 3.18. Tính chất nhiệt của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau

Loại bột	Nhiệt độ (°C)				Độ bền nhiệt
	Mất nước - T_m	Gây đứt gãy nhóm chức - T_m	Phân hủy nhóm chức - T_c	Phân hủy hoàn toàn cấu trúc	
Inulin tinh sạch	131	-	226	537	Đối chứng
Inulin - dextrin	93	-	207	508	Giảm
Inulin - maltodextrin	72,97	152	497	> 600	Tăng
Inulin - gum arabic	109	226	322	563	Tăng

Bảng 3.19. Hàm lượng Inulin và tính chất cảm quan của các loại bột sấy phun

Chất mang	Độ tan	Hàm lượng Inulin (mg/g)	Hàm lượng Fructan (mg/g)	Hàm lượng Tro (%)	pH	Trạng thái cảm quan
Maltodex	Dễ tan	446,60 ^a ± 4,75	472,56 ^a ± 3,22	4,82 ^b ± 0,07	5,46	Hơi chua ngọt, mùi đặc trưng
Dextrin	Dễ tan	404,14 ^b ± 5,99	431,16 ^b ± 7,59	1,91 ^c ± 0,08	5,15	Hơi chua ngọt, mùi đặc trưng
Gum Arabic	Dễ tan	442,39 ^a ± 5,19	469,75 ^a ± 2,19	5,09 ^a ± 0,05	5,84	Hơi chua, vị hơi đắng, mùi đặc trưng

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.36, 3.37 và các bảng 3.17 ÷ 3.19 cho thấy:

*** Về kích thước hạt và độ phân tán**

Kết quả sấy phun cho thấy bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung maltodextrin có kích thước hạt lớn nhất ($882,2 \pm 101,4$) nm, lớn hơn kích thước hạt của bột inulin đắng sâm sấy phun bổ sung dextrin ($666,1 \pm 51,60$) nm và Gum Arabic ($438,6 \pm 76,61$) nm. Tuy vậy bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung chất mang maltodextrin lại có chỉ số PDI (Polydispersion Index) là 0,497, thấp nhất so với chỉ số PDI của bột inulin củ đắng sâm sấy phun sử dụng chất mang gum arabic và dextrin (chỉ số PDI của bột inulin củ đắng sâm sấy phun sử dụng chất mang gum arabic và dextrin lần lượt là 0,598 và 0,735). Kết quả đánh giá mật độ của bột inulin củ đắng sâm sấy phun còn cho thấy mật độ bột inulin củ đắng sâm sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin là 100% trong khi bột inulin củ đắng sâm sấy phun sử dụng chất mang dextrin và gum arabic tương ứng chỉ là 89,2% và 47,5%.

Về mặt lý thuyết, đường kính trung bình của kích thước bột inulin củ đắng sâm sấy phun được biểu diễn bằng thông số Z-average (d. nm). Theo tiêu chuẩn ISO 22412 (2008) [148], độ phân tán các chất mang (chỉ số phân bố kích thước - PDI hay chỉ số đa phân tán) là thước đo không thứ nguyên của độ rộng phân bố kích thước. PDI có giá trị nằm trong khoảng 0 đến 1. Khi $PDI < 0,3$ thì bột có phân bố kích thước hẹp, bột có $PDI > 0,5$ sẽ có khoảng phân bố rộng. Nếu PDI quá lớn, gần bằng 1 thì bột có thể không phù hợp với phương pháp đo nhiễu xạ ánh sáng động do có chứa nhiều tiểu phân có kích thước lớn quá giới hạn đo của máy. Kết quả khác nhau về PDI được giải thích là do bản

chất các chất mang, khi chất mang làm cho mẫu giảm tính đồng nhất giữa các hạt nano sẽ dẫn đến PDI tăng. Lý thuyết này cho thấy bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng maltodextrin có chỉ số PDI thấp nhất (0,497). Như vậy maltodextrin có khả năng làm cho bột inulin củ đẳng sâm sấy phun có tính đồng nhất cao hơn hẳn dextrin và gum arabic. Mặt khác, mật độ hạt của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin là 100% cũng cao hơn hẳn khi sử dụng dextrin (89,2%) và gum arabic (47,5%). Từ các phân tích ở trên cho thấy maltodextrin là chất mang tạo ra bột inulin củ đẳng sâm sấy phun có độ phân tán tốt nhất.

*** Về tính chất nhiệt**

Kết quả đánh giá tính chất nhiệt của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun sử dụng các chất mang khác nhau (Hình 3.37) cho thấy bột inulin củ đẳng sâm không sử dụng chất mang có peak thu nhiệt T_m ở khoảng nhiệt độ 131°C tượng trưng cho sự mất nước hấp thụ trong phân tử inulin và có peak tỏa nhiệt (T_c) ở khoảng nhiệt độ 226°C tượng trưng cho sự phân hủy các nhóm chức có trong thành phần của bột inulin đẳng sâm sấy phun. Peak tỏa nhiệt (T_c) ở khoảng nhiệt độ 537°C tượng trưng cho sự phân hủy nhóm chức của inulin tinh sạch và tỏa ra một nhiệt năng khoảng 73J/g. Trong khi đó bột inulin đẳng sâm sử dụng chất mang maltodex (inulin-maltodextrin) có nhiệt độ khô mất nước là 72°C, thấp nhất so với nhiệt độ khô mất nước của bột inulin - dextrin (93°C) và bột inulin-gum arabic (109°C). Như vậy, nhiệt độ khô mất nước của bột inulin củ đẳng sâm sấy phun có sử dụng chất mang thấp hơn rất nhiều so với mức nhiệt mất nước của bột inulin tinh sạch không có chất mang (131°C). Kết quả này cho thấy, khi sử dụng chất mang thì bột inulin củ đẳng sâm sấy phun với chất mang sẽ có nhiệt làm khô thấp hơn tức inulin sẽ ít bị phân hủy hơn khi sấy phun chỉ có inulin. Kết quả phân tích cũng cho thấy sử dụng maltodextrin sẽ làm cho bột inulin - maltodextrin có nhiệt độ làm khô thấp hơn.

Kết quả phân tích cũng cho thấy nhiệt độ phân hủy T_c nhóm chức (-OH) của bột sấy inulin-maltodextrin cao nhất (497°C) và nhiệt độ phân hủy hoàn toàn trên 600°C, cao hơn so với nhiệt độ phân hủy nhóm chức T_c của bột sấy inulin-dextrin (207°C) và inulin-gum arabic (322°C). Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy nhiệt độ phân hủy nhóm chức T_c của bột sấy inulin-maltodextrin (497°C) cao gấp đôi so với nhiệt độ phân hủy nhóm chức của bột inulin củ đẳng sâm tinh sạch không có chất mang (226°C). Kết quả này cho thấy khi có chất mang maltodextrin inulin sẽ được bảo vệ tốt hơn nên khó

bị phá hủy bởi nhiệt độ khi sấy. Kết quả phân tích cũng cho thấy nhiệt độ phân hủy hoàn toàn bột sấy phun inulin-maltodextrin là 600°C, cao nhất so với nhiệt độ phân hủy các loại bột sấy phun khác. Cụ thể, nhiệt độ phân hủy hoàn toàn bột sấy phun inulin-dextrin, inulin-gum arabic và inulin củ đấng sâm tinh sạch lần lượt là 508°C, 563°C và 537°C. Kết quả này có nghĩa là khi sử dụng maltodextrin làm chất mang khi sấy phun tạo bột đấng sâm thì inulin sẽ được bảo vệ tốt hơn khi sử dụng các chất mang là dextrin, gum arabic và không sử dụng chất mang.

Kết quả này có thể được giải thích là do maltodextrin chứa nhiều nhóm hydroxyl (–OH) và có cấu trúc phân nhánh nên các nhóm hydroxyl (–OH) phân bố đều trong không gian nên dễ tương tác với các nhóm hydroxyl (–OH) của inulin từ đó tạo thành cấu trúc phức hợp bao lấy phân tử inulin làm cho inulin được bảo vệ tốt hơn [38].

Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy sử dụng chất mang maltodextrin trong sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm sẽ tạo ra bột inulin củ đấng sâm nhanh khô hơn, bột bền với nhiệt và inulin được bảo vệ tốt nhất.

*** Về hàm lượng inulin và Frutan**

Kết quả phân tích ở bảng 3.19 cho thấy khi sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm sử dụng chất mang khác nhau thì hàm lượng inulin của bột cũng khác nhau và tất cả các dạng bột inulin củ đấng sâm sấy phun đều dễ tan trong nước. Cụ thể, hàm lượng inulin của bột sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin là $(472,56 \pm 3,22)$ mg/g, cao nhất trong số các mẫu bột sấy phun đã nghiên cứu và hàm lượng inulin của bột sấy phun sử dụng chất mang dextrin đạt thấp nhất $(431,16 \pm 7,59)$ mg/g.

Tương tự như trên, hàm lượng fructan của bột inulin củ đấng sâm sấy phun sử dụng chất mang maltodextrin đạt mức cao nhất $(472,56 \pm 3,22)$ mg/g và hàm lượng fructan của bột inulin củ đấng sâm sấy phun sử dụng chất mang dextrin thấp nhất, chỉ là $(431,16^b \pm 7,59)$ mg/g. Tuy vậy, hàm lượng tro của bột inulin củ đấng sâm sấy phun với maltodextrin là 4,82%, thấp hơn hàm lượng tro của bột inulin củ đấng sâm sấy phun với gum arabic 5,09% và cao hơn hàm lượng tro của bột củ đấng sâm sấy phun với dextrin 1,91%.

Từ tất cả các phân tích ở trên cho thấy sử dụng maltodextrin làm chất mang trong sấy phun tạo bột inulin sẽ tạo ra bột sấy phun nhanh khô hơn, bền nhiệt và inulin được bảo vệ tốt hơn. Mặt khác, bột inulin củ đấng sâm sấy phun có hàm lượng inulin cao

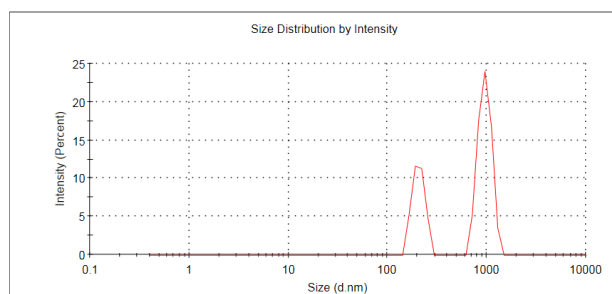
nhất. Do vậy, maltodextrin được lựa chọn là chất mang trong sấy phun tạo bột inulin.

3.5.1.2. Xác định nồng độ chất mang

Tiến hành 3 mẫu sấy phun inulin củ đắng sâm (ĐS1, ĐS2 và ĐS3) bổ sung maltodextrin với tỷ lệ khác nhau: 5%, 10% và 15%. Các mẫu đều sấy phun ở nhiệt độ không khí đầu vào/ra: 180/85 °C, áp suất khí nén (ASKN) 3 atm, tốc độ đĩa phun (TĐDP) 16.000 vòng/phút, tương đương tốc độ bơm nhập liệu (TĐ BNL) là 10 ml/phút. Sau khi sấy phun đánh giá kích thước hạt (Z-average), độ phân tán, tính chất nhiệt, hàm lượng inulin của bột củ đắng sâm thu được. Kết quả trình bày ở các hình 3.38÷3.39 và bảng 3.20.

Results

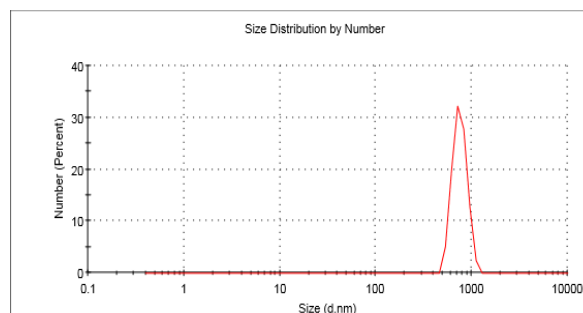
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.n.
Z-Average (d.nm): 539.3	Peak 1: 957.2	67.1	142.9
Pdl: 0.666	Peak 2: 205.7	32.9	28.01
Intercept: 0.930	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report			



Mẫu sử dụng 5% maltodextrin (ĐS 1)

Results

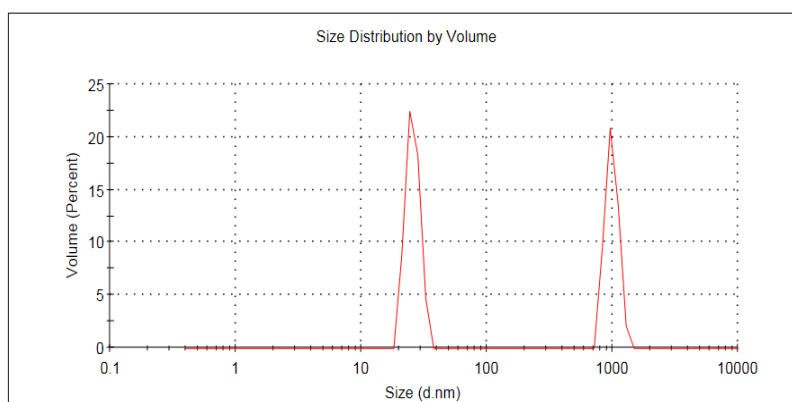
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.n
Z-Average (d.nm): 882.2	Peak 1: 758.9	100.0	101.4
Pdl: 0.497	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report			



Mẫu sử dụng 10% maltodextrin (ĐS 2)

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1523	Peak 1: 988.5	45.8	118.4
Pdl: 0.637	Peak 2: 25.84	54.2	3.260
Intercept: 0.962	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Refer to quality report			

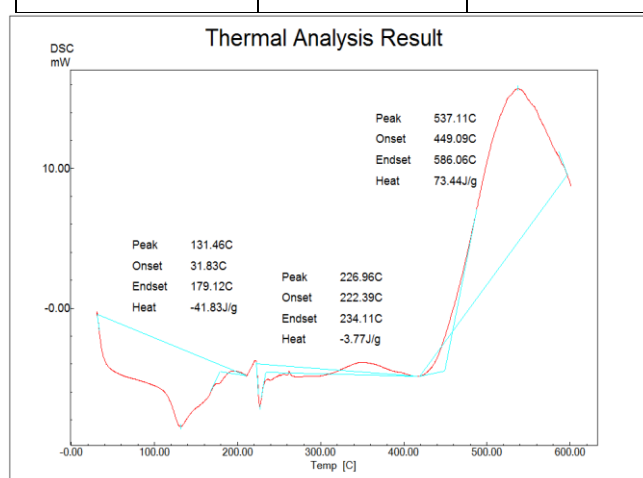


Mẫu sử dụng 15% maltodextrin (ĐS 3)

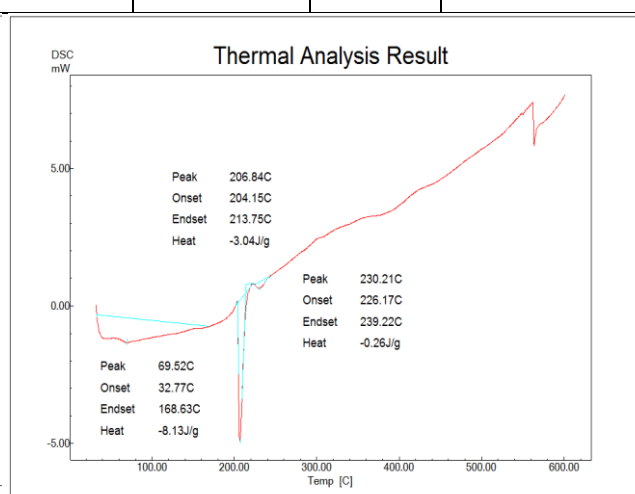
Hình 3.38. Giải đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đắng sâm sấy phun với nồng độ maltodextrin khác nhau

Bảng 3.20. Kích thước hạt và PDI của bột inulin củ đấng sảy phun với nồng độ maltodextrin khác nhau

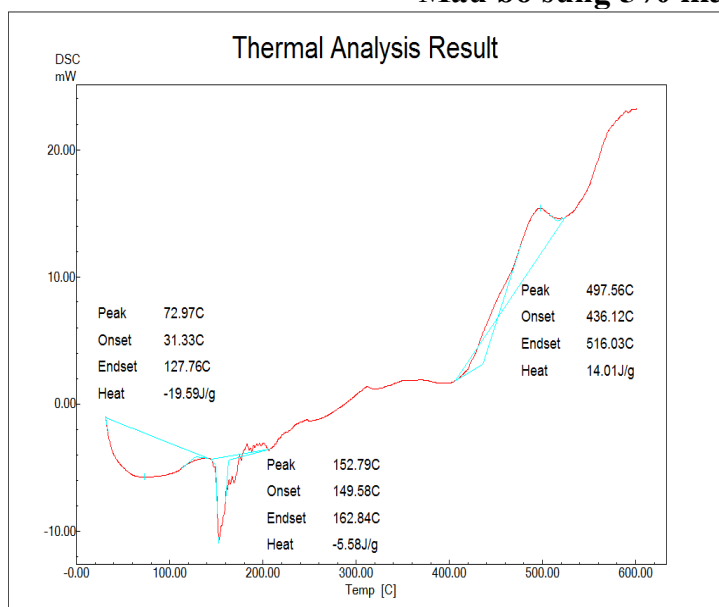
Tỷ lệ maltodextrin (%)	Kích thước hạt trung bình (d.nm)	Kích thước hạt và mật độ		PDI	Độ ẩm (%)
		Kích thước hạt (d.nm)	Mật độ (%)		
5	539,3	957,2±142,9	67,1	0,66	6,31±0,17
		205,7±28,01	32,9		
10	758,9	758,9±101,4	100	0,497	6,31±0,71
15	1523,0	988,5±118,4	45,8	0,637	4,27±0,13
		25,84±3,26	54,2		



Mẫu inulin tinh sạch



Mẫu bổ sung 5% maltodextrin (ĐS 1)



Mẫu bổ sung 10% maltodextrin (ĐS 2)

Hình 3.39. Biểu đồ phân tích nhiệt của mẫu inulin đấng sảy phun với tỷ lệ maltodextrin khác nhau

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.37 ÷ 3.40 và bảng 3.20 cho thấy:

*** Về kích thước hạt và độ phân tán**

Kết quả phân tích phổ kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đắng sâm sấy phun (Hình 3.38) cho thấy mẫu inulin sấy phun bổ sung 5% maltodextrin có kích thước hạt trung bình nhỏ nhất (539,3 nm), nhỏ hơn kích thước hạt trung bình của mẫu inulin sấy phun bổ sung 10% maltodextrin (758,9 nm) và mẫu bổ sung 15% maltodextrin (1523 nm). Như vậy, mẫu sấy phun bổ sung 15% maltodextrin có kích thước hạt lớn gấp 3 lần kích thước hạt của mẫu bổ sung 5% maltodextrin và lớn hơn gần gấp 2 lần so với kích thước hạt của mẫu bổ sung 10% maltodextrin. Ngoài ra, mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin có chỉ số PDI 0,497 thấp nhất nhưng lại có mật độ hạt cao nhất là 100%. Trong khi đó, mẫu bột inulin củ đắng sâm bổ sung 5% maltodextrin có chỉ số đa phân tán PDI cao nhất, bằng 0,66 và có 2 chỉ số về kích thước hạt và mật độ hạt. Mẫu bột inulin củ đắng sâm bổ sung 15% maltodextrin lại có chỉ số PDI bằng 0,637, gần tương đương với chỉ số PDI của mẫu inulin bổ sung 5% maltodextrin. Về lý thuyết, mẫu có chỉ số PDI thấp và mật độ hạt cao tức là bột sấy phun có tính đồng nhất cao hơn.

Như vậy, mẫu bột inulin sấy phun bổ sung 10% maltodextrin có tính đồng nhất cao hơn tất cả các mẫu bột sấy phun khác.

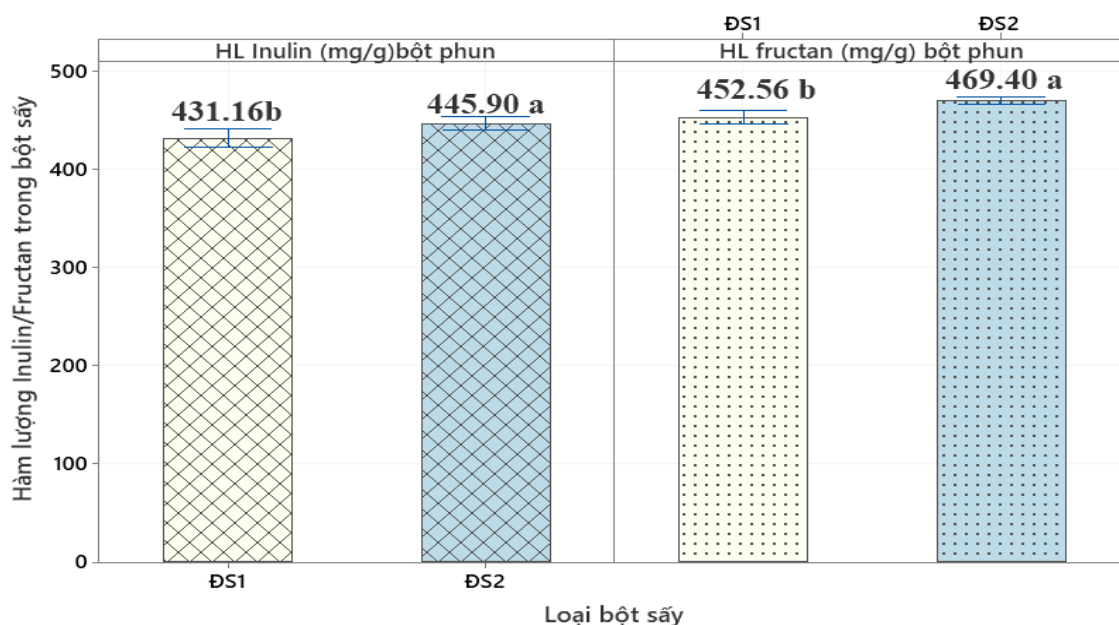
*** Về tính chất nhiệt**

Kết quả phân tích nhiệt ở hình 3.39 cho thấy mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin có một peak thu nhiệt ở 69,52°C tương ứng với sự mất nước, một peak thu nhiệt ở 206,84°C tương ứng với sự đứt gãy nhóm chức và một peak thu nhiệt (0,26J/g) ở 230,21°C, tương ứng với nhiệt phân hủy nhóm chức. Như vậy, nhiệt phân hủy nhóm chức của mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin gần bằng với nhiệt phân hủy nhóm chức của bột inulin củ đắng sâm sấy phun tinh sạch (226,96°C). Kết quả phân tích cũng cho thấy nhiệt độ phân hủy hoàn toàn mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin là 547°C, gần tương đương với nhiệt phân hủy của mẫu bột inulin tinh sạch sấy phun (537,11°C). Mặt khác, kết quả phân tích kích thước hạt còn cho thấy mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin có 2 loại hạt, không đồng đều về mặt kích thước và có PDI khá cao là 0,66.

Kết quả, chứng tỏ mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin không có tính ổn định, có nghĩa lượng maltodextrin bổ sung 5% chưa phù hợp.

Kết quả phân tích nhiệt ở hình 3.39 cho thấy mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin (Mẫu ĐS2) có 1 peak thu nhiệt ở 72,97°C và một peak thu nhiệt làm đứt gãy nhóm chức ở 152,79°C. Cả hai peak nhiệt này đều thấp hơn peak nhiệt của mẫu bột inulin tinh sạch. Tuy nhiên, nhiệt phân hủy hoàn toàn nhóm chức của mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin là 497,56°C, cao hơn nhiều so với nhiệt phân hủy hoàn toàn nhóm chức của mẫu bột inulin tinh sạch 226,96°C và nhiệt phân hủy hoàn toàn bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin > 600°C. Kết quả này chứng tỏ bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin bền nhiệt hơn mẫu inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 5% maltodextrin (ĐS1).

* Hàm lượng inulin và fructan



Hình 3.40. Sự thay đổi hàm lượng inulin và fructan của các mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun với tỷ lệ maltodextrin sử dụng khác nhau

Kết quả phân tích ở hình 3.40 cho thấy hàm lượng inulin và fructan của mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin (ĐS2) là $(445,90 \pm 2,79)$ mg/g và $(469,40 \pm 1,61)$ mg/g.

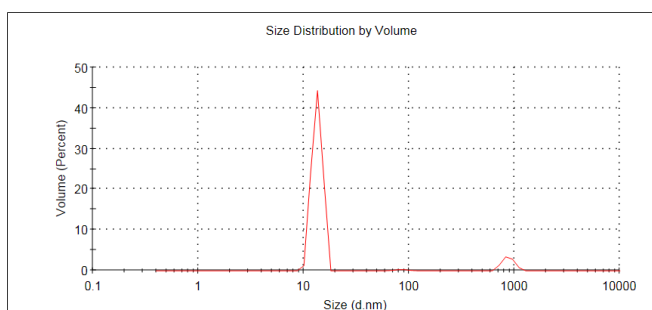
Từ những phân tích ở trên cho thấy mẫu bột inulin củ đắng sâm sấy phun bổ sung 10% maltodextrin có tính đồng nhất cao và chịu được nhiệt độ cao hơn các mẫu khác. Do vậy, nồng độ maltodextrin bổ sung 10% được lựa chọn trong quá trình sấy phun tạo bột inulin đắng sâm.

3.5.2. Xác định nhiệt độ khí đầu vào

Tiến hành 4 mẫu sấy phun tạo bột inulin củ đấng sầm với nhiệt độ khí đầu vào khác nhau: 130°C, 150°C, 185°C và 210°C. Các mẫu đều sấy phun với nhiệt độ không khí đầu ra 85°C, tỷ lệ maltodextrin bổ sung 10%, áp suất khí nén (ASKN) 3 atm, tốc độ đĩa phun (TĐDP) 16.000 vòng/phút tương đương tốc độ bơm nhu động nhập liệu (TĐBNL) là 10 ml/phút. Sau khi sấy phun đánh giá: kích thước hạt (Z-average), độ phân tán, tính chất nhiệt, hàm lượng inulin của bột inulin củ đấng sầm thu được. Kết quả được trình bày ở các hình 3.41 và các bảng 3.21.

Results

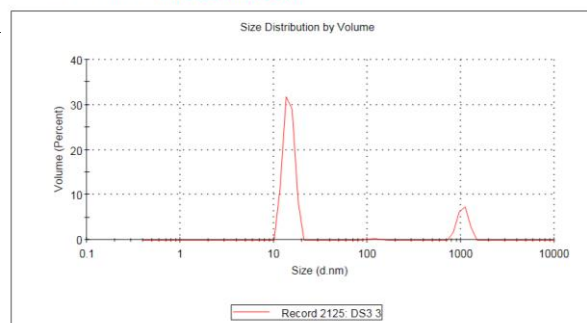
	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 1224	Peak 1: 876.4	8.4	110.7
Pdl: 0.734	Peak 2: 85.71	0.7	10.89
Intercept: 0.994	Peak 3: 13.51	90.9	1.466
Result quality: Refer to quality report			



Mẫu nhiệt độ khí đầu vào 130°C

Results

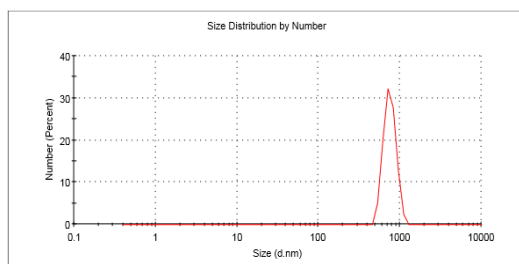
	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 1070	Peak 1: 1054	18.2	132.2
Pdl: 0.806	Peak 2: 117.3	0.8	14.57
Intercept: 0.903	Peak 3: 14.55	80.9	1.851
Result quality: Refer to quality report			



Mẫu nhiệt độ khí đầu vào 150°C

Results

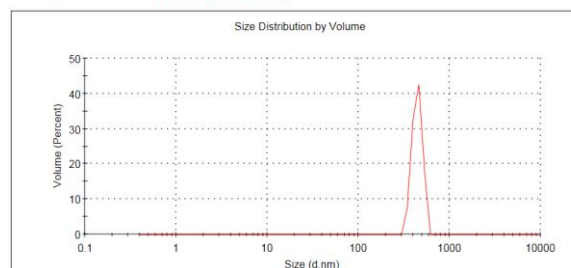
	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm)
Z-Average (d.nm): 882.2	Peak 1: 758.9	100.0	101.4
Pdl: 0.497	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.938	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Refer to quality report			



Mẫu nhiệt độ khí đầu vào 185°C

Results

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 996.2	Peak 1: 442.2	100.0	54.28
Pdl: 0.686	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 1.01	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Refer to quality report			



Mẫu nhiệt độ khí đầu vào 210°C

Hình 3.41. Giải đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán của bột inulin củ đấng sầm sấy phun với nhiệt độ khí đầu vào khác nhau

Bảng 3.21. Kích thước hạt và PDI của bột inulin củ đấng sâm sấy phun với nhiệt độ khí đầu vào khác nhau

STT	Nhiệt độ khí đầu vào (°C)	Kích thước hạt trung bình (d. nm)	Kích thước hạt và mật độ		PDI	Độ ẩm (%)
			Kích thước hạt (d. nm)	Mật độ (%)		
1	130 (ĐS 4)	1224	876,4±110,7	8,4	0,734	6,25±0,4
			85,71±10,89	0,7		
			13,51±1,466	90,9		
2	150 (ĐS 5)	1070	1054±132,2	18,2	0,806	5,40±0,05
			117,3±14,57	0,8		
			14,55±1,851	80,9		
3	185(ĐS2)	884,2	758,9±101,4	100	0,497	6,06±0,27
4	210(ĐS6)	996,2	442,2±54,28	100	0,686	4,27±0,33

Từ các kết quả trình bày ở các hình 3.41 và bảng 3.21 cho thấy mẫu sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm ở nhiệt độ khí đầu vào 185°C tạo thành chỉ một loại hạt có kích thước hạt trung bình là 884,2 nm, nhỏ nhất trong số các loại bột sấy phun đã thử nghiệm. Mặt khác, mẫu sấy phun tạo bột inulin ở nhiệt độ khí đầu vào 185°C còn có chỉ số PDI thấp nhất và bằng 0,497. Khi chỉ số PDI của hạt sấy phun nhỏ hơn 0,5 tức độ rộng phân bố kích thước hẹp và bột sấy phun có tính đồng nhất cao hơn. Ngoài ra, mẫu sấy phun tạo bột inulin ở nhiệt độ khí đầu vào 185°C còn có mật độ hạt là 100%, cao nhất trong các mẫu sấy phun. Trong khi đó các mẫu bột inulin củ đấng sâm sấy phun ở nhiệt độ khí đầu vào lớn hơn hoặc nhỏ hơn 185°C đều có kích thước hạt lớn hơn, chỉ số PDI >0,6 và tạo thành nhiều loại hạt có kích cỡ khác nhau trong một chế độ sấy. Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy mẫu bột sấy phun inulin ở nhiệt độ khí đầu vào 185°C có độ đồng đều về kích thước hạt và hạt có kích thước nhỏ, mịn hơn các mẫu bột khác. Kết quả này chứng tỏ chế độ sấy mẫu bột này là phù hợp.

Từ những phân tích ở trên cho phép lựa chọn các thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột inulin: chất mang là maltodextrin sử dụng với nồng độ 10%, nhiệt độ khí đầu vào 185°C và nhiệt độ buồng sấy 85°C, áp suất khí nén 3 atm, tốc độ bơm nhập liệu 10 ml/p tương ứng với tốc độ đĩa phun 16000 v/p.

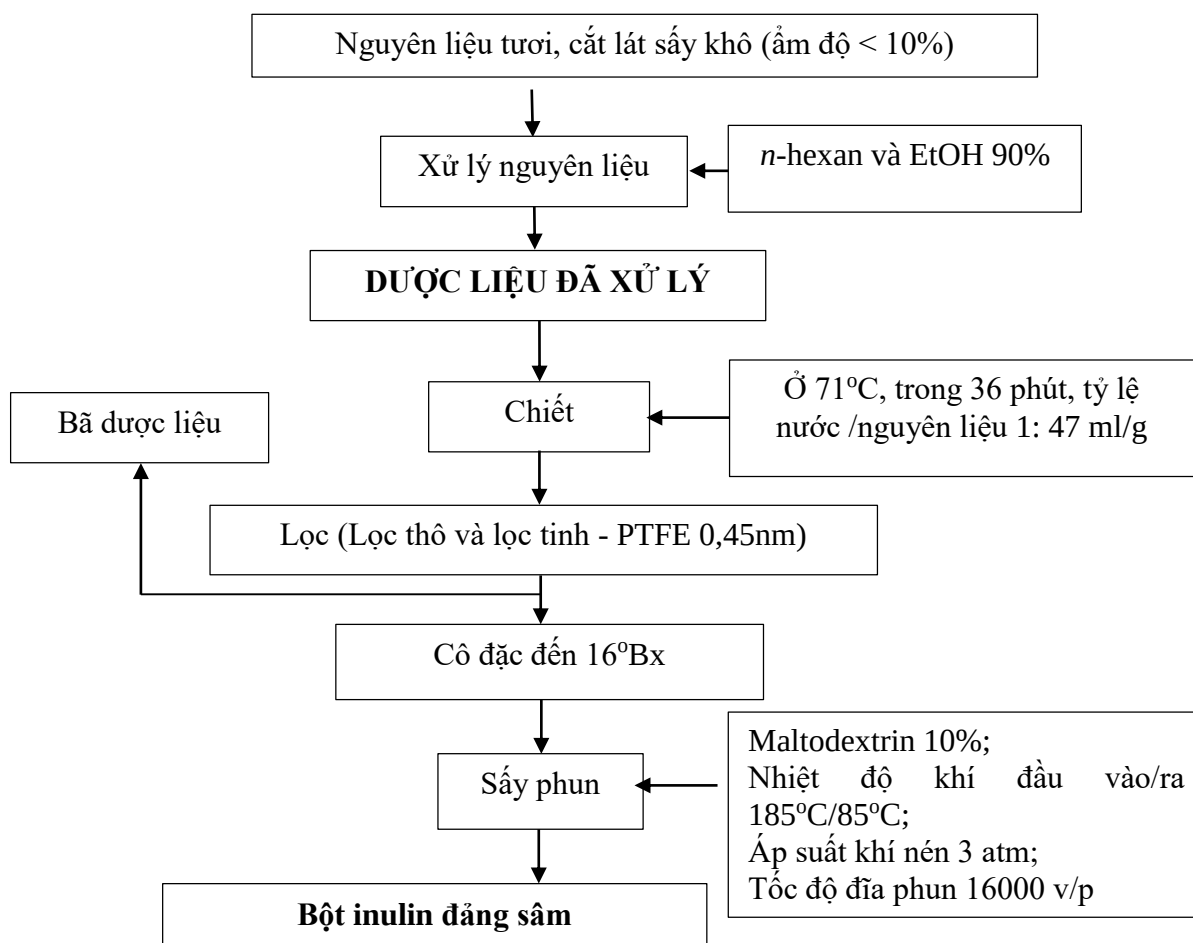
3.5.3. Đề xuất quy trình sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm và sản xuất thử

3.5.3.1. Đề xuất quy trình sấy phun

Từ các nghiên cứu ở trên, cho phép đề xuất quy trình sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm trình bày ở hình 3.42.

* Thuyết minh qui trình

+ **Nguyên liệu:** củ đấng sâm tươi mọc tự nhiên tại Lạc Dương, Lâm Đồng. Sau khi thu hoạch, tiến hành phân loại và lựa chọn củ tươi đạt ba năm tuổi. Sau đó, tiến hành xử lý, rửa sạch tạp chất, thái mỏng (1 mm) và sấy khô ở nhiệt độ 55°C cho đến khi đạt ẩm độ <10% thì bao gói bằng bao bì PA hút chân không 100%, bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh (6 ± 1) °C để dùng làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.



Hình 3.42. Qui trình sấy phun tạo bột inulin củ đấng sâm

+ **Xử lý nguyên liệu:** củ đấng sâm khô được nghiền nhỏ <125 mm và rây. Sau đó, bột củ đấng sâm được xử lý loại chất béo bằng n-hexan tinh khiết và sấy khô ở nhiệt độ 55°C. Tiếp theo, bột củ đấng sâm tiếp tục được xử lý bằng Ethanol 90% trong 15 phút theo hình thức chưng cất hồi lưu để loại đường tự do, chất màu, các acid amin và các chất tan trong ethanol 90%. Nguyên liệu sau khi xử lý sơ bộ được sấy khô ở nhiệt

độ 55°C và dùng làm nguyên liệu chiết inulin, fructan.

+ **Chiết:** chiết inulin và fructan bằng nước cất hai lần trong điều kiện có sự hỗ trợ của sóng siêu âm ở tần số 37 KHz, nhiệt độ 71°C với tỉ lệ nước so với nguyên liệu 47 ml/gam trong 36 phút.

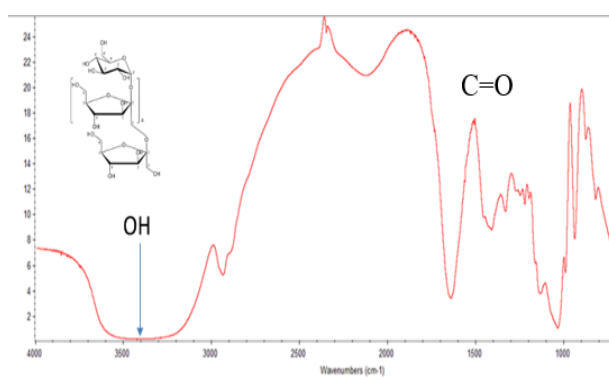
+ **Lọc:** trước tiên lọc dịch chiết bằng vải lọc để thu dịch lọc thô. Sau đó, dịch lọc tiếp tục được lọc bằng lưới lọc với kích cỡ 0,1mm và sau đó lọc qua màng siêu lọc PTFE 0,45nm để thu dịch lọc inulin, fructan.

+ **Cô đặc:** cô đặc dịch lọc bằng thiết bị cô quay chân không với tốc độ quay 90v/p ở 55°C cho đến dịch lọc đạt độ đặc 16°Bx và thu dịch cô đặc để dùng cho quá trình sấy phun.

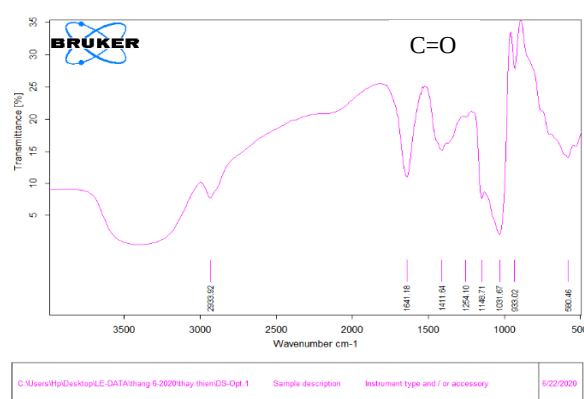
+ **Sấy phun:** tiến hành sấy phun tạo bột inulin củ đắng sâm bằng máy sấy phun, sử dụng chất mang maltodextrin ở nồng độ 10%. Quá trình sấy phun được thực hiện ở nhiệt độ khí đầu vào 185°C, nhiệt độ buồng sấy 85°C, áp suất khí nén 3 atm, tốc độ bơm nhập liệu 10 ml/p tương đương với tốc độ đĩa phun 16000 v/p. Bột sấy phun inulin thành phẩm được bao gói bằng bao bì PA hút chân không 100% và bảo quản nhiệt độ phòng (25°C).

3.5.3.2. Sản xuất thử và đánh giá chất lượng bột inulin củ đắng sâm

Tiến hành sấy phun tạo bột inulin củ đắng sâm thành phẩm theo quy trình đã đề xuất ở trên và tiến hành đánh giá chất lượng bột inulin đắng sâm, đánh giá đặc tính cấu trúc của bột inulin củ đắng sâm sấy phun bằng kỹ thuật đo phổ FT-IR. Kết quả trình bày ở hình 3.43 và bảng 3.22.



Phổ FT- IR của bột inulin củ đắng sâm
tinh sạch



Phổ FT- IR của bột inulin củ đắng sâm
sấy phun thành phẩm

Hình 3.43. Phổ FT- IR của bột inulin củ đắng sâm tinh sạch và sấy phun

**Bảng 3.22. Kết quả phân tích một số thành phần và đặc tính của bột inulin củ
đăng sâm sậy phun thành phẩm**

STT	Đặc tính	Đơn vị tính	Kết quả	Giới hạn cho phép
1. Trạng thái cảm cảm quan				
1.1.	Màu		Nâu vàng	
1.2	Mùi		Có mùi thơm đặc trưng của đăng sâm	
1.3	Vị		Ngọt nhẹ	
2. Đặc tính lý - hóa học				
2.1	Độ ẩm	%	6,06±0,27	
2.2	Nhiệt phân hủy hoàn toàn các phân tử	°C	> 600	
2.3	Kích thước hạt	d.nm	884,2	
2.4	Mật độ	%	100	
2.5	PDI		0,497	
2.7	pH		5,18±0,01	
2.8	Hàm lượng inulin	(mg/g)	445,90 ± 2,79	
2.9	Hàm lượng fructan	(mg/g)	469,40 ± 1,61	
2.10	Độ hòa tan	g/ml/phút	1/9,5±0,5/15	Thuộc loại dễ tan (ĐĐVN, V 2017)
2.10	Tro (tro) tổng số	%	4,82 ± 0,07	
3. Hàm lượng kim loại nặng (QĐ 46/2007 của BYT. Ngày Ngày 19/12/2007*)				
	Pb	ppm	KPH	10
	Cd	ppm	KPH	0,3
	Hg	ppm	KPH	0,5
	As	ppm	KPH	5,0
2.11	Tạp chất vô cơ	ppm	KPH	
4. Kiểm nghiệm vi sinh vật (QĐ 46/2007 của BYT. Ngày Ngày 19/12/2007*)				
3.1	Tổng số VSVHK	CFU/g	1,0 x10 ²	10 ⁴
3.2	<i>E. coli</i>	CFU/g	KPH	Không có
3.3	<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/g	KPH	10
3.4	<i>Salmonella spp</i>	Có hoặc KPH/25 g	KPH	Không có
3.4	Tổng số bào tử nấm men- nấm mốc	CFU/g	KPH	10 ²

Ghi chú: KPH - Không phát hiện

**** Quyết định v/v ban hành “Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm”**

Từ các kết quả phân tích ở bảng 3.22 và hình 3.43 cho thấy:

*** Về mặt cấu trúc của inulin:** kết quả phân tích phổ FT- IR của bột inulin củ đắng sâm sấy phun thành phẩm và bột inulin tinh khiết (Hình 3.43) cho thấy trên phổ FT- IR, cả 2 chế phẩm đều có một peak tròn rộng biểu hiện cho nhóm OH kéo dài từ vùng 3300 cm^{-1} tới 3500 cm^{-1} , peak biểu hiện cho C=O tại vùng $1631\div 1640\text{ cm}^{-1}$ và peak biểu hiện CH tại vùng $2927\div 2932\text{ cm}^{-1}$. Kết quả này chứng tỏ cấu trúc hóa học của inulin ở 2 mẫu là không khác nhau. Thêm vào đó, cả 2 hình ảnh phổ đều có các peak tại vùng 943 cm^{-1} chỉ ra sự hiện diện của Fructose furanose không thay đổi.

Từ kết quả phân tích ở trên cho thấy inulin đã được bảo tồn cấu trúc trong quá trình sấy phun và chế độ sấy phun đã lựa chọn là phù hợp cho quá trình sấy phun tạo bột chế phẩm inulin củ đắng sâm thành phẩm.

*** Về trạng thái cảm quan**

Sản phẩm bột inulin củ đắng sâm (*C. javanica*) sấy phun thành phẩm là dạng bột có màu vàng nâu và có mùi thơm đặc trưng.

*** Về một số chỉ tiêu lý - hóa**

Kết quả phân tích cũng cho thấy bột inulin củ đắng sâm sấy phun có độ ẩm ($6,06 \pm 27$) %, hàm lượng tro tổng số: ($4,82 \pm 0,07$) % và bột tan hoàn toàn trong nước ở mức $1\text{g}/10\text{ ml}$ nước với thời gian tan nhanh (15 phút). Độ pH của bột là ($5,18 \pm 0,0$). Sản phẩm bột có hàm lượng inulin đạt trung bình ($445,90 \pm 2,79$) mg/g và hàm lượng fructan trung bình ($469,40 \pm 1,61$) mg/g. Ngoài ra, kết quả phân tích còn cho thấy sản phẩm bột inulin củ đắng sâm sấy phun không chứa kim loại nặng theo quy định của Bộ Y tế (QĐ 46/2007). Kết quả phân tích cho thấy bột inulin củ đắng sâm sấy phun đạt tiêu chuẩn về hàm lượng kim loại nặng dùng cho thực phẩm chức năng.

*** Về chỉ tiêu vi sinh vật**

Kết quả phân tích ở bảng cho 3.22 thấy sản phẩm bột inulin củ đắng sâm sấy phun đạt yêu cầu về các chỉ tiêu vi sinh vật theo quy định của Bộ Y Tế (QĐ 46/2007).

Từ những phân tích trên cho thấy sản phẩm bột inulin củ đắng sâm sấy phun sản xuất theo quy trình của luận án có chất lượng cảm quan, hóa học và các chỉ tiêu vi sinh vật đạt yêu cầu của sản phẩm thực phẩm theo Quy định hiện hành của Bộ Y tế. Như vậy, sản phẩm sấy phun đã sản xuất hoàn toàn có thể định hướng dùng trong thực phẩm và thực phẩm chức năng.

3.6. THỬ NGHIỆM SỬ DỤNG INULIN CỦ ĐẰNG SÂM TẠO BỘT SYMBIOTIC ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM

3.6.1. Ảnh hưởng của bột inulin củ đặng sâm sấy phun đến sự phát triển của một số loại vi probiotic

Inulin và FOS có khả năng kích thích tăng sinh tế bào của nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* do chúng là nguồn cơ chất cho vi khuẩn phát triển và lên men tạo ra các acid béo mạch ngắn: acetic, propionic, butyric (SCFA) - đây là các acid béo mạch ngắn có khả năng ức chế các loại vi khuẩn gây bệnh sống trong đường ruột con người. Do vậy, inulin và FOS được xem là các prebiotic [38, 130]. Chính vì thế luận án sử dụng các chủng vi khuẩn thuộc nhóm trên để thử nghiệm khả năng kích thích sinh trưởng của bột inulin củ đặng sâm sấy phun. Kết quả đánh giá hoạt tính prebiotic của bột inulin củ đặng sâm khi bổ sung với lượng 4% (tương đương 2% inulin tinh khiết) vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn được trình bày qua bảng 3.23.

Bảng 3.23. Kết quả nuôi tăng sinh khối vi khuẩn trong môi trường bổ sung bột inulin củ đặng sâm sấy phun

ST T	Loài vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)			
		Sinh khối riêng	Sau khi nuôi tăng sinh	Nuôi bổ sung bột inulin đặng sâm	
				Mật độ	Mật độ so với nuôi không bổ sung (sau tăng sinh)
1	<i>E. faecalis</i> (M1)	$1,7 \times 10^{10}$	2×10^9	5×10^9	↑2,5 lần
2	<i>L. acidophilus</i> (M2)	8×10^9	$3,1 \times 10^9$	9×10^9	↑ 2,9 lần
3	<i>L. rhamnosus</i> (M3)	$6,3 \times 10^9$	3×10^9	8×10^9	↑2,6 lần
4	<i>E. faecalis</i> (M4)	2×10^{10}	5×10^6	7×10^6	↑1,4 lần
5	<i>L. plantarum</i> (M6)	2×10^9	3×10^9	$15,9 \times 10^9$	↑5,3 lần
6	<i>L. acidophilus</i> (M7)	4×10^{10}	2×10^{10}	$2,3 \times 10^{11}$	↑11,5 lần
7	<i>B. longum</i> (M8)	10^8	$8,2 \times 10^9$	8×10^{10}	↑9,75 lần
8	<i>B. lactiCs</i> (M9)	10^8	$1,3 \times 10^9$	7×10^9	↑5,38 lần

Ghi chú: ↑: Tăng.

Từ kết quả phân tích trình bày bảng 3.23 cho thấy ở mức bổ sung 4% (w/v) bột inulin củ đặng sâm sấy phun (tương đương 1,8÷2% inulin sạch) đều có ảnh hưởng tới sự sinh trưởng phát triển của các loài vi khuẩn đã thử nghiệm và các loài vi khuẩn khác nhau sẽ phát triển khác nhau tùy thuộc vào mật độ nuôi ban đầu và phụ thuộc vào loài vi khuẩn. Cụ thể, tất cả các mẫu nuôi vi khuẩn có bổ sung 4% bột inulin củ đặng sâm đều có mức độ tăng sinh mật độ tế bào vi khuẩn trong môi trường nuôi cao hơn mẫu đối

chứng từ 1,4 lần cho tới 11,5 lần, Chẳng hạn mẫu nuôi *L. plantarum* (M6) bổ sung bột inulin củ đắng sâm làm tăng sinh khối lên gấp 5,3 lần, so với mẫu đối chứng. Cá biệt mẫu nuôi *L. acidophillus* (M7) làm tăng sinh khối lên gấp 11,5 lần so với mẫu đối chứng. Trong khi đó, mẫu nuôi 02 loài vi khuẩn yếm khí thuộc *Bifidobacterium* là *B. longum* (M8) và *B. lactiCs* (M9) có bổ sung bột inulin củ đắng sâm cũng có mức độ tăng sinh sinh khối tương ứng là 9,75 lần và 5,38 lần.

So sánh với chuẩn qui định (TCVN 9635: 2013) thì tất cả các mẫu nuôi vi khuẩn có bổ sung 4% bột inulin củ đắng sâm sấy phun đều làm tăng mật độ vi khuẩn và tất cả các mẫu đều có mật độ vi khuẩn cao hơn về số lượng vi khuẩn sống. Kết quả có thể được giải thích là do vi khuẩn có enzyme inulinase để thủy phân inulin nên có khả năng sử dụng inulin làm nguồn carbon nên số lượng tế bào của chúng tăng khi môi trường nuôi được bổ sung inulin [156].

Theo Bielecka và cộng sự (2002) thì có sự khác biệt về sinh trưởng và phát triển của chủng *Bifidobacterium* khi bổ sung FOS (DP 3-10) vào môi trường nuôi. Cụ thể, trong số 30 chủng nhóm *Bifidobacteria* được nghiên cứu có 18 chủng khi nuôi trong môi trường bổ FOS thì số lượng vi khuẩn tăng từ 1,1 đến 5,2 lần so với trong môi trường đối chứng có chứa đường sữa. Tuy nhiên một số chủng lại tăng trưởng yếu trong môi trường có bổ sung FOS do không có khả năng sử dụng FOS làm nguồn carbon [40].

Kết quả nghiên cứu của luận án có điểm giống với nghiên cứu của Chen (2012) về ảnh hưởng của thuốc cổ truyền đối với vi khuẩn đường ruột cho thấy khi bổ sung dịch chiết riêng lẻ của thảo dược có bản chất polysaccharide trên mô hình chuột bình thường cho thấy số lượng vi khuẩn nhóm *Bifidobacteria* và *Lactobacilli* gia tăng cực kỳ cao ($p < 0,01$) và khi bổ sung phối hợp dịch chiết hoàng kỳ (*Astragalus ssp*) và củ đắng sâm (*Codonopsis ssp*) trên người tình nguyện thì hàm lượng vi khuẩn nhóm *Bifidobacteria* tăng cực kỳ cao ($p < 0,01$) [48].

Từ các phân tích ở trên cho thấy bột inulin củ đắng sâm sấy phun khi bổ sung với hàm lượng 4% w/v (tương đương 1,8-2% inulin) vào môi trường nuôi cấy (MRS) có thể kích thích sinh trưởng và làm tăng sinh khối của 8 chủng vi khuẩn thử nghiệm riêng lẻ từ 1,4 lần ÷ 11,5 lần. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy bột inulin củ đắng sâm sấy phun khi bổ sung với hàm lượng 4% vào môi trường nuôi cấy có thể làm tăng sinh mạnh sinh khối các chủng L. plantarum, L. acidophillus (M7), B. longum, B. lactiCs từ 5,3 lần đến 11,5 lần. Do vậy, các chủng này được lựa chọn để phối trộn với bột inulin củ đắng sâm sấy phun tạo thành chế phẩm synbiotic trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.6.2. Tối ưu hóa công đoạn phối trộn bột inulin củ đắng sâm với sinh khối vi khuẩn

tạo chế phẩm synbiotic

3.6.2.1. Phân tích thống kê và lựa chọn mô hình phù hợp

Tiến hành tối ưu hóa quá trình phối trộn tạo synbiotic sử dụng phần mềm DE 12.0 xây dựng mô hình Mix-optimal gồm 25 tổ hợp phối trộn nuôi vi khuẩn bổ sung bột inulin củ đấng sâm sáy phun để nuôi 4 chủng vi khuẩn lactic, 4 hàm mục tiêu Y_1 , Y_2 , Y_3 , Y_4 là sinh khối các chủng vi khuẩn (Bảng 3.24). Giới hạn dao động các biến độc lập đầu vào $X_1(0.1 \div 2.6)$ g; Các biến X_2 ; X_3 ; X_4 ; X_5 dao động trong khoảng $(0,1 \div 1,0)$ g tương ứng với số g bột inulin củ đấng sâm và sinh khối (CFU/g) của *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. lactiCs*. Kiểm tra số lượng khuẩn lạc trong các tổ hợp hợp nuôi vi khuẩn phối trộn bột inulin củ đấng sâm với tỷ lệ bổ sung khác nhau sau 36 - 48 giờ nuôi cấy. Kết quả trình bày ở các bảng 3.24 ÷ 3.25.

Bảng 3.24. Tổ hợp phối trộn prebiotic và probiotic													
Run	Biến độc lập đầu vào (g)					Hàm mục tiêu Yi ($Y_i \times 10^8$ CFU/g)							
						<i>Y1- L. acidophilus</i>		<i>Y2- L. plantarum</i>		<i>Y3- B. longum</i>		<i>Y4- B. lactiCs</i>	
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	GT thực nghiệm	GT ước đoán	GT thực nghiệm	GT ước đoán	GT thực nghiệm	GT ước đoán	GT thực nghiệm	GT ước đoán
1	0.744	1.000	0.607	0.549	0.100	25	19	113	113	39	40	72	61
2	0.100	0.691	0.584	0.642	0.982	33	29	11	37	2	18	5	6
3	1.357	0.268	1.000	0.275	0.100	121	121	321	318	2	4	0	0
4	0.225	1.000	1.000	0.100	0.675	36	40	22	15	0	0	66	59
5	0.906	0.642	0.824	0.100	0.528	147	142	131	153	0	0	51	86
6	1.975	0.100	0.100	0.100	0.725	61	54	25	26	0	6	199	205
7	0.888	0.646	0.163	1.000	0.303	47	53	34	25	22	27	47	43
8	1.543	0.662	0.385	0.100	0.310	150	156	123	120	32	37	96	94
9	0.711	0.100	1.000	0.189	1.000	26	27	153	146	0	4	126	108
10	0.303	1.000	0.100	1.000	0.597	22	18	0	3	64	63	95	94
11	1.255	0.167	0.522	0.100	0.956	51	57	165	167	10	8	209	217
12	1.543	0.662	0.385	0.100	0.310	165	156	131	120	41	37	119	94
13	1.108	0.100	0.584	0.760	0.448	61	64	97	98	151	138	125	157
14	1.345	0.443	0.100	0.487	0.625	115	121	0	-1	11	14	71	63
15	0.100	0.580	1.000	1.000	0.320	0	3	81	81	19	15	4	4
16	1.108	0.100	0.584	0.760	0.448	69	64	91	98	139	138	179	157
17	0.777	0.100	0.123	1.000	1.000	23	25	0	0	158	156	167	167
18	1.345	0.443	0.100	0.487	0.625	125	121	0	-1	21	14	68	63
19	1.498	0.302	0.100	1.000	0.100	20	12	1	6	29	30	0	2
20	0.188	0.100	1.000	0.713	1.000	3	-2	15	19	98	103	39	44
21	2.600	0.100	0.100	0.100	0.100	16	20	1	2	0	-2	0	1
22	0.100	0.691	0.584	0.642	0.982	25	29	65	37	32	18	2	6
23	0.800	1.000	0.100	0.100	1.000	90	90	93	94	66	66	178	177
24	1.273	1.000	0.100	0.527	0.100	48	54	0	4	49	47	0	20
25	1.108	0.100	0.584	0.760	0.448	58	64	108	98	126	138	167	157

Dựa trên các thông số được tính toán, mối tương quan giữa các hàm mục tiêu, phân tích giá trị hồi qui của các dữ liệu thực nghiệm. Thiết kế Mix-optimal đưa ra kết quả phân tích ANOVA của các hàm mục tiêu. Kết quả trình bày trong bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả phân tích Anova các hàm mục tiêu Y_i

Giá trị	Hàm mục tiêu Y_i			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
R^2	0,989	0,982	0,984	0,967
Adjusted R^2	0,975	0,957	0,9616	0,92
Predicted R^2	0,811	0,817	0,8876	0,85
Adeq Precision	26,73	21,02	20,73	14,16
Std. Dev.	7,45	12,94	9,93	19,78
Mean	60,04	62,00	44,44	82,68

Phân tích kết quả bảng 3.24 ÷ 3.25 cho thấy:

Sinh khối khuẩn lạc *L. acidophilus* dao động từ 0 đến 165×10^8 CFU/g, độ lệch chuẩn Std 7,45; sinh khối khuẩn lạc *L. plantarum* dao động từ 0 đến 321×10^8 CFU/g trung bình 62×10^8 CFU; Sinh khối khuẩn lạc *B. longum* dao động từ 0 đến 158×10^8 CFU/g; Sinh khối khuẩn lạc *B. lactiCs* dao động từ 0 đến 209×10^8 CFU/g. Các hệ số của phương trình Y_i ($R^2 > 0,95$) chỉ ra rằng chỉ có 0,05% tổng số biến thể không được mô hình giải thích. Giá trị của hệ số hồi qui điều chỉnh (Adj- R^2) $> 0,9$ xác nhận rằng mô hình này là có ý nghĩa ($p < 0,05$). Giá trị Adeq Precision đều > 4 chỉ ra các mô hình đủ tin cậy để dự đoán trong phạm vi các biến thử nghiệm.

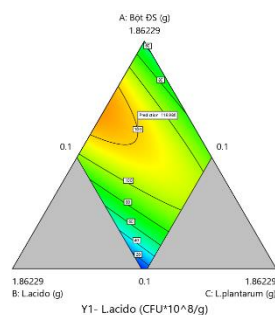
Các phương trình hồi qui Y_i dạng bậc 1 như sau:

$$Y_1 = 18,75X_1 - 751,35X_2 + 199,10X_3 - 264,81X_4 - 671,62X_5 + 1603,55X_1X_2 + 136,11X_1X_3 + 265,78X_1X_4 + 1111,23X_1X_5 + 753,29X_2X_3 + 1110,64X_2X_4 + 2489,48X_2X_5 + 85,47X_3X_4 + 545,84X_3X_5 + 1694,67X_4X_5.$$

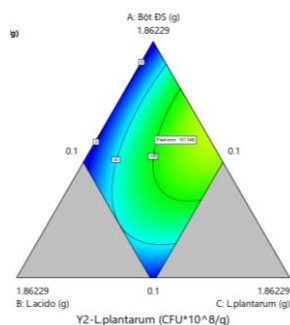
$$Y_2 = -1,17X_1 - 233,92X_2 - 502,14X_3 + 451,98X_4 + 275,61X_5 + 486,06X_1X_2 + 1895,58X_1X_3 - 719,92X_1X_4 - 179,97X_1X_5 + 1296,71X_2X_3 + 79,59X_2X_4 - 358,28X_2X_5 + 258,43X_3X_4 + 535,89X_3X_5 - 1280,18X_4X_5.$$

$$Y_3 = -2,34X_1 + 1278,78X_2 - 539,63X_3 + 465,39X_4 - 452,61X_5 - 1555,93X_1X_2 + 974,59X_1X_3 - 375,52X_1X_4 + 643X_1X_5 - 1409,43X_2X_3 - 3231,67X_2X_4 - 1069,47X_2X_5 + 789,65X_3X_4 + 1362,59X_3X_5 + 936,64X_4X_5.$$

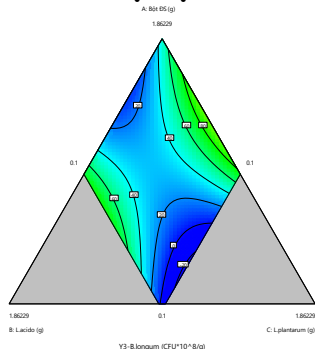
$$Y_4 = -0,467X_1 + 1470,62X_2 - 882,72X_3 + 865,77X_4 - 291,82X_5 - 2032,82X_1X_2 + 1643,38X_1X_3 - 1141,00X_1X_4 + 1489,03X_1X_5 - 956,27X_2X_3 - 3637,44X_2X_4 - 1485,51X_2X_5 + 436,49X_3X_4 + 1836,43X_3X_5 - 590,01X_4X_5.$$



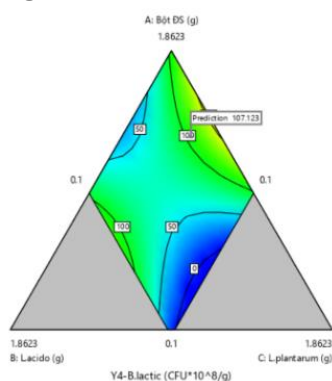
Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *L. acidophillus*



Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *L. plantarum*



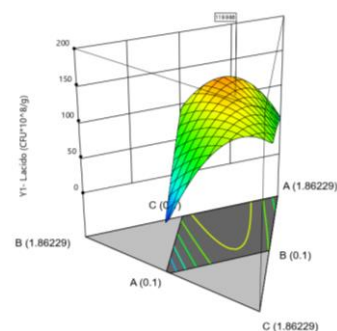
Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin củ đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *B. longum*



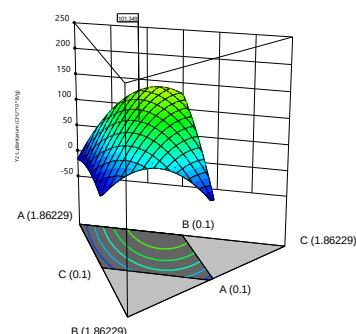
Đường đồng mức biểu diễn ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin củ đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *B. lactiCs*

A. Mô hình 2D

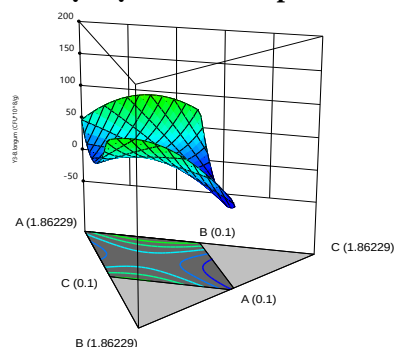
Hình 3.44. Mô hình 2D, 3D của các hàm mục tiêu Y_i dưới tác động của các yếu tố đầu vào



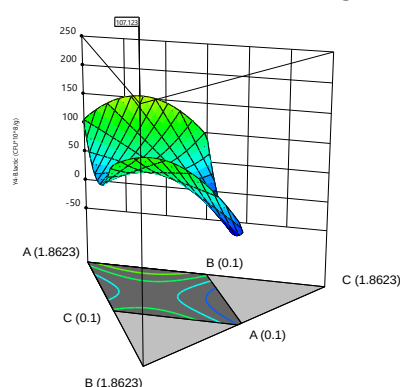
Ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *L. acidophillus*



Ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *L. plantarum*



Ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin củ đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *B. longum*



Ảnh hưởng của tỷ lệ bột inulin củ đẳng sâm đến mật độ vi khuẩn *B. lactiCs*

B. Mô hình 3D

Mô hình 2D và 3D (Hình 3.44) cho thấy giá trị tối ưu nằm ở đường biên của mô hình, phù hợp với thiết kế của Mix- optimal ban đầu. Giá trị P-value được sử dụng như một công cụ để kiểm tra tầm quan trọng của từng hệ số tương quan, từ đó có thể chỉ ra sự tương tác giữa các biến trong mô hình và giá trị P-value càng nhỏ hệ số tương quan càng có ý nghĩa. Các giá trị P của mô hình < 0.0001 cho thấy sự phù hợp của mô hình thực nghiệm là rất cao ($p < 0,01$) (Bảng 3.26).

Giá trị các hệ số Bij của X_1X_2 ; X_1X_3 ; X_1X_4 ; X_1X_5 thực nghiệm đều $< 0,05$ chứng minh có sự tương quan cao giữa tỷ lệ bột inulin củ đắng sâm sử dụng và các loại vi khuẩn thử nghiệm ($0,01 < p < 0,05$). Giá trị các hệ số Bij của các biến kết hợp X_2X_3 ; X_2X_4 ; X_2X_5 ; X_3X_4 ; X_3X_5 ; X_4X_5 thực nghiệm $> 0,05$ chứng minh có sự tăng sinh và cạnh tranh của các chủng thử nghiệm khi nuôi chung trong môi trường có bổ sung bột inulin củ đắng sâm ($0,01 < p < 0,05$).

Bảng 3.26. Mật độ xác suất của các hàm mục tiêu

Giá trị	Y_1 - <i>L. acidophilus</i>		Y_2 - <i>L. plantarum</i>		Y_3 - <i>B. longum</i>		Y_4 - <i>B. lactiCs</i>	
	F	P	F	P	F	P	F	P
Mô hình	69.33	< 0.0001	39.64	< 0.0001	43.93	< 0.0001	20.72	< 0.0001
⁽¹⁾ Linear Mixture	87.56	< 0.0001	75.81	< 0.0001	54.53	< 0.0001	25.73	< 0.0001
X_1X_2	200.99	< 0.0001	6.14	0.0326	106.53	< 0.0001	45.83	< 0.0001
X_1X_3	1.51	0.2478	97.19	< 0.0001	43.48	< 0.0001	31.16	0.0002
X_1X_4	4.60	0.0575	11.23	0.0073	5.17	0.0462	12.03	0.0060
X_1X_5	93.84	< 0.0001	0.8187	0.3868	17.69	0.0018	23.81	0.0006
X_2X_3	21.69	0.0009	21.38	0.0009	42.75	< 0.0001	4.96	0.0501
X_2X_4	35.58	0.0001	0.0608	0.8102	169.58	< 0.0001	54.15	< 0.0001
X_2X_5	242.15	< 0.0001	1.67	0.2255	25.16	0.0005	12.23	0.0057
X_3X_4	0.3309	0.5778	1.01	0.3394	15.90	0.0026	1.22	0.2944
X_3X_5	8.90	0.0137	2.85	0.1221	31.21	0.0002	14.29	0.0036
X_4X_5	80.41	< 0.0001	15.26	0.0029	13.83	0.0040	1.38	0.2668

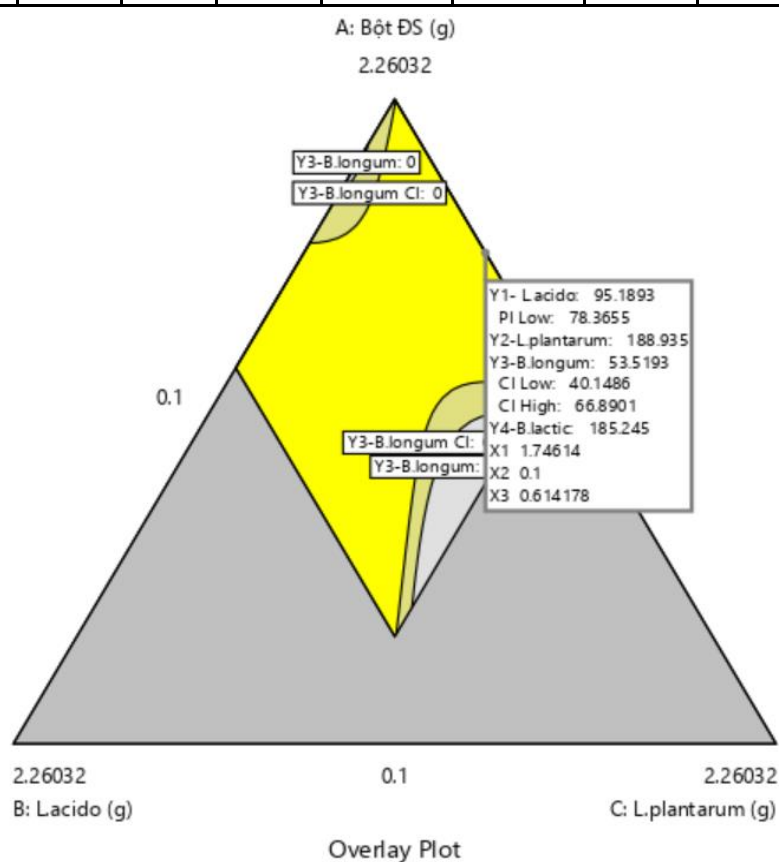
Như vậy, mô hình bậc 1 hoàn toàn phù hợp với lý thuyết và thực nghiệm với $p < 0,0001 < 0,05$ (Bảng 3.26). Các hệ số của mô hình cũng có $p < 0,05$ nên chúng hoàn toàn có ý nghĩa về mặt thống kê và phù hợp với mô hình.

3.6.2.2. Phân tích tối ưu và trùng lặp bề mặt đáp ứng các hàm mục tiêu

Tiến hành phân tích và trùng lặp 4 bề mặt đáp ứng để tìm ra tổ hợp phối trộn tối ưu trình bày ở bảng 3.27.

Bảng 3.27. Kết quả dự đoán các thông số tối ưu

Chọn lựa	Hàm lượng sinh khối phối trộn (g)					Sinh khối VSV x 10 ⁸ CFU/3g				Desirability	
	Bột đăng sâm	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. lactiCs</i>	Y1- <i>L. acidophilus</i>	Y2- <i>L. plantarum</i>	Y3- <i>B. longum</i>	Y4- <i>B. lactiCs</i>		
1	1,746	0,10	0,614	0,10	0,44	95,146	188,985	53,56	185,4	0,614	Selected
2	1,333	0,75	0,43	0,10	0,38	148,5	122,2	49,35	112,6	0,551	
3	0,100	0,55	0,66	0,92	0,76	33,89	36,77	63,66	38,65	0,278	



Hình 3.45. Kết quả trùng lặp các mặt đáp ứng

Các hàm mục tiêu được trùng lặp bề mặt đáp ứng. Hình 3.45 cho biết mật độ tối ưu của *L. acidophilus* được dự đoán là 95,18 x10⁸ CFU/g và dao động trong khoảng 74,446 - 115,81x10⁸ CFU/g; Mật độ tối ưu của *L. plantarum* được dự đoán tương ứng 188,93 x10⁸ CFU/g và dao động trong khoảng (153,07-224,82) x10⁸ CFU/g; Mật độ tối ưu của *B. longum* được dự đoán tối ưu là 53,51 x10⁸ CFU/g và dao động trong khoảng (25,91- 81,12) x10⁸ CFU/g và mật độ của *B. lactiCs* được dự đoán tối ưu đạt 185,245 x10⁸ CFU/g, động trong khoảng (130,50 -240,33) CFU/g. Tuy nhiên tần suất mà mô hình dự báo chỉ đạt 61% nên cần kiểm

tra lại tổ hợp tối ưu được đề xuất và so sánh với các tổ hợp (TH) có sinh khối cao nhất (Bảng 3.24). Kết quả trình bày qua bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả kiểm tra lại một số tổ hợp có mật độ khuẩn lạc cao nhất

Thành phần	Khối lượng trong synbiotic (g/3g)				SK riêng CFU/g	Mật độ trong synbiotic CFU/g			
	TH tối ưu	TH 12	TH 3	TH 11		TH tối ưu	TH 12	TH 3	TH 11
Bột sẩy DS	1,746	1,543	1,35	1,254		-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	0,10	0,66	0,268	0,166	5×10^{10}	$2,6 \times 10^{11}$	$15,5 \times 10^{10}$	9×10^{10}	8×10^7
<i>L. plantarum</i>	0,614	0,385	1,00	0,522	2×10^{11}	$5,6 \times 10^{11}$	8×10^{11}	$2,81 \times 10^{11}$	4×10^{11}
<i>B. longum</i>	0,10	0,1	0,275	0,1	8×10^{10}	$8,8 \times 10^{10}$	9×10^{10}	6×10^{10}	$7,5 \times 10^9$
<i>B. lactiCs</i>	0,440	0,31	0,1	0,956	10^{11}	4.1×10^{11}	3.9×10^{11}	$1,1 \times 10^{11}$	10^9
						Sự biến động mật độ trong synbiotic sau 24 ÷ 48h nuôi cấy (Số lần tăng hoặc giảm)			
<i>L. acidophilus</i>						↑5,2	↑5,1	↑1,8	K tăng
<i>L. plantarum</i>						↑2,8	↑4	1,4	↑2
<i>B. longum</i>						↑1,1	↑1,1	K tăng	K tăng
<i>B. lactiCs</i>						↑4,1	↑3,9	↑1,1	K tăng

Ghi chú: ↑ = tăng; K tăng = không tăng

Như vậy, ở tổ hợp tối ưu và tổ hợp 12 (TH 12), các chủng vi khuẩn đều gia tăng mật độ trong khi các tổ hợp còn lại vi khuẩn phát triển không đều. Cả hai tổ hợp tối ưu và tổ hợp 12 đều đạt yêu cầu về mật độ vi khuẩn. Tuy nhiên hàm lượng bột inulin củ đắng sâm bổ sung ở tổ hợp 12 cần ít hơn. Vì vậy hàm lượng bột inulin củ đắng sâm 0,514 g được phối trộn với sinh khối *L. acidophilus* 0,22 g (SK riêng 5×10^{10} CFU/g); 0,128 g sinh khối *L. plantarum* (SK riêng 2×10^{11} CFU/g); 0,033g *B. longum* (SK riêng 8×10^{10} CFU/g) và 0,1 g sinh khối *B. lactiCs* (SK riêng 10^{11} CFU/g) được chọn lựa để tạo chế phẩm synbiotic.

Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của tác giả Li và cộng sự (2018) về hoạt tính prebiotic của 3 loại Inulin dạng fructan trong loài *C. pilosula* đến vi khuẩn *B. longum* khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy (MRS) với nồng độ 2%. Cơ sở để giải thích được cho là DP (Degree polimer) của fructan là chìa khóa quyết định mà trong đó bao gồm các yếu tố như cấu trúc hóa học, số lượng các đơn vị monomer, DP và liên kết mạch thẳng hay mạch nhánh cũng như khả năng hòa tan trong nước [93].

Với những phân tích ở trên, có thể thấy rằng bột inulin đẳng sâm có đặc tính prebiotic cao, kích thích vi khuẩn đơn lẻ gia tăng mật độ cao hơn khi phối hợp nhiều chủng vì bản chất các vi khuẩn có đặc tính giống nhau sẽ cạnh tranh dinh dưỡng.

Từ các kết quả nghiên cứu đã xác định được công thức tối ưu cho việc phối trộn tạo synbiotic (g/g): hàm lượng bột inulin đẳng sâm 0,514 g được phối trộn với sinh khối L. acidophillus 0,22 g (SK riêng 5×10^{10} CFU/g); 0,128 g sinh khối L. plantarum (SK riêng 2×10^{11} CFU/g); 0,033 g B. longum (SK riêng 8×10^{10} CFU/g) và 0,1g sinh khối B. lactiCs (SK riêng 10^{11} CFU/g) được chọn lựa để tạo chế phẩm synbiotic.

3.7. THỬ NGHIỆM CHẾ PHẨM SYNBIOTIC TRÊN CHUỘT THÍ NGHIỆM

3.7.1. Thử nghiệm độc tính cấp

Chế phẩm synbiotic được phân tán trong nước cất ở nồng độ cao nhất có thể cho chuyển qua được kim cho chuột uống là 0,73 g/ml. Sau khi cho chuột uống chế phẩm synbiotic với liều cao nhất có thể chuyển qua kim là 36,5 g/kg (tương ứng với thể tích cho uống tối đa là 50 ml/kg). Kết quả cho chuột uống chế phẩm synbiotic cho thấy chuột không có biểu hiện gì bất thường trong vòng 72 giờ và tiếp tục theo dõi chuột trong 14 ngày cho thấy chuột sống khỏe mạnh, hoạt động, di chuyển, ăn uống, đi tiểu bình thường, lông mượt, mắt sáng, phân khô và không có chuột nào chết trong suốt quá trình thử nghiệm. Mặt khác, kết quả cân trọng lượng chuột thử nghiệm độc tính (Bảng 3.29) cho thấy chuột tăng trưởng đều, ổn định.

Bảng 3.29. Kết quả cân trọng lượng chuột thử nghiệm độc tính cấp

Chuột	Giới	Trọng lượng chuột thử nghiệm (gam)			
		Ngày 1	Ngày 3	Ngày 7	Ngày 14
1	Đực	22,6	25,3	30,0	36,4
2		20,0	23,2	27,8	22,5
3		23,4	25,6	30,9	36,3
4		25,2	28,7	36,2	44,0
5		22,0	24,5	30,8	37,5
6	Cái	26,4	28,1	31,8	35,5
7		22,5	26,9	35,4	39,1
8		21,4	27,3	31,6	39,3
9		23,5	25,6	31,5	38,6
10		21,2	28,8	30,0	35,0

Từ kết quả thử nghiệm cho thấy chế phẩm synbiotic là sản phẩm không thể hiện độc tính cấp theo đường uống với liều tối đa đã cho chuột uống (D_{max}) là 36,5 g/kg. Do vậy, luận án không xác định được giá trị LD_{50} của đối với chuột thí nghiệm.

3.7.2. Tác động điều trị tiêu chảy cấp của chế phẩm synbiotic

Kết quả thử nghiệm khả năng điều trị tiêu chảy cấp của chế phẩm synbiotic được thể hiện trên hình các 3.46÷3.47 và các bảng 3.30.



Chuột bình thường

Chuột bị tiêu chảy

Hình 3.46. Hình ảnh về tình trạng phân bình thường và phân chuột bị tiêu chảy

Bảng 3.30. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột thử nghiệm tiêu chảy cấp

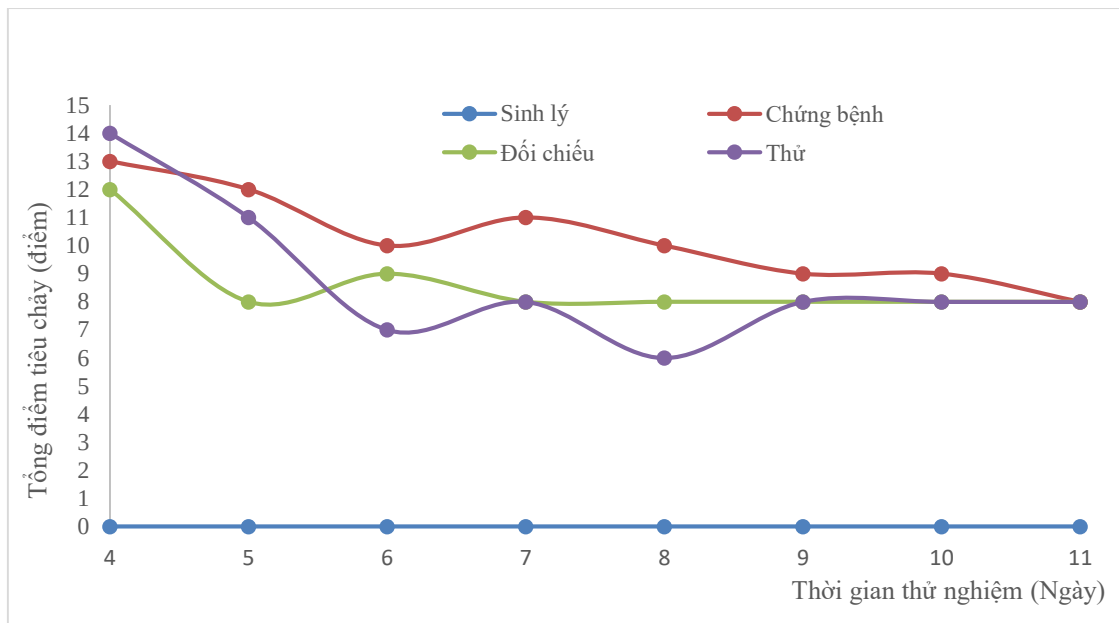
Lô thí nghiệm (n = 8)	Thời gian theo dõi (ngày)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sinh lý	23,1 ±0,4	26,2 ±0,6	28,5 ±0,7	29,4 ±0,9	29,8 ±1,2	31,5 ±1,2	30,7 ±1,5	31,9 ±1,2	32,5 ±1,1	33,2 ±1,1	32,0 ±1,0
Chứng bệnh	21,7 ±0,7	21,8 ±0,6**	24,0 ±0,6**	23,8 ±0,6**	23,1 ±0,5**	24,1 ±0,7**	25,8 ±0,6*	27,2 ±0,5*	27,1 ±1,3*	28,8 ±0,6*	28,8 ±0,4
Đối chiếu	23,2 ±0,7	24,4 ±0,5*#	26,1 ±0,6*#	26,3 ±0,6*#	27,4 ±0,6##	28,1 ±0,9##	28,8 ±0,6##	28,8 ±0,6	31,0 ±0,5##	31,5 ±0,7#	31,5 ±0,7#
Uống synbiotic	21,9 ±0,4	23,6 ±0,5*#	24,9 ±0,5**	25,7 ±0,5**	25,3 ±0,6*#	27,7 ±0,8*#	29,2 ±0,9##	30,2 ±0,8##	30,5 ±0,5#	31,3 ±0,9#	30,7 ±0,9

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$: khi so sánh với lô chứng bệnh ở cùng thời điểm

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy:

* **Về trạng thái phân:** Kết quả quan sát cho thấy phân chuột ở lô sinh lý có trạng thái khô rắn và có màu đậm trong suốt quá trình thử nghiệm. Trong khi đó ở lô thí nghiệm cho uống hỗn hợp kháng sinh streptomycin liều 2 g/kg và lincomycin liều 3 g/kg, sau 4 ngày tất cả chuột đều xuất hiện triệu chứng tiêu chảy từ nhẹ đến nặng, cụ thể tăng số lần đi đại tiện, phân ở trạng thái mềm đến lỏng, màu nhạt và có hiện tượng dính bả ở hậu môn, mức độ tăng cân thấp, chứng tỏ streptomycin và lincomycin đã gây được mô hình tiêu chảy cấp trên chuột nhắt.



Hình 3.47. Sự thay đổi tổng điểm tiêu chảy ở các lô chuột thử nghiệm theo thời gian thí nghiệm

*** Trọng lượng trung bình của chuột thí nghiệm:** kết quả phân tích cho thấy các lô chuột trước khi bắt đầu thử nghiệm đều có trọng lượng tương đương nhau và sự khác biệt về trọng lượng giữa chúng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả phân tích cũng cho thấy chuột ở lô sinh lý có trọng lượng cơ thể tăng đều trong suốt quá trình thử nghiệm với mức tăng trung bình 1-2 g/ngày. Lô chứng bệnh, chuột có trọng lượng cơ thể tăng chậm hoặc hầu như không thay đổi và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý ở cùng thời điểm cân trọng lượng chuột từ ngày 2 đến ngày 10 ($p < 0,05$). Trong khi đó, ở lô điều trị với thuốc đối chiếu Bioflora với liều 0,067 viên/kg, chuột có trọng lượng cao hơn và có ý nghĩa thống kê so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$) và khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Kết quả phân tích cũng cho thấy so với lô chứng bệnh, lô chuột uống chế phẩm synbiotic có trọng lượng cơ thể khác biệt không đáng kể trong 4 ngày đầu gây bệnh ($p > 0,05$) nhưng trong giai đoạn được điều trị bằng chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg/ngày thì chuột tăng cân đều, cao hơn so với lô chứng bệnh sau 1 ngày điều trị ($p < 0,05$) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chuột ở lô sinh lý từ sau 2 ngày điều trị ($p > 0,05$).

*** Tác động của chế phẩm synbiotic lên tình trạng tiêu chảy**

Kết quả đánh giá điểm tiêu chảy ở chuột sau 4 ngày uống hỗn hợp kháng sinh liều cao và hàng ngày trong giai đoạn điều trị cho thấy chuột ở lô sinh lý đều có tổng điểm tiêu chảy bằng 0 trong suốt quá trình thử nghiệm. Trong khi đó, các lô chuột uống hỗn hợp

kháng sinh sau 4 ngày có tổng điểm tiêu chảy tăng lên khoảng 12-14. Trong giai đoạn điều trị, lô chứng bệnh có tổng điểm tiêu chảy giảm từ từ chứng tỏ có sự tự hồi phục nhưng chậm, trong khi lô chuột được điều trị với thuốc đối chiếu Bioflora hoặc chế phẩm synbiotic đều có tổng điểm tiêu chảy giảm nhanh và mạnh hơn so với lô chứng bệnh (Bảng 3.30).

Từ các phân tích ở trên cho thấy chế phẩm synbiotic có khả năng điều trị tiêu chảy ở chuột thí nghiệm.

3.7.3. Tác động kích thích miễn dịch của chế phẩm synbiotic

Kết quả thử nghiệm khả năng kích thích miễn dịch của chế phẩm synbiotic trên chuột thử nghiệm được trình bày ở các bảng 3.31÷3.35.

Bảng 3.31. Kết quả phân tích công thức máu của chuột trước thử nghiệm

Chuột	Số lượng BC (10 ⁹ /L)	Số lượng BC trung tính (10 ⁹ /L)	Số lượng BC lympho (10 ⁹ /L)	Số lượng BC mono (10 ⁹ /L)	% BC trung tính	% BC lympho	% BC mono	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	RKHÔ	PLT	MPV	PKHÔ
1	6,2	0,3	5,1	0,8	3,9	82,7	13,4	10,3	16,7	58,6	57	16,1	28,4	15,9	1974	4,8	6,8
2	9,1	0,6	7,6	0,9	4,4	84,6	11,0	7,9	12,2	44,5	56	15,4	27,4	20,6	930	5,0	9,6
3	5,3	0,6	4,4	0,3	9,6	83,2	7,2	8,9	14,1	49,7	56	15,9	28,4	16,9	2320	4,9	6,7
4	5,9	0,2	5,2	0,5	1,7	88,9	9,4	10,8	16,4	61,0	57	15,3	26,9	18,3	2393	5,8	6,4
5	3,7	0,3	3,0	0,4	4,9	82,2	12,9	9,4	14,7	54,6	58	15,6	26,9	19,8	2717	6,4	5,5
6	5,8	0,2	5,1	0,5	2,3	88,5	9,2	9,8	14,4	52,5	54	14,7	27,3	18,6	1383	5,3	7,1
7	6,4	0,9	4,8	0,7	13,3	75,2	11,5	8,9	11,4	40,4	45	12,9	28,3	19,7	1816	8,5	8,8
8	3,1	0,2	2,7	0,2	2,5	88,0	9,5	8,3	12,9	46,3	56	15,5	27,8	18,5	2824	5,4	6,4
TB	5,69	0,41	4,74	0,54	5,33	84,16	10,51	9,29	14,10	50,95	54,88	15,18	27,68	18,54	2044,63	5,76	7,16
SEM	0,64	0,09	0,53	0,09	1,43	1,60	0,73	0,34	0,67	2,50	1,47	0,36	0,23	0,55	231,23	0,43	0,48

Chú thích:

WBC: Số lượng bạch cầu

RBC: Lượng hồng cầu

HgB: Huyết sắc tố

MCV: Thể tích trung bình hồng cầu

HCT: Thể tích khối hồng cầu

PLT: Số lượng tiểu cầu

RKHÔ: Tỷ lệ phân bố hồng cầu

MCH: Huyết sắc tố trung bình hồng cầu

MCHC: Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu

Bảng 3.32. Kết quả đánh giá trọng lượng cơ thể chuột ở các lô thử nghiệm

Lô (n = 8)	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
Sinh lý	23,84 ± 1,64	25,79 ± 1,53	27,40 ± 1,43	28,43 ± 1,12	28,38 ± 1,14
Chứng bệnh	23,94 ± 0,84	24,63 ± 0,87	25,70 ± 0,98	24,60 ± 0,89*	25,56 ± 0,87*
Filgrastim 50µg/kg	21,39 ± 0,92 [#]	20,96 ± 0,76 ^{*#}	21,86 ± 0,78 ^{**##}	22,29 ± 0,81 ^{**#}	22,18 ± 1,09 ^{**#}
Synbiotic 1,2 g/kg	21,60 ± 1,01	20,50 ± 0,91 ^{###}	21,71 ± 0,79 ^{*#}	22,11 ± 0,90 ^{**}	21,14 ± 0,97 ^{**##}

* $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$: khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm

[#] $p < 0,05$ và ^{##} $p < 0,01$: khi so sánh với lô chứng bệnh ở cùng thời điểm

Bảng 3.33. Trọng lượng tương đối của một số cơ quan miễn dịch ở chuột thí nghiệm

Lô (n = 8)	Gan	Lách	Tuyến ức	Tuyến thượng thận
Sinh lý	4,52 ± 0,66	0,52 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,01 ± 0,00
Chứng bệnh	3,92 ± 0,86	0,18±0,02**	0,09 ± 0,01**	0,02 ± 0,00
Filgrastim 50µg/kg	5,86 ± 0,40	0,21±0,02**	0,09 ± 0,01**	0,02 ± 0,00
Biotic 1,2 g/kg	4,97 ± 0,82	0,21±0,03**	0,08 ± 0,01**	0,02 ± 0,00

** $p < 0,01$: so với lô sinh lý

Bảng 3.34. Sự thay đổi về số lượng và công thức bạch cầu (BC) của chuột ở các lô thử nghiệm

Lô (n = 8)	Tổng số lượng BC	Số lượng BC ($10^9/L$)			Tỷ lệ BC (%)		
		Trung tính	Lympho	Mono	Trung tính	Lympho	Mono
Sinh lý	6,13 ± 0,34	0,26 ± 0,04	5,56 ± 0,33	0,30 ± 0,06	3,09 ± 0,98	91,30 ± 1,26	5,61 ± 0,64
Chứng bệnh	1,03 ± 0,06**	0,14 ± 0,02*	0,84 ± 0,05**	0,20 ± 0,12*	2,13 ± 0,27	88,26 ± 1,58	9,61 ± 1,44*
Filgrastim 50µg/kg	2,10 ± 0,17***	0,16 ± 0,03	1,71 ± 0,14***	0,23 ± 0,04	2,90 ± 0,48	84,80 ± 1,43*	12,30 ± 1,08**
Synbiotic 1,2 g/kg	1,09 ± 0,08***	0,13 ± 0,03	0,85 ± 0,07***	0,10 ± 0,01	8,20 ± 2,18 [#]	82,89 ± 2,95*	8,91 ± 1,10**

* $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ so với lô sinh lý, [#] $p < 0,05$ và *** $p < 0,01$ so với lô chứng bệnh

Bảng 3.35. Kết quả phân tích công thức máu của chuột thử nghiệm

Lô (n = 8)	RBC ($10^{12}/L$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	R khô (%)	PLT ($10^9/L$)	MPV	P khô
Sinh lý	8,89 ± 0,47	11,08 ± 1,62	52,51 ± 3,09	59,00 ± 0,63	12,43 ± 1,90	21,11 ± 3,24	18,70±0,60	1229,00 ± 88,96	6,55 ± 0,26	13,09 ± 0,86
Chứng bệnh	5,89 ± 0,55**	8,88 ± 0,59*	30,79 ± 2,37**	53,13 ± 1,98*	15,49±0,68**	29,16 ± 0,42	18,93 ± 0,72	898,25 ± 121,90	7,48 ± 0,63	8,89 ± 0,60**
Filgrastim 50µg/kg	6,41 ± 0,64**	9,81 ± 1,05	34,13 ± 4,00**	52,63 ± 1,27**	15,26 ± 0,28	29,05±0,51**	19,45 ± 1,04	818,88 ± 97,71*	7,40 ± 0,45	9,16 ± 1,15
Synbiotic 1,2 g/kg	7,46 ± 0,29***	11,38 ± 0,39 [#]	40,49 ± 1,64***	54,38 ± 1,67*	15,33 ± 0,58	28,16 ± 0,44**	18,19 ± 0,78	1037,00 ± 99,87	7,50 ± 0,62	11,38 ± 1,31

* $p < 0,05$ và ** $p < 0,01$ so với lô sinh lý, $p < 0,05$ và *** $p < 0,01$ so với lô chứng bệnh

Chú thích:

RBC: Lượng hồng cầu; HgB: Huyết sắc tố MCV: Thể tích trung bình hồng cầu

HCT: Thể tích khối hồng cầu

PLT: Số lượng tiểu cầu R khô: Tỷ lệ phân bố hồng cầu; MCH: Huyết sắc tố trung bình hồng cầu MCHC: Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu

Từ các kết quả phân tích ở các bảng 3.31 ÷ 3.35 cho thấy:

*** Về công thức máu của chuột trước thử nghiệm:** Kết quả phân tích công thức máu của chuột trước thử nghiệm so sánh với các chỉ số sinh hóa máu ở chuột bình thường do Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. (2001), The laboratory mouse, CRC Press Inc., USA công bố cho thấy các thông số này nằm trong khoảng giới hạn bình thường (109/L) và chuột đạt tiêu chuẩn sử dụng cho thí nghiệm.

*** Về trọng lượng cơ thể chuột ở các lô thí nghiệm**

Kết quả phân tích cho thấy khi tiêm phúc mạc chuột bằng cyclophosphamid để gây suy giảm miễn dịch cho thấy trọng lượng của chuột ở lô chứng bệnh giảm khoảng 3 - 4 g so với lô sinh lý (Bảng 3.32) và sự khác biệt có ý nghĩa vào ngày 4,5 ($p < 0,05$). Tại cùng thời điểm khảo sát, so với lô chứng bệnh, trọng lượng cơ thể chuột ở lô uống sản phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg thấp hơn và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê vào ngày 2, 3 và 5 ($p < 0,05$). Kết quả phân tích chuột ở lô đối chứng filgrastim 50 $\mu\text{g/kg}$ cũng cho kết quả tương tự đó là trọng lượng chuột thấp hơn so với lô chứng bệnh ở tất cả 5 ngày khảo sát ($p < 0,05$). Kết quả này có thể được giải thích là do tác động của cyclophosphamid lên các lô chuột khác nhau và có ý nghĩa từ ngày thứ 2 ($p < 0,05$).

Từ kết quả phân tích bước đầu ở trên cho thấy việc cho chuột dùng filgrastim hoặc uống sản phẩm synbiotic chưa thể hiện được tác động phục hồi trọng lượng cơ thể chuột bị suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamid.

*** Về trọng lượng tương đối của gan, lách, tuyến ức và tuyến thượng thận trên chuột thử nghiệm**

Kết quả đánh giá tác động cyclophosphamid lên trọng lượng tương đối của gan, lách, tuyến ức và tuyến thượng thận trên chuột thử nghiệm cho thấy so với chuột ở lô uống muối sinh lý, trọng lượng tương đối của lách và tuyến ức của chuột ở lô chứng bệnh thấp hơn lần lượt 2,9 lần và 2,1 lần ($p < 0,01$). Trong khi đó, trọng lượng tương đối của gan và tuyến thượng thận thay đổi không đáng kể và sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này chứng tỏ cyclophosphamid tiêm phúc mạc liều 150 mg/kg vào ngày thứ nhất đã gây tổn thương một số cơ quan miễn dịch chính của chuột thử nghiệm.

So với lô chứng bệnh, chuột ở lô uống sản phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg hoặc tiêm thuốc đối chứng dương filgrastim 50 $\mu\text{g/kg}$ có sự tăng trọng lượng tương đối của gan và lách, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đối với các cơ quan khác, sự thay đổi trọng lượng tương đối không đáng kể so với lô chứng bệnh.

*** Về số lượng bạch cầu và tỷ lệ giữ các loại bạch cầu**

Kết quả phân tích cho thấy chuột ở lô chứng bệnh tiêm cyclophosphamid có tổng số lượng bạch cầu giảm 6,0 lần so với lô sinh lý ($p < 0,01$) kèm theo sự giảm số lượng bạch cầu trung tính (giảm 1,9 lần), số lượng bạch cầu lympho (giảm 6,6 lần) và bạch cầu đơn nhân (giảm 1,5 lần) và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả này chứng tỏ sử dụng cyclophosphamid tiêm phúc mạc chuột với liều 150 mg/kg đã gây ra sự suy giảm miễn dịch trên chuột nhắt. Kết quả cũng cho thấy khi tiêm filgrastim phúc mạc chuột với liều 50 $\mu\text{g/kg}$ giúp tăng tổng số lượng bạch cầu và số lượng bạch cầu lympho so với lô chứng bệnh ($p < 0,05$). Ở lô cho chuột uống sản phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg liên tục trong 5 ngày đã giúp làm tăng gia khả năng đề kháng của chuột thông qua việc tăng tổng số lượng bạch cầu, số lượng bạch cầu lympho, tỷ lệ bạch cầu trung tính so với lô chứng bệnh và sự gia tăng bạch cầu có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Từ kết quả phân tích cho thấy chế phẩm synbiotic có tác động kích thích miễn dịch trên mô hình chuột nhắt bị gây suy giảm miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc với liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg.

*** Về công thức máu của chuột thử nghiệm:**

Kết quả phân tích ở bảng 3.35 cho thấy ở lô chứng bệnh tiêm cyclophosphamid, tổng số lượng hồng cầu của chuột giảm 1,5 lần so với lô sinh lý ($p < 0,01$) kèm theo sự giảm Hb, Hct MCV, tăng MCH ($p < 0,05$), giảm tổng số lượng tiểu cầu (giảm 1,5 lần). Kết quả này chứng tỏ cyclophosphamid khi tiêm phúc mạc với liều 150 mg/kg đã gây suy giảm miễn dịch ở chuột nhắt kèm theo tình trạng giảm hồng cầu và tiểu cầu. Trong khi đó khi tiêm phúc mạc chuột bằng filgrastim với liều 50 $\mu\text{g/kg}$ có sự tăng tổng số lượng hồng cầu và số lượng tiểu cầu nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Khi cho chuột uống sản phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg liên tục trong 5 ngày giúp làm tăng số lượng hồng cầu, tăng Hb, Hct so với lô chứng bệnh và sự gia tăng có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả phân tích này chứng tỏ sản phẩm synbiotic đã kích sự tăng sinh hồng cầu, tăng Hb, Hct và đã thể hiện tác động hạn chế tình trạng thiếu máu trên chuột nhắt bị tiêm phúc mạc với liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg.

Từ tất cả những phân tích ở trên cho thấy chế phẩm synbiotic đã thể hiện tác động kích thích miễn dịch trên chuột nhắt bị gây suy giảm miễn dịch bằng cách tiêm phúc mạc liều duy nhất cyclophosphamid 150 mg/kg.

3.7.4. Thử nghiệm độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic

Kết quả thử nghiệm độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic trên chuột được

	Chung	26,07 ± 0,58	29,73 ± 0,70**	29,02 ± 0,77**
Ngày 14	Đực	26,18 ± 0,66 [#]	30,36 ± 1,38*	29,88 ± 1,25*
	Cái	28,37 ± 0,63 [#]	29,70 ± 0,77	28,63 ± 0,62
	Chung	27,28 ± 0,51	30,03 ± 0,77*	29,26 ± 0,70*
Ngày 17	Đực	26,96 ± 1,12	28,02 ± 0,83	31,64 ± 1,94
	Cái	30,02 ± 0,61	30,80 ± 1,46	31,68 ± 1,45
	Chung	28,49 ± 0,79	29,41 ± 0,92	31,66 ± 1,14*
Ngày 21	Đực	31,04 ± 1,22	29,48 ± 0,91	33,34 ± 2,05
	Cái	32,10 ± 0,46	31,80 ± 1,55	31,26 ± 1,33
	Chung	31,57 ± 0,64	30,64 ± 0,93	32,30 ± 1,20
Ngày 24	Đực	32,76 ± 1,05	31,28 ± 0,86	35,64 ± 2,63
	Cái	33,06 ± 0,51	32,86 ± 1,86	31,54 ± 1,60
	Chung	32,91 ± 0,55	32,07 ± 1,00	33,59 ± 1,60
Ngày 28	Đực	33,34 ± 1,01	32,40 ± 1,22	35,94 ± 2,78
	Cái	34,48 ± 0,65	33,46 ± 1,75	32,54 ± 1,58
	Chung	34,41 ± 0,57	32,93 ± 1,02	34,24 ± 1,61

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm

[#] $p < 0,05$: khi so sánh với chuột khác giới của cùng lô thử nghiệm

Bảng 3.38. Kết quả phân tích huyết học của chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm

Chỉ số	Giới	Sau 14 ngày			Sau 28 ngày		
		Lô			Lô thí nghiệm		
		Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg	Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg
WBC (10 ⁹ /L)	Đực	5,86 ± 0,99	5,94 ± 0,31 [#]	5,42 ± 0,26 [#]	4,98 ± 0,55 ^{##}	7,20 ± 1,69	9,18 ± 0,64**
	Cái	7,30 ± 0,60	8,56 ± 0,80 [#]	7,86 ± 0,74 [#]	9,20 ± 0,35 ^{##}	9,16 ± 0,67	7,96 ± 0,34*
	Chung	6,58 ± 0,60	7,25 ± 0,60	6,64 ± 0,55	7,09 ± 0,77	8,18 ± 0,92	8,57 ± 0,40
RBC (10 ¹² /L)	Đực	8,29 ± 0,30	7,35 ± 0,27	7,43 ± 0,23 [#]	8,31 ± 0,14 [#]	8,06 ± 0,12	8,03 ± 0,17
	Cái	8,95 ± 0,25	7,99 ± 0,16*	8,54 ± 0,29 [#]	7,69 ± 0,15 [#]	7,63 ± 0,23	7,87 ± 0,17
	Chung	8,62 ± 0,21	7,67 ± 0,18**	7,99 ± 0,25	8,00 ± 0,14	7,85 ± 0,14	7,95 ± 0,12
Hgb (g/dL)	Đực	14,26 ± 0,51	13,06 ± 0,80	12,20 ± 0,70	13,08 ± 0,22 [#]	12,80 ± 0,29 [#]	12,38 ± 0,31
	Cái	14,46 ± 0,56	12,96 ± 0,50	14,12 ± 0,76	11,98 ± 0,16 [#]	11,42 ± 0,46 [#]	12,10 ± 0,09
	Chung	14,36 ± 0,36	13,01 ± 0,45	13,16 ± 0,58	12,53 ± 0,22	12,11 ± 0,34	12,24 ± 0,16
HCT (%)	Đực	46,64 ± 1,63	40,96 ± 2,55	40,42 ± 2,75	45,14 ± 0,86 ^{##}	44,78 ± 1,23 [#]	44,86 ± 0,55 [#]
	Cái	45,84 ± 1,92	43,62 ± 1,61	45,54 ± 2,16	41,38 ± 0,32 ^{##}	39,58 ± 1,15 [#]	42,98 ± 0,38* [#]
	Chung	46,24 ± 1,20	42,29 ± 1,49	42,98 ± 1,86	43,26 ± 0,76	42,18 ± 1,18	43,92 ± 0,45
MCV (fL)	Đực	56,40 ± 1,03 [#]	55,60 ± 1,63	54,20 ± 2,11	54,42 ± 0,74	55,66 ± 1,29 [#]	55,98 ± 0,51

	Cái	51,48 ± 1,82 [#]	54,40 ± 1,44	53,20 ± 1,36	53,92 ± 0,76	51,98 ± 0,99 [#]	54,78 ± 0,89
	Chung	53,94 ± 1,28	55,00 ± 1,04	53,70 ± 1,19	54,17 ± 0,51	53,82 ± 0,98	55,38 ± 0,52
MCH (pg)	Đực	17,16 ± 0,45	17,66 ± 0,52	16,30 ± 0,54	15,70 ± 0,13	15,82 ± 0,31	15,36 ± 0,13
	Cái	16,14 ± 0,65	16,18 ± 0,61	16,44 ± 0,52	15,14 ± 0,58	14,90 ± 0,37	15,36 ± 0,30
	Chung	16,65 ± 0,41	16,92 ± 0,45	16,37 ± 0,35	15,42 ± 0,30	15,36 ± 0,27	15,36 ± 0,16
MCHC (g/dL)	Đực	30,54 ± 0,59	31,86 ± 0,50 [#]	30,28 ± 1,17	28,94 ± 0,24	28,56 ± 0,36	27,52 ± 0,43 [*]
	Cái	31,58 ± 1,16	29,68 ± 0,56 [#]	30,96 ± 0,51	28,90 ± 0,21	28,78 ± 0,35	28,10 ± 0,14 [*]
	Chung	31,06 ± 0,64	30,77 ± 0,51	30,62 ± 0,61	28,92 ± 0,15	28,67 ± 0,24	27,81 ± 0,23 ^{**}
R khô (%)	Đực	21,56 ± 0,91	23,40 ± 1,35 [#]	20,24 ± 0,81	23,20 ± 0,72	22,22 ± 0,79	21,40 ± 0,72
	Cái	20,80 ± 0,94	19,50 ± 1,08 [#]	20,22 ± 1,07	21,30 ± 0,57	20,80 ± 1,17	20,84 ± 1,11
	Chung	21,18 ± 0,63	21,45 ± 1,04	20,23 ± 0,63	22,25 ± 0,54	21,51 ± 0,71	21,12 ± 0,63
PLT (10 ⁹ /L)	Đực	710,20 ± 55,27	890,60 ± 112,81	826,20 ± 46,21	801,80 ± 58,67	737,60 ± 104,09	748,80 ± 55,66
	Cái	744,80 ± 35,95	769,80 ± 58,07	826,40 ± 96,49	753,40 ± 70,73	597,20 ± 65,68	663,60 ± 40,04
	Chung	727,50 ± 31,61	830,20 ± 63,11	826,30 ± 50,44	777,60 ± 44,06	667,40 ± 62,56	706,20 ± 35,31

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm

[#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ khi so sánh với chuột khác giới của cùng lô thử nghiệm

Chú thích:

WBC: Số lượng bạch cầu

RBC: Lượng hồng cầu

HgB: Huyết sắc tố

MCV: Thể tích trung bình hồng cầu

HCT: Thể tích khối hồng cầu

PLT: Số lượng tiểu cầu

R khô: Tỷ lệ phân bố hồng cầu

MCH: Huyết sắc tố trung bình hồng cầu

MCHC: Nồng độ huyết sắc tố trung bình hồng cầu

Bảng 3.39. Chỉ số chức năng gan ở chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm

Thông số	Lô Giới	Sau 14 ngày			Sau 28 ngày		
		Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg	Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg
AST (U/L)	Đực	133,54 ± 17,78	149,78 ± 27,92	159,36 ± 10,98 ^{##}	173,98 ± 19,19	177,14 ± 18,44	169,18 ± 17,83
	Cái	134,74 ± 11,59	149,26 ± 11,39	109,96 ± 6,68 ^{##}	153,64 ± 9,21	184,04 ± 18,79	152,70 ± 14,17

	Chung	134,14 ± 10,01	149,52 ± 14,21	134,66 ± 10,22	163,81 ± 10,59	180,59 ± 12,46	160,94 ± 11,08
ALT (U/L)	Đực	82,78 ± 7,44	66,92 ± 6,98	70,50 ± 4,01 [#]	56,28 ± 4,50	68,96 ± 7,03	57,18 ± 5,15
	Cái	64,24 ± 1,50	61,54 ± 3,71	60,48 ± 2,37 [#]	52,66 ± 4,94	63,72 ± 10,07	51,18 ± 4,85
	Chung	73,51 ± 4,73	64,23 ± 3,83	65,49 ± 2,76	54,47 ± 3,21	66,34 ± 5,85	54,18 ± 3,48

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm

[#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ khi so sánh với chuột khác giới của cùng lô thử nghiệm

Bảng 3.40. Chỉ số chức năng thận ở chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm

Thông số	Lô Giới	Sau 14 ngày			Sau 28 ngày		
		Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg	Sinh lý	Mẫu thử 1,2 g/kg	Mẫu thử 2,4 g/kg
Ure (mmol/l)	Đực	6,57 ± 0,21	6,56 ± 0,23	7,99 ± 0,52 ^{*#}	5,87 ± 0,16	6,96 ± 0,93	9,96 ± 0,77 ^{**}
	Cái	7,50 ± 0,44	7,28 ± 0,26	6,25 ± 0,30 ^{*#}	6,93 ± 0,76	7,58 ± 0,37	8,48 ± 0,43
	Chung	7,04 ± 0,28	6,92 ± 0,20	7,12 ± 0,40	6,40 ± 0,41	7,27 ± 0,48	9,22 ± 0,48 ^{**}
Creatinin (umol/l)	Đực	39,66 ± 1,47	39,12 ± 1,94	43,60 ± 2,11	45,70 ± 1,54	45,50 ± 1,70	44,36 ± 0,99
	Cái	44,10 ± 1,29	39,62 ± 1,58 [*]	38,94 ± 0,69 [*]	44,46 ± 0,97	45,16 ± 1,95	44,78 ± 0,41
	Chung	41,88 ± 1,18	39,37 ± 1,18	41,27 ± 1,30	45,08 ± 0,88	45,33 ± 1,22	44,57 ± 0,51

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ khi so sánh với lô sinh lý ở cùng thời điểm.

[#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$ khi so sánh với chuột khác giới của cùng lô thử nghiệm.

Kết quả thử nghiệm độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic trên chuột trình bày ở các bảng 3.36 ÷ 3.40 cho thấy:

*** Về trạng thái sinh lý của chuột trước khi thí nghiệm:**

Kết quả phân tích ở bảng 3.36 cho thấy chuột nhất sử dụng cho thử nghiệm sau khi đã được nuôi ổn định ở điều kiện thí nghiệm (khoảng 7 tuần tuổi) có công thức máu (WBC, RBC, HGB, MCV, MCH, MCHC) và các thông số về chức năng gan (AST và ALT) nằm trong khoảng giới hạn của chuột bình thường theo Suckow và Cs (2001). Như vậy, chuột có công thức máu và các thông số về chức năng gan phù hợp cho việc sử dụng để đánh giá độc tính bán trường diễn của chế phẩm synbiotic. Tuy vậy, các thông số về chức năng thận

(ure, creatinin) của chuột dùng trong thí nghiệm có sự khác biệt. Sự khác biệt về các thông số chức năng thận có thể được lý giải là do sự khác biệt về mặt sinh lý giữa mỗi cá thể chuột thí nghiệm.

*** Về trọng lượng của chuột**

Kết quả phân tích cho thấy trọng lượng cơ thể của chuột được cho uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ở hầu hết các thời điểm khảo sát ($p > 0,05$), ngoại trừ thời điểm ngày 10 và ngày 14 chuột ở 2 lô cho chế phẩm synbiotic có trọng lượng tăng nhẹ so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p < 0,05$). Khi xét riêng từng giới cho thấy vào tuần thứ 2 của quá trình thử nghiệm, trọng lượng cơ thể của nhóm chuột đực ở 2 lô được cho uống chế phẩm synbiotic tăng cao hơn so với lô sinh lý ($p < 0,05$). Tuy nhiên, ở các thời điểm còn lại, trọng lượng cơ thể của nhóm chuột đực được uống chế phẩm synbiotic không khác biệt đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Đối với nhóm chuột cái, trọng lượng cơ thể của các lô chế phẩm synbiotic thay đổi không có ý nghĩa thống kê so với lô sinh lý trong suốt quá trình thử nghiệm ($p > 0,05$). Khi so sánh trong từng lô, trọng lượng cơ thể của nhóm chuột đực và chuột cái tại cùng thời điểm thử nghiệm khác biệt không đáng kể.

Như vậy, việc cho chuột uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg trong 14 ngày hoặc 28 ngày liên tiếp không làm thay đổi thể trọng chuột so với lô sinh lý. Mặt khác, kết quả cũng cho thấy giữa hai giới chuột thử nghiệm, trọng lượng cơ thể chuột trong cùng lô thử nghiệm khác biệt không đáng kể.

*** Về công thức máu huyết học**

Kết quả đánh giá các thông số huyết học của chuột sau 14 và 28 ngày thử nghiệm cho thấy sau 14 ngày thử nghiệm chỉ số huyết học của lô chuột uống chế phẩm synbiotic với liều sử dụng 1,2 g/kg và 2,4 g/kg khác biệt không có ý nghĩa so với lô sinh lý ($p > 0,05$). Tuy vậy, số lượng hồng cầu (RBC) của chuột được uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg giảm nhẹ ($p < 0,05$), nhưng vẫn nằm trong giới hạn cho phép của chuột bình thường. Khi phân tích theo giới tính của chuột cho thấy các thông số huyết học của chuột đực hoặc chuột cái uống chế phẩm synbiotic ở cả hai liều thử nghiệm không khác biệt so với chuột sinh lý ở cùng giới tính ($p > 0,05$). Mặt khác, kết quả phân tích cũng cho thấy chỉ số huyết học của chuột đực và chuột cái trong cùng một lô khác biệt không đáng kể ($p > 0,05$).

Tuy vậy, số liệu phân tích một số thông số huyết học như WBC, RBC, HGB, HCT

của chuột ở lô sinh lý uống nước cất sau 28 ngày thử nghiệm có sự khác biệt về các thông số huyết học giữa 2 nhóm chuột đực và cái ($p < 0,05$). Kết quả này có thể giải thích do sự khác biệt về mặt sinh học giữa 2 nhóm giới tính chuột. Ở 2 lô chuột được cho uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg thì các thông số huyết học về bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ở cùng thời điểm ($p > 0,05$), ngoại trừ ở chuột trong lô uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg có chỉ số MCHC giảm nhẹ ($p < 0,05$). Kết quả tương tự khi phân tích riêng theo giới. Thông số huyết học của chuột đực hoặc chuột cái trong cùng một lô phần lớn khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Từ các kết quả phân tích ở trên cho thấy chuột uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến đa số các thông số công thức máu.

*** Về chức năng gan của chuột**

Kết quả phân tích cho thấy so với chuột ở lô sinh lý ở thời điểm ngày 14 và ngày 28, chỉ số AST và ALT của chuột ở các lô uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg thay đổi không đáng kể ($p > 0,05$). Phân tích riêng theo giới cho thấy chức năng gan (AST, ALT) của chuột đực hoặc chuột cái uống chế phẩm synbiotic ở cả hai liều thử nghiệm không khác biệt so với chuột cùng giới ở lô sinh lý ($p > 0,05$). Giữa chuột đực và cái trong cùng lô, đa phần các lô có hoạt tính AST và ALT khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), trừ lô uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg trong 14 ngày có hoạt tính AST và ALT của nhóm chuột đực cao hơn chuột cái, nhưng vẫn nằm trong giới hạn của chuột bình thường.

+ Kết quả phân tích vi thể tế bào gan của chuột.

Kết quả phân tích vi thể tế bào gan của chuột trình bày qua bảng 3.41 và hình 3.48÷3.50.



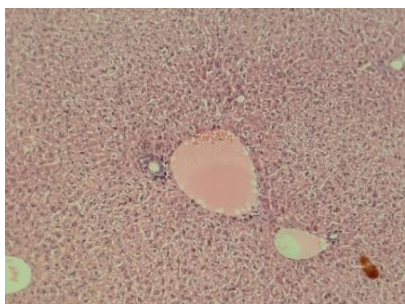
Chuột 1. Viêm gan mức độ 1/18



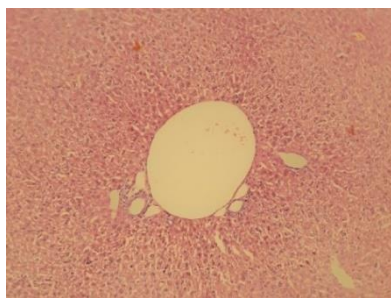
Chuột 2. Viêm gan mức độ 1/18



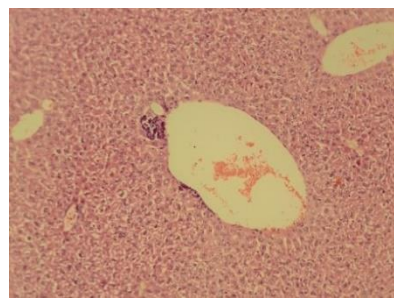
Chuột 3. Viêm gan mức độ 1/18



Chuột 4. Viêm gan mức độ 1/18

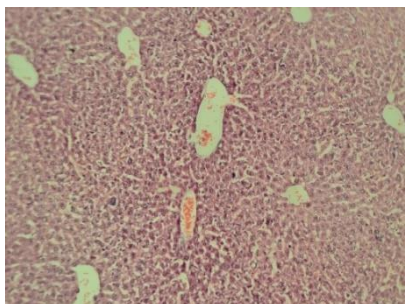


Chuột 5. Viêm gan mức độ 2/18

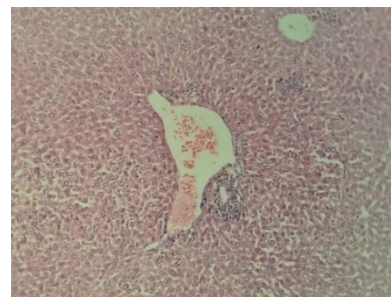


Chuột 6. Viêm gan mức độ 3/18

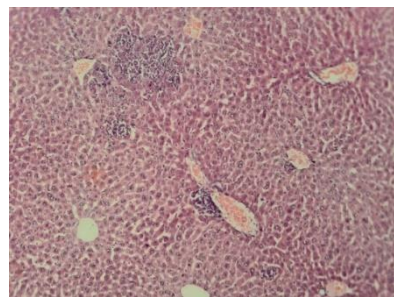
Hình 3.48. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô sinh lý sau 28 ngày



Chuột 1. Viêm gan mức độ 1/18



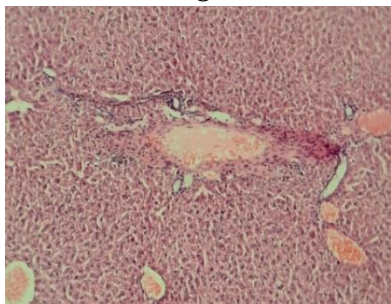
Chuột 2. Viêm gan mức độ 3/18



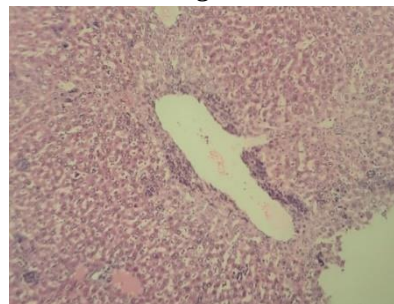
Chuột 3. Viêm gan mức độ 3/18



Chuột 4. Viêm gan mức độ 4/18

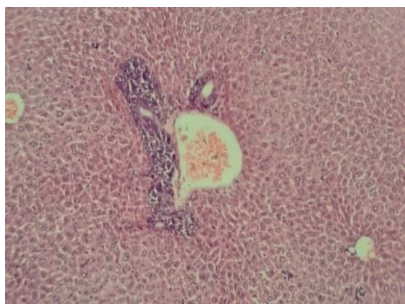


Chuột 5. Viêm gan mức độ 5/18

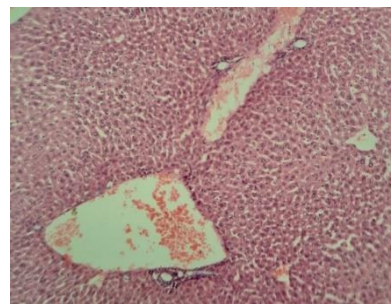


Chuột 6. Viêm gan mức độ 7/18

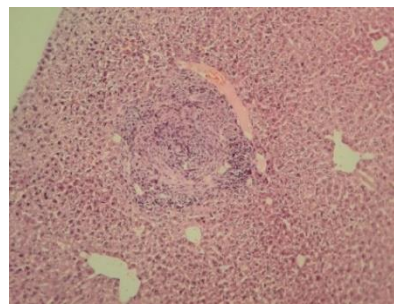
Hình 3.49. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô uống Synbiotic liều 1,2 g/kg sau 28 ngày



Chuột 1. Viêm gan mức độ 5/18



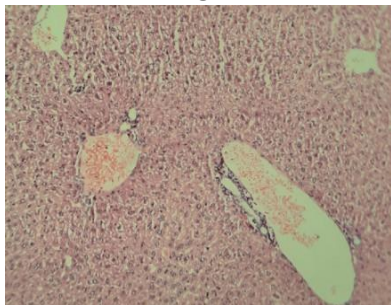
Chuột 2. Viêm gan mức độ 2/18



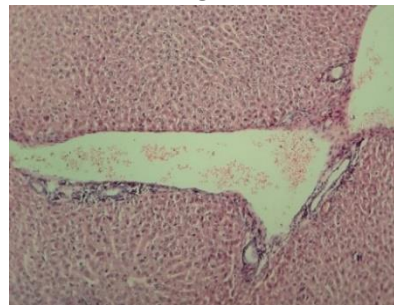
Chuột 3. Viêm gan mức độ 6/18



Chuột 4. Viêm gan mức độ 7/18



Chuột 5. Viêm gan mức độ 3/18



Chuột 6. Viêm gan mức độ 5/18

Hình 3.50. Vi thể tế bào gan của chuột ở lô uống Synbiotic liều 2,4 g/kg sau 28 ngày

Bảng 3.41. Kết quả phân tích vi thể cấu trúc tế bào gan của các lô thử nghiệm

Vi thể gan	Lô (n = 6)								
	Sinh lý			Synbiotic 1,2 g/kg			Synbiotic 2,4 g/kg		
Giới	Đực	Cái	Chung	Đực	Cái	Chung	Đực	Cái	Chung
Viêm gan 1/18	3	1	4		1	1			
Viêm gan 2/18		1	1				1		1
Viêm gan 3/18		1	1	2		2	1		1
Viêm gan 4/18				1		1			
Viêm gan 5/18					1	1		2	2
Viêm gan 6/18								1	1
Viêm gan 7/18					1	1	1		1

Kết quả phân tích vi thể cấu trúc gan cho thấy 6/6 mẫu gan của lô sinh lý viêm gan ở mức độ 1/18 - 3/18 (hoại tử quanh khoảng cửa: 1/4; hoại tử trong tiểu thùy: 1/4; viêm quanh khoảng cửa: 1/4). Lô cho chuột uống sản phẩm Synbiotic 1,2 g/kg có 6/6 mẫu gan viêm gan mức độ tối thiểu 1/18 - 7/18 (hoại tử quanh khoảng cửa: 1/4; hoại tử quanh tĩnh mạch trung tâm: 1/6; hoại tử trong tiểu thùy: 4/4; viêm quanh khoảng cửa: 1/4). Ở lô Synbiotic 2,4 g/kg, 6/6 mẫu gan viêm mức độ 2/18 - 7/18 có tình trạng hoại tử quanh tĩnh mạch trung tâm và hoại tử trong tiểu thùy. Kết quả này cho thấy có thể gan bị tổn thương ở mức độ nhẹ nhưng chưa làm thay đổi hoạt tính enzyme gan nên thông số hoạt tính ALT, AST của chuột thử nghiệm uống Synbiotic không thay đổi so với lô sinh lý.

Như vậy, chuột nhắt uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tiếp không ảnh hưởng đến chức năng gan của chuột.

*** Về chức năng thận**

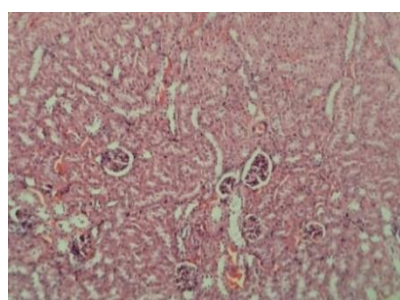
Kết quả đánh giá chức năng thận cho thấy sau 14 ngày thí nghiệm, chuột uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg có chỉ số ure và creatinin thay đổi không đáng kể so với lô sinh lý ở cùng thời điểm ($p > 0,05$). Khi so sánh giữa 2 giới trong cùng lô thử nghiệm, đa phần các thông số chức năng thận giữa chuột đực và chuột cái trong cùng lô khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), trừ lô uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg có nồng độ ure của nhóm chuột đực cao hơn chuột cái.

Sau 28 ngày thử nghiệm, lô chuột được cho uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg có các thông số chức năng thận khác biệt không đáng kể so với lô sinh lý ($p > 0,05$), kết quả tương tự khi phân tích riêng theo giới. Ở lô chuột uống chế phẩm synbiotic với liều 2,4 g/kg, có nồng độ ure cao hơn có ý nghĩa so với lô sinh lý cùng thời điểm ($p < 0,05$), nồng

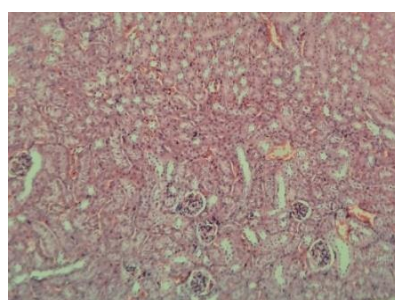
độ creatinin khác biệt không đáng kể ($p > 0,05$).

+ Kết quả phân tích vi thể tế bào thận

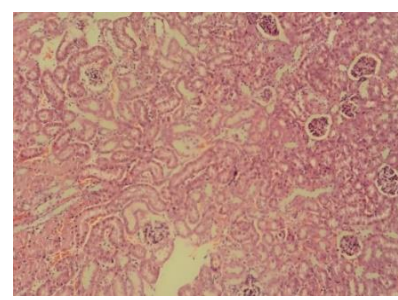
Kết quả phân tích vi thể tế bào thận được tổng hợp trong Bảng 3.42 và hình 3.51÷3.53.



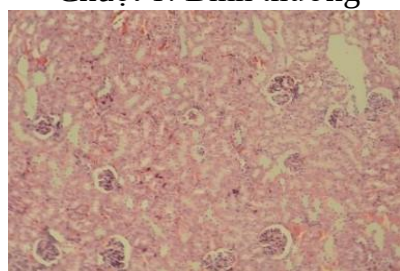
Chuột 1: Bình thường



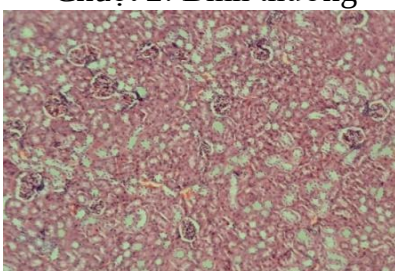
Chuột 2: Bình thường



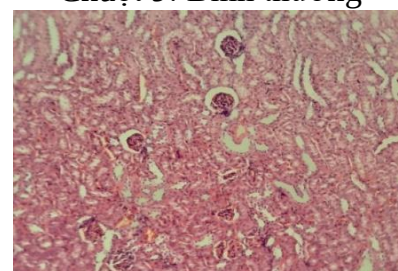
Chuột 3: Bình thường



Chuột 4: Bình thường

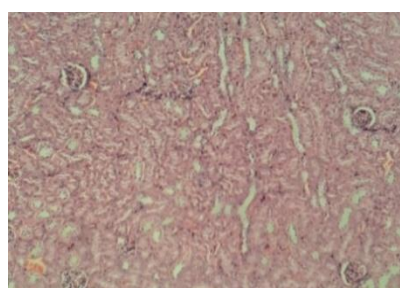


Chuột 5: Bình thường

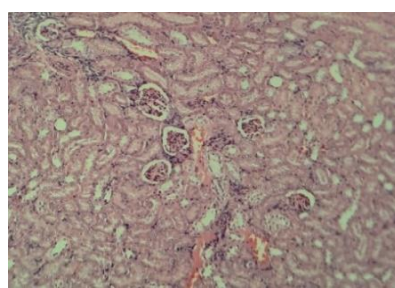


Chuột 6: Bình thường

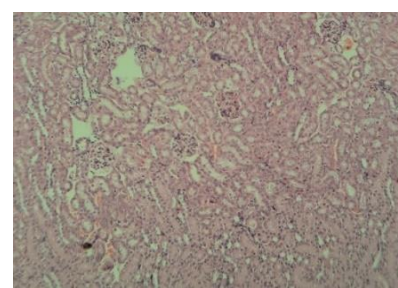
Hình 3.51. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô sinh lý sau 28 ngày



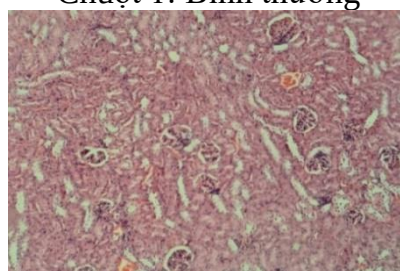
Chuột 1: Bình thường



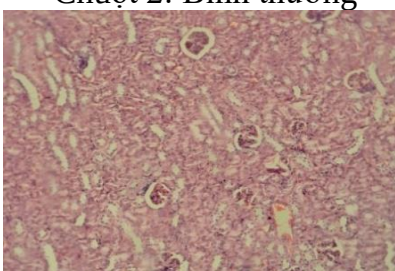
Chuột 2: Bình thường



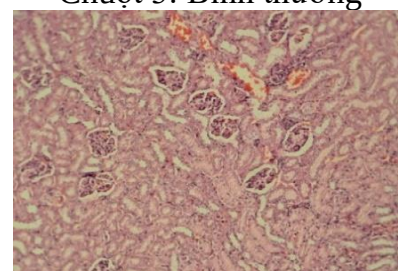
Chuột 3: Bình thường



Chuột 4: Bình thường

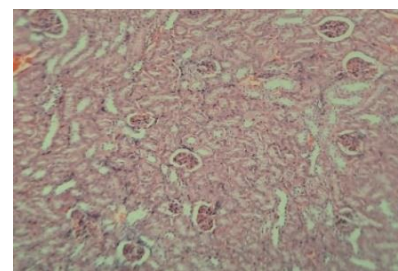
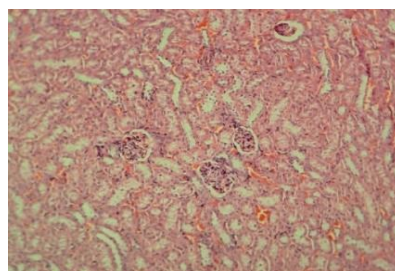
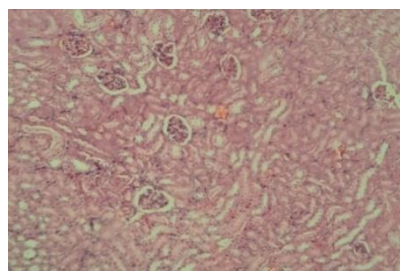


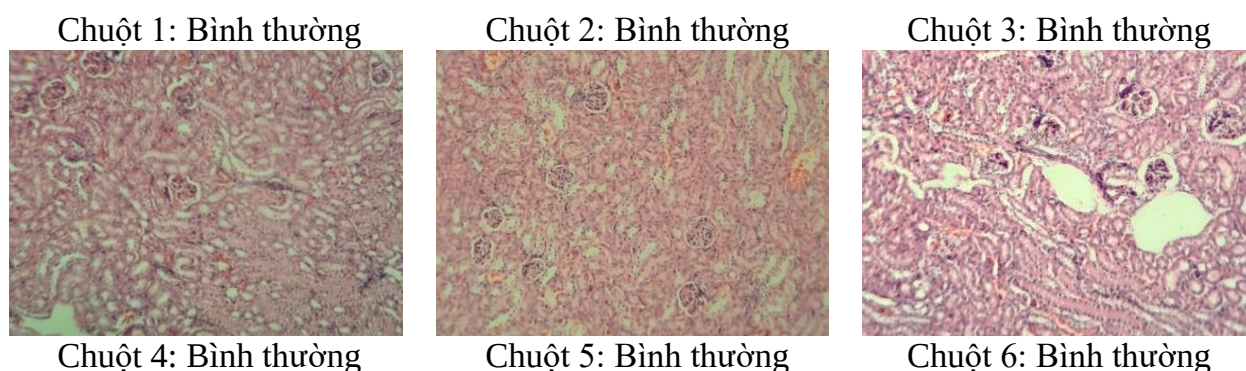
Chuột 5: Bình thường



Chuột 6: Bình thường

Hình 3.52. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô uống Synbiotic liều 1,2 g/kg sau 28 ngày





Hình 3.53. Vi thể tế bào thận của chuột ở lô uống Synbiotic liều 2,4 g/kg sau 28 ngày

Bảng 3.42. Kết quả phân tích vi thể cấu trúc tế bào thận của các lô thử nghiệm

Vi thể thận	Lô (n = 6)								
	Sinh lý			Synbiotic 1,2 g/kg			Synbiotic 2,4 g/kg		
Giới	Đực	Cái	Chung	Đực	Cái	Chung	Đực	Cái	Chung
Bình thường	3	3	6	3	3	6	3	3	6
Viêm thận - bề thận mạn tính	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Kết quả cho thấy tất cả 6/6 mẫu (100%) của các lô sinh lý, lô Synbiotic 1,2 g/kg và 2,4 g/kg có vi thể tế bào thận bình thường, không có tình trạng viêm thận, viêm bề thận. Kết quả này gợi ý sản phẩm Synbiotic uống liên tục 28 ngày ở liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg không ảnh hưởng của đến cấu trúc vi thể thận.

Như vậy, việc cho chuột nhắt uống mẫu thử với liều 1,2 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tục không ảnh hưởng đến chức năng thận, cấu trúc vi thể thận.

Từ các phân tích ở trên cho thấy chuột nhắt uống chế phẩm synbiotic với liều 1,2 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày liên tục không ảnh hưởng đến chức năng thận.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu ở trên cho thấy luận án đã hoàn thành tất cả các nội dung nghiên cứu đã đặt ra, thể hiện qua các kết luận sau:

1) Luận án xác định được các đặc điểm hình thái và cấu trúc mô củ đẳng sâm mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng làm cơ sở phân biệt độ tuổi, thời gian thu hoạch củ đẳng sâm. Mặt khác, luận án cũng xác định được củ đẳng sâm 3 năm tuổi có thành phần các chất đạt tiêu chuẩn DDVN, V (2017): Hàm lượng đường tổng số: $(10,08 \pm 0,88)$ °Bx, hàm lượng chất chiết tổng số: $(58,2 \pm 1,57)$ g/100g; hàm lượng tro tổng số: $(5,50 \pm 0,17)$ %, không chứa tạp chất vô cơ và kim loại nặng.

2) Luận án đã xác định được các thông số tối ưu cho quá trình chiết inulin từ Củ đẳng sâm tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng: dung môi chiết là nước cất 2 lần, nhiệt độ chiết 71°C, thời gian chiết 36 phút và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 47ml/g với hiệu suất chiết inulin củ đẳng sâm đạt 23,93%, fructan 26,96% và tổng chất chiết hòa tan đạt 61,35%. Luận án cũng xác định được các thông số thích hợp cho quá trình kết tủa thu inulin: nhiệt độ thích hợp để cô đặc dịch chiết trước khi kết tủa đến 16°Bx là 55°C, tác nhân kết tủa thích hợp là ethanol, nồng độ ethanol thích hợp cho quá trình kết tủa inulin là 80% và nồng độ ethanol thích hợp cho quá trình kết tủa fructan là 90%, nhiệt độ thích hợp để kết tủa inulin là (6 ± 1) °C với hiệu suất kết tủa trung bình đạt 95,53%.

3) Luận án đã tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin từ Củ đẳng sâm tự nhiên mọc tại Lạc Dương Lâm Đồng. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể tinh sạch inulin từ dịch chiết thô bằng phương pháp kết tủa lại nhiều lần (6 lần) bằng ethanol ở nồng độ gây kết tủa 80% với hiệu suất thu inulin tinh sạch là $(75,85 \pm 0,84)$ %. Polysacchride tinh sạch thu nhận từ củ đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương-Lâm Đồng gồm 2 phân tử fructose polysaccharid: một phân tử có khối lượng 3.193 Da, có 19-23 đơn phân, chiếm 96,448% và một phân tử có khối lượng phân tử 1.112.892 Da, chiếm 3,55%.

4) Luận án cũng xác định được một số thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột inulin đẳng sâm: chất trợ sấy là maltodextrin với tỷ lệ bổ sung thích hợp là 10%, nhiệt độ khí đầu vào 185°C và nhiệt độ không khí buồng sấy là 85°C, áp suất khí nén 3 atm, tốc độ bơm nhập liệu 10ml/p tương ứng với tốc độ đĩa phun 16000 v/p. Bột inulin đẳng sâm sấy phun có hàm lượng inulin đạt $(445,90 \pm 2,79)$ mg/g; hàm lượng fructan đạt $(469,40$

$\pm 1,61$) mg/g, pH ($5,18 \pm 0,01$), hàm lượng tro ($4,82 \pm 0,07$) %. Độ hòa tan: ($1/9,5 \pm 0,5/15$) (g/ml/phút); Độ ẩm ($6,06 \pm 0,27$) %; không chứa tạp chất vô cơ và kim loại nặng. Bột inulin củ đắng sâm có kích thước hạt ($882,2 \pm 101,4$) nm, mật độ hạt 100%, độ phân tán PDI 0,497; Nhiệt độ phân hủy hoàn toàn các phân tử trong bột inulin củ đắng sâm trên 600°C . Bột inulin củ đắng sâm đạt tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm theo qui định hiện hành của Bộ Y tế.

5) Kết quả sử dụng bột inulin củ đắng sâm để tạo chế phẩm synbiotic định hướng ứng dụng trong thực phẩm: Bột inulin củ đắng sâm có đặc tính prebiotic mạnh với liều sử dụng 4,0 % (w/w)- tương đương 2% tính theo bột inulin sạch có thể kích tăng sinh tế bào (CFU) của 8 chủng vi khuẩn từ $1,4 \div 11,5$ lần (2 chủng *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum*, *B. lactic*, 2 chủng *Enterococcus faecalis*), trong đó chủng *L. acidophilus* (M7) đạt mức tăng sinh cao nhất là $2,3 \times 10^{11}$ CFU/g và chủng *Enterococcus faecalis* (M4) đạt mức tăng sinh thấp nhất là 7×10^8 CFU/g.

6) Công thức phối trộn tạo bột synbiotic: Bột inulin củ đắng sâm 0,514 g/g, sinh khối chủng vi khuẩn *L. acidophilus* (5×10^{10} CFU/g): 0,22 g/g; sinh khối *L. plantarum* (2×10^{11} CFU/g): 0,128 g/g; sinh khối *B. longum* (8×10^{10} CFU/g): 0,033 g/g và sinh khối *B. lactics* (10^{11} CFU/g): 0,1g/g.

7) Kết quả thử nghiệm trên chuột nhắt cho thấy chế phẩm synbiotic với liều sử dụng liều 1,2 g/kg và 2,4 g/kg trong 14 hoặc 28 ngày không độc, không ảnh hưởng đến chức năng của gan, thận ở chuột thử nghiệm và chế phẩm synbiotic có khả năng kích thích miễn dịch cũng như có khả năng điều trị tiêu chảy ở chuột nhắt.

2. KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu ở trên, cho phép đề xuất một số ý kiến sau:

- Tiến hành nhân giống và trồng củ đắng sâm để bảo tồn gen và đảm bảo nguyên liệu cho quá trình sản xuất.

- Tiếp tục sản xuất thử nghiệm bột củ đắng sâm sấy phun dạng prebiotic, synbiotic ở quy mô lớn làm cơ sở xây dựng giá thành và thương mại hóa sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Cường, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ và Phạm Duy Mai (2015), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam. Phần thực vật*, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
3. Bộ Y Tế (2007), "Quy định giới hạn tối đa ô nhiễm sinh học và hóa học trong thực phẩm". Số 46/2007/QĐ-BYT. Ngày 19/12/2007. .
4. Bộ Y Tế (2015), "Quyết định 179/QĐ-BYT. Kế hoạch triển khai thực hiện bảo tồn và khai thác dược liệu tự nhiên".
5. Bộ Y tế (2016), "Phát triển dược liệu bền vững. QĐ 793/TB-BYT".
6. Bộ Y tế (2017), *Dược Điển Việt Nam V*, tái bản lần 5, tập. 2, NXB Y học, Hà Nội, tr 1043.
7. Bộ Y Tế (2015), "Thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu. Quyết định số 141/QĐ-K2ĐT".
8. Đỗ Tất Lợi (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học.
9. Đỗ Tất Lợi (2011), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB Y học, Hà Nội.
10. Đỗ Trung Đàm (2014), "Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc", *NXB Y học. Hà Nội*.
11. Hiệp hội Thực Phẩm Chức Năng Việt Nam (2014), *Thực phẩm chức năng. Người tiêu dùng và hoạt động quảng cáo trực tuyến của doanh nghiệp*, TP HCM.
12. Hội dược liệu tỉnh Lâm Đồng (2013), *Danh lục tài nguyên cây dược liệu tỉnh Lâm Đồng*.
13. Đỗ Văn Mai, Nguyễn Thị Ngọc Đan, Dương Thị Mộng Ngọc và Trần Công Luận (2014), "Bước đầu nghiên cứu đánh giá khả năng khai thác và sử dụng cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) trồng làm nguyên liệu tại Lâm Đồng", *Sở KH-CN Lâm Đồng*, tr. 197.
14. Nguyễn Thành Đạt và Mai Thị Hằng (2000), *Sinh học vi sinh vật*, NXB Giáo dục.
15. Nguyễn Thị Huyền và Văn Việt (2017), "Nghiên cứu nhanh In vitro sinh khối rễ tơ cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica*)", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm Nghiệp*, tr. 34-41.
16. Nguyễn Thị Kim Phụng (2007), *Phương pháp cô lập chất hữu cơ*, NXB Đại học Quốc Gia, TP HCM.
17. Nguyễn Thị Thanh Nga (2012), "Đánh giá đa dạng di truyền một số loài cây dược liệu Việt Nam thuộc chi Đẳng sâm (*Codonopsis spp*) bằng kỹ thuật AND mã vạch", *Luận văn ThS. ngành: Di truyền học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên*.

18. Nguyễn Thị Mỹ Nương, Bùi Thị Như Ngọc, Âu Tuyết Mai và Đinh Minh Hiệp (2017), "Đánh giá tác dụng tăng cường miễn dịch của Bài thuốc Nam Địa Long trên chuột gây suy giảm miễn dịch bằng cyclophosphamide", *Tạp chí phát triển KH &CN. Chuyên san khoa học tự nhiên*. 1(6), tr. 68-75.
19. Trần Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thu Hương và Nguyễn Minh Đức (2015), "Nghiên cứu tác dụng tăng cường miễn dịch của cao xương cá sấu hoa cà", *Tạp chí Dược liệu*. 20(2), tr. 121-126.
20. Thủ tướng Chính phủ (2013), "Quyết định phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030". 1976/QĐ-TTg.
21. Tiêu chuẩn quốc gia VN (2013), "TCVN 9635 :2013. ISO 2998 : Sản phẩm sữa - định lượng vi khuẩn bifidus giả định - kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37°C".
22. Tổng cục Đo lường Chất lượng (2013), "TCVN 9635 :2013. ISO 2998 : Sản phẩm sữa - định lượng vi khuẩn bifidus giả định - kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 37°C".
23. Tổng cục Đo lường Chất lượng (2013), "TCVN 9633: 2013. Giống vi khuẩn khởi động – Tiêu chuẩn nhận dạng".
24. Tổng cục Đo lường Chất lượng (2007), "TCVN 7771:2007. Xác định chất rắn hoà tan - Phương pháp khúc xạ kế".
25. Tống Xuân Hoa (2014), "Nhân giống cây sâm dây (*Codonopsis javanica*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật", *Đại học Sư phạm Thái Nguyên*.
26. Trần Hùng (2004), *Phương pháp nghiên cứu dược liệu*, Trường Đại Học Y Dược TP Hồ Chí Minh.
27. Trần Thanh Hà, Đỗ Thị Hà và Nguyễn Minh Khởi (2014), "Thành phần hóa học của rễ đẳng sâm", *Tạp chí Dược liệu*. 19 (4), tr. 211-216.
28. Trương Hoàng Duy, Lê Phạm Tấn Quốc, Trần Thị Hồng Cẩm, Phạm Thị Kim Ngọc và Đồng Thị Anh Đào (2015), "Tối ưu hoá trích ly thu nhận dịch saponin từ đẳng sâm *C. javanica* bằng Enzyme Alpha-Amylas", *Đặc san thông tin khoa học và công nghệ*. 3.
29. Viện Dược liệu (2008), *Kỹ thuật chiết xuất dược liệu*, NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
30. Vũ Thanh Thảo (2014), "Nghiên cứu đặc tính probiotic của *Bacillus subtilis* BS02", *Y học thực hành* 907, tr. 21-25.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

31. Arturo Anadón, María Rosa Martínez-Larrañaga, Irma Ares, and María Aránzazu Martínez (2016), "ProbioticCs: safety and toxicity considerations", *Nutraceuticals*, Elsevier, pp. 777-798.
32. Marimuthu Anandharaj, Balayogan Sivasankari, and Rizwan Parveen Rani (2014), "Effects of probioticCs, prebioticCs, and synbioticCs on hypercholesterolemia: a review", *Chinese Journal of Biology*. 2014.

33. Franck Anne and De Leenheer Leen (2005), "Inulin", *Biology-Chemistry-Biotechnology-Applications*. 6.
34. Alexsandra Conceição Apolinário, Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno, Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão, Adalberto Pessoa, and Attilio Converti (2014), "Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology", *Carbohydrate polymers*. 101, pp. 368-378.
35. BH Azis, B Chin, MP Deacon, SE Harding, and GM Pavlov (1999), "Size and shape of inulin in dimethyl sulphoxide solution", *Carbohydrate Polymers*. 38(3), pp. 231-234.
36. Jannatul Azmir, ISM Zaidul, MM Rahman, KM Sharif, A Mohamed, F Sahena, MHA Jahurul, K Ghafoor, NAN Norulaini, and AKM Omar (2013), "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review", *Journal of Food Engineering*. 117(4), pp. 426-436.
37. Vandana Bali, Parmjit S Panesar, Manab B Bera, and Reeba Panesar (2015), "Fructo-oligosaccharides: production, purification and potential applications", *Food Science and Nutrition*. 55(11), pp. 1475-1490.
38. Thomas Barclay, Markovic Milena Ginic, Peter Cooper, and Nikolai Petrovsky (2016), "Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses", *Excipients and Food Chemicals*. 1(3), p. 1132.
39. Nouredine Benkeblia (2013), "Fructooligosaccharides and fructans analysis in plants and food crops", *Journal of Chromatography A*. 1313, pp. 54-61.
40. Maria Bielecka, Elżbieta Biedrzycka, and Anna Majkowska (2002), "Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness", *Food Research International*. 35(2-3), pp. 125-131.
41. Prasandeep Biswal, Abhisek Pal, and Alok P Das (2017), "Current trends and future prospective of prebiotics as therapeutic food", *Microbial Production of Food Ingredients and Additives*, Elsevier, pp. 57-88.
42. Christophe Blecker, J-P Chevalier, C Fougnes, J-C Van Herck, C Deroanne, and Michel Paquot (2003), "Characterisation of different inulin samples by DSC: influence of polymerisation degree on melting temperature", *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 71(1), pp. 215-224.
43. Anjana Challa, D Ramkishan Rao, Chandramohan B Chawan, and Louis Shackelford (1997), "Bifidobacterium longum and lactulose suppress azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats", *Carcinogenesis*. 18(3), pp. 517-521.
44. R Chang (2002), "Bioactive polysaccharides from traditional Chinese medicine herbs as anticancer adjuvants", *The Journal of Alternative & Complementary Medicine*. 8(5), pp. 559-565.

45. Gonzalez Chavez, Lizeth Monica, Figueroa Buenrostro, Juan Jose, and Cristobal N Aguilar (2019), *Handbook of Research on Food Science and Technology: Volume 3: Functional Foods and Nutraceuticals*, Apple Academic Press.
46. RPGR Chawla and GR Patil (2010), "Soluble dietary fiber", *Food Science and Food Safety*. 9(2), pp. 178-196.
47. Kun-Ning Chen, Wen-Huang Peng, Chien-Wen Hou, Chung-Yu Chen, Hwei-Hsien Chen, Chia-Hua Kuo, and Mallikarjuna Korivi (2013), "Codonopsis javanica root extracts attenuate hyperinsulinemia and lipid peroxidation in fructose-fed insulin resistant rats", *Journal of food and drug analysis*. 21(4), pp. 347-355.
48. Tingtao Chen, Shunqiang Xiong, Mengjuan Wang, Qinlong Wu, and Hua Wei (2012), "Effects of traditional Chinese medicines on intestinal bacteria: a review".
49. Yun-Fang Chen, Hsiao-Yuh Roan, Chong-Kuei Lii, Yuan-Ching Huang, and Tsu-Shing Wang (2011), "Relationship between antioxidant and antiglycation ability of saponins, polyphenols, and polysaccharides in Chinese herbal medicines used to treat diabetes", *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(11), pp. 2322-2331.
50. Hye-Kyung Choi, Eun-Kyung Won, Young Pyo Jang, and Se-Young Choung (2013), "Antiobesity effect of Codonopsis lanceolata in high-calorie/high-fat-diet-induced obese rats".
51. Shanshan Chu, Lingling Tan, Chanchan Liu, Huasheng Peng, Haiyan Duan, and Luqi Huang (2018), "Growth rings in roots of medicinal perennial dicotyledonous herbs from temperate and subtropical zones in China", *Microscopy Research and Technique*. 81(4), pp. 365-375.
52. Regiane Victória de Barros Fernandes, Soraia Vilela Borges, and Diego Alvarenga Botrel (2014), "Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil". 101, pp. 524-532.
53. L De Leenheer (1994), "Production and use of inulin: industrial reality with a promising future", *Carbohydrates as organic raw materials*. 3, pp. 67-92.
54. Arildo José Braz De Oliveira, Regina Aparecida Correia Gonçalves, Talita Perez Cantuaria Chierito, Marcelo Müller dos Santos, Lauro Mera de Souza, Philip Albert James Gorin, Guilherme Lanzi Sasaki, and Marcello Iacomini (2011), "Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni", *J Food Chemistry*. 129(2), pp. 305-311.
55. Devinder Dhingra, Mona Michael, Hradesh Rajput, and RT Patil (2012), "Dietary fibre in foods: a review", *Food Science and Technology*. 49(3), pp. 255-266.
56. P Dysseler, D Hoffem, J Fockede, B Quemener, JF Thibault, and P Coussement (1999), "Determination of inulin and oligofructose in food products (modified AOAC dietary fiber method)", *Food Science and Technology*, pp. 213-228.

57. Hanen Falleh, Riadh Ksouri, Marrie-Elizabeth Lucchessi, Chedly Abdelly, and Christian Magné (2012), "Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. Aizoaceae shoots", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 11(2), pp. 243-249.
58. Chen Fang fang (2013), "Analysis of fingerprint seals of root *Codonopsis* by HPLC and analysis of chemometriCs", *Chinese Herbal Medicines*. 5(1.4), pp. 307–312.
59. Oluyemisi Folashade, Henry Omoregie, and Peter Ochogu (2012), "Standardization of herbal medicines-A review", *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 4(3), pp. 101-112.
60. George Francis (2002), "The biological action of saponins in animal systems: a review", *British Journal of Nutrition*. 88(06), pp. 587-605.
61. A Franck (2002), "Technological functionality of inulin and oligofructose", *British Journal of Nutrition*. 87(S2), pp. S287-S291.
62. S. M. Gao, J. S. Liu, M. Wang, T. T. Cao, Y. D. Qi, B. G. Zhang, X. B. Sun, H. T. Liu, and P. G. Xiao (2018), "Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Codonopsis*: A review", *J Ethnopharmacol*. 219, pp. 50-70.
63. Shi-Man Gao, Jiu-Shi Liu, Min Wang, Ting-Ting Cao, Yao-Dong Qi, Ben-Gang Zhang, Xiao-Bo Sun, Hai-Tao Liu, and Pei-Gen Xiao (2018), "Traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Codonopsis*: A review", *Journal of ethnopharmacology*. 219, pp. 50-70.
64. Gary Flamm, Walter Glinsmann, David Kritchevsky, Leon Prosky, and Marcel Roberfroid (2001), "Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence", *Food Science and Nutrition*. 41(5), pp. 353-362.
65. Glenn R Gibson, Robert W Hutkins, Mary Ellen Sanders, Susan L Prescott, Raylene A Reimer, Seppo J Salminen, Karen Scott, Catherine Stanton, Kelly S Swanson, and Patrice D Cani (2017), "The International Scientific Association for ProbiotiCs and PrebiotiCs (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotiCs".
66. Glenn R Gibson, Robert A Rastall, and Marcel B Roberfroid (1999), "PrebiotiCs", *Colonic microbiota, nutrition and health*, Springer, pp. 101-124.
67. Paweł Glibowski and Anna Bukowska (2011), "The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability", *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 10(2), pp. 189-196.
68. Athanasia M Goula and Konstantinos G Adamopoulos (2008), "Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties", *Drying Technology*. 26(6), pp. 726-737.
69. Włodzimierz Grajek, Anna Olejnik, and Anna Sip (2005), "ProbiotiCs, prebiotiCs and antioxidants as functional foods". 52(3), p. 665.

70. Anil K Gupta, Navdeep Kaur, and Narinder Kaur (2002), "Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition", *Journal of Biosciences*. 27(7), pp. 703-714.
71. Ole Hansen and John Jensen (1993), Method for preparing a mixture of saccharides, Editor^Editors, Google Patents.
72. Jing-Yu He, Na Ma, Shu Zhu, Katsuko Komatsu, Zhi-Yuan Li, and Wei-Ming Fu (2015), "The genus *Codonopsis* (Campanulaceae): A review of phytochemistry, bioactivity and quality control", *Journal of Natural Medicines*. 69(1), pp. 1-21.
73. Van Bekkun Herman (2003), "Carbohydrates sa Chemical Feedstock", *Chemistry for Suistainable Development*. 11, pp. 11-21.
74. Hannah D Holscher, Jamie L Doligale, Laura L Bauer, Vishnupriya Gourineni, Christine L Pelkman, George C Fahey, and Kelly S Swanson (2014), "Gastrointestinal tolerance and utilization of agave inulin by healthy adults", *Food & function*. 5(6), pp. 1142-1149.
75. Bao Yu Hu, Jun Cai Deng, Cai-Qiong Yang, Yao Hu, Jing Zhang, Wen Yu Yang, and Jiang Liu (2017), "Extraction optimization, purification and characterization of polysaccharides from the seed coat of black soybean", *PloS One*. 12(12), p. e0190202.
76. Wei Hua (2012), "Effects of traditionl Chinese medicines on intestinal bacteria: Review", *India Journal of Traditional Knowleges*. 11(30), pp. 104-407.
77. Laura Jaime, Francisco Martínez, Cabrejas Maria A Martín, Esperanza Mollá, Andréu Francisco J López, Keith W Waldron, and Rosa M Esteban (2001), "Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues", *The Science of Food and Agriculture*. 81(2), pp. 177-182.
78. Ju -li Yuan (2011), "Study on the optimum harvest time of *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) LT Shen", *Applied Chemical Industry*(6), p. 18.
79. G Kelly (2009), "Inulin-type prebiotiCs: a review.(Part 2)", *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 14(1), pp. 36-55.
80. Raj K Keservani, Rajesh K Kesharwani, Narendra Vyas, Sarang Jain, Ramsaneh Raghuvanshi, and Anil K Sharma (2010), "Nutraceutical and functional food as future food: a review", *Pharmacia Lettre*. 2(1), pp. 106-116.
81. Krittiya Khuenpet, Mika Fukuoka, Weerachet Jittanit, and Sarote Sirisansaneeyakul (2017), "Spray drying of inulin component extracted from Jerusalem artichoke tuber powder using conventional and ohmic-ultrasonic heating for extraction process", *Journal of Food Engineering*. 194, pp. 67-78.
82. ME Knipschildt (1986), "Recent developments in spray drying of milk", *Concentration and Drying of Foods*, pp. 221-270.
83. Radava R Korac and Kapil M Khambholja (2011), "Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation", *Pharmacognosy* 5(10), p. 164.
84. SS Koruri, D Banerjee, R Chowdhury, and P Bhattacharya (2014), "Studies on prebiotic food additive (inulin) in indian dietary fibre sources-garlic (*Allium sativum*), wheat

(Triticum spp.), oat (Avena sativa) and dalia (Bulgur)", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(9), pp. 278-282.

85. Yuoh Ku, Olaf Jansen, Carolyn J Oles, Esther Z Lazar, and Jeanne I Rader (2003), "Precipitation of inulins and oligoglucoses by ethanol and other solvents", *Food Chemistry*. 81(1), pp. 125-132.

86. V Prasanna Kumar, KV Harish Prashanth, and YP Venkatesh (2015), "Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (Allium cepa)", *Carbohydrate Polymers*. 117, pp. 115-122.

87. Somnath Kundu and Swarnali Brahma (2016), "Ethnobotanical and pharmacological properties of codonopsis (campanulaceae): A review".

88. Oluyemisi Folashade Kunle, Henry Omoregie Egharevba, and Peter Ochogu Ahmadu (2012), "Standardization of herbal medicines-A review", *International Journal of Biodiversity and Conservation*. 4(3), pp. 101-112.

89. Alves Larissa L, Richards Neila SPS, Mattanna Paula, Andrade Diego F, S Rezer Adriano P, Milani Liana IG, Adriano G Cruz, and Faria José AF (2013), "Cream cheese as a symbiotic food carrier using B ifidobacterium animalis B b-12 and L actobacillus acidophilus L a-5 and inulin", *International Journal of Dairy Technology*. 66(1), pp. 63-69.

90. TG Lammers (2007), "Campanulaceae", *Flowering Plants· Eudicots*, Springer, pp. 26-56.

91. RHMJ Lemmens (1989), *Plant Resources of South-East Asia*, Pudoc.

92. Victor E Levine and William W Becker (1959), "The determination of inulin in blood and in urine by means of vanillin in acid medium", *Clinical Chemistry*. 5(2), pp. 142-148.

93. Dandan Li, Jin M Kim, Zhengyu Jin, and Jie Zhou (2008), "Prebiotic effectiveness of inulin extracted from edible burdock", *Anaerobe*. 14(1), pp. 29-34.

94. J. Li, X. Zhang, L. Cao, J. Ji, and J. Gao (2018), "Three Inulin-Type Fructans from Codonopsis pilosula (Franch.) Nannf. Roots and Their Prebiotic Activity on Bifidobacterium longum", *Molecules*. 23(12).

95. Shanshan Li, Yuli Qi, Lixue Chen, Di Qu, Zhiman Li, Kun Gao, Jianbo Chen, and Yinshi Sun (2019), "Effects of Panax ginseng polysaccharides on the gut microbiota in mice with antibiotic-associated diarrhea", *International journal of biological macromolecules*. 124, pp. 931-937.

96. Tong Kwee Lim (2012), *Edible medicinal and non-medicinal plants*, Vol. 1, Springer.

97. Wei Lingyun, Wang Jianhua, Zheng Xiaodong, Teng Da, Yang Yalin, Cai Chenggang, Feng Tianhua, and Zhang Fan (2007), "Studies on the extracting technical conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers", *Food Engineering*. 79(3), pp. 1087-1093.

98. Sahar Akhavan Mahdavi, Seid Mahdi Jafari, Mohammad Ghorbani, and Elha Assadpoor (2014), "Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review". 32(5), pp. 509-518.
99. Bimakr Mandana, Rahman Russly Abdul, Taip Farah Saleena, Ganjloo Ali, Salleh Liza Md, Selamat Jinap, Hamid Azizah, and Zaidul ISM (2011), "Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves", *Food and bioproducts processing*. 89(1), pp. 67-72.
100. Willard L McRary and Marion Slattery (1945), "The colorimetric determination of fructosan in plant material", *Biological Chemistry*. 157, pp. 161-167.
101. Maarten A Mensink, Henderik W Frijlink, Kees van der Voort Maarschalk, and Wouter LJ Hinrichs (2015), "Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics", *Carbohydrate polymers*. 130, pp. 405-419.
102. D Meyer, S Bayarri, A Tárrega, and E Costell (2011), "Inulin as texture modifier in dairy products", *Food Hydrocolloids*. 25(8), pp. 1881-1890.
103. D Meyer and M Stasse-Wolthuis (2009), "The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health", *European journal of clinical nutrition*. 63(11), p. 1277.
104. Morgan Michelle (2009), "Ethanol in Herbal Medicine", *MediHerb*.
105. Elnaz Milani, Arash Koocheki, and Q Ali Golimovahhed (2011), "Extraction of inulin from Burdock root (*Arctium lappa*) using high intensity ultrasound", *International journal of Food science & Technology*. 46(8), pp. 1699-1704.
106. Shalini Mishra and HN Mishra (2013), "Effect of synbiotic interaction of fructooligosaccharide and probiotics on the acidification profile, textural and rheological characteristics of fermented soy milk", *Food and Bioprocess Technology*. 6(11), pp. 3166-3176.
107. Deshani C Mudannayake, Kuruppu MS Wimalasiri, Kahandage FST Silva, and Said Ajlouni (2015), "Comparison of properties of new sources of partially purified inulin to those of commercially pure chicory inulin", *Journal of food science*. 80(5), pp. C950-C960.
108. Muhammad Shoaib, Aamir Shehzad, Mukama Omar, Allah Rakha, Husnain Raza, Hafiz Rizwan Sharif, Azam Shakeel, Anum Ansari, and Sobia Niazi (2016), "Inulin: Properties, health benefits and food applications", *Carbohydrate Polymers*. 147, pp. 444-454.
109. Raymond H Myers, Montgomeryn Douglas C, Cook Anderson, and M Christine (2016), *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, John Wiley & Sons.
110. Huan Jie Nan, Xue Mei Qin, Bin Wu, Ying Li, Li Zeng Zhang, and Xiao-Qing Guo (2008), "Ultrasonic extraction and content determination of polysaccharide in *Codonopsis*", *Journal of Shanxi Medical University*. 39, pp. 641-643.

111. Kathy R Niness (1999), "Inulin and oligofructose: what are they?", *The Journal of nutrition*. 129(7), pp. 1402S-1406s.
112. Thomas D Nolin, Ivan V Colaizzi, Paul M Palevsky, Gary R Matzke , and Reginald F Frye (2002), "Rapid microtiter plate assay for determination of inulin in human plasma and dialysate", *Journal of pharmaceutical biomedical analysis*. 28(2), pp. 209-215.
113. Arildo José Braz Oliveira, Regina Aparecida Correia Gonçalves, Talita Perez Cantuaria Chierito, Marcelo Müller Santos, Lauro Mera Souza, Philip Gorin, James Albert, Guilherme Lanzi Sasaki, and Marcello Iacomini (2011), "Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni", *Food Chemistry*. 129(2), pp. 305-311.
114. D Pencheva, N Petkova, and P Denev (2012), "Determination of inulin in dough products", *Scientific works of UFT: "Food science "*, pp. 339-344.
115. D Pencheva, N Petkova, and P Denev (2012), "Determination of inulin in dough products", *Scientific Works of UFT*. 59, pp. 339-344.
116. Nadezhda Petkova and Panteley Denev (2013), "Evaluation of fructan contents in the taproots of plants *Lactuca serriola* L. and *Sonchus oleraceus* L", *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. 17, pp. 117-122.
117. Nadezhda Petkova and Panteley Denev (2015), Methods for determination of inulin, *Monograph of 4rd European young engineers conference*, p. 135.
118. Nadezhda Petkova, Manol Ognyanov, Mina Todorova, and Denev Panteley (2015), "Ultrasound-assisted extraction and characterisation of inulin-type fructan from roots of elecampane (*Inula helenium* L.)", *Acta Scientifica Naturalis*. 1(1), pp. 225-235.
119. NT Petkova, G Sherova, and PP Denev (2018), "Characterization of inulin from dahlia tubers isolated by microwave and ultrasound-assisted extractions", *International Food Research Journal*. 25(5).
120. N Petroski (2017), "Advax Adjuvant: A Potent and Safe Immunopotentiator Composed of Delta Inulin", *Immunopotentiators in Modern Vaccines*, Elsevier, pp. 199-210.
121. Glyn O Phillips (1998), "Acacia gum (Gum Arabic): A nutritional fibre; metabolism and calorific value", *Food Additives & Contaminants*. 15(3), pp. 251-264.
122. Phisut N (2012), "Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product".
123. Pilar Prieto, Manuel Pineda, and Miguel Aguilar (1999), "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E", *Analytical Biochemistry*. 269(2), pp. 337-341.
124. Leon Prosky and Hubert Hoebregs (1999), "Methods to Determine Food Inulin and Oligofructose", *The Journal of Nutrition*. 129(7), pp. 1418S-1423S.

125. Chun-Feng Qiao, Zhen-Dan He, Quan-Bin Hae, Hong-Xi Xu, and Ren-Wang Jiang (2007), "The use of lobetyolin and HPLC-UV fingerprints for quality assessment of *Radix Codonopsis*", *Food Drug Analysis*. 15(3).
126. Rajashree Rane, Rahul Shelar, Yogesh Shinde, Supriya Lad, Siddhesh Desai, Milind Vartak, Chetna Chotalia, and Rajiv Salvi (2018), "Spectrophotometric Method for Quantitative Determination of Inulin in Naturo lax–A Powder", *Int J Pharma Res Health Sci*. 6(1), pp. 2160-4.
127. Robert A Rastall and Vatsala Maitin (2002), "PrebioticCs and synbioticCs: towards the next generation", *Biotechnology*. 13(5), pp. 490-496.
128. Reza Karimi, Mohammad Hossein Azizi, Mehran Ghasemlou, and Moharam Vaziri (2015), "Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review", *Carbohydrate Polymers*. 119, pp. 85-100.
129. Marcel B Roberfroid (1999), "Caloric value of inulin and oligofructose", *The Journal of nutrition*. 129(7), pp. 1436S-1437S.
130. Marcel B Roberfroid (2007), "Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients", *Book*, p. 392.
131. Re Roberta, Pellegrini Nicoletta, Proteggente Anna, Pannala Ananth, Yang Min, and Rice-Evans Catherine (1999), "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay", *Biology and Medicine*. 26(9-10), pp. 1231-1237.
132. Sébastien N Ronkart, Christophe S Blecker, Hélène Fourmanoir, Christian Fougnes, Claude Deroanne, Jean-Claude Van Herck, and Michel Paquot (2007), "Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis", *Analytica Chimica Acta*. 604(1), pp. 81-87.
133. Sébastien N Ronkart, Christophe S Blecker, Hélène Fourmanoir, Christian Fougnes, Claude Deroanne, Jean-Claude Van Herck, and Michel Paquot (2007), "Characterization of the physical state of spray-dried inulin", *Food BiophysiCs*. 2(2-3), pp. 83-92.
134. Maddalena Rossi, Claudio Corradini, Alberto Amaretti, Marcello Nicolini, Anna Pompei, Simona Zanoni, and Diego Matteuzzi (2005), "Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures", *Appl. Environ. Microbiol*. 71(10), pp. 6150-6158.
135. Karppinen S, Myllymäki O, Forssell P, and Poutanen K (2003), "Fructan content of rye and rye products", *Cereal Chemistry*. 80(2), pp. 168-171.
136. Nielsen S. Suzanne (2010), *Food Analysis Laboratory Manual*, Second Edition ed, University West Lafayette, USA.
137. RS Sawant and AG Godghate (2013), "Qualitative phytochemical screening of rhizomes of *Curcuma longa* Linn", *J International Journal of Science, Environment Technology*. 2(4), pp. 634-641.

138. Katharina E Scholz-Ahrens, Berit Adolphi, Florence Rochat, Denis V Barclay, Michael De Vrese, Yahya Açı, and Jürgen Schrezenmeir (2016), "Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats—impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over", *NFS Journal*. 3, pp. 41-50.
139. George E Schreiner (1950), "Determination of inulin by means of resorcinol", *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*. 74(1), pp. 117-120.
140. Fritz Hans Schweingruber and Peter Poschlod (2005), *Growth rings in herbs and shrubs: life span, age determination and stem anatomy*, Vol. 79, Swiss Federal Research Institute WSL Birmensdorf.
141. Ivana Simonovas (2010), "HPLC determination of inulin in plant materials", *Acta Chimica Slovaca*. 3(2), pp. 122-129.
142. Vernon Singleton, L, Rudolf Orthofer, and M Lamuela Raventos Rosa (1999), "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent", *Methods in enzymology*. 299, pp. 152-178.
143. AR Srividya and VJ Vishnuvarthan (2011), "Probiotic: a rational approach to use Probiotic as medicine", *Pharmaceutic Front Res*. 1, pp. 126-134.
144. Yongxu Sun, Jicheng Liu, and John F Kennedy (2010), "Application of response surface methodology for optimization of polysaccharides production parameters from the roots of *Codonopsis pilosula* by a central composite design", *Carbohydrate Polymers*. 80(3), pp. 949-953.
145. Hoon H Sunwoo, Chong-Tai Kim, Do-Yeon Kim, Jin-Soo Maeng, Chang-Won Cho, and Soo-Jeong Lee (2013), "Extraction of ginsenosides from fresh ginseng roots (*Panax ginseng* CA Meyer) using commercial enzymes and high hydrostatic pressure", *Biotechnology letters*. 35(7), pp. 1017-1022.
146. Benny KH Tan and Vanitha J (2004), "Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review", *Current Medicinal Chemistry*. 11(11), pp. 1423-1430.
147. Linda C Tapsell, Ian Hemphill, Lynne Cobiac, David R Sullivan, Michael Fenech, Craig S Patch, Steven Roodenrys, Jennifer B Keogh, Peter M Clifton, and Peter G Williams (2006), "Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future".
148. Particle characterization including sieving. Subcommittee SC 4 Technical Committee ISO/TC 24, Particle characterization (2017), *Particle size analysis: dynamic light scattering (DLS)*, ISO.
149. Shweta Tewari, Kulathooran Ramalakshmi, Laxmi Methre, Lingamallu Rao, and Mohan Jagan (2015), "Microwave-Assisted extraction of inulin from chicory roots using response surface methodology", *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 2015.
150. Francis Thevenet (2010), "Acacia Gum (Gum Arabic)", *Food Stabilizers, Thickeners and Gelling Agents*, Wiley Online Library.

151. Thomas Barclay, Markovic Milena Ginic, Peter Cooper, and Nikolai Petrovsky (2016), "Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses", *Excipients and Food Chemicals*. 1(3), p. 1132.
152. JTCL Toneli, KJ Park, JRP Ramalho, FEX Murr, and IMD Fabbro (2008), "Rheological characterization of chicory root (*Cichorium intybus* L.) inulin solution", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 25(3), pp. 461-471.
153. Shu-Chi Tsai, Shu-Fang Lu, Wen-Wen Yu, Hsiao-Chen Lin, and Wei-Guang Fu (2007), "A study on the analytical methods for total dietary fiber in fructan-containing foods". 15(3), pp. 325-331.
154. BC Tunland (2000), "Inulin-A comprehensive scientific review", *Duncan Crow Wholistic Consultan*, pp. 1-83.
155. BC Tunland and D Meyer (2002), "Nondigestible oligo-and polysaccharides (Dietary Fiber): their physiology and role in human health and food", *Food Science and Food Safety*. 1(3), pp. 90-109.
156. Erick J Vandamme and Dirk G Derycke (1983), "Microbial inulinases: fermentation process, properties, and applications", *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier, pp. 139-176.
157. Francisca Wardah and Setyowati Murti (2011), Utilization of Kolesom (*Codonopsis javanica*) as a Tonicat Gunung Jampang Village, South Garut, *The 40 Meeting of National Working Group on Indonesia Medicinal Plants*, Editor^Editors, Biopharmaca Research Center, Institute of Research and Community Services - Bogor Agricultural University, Indonesia, p. 208.
158. WHO (1992), "Quality control methods for medicinal plant materials ".
159. WHO (2015), "Standard for ginseng products codex stan 321-2015".
160. WHO and FAO (2001), "Health and nutritional properties of probiotiCs in food including powder milk with live lactic acid bacteria", *Prevention*. 5(1), pp. 1-4.
161. WHO Western Pacific Region (1990), *Medicinal plants in Viet nam*, Ha noi.
162. Ricardo G Woisky and Antonio Salatino (1998), "Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control". 37(2), pp. 99-105.
163. JMW Wong, EM Comelli, CWC Kendall, JL Sievenpiper, JC Noronha, and DJA Jenkins (2017), "Dietary Fiber, Soluble and Insoluble, Carbohydrates, Fructose, and Lipids", *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, Elsevier, pp. 187-200.
164. Jun Xu, Rui-Qi Yue, Jing Liu, HingMan Ho, Tao Yi, Hu-Biao Chen, and Quan-Bin Han (2014), "Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation", *International Journal of Biological Macromolecules*. 67, pp. 205-209.

165. Chunxia Yang, Yuqiang Gou, Jiayu Chen, Jing An, Wenxia Chen, and Fangdi Hu (2013), "Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from *Codonopsis pilosula*", *Carbohydrate Polymers*. 98(1), pp. 886-895.
166. Lujia Yang, Qian Zhang, Jieyao Huang, Danning Liu, Yunfei Lan, Lujiang Yuan, and Qianfeng Chen (2020), "Xianglian Pill ameliorates antibiotic-associated diarrhea by restoring intestinal microbiota and attenuating mucosal damage", *Journal of Ethnopharmacology*. 264, p. 113377.
167. OA Yevtifieieva, Kseniya I Proskurina, Nataliya N Smelova, and I Yu Petukhova (2016), "Development and validation of UV-Spectrophotometric method for quantitative determination of inulin by specific absorbance".
168. Ki-Yeon Yoo, Choong Hyun Lee, Hua Li, Joon Ha Park, Jung Hoon Choi, In Koo Hwang, Il-Jun Kang, and Moo-Ho Won (2011), "Ethyl acetate extracts of raw and steamed *Codonopsis lanceolata* protects against ischemic damage potentially by maintaining SOD1 and BDNF levels", *International Journal of Neuroscience*. 121(9), pp. 503-509.
169. Yuanfeng Zou, Xingfu Chen, Wenyu Yang, and Sha Liu (2011), "Response surface methodology for optimization of the ultrasonic extraction of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* LT Shen", *Carbohydrate Polymers*. 84(1), pp. 503-508.
170. Simona Zavoi, Florinela Fetea, Floricuta Ranga, Anca Bacui, and Carmen Socacui (2011), "Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by UV-Vis and FT-MIR spectroscopy", *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 39(2), pp. 82-89.
171. Wenzhao Zhang (2017), Brief Description of the Difference between Ginseng and *Codonopsis*, 2016 7th International Conference on Education, Management, Computer and Medicine (EMCM 2016), Atlantis Press.
172. Ya Jun Zhang, Li Xia Zhang, Jing Feng Yang, and Zhong Yan Liang (2010), "Structure analysis of water-soluble polysaccharide CPPS3 isolated from *Codonopsis pilosula*", *Fitoterapia*. 81(3), pp. 157-161.
173. Li Zhanting (2012), "The protection reduce the lack of blood at the dragon mice of the polysaccharide *C. pilosula*", *Carbohydrate Polymers*. 90(1.4), pp. 1739–1743.
174. Zhongzhen Zhao, Zhitao Liang, and Guo Ping (2011), "Macroscopic identification of Chinese medicinal materials: traditional experiences and modern understanding", *Journal of Ethnopharmacology*. 134(3), pp. 556-564.
175. Zhen Ming Chi, Tong Zhang, Tian-Shu Cao, Xiao-Yan Liu, Wei Cui, and Chun-Hai Zhao (2011), "Biotechnological potential of inulin for bioprocesses", *Bioresource Technology*. 102(6), pp. 4295-4303.

176. Qin Yan Zhu, M Hackman Robert, L Ensunsa Jodi, R Holt Roberta, and L Keen Carl (2002), "Antioxidative activities of oolong tea", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(23), pp. 6929-6934.
177. JE Zimeri and JL Kokini (1998), "An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies", *International Dairy Journal*. 8(5-6), pp. 473-479.
178. Angela Zuleta and María E. Sambucetti (2001), "Inulin Determination for Food Labeling", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(10), pp. 4570-4572.
179. Bao Yu Hu, Jun Cai Deng, Cai Qiong Yang, Yao Hu, Jing Zhang, Wen Yu Yang, and Jiang Liu (2017), *Extraction optimization, purification and characterization of polysaccharides from the seed coat of black soybean*, accessed 12-12, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5739467/>.
180. Alanna J. Moshfegh, James E. Friday, Joseph P. Goldman, and Jaspreet K. Chug Ahuja (1999), "Presence of Inulin and Oligofructose in the Diets of Americans", *The Journal of Nutrition*. 129(7), pp. 1407S-1411S.
181. Muhammad Shoaib, Aamir Shehzad, Mukama Omar, Allah Rakha, Husnain Raza, Hafiz Rizwan Sharif, Azam Shakeel, Anum Ansari, and Sobia Niazi (2016), "Inulin: Properties, health benefits and food applications", *Carbohydrate polymers*. 147, pp. 444-454.

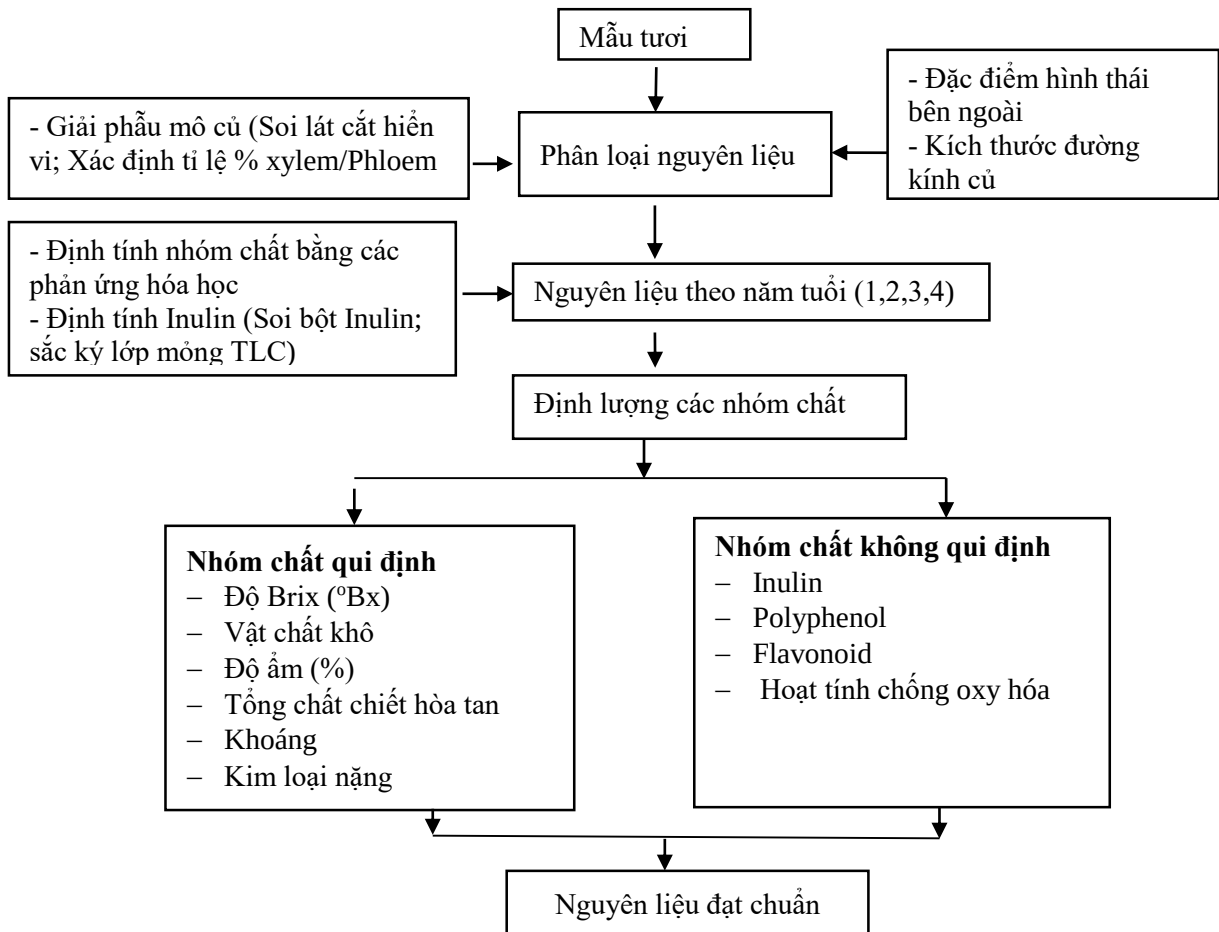
PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1. BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM TRONG NGHIÊN CỨU

1.1. Xác định nguyên liệu đạt chuẩn

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định thời điểm thu hoạch thích hợp và xác định nguyên liệu đạt tiêu chuẩn làm nguyên liệu cho sản xuất bột Inulin.

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ hình 1.



Hình 1. 5. Sơ đồ phân loại đẳng sâm theo năm tăng trưởng

1.1.1. Phân loại độ tuổi dựa vào đặc điểm hình thái và phân tích giải phẫu mô củ + Dựa vào đặc điểm hình thái

Các đặc điểm mô tả hình thái bên ngoài (Màu, mùi, vị, lát cắt tươi, khô) theo Dược Điển Việt Nam V (2017) và nghiên cứu của Zhang (2017).

Các đặc điểm nhận dạng chính: Số vòng năm trên vỏ rễ. Sự phân nhánh của rễ chính, mặt lát cắt tươi và khô theo Zhao và Cs (2011).

Kích thước đường kính củ (mm): Đo chỗ phình to nhất của củ bằng thước kẹp lòng tròn với đơn vị nhỏ nhất 0,1mm.

+ Phân tích giải phẫu mô củ:

Mẫu tiêu bản hiển vi: Mỗi củ chỉ cắt 01 lát. Dùng dao lam cắt lát mỏng vuông góc với thân rễ, cách cổ rễ 1,5-2cm. Cố định hình dạng lát cắt bằng Ethanol 70%, sau đó nhuộm màu lát cắt bằng Carmin lục Iode theo Trần Hùng (2004). Lát cắt tiêu bản hiển vi được soi trên kính hiển vi soi nổi ở độ phóng đại 1-1,25 lần (Olympus SZX7, Nhật).

1.1.2. Định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học

Chiết được liệu lần lượt với các dung môi theo độ phân cực tăng dần từ *n*-hexan đến ethanol 90% và sau cùng là nước. Các dịch chiết được sử dụng để định tính các nhóm hợp chất tự nhiên bằng các phản ứng hóa học đặc trưng.

+ Định tính thành phần các chất trong dịch chiết *n*-hexan

Cân 5g bột dược liệu vào bình chiết Soxhlet. Chiết bằng *n*-hexan đến khi dung môi trong bình chiết không màu. Dịch chiết *n*-hexan được cô đặc trong cô quay chân không thu hồi bớt dung môi. Dịch cô đặc được dùng định tính:

- Chất béo : Chấm 3 giọt dịch chiết *n*-hexan lên giấy lọc. Sấy nhẹ đến khô. Nếu thấy có vết mờ trên giấy lọc nghĩa là có chất béo.

- Carotenoid : Cho vào ống nghiệm 1ml dịch chiết, để bốc hơi dung môi đến cạn. Thêm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc. Nếu thấy xuất hiện màu xanh dương là có thể có carotenoid.

- Phytosterol : (thử nghiệm Lieberman) (AC_2/ H_2SO_4). Hút 15 ml chiết xuất vào chén và cô đặc đến cạn, nhỏ 10 giọt Anhidric acetic vào chén để hòa tan cạn, rót hết dung dịch này vào ống nghiệm. Nhỏ chậm chậm vài giọt H_2SO_4 đậm đặc và lắc, để đứng ống nghiệm nếu thấy mặt phân cách giữa 2 dung dịch trong ống nghiệm có màu vàng lục hoặc lục đỏ, có thể có phytosterol.

- Tinh dầu : Hút 3-5 ml vào chén sứ và cho bốc hơi đến khô, nếu có mùi thơm đặc trưng là có tinh dầu.

+ Định tính các thành phần trong dịch chiết ethanol

Phần bã thô sau khi chiết với *n*-hexan, được sấy khô. Đun hồi lưu trong 20 phút với 90 ml EtOH 90 %. Lọc lấy dịch để định tính các chất sau:

- Alkaloid : Hút 15ml dịch chiết cô đặc cách thủy đến cạn. Hòa cạn với 3-4 ml HCl 2%. Dung dịch này được thử với 4 thuốc thử Wagner, thuốc thử Bouchardat và Dragendorff. Nếu dương tính với cả 3 loại thuốc thử, có thể có alkaloid.

- Thử nghiệm Wagner : 1ml dịch chiết được xử lý bằng thuốc thử Wagner. Sự hình thành kết tủa màu nâu đỏ cho thấy sự hiện diện của các alkaloid.

○ Thử nghiệm Dragendorff : 1ml chiết xuất được thêm vào 2 giọt thuốc thử Dragendorff. Sự phát triển của kết tủa dạng kem là dấu hiệu cho thấy sự hiện diện của các alkaloid

– Polyphenol : 15 ml dịch chiết được cô đặc còn 2ml. Thêm vào 4 giọt dung dịch FeCl_3 5%. Sự hình thành của màu đen hơi xanh cho thấy sự hiện diện của Polyphenol.

– Flavonoid : Phản ứng (PU) với dung dịch NaOH 10 % : Cho 1ml dịch chiết còn vào ống nghiệm, thêm vài giọt dung dịch NaOH 10%, nếu thấy xuất hiện tủa đục và màu của dịch chiết vàng đậm lên là phản ứng dương tính.

– Coumarin : 3 ml NaOH 10% được thêm vào 2 ml dịch chiết hình thành màu vàng cho thấy sự hiện diện của Coumarin.

– Saponin : 5 ml dịch chiết được cô đặc các thủy đến cạn trong ống nghiệm, thêm 5 ml nước cất, bịt miệng ống. Lắc mạnh dọc theo chiều dài của ống trong 15 phút, nếu có bọt bền có thể có saponin.

– Acid amin : Thử nghiệm Ninhydrin: Đổ 2 ml dịch chiết lên trên 2 ml trên thuốc thử ninhydrin và đun sôi trong vài phút, hình thành màu xanh lam cho thấy sự hiện diện của axit amin [137].

– Đường khử (PU Fehling's Test) : 15 ml dung dịch ethanol, cô đặc đến cạn. Hòa tan với 4-5 ml nước cất. đun nóng và lọc. Cho vào dịch lọc 4-5 giọt dung dịch Fehling A, 4-5 giọt dung dịch Fehling B. Đun cách thủy. Sự hình thành kết tủa màu vàng hoặc nâu đỏ cho thấy sự có mặt của đường khử trong dung dịch thử (Chất hydroxit đồng kiềm màu xanh có trong dung dịch Fehling, khi được đun nóng với sự khử đường, được khử thành oxit đồng màu vàng hoặc đỏ và nó bị kết tủa.

– Acid hữu cơ

○ Cho vào ống nghiệm 5 ml dịch chiết còn, thêm 1 lần thể tích nước và thêm vài tinh thể Na_2CO_3 . Nếu thấy có sủi bọt có thể có acid hữu cơ.

○ Hút 5 ml dịch chiết còn, cô đặc đến cạn, thêm 1 ml nước hòa tan cạn, nhỏ 1 giọt lên giấy quỳ. Nếu giấy quỳ chuyển màu đỏ là có acid hữu cơ.

+ Định tính các thành phần trong dịch chiết nước

Phần bã sau khi chiết với EtOH 90% được sấy khô, sau đó chiết siêu âm với dung dịch nước và H_2SO_4 1% (3 lần x 60 ml/lần). Cô đặc xuống còn 60 ml.

– Saponin : Hút 10 ml dung dịch được lắc mạnh dọc theo chiều dài của ống trong 15 phút, nếu có bọt bền có thể có saponin.

– Tanin : 15 ml dung dịch được trung hòa với acetat natri, thêm vài giọt clorua sắt (FeCl_3) 5% (TS-Tets solution 50g/l) vào dịch chiết, nó chuyển sang màu đen hơi xanh hoặc đen lục.

– Inulin :

+ Định tính inulin và fructan bằng phương pháp soi bột

Hút 15 ml cô đặc đến cạn. Đặt 1 hoặc 2 giọt ethanol 80% trên phiến kính. Làm ẩm đầu kim bằng nước và nhúng vào cồn. Chuyển một lượng nhỏ cồn dính vào đầu kim vào giọt chất lỏng trên phiến kính. Khuấy kỹ cồn thận và áp lên trên kính một lamien loại bỏ chất lỏng dư ra khỏi rìa của tấm kính bằng một dải giấy lọc. Quan sát tinh thể inulin.

+ Định tính inulin bằng sắc ký lớp mỏng TLC

Sắc ký lớp mỏng được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn silica gel 60 F254 (Merck) và silica gel RP (Merck). Thuốc thử hiện màu là dung dịch H_2SO_4 10% và đèn tử ngoại bước sóng 254 và 365 nm.

Thực hiện: Dung dịch Inulin chuẩn (Merck) và mẫu có nồng độ 5,10, 20 mg/ml được thủy phân bằng axit oxalic 5%. Tỷ lệ dung dịch inulin chuẩn/ acid oxalic 1:4. Đun cách thủy trong 120 phút. Hút 6 μl của mỗi mẫu thủy phân chấm trên lớp mỏng Silica gel 60 F₂₅₄, 3x7 cm, sấy khô bằng máy sấy cầm tay, sau đó thả tấm lớp mỏng vào trong bình sắc ký chứa hệ dung môi axit axetic: CHCl_3 : H_2O với tỷ lệ (7: 6: 1). Đợi đến khi pha động cách mép lớp mỏng 1cm. Sấy khô, tiếp tục phun thuốc thử hiện màu (0,2% resorcinol trong axit sulfuric 10%). Sấy khô, soi UV. Thực hiện tương tự đối với bột của 20 ml dịch chiết đã được cô đặc đến cạn. So sánh mẫu nghiên cứu với chất chuẩn Glucose, Fructose, Sucrose, Inulin (Merck- Đức).

– Anthranoid (Phản ứng Borntraeger) : Cho vào ống nghiệm 1g bột dược liệu, thêm dung dịch H_2SO_4 25% tới ngập dược liệu rồi đun sôi trong vài phút. Lọc dịch chiết vào bình gạn, để nguội rồi lắc với 5ml ether. Lấy 1ml dịch chiết ether cho vào ống nghiệm, thêm 1ml KOH 10%. Nếu có anthranoid sẽ thấy xuất hiện màu đỏ ở lớp kiềm.

1.1.3. Định lượng hóa học các chỉ tiêu qui định

– *Xác định độ ẩm*

Độ ẩm được xác định theo WHO (1992) [158]. Chỉ tiêu này thực hiện bằng thiết bị sấy ẩm hồng ngoại tự động (Moisture, AF 50, Nhật). Thực hiện cân 2 g mẫu cho một lần đo.

– *Định lượng đường tổng số*

Cắt lát, trộn đều và giã nhuyễn để lấy dịch nguyên chất, nhỏ vài giọt dịch nước từ mẫu thu được vào thiết bị đo độ Bx. Đọc số hiện trên màn hình.

– *Vật chất khô*

Mẫu tươi cắt lát mỏng và cân 100g, sấy 105°C đến khô. Để vào bình hút ẩm 2h. Sấy lại, thao tác lặp lại đến khi trọng lượng không đổi. Cân khối lượng mẫu sau khi sấy.

$$\text{Hàm lượng vật chất khô(g/100g)} W = W_1 - W_2$$

Trong đó W_1 : Khối lượng của mẫu trước khi sấy khô (100g)

W_2 : Khối lượng của mẫu sau khi sấy khô (g).

– *Tổng chất chiết hòa tan*

Cân chính xác 2,0 g mẫu khô, thêm nước vừa đủ 100 ml. Cân trọng lượng (a). Đun hồi lưu 15 phút. Lọc, thu dịch chiết và loại bã. Bù nước cho đủ trong lượng (a). Hút 25ml dịch chiết vào đĩa petri đã cân khối lượng. Sấy mẫu trong tủ sấy ở 105°C/3h. Cân lại khối lượng.

$$\text{Tổng chất rắn hòa tan (mg/g)} = [(m_2 - m_1) \cdot \frac{V}{v}] \times 1/m$$

Trong đó: m khối lượng mẫu đem chiết (g)

m_2 : khối lượng đĩa petri và mẫu sau khi sấy khô (g)

m_1 : khối lượng đĩa petri (g)

V: thể tích chiết

v: thể tích đem đi làm khô

– *Tro tổng số và tro không tan trong acid*

+ *Tro tổng số*

Cân chính xác 2g mẫu khô vào một chén nung sứ chịu nhiệt đã được nung khô trước đó. Trải vật liệu thành một lớp mỏng và đốt cháy bằng cách tăng dần nhiệt lên 500-600°C cho đến khi nó có màu trắng, không còn màu đen carbon. Làm nguội trong bình hút ẩm trong 30 phút và cân ngay. Tính hàm lượng tro tổng số tính bằng mg/g vật liệu khô.

$$\text{Tổng lượng tro (\%)} = (m_2 - m_1) \cdot \frac{100}{m}$$

Trong đó: m_2 : Khối lượng cốc và tro (mg)

m_1 : Khối lượng cốc trước khi đốt (mg)

m: Khối lượng mẫu đem đốt (mg)

+ *Tro không tan trong acid*

Thêm 25ml axit clohydric TS (Test solution) (~70g/l) vào chén nung chứa tro tổng số, đậy nắp và đun sôi nhẹ trong 5 phút. Rửa nắp và chén nung bằng 5 ml nước. Lọc qua giấy lọc không tro đã được làm khô và cân trọng lượng trước đó; thu chất không hòa tan trên giấy lọc không tro và rửa bằng nước nóng cho đến khi dịch lọc trung tính. Sấy khô giấy lọc và chất không hòa tan đến khối lượng không đổi. Để cạn nguội trong bình hút ẩm thích hợp trong 30 phút, cân ngay. Tính hàm lượng tro không tan trong axit tính bằng mg/g vật liệu khô.

– *Xác định hàm lượng các kim loại nặng và tạp chất vơ cơ*

Các nguyên tố kim loại nặng Hg, As, Cd và Pb được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử - lò graphite - chất cải biến hóa học (CM-GF-AAS) theo TCVN 7602:2007/ (AOAC 972.25).

$$\text{Hàm lượng kim loại nặng (K)} = \frac{x.k.V}{m.v.1000} \text{ (mg/kg)}$$

Với x là nồng độ kim loại trong mẫu phân tích (mg), k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích dịch chiết mẫu (ml), v: Thể tích dịch chiết đem phân tích (ml), m: Khối lượng mẫu phân tích (g).

*** Thủy ngân**

Nguyên lý: Thủy ngân được tách khỏi phần mẫu thử đã phân hủy dưới dạng hơi thủy ngân bằng phương pháp hóa hơi lạnh, sau đó lượng thủy ngân được xác định bằng đo phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa trên thiết bị MVU – AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản. Hàm lượng thủy ngân được xác định theo phương pháp đường chuẩn.

Hóa chất: H₂SO₄ đặc; 5 M; 9 M. HNO₃ đặc; 0,05 M; 7 M. Na₂MoO₄ 2%: hòa tan 2 g Na₂MoO₄ với nước cất rồi định mức đến 100 ml và acid HClO₄.

Dung dịch khử: pha 50 ml acid sulfuric đặc với 300 ml nước cất, để nguội và hòa tan 15 g NaCl, 15 g hydroylamin sulfat và 25 g SnCl₂. Định mức đến 500 ml với nước cất 2 lần.

Dung dịch pha loãng: pha 56 ml acid nitric đặc và 67 ml acid sulfuric với 500 ml nước cất rồi định mức 1000 ml.

Dung dịch chuẩn gốc thủy ngân 1000 mg/l -Merck

Dung dịch chuẩn thủy ngân 1 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc định mức 100 ml với HNO₃ 0,05 M.

Dung dịch chuẩn thủy ngân 0,01 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn 1 mg/l định mức 100 ml với HNO₃ 0,05 M.

Thực hiện:

Cân 5 g mẫu thử cho vào bình phân hủy, thêm 25 ml H_2SO_4 9 M, 20 ml acid HNO_3 7 M, 1 ml Na_2MoO_4 2%. Lắp bộ sinh hàn và đun nhẹ trong 1h rồi để yên trong 15 phút, thêm 20 ml hỗn hợp acid HNO_3 7 M và acid HClO_4 tỷ lệ 1:1 qua sinh hàn.

Tắt nước sinh hàn và đun sôi mạnh đến xuất hiện khói trắng trong bình, tiếp tục đun trong 10 phút.

Để nguội thêm cẩn thận 10 ml nước qua bộ sinh hàn, đun sôi trong 10 phút, tắt bếp và rửa sinh hàn bằng nước cất 2 lần. Để nguội, chuyển vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng nước cất 2 lần.

Tiến hành phép thử trắng với quy trình như trên nhưng thay mẫu thử bằng nước cất 2 lần.

Pha dãy dung dịch chuẩn: lấy lần lượt 1; 2; 5; 10; 20; 50 ml dung dịch chuẩn Hg 0,01 mg/l vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng HNO_3 0,05 M. Dãy nồng độ thu được là 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 $\mu\text{g/l}$.

Tiến hành đo dãy chuẩn và mẫu thử theo quy trình của thiết bị MVU – AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.

Kết quả đường chuẩn và mẫu thử được phần mềm của thiết bị xử lý.

*** Asen**

Nguyên lý: Xác định asen trong đẳng sâm bằng kỹ thuật đo phổ hấp thụ nguyên tử giải phóng hydrua trên thiết bị HVG 1A, AA 7000 – Shimadzu – Nhật Bản.

Hóa chất: Acid HNO_3 đặc. Acid HCl 8 M; 6M. Dung dịch NaBH_4 1%: hòa tan 1g NaBH_4 trong NaOH 1%, định mức đến vạch bằng NaOH 1%.

Dung dịch KI 20%: hòa tan 20g KI trong nước cất, để yên đến nhiệt độ phòng rồi định mức 100 ml bằng nước cất 2 lần. Pha dung dịch trước khi sử dụng.

Dung dịch chuẩn gốc asen 1000 mg/l – Merck

Dung dịch chuẩn asen 1 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Dung dịch chuẩn asen 0,1 mg/l: lấy 10 ml dung dịch chuẩn 1 mg/l định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Thực hiện:

Cân 5g mẫu thử vào bình phá mẫu, thêm vào 30 ml HNO_3 đặc, để yên qua đêm.

Lắp bộ sinh hàn rồi tiến hành đun phá mẫu trong 2h.

Để nguội, thêm vào 20 ml nước cất, đun sôi trong 10 phút. Tắt điện, tắt nước sinh hàn. Để nguội, chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng nước cất 2 lần.

Tiến hành phép thử trắng với quy trình như trên nhưng thay mẫu thử bằng nước cất 2 lần.

Pha dãy dung dịch chuẩn: lấy lần lượt 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ml dung dịch chuẩn As 0,1 mg/l vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng HNO_3 0,05 M. Dãy nồng độ thu được là 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 $\mu\text{g/l}$.

Đo dãy chuẩn và mẫu thử theo quy trình của thiết bị HVG 1A, AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.

Kết quả đường chuẩn và mẫu thử được phân mềm của thiết bị xử lý.

*** Cadmi**

Nguyên lý: Phân hủy các hợp chất hữu cơ bằng acid nitric đậm đặc ở nhiệt độ cao. Xác định cation cadmi (II) trong dịch chiết bằng kỹ thuật đo phổ hấp nguyên tử không ngọn lửa, thực hiện trên GFA – AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.

Hóa chất:

Acid nitric đặc; acid nitric/nước 1:9 (v: v); 0,05 M. Dung dịch chuẩn gốc cadmi 1000 mg/l (Merck).

Dung dịch chuẩn cadmi 1 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Dung dịch chuẩn cadmi 0,01 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn 1 mg/l định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Thực hiện:

Cân 5g mẫu thử vào bình phá mẫu, thêm vào 30 ml HNO_3 đặc, để yên qua đêm.

Lắp bộ sinh hàn rồi tiến hành đun phá mẫu trong 2h.

Để nguội, thêm vào 20 ml nước cất, đun sôi trong 10 phút. Tắt điện, tắt nước sinh hàn. Để nguội, chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng nước cất 2 lần.

Tiến hành phép thử trắng với quy trình như trên nhưng thay mẫu thử bằng nước cất 2 lần.

Pha dãy dung dịch chuẩn: lấy lần lượt 1; 2; 5; 10; 20; 50 ml dung dịch chuẩn Cd^{2+} 0,01 mg/l vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng HNO_3 0,05 M. Dãy nồng độ thu được là 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 $\mu\text{g/l}$.

Đo dãy chuẩn và mẫu thử theo quy trình của thiết bị GFA-AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.

Kết quả đường chuẩn và mẫu thử được phần mềm của thiết bị xử lý.

*** Chì**

Nguyên lý: *Phân hủy các hợp chất hữu cơ bằng acid nitric đậm đặc ở nhiệt độ cao. Xác định cation chì (II) trong dịch chiết bằng kỹ thuật đo phổ hấp nguyên tử không ngọn lửa, thực hiện trên GFA – AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.*

Hóa chất:

Acid nitric đặc; acid nitric/nước 1:9 (v:v); 0,05 M. Dung dịch chuẩn gốc chì 1000 mg/l (Merck).

Dung dịch chuẩn chì 1 mg/l: lấy 1 ml dung dịch chuẩn gốc định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Dung dịch chuẩn chì 0,1 mg/l: lấy 10 ml dung dịch chuẩn 1 mg/l định mức 100 ml với HNO_3 0,05 M.

Thực hiện:

Cân 5g mẫu thử vào bình phá mẫu, thêm vào 30 ml HNO_3 đặc, để yên qua đêm.

Lắp bộ sinh hàn rồi tiến hành đun phá mẫu trong 2h.

Để nguội, thêm vào 20 ml nước cất, đun sôi trong 10 phút. Tắt điện, tắt nước sinh hàn. Để nguội, chuyển toàn bộ vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng nước cất 2 lần.

Tiến hành phép thử trắng với quy trình như trên nhưng thay mẫu thử bằng nước cất 2 lần.

Pha dãy dung dịch chuẩn: lấy lần lượt 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 ml dung dịch chuẩn Pb^{2+} 0,1 mg/l vào bình định mức 100 ml rồi định mức đến vạch bằng HNO_3 0,05 M. Dãy nồng độ thu được là 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 $\mu\text{g/l}$.

Đo dãy chuẩn và mẫu thử theo quy trình của thiết bị GFA - AA 7000, Shimadzu – Nhật Bản.

Kết quả đường chuẩn và mẫu thử được phần mềm của thiết bị xử lý.

– *Xác định nguyên liệu đạt chuẩn*

Qui định tiêu chuẩn cho đẳng sâm nguyên liệu theo DĐVN, V (2017) [6]

1.1.4. Định lượng Polyphenol, Flavonoid hoạt tính chống oxy hóa

+ Chiết mẫu định lượng Polyphenol, Flavonoid

Cân 2 gram mẫu cho vào bình tam giác với 100 ml ethanol 99,7% và lắc trong 5 giờ ở nhiệt độ phòng (25°C). Sau đó giữ yên hỗn hợp trong 24 tiếng ở nhiệt độ phòng (25°C) và lọc thu dịch sau khi lọc bằng giấy lọc. Phần rắn tiếp tục được chiết 2 lần với 30 ml ethanol 99,7%. Gộp dịch, cô quay chân không ở 40°C (KIA, V10 Digital. Hàn Quốc) và bảo quản lạnh âm sâu (-52°C) (Sanyo, Nhật) trong chai tối màu để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Trước khi phân tích, dịch được rã đông chậm, lọc qua màng lọc 0,45 µm (Allpure PTFE, Taiwain).

+ Định lượng Polyphenol

Nguyên lý: Các polyphenol trong dịch chiết được xác định bằng đo màu, dùng thuốc thử Folin-Ciocalteu. Thuốc thử này chứa chất oxi hóa là axit phospho-vonframic, trong quá trình khử, các nhóm hydroxy phenol dễ bị oxi hóa, chất oxi hóa này sinh ra màu xanh có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 755 nm. Phản ứng này là do sự hình thành màu xanh của vonfram và molybden.

Thực hiện: Bỏ sung 1200µl thuốc thử Folin - Ciocalteu 10% vào 80µL dịch mẫu và giữ trong 6 phút ở nhiệt độ phòng (25°C), sau đó tiếp tục bỏ sung 1200µl Na₂CO₃ 7,5% (w/v) vào hỗn hợp và ủ 60 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Hỗn hợp cuối cùng được đo độ hấp thụ ở 755 nm với chất chuẩn acid garlic (Merck) và mẫu trắng là 99,7% ethanol.

$$\text{Hàm lượng Poyphenol (PL)} = \frac{x.k.V}{m.v.1000} \text{ (mg/g)}$$

Với x là nồng độ acid garlic trong mẫu phân tích, k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích dịch chiết (ml), v: Thể tích dịch mẫu phân tích, m: Khối lượng mẫu phân tích (g).

+ Định lượng Flavonoid

Nguyên lý: Flavonoid trong dịch chiết tạo phức màu vàng với dung dịch AlCl₃. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng Flavonoid.

Thực hiện: Hút 0,5ml dịch mẫu, 1,5 ml ethanol 99,7%, 0,1ml AlCl₃10%, 0,1 ml kali acetate 1M (CH₃COOK) và 2,8 ml nước cất), lắc đều và giữ 30 phút ở nhiệt độ phòng (25°C) trong bóng tối. Độ hấp thụ của hỗn hợp cuối cùng được đo ở bước sóng 430 nm với chất chuẩn là quercetin. Ở mẫu trắng, quercetin được thay bằng ethanol 99,7%; 0,1 ml AlCl₃ 10% thay bằng 0,1 ml nước cất 2 lần.

$$\text{Hàm lượng Flavonois (FL)} = \frac{x.k.V}{m.v.1000} \text{ (mg/g)}$$

Với x là nồng độ Quercetin trong mẫu phân tích, k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích dịch chiết (ml), v: Thể tích dịch mẫu phân tích, m: Khối lượng mẫu phân tích (g).

+ **Xác định hoạt tính chống oxy hóa**

– **Xác định hoạt tính khử Fe (RP- Reducing Power)**

Nguyên lý: Chất chống oxy hóa trong dịch chiết sẽ khử sắt (III) thành sắt (II) và làm dung dịch chuyển từ màu vàng sang màu xanh lá cây.

Đầu tiên, lần lượt 1 ml dung dịch đệm phosphate (pH 7,2) và 0,4 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ 1% vào 1 ml dịch mẫu, sau đó lắc và giữ ở 50°C. Sau 20 phút, thêm lần lượt 1 ml CCl_3COOH 10%, 0,6 ml nước cất và 0,16 ml $FeCl_3$ 0,1% vào hỗn hợp và giữ 5 phút trước khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 699 nm với chất chuẩn $FeSO_4$ (Merck).

$$\text{Năng lực khử F} = \frac{x.k.V}{v.m.1000} \text{ (mg } FeSO_4/g)$$

Với x là nồng độ $FeSO_4$ trong mẫu phân tích, k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích dịch chiết (ml), v: Thể tích dịch mẫu phân tích, m: Khối lượng mẫu phân tích (g).

– **Xác định hoạt tính khử ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)**

Nguyên lý: ABTS trong dung dịch phản ứng với $K_2S_2O_8$ sau 14 -16 tiếng, tạo thành dung dịch $ABTS^+$ (màu xanh dương). Các chất chống oxy hóa trong dịch chiết oxy hóa $ABTS^+$ làm chúng trở về dạng ABTS. Khả năng chống oxy hóa càng mạnh thì màu của dung dịch $ABTS^+$ càng giảm.

Thực hiện: Chuẩn bị dung dịch [ABTS (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-acid)] (7mmol/l) và $K_2S_2O_8$ (2,45mmol/l) theo tỉ lệ 1/1 (v/v) và giữ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 16 tiếng. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng với ethanol 99,7% tỉ lệ 1/50 (v/v) để độ hấp thụ của dung dịch $ABTS^+$ là $0,7 \pm 0,02$, tiếp theo, đồng hóa hỗn hợp (40 µl dịch mẫu và 4 ml dung dịch $ABTS^+$) và giữ 6 phút ở nhiệt độ phòng (25°C) trong bóng tối trước khi đo độ hấp thụ ở 734 nm, nước cất là mẫu đối chứng. Hoạt tính ABTS được tính như sau:

$$\%inhibition = \frac{(Ac - As)}{Ac} \times 100$$

Với As (Sample) là độ hấp thụ của mẫu được kiểm tra, Ac (Control) là độ hấp thụ của mẫu đối chứng.

– **Định lượng tổng năng lực khử TAC**

Nguyên lý: Chất chống oxy hóa có trong dịch chiết sẽ khử Mo (VI) về Mo (V), sau đó hình thành nhóm phosphate xanh - Mo (V) phức tạp trong môi trường acid.

Thực hiện: Hút 0,5ml dịch chiết, thêm 5ml dung dịch TAC (gồm 0,6 M H₂SO₄; 28 mM sodium phosphate; 4mM amonium molybdate). Sau đó ủ ở nhiệt độ 95°C trong 90 phút, tiếp tục làm lạnh đến nhiệt độ phòng (25°C). Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 694 nm. Vitamin C được dùng làm chất chuẩn.

$$\text{Tổng năng lực khử TAC} = \frac{x \cdot k \cdot V}{v \cdot m \cdot 1000} \text{ (mg Vit C/g khô)}$$

Với x là nồng độ acid ascorbic trong mẫu phân tích, k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích của mẫu chiết (ml), v: Thể tích mẫu phân tích, m: Khối lượng mẫu phân tích tính (g).

1.1.5. Định lượng Fructan/Inulin

Nguyên lý: Hydroxy methyl furfural hình thành từ fructose trong môi trường acid phản ứng với resorcinol để cung cấp cho một sản phẩm màu đỏ cam.

+ Chiết mẫu định lượng Inulin/fructan

Cân 2 g mẫu vào bình thủy tinh và bổ sung 50 ml nước/lần vào bình và siêu âm (Elmasonic S 300H) với thời gian 70 phút, lần lượt 30/10/ 10/10/10/phút/lần. Tần số siêu âm 50-60 Hz và nhiệt độ siêu âm là 70°C. Lọc dịch lọc thô bằng lưới lọc, lọc tiếp qua giấy lọc Whatman và lọc tinh bằng màng siêu lọc 0,45 µm (Allpure PTFE, Taiwain) trước khi định lượng Inulin.

Mẫu dùng để định lượng Inulin thu được bằng cách kết tủa dịch chiết với EtOH 80%. Để lạnh (6 ± 1)°C /12-24h. Ly tâm lạnh 16°C/16000 v/ phút/15 phút.

+ Định lượng Inulin

Hỗn hợp dung dịch hiện màu:

- Dung dịch HCl 30% (Tỉ lệ HCl dd/ nước cất 5:1)
- Resorcinol 200 mg resorcinol + 50 mg thiure + 20 ml acid galacia

Thực hiện: Hút A ml mẫu, thêm nước vừa đủ 1ml. Thêm 0,5 ml hỗn hợp dung dịch hiện màu (200 mg resorcinol, 50 mg thiure; 20 ml acid galacia) và thêm 3,5 ml acid clohydric (HCl 30%) vào ống nghiệm có nắp vặn. Ủ cách thủy ở 80°C trong 10 phút. Làm nguội trong bể nước lạnh. Đo độ hấp thụ của hỗn hợp ở bước sóng (483 nm) trong vòng 30 phút.

$$\text{Hàm lượng inulin } I = \frac{x \cdot k \cdot V}{m \cdot v \cdot 1000} \text{ (mg/g)}$$

Với x là nồng độ fructose trong mẫu phân tích (mg), k: Hệ số pha loãng, V: Thể tích dịch chiết mẫu (ml); v: Thể tích dịch chiết đem phân tích (ml), m: là khối lượng mẫu phân tích (g).

+ Định lượng Fructan

Định lượng Fructan thực hiện tương tự như định lượng inulin. Mẫu dùng để định lượng fructan thu được bằng cách kết tủa dịch chiết với EtOH 90%. Để lạnh (6 ± 1)°C /12-24h. Ly tâm lạnh 16°C/16000 v/ phút/ 15 phút.

$$\text{Hàm lượng Fructan } F = \frac{x.k.V}{m.v.1000} \text{ (mg/g)}$$

1.1.6. Định lượng Saccharide toàn phần

Hàm lượng saccharide toàn phần được xác định bằng phương pháp phenol acid.

Nguyên lý: Trong môi trường acid nóng, carbohydrate bị thủy phân tạo đường đơn và tiếp tục bị khử và trở thành các dẫn xuất furan (pentose thành furfural, hexose thành hydroxymethyl furfural). Các dẫn xuất furan này tạo sản phẩm màu tím với phenol có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490 nm.

Vật liệu : Phenol 5%: phenol (5g) hòa tan trong nước cất và pha loãng tới 100 ml;

- Acid sulphuric 96%.

- Chuẩn glucose:

+ Dung dịch stock 1 mg/ml

+ Dung dịch dụng chuẩn (Working standard) 0,1 mg/ml

Xây dựng đường chuẩn glucose

Chuẩn bị 6 ống nghiệm khô sạch. Dùng pipet lấy chính xác các thể tích dung dịch glucose 0,1mg/ml và thêm nước vừa đủ 2ml như trong bảng 3.1 và lắc đều:

Bảng 1. 4. Các dung dịch glucose chuẩn

Nồng độ dung dịch glucose cần pha (µg/ml)	0	10	20	30	40	50
Dung dịch chuẩn glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Nước cất (ml)	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0

- Thêm 1ml dung dịch phenol 5% vào mỗi ống nghiệm.

- Thêm 7ml acid sulphuric 96% vào mỗi ống nghiệm và lắc đều.

- Đặt ống nghiệm trong cách thủy ở nhiệt độ 40°C trong 45 phút, để nguội và đem đo quang ở bước sóng 490 nm.

Xây dựng đường chuẩn glucose dựa vào độ hấp thụ (A) và nồng độ glucose (mg/ml).

Chuẩn bị dung dịch mẫu thử

Chuẩn bị mẫu từ rễ đảng sâm

Cân chính xác khoảng 1,00 g (m) bột dược liệu đã xay nhỏ, loại tạp bằng còn 90% bằng cách chiết hồi lưu trên cách thủy (50ml còn 80% x2 lần) thời gian mỗi lần 30 phút. Lọc bỏ dịch chiết còn 90%, sấy bã dược liệu cùng giấy lọc và bình đến khô. Chiết sacharid bằng nước cất bằng cách chiết hồi lưu trong cách thủy 2 lần, mỗi lần với 25ml nước, thời gian 2 giờ. Tập trung dịch chiết nước vào bình định mức 50ml, thêm nước đến vạch thu được dung dịch A. Lấy chính xác 1ml dung dịch A vào bình định mức 100ml, thêm nước vừa đủ đến vạch thu được dung dịch B. Lấy chính xác 5ml dung dịch B vào bình định mức 10ml, thêm nước vừa đủ đến vạch thu được dung dịch C.

Mẫu bột polysaccharide thô chiết từ đảng sâm:

Cân chính xác 0,30 g bột saccharide toàn phần, hòa tan hoàn toàn trong 30 ml nước nóng. Lọc qua giấy lọc vào bình định mức 50ml. Rửa giấy lọc với khoảng 20 ml nước. Dịch lọc để nguội đến nhiệt độ phòng. Thêm nước đến vạch thu được dung dịch A. Lấy chính xác 1ml dung dịch A vào bình định mức 100ml, thêm nước vừa đủ đến vạch thu được dung dịch B. Lấy chính xác 5ml dung dịch B vào bình định mức 10 ml, thêm nước vừa đủ đến vạch thu được dung dịch C.

Tạo dẫn xuất với mẫu thử:

Hút chính xác 2 ml dung dịch thử (C) vào ống nghiệm khô sạch. Thêm vào mỗi ống nghiệm 1ml dung dịch phenol 5%, và thêm từ từ 7ml dung dịch acid sulfuric đặc, lắc đều. Đặt ống nghiệm trong cách thủy ở nhiệt độ 40°C trong 45 phút, để nguội và đem đo quang ở bước sóng 490 nm.

Tính toán kết quả

Tính toán hàm lượng polysaccharide tính theo glucose có trong dung dịch mẫu thử (C_t) dựa vào đường chuẩn và số lần pha loãng mẫu.

Hàm lượng saccharide trong mẫu thử tính theo khối lượng khô kiệt tính theo glucose được tính theo công thức:

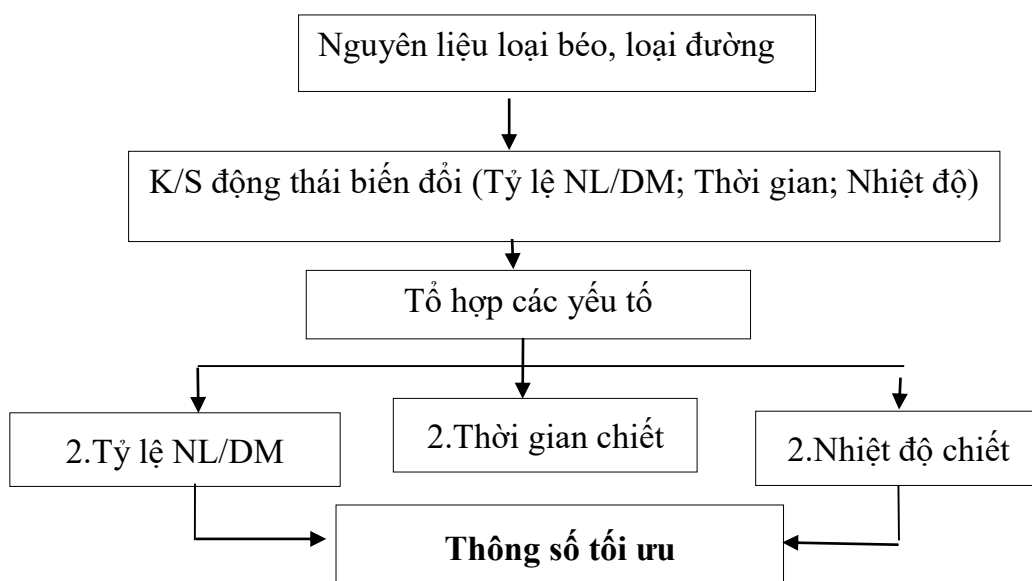
$$X (\%) = \frac{C_t \cdot 10^{-6} \cdot 50 \cdot K \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}$$

Trong đó: C_t : Nồng độ polysaccharid trong dung dịch mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)

K: Hệ số pha loãng mẫu; m: Khối lượng mẫu thử (g); W: Độ ẩm của mẫu thử (%)

1.2. Nghiên cứu chiết inulin

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ mô tả hình 1.2. và bảng 1.2.



Hình 1. 6. Sơ đồ tối ưu hóa quá trình chiết

Bảng 1. 5. Tổ hợp thực nghiệm tối ưu hóa

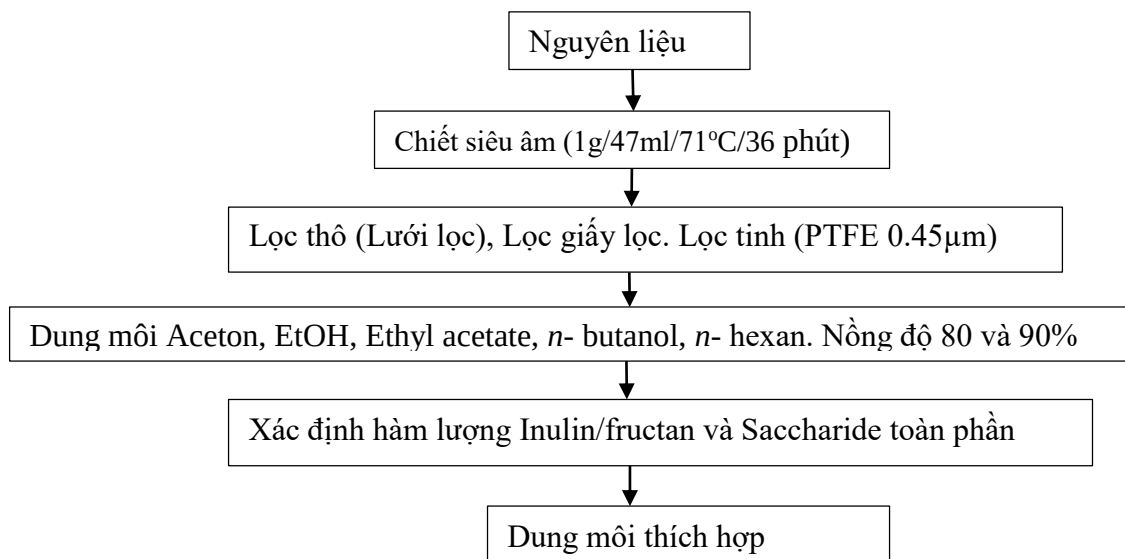
Std	Run	X ₁	X ₂	X ₃	Hàm mục tiêu Y _i (mg/g)		
					Y1:HL Inulin	Y2:HL fructan	Y3: HL chất chiết hòa tan
5	4	-1	0	-1			
9	5	0	-1	-1			
...	...	...	...	...			
17	10	0	1	1			

1.3. Nghiên cứu kết tủa inulin

1.3.1. Xác định dung môi

Mục đích nhằm chọn dung môi thích hợp nhất.

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ mô tả hình 1.3.



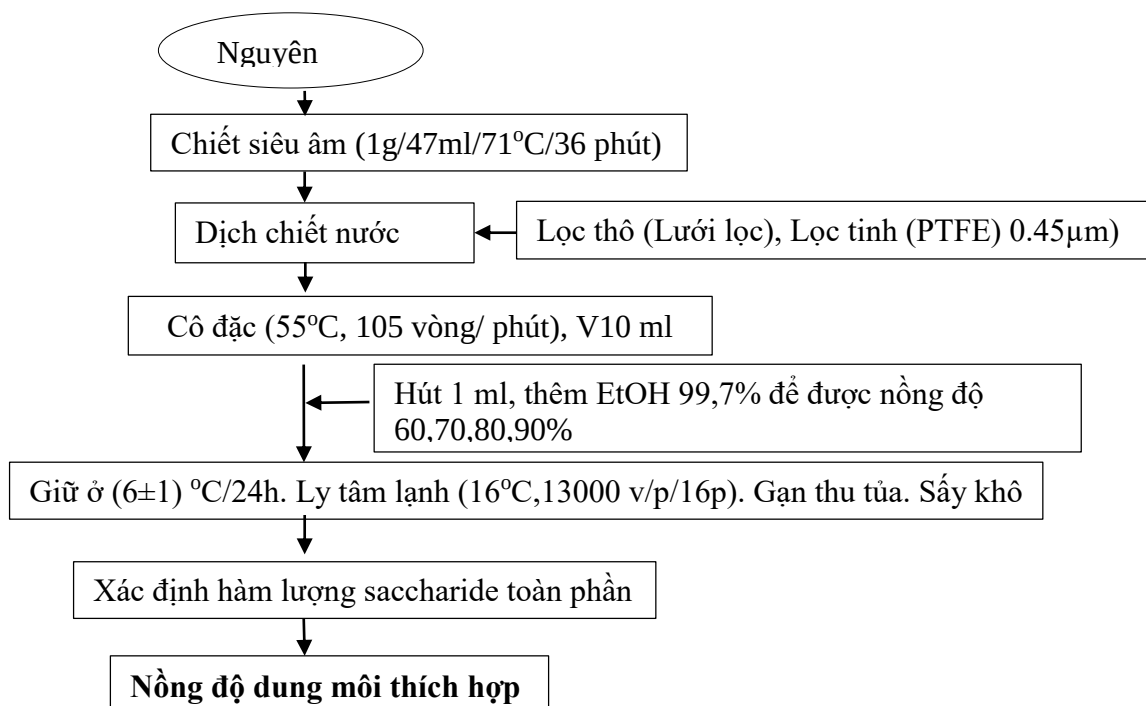
Hình 1. 7. Sơ đồ thí nghiệm ảnh hưởng của dung môi

Sử dụng các dung môi có độ phân cực khác nhau để kết tủa thu hồi bột thô trong dịch chiết. Các dung môi Aceton, EtOH, Ethyl acetate, *n*- butanol, *n*- hexan 99,7% ở các nồng độ 80% và 90%, để lạnh ở $(6\pm 1)^\circ\text{C}$ trong 24h. Ly tâm lạnh (16°C), 13000 vòng/phút/16 phút. Gạn thu tủa. Lặp lại 3 lần. Sấy khô ở 55°C . Xác định hàm lượng saccharide toàn phần thu được; hàm lượng Inulin và fructan trong các dung môi.

1.3.2. Xác định nồng độ dung môi

Mục đích của nghiên cứu này nhằm chọn nồng độ dung môi thích hợp nhất.

Sau khi có được dung môi thích hợp sẽ khảo sát nồng độ dung môi ở các nồng độ 60, 70, 80, 90%. Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ mô tả hình 1.4

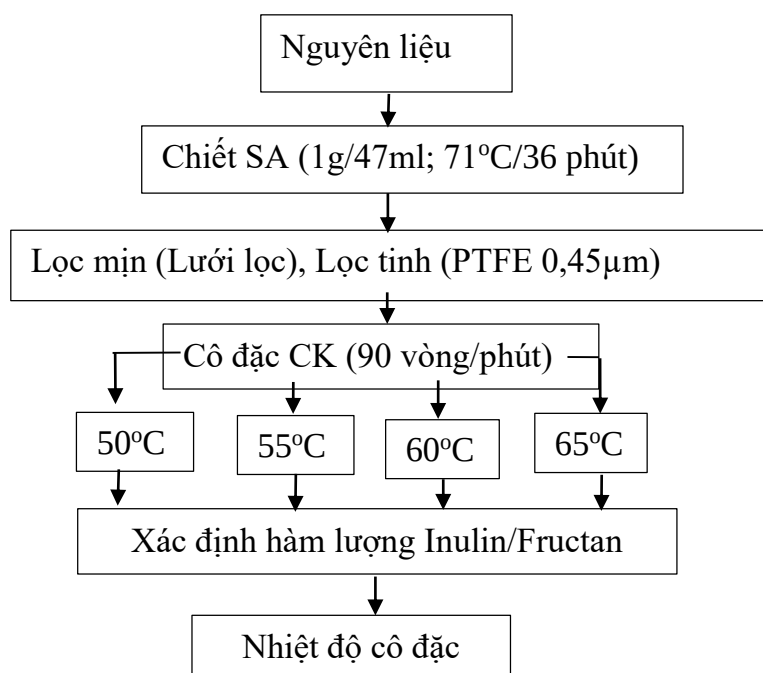


Hình 1. 8. Sơ đồ xác định nồng độ dung môi thích hợp

1.3.3. Xác định nhiệt độ cô đặc chân không

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định nhiệt độ cô đặc thích hợp nhất

Hút 125ml dịch chiết được cô đặc chân không xuống thể tích 25ml (V_1) và còn 10ml (V_2) ở các mức nhiệt độ khác nhau 50,55,60,65°C. Xác định hàm lượng Inulin/Fructan theo các mức nhiệt độ (Hình 1.5).

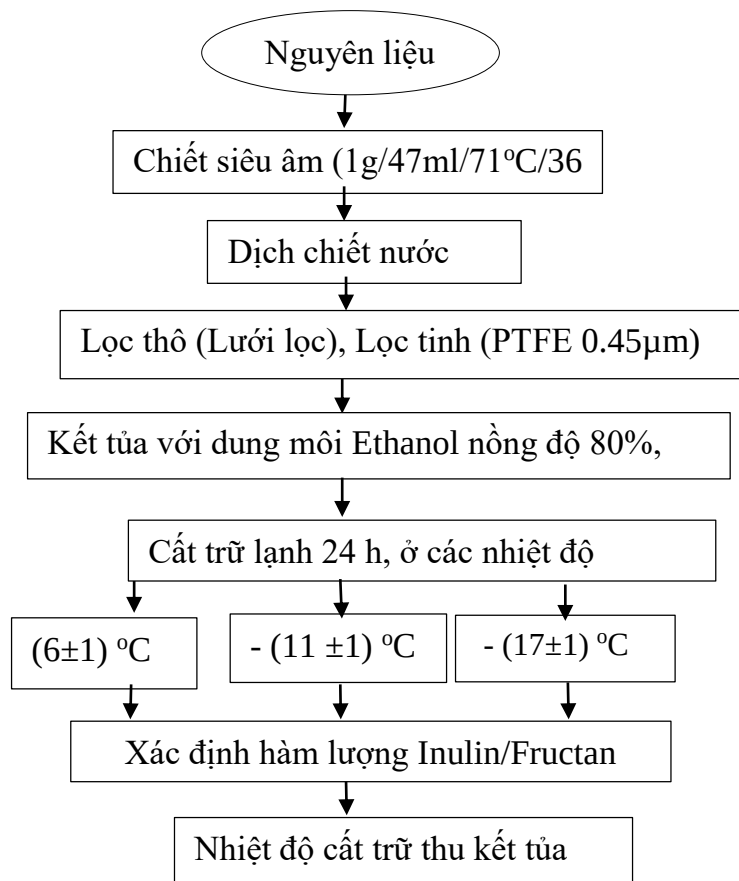


Hình 1. 9. Sơ đồ xác định nhiệt độ thích hợp khi cô đặc chân không

1.3.4. Xác định nhiệt độ cất trữ thu kết tủa

Mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định nhiệt độ cất trữ thu kết tủa Inulin/fructan tối đa.

Lựa chọn nhiệt độ cất trữ đến hàm lượng kết tủa Inulin, fructan (Hình 1.6).



Hình 1. 10. Sơ đồ khảo sát và xác định nhiệt độ kết tủa inulin

1.4. Tinh sạch inulin, xác định cấu trúc và khối lượng phân tử Inulin

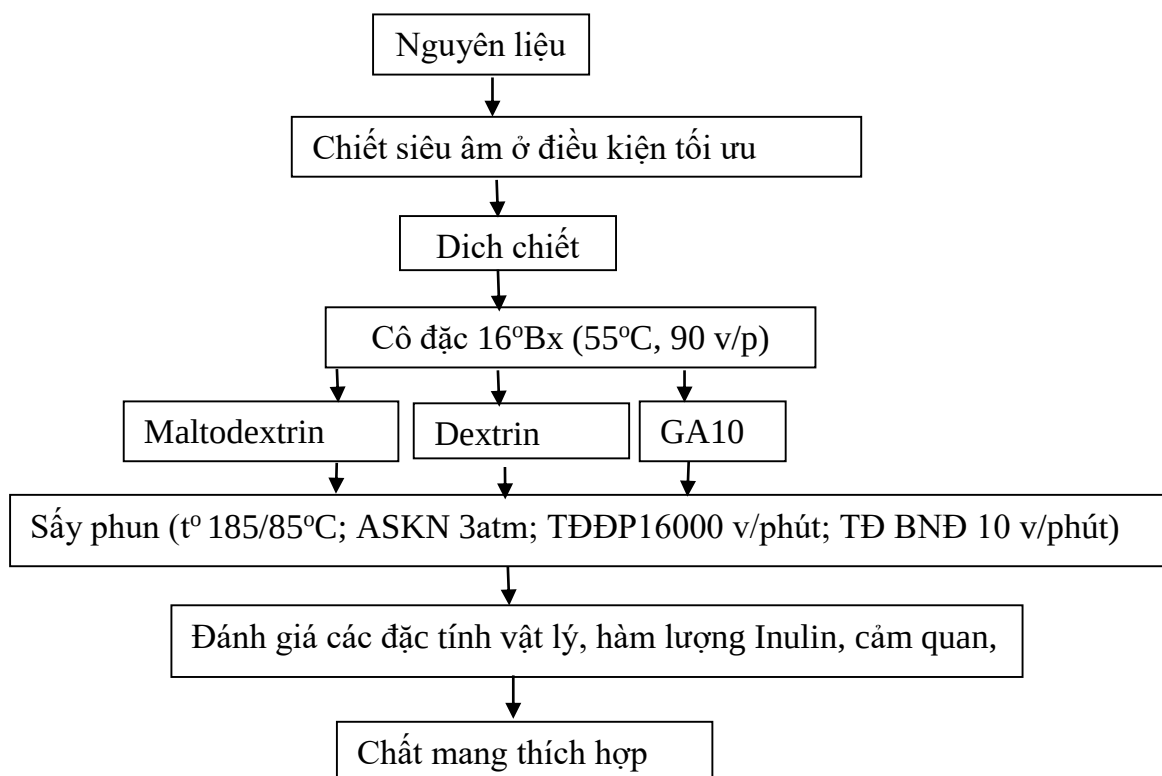
Khối lượng phân tử và cấu trúc phân tử Inulin được xác định bằng sắc ký lọc rây phân tử hiệu năng cao, phân tích phổ FT-IR, phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^1H , ^{13}C -NMR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (HSQC, HMBC).

1.5. Sấy phun

Mục đích của thí nghiệm này là lựa chọn chất mang và khảo sát các thông số ảnh hưởng đến quá trình tạo bột sấy (tỷ lệ chất mang, nhiệt độ sấy). Đánh giá đặc tính và độ an toàn của bột hòa tan. Đề xuất qui trình sấy phun.

1.5.1. Lựa chọn chất mang

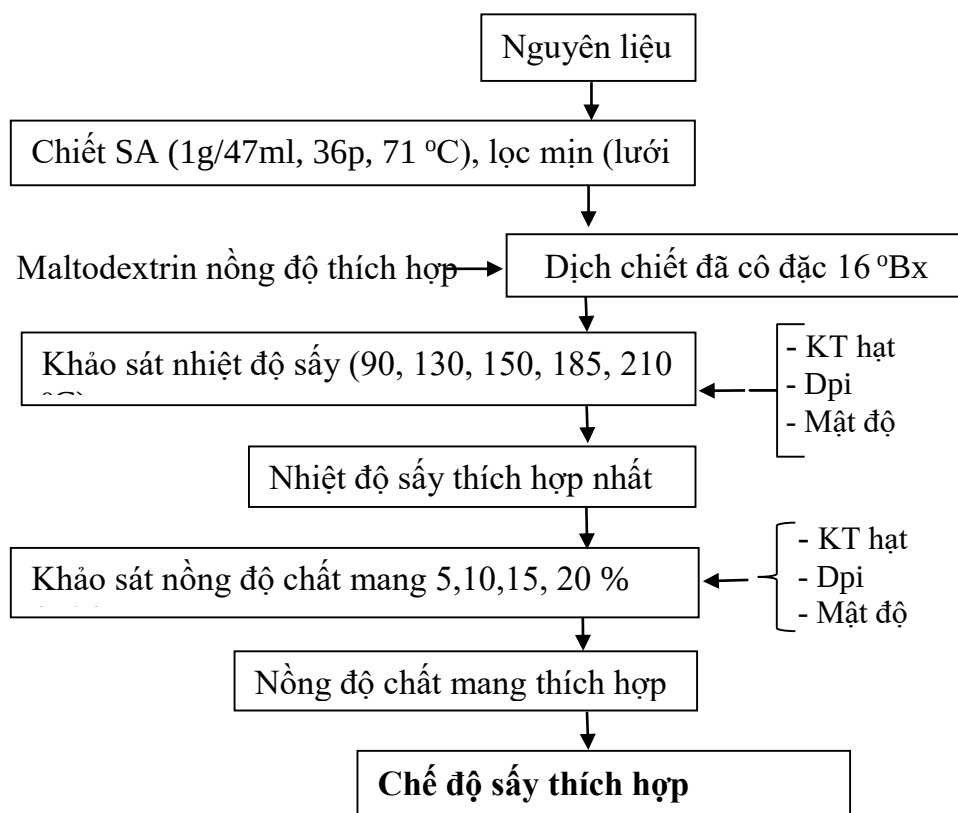
Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ mô tả ở sơ đồ hình 1.7



Hình 1.11. Sơ đồ khảo sát lựa chọn chất mang

1.5.2. Khảo sát nồng độ chất mang và chế độ sấy thích hợp

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ mô tả hình 1.8



Hình 1.12. Sơ đồ khảo sát chế độ sấy

Sau khi có chất mang thích hợp, tiến hành khảo sát nhiệt độ sấy ở các ngưỡng nhiệt khác nhau (90,130,150,185,210°C) để lựa chọn nhiệt độ sấy thích hợp. Các thông số sấy khác được cố định gồm: Chất mang ở nồng độ 10%; Áp suất khí nén (ASKN) 3 atm; Tốc độ đĩa phun (TĐDP) 16000 vòng/phút; Tốc độ bơm nhu động (TĐBNĐ) 10 vòng/phút. Sau khi lựa chọn được nhiệt độ sấy thích hợp. Cố định nhiệt độ sấy, tiếp tục khảo sát nồng độ chất mang ở các mức 5, 10, 15, 20% để chọn nồng độ chất mang thích hợp. Đánh giá các đặc tính bột (kích thước hạt, mật độ, độ phân tán, hàm lượng Inulin).

1.6. Chế phẩm bột Inulin sấy phun

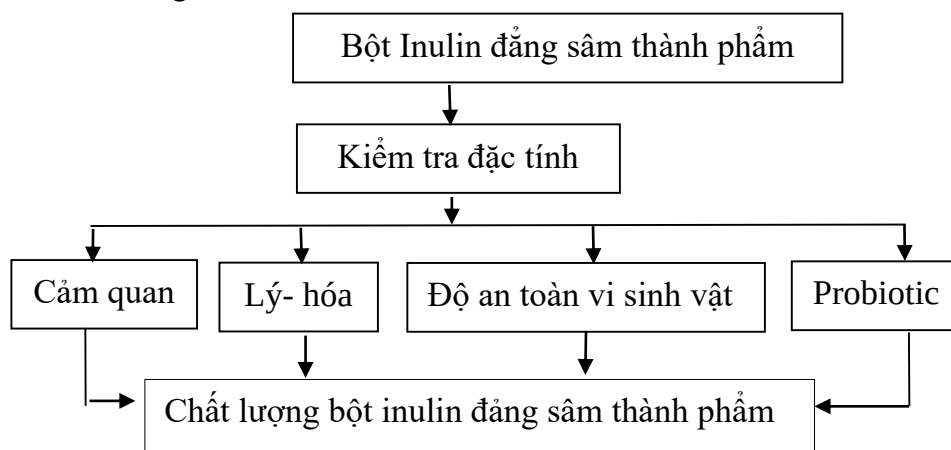
1.6.1. Đánh giá sự ổn định về cấu trúc inulin trong bột sấy

Phổ FT- IR được thực hiện để khẳng định sự ổn định về mặt cấu trúc của inulin trong bột sấy phun.

1.6.2. Đánh giá chất lượng bột đẳng sâm thành phẩm

Bột sấy thành phẩm được kiểm tra các đặc tính cảm quan, lý hóa và vi sinh.

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ hình 1.9



Hình 1.13. Sơ đồ đánh giá chất lượng bột đẳng sâm thành phẩm

1.6.3. Đánh giá hoạt tính Prebiotic

Tiến hành thực nghiệm theo sơ đồ hình 1.10

+ Kiểm tra mật độ trong mẫu ban đầu từ các nguồn khác nhau

Hòa tan 10 g sinh khối probiotic các loại cần thử nghiệm trong 90ml nước muối sinh lý tiệt trùng. Hoạt hóa mẫu ở 37°C/30 phút, pha loãng mẫu nồng độ thích hợp ($10^8 \div 10^{10}$), cấy trải dịch pha loãng vào môi trường MRS agar. Ủ hiếu khí (đối với *Lactobacillus*) và yếm khí (đối với *Bifidobacterium*) ở 37°C. Kiểm tra mật độ sau 24 - 48h (CFU/g).

+ Kiểm tra mẫu sau khi đã tăng sinh

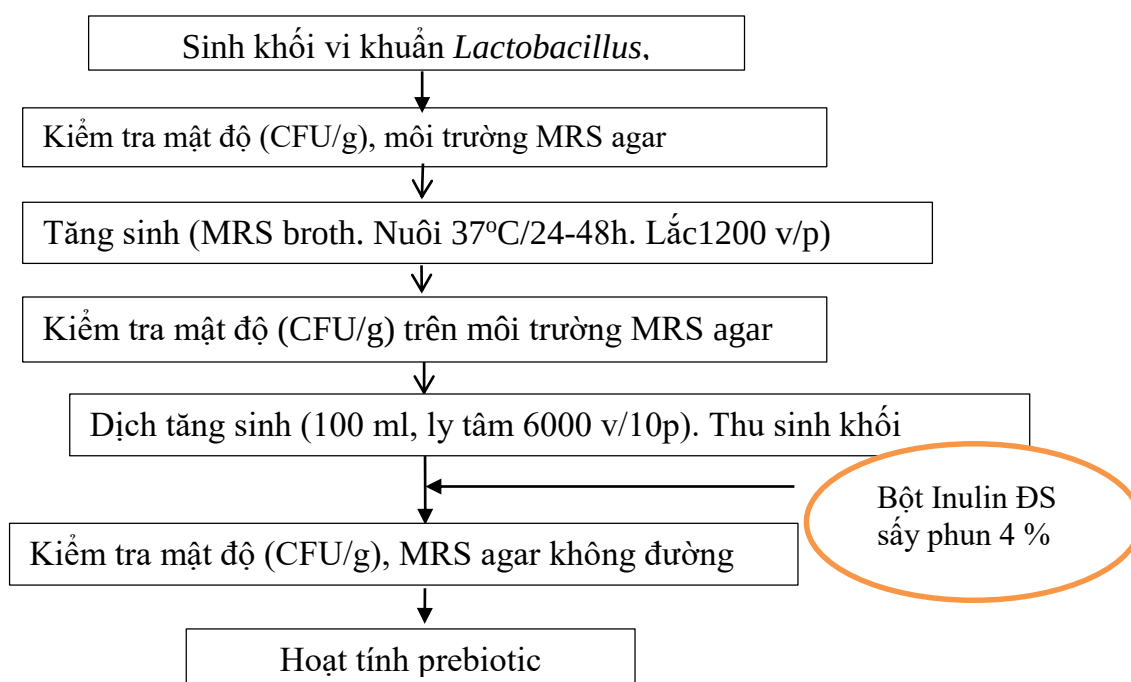
Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng lỏng, tiệt trùng, để tăng sinh (môi trường MRS), cấy vi khuẩn vào môi trường dinh dưỡng và nuôi ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24-48h lắc ở 1200 v/phút. Kiểm tra mật độ VSV sau 24-48h bằng phương pháp pha loãng mẫu đến nồng độ thích hợp ($10^8 \div 10^{10}$).

+ *Kiểm tra hoạt tính probiotic và lựa chọn chủng vi khuẩn*

Lấy 100 ml dung dịch tăng sinh mang đi ly tâm ở 8000 vòng/phút/10 phút thu sinh khối, phối trộn với 4 g bột đẳng sâm thành phẩm và 96g bột maltodextrin tiệt trùng. Kiểm tra mật độ VSV ở nồng độ 10^{-9} - 10^{-10} . Ủ ở nhiệt độ 37°C. Kiểm tra mật độ sau 24-48h. Mật độ VSV $>10^8$ CFU là đạt yêu cầu theo qui định của TCVN-9633:2013.

+ *Tạo sinh khối probiotic riêng từng loài*

Các chủng vi khuẩn tiềm năng được tăng sinh chuyên biệt, ly tâm thu sinh khối VSV đậm đặc và được phối trộn với các chất mang để tạo sinh khối probiotic riêng biệt từng chủng. Sinh khối này được dùng phối trộn với bột sấy đẳng sâm tạo synbiotic. Sinh khối các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi cơ quan chức năng.



Hình 1. 14. Sơ đồ đánh giá hoạt tính Prebiotic

PHỤ LỤC 2. VẬT TƯ VÀ HÓA CHẤT DÙNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng cao áp Shimadzu model:LC-20AT sử dụng cột C18, máy sắc ký lỏng cao áp Alltech AT32020 - Mỹ,

Thiết bị đo phổ IR Nicolet IS5 FT-IR,

Thiết bị đo phổ MS AGILENT 1100 LC-MSD Trap,

Máy đo phổ NMR Bruker Avance-500 MHz, Hệ thống sắc ký khí ghép nối khối phổ GC-MS (SCION SQ 456-GC),

Bể điều nhiệt 1013 GFL - Đức,

Bể siêu âm Elmasonic S 300H, tần số 50-60 Hz-Mỹ,

Thiết bị đo kim loại nặng AA 7000, Shimadzu-Nhật,

Dụng cụ đo độ đường (Brix Digital Refractometer)-Mỹ,

Kính soi nổi Olympus Digital SZX7-Nhật,

Thiết bị cô quay chân không IKA HB 10, Digital-Đức,

Thiết bị đo pH độ dẫn nhiệt độ để bàn OAKTON. Model pH/Con 510 Benchtop Meters.

Máy lắc (Shaker) IKA-KS260- Hàn Quốc,

Thiết bị đo quang phổ tử ngoại khả kiến DR5000- Hach. Mỹ,

Thiết bị đo ẩm Moisture Analyzer MF-50-Nhật,

Máy đóng gói chân không SVP-10 ARY VACMASTER-Mỹ,

Máy ly tâm lạnh Universe- R, Hettich-Đức,

Lò nung 30-3000°C Nabertherm-Anh,

Tủ ẩm và tủ sấy Memmert-Đức,

Tủ lạnh âm sâu (-52°C) KIA-Hàn Quốc,

Tủ cấy an toàn sinh học cấp II Esco - Mỹ và các thiết bị thông dụng khác.

2.2. Hóa chất và vật tư

+ *Thành phần môi trường MRS tổng hợp (Merck)*

KH ₂ PO ₄	2g
CH ₃ COONa	5g
MnSO ₄	vết (0.025g)
Glucose	20g
Agar	20g
Pepton	10g
Yeast Extract	5g
Amonium Citrate	2g
Nước cất vô	1000 ml

+ *Các loại vật tư*

Giấy lọc định lượng không tro-Đức; Màng siêu lọc PTFE 0,45µm-Đài Loan; Giấy siêu lọc cellulose nitrate filter 0,45 µm-Đức; Lưới lọc mịn Kitchen Good-Hàn Quốc.

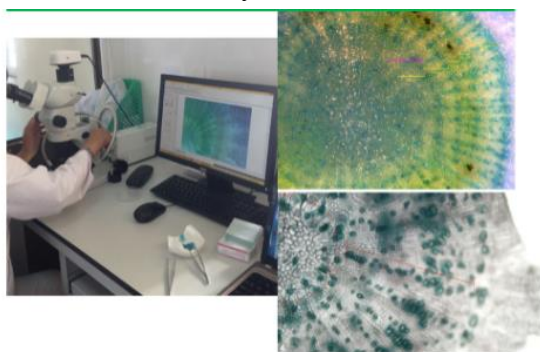
PHỤ LỤC 3. MỘT SỐ HÌNH ẢNH TRONG QUÁ TRÌNH THÍ NGHIỆM



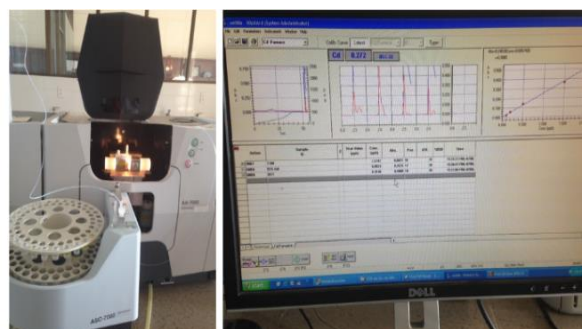
Hình 3.1. Lấy mẫu tại thực địa



Hình 3.2. Phân loại nguyên liệu



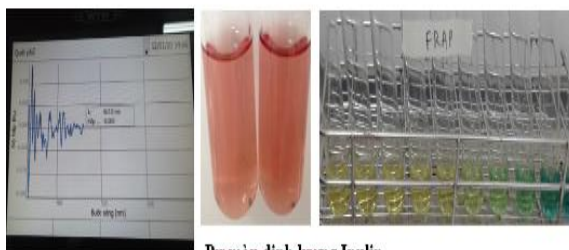
Hình 3.3. Xác định vòng năm tuổi bằng kính hiển vi soi nổi



Hình 3.4. Xác định kim loại nặng trong nguyên liệu



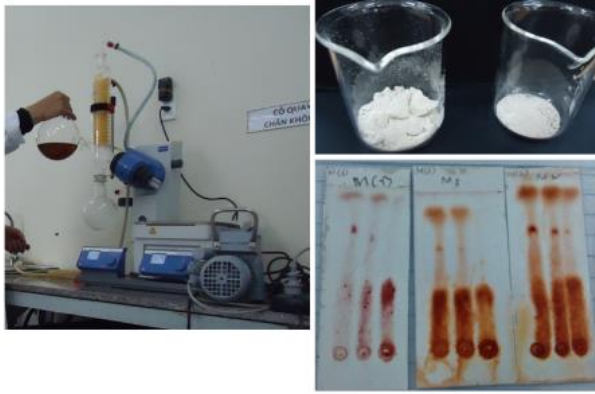
Phản ứng màu xác định một số nhóm chất



Hình 3.5. Phản ứng màu xác định một số nhóm chất



Hình 3.6. Sấy và bảo quản nguyên liệu



Hình 3.7. Tinh sạch bột Inulin



Hình 3.8. Kiểm tra chất lượng bột đẳng sâm sấy phun

CÔNG TY TNHH CÔNG NGHỆ LEGENDBIO
Số 4 ngõ 172, Phố Xuân Hòa, Phường Trung Vĩ,
Quận Nam Từ Liêm, Thành phố Hà Nội, Việt Nam
TEL: 0983606931
FAX: _____

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số kiểm nghiệm: 0218/QC/2019

Mẫu thử nghiệm: *Lactobacillus plantarum*
Nơi sản xuất: Công ty TNHH Công nghệ Legend Bio
Số lot: LP20190605
Ngày sản xuất: 05/06/2019
Người lấy mẫu: Nguyễn Xuân Vỹ
Yêu cầu thử nghiệm: (Theo yêu cầu)
Ngày nhận mẫu: 25/06/2019
Người nhận mẫu: Nguyễn Thị Nhung
Ngày trả kết quả: 05/07/2019

Hạn sử dụng: 12 tháng kể từ ngày sản xuất

YÊU CẦU		PHƯƠNG PHÁP	KẾT QUẢ
1	Cảm quan: Bột mịn, màu trắng ngà	-	Đúng
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> $\geq 3.0 \times 10^{10}$ CFU/g	TCVN 8730:2011	3.15×10^{10} CFU/g
3	Độ ẩm: $\leq 8\%$	AOAC 950.46	5.8 %
4	Coliforms $\leq 10^2$ CFU/g	TCVN 6848:2007	Không phát hiện
5	<i>E. coli</i> $\leq 10^1$ CFU/g	TCVN 6846:2007	Không phát hiện
6	<i>Salmonella</i> Không được có	TCVN 4829:2005	Không phát hiện
7	Tổng số nấm men, nấm mốc $\leq 10^2$ CFU/g	TCVN 8275-2:2010	Không phát hiện
8	Bảo quản: - Trong túi kín, nơi khô ráo, tránh ánh sáng trực tiếp. - Nhiệt độ $\leq 25^\circ\text{C}$	TCCS	Tủ mát $4 - 10^\circ\text{C}$

Hà Nội, ngày 05 tháng 07 năm 2019

Kiểm tra chất lượng sản phẩm: *Nguyễn Thị Nhung*
NGUYỄN THỊ NHUNG

Phụ trách sản xuất: *Phùng Thị Huyền Trang*
PHÙNG THỊ HUYỀN TRANG

Hình 3.9. Chứng nhận nguồn gốc chủng giống vi sinh vật



Hình 3.10. Kiểm tra mật độ vi khuẩn khi bổ sung bột đẳng sâm sấy phun