

**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 ĐẮNG SÂM
(*CODONOPSIS JAVANICA*) TỰ NHIÊN MỘC TẠI
LẠC DƯƠNG - LÂM ĐỒNG**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

KHÁNH HÒA – 2021

Công trình được hoàn thành tại Trường Đại học Nha Trang

Hướng dẫn khoa học: 1.PGS. TS. Vũ Ngọc Bội

2. PGS. TS. Đào Xuân Vinh

Phản biện 1: GS.TS. Nguyễn Thị Thanh Mai

Phản biện 2: PGS.TS. Phùng Thị Thanh Tú

Phản biện 3: GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

Luận án được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp trường, họp tại Trường Đại học Nha Trang vào giờ 8 ngày 28 tháng 11 năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại: Thư viện Quốc gia và Thư viện Trường Đại học Nha Trang

TÓM TẮT NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đề tài luận án: Nghiên cứu thu nhận và tạo bột inulin từ củ Đẳng 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 inulin từ củ đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) và tạo chế phẩm synbiotic từ inulin củ đẳng 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 đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) mọc tự nhiên ở Lạc Dương - Lâm Đồng làm cơ sở phân biệt độ tuổi và 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: $(10,08 \pm 0,88)^{\circ}\text{Bx}$, 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 Đẳng 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 từ 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 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 đẳng 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), dùng 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 đẳng sâm (*Codonopsis javanica*) mọc tự nhiên tại Lạc Dương- Lâm Đồng gồm 2 phân tử fructose polysaccharide: 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 đắng sâm sấy phun có hàm lượng inulin đạt (445,90±2,79) mg/g; hàm lượng Fructan đạt (469,40±1,61) mg/g, pH (5,18±0,01), hàm lượng khoáng (tro) (4,82±0,07) %. Độ hòa tan: 1/9,5±0,5/15 (g/ml/phút; Độ ẩm (6,06±0,27) % và không chứa tạp chất vô cơ và kim loại nặng. Bột inulin đắng sâm có kích thước hạt (882,2±101,4) nm, mật độ hạt 100%, độ phân tán 0,497 PDI, nhiệt độ nóng chảy trên 600°C. Bột inulin 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 đắng sâm tạo chế phẩm synbiotic để định hướng ứng dụng trong thực phẩm và thu được một số kết quả: Bột inulin đắng sâm có đặc tính prebiotic mạnh với liều sử dụng 4% (tương đương 1,8-2% tính theo lượng inulin sạch) có thể kích tăng sinh tế bào (CFU) của 8 chủng vi khuẩn lactic (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. lactics* (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

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Các chất chiết từ thảo dược có nguồn gốc tự nhiên với đặc điểm nổi bật là không độc, không có tác dụng phụ, đa tác dụng nên được sử dụng làm thực phẩm chức năng và dần dần thay thế cho thuốc.

Ngày 30/10/2013, Thủ tướng Chính phủ 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 vào 28 loại dược liệu bản địa trong đó có đẳng sâm (*Codonopsis javanica*). Theo định hướng này, các nhà nghiên cứu đang quan tâm tới việc nghiên cứu chiết tách, thu nhận các chất dưới dạng tinh khiết từ thực vật nói chung và đẳng sâm mọc tự nhiên để nâng cao hiệu lực ứng dụng thảo dược trong mọi lĩnh vực.

Do điều kiện tự nhiên đặc biệt, Lâm Đồng có 1664 loài thuộc 237 họ thực vật, chiếm gần 50% số lượng cây thuốc trong cả nước. Ngoài ra, Lâm Đồng còn được quy hoạch là vùng dược liệu trọng điểm.

Từ những lý do nêu trên 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”.

2. Mục tiêu của luận án

- 1) Xác định thời gian thu hoạch củ Đẳng sâm mọc tự nhiên
- 2) Nghiên cứu chiết rút inulin, tinh sạch, xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin trong củ đẳng sâm tự nhiên.
- 3) Nghiên cứu sấy phun tạo bột inulin và thử nghiệm sử dụng bột sấy phun tạo bột synbiotic định hướng ứng dụng trong thực phẩm.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng

Nguyên liệu đẳng sâm dùng trong nghiên cứu thời gian thu hoạch là loại tươi, hỗn hợp thu thập ngẫu nhiên.

Nguyên liệu dùng để chiết rút inulin là phần thô nguyên liệu củ đẳng sâm sau khi xử lý bằng dung môi hữu cơ (*n*-hexan, ethanol).

3.2. Phạm vi nghiên cứu

- 1) Nghiên cứu xác định thời gian thu hoạch củ đẳng sâm tự nhiên.
- 2) Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết rút inulin từ củ đẳng sâm tự nhiên.
- 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 bột đẳng sâm sấy phun tạo bột synbiotic, định hướng ứng dụng trong thực phẩm.
- 6) Xác định độ an toàn và đặc tính chế phẩm synbiotic

4. Phương pháp nghiên cứu: Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu chuẩn của Thế giới và Việt Nam trong nghiên cứu thu nhận Inulin từ dược liệu đẳng sâm (*Codonopsis javanica*), có sử dụng toán học để tối ưu hóa nhằm đảm bảo kết quả thí nghiệm có độ tin cậy cao.

5. Kết cấu của luận án

Luận án gồm 141 trang, trong đó 31 trang tổng quan, 21 trang phương pháp nghiên cứu, 87 trang kết quả nghiên cứu, kết luận 2 trang, 51 bảng số liệu, 64 hình, 181 tài liệu tham khảo (tiếng Việt 30 tài liệu, tiếng Anh 151 tài liệu) và phụ lục 25 trang.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về cây đẳng sâm và inulin

Cây đẳng sâm thuộc chi *Codonopsis*. Trong số 47 loài được công bố thì chỉ có 02 loài phân bố tại Việt Nam. Loài đẳng sâm phân bố hẹp ở một số vùng có độ cao trên 800 – 2000 m. Đây là loài trong danh mục của Sách đỏ VN. Tại tỉnh Lâm Đồng chỉ có 01 loài *Codonopsis javanica* và là loài đặc trưng ở đây.

Inulin là một polysaccharide loại fructan mạch thẳng, gồm 95% đường fructose và là một cacbonhydrate dự trữ. Liên kết trong mạch dạng β -D (2,1). Khi ở dạng chuỗi dài có DP_n ($10 \leq n \leq 70$) đơn vị, DP_{av} 25 gọi là Inulin, khi ở dạng chuỗi ngắn được gọi là FOS ($3 \leq n \leq 10$). DP (Degree polimer) của Inulin nguồn gốc thực vật tương đối thấp (tối đa < 200). DP của Inulin là một trong những thông số quan trọng nhất quyết định các tính chất lý hóa, sinh học khác.

Do sự thay đổi DP trong chiều dài chuỗi nên trọng lượng phân tử của inulin thay đổi từ 3500 đến 5500 Da. Khối lượng phân tử của Inulin (loại Fructan) từ 5.0×10^2 đến 1.3×10^4 Da và Levan (loại Fructan) mạch nhánh từ 1×10^4 - 1×10^8 Da.

Do liên kết β ở vị trí C_2 của các fructose và kết thúc mạch là một phân tử glucose được liên kết bằng liên kết α (1-2) nên Inulin/FOS không bị tiêu hoá bởi các enzym α -glucosidase; maltase-isomaltase; sucrase trong đường tiêu hóa người, động vật và được xếp vào nhóm chất xơ hòa tan không tiêu hóa được (NDO-nondigestible oligosaccharide).

1.2. Công nghệ tách chiết, sản xuất và tinh sạch inulin

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. Quá trình chiết tách cũng có ảnh hưởng đến DP của Inulin.

Quá trình tách inulin về cơ bản bao gồm ba bước: Chiết xuất inulin; 2. Loại bỏ tạp chất và inulins DP thấp; 3. Phun (sấy) khô.

Tinh sạch Inulin trải qua hai giai đoạn. 1-Chiết và thanh lọc thông qua vôi hóa carbonat; 2-kết tủa và lọc kết hợp khử khoáng.

1.3. Sấy phun tạo bột inulin/FOS

Khi sấy phun, tính chất bột trợ sấy là một yếu tố quan trọng. Có rất nhiều các chất mang khác nhau có những ưu điểm và nhược điểm khác nhau nên cần khảo sát lựa chọn chất mang phù hợp với nguyên liệu và sản phẩm. Các thông số quá trình sấy phun ảnh hưởng đến các tính chất hóa lý khác nhau của bột sấy. Mặt khác tính chất của bột sấy phun phụ thuộc vào các tính chất vật lý và hóa học của nguyên liệu, thông số thiết kế và hoạt động máy sấy như tốc độ dòng cấp liệu, tốc độ

phun và nhiệt độ không khí vào. Hiệu quả sấy có thể được tối đa hóa bởi lựa chọn đúng các thông số sấy phun bao gồm nhiệt độ vào và nhiệt độ không khí làm khô, nhiệt độ tiến hành, loại chất mang.

1.4. Một số nghiên cứu ứng dụng inulin

Inulin đã được chứng minh là đa tác dụng, có khả năng ứng dụng trong y học, thực phẩm. Nó đã được chứng minh là có khả năng điều hòa miễn dịch, tăng cường miễn dịch, tác nhân chống thư; Tăng cường quần thể vi khuẩn probiotic đường ruột nên có vai trò như là một prebiotic; Chống nhiễm trùng đường ruột; Bệnh ruột kích thích; chống ung thư ung thư ruột kết và bệnh viêm loét đại tràng IBD (inflammatory bowel diseases - viêm loét đại tràng và bệnh Crohn's), tăng sự bài tiết của các cytokine chống viêm. Ngăn ngừa bệnh tăng huyết áp (anti-hypertensive); giảm triglycerides trong máu, ngăn ngừa bệnh tim mạch; quản lý bệnh tiểu đường chống béo phì; Làm tá dược cho vaccin, tăng sự hấp thụ canxi và magie nhưng không ảnh hưởng đến sự cân bằng của các khoáng khác; Khoáng hóa xương ở người trẻ khỏe mạnh chống loãng xương nhưng không gây đột biến, gây ung thư hoặc gây quái thai.

Inulin đã được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm chức năng, làm vật liệu tổng hợp trong thực phẩm dinh dưỡng và thuốc. Inulin là nguồn nguyên liệu thô tái tạo để sản xuất bio-ethanol, siro fructose, protein đơn bào và dầu đơn bào, thu FOS và các sản phẩm hữu ích khác.

Từ các nghiên cứu về Inulin trong nước và trên thế giới cho thấy inulin có nhiều đặc tính phù hợp cho việc sử dụng trong y học, thực phẩm như có nguồn gốc tự nhiên từ thảo mộc không độc hại và nhiều tác dụng trong đó có đặc tính prebiotic. Hiện tại, các nghiên cứu ứng dụng inulin trong thảo mộc chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ mặc dù đã có một số nghiên cứu chứng minh inulin đa tác dụng.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu

2.1.1. Củ thảo mộc nguyên liệu

Củ thảo mộc (*Codonopsis javanica*) (Blume) Hook.f.) nguyên liệu mọc tự nhiên tại 3 xã Đa Sa; Đa Nhím; Đa Chais, huyện Lạc Dương, Lâm Đồng.

2.1.2. Chất mang

Các chất mang (chất trợ sấy, chất phụ gia): Maltodextrin $C_6nH_{(10n+2)}O_{(5n+1)}$. Dextrin $(C_6H_{10}O_5)_n$ (INS 1400); Gum Arabic (INS 414) do công ty TNHH Nam Giang cung cấp.

2.1.3. Giống vi sinh vật

Đề tài sử dụng 8 chủng vi khuẩn lactic có nguồn gốc khác nhau đều nằm trong danh mục các loài vi khuẩn probiotic theo TCVN 9633:2013.

E. faecalis (M1) và *L. acidophilus* (M2) do Công ty TNHH CN Sinh học Việt-Úc, TP. Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa cung cấp;

Chủng *L. rhamnosus* (M3), *E. faecalis* (M4) và *L. acidophilus* (M5), *L. plantarum* (M6) từ Công ty TNHH Legend BIO, Hà Nội cung cấp;

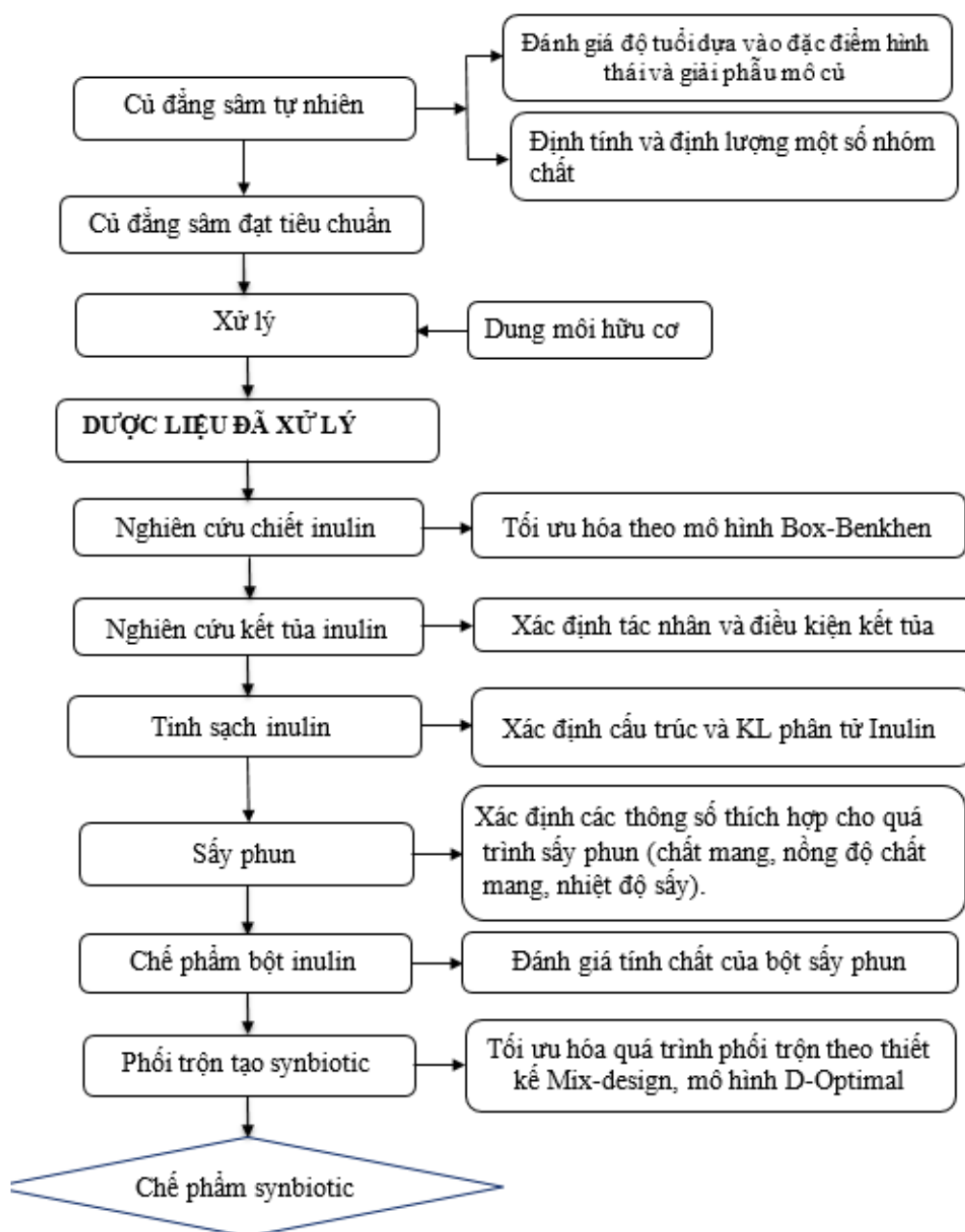
Chủng *Lactobacillus acidophilus* (M7) từ Bảo tàng giống VSV Việt Nam (VTTC);

Chủng *B. longum* (YK1), *B. lactic* (YK2) từ PTN Vi sinh, K. Sinh học, Trường ĐH Đà Lạt.

2.2. Các phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Các thí nghiệm được bố trí theo sơ đồ nghiên cứu tổng quát (Hình 2.3).



Hình 2.3. Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

Luận án tiến hành nghiên cứu xác định từng công đoạn cho quá trình nghiên cứu. Cụ thể, phân loại nguyên liệu tươi dựa vào các đặc điểm đặc trưng về hình thái và hiển vi để xác định tuổi thu hoạch và loại nguyên liệu đạt tiêu chuẩn dược liệu. Từ dược liệu sau khi xử lý bằng các dung môi hữu cơ sẽ tiến hành tối ưu hóa quá trình chiết inulin và lựa chọn tác nhân gây kết tủa.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu tinh sạch để xác định cấu trúc phân tử inulin của củ đẳng sâm ở Lạc Dương - Lâm đồng. Sau đó nghiên cứu tạo bột sấy phun từ dịch chiết chứa inulin và kiểm tra chất

lượng bột, hoạt tính prebiotic của bột. Cuối cùng tiến hành thử nghiệm tạo chế phẩm synbiotic bằng cách tối ưu hóa tỉ lệ phối trộn sinh khối prebiotic thu được và probiotic đã được tạo riêng trước đó.

2.2.2. Các phương pháp phân tích hình thái, mô học và hóa học củ đẳng sâm

- + Lấy mẫu và xử lý mẫu: theo WHO (1992) và DD VN V, (2017).
- + Phân tích hình thái dựa theo mô tả của DD VN V, (2017) và Zhang (2017).
- + Xác định năm tuổi thông qua vòng tăng trưởng hàng năm theo Schweingruber và Cs (2005).
- + Đo đường kính xylem, phloem (μm) được đo bằng thước đo trong phần mềm chuyên dụng của kính hiển vi soi nổi Olympus SZX 7, Nhật.
- + Định tính thành phần các chất trong dịch chiết n-hexan, trong dịch chiết cồn theo Sawant và Cs (2013).
- + Định tính Tanin theo WHO (1992).
- + Định tính tinh dầu; Anthranoid (PU Borntraeger) theo Nguyễn.T. Kim Phụng (2007).
- + Định tính Inulin ; Fructan bằng phương pháp soi bột WHO (1992)
- + Định tính inulin bằng sắc ký lớp mỏng TLC theo Yevtifieieva và Cs (2016)
- + Xác định độ ẩm; Xác định vật chất khô (VCK); Hàm lượng tổng chất chiết hòa tan; Hàm lượng khoáng tổng số và khoáng không tan trong acid được xác định theo WHO (1992).
- + Hàm lượng đường tổng số ($^{\circ}\text{Bx}$) được xác định theo TCVN 7771: 2007 (ISO 2173:2003
- + Các nguyên tố kim loại nặng Hg, As, Cd và Pb được xác định bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa theo TCVN 7602:2007/ (AOAC 972.25).
- + Xác định nguyên liệu đạt chuẩn theo DDVN V, (2017)
- + Định lượng polyphenol theo Singleton và Cs (1999). Gallic acid làm chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 755 nm.
- + Định lượng Flavonoid theo Woisky và Cs. Quercetin làm chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 430 nm.
- + Xác định hoạt tính khử Fe (RP): được xác định theo Zhu và Cs. (2002). FeSO_4 làm chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 699 nm.
- + Xác định hoạt tính khử ABTS theo Roberta và Cs (1999).
- + Định lượng tổng năng lực khử TAC theo Prieto Cs (1999). Vitamin C làm chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 694 nm.
- + Định lượng Fructan và Inulin bằng phương pháp quang phổ so màu UV-VIS theo Pencheva và Cs (2012). Phức hợp hiện màu Resorcinol – Thiure. Fructose là chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 483 nm.
- + Hàm lượng saccharidee toàn phần (ScTP) được xác định bằng phương pháp phenol acid theo Chen và Cs (2011). Glucose là chất chuẩn. Thực hiện đo quang ở bước sóng 490 nm.
- + Tinh sạch Inulin bằng phương pháp kết tinh lại nhiều lần. Kiểm tra độ tinh sạch bằng sắc ký bản mỏng TLC theo Yevtifieieva và Cs (2016).
- + Xác định khối lượng phân tử của Inulin bằng phương pháp phương pháp sắc ký rây phân tử (sắc ký gel).

- + Xác định cấu trúc inulin bằng đo phổ hồng ngoại FT-IR, phổ MNR, phổ phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều HSQC, HMQC.
- + Đánh giá tính chất vật lý của bột sấy phun được xác định theo phương pháp tán xạ ánh sáng động (Dynamic Light Scattering-DLS) theo tiêu chuẩn ISO 22412 (2008) (Technical Committee ISO/TC 24, 2017).
- + Nhiệt nóng chảy được đo bằng thiết bị đo nhiệt tự động C-60. (USA).
- + Giá trị pH thực hiện đo bằng thiết bị đo pH.
- + Độ hòa tan thực hiện theo phương pháp của DĐVN, V (2017) hoặc QCVN-3/7/2019.
- + Thành phần và đặc tính của bột inulin củ đắng sâm sấy phun thành phẩm được áp theo Quyết định 46/2007/ của Bộ Y tế về thực phẩm chức năng.

Phương pháp định lượng vi sinh vật

- + Xác định hàm lượng 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 *Cl. 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.

Phương pháp xác định đặc tính và độc tính chế phẩm synbiotic

Đặc tính và độc tính chế phẩm synbiotic được thuê khoán chuyên môn tại khoa Dược-ĐHYD tp HCM.

2.3. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Theo phương pháp thống kê. Mỗi thí nghiệm đều tiến hành 3 lần, mỗi lần 3 mẫu và kết quả là trung bình cộng của các lần thí nghiệm. Tính toán và vẽ đồ thị, xử lý kết quả theo thống kê kiểm định so sánh các giá trị trung bình giữa các nhóm, phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm Minitab 18.0. Phân tích dữ liệu và thiết kế tối ưu hóa bằng phần mềm Design Expert 12.0.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu xác định thời gian thu hoạch nguyên liệu củ đắng sâm

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

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể dựa vào các đặc tính hình thái và mô học của củ đắng sâm để xác định độ tuổi nguyên liệu. Cụ thể:

- *Giai đoạn một năm tuổi: củ đắng sâm chưa có vết sẹo trên cổ rễ, cổ rễ ngắn, màu trắng ngà, vỏ mỏng, nhìn trong mọng nước, rễ củ chưa phân nhánh và có vị ngọt nhẹ. Khi giải phẫu mô thì phần xylem của củ đắng sâm có dạng tròn, tia gỗ hình nan quạt chưa rõ.*
- *Giai đoạn hai năm tuổi: củ đắng sâm có 2 vòng sẹo trên cổ rễ, cổ rễ ngắn, màu trắng ngà, vỏ hơi dày, nhìn không mọng nước, rễ 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 sọc trên vỏ rễ, vỏ rễ dài, màu trắng ngà, vỏ dày, cầm chắc tay, rễ 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 sọc trên vỏ rễ, vỏ rễ dài, màu trắng ngà, vỏ dày, xù xì, cầm chắc tay, rễ 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 đẳng sâm để xác định độ tuổi làm cơ sở cho việc thu mẫu 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

Kết quả nghiên cứu đánh giá kích thước đường kính của 1842 củ đẳng sâm thuộc 4 độ tuổi khác nhau (Bảng 3.1) cho thấy giữa đường kính củ đẳng sâm và độ tuổi có mối liên quan với nhau và có thể dựa vào kích cỡ củ để đánh giá độ tuổi của chúng.

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 ± 0,29
2	2	548	1,09 ^c ± 0,19
3	3	609	1,66 ^b ± 0,23
4	4	162	2,24 ^a ± 0,30

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

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

Từ các kết quả phân tích (Bảng 3.2) cho thấy mẫu củ đẳng sâm có các vòng tăng trưởng và có thể dựa vào cấu trúc giải phẫu mô củ đẳng sâm để phân biệt độ tuổi của cây đẳng sâm.

Bảng 3.2. Kết quả phân tích giải phẫu mô của củ đẳng 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 một cột khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$

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

3.1.2.1. Định tính các nhóm chất

Kết quả định tính một số các nhóm chất hữu cơ có trong dịch chiết củ đẳng sâm 3 năm tuổi (Bảng 3.3)

Bảng 3.3. Kết quả phân tích định tính một số các nhóm chất hữu cơ có trong dịch chiết

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	-	Không 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 Rf ngang với chuẩn Inulin (Merck)
		Lớp mỏng TLC	+++	
14	Alcaloid	Thuốc thử Mayer	++	Có Alcaloid
		Thuốc thử Bouchardat	+++	
		Thuốc thử Dragendorff	++	
15	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	+	Có Anthranoid
16	Tannin	Phản ứng với FeCl ₃	-	Không phát hiện có tanin

Ghi chú: - phản ứng âm tính +: phản ứng dương tính.

++: phản ứng dương tính rõ ++: phản ứng dương tính rất rõ

Kết quả (Bảng 3.3) cho thấy: Trong 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 và không có carotenoid, saponin và tannin.

Phản ứng định tính Inulin trong rễ củ đẳng sâm cho phản ứng màu vàng cam và định tính inulin bằng TLC cho thấy hệ số R_f inulin của mẫu bột thô tương đương với R_f của chất chuẩn Inulin (Merck).

3.1.2.2. Định lượng các chất

Tiến hành phân tích định lượng một số chất theo qui định về quản lý chất lượng thảo dược theo WHO (1992). Kết quả như sau

* **Về hàm lượng đường:** Xu hướng giảm dần khi độ tuổi tăng. Năm thứ nhất đạt mức (16,48 %) giảm dần xuống 127,2 %, tiếp tục giảm xuống còn 10,08 % vào năm thứ 3 và thấp nhất vào năm thứ 4 (7,03) %.

* **Về hàm lượng chất chiết hòa tan:** Xu hướng biến động giảm dần khi độ tuổi tăng. Năm thứ nhất đạt mức (68,63 %) giảm dần xuống 61,61 %, tiếp tục giảm xuống còn 54,24 % vào năm thứ 3 và thấp nhất vào năm thứ 4 (52,72) %.

* **Về hàm lượng tro tổng số:** Xu hướng của hàm lượng khoáng tổng số tỉ lệ thuận với năm tuổi. Năm thứ nhất đạt mức (3,33 %) tăng dần lên 4,09 %, tiếp tục tăng lên đến 5,5 % vào năm thứ 3 và cao nhất vào năm thứ 4 (6,36) %.

* **Về hàm lượng Inulin:** Hàm lượng Inulin trong các giai đoạn tuổi khác nhau đi theo qui luật đường phi tuyến tính bậc 2, hàm lượng đạt đỉnh cao nhất vào năm thứ 3 (222,24) mg/g khô, con số này cao thứ nhì vào năm thứ 4 (127,41) mg/g, hàm lượng inulin thấp hơn vào năm thứ 2 (198,22) mg/g khô và thấp nhất khi đẳng sâm một năm tuổi (169,82) mg/g khô. Mối tương quan giữa hàm lượng inulin và các giai đoạn tăng trưởng tuân theo phương trình:

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

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

Kết quả phân tích kim loại nặng bằng kỹ thuật quang phổ hấp thụ nguyên tử AAS cho thấy củ đẳng sâm không chứa các kim loại nặng (Hg; Pb; As; Cd) và tạp chất vô cơ.

* **Về hàm lượng polyphenol và flavonoid**

Mối tương quan giữa hàm lượng polyphenolm flavonoid và thời gian tăng trưởng ở củ đẳng sâm ($R^2 > 0,90$) được thể hiện bằng phương trình hồi qui sau đây:

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

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

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 acid garlic /g khô)	09,2 ^d ± 0,04	1,18 ^c ± 0,05	1,39 ^a ± 0,055	1,29 ^b ±0,03
Hàm lượng flavanoid (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)

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.5) cho thấy:

- Thời gian tăng trưởng có ảnh hưởng mạnh đến sự tích lũy hàm lượng inulin, polyphenol, flavonoid, đường tổng số và khoáng chất, cũng như hoạt tính chống oxy hóa tổng, hoạt tính khử sắt và hoạt tính khử ABTS có trong dịch chiết của củ đẳng sâm.
- 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.
- Củ đẳng sâm không chứa kim loại nặng và tạp chất vô cơ.

Luận án chọn củ đẳng sâm 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 nghiên cứu (Bảng 3.6) cho thấy củ đẳng sâm 4 năm tuổi có hàm lượng khoáng chất tổng số vượt quy định của Dược Điển VN (> 6 %) trong khi ở các độ tuổi 1, 2 và 3 năm đều đạt tiêu chuẩn DDVN (2007). Củ đẳng sâm ở tất cả các độ tuổi không chứa kim loại nặng và tạp chất vô cơ. Tuy nhiên, củ giai đoạn 3 năm tuổi có hàm lượng Inulin và polyphenol cao nhất. Do vậy, luận án quyết định chọn củ đẳng sâm giai đoạn 3 năm tuổi làm nguyên liệu cho quá trình nghiên cứu.

Bảng 3.6. Hàm lượng các chất của củ đẳng sâm

Chỉ tiêu	Tiêu chuẩn của DD VN	Độ tuổi (năm)			
		1	2	3	4
Độ ẩm (%)	<15	< 5	< 5	< 5	< 5
Phản ứng định tính	+	+	+	+	+
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 tổng số (%)	< 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: * (Bộ Y tế, 2017); KPH: Không phát hiện; (+) Dương tính; (-) Âm tính

3.2. Nghiên cứu tối ưu hóa quá trình chiết inulin từ củ đẳng sâm tự nhiên

3.2.1. Tối ưu hóa công đoạn chiết rút inulin theo mô hình Box-Behnken

* Xác định mô hình hồi quy

Từ đồ thị đường đồng mức 2D và 3D (Hình 3.18) biểu diễn ảnh hưởng nhiệt độ, thời gian và tỉ lệ dung môi nguyên đến hiệu quả chiết inulin, fructan, chất chiết hòa tan, chọn được khoảng tối ưu của chế độ chiết xuất là nhiệt độ (60-80) °C, thời gian (20-50) phút, tỷ lệ DM/NL (20 - 60)ml/g.

Phương trình hồi quy của hàm lượng Inulin:

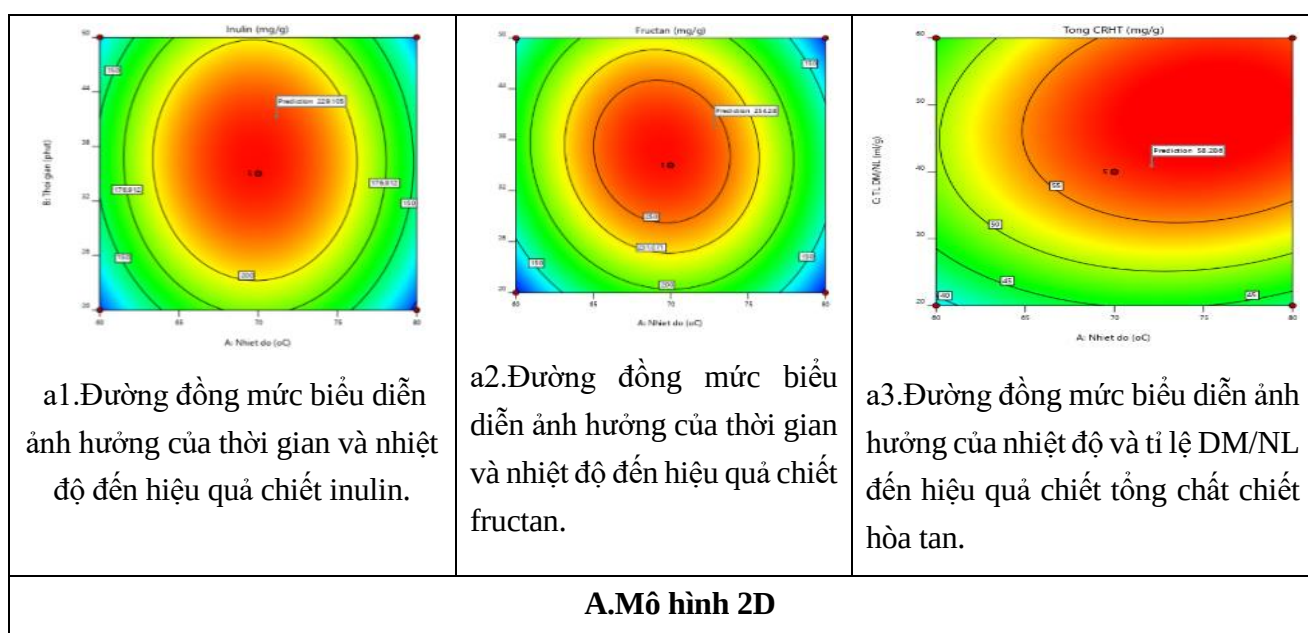
$$Y_1 = 234.87 - 3.42X_1 + 8.98X_2 + 27.78X_3 - 1.61X_1X_2 - 6.49X_1X_3 - 7.19X_2X_3 - 85.10X_1^2 - 45.42X_2^2 - 30.72X_3^2 \quad (1)$$

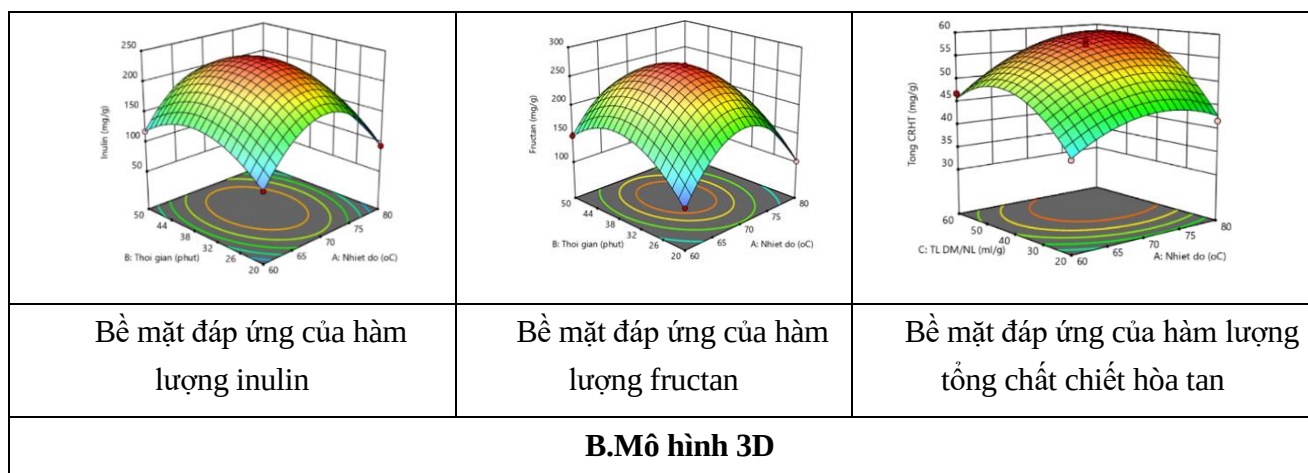
Phương trình hồi quy của hàm lượng Fructan:

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

Phương trình hồi quy của hàm lượng chất chiết hòa tan:

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



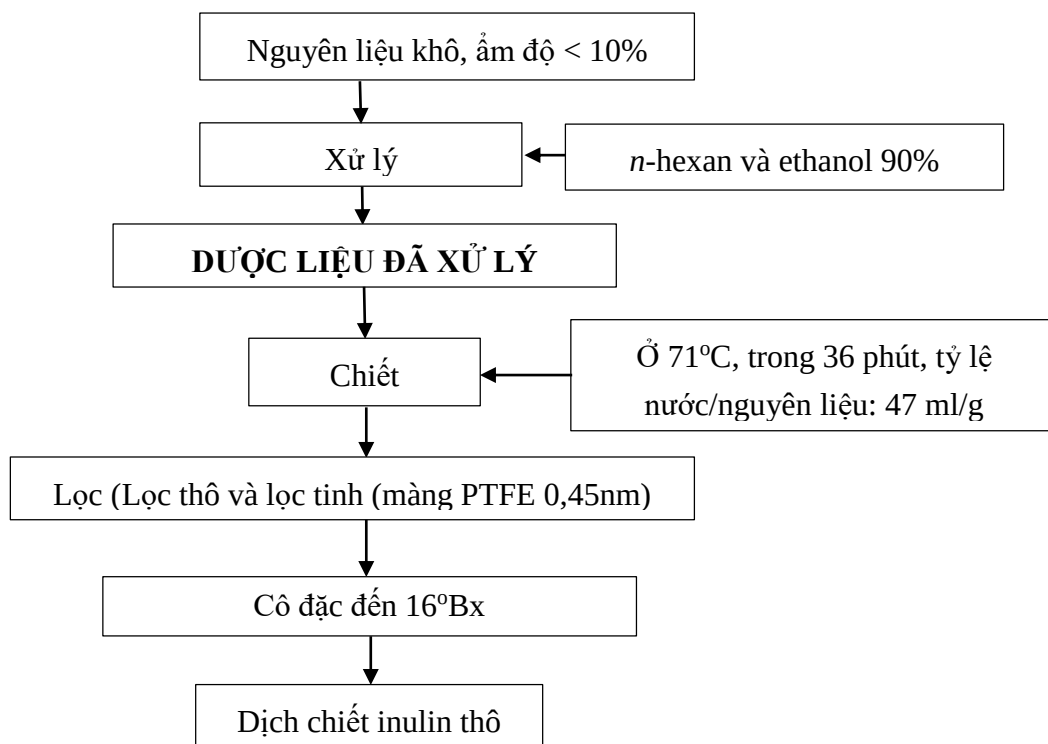


Hình 3.18. Mô hình 2D (A), 3D (B) tiên đoán điểm tối ưu của các hàm mục tiêu dưới ảnh hưởng của các yếu tố đầu vào

*** Xác định thông số tối ưu cho quá trình chiết inulin, fructan, tổng chất chiết hòa tan**

Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện tối ưu để chiết Inulin, Fructan và tổng chất chiết hòa tan từ củ đẳng sâm khô ở nhiệt độ 71°C, thời gian chiết 36 phút và tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 47ml/g. Hiệu suất chiết Inulin trong củ đẳng sâm đạt 23,93%, Fructan 26,96% và tổng chất chiết hòa tan đạt 61,35 % và chiết 1 lần.

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



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

3.3 Xác định một số thông số thích hợp cho quá trình kết tủa inulin từ dịch chiết

3.3.1. Xác định dung môi và nồng độ dung môi

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.7) cho thấy ethanol và aceton là 2 dung môi kết tủa thu inulin, fructan và saccharidee trong dịch chiết nước củ đẳng sâm với hàm lượng cao nhất. 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.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của dung môi và nồng độ dung môi đến hàm lượng saccharid toàn phần, inulin và fructan thu được sau kết tủa

Dung môi	Nồng độ 80%			Nồng độ 90%		
	Hàm lượng polysaccharide toàn phần (mg/g khô)	Hàm lượng inulin (mg/g khô)	Hiệu suất kết tủa Inulin (%)	Hàm lượng saccharid 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
Et-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 ($p < 0,05$)

3.3.2. Xác định nồng độ ethanol

Kết quả nghiên cứu cho thấy dung môi EtOH nồng độ 80% dùng để kết tủa Inulin và nồng độ 90% dùng để kết tủa Fructan.

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ cô đặc nên thiết lập dưới 65°C, cụ thể là 55°C. Khi cô đặc chân không ở nhiệt độ cao hơn 55°C có ảnh hưởng đến hàm lượng Inulin.

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

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

Nhiệt độ (°C)	Dung môi nước (Đối chứng)	Dung môi EtOH			
		80%		90%	
	HL Inulin (mg/g khô)	HL Inulin (mg/g khô)	Hiệu suất (%)	HL 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 ($p < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.7, 3.12) cho thấy các yếu tố như dung môi, nồng độ dung môi, nhiệt độ lưu trữ thu kết tủa, nhiệt độ cô đặc dịch chiết đều có ảnh hưởng đến hàm lượng inulin, fructan thu được.

Dung môi Ethanol nồng độ 80 và 90%, nhiệt độ lưu trữ để thu kết tủa (6 ± 1) °C và nhiệt độ cô đặc 55°C là những thông số giúp thu hồi hàm lượng inulin cao nhất nên được chọn lựa cho những nghiên cứu tiếp theo trong luận án.

3.4. Nghiên cứu tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc phân tử inulin

3.4.1. Nghiên cứu tinh sạch inulin

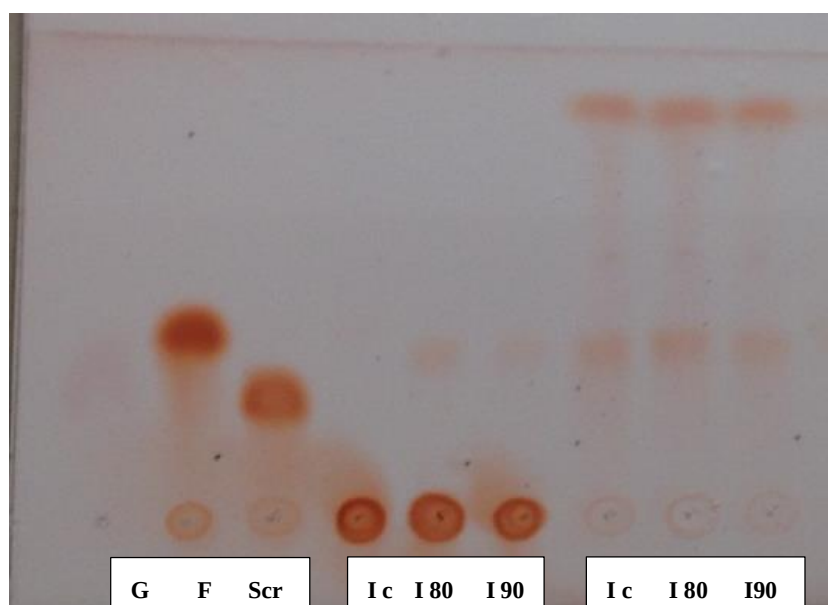
Bảng 3.13. Hiệu suất thu hồi inulin đẳng sâm qua các giai đoạn tái kết tủa

Lần kết tủa	Hàm lượng saccharide trước khi kết tủa	Hàm lượng inulin sau kết tủa (mg/g bột thô)	Hiệu suất thu hồi inulin sau tinh sạch (%)
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 ($p < 0.05$)

Như vậy, sau khi tái kết tủa nhiều lần có thể thu được inulin tinh sạch.

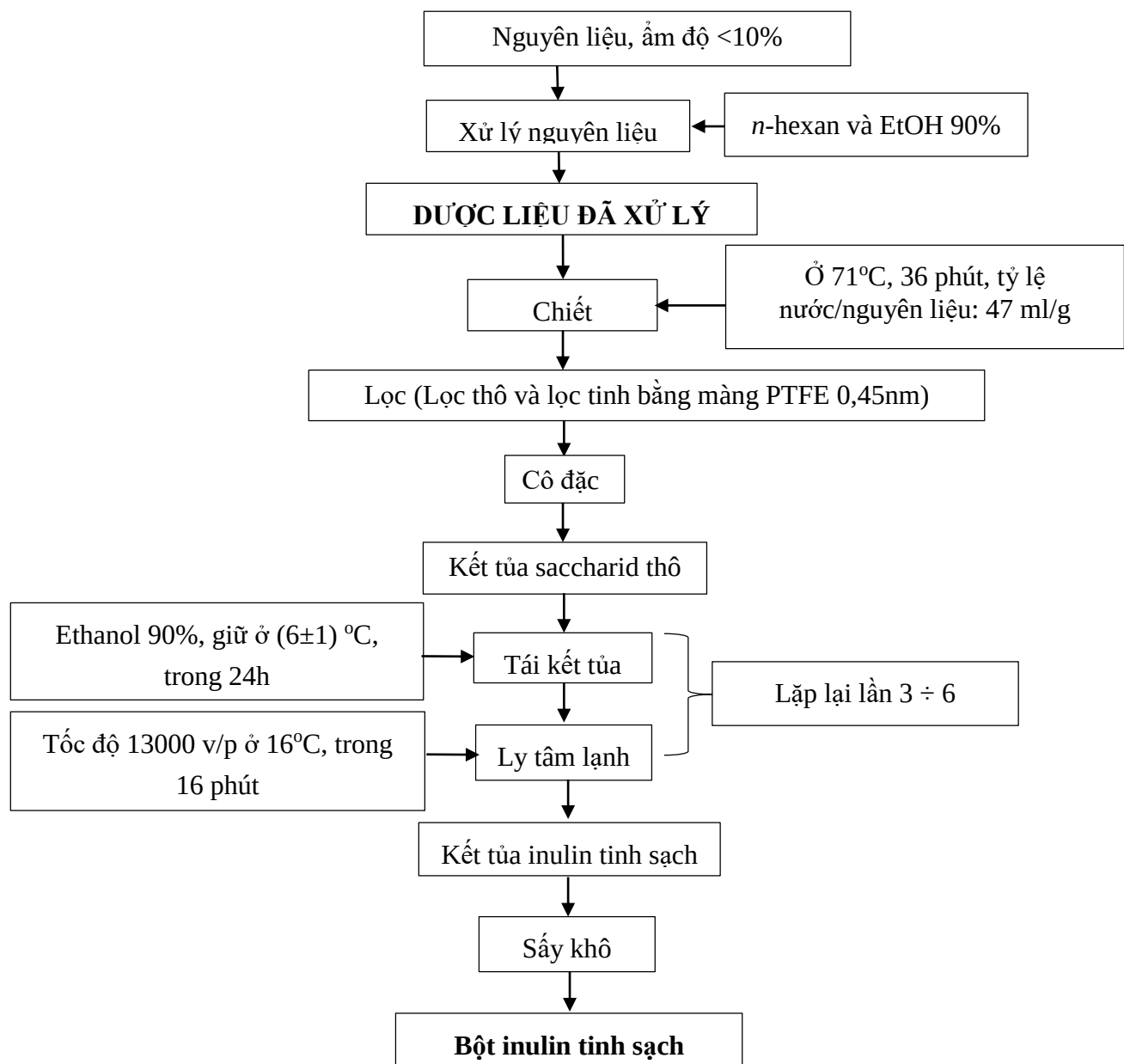
Kiểm tra độ tinh sạch của inulin thu được bằng sắc ký bản mỏng trên silicagel cho thấy R_f của inulin tinh sạch (0,411) và R_f mẫu chuẩn (0,415) tương đương nhau.



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

3.4.2. Đề xuất quy trình tinh sạch inulin từ củ đẳng sâm

* Quy trình tinh sạch Inulin



Hình 3.26. Quy trình tinh sạch inulin từ dịch chiết đẳng sâm

*** Giải thích quy trình**

Xử lý nguyên liệu: Nguyên liệu tươi được xử lý, làm sạch, sấy khô <60°C đến khi có ẩm độ <10%.

Mẫu khô được loại béo, loại đường tự do, các chất màu, các acid amin và các chất tan trong EtOH 90%. Phần bã dược liệu được làm khô dùng làm nguyên liệu chiết Inulin, fructan.

Chiết siêu âm: Phần bã dược liệu được chiết xuất có sự hỗ trợ của sóng siêu âm bằng dung môi nước, nhiệt độ 71°C, tỉ lệ NL/DM 1g/47 ml trong 36 phút.

Lọc: Lọc thô dịch chiết bằng vải, sau đó bằng lưới lọc và cuối cùng lọc qua màng siêu lọc (PTFE 0,45nm) thu dịch lọc.

Cô đặc: Dịch được cô đặc ở 55°C, đến 16°Bx để loại bỏ một phần nước, tiết kiệm chi phí dung môi, tăng hàm lượng vật chất khô.

Kết tủa sacharide thô: Thêm EtOH 90%. Giữ ở $(6 \pm 1) ^\circ\text{C}/24 \text{ h}$. Ly tâm lạnh $16^\circ\text{C}/13000$ vòng/phút/16 phút thu kết tủa saccharidee thô và loại bỏ chất màu, đường tự do. Sấy khô kết tủa. Kết tủa-ly tâm: hòa tan kết tủa với nước cất 2 lần, thêm EtOH 80%. Giữ lạnh ở $(6 \pm 1) ^\circ\text{C}/24 \text{ h}$. Ly tâm lạnh $16^\circ\text{C}/13000$ vòng/phút/16 phút để thu kết tủa. Xác định hàm lượng Inulin sau mỗi lần tinh sạch.

Kiểm tra độ tinh sạch trong mẫu tinh sạch lần cuối cùng bằng bản mỏng TLC và dùng mẫu tinh sạch này để thực hiện nghiên cứu cấu trúc phân tử trong thí nghiệm tiếp theo.

3.4.3. Xác định đặc điểm cấu trúc phân tử Inulin

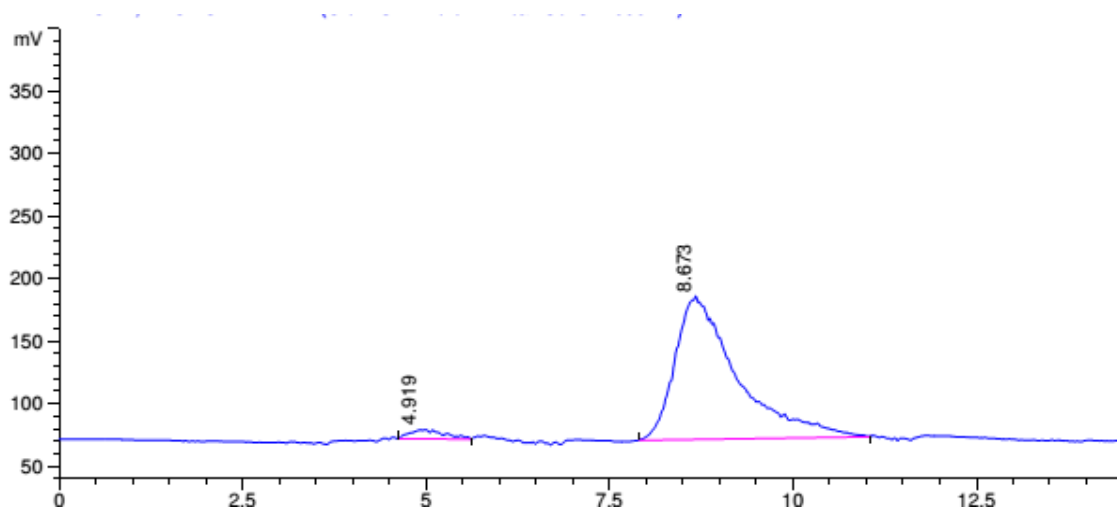
3.4.3.1. Trọng lượng phân tử của inulin

Kết quả phân tích cho thấy inulin tinh sạch từ đẳng sâm có chứa 2 loại fructose polysaccharide: một phân tử có khối lượng 3.193 Da, chiếm 96,448 % và một phân tử có khối lượng phân tử 1.112.892 Da, chiếm 3,552 % (Bảng 3.15).

Kết quả thực nghiệm và phân tích (Hình 3.27) cho thấy phân tử fructose polysaccharide có khối lượng 3.193 Da, chiếm 96,448 % có DP 19-23 đơn vị fructose.

Bảng 3.15. Kết quả phân tích khối lượng phân tử của các thành phần fructose polysaccharide trong đẳng sâm

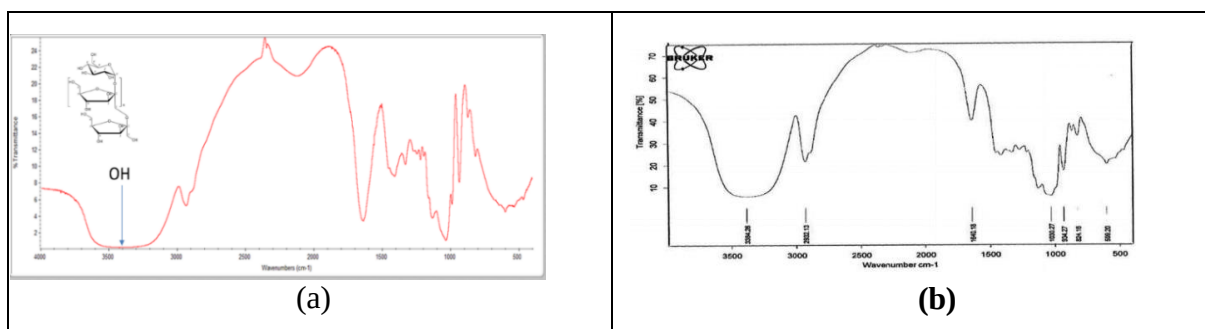
STT	Rt (min)	Diện tích pic	Tỷ lệ diện tích pic (%)	Khối lượng phân tử (Da)
1	4,919	247,161	3,552	1.112.892
2	8,673	6711, 200	96,448	3.193



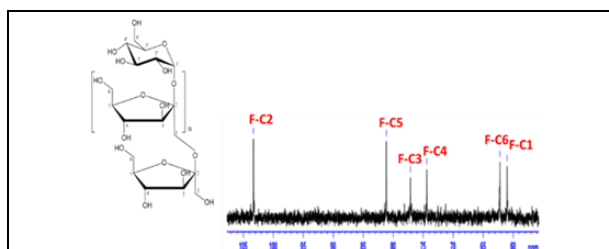
Hình 3.27. Sắc ký đồ sắc ký gel của mẫu polysaccharide đẳng sâm

3.4.3.2. Xác định cấu trúc phân tử inulin

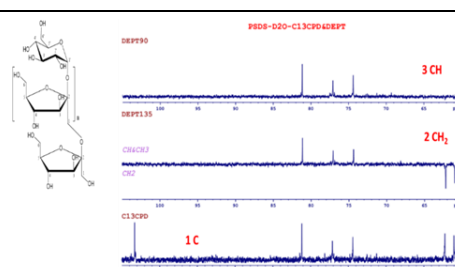
Kết quả phân tích sắc ký gel và các phổ FT-IR, NMR, DEPT, HSQC, HMBC của bột đẳng sâm tinh sạch. (Hình 3.28÷3.34) và bảng 3.16. Polysaccharide trong đẳng sâm được xác định là một inulin dạng fructopolysaccharide với DP khoảng 19-23 (Hình 3.35).



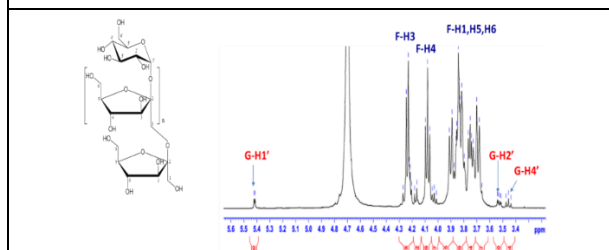
Hình 3.28 - 3.29. Phổ IR của bột đẳng sâm tinh sạch (a) và inulin thương mại (b)



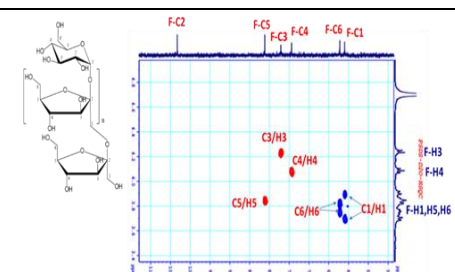
Hình 3.30. Phổ ^{13}C -NMR (D_2O , 125 MHz)



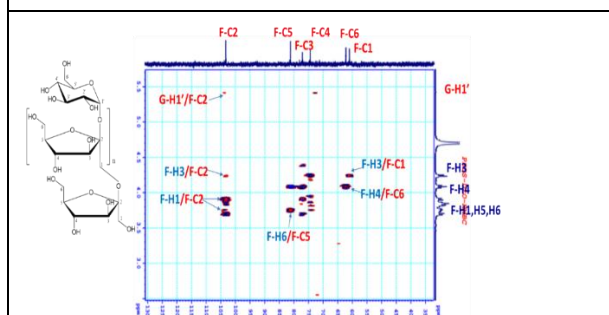
Hình 3.31. Phổ DEPT



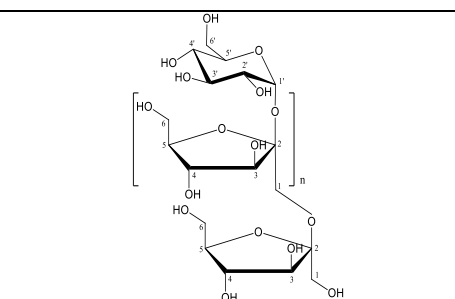
Hình 3.32. Phổ ^1H -NMR (D_2O , 500 MHz)



Hình 3.33. Phổ HSQC



Hình 3.34. Phổ HMBC



Hình 3.35. Cấu trúc hóa học của inulin

Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR và cấu trúc phân tử của inulin

C	* δ_{C} (ppm)	^{a,b} δ_{C} (ppm)	DEPT	^{a,c} δ_{H} (ppm) (J, Hz)	Các tương tác HMBC quan trọng (H→C)
→1)-β-D-Fructofuranosyl-(2→					
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) 3,75 (m, 1H)	C-4, C-5
α -D-Glucopyranosyl-(1→					
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 Cs

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Inulin trong đảng sâm tự nhiên ở tỉnh Lâm Đồng thuộc dạng GFn. Có 2 loại polysaccharide, 1 loại là inulin dạng fructose-polysaccharide, chiếm số lượng lớn 96,448% có khối lượng phân tử khoảng 3.193 Da và một loại chiếm 3,552%, có khối lượng phân tử khoảng 1.112.892 Da.

3.5. Nghiên cứu sấy phun tạo bột inulin

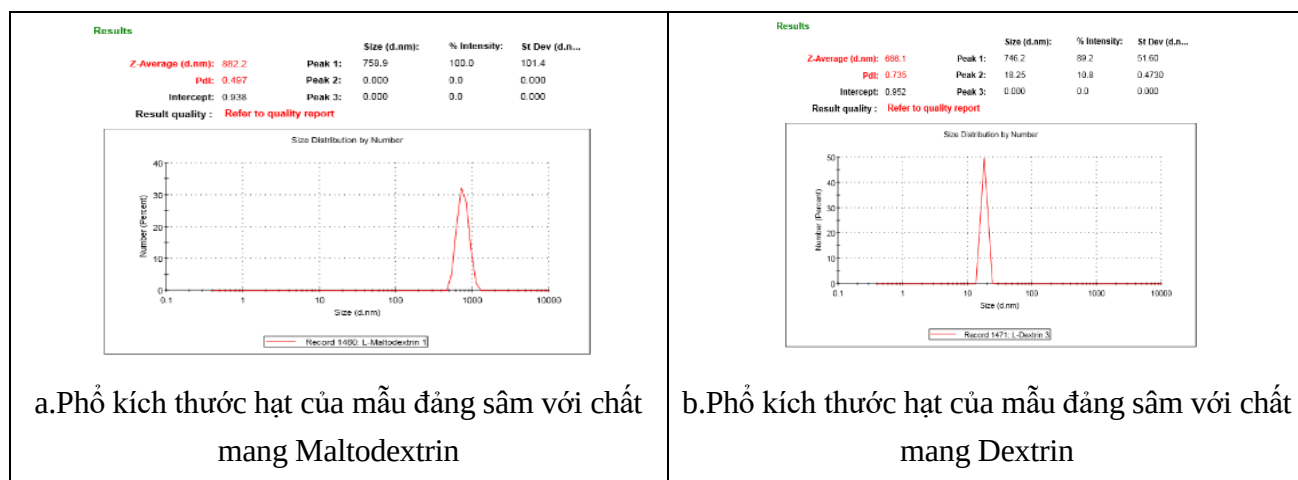
3.5.1. Xác định chất mang và tỷ lệ chất mang

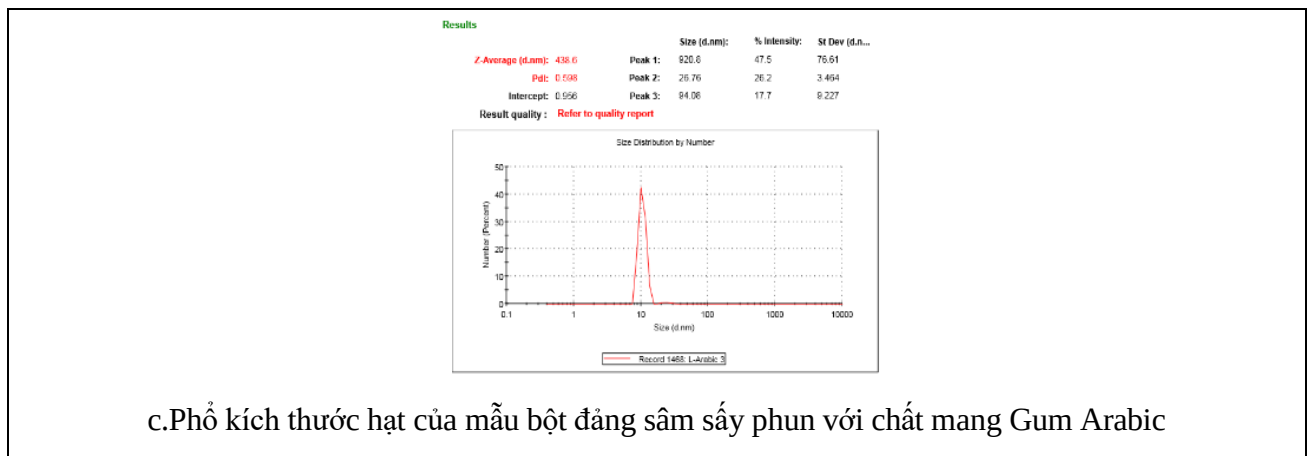
3.5.1.1. Xác định chất mang

Thông số sấy: Dung dịch sấy phun 16^oBx; Nồng độ chất mang 10%; Nhiệt độ không khí đầu vào/ra 180/85^oC; áp suất khí nén (ASKN) 3 atm; Tốc độ đĩa phun (TĐĐP) 16000 vòng/phút; Tốc độ bơm nhu động (TĐ BNĐ) 10 vòng/phút.

a. Xét tính chất vật lý

* Về kích thước hạt và chỉ số phân bố kích thước



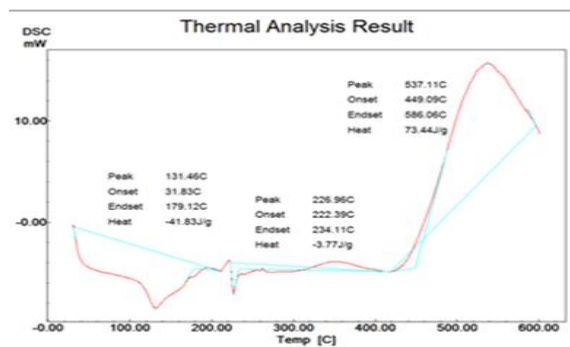


Hình 3.36. Giải đồ phân tích kích thước hạt và độ phân tán

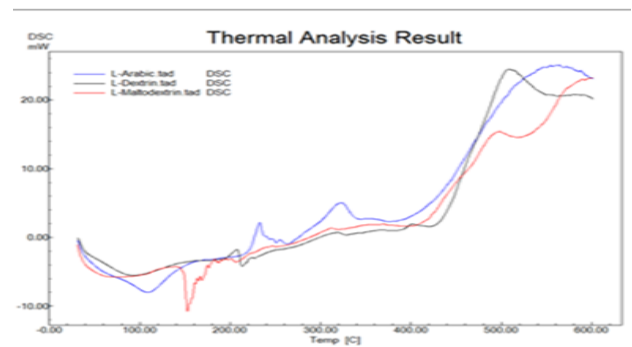
Kết quả phân tích phổ (Hình 3.36 a,b,c) cho thấy bột đẳng sâm sấy phun với chất mang là maltodextrin có PDI 0,497 nhỏ nhất so với 2 chất mang Dextrin và Gum Arabic.

*Về tính chất nhiệt

Kết quả được trình bày ở hình 3.37(a, b).



a) Bột đẳng sâm tinh sạch



b) Bột đẳng sâm sấy phun với các chất mang

Hình 3.37 (a, b). Giải đồ phân tích nhiệt vi sai bột inulin tinh sạch (a) và sấy phun (b)

Các kết quả phân tích giải đồ phân tích nhiệt vi sai cho thấy chất mang maltodextrin giúp tạo bột inulin củ đẳng sâm có độ bền nhiệt và bảo vệ inulin tốt hơn các chất mang dextrin và gum arabic.

b. Về hàm lượng Inulin

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

Loại chất mang	Độ tan	Hàm lượng Inulin (mg/g)	Hàm lượng Fructan (mg/g)	Hàm lượng khoáng tổng số (%)	pH	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 đẳng sâm 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 đẳng sâm 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 đẳng sâm đặc trưng

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

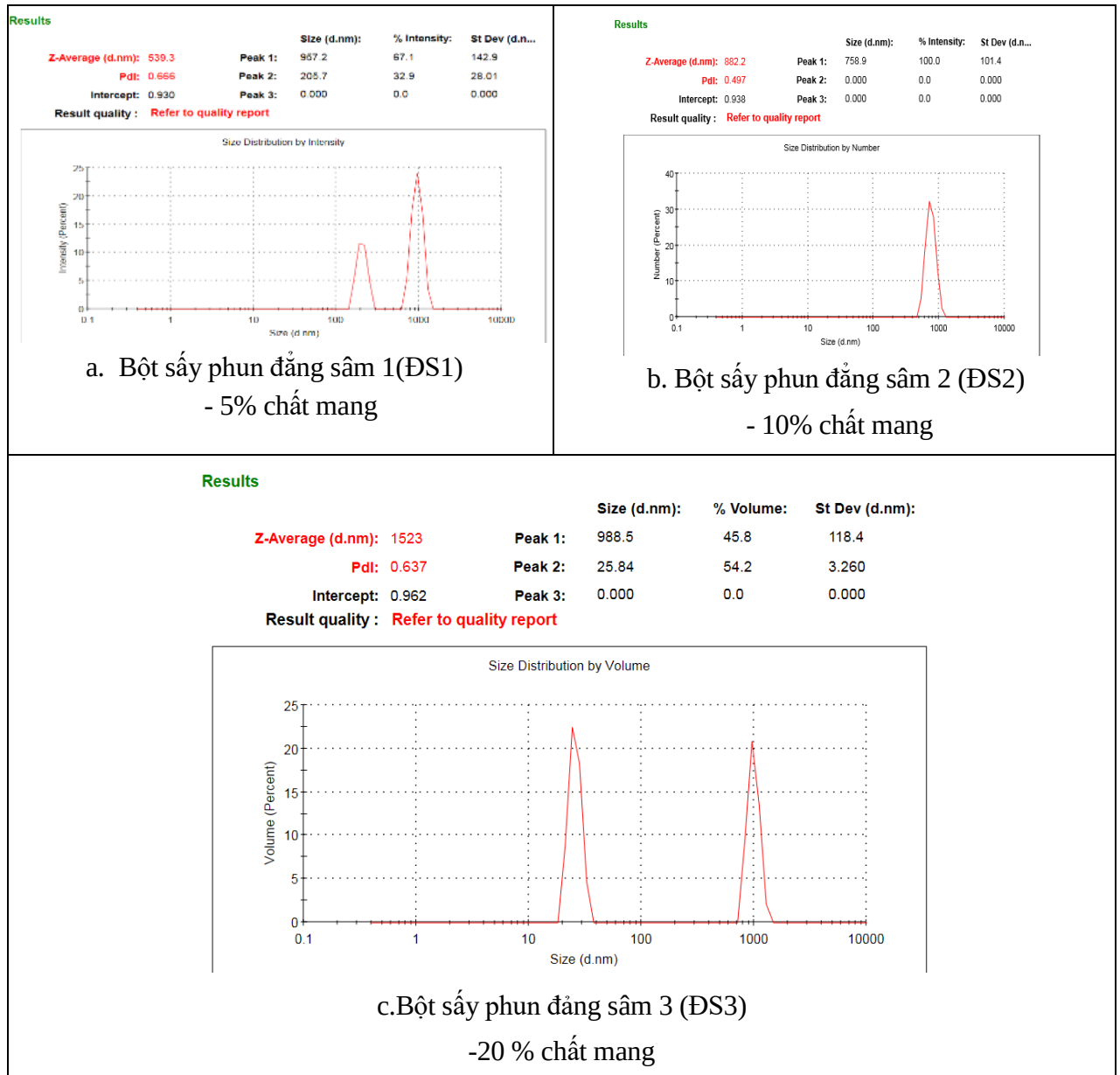
Kết quả phân tích các hình 3.36÷3.37 và bảng 3.19 cho thấy matodextrin là chất mang thích hợp dùng sấy phun tạo bột inulin đẳng sâm.

3.5.1.2. Xác định nồng độ chất mang

* Về kích thước hạt

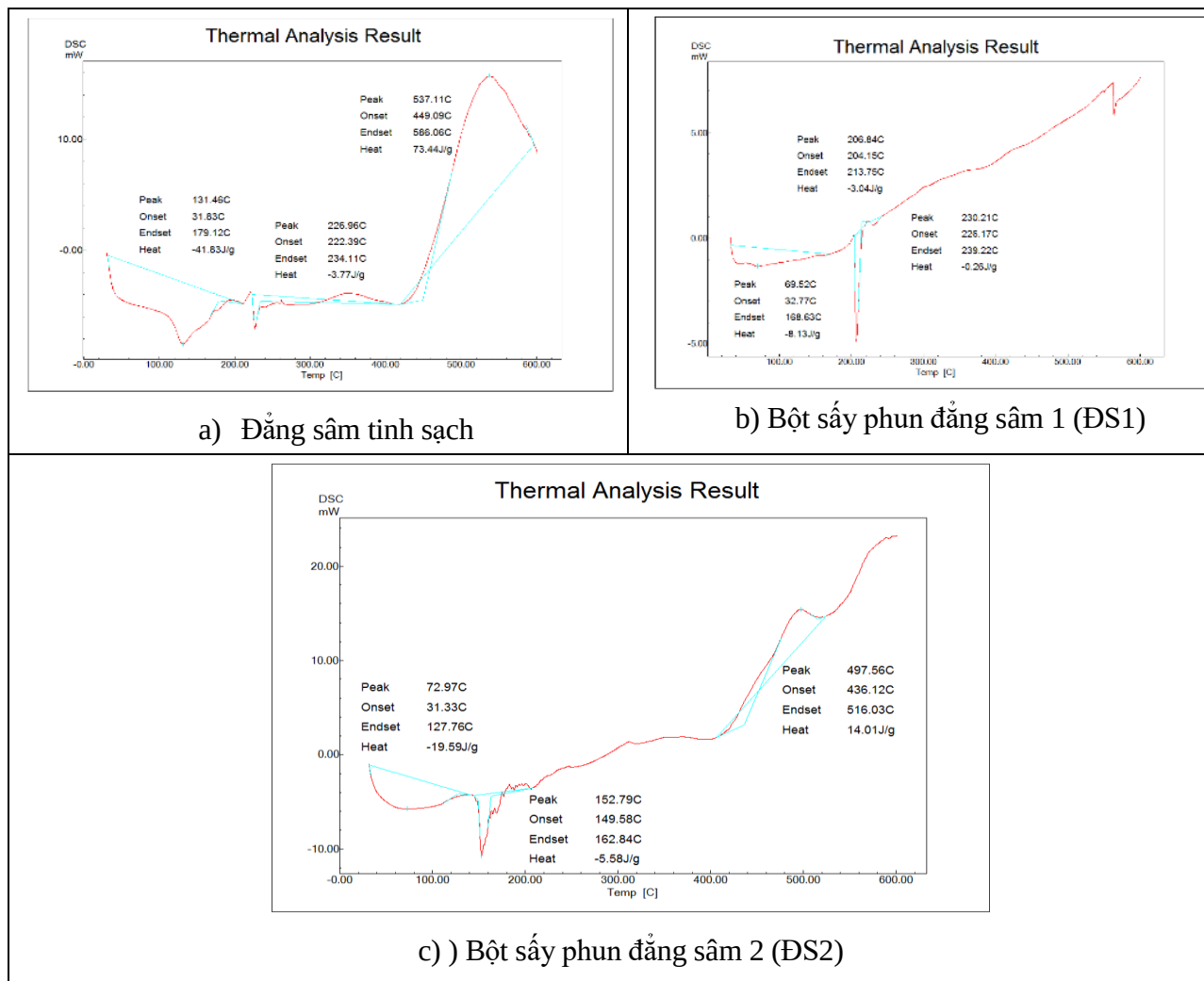
Chất mang Maltodextrin ở các nồng độ 5,10, 20% (w/v) được thêm vào dịch chiết. Nhiệt độ sấy được cố định ở mức nhiệt đầu vào/ra 185/85°C tương ứng với bột sấy phun ĐS1; ĐS2; ĐS3.

Kết quả phân tích phổ kích thước (Hình 3.38 abc) cho thấy: Mẫu đẳng sâm 3 không đạt yêu cầu về các chỉ tiêu cho nên bị loại, mẫu đẳng sâm 1 ưu thế về kích thước hạt nhưng yếu thế về chỉ số PDI. Do đó, tính chất nhiệt và hàm lượng inulin cần phải được tiếp tục phân tích để so sánh, đánh giá giữa 2 mẫu ĐS1 và ĐS2 với mẫu đẳng sâm tinh sạch.



Hình 3.38 (a, b, c). Kích thước hạt của các loại bột inulin đẳng sâm theo nồng độ chất mang

* Về tính chất nhiệt



Hình 3.39. Biểu đồ phân tích nhiệt của 3 mẫu đẳng sâm sắn phun (a) Mẫu đẳng sâm tinh sạch, mẫu sắn đẳng sâm 1, c) Mẫu sắn đẳng sâm 2

Kết quả phân tích biểu đồ nhiệt (Hình 3.39) cho thấy mẫu đẳng sâm 2 bền nhiệt hơn mẫu đẳng sâm 1 nhiều lần. Thêm vào đó PDI của mẫu đẳng sâm 2 là 0,497 rất gần với mức 0,4.

Xét về tính chất nhiệt thì mẫu đẳng sâm 2 được chọn lựa.

* Về hàm lượng Inulin và fructan

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

Hàm lượng Inulin trong mẫu đẳng sâm 1 đạt 431,16^b mg/g bột và mẫu ĐS2 đạt 459,90^a mg/g bột. Trong khi đó hàm lượng fructat của mẫu ĐS1 và ĐS2 lần lượt là 452,56^b, 469,40^a.

Như vậy mẫu ĐS 2 có hàm lượng các chất Inulin, fructan cao hơn mẫu đẳng sâm 1. Kết hợp với kết quả nghiên cứu về tính chất nhiệt (Hình thì nồng độ chất mang 10% được chọn lựa để bổ sung vào dịch chiết.

3.5.2. Xác định nhiệt độ khí đầu vào

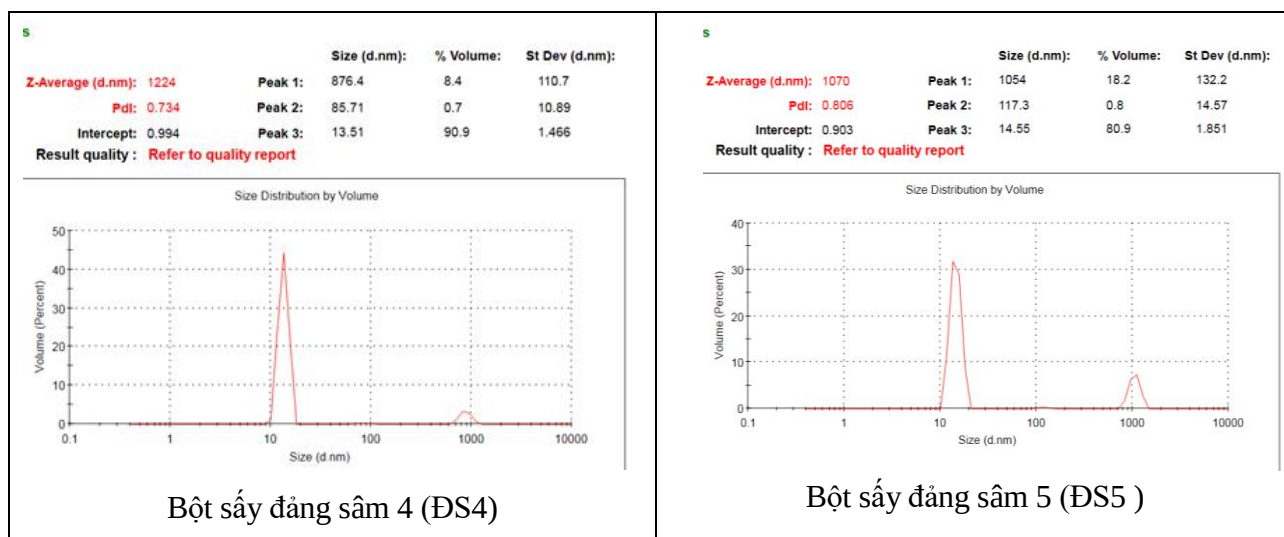
Có định chất mang ở mức 10%, nhiệt độ sấy đầu vào ở các mức 130,150,185, 210°C và nhiệt độ đầu ra 85°C, tương ứng với mẫu sắn ĐS4, ĐS5, ĐS2, ĐS6. Kết quả phân tích kích thước hạt được thể hiện qua các biểu đồ (Hình 3.41) và bảng 3.21.

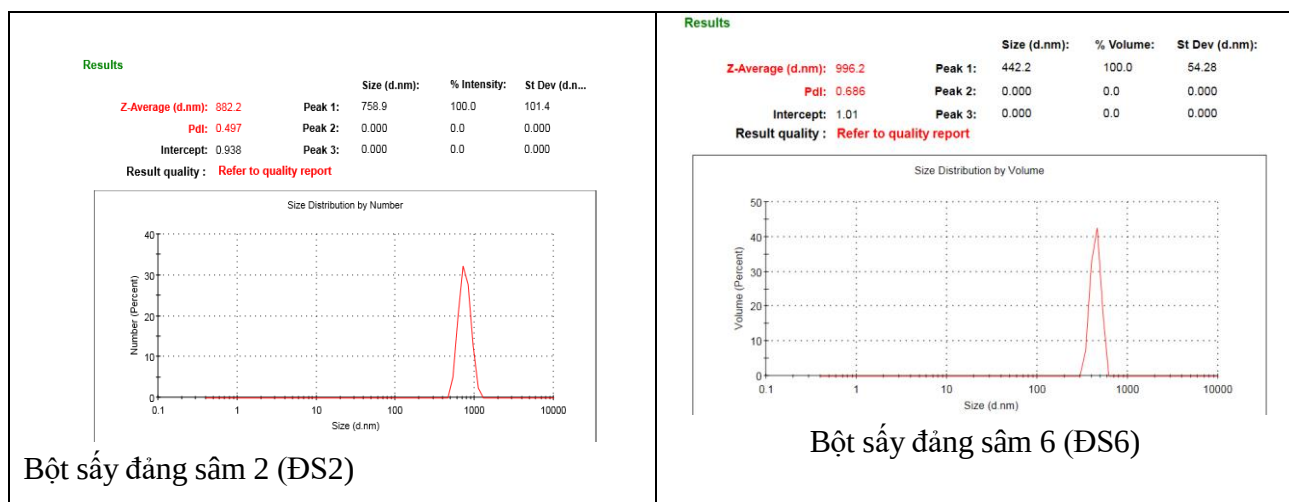
Bảng 3.21. Kích thước hạt và PDI theo nhiệt độ sấy

Nhiệt độ buồng sấy- vào/ra (°C)	Mẫu	K thước hạt trung bình (d.nm)	Kích thước hạt và mật độ		PDI	Độ ẩm (%)
			Kích thước loại hạt (d.nm)	Mật độ (%)		
130/85	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		
150/85	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		
185/85	ĐS 2	884,2	758,9±101,4	100	0,497	6,06±0,27
210/85	ĐS 6	996,2	442,2±54,28	100	0,686	4,27±0,33

Khi sấy ở nhiệt độ vào/ra là 185/85°C, mẫu sấy đẳng sâm 2 có thước nhỏ nhất, đạt 884,2 nm và PDI 0,497, mật độ hạt 100%. Kết quả này cho thấy độ đồng đều về kích thước hạt của mẫu đẳng sâm 2, các mẫu sấy đẳng sâm còn lại đều có kích thước lớn hơn. Cụ thể mẫu đẳng sâm 4 và đẳng sâm 5 đều có kích thước lớn hơn 1000 nm, PDI >0,7 và có tới 3 loại hạt trong mẫu sấy. Kết quả này minh rằng khi sấy ở các mức nhiệt khác 185/85 sẽ cho mẫu có kích thước hạt lớn và không đồng đều.

Như vậy, thông số thích hợp cho quá trình sấy phun tạo bột là chất mang 10%, nhiệt độ sấy vào/ra 185/85°C, ASKN 3 atm, TĐBND 20 v/p, TĐDP 16000 v/p.

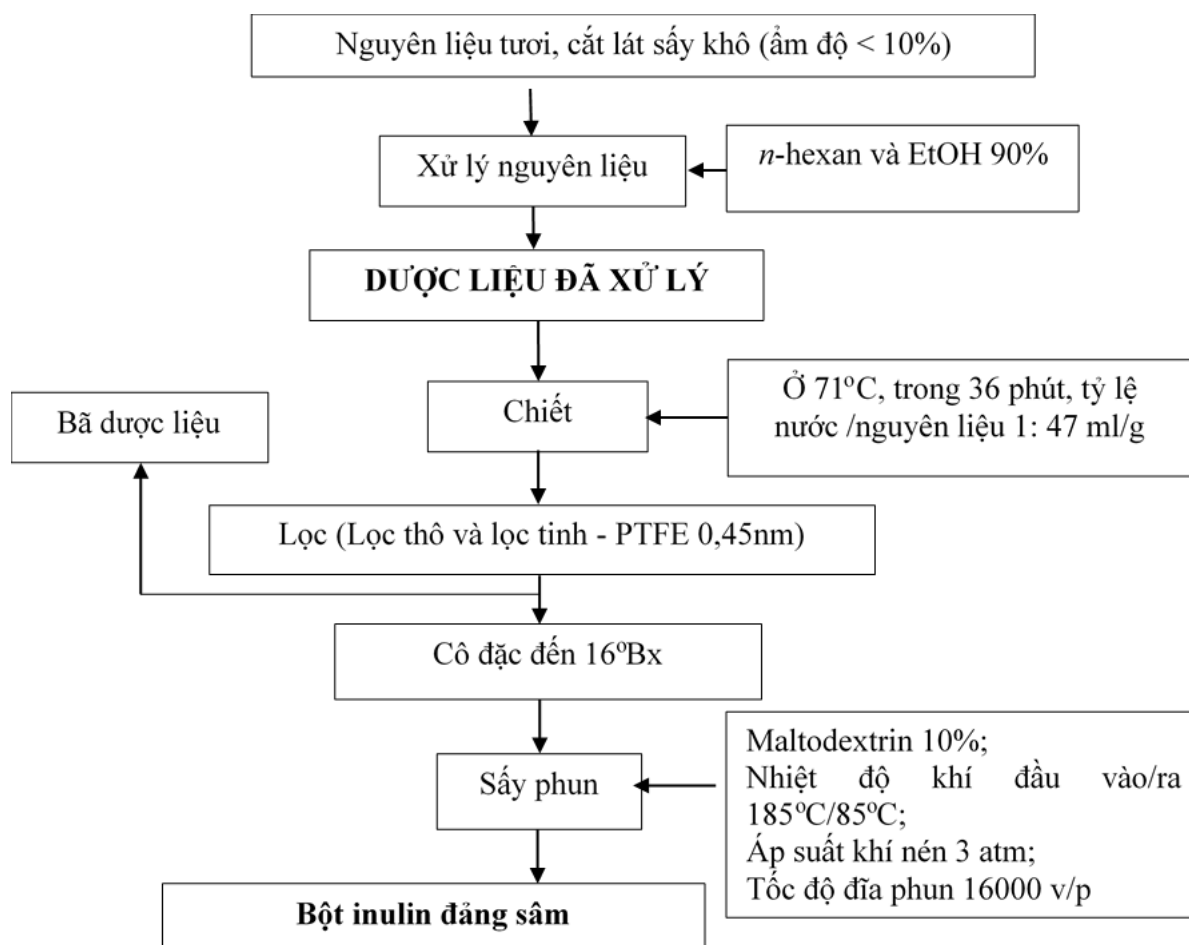




Hình 3.41. Kích thước hạt của các loại bột sáy theo nhiệt độ

3.5.3. Đề xuất quy trình sấy phun và sản xuất thử bột Inulin đẳng sâm

3.5.3.1. Quy trình sấy phun tạo bột đẳng sâm



Hình 3.42. Quy trình sấy phun tạo bột inulin từ đẳng sâm

Thuyết minh quy trình

- Đẳng sâm tươi, đạt tiêu chuẩn nguyên liệu dược, được rửa sạch, thái lát mỏng bằng dao, sấy nóng (<60°C) đến khô (độ ẩm <10%), được bao gói chân không bảo quản ở nhiệt độ thường.
- Chiết siêu âm chiết dịch ở nhiệt độ 71°C/36p /47 ml. Chiết 1 lần.

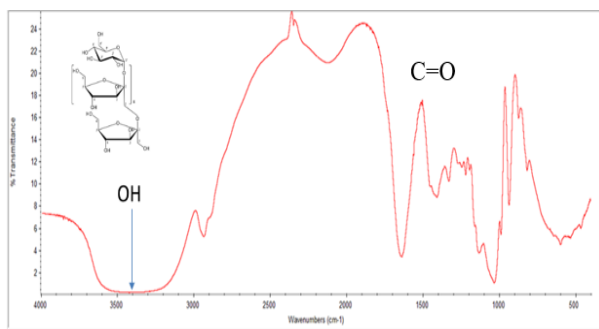
3. Cô đặc dịch chiết trong điều kiện chân không đến 16 °Bx (Tốc độ 90 vòng/phút, nhiệt độ 55°C).

4. Sấy phun: Thêm 10% Maltodextrin vào dịch cô đặc, đồng nhất dịch. Tiến hành sấy phun (Nhiệt độ 85°C; ASKN 3 atm, TĐBNĐ 20v/p, TĐDP 16000 v/p) thu bột thành phẩm.

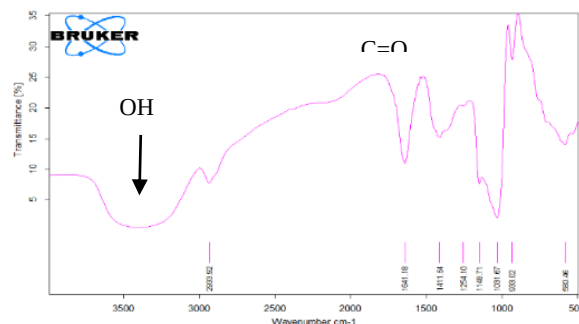
5. Kiểm tra chất lượng bột thành phẩm thông qua các đánh giá về đặc tính cảm quan, lý hóa, vi sinh, hoạt tính prebiotic So sánh với QCVN số 46/2007 về chất lượng dành cho sản phẩm thực phẩm chức năng.

6. Bột sấy phun đẳng sâm thành phẩm được bao gói hút chân không, bảo quản nhiệt độ phòng (25°C).

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



a) Bột inulin đẳng sâm tinh sạch



b) Bột inulin đẳng sâm sấy phun

Hình 3.43. Phổ FT- IR của bột inulin đẳng sâm tinh sạch (a) và sấy phun (b)

Phổ FT-IR sẽ cho biết sự ổn định về mặt cấu trúc của inulin trong bột sấy phun. Kết quả nghiên cứu cho thấy (Hình 3.43): Cấu trúc hóa học Inulin giống nhau giữa mẫu đẳng sâm tinh sạch và mẫu sấy phun. Thêm vào đó các peak tại vùng 943 cm⁻¹ chỉ ra sự hiện diện của Fructose-furanoryl không thay đổi.

Như vậy ở chế độ sấy nói trên không làm ảnh hưởng cấu trúc phân tử Inulin trong bột sấy phun. Điều này làm cơ sở để khẳng định tính chất sinh học của bột inulin đẳng sâm sấy phun trong các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.22. Kết quả các đặc tính của bột đẳng sâm sấy phun thành phẩm

STT	Đặc tính	ĐVT	Kết quả	Giới hạn cho phép
1.Đặc tính cảm cảm quan				
1.1.	Màu		Nâu nhạt	
1.2	Mùi		Thơm của đẳng 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	
2.10	Khoáng (tro) tổng số	%	4,82 ± 0,07	
3. Kim loại nặng (Theo QĐ số:46/2007/QĐ-BYT. 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	
3. Độ an toàn vi sinh vật (Theo QĐ số:46/2007/QĐ-BYT. Ngày 19/12/2007*)				
3.1	Tổng số VSVHK	CFU/g	1,0 x10 ²	10 ⁴
3.2	Tổng số <i>Escherichia coli</i>	CFU/g	KPH	Không có
3.3	Tổng số <i>Clostridium perfringens</i>	CFU/g	KPH	10
3.4	Phát hiện <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”

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3.22) cho thấy:

***Về chất lượng cảm quan**

Sản phẩm bột sấy phun thu được từ dịch chiết đẳng sâm dạng bột, màu nâu vàng, thơm mùi đẳng sâm.

*** Về các chỉ tiêu lý – hóa**

Bột Inulin đẳng sâm sấy phun thu được có độ ẩm là (6,06 ± 0,27) %, khoáng tổng số (4,82^b ± 0,07) %. Tan hoàn toàn trong nước (1g/10 ml), thời gian tan nhanh (15 phút). Độ pH trong khoảng (5,18 ± 0,01). Sản phẩm bột sấy phun thành phẩm có hàm lượng Inulin trung bình (445,90 ± 2,79) mg/g bột sấy phun; hàm lượng Fructan trung bình (469,40 ± 1,61) mg/g bột sấy phun; Không phát hiện hàm lượng kim loại nặng.

*** Về chỉ tiêu vi sinh vật**

Bột inulin đẳng sâm sấy phun đạt yêu cầu về các chỉ tiêu VSV theo quy định của Bộ Y tế.

Từ những phân tích trên cho thấy, sản phẩm bột inulin đẳng sâm sấy phun theo quy trình của luận án đạt các tiêu chí về chất lượng cảm quan, hóa học và đạt các yêu cầu vi sinh vật (qui chuẩn BHYT). Vì vậy, có thể dùng cho sản xuất thực phẩm và thực phẩm chức năng.

3.6. Thử nghiệm sử dụng inulin từ đẳng sâm tạo bột synbiotic và định hướng ứng dụng trong thực phẩm

3.6.1. Ảnh hưởng của bột inulin đẳng sâm đến sự phát triển của một số loại vi khuẩn dùng trong sản xuất chế phẩm probiotic

Bảng 3.23. Hoạt tính prebiotic của bột sáy phun

S T T	Loài vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/g)			
		Ban đầu	Sau khi nuôi tăng sinh	Nuôi có bổ sung bột sáy inulin đẳng 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: CFU: Colon Forming Unit; ↑Tăng

Khi bổ sung bột sáy đẳng sâm với hàm lượng 4 % (w/v-tương đương 2% inulin) vào môi trường nuôi cấy tạo prebiotic 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 đẳng sâm sáy phun khi bổ sung với hàm lượng 4% (w/v) vào môi trường nuôi cấy có thể làm tăng sinh mạnh sinh khối các chủng *L. plantarum*, *L. acidophilus* (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 đẳng sâm tạo thành chế phẩm synbiotic trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.6.2. Tối ưu hóa quá trình phối trộn bột inulin với sinh khối probiotic tạo chế phẩm synbiotic

* Xác định mô hình hồi quy

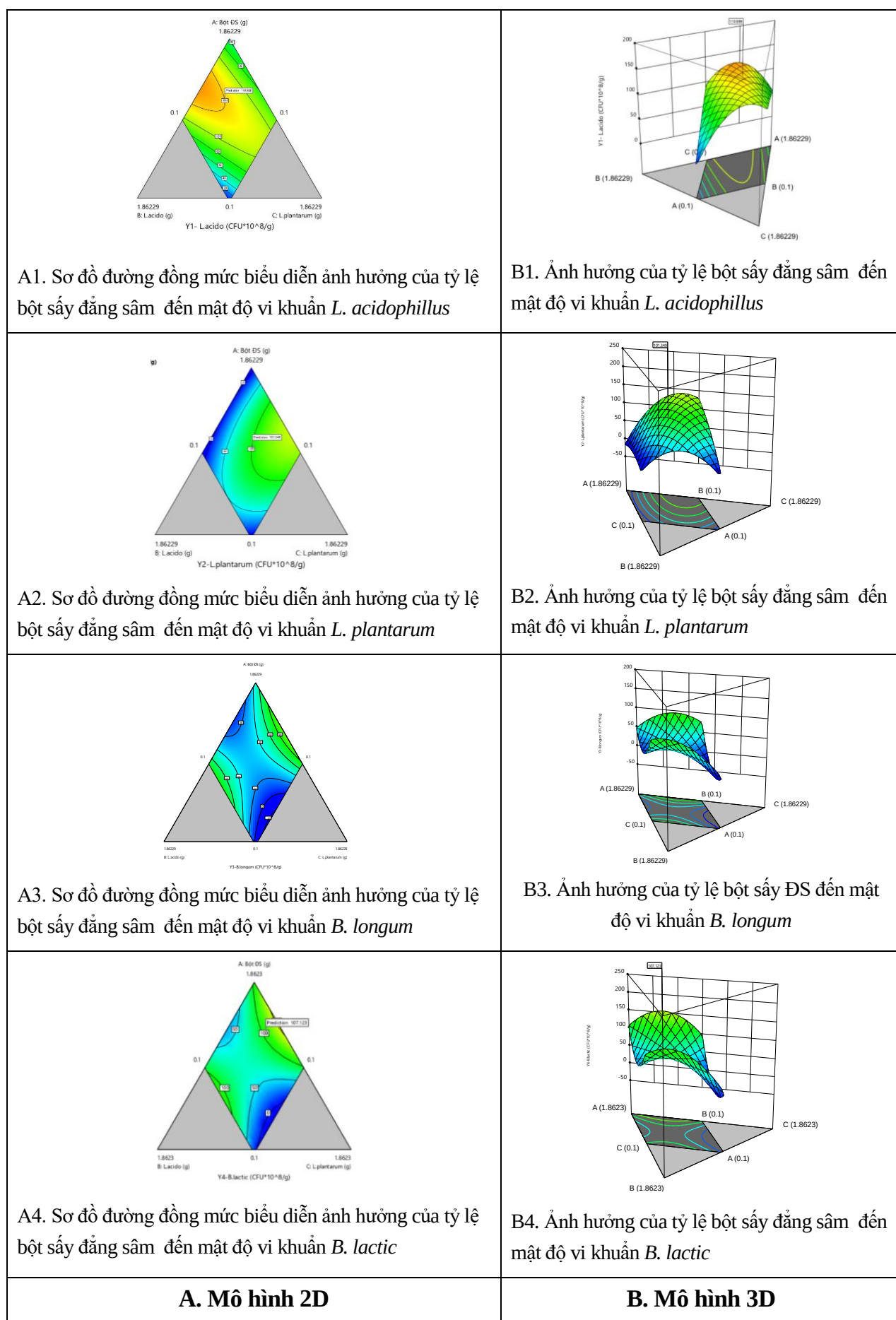
Các phương trình hồi quy Yi dạng như sau:

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

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

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

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



Hình 3.44. Mô hình 2D(A), 3D(B) các mặt đáp ứng của hàm mục tiêu Yi tiêu dưới tác động của tỉ lệ bột sấy đẳng sâm bổ sung

*** Xác định thông số tối ưu cho quá trình phối trộn tạo synbiotic**

Phân tích và tiến hành trùng lặp 4 bề mặt đáp ứng cho kết quả dự đoán các thông số tối ưu như sau: Bột inulin đẳng sâm 0,55g/g; *L. acidophilus* 0,03g/g; *L. plantarum* 0,25g/g; *B. longum* 0,03; *B. lactis* 0,14g/g.

Kiểm tra lại tại điểm tối ưu được đề xuất và so sánh với các tổ hợp có sinh khối cao nhất. Kết quả trình bày qua bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả kiểm tra lại một số tổ hợp có mật độ 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 sáy ĐS	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. lactis</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. lactis</i>						↑4,1	↑3,9	↑1,1	K tăng

Ghi chú: ↑ tăng ... lần; K = không

Từ các kết quả nghiên cứu đã xác định được công thức tối ưu cho việc phối trộn tạo synbiotic: Vì vậy hàm lượng bột inulin đẳng sâm sáy phun 0,514 g được phối trộn với sinh khối *L. acidophilus* (M7) 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 0,1 g sinh khối *B. lactis* (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

Kết quả thử nghiệm chế phẩm trên chuột thí nghiệm như sau:

Thử nghiệm độc tính cấp: Từ kết quả thử nghiệm cho thấy chế phẩm synbiotic chứa inulin đẳng sâm không thể hiện độc tính cấp theo đường uống với với chuột thử nghiệm ở liều tối đa (D_{max}) 36,5 g/kg. Vì vậy, luận án không xác định được giá trị LD50 của chế phẩm.

Tác động điều trị tiêu chảy cấp: Chế phẩm synbiotic có khả năng điều trị tiêu chảy ở chuột thí nghiệm.

Tác động kích thích miễn dịch: 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.

Thử nghiệm độc tính bán trường diễn: 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 gan, 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 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 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 $(6 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 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 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 đẳng sâm mọc tự nhiên tại Lạc Dương - Lâm Đồng gồm 2 phân tử fructose polysacccharide: 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 khoáng $(4,82 \pm 0,07)$ %. 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 đẳng 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 đẳng sâm trên 600°C. Bột inulin đẳng 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 đẳng sâm để tạo chế phẩm synbiotic định hướng ứng dụng trong thực phẩm: Bột inulin đẳng sâm có đặc tính prebiotic mạnh với liều sử dụng 4,0% (w/w tương đương 2% tính theo Inulin) 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. lactis*, 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 đẳng 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. lactis* (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 đẳng sâm để bảo tồn gen và đảm bảo nguyên liệu cho quá trình sản xuất.

- Tiếp tục sản xuất thử nghiệm bột đẳng sâm sấy phun dạng prebiotic, synbiotic ở quy mô lớn làm cơ sở xây dựng giá thành và thương mại hóa sản phẩm.