

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NGUYỄN THỊ TỐ UYÊN

**ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HOÁ,
KHÁNG KHUẨN VÀ TÁC ĐỘNG LÊN MỘT SỐ
VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CỦA BỘT LÁ LÚA NON
(*Oryza sativa*)**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

TP. Hồ Chí Minh - Năm 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học 1: **TS. Nguyễn Hữu Thanh**

Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc Gia TP.HCM

Người hướng dẫn khoa học 2: **PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo -**

Viện Khoa học Sự sống, Viện Hàn lâm KHCN Việt Nam

Phản biện 1: PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp.

Phản biện 2: TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan.

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết thực hiện đề tài

Cây lúa (*Oryza sativa*) là cây lương thực chủ lực tại nhiều quốc gia châu Á, cung cấp lương thực cho hơn một nửa dân số toàn cầu. Việt Nam hiện đứng thứ 5 thế giới về sản xuất và tiêu thụ lúa gạo, với Đồng bằng sông Cửu Long là vùng trồng trọng điểm.

Gần đây, nhiều nghiên cứu đã khai thác giá trị dinh dưỡng và dược liệu từ lá non của các loài ngũ cốc như lúa mì, lúa mạch, yến mạch. Lá non chứa nhiều hợp chất sinh học có hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm, thải độc, hỗ trợ điều trị ung thư và kháng khuẩn. Bột lá lúa mì non đã được thương mại hóa nhờ hàm lượng cao chlorophyll, polyphenol, axit amin, vitamin, khoáng chất và enzyme. Nghiên cứu mới cho thấy lá lúa gạo có thành phần tương tự lá lúa mì, mở ra tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu bản địa giàu giá trị sinh học.

Lá lúa non được ghi nhận chứa nhiều polyphenol, flavonoid với hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm, phòng ngừa ung thư. Các mô sinh dưỡng của cây lúa cũng là nơi tổng hợp các hợp chất sinh học quan trọng như axit amin, flavonoid, phenolamide, terpene và vitamin. Tuy nhiên, số nghiên cứu chuyên sâu về thành phần hóa học, hoạt tính kháng khuẩn và lợi khuẩn đường ruột của lá lúa non còn hạn chế. Ngoài ra, các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng như giống lúa, điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hoạch và quy trình chế biến chưa được nghiên cứu hệ thống. Vì vậy, đề tài được thực hiện nhằm làm rõ tiềm năng sinh học của lá lúa non và xây dựng quy trình sản xuất phù hợp để tạo ra sản phẩm có giá trị ứng dụng cao.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Luận án nhằm nghiên cứu và phát triển sản phẩm bột cao chiết lá lúa non (sau đây gọi tắt là bột lá lúa non – BLL) từ giống *Oryza sativa* với các mục tiêu như sau:

- (1) Tối ưu hoá điều kiện thu hoạch lá lúa chứa hàm lượng cao các hợp chất sinh học.
- (2) Xây dựng quy trình thu nhận bột cao chiết lá lúa non có hiệu quả sinh học cao.
- (3) Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột của BLL.

3. Nội dung nghiên cứu

1. Xác định giống lúa, thời gian thu hoạch và điều kiện che sáng tối ưu để nâng cao tích lũy hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa.
2. Xây dựng quy trình sản xuất bột lá lúa non bằng tối ưu hóa các công đoạn chế biến nhằm bảo toàn hợp chất và hoạt tính sinh học.
3. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn của bột lá lúa non qua thử nghiệm in-vitro và khảo sát tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột qua phân tích 16S rRNA và các chỉ số sinh lý trên chuột.

4. Cơ sở khoa học và thực tiễn

Nghiên cứu góp phần bổ sung cơ sở khoa học về khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và hỗ trợ lợi khuẩn đường ruột của lá lúa non. Từ đó, xây dựng quy trình sản xuất bột lá lúa non chất lượng cao, phù hợp phát triển sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc thực vật, ứng dụng trong thực phẩm chức năng, dược phẩm, mỹ phẩm và nâng cao giá trị thương mại cây lúa.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu về cây lúa

1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và phân bố

Cây lúa (*Oryza sativa*) thuộc họ Hòa thảo, có nguồn gốc từ Nam Á và Đông Á, là loài trồng phổ biến nhất toàn cầu. Về phân loại, *O. sativa* gồm hai phân loài chính: *indica* (phân bố vùng nhiệt đới, chịu nhiệt tốt) và *japonica* (phân bố vùng ôn đới, chịu lạnh tốt). Sự phân bố này gắn liền đặc điểm sinh thái, khả năng thích nghi và canh tác ở các vùng khí hậu khác nhau.

1.1.2. Tình hình sản xuất và đa dạng giống lúa tại Việt Nam

Việt Nam đứng thứ 5 thế giới về sản lượng lúa, đạt khoảng 43–44 triệu tấn thóc/năm trên diện tích 7 triệu ha. Đồng bằng sông Cửu Long là vùng trọng điểm, đóng góp hơn 50% sản lượng và phần lớn gạo xuất khẩu. Hệ thống giống lúa rất đa dạng, gồm *indica*, *japonica* và các giống lúa mùa bản địa có khả năng chịu hạn, mặn, sâu bệnh tốt, đóng vai trò quan trọng trong chọn tạo giống mới. Ngoài giá trị lương thực, cây lúa còn là nguồn nguyên liệu sinh học tiềm năng phục vụ thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược liệu và năng lượng sinh học, hướng tới kinh tế tuần hoàn.

1.1.3. Đặc điểm sinh lý và giai đoạn sinh trưởng

Cây lúa có chiều cao 90–120 cm (giống lai) hoặc cao hơn ở giống bản địa; lá gồm bẹ, phiến, lưỡi và tai lá, đóng vai trò chính trong quang hợp. Bông lúa nhỏ, tự thụ phấn; hạt dài 5–12 mm. Giống *indica* cho hạt dài, ít dính; giống *japonica* cho hạt ngắn, dẻo hơn. Chu kỳ sinh trưởng gồm ba giai đoạn: sinh dưỡng, sinh sản và chín, kéo dài 3–6 tháng tùy giống.

Tại Đồng bằng sông Cửu Long, chủ yếu trồng giống *indica* (IR50404, OM, ST, KC) và giống bản địa (Nàng Thơm, Tài Nguyên, Nếp Tím, Huyết Rồng). IR50404 có thời gian ngắn (85–90 ngày) nhưng chất lượng gạo thấp; các giống bản địa dài ngày hơn, có mùi thơm, chất lượng cao hoặc giàu anthocyanin (gạo thảo dược).

1.2.2. Các hợp chất sinh học thực vật trong lá lúa

1.2.2.1. Chất diệp lục (*Chlorophyll*)

Lá lúa có hàm lượng chlorophyll cao, tương đương hoặc vượt lá lúa mì nhưng thấp hơn lá lúa mạch. Chlorophyll và chlorophyllin có hoạt tính chống ung thư, giải độc gan, kháng viêm, hỗ trợ miễn dịch, thanh lọc máu, phục hồi tổn thương, quản lý cân nặng và cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột.

1.2.2.2. Các hợp chất *polyphenol*

Polyphenol là hợp chất thứ cấp quan trọng, có khả năng chống oxy hóa, kháng viêm, kháng khuẩn và bảo vệ tế bào. Lá lúa non chứa nhiều phenolic, flavonoid, đặc biệt anthocyanin ở giống gạo màu. Thành phần polyphenol phụ thuộc giống, giai đoạn thu hoạch và điều kiện canh tác. Các hợp chất chính gồm anthocyanin, catechin, epicatechin, EGCG, rutin, axit protocatechuic, axit vanillic, axit caffeic, axit ferulic, luteolin, kaempferol. Những hợp chất này có tác dụng chống oxy hóa, bảo vệ tim mạch, hạ đường huyết, ngăn lão hóa và thoái hóa thần kinh.

1.3. Yếu tố ảnh hưởng đến các hợp chất sinh học

1.3.1. Giống lúa

Yếu tố di truyền quyết định khả năng tích lũy hợp chất sinh học. Giống gạo màu, đặc biệt gạo đen, có hàm lượng phenolic, flavonoid, anthocyanin cao hơn giống gạo trắng. Giống chịu hạn, chịu mặn thường tích lũy hợp chất sinh học nhiều hơn.

1.3.2. Giai đoạn sinh trưởng

Lá non (5–7 ngày tuổi) có hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, giảm dần khi cây trưởng thành. Thu hoạch sớm tối ưu để thu được lá giàu hoạt tính sinh học.

1.3.3. Điều kiện ánh sáng

Ánh sáng yếu thúc đẩy tích lũy chlorophyll nhằm duy trì quang hợp, trong khi ánh sáng mạnh kích thích tổng hợp flavonoid, phenolic và tăng

hoạt tính chống oxy hóa. Che sáng làm giảm flavonoid, ngược lại ánh sáng cường độ cao nâng hàm lượng hợp chất thứ cấp.

1.4. Phương pháp sử dụng trong chế biến bột lá lúa

1.4.1. Dung môi sử dụng trong chiết xuất

Chiết xuất bằng dung môi là phương pháp phổ biến để thu nhận hợp chất chống oxy hóa từ thực vật. Dung môi lý tưởng cần an toàn, dễ bay hơi, không gây phân hủy hoạt chất. Etanol và nước được sử dụng nhiều nhờ tính an toàn và khả năng hòa tan tốt flavonoid, polyphenol. Lựa chọn loại dung môi, nồng độ và điều kiện tối ưu là yếu tố quyết định chất lượng sinh học dịch chiết.

1.4.2. Phương pháp bất hoạt enzyme

Bất hoạt enzyme, đặc biệt là polyphenol oxidase (PPO), giúp ngăn oxy hóa, giữ màu xanh lá và bảo tồn hợp chất sinh học. Các phương pháp gồm chần nhiệt, vi sóng, siêu âm hoặc kết hợp. Chần nhiệt có thể ức chế PPO nhưng đôi khi làm giảm chlorophyll. Kết hợp siêu âm với nhiệt độ kiểm soát cho hiệu quả cao hơn, vừa ức chế PPO, vừa bảo tồn tốt chlorophyll và polyphenol. Với lá lúa, cần nghiên cứu tối ưu hóa để giữ giá trị sinh học cao nhất.

1.4.3. Phương pháp sấy phun

Sấy phun là kỹ thuật phổ biến để tạo bột, giúp bảo tồn hợp chất sinh học, ổn định sản phẩm và dễ bảo quản. Maltodextrin (MD) thường dùng làm chất mang để bảo vệ polyphenol, flavonoid, anthocyanin khỏi oxy hóa. Hiệu quả sấy phụ thuộc nhiệt độ, áp suất, tốc độ cấp liệu và nồng độ MD. Sấy phun được xem là phương pháp kinh tế, hiệu quả để sản xuất bột lá lúa non có chất lượng cao.

1.5. Vi sinh vật đường ruột và ảnh hưởng của sản phẩm thực vật

Hệ vi sinh vật đường ruột (VSVĐR) gồm hàng nghìn tỷ vi khuẩn, chủ yếu thuộc Bacteroidetes và Firmicutes, đóng vai trò thiết yếu trong chuyển hóa dinh dưỡng, bảo vệ niêm mạc ruột, cân bằng năng lượng và điều

hòa miễn dịch. VSVĐR sản xuất axit béo chuỗi ngắn (SCFA) như acetate, propionate, butyrate – có lợi cho sức khỏe đường ruột, phòng béo phì và ung thư đại tràng.

Các hợp chất thực vật, đặc biệt polyphenol, tác động tích cực đến VSVĐR bao gồm tăng vi khuẩn có lợi (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*), kích thích sản xuất SCFA, ức chế vi khuẩn gây bệnh, cải thiện đa dạng vi sinh, điều chỉnh tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes*, tương tác hai chiều (vi khuẩn chuyển hóa polyphenol thành chất hoạt tính sinh học, đồng thời polyphenol điều chỉnh cấu trúc VSVĐR). Nhờ cơ chế này, chiết xuất thực vật có tiềm năng hỗ trợ sức khỏe tiêu hóa, giảm rối loạn chuyển hóa và tăng cường miễn dịch.

1.6. Các thử nghiệm đánh giá hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa của hợp chất sinh học được đánh giá in vitro dựa trên cơ chế chuyển electron đơn (SET) với các thử nghiệm phổ biến gồm DPPH, ABTS (TEAC), FRAP và RP – đều đo sự thay đổi màu sắc khi chất chống oxy hóa khử chất nền.

+ DPPH: Đo khả năng nhứt gốc tự do DPPH, giảm màu tím tại 517 nm, phản ánh trực tiếp năng lực chống oxy hóa.

+ ABTS: Đo khả năng khử gốc cation ABTS^{•+} màu xanh lam tại 734 nm, kết quả quy đổi tương đương Trolox (TEAC).

+ FRAP: Đo năng lực khử phức Fe³⁺–TPTZ thành Fe²⁺–TPTZ màu xanh đậm tại 593 nm.

+ RP (Reducing Power): Đo khả năng khử Fe³⁺ thành Fe²⁺ tạo phức Prussian Blue đo tại 700 nm.

Kết hợp nhiều phép thử SET giúp đánh giá toàn diện khả năng trung hòa gốc tự do và năng lực khử kim loại của bột lá lúa non (BLL), làm rõ vai trò của polyphenol, flavonoid và chlorophyll.

1.7. Vi sinh vật gây bệnh sử dụng trong đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm

Pseudomonas aeruginosa: Vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, gây nhiễm trùng vết bỏng, phổi, máu và tiết niệu, kháng nhiều loại kháng sinh, là mối đe dọa lớn trong bệnh viện.

Staphylococcus aureus: Vi khuẩn Gram dương, gây nhiễm trùng da, huyết, phổi, tim mạch và ngộ độc thực phẩm; đặc biệt nguy hiểm với các chủng kháng methicillin (MRSA).

Escherichia coli: Vi khuẩn Gram âm thường trú đường ruột nhưng có thể gây viêm ruột, tiết niệu, nhiễm trùng huyết; nhiều chủng có độc lực cao và kháng kháng sinh.

Candida albicans: Nấm men cơ hội cư trú trên da và niêm mạc, gây viêm da, viêm niêm mạc, nhiễm nấm toàn thân ở người suy giảm miễn dịch, khó điều trị do kháng thuốc.

1.8. Các nghiên cứu trong và ngoài nước về hoạt tính sinh học của lá lúa

1.8.1. Nghiên cứu ngoài nước

Đánh giá thành phần hợp chất sinh học (polyphenol, anthocyanin, acid phenolic, acid béo dễ bay hơi) ở các giống lúa khác nhau và các giai đoạn sinh trưởng.

Một số nghiên cứu chứng minh khả năng bảo vệ DNA, chống viêm, chống ung thư, hỗ trợ kiểm soát béo phì và tiểu đường, nhưng chưa có nghiên cứu về sản phẩm bột lá lúa hay ảnh hưởng lên hệ vi sinh đường ruột.

1.8.2. Nghiên cứu trong nước

Chưa có nghiên cứu trực tiếp về lá lúa, nhưng nhiều nghiên cứu tương tự đã tối ưu chiết xuất, sấy phun và đánh giá chống oxy hóa, kháng khuẩn từ thực vật khác (gạo mầm, gạo lứt, lá dứa, cây nhàu, rau càng cua). Kỹ thuật sấy phun, lựa chọn dung môi, chất mang và điều kiện chế biến tối ưu giúp bảo tồn polyphenol, chlorophyll và hoạt tính sinh học trong sản phẩm dạng bột.

Tóm lại, BLL có tiềm năng chống oxy hóa, kháng khuẩn và bảo vệ sức khỏe nhờ giàu polyphenol, flavonoid và chlorophyll. Các thử nghiệm in

vitro (DPPH, ABTS, FRAP, RP) là phù hợp để đánh giá hoạt tính. Việc nghiên cứu thêm về BLL, đặc biệt sản phẩm dạng bột và ảnh hưởng lên vi sinh vật đường ruột, là hướng đi mới cần thiết.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu: Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ KH&CN Cần Thơ và Đại học Y Dược Cần Thơ.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa: 6 giống gồm IR50404 (cao sản), Nàng Thơm, Tài Nguyên, Hương Lài (lúa thơm), Nếp Tím và Huyết Rồng (lúa màu). Các giống đáp ứng tiêu chí kháng bệnh tốt, thích nghi nhiều loại đất, sinh khối lá cao, giàu hợp chất sinh học.

Chủng vi sinh vật: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và nấm *Candida albicans* (ATCC chuẩn).

Động vật thí nghiệm: Chuột BALB/c 8 tuần tuổi, khỏe mạnh.

Đất và nước: Đất phù sa (0–20 cm) tại Cần Thơ, nước máy sạch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ thí nghiệm chung

Thí nghiệm gồm các bước: trồng – thu hoạch lá – xử lý mẫu – phân tích hóa sinh – sản xuất bột – đánh giá hoạt tính sinh học.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1 khảo sát ảnh hưởng của giống lúa (6 giống), giai đoạn sinh trưởng (1–6 tuần) và điều kiện ánh sáng (tự nhiên, che 1 lớp và che 2 lớp) đến hàm lượng chlorophyll, polyphenol, xơ tan, hoạt tính chống oxy hóa (DPPH) và thành phần hợp chất sinh học phân tích bằng GC-MS.

Thí nghiệm 2 tối ưu quy trình sản xuất bột lá lúa non với bốn bước: bất hoạt enzyme bằng chần, vi sóng, siêu âm ở các mức thời gian khác nhau; chiết xuất bằng ethanol với nồng độ 0–80% và tỷ lệ dung môi/lá 5:1–15:1;

sấy phun ở 110–160 °C so sánh với sấy đông khô; và bảo quản bột ở nhiệt độ phòng, 5 °C và –18 °C trong 6 tháng. Các chỉ tiêu đánh giá gồm chlorophyll, polyphenol, flavonoid, xơ tan và khả năng chống oxy hóa.

Thí nghiệm 3 đánh giá hoạt tính sinh học của bột lá lúa non, gồm

- Hoạt tính chống oxy hóa qua các phép thử DPPH, ABTS, FRAP, RP (so sánh với vitamin C);
- Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm thông qua phương pháp khuếch tán trên thạch và xác định MIC
- Tác động của BLL đến hệ vi sinh đường ruột chuột (16S rRNA). Thí nghiệm trên 45 chuột BALB/c (8 tuần tuổi) chia 3 nhóm: đối chứng, BLL150 và BLL300 (150–300 mg/kg/ngày) trong 14 ngày. Chuột được uống BLL pha nước cất bằng bơm dạ dày, liều hiệu chỉnh theo cân nặng. Phân tươi thu buổi sáng, gộp theo nhóm, bảo quản –80 °C để phân tích LAB, vi khuẩn hiếu khí và hệ vi sinh (16S rRNA). Đồng thời đo tăng trọng, xét nghiệm huyết học và mô học ruột non.

2.3. Các phương pháp phân tích

2.3.1. Ly trích dịch lá lúa: Chiết bằng ethanol 80%, lọc qua Whatman số 4, cô quay dưới 45 °C, bảo quản –18 °C.

2.3.2. Phân tích chlorophyll: Trích ethanol 80%, đo quang phổ UV-Vis tại 645 nm và 663 nm, tính chlorophyll tổng, a, b.

2.3.3. Phân tích polyphenol tổng: Dùng phương pháp Folin–Ciocalteu, đo hấp thụ 750 nm, biểu thị mg GAE/g tươi.

2.3.4. Phân tích flavonoid tổng: Dùng NaNO₂, AlCl₃, NaOH, đo quang phổ 510 nm, tính theo quercetin tương đương (QE).

2.3.5. Phân tích xơ tan: Kết tủa bằng ethanol lạnh, ly tâm, sấy khô, cân phần cặn.

2.3.6. Xác định hoạt tính enzyme PPO: Dùng pyrocatechol, đo hấp thụ 420 nm, tính hoạt độ enzyme IU.

- 2.3.7. Phân tích DPPH: Phản ứng với dung dịch DPPH 0,15 mM, đo hấp thụ 517 nm, tính % ức chế và IC_{50} .
- 2.3.8. Phân tích ABTS: Chuẩn hóa dung dịch ABTS^{•+}, phản ứng 6 phút, đo hấp thụ 734 nm, tính % ức chế và IC_{50} .
- 2.3.9. Phân tích năng lực khử (RP): Dùng $K_3Fe(CN)_6$, đo hấp thụ 700 nm, biểu thị IC_{50} (Reducing Power).
- 2.3.10. Phân tích FRAP: Thuốc thử FRAP (TPTZ + $FeCl_3$), ủ 37 °C, đo hấp thụ 593 nm, xác định IC_{50} .
- 2.3.11. Phân tích thành phần hợp chất GC-MS/MS: Sử dụng hệ Agilent 7890B–7000C, so phổ với thư viện NIST-MS và Wiley.
- 2.3.12. Phân tích catechin bằng HPLC: Hệ Alliance E2695, cột C18, phát hiện tại 280 nm, định danh catechin, EGCG, ECG.
- 2.3.13. Khuếch tán giếng thạch: Ủ vi sinh trên LB/SD agar, nhỏ dịch chiết, đo vòng ức chế IZ.
- 2.3.14. Xác định MIC: Pha loãng dịch chiết trong LB/SD broth, đo OD_{600/530} nm, ghi nhận nồng độ ức chế tối thiểu.
- 2.3.15. Xác định mật số LAB/vi khuẩn hiếu khí: Nuôi trên MRS + $CaCO_3$ agar và LB agar, đếm CFU, biểu thị $\log_{10}$ CFU/mL.
- 2.3.16. Môi trường nuôi cấy: MRS agar cho LAB, LB agar cho vi khuẩn hiếu khí, SD agar cho nấm *C. albicans*.
- 2.3.17. Xét nghiệm huyết học: Thu máu chọc tim, chống đông EDTA, phân tích RBC, WBC, PLT, Hb, HCT, MCV, MCH, RDW.
- 2.3.18. Phân tích mô học ruột non: Cố định paraformaldehyde 4%, khử nước, đúc paraffin, cắt 5 μ m, nhuộm H&E, quan sát kính hiển vi.
- 2.3.19. Giải trình tự gen 16S rRNA: Chiết DNA bằng QIAamp kit, PCR vùng V3–V4, giải trình tự Illumina MiSeq, xử lý QIIME2, phân loại SILVA, dự đoán chức năng PICRUST2.

2.3.20. Phương pháp xử lý số liệu: Dữ liệu được xử lý trên Excel, ANOVA và Duncan ($p < 0,05$) bằng Statgraphics, phân tích PCA, phân cụm và tương quan Spearman bằng XLSTAT.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa non

3.1.1. Hàm lượng chlorophyll tổng

Hàm lượng chlorophyll tăng dần từ tuần 1 đến tuần 5 rồi giảm nhẹ ở tuần 6. Giống HRO đạt đỉnh ở tuần 4, trong khi HLA cao nhất ở tuần 3 và các giống NTI, IR504, TNG đạt cao nhất ở tuần 5. Không che sáng hoặc che một lớp lưới duy trì chlorophyll cao hơn so với che hai lớp ($p < 0,05$). Giống HLA, IR504, NTI nổi bật hơn HRO, NTH, TNG. Thời điểm tối ưu thu hoạch là tuần 4–5, không che sáng.

3.1.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b

Tỷ lệ chlorophyll a/b thay đổi theo giống và giai đoạn, HRO cao nhất ở tuần 2, HLA thấp nhất. Không có khác biệt rõ giữa các mức che sáng, nhưng HRO và TNG thường có tỷ lệ cao hơn NTI. Che hai lớp lưới cho tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là không che sáng, thấp nhất là che một lớp.

3.1.3. Hàm lượng polyphenol tổng

Polyphenol tăng từ tuần 1 đến tuần 5 rồi giảm nhẹ tuần 6. IR504 có giá trị cao nhất, tiếp theo là TNG và NTH. Ánh sáng đầy đủ kích thích tích lũy polyphenol, trong khi che sáng làm giảm đáng kể. IR504 và NTH nổi bật nhất ở điều kiện không che sáng.

3.1.4. Hàm lượng xơ tan

Xơ tan tăng mạnh đến tuần 4 rồi ổn định. Khác với chlorophyll và polyphenol, che sáng hai lớp lưới giúp tích lũy xơ tan cao nhất. HRO, NTH, NTI phản ứng mạnh với che sáng, còn TNG ít biến động.

3.1.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính chống oxy hoá đạt đỉnh ở tuần 5 rồi giảm sau đó. IR504 và HRO có giá trị cao nhất. Không che sáng giúp tăng DPPH rõ rệt ($p < 0,05$), trong khi che hai lớp lưới làm giảm mạnh, HLA thấp nhất.

3.1.6. Môi tương quan hợp chất – hoạt tính chống oxy hoá

Polyphenol có mối tương quan mạnh với hoạt tính DPPH, trong khi chlorophyll tổng cũng liên quan đến cả polyphenol và DPPH. Ngược lại, xơ tan và tỷ lệ a/b không có tương quan đáng kể. Phân tích cụm cho thấy polyphenol gắn chặt với DPPH, còn chlorophyll liên kết với tỷ lệ a/b.

3.1.7. Đánh giá chung

Giai đoạn sinh trưởng và ánh sáng ảnh hưởng rõ rệt đến hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hoá. Tuần 5, không che sáng là tối ưu để thu hoạch lá lúa non giàu chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá, đặc biệt giống IR504. Ánh sáng mạnh kích thích polyphenol, còn che sáng nhẹ giúp tăng xơ tan.

3.1.2. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non

Phân tích GC-MS trên sáu giống lúa ở tuần 1, 3 và 5 cho thấy sự biến đổi rõ rệt về thành phần hợp chất. Giai đoạn tuần 1 ưu thế monoterpenoid, este axit béo và phenol, phản ánh hoạt động chuyển hóa khởi đầu. Tuần 3 tăng cường meroterpenoid, steroid, amin axit béo và hydrocarbon mạch thẳng – đại diện cho pha trung gian. Tuần 5 đa dạng hóa mạnh với benzaldehyde, nitrile béo, triterpenoid, hợp chất dị vòng và các dẫn xuất axit béo, thể hiện giai đoạn hoàn thiện sinh lý.

Theo giống, IR504 và HRO duy trì diterpenoid, este phthalate và steroid xuyên suốt, nhưng tuần 5 xuất hiện thêm nhiều hợp chất đặc trưng. TNG và NTH gia tăng meroterpenoid, steroid và hợp chất dị vòng ở giai đoạn muộn. NTI và HLA thể hiện sự phong phú hợp chất ở tuần 5 với benzaldehyde, hydrocarbon vòng, amin béo và triterpenoid.

Tóm lại, quá trình sinh trưởng ảnh hưởng mạnh đến sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp trong lá lúa, với tuần 1 đặc trưng giai đoạn khởi phát, tuần 3 pha trung gian và tuần 5 giai đoạn hoàn thiện có sự đa dạng hợp chất cao nhất.

3.1.2.2. Ảnh hưởng điều kiện ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa

Phân tích GC-MS ở tuần thứ 5 cho thấy ánh sáng định hình rõ rệt mô hình chuyển hóa hợp chất trong lá lúa. Dưới điều kiện không che sáng, các giống IR504, HLA, HRO, NTH, TNG và NTI tập trung sinh tổng hợp diterpenoid, phenol, steroid, meroterpenoid, este phthalate, rượu béo, aldehyde béo, nitrile béo và hợp chất dị vòng – nhóm hợp chất giàu hoạt tính sinh học. Ngược lại, che sáng hai lớp lưới thúc đẩy tổng hợp lipid và các chất trung gian như este, amide axit béo, hydrocarbon thẳng, triterpenoid, terpene ketone và alkaloid.

Phân tích CA và dendrogram cho thấy mẫu không che sáng phân cụm riêng biệt, đồng nhất hơn về thành phần hợp chất, trong khi mẫu che sáng phân tán và hình thành nhóm riêng, phản ánh đặc điểm chuyển hóa thích nghi với thiếu ánh sáng.

Tóm lại, ánh sáng mạnh kích thích sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, trong khi che sáng thúc đẩy con đường chuyển hóa lipid và hợp chất thích nghi.

3.1.2.3. Đánh giá ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non

Phân tích GC-MS cho thấy thời gian sinh trưởng và ánh sáng là hai yếu tố then chốt chi phối thành phần hợp chất thứ cấp. Theo thời gian, từ tuần 1 đến tuần 5, lá lúa đa dạng hóa hợp chất, phản ánh nhu cầu trao đổi chất tăng khi cây phát triển. Về ánh sáng, không che sáng duy trì sự đa dạng hợp chất, trong khi che sáng thúc đẩy tích lũy các nhóm chất đặc thù nhằm

thích nghi với môi trường thiếu ánh sáng. Dựa trên kết quả này, nghiên cứu đề xuất hai con đường chuyển hóa chính:

*** Con đường chuyển hóa chlorophyll – phytol theo thời gian sinh trưởng**

Phytol, thành phần cấu trúc cốt lõi của chlorophyll, xuất hiện nhiều ở cả ba giai đoạn sinh trưởng. Khi chlorophyll bị thủy phân, phytol được tái sử dụng để tổng hợp vitamin E và este axit béo, đồng thời hỗ trợ tái phân bố dinh dưỡng và tránh tích lũy sản phẩm trung gian độc hại. Quá trình này đảm bảo duy trì quang hợp, phát triển lá và chồi, đồng thời cung cấp tiền chất cho các hợp chất thứ cấp quan trọng như tocopherol, góp phần bảo vệ tế bào và tối ưu hóa hiệu suất sinh trưởng.

*** Sự khác biệt chuyển hóa theo điều kiện che sáng**

Dưới ánh sáng đầy đủ, lá lúa tăng cường tổng hợp diterpenoid, steroid, phytosterol và vitamin E – các hợp chất chống oxy hóa hỗ trợ quang hợp và bảo vệ màng tế bào. Ngược lại, che sáng hai lớp lưới làm giảm hiệu suất quang hợp, khiến cây ưu tiên tích lũy este axit béo, triterpenoid và brassinosteroid để điều chỉnh thành phần lipid màng và thích nghi với điều kiện ánh sáng yếu. Đồng thời, brassinosteroid và auxin được tăng cường, thúc đẩy kéo dài thân lá nhằm tăng khả năng bắt sáng.

3.2. Khảo sát các điều kiện tối ưu trong sản xuất bột lá lúa non

3.2.1. Phương pháp bất hoạt enzyme polyphenol oxidase

3.2.1.1. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất chlorophyll

Tỷ lệ mất chlorophyll phụ thuộc phương pháp và thời gian xử lý. Chần nhiệt gây tổn thất thấp nhất (khoảng 5–10%), vi sóng làm mất nhiều hơn (7–18%), còn siêu âm cao nhất, lên đến 20% sau thời gian dài. Chần nhiệt hiệu quả hơn vi sóng và siêu âm.

3.2.1.2. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất polyphenol

Chần nhiệt làm mất polyphenol cao hơn các phương pháp khác (3–15%), trong khi vi sóng thấp nhất (<7%) và siêu âm chỉ tăng đáng kể sau 25

phút. Thống kê cho thấy chân nhiệt gây tổn thất nhiều hơn, nhưng không khác biệt đáng kể so với vi sóng dài hay siêu âm kéo dài.

3.2.1.3. Ảnh hưởng xử lý lên ức chế enzyme PPO

Chân nhiệt bất hoạt PPO nhanh và hiệu quả nhất (>80%), vi sóng đạt mức trung bình (~30–42%), còn siêu âm thấp nhất (~20–35%).

3.2.1.4. Đánh giá tổng hợp

Chân nhiệt tuy làm mất một phần chlorophyll và polyphenol cao hơn vi sóng và siêu âm, nhưng hiệu quả bất hoạt PPO vượt trội, giúp ngăn quá trình oxy hóa, bảo toàn dưỡng chất trong các giai đoạn chế biến tiếp theo. Kết hợp với khả năng thanh trùng và loại bỏ tạp chất, chân nhiệt ở 100°C trong 4 phút được xác định là tối ưu, đạt trên 80% bất hoạt PPO, đồng thời giữ mức tổn thất chlorophyll và polyphenol thấp nhất trong toàn bộ quy trình.

3.2.2. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ etanol đến chiết xuất các hợp chất trong lá lúa non

3.2.2.1. Ảnh hưởng đến chiết xuất chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll tổng tăng khi nồng độ etanol tăng, đạt cao nhất ở 60–80% với sự khác biệt có ý nghĩa so với các nồng độ khác ($p < 0,05$). Về tỷ lệ dung môi:lá, mức 5:1 cho hiệu suất thấp nhất, trong khi 10:1 và 15:1 đạt giá trị cao và ổn định, không khác biệt đáng kể trong cùng điều kiện ($p > 0,05$). Tỷ lệ 10:1 được xác định tối ưu, đạt hàm lượng chlorophyll khoảng 1310–1340 $\mu\text{g/g}$ ở nồng độ 60–80% etanol.

3.2.2.2. Ảnh hưởng đến chiết xuất polyphenol

Etanol chiết xuất polyphenol hiệu quả hơn nước ($p < 0,05$). Ở tỷ lệ 5:1, polyphenol giảm nhẹ từ 20–60% rồi tăng ở 80%, trong khi tỷ lệ 10:1 và 15:1 tăng từ 20–60% rồi giảm nhẹ ở 80%. Polyphenol cao nhất đạt tại etanol 60% với tỷ lệ 10:1, tương đương 15:1 nhưng tiết kiệm dung môi hơn.

3.2.2.3. Đánh giá chung

Etanol 60–80% tối ưu cho chiết xuất chlorophyll và polyphenol, trong đó chlorophyll cao nhất ở 80%, polyphenol ở 60%. Tỷ lệ dung môi:lá

10:1 cho hiệu suất chiết tốt và tiết kiệm dung môi, phù hợp hơn 5:1 (quá đặc) và không kém hiệu quả so với 15:1. Hiệu quả chiết xuất phụ thuộc độ phân cực dung môi và đặc tính nguyên liệu; do đó, cần bổ sung khảo sát nhiệt độ và thời gian để tối ưu hóa quá trình.

3.2.3. Ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến chất lượng bột lá lúa non

3.2.3.1. Ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính DPPH

Nhiệt độ sấy phun cao làm giảm đáng kể chlorophyll, polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hóa. Ở 120–130°C, các chỉ số này duy trì tốt hơn, nhưng giảm mạnh khi tăng lên 140–160°C. Polyphenol và flavonoid cao nhất ở 120°C, thấp hơn sấy đông khô nhưng vẫn vượt trội so với các mức nhiệt cao hơn. Hoạt tính DPPH giảm dần theo nhiệt độ, cao nhất ở sấy đông khô, sau đó là 120°C. Hàm lượng xơ tan không bị ảnh hưởng đáng kể giữa các điều kiện.

3.2.3.2. Tương quan giữa các hợp chất và hoạt tính DPPH

Phân tích Spearman cho thấy polyphenol và flavonoid tương quan chặt với hoạt tính DPPH, tiếp theo là chlorophyll tổng và chlorophyll b; chlorophyll a có tương quan thấp hơn, còn xơ tan không liên quan. Phân tích cụm xác nhận polyphenol và DPPH có mức liên kết cao nhất, phù hợp với vai trò chính của chúng trong khả năng khử gốc tự do.

3.2.3.3. Đánh giá chung

Sấy phun trên 140°C gây suy giảm hợp chất sinh học do phân hủy nhiệt và phản ứng oxy hóa. Ở 120°C, bột lá lúa non giữ được nhiều chlorophyll, polyphenol, flavonoid và hoạt tính DPPH cao nhất so với các mức nhiệt khác. Sấy phun 120°C được xem là tối ưu, cân bằng giữa chất lượng, hiệu suất và chi phí, phù hợp cho sản xuất quy mô công nghiệp hơn sấy đông khô.

3.2.4. Phân tích chất lượng bột lá lúa non theo tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm

BLL không phát hiện vi sinh vật gây bệnh (*E. coli*, *Coliforms*, *Bacillus cereus*) và nấm mốc, tổng vi sinh vật hiếu khí ở mức thấp ($2,2 \times 10^3$ CFU/g). Hàm lượng kim loại nặng (As, Hg, Pb, Cd, Zn) và độc tố aflatoxin đều dưới ngưỡng phát hiện, đáp ứng tiêu chuẩn an toàn thực phẩm theo Quyết định 46/2007/QĐ-BYT.

3.2.5. Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian bảo quản đến chất lượng BLL

3.2.5.1. Ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll tổng

Chlorophyll giảm dần trong 6 tháng bảo quản. Ở nhiệt độ phòng ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) suy giảm nhanh nhất, trong khi bảo quản lạnh 5°C tốt hơn và -18°C duy trì hàm lượng cao nhất với khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.5.2. Ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng

Polyphenol cũng giảm theo thời gian, mức giảm chậm nhất ở -18°C , tiếp theo là 5°C , và nhanh nhất ở nhiệt độ phòng. Sau 6 tháng, giá trị ở -18°C vẫn cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.5.3. Ảnh hưởng đến hàm lượng xơ tan

Xơ tan dao động nhẹ ($500\text{--}545$ mg/g) và không khác biệt ý nghĩa giữa các điều kiện bảo quản ($p > 0,05$).

3.2.5.4. Ảnh hưởng đến hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính DPPH giảm dần trong 6 tháng, nhưng được duy trì tốt hơn ở 5°C và -18°C , trong khi nhiệt độ phòng làm giảm nhanh nhất.

3.2.5.5. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản

Nhiệt độ cao thúc đẩy phân hủy chlorophyll (tạo pheophytin) và oxy hóa polyphenol, làm suy giảm hoạt tính chống oxy hóa. Bảo quản lạnh, đặc biệt -18°C , hạn chế phản ứng enzyme còn sót lại, duy trì tốt hơn các hợp chất sinh học và hoạt tính sinh học. Vì vậy, nhiệt độ 5°C và -18°C là điều kiện bảo quản thích hợp nhất, giúp giữ ổn định chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của BLL trong thời gian dài.

Tóm lại, quá trình sản xuất BLL được đề xuất bao gồm: thu hoạch lá lúa giống IR50404, chần trong 4 phút, chiết bằng dung môi etanol 60%

với tỷ lệ DM:LL 10:1, sấy phun ở 120°C sử dụng MD 10% và bảo quản ở 5°C hoặc -18°C, nhằm tối ưu hóa chất lượng sản phẩm.

3.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của bột lá lúa non

3.3.1. Phân tích HPLC xác định nhóm chất catechin

Kết quả HPLC cho thấy BLL chứa ba hợp chất polyphenol chính thuộc nhóm catechin: Catechin (1,23 mg/L), Epigallocatechin gallate – EGCG (0,90 mg/L) và Epicatechin gallate – ECG (2,59 mg/L). Đây là các flavanol có hoạt tính sinh học đa dạng, được ứng dụng trong thực phẩm chức năng, y học và mỹ phẩm nhờ khả năng bảo vệ da và tế bào khỏi stress oxy hóa.

3.3.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa của BLL

Hàm lượng chlorophyll và polyphenol trong BLL tăng theo nồng độ, cao nhất ở 10% (w/v), trong khi xơ tan biến động không ý nghĩa. BLL có khả năng khử gốc tự do (DPPH, ABTS) và khả năng khử sắt (FRAP, RP) nhưng hiệu lực thấp hơn nhiều so với vitamin C. Kết quả cho thấy BLL có tiềm năng chống oxy hóa, chủ yếu nhờ chlorophyll và polyphenol, nhưng hoạt tính yếu hơn các chất chuẩn mạnh.

3.3.3. Phân tích mối tương quan giữa thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa

Phân tích Spearman cho thấy polyphenol tương quan rất mạnh với hoạt tính chống oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP, RP), tương tự chlorophyll. Ngược lại, xơ tan chỉ có tương quan yếu, không đóng vai trò chính trong cơ chế khử gốc tự do. Phân tích cụm khẳng định polyphenol và chlorophyll là hai nhóm hợp chất chính quyết định khả năng chống oxy hóa của BLL.

3.3.4. Đánh giá khả năng chống oxy hóa của BLL

BLL chứa catechin và dẫn xuất, góp phần trung hòa gốc tự do, khử ion kim loại và bảo vệ tế bào. Mặc dù hoạt tính chống oxy hóa của BLL thấp hơn nhiều loại bột thực vật giàu phenolic khác, kết quả vẫn chứng minh BLL có tiềm năng ứng dụng như nguồn hỗ trợ chống oxy hóa tự nhiên. Nghiên

cứu này là cơ sở để phát triển BLL thành nguyên liệu cho thực phẩm chức năng và sản phẩm bảo vệ sức khỏe, đặc biệt khi kết hợp với các nguồn chất chống oxy hóa mạnh hơn.

3.4. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của bột lá lúa non

3.4.1. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn đối với *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* và kháng nấm *C. albicans*

BLL được thử nghiệm ở các nồng độ 500–8.000 µg/mL bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và xác định MIC. Kết quả cho thấy BLL có hoạt tính kháng khuẩn phụ thuộc nồng độ, mạnh nhất trên *S. aureus* (ZI tối đa 21,33 mm), tiếp đến *E. coli* (20,24 mm) và *P. aeruginosa* (19,33 mm), trong khi kháng nấm *C. albicans* rất yếu ($ZI \leq 5$ mm). MIC dao động từ 3,9–4,8 mg/mL đối với vi khuẩn và > 8 mg/mL đối với *C. albicans*, thấp hơn nhiều so với Ampicillin/Metronidazole ($MIC < 100$ µg/mL). Điều này cho thấy BLL chỉ có khả năng ức chế nhẹ vi khuẩn và hầu như không hiệu quả trên nấm men.

3.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của BLL

BLL đạt mức kháng khuẩn trung bình–mạnh trên vi khuẩn Gram dương và Gram âm khi tăng nồng độ ≥ 2.000 µg/mL, nhưng không đáng kể trên *C. albicans*. Sự nhạy cảm cao hơn của *S. aureus* có thể do cấu trúc Gram dương dễ thấm hợp chất phenolic. Catechin (EGCG, ECG) trong BLL đóng vai trò chính trong ức chế vi khuẩn qua cơ chế phá vỡ màng và ức chế enzyme nội bào, nhưng hiệu quả bị hạn chế do cần nồng độ cao. Việc sấy phun và sử dụng maltodextrin có thể làm giảm hàm lượng và khả năng khuếch tán hoạt chất, dẫn đến MIC cao.

Nhìn chung, BLL chỉ có tác dụng kìm hãm nhẹ vi sinh vật, đặc biệt trên *S. aureus* và *E. coli*, nhưng không phải tác nhân kháng khuẩn mạnh. Để tăng hiệu lực, cần tối ưu chiết tách, giảm tỷ lệ chất mang và kết hợp với các chất tăng thấm màng hoặc hoạt chất kháng khuẩn mạnh hơn nhằm ứng dụng trong bảo quản thực phẩm hoặc hỗ trợ điều trị.

3.5. Tác động tiêu thụ bột lá lúa lên hệ vi sinh vật đường ruột ở chuột

3.5.1. Khảo sát ảnh hưởng của bột lá lúa lên hệ vi sinh vật đường ruột

3.5.1.1. Chỉ số huyết học

Sau 14 ngày bổ sung BLL, chuột ở cả hai liều 150 mg/kg (PC150) và 300 mg/kg (PC300) ghi nhận sự tăng RBC, WBC và PLT có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (PCDC), gợi ý BLL hỗ trợ nhẹ quá trình tạo máu và điều hòa miễn dịch. Đặc biệt, WBC và các phân nhóm bạch cầu (NEU, LYM, MON, EOS) tăng rõ ở PC300, cho thấy liều cao kích hoạt đồng thời miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích nghi. Ngược lại, HGB, HCT, MCV và MCH giảm nhẹ nhưng vẫn trong giới hạn sinh lý, không gây thiếu máu hay rối loạn chức năng vận chuyển oxy. Kết quả này chứng minh BLL an toàn trên hệ huyết học, đồng thời có khả năng điều hòa miễn dịch nhẹ mà không gây viêm bất thường.

3.5.1.2. Mô học ruột non

Quan sát mô học ruột non nhuộm H&E cho thấy cấu trúc biểu mô ở tất cả nhóm đều nguyên vẹn, nhung mao đều, không phát hiện dấu hiệu viêm, hoại tử hay mất biểu mô. Chiều dài nhung mao và mật độ tế bào tiết nhầy không khác biệt đáng kể giữa các nhóm. Điều này chứng minh BLL không gây tổn thương hàng rào niêm mạc ruột và đạt tiêu chuẩn an toàn khi sử dụng dài hạn.

3.5.1.3. Trọng lượng cơ thể

Trong 14 ngày thí nghiệm, nhóm PC150 tăng trọng ít hơn đối chứng (1,5 g so với 2,0 g), gợi ý có tác dụng hỗ trợ kiểm soát cân nặng. Ngược lại, nhóm PC300 tăng trọng đáng kể (3,2 g, $p < 0,05$), cho thấy liều cao thúc đẩy tăng trưởng. Hiện tượng này phụ thuộc liều và có thể liên quan đến sự thay đổi cấu trúc hệ vi sinh vật: PC150 ưu tiên lợi khuẩn kiểm soát hấp thu lipid, còn PC300 ưu tiên vi khuẩn sinh SCFA, tăng hấp thu năng lượng và dự trữ mỡ.

3.5.1.4. Mật số vi khuẩn LAB và AeB

Sau 14 ngày bổ sung BLL, nhóm đối chứng (PCDC) duy trì mật số AeB và LAB ở mức thấp. Ở liều 150 mg/kg (PC150), cả AeB và LAB đều tăng rõ rệt, đặc biệt LAB tăng gấp nhiều lần so với đối chứng ($p < 0,05$), chứng minh BLL có đặc tính prebiotic, cung cấp cơ chất lên men và tạo môi trường thuận lợi cho lợi khuẩn phát triển. LAB sản sinh SCFA (butyrate, acetate), giúp giảm pH ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh và củng cố hàng rào bảo vệ ruột. Ngược lại, liều 300 mg/kg (PC300) vẫn duy trì AeB cao nhưng LAB giảm so với PC150, dù vẫn cao hơn đối chứng, có thể do nồng độ polyphenol cao gây ức chế nhẹ một số chủng LAB hoặc làm pH ruột giảm quá mức. Hiện tượng “liều thấp tối ưu – liều cao kém hiệu quả” này đã được ghi nhận ở nhiều nghiên cứu prebiotic khác. Như vậy, 150 mg/kg là liều tối ưu để kích thích LAB, trong khi liều cao vẫn hiệu quả nhưng kém hơn cho nhóm vi khuẩn này, dù vẫn cải thiện AeB.

3.5.1.5. Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột

Phân tích 16S rRNA cho thấy BLL điều chỉnh đa dạng và cấu trúc hệ vi sinh vật ruột theo hướng phụ thuộc liều. Ở chỉ số đa dạng alpha, PC300 có Ace, Chao1 và Shannon cao nhất, phản ánh cộng đồng vi sinh phong phú và cân bằng hơn. Phân tích beta-diversity qua PCoA Bray-Curtis cho thấy PC300 phân tách rõ rệt so với đối chứng và PC150, chứng minh liều cao có tác động mạnh hơn lên cấu trúc cộng đồng vi sinh.

Về thành phần ở cấp ngành, PC300 tăng tỷ lệ *Firmicutes* – liên quan đến tăng hấp thu năng lượng – và *Desulfobacterota* – liên quan đến chuyển hóa lưu huỳnh, đồng thời giảm *Proteobacteria* và *Bacteroidota* – nhóm thường gắn với viêm và sản xuất SCFA ngắn hạn. Trong khi đó, PC150 tăng *Proteobacteria* gấp nhiều lần đối chứng, phản ánh xu hướng kiểm soát cân nặng nhưng có thể kèm nguy cơ viêm nhẹ. Ở cấp họ, PC300 ưu thế *Lachnospiraceae* – nhóm vi khuẩn sinh SCFA như acetate, thúc đẩy hấp thu năng lượng và tăng cân; còn PC150 ưu thế *Lactobacillaceae* – lợi khuẩn giúp giảm hấp thu lipid và kiểm soát trọng lượng, nhưng đi kèm tăng

Enterobacteriaceae – nhóm có thể gây viêm. Ở cấp chi, PC300 giàu *Lachnospiraceae* NK4A136 group, *Ruminococcus* và *Roseburia* – vi khuẩn sinh SCFA hỗ trợ tăng hấp thu năng lượng, cân bằng glucose và thúc đẩy tăng trưởng; ngược lại, PC150 ưu thế *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Enterococcus* – lợi khuẩn giúp điều hòa chuyển hóa lipid, cải thiện miễn dịch và giảm hấp thu chất béo. Như vậy, liều thấp 150 mg/kg ưu tiên *Lactobacillus* hỗ trợ kiểm soát trọng lượng, còn liều cao 300 mg/kg ưu tiên *Lachnospiraceae* – thúc đẩy hấp thu năng lượng và tăng cân.

3.5.1.6. Chức năng dự đoán của hệ vi sinh vật

Phân tích chức năng dự đoán (PICRUSt, KEGG KO, EC, MetaCyc) cho thấy sự khác biệt rõ rệt theo liều. Liều thấp PC150 tăng cường các con đường phân giải carbohydrate, lipid và lên men lactic, giúp tiêu hao năng lượng nhanh và kiểm soát cân nặng. Các enzyme oxy hóa chất béo như acyl-CoA oxidase và triacylglycerol lipase biểu hiện mạnh, thúc đẩy giảm tích lũy mỡ. Ngoài ra, các gen liên quan đến chuyển hóa catechin thành catechol tăng cao, giúp giảm hấp thu glucose và cải thiện chuyển hóa năng lượng. Ngược lại, liều cao PC300 ưu tiên tổng hợp axit amin chuỗi nhánh (L-isoleucine, L-valine), liên quan đến tăng sinh khối và dự trữ năng lượng, phù hợp với thành phần vi sinh vật giàu *Lachnospiraceae*, *Ruminococcus* và *Roseburia* – nhóm hỗ trợ hấp thu năng lượng, tăng hiệu suất chuyển hóa và thúc đẩy tăng trọng. Trong khi đó, nhóm đối chứng PCDC duy trì các con đường cơ bản về tổng hợp nucleotide và ổn định di truyền, phản ánh trạng thái cân bằng vi sinh nền chưa bị can thiệp.

Tóm lại, BLL an toàn trên mô hình chuột, không gây độc tính huyết học hay mô học. Liều 150 mg/kg tối ưu để kích thích LAB, *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, hỗ trợ miễn dịch và kiểm soát cân nặng thông qua tăng phân giải carbohydrate và lipid. Ngược lại, liều 300 mg/kg làm phong phú vi khuẩn sinh SCFA như *Lachnospiraceae* và *Ruminococcus*, tăng đa dạng vi sinh, thúc đẩy hấp thu năng lượng và tăng trưởng. Sự khác biệt này mở ra

khả năng ứng dụng BLL linh hoạt cho các mục tiêu kiểm soát cân nặng hoặc tăng trưởng, tùy thuộc vào liều bổ sung.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

Nghiên cứu đã chứng minh giá trị sinh học và tiềm năng ứng dụng của bột lá lúa (BLL) từ giống IR50404. Lá lúa thu hoạch ở tuần thứ 5, không che sáng, có hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, đồng thời cho hoạt tính chống oxy hóa mạnh. Quy trình chế biến tối ưu gồm chần ở 100 °C trong 4 phút, chiết bằng ethanol 60% (tỷ lệ 10:1) và sấy phun ở 120 °C giúp bảo toàn tốt hợp chất sinh học. Sản phẩm ổn định nhất khi bảo quản ở 5 °C hoặc -18 °C.

Về hoạt tính sinh học, BLL thể hiện khả năng chống oxy hóa mạnh (IC_{50} từ 36,67–80,9 mg/mL) và ức chế vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ở MIC 3939–4787 µg/mL; tác dụng kháng nấm *C. albicans* yếu (MIC > 8000 µg/mL). Phân tích thành phần cho thấy lá lúa tuần 5 giàu hợp chất hoạt tính, gợi ý cơ chế tái sử dụng phytol từ phân hủy chlorophyll để tổng hợp axit béo, vitamin E và chlorophyll mới, đồng thời điều chỉnh chuyển hóa thích nghi của cây.

BLL điều chỉnh hệ vi sinh vật ruột trên mô hình chuột theo liều. Liều 150 mg/kg tăng *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, đồng thời thúc đẩy biểu hiện gen phân giải glucose, lipid và chuyển hóa catechin thành catechol, hỗ trợ kiểm soát tăng trọng và tiêu hao năng lượng. Liều 300 mg/kg tăng *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Desulfovibrio*, thúc đẩy tổng hợp axit amin mạch nhánh và tăng tích lũy khối cơ. Kết quả khẳng định lựa chọn liều phù hợp quyết định hiệu quả dinh dưỡng và sinh lý.

Kiến nghị

Trên cơ sở các kết quả đạt được, bột cao chiết lá lúa có tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực thực phẩm chức năng, phụ gia chăn nuôi và khai

thác tài nguyên nông nghiệp bền vững. Tuy nhiên, một số khía cạnh vẫn cần được hoàn thiện và mở rộng trong các nghiên cứu tiếp theo.

Đối với quy trình thu nhận bột, cần bổ sung đánh giá hiệu suất thu hồi và các chỉ tiêu công nghệ như độ ẩm, kích thước hạt và độ hòa tan, nhằm hoàn thiện quy trình ở quy mô ứng dụng và bảo đảm tính ổn định của sản phẩm.

Trong nghiên cứu hoạt tính sinh học và lợi khuẩn, cần kéo dài thời gian can thiệp, bổ sung phân tích hệ vi sinh vật trước xử lý, và chuyển sang lấy mẫu phân đơn thay cho mẫu gộp để phản ánh biến thiên cá thể chính xác hơn. Đồng thời, nên kết hợp phân tích các chỉ số hóa sinh và chuyển hóa năng lượng nhằm đánh giá toàn diện tác động sinh lý của BLL.

Kết quả bước đầu cho thấy bổ sung BLL ở liều 300 mg/kg giúp cải thiện cấu trúc hệ vi sinh vật và tăng trọng ở chuột, gợi mở tiềm năng ứng dụng như một phụ gia prebiotic tự nhiên cho gia cầm và gia súc trong chăn nuôi. Tuy nhiên, để xác nhận tính ứng dụng thực tiễn, cần nghiên cứu bổ sung trên vật nuôi thực tế, đồng thời đánh giá các chỉ tiêu chuyển hóa năng lượng, hấp thu dinh dưỡng và hiệu suất tăng trưởng.

Những đóng góp mới của luận án

1. Xây dựng quy trình công nghệ thu nhận bột lá lúa non giàu hoạt tính sinh học, tối ưu hóa điều kiện thu hoạch và chế biến để bảo tồn hợp chất có lợi như polyphenol, flavonoid, chlorophyll.
2. Chứng minh hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non qua thử nghiệm *in-vitro* và trên mô hình chuột, khẳng định tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và hỗ trợ sức khỏe đường tiêu hóa.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Nguyen, Thi To Uyen**, Nguyen, Phu Tho, Nguyen, Thi Tho, Nguyen, Thi Phuong Thao, and Nguyen, Huu Thanh. (2024) Rice leaves or ricegrass-available biomaterial with potential biological activities for different industrial applications: a review. *Discover Food*. 4 (1), 106.

2. **Nguyen, Thi To Uyen**, Nguyen, Phu Tho, Nguyen, Thi Tho, Nguyen, Thi Phuong Thao, Dang, Chi Thien, and Nguyen, Huu Thanh. (2024) Phytochemical profile, antioxidant and antibacterial activities of the ethanolic rice (*Oryza sativa*) leaf extract. *Vegetos*. doi.org.10.1007/s42535-024-01142-5.

3. Nguyen, Phu Tho, **Nguyen, Thi To Uyen**, Nguyen, Thi Phuong Thao, and Nguyen, Huu Thanh. (2024) Bioactive compounds and their antioxidant activities in the ethanol extract from rice leaves (*Oryza sativa* L.) of different varieties. *Tropical Journal of Natural Product Research*. 8 (5), 7196–7200.

4. Nguyen, Phu Tho, **Nguyen, Thi To Uyen**, Nguyen, Thi Phuong Thao, Nguyen, Huu Thanh, Dang, Chi Thien, Pham, Minh Nhut, Nguyen, Thi Tho. (2024) Insights into the metabolism of rice leaves (*Oryza sativa* L.) under shade stress by investigating the metabolite profile using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. *Russian Journal of Plant Physiology*. 71 (4), 126.

5. **Thi-To-Uyen Nguyen**, Phu-Tho Nguyen, Minh-Nhut Pham, Thi-Phuong-Thao Nguyen, Thanh-Thai Tran, Huu-Thanh Nguyen, Thi-Tho Nguyen. (2025) Uncovering metabolite changes in rice leaves (*Oryza sativa*) during vegetative stages through GC-MS-based ethanolic extract analysis. *Agriculture and Natural Resources*. 59 (3), 590312.

6. **Nguyễn Thị Tố Uyên**, Nguyễn Phú Thọ, Nguyễn Hữu Thanh, Đặng Chí Thiện, and Nguyễn Thị Phương Thảo. (2022) Đánh giá sự thay đổi hàm lượng các hoạt chất sinh học và khả năng chống oxy hoá của bột lá lúa non (*Oryza sativa*) trong quá trình chế biến. *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*. 18 (5+6), 10–19.

7. **Nguyễn Thị Tố Uyên**, Nguyễn Phú Thọ, Nguyễn Hữu Thanh, Đặng Chí Thiện, and Nguyễn Thị Phương Thảo. (2024) Ảnh hưởng của điều kiện che sáng và thời điểm thu hoạch lá lên hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính kháng nấm *Candida* của dịch chiết lá lúa (*Oryza sativa* L.). *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*. 20 (4), 60–71.