

**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*)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

TP. HỒ CHÍ MINH – 2026

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 TỎ 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*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ



Nguyễn Thị Trung

Người hướng dẫn 1

A blue ink signature of TS. Nguyễn Hữu Thanh.

TS. Nguyễn Hữu
Thanh

Người hướng dẫn 2

A blue ink signature of PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo.

PGS.TS. Nguyễn Thị
Phương Thảo

TP. HỒ CHÍ MINH – 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "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*)" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của **TS. Nguyễn Hữu Thanh** và **PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo**. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 26 tháng 01 năm 2026

Tác giả luận án



Nguyễn Thị Tố Uyên

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc đến Thầy TS. Nguyễn Hữu Thanh và Cô PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo đã đồng hành, hướng dẫn và định hướng khoa học trong suốt quá trình thực hiện luận án này. Thầy và Cô không chỉ truyền đạt kiến thức chuyên môn sâu rộng, mà còn luôn theo sát, động viên và tạo động lực để tôi vượt qua những khó khăn trong suốt chặng đường nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo cùng Phòng Quản lý tổng hợp của Viện Khoa học Sự sống, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ nhiệt tình, tạo điều kiện thuận lợi về cơ sở vật chất và môi trường nghiên cứu trong suốt thời gian thực hiện luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban Giám hiệu, lãnh đạo các Khoa và tập thể giảng viên Học viện Khoa học và Công nghệ đã tận tình giảng dạy và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện.

Tôi xin cảm ơn đề tài cấp Sở Khoa học và Công nghệ TP. Cần Thơ “Xác định hoạt tính chống oxy hóa và kháng nấm của lúa non để làm thực phẩm chức năng và mỹ phẩm chăm sóc da” với đơn vị chủ trì là Trung tâm Ứng dụng Tiên bộ Khoa học và Công nghệ TP. Cần Thơ đã hỗ trợ một phần kinh phí cho các nghiên cứu trong luận án này.

Luận án được thực hiện dưới sự tài trợ của Chương trình học bổng thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.TS.145 và VINIF.2024.TS.044 và của Tập Đoàn Novatech (2025) cho nghiên cứu sinh có thành tích học tập và nghiên cứu xuất sắc. Sự hỗ trợ này có ý nghĩa rất lớn, giúp tôi có thêm điều kiện và động lực để theo đuổi hành trình học thuật một cách nghiêm túc và hiệu quả.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến gia đình, thầy cô, bạn bè và đồng nghiệp – những người đã luôn là điểm tựa tinh thần vững chắc, đồng hành và khích lệ tôi trên hành trình học thuật đầy thử thách nhưng cũng nhiều ý nghĩa này.

Xin chân thành cảm ơn!

TP. Hồ Chí Minh, ngày 26 tháng 01 năm 2026

Tác giả luận án



Nguyễn Thị Tố Uyên

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	viii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	x
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. Giới thiệu về cây lúa	4
1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và phân bố	4
1.1.2. Tình hình sản xuất, phân bố và đa dạng giống lúa tại Việt Nam	4
1.1.3. Đặc điểm sinh lý và giai đoạn sinh trưởng một số giống lúa ở Việt Nam	5
1.2. Thành phần dinh dưỡng và các hợp chất sinh học trong lá lúa non	7
1.2.1. Thành phần dinh dưỡng.....	7
1.2.2. Các hợp chất sinh học thực vật trong lá lúa	8
1.2.2.1. Chlorophyll	8
1.2.2.2. Các hợp chất polyphenol	9
1.3. Yếu tố ảnh hưởng đến các hợp chất sinh học trong lá lúa	10
1.3.1. Giống lúa	10
1.3.2. Giai đoạn sinh trưởng	11
1.3.3. Điều kiện ánh sáng	12
1.4. Phương pháp sử dụng trong chế biến bột lá lúa	13
1.4.1. Dung môi sử dụng trong chiết xuất	13
1.4.2. Phương pháp bất hoạt enzyme.....	14
1.4.3. Phương pháp sấy phun	15
1.5. Vi sinh vật đường ruột và ảnh hưởng của sản phẩm thực vật	16
1.6. Các phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hoá	18
1.6.1. Phương pháp quét gốc tự do DPPH.....	18
1.6.2. Phương pháp năng lực chống oxy hóa tương đương Trolox (ABTS)	18
1.6.3. Phương pháp năng lực khử sắt (FRAP).....	18
1.6.4. Phương pháp năng lực khử tổng số (Reducing Power – RP)	19
1.7. Vi sinh vật gây bệnh sử dụng trong đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật	19
1.7.1. Vi khuẩn <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
1.7.2. Vi khuẩn <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.7.3. Vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>	20

1.7.4. Nấm <i>Candida albicans</i>	21
1.8. Các nghiên cứu trong và ngoài nước về hoạt tính sinh học của lá lúa và sản phẩm từ lá lúa	21
1.8.1. Nghiên cứu ngoài nước	21
1.8.2. Nghiên cứu trong nước	24
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	26
2.1. Phương tiện nghiên cứu	26
2.1.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	26
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu	26
2.1.2.1. Giống lúa sử dụng trong nghiên cứu.....	26
2.1.2.2. Chủng vi sinh vật sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật.....	27
2.1.2.3. Động vật thí nghiệm	28
2.1.2.4. Đất và nước sử dụng trong thí nghiệm	28
2.1.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất.....	28
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	29
2.2.1. Sơ đồ thí nghiệm chung.....	29
2.2.2. Bố trí thí nghiệm.....	30
2.2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của giống lúa, điều kiện sinh trưởng và thời điểm thu hoạch đến hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng hợp chất trong lá lúa non.....	30
2.2.2.2. Khảo sát quy trình công nghệ thu nhận BLL.....	31
2.2.2.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá, kháng vi sinh vật và tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột.....	33
2.3. Các phương pháp phân tích.....	38
2.3.1. Ly trích dịch lá lúa.....	38
2.3.2. Phân tích hàm lượng chlorophyll tổng	38
2.3.3. Phân tích hàm lượng polyphenol tổng.....	39
2.3.4. Xác định tỷ lệ tổn thất chlorophyll và polyphenol	39
2.3.5. Phân tích hàm lượng flavonoid tổng	40
2.3.6. Phân tích hàm lượng xơ hòa tan	40
2.3.7. Xác định hoạt tính enzyme polyphenol oxidase.....	41
2.3.8. Phân tích khả năng khử gốc tự do DPPH	42
2.3.9. Phân tích khả năng khử gốc tự do ABTS	42
2.3.10. Phân tích năng lực khử (RP).....	43

2.3.11. Phân tích khả năng khử sắt (FRAP)	43
2.3.12. Phân tích thành phần hợp chất bằng GC-MS/MS	44
2.3.13. Phân tích thành phần hợp chất bằng HPLC.....	44
2.3.14. Phương pháp khuếch tán trên giếng thạch.....	45
2.3.15. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)	45
2.3.16. Phương pháp xác định mật số vi khuẩn LAB và AeB.....	46
2.3.17. Môi trường sử dụng nuôi cấy vi sinh vật.....	47
2.3.18. Xét nghiệm huyết học.....	47
2.3.19. Phân tích hình thái mô học ruột non.....	48
2.3.20. Phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA	48
2.3.21. Phương pháp xử lý số liệu.....	49
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	50
3.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá trong lá lúa non.....	50
3.1.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá trong lá lúa non	50
3.1.1.1. Hàm lượng chlorophyll tổng.....	50
3.1.1.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b.....	51
3.1.1.3. Hàm lượng polyphenol tổng	53
3.1.1.4. Hàm lượng xơ hòa tan	54
3.1.1.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH	56
3.1.1.6. Phân tích mối tương quan giữa hàm lượng hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa non.....	57
3.1.1.7. Đánh giá ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa non.....	59
3.1.2. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non.....	60
3.1.2.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non	60
3.1.2.2. Ảnh hưởng điều kiện ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa.....	65
3.1.2.3. Đánh giá ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện che phủ ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non	67
3.2. Khảo sát các điều kiện chế biến phù hợp trong thu nhận BLL	71
3.2.1. Phương pháp bất hoạt enzyme polyphenol oxidase	71

3.2.1.1. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất hàm lượng chlorophyll trong lá lúa.....	71
3.2.1.2. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất hàm lượng polyphenol trong lá lúa	72
3.2.1.3. Ảnh hưởng các điều kiện xử lý lên sự ức chế enzyme polyphenol oxidase	73
3.2.1.4. Đánh giá ảnh hưởng các phương pháp bất hoạt enzyme	74
3.2.2. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ ethanol đến chiết xuất các hợp chất trong lá lúa non	75
3.2.2.1. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ ethanol đến chiết xuất chlorophyll.....	75
3.2.2.2. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ ethanol đến chiết xuất polyphenol	76
3.2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng dung môi ethanol đến chiết xuất chlorophyll và polyphenol	77
3.2.3. Ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến chất lượng của BLL.....	77
3.2.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính bắt gốc tự do (DPPH) của BLL.....	77
3.2.3.2. Phân tích tương quan giữa các hợp chất và hoạt tính DPPH	79
3.2.3.3. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến chất lượng BLL	81
3.2.4. Phân tích chất lượng BLL theo tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm ..	83
3.2.5. Ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian bảo quản đến chất lượng BLL	84
3.2.5.1. Ảnh hưởng đến hàm lượng chlorophyll tổng.....	84
3.2.5.2. Ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng	85
3.2.5.3. Ảnh hưởng đến hàm lượng xơ hòa tan	86
3.2.5.4. Ảnh hưởng đến hoạt tính bắt gốc tự do DPPH	87
3.2.5.5. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian bảo quản lên chất lượng của BLL	87
3.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của bột lá lúa non.....	89
3.3.1. Phân tích HPLC xác định nhóm chất catechin	89
3.3.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của BLL	90
3.3.3. Phân tích mối tương quan giữa thành phần hoá học và hoạt tính chống oxy hoá của BLL	92
3.3.4. Đánh giá khả năng chống oxy hoá của BLL	93
3.4. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL	95
3.4.1. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL	95
3.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL	97

3.5. Tác động tiêu thụ BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột.....	98
3.5.1. Khảo sát ảnh hưởng của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột.....	98
3.5.1.1. Chỉ số huyết học	98
3.5.1.2. Hình thái mô học ruột non	100
3.5.1.3. Trọng lượng chuột	101
3.5.1.4. Mật số vi khuẩn LAB và AeB	101
3.5.1.5. Thành phần và dự đoán chức năng hệ vi sinh vật đường ruột.....	103
3.5.2. Đánh giá tác động tiêu thụ BLL trên mô hình chuột.....	114
3.5.2.1. Huyết học và mô học	114
3.5.2.2. Mật số vi khuẩn LAB và AeB	114
3.5.2.3. Hệ vi sinh vật đường ruột	114
3.5.2.4. Dự đoán chức năng hệ vi sinh vật đường ruột.....	117
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	121
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ..	123
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	124
PHỤ LỤC 1. Kết quả phân tích thống kê	xiii
PHỤ LỤC 2. Hình ảnh, số liệu và các kết quả phân tích chỉ tiêu lá lúa	xxxvi
PHỤ LỤC 3. Kết quả phân tích các chỉ số	lxx

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2'-azino-bis(acid 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic)
AeB	Aerobic bacteria	Vi khuẩn hiếu khí
BLL	Rice leaf powder	Bột cao chiết lá lúa non
CA	Correspondence analysis	Phân tích tương ứng
CDAS	Light intensity	Cường độ ánh sáng
cs.	Co-author	Cộng sự
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
IZ	Inhibition zone	Vùng ức chế
EGCG	Epigallocatechin-3- gallate	Epigallocatechin-3- gallate
FRAP	The ferric reducing antioxidant power	Khả năng chống oxy hóa khử sắt
GAE	Gallic acid equivalent	Tương đương acid gallic
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu cao năng
IRRI	The International Rice Research Institute	Viện nghiên cứu lúa gạo quốc tế
LAB	Lactic acid bacteria	Vi khuẩn acid lactic
LB	Luria-Bertani	Luria-Bertani
MD	Maltodextrin	Maltodextrin
MIC	Minimum inhibitory concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
PCA	Principal component analysis	Phân tích thành phần chính
PPO	Polyphenol oxidase	Enzyme polyphenol oxidase
ROS	Reactive oxygen species	Các loại oxy hoá phản ứng
RP	Reducing Power	Khả năng khử sắt
TE	Trolox equivalent	Tương đương Trolox
VSVDR	Gut microbiota	Vi sinh vật đường ruột

DANH MỤC BẢNG

Nội dung bảng	Số trang
Bảng 1.1. Thành phần dinh dưỡng của lá lúa non (<i>O. sativa</i>)	8
Bảng 2.1. Các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu	26
Bảng 3.1. Hàm lượng chlorophyll tổng ($\mu\text{g/g}$ lá) trong lá lúa theo điều kiện che sáng	51
Bảng 3.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b trong lá lúa theo điều kiện che sáng	52
Bảng 3.3. Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g lá) của lá lúa theo điều kiện che sáng	54
Bảng 3.4. Hàm lượng xơ hòa tan (mg/g lá) trong lá lúa theo điều kiện che sáng	55
Bảng 3.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH ($\mu\text{mol TE/g}$ lá) của lá lúa theo điều kiện che sáng	57
Bảng 3.6. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các chỉ tiêu sinh hoá của lá lúa	58
Bảng 3.7. Hàm lượng chlorophyll tổng, chlorophyll a, chlorophyll b của BLL theo nhiệt độ sấy phun	78
Bảng 3.8. Hàm lượng polyphenol, flavonoid, xơ hòa tan và hoạt tính DPPH của BLL theo nhiệt độ sấy phun	79
Bảng 3.9. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các hợp chất và hoạt tính DPPH của BLL	80
Bảng 3.10. Phân tích chất lượng BLL	84
Bảng 3.11. Hàm lượng chlorophyll, polyphenol và xơ hòa tan trong BLL	90
Bảng 3.12. Phương trình hồi quy và IC_{50} của BLL và vitamin C	92
Bảng 3.13. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các thông số của BLL	93
Bảng 3.14. Đường kính vòng ức chế (mm) của BLL đối với vi khuẩn và nấm	96
Bảng 3.15. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của BLL đối với vi khuẩn và nấm	97
Bảng 3.16. Chỉ số huyết học của chuột sau khi tiêu thụ BLL	99
Bảng 3.17. Chỉ số đa dạng alpha và beta	104

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Nội dung hình	Số trang
Hình 1.1. Thời gian sinh trưởng và các giai đoạn phát triển của cây lúa	6
Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm chung	29
Hình 2.2. Lúa được trồng trong các khay nhựa điều kiện ngoài trời	31
Hình 2.3. Bố trí thí nghiệm chuột bổ sung bột lá lúa	35
Hình 2.4. Chuột cho uống bột lá lúa bằng kim đầu tù	35
Hình 2.5. Thu nhận mẫu phân chuột	37
Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm 3.3	38
Hình 3.1. Hàm lượng chlorophyll tổng trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng	50
Hình 3.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng	52
Hình 3.3. Hàm lượng polyphenol tổng trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng	53
Hình 3.4. Hàm lượng xơ hòa tan trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng	55
Hình 3.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của lá lúa theo thời gian sinh trưởng	56
Hình 3.6. Phân tích cụm giữa hàm lượng các chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa	58
Hình 3.7. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa IR504 theo thời gian sinh trưởng	61
Hình 3.8. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa TNG theo thời gian sinh trưởng	62
Hình 3.9. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa NTH theo thời gian sinh trưởng	62
Hình 3.10. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa NTI theo thời gian sinh trưởng	63
Hình 3.11. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa HLA theo thời gian sinh trưởng	63
Hình 3.12. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa HRO theo thời gian sinh trưởng	64
Hình 3.13. Biểu đồ CA sự hiện diện nhóm chất theo giống lúa và điều kiện che sáng	65

Hình 3.14. Biểu đồ dendogram về sự khác biệt trong biểu hiện nhóm chất của sáu giống lúa theo điều kiện che sáng	66
Hình 3.15. Đề xuất con đường thủy phân và luân chuyển chlorophyll trong lá lúa	68
Hình 3.16. Đề xuất con đường chuyển hóa của các hợp chất thứ cấp trong lá lúa dưới điều kiện che sáng và không che sáng	69
Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tổn thất chlorophyll trong lá lúa	72
Hình 3.18. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tổn thất polyphenol trong lá lúa	73
Hình 3.19. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tỷ lệ ức chế enzyme polyphenol oxidase trong lá lúa	74
Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỷ lệ (dung môi: lá lúa non) và nồng độ ethanol đến quá trình chiết xuất chlorophyll	75
Hình 3.21. Ảnh hưởng của tỷ lệ (dung môi: lá lúa non) và nồng độ ethanol đến quá trình chiết xuất polyphenol	76
Hình 3.22. Bột lá lúa sau sấy phun và sấy đông khô (đối chứng)	78
Hình 3.23. Biểu đồ phân tích cụm giữa các giá trị của BLL	80
Hình 3.24. Hàm lượng chlorophyll tổng trong BLL theo thời gian bảo quản	85
Hình 3.25. Hàm lượng polyphenol tổng trong BLL theo thời gian bảo quản	86
Hình 3.26. Hàm lượng xơ hòa tan trong BLL theo thời gian bảo quản	86
Hình 3.27. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của BLL theo thời gian bảo quản	87
Hình 3.28. Đề xuất quy trình công nghệ thu nhận bột lá lúa non	88
Hình 3.29. Sắc ký đồ trong kết quả phân tích HPLC của BLL	89
Hình 3.30. Thử nghiệm DPPH, ABTS, FRAP và RP theo nồng độ BLL	91
Hình 3.31. Biểu đồ phân tích cụm giữa các thông số của bột lá lúa	93
Hình 3.32. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của BLL bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch	95
Hình 3.33. Hình thái lớp cắt ruột non nhuộm hematoxylin và eosin	100
Hình 3.34. Gia tăng trọng lượng chuột sau 14 ngày	101
Hình 3.35. Nuôi cấy vi khuẩn LAB và AeB trong phân sau 24 giờ	102

Hình 3.36. Mật số vi khuẩn LAB và AeB trong phân	103
Hình 3.37. Biểu đồ phân tích tọa độ chính (PCoA) về sự đa dạng beta	104
Hình 3.38. Sự phong phú thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp ngành	105
Hình 3.39. Sự phong phú về thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp họ	106
Hình 3.40. Sự phong phú về thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp chi	107
Hình 3.41. Hồ sơ dự đoán chức năng trong 20 con đường enzyme biểu hiện cao nhất (KEGG EC)	109
Hình 3.42. Hồ sơ dự đoán chức năng trong 20 gen biểu hiện cao nhất (KEGG KO)	111
Hình 3.43. Hồ sơ dự đoán chức năng của hệ vi khuẩn đường ruột trong 20 con đường biểu hiện cao nhất (KEGG MetaCyc)	113
Hình 3.44. Mức độ biểu hiện các con đường chuyển hoá chính (KEGG Metacyc) cao nhất giữa các nhóm chuột	118
Hình 3.45. Mô tả sự khác biệt trong thành phần hệ vi sinh đường ruột và con đường chuyển hóa ở chuột được bổ sung BLL	119

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 và đóng vai trò cung cấp lương thực chính cho hơn một nửa dân số toàn cầu [1]. Là một trong những loại cây trồng quan trọng nhất, lúa chiếm diện tích lớn trong canh tác nông nghiệp. Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA), Việt Nam hiện xếp thứ 5 trên thế giới về sản xuất và tiêu thụ lúa gạo, trong đó vùng Đồng bằng sông Cửu Long là một trong ba khu vực trồng lúa trọng điểm [2].

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu đã tập trung khai thác giá trị dinh dưỡng và dược liệu từ các bộ phận sinh dưỡng của cây ngũ cốc, đặc biệt là lá non của lúa mì, lúa mạch và yến mạch. Các tài liệu nghiên cứu đã chứng minh lá non của các loài này chứa nhiều hợp chất thực vật có hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, kháng viêm, thải độc, hỗ trợ điều trị ung thư và kháng khuẩn [3,4]. Bột lá lúa mì non (*Triticum aestivum*) đã được thương mại hóa từ hơn 40 năm trước, trở thành nguyên liệu phổ biến trong ngành thực phẩm chức năng nhờ thành phần giàu chlorophyll, polyphenol, amino acid, vitamin, khoáng chất và các enzyme hoạt tính [5]. Đáng chú ý, nghiên cứu gần đây cho rằng lá lúa gạo có thành phần dinh dưỡng và các hợp chất sinh học gần giống với lá lúa mì [6], gợi mở tiềm năng ứng dụng của lá lúa như một nguyên liệu bản địa có giá trị cao, đặc biệt trong bối cảnh Việt Nam là một trong các quốc gia sản xuất lúa gạo hàng đầu khu vực.

Nhiều bằng chứng khoa học đã ghi nhận rằng lá lúa non chứa hàm lượng đáng kể các hợp chất polyphenol và flavonoid có hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, chống viêm và phòng ngừa ung thư [7,8]. Bên cạnh đó, các mô sinh dưỡng như lá, thân và chồi của cây lúa được xác định là nơi biểu hiện mạnh mẽ các gen liên quan đến tổng hợp các hợp chất sinh học bao gồm amino acid, flavonoid, phenolamide, terpene và vitamin [9]. Những dữ liệu này khẳng định tiềm năng khai thác lá lúa non như một nguồn nguyên liệu sinh học mới phục vụ cho mục tiêu chiết xuất hợp chất chức năng ứng dụng trong các ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm.

Tuy nhiên, cho đến nay, số lượng nghiên cứu chuyên sâu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của lá lúa non còn hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu về hoạt tính kháng khuẩn và lợi khuẩn đường ruột chưa được công bố rộng rãi. Ngoài ra, các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng bột lá lúa non như giống lúa, điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hoạch cũng như quy trình chế biến vẫn chưa được nghiên cứu hệ thống. Vì vậy, luận án được thực hiện nhằm làm rõ tiềm năng sinh

học của lá lúa non và xây dựng quy trình thu nhận bột 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) Xác định điều kiện thu hoạch phù hợp (về giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng) nhằm thu nhận lá lúa có hàm lượng tổng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao.
- (2) Thiết lập quy trình thu nhận bột lá lúa non thông qua việc xác định điều kiện bất hoạt enzyme, nồng độ dung môi, nhiệt độ sấy phun và điều kiện bảo quản thích hợp giúp duy trì tốt nhất hàm lượng hoạt chất và hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm.
- (3) Xác định hoạt tính chống oxy hóa, khả năng kháng vi sinh vật *in-vitro* và tác động điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột của sản phẩm bột lá lúa non trên mô hình chuột.

3. Nội dung nghiên cứu

1/ Xác định điều kiện phù hợp về giống lúa, thời gian thu hoạch và điều kiện che sáng nhằm nâng cao khả năng tích lũy các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của lá lúa non.

2/ Xây dựng quy trình thu nhận BLL thông qua lựa chọn các khâu chế biến (bất hoạt enzyme, chiết tách, sấy phun và bảo quản) để bảo toàn hàm lượng hợp chất và hoạt tính sinh học.

3/ Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng vi sinh vật của sản phẩm BLL bằng các thử nghiệm *in-vitro*, đồng thời khảo sát tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột thông qua phân tích thành phần, chức năng hệ vi sinh vật (giải trình tự gen 16S rRNA) và các chỉ số sinh lý trên chuột.

4. Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài

Kết quả nghiên cứu của luận án góp phần bổ sung cơ sở khoa học về tiềm năng sinh học của lá lúa non bao gồm khả năng chống oxy hóa, kháng vi sinh vật và hỗ trợ lợi khuẩn đường ruột. Trên cơ sở đó, luận án xây dựng quy trình thu nhận BLL có chất lượng cao, phù hợp với định hướng phát triển các sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc thực vật. Sản phẩm thu được có tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực như thực phẩm chức năng, dược phẩm và nông nghiệp, đồng thời góp

phần nâng cao giá trị thương mại từ cây lúa – loại cây trồng truyền thống chủ lực tại Việt Nam.

5. Những đóng góp mới của luận án

1- Xây dựng quy trình công nghệ thu nhận bột cao chiết lá lúa non có hoạt tính sinh học cao, bao gồm các giai đoạn tối ưu hóa điều kiện thu hoạch và chế biến nhằm bảo tồn tối đa các hợp chất có lợi như polyphenol, flavonoid và chlorophyll.

2- Chứng minh hoạt tính chống oxy hoá, kháng vi sinh vật và hỗ trợ điều hoà hệ vi sinh vật đường ruột của BLL thông qua các thử nghiệm trong ống nghiệm và trên mô hình chuột, góp phần khẳng định tiềm năng ứng dụng của sản phẩm trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và hỗ trợ sức khỏe đường tiêu hóa.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu về cây lúa

1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và phân bố

Lúa (*Oryza sativa* L.) là loài thực vật một lá mầm thuộc họ Hòa thảo (*Poaceae*), chi *Oryza*. Đây là loài lúa có năng suất cao, được trồng phổ biến và trên diện tích rộng lớn nhất toàn cầu, có nguồn gốc từ khu vực Nam Á và Đông Á [10].

Về mặt phân loại, *O. sativa* được chia thành hai phân loài chính: *O. sativa* ssp. *japonica* và *O. sativa* ssp. *indica*. Trong đó, các giống thuộc phân loài *indica* chủ yếu được canh tác tại các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là tại các khu vực đồng bằng ngập nước của Nam Á và Đông Nam Á như Sri Lanka, miền Nam và Trung của Trung Quốc, Ấn Độ, Pakistan, Indonesia, Philippines, Đài Loan và Việt Nam. Ngược lại, các giống thuộc phân loài *japonica* - gồm *temperate japonica* (phù hợp với vùng ôn đới như miền Bắc và Đông của Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc) và *tropical japonica* (trước đây gọi là *javanica*, thích ứng tốt tại vùng cao Đông Nam Á và Nam Á) - thường xuất hiện ở những khu vực ôn đới, bán ôn đới và vùng núi cao, có khí hậu mát mẻ hoặc ẩm thấp [11].

Sự phân bố địa lý của các phân loài phụ này có liên quan mật thiết đến các đặc điểm thích nghi sinh lý. Cụ thể, các giống *O. sativa* ssp. *indica* thể hiện khả năng chịu nhiệt cao, trong khi các giống *O. sativa* ssp. *japonica* lại có khả năng chịu lạnh tốt hơn so với các giống lúa còn lại [11]. Những đặc điểm này là cơ sở cho việc phân bố sinh thái và canh tác thích nghi của các giống lúa trong điều kiện khí hậu khác nhau trên thế giới.

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

Theo Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hợp Quốc (FAO), Việt Nam hiện là quốc gia đứng thứ năm thế giới về sản lượng lúa, với tổng sản lượng đạt khoảng 43 – 44 triệu tấn gạo trong năm 2024 [12]. Diện tích gieo trồng lúa cả năm tại Việt Nam duy trì ở mức ổn định, khoảng 7 triệu hecta, tương đương với khoảng 3,5 – 3,75 triệu hecta diện tích canh tác (tính theo một vụ) [13]. Lúa là loại cây trồng được trồng phổ biến ở khắp các vùng miền trên cả nước. Trong đó, đồng bằng sông Hồng và sông Cửu Long là hai nơi có diện tích trồng lúa lớn nhất [2].

Đặc biệt, vùng Đồng bằng sông Cửu Long giữ vai trò then chốt trong sản xuất lúa gạo quốc gia, không chỉ về quy mô mà còn về sản lượng. Khu vực này đóng góp hơn 50% tổng sản lượng lúa cả nước, với sản lượng thu hoạch ước tính

đạt khoảng 24 triệu tấn trong năm 2024 [14]. Đây là vùng trọng điểm lúa gạo quốc gia và cũng là khu vực cung cấp phần lớn gạo xuất khẩu của Việt Nam.

Hệ thống giống lúa được trồng tại Việt Nam rất đa dạng về hình thái, sinh lý và di truyền, phản ánh sự phong phú sinh thái của một quốc gia trải dài theo trục vĩ tuyến, bao gồm nhiều vùng khí hậu và hệ sinh thái canh tác khác nhau. Các giống phổ biến hiện nay bao gồm *O. sativa* ssp. *indica*, *O. sativa* ssp. *japonica* và các giống lúa mùa bản địa có nguồn gốc lâu đời [15]. Đặc biệt, khu vực Đồng bằng sông Cửu Long là nơi tập trung nhiều giống lúa có sự đa dạng di truyền cao, thích nghi với điều kiện sinh thái phức tạp của vùng đồng bằng ven biển và chịu ảnh hưởng mặn, hạn [16].

So với các giống lúa lai hiện đại, các giống lúa mùa bản địa thể hiện nhiều đặc tính ưu việt như khả năng chịu hạn, mặn, sâu bệnh và côn trùng, cũng như hiệu quả hấp thu dinh dưỡng cao hơn. Những giống này đóng vai trò quan trọng trong công tác chọn tạo và cải tiến giống lúa, đặc biệt trong bối cảnh biến đổi khí hậu và nhu cầu nâng cao chất lượng gạo thương phẩm [15].

Với diện tích canh tác lớn và sản lượng sinh khối dồi dào, cây lúa không chỉ đóng vai trò là cây lương thực chiến lược, mà còn là nguồn nguyên liệu sinh học tiềm năng cho các ngành công nghiệp khác như thực phẩm chức năng, mỹ phẩm, dược liệu và năng lượng sinh học. Trong đó, các phụ phẩm từ cây lúa như lá, thân và vỏ trấu đang được quan tâm khai thác theo hướng kinh tế tuần hoàn, góp phần thúc đẩy phát triển bền vững nông nghiệp Việt Nam.

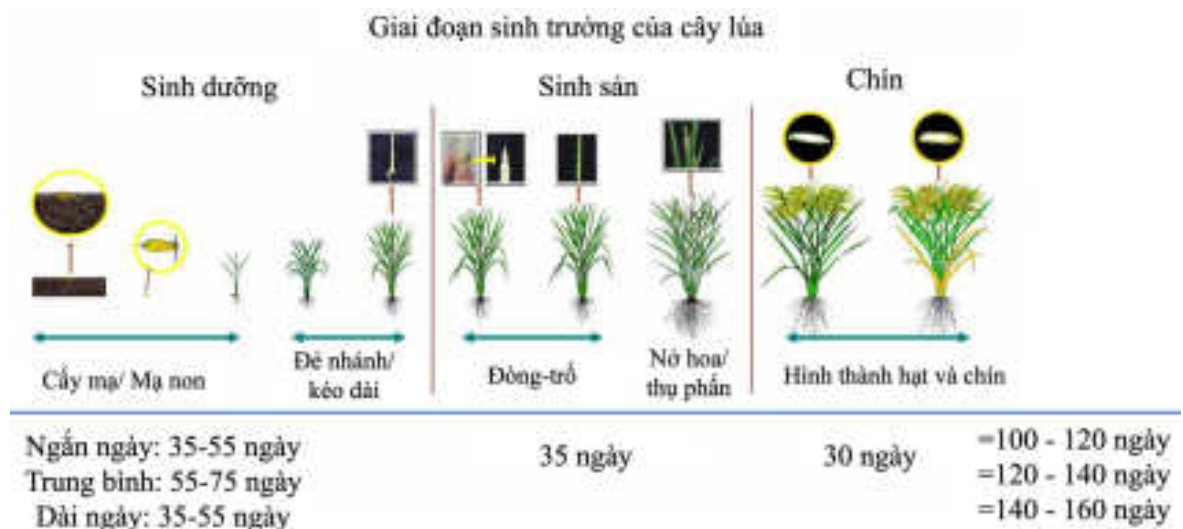
1.1.3. Đặc điểm sinh lý và giai đoạn sinh trưởng một số giống lúa ở Việt Nam

Về hình thái, cây lúa lai hiện đại có chiều cao trung bình từ 90–120 cm, trong khi một số giống lúa mùa bản địa có thể đạt chiều cao trên 120 cm [17]. Mỗi lá lúa bao gồm bốn phần chính: bẹ lá, phiến lá, lưỡi lá và tai lá. Bẹ lá ôm sát thân, hình trụ, dài khoảng 10–30 cm, có màu xanh lục, bề mặt có thể có lông mịn hoặc nhẵn, đảm nhận vai trò bảo vệ chồi non và vận chuyển dinh dưỡng. Phiến lá hình dải, dài 20–50 cm, rộng 1–2,5 cm, có mép lá dạng răng cưa nhỏ. Lưỡi lá là màng mỏng nằm giữa bẹ và phiến lá, dài khoảng 1–3 mm. Tai lá là hai mấu nhỏ, hình lưỡi liềm, có màu xanh hoặc tím. Lá đóng vai trò trung tâm trong quá trình quang hợp, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng đẻ nhánh và năng suất hạt. Bông lúa nhỏ, tự thụ phấn, mọc thành cụm dài 30–50 cm, có nhánh cong hoặc rủ xuống. Hạt lúa là dạng quả thóc, có chiều dài 5–12 mm và độ dày 2–3 mm [18].

Về sinh lý, giống *indica* và *japonica* thể hiện sự khác biệt. Giống *japonica* thường có chiều cao thấp hơn, phiến lá hẹp, màu nhạt, khả năng chịu lạnh tốt,

chống đổ mạnh, ít nhánh, tỷ lệ nảy mầm thấp và nhạy cảm với bệnh đạo ôn hơn so với giống *indica*. Ngoài ra, giống *japonica* thường có nhiều lông tơ hơn. Về hình thái hạt, *indica* cho hạt dài, ít dính (do hàm lượng amylopectin thấp), trong khi *japonica* có hạt ngắn, dính hơn [18].

Theo phân loại nông học, chu kỳ phát triển của cây lúa bao gồm ba giai đoạn chính: sinh dưỡng (vegetative), sinh sản (reproductive) và chín (ripening). Giai đoạn sinh dưỡng kéo dài từ khi nảy mầm đến khi phân hóa mầm hoa, thường dao động từ 35–75 ngày đối với giống lúa lai và 55–95 ngày đối với giống lúa mùa bản địa. Giai đoạn sinh sản (từ hình thành đến trổ hoa) kéo dài khoảng 35 ngày. Tổng thời gian từ nảy mầm đến chín có thể kéo dài 3–6 tháng, phụ thuộc vào yếu tố di truyền. Nhìn chung, lúa lai có chu kỳ sinh trưởng từ 100–120 ngày, trong khi các giống bản địa có thể kéo dài tới 160–180 ngày. Ở điều kiện nhiệt đới, lúa có chu kỳ 120 ngày thường có 60 ngày sinh dưỡng, 30 ngày sinh sản và 30 ngày chín (Hình 1.1) [17].



Hình 1.1. Thời gian sinh trưởng và các giai đoạn phát triển của cây lúa

Nguồn Viện nghiên cứu lúa gạo quốc tế (IRRI) [17].

Trong điều kiện môi trường thuận lợi, giai đoạn sinh dưỡng có thể chiếm tới 50% tổng chu kỳ sinh trưởng với sự gia tăng mạnh mẽ về số nhánh, diện tích lá, chiều cao cây, khối lượng khô của chồi và chỉ số diện tích lá (leaf area index). Các yếu tố như nhiệt độ và quang chu kỳ có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ phát triển trong giai đoạn này [19].

Tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, giống *O. sativa* ssp. *indica* là chủ đạo, bao gồm các giống lúa cao sản như IR50404, các giống bản địa như Tài Nguyên, Nàng Thơm, Nếp Tím Bạc Liêu, Huyết Rồng và các dòng lai tạo như OM, ST, KC [16].

Giống IR50404—được phát triển bởi IRRI—là một giống lúa cao sản phổ biến tại Việt Nam, đặc biệt tại Đồng bằng sông Cửu Long. Giống này có thời gian sinh trưởng ngắn (85–90 ngày), dễ canh tác, thích nghi tốt và năng suất cao (6–8 tấn/ha), nhưng chất lượng gạo thấp do tỷ lệ bạc bụng và hàm lượng amylose cao [20].

Các giống lúa mùa bản địa như Nàng Thơm và Tài Nguyên có thời gian sinh trưởng dài, mùi thơm đặc trưng, được ưa chuộng về mặt cảm quan. Giống Jasmine 85 (Hương Lài), do IRRI lai tạo, cũng được canh tác rộng rãi tại Đồng bằng sông Cửu Long [21].

Giống Nếp Tím và Huyết Rồng là các giống lúa bản địa đặc sắc, có màu hạt từ đỏ đến tím đen do hàm lượng anthocyanin cao, thường được gọi là "gạo thảo dược" vì tiềm năng chống oxy hóa. Những giống này có thời gian sinh trưởng dài (175–180 ngày), khả năng chống chịu cao, năng suất trung bình khoảng 3,5–3,7 tấn/ha [22].

Lá lúa non của các giống lúa kể trên được xác định là nguồn nguyên liệu sinh học tiềm năng, tương tự như phần hạt vốn đã được khai thác lâu đời. Theo một nghiên cứu sử dụng phân tích hệ chất chuyển hóa mục tiêu và không mục tiêu, các mô sinh dưỡng như lá, thân và chồi là nơi thể hiện mạnh các gen liên quan đến sinh tổng hợp các hợp chất sinh học như amino acid, flavonoid, phenolamide, terpene và vitamin [9]. Một số nghiên cứu khác báo cáo rằng lá lúa non chứa các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa, chống béo phì, chống đái tháo đường, bảo vệ tế bào và ức chế tế bào ung thư [8,23–26]. Do đó, lá lúa non là nguồn nguyên liệu sinh học có tiềm năng lớn để phát triển thành sản phẩm dinh dưỡng và ứng dụng trong các ngành công nghiệp.

1.2. Thành phần dinh dưỡng và các hợp chất sinh học trong lá lúa non

1.2.1. Thành phần dinh dưỡng

Thành phần dinh dưỡng cơ bản của lá lúa non bao gồm độ ẩm, tro, chất béo, chất xơ, đạm (protein), carbohydrate và năng lượng trao đổi, là các chỉ tiêu phản ánh giá trị dinh dưỡng, chất lượng, độ ổn định và tính an toàn của nguyên liệu thực phẩm. Hàm lượng cụ thể của các thành phần này được trình bày trong Bảng 1.1.

Trong đó, carbohydrate tiêu hóa được (chủ yếu là tinh bột và các đường đơn, đường đôi) và chất xơ (carbohydrate không tiêu hóa) là hai nhóm thành phần quan trọng, có vai trò bổ trợ lẫn nhau trong chế độ dinh dưỡng cân đối. Carbohydrate cung cấp năng lượng cho quá trình trao đổi chất, trong khi chất xơ hỗ trợ hệ tiêu hóa, duy trì cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, điều hòa chuyển hóa

lipid và glucose, đồng thời góp phần tăng cường sức khỏe tổng thể [27]. Các nghiên cứu cho thấy chất xơ từ cây ngũ cốc có khả năng thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật có lợi (như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*), ức chế vi sinh vật gây bệnh và cải thiện sức khỏe đường ruột [27,28]. Nhờ hàm lượng chất xơ cao, lá lúa non có tiềm năng lớn để phát triển thành nguồn nguyên liệu lợi khuẩn (prebiotic) hoặc phụ gia thực phẩm chức năng, góp phần gia tăng giá trị dinh dưỡng và kinh tế cho sản phẩm từ cây lúa.

Bảng 1.1. Thành phần dinh dưỡng của lá lúa non (*O. sativa*) (5 – 25 ngày)

Thành phần	Hàm lượng (trong 100g trọng lượng tươi)
Độ ẩm (%)	64,72–79,11
Đạm (g)	3,38–5,99
Chất béo (g)	0,32–1,2
Tro (g)	2,86–5,78
Carbohydrate (g)	12,22–24,54
Chất xơ (g)	11,98–16,92
Năng lượng (Kcal)	73,44–124,00

Nguồn Tamprasit và cs. (2019) [29].

Ghi chú: Trong nghiên cứu này, hàm lượng chất xơ được phân tích riêng biệt theo phương pháp AOAC 985.29 (2016). Hàm lượng Carbohydrate được các tác giả tính toán theo phương pháp chênh lệch (100% trừ đi ẩm, protein, lipid, tro và chất xơ), do đó giá trị này biểu thị cho phần carbohydrate phi xơ (non-fiber carbohydrate).

Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây cũng ghi nhận sự hiện diện của các fatty acid tự nhiên trong lá lúa non, đặc biệt là ở các giống gạo hạt dài, trắng hoặc đen, bao gồm α -linolenic acid, linoleic acid, palmitic acid và stearic acid - đây là các hợp chất góp phần tạo nên mùi hương đặc trưng ở giống Jasmine và cũng được tìm thấy trong một số sản phẩm trà xanh thương mại [30]. Linoleic acid và α -linolenic acid được chứng minh có khả năng ức chế vi khuẩn *Staphylococcus aureus* [31].

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

1.2.2.1. Chlorophyll

Hầu hết lá của các loại ngũ cốc đều có chứa hàm lượng chlorophyll cao [7,32]. Khi so sánh hàm lượng chlorophyll trong lá của lúa gạo, lúa mì và lúa mạch, kết quả nghiên cứu cho thấy lá lúa gạo giống Jasmine và Sukhothai 2 có

hàm lượng chlorophyll cao hơn so với lá lúa mì nhưng thấp hơn so với lá lúa mạch [7]. Trong y học, chlorophyll được báo cáo là hợp chất có hoạt tính sinh học có thể ngăn ngừa ung thư, giải độc gan, kích thích hệ thống miễn dịch, kháng viêm và hỗ trợ phục hồi nhanh vết thương [33]. Chlorophyll và chlorophyllin là những thành phần hữu ích của dược phẩm, thực phẩm và mỹ phẩm vì chúng sở hữu các hoạt tính sinh học đa dạng khác nhau. Nghiên cứu trên mô hình chuột tiêu thụ sản phẩm thực vật chứa hàm lượng cao chlorophyll giúp kiểm soát cân nặng, béo phì và giúp cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột [34].

1.2.2.2. Các hợp chất polyphenol

Polyphenol là nhóm hợp chất thứ cấp phổ biến trong thực vật, đóng vai trò quan trọng trong các hoạt tính sinh học và dược lý, đặc biệt là khả năng chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn và bảo vệ tế bào [35]. Hàm lượng và thành phần polyphenol là yếu tố quyết định tiềm năng sinh học của cây trồng, trong đó lá lúa non được ghi nhận chứa nhiều hợp chất phenolic và flavonoid [8,29].

So sánh giữa các giống lúa, lá của giống gạo màu có hàm lượng anthocyanin và polyphenol cao hơn đáng kể so với giống gạo trắng [26,36]. Ở giai đoạn 8 ngày tuổi, polyphenol trong lá lúa tương đương hoặc thấp hơn nhẹ so với lá lúa mì [6]. Tuy nhiên, nghiên cứu của Wangcharoen và Phimphilai (2016) lại cho thấy chiết xuất lá lúa có hàm lượng polyphenol cao hơn 2–4 lần so với lá lúa mì [7]. Khanthapok và cs. (2015) khi khảo sát 14 giống lúa Thái Lan (7 giống gạo trắng và 7 giống gạo màu) cũng ghi nhận lá gạo màu có hàm lượng polyphenol cao hơn lá gạo trắng và cao hơn cả lá lúa mì [26]. Điều này khẳng định thành phần và hàm lượng polyphenol phụ thuộc chặt chẽ vào yếu tố di truyền giống lúa.

Tamprasit và cs. (2019) khi phân tích HPLC-DAD trên lá lúa 5–25 ngày tuổi đã xác định các hợp chất phenolic như protocatechuic acid, vanillic acid và rutin. Các hợp chất này đạt hàm lượng cao nhất ở giai đoạn thu hoạch sớm (5–7 ngày tuổi), đặc biệt vanillic acid cao nhất ở gạo đen (7,69 mg/g chiết xuất khô) và rutin cao nhất ở gạo trắng (1,68 mg/g chiết xuất khô). Hàm lượng phenolic tổng trong gạo đen cao hơn gạo trắng ở giai đoạn non, trong khi flavonoid lại cao hơn ở gạo trắng [29].

Ngoài anthocyanin, lá lúa còn chứa nhiều hợp chất phenolic khác như catechin, epicatechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), luteolin, kaempferol, protocatechuic acid, vanillic acid, caffeic acid, ferulic acid và chlorogenic acid và rutin [37,38]. Phimphilai và cs. (2021) [39] đã chứng minh dịch chiết lá lúa non

giống Sukhothai-1 (12–15 ngày tuổi) chứa catechin 2,71–3,57 mg/40 mL, epicatechin 0,98–1,85 mg/40 mL và EGCG 25,47–27,55 mg/40 mL.

Anthocyanin là sắc tố flavonoid quan trọng trong lá lúa, đặc biệt ở giống gạo màu. Hợp chất này có hoạt tính chống oxy hóa mạnh, hỗ trợ chống viêm, bảo vệ tim mạch, giảm cholesterol, hạ đường huyết, ngăn ngừa lão hóa mô và bệnh thoái hóa thần kinh [40]. Protocatechuic acid, chất chuyển hóa của anthocyanin – được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, kháng ung thư, bảo vệ thần kinh và kháng khuẩn [41]. Vanillic acid cũng được ghi nhận có tác dụng chống oxy hóa, chống viêm và ngăn ngừa thoái hóa thần kinh [42]. Rutin, một flavonoid phổ biến trong lá lúa, có tác dụng bảo vệ mạch máu, chống ung thư, bảo vệ thần kinh và điều hòa đường huyết [43].

Như vậy, lá lúa chứa một phổ hợp chất phenolic đa dạng, bao gồm anthocyanin, flavonoid, phenolic acid và catechin – các hợp chất đóng vai trò then chốt trong hoạt tính chống oxy hóa và các hiệu ứng sinh học có lợi. Thành phần và hàm lượng polyphenol phụ thuộc vào giống lúa, giai đoạn thu hoạch và điều kiện canh tác, là cơ sở khoa học cho việc khai thác lá lúa như nguồn nguyên liệu tiềm năng cho thực phẩm chức năng và dược phẩm.

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

Thành phần và hàm lượng các hợp chất sinh học trong cây thay đổi phụ thuộc vào giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng.

1.3.1. Giống lúa

Đặc điểm di truyền của giống lúa đóng vai trò quyết định trong việc hình thành đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và đặc biệt là khả năng tổng hợp các hợp chất sinh học trong cây. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh sự khác biệt đáng kể về thành phần và hàm lượng các hợp chất này tùy thuộc vào bản chất di truyền của từng giống.

Roland và cs. (2017) đã đưa ra sự khác biệt trong hàm lượng và loại hợp chất sinh học có trong lá lúa giữa hai loài *O. glaberrima* và *O. sativa* [44]. Du và cs. (2021) ghi nhận rằng gallic acid và caffeic acid chỉ hiện diện ở *O. sativa* spp. *indica*, trong khi rutin chỉ phát hiện ở *O. sativa* spp. *japonica* [45]. Nghiên cứu của Nayeem và cs. (2021) trên năm giống lúa khác nhau cho thấy tổng hàm lượng phenolic, flavonoid và anthocyanin cao hơn đáng kể ở lúa gạo màu, đặc biệt là giống gạo đen [46]. Ngoài ra, các bộ phận của cây như hạt, thân, lá và rễ cũng tích lũy các hợp chất này khác nhau, trong đó lá và thân ở giai đoạn 30 ngày tuổi chứa hàm lượng phenolic cao nhất.

Kumbar và cs. (2021) so sánh hai giống lúa Rashi (chịu hạn) và Swarna (nhạy cảm), nhận thấy Rashi có hàm lượng phenolic và chlorophyll cao hơn trong cả giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng và sinh sản [47]. Điều này có nghĩa các giống mang tính chống chịu tốt thường có khả năng tích lũy các hợp chất sinh học cao hơn, nhờ hệ gen thích nghi hiệu quả hơn với điều kiện bất lợi.

Theo Dong và cs. (2014), thành phần và hàm lượng flavonoid không chỉ phụ thuộc vào giống mà còn thay đổi theo từng bộ phận của cây. Cụ thể, giống *Indica* có xu hướng tích lũy flavonoid cao hơn, trong khi giống *Japonica* lại giàu flavone acyl hóa vòng thơm. Tương tự, các giống lúa màu có khả năng tích lũy các hợp chất chống oxy hóa mạnh như quercetin, ferulic acid, p-coumaric acid, ascorbic acid, caffeic acid và genistein [48].

Tamprasit và cs. (2019) khẳng định lá của giống lúa đen có hàm lượng anthocyanin tổng cao hơn các giống lúa màu khác, trong khi giống lúa trắng lại chứa nhiều polyphenol hơn. Dù hàm lượng chlorophyll giữa hai giống lúa trắng và đen không khác biệt đáng kể, lá lúa trắng thường có chlorophyll cao hơn ở giai đoạn đầu. Ngoài ra, flavonoid và các hydroxybenzoic acid thường tích lũy nhiều hơn ở giống lúa đen [29].

Khanthapok và cs. (2015) cũng khẳng định rằng lá của giống lúa gạo màu chứa hàm lượng polyphenol cao hơn so với các giống gạo trắng, đồng thời có khả năng chống oxy hóa mạnh hơn. Những bằng chứng trên cho thấy sự khác biệt trong biểu hiện gen điều khiển quá trình tổng hợp các hợp chất sinh học thực vật chính là hệ quả của nền tảng di truyền từng giống lúa [26].

1.3.2. Giai đoạn sinh trưởng

Hàm lượng và thành phần các hợp chất sinh học trong thực vật, đặc biệt là chlorophyll và polyphenol, có sự biến đổi đáng kể theo từng giai đoạn sinh trưởng. Theo Kumbar và cs. (2021), hàm lượng chlorophyll tổng trong lá lúa cao hơn ở giai đoạn sinh trưởng so với giai đoạn sinh sản, trong khi hàm lượng phenolic giữa hai giai đoạn này không có sự chênh lệch đáng kể [47]. Mollaei và cs. (2020) khi nghiên cứu cây thảo mộc *Zosima absinthifolia* cũng ghi nhận sự biến thiên thành phần và hàm lượng các hợp chất sinh học theo thời gian sinh trưởng [49]. Cụ thể, hàm lượng các hợp chất phenolic như caffeic acid, salicylic acid, cũng như hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn ở giai đoạn phát triển sớm cao hơn so với giai đoạn chín hạt. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên cây đậu nành khi tổng hợp flavonoid trong lá chịu ảnh hưởng đáng kể bởi giai đoạn phát triển [50]. Nhìn chung, cây con hoặc các bộ phận còn non thường tích lũy lượng lớn các hợp chất

phenolic để phục vụ cho nhu cầu tăng trưởng, trong khi ở giai đoạn trưởng thành hoặc lão hóa, hàm lượng các hợp chất này có xu hướng giảm.

Đối với cây lúa, Tamprasit và cs. (2019) đã chứng minh rằng lá giống lúa gạo trắng thu hoạch ở giai đoạn 5–7 ngày tuổi chứa hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao hơn so với giai đoạn 20–25 ngày tuổi [29]. Đồng thời, các hợp chất hydroxybenzoic (như protocatechuic acid và vanillic acid) và flavonoid (rutin) cũng được phát hiện với hàm lượng cao hơn ở giai đoạn sớm. Tương tự, Niroula và cs. (2019) ghi nhận rằng phần lá của cây con 16 ngày tuổi thuộc các loài ngũ cốc như ngô, lúa mì và lúa mạch chứa hàm lượng polyphenol tổng cao hơn đáng kể so với phần hạt của chúng [51].

Việc đánh giá sự thay đổi hàm lượng hợp chất sinh học theo từng giai đoạn phát triển đóng vai trò thiết yếu trong việc xác định thời điểm thu hoạch phù hợp nhằm thu nhận sản phẩm giàu hoạt chất sinh học. Đồng thời, những nghiên cứu này còn cung cấp cơ sở khoa học cho việc hiểu rõ hơn về các con đường chuyển hóa và điều hòa trao đổi chất trong cây, từ đó định hướng các biện pháp nông học nhằm nâng cao hiệu quả sinh trưởng và giá trị sử dụng của cây trồng. Do đó, việc xác định thời điểm thu hoạch thích hợp đối với lá lúa là yếu tố then chốt để đảm bảo thu được sản phẩm có chất lượng sinh học cao nhất.

1.3.3. Điều kiện ánh sáng

Ánh sáng là một trong những yếu tố môi trường quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng, phát triển và khả năng tích lũy các hợp chất chuyển hóa thứ cấp trong thực vật. Ba yếu tố chính của điều kiện ánh sáng gồm chất lượng ánh sáng (bước sóng), cường độ chiếu sáng và chu kỳ quang [52]. Đây là nguồn năng lượng chủ yếu cung cấp cho quá trình quang hợp – cơ chế chuyển hóa năng lượng ánh sáng thành năng lượng hóa học trong lục lạp [53]. Quang hợp bị chi phối mạnh bởi cường độ bức xạ, ảnh hưởng đến hiệu suất quang năng và các hoạt động sinh lý khác của cây.

Dưới điều kiện ánh sáng yếu, lục lạp thường dịch chuyển về phía lớp tế bào trên để tối ưu hóa việc hấp thụ ánh sáng. Cây trồng trong điều kiện thiếu sáng thường tích lũy lượng chlorophyll cao hơn so với cây phát triển trong điều kiện ánh sáng mạnh, giúp duy trì hiệu suất quang hợp trong môi trường hạn chế ánh sáng [54].

Ngược lại, quá trình sinh tổng hợp các hợp chất phenolic và flavonoid lại phụ thuộc mạnh mẽ vào cường độ chiếu sáng. Các hợp chất này được kích thích tổng hợp khi cây tiếp xúc với ánh sáng, đặc biệt là ánh sáng có năng lượng cao.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mối liên hệ tích cực giữa ánh sáng và hàm lượng phenolic, flavonoid trong mô thực vật [55]. Flavonoid, đặc biệt là các flavonol và catechin, có vai trò bảo vệ thực vật trước tác động gây hại của tia UV, do đó chúng thường được sinh tổng hợp nhiều hơn trong điều kiện ánh sáng mạnh [56]. Gần đây, Wang và cs. (2022) đã chứng minh rằng cường độ ánh sáng cao thúc đẩy sự tích lũy flavonoid ở cây kiêu mạch [57].

Điều kiện che bóng hoặc thiếu ánh sáng có ảnh hưởng tiêu cực đến tổng hợp flavonoid. Ye và cs. (2021) khẳng định rằng che sáng làm giảm đáng kể hàm lượng flavonoid, đặc biệt là các flavonol glycoside và catechin – những hợp chất chính quyết định chất lượng lá trà (*Camellia sinensis*) [58]. Tương tự, Karimi và cs. (2013) cũng ghi nhận ảnh hưởng của mức độ chiếu sáng khác nhau trong nhà kính lên cây *Labisia pumila*. Kết quả cho thấy ánh sáng mạnh không chỉ làm tăng tích lũy phenolic và flavonoid mà còn làm tăng hoạt tính chống oxy hóa ở cả lá, thân và rễ – trong đó lá là bộ phận tích lũy mạnh nhất [59].

Như vậy, cường độ ánh sáng là yếu tố then chốt ảnh hưởng đến sự tích lũy các hợp chất sinh học trong thực vật. Trong khi ánh sáng yếu thúc đẩy tích lũy chlorophyll nhằm duy trì hiệu suất quang hợp, thì ánh sáng mạnh lại là điều kiện phù hợp để tăng sinh các chất chuyển hóa thứ cấp như flavonoid và phenolic. Tuy nhiên, phản ứng tích lũy các hợp chất này còn phụ thuộc vào đặc điểm sinh lý và mức độ thích nghi riêng của từng loài cây, do đó việc thiết lập điều kiện ánh sáng phù hợp là cần thiết để tối ưu hóa hiệu quả sinh học của cây trồng.

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 một trong những kỹ thuật phổ biến nhất để tách các hợp chất chống oxy hóa từ thực vật. Một dung môi lý tưởng cần đáp ứng các tiêu chí như: độc tính thấp, dễ bay hơi ở nhiệt độ thấp, khả năng thúc đẩy hấp thu sinh học của dịch chiết, hỗ trợ bảo quản, đồng thời không gây biến tính hay phân hủy các thành phần hoạt chất [60]. Do dịch chiết sau cùng có thể còn sót lại một lượng nhỏ dung môi, việc lựa chọn dung môi không độc hại là yêu cầu bắt buộc, đặc biệt trong các nghiên cứu đánh giá hoạt tính sinh học hoặc ứng dụng thực tiễn.

Ethanol và nước là hai dung môi được sử dụng rộng rãi trong chiết xuất các hợp chất chống oxy hóa từ thực vật và thực phẩm có nguồn gốc thực vật. Đây là các dung môi phân cực, an toàn cho sức khỏe con người, đồng thời có khả năng hoà tan tốt nhiều nhóm hợp chất sinh học, đặc biệt là flavonoid và polyphenol –

những chất có độ phân cực cao [61]. Nghiên cứu của Zeroual và cs. (2022) cho thấy, chiết xuất bằng ethanol từ cây hương thảo cho hàm lượng polyphenol và flavonoid tổng cao hơn so với các dung môi khác [62].

Không chỉ loại dung môi, mà nồng độ và tỷ lệ pha loãng dung môi cũng đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả chiết xuất. Cụ thể, chiết xuất bằng ethanol 50% từ lá Katuk cho kết quả thu nhận polyphenol và flavonoid cao hơn so với ethanol 70% và 96% [63]. Tương tự, nghiên cứu của Berwal và cs. (2021) trên nụ và lá cây *Calligonum polygonoides* sử dụng các dung môi ethanol, methanol và acetone ở ba nồng độ (50%, 75%, 100%) đã ghi nhận nồng độ 50% của mỗi dung môi đều cho hiệu quả chiết xuất và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn các nồng độ còn lại [64].

Vì vậy, việc lựa chọn loại dung môi, nồng độ và điều kiện chiết tách cần được thiết kế phù hợp theo từng loại nguyên liệu thực vật nhằm đảm bảo sự tương thích về độ phân cực và tính chất hóa học của các hợp chất mục tiêu. Trong nghiên cứu với lá lúa, lựa chọn dung môi phù hợp không chỉ quyết định đến hiệu suất chiết xuất mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng sinh học và tiềm năng ứng dụng của sản phẩm chiết thu được.

1.4.2. Phương pháp bất hoạt enzyme

Bất hoạt enzyme là quá trình làm mất hoạt tính hoặc phá hủy các enzyme oxy hóa có trong mô thực vật, nhằm kiểm soát quá trình oxy hóa, cố định màu xanh tự nhiên của lá và bảo vệ các hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học [65]. Enzyme polyphenol oxidase (PPO) đóng vai trò chính trong quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic, là nguyên nhân gây hiện tượng hóa nâu không mong muốn trong thực phẩm và nguyên liệu thực vật [66]. Do đó, việc ức chế hoạt động của PPO là cần thiết để ngăn ngừa sự suy giảm chất lượng cảm quan và dinh dưỡng, bao gồm màu sắc, mùi vị, cấu trúc và khả năng chấp nhận tổng thể của sản phẩm.

Trong công nghiệp thực phẩm, nhiều phương pháp đã được áp dụng để bất hoạt enzyme PPO, bao gồm chần nhiệt, xử lý vi sóng và siêu âm [67]. Ví dụ, nghiên cứu trên chiết xuất quả lựu (*Punica granatum* L.) ghi nhận hoạt tính PPO giảm 76% khi chần ở 90°C trong 30 giây, và giảm 68% khi chần ở 100°C trong 60 giây [68]. Tương tự, Magangana và cs. (2022) cho thấy chần vỏ lựu ở 80°C trong 3 phút làm giảm 40–50% hoạt tính PPO [69]. Ngoài tác dụng ức chế enzyme, các phương pháp này còn được đánh giá về khả năng bảo tồn chlorophyll và polyphenol trong nguyên liệu [70]. Việc áp dụng vi sóng để xử lý lá dừa có ảnh

hưởng đến hàm lượng chlorophyll và polyphenol, tùy thuộc vào thời gian và công suất vi sóng [71].

Tuy nhiên, việc xử lý nhiệt đôi khi gây suy giảm hàm lượng chlorophyll, như đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trên lá *Cinnamomum porfectum* [72] và *Ocimum basilicum* [73]. Do đó, nhiều công trình đề xuất sử dụng các phương pháp kết hợp để nâng cao hiệu quả bất hoạt enzyme mà vẫn bảo tồn các hợp chất sinh học quan trọng. Ví dụ, Anaya-Esparza và cs. (2017) cho rằng sự kết hợp giữa siêu âm và kiểm soát nhiệt độ giúp tăng hiệu quả ức chế PPO trong chế biến mật hoa măng cầu xiêm [74]. Nghiên cứu của Xin và cs. (2015) trên lá ngải cứu ghi nhận phương pháp siêu âm kết hợp nhiệt đạt hiệu quả ức chế PPO cao hơn (92,7%) và giữ lại chlorophyll nhiều hơn (96,7%) so với phương pháp chần nhiệt thông thường [75].

Việc lựa chọn phương pháp bất hoạt enzyme phụ thuộc vào loại nguyên liệu, mục tiêu sản phẩm và đặc tính hoá học của hợp chất cần bảo tồn. Đối với lá lúa, nghiên cứu về kỹ thuật bất hoạt enzyme vẫn còn hạn chế. Do đó, cần triển khai các nghiên cứu nền tảng nhằm thiết lập quy trình chế biến phù hợp, tối ưu hiệu quả bảo tồn chlorophyll và polyphenol, góp phần nâng cao chất lượng sinh học và giá trị ứng dụng của BLL.

1.4.3. Phương pháp sấy phun

Sấy phun là một trong những kỹ thuật quan trọng và được ứng dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, đặc biệt để sản xuất các sản phẩm dạng bột [76]. Phương pháp này sử dụng nhiệt độ đầu vào từ 120°C đến 190°C để nhanh chóng làm khô nguyên liệu dạng lỏng thành dạng bột mịn. Trong quá trình sấy phun, các chất mang được bổ sung nhằm bảo vệ các hợp chất nhạy cảm, tăng cường độ ổn định và cải thiện đặc tính cảm quan của sản phẩm. Trong số các chất mang phổ biến, maltodextrin (MD) – một polysaccharide có nguồn gốc từ tinh bột – được sử dụng nhiều nhất nhờ các ưu điểm như chi phí thấp, độ hòa tan cao, độ nhớt thấp ở nồng độ chất rắn cao, khả năng tạo màng bao tốt và bảo vệ hợp chất sinh học khỏi quá trình oxy hóa [77].

Việc lựa chọn các thông số vận hành như nhiệt độ, áp suất, tốc độ cấp liệu, lưu lượng khí và tỷ lệ chất mang đóng vai trò quan trọng để nâng cao hiệu suất thu hồi hợp chất sinh học. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả của sấy phun trong bảo tồn các hợp chất phenolic và flavonoid cũng như khả năng chống oxy hóa của sản phẩm. Ví dụ, bột tỏi đen (*Allium sativum* L.) sấy phun ở 225°C cho hàm lượng phenolic và flavonoid tổng số cao cùng hoạt tính chống oxy hóa mạnh

[78]. Buratto và cs. (2019) khi nghiên cứu chiết xuất quả *Feijoa sellowiana* cũng ghi nhận sấy phun giúp giữ lại hàm lượng hợp chất sinh học cao [79]. Júnior và cs. (2023) áp dụng sấy phun cho chiết xuất vỏ quả *Spondias purpurea* và đạt hiệu suất đóng gói tới 98,83% với hạt bột mịn, có kích thước đồng đều, đồng thời thể hiện hoạt tính bắt gốc tự do (DPPH, FRAP) vượt trội [80].

Chất mang MD đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ và ổn định các hợp chất sinh học trong quá trình sấy phun. Nghiên cứu của Iturri và cs. (2021) trên bột từ quả *Eugenia stipitata* cho thấy MD giúp bảo tồn hàm lượng polyphenol, flavonoid và khả năng chống oxy hóa trong quá trình bảo quản [81]. Rezende và cs. (2018) cũng báo cáo rằng MD cải thiện độ ổn định của anthocyanin, carotenoid, ascorbic acid và các hợp chất phenolic trong bột sơ ri (*Malpighia emarginata*) [82].

Nồng độ MD có thể khác nhau tùy thuộc vào loại nguyên liệu. Ví dụ, chiết xuất lá dâu tằm cho kết quả tốt nhất với MD 12% [83], trong khi bột tỏi đen đạt chất lượng tốt với MD 8% [78]. Saavedra-Leos và cs. (2021) nghiên cứu tối ưu hóa sấy phun nước ép bông cải xanh với MD ở nồng độ 5% kết hợp nhiệt độ 220°C đạt hàm lượng polyphenol tổng và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất [84].

Sấy phun được đánh giá là một phương pháp hiệu quả, kinh tế và linh hoạt trong công nghiệp thực phẩm. Phương pháp này có khả năng chuyển đổi nhanh chóng nguyên liệu từ dạng lỏng sang dạng bột ổn định, dễ bảo quản, đồng thời bảo vệ tốt các hợp chất sinh học. Do đó, sấy phun là lựa chọn tiềm năng để tạo sản phẩm bột từ lá lúa non, vừa tiết kiệm chi phí, vừa đảm bảo giữ lại tối đa giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học của nguyên liệu.

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

Hệ vi sinh vật đường ruột (VSVĐR) là một quần xã vi sinh vật đa dạng cư trú trong đường tiêu hóa, đóng vai trò thiết yếu trong việc duy trì sức khỏe và cân bằng sinh lý của vật chủ [85]. VSVĐR bình thường hỗ trợ bảo vệ hàng rào niêm mạc ruột, tham gia chuyển hóa dinh dưỡng, cân bằng nội môi năng lượng, ức chế sự xâm nhập của mầm bệnh và điều hòa đáp ứng miễn dịch. Hoạt động trao đổi chất của VSVĐR có tác động sâu rộng đến cân bằng nội môi và nhiều bệnh lý ở người [86]. Khoảng 10% các chất chuyển hóa có trong máu của động vật có vú có nguồn gốc trực tiếp từ vi khuẩn đường ruột [85]. Thông qua quá trình lên men, VSVĐR sản xuất các fatty acid chuỗi ngắn (short chain fatty acid - SCFA) như acetate, propionate và butyrate, mang lại nhiều lợi ích như ức chế vi khuẩn gây

bệnh, duy trì chức năng ruột kết và hỗ trợ phòng ngừa béo phì, ung thư đại trực tràng [87].

Cơ thể con người chứa khoảng 38 nghìn tỷ vi khuẩn, chủ yếu tập trung ở ruột, đặc biệt là ruột kết [88]. Ít nhất 395 kiểu hình vi khuẩn đã được xác định trong niêm mạc ruột và phân, trong đó hơn 90% thuộc hai ngành chính là *Bacteroidetes* và *Firmicutes*. Trên mô hình chuột, *Proteobacteria* và *Lactobacillales* – các vi khuẩn kỵ khí phân chia nhanh – chiếm ưu thế ở ruột non, trong khi *Bacteroidales* và *Clostridiales* đóng vai trò chủ đạo trong chuyển hóa ở ruột già [89].

Việc tiêu thụ thực phẩm có nguồn gốc thực vật đã được chứng minh có tác động tích cực đến thành phần và chức năng của hệ VSVĐR. Đặc biệt, các hợp chất sinh học như polyphenol có khả năng điều chỉnh cấu trúc VSVĐR [90]. Chiết xuất thực vật không chỉ làm tăng số lượng vi khuẩn có lợi mà còn thúc đẩy sản xuất SCFA và ức chế vi khuẩn gây bệnh trên mô hình động vật [91]. Việc bổ sung chiết xuất thực vật cũng góp phần cải thiện tính đa dạng vi sinh, điều chỉnh tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* và hỗ trợ sức khỏe trong các rối loạn chuyển hóa [92]. Liang và cs. (2023) báo cáo rằng polysaccharide từ quả *Lycium barbarum* kích thích sự phát triển của *Lactobacillus* và *Lactococcus*, đồng thời gia tăng sản xuất SCFA ở chuột [93]. Pérez-Burillo và cs. (2020) báo cáo chiết xuất thực vật thúc đẩy sự phát triển của các vi khuẩn sản xuất butyrate như *Coproccoccus* và *Butyricimonas*, đồng thời ức chế *Escherichia/Shigella* – nhóm vi khuẩn liên quan đến rối loạn tiêu hóa, đồng thời tăng *Faecalibacterium*, một vi khuẩn sản xuất butyrate có lợi [87].

Polyphenol thể hiện cơ chế tương tác hai chiều với VSVĐR. Một mặt, vi khuẩn đường ruột chuyển hóa polyphenol thành các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học; mặt khác, polyphenol điều chỉnh thành phần VSVĐR, ức chế vi khuẩn gây bệnh và kích thích vi khuẩn có lợi [91,94]. Nghiên cứu của Jia và cs. (2022) cho thấy polyphenol từ gạo màu làm tăng *Prevotella*, *Megamonas* và *Bifidobacterium*, đồng thời giảm *Bacteroides* và *Escherichia-Shigella* [92]. Polyphenol từ cám gạo đen đã được chứng minh có khả năng cải thiện béo phì và rối loạn chuyển hóa bằng cách điều chỉnh thành phần VSVĐR, đồng thời tác động đến chuyển hóa lipid và glucose [95].

Các chất chuyển hóa thứ cấp từ quá trình phân giải của VSVĐR sở hữu hoạt tính chống oxy hóa và chống viêm, giúp giảm stress oxy hóa, ức chế cytokine tiền viêm, bảo vệ hàng rào niêm mạc ruột và điều hòa miễn dịch [96]. Do đó, can

thiệt dinh dưỡng dựa trên thực vật được xem là một chiến lược tiềm năng nhằm điều chỉnh hệ VSVD_R và cải thiện sức khỏe toàn diện của vật chủ.

1.6. Các phương pháp đánh giá hoạt tính chống oxy hoá

Hoạt tính chống oxy hóa của các hợp chất sinh học thường được xác định thông qua các thử nghiệm *in-vitro* dựa trên hai cơ chế chính: chuyển electron đơn (Single electron transfer – SET) và chuyển nguyên tử hydro (Hydrogen atom transfer – HAT). Trong đó, nhóm phương pháp SET định lượng khả năng của chất thử trong việc nhường electron để trung hòa các tác nhân oxy hóa hoặc ion kim loại chuyển tiếp. Cơ chế này phản ánh trực tiếp năng lực khử và có mối tương quan chặt chẽ với hàm lượng polyphenol, flavonoid cùng các hợp chất phenolic tổng số [97].

Bốn phương pháp phổ biến thuộc nhóm SET bao gồm: DPPH, ABTS (hoặc TEAC), FRAP và RP. Dù sử dụng các cơ chế oxy hóa khác nhau, các kỹ thuật này đều dựa trên nguyên lý thay đổi cường độ màu sắc của dung dịch khi cơ chất bị khử bởi các tác nhân chống oxy hóa [98].

1.6.1. Phương pháp quét gốc tự do DPPH

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) là một gốc tự do bền vững, có màu tím đặc trưng với cực đại hấp thụ tại bước sóng 517 nm. Khi tương tác với các hợp chất có khả năng cho electron hoặc proton, gốc DPPH• bị khử thành dạng phân tử không màu. Độ giảm mật độ quang (OD) tại 517 nm tỉ lệ thuận với khả năng quét gốc tự do của mẫu thử. Đây là phương pháp phổ biến nhờ quy trình thực hiện đơn giản, nhanh chóng và hiệu quả trong việc đánh giá các hợp chất phenolic [99].

1.6.2. Phương pháp năng lực chống oxy hóa tương đương Trolox (ABTS)

Thử nghiệm này dựa trên sự oxy hóa ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) để tạo thành gốc cation ABTS•⁺ có màu xanh lam, hấp thụ cực đại tại 734 nm. Các chất chống oxy hóa sẽ khử gốc cation này, làm nhạt màu dung dịch phản ứng. Hoạt tính chống oxy hóa được quy đổi về đơn vị tương đương Trolox (TEAC) – một dẫn xuất tan trong nước của vitamin E – giúp dễ dàng so sánh hiệu năng giữa các mẫu nghiên cứu. Ưu điểm nổi bật của ABTS là tính linh hoạt, có khả năng ứng dụng cho cả hệ thống ưa nước lẫn ưa dầu [99].

1.6.3. Phương pháp năng lực khử sắt (FRAP)

Phương pháp FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) dựa trên nguyên lý khử phức hợp sắt (III) tripyridyltriazine (Fe^{3+} –TPTZ) thành phức hợp sắt (II)

(Fe^{2+} –TPTZ) có màu xanh đậm, đo tại bước sóng 593 nm. Khác với DPPH hay ABTS, FRAP không đánh giá khả năng bắt gốc tự do mà tập trung vào năng lực hiến electron của chất chống oxy hóa để khử ion kim loại. Chỉ số FRAP biểu thị tiềm năng chống oxy hóa tổng thể thông qua khả năng khử trực tiếp của mẫu [98].

1.6.4. Phương pháp năng lực khử tổng số (Reducing Power – RP)

Thử nghiệm RP đánh giá khả năng hiến electron thông qua phản ứng khử ion Fe^{3+} thành Fe^{2+} trong môi trường đệm phosphate. Ion Fe^{2+} sau đó phản ứng với potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] tạo thành phức màu xanh Prussian (Prussian Blue) với đỉnh hấp thụ tại 700 nm. Độ hấp thụ quang (OD) tăng dần theo năng lực khử của mẫu, phản ánh tiềm năng chống oxy hóa của các hợp chất sinh học. So với các phương pháp khác, RP cho phép khảo sát hoạt tính khử trong điều kiện phản ứng nhẹ nhàng và phù hợp cho cả dịch chiết dung môi hữu cơ lẫn dịch chiết nước [98].

Mặc dù các phép thử DPPH, ABTS, FRAP và RP đều vận hành theo cơ chế SET, kết quả thu được có thể có sự khác biệt do tính đặc hiệu của gốc tự do, dung môi phản ứng và độ hòa tan của các hoạt chất [100]. Do đó, việc phối hợp nhiều phương pháp là cần thiết để có cái nhìn đa chiều về cơ chế và cường độ chống oxy hóa.

Đối với đối tượng nghiên cứu là BLL non, việc lựa chọn các thử nghiệm nhóm SET là hoàn toàn phù hợp. Thành phần chính của mẫu chứa hàm lượng cao polyphenol và flavonoid – những nhóm chất có cơ chế chống oxy hóa chủ đạo là hiến tặng electron và tạo phức chelate với kim loại. Sự kết hợp này không chỉ giúp khẳng định khả năng quét gốc tự do mà còn làm sáng tỏ năng lực khử kim loại, củng cố cơ sở khoa học cho việc ứng dụng BLL trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

1.7. Vi sinh vật gây bệnh sử dụng trong đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật

1.7.1. Vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (trực khuẩn mủ xanh) là vi khuẩn Gram âm, hiếu khí, thuộc họ *Pseudomonadaceae*, lớp *Gammaproteobacteria*. Vi khuẩn này nổi bật nhờ khả năng chuyển hóa linh hoạt, cho phép sinh trưởng trong nhiều môi trường tự nhiên và nhân tạo, kể cả môi trường thiếu oxy [101].

P. aeruginosa không sinh bào tử nhưng có thể gây nhiều loại nhiễm trùng trên cả vật chủ khỏe mạnh và suy giảm miễn dịch, đặc biệt nguy hiểm với bệnh nhân tiểu đường hoặc bệnh nhân xơ nang [102]. Đây là tác nhân chính của các

bệnh như nhiễm trùng vết bỏng, viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết và nhiễm trùng đường tiết niệu [103].

Khả năng thích nghi cao, nhiều cơ chế đề kháng kháng sinh và hệ thống phòng vệ phức tạp khiến *P. aeruginosa* trở thành mối đe dọa lớn trong y học hiện đại. Vi khuẩn này là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây nhiễm trùng bệnh viện, chiếm khoảng 11–13,8% các ca nhiễm tại cơ sở y tế và là tác nhân hàng đầu gây tử vong ở bệnh nhân xơ nang [104].

1.7.2. Vi khuẩn *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus là vi khuẩn hình cầu Gram dương, không di động, thuộc họ *Micrococcaceae*, có khả năng sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí hoặc kỵ khí tùy ý [105]. Vi khuẩn phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 30–37°C và pH từ 7–7,5 và có thể tồn tại trong môi trường chứa tới 10% muối, cho phép phát triển trên nhiều loại thực phẩm.

S. aureus là tác nhân phổ biến gây ngộ độc thực phẩm và nhiễm trùng ở người. Mặc dù thường cư trú ở da và niêm mạc (đặc biệt vùng mũi) của người khỏe mạnh, vi khuẩn này có thể gây bệnh nếu xâm nhập vào máu hoặc các mô sâu [105]. Các bệnh lý do *S. aureus* gây ra rất đa dạng, bao gồm nhiễm khuẩn huyết, viêm phổi, viêm nội tâm mạc, viêm mô tế bào, viêm tủy xương, viêm khớp, nhiễm trùng tiết niệu và hội chứng sốc nhiễm độc [106].

Vi khuẩn này đặc biệt nguy hiểm trong môi trường bệnh viện, là nguyên nhân hàng đầu của nhiễm trùng liên quan đến dụng cụ y tế và phẫu thuật. Các chủng kháng thuốc như MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*) làm cho việc điều trị trở nên phức tạp, trong khi các cơ chế lẩn tránh miễn dịch giúp vi khuẩn tồn tại và tái nhiễm dễ dàng [107]. Do đó, *S. aureus* được xem là một trong những tác nhân gây bệnh cơ hội nguy hiểm nhất ở người hiện nay.

1.7.3. Vi khuẩn *Escherichia coli*

Escherichia coli là vi khuẩn Gram âm, thuộc họ *Enterobacteriaceae*, thường cư trú trong đường ruột người và động vật, đặc biệt là ở ruột già. Ngoài ra, vi khuẩn còn có thể hiện diện ở miệng, cơ quan sinh dục và môi trường ngoài [108]. *E. coli* phát triển tốt ở 37°C, trong khoảng nhiệt độ 5–45°C và pH tối ưu từ 7–7,5.

Mặc dù là thành phần bình thường của hệ vi sinh đường ruột, *E. coli* cũng là tác nhân gây ra nhiều bệnh lý như viêm ruột, nhiễm trùng tiết niệu, nhiễm trùng huyết, viêm màng não ở trẻ sơ sinh. Vi khuẩn này sở hữu nhiều yếu tố độc lực có khả năng tác động đến tế bào chủ thông qua các cơ chế như ức chế truyền tín hiệu,

rối loạn tiết ion, tổng hợp protein và phá vỡ cấu trúc tế bào [109]. Dựa vào vị trí gây bệnh, *E. coli* được phân thành hai nhóm chính: nhóm gây bệnh đường ruột và nhóm gây bệnh ngoài đường ruột. Các chủng gây bệnh đường ruột bao gồm: *E. coli* xuất huyết (EHEC), *E. coli* gây bệnh (EPEC), *E. coli* sinh độc tố ruột (ETEC), *E. coli* xâm nhập (EIEC), *E. coli* kết dính (EAEC), *E. coli* bám dính lan tỏa (DAEC) và *E. coli* xâm lấn bám dính (AIEC). Trong đó, EHEC không chỉ gây bệnh tiêu hóa mà còn liên quan đến hội chứng tán huyết tăng ure máu (HUS). Nhiều chủng *E. coli* là mầm bệnh truyền qua thực phẩm, gây ra các vụ dịch nguy hiểm tại nhiều quốc gia, đặc biệt ở các nước đang và kém phát triển [110].

Tình trạng kháng thuốc của *E. coli* đang là mối đe dọa toàn cầu. Vi khuẩn có tỷ lệ kháng cao với các kháng sinh truyền thống như ampicillin, đồng thời xuất hiện ngày càng nhiều chủng kháng fluoroquinolone và cephalosporin phổ rộng. Sự lan truyền gen kháng thuốc thông qua plasmid góp phần gia tăng nhanh chóng tỷ lệ đa kháng thuốc ở *E. coli*, trở thành mối lo ngại nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng [111].

1.7.4. Nấm *Candida albicans*

Candida albicans là nấm men thuộc chi *Candida*, thường cư trú như một sinh vật cộng sinh trên da và niêm mạc miệng, đường tiêu hóa, đường sinh dục của người và động vật [112]. Đây là loài nấm cơ hội phổ biến nhất có khả năng chuyển từ trạng thái cộng sinh sang gây bệnh khi hàng rào bảo vệ của vật chủ bị suy yếu, đặc biệt trong bối cảnh sử dụng kháng sinh phổ rộng hoặc thuốc ức chế miễn dịch [113].

C. albicans là nguyên nhân gây ra các bệnh nhiễm nấm bề mặt như viêm da, viêm niêm mạc miệng, viêm âm đạo. Trong các trường hợp nghiêm trọng hơn, có thể gây nhiễm nấm toàn thân đe dọa tính mạng, đặc biệt ở bệnh nhân suy giảm miễn dịch [114]. Điều trị nhiễm *Candida* hiện gặp nhiều thách thức do số lượng thuốc chống nấm hạn chế và độc tính cao do đặc điểm nhân chuẩn của nấm [115]. Bên cạnh đó, tình trạng kháng thuốc ngày càng gia tăng ở các chủng *Candida* khiến việc điều trị càng phức tạp hơn.

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

1.8.1. Nghiên cứu ngoài nước

Các nghiên cứu quốc tế về lá lúa chủ yếu tập trung vào việc đánh giá thành phần hoá học và hàm lượng các hợp chất sinh học của lá lúa ở các giống lúa khác nhau, đặc biệt trong giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng. Chẳng hạn, Tamprasit và

cs. (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của độ tuổi lá lúa (từ 5–25 ngày) đến hàm lượng các hợp chất sinh học cho thấy sự biến đổi đáng kể theo thời gian thu hoạch [29]. Tương tự, Khanthapok và cs. (2015) đã khảo sát trên 14 giống lúa *O. sativa* bao gồm bảy giống gạo trắng và bảy giống gạo màu dao động từ 1,9 đến 4,3 mg tương đương gallic acid (GAE)/g dịch chiết khô, với các giống gạo màu thể hiện hàm lượng polyphenol cao nhất [26]. Nghiên cứu của Sakulnarmrat và cs. (2018) trên hai giống lúa (gạo trắng và gạo đen) ở giai đoạn 10 ngày tuổi cũng báo cáo thành phần và hàm lượng polyphenol thay đổi tùy thuộc vào giống lúa; Gallic acid là hợp chất phenolic chính trong dịch chiết lá lúa gạo trắng, trong khi chlorogenic acid chiếm ưu thế trong dịch chiết lá lúa gạo đen [30]. Phân tích sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS) trên các fatty acid trong lá lúa ghi nhận sự hiện diện của các fatty acid tương đồng ở cả 2 giống lúa, bao gồm palmitic acid, stearic acid, linoleic acid và α -linolenic acid. Các dẫn xuất fatty acid dễ bay hơi này được xác định là yếu tố chính tạo nên mùi hương tươi mát đặc trưng của lá lúa [30].

Về ứng dụng thực tiễn, một số nghiên cứu đã phát triển sản phẩm nước uống từ dịch chiết lá lúa. Wangcharoen và Phimphilai (2016) đã khảo sát nước uống từ dịch chiết lá lúa của ba giống (Jasmine, Sukhothai 1 và Sukhothai 2), trong 200 mL có hàm lượng chlorophyll tổng dao động từ 82–958 μ g, hàm lượng phenolic tổng tương đương 5,60–26,14 mg GAE và khả năng chống oxy hóa qua các thử nghiệm ABTS và FRAP đạt giá trị tương ứng 17,88–35,18 mg vitamin C và 5,66–23,70 mg FeSO₄ [7]. Nước uống từ lá lúa của giống Jasmine và Sukhothai 2 cho thấy có hoạt tính chống oxy hóa vượt trội so với giống Sukhothai 1, lúa mì và lúa mạch, đồng thời hàm lượng polyphenol tổng được xác định có mối tương quan chặt chẽ với hoạt tính chống oxy hóa [7]. Những kết quả này khẳng định tiềm năng của nước ép lá lúa như một loại thức uống giàu chất chống oxy hóa.

Hoạt tính chống oxy hóa của lá lúa cũng là chủ đề được quan tâm trong nhiều nghiên cứu. Chomchan và cs. (2016) đã báo cáo rằng dịch chiết lá lúa gạo có hoạt tính chống oxy hóa thấp hơn so với dịch chiết lá lúa mì trong các thử nghiệm DPPH, ABTS, FRAP, FCA (khử ion sắt) và HRSA (quét gốc hydroxyl) [6]. Tuy nhiên, kết quả này trái ngược với nghiên cứu của Wangcharoen và Phimphilai (2016), trong đó dịch chiết nước lá lúa cho hoạt tính chống oxy hóa (ABTS và FRAP) cao hơn so với dịch chiết nước lá lúa mì và lá lúa mạch [7]. Khanthapok và cs. (2015) sử dụng 14 giống lúa để đánh giá khả năng chống oxy hóa thông qua các thử nghiệm DPPH, FRAP, BCB (khử β -carotene) và TBARS (phản ứng thiobarbituric acid), kết luận rằng dịch chiết từ lá lúa màu thể hiện hoạt

tính chống oxy hóa vượt trội so với dịch chiết lá lúa trắng và lá lúa mì [26]. Nhìn chung, các nghiên cứu này khẳng định lá lúa, đặc biệt là giống lúa màu, sở hữu hoạt tính chống oxy hoá đáng kể thông qua các thử nghiệm *in-vitro*.

Về khả năng bảo vệ chống lại tổn thương oxy hóa và độc tính tế bào, Phimphilai và cs. (2021) phát hiện dịch chiết lá lúa từ giống Sukhothai-1 có khả năng loại bỏ gốc tự do ở gan, ức chế quá trình peroxid hóa lipid và thể hiện hoạt tính thải sắt FRAP [39]. Đồng thời, bổ sung dịch chiết lá lúa làm giảm đáng kể nồng độ TBARS trong tế bào ung thư gan người (HepG2) bị tổn thương bởi hydro peroxit và không gây độc tế bào gan, cũng như không gây độc tính cấp/mãn tính trên mô hình động vật [39]. Khanthapok và cs. (2015) báo cáo dịch chiết lá lúa màu chứa hàm lượng anthocyanin cao, có khả năng phục hồi tổn thương DNA do ion sắt và hydrogen peroxide gây ra [26]. Tương tự, lá lúa giống Biris (Malaysia) được ghi nhận có tác dụng bảo vệ DNA trước tổn thương do doxorubicin gây ra [116]. Ngoài ra, bổ sung dịch chiết lá lúa cải thiện đáng kể khả năng sống sót của tế bào cơ tim chuột mà không ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị doxorubicin trên tế bào ung thư [116]. Chomchan và cs. (2018) báo cáo rằng chiết xuất lá lúa (250–10.000 µg/mL) bảo vệ tế bào thận khỏi độc tính của cadmium clorua bằng cách giảm mức độ malondialdehyde và tổn thương DNA [23].

Về khả năng chống viêm và chống ung thư, chiết xuất lá lúa đen được ghi nhận có hoạt tính chống viêm thông qua điều hoà sự biểu hiện các yếu tố gây viêm [8,24]. Thepthanee và cs. (2021) đã chứng minh lá lúa đen kích thích gây chết theo chu trình (apoptosis) thông qua con đường ty thể và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư gan ở người [8]. Nghiên cứu tiếp theo của Thepthanee và cs. (2022) phân tách dịch chiết ethyl acetate từ lá lúa đen thành 5 phân đoạn, tất cả đều có hoạt tính ức chế sự phát triển của tế bào ung thư gan, vú và đại trực tràng [25].

Liên quan đến chống béo phì và tiểu đường, Sakulnarmrat và cs. (2018) phát hiện dịch chiết acetone từ lá lúa giống Jasmine ức chế mạnh mẽ enzyme α -amylase và lipase tuyến tụy, cho thấy tiềm năng trong kiểm soát béo phì và tiểu đường [30].

Tóm lại, các nghiên cứu quốc tế tập trung phân tích thành phần hợp chất sinh học trong lá lúa, so sánh hàm lượng các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa giữa các giống khác nhau. Các hoạt tính chống oxy hoá, bảo vệ DNA, chống ung thư, béo phì, tiểu đường của lá lúa đã được đánh giá thông qua một số phương pháp *in-vitro* và *in-vivo* trên tế bào và mô hình động vật. Tuy nhiên, hiện

chưa có nghiên cứu nào khảo sát sản phẩm BLL, cũng như đánh giá hiệu quả kháng khuẩn hoặc ảnh hưởng của chúng lên hệ vi sinh đường ruột.

1.8.2. Nghiên cứu trong nước

Hiện nay, các nghiên cứu trong nước chưa ghi nhận công trình nào tập trung vào việc khai thác tiềm năng của lá lúa non. Tuy nhiên, một số nghiên cứu liên quan đã được thực hiện nhằm đánh giá hàm lượng các hợp chất sinh học, khảo sát các thông số kỹ thuật trong chế biến sản phẩm thực vật dạng bột, cũng như khảo sát khả năng chống oxy hoá và kháng khuẩn từ các loài thực vật khác.

Nghiên cứu của Đỗ Tấn Khang và cs. (2018) đã so sánh hàm lượng hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hoá của các phân đoạn dịch chiết từ gạo mầm và gạo lứt. Kết quả ghi nhận hàm lượng polyphenol tổng trong phân đoạn nước của gạo lứt cao hơn gấp 4 lần so với gạo mầm [117]. Về hoạt tính chống oxy hoá, phân đoạn ethyl acetate từ gạo mầm thể hiện khả năng ức chế gốc tự do DPPH cao nhất (trên 50%) trong khi phân đoạn chloroform trong gạo lứt đạt hiệu quả cao nhất trong thử nghiệm ABTS. Ngoài ra, tất cả các phân đoạn đều cho khả năng khử sắt (RP) ở mức cao nhất [117]. La Thị Hiền và cs. (2017) đã khảo sát các điều kiện chiết xuất chất chống oxy hóa từ lá đắng (*Vernonia amygdalina*) bằng dung môi nước [118]. Kết quả cho thấy điều kiện chiết xuất tối ưu là 70°C trong 40 phút với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:30, đạt hiệu suất chiết xuất cao nhất [118].

Nghiên cứu của Võ Tú Anh và cs. (2017) đã đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và chống oxy hoá của cao chiết từ thân và lá cây Bọ Mắm (*Pouzolzia zeylanica* L.) sử dụng các dung môi khác nhau [119]. Tác giả báo cáo rằng tất cả các cao chiết đều có khả năng ức chế vi khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus*, với hiệu quả kháng khuẩn vượt trội hơn so với amoxicillin. Đồng thời, các cao chiết thân và lá Bọ Mắm thể hiện khả năng bắt gốc tự do DPPH, dù hoạt tính kháng oxy hóa thấp hơn vitamin C [119].

Cao Thị Ngọc Ánh và Mạc Thị Hà Thanh (2019) đã nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp sấy phun đến chất lượng sản phẩm bột từ cây nhàu (*Morinda citrifolia* L.) bao gồm khả năng chống oxy hoá và kháng khuẩn. Kết quả chỉ ra sấy phun ở 160°C trong 5 giây tạo ra sản phẩm bột có giá trị dinh dưỡng, hàm lượng vitamin C và polypenol tổng số cao hơn so với các mức nhiệt độ 140°C và 180°C. Hoạt tính chống oxy hoá (thử nghiệm DPPH) đạt IC₅₀ là 2,9 mg/mL, đồng thời khả năng kháng khuẩn đối với *E. coli* (đường kính vòng ức chế 4,5 mm) và *Bacillus subtilis* (3,5 mm) cũng đạt cao nhất ở điều kiện này [120].

Về chiết xuất chlorophyll và polyphenol ứng dụng trong thực phẩm, nghiên cứu của Lê Thị Hồng Ánh và cs. (2016) đã phát triển quy trình thu nhận bột màu chlorophyll từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. bằng công nghệ sấy phun. Sản phẩm thu được là bột màu xanh mịn, độ ẩm thấp, tan tốt trong nước với hiệu suất thu hồi chlorophyll đạt 62,96% [121]. Nghiên cứu của Trương Quốc Tất và cs. (2021) về sản xuất bột rau càng cua (*Peperomia pellucida*) sử dụng ethanol 70% và sấy ở 70°C đã bảo toàn hàm lượng hợp chất sinh học và đạt hoạt tính chống oxy hoá cao nhất [122]. Ngoài ra, Nguyễn Nhật Minh Phương và Nguyễn Hữu Nhân (2022) đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất chlorophyll và polyphenol từ lá dứa (*Pandanus amaryllifolius*). Điều kiện được lựa chọn là chiết xuất bằng ethanol 80% ở 80°C trong 20 phút với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:20 (w/v) đạt hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hoá cao [123]. Sử dụng chất mang albumin 10% và sấy ở 60–65°C cũng được xác định là phù hợp để ổn định các hợp chất sinh học trong sản phẩm cuối.

Tóm lại, qua tổng quan các công trình trong và ngoài nước có thể nhận thấy rằng, phần lớn các nghiên cứu hiện nay tập trung vào xác định thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính sinh học cơ bản của các dịch chiết từ lá lúa, đặc biệt là hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ tế bào thông qua các thử nghiệm *in-vitro*. Một số nghiên cứu mở rộng sang mô hình *in-vivo* đã bước đầu chứng minh tính an toàn khi tiêu thụ dịch chiết lá lúa, tuy nhiên các công trình này chủ yếu sử dụng dịch chiết lỏng, chưa đi vào quá trình ứng dụng sản xuất sản phẩm dạng bột từ lá lúa non.

Bên cạnh đó, các nghiên cứu hiện có chưa xem xét mối liên hệ giữa thành phần hợp chất sinh học của lá lúa non với tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột, cũng như chưa có công trình nào đánh giá đồng thời các đặc tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động sinh lý trong cùng một nghiên cứu tích hợp. Phần lớn các nghiên cứu trước đây chỉ dừng lại ở việc xác định hoạt tính chống oxy hóa *in-vitro* mà thiếu các bằng chứng *in-vivo* về ảnh hưởng của sản phẩm lá lúa non đến cân bằng vi sinh vật đường ruột và sức khỏe tiêu hóa động vật.

Tại Việt Nam, hiện chưa có nghiên cứu hệ thống về sản phẩm BLL hoặc bột cao chiết lá lúa non. Vì vậy, việc xây dựng quy trình thu nhận bột cao chiết lá lúa non, đồng thời đánh giá toàn diện hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột là hướng nghiên cứu mới, có ý nghĩa khoa học và giá trị ứng dụng thực tiễn, góp phần mở rộng tiềm năng khai thác cây lúa như một nguồn nguyên liệu sinh học giá trị cao, bên cạnh vai trò cây lương thực.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Thí nghiệm trồng và thu hoạch lá lúa được thực hiện tại khu thực nghiệm và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và kháng vi sinh vật được thực hiện tại Phòng Phòng Vi sinh của Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ (Địa chỉ: Số 166 Nguyễn Văn Cừ, phường An Bình, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ) trong khoảng thời gian từ tháng 07/2022 đến tháng 07/2024.

- Thí nghiệm đánh giá tác động của bột lá lúa lên hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình chuột được thực hiện tại Đơn vị nghiên cứu động vật thực nghiệm, Đại học Y Dược Cần Thơ (Địa chỉ: Số 179 Nguyễn Văn Cừ, phường An Khánh, quận Ninh Kiều, thành phố Cần Thơ) từ tháng 08/2024 đến tháng 05/2025.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

2.1.2.1. Giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

Tiêu chí lựa chọn giống lúa bao gồm:

- Khả năng kháng sâu bệnh tốt, giúp đảm bảo sinh trưởng ổn định và giảm tác động của dịch hại trong điều kiện canh tác bán tự nhiên.

- Khả năng thích nghi tốt trên nhiều loại đất, đặc biệt là các loại đất khó như đất nhiễm phèn, đất thấp, và có khả năng chịu ngập úng.

- Tiềm năng sinh khối cao, đặc biệt là sinh khối lá tươi, nhằm tối ưu hóa hàm lượng các hợp chất tự nhiên tích lũy trong lá lúa non.

Dựa vào tiêu chí, nghiên cứu lựa chọn 6 giống lúa bao gồm hai giống thuộc nhóm lúa mùa truyền thống (lúa thơm và lúa có màu sắc) và một giống cao sản (Bảng 2.1).

Bảng 2.1. Các giống lúa sử dụng trong nghiên cứu

Nhóm giống lúa	Giống lúa – Ký hiệu	Đặc điểm sinh học và canh tác
Giống lúa cao sản	IR50404	Giống lúa cao sản được trồng phổ biến tại Đồng bằng sông Cửu Long. Có thời gian sinh trưởng ngắn, năng suất cao, dễ canh tác. Tuy nhiên, chất lượng gạo trung bình do hàm lượng amylose cao và tỷ lệ bạc bụng lớn.

Nhóm giống lúa	Giống lúa – Ký hiệu	Đặc điểm sinh học và canh tác
	Nàng Thơm – NTH	Giống lúa bản địa có hương thơm đặc trưng, giá trị cảm quan cao, được ưa chuộng tại thị trường trong nước và xuất khẩu.
Giống lúa thơm	Tài Nguyên – TNG	Giống lúa mùa truyền thống, có mùi thơm tự nhiên, được trồng rộng rãi tại khu vực ĐBSCL.
	Hương Lài – HLA	Còn gọi là Jasmine 85, là giống lúa thơm được lai tạo và cải tiến từ IRRI, có giá trị thương mại cao.
Giống lúa có màu sắc đặc biệt	Nếp Tím – NTI	Giống lúa bản địa có vỏ trấu màu tím, giàu anthocyanin, tiềm năng sử dụng trong sản phẩm gạo chức năng và dược liệu.
	Huyết Rồng – HRO	Giống lúa bản địa có hạt màu đỏ sẫm, chứa nhiều hợp chất phenolic và anthocyanin, được định hướng phát triển trong lĩnh vực thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Tất cả các giống được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Tập đoàn Lộc Trời (Địa chỉ: Số 23 Hà Hoàng Hồ, Phường Mỹ Xuyên, Thành phố Long Xuyên, Tỉnh An Giang).

2.1.2.2. Chứng vi sinh vật sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật

Thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật được thực hiện trên ba chủng vi khuẩn chuẩn gồm: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6432, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và *Escherichia coli* ATCC 8739. Ngoài ra, chủng nấm gây bệnh thường gặp *Candida albicans* ATCC 10231 cũng được sử dụng để đánh giá khả năng kháng nấm. Các chủng vi sinh vật được lựa chọn là những nhóm đại diện tiêu biểu, phổ biến và có ý nghĩa lâm sàng trong đánh giá phổ kháng khuẩn và kháng nấm, đồng thời có cấu trúc tế bào đa dạng và phù hợp với tiêu chuẩn nghiên cứu khoa học. Điều này giúp đánh giá toàn diện tiềm năng kháng vi sinh vật của BLL và hỗ trợ định hướng ứng dụng thực tế.

Tất cả các chủng vi sinh vật trên được cung cấp bởi Phòng Vi sinh vật, Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ.

2.1.2.3. Động vật thí nghiệm

Chuột thí nghiệm thuộc chủng BALB/c (*Mus musculus*), 8 tuần tuổi, khỏe mạnh, không mang mầm bệnh. Chuột được cung cấp bởi Đơn vị nghiên cứu động vật thực nghiệm, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

2.1.2.4. Đất và nước sử dụng trong thí nghiệm

Đất trồng được thu thập từ lớp đất mặt (0–20 cm) tại khu vực ruộng lúa thuộc phường An Bình, thành phố Cần Thơ. Đây là loại đất phù sa có độ phì đồng đều, địa hình bằng phẳng và khả năng giữ nước tốt, phù hợp cho sự sinh trưởng của cây lúa.

Nước tưới được cung cấp từ hệ thống nước máy của Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ, đảm bảo sạch và an toàn trong suốt quá trình thí nghiệm.

2.1.3. Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

Hóa chất bao gồm các chất chuẩn, thuốc thử và dung môi sử dụng trong các phân tích: Trolox (Sigma-Aldrich, USA), DPPH (Tokyo Chemical Industry, Japan), TPTZ (Sigma-Aldrich, Germany), ABTS (Sigma-Aldrich, Germany), $K_3Fe(CN)_6$ (Xilong, China), gallic acid (Sigma-Aldrich, USA), ethanol và methanol (Merck, Germany), acetonitrile (Merck, Germany), thuốc thử Folin–Ciocalteu (Merck, Germany), Na_2CO_3 , pyrocatechol, polyethylene glycol, NaH_2PO_4 , H_2O_2 , cồn tuyệt đối C_2H_5OH , $MgSO_4$, NaCl, trisodium citrate $Na_3C_6H_5O_7$, disodium citrate sesquihydrate $C_{12}H_{18}Na_4O_{17}$ (Sigma-Aldrich, USA), ampicillin (Domesco, Việt Nam), metronidazol (STADA, Việt Nam), vitamin C (DMS-Firmenich, China), maltodextrin DE 10-12 (VMC Group, Indonesia).

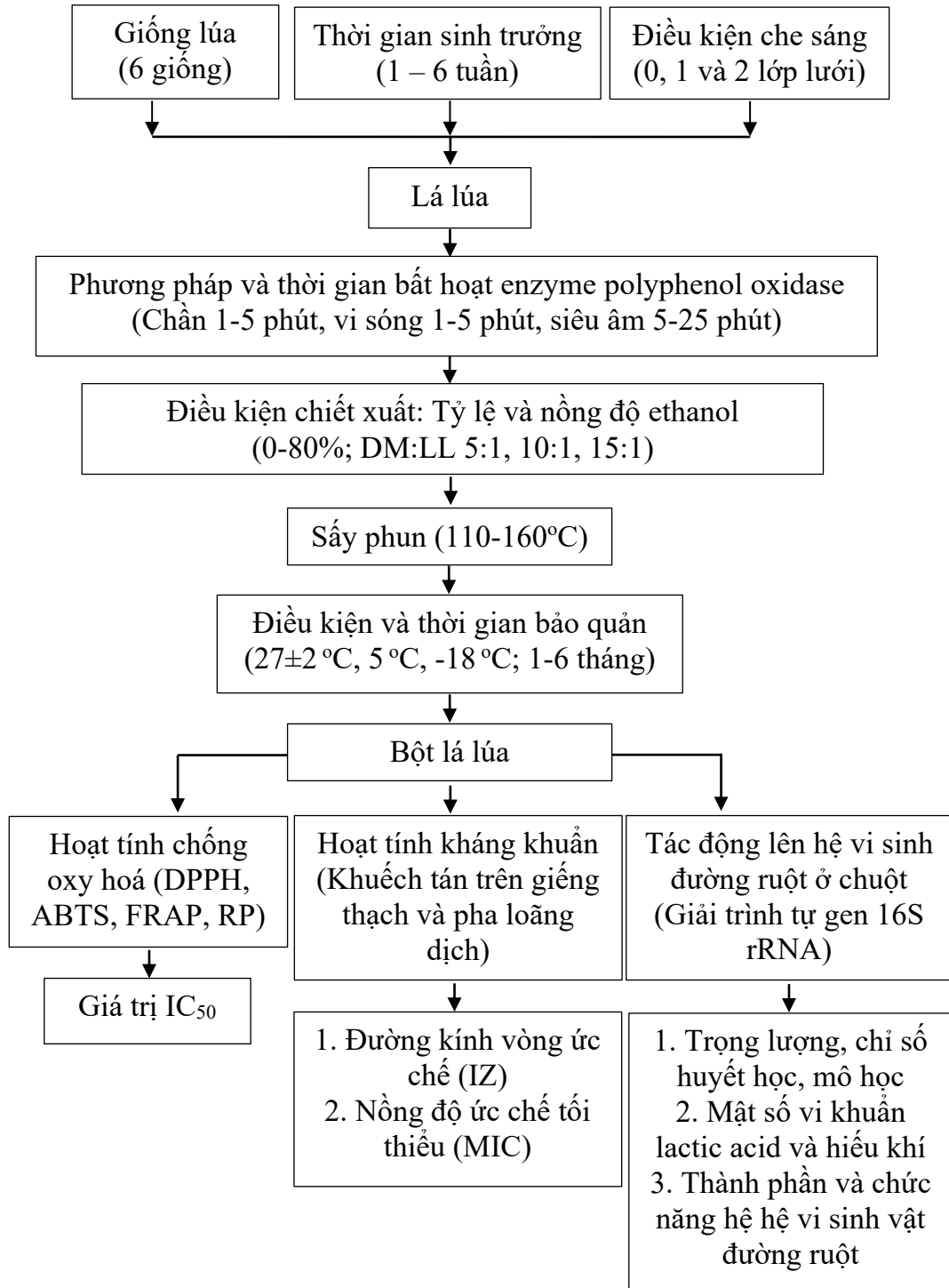
Môi trường vi sinh: Peptone, yeast extract (China), agar (Việt Nam).

Thiết bị: Máy đo phổ hấp thụ UV-VIS (Genesys 150, Thermo Scientific, Hoa Kỳ), Hệ thống sắc ký khí khối phổ GC-MS/MS (7890B-7000C, Agilent, Hoa Kỳ), Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (Alliance E2695, Waters, Hoa Kỳ), Máy ly tâm lạnh (Hermle Z326K, Labnet, Hoa Kỳ/Đài Loan), Cân kỹ thuật 4 số và 2 số (Pioneer PX, Ohaus, Hoa Kỳ/Trung Quốc), Máy sấy phun (ADL311SA, Yamato, Nhật Bản), Máy sấy đông khô (ScanVac CoolSafe 110-4, Labogene, Đan Mạch), Máy khuấy từ gia nhiệt, máy vortex (MSH-20D & VX-200, Labnet, Hoa Kỳ/Mexico), Pipetman (Proline Plus, MRC, Israel/Trung Quốc), nồi hấp tiệt trùng (CLG-32L, ALP, Nhật Bản), Tủ sấy (UN55, Memmert, Đức), tủ lạnh 2–8 °C và tủ âm sâu –20 °C (ULUF 450, Arctiko, Đan Mạch), Lò vi sóng điện tử (R-75MT, Sharp, Nhật Bản/Trung Quốc).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sơ đồ thí nghiệm chung

Quy trình thí nghiệm được tóm tắt trong sơ đồ hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ thí nghiệm chung

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

2.2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của giống lúa, điều kiện sinh trưởng và thời điểm thu hoạch đến hoạt tính chống oxy hóa và hàm lượng hợp chất trong lá lúa non

Bố trí thí nghiệm 1. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với ba nhân tố: giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng. Mỗi tổ hợp thí nghiệm được lặp lại ba lần.

Nhân tố giống lúa: Gồm sáu giống được ký hiệu là IR504 (IR50404), NTH (Nàng Thơm), TNG (Tài Nguyên), HLA (Hương Lài), NTI (Nếp Tím) và HRO (Huyết Rồng).

Nhân tố thời gian sinh trưởng: Bao gồm sáu giai đoạn thu hoạch tương ứng với 1, 2, 3, 4, 5 và 6 tuần sau gieo.

Nhân tố điều kiện ánh sáng: Không che sáng (ngoài trời hoàn toàn), cường độ ánh sáng dao động từ 49.369–123.207 Lux. Che sáng bằng một lớp lưới polyetylen màu đen (OOKAS, Đức), giảm 60% cường độ ánh sáng tự nhiên, tương ứng 16.178–48.447 Lux. Che sáng bằng hai lớp lưới, giảm 90% cường độ ánh sáng tự nhiên, tương ứng 5.738–12.151 Lux.

Thí nghiệm được thực hiện ngoài trời trong khung giờ từ 08:00 đến 16:00, với nhiệt độ trung bình ghi nhận từ 24,5°C (tối thiểu) đến 32,6°C (tối đa).

Ghi chú: Thí nghiệm được bố trí với ba mức cường độ chiếu sáng được thiết kế có chủ đích khoa học nhằm đánh giá phản ứng sinh lý – sinh hóa của cây lúa non dưới các mức ánh sáng khác nhau. Ánh sáng là yếu tố môi trường then chốt chi phối quá trình quang hợp và sinh tổng hợp các hợp chất phenolic, flavonoid và chlorophyll, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính sinh học của lá lúa non. Mặc dù điều kiện che sáng không phản ánh mô hình canh tác phổ biến, song đây là phương pháp nghiên cứu sinh lý thực vật được ứng dụng rộng rãi để mô phỏng các trạng thái sinh thái khác nhau như mật độ trồng dày, che bóng tự nhiên hoặc vùng ánh sáng yếu.

Tiến hành thí nghiệm 1. Hạt giống được rửa sạch và ngâm trong nước ấm (40–50°C) trong 24 giờ, sau đó ủ ẩm bằng vải thưa trong 48 giờ để kích thích nảy mầm. Đất phù sa bề mặt được thu tại địa điểm thực nghiệm, cho vào khay nhựa (kích thước 65 × 42 × 16 cm, khối lượng 25 kg/khay) và để ổn định 1 ngày trước khi gieo. Hạt được gieo với mật độ 200 hạt/khay (xấp xỉ 500 hạt/m², khoảng cách giữa các hạt 1–2 cm). Các khay được đặt trong điều kiện ánh sáng tương ứng và tưới nước hai lần mỗi ngày.

Chế độ bón phân bao gồm: Đạm (urea) bón sau 7 ngày tuổi với liều lượng 1–2 g pha trong 5 L nước/m²; Phân NPK bón bổ sung sau 14 và 28 ngày tuổi với liều lượng 0,5–1 g/m².

Thu mẫu và xử lý mẫu. Lá lúa được thu hoạch định kỳ theo tuần, lúc 9 giờ sáng, sau đó được nghiền ngay để thu dịch chiết. Một phần mẫu được xử lý và bảo quản ở –20°C để phân tích GC-MS. Việc xử lý, định mức thể tích và bơm mẫu vào thiết bị được thực hiện đồng nhất giữa các nghiệm thức.



Hình 2.2. Lúa được trồng trong các khay nhựa điều kiện ngoài trời tại Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ Cần Thơ.

Chỉ tiêu phân tích. Hàm lượng chlorophyll tổng xác bằng phương pháp đo quang phổ; Hàm lượng polyphenol tổng theo phương pháp Folin-Ciocalteu; Hàm lượng chất xơ hòa tan; Hoạt tính chống oxy hóa thông qua thử nghiệm DPPH; Phân tích GC-MS thực hiện trên các mẫu đại diện tại một số thời điểm sinh trưởng để xác định thành phần hợp chất sinh học đặc trưng.

2.2.2.2. Khảo sát quy trình công nghệ thu nhận BLL

Thí nghiệm 2.1. Ảnh hưởng của phương pháp và thời gian bất hoạt enzyme đến hàm lượng chlorophyll và polyphenol.

Bố trí thí nghiệm 2.1. Thí nghiệm được thiết kế theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại. Nhân tố khảo sát bao gồm phương pháp và thời gian bất hoạt enzyme được thực hiện như sau:

- Phương pháp chần: Mẫu lá lúa được chần trong nước sôi (100°C) với tỷ lệ nguyên liệu:nước là 1:20 (w/v) để đảm bảo nhiệt độ không bị sụt giảm đột ngột khi bổ sung nguyên liệu. Sau thời gian xử lý (1, 2, 3, 4, 5 phút), mẫu được vớt ra và làm lạnh ngay lập tức trong nước đá (4°C) để dừng tác động nhiệt của quá trình chần.

- Phương pháp vi sóng: Sử dụng lò vi sóng điện tử R75MT (Sharp, Nhật Bản) vận hành ở tần số 2450 MHz với công suất thiết lập là 600 W. Mẫu được rải đều trong cốc thủy tinh chịu nhiệt, đặt tại tâm đĩa xoay để đảm bảo phân bố nhiệt đồng đều lên toàn bộ khối lá.

- Phương pháp siêu âm: Mẫu được xử lý trong bể rửa siêu âm Elmasonic S 300H (Elma, Đức) vận hành ở tần số 37 kHz và công suất hiệu dụng 300 W. Tần số này được lựa chọn dựa trên nghiên cứu của Ji và cs. (2022) [124], cho thấy hiệu quả cao trong việc trích ly hợp chất polyphenol từ lá thực vật mà vẫn hạn chế sự phân hủy nhiệt. Để kiểm soát nhiệt độ sinh ra do hiệu ứng xâm thực (cavitation) và duy trì nhiệt độ mẫu $< 40^{\circ}\text{C}$, nước trong bể được thay thế định kỳ mỗi 10 phút và kết hợp bổ sung đá lạnh vào khoang nước bao quanh cốc chứa mẫu.

Mỗi phương pháp được khảo sát tại 5 mức thời gian khác nhau: chân và vi sóng (1, 2, 3, 4 và 5 phút), siêu âm (5, 10, 15, 20 và 25 phút) [125]. Đối chứng là mẫu không xử lý bất hoạt enzyme.

Tiến hành thí nghiệm 2.1. Lá lúa non từ giống có hoạt tính chống oxy hóa cao được thu hoạch theo điều kiện được lựa chọn từ thí nghiệm 1. Sau xử lý bất hoạt enzyme theo các điều kiện nêu trên, mẫu được nghiền và thu dịch chiết để phân tích.

Chỉ tiêu phân tích. Hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính enzyme polyphenol oxidase trước và sau xử lý để tính toán tỷ lệ tổn thất và hiệu quả ức chế enzyme.

Thí nghiệm 2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ và nồng độ ethanol đến hiệu quả chiết xuất hợp chất chống oxy hóa.

Bố trí thí nghiệm. Thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên, hai nhân tố: nồng độ ethanol (0%, 20%, 40%, 60%, 80%) và tỷ lệ dung môi/lá lúa (5:1, 10:1, 15:1), mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần [63].

Tiến hành thí nghiệm. Lá lúa non sau khi được xử lý bất hoạt enzyme (theo điều kiện được lựa chọn từ thí nghiệm 2.1) được nghiền mịn và trích ly bằng ethanol theo các tỷ lệ và nồng độ khảo sát. Dịch chiết được cô quay ở 45°C để loại dung môi và chuẩn hóa thể tích trước khi tiến hành các phân tích hóa học.

Chỉ tiêu phân tích. Hàm lượng chlorophyll và polyphenol tổng.

Thí nghiệm 2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến chất lượng BLL

Bố trí thí nghiệm. Thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên với sáu mức nhiệt độ sấy phun ($110\text{--}160^{\circ}\text{C}$) và một nghiệm thức đối chứng bằng sấy đông khô (-85°C).

Maltodextrin (DE 10–12) nồng độ 10% (w/v) được sử dụng làm chất mang, mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần [82].

Tiến hành thí nghiệm. Dịch lá lúa non sau khi trích ly ethanol (thí nghiệm 2.2) được bổ sung chất mang Maltodextrin (DE 10–12) nồng độ 10% (w/v) và đem sấy bằng máy sấy phun với tốc độ dòng 7–8 mL/phút. Đối với đối chứng, mẫu được sấy đông khô đến khi đạt độ ẩm 5%.

Chỉ tiêu phân tích. Hàm lượng chlorophyll, polyphenol, flavonoid, xơ hòa tan và khả năng khử gốc tự do (DPPH).

Thí nghiệm 2.4. Ảnh hưởng của điều kiện bảo quản đến chất lượng BLL.

Bố trí thí nghiệm. Thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên với hai nhân tố: nhiệt độ bảo quản (nhiệt độ phòng 27 ± 2 °C, 5 °C và -18 °C) và thời gian bảo quản (1–6 tháng), mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần.

Điều kiện nhiệt độ phòng được áp dụng theo khuyến nghị của tiêu chuẩn TCVN ISO/TS 22002-5:2023 về kiểm soát môi trường lưu trữ trong chuỗi sản xuất thực phẩm nhằm đảm bảo tính ổn định của các hợp chất có hoạt tính sinh học trong suốt thời gian lưu trữ [126]. Nhiệt độ lạnh và đông được lựa chọn tham khảo từ các nghiên cứu trước đây trong bảo quản bột thực vật chứa polyphenol và hợp chất nhạy nhiệt [127].

Tiến hành thí nghiệm. Mẫu BLL (5 g) được phân phối vào ống ly tâm 15 mL làm từ nhựa polypropylen, nắp kín, có bọc giấy nhôm nhằm hạn chế tiếp xúc với ánh sáng và độ ẩm. Mẫu sau đó được bảo quản ở các điều kiện nhiệt độ đã nêu trong thời gian 6 tháng. Nhiệt độ được theo dõi bằng thiết bị ghi nhiệt độ tự động và điều chỉnh về ± 2 °C.

Chỉ tiêu theo dõi. Hàm lượng chlorophyll, polyphenol, xơ hòa tan và hoạt tính khử gốc tự do DPPH tại các thời điểm bảo quản.

2.2.2.3. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá, kháng vi sinh vật và tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột

Thí nghiệm 3.1. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của BLL thông qua các thử nghiệm loại bỏ gốc tự do DPPH, ABTS, năng lực khử (Reducing Power – RP) và khả năng khử sắt (Ferric Reducing Antioxidant Power – FRAP).

Bố trí thí nghiệm 3.1. Thiết kế theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 10 mức nồng độ BLL (1–10%, w/v), lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức.

Tiến hành thí nghiệm 3.1. BLL được hòa tan trong nước cất để thu được 10 mức nồng độ từ 1–10% (w/v). Hỗn dịch được khuấy kỹ, sau đó lọc qua giấy lọc Whatman số 1 để loại bỏ phần không tan. Tiến hành xác định hàm lượng

chlorophyll tổng, polyphenol tổng, xơ hòa tan và hoạt tính chống oxy hóa qua các thử nghiệm chống oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP, RP). Hiệu quả chống oxy hóa được so sánh với vitamin C qua giá trị IC_{50} .

Chỉ tiêu phân tích. Giá trị IC_{50} thông qua các thử nghiệm nêu trên.

Thí nghiệm 3.2. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của BLL thông qua phương pháp khuếch tán trên thạch (đường kính vòng ức chế – IZ) và phương pháp pha loãng dịch (xác định nồng độ ức chế tối thiểu – MIC).

Bố trí thí nghiệm 3.2. Thí nghiệm được thiết kế theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm ba lần lặp lại cho mỗi nồng độ của BLL (500, 1000, 2000, 4000 và 8000 $\mu\text{g/mL}$), được hòa tan trong dung dịch DMSO 30% (v/v). Ampicillin (100 $\mu\text{g/mL}$) và metronidazol (100 $\mu\text{g/mL}$) lần lượt được sử dụng làm đối chứng dương cho vi khuẩn và nấm. DMSO 30% được sử dụng làm đối chứng âm.

Chủng vi sinh vật sử dụng gồm *P. aeruginosa* ATCC 6432, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739 và *C. albicans* ATCC 10231. Vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường Luria-Bertani (LB) và nấm trên môi trường Sabouraud dextrose (SD).

Tiến hành thí nghiệm 3.3. Các chủng vi khuẩn và nấm men được hoạt hóa bằng cách nuôi cấy trong môi trường lỏng và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, tế bào được thu hồi và pha loãng trong dung dịch NaCl 0,85% vô trùng, sau đó chuẩn hóa mật độ đục tương ứng với chuẩn McFarland 0,5 ($OD_{600} \approx 0,08-0,10$), tương đương khoảng $1,5 \times 10^8$ CFU/mL đối với vi khuẩn và $1-5 \times 10^6$ CFU/mL đối với nấm men *C. albicans*. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của BLL được đánh giá bằng hai phương pháp: khuếch tán trên thạch xác định đường kính vòng ức chế (IZ) và pha loãng dịch trong môi trường lỏng nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Chỉ tiêu phân tích. Đường kính vùng ức chế (mm), giá trị MIC ($\mu\text{g/mL}$).

Thí nghiệm 3.3. Khảo sát tác động của tiêu thụ BLL đến hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình chuột.

Mục tiêu. Đánh giá ảnh hưởng của việc tiêu thụ BLL đến hệ vi sinh đường ruột chuột thông qua 1) Nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường thạch xác định tổng số vi khuẩn lactic acid (Lactic acid bacteria–LAB) và tổng số vi khuẩn hiếu khí (Aerobic bacteria–AeB) trong mẫu phân; 2) Giải trình tự gen 16S rDNA của hệ vi sinh vật trong mẫu phân; 3) Đánh giá tác động của tiêu thụ BLL lên chỉ số sinh lý chuột (chỉ số huyết học, mô học và trọng lượng chuột).



Hình 2.3. Bố trí thí nghiệm chuột tiêu thụ BLL

Bố trí thí nghiệm 3.3. Thí nghiệm sử dụng tổng cộng 45 con chuột BALB/c (8 tuần tuổi, khỏe mạnh, không mang mầm bệnh), được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm xử lý ($n = 5$ mỗi nhóm, lặp lại ba lần). Các nhóm bao gồm: nhóm đối chứng âm (PCDC) được cho ăn khẩu phần tiêu chuẩn và uống nước cất; nhóm PC150 được cho ăn khẩu phần tiêu chuẩn và bổ sung BLL với liều 150 mg/kg thể trọng/ngày; và nhóm PC300 được cho ăn khẩu phần tiêu chuẩn và bổ sung BLL với liều 300 mg/kg thể trọng/ngày. Liều lượng BLL được lựa chọn tham khảo từ

ngiên cứu của Phimphilai và cs. (2021) [39]. Thời gian xử lý kéo dài trong 14 ngày liên tục.

Tiến hành thí nghiệm 3.3. Thí nghiệm được tiến hành tuân thủ theo hướng dẫn của Hội đồng đạo đức Trường Đại học Y Dược Cần Thơ (số 25.002.GV.NT/PCT-HĐĐĐ). Trước khi tiến hành, chuột được nuôi thích nghi trong các lồng nhựa chuyên dụng trong thời gian một tuần. Điều kiện môi trường nuôi chuột được duy trì ổn định với nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $55 \pm 10\%$, và chu kỳ sáng–tối 12:12 giờ (ánh sáng từ 7:00 đến 19:00) (Hình 2.3). Trong suốt thời gian thí nghiệm, chuột được cung cấp đầy đủ nước uống và thức ăn hỗn hợp dạng viên tiêu chuẩn, không hạn chế về khẩu phần ăn theo hướng dẫn của các nghiên cứu trước đó [128].

Sau thời gian thích nghi một tuần, chuột trong các nhóm xử lý được cho uống BLL bằng phương pháp bơm dạ dày, sử dụng kim đầu tù, với dung dịch đã pha loãng bằng nước cất (Hình 2.4). Nhóm đối chứng được cho uống nước cất theo cách tương tự. Thời điểm cho uống cố định lúc 13:00 giờ mỗi ngày, trong 14 ngày liên tiếp. Liều lượng BLL được hiệu chỉnh theo cân nặng chuột mỗi ngày, tương ứng khoảng 3,3–3,5 mg BLL/chuột/ngày (PC150) và 6,6–6,8 mg BLL/chuột/ngày (PC300).



Hình 2.4. Chuột cho uống BLL bằng kim đầu tù

Trọng lượng cơ thể của chuột được đo tại hai thời điểm (ngày 0 và ngày 14 của thí nghiệm) nhằm đánh giá mức tăng trọng (weight gain) của ba nhóm thí nghiệm.

Để xác định mật số vi khuẩn LAB và AeB, mẫu phân được thu thập riêng biệt theo từng lồng nuôi, với ba lần lặp lại cho mỗi nhóm chuột thí nghiệm.

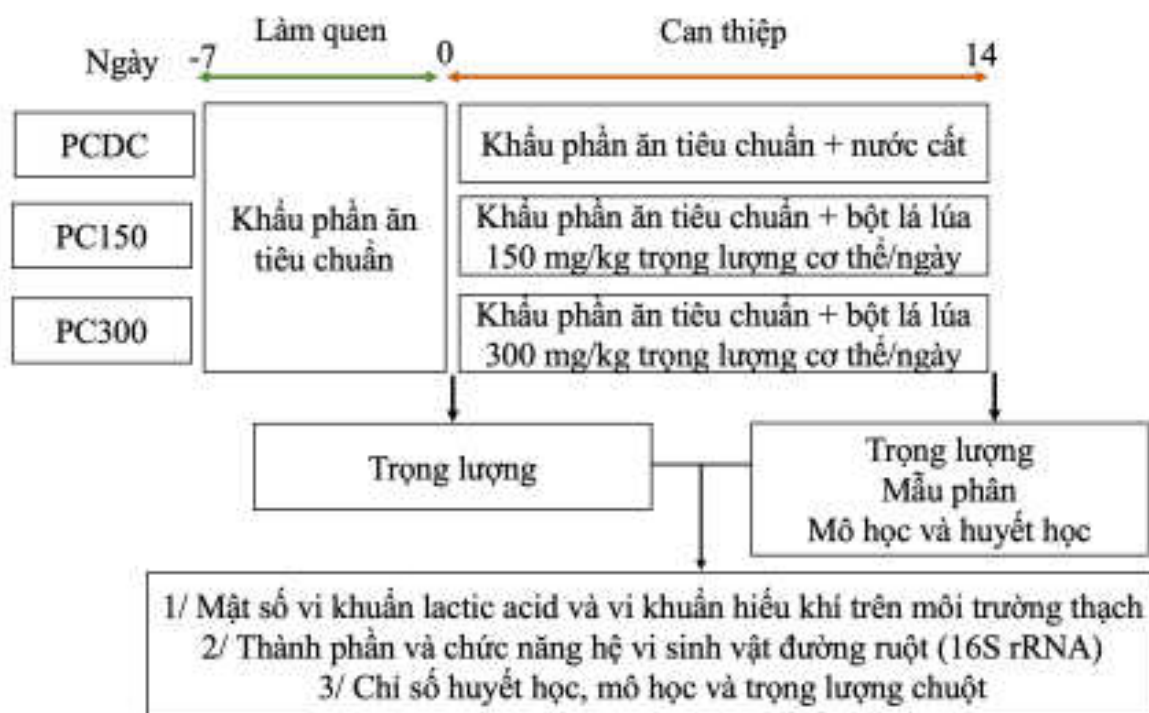


Hình 2.5. Thu nhận mẫu phân chuột

Đối với phân tích thành phần hệ vi sinh vật đường ruột bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA, mẫu phân được thu thập theo phương pháp gộp, tức là thu từ từng cá thể chuột, sau đó gộp theo nhóm ($n = 15$ chuột/nhóm) để tạo thành một mẫu đại diện cho mỗi nhóm thí nghiệm.

Mẫu phân được thu vào buổi sáng sau 14 ngày thí nghiệm, ngay sau khi bài tiết, bằng cách nhẹ nhàng nâng chuột và thu gom trực tiếp phân tươi vào ống falcon vô trùng (Hình 2.5). Các ống chứa mẫu được dán nhãn đầy đủ và bảo quản ngay ở -80°C cho đến khi tiến hành phân tích. Riêng phần mẫu dùng cho nuôi cấy vi sinh vật được xử lý trong vòng 1 giờ sau khi thu để đảm bảo độ sống và số lượng vi khuẩn chính xác. Sau thời gian thí nghiệm, chuột được gây mê bằng diethyl ether để lấy mẫu máu qua phương pháp chọc tim. Mẫu máu sau đó được bảo quản ở -80°C để phân tích các chỉ số huyết học. Sau khi lấy máu, chuột được kết thúc bằng phương pháp trật đốt sống cổ và thu mẫu ruột non để tiến hành phân tích hình thái mô học.

Sơ đồ thí nghiệm 3.3



Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm 3.3

2.3. Các phương pháp phân tích

2.3.1. Ly trích dịch lá lúa

Dịch chiết lá lúa được thu nhận theo phương pháp của Tamprasit và cs. (2019) với một số điều chỉnh [29]. Lá lúa tươi sau khi thu hoạch được rửa sạch, để ráo ở nhiệt độ phòng và cắt thành đoạn nhỏ (0,2–0,5 cm). Mẫu được cân 1 g, nghiền mịn và chiết bằng 10 mL ethanol 80% (v/v). Hỗn hợp chiết được lọc qua giấy lọc Whatman số 4. Dịch lọc sau đó được cô quay chân không ở nhiệt độ dưới 45 °C để loại bỏ ethanol và tái định mức về thể tích ban đầu bằng nước cất. Dịch chiết thô được bảo quản ở -18 °C để phục vụ các phân tích tiếp theo.

2.3.2. Phân tích hàm lượng chlorophyll tổng

Hàm lượng chlorophyll được xác định theo phương pháp của Rajalakshmi và Banu (2015) với một số điều chỉnh [129]. Một gram lá lúa tươi được cắt nhỏ, nghiền với 40 mL ethanol 80% (v/v), sau đó ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch nổi (supernatant) chứa chlorophyll được thu lại, trong khi phần cặn được tiếp tục trích ly bằng ethanol mới. Quá trình trích ly và ly tâm được lặp lại nhiều lần cho đến khi phần cặn không còn màu xanh. Các dịch chiết được gộp chung, sử dụng để đo độ hấp thụ ánh sáng bằng phổ UV-Vis.

Dung dịch chiết được đo độ hấp thụ tại hai bước sóng đặc trưng là 645 nm (A_{645}) và 663 nm (A_{663}), với mẫu trắng là ethanol tuyệt đối. Độ hấp thụ tại các bước sóng này phản ánh hàm lượng các sắc tố chlorophyll có trong mẫu. Hàm

lượng chlorophyll tổng số, chlorophyll a và chlorophyll b được tính toán theo các công thức sau:

$$+ \text{Chlorophyll tổng } (\mu\text{g/mL}) = 20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$$

$$+ \text{Chlorophyll a } (\mu\text{g/mL}) = 12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$$

$$+ \text{Chlorophyll b } (\mu\text{g/mL}) = 22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}$$

2.3.3. Phân tích hàm lượng polyphenol tổng

Hàm lượng polyphenol tổng trong dịch chiết lá lúa được xác định theo phương pháp Folin–Ciocalteu có điều chỉnh, dựa trên mô tả của Tamprasit và cs. (2019) [29]. Một gram lá lúa tươi được cắt nhỏ, nghiền trong cối sứ và chiết bằng 10 mL ethanol 80% (v/v). Dịch chiết được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 5 phút và phần dịch nổi được thu để phân tích.

Hỗn hợp phản ứng gồm 0,5 mL dịch chiết, 2,5 mL thuốc thử Folin–Ciocalteu (pha loãng 10 lần) và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó, thêm 2 mL dung dịch Na_2CO_3 1 M và định mức thể tích lên 10 mL bằng nước cất. Hỗn hợp được lắc đều và ủ trong điều kiện tối ở nhiệt độ phòng trong 90 phút. Độ hấp thụ quang được đo tại bước sóng 750 nm bằng máy quang phổ UV-VIS ($\lambda_{\text{max}} = 750 \text{ nm}$). Hàm lượng polyphenol tổng được biểu thị dưới dạng mg tương đương gallic acid (GAE)/g lá tươi.

Công thức tính: $P = (a \times k \times V) / (1000 \times m)$. Trong đó: P: Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g mẫu tươi); a: Nồng độ polyphenol tương đương gallic acid của mẫu, xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); V: thể tích toàn bộ dịch chiết (mL); m: Khối lượng mẫu lá lúa tươi (g); k: Hệ số pha loãng (nếu có).

Xây dựng đường chuẩn gallic acid

Dung dịch chuẩn gallic acid 1000 ppm được pha bằng cách hòa tan 0,1 g gallic acid vào ethanol và định mức lên 100 mL. Sau đó, pha loãng thành các nồng độ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 và 100 $\mu\text{g/mL}$.

Mỗi 0,5 mL dung dịch gallic acid được trộn với 5 mL thuốc thử Folin–Ciocalteu 10%, sau 5 phút thêm 4 mL Na_2CO_3 1 M và định mức lên 10 mL. Hỗn hợp được giữ trong điều kiện tối trong 90 phút, sau đó đo độ hấp thụ tại bước sóng 750 nm. Đường chuẩn được xây dựng từ dữ liệu độ hấp thụ và nồng độ gallic acid để phục vụ việc tính toán polyphenol tổng trong mẫu nghiên cứu.

2.3.4. Xác định tỷ lệ tổn thất chlorophyll và polyphenol

Tỷ lệ tổn thất chlorophyll và polyphenol được xác định dựa trên sự thay đổi hàm lượng của các hợp chất này trước và sau khi xử lý bất hoạt enzyme (chần, vì

sóng, siêu âm). Hàm lượng chlorophyll và polyphenol được xác định theo phương pháp đã mô tả tại Mục 2.3.2 và 2.3.3.

Giá trị tổn thất (%) được tính theo công thức: Tỷ lệ tổn thất (%) = $100 - [(C_{\text{sau}}/C_{\text{trước}}) \times 100]$. Trong đó: $C_{\text{trước}}$: Hàm lượng hợp chất (chlorophyll hoặc polyphenol) trong mẫu lá trước xử lý bất hoạt enzyme ($\mu\text{g/mL}$ hoặc mg GAE/g); C_{sau} : Hàm lượng hợp chất (chlorophyll hoặc polyphenol) trong mẫu lá sau khi xử lý bất hoạt enzyme ($\mu\text{g/mL}$ hoặc mg GAE/g).

Kết quả được biểu diễn dưới dạng tỷ lệ phần trăm (%) tổn thất, phản ánh mức độ biến đổi hoặc hao hụt của hợp chất do tác động của từng phương pháp và thời gian xử lý.

2.3.5. Phân tích hàm lượng flavonoid tổng

Hàm lượng flavonoid tổng trong dịch chiết lá lúa được xác định theo phương pháp của Sen và cs. (2013) với một số điều chỉnh phù hợp [130]. Một mililít dịch chiết được cho vào ống eppendorf, sau đó thêm 1.000 μL nước cất và 200 μL dung dịch NaNO_2 5%. Hỗn hợp được để phản ứng trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp tục thêm 200 μL dung dịch AlCl_3 10% và ủ tiếp 6 phút. Sau đó, bổ sung 2.000 μL dung dịch NaOH 1 M và 600 μL nước cất để đạt tổng thể tích 5 mL. Dung dịch thu được được trộn đều và đo độ hấp thụ ở bước sóng 510 nm bằng máy quang phổ UV-VIS. Hàm lượng flavonoid tổng được tính toán dựa trên đường chuẩn với quercetin trong khoảng nồng độ 10–100 $\mu\text{g/mL}$, kết quả được biểu thị dưới dạng miligam tương đương quercetin (QE)/g mẫu tươi.

Công thức tính: $F = (c \times k \times V)/(1000 \times m)$. Trong đó: F: Hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g mẫu); c: Nồng độ quercetin tương ứng trên đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$); V: Thể tích dịch chiết (mL); m: Khối lượng mẫu tươi (g); k: Hệ số pha loãng (nếu có).

➤ Xây dựng đường chuẩn quercetin:

Dung dịch chuẩn quercetin 1.000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) được chuẩn bị bằng cách hòa tan 0,1 g quercetin vào ethanol và định mức lên 100 mL. Sau đó, pha loãng để thu được các nồng độ từ 0 đến 100 $\mu\text{g/mL}$. Mỗi ống chuẩn được xử lý giống như mẫu thử theo các bước phản ứng đã mô tả ở trên. Độ hấp thụ được đo tại 510 nm và giá trị thu được được sử dụng để xây dựng đường chuẩn quercetin, từ đó tính toán hàm lượng flavonoid tổng của mẫu nghiên cứu.

2.3.6. Phân tích hàm lượng xơ hòa tan

Hàm lượng xơ hòa tan trong mẫu chiết được xác định dựa trên phương pháp kết tủa ethanol lạnh với một số hiệu chỉnh [131]. Dịch chiết lá lúa sau khi ly tâm

loại bỏ cặn thô được trộn với ethanol tuyệt đối lạnh (96%, tỷ lệ 1:4, v/v), sau đó ủ ở 4°C trong 24 giờ để kết tủa phần xơ hòa tan. Kết tủa thu được bằng cách ly tâm ở 8.400 vòng/phút trong 30 phút. Phần kết tủa được thu gom, rửa nhẹ bằng ethanol 80%, rồi đem sấy ở 55°C trong tủ sấy chân không đến khi khối lượng không đổi. Khối lượng phần xơ hòa tan khô được cân và dùng để tính hàm lượng xơ hòa tan theo công thức:

Hàm lượng xơ hòa tan (mg/g mẫu tươi) = $(m_1 / m_0) \times 1000$. Trong đó: m_1 : khối lượng phần xơ tan khô (g); m_0 : khối lượng mẫu tươi ban đầu (g).

2.3.7. Xác định hoạt tính enzyme polyphenol oxidase

Hoạt tính của enzyme PPO được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ UV-Vis dựa trên phản ứng oxy hóa pyrocatechol thành benzoquinone, theo phương pháp của Tram và cs. (2015), với một số điều chỉnh [132].

Chuẩn bị dịch chiết enzyme: 10 g lá lúa tươi được cắt nhỏ và nghiền trong cối sứ lạnh cùng 50 mL dung dịch đệm phosphate 0,1 M (pH 7,5) có bổ sung 1% (w/v) polyethylene glycol (PEG). Hỗn hợp được khuấy liên tục trong 30 phút ở 4°C trong tối nhằm hạn chế quá trình oxy hóa không enzym và hỗ trợ chiết enzyme. Dịch nghiền được lọc qua lớp vải mịn, sau đó ly tâm ở 3.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần dịch nổi thu được là dịch chiết enzyme thô, được bảo quản trên đá lạnh cho đến khi sử dụng.

Xác định hoạt tính PPO: Hoạt tính enzyme được đo dựa trên phản ứng oxy hóa pyrocatechol (không màu) thành benzoquinone (màu vàng nâu), có cực đại hấp thụ tại 420 nm. Hệ phản ứng gồm 0,1 mL dịch chiết enzyme, 0,9 mL đệm phosphate 0,1 M (pH 8,0) và 2,0 mL dung dịch pyrocatechol 0,05 M. Phản ứng được thực hiện trong cuvet thạch có chiều dài quang học 1 cm ở nhiệt độ phòng ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Phản ứng bắt đầu khi pyrocatechol được thêm vào hỗn hợp và độ hấp thụ quang học (A) được theo dõi tại 420 nm bằng máy quang phổ UV-Vis.

Hoạt độ enzyme được tính toán theo định luật Lambert–Beer: $A = \varepsilon \times C \times l$

Trong đó: A: độ hấp thụ quang học đo được tại 420 nm; ε : hệ số hấp thụ mol của benzoquinone tại 420 nm là $24.300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; C: nồng độ benzoquinone tạo thành (mol/L); l: chiều dài cuvet (1 cm).

Đơn vị hoạt tính enzyme (IU) được tính là lượng enzyme xúc tác tạo ra 1 μmol benzoquinone/phút, theo công thức: $\text{IU} = (C \times 0,1 \text{ mL}) / (3 \text{ mL} \times 10^{-6})$

Trong đó: C: nồng độ benzoquinone (mol/L); 0,1 mL: thể tích dịch chiết enzyme sử dụng trong phản ứng; 3 mL: tổng thể tích hỗn hợp phản ứng; 10^{-6} : hệ số quy đổi từ mol sang μmol .

2.3.8. Phân tích khả năng khử gốc tự do DPPH

Khả năng khử gốc tự do DPPH của dịch chiết lá lúa được xác định theo phương pháp của Thepthanee và cs. (2021) với một số điều chỉnh [8]. Cụ thể, 1,5 mL dung dịch DPPH 0,15 mM pha trong ethanol 95% được thêm vào 1,5 mL dịch chiết lá lúa ở các nồng độ khác nhau. Hỗn hợp được trộn đều và ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Độ hấp thụ được đo tại bước sóng 517 nm bằng máy quang phổ UV-Vis. Mức độ khử gốc tự do DPPH được đánh giá dựa trên phần trăm ức chế và giá trị IC_{50} .

Phần trăm ức chế được tính theo công thức: $\% \text{ ức chế DPPH}^+ = [(A_{\text{Chứng}} - A_{\text{Mẫu}})/A_{\text{Chứng}}] \times 100$. Trong đó: $A_{\text{Chứng}}$: độ hấp thụ của dung dịch chứa DPPH và ethanol (không có mẫu); $A_{\text{Mẫu}}$: độ hấp thụ của hỗn hợp chứa dịch chiết và DPPH.

Giá trị IC_{50} (nồng độ dịch chiết cần thiết để khử 50% gốc DPPH•) được xác định bằng phương pháp nội suy từ đồ thị phần trăm ức chế theo nồng độ dịch chiết.

Xây dựng đường chuẩn Trolox: Dung dịch Trolox chuẩn 1000 μM được pha loãng để tạo thành các nồng độ: 0, 10, 20, 30, 40, 50 và 60 μM . Mỗi nồng độ Trolox (1,5 mL) được phản ứng với 1,5 mL dung dịch DPPH 0,15 mM. Sau 30 phút ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng, đo độ hấp thụ tại 517 nm. Từ đó, xây dựng đường chuẩn và biểu thị kết quả hoạt tính DPPH của dịch chiết theo đơn vị μmol Trolox tương đương trên gam nguyên liệu tươi ($\mu\text{mol TE/g}$).

Chuẩn bị dung dịch DPPH: Dung dịch DPPH 0,15 mM được pha bằng cách hòa tan 0,0059 g DPPH trong 100 mL ethanol 96%.

Đối chứng Vitamin C: Vitamin C được pha ở nồng độ gốc 1.000 $\mu\text{g/mL}$ trong ethanol và tiếp tục pha loãng để tạo các nồng độ trong khoảng 0–100 $\mu\text{g/mL}$. Các dung dịch chuẩn này sử dụng để xây dựng đường chuẩn riêng cho các phép đo DPPH, ABTS, FRAP hoặc RP.

2.3.9. Phân tích khả năng khử gốc tự do ABTS

Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS được xác định theo phương pháp của Thepthanee và cs. (2022) với một số điều chỉnh [25]. Mẫu thử gồm 20 μL dịch chiết lá lúa ở các nồng độ khác nhau được trộn với 180 μL dung dịch ABTS đã chuẩn hóa. Hỗn hợp được ủ trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 6 phút, sau đó đo độ hấp thụ tại bước sóng 734 nm bằng máy quang phổ UV-VIS.

Khả năng bắt trung hoà gốc tự do ABTS được tính toán: $\% \text{ trung hoà ABTS}^+ = [(A_{\text{Chứng}} - A_{\text{Mẫu}})/A_{\text{Chứng}}] \times 100 \%$. Trong đó: $A_{\text{Chứng}}$: độ hấp thụ của mẫu trắng (không có dịch chiết); $A_{\text{Mẫu}}$: độ hấp thụ của mẫu có dịch chiết. Giá trị IC_{50} (nồng độ dịch chiết ức chế 50% ABTS) được xác định thông qua đường cong

hồi quy phi tuyến giữa nồng độ mẫu và % ức chế. Ascorbic acid được sử dụng làm đối chứng chuẩn để so sánh hoạt tính chống oxy hóa.

Chuẩn bị dung dịch ABTS^{•+}: trộn 7 mM ABTS với 2.45 mM potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) theo tỷ lệ thể tích 1:1. Hỗn hợp được để phản ứng trong tối ở 25°C trong 12–16 giờ, cho phép hình thành ổn định gốc ABTS^{•+}. Sau đó, dung dịch ABTS^{•+} được pha loãng bằng ethanol hoặc nước cất đến khi có độ hấp thụ tại 734 nm đạt 1.00 ± 0.02 . Dung dịch ABTS^{•+} sau khi chuẩn hóa có thể ổn định trong tối ở 4°C trong vòng 48 giờ.

2.3.10. Phân tích năng lực khử (RP)

Khả năng khử (Reducing power - RP) được thực hiện theo phương pháp của Sobuj và cs. (2021), với một số điều chỉnh [133]. Quy trình tiến hành như sau: 500 μ L dịch chiết ở các nồng độ khác nhau được trộn với 500 μ L dung dịch đệm phosphate (0,2 M, pH 6,6) và 500 μ L dung dịch potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] 1% (w/v). Hỗn hợp được ủ trong điều kiện tối ở 50°C trong 20 phút để xảy ra phản ứng khử Fe^{3+} thành Fe^{2+} . Sau đó, thêm 500 μ L dung dịch trichloroacetic acid 10% (w/v) để dừng phản ứng, ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 10 phút. Tiếp theo, 500 μ L lớp dịch phía trên được thu lấy, trộn với 500 μ L nước cất và 100 μ L dung dịch $FeCl_3$ 0,1% (w/v). Phản ứng giữa Fe^{2+} và $FeCl_3$ tạo thành phức chất màu xanh lam, có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 700 nm. Độ hấp thụ (A_{700}) được đo bằng máy quang phổ UV-VIS, phản ánh mức độ chuyển hóa $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ và do đó thể hiện khả năng khử sắt của mẫu. Hoạt tính khử sắt được biểu thị bằng giá trị IC_{50} (Reducing Power IC_{50}): là nồng độ dịch chiết cần thiết để đạt độ hấp thụ 0,5 tại 700 nm, xác định bằng phương pháp nội suy tuyến tính từ đường cong nồng độ – A_{700} . Vitamin C được sử dụng làm chất chuẩn dương để so sánh hiệu quả khử giữa các mẫu.

2.3.11. Phân tích khả năng khử sắt (FRAP)

Khả năng khử sắt (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) của dịch chiết lá lúa được xác định theo phương pháp của Chomchan và cs. (2016), với một số điều chỉnh [6]. Quy trình thực hiện: Trộn 1000 μ L dung dịch thuốc thử FRAP với 50 μ L dịch chiết lá lúa, lắc đều và ủ ở 37°C trong bóng tối trong 30 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ của hỗn hợp tại bước sóng 593 nm bằng máy quang phổ UV-VIS. Hoạt tính FRAP được biểu thị qua giá trị IC_{50} , là nồng độ dịch chiết cần thiết để đạt độ hấp thụ 0,5 tại bước sóng 593 nm. Giá trị này được xác định bằng nội suy tuyến tính từ đường cong quan hệ giữa nồng độ dịch chiết và độ hấp thụ quang học.

Chuẩn bị thuốc thử FRAP: Thuốc thử FRAP được pha tươi ngay trước khi sử dụng bằng cách trộn theo tỷ lệ thể tích 10:1:1 gồm: 300 mM acetate buffer (pH 3,6), 10 mM TPTZ trong 40 mM HCl và 20 mM FeCl₃. Các thành phần được chuẩn bị như sau: Acetate buffer (300 mM, pH 3,6): Hòa tan 24.6 g CH₃COONa trong khoảng 800 mL nước cất, điều chỉnh pH bằng CH₃COOH 99.5% (~30 mL), định mức lên 1 L. Bảo quản ở 4°C. Dung dịch HCl 40 mM: Pha 3.38 mL HCl đậm đặc (37%) vào nước cất và định mức 1 L. TPTZ 10 mM: Hòa tan 0.0312 g TPTZ trong 10 mL HCl 40 mM, đun nhẹ ở 50°C nếu cần thiết. FeCl₃ 20 mM: Hòa tan 0.0324 g FeCl₃ trong 10 mL nước cất.

2.3.12. Phân tích thành phần hợp chất bằng GC-MS/MS

Phân tích thành phần hóa học của dịch chiết lá lúa được thực hiện bằng phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS/MS), với một số điều chỉnh dựa theo quy trình mô tả bởi Salleh và Khamis (2021) [134]. Hệ thống sắc ký khí ghép khối phổ 7890B-7000C (Agilent, Hoa Kỳ) được sử dụng kết hợp với cột mao quản Agilent 122-5532G (kích thước 40 m × 250 μm × 0,25 μm), sử dụng khí helium làm khí mang với tốc độ dòng 1,2 mL/phút. Mẫu (1 μL) được tiêm vào buồng tiêm ở nhiệt độ 280°C theo chế độ chia dòng (split mode) với tỷ lệ chia 25:1, lưu lượng dòng chia là 30 mL/phút và lưu lượng dòng thanh lọc (purge flow) duy trì ở mức 3 mL/phút. Áp suất hệ thống được thiết lập ở 15 psi, tốc độ di chuyển trung bình của khí mang là 34,908 cm/giây. Chương trình nhiệt độ lò cột được thiết lập như sau: bắt đầu từ 70°C, tăng 25°C/phút đến 150°C; tiếp tục tăng 10°C/phút đến 200°C; sau đó tăng 15°C/phút đến 280°C và giữ trong 5 phút. Tổng thời gian phân tích là 54 phút. Phổ khối được ghi nhận ở chế độ ion hóa bằng điện tử (EI) với năng lượng ion hóa 70 eV. Các hợp chất được định danh thông qua việc so sánh phổ thu được với cơ sở dữ liệu phổ trong thư viện NIST-MS 05 và Wiley GC-MS 2007.

2.3.13. Phân tích thành phần hợp chất bằng HPLC

Định lượng các hợp chất polyphenol nhóm catechin trong BLL được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Zielinski và cs. (2015), với một số điều chỉnh [135]. BLL được hòa tan trong methanol 80% theo tỷ lệ thích hợp (100 mg/10 mL), siêu âm 20 phút và ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch chiết thu được được lọc qua màng lọc syringe nylon 0,22 μm (Millipore, Brazil) trước khi phân tích. Một thể tích 20 μL mẫu được tiêm vào hệ thống HPLC Alliance E2695 (Waters, Hoa Kỳ), được kết nối với đầu dò diode array detector (DAD) PDA 2998 (Waters, Hoa Kỳ), có tích hợp bơm bậc bốn và bộ lấy mẫu tự động, tốc độ dòng:

1,0 mL/phút. Phân tách sắc ký được thực hiện trên cột InertSustain C18 (4,6 mm × 150 mm, kích thước hạt 5 µm; Waters, Hoa Kỳ) ở nhiệt độ cột duy trì ở 30°C. Pha động bao gồm dung môi A (phosphoric acid 0,1%, v/v) và dung môi B (methanol), với chương trình gradient như sau: 1–10% B (0–2 phút), 10–50% B (2–30 phút), 50–80% B (30–35 phút), sau đó tiến hành rửa và tái cân bằng cột. Tốc độ dòng được duy trì ở 1,0 mL/phút. Tổng thời gian phân tích là 40 phút. Bước sóng phát hiện: 280 nm, phù hợp để phát hiện các hợp chất nhóm catechin. Phổ UV được ghi nhận trong khoảng 200–400 nm để hỗ trợ định danh. Việc nhận diện các hợp chất được thực hiện bằng cách so sánh thời gian lưu (Rt) và phổ hấp thụ UV với các chuẩn gốc: catechin, EGCG và ECG. Đường chuẩn được xây dựng từ dung dịch chuẩn có nồng độ 1–100 µg/mL. Định lượng được thực hiện bằng phương pháp ngoại chuẩn, với đường hồi quy tuyến tính và các chỉ số: thời gian lưu, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), hệ số tương quan (R^2) được tính cho từng hợp chất.

2.3.14. Phương pháp khuếch tán trên giếng thạch

Phương pháp khuếch tán giếng thạch được thực hiện theo Syeda và Riazunnisa (2020) với một số điều chỉnh [136]. Mỗi đĩa thạch được chuẩn bị bằng cách trải đều 100 µL huyền dịch vi sinh vật (vi khuẩn hoặc nấm) lên bề mặt môi trường thạch thích hợp: môi trường LB đối với vi khuẩn và môi trường Sabouraud dextrose (SD) đối với nấm. Sau khi để khô ở điều kiện vô trùng trong 15 phút, tiến hành đục các giếng thạch có đường kính 6 mm trên bề mặt đĩa. Sau đó, nhỏ 50 µL dịch BLL đã pha loãng ở các nồng độ khác nhau (hoặc dung dịch đối chứng) vào từng giếng. Đĩa được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Mỗi nghiệm thức được thực hiện với ba lần lặp lại. Hoạt tính kháng khuẩn hoặc kháng nấm được đánh giá thông qua sự xuất hiện của vòng ức chế (IZ) xung quanh giếng. Đường kính vòng ức chế (mm) được xác định theo công thức: Đường kính vòng ức chế (mm) = Đường kính toàn bộ vòng vô khuẩn – Đường kính giếng thạch. Việc đo đường kính được thực hiện bằng thước đo thang chính xác.

2.3.15. Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration - MIC) của BLL được xác định bằng phương pháp pha loãng dịch trong môi trường lỏng, dựa theo Berkow và cs. (2020) với một số điều chỉnh [137]. BLL được pha loãng trong DMSO 30% để tạo dãy nồng độ: 500, 1000, 2000, 4000 và 8000 µg/mL. Huyền phù vi sinh vật được chuẩn hóa theo chuẩn McFarland 0,5 ($OD_{600} \approx 0,08–0,10$), tương ứng với mật số $1–1,5 \times 10^8$ CFU/mL đối với vi khuẩn và $1–5 \times 10^6$ CFU/mL

đối với nấm men. Mỗi ống thử chứa tổng thể tích 10 mL, bao gồm 8 mL môi trường nuôi cấy (LB cho vi khuẩn, SD cho nấm), 1 mL dịch huyền phù vi sinh vật và 1 mL dung dịch BLL ở các nồng độ tương ứng. Các ống đối chứng được bố trí như sau: (a) ống chỉ chứa môi trường (không có BLL và vi sinh vật); (b) ống chứa môi trường và vi sinh vật (không có BLL); (c) ống chứa môi trường và BLL (không có vi sinh vật). Ampicillin (100 µg/mL) và metronidazole (100 µg/mL) được sử dụng tương ứng làm đối chứng dương cho vi khuẩn và nấm. Tất cả các ống được ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, độ đục của mẫu được đo bằng máy quang phổ UV-VIS tại bước sóng 600 nm đối với vi khuẩn và 530 nm đối với nấm. Tỷ lệ phần trăm ức chế sinh trưởng được tính theo công thức: % ức chế = $[(OD_{VK+MTr+BLL} - OD_{MTr+BLL}) / (OD_{VK+MTr} - OD_{MTr})] \times 100$. Trong đó, VK = vi khuẩn, MTr = môi trường, BLL = Bột lá lúa. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được ghi nhận là nồng độ BLL thấp nhất có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi sinh vật, thể hiện qua việc không có sự tăng OD so với đối chứng âm. Mỗi nghiệm thức được lặp lại ba lần.

2.3.16. Phương pháp xác định mật số vi khuẩn LAB và AeB

Mật số vi khuẩn LAB được xác định bằng cách nuôi cấy trên môi trường thạch MRS có bổ sung CaCO₃ 1% (w/v), trong khi vi khuẩn AeB được nuôi cấy trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB). Quy trình thực nghiệm được tham khảo và điều chỉnh từ Berendika và cs. (2022) và Pradini và cs. (2024) [138,139].

Chuẩn bị mẫu: Khoảng 30 mg mẫu phân chuột được cân và cho vào 1 mL dung dịch NaCl 0,85% (w/v), sau đó lắc vortex trong 30 giây để phân tán đều. Dịch phân thu được được pha loãng tuần tự bằng dung dịch NaCl 0,85% để tạo dãy nồng độ pha loãng từ 10⁻⁵ đến 10⁻⁷.

Nuôi cấy và ủ mẫu: Từ mỗi mức pha loãng, lấy 100 µL dịch mẫu trải đều lên bề mặt đĩa thạch: MRS + 1% CaCO₃ agar cho vi khuẩn LAB; LB agar cho vi khuẩn AeB. Tất cả các đĩa được ủ trong điều kiện hiếu khí ở 37°C trong 24 giờ. Sau thời gian ủ, các khuẩn lạc được đếm bằng mắt thường.

Công thức tính mật độ vi sinh vật: $A = N / (n_1 V f_1 + \dots + n_i V f_i)$. Trong đó: A: Mật độ vi khuẩn (CFU/mL); N: Tổng số khuẩn lạc đếm được trên các đĩa đã chọn; V: Thể tích mẫu; n_i: Số lượng đĩa ở mức pha loãng thứ i; f_i: Hệ số pha loãng tương ứng của đĩa i.

Biểu diễn và xử lý kết quả: Kết quả được biểu diễn dưới dạng logarit cơ số 10 của số đơn vị hình thành khuẩn lạc trên mỗi mL dịch nuôi cấy (log₁₀ CFU/mL). Mỗi mẫu được thực hiện song song ba đĩa và lặp lại ba lần (n = 3).

Lưu ý: Môi trường LB là môi trường không chọn lọc, cho phép phát triển các nhóm vi khuẩn hiếu khí, kỵ khí tùy nghi và kỵ khí không bắt buộc; do đó, kết quả AeB phản ánh tổng mật số vi sinh vật có khả năng phát triển trong điều kiện hiếu khí.

2.3.17. Môi trường sử dụng nuôi cấy vi sinh vật

Hai loại môi trường được sử dụng trong nghiên cứu gồm MRS agar bổ sung CaCO_3 1% (w/v) cho vi khuẩn LAB và LB agar cho tổng số vi khuẩn AeB nuôi cấy được trong điều kiện hiếu khí [138]. Ngoài ra, môi trường LB cũng được dùng để tăng sinh khối các chủng *E. coli*, *P. aeruginosa* và *S. aureus*. Đối với nấm *C. albicans* sử dụng môi trường Sabouraud dextrose (SD) dựa trên công thức của Lodovico và cs. (2023) [140].

Thành phần môi trường MRS + CaCO_3 (1%) gồm: peptone (20 g), yeast extract (5 g), natri clorua (NaCl , 10 g), dextrose (20 g), sodium acetate (5 g), ammonium citrate (2 g), disodium phosphate (2 g), Tween 80 (1 g), magnesium sulphate (0,10 g), manganese sulphate (0,05 g) và calcium carbonate (5 g), 15–20 g agar/L, pha trong 1000 mL nước cất, pH $7,0 \pm 0,2$. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp nhiệt uớt ở 121°C , áp suất 1 atm trong 20 phút. Sau khi đổ đĩa, môi trường có màu trắng đục. Sự hình thành vòng tan CaCO_3 xung quanh khuẩn lạc được sử dụng làm chỉ thị nhận biết các chủng LAB sinh acid.

Môi trường Luria-Bertani (LB) gồm: peptone (10 g), yeast extract (5 g) và NaCl (10 g), 15–20 g agar/L, pha trong 1000 mL nước cất, với pH được điều chỉnh $7,5 \pm 0,2$. Sau đó, khử trùng hỗn hợp môi trường ở 121°C , áp suất 1 atm trong 20 phút.

Môi trường SD gồm: dextrose (40 g) và peptone (10 g) trong 1000 mL nước cất, pH được điều chỉnh $5,6\text{--}6,0 \pm 0,2$. Môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút, và khi cần nuôi cấy trên môi trường rắn, agar được bổ sung ở nồng độ 15–20 g/L.

2.3.18. Xét nghiệm huyết học

Mẫu máu toàn phần (1 mL) được thu thập bằng phương pháp chọc tim (sau gây mê). Sau khi cố định chuột ở tư thế ngửa, kim tiêm vô trùng được đưa qua khoang liên sườn thứ tư – năm, hướng về phía mỏm tim để hút máu trực tiếp từ buồng tim. Lượng máu thu được được chuyển ngay vào ống nghiệm có chứa chất chống đông EDTA và nhẹ nhàng đảo trộn để tránh hiện tượng đông máu.

Mẫu máu sau đó được phân tích ngay để đánh giá các chỉ số huyết học, bao gồm số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC), tiểu cầu (PLT), nồng độ

hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), thể tích trung bình hồng cầu (MCV), nồng độ hemoglobin trung bình (MCH), phân bố kích thước tế bào (RDW) và các chỉ số huyết học liên quan, bằng máy phân tích huyết học tự động 3 thành phần (YR05123, Kalstein, Pháp).

2.3.19. Phân tích hình thái mô học ruột non

Quy trình nhuộm mô được thực hiện theo phương pháp của Sun và cs. (2024) với một số điều chỉnh [141]. Mẫu ruột non được rửa nhẹ bằng dung dịch đệm phosphate (Phosphate buffered saline - PBS) để loại bỏ dịch thừa, sau đó cố định trong dung dịch paraformaldehyde 4% (v/v) ở 4 °C trong 24 giờ.

Sau cố định, mẫu mô được khử nước qua dãy ethanol tăng dần (70%, 80%, 90%, 95% và tuyệt đối), làm trong bằng xylene và đúc vào paraffin. Các khối paraffin được cắt thành lát mỏng dày 5 µm bằng máy vi cắt quay (Leica RM2125 RTS, Đức).

Các phiên mô sau đó được loại bỏ paraffin bằng xylene, ngâm nước trở lại qua dãy ethanol giảm dần và nước cất, sau đó nhuộm hematoxylin trong 5–10 phút, rửa bằng nước, tiếp tục nhuộm eosin trong 1–3 phút.

Sau nhuộm, phiên được khử nước, làm trong bằng xylene và gắn lamên bằng nhựa gắn chuyên dụng. Quan sát mô học được thực hiện dưới kính hiển vi quang học (Olympus CX23, Nhật Bản) kết hợp hệ thống camera tích hợp để chụp ảnh và phân tích hình thái.

2.3.20. Phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA

Thu thập và bảo quản mẫu: Mẫu phân chuột (0,3–0,5 g) được thu tại các thời điểm định sẵn cho vào ống ly tâm vô trùng 2 mL và bảo quản ở –80 °C cho đến khi phân tích.

Các quy trình phân tích hệ gen 16S rRNA được thực hiện bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics.

Chiết xuất và định lượng DNA: Khoảng 200 mg mẫu được sử dụng để chiết DNA tổng số bằng bộ kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch DNA được kiểm tra bằng Qubit 4.0 fluorometer kết hợp Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) [142].

Khuếch đại gen đích và xây dựng thư viện: Vùng V3–V4 của gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi phổ biến: Mồi xuôi (forward) 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3' và mồi ngược (reverse) 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'. Quy trình chạy PCR gồm 2 vòng:

- PCR vòng 1: 1 chu kỳ khởi đầu 94 °C/3 phút; 14–16 chu kỳ gồm 94 °C/30 giây, 53 °C/30 giây, 72 °C/30 giây; kết thúc 72 °C/5 phút.
- PCR vòng 2: 1 chu kỳ khởi đầu 94 °C/3 phút; 10–12 chu kỳ gồm 94 °C/10 giây, 60 °C/30 giây, 72 °C/15 giây; kết thúc 72 °C/5 phút.

Sản phẩm PCR (~460–600 bp) được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1,5%, tinh sạch bằng AMPure XP beads (Beckman Coulter, Thụy Sĩ) và rửa giải trong nước không chứa DNase. DNA thư viện được định lượng bằng QuantiFluor-ST (Promega, Hoa Kỳ) và kiểm tra chất lượng bằng qPCR sử dụng KAPA Library Quantification Kit for Illumina (nồng độ yêu cầu $\geq 0,3$ nM) [143].

Giải trình tự và xử lý dữ liệu: Thư viện đạt yêu cầu được giải trình tự trên hệ thống Illumina MiSeq (Illumina, Hoa Kỳ) với chế độ paired-end 2×250 bp (mục tiêu ≥ 100.000 lần đọc (reads)/mẫu). Dữ liệu FASTQ được xử lý bằng QIIME2, pipeline DADA2 để lọc lỗi đọc và xây dựng amplicon sequence variants (ASV). Trình tự được phân loại bằng phương pháp classified-consensus-blast với cơ sở dữ liệu SILVA SSURef v138. Các reads kém chất lượng ($Q < 20$, độ dài < 100 bp) và adapter được loại bỏ bằng Cutadapt 2.10 [128].

Phân tích đa dạng và dự đoán chức năng: Đa dạng alpha (ACE, Shannon, Simpson, Faith's PD), đa dạng beta (PCoA dựa trên Bray-Curtis) được tính toán để đánh giá độ sâu trình tự và phong phú loài. Dự đoán chức năng vi sinh vật được thực hiện bằng PICRUST2 v2.5.3, tạo hồ sơ chức năng gồm KEGG Pathways (MetaCyc), KEGG Orthology (KO) và Enzyme Commission (EC) [144].

2.3.21. Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu thô được tiền xử lý và tính toán các chỉ số thống kê mô tả (giá trị trung bình, độ lệch chuẩn) bằng Microsoft Excel. Phân tích phương sai (ANOVA) được thực hiện trên phần mềm Statgraphics Centurion 18, kết hợp kiểm định hậu nghiệm Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Ngoài ra, phần mềm XLSTAT được sử dụng cho các phân tích đa biến, bao gồm phân tích thành phần chính (PCA), phân tích phân cụm (CA) và phân tích tương quan Spearman (R) nhằm đánh giá mối quan hệ giữa các biến.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

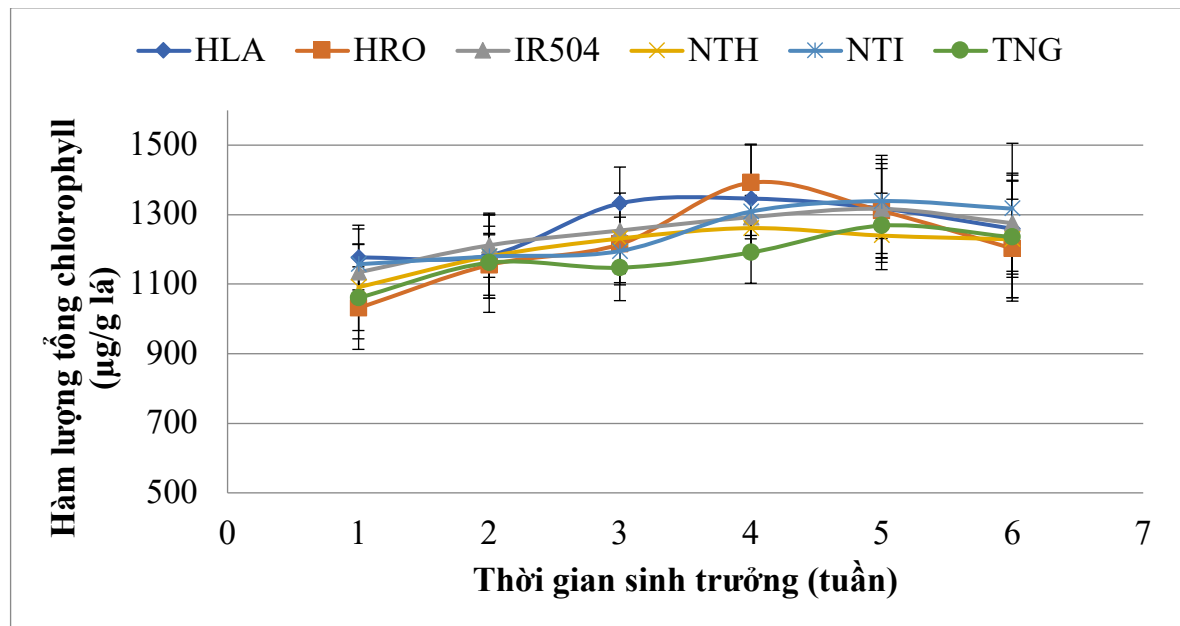
3.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá trong lá lúa non

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

3.1.1.1. Hàm lượng chlorophyll tổng

Kết quả khảo sát sự biến động hàm lượng chlorophyll tổng theo thời gian sinh trưởng của sáu giống lúa được thể hiện ở Hình 3.1. Nhìn chung, hàm lượng chlorophyll tổng có xu hướng tăng dần từ giai đoạn tuần 1 và đạt mức cao trong giai đoạn tuần 4 – 5, sau đó có dấu hiệu giảm nhẹ hoặc đi ngang ở tuần thứ 6. Cụ thể, giá trị chlorophyll tổng dao động trong khoảng 1.147,59 đến 1.391,90 $\mu\text{g/g}$ lá tươi.

Xét chi tiết từng giống, thời điểm tích lũy chlorophyll cực đại có sự khác biệt nhất định do đặc tính di truyền: Giống HLA đạt đỉnh sớm nhất vào tuần thứ 3 (1.332,48 $\mu\text{g/g}$), sau đó giảm dần; Giống HRO đạt giá trị cao nhất tại tuần thứ 4 (1.391,90 $\mu\text{g/g}$); Tuy nhiên, các giống IR504, NTH và TNG lại cho thấy sự tích lũy chlorophyll cao nhất và ổn định tại tuần thứ 5. Đặc biệt, giống lúa cao sản chủ lực IR504 duy trì hàm lượng chlorophyll cao tại tuần 5, không có sự sụt giảm đáng kể so với tuần 4.



Hình 3.1. Hàm lượng chlorophyll tổng trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng

Kết quả phân tích thống kê chung cho cả 6 giống (Bảng P1.1.1) cũng xác nhận tuần 4 và tuần 5 là giai đoạn lá lúa có hàm lượng chlorophyll cao nhất, với

sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm này ($p > 0,05$). Tuy nhiên, xét đến mục tiêu thu nhận sinh khối ổn định và sự tích lũy đồng thời của các hợp chất khác (như polyphenol, sẽ được thảo luận ở mục 3.1.1.3), tuần thứ 5 được xác định là thời điểm thu hoạch phù hợp nhất để đại diện cho giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng cực đại của cây lúa.

Để làm rõ hơn tác động của ánh sáng đến khả năng tích lũy chlorophyll tại thời điểm thu hoạch tối ưu, số liệu phân tích của các giống lúa tại tuần các tuần được sử dụng để so sánh giữa các điều kiện che sáng (Bảng 3.1).

Kết quả cho thấy điều kiện ánh sáng tự nhiên (không che sáng) và che sáng một lớp lưới giúp duy trì hàm lượng chlorophyll cao hơn đáng kể so với điều kiện che sáng hai lớp lưới ($p < 0,05$). Cụ thể, tại tuần thứ 5, các giống HLA, NTI và IR504 đạt hàm lượng chlorophyll cao nhất trong điều kiện không che sáng (lần lượt là 1.360,58; 1.331,83 và 1.312,13 $\mu\text{g/g}$). Ngược lại, điều kiện che sáng quá mức (hai lớp lưới) làm giảm hàm lượng chlorophyll ở tất cả các giống, phản ánh sự ức chế quang hợp khi thiếu hụt ánh sáng nghiêm trọng.

Bảng 3.1. Hàm lượng chlorophyll tổng ($\mu\text{g/g}$ lá) trong lá lúa theo điều kiện che sáng

Giống lúa	Không che sáng	Một lớp lưới	Hai lớp lưới
HLA	1360,58 ^c ±108,88	1347,82 ^b ±85,92	1099,46 ^b ±58,12
HRO	1288,29 ^{ab} ±113,73	1295,47 ^{ab} ±128,11	1069,6 ^{ab} ±123,18
IR504	1312,13 ^{abc} ±93,32	1320,15 ^{ab} ±86,33	1110,52 ^b ±78,47
NTH	1267,32 ^{ab} ±49,23	1291,79 ^{ab} ±69,03	1057,23 ^{ab} ±85,14
NTI	1331,83 ^{bc} ±105,25	1317,35 ^{ab} ±77,19	1099,64 ^b ±91,61
TNG	1258,32 ^a ±80,36	1256,84 ^a ±82,38	1017,51 ^a ±84,24
CV%	7,02	6,76	8,09

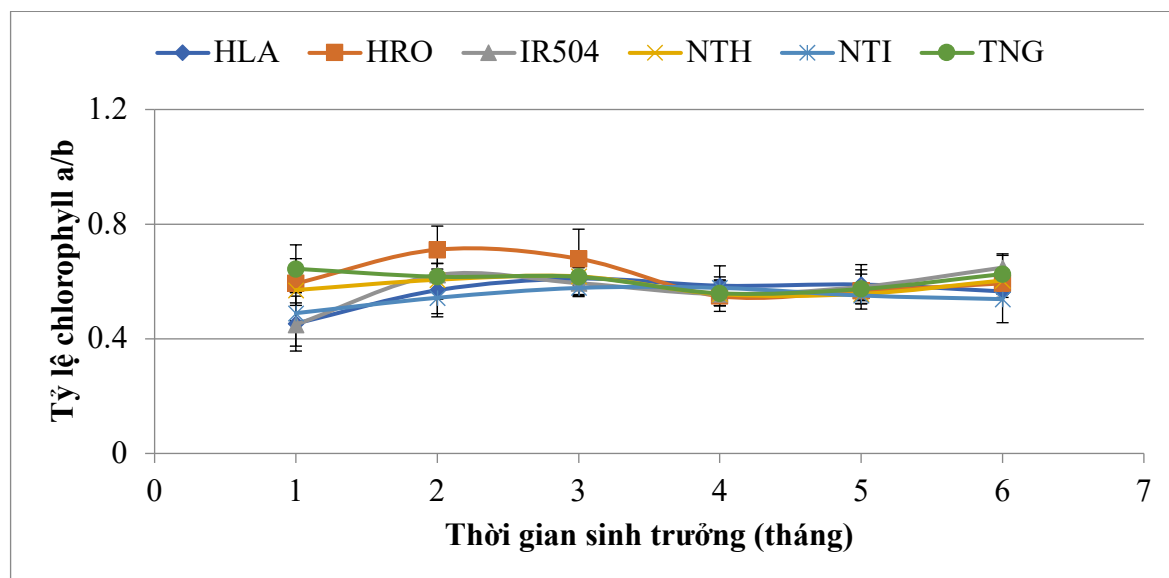
Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD. Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giống lúa trong cùng một điều kiện che sáng ($p < 0,05$).

Như vậy, dựa trên sự phân tích tổng hợp về biến động theo thời gian và phản ứng với ánh sáng, nghiên cứu xác định lá lúa (đặc biệt là giống IR504) thu hoạch ở tuần thứ 5 trong điều kiện không che sáng là điều kiện thích hợp nhất để thu nhận nguồn nguyên liệu giàu chlorophyll.

3.1.1.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b

Tỷ lệ chlorophyll a/b phản ánh sự cân bằng giữa hai dạng sắc tố quang hợp chính và thay đổi theo giai đoạn sinh trưởng cũng như đặc tính giống (Hình 3.2).

Trong ba tuần đầu, tỷ lệ này biến động tùy theo giống: IR504 tăng rõ rệt từ 0,45 lên 0,62 trong tuần 1–2, trong khi NTH và NTI duy trì ổn định. Giống HRO đạt tỷ lệ cao nhất vào tuần 2 (0,71), khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các giống khác ($p < 0,05$, Bảng P1.1.2). Nhìn chung, các giống NTH, HRO và TNG có tỷ lệ chlorophyll a/b cao hơn đáng kể ($p < 0,05$).



Hình 3.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng

Tỷ lệ chlorophyll a/b giữa các điều kiện che sáng khác nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng 3.2 và P1.1.2). Tuy nhiên, trong các điều kiện không che sáng và che sáng bằng một lớp lưới, tỷ lệ chlorophyll a/b biểu hiện sự biến thiên giữa các giống lúa.

Về ảnh hưởng của điều kiện che sáng, phân tích cho thấy tỷ lệ chlorophyll a/b không khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ba điều kiện ($p > 0,05$), nhưng có sự biến thiên rõ rệt giữa các giống trong từng điều kiện cụ thể.

Bảng 3.2. Tỷ lệ chlorophyll a/b trong lá lúa theo điều kiện che sáng

Giống lúa	Không che sáng*	Một lớp lưới*	Hai lớp lưới ^{ns}
HLA	0,511 ^a ±0,09	0,567 ^{ab} ±0,07	0,609±0,05
HRO	0,662 ^d ±0,16	0,593 ^b ±0,07	0,591±0,03
IR504	0,576 ^{abc} ±0,09	0,569 ^{ab} ±0,10	0,581±0,06
NTH	0,588 ^{bc} ±0,06	0,576 ^{ab} ±0,05	0,590±0,07
NTI	0,524 ^{ab} ±0,05	0,539 ^a ±0,05	0,575±0,06
TNG	0,605 ^{cd} ±0,07	0,598 ^b ±0,05	0,615±0,08
CV%	14,79	11,34	9,82

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD. *: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một điều*

kiện che sáng ($p < 0,05$). ns: Trong cùng một cột không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

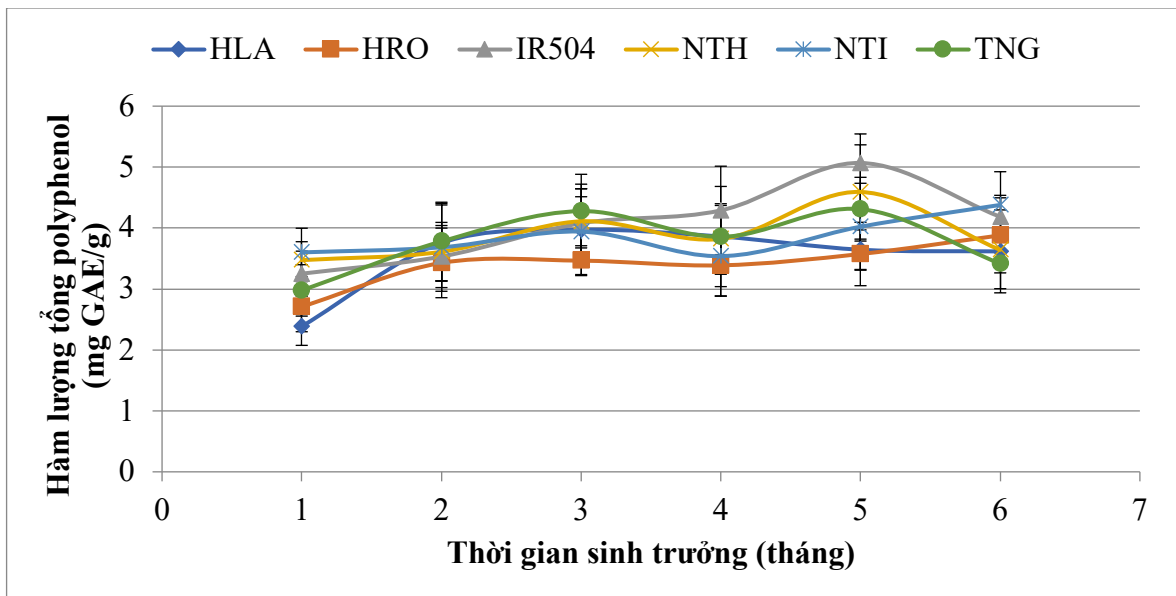
Trong điều kiện không che sáng, HRO có tỷ lệ chlorophyll a/b cao nhất (0,66), còn HLA thấp nhất (0,51), với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tương tự, ở điều kiện che sáng một lớp lưới, giống HRO và TNG vẫn duy trì tỷ lệ cao hơn so với NTI ($p < 0,05$). Tuy nhiên, ở điều kiện che sáng hai lớp lưới, sự khác biệt giữa các giống không còn ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Xét theo mức độ che sáng, tỷ lệ chlorophyll a/b cao nhất trong điều kiện che sáng hai lớp lưới, tiếp theo là không che sáng và thấp nhất ở điều kiện che sáng một lớp lưới.

Tóm lại, tỷ lệ chlorophyll a/b chịu ảnh hưởng bởi giai đoạn sinh trưởng, điều kiện chiếu sáng và giống lúa. Trong mọi điều kiện, chlorophyll a có xu hướng thấp hơn chlorophyll b, phản ánh chiến lược thích ứng của cây với cường độ ánh sáng khác nhau trong môi trường trồng trọt.

3.1.1.3. Hàm lượng polyphenol tổng

Tương tự chlorophyll, hàm lượng polyphenol tổng trong lá lúa biến động theo thời gian sinh trưởng và khác biệt giữa các giống (Hình 3.3). Nhìn chung, giá trị polyphenol tổng có xu hướng tăng từ tuần 1 đến tuần 5, sau đó giảm nhẹ vào tuần 6.



Hình 3.3. Hàm lượng polyphenol tổng trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng

Cụ thể, giống IR504 đạt hàm lượng cao nhất vào tuần 5 (5,07 mg GAE/g lá), tiếp theo là NTH (4,31 mg GAE/g lá) và TNG (4,59 mg GAE/g lá). Ngược lại, giống HLA đạt đỉnh sớm hơn vào tuần 3, trong khi NTI và HRO ghi nhận mức cao nhất vào tuần 6 (tương ứng 4,38 và 3,88 mg GAE/g lá). Phân tích thống kê

cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa giữa các thời điểm ($p < 0,05$), trừ tuần 4 và tuần 6 ($p > 0,05$). Trong số các giống, IR504 ghi nhận hàm lượng polyphenol tổng cao nhất, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa ($p < 0,05$) (Bảng P.1.1.3).

Hàm lượng polyphenol tổng chịu ảnh hưởng lớn bởi điều kiện che sáng (Bảng 3.3). Trong điều kiện không che sáng, hàm lượng polyphenol cao nhất (5,21–6,09 mg GAE/g lá). Khi che bằng một lớp lưới, giá trị này giảm khoảng 50% (3,12–3,97 mg GAE/g lá) và giảm mạnh nhất khi che hai lớp lưới (1,78–2,54 mg GAE/g lá). Phân tích thống kê xác nhận sự khác biệt rõ rệt giữa các điều kiện ($p < 0,05$), trong đó không che sáng cho giá trị cao nhất.

Ở điều kiện không che sáng, hàm lượng polyphenol tổng đạt cao nhất đối với các giống lúa NTH, NTI và TNG so với giống HRO với khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong điều kiện che sáng bằng một lớp và hai lớp lưới, IR504 tiếp tục thể hiện ưu thế với hàm lượng lần lượt là 3,97 và 2,54 mg GAE/g lá, cao hơn đáng kể so với các giống khác ($p < 0,05$).

Bảng 3.3. Hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g lá) của lá lúa theo điều kiện che sáng

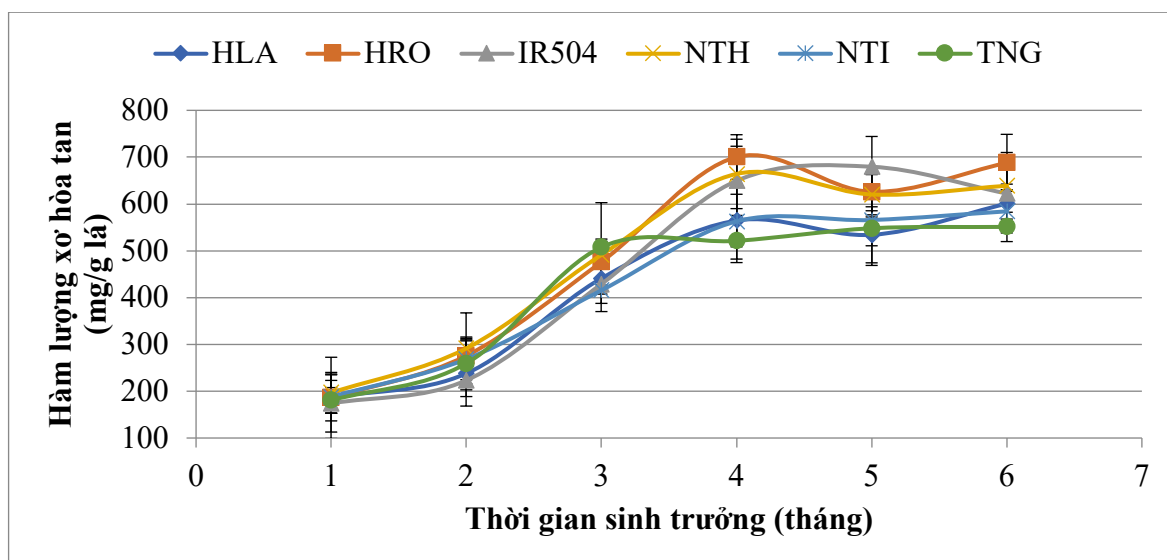
Giống lúa	Không che sáng	Một lớp lưới	Hai lớp lưới
HLA	5,65 ^{ab} ±0,90	3,18 ^a ±0,36	1,78 ^a ±0,42
HRO	5,21 ^a ±0,58	3,12 ^a ±0,48	1,89 ^a ±0,51
IR504	5,69 ^{ab} ±0,74	3,97 ^c ±0,46	2,54 ^b ±0,76
NTH	6,09 ^b ±0,91	3,37 ^{ab} ±0,46	2,15 ^{ab} ±0,79
NTI	6,07 ^b ±0,32	3,57 ^b ±0,56	1,94 ^a ±0,59
TNG	5,82 ^b ±0,83	3,57 ^b ±0,60	1,91 ^a ±0,68
CV%	12,42	14,07	30,54

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giống lúa trong cùng một điều kiện che sáng ($p < 0,05$).

Nhìn chung, ánh sáng mạnh kích thích quá trình tích lũy polyphenol trong lá lúa, với sự suy giảm rõ rệt khi che sáng. Điều này khẳng định vai trò quan trọng của ánh sáng trong điều hòa tổng hợp các hợp chất phenolic ở cây lúa.

3.1.1.4. Hàm lượng xơ hòa tan

Hàm lượng xơ hòa tan trong lá lúa tăng dần từ tuần thứ nhất đến tuần thứ tư và ổn định ở các tuần tiếp theo (Hình 3.4).



Hình 3.4. Hàm lượng xơ hòa tan trong lá lúa theo thời gian sinh trưởng

Cụ thể, từ mức khoảng 200 mg/g lá ở tuần đầu, hàm lượng tăng lên 550–700 mg/g lá vào tuần thứ tư, duy trì đến tuần thứ sáu. Xu hướng này tương đối đồng nhất giữa các giống, không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê ($p > 0,05$) (Bảng P.1.1.4). Tuy nhiên, so với các tuần đầu, hàm lượng xơ hòa tan ở tuần thứ tư, năm và sáu cao hơn có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Bảng 3.4. Hàm lượng xơ hòa tan (mg/g lá) trong lá lúa theo điều kiện che sáng

Giống lúa	Không che sáng ^{ns, a}	Một lớp lưới ^{ns, b}	Hai lớp lưới ^{ns, c}
HLA	411,13±157,22	440,83±176,71	430,43±173,64
HRO	453,63±179,26	490,00±195,51	518,82±185,87
IR504	412,19±180,34	433,57±188,08	478,33±197,88
NTH	434,29±161,80	469,32±165,60	514,02±197,91
NTI	395,09±141,37	419,40±169,90	477,99±186,01
TNG	395,23±163,55	389,04±173,57	423,16±166,66
CV%	39,32	40,63	39,06

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD. Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện che sáng ($p < 0,05$). ns: Trong cùng một cột không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giống lúa ($p > 0,05$).

Theo điều kiện che sáng, trái ngược với chlorophyll và polyphenol, xơ hòa tan tích lũy nhiều hơn dưới điều kiện che sáng mạnh (Bảng 3.4). Cụ thể, không che sáng, giá trị này đạt 395,09–453,63 mg/g lá; che sáng một lớp lưới đạt 389,04–

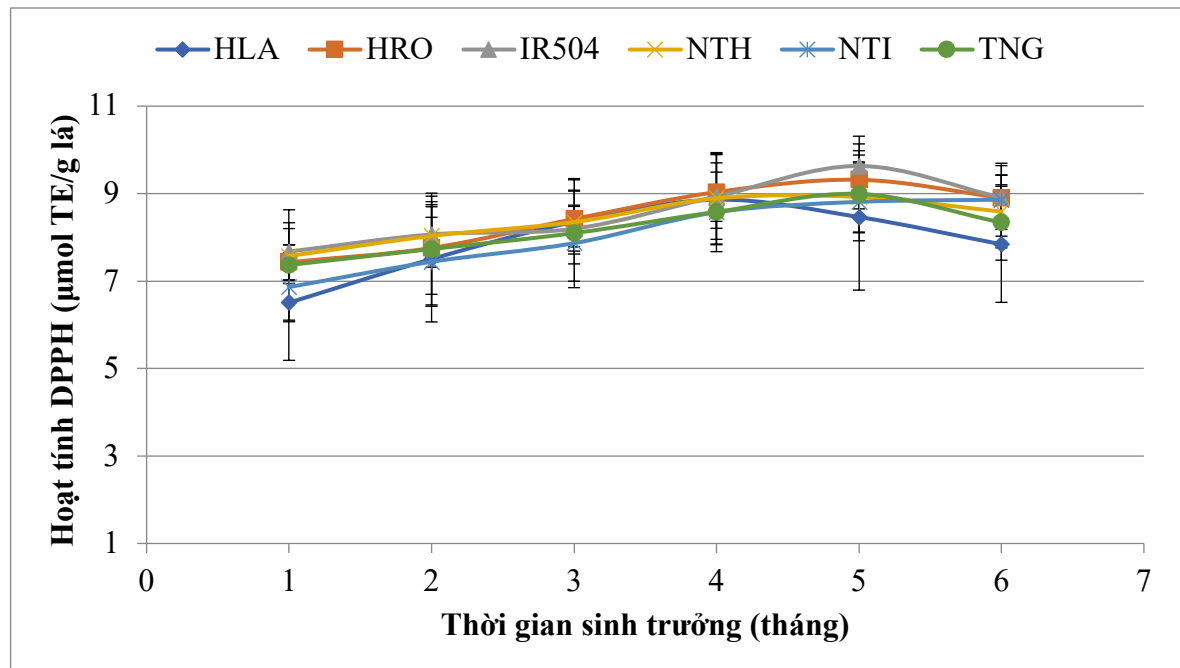
490,00 mg/g lá; che sáng hai lớp lưới: 423,16–544,67 mg/g lá (cao nhất và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p < 0,05$).

Các giống HRO, NTH và NTI phản ứng mạnh với điều kiện che sáng, với hàm lượng xơ hòa tan cao hơn rõ rệt dưới một và hai lớp lưới so với điều kiện không che. Mặc dù giống TNG đạt giá trị cao nhất ở điều kiện che sáng hai lớp (544,67 mg/g lá), sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê khi so với các giống khác ($p > 0,05$).

Tóm lại, điều kiện che sáng bằng hai lớp lưới kết hợp với giai đoạn sinh trưởng từ tuần thứ tư trở đi là yếu tố thuận lợi nhất cho sự tích lũy xơ hòa tan trong lá lúa.

3.1.1.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của lá lúa chịu ảnh hưởng bởi thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng (Hình 3.5; Bảng 3.5).



Hình 3.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của lá lúa theo thời gian sinh trưởng

Chiết xuất lá lúa thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tăng dần từ tuần đầu, đạt đỉnh ở tuần thứ năm đối với hầu hết giống, sau đó giảm nhẹ. Giống IR504 và HRO ghi nhận giá trị cao nhất lần lượt là 9,63 và 9,32 $\mu\text{mol TE/g}$ lá (tuần 5). Giống HLA đạt đỉnh sớm ở tuần 4 (8,86 $\mu\text{mol TE/g}$ lá), trong khi NTI đạt cao nhất vào tuần 6 (8,86 $\mu\text{mol TE/g}$ lá). Phân tích thống kê xác nhận hoạt tính DPPH cao nhất tại tuần 5, với sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) (Bảng P1.1.5). Trong số các giống, IR504 biểu hiện hoạt tính cao nhất ($p < 0,05$).

Về điều kiện ánh sáng, không che sáng giúp tăng hoạt tính DPPH đáng kể so với che một và hai lớp lưới (Bảng 3.5), với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong điều kiện không che sáng, sự khác biệt giữa các giống không có ý nghĩa ($p > 0,05$).

Trong điều kiện che một lớp, giống HRO đạt giá trị cao nhất ($8,63 \mu\text{mol TE/g lá}$), NTI thấp nhất ($7,97 \mu\text{mol TE/g lá}$). Ở điều kiện che hai lớp, HLA có hoạt tính thấp nhất ($6,44 \mu\text{mol TE/g lá}$), khác biệt rõ rệt với IR504 (7,90) và HRO (7,76) ($p < 0,05$).

Bảng 3.5. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH ($\mu\text{mol TE/g lá}$) của lá lúa theo điều kiện che sáng

Giống lúa	Không che sáng ^{ns}	Một lớp lưới*	Hai lớp lưới*
HLA	9,17 $\pm$ 0,85	8,16 ^{ab} $\pm$ 0,91	6,44 ^a $\pm$ 0,80
HRO	9,05 $\pm$ 0,77	8,63 ^b $\pm$ 0,89	7,76 ^{cd} $\pm$ 0,73
IR504	9,39 $\pm$ 0,82	8,42 ^{ab} $\pm$ 0,76	7,90 ^d $\pm$ 0,59
NTH	9,37 $\pm$ 0,67	8,17 ^{ab} $\pm$ 0,51	7,64 ^{cd} $\pm$ 0,43
NTI	8,92 $\pm$ 0,86	7,97 ^a $\pm$ 0,71	7,32 ^{bc} $\pm$ 0,88
TNG	9,42 $\pm$ 0,40	8,15 ^{ab} $\pm$ 0,61	6,98 ^b $\pm$ 0,77
CV%	7,92	8,85	9,66

*Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD. *: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các giống lúa trong cùng một điều kiện che sáng ($p < 0,05$). ns: Trong cùng một cột không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.*

Tóm lại, ánh sáng mạnh là yếu tố thúc đẩy hoạt tính chống oxy hóa trong lá lúa, với giá trị cao nhất ghi nhận ở giống IR504 tại tuần thứ 5 dưới điều kiện không che sáng.

3.1.1.6. Phân tích mối tương quan giữa hàm lượng hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa non

Nhằm đánh giá mối liên hệ giữa các chỉ tiêu sinh hóa, nghiên cứu đã thực hiện phân tích tương quan Spearman và phân tích phân cụm đa biến theo thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng (Bảng 3.6, Hình 3.6).

Dựa trên kết quả phân tích Spearman, hàm lượng chlorophyll tổng có tương quan mạnh với chlorophyll a ($R=0,908$; $p < 0,01$) và chlorophyll b ($R=0,818$; $p < 0,01$). Polyphenol tổng tương quan chặt chẽ với hoạt tính bắt gốc tự do DPPH ($R=0,752$; $p < 0,01$), đồng thời cũng có mối liên hệ với chlorophyll tổng ($R=0,635$; $p < 0,01$). Hoạt tính DPPH cũng có liên quan đến hàm lượng chlorophyll tổng

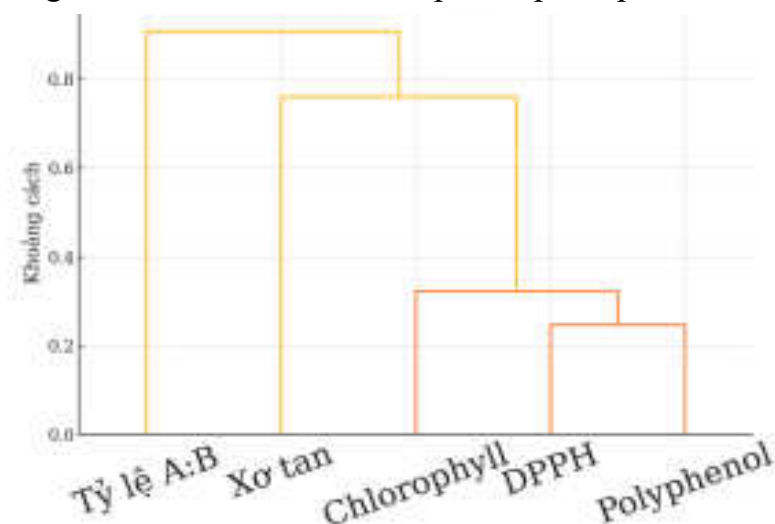
($R=0,720$; $p<0,01$). Ngược lại, xơ hòa tan có tương quan yếu với các chỉ tiêu còn lại, trong khi tỷ lệ chlorophyll a/b không tương quan đáng kể với bất kỳ biến nào ($p>0,05$).

Bảng 3.6. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các chỉ tiêu sinh hoá của lá lúa

	Chl	Chl a/b	Poly	DPPH	Xơ hòa tan
Chl	1,000				
Chl a/b	-0,170*	1,000			
Poly	0,635*	-0,084 ^{ns}	1,000		
DPPH	0,720*	-0,034 ^{ns}	0,752*	1,000	
Xơ hòa tan	0,300*	0,083 ^{ns}	0,005 ^{ns}	0,416*	1,000

Ghi chú: *: có ý nghĩa thống kê ($p<0,01$), ns: không có ý nghĩa thống kê ($p>0,05$), Chl=chlorophyll, Poly=polyphenol.

Phân tích cụm (phương pháp trung bình nhóm với khoảng cách bình phương Euclidean) xác định hai nhóm biến có mối liên hệ gần gũi: (1) polyphenol và DPPH; (2) chlorophyll tổng, chlorophyll a và chlorophyll b. Trong khi đó, hàm lượng xơ hòa tan và tỷ lệ chlorophyll a/b tách biệt rõ, phản ánh mối liên hệ yếu hoặc không đáng kể với các nhóm còn lại, phù hợp với phân tích Spearman.



Hình 3.6. Phân tích cụm giữa hàm lượng các chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa

Tóm lại, hàm lượng polyphenol và chlorophyll là các yếu tố có mối tương quan cao với hoạt tính chống oxy hóa của lá lúa và bị chi phối bởi giai đoạn sinh trưởng cũng như cường độ ánh sáng.

3.1.1.7. Đánh giá ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa non

Sự biến động của các hợp chất sinh học theo thời gian sinh trưởng phản ánh chu trình chuyển hóa năng lượng và trạng thái sinh lý của cây lúa [145]. Giai đoạn tuần thứ 4–5 tương ứng với thời kỳ đẻ nhánh tích cực và chuẩn bị làm đòng (pre-booting), đây là thời điểm quá trình quang hợp diễn ra mạnh mẽ nhất nhằm tích lũy năng lượng và sinh khối cho cây. Sự gia tăng cường độ quang hợp đòi hỏi sự tích lũy tối đa chlorophyll, đồng thời thúc đẩy sinh tổng hợp các hợp chất polyphenol đóng vai trò bảo vệ mô non trước các tác nhân oxy hóa và tham gia vào quá trình chuyển hóa cơ bản [146].

Ngược lại, sự sụt giảm hàm lượng các chất này ở tuần thứ 6 có thể được giải thích bởi quá trình lão hóa (senescence) tự nhiên hoặc sự chuyển dịch dòng dinh dưỡng (nutrient remobilization) từ lá sang thân và đòng để chuẩn bị cho giai đoạn sinh sản. Quá trình này dẫn đến sự phân giải chlorophyll và giảm nồng độ các chất chuyển hóa thứ cấp tích lũy trong phiến lá, giải thích cho xu hướng giảm hoạt tính sinh học quan sát được ở giai đoạn này.

Kết quả thu được phù hợp với các báo cáo trước đó của Khanthapok và cs. (2015) và Tamprasit và cs. (2019), trong đó hàm lượng các hợp chất này thay đổi theo giai đoạn sinh trưởng và khác biệt giữa các giống lúa [26,29]. Sự thay đổi hoạt tính chống oxy hóa được ghi nhận có liên quan đến sự hiện diện và nồng độ các chất chống oxy hóa nội sinh, trong đó polyphenol là nhóm hợp chất có tương quan thuận mạnh với hoạt tính DPPH [147]. Trong nghiên cứu hiện tại, mối tương quan này được xác nhận với ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đặc biệt, giống IR504 thu hoạch vào tuần thứ năm cho hàm lượng polyphenol và hoạt tính DPPH cao nhất.

Tuy nhiên, bên cạnh xu hướng tăng chung, kết quả cũng ghi nhận những biến động cục bộ đáng chú ý ở một số thời điểm cụ thể. Đối với polyphenol, sự sụt giảm hàm lượng ở tuần thứ 4 (quan sát thấy ở giống HLA và HRO) hoặc tuần thứ 6 có thể được giải thích bởi quá trình lignine hóa (lignification). Khi cây lúa phát triển mạnh về sinh khối, một phần các hợp chất phenolic đơn giản được huy động để tham gia vào quá trình polymer hóa tạo thành lignin nhằm củng cố vách tế bào, làm giảm lượng polyphenol tự do có thể chiết xuất được [47]. Tương tự, đối với xơ hòa tan, xu hướng giảm nhẹ ở tuần thứ 5 và tăng trở lại ở tuần thứ 6 phản ánh sự chuyển dịch ưu tiên năng lượng của cây. Tại tuần thứ 5 (giai đoạn đẻ nhánh tối đa), cây ưu tiên tổng hợp các thành phần xơ cấu trúc (không tan) để hỗ

trợ bộ khung cơ học, sau đó tái tích lũy xơ hòa tan như một nguồn dự trữ năng lượng khi bước vào giai đoạn chuyển tiếp sang sinh sản [18].

Ánh sáng là yếu tố thiết yếu đối với quá trình quang hợp và tổng hợp các chất chuyển hóa ở thực vật. Nghiên cứu trên lúa mì cho thấy điều kiện ánh sáng yếu có thể làm tăng hàm lượng chlorophyll trong lá [148]. Trong nghiên cứu này, điều kiện che sáng bằng một lớp lưới làm tăng hàm lượng chlorophyll tổng ở các giống HRO, IR504 và NTH. Tuy nhiên, che sáng quá mức (hai lớp lưới) làm giảm đáng kể chlorophyll, có thể do ảnh hưởng bất lợi đến hệ thống quang hợp [149].

Ngoài ra, cường độ ánh sáng còn ảnh hưởng đến quá trình tích lũy các hợp chất chuyển hóa thứ cấp như polyphenol. Song và cs. (2022) ghi nhận sự giảm anthocyanin trong gạo màu khi bị che sáng [150]. Ánh sáng đầy đủ có thể kích thích sinh tổng hợp polyphenol, đóng vai trò bảo vệ thực vật trước tác động của tia UV [151]. Trong nghiên cứu này, ánh sáng đầy đủ đã kích thích tổng hợp nhiều polyphenol trong lá lúa.

Chlorophyll và polyphenol đều được chứng minh có khả năng chống oxy hóa cao. Nghiên cứu này xác nhận mối liên hệ chặt chẽ giữa các hợp chất này và hoạt tính DPPH, với sự biến động phụ thuộc vào thời gian sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng. Phân tích tương quan đa biến và phân tích cụm đã làm rõ mối liên hệ mật thiết giữa hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa ($p < 0,01$), phù hợp với các kết quả trước đó trên lá lúa, cám và hạt gạo nảy mầm [26,152].

Tóm lại, tuần thứ năm trong điều kiện không che sáng được xác định là thời điểm phù hợp để thu hoạch lá lúa non nhằm thu nhận hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất, đặc biệt đối với giống IR504.

3.1.2. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng và điều kiện ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non

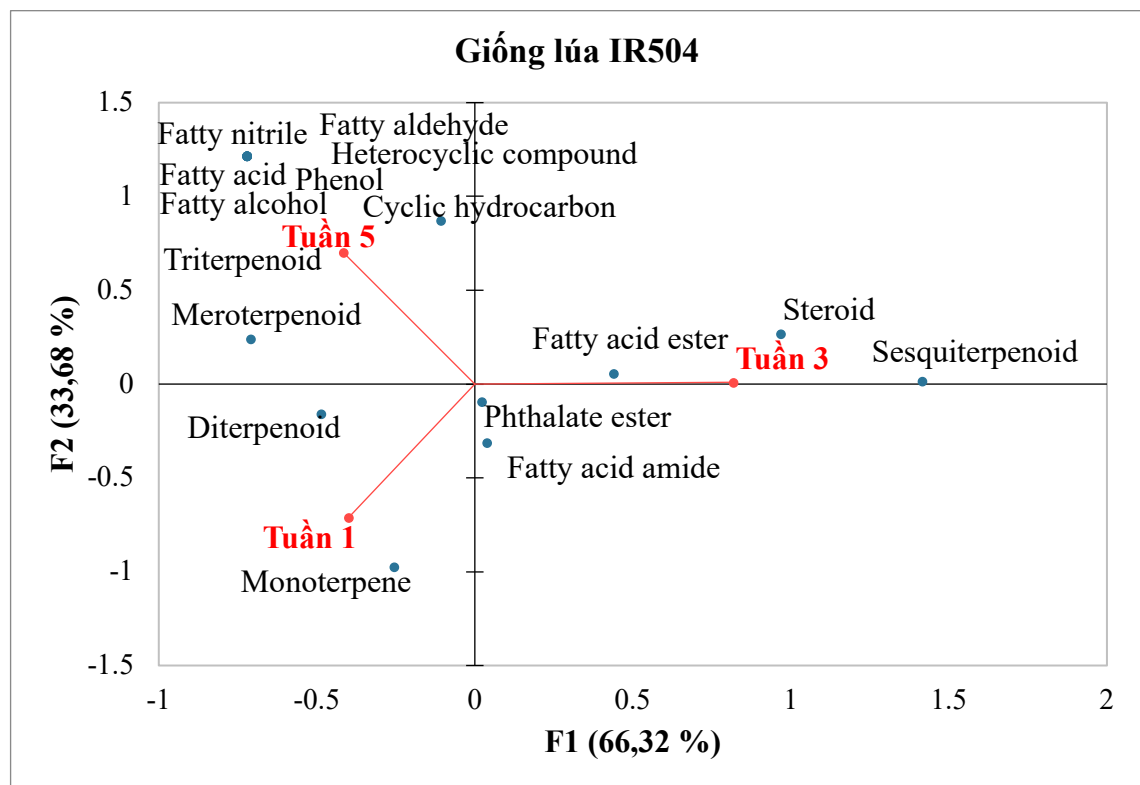
3.1.2.1. Ảnh hưởng thời gian sinh trưởng đến sinh tổng hợp các hợp chất trong lá lúa non

Để khảo sát ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng đến sinh tổng hợp các hợp chất thực vật, nghiên cứu đã phân tích lá lúa của sáu giống tại ba thời điểm (tuần 1, 3 và 5) bằng phương pháp GC-MS. Kết quả được trình bày tại Phụ lục 2 (Hình P2.11–P2.13; Bảng P2.1–P2.6) và dữ liệu tổng hợp phân nhóm trong Phụ lục 1 (Bảng P1.1.7–P1.1.9). Phân tích tương ứng (Correspondence analysis – CA) được thực hiện để xác định mối liên hệ giữa giai đoạn sinh trưởng và sự biểu hiện nhóm hợp chất trong lá lúa (Hình 3.7-3.12; Bảng P1.1.10).

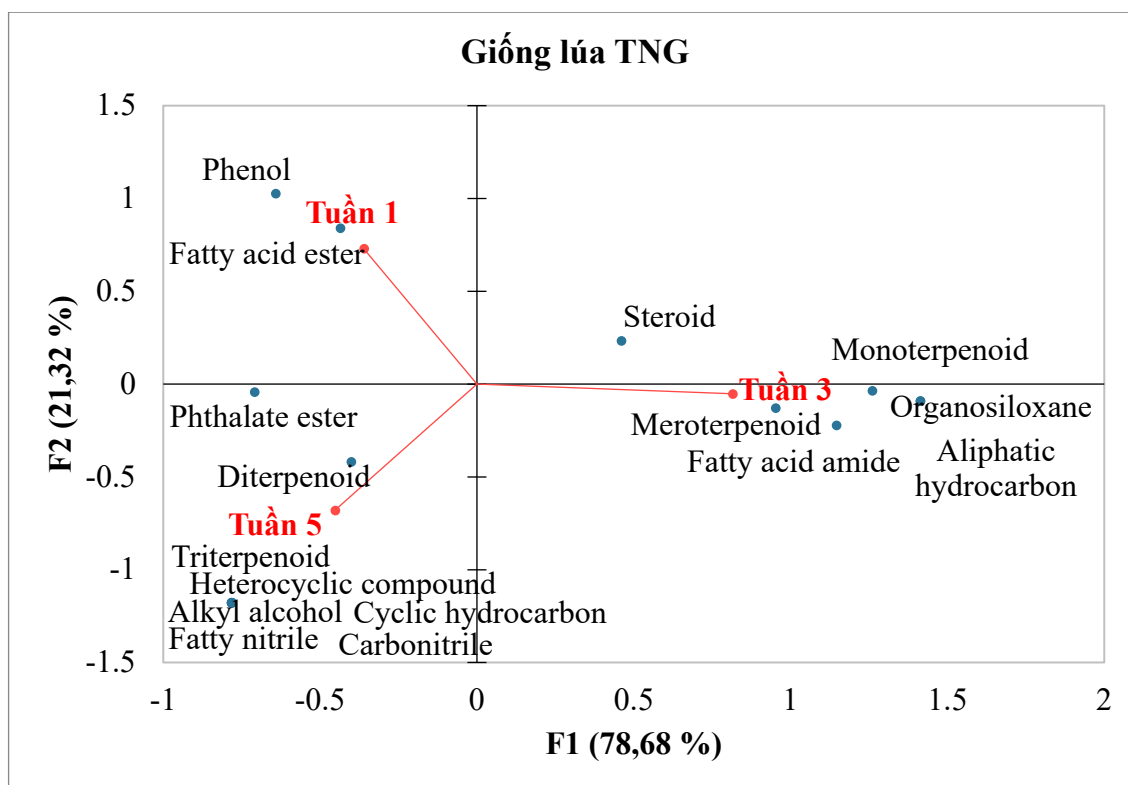
Giống IR504: Lá lúa ở cả ba giai đoạn tổng hợp chủ yếu diterpenoid, fatty acid ester, phthalate ester và fatty acid amide. Tuần 5 thể hiện sự đa dạng hóa hợp chất cao hơn với sự xuất hiện thêm fatty acid, fatty alcohol, fatty aldehyde, fatty nitrile, phenol, triterpenoid và heterocyclic compound. Tuần 1 ghi nhận monoterpene, còn tuần 3 ưu thế sesquiterpenoid và steroid.

Giống TNG: Tất cả các tuần ghi nhận diterpenoid, fatty acid ester, meroterpenoid, monoterpene và steroid. Tuần 1 chủ yếu tổng hợp fatty acid ester; tuần 3 ưu tiên meroterpenoid và steroid; tuần 5 xuất hiện nhiều hợp chất đặc trưng như alkyl alcohol, carbonitrile, cyclic hydrocarbon, fatty nitrile, heterocyclic compound và triterpenoid.

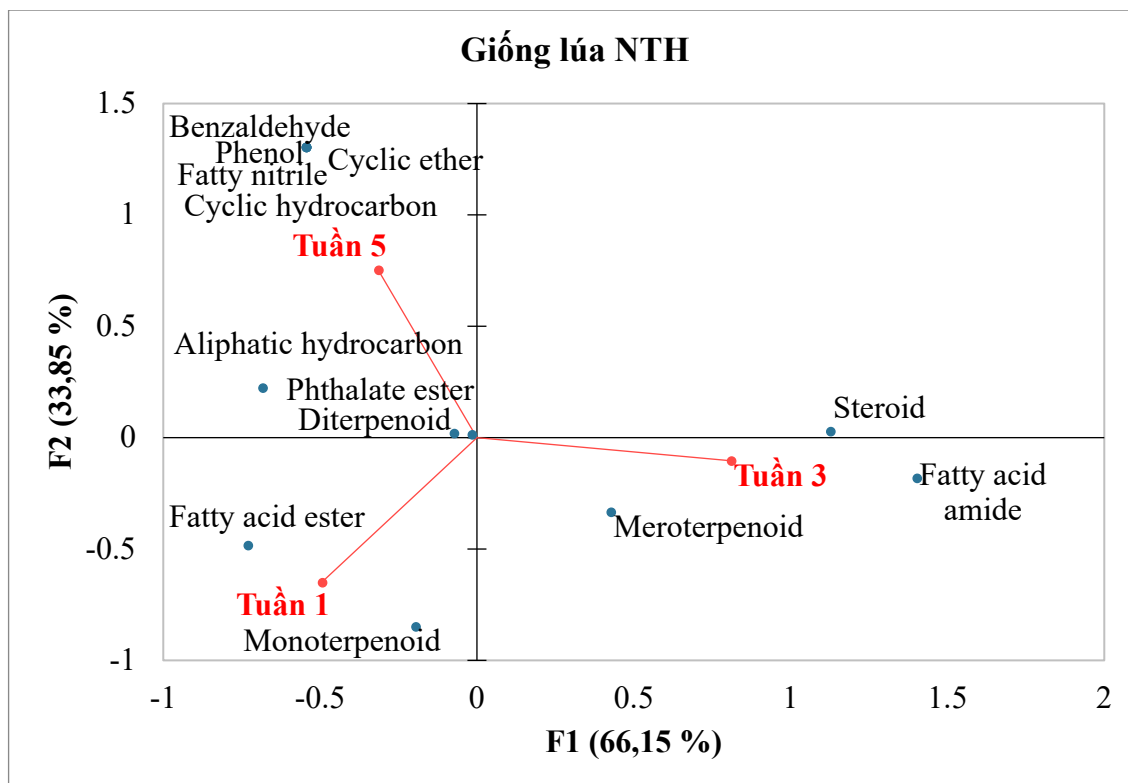
Giống NTH: Các hợp chất chính gồm diterpenoid, fatty acid ester, meroterpenoid và phthalate ester. Fatty acid ester và monoterpene nổi bật ở tuần 1; meroterpenoid, steroid và fatty amine tăng mạnh ở tuần 3; tuần 5 xuất hiện benzaldehyde, cyclic ether, cyclic hydrocarbon, fatty nitrile và phenol – không có ở tuần 1 và 3.



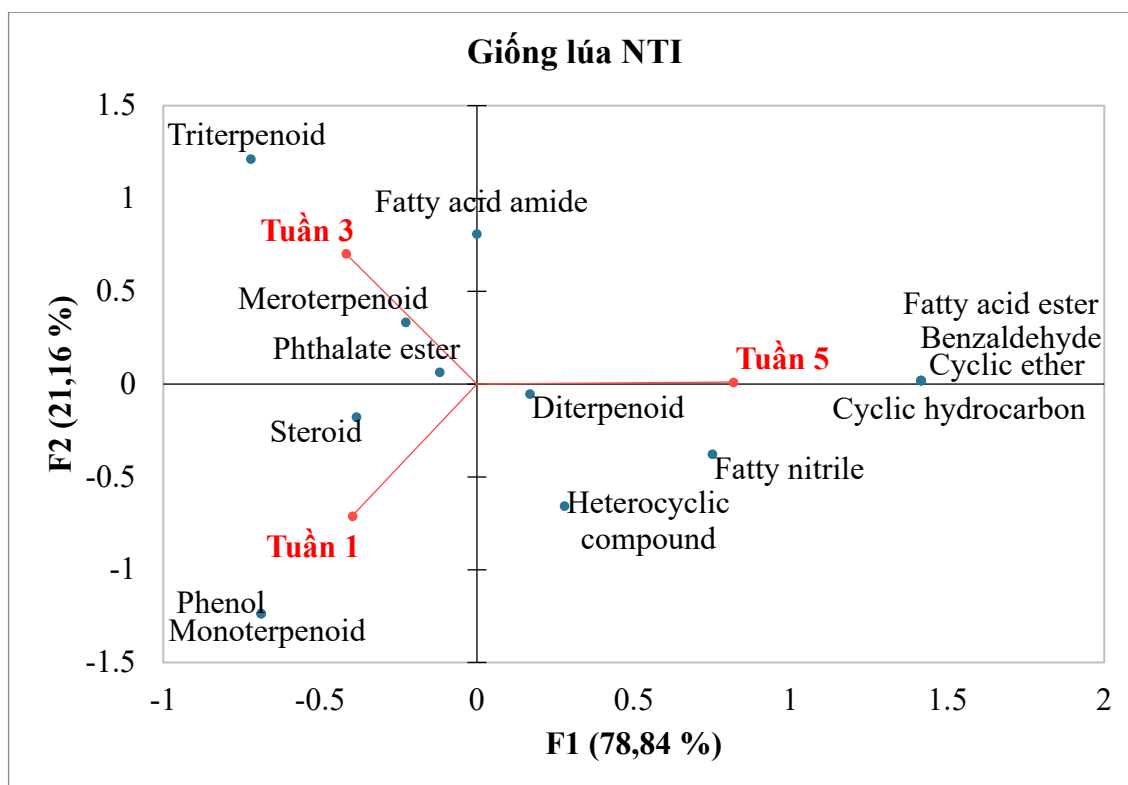
Hình 3.7. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa IR504 theo thời gian sinh trưởng



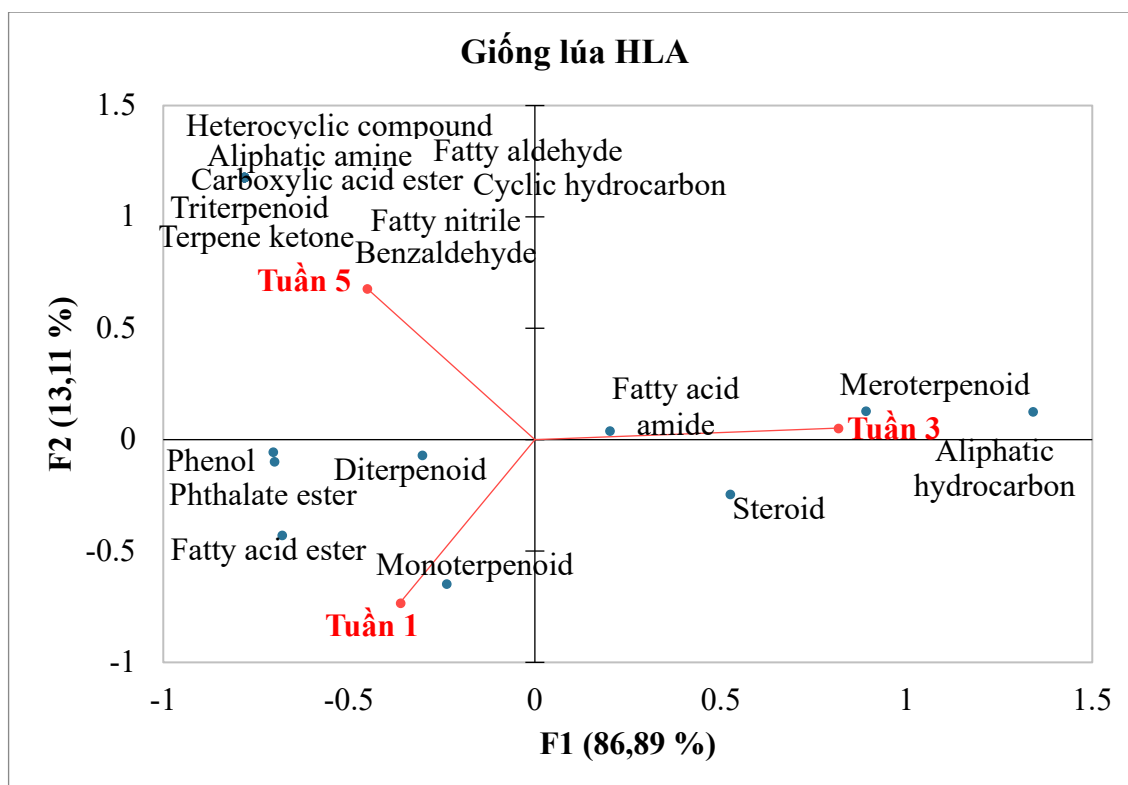
Hình 3.8. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa TNG theo thời gian sinh trưởng



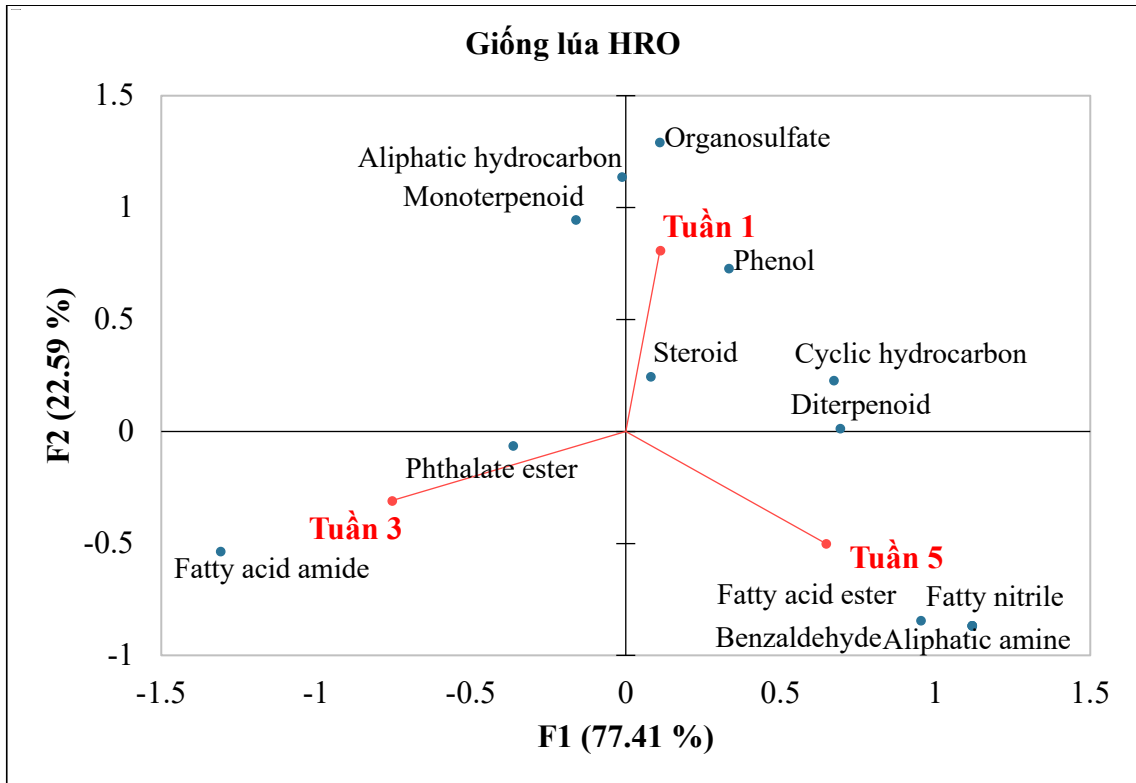
Hình 3.9. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa NTH theo thời gian sinh trưởng



Hình 3.10. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa NTI theo thời gian sinh trưởng



Hình 3.11. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa HLA theo thời gian sinh trưởng



Hình 3.12. Biểu đồ CA về tổng hợp nhóm chất của giống lúa HRO theo thời gian sinh trưởng

Giống NTI: Diterpenoid, meroterpenoid, este phthalate và steroid có mặt ở cả ba thời điểm. Tuần 1 xuất hiện monoterpenoid và phenol; tuần 3 có triterpenoid; tuần 5 ghi nhận nhiều hợp chất đặc thù như benzaldehyde, cyclic ether, cyclic hydrocarbon và fatty acid ester. Fatty nitrile và heterocyclic compound xuất hiện ở tuần 1 và 5; aliphatic hydrocarbon tăng ở tuần 3.

Giống HLA: Diterpenoid, fatty acid amide, meroterpenoid, monoterpenoid và steroid xuất hiện ở cả ba tuần. Tuần 1 ưu tiên diterpenoid và monoterpenoid, trong khi tuần 3 tăng cường meroterpenoid và fatty acid amide. Tuần 5 có mặt nhiều hợp chất đặc trưng như fatty amine, benzaldehyde, carboxylic acid ester, cyclic hydrocarbon, fatty aldehyde, fatty nitrile, heterocyclic compound, terpene ketone và triterpenoid.

Giống HRO: Diterpenoid, phenol, phthalate ester và steroid được tổng hợp xuyên suốt ba tuần. Tuần 1 đặc trưng bởi monoterpenoid, fatty hydrocarbon, phenol và organosulfate; tuần 3 và 5 tăng cường dẫn xuất fatty acid (amide, ester). Fatty amine, benzaldehyde và fatty nitrile chỉ xuất hiện ở tuần 5.

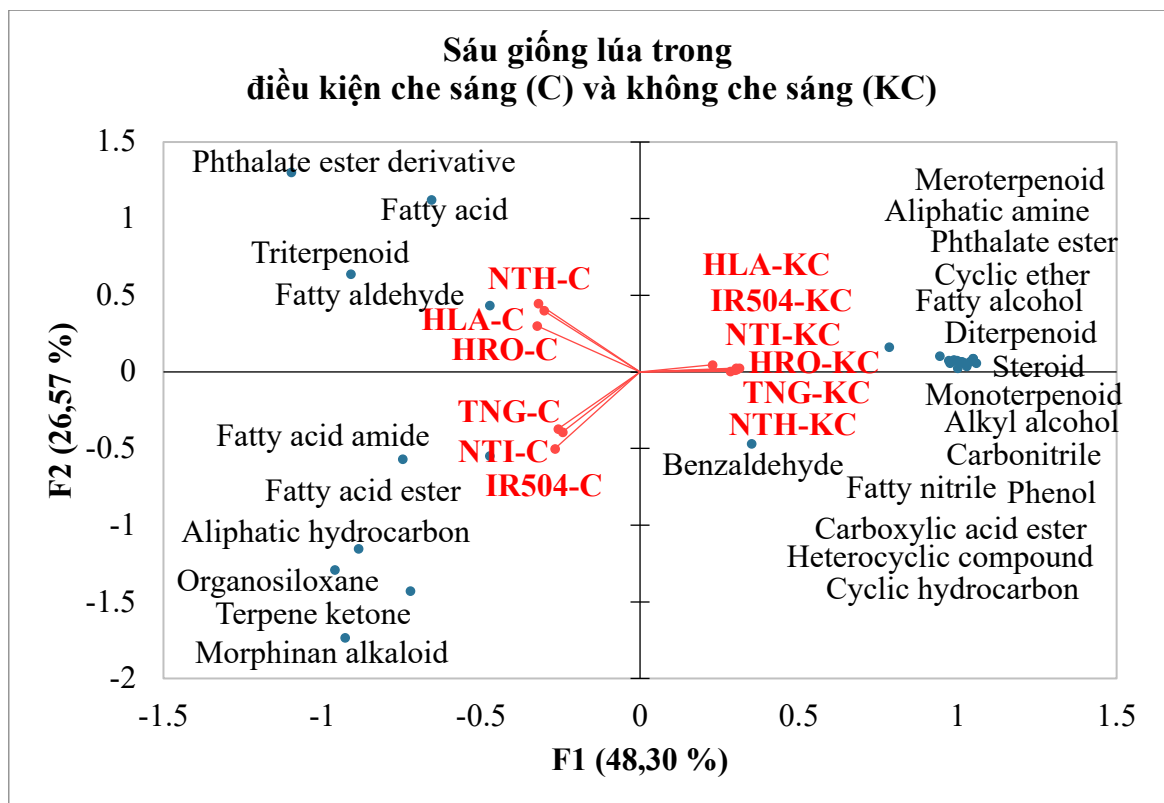
Tóm lại, sự tổng hợp các hợp chất thực vật trong lá lúa biến đổi rõ rệt theo thời gian sinh trưởng. Trong đó, tuần 1 đặc trưng bởi sự xuất hiện ưu thế của monoterpenoid, fatty acid ester và phenol – đại diện cho giai đoạn khởi đầu chuyển

hóa; tuần 3 tăng cường tổng hợp các hợp chất chức năng như meroterpenoid, steroid, fatty amine và aliphatic hydrocarbon – phản ánh hoạt động sinh hóa trung gian; tuần 5 đa dạng hóa mạnh với sự xuất hiện của nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp như benzaldehyde, fatty nitrile, triterpenoid và heterocyclic compound – đặc trưng cho giai đoạn hoàn thiện sinh lý.

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

Để làm rõ ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng đến sinh tổng hợp các hợp chất thực vật, nghiên cứu đã tiến hành phân tích thành phần hợp chất trong lá của sáu giống lúa ở giai đoạn sinh trưởng tuần thứ 5 dưới hai điều kiện ánh sáng: (1) không che sáng (KC) và (2) che sáng bằng hai lớp lưới đen (C). Phân tích GC-MS được thực hiện để xác định các hợp chất có trong mẫu lá, với kết quả được trình bày chi tiết trong Phụ lục 2 (Hình P2.13, P2.14; Bảng P2.7–12). Các hợp chất được phân loại theo cấu trúc và chức năng hóa học (Bảng P1.1.12–13), sau đó tiến hành phân tích đa biến gồm: phân tích tương ứng (CA) và phân cụm theo thứ bậc (AHC) (Bảng P1.1.14).

Phân tích tương ứng (CA) (Hình 3.13) cho thấy sự phân tách rõ ràng giữa hai nhóm mẫu theo điều kiện chiếu sáng.



Hình 3.13. Biểu đồ CA sự hiện diện nhóm chất theo giống lúa và điều kiện che sáng

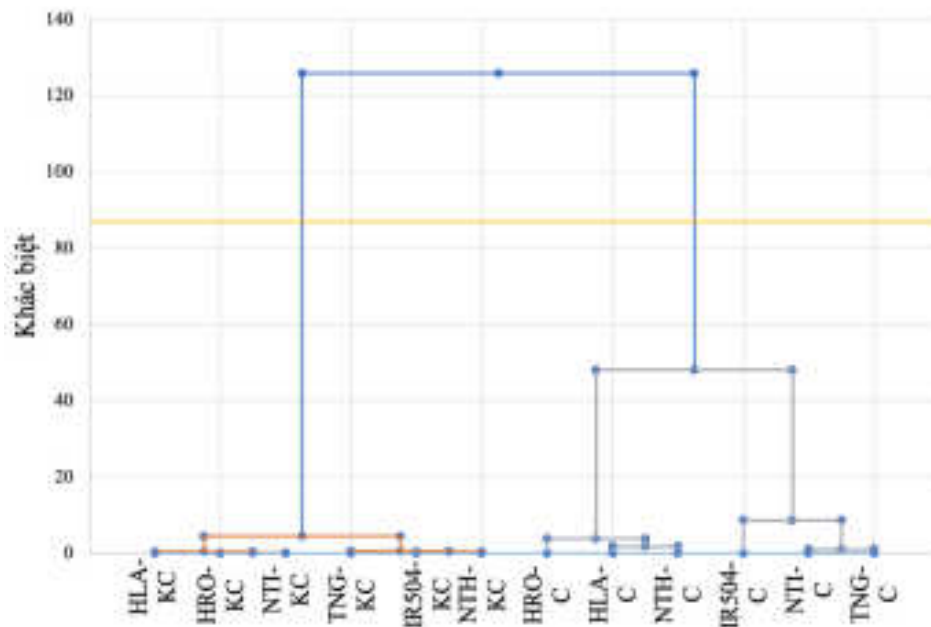
Các mẫu không che sáng (IR504-KC, HLA-KC, HRO-KC, NTH-KC, TNG-KC, NTI-KC) phân bố tập trung ở bên phải trục F1, liên kết mạnh với các nhóm hợp chất đa dạng như diterpenoid, phenol, steroid, meroterpenoid, phthalate ester, fatty amine, fatty alcohol, fatty nitrile, heterocyclic compound, cyclic hydrocarbon và carbonitrile.

Trong khi đó, các mẫu che sáng (C) phân tán về phía trái trục F1, cho thấy xu hướng chuyển hóa khác biệt, được chia thành hai nhóm:

+ Nhóm NTH-C, HLA-C, HRO-C: liên kết với các chất như fatty acid, triterpenoid, fatty aldehyde và dẫn xuất phthalate ester.

+ Nhóm TNG-C, NTI-C, IR504-C: ưu tiên các chất như fatty acid amide, fatty acid ester, aliphatic hydrocarbon, organosiloxane, terpene ketone và morphinan alkaloid.

Phân tích cụm (dendrogram): phản ánh mối quan hệ tương đồng về thành phần hợp chất giữa các mẫu lúa dưới điều kiện có che sáng (C) và không che sáng (KC) (Hình 3.14).



Hình 3.14. Biểu đồ dendrogram về sự khác biệt trong biểu hiện nhóm chất của sáu giống lúa theo điều kiện che sáng

Ghi chú: C = điều kiện che sáng 2 lớp lưới; KC = điều kiện không che sáng.

Các mẫu không che sáng (KC) có xu hướng phân cụm thành một nhánh riêng biệt, bao gồm IR504-KC, NTI-KC, HRO-KC, HLA-KC, TNG-KC và NTH-KC. Điều này thể hiện sự đồng nhất trong mẫu không che sáng về mặt sinh tổng hợp hợp chất. Các mẫu có che sáng (C), cụ thể là IR504-C, NTI-C và TNG-C, tạo thành một cụm riêng, thể hiện đặc điểm chuyển hóa khác biệt so với nhóm không

che sáng. Mẫu NTH-C và HRO-C đứng gần ranh giới phân cụm, phản ánh mức độ tương đồng trung gian giữa hai điều kiện chiếu sáng ở những giống này.

Như vậy, lá lúa trong điều kiện không che sáng sinh tổng hợp mạnh các nhóm hợp chất như diterpenoid, phenol, steroid, meroterpenoid, và phthalate ester, trong khi hàm lượng fatty acid ester lại thấp hơn. Ngược lại, dưới điều kiện che sáng, lá lúa tăng cường tổng hợp fatty acid ester, aliphatic hydrocarbon, triterpenoid và morphinan alkaloid, cho thấy cơ chế chuyển hướng chuyển hóa thích nghi với môi trường thiếu ánh sáng. Như vậy, điều kiện ánh sáng là yếu tố phân hóa rõ rệt trong mô hình tổng hợp các hợp chất thực vật của lá lúa.

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

Phân tích thống kê đa biến (PCA, CA và AHC) cho thấy thời gian sinh trưởng và điều kiện chiếu sáng là hai yếu tố then chốt quyết định đến sự biến thiên về số lượng và thành phần hợp chất thực vật. Cụ thể:

- + Theo thời gian sinh trưởng, các nhóm hợp chất biến đổi theo hướng ngày càng đa dạng và phức tạp hơn ở tuần 5 so với tuần 1 và tuần 3, phản ánh nhu cầu trao đổi chất gia tăng khi cây bước vào giai đoạn sinh trưởng mạnh mẽ.

- + Theo điều kiện chiếu sáng, sự hiện diện và hàm lượng các nhóm chất thay đổi rõ rệt, điều này phản ứng thích nghi chuyển hóa của cây lúa với cường độ ánh sáng.

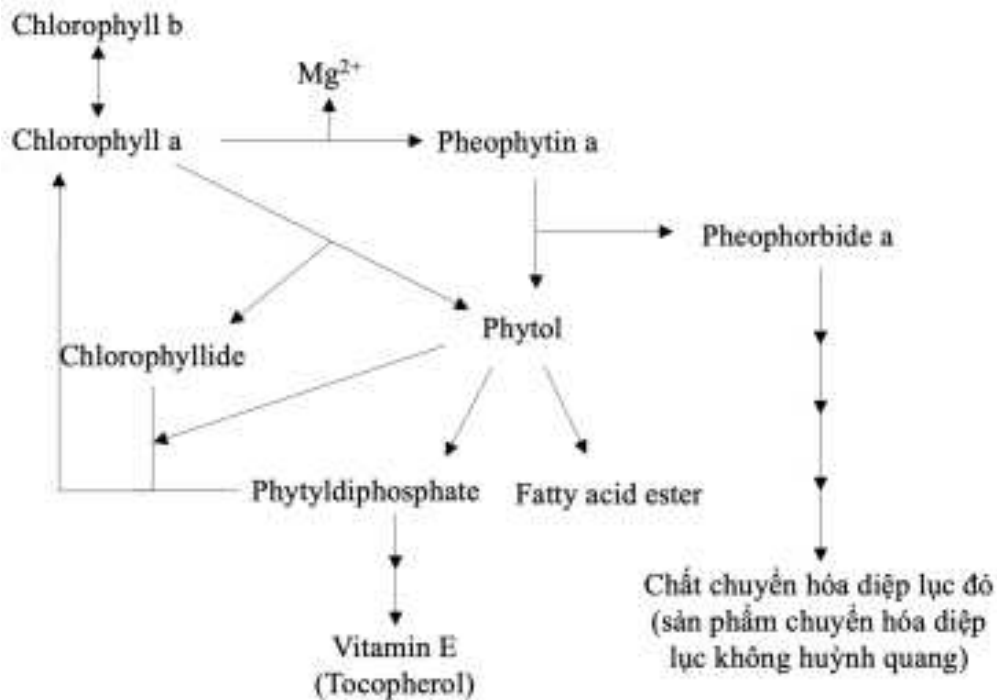
Căn cứ vào sự thay đổi thành phần nhóm chất theo thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng của các giống lúa, nghiên cứu đề xuất hai con đường biến dưỡng/trao đổi chất quan trọng trong cây lúa giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng gồm: (1) con đường chuyển hóa chlorophyll và phytol theo thời gian sinh trưởng và (2) sự khác biệt về chuyển hóa các chất trong lá lúa theo điều kiện chiếu sáng.

***** Con đường chuyển hoá của chlorophyll và phytol theo điều kiện sinh trưởng***

Kết quả phân tích GC-MS trên sáu giống lúa tại ba thời điểm sinh trưởng (tuần 1, tuần 3 và tuần 5) cho thấy phytol là một trong những hợp chất có tỷ lệ diện tích peak cao nhất ở tất cả các giống. Hàm lượng chlorophyll ở các giai đoạn này có tương quan chặt chẽ với hàm lượng phytol trong kết quả GC-MS, do phytol chính là thành phần cấu trúc cốt lõi của chlorophyll. Sự biến đổi hàm lượng phytol theo thời gian phản ánh quá trình thủy phân và tái sử dụng các thành phần chlorophyll nhằm đáp ứng nhu cầu phát triển của cây lúa [153].

Chlorophyll đóng vai trò trung tâm trong quá trình quang hợp, giúp hấp thụ ánh sáng mặt trời và chuyển hóa năng lượng [154]. Cấu trúc chlorophyll gồm

nhóm porphyrin liên kết với phytol và ion maginesi (Mg^{2+}). Hàm lượng chlorophyll thường được dùng làm chỉ số đánh giá năng suất cây trồng, khả năng quang hợp, tình trạng dinh dưỡng đậm và sức khỏe cây [155].



Hình 3.15. Đề xuất con đường thủy phân chlorophyll và luân chuyển phytol trong lá lúa

Trong giai đoạn sinh dưỡng (tuần 1–5), cây lúa tăng cường quang hợp để phục vụ sinh trưởng lá, chồi và ngọn. Chlorophyll liên tục được tổng hợp nhưng đồng thời cũng bị thủy phân khi lá già hoặc tổn thương. Các sản phẩm thủy phân sẽ được tái sử dụng tổng hợp chlorophyll mới hoặc tham gia vào con đường chuyển hóa thứ cấp [156]. Quá trình phân hủy chlorophyll vừa giúp tái phân bổ nitrogen, vừa tránh tích lũy sản phẩm trung gian độc hại. Phytol là một sản phẩm thủy phân của chlorophyll, có thể được chuyển hóa thành vitamin E (tocopherol) hoặc fatty acid ester [157].

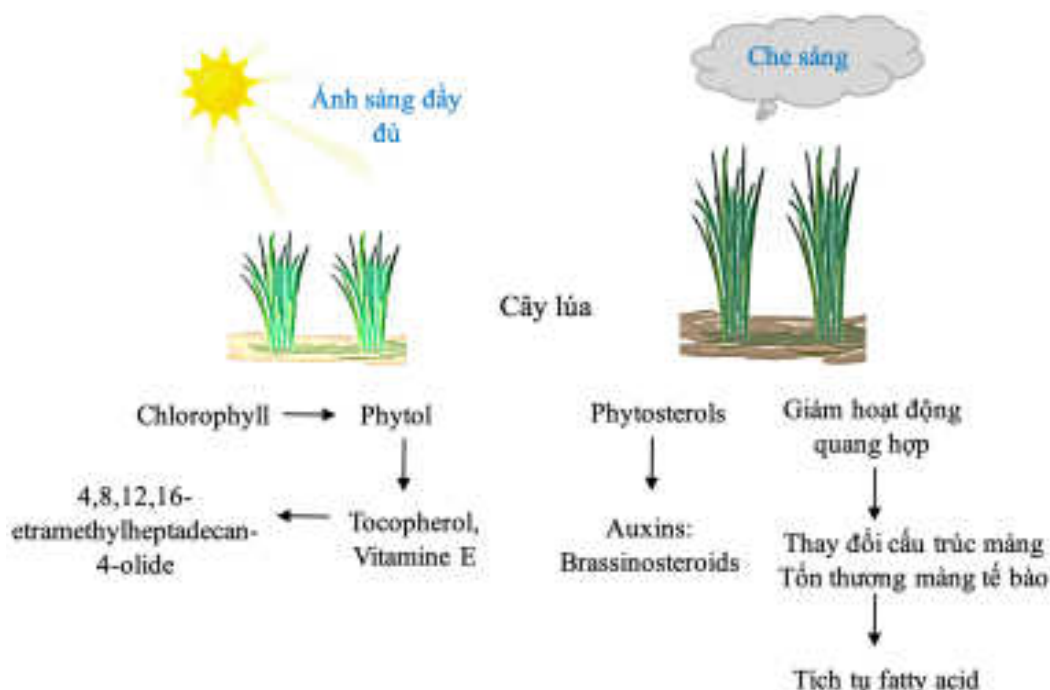
Đề xuất con đường thủy phân chlorophyll trong lá lúa dựa trên kết quả GC-MS của nghiên cứu và tham khảo từ nghiên cứu trên *Arabidopsis* [158] (Hình 3.15). Phytol được giải phóng từ chlorophyll, sau đó hoạt động như tiền chất tổng hợp vitamin E và fatty acid ester. Kết quả GC-MS đã xác nhận sự hiện diện của tocopherol và các fatty acid ester trong lá của cả sáu giống lúa.

**** Sự khác biệt về chuyển hoá trong lá lúa theo điều kiện che phủ ánh sáng**

Dựa trên phân tích thành phần chính (PCA), lá của các giống lúa tích lũy nhiều diterpenoid, steroid và phthalate ester nhưng giảm hàm lượng fatty acid ester trong điều kiện không che phủ ánh sáng. Ngược lại, dưới điều kiện che phủ hai

lớp lưới, cây lúa ưu tiên sinh tổng hợp fatty acid ester, aliphatic hydrocarbon, triterpenoid và dẫn xuất phthalate ester. Điều kiện không che phủ giúp cây lúa duy trì sự đa dạng hóa các nhóm hợp chất, trong khi điều kiện che phủ khiến cây tập trung vào một số nhóm hợp chất đặc thù. Những khác biệt này phản ánh vai trò quan trọng của các chất chuyển hóa trong cơ chế thích nghi sinh hóa của cây lúa dưới các điều kiện ánh sáng khác nhau. Cụ thể, trong điều kiện không che phủ, lá lúa tăng cường tích lũy phytosterol và diterpenoid nhưng giảm fatty acid ester; ngược lại, điều kiện che phủ thúc đẩy sự tích lũy fatty acid ester.

Dưới điều kiện ánh sáng đầy đủ, cây lúa thích nghi bằng cách tăng cường tổng hợp các hợp chất có hoạt tính chống oxy hóa như steroid, diterpenoid và vitamin E. Sự hiện diện của phytol, được giải phóng từ quá trình thủy phân chlorophyll dưới tác động của căng thẳng ánh sáng [158], là bằng chứng xác thực cho cơ chế này. Phytol đóng vai trò tiền chất trong con đường tổng hợp vitamin E. Ngoài ra, sản phẩm quang phân hủy của vitamin E là 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide [159] cũng được phát hiện trong kết quả GC-MS, minh họa rõ ràng quá trình chuyển hóa này.



Hình 3.16. Đề xuất con đường chuyển hóa của các hợp chất thứ cấp trong lá lúa dưới điều kiện che sáng và không che sáng

Ngược lại, dưới điều kiện che phủ ánh sáng, cây lúa phản ứng bằng cách tăng cường sinh tổng hợp fatty acid ester, bao gồm các hợp chất như methyl hexadecanoate, methyl 9-octadecenoate, methyl 14-methylpentadecanoate, ethyl oleate, ethyl dodecanoate và ethyl tetradecanoate. Các fatty acid và dẫn xuất của

chúng không chỉ đóng vai trò điều chỉnh thành phần lipid màng tế bào và dự trữ năng lượng mà còn tham gia vào các con đường bảo vệ thực vật, tăng cường khả năng chống chịu với các căng thẳng sinh học và phi sinh học [160]. Môi trường thiếu ánh sáng dẫn đến giảm hiệu suất quang hợp, buộc cây điều chỉnh thành phần lipid màng để duy trì chức năng tế bào [161]. Đặc biệt, che phủ quá mức còn có thể gây ra quá trình peroxy hóa lipid, dẫn tới tổn thương màng sinh học [162]. Do đó, sự tích lũy fatty acid ester trong điều kiện che phủ được coi là tín hiệu phản ứng sinh học với căng thẳng ánh sáng yếu. Tương tự, các triacylglycerol (như methyl hexadecanoate và methyl octadecenoate) đã được chứng minh giúp cây tăng khả năng chịu bóng kéo dài [163].

Sterol, tiền chất của các hormone thực vật, đóng vai trò thiết yếu trong sinh trưởng và phát triển [164]. Trong điều kiện không che phủ, các sterol chính được ghi nhận bao gồm stigmasterol, stigmasterol 22,23-dihydro, androst-5,15-dien-3-ol acetate và spinasterone. Ngược lại, trong điều kiện che phủ, chỉ phát hiện squalene, một chất trung gian trong con đường tổng hợp phytosterol [165]. Điều này cho thấy quá trình tổng hợp phytosterol bị gián đoạn, dẫn tới sự tích lũy squalene. Các phytosterol như stigmasterol, campesterol và β -sitosterol là tiền chất của brassinosteroid, nhóm hormone có vai trò điều hòa phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào, đồng thời tham gia phản ứng thích nghi với căng thẳng môi trường [166]. Nhiều nghiên cứu trên cây trà xanh và đậu xanh cũng đã chứng minh rằng brassinosteroid được tăng cường tổng hợp dưới điều kiện bóng râm, giúp cây mở rộng diện tích lá, thúc đẩy sinh trưởng và nâng cao khả năng chịu đựng ánh sáng yếu [167,168].

Brassinosteroid còn tương tác với auxin để điều chỉnh sinh trưởng và phản ứng với các yếu tố căng thẳng [166]. Sự tương tác này thúc đẩy kéo dài cuống lá trong điều kiện bóng râm. Đồng thời, trong điều kiện thiếu ánh sáng, cây thường tăng cường tổng hợp auxin, dẫn đến kéo dài thân, lá và chồi, đồng thời làm giảm độ mở rộng của phiến lá [169,170]. Quan sát thực nghiệm trong nghiên cứu này cho thấy lá lúa trong điều kiện che phủ ánh sáng có thân kéo dài nhưng phiến lá hẹp hơn so với điều kiện không che phủ. Dữ liệu GC-MS cũng xác nhận sự tích lũy squalene mà không ghi nhận sterol trong điều kiện che phủ, gợi ý rằng sterol có thể đã chuyển hóa thành brassinosteroid và auxin. Mô tả đề xuất sự khác biệt trong biểu hiện nhóm chất giữa điều kiện che sáng và không che sáng được trình bày trong hình 3.16.

Tóm lại, điều kiện ánh sáng khác nhau ảnh hưởng đáng kể đến sinh tổng hợp và chuyển hóa các hợp chất thực vật trong lá lúa. Cây lúa dưới ánh sáng đầy đủ ưu tiên tổng hợp các hợp chất chống oxy hóa như diterpenoid, steroid, vitamin E và phytosterol nhằm hỗ trợ sinh trưởng và bảo vệ màng tế bào. Ngược lại, trong điều kiện che phủ ánh sáng, cây lúa chuyển sang tích lũy fatty acid ester và brassinosteroid để thích nghi với giảm hiệu suất quang hợp và nguy cơ tổn thương màng. Sự khác biệt này phản ánh rõ cơ chế điều chỉnh chuyển hóa linh hoạt của cây lúa nhằm thích ứng với môi trường ánh sáng thay đổi.

Từ kết quả thí nghiệm khảo sát các điều kiện về giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng, tuần thứ năm trong điều kiện không che sáng được xác định là thời điểm thu hoạch phù hợp để thu nhận lá lúa non có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất, đặc biệt đối với giống IR504, là giống có hiệu suất tích lũy hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa nổi bật nên được lựa chọn làm nguồn nguyên liệu chuẩn cho các thí nghiệm về quy trình chế biến, chiết tách và đánh giá tác động sinh học.

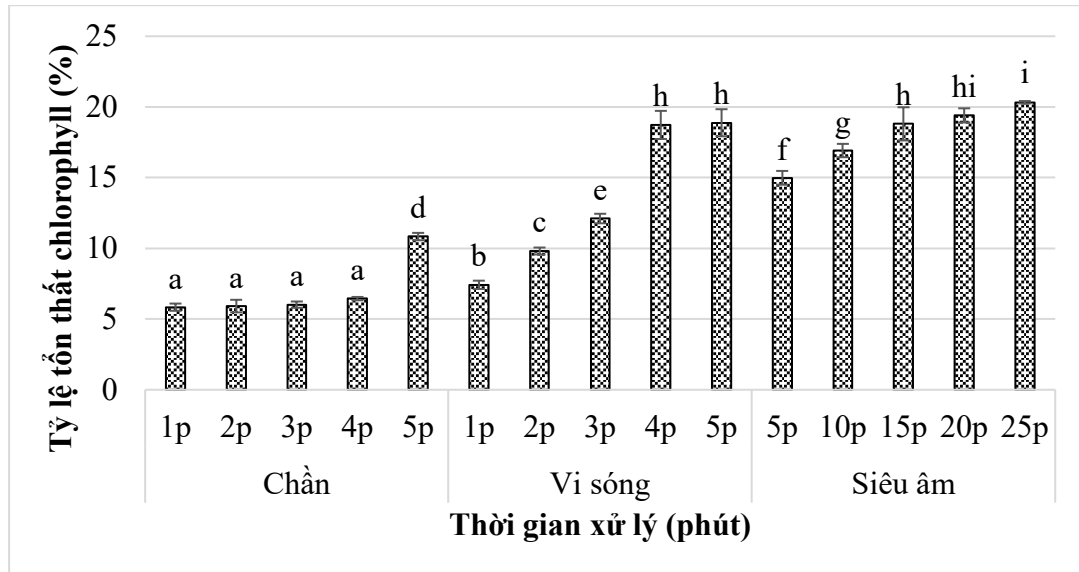
3.2. Khảo sát các điều kiện chế biến phù hợp trong thu nhận BLL

3.2.1. Phương pháp bất hoạt enzyme polyphenol oxidase

3.2.1.1. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất hàm lượng chlorophyll trong lá lúa

Tỷ lệ tổn thất chlorophyll trong lá lúa phụ thuộc đáng kể vào phương pháp và thời gian xử lý (Hình 3.17). Trong phương pháp chần nhiệt, tỷ lệ tổn thất chlorophyll dao động từ 5–6% trong 4 phút đầu, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm 1, 2, 3 và 4 phút ($p > 0,05$). Tuy nhiên, sau 5 phút, tỷ lệ tổn thất tăng lên 10%, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các thời gian xử lý dưới 4 phút ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.1).

Phương pháp vi sóng và siêu âm gây tổn thất chlorophyll cao hơn đáng kể so với chần nhiệt. Xử lý bằng vi sóng trong 1–3 phút ghi nhận tỷ lệ tổn thất từ 7–12%, tăng lên 18% sau 4–5 phút. Đối với siêu âm, tỷ lệ tổn thất dao động từ 15–20% trong khoảng thời gian 5–25 phút, cao gấp 3–4 lần so với chần nhiệt. Phân tích thống kê khẳng định rằng chần nhiệt gây tổn thất chlorophyll thấp hơn có ý nghĩa so với hai phương pháp còn lại ($p < 0,05$). Do đó, chần nhiệt được xem là phương pháp phù hợp để bất hoạt enzyme PPO trong quá trình chế biến lá lúa, đảm bảo hạn chế tổn thất chlorophyll ở mức thấp nhất.



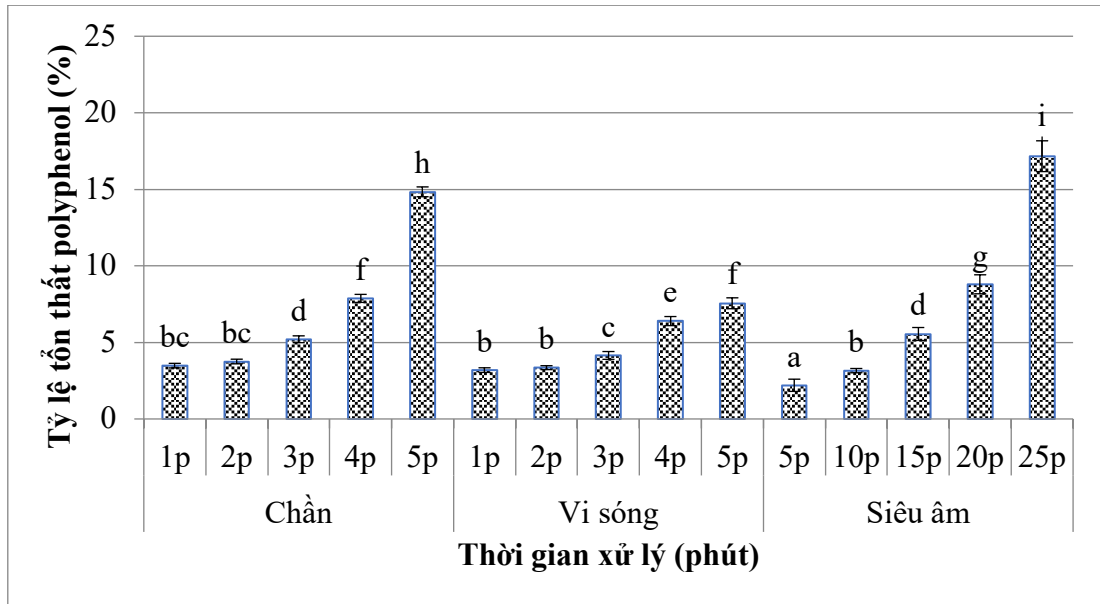
Hình 3.17. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tổn thất chlorophyll trong lá lúa

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện xử lý ($p < 0,05$).

Tóm lại, chần nhiệt ở 100°C trong 4 phút là điều kiện phù hợp để bất hoạt enzyme PPO trong lá lúa, đồng thời hạn chế tổn thất chlorophyll ở mức thấp nhất so với vi sóng và siêu âm.

3.2.1.2. Ảnh hưởng phương pháp bất hoạt enzyme đến tổn thất hàm lượng polyphenol trong lá lúa

Các phương pháp chần nhiệt, vi sóng và siêu âm đều tác động đến hàm lượng polyphenol tổng (Hình 3.18). Trong chần nhiệt, tỷ lệ tổn thất polyphenol dao động từ 3–5% trong 1–3 phút, tăng lên 8% sau 4 phút và đạt 15% sau 5 phút. Đối với siêu âm, tổn thất polyphenol không đáng kể (2–3%) trong 5–10 phút, nhưng tăng lên 17% sau 25 phút. Phương pháp vi sóng cho kết quả tổn thất thấp nhất, chỉ dưới 4% trong 3 phút đầu và khoảng 7% sau 4–5 phút.



Hình 3.18. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tổn thất polyphenol trong lá lúa

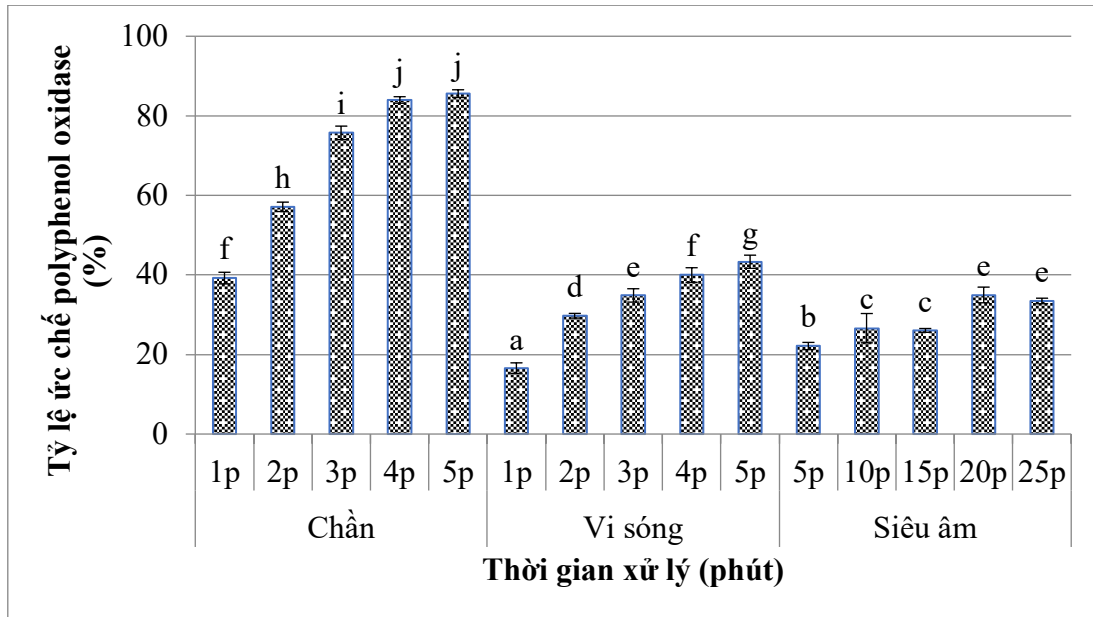
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện xử lý ($p < 0,05$).

Phân tích thống kê thể hiện chần nhiệt gây tổn thất polyphenol cao hơn so với vi sóng và siêu âm ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.2). Tuy nhiên, tổn thất polyphenol khi chần trong 3–4 phút không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với xử lý vi sóng 5 phút và siêu âm 15 phút ($p > 0,05$).

3.2.1.3. Ảnh hưởng các điều kiện xử lý lên sự ức chế enzyme polyphenol oxidase

Enzyme PPO xúc tác quá trình oxy hóa các hợp chất polyphenol, làm suy giảm các thành phần chống oxy hóa như polyphenol và chlorophyll trong quá trình chế biến. Việc bất hoạt enzyme này là cần thiết nhằm hạn chế tổn thất các hợp chất sinh học. Kết quả cho thấy chần nhiệt là phương pháp ức chế PPO hiệu quả nhất (Hình 3.19).

Chần nhiệt trong 1 phút bất hoạt khoảng 40% PPO, tăng lên trên 80% sau 4–5 phút. Trong khi đó, xử lý vi sóng trong 2–5 phút chỉ bất hoạt 30–42% PPO, còn siêu âm trong 5–25 phút đạt hiệu suất thấp hơn, chỉ 20–35%.



Hình 3.19. Ảnh hưởng của điều kiện xử lý (chần, vi sóng và siêu âm) đến tỷ lệ ức chế enzyme polyphenol oxidase trong lá lúa

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các điều kiện xử lý ($p < 0,05$).

Phân tích thống kê xác nhận chần nhiệt cho hiệu quả bất hoạt PPO cao hơn rõ rệt so với vi sóng và siêu âm ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.3).

3.2.1.4. Đánh giá ảnh hưởng các phương pháp bất hoạt enzyme

Bất hoạt enzyme PPO là bước quan trọng nhằm kiểm soát quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic và đảm bảo chất lượng sản phẩm BLL. Chần nhiệt ở 100°C bất hoạt trên 80% PPO sau 4–5 phút nhờ khả năng biến tính cấu trúc protein enzyme ở nhiệt độ cao. Các nghiên cứu trước đó cũng ghi nhận hiệu quả tương tự: chần 2 phút ở 100°C giúp bất hoạt trên 90% PPO ở cây hương xuân (*Toona sinensis*) [171], gần 90% ở cần nước (*Oenanthe javanica*) trong 1–2 phút [172] và 70–90% ở rau diếp xoăn (*Cichorium intybus*) khi chần ở 80–90°C trong 2 phút [173]. Do lá lúa có cấu trúc phiến cứng và dai, thời gian và nhiệt độ xử lý cần cao hơn để đạt hiệu quả bất hoạt PPO. Ngoài ra, chần nhiệt còn giúp thanh trùng vi sinh vật, loại bỏ tạp chất và hạn chế nguy cơ suy giảm chất lượng do hoạt tính enzyme hoặc độc tính vi sinh [174].

Các nghiên cứu trước đây sử dụng phương pháp vi sóng và siêu âm trên các loài thực vật khác cũng cho hiệu quả cao trong bất hoạt enzyme: Phương pháp vi sóng (600 W, 1–2 phút) bất hoạt khoảng 75–80% PPO trên cần nước [172] và siêu âm (20–50 kHz) cũng cho kết quả tốt trên lá cà phê [124]. Các nghiên cứu này cho thấy cơ chế chính của sự thay đổi hàm lượng chlorophyll và polyphenol có thể

liên quan đến quá trình phá vỡ cấu trúc tế bào lá và bất hoạt enzyme PPO. Sự gia tăng hiệu suất chiết tách khi xử lý siêu âm có thể do hiệu ứng xâm thực (cavitation) tạo vi khe nứt trong mô lá, hỗ trợ giải phóng hợp chất hòa tan. Ở điều kiện vi sóng, năng lượng nhiệt nội sinh giúp chiết tách nhanh nhưng dễ gây phân hủy hợp chất nhạy nhiệt ở thời gian xử lý dài. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, vi sóng và siêu âm cho hiệu quả bất hoạt PPO thấp hơn so với chần nhiệt.

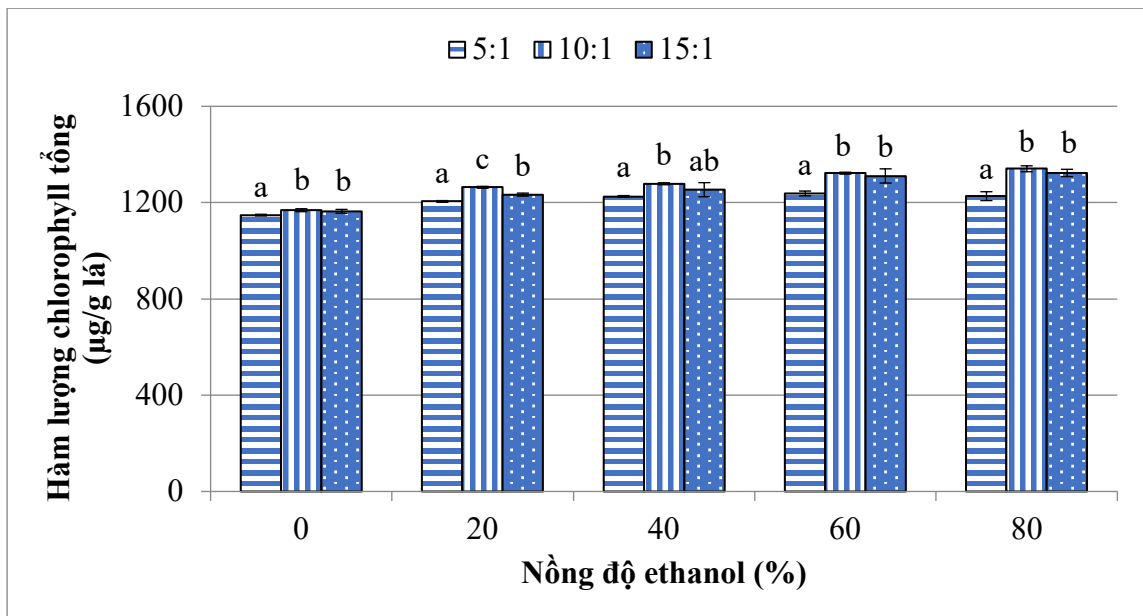
Mặc dù chần nhiệt gây tổn thất chlorophyll và polyphenol cao hơn, nhưng khả năng bất hoạt PPO vượt trội giúp hạn chế tổn thất trong các giai đoạn chế biến tiếp theo. Nghiên cứu trên lá bạc hà thể hiện chần nhiệt trước sấy phun giúp bảo toàn chlorophyll, carotenoid và polyphenol nhờ bất hoạt hiệu quả các enzyme oxy hóa [175].

Vì vậy, chần nhiệt ở 100°C trong 4 phút được xác định là phương pháp thích hợp cho hiệu quả bất hoạt PPO trên 80%, đồng thời bảo toàn tối đa hàm lượng chlorophyll và polyphenol trong lá lúa non.

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

3.2.2.1. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ ethanol đến chiết xuất chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll tổng tăng dần khi nồng độ ethanol tăng (Hình 3.20).



Hình 3.20. Ảnh hưởng của tỷ lệ (dung môi: lá lúa non) và nồng độ ethanol đến quá trình chiết xuất chlorophyll

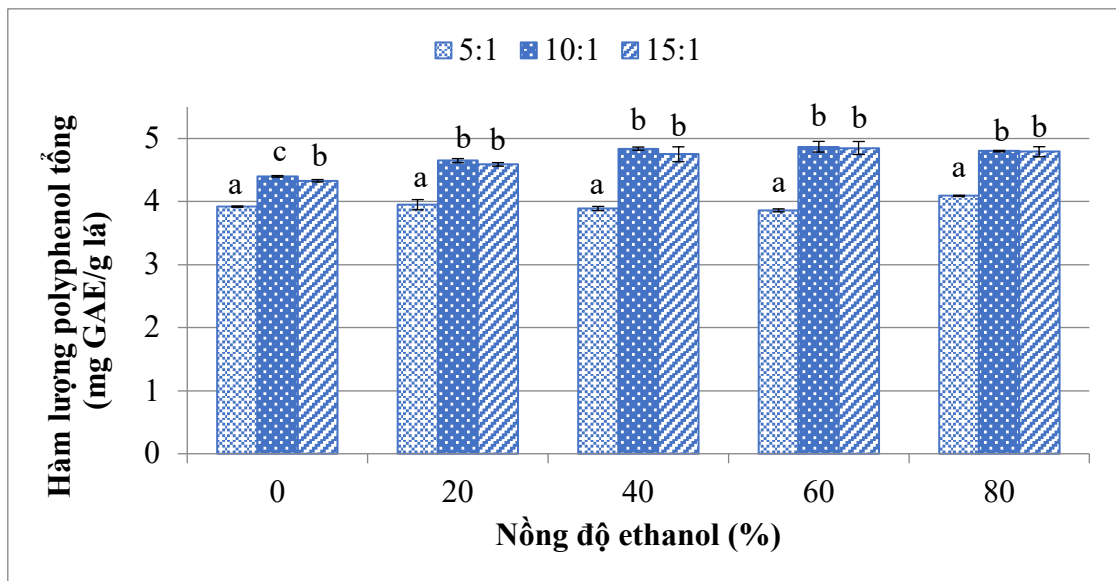
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột ở cùng nồng độ ethanol thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tỷ lệ ly trích ($p < 0,05$).

Ethanol cho hiệu suất chiết xuất chlorophyll cao hơn nước, đặc biệt ở nồng độ 60% và 80%, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nồng độ khác ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.4).

Về tỷ lệ dung môi:lá lúa non, tỷ lệ 5:1 ghi nhận hàm lượng chlorophyll thấp hơn đáng kể so với 10:1 và 15:1. Mức chlorophyll cao nhất (1238,07 $\mu\text{g/g}$) thu được tại nồng độ ethanol 60% với tỷ lệ 5:1. Tuy nhiên, tỷ lệ 10:1 cho hiệu quả chiết xuất cao hơn và ổn định hơn trong các điều kiện, với hàm lượng chlorophyll dao động từ 1310–1340 $\mu\text{g/g}$ ở nồng độ ethanol 60–80%, không có khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ 10:1 và 15:1 trong cùng điều kiện ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tỷ lệ 10:1 cho hiệu quả chiết xuất cao nhất với sự khác biệt ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.4).

3.2.2.2. Ảnh hưởng tỷ lệ và nồng độ ethanol đến chiết xuất polyphenol

Nồng độ và tỷ lệ ethanol đều ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol chiết xuất được từ lá lúa (Hình 3.21).



Hình 3.21. Ảnh hưởng của tỷ lệ (dung môi: lá lúa non) và nồng độ ethanol đến quá trình chiết xuất polyphenol

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột ở cùng nồng độ ethanol thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các tỷ lệ ly trích ($p < 0,05$).

Hàm lượng polyphenol tổng chiết xuất bằng nước thấp hơn đáng kể so với ethanol ($p < 0,05$). Ở tỷ lệ 5:1, polyphenol giảm nhẹ khi nồng độ ethanol tăng từ 20–60%, nhưng lại tăng ở nồng độ 80%. Trong khi đó, các tỷ lệ 10:1 và 15:1 ghi nhận xu hướng ngược lại: polyphenol tăng từ 20–60% ethanol và giảm nhẹ ở 80%. Sự khác biệt không ý nghĩa giữa các nồng độ 40%, 60% và 80% ethanol ($p > 0,05$) (Bảng P1.2.5).

Tỷ lệ 5:1 cho hiệu suất chiết xuất polyphenol thấp hơn đáng kể so với 10:1 và 15:1. Hàm lượng polyphenol cao nhất đạt được ở tỷ lệ 10:1 với ethanol 60%, tương đương với tỷ lệ 15:1 ở cùng nồng độ. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa hai tỷ lệ này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng P1.2.5). Vì vậy, tỷ lệ 10:1 là phù hợp về cả hiệu quả chiết và tiết kiệm dung môi.

3.2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng dung môi ethanol đến chiết xuất chlorophyll và polyphenol

Ethanol là dung môi phổ biến và an toàn, thường được sử dụng để chiết xuất chlorophyll và polyphenol từ nguồn nguyên liệu thực vật [176]. Ethanol được báo cáo cho hiệu quả chiết xuất các hợp chất sinh học cao hơn các dung môi khác như hexane, ethyl acetate, butanol và nước [7,8]. Ethanol 60% cho hiệu quả chiết xuất cao nhờ khả năng hòa tan tốt các hợp chất phenolic có phân cực trung bình. Kết quả này phù hợp với xu hướng chung của nghiên cứu trên nguyên liệu lá xanh khác [176]. Hiệu suất trích ly cao tại nồng độ ethanol 60% cho thấy các hợp chất đích (catechin, flavonoid) trong lá lúa có độ phân cực trung bình, tương thích tốt với hệ dung môi này hơn là nước hoặc cồn tuyệt đối.

Tỷ lệ dung môi:lá lúa 10:1 được xác định là phù hợp cho chiết xuất lá lúa. Tỷ lệ 5:1 tạo hỗn hợp quá đặc, làm giảm tiếp xúc giữa dung môi và nguyên liệu, từ đó hạn chế hiệu suất chiết. Trong khi đó, tỷ lệ 15:1 mặc dù cho hiệu suất cao, nhưng không khác biệt có ý nghĩa so với 10:1 và làm tăng chi phí dung môi. Một nghiên cứu trên lá *Malva parviflora* đề xuất tỷ lệ 20:1 là tối ưu [177]. Vì vậy, tỷ lệ ly trích có thể phụ thuộc vào từng loại nguyên liệu thực vật.

Hiệu quả chiết xuất còn bị chi phối bởi độ phân cực của dung môi và đặc tính của nguyên liệu [178]. Để tối ưu hóa quá trình chiết các hợp chất chống oxy hóa, cần bổ sung khảo sát về nhiệt độ và thời gian xử lý.

Kết quả nghiên cứu đã xác định ethanol 60% kết hợp với tỷ lệ dung môi:lá lúa 10:1 là điều kiện chiết xuất phù hợp, đảm bảo thu được hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao với hoạt tính sinh học đáng kể.

3.2.3. Ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến chất lượng của BLL

3.2.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính bắt gốc tự do (DPPH) của BLL

Nhiệt độ sấy phun ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của BLL. Thí nghiệm được thực hiện ở các mức nhiệt 110°C, 120°C, 130°C, 140°C, 150°C và 160°C, trong đó mẫu sấy đông khô được sử dụng làm đối chứng (Hình 3.22).



Hình 3.22. Bột lá lúa sau sấy phun và sấy đông khô (đối chứng)

Hàm lượng chlorophyll tổng, chlorophyll a và chlorophyll b có xu hướng giảm khi nhiệt độ tăng (Bảng 3.7). Ở các mức 120°C và 130°C, hàm lượng chlorophyll tổng được duy trì tương đối cao, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các mức nhiệt cao hơn (Bảng P1.2.6).

Bảng 3.7. Hàm lượng chlorophyll tổng, chlorophyll a, chlorophyll b của BLL theo nhiệt độ sấy phun

Phương pháp sấy	Chlorophyll tổng ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll a ($\mu\text{g/g}$)	Chlorophyll b ($\mu\text{g/g}$)
Trước SP	1480,16 ^d ±12,56	606,65 ^c ±1,41	874,01 ^c ±11,93
SP 110°C	-	-	-
SP 120°C	1309,15^c±16,14	471,68^c±27,36	837,94^c±35,26
SP 130°C	1262,68 ^c ±4,19	427,46 ^b ±6,61	835,67 ^c ±7,20
SP 140°C	1190,54 ^b ±7,93	451,50 ^{bc} ±12,94	739,45 ^b ±5,91
SP 150°C	1148,77 ^b ±10,67	451,06 ^{bc} ±7,29	698,10 ^b ±3,46
SP 160°C	921,80 ^a ±48,66	364,51 ^a ±18,26	557,61 ^a ±30,47
Sấy ĐK	1427,87 ^d ±7,74	565,10 ^d ±1,86	863,26 ^c ±8,29
CV%	1,40	2,49	2,02

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một cột ($p < 0,05$). (-) Sản phẩm sau sấy bị vón cục không khô. SP = Sấy phun. ĐK = Đông khô.

Hàm lượng chlorophyll a bị suy giảm đáng kể ngay từ 120°C, chỉ còn khoảng 77% so với giá trị ban đầu (606,65 $\mu\text{g/g}$ xuống còn 471,68 $\mu\text{g/g}$, $p < 0,05$; Bảng P1.2.7). Trong khi đó, chlorophyll b ổn định hơn ở 120–130°C ($p > 0,05$; Bảng P1.2.8), nhưng giảm mạnh ở 160°C. Mẫu sấy ở 110°C bị vón cục, không khô hoàn toàn nên không được phân tích.

Bảng 3.8. Hàm lượng polyphenol, flavonoid, xơ hòa tan và hoạt tính DPPH của BLL theo nhiệt độ sấy phun

Phương pháp sấy	Polyphenol tổng (mg GAE/g)	Flavonoid tổng (mg QE/g)	DPPH (μ mol TE/g)	Xơ hòa tan (mg/g)
Trước SP	4,26 ^f ±0,02	2,14 ^g ±0,01	3,05 ^g ±0,00	381,43 ^a ±89,92
SP 110°C	-	-	-	-
SP 120°C	3,34^d±0,12	1,52^e±0,03	2,22^e±0,00	499,32^{bc}±10,32
SP 130°C	2,47 ^c ±0,00	1,45 ^d ±0,03	1,42 ^d ±0,01	451,05 ^{abc} ±18,48
SP 140°C	2,02 ^b ±0,00	1,37 ^c ±0,01	1,21 ^c ±0,00	442,43 ^{ab} ±14,24
SP 150°C	1,85 ^b ±0,12	1,29 ^b ±0,05	1,04 ^b ±0,02	461,75 ^{abc} ±7,83
SP 160°C	1,55 ^a ±0,03	0,96 ^a ±0,01	0,95 ^a ±0,04	461,26 ^{abc} ±18,53
Sấy ĐK	3,65 ^e ±0,15	1,61 ^f ±0,02	2,28 ^f ±0,01	551,94 ^c ±15,33
CV%	3,32	1,63	1,82	5,92

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD. Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một cột ($p < 0,05$). (-) Sản phẩm sau sấy bị vón cục không khô. SP = Sấy phun, ĐK = Đông khô, GAE = tương đương gallic acid, TE = tương đương Trolox.

Về hàm lượng polyphenol, flavonoid, hoạt tính bắt gốc tự do DPPH và xơ hòa tan (Bảng 3.8), sấy phun ở 120°C cho giá trị polyphenol (3,34 mg GAE/g) và flavonoid (1,52 mg QE/g) cao nhất trong các mẫu sấy phun, thấp hơn mẫu sấy đông khô nhưng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mức nhiệt cao hơn ($p < 0,05$; Bảng P1.2.9 và P1.2.10). Hoạt tính DPPH đạt cao nhất ở mẫu sấy đông khô (3,05 μ mol TE/g), tiếp đến là mẫu sấy ở 120°C (2,22 μ mol TE/g), cho thấy ảnh hưởng tiêu cực của nhiệt độ cao đến khả năng bắt gốc tự do (Bảng P1.2.11). Hàm lượng xơ hòa tan dao động không đáng kể giữa các điều kiện sấy ($p > 0,05$; Bảng P1.2.12).

Tóm lại, sấy phun 120°C là nhiệt độ thích hợp giúp giữ hàm lượng hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất so với các mức nhiệt sấy phun khác.

3.2.3.2. Phân tích tương quan giữa các hợp chất và hoạt tính DPPH

Để đánh giá mối liên hệ giữa hàm lượng các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa, phân tích tương quan Spearman được thực hiện trên các mẫu BLL sau sấy.

Kết quả phân tích thống kê ghi nhận mối tương quan chặt chẽ giữa hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính bắt gốc tự do DPPH ($p < 0,01$) (Bảng

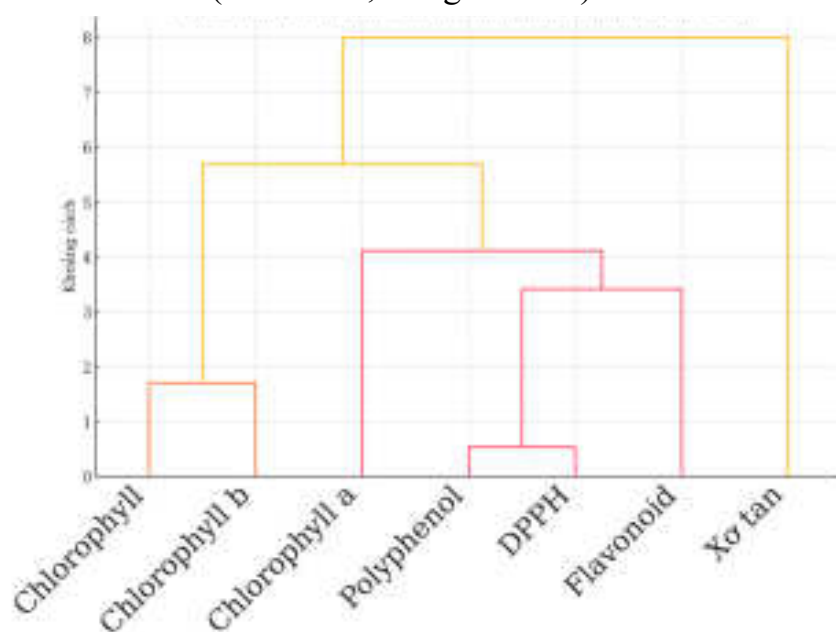
3.9). Tương tự, hàm lượng flavonoid cũng thể hiện mối tương quan cao với hoạt tính DPPH ($R=0,979$; $p<0,01$). Hàm lượng chlorophyll a và chlorophyll b cũng có mối tương quan với hoạt tính DPPH, với R lần lượt là 0,829 và 0,936 ($p<0,01$). Tuy nhiên, không ghi nhận mối tương quan giữa hàm lượng xơ hòa tan và hoạt tính DPPH hoặc các hợp chất khác ($p>0,05$) (Bảng P1.2.13).

Bảng 3.9. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các hợp chất và hoạt tính DPPH của BLL

	Chlo	Chlo a	Chlo b	Poly	Flav	DPPH
Chlo	1,000					
Chlo a	0,835*	1,000				
Chlo b	0,969*	0,731*	1,000			
Poly	0,981*	0,808*	0,957*	1,000		
Flav	0,984*	0,953*	0,953*	0,991*	1,000	
DPPH	0,979*	0,829*	0,936*	0,977*	0,979*	1,000
Xơ hòa tan	0,253 ^{ns}	0,232 ^{ns}	0,238 ^{ns}	0,238 ^{ns}	0,213 ^{ns}	0,248 ^{ns}

Ghi chú: (): Mối tương quan có ý nghĩa thống kê $p<0,01$. ns: Mối tương quan không có ý nghĩa thống kê $p>0,05$. Chlo=Chlorophyll, Poly=Polyphenol, Flav=Flavonoid.*

Kết quả phân tích cụm bằng phương pháp trung bình nhóm với khoảng cách Euclidean bình phương cho thấy polyphenol và DPPH có mức liên kết cao nhất, tiếp theo là flavonoid (Hình 3.23; Bảng P1.2.14).



Hình 3.23. Biểu đồ phân tích cụm giữa các giá trị của BLL

Chlorophyll tổng và chlorophyll b cũng có mối liên kết chặt hơn so với chlorophyll a. Xơ hòa tan tách biệt hoàn toàn với các nhóm hợp chất sinh học khác, phù hợp với phân tích tương quan Spearman.

Tóm lại, polyphenol và flavonoid có mối liên hệ chặt chẽ nhất với hoạt tính chống oxy hóa DPPH, tiếp theo là chlorophyll tổng và chlorophyll b, trong khi chlorophyll a tương quan thấp hơn và xơ hòa tan không có mối tương quan đáng kể. Kết quả phân tích cụm phù hợp với tương quan Spearman, khẳng định vai trò chủ đạo của polyphenol và flavonoid trong khả năng khử gốc tự do.

3.2.3.3. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun đến chất lượng BLL

Việc xác định 120°C là nhiệt độ thích hợp nhất trong phạm vi nghiên cứu phản ánh sự cân bằng nhiệt động học quan trọng giữa tốc độ bay hơi nước và độ bền nhiệt của các hợp chất hữu cơ. Ở mức nhiệt độ này, quá trình truyền nhiệt và truyền khối diễn ra đủ nhanh để dung môi bay hơi, giúp chất mang maltodextrin nhanh chóng hình thành lớp màng bao bọc, bảo vệ các hoạt chất bên trong trước khi chúng chịu tác động phá hủy kéo dài của nhiệt độ.

Ngược lại, ở các mức nhiệt độ sấy cao hơn (>130°C), mặc dù hiệu suất làm khô tăng nhưng động học phân hủy của các hợp chất nhạy nhiệt diễn ra mạnh mẽ hơn tốc độ tạo màng bảo vệ [179]. Cụ thể, nhiệt độ cao thúc đẩy phản ứng thế ion trung tâm Mg^{2+} bằng H^+ trong vòng porphyrin của chlorophyll để tạo thành pheophytin sẫm màu, đồng thời kích hoạt các phản ứng oxy hóa và trùng ngưng làm phá vỡ cấu trúc của polyphenol và flavonoid [180]. Sự suy giảm đồng thời của hai nhóm hợp chất chủ lực này là nguyên nhân trực tiếp dẫn đến việc giảm mạnh hoạt tính khử gốc tự do DPPH ở các mẫu sấy nhiệt độ cao. Các kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đó như trên bột lá ổi [181], bột lá sả [182], và trà xanh [183], trong đó các hợp chất phenolic bị suy giảm rõ rệt khi sấy ở nhiệt độ trên 140°C.

So sánh với các nghiên cứu trước, nhiệt độ sấy phun thích hợp có sự khác biệt tùy thuộc vào loại nguyên liệu. Cụ thể, nghiên cứu trên bột lá sả ở nhiệt độ 130°C là phù hợp nhất để bảo toàn hàm lượng polyphenol, flavonoid và hoạt tính chống oxy hóa [182], trong khi bột lá trà xanh đạt hàm lượng polyphenol cao nhất ở 140°C [183].

Sự suy giảm hàm lượng chlorophyll, polyphenol và flavonoid trong quá trình sấy được xem là nguyên nhân chính làm giảm hoạt tính DPPH. Nghiên cứu trên cây hương nhu (*Dracocephalum moldavica* L.) cũng cho thấy sấy phun ở

nhệt độ từ 150°C trở lên gây suy giảm đáng kể hoạt tính DPPH, chủ yếu do phân hủy các hợp chất phenolic và tăng cường phản ứng oxy hóa [184].

Phân tích cụm và tương quan Spearman đã khẳng định mối liên hệ chặt chẽ giữa các hợp chất này và hoạt tính chống oxy hóa, phù hợp với các nghiên cứu trước đó [185,186]. Polyphenol và flavonoid là những hợp chất đóng vai trò chính trong khả năng khử gốc tự do của BLL. Nhóm hợp chất này có cấu trúc giàu nhóm hydroxyl (-OH) dễ dàng cho và nhận electron, giúp trung hòa các gốc tự do DPPH thông qua cơ chế cho hydrogen hoặc chuyển electron. Điều này lý giải mối tương quan rất cao giữa hàm lượng các hợp chất này và hoạt tính bắt gốc DPPH. Trong khi đó, chlorophyll cũng có hoạt tính chống oxy hóa nhờ khả năng tạo phức với ion kim loại và khử các dạng oxy phản ứng, nhưng vai trò này yếu hơn so với polyphenol và flavonoid.

Ngược lại, hàm lượng xơ hòa tan có xu hướng ổn định giữa các mức nhiệt độ và không liên quan đến hoạt tính chống oxy hóa, do không có cấu trúc hóa học thuận lợi cho phản ứng bắt gốc tự do, phù hợp với các nghiên cứu trước đây về đặc tính sinh học của chất xơ. Tuy nhiên, nhiều công trình đã chỉ ra rằng xơ hòa tan có thể tương tác với polyphenol qua liên kết hydro hoặc cộng hóa trị, giúp cải thiện độ ổn định và khả năng hấp thu của các hợp chất này [187].

MD là một polyglucosaccharide trơ về mặt sinh học (không chứa polyphenol), nên không ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm [81]. Vi bao bằng MD giúp bảo vệ các hợp chất phenolic khỏi phân hủy nhiệt trong quá trình sấy và nâng cao độ bền của sản phẩm trong bảo quản [188]. Khi dịch phun tiếp xúc với không khí nóng, nước bốc hơi nhanh chóng, các phân tử MD có xu hướng di chuyển ra bề mặt giọt lỏng, tạo thành một lớp vỏ cứng bao bọc lấy các hợp chất chlorophyll và polyphenol ở bên trong. Lớp vỏ này hoạt động như một rào cản vật lý, hạn chế sự tiếp xúc trực tiếp của oxy và nhiệt độ cao với các hoạt chất nhạy cảm, giảm thiểu phản ứng oxy hóa và phân hủy nhiệt. Tại nhiệt độ đầu vào 120°C, quá trình bay hơi nước diễn ra đủ nhanh để làm khô hạt bột nhưng nhiệt độ bề mặt hạt bột không tăng quá cao, giúp bảo vệ cấu trúc porphyrin của chlorophyll. Nếu nhiệt độ đầu vào quá thấp (<120°C), quá trình bay hơi chậm dẫn đến độ ẩm dư cao, bột dễ bị dính vào thành buồng sấy, làm giảm hiệu suất thu hồi và tăng nguy cơ oxy hóa do ẩm. Ngược lại, nếu nhiệt độ quá cao (>130°C), lớp vỏ bảo vệ MD có thể bị nứt vỡ do áp suất hơi nước nội tại tăng nhanh, đồng thời nhiệt độ đầu ra tăng cao sẽ gây biến tính nhiệt các hợp chất polyphenol, dẫn đến suy giảm hoạt tính kháng oxy hóa như đã ghi nhận ở kết quả thực nghiệm.

Mặc dù sấy đông khô bảo toàn hợp chất sinh học tốt hơn, nhưng chi phí và năng lượng tiêu thụ cao [189], không phù hợp cho sản xuất quy mô công nghiệp. Trong khi đó, sấy phun ở 120°C cho sản phẩm bột có chất lượng cao, bảo toàn hoạt chất sinh học và phù hợp để ứng dụng trong ngành thực phẩm chức năng.

Ngoài ra, để hoàn thiện quy trình công nghệ, các chỉ tiêu công nghệ như hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm, độ hòa tan và kích thước hạt cần được khảo sát chi tiết hơn trong các nghiên cứu tiếp theo, nhằm nâng cao tính ổn định, khả năng hòa tan và giá trị ứng dụng thực tiễn của sản phẩm bột lá lúa non.

Tóm lại, sấy phun ở 120°C là nhiệt độ thích hợp để thu nhận BLL, giúp bảo toàn tốt chlorophyll, polyphenol, flavonoid và duy trì hoạt tính chống oxy hóa, đồng thời tiết kiệm chi phí hơn so với sấy đông khô, phù hợp cho sản xuất quy mô công nghiệp.

3.2.4. Phân tích chất lượng BLL theo tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm

Kết quả phân tích các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm của BLL được trình bày tại Bảng 3.10. Về chỉ tiêu vi sinh vật, kết quả cho thấy sản phẩm có độ sạch khuẩn cao. Các vi sinh vật chỉ thị và gây bệnh phổ biến như *E. coli*, *Coliforms*, *Clostridium perfringens* và *Bacillus cereus* đều nằm dưới ngưỡng phát hiện (< 10 CFU/g). Tổng số vi sinh vật hiếu khí ($2,2 \times 10^3$ CFU/g) và tổng số bào tử nấm men, nấm mốc (< 10 CFU/g) đều thấp hơn rất nhiều so với giới hạn cho phép quy định tại Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia QCVN 8-3:2012/BYT đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm (nhóm sản phẩm dạng bột từ ngũ cốc và thực vật).

Về chỉ tiêu hóa lý, hàm lượng các kim loại nặng độc hại bao gồm chì (Pb), asen (As), thủy ngân (Hg), và cadimi (Cd) đều không phát hiện (ND) hoặc thấp hơn ngưỡng quy định tại QCVN 8-2:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm. Đồng thời, hàm lượng độc tố vi nấm Aflatoxin (tổng số và B1) cũng không được ghi nhận trong mẫu sản phẩm, đáp ứng yêu cầu an toàn theo QCVN 8-1:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm.

Bảng 3.10. Kết quả phân tích chất lượng BLL so với quy chuẩn Việt Nam

Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả	Giới hạn cho phép	Quy chuẩn tham chiếu
I. Chỉ tiêu vi sinh vật		QCVN 8-3:2012/BYT⁽¹⁾		
Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	$2,2 \times 10^3$	10^6	TCVN 4884:2005
<i>Coliforms</i>	CFU/g	< 10	10	TCVN 6848:2007
<i>E. coli</i>	CFU/g	< 10	10	TCVN 7924-2:2008
<i>Bacillus cereus</i>	CFU/g	< 10	10^2	TCVN 4992:2005
<i>Clostridium perfringens</i>	CFU/g	< 10	10	TCVN 4991:2005
Tổng số bào tử nấm men, mốc	CFU/g	< 10	10^3	TCVN 8275-1:2010
II. Kim loại nặng		QCVN 8-2:2011/BYT⁽²⁾		
Asen (As)	mg/kg	ND	1,0	AOAC 986.15
Chì (Pb)	mg/kg	ND	2,0	AOAC 986.15
Cadimi (Cd)	mg/kg	ND	1,0	AOAC 986.15
Thủy ngân (Hg)	mg/kg	ND	0,05	AOAC 971.21
Đồng (Cu)	mg/kg	ND	-	AOAC 999.10
Kẽm (Zn)	mg/kg	ND	-	AOAC 999.10
III. Độc tố vi nấm		QCVN 8-1:2011/BYT⁽³⁾		
Aflatoxin tổng số	µg/kg	ND	10	TCVN
Aflatoxin B1	µg/kg	ND	5	TCVN

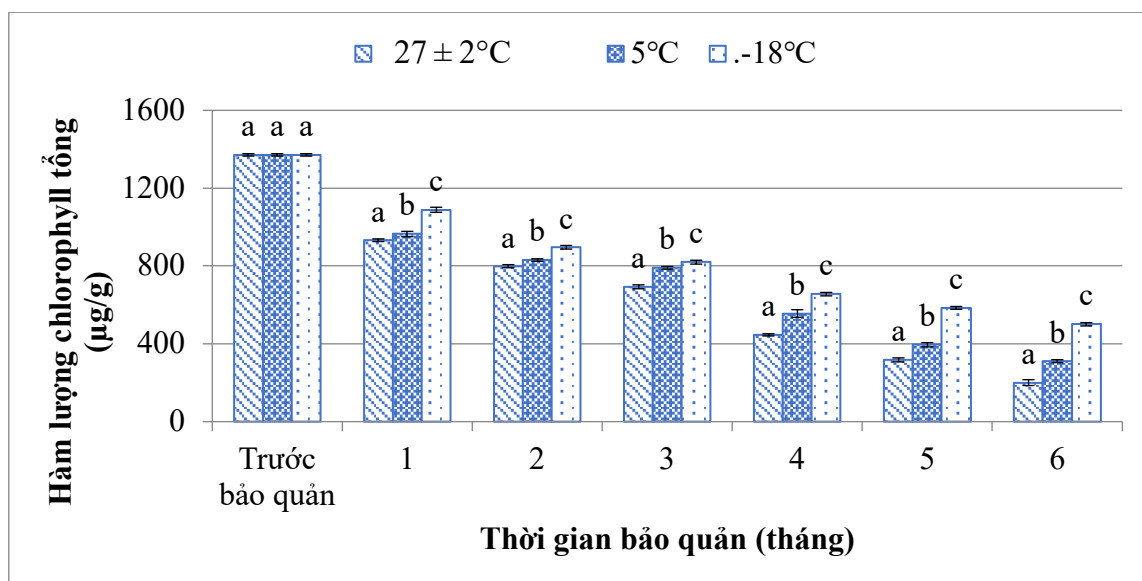
Ghi chú: ND (Not Detected): Không phát hiện; (-): Không quy định giới hạn trong quy chuẩn tương ứng; (1) Áp dụng giới hạn đối với nhóm "Sản phẩm dạng bột từ ngũ cốc, tinh bột, củ" (Mục 1.4 - QCVN 8-3:2012/BYT); (2) Áp dụng giới hạn đối với nhóm "Rau, quả dạng khô" (QCVN 8-2:2011/BYT) để đảm bảo an toàn cao nhất cho sản phẩm dạng bột thực vật; (3) QCVN 8-1:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm.

Như vậy, kết quả phân tích khẳng định quy trình công nghệ thu nhận BLL (từ khâu xử lý nguyên liệu, chiết xuất đến sấy phun) đã đảm bảo tốt các yêu cầu về vệ sinh an toàn thực phẩm. Sản phẩm BLL đạt tiêu chuẩn để sử dụng làm nguyên liệu trong chế biến thực phẩm chức năng hoặc các chế phẩm bổ sung dinh dưỡng cho người và động vật.

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

Hàm lượng chlorophyll tổng trong BLL giảm dần trong suốt thời gian 6 tháng bảo quản ở các điều kiện $27 \pm 2^\circ\text{C}$, 5°C và -18°C (Hình 3.24). Sự suy giảm này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) từ tháng thứ nhất đến tháng thứ sáu (Bảng P1.2.15).



Hình 3.24. Hàm lượng chlorophyll tổng trong BLL theo thời gian bảo quản

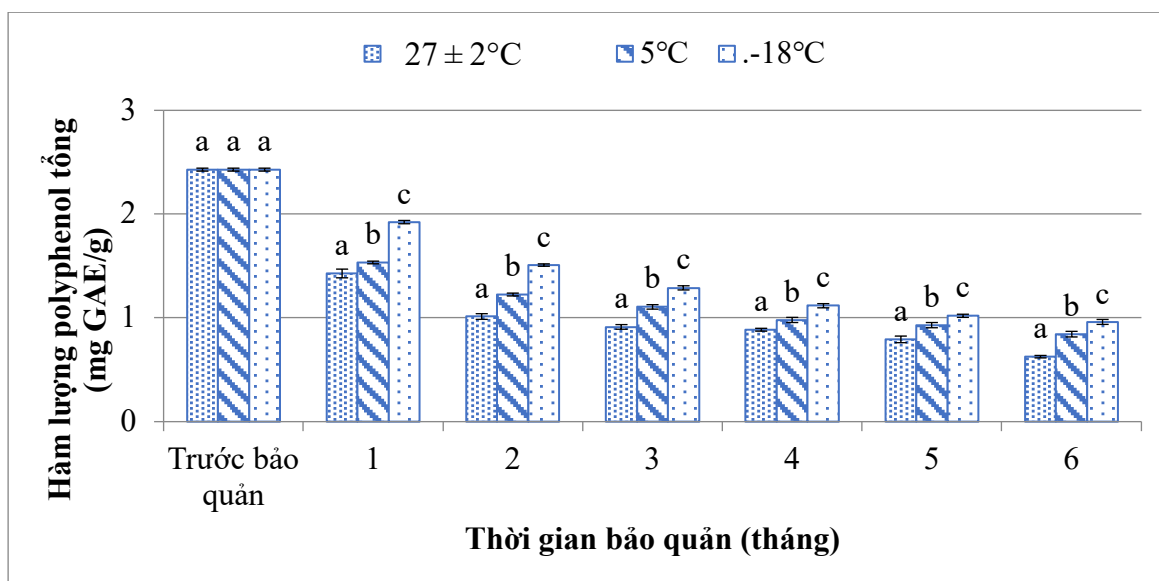
Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một thời gian bảo quản ($p < 0,05$).

Trong ba điều kiện nghiên cứu, BLL bảo quản ở nhiệt độ phòng $27 \pm 2^\circ\text{C}$ dẫn đến sự suy giảm nhanh nhất, đặc biệt ở tháng thứ sáu, hàm lượng chlorophyll chỉ còn khoảng 200 µg/g. Ngược lại, bảo quản ở -18°C duy trì hàm lượng chlorophyll cao nhất trong toàn bộ thời gian, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các điều kiện còn lại ($p < 0,05$). Bảo quản ở 5°C cũng giúp duy trì chlorophyll tốt hơn so với $27 \pm 2^\circ\text{C}$, nhưng kém hiệu quả hơn so với -18°C .

3.2.5.2. Ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol tổng

Tương tự như chlorophyll, hàm lượng polyphenol tổng trong BLL cũng giảm dần qua 6 tháng bảo quản (Hình 3.25). Sự giảm này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở cả ba điều kiện bảo quản (Bảng P1.2.16).

Bảo quản ở nhiệt độ thấp cho hiệu quả tốt hơn trong bảo toàn polyphenol. Cụ thể, sau 1 tháng, hàm lượng polyphenol ở -18°C đạt 1,92 mg GAE/g, cao hơn đáng kể so với 1,53 mg GAE/g ở 5°C và 1,43 mg GAE/g ở nhiệt độ phòng $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Xu hướng này được duy trì cho đến tháng thứ sáu, với các giá trị tại -18°C vẫn cao hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các điều kiện khác.

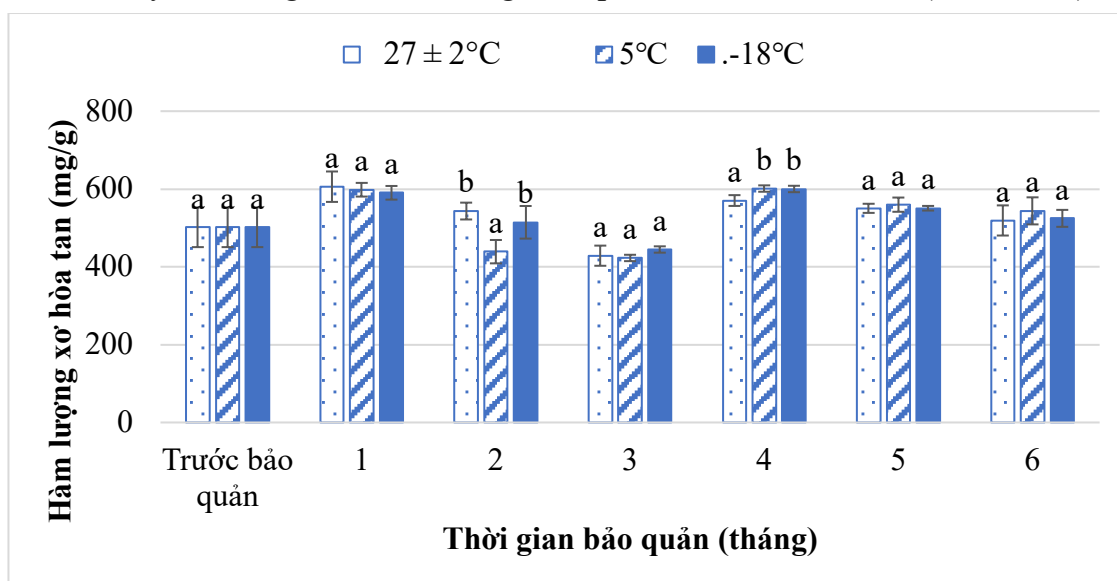


Hình 3.25. Hàm lượng polyphenol tổng trong BLL theo thời gian bảo quản

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một thời gian bảo quản ($p < 0,05$).

3.2.5.3. Ảnh hưởng đến hàm lượng xơ hòa tan

Hàm lượng xơ hòa tan dao động trong khoảng 500–545 mg/g và không ghi nhận sự thay đổi đáng kể sau 6 tháng bảo quản ở cả ba điều kiện (Hình 3.26).



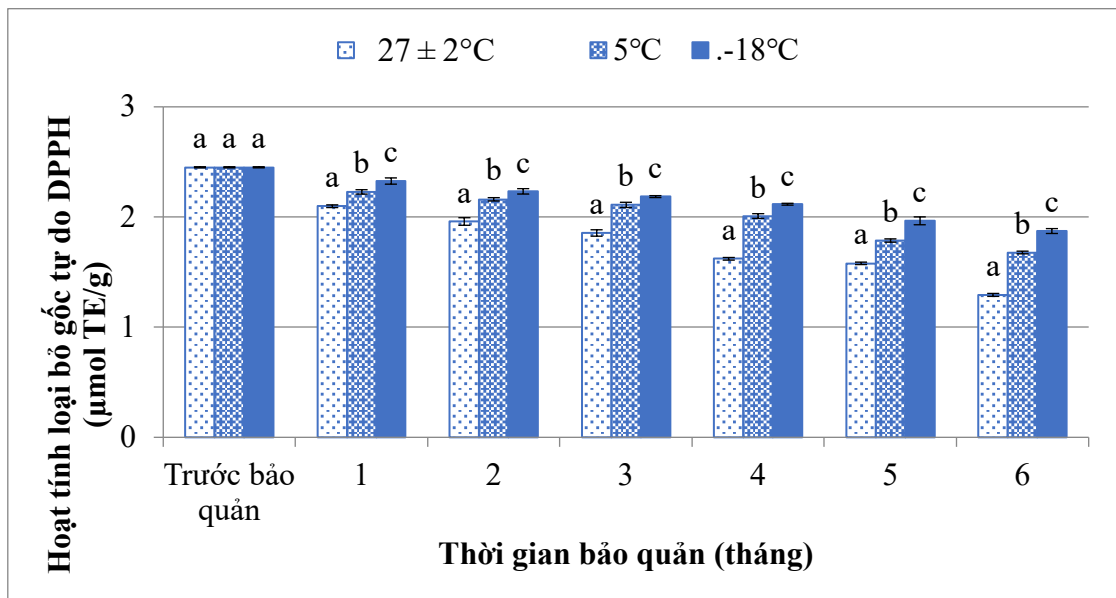
Hình 3.26. Hàm lượng xơ hòa tan trong BLL theo thời gian bảo quản

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một thời gian bảo quản ($p < 0,05$).

Mặc dù có sự biến động nhẹ theo thời gian – cao nhất ở tháng thứ nhất và thứ tư (570–605 mg/g) và thấp nhất ở tháng thứ ba (422–444 mg/g) – nhưng phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt này không có ý nghĩa ($p > 0,05$) (Bảng P1.2.17). So sánh theo điều kiện bảo quản, -18°C ghi nhận hàm lượng xơ hòa tan cao hơn nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

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

Hoạt tính chống oxy hóa của BLL, được đo thông qua khả năng khử gốc tự do DPPH, cũng giảm dần theo thời gian bảo quản ở tất cả các điều kiện nhiệt độ (Hình 3.27). Trong 4 tháng đầu, hoạt tính DPPH giảm chậm hơn ở điều kiện 5°C và -18°C, với giá trị lần lượt đạt 2,01 $\mu\text{mol TE/g}$ và 2,12 $\mu\text{mol TE/g}$ ở tháng thứ tư. Tuy nhiên, từ tháng thứ năm trở đi, mức suy giảm rõ rệt hơn, đặc biệt ở nhiệt độ phòng $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Phân tích thống kê xác nhận sự suy giảm này là có ý nghĩa ($p < 0,05$) (Bảng P1.2.18), trong đó hoạt tính DPPH ở điều kiện 5°C và -18°C luôn cao hơn đáng kể so với nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ trong suốt thời gian bảo quản ($p < 0,05$).



Hình 3.27. Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH của BLL theo thời gian bảo quản

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên đầu cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một thời gian bảo quản ($p < 0,05$).

3.2.5.5. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ và thời gian bảo quản lên chất lượng của BLL

Chlorophyll là hợp chất dễ phân hủy bởi nhiệt, ánh sáng và enzyme chlorophyllase. Hai cơ chế phân hủy phổ biến gồm: (1) phản ứng thay thế ion Mg^{2+} bằng H^+ tạo pheophytin, làm chuyển màu từ xanh lục sang nâu ô liu, và (2) sự thủy phân bởi enzyme chlorophyllase, tạo chlorophyllide và sau đó tiếp tục biến đổi thành pheophorbide dưới tác động nhiệt [180]. Các báo cáo trên bột thylakoid cũng xác nhận sự suy giảm chlorophyll do thủy phân enzyme và phân hủy hóa học trong suốt quá trình bảo quản [190]. Kết quả nghiên cứu hiện tại phù hợp với các báo cáo trên, khi chlorophyll giảm dần theo thời gian, đặc biệt là ở nhiệt độ cao.

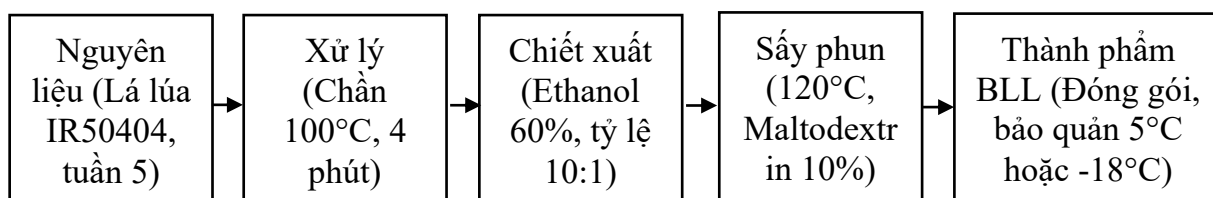
Hàm lượng polyphenol tổng cũng suy giảm mạnh theo thời gian, chứng tỏ tính nhạy cảm cao của các hợp chất phenolic trong BLL. Trong một nghiên cứu trên quả *Myrica rubra*, anthocyanin bị phân hủy nhanh hơn so với các polyphenol khác [191]. Nguyên nhân chính là do hoạt động của enzyme PPO còn sót lại, xúc tác quá trình oxy hóa các hợp chất phenolic thành quinon, dẫn đến đổi màu và suy giảm hoạt tính sinh học [192]. Tốc độ suy giảm hoạt chất tuân theo quy luật động học, trong đó nhiệt độ thấp (-18°C) làm giảm đáng kể tốc độ phản ứng oxy hóa và hoạt động của enzyme PPO còn sót lại.

Hoạt tính DPPH của BLL phản ánh rõ rệt xu hướng suy giảm cùng với chlorophyll và polyphenol. Nghiên cứu trên bột trà xanh *Camellia sinensis* với hoạt tính DPPH và polyphenol giảm mạnh ở các điều kiện nhiệt độ cao chỉ sau hai tháng bảo quản [193]. Các hợp chất phenolic dễ bị thoái biến khi tiếp xúc lâu với nhiệt độ cao, làm giảm khả năng chống oxy hóa [193]. Trong khi đó, bảo quản lạnh, đặc biệt ở -18°C , giúp duy trì hàm lượng hoạt chất và hoạt tính sinh học tốt hơn. Kết quả này tương đồng với báo cáo trên vi tảo *Arthrospira platensis* khi bảo quản đông lạnh duy trì tốt các hợp chất sinh học [185].

Mặc dù xơ hòa tan không có thay đổi đáng kể trong suốt quá trình bảo quản, nhưng các nghiên cứu đã ghi nhận vai trò của xơ hòa tan trong việc liên kết với polyphenol thông qua liên kết ether, ester hoặc hydro, đóng góp vào hoạt tính chống oxy hóa của thực phẩm [187]. Do đó, việc bảo toàn xơ hòa tan là yếu tố có giá trị dinh dưỡng và chức năng.

Nhiệt độ bảo quản thấp, đặc biệt 5°C và -18°C , giúp duy trì tốt hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của BLL, đồng thời giảm hoạt động của các enzyme chưa được bất hoạt hoàn toàn. Trong đó, -18°C là điều kiện thích hợp để bảo quản BLL, đảm bảo chất lượng sản phẩm trong thời gian dài.

Tóm lại, quá trình công nghệ thu nhận BLL được đề xuất bao gồm:



Hình 3.28. Đề xuất quy trình công nghệ thu nhận bột lá lúa non.

Thuyết minh quy trình (Hình 3.28): Lá lúa non giống IR50404 được thu hoạch tại tuần thứ 5 (giai đoạn tích lũy hoạt chất cao nhất). Nguyên liệu sau khi làm sạch được chần ở 100°C trong 4 phút để bất hoạt hoàn toàn enzyme PPO, ngăn ngừa phản ứng nâu hóa. Quá trình trích ly thực hiện với ethanol 60%, tỷ lệ

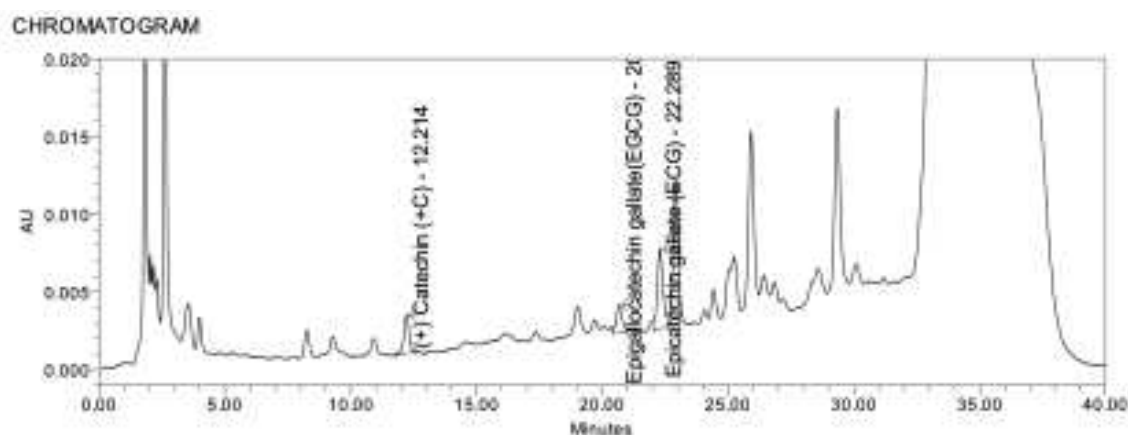
1:10 giúp thu hồi tối đa chlorophyll và polyphenol. Dịch chiết sau đó được phối trộn với maltodextrin 10% và sấy phun ở nhiệt độ 120°C – điều kiện đã được chứng minh giúp cân bằng giữa hiệu suất thu hồi bột và bảo toàn hoạt tính chống oxy hóa (DPPH). Sản phẩm cuối cùng cần được bảo quản ở nhiệt độ thấp (5°C đến -18°C) để duy trì chất lượng ổn định.

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

3.3.1. Phân tích HPLC xác định nhóm chất catechin

Kết quả phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) tại Hình 3.29 cho thấy biên dạng sắc ký đồ của dịch chiết BLL khá phức tạp với sự xuất hiện của nhiều tín hiệu (peak) khác nhau, phản ánh sự đa dạng của các thành phần hóa học trong mẫu. Trong phạm vi nghiên cứu này, dựa trên so sánh với chất chuẩn, đề tài đã xác định được sự hiện diện của một số hợp chất thuộc nhóm catechin bao gồm: Catechin (1,23 mg/L), epigallocatechin gallate (EGCG) (0,90 mg/L), và epicatechin gallate (ECG) (2,59 mg/L).

Bên cạnh nhóm catechin đã định danh, sắc ký đồ cũng ghi nhận nhiều peak có cường độ tín hiệu cao khác chưa được xác định cấu trúc. Điều này cho thấy ngoài nhóm catechin, trong BLL còn tồn tại tiềm năng các nhóm hợp chất thứ cấp khác cùng đóng góp vào đặc tính sinh học chung của sản phẩm.



Hình 3.29. Sắc ký đồ trong kết quả phân tích HPLC của BLL

Nhóm chất catechin thuộc họ flavanol, đã được chứng minh có hoạt tính sinh học đa dạng như: chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, chống ung thư, chống dị ứng, chống đông máu, chống loét và kháng virus [194]. Trong đó, EGCG là hợp chất nổi bật nhất do chứa nhiều nhóm hydroxyl trong cấu trúc, giúp trung hòa các gốc tự do, tạo phức với kim loại và ức chế các enzyme gây viêm như cyclooxygenase và lipoxygenase [195]. Các catechin không chỉ có tiềm năng ứng dụng trong y học, đặc biệt trong điều trị các bệnh lý như tim mạch, tiểu đường và

ung thư nhờ khả năng bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa và tổn thương DNA [196], mà còn được sử dụng trong mỹ phẩm với vai trò chống lão hóa, bảo vệ da khỏi tác động của tia UV [197]. Sự hiện diện của các catechin trong BLL là cơ sở quan trọng để giải thích một phần những tác động sinh học tiềm năng của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột và sức khỏe vật chủ.

3.3.2. Khảo sát hoạt tính chống oxy hoá của BLL

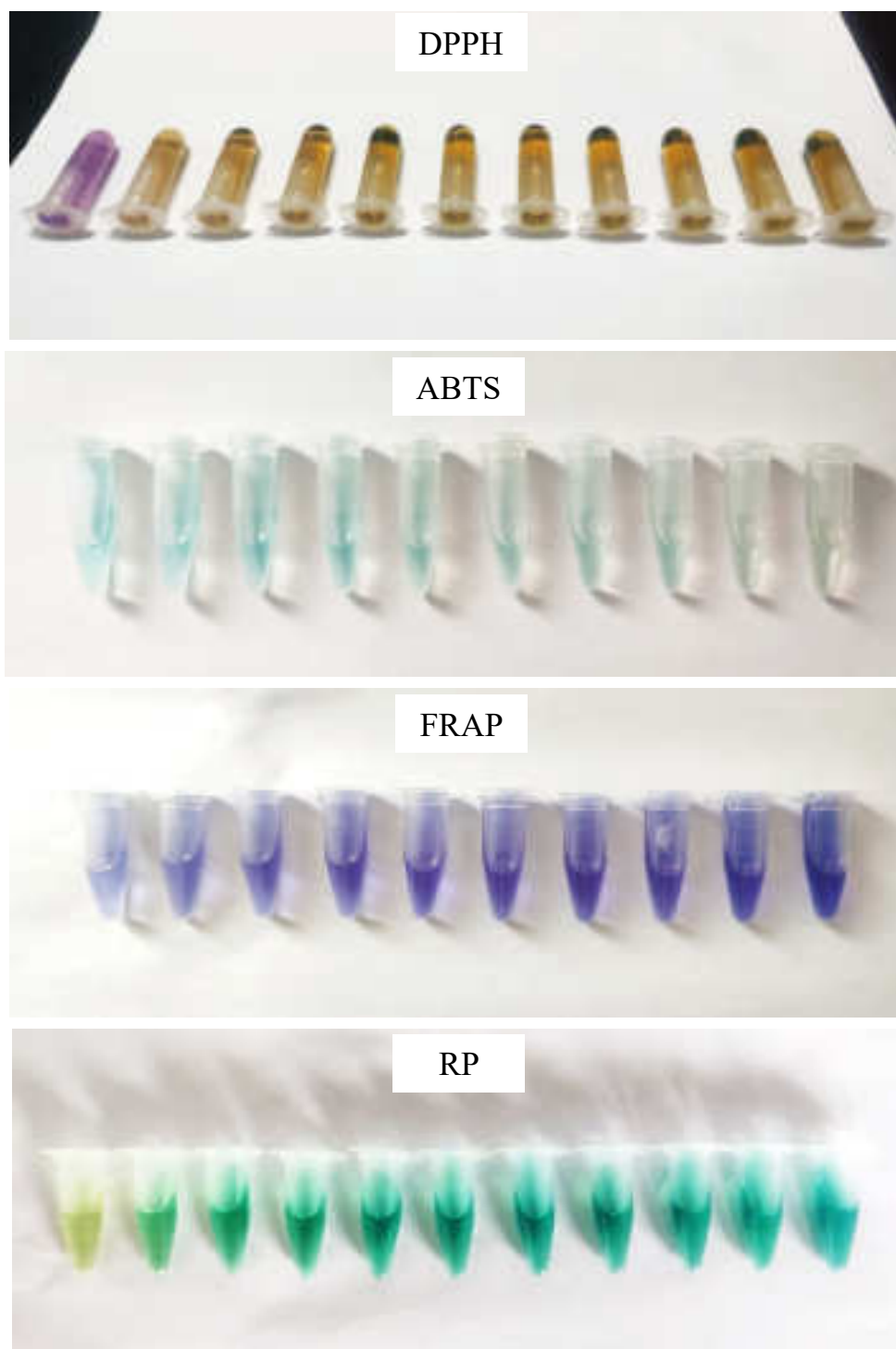
BLL ở các nồng độ từ 1% đến 10% (w/v) được phân tích về hàm lượng các chất bao gồm chlorophyll tổng, polyphenol tổng và xơ hòa tan. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Hàm lượng chlorophyll, polyphenol và xơ hòa tan trong BLL

Nồng độ BLL (%) (w/v)	Chlorophyll tổng* (µg/g)	Polyphenol tổng* (mg GAE/g)	Xơ hòa tan ^{ns} (mg/g)
1	491,83 ^a ±16,15	0,86 ^a ±0,04	590,72±73,08
2	556,91 ^b ±10,24	1,03 ^b ±0,02	599,60±19,30
3	606,47 ^{bc} ±13,53	1,11 ^{bc} ±0,01	599,75±27,52
4	660,24 ^{cd} ±31,25	1,17 ^{cd} ±0,05	608,24±7,34
5	702,04 ^{de} ±12,97	1,24 ^{de} ±0,04	596,40±10,46
6	734,12 ^e ±21,92	1,35 ^e ±0,07	603,40±13,16
7	792,04 ^f ±4,67	1,45 ^f ±0,10	611,57±26,88
8	805,42 ^{fg} ±36,49	1,54 ^f ±0,12	600,79±6,49
9	860,99 ^{gh} ±31,52	1,80 ^g ±0,03	625,21±7,88
10	868,47 ^h ±15,94	1,96 ^h ±0,03	630,21±3,01
CV%	2,75	3,81	3,25

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD. (): Trong cùng một cột, các giá trị theo sau bởi một hoặc những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). ns: các giá trị trong cùng một cột khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). GAE = tương đương gallic acid.*

Hàm lượng chlorophyll tổng tăng dần theo nồng độ BLL. Ở nồng độ 1%, hàm lượng chlorophyll tổng thấp nhất, trong khi ở nồng độ 10%, hàm lượng đạt cao nhất, tăng khoảng 1,7 lần so với nồng độ 1%. Phân tích thống kê cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa về hàm lượng chlorophyll giữa các nồng độ BLL ($p < 0,05$) (Bảng P1.3.1).



Hình 3.30. Thử nghiệm DPPH, ABTS, FRAP và RP theo nồng độ BLL

Hàm lượng polyphenol tổng cũng tăng theo nồng độ BLL, với giá trị thấp nhất là 0,86 mg GAE/g ở nồng độ 1% và cao nhất là 1,96 mg GAE/g ở nồng độ 10%. Phân tích thống kê ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa về hàm lượng polyphenol tổng ở các nồng độ 1%, 2%, 6%, 9% và 10% ($p < 0,05$) (Bảng P1.3.2).

Khác với chlorophyll và polyphenol, hàm lượng xơ hòa tan biến thiên không ổn định theo nồng độ BLL. Sự biến động này khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) (Bảng P1.3.3).

Hoạt tính chống oxy hóa của BLL được đánh giá thông qua giá trị IC₅₀ trong các phép thử DPPH, ABTS, FRAP và RP, với vitamin C làm đối chứng (Hình 3.31 và Bảng 3.12). Kết quả cho thấy BLL có khả năng khử gốc tự do nhưng hiệu lực thấp hơn đáng kể so với chất chuẩn vitamin C ở cả 4 xét nghiệm.

Bảng 3.12. Phương trình hồi quy và IC₅₀ của BLL và vitamin C

Thử nghiệm	Mẫu	Phương trình hồi quy	R ²	IC ₅₀
DPPH	Vitamin C	$y = 8,0377x + 0,8419$	0,995	6,12 µg/mL
	BLL	$y = 0,5554x + 24,622$	0,789	45,69 mg/mL
ABTS	Vitamin C	$y = 1,1118x + 2,5817$	0,993	42,65 µg/mL
	BLL	$y = 0,5624x + 4,5034$	0,987	80,90 mg/mL
FRAP	Vitamin C	$y = 2,0463x + 2,7414$	0,990	23,09 µg/mL
	BLL	$y = -0,0076x^2 + 1,3736x + 9,8487$	0,951	36,67 mg/mL
RP	Vitamin C	$y = 0,0462x + 0,0187$	0,991	3,69 µg/mL
	BLL	$y = -0,004x^2 + 1,0713x + 8,8369$	0,964	46,49 mg/mL

Nhìn chung, hàm lượng chlorophyll và polyphenol trong BLL tăng dần theo nồng độ, trong khi xơ hòa tan không biến động có ý nghĩa thống kê. BLL thể hiện khả năng chống oxy hóa thông qua các phép thử DPPH, ABTS, FRAP và RP nhưng hiệu lực thấp hơn đáng kể so với vitamin C. Điều này cho thấy BLL có tiềm năng chống oxy hóa, chủ yếu nhờ các hợp chất chlorophyll và polyphenol, nhưng hoạt tính yếu hơn so với chất chống oxy hóa chuẩn.

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

Phân tích đa biến, bao gồm tương quan Spearman và phân tích cụm, được thực hiện để đánh giá mối quan hệ giữa hàm lượng hợp chất và hoạt tính chống oxy hóa của BLL (Bảng P1.3.4 và P1.3.5). Kết quả phân tích tương quan Spearman (Bảng 3.13) thể hiện mối liên hệ rõ rệt giữa hàm lượng các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của BLL. Cụ thể, hàm lượng polyphenol thể hiện tương quan cao và có ý nghĩa thống kê ($p < 0,01$) với các chỉ số hoạt tính chống oxy hóa, bao gồm DPPH ($R = 0,984$), ABTS ($R = 0,971$), FRAP ($R = 0,980$) và RP ($R = 0,983$). Tương tự, hàm lượng chlorophyll cũng có mối tương quan chặt chẽ với DPPH ($R = 0,965$), ABTS ($R = 0,958$), FRAP ($R = 0,952$) và RP ($R =$

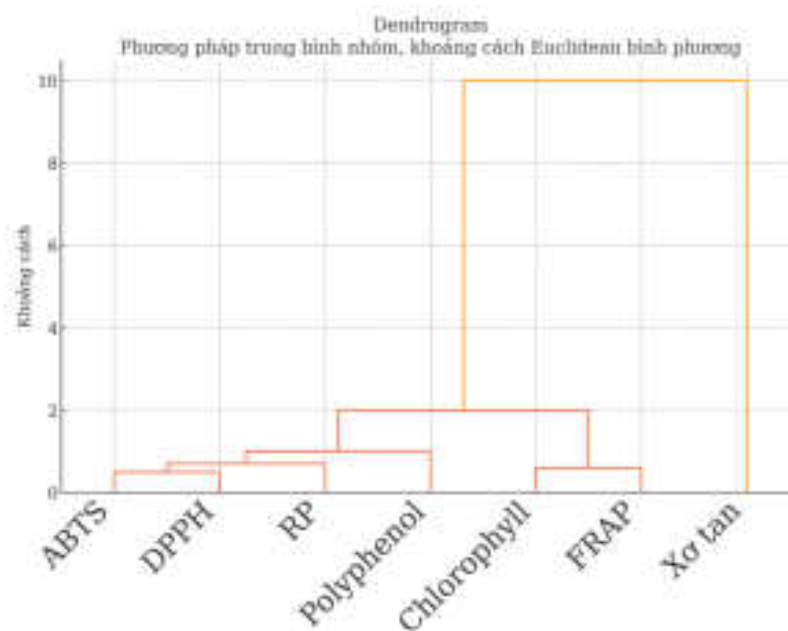
0,972) ($p < 0,01$), chứng tỏ vai trò quan trọng của sắc tố này trong việc tham gia vào quá trình trung hòa gốc tự do và khử oxy hóa.

Bảng 3.13. Hệ số tương quan Spearman (R) giữa các thông số của bột lá lúa

	Chlo	Poly	Xơ hòa tan	DPPH	ABTS	FRAP
Chlo	1,000					
Poly	0,967*	1,000				
Xơ hòa tan	0,393**	0,429**	1,000			
DPPH	0,965*	0,984*	0,408**	1,000		
ABTS	0,958*	0,971*	0,369**	0,984*	1,000	
FRAP	0,952*	0,980*	0,396**	0,988*	0,988*	1,000
RP	0,972*	0,983*	0,368**	0,988*	0,992*	0,989*

Ghi chú: (*) Mối tương quan với ý nghĩa thống kê $p < 0,01$. (**) Mối tương quan có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Chlo = Chlorophyll; Poly = Polyphenol.

Ngược lại, hàm lượng xơ hòa tan chỉ thể hiện mối tương quan thấp với các phép thử chống oxy hóa, với hệ số R dao động từ 0,36 đến 0,41 ($p < 0,05$), cho thấy chất xơ không đóng vai trò chính trong hoạt tính chống oxy hóa trực tiếp của BLL.



Hình 3.31. Biểu đồ phân tích cụm giữa các thông số của BLL

Phân tích cụm sử dụng phương pháp trung bình nhóm với khoảng cách Euclidean bình phương cho thấy polyphenol nhóm cùng DPPH, ABTS, RP; trong khi chlorophyll gần với FRAP (Hình 3.31).

3.3.4. Đánh giá khả năng chống oxy hoá của BLL

Hoạt tính chống oxy hóa của BLL được xác định là kết quả của sự tương tác tổng hợp giữa đa dạng các thành phần hoạt chất. Kết quả phân tích tương quan

đã khẳng định vai trò quan trọng của hàm lượng polyphenol tổng số và chlorophyll trong cơ chế khử gốc tự do và khử sắt của sản phẩm. Đối với nhóm catechin, mặc dù kết quả HPLC cho thấy hàm lượng định lượng được (Catechin, EGCG, ECG) chưa chiếm ưu thế tuyệt đối so với các tín hiệu (peak) khác trên sắc ký đồ, sự hiện diện của chúng vẫn được ghi nhận là một trong những nhân tố đóng góp vào tiềm năng chống oxy hóa chung của BLL. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của các peak có cường độ cao chưa được định danh gợi ý rằng còn tồn tại các nhóm hợp chất khác cùng tham gia vào hoạt tính sinh học tổng thể, tạo nên tác động cộng hưởng thay vì chỉ phụ thuộc vào riêng lẻ nhóm chất catechin.

Catechin và các dẫn xuất là nhóm flavonoid nổi bật có cơ chế chống oxy hóa thông qua khả năng cho proton hoặc electron để trung hòa gốc tự do, đồng thời tạo phức chelating với ion kim loại chuyển tiếp (Fe^{2+} , Cu^{2+}), từ đó hạn chế phản ứng Fenton sinh ra gốc hydroxyl gây hại [194]. Ngoài ra, catechin còn có khả năng ổn định gốc tự do thông qua cộng hưởng electron trên vòng phenolic, làm giảm hoạt tính oxy hóa của các gốc tự do.

BLL có khả năng quét gốc tự do (DPPH, ABTS) và khả năng khử (FRAP, RP) nhưng giá trị IC_{50} cao hơn đáng kể so với chất chuẩn Vitamin C, phản ánh hoạt tính chống oxy hóa của BLL yếu hơn. Điều này được lý giải bởi hàm lượng polyphenol trong BLL thấp hơn so với các nguồn giàu chất chống oxy hóa khác. BLL có thể đóng vai trò như một nguồn chống oxy hóa hỗ trợ, đặc biệt khi kết hợp với các hợp chất có hoạt tính mạnh hơn trong công thức thực phẩm chức năng hoặc sản phẩm tăng cường sức khỏe.

So sánh với các sản phẩm bột thực vật khác, hoạt tính chống oxy hóa của BLL thấp hơn bột lá lúa mì (IC_{50} DPPH = 1,48 mg/g) [198], bột *Eugenia stipitata* qua sấy phun (IC_{50} DPPH = 3,6–4,5 mg/mL) [81], bột vỏ *Opuntia ficus* (IC_{50} DPPH = 0,41–1,25 mg/mL) [199] hay bột vỏ thanh long (*Hylocereus polyrhizus*) (IC_{50} DPPH = 11,44 mg GAE/100 mL) [200].

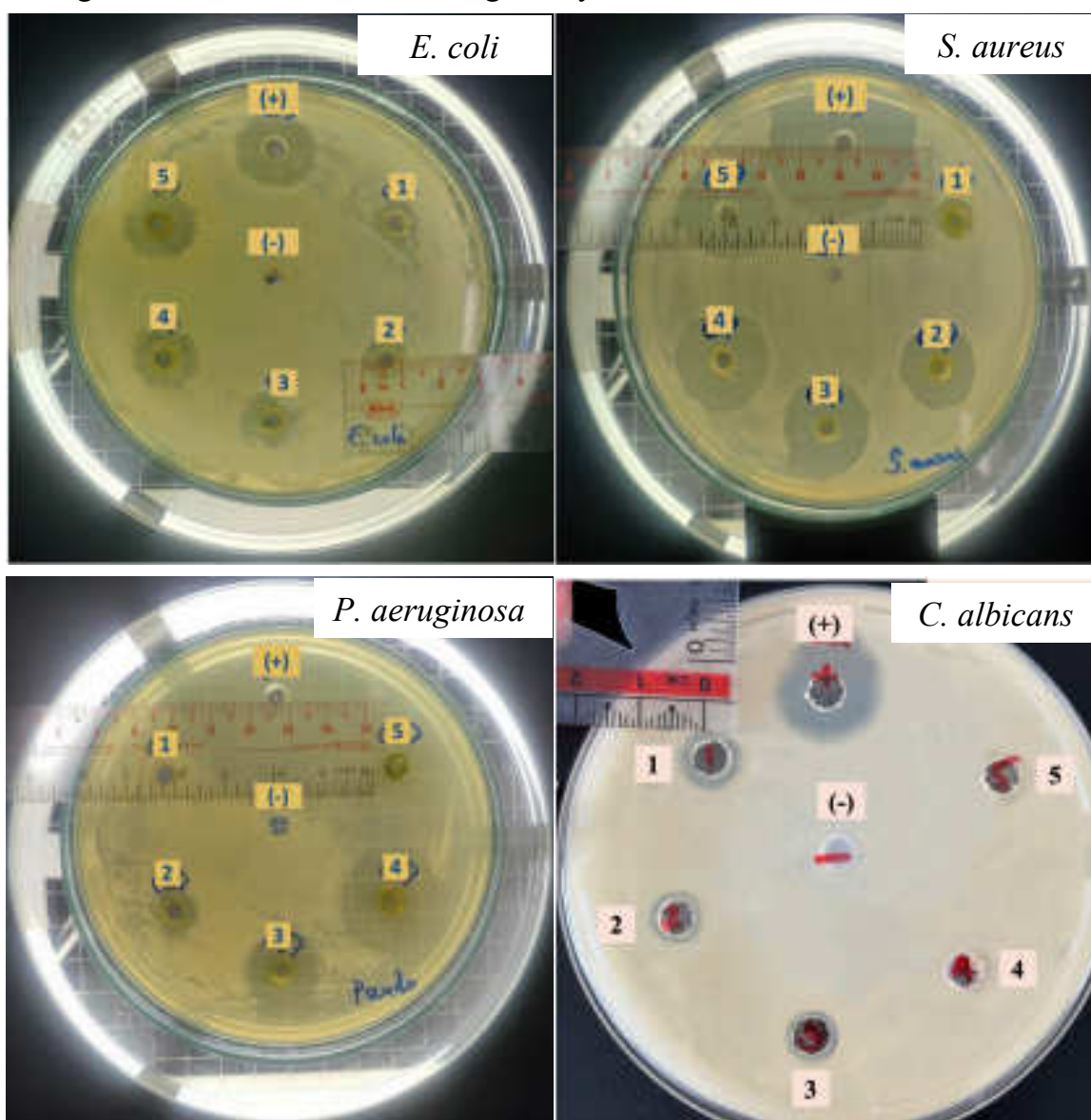
Phân tích đa biến xác nhận mối tương quan chặt chẽ giữa hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của BLL, tương đồng với các nghiên cứu trước đây [51,201]. Ngoài ra, xơ hòa tan trong BLL tuy có tương quan yếu nhưng cũng góp phần vào hoạt tính chống oxy hóa thông qua liên kết hydro hoặc ether với polyphenol.

3.4. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL

3.4.1. Khảo sát hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL

BLL được hòa tan trong DMSO 30%, với các nồng độ 500, 1.000, 2.000, 4.000 và 8.000 $\mu\text{g/mL}$ nhằm đánh giá hoạt tính kháng khuẩn *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* và kháng nấm *C. albicans*.

Kết quả khuếch tán trên giếng thạch (Bảng 3.14 và Hình 3.32) chứng minh BLL thể hiện hoạt tính kháng khuẩn phụ thuộc nồng độ đối với cả vi khuẩn Gram dương, Gram âm và hoạt tính kháng nấm yếu.



Hình 3.32. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của BLL bằng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch

Ghi chú: Nồng độ bột lá lúa 500 $\mu\text{g/mL}$ (1), 1000 $\mu\text{g/mL}$ (2), 2000 $\mu\text{g/mL}$ (3), 4000 $\mu\text{g/mL}$ (4) và 8000 $\mu\text{g/mL}$ (5). ĐC âm (-): DMSO 30%. ĐC dương (+): Ampicillin (100 $\mu\text{g/mL}$).

Đối với *S. aureus*, BLL tạo vòng ức chế từ $5,33 \pm 0,58$ mm tại nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$ và đạt tối đa $21,33 \pm 0,58$ mm ở 8.000 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy độ nhạy cảm cao nhất so với các chủng thử nghiệm ($p < 0,05$) (Bảng P1.4.2).

Bảng 3.14. Đường kính vòng ức chế (mm) của BLL đối với vi khuẩn và nấm

Nồng độ BLL ($\mu\text{g/mL}$)	Đường kính vòng ức chế (mm)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
500	0	$5,33^a \pm 0,58$	$4,80^a \pm 0,16$	0
1000	$3,67^b \pm 0,15$	$12,67^b \pm 1,15$	$8,56^b \pm 0,46$	0
2000	$9,33^c \pm 1,03$	$16,00^c \pm 1,00$	$12,24^c \pm 1,22$	$1,5^b \pm 0,44$
4000	$15,67^d \pm 1,15$	$18,67^d \pm 0,58$	$16,24^d \pm 0,46$	$3,5^c \pm 0,50$
8000	$19,33^e \pm 1,03$	$21,33^e \pm 0,58$	$20,24^e \pm 1,22$	$5,0^d \pm 0,50$
Ampicillin	$37,33^f \pm 1,53$	$31,67^a \pm 1,15$	$25,01^f \pm 0,58$	-
Metronidazol	-	-	-	$7,0^e \pm 0,30$
DMSO	0	0	0	0

Ghi chú: Giá trị đường kính vòng ức chế là giá trị trung bình $\pm$ SD. Trong cùng một cột, các giá trị theo sau bởi một hoặc những chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Đối chứng âm: DMSO 30%. Đối chứng dương: Ampicillin (100 $\mu\text{g/mL}$) đối với vi khuẩn và Metronidazole (100 $\mu\text{g/mL}$) đối với nấm.

E. coli cũng nhạy cảm tương đối, với đường kính ức chế tăng từ $4,80 \pm 0,16$ mm tại 500 $\mu\text{g/mL}$ lên $20,24 \pm 1,22$ mm ở 8.000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Bảng P1.4.3).

Đối với *P. aeruginosa*, BLL không tạo vòng ức chế ở 500 $\mu\text{g/mL}$, nhưng ở các nồng độ từ 1.000–8.000 $\mu\text{g/mL}$ xuất hiện vòng ức chế từ $3,67 \pm 0,15$ mm đến $19,33 \pm 1,03$ mm ($p < 0,05$) (Bảng P1.4.1).

Trong khi đó, nấm *C. albicans* chỉ biểu hiện vòng ức chế nhỏ từ $1,5 \pm 0,44$ mm đến $5,0 \pm 0,50$ mm ở nồng độ 2.000–8.000 $\mu\text{g/mL}$ và không ghi nhận hoạt tính ở 500 và 1.000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Bảng P1.4.4), chứng tỏ BLL có tác dụng kháng nấm yếu. So sánh với đối chứng dương ampicillin (đối với vi khuẩn) và metronidazole (đối với nấm), BLL có hiệu lực kháng khuẩn thấp hơn đáng kể.

Dựa trên kết quả MIC trình bày ở Bảng 3.15, BLL thể hiện khả năng kháng khuẩn ở mức độ nhất định. Trong các chủng vi sinh vật thử nghiệm, *S. aureus* nhạy cảm cao nhất với MIC đạt $3939,16 \pm 100,52$ $\mu\text{g/mL}$, cho thấy BLL có tác động ức chế nhất định đối với vi khuẩn Gram dương. Đối với vi khuẩn Gram âm, *P. aeruginosa* và *E. coli* có mức MIC tương đối tương đồng, lần lượt là 4787,56

$\pm 191,64 \mu\text{g/mL}$ và $4817,50 \pm 313,40 \mu\text{g/mL}$, phản ánh hoạt tính kháng khuẩn yếu hơn so với trên *S. aureus*.

Bảng 3.15. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của BLL

Vi khuẩn	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	BLL	Ampicillin	Metronidazole
<i>P. aeruginosa</i>	$4787,56 \pm 191,64$	< 100	
<i>S. aureus</i>	$3939,16 \pm 100,52$	< 100	
<i>E. coli</i>	$4817,50 \pm 313,40$	< 100	
<i>C. albicans</i>	> 8.000		< 100

Ghi chú: Giá trị MIC là giá trị trung bình $\pm$ SD. Đối chứng dương: Ampicillin ($100 \mu\text{g/mL}$) đối với vi khuẩn và Metronidazole ($100 \mu\text{g/mL}$) đối với nấm.

Đối với nấm *C. albicans*, MIC lớn hơn $8.000 \mu\text{g/mL}$, chứng tỏ BLL có tác dụng kháng nấm yếu. So sánh với đối chứng dương (ampicillin và metronidazole có MIC $< 100 \mu\text{g/mL}$), hoạt tính kháng khuẩn của BLL còn thấp, đòi hỏi nồng độ cao để ức chế được sự phát triển của vi sinh vật.

3.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật của BLL

Kết quả định lượng MIC và đường kính vòng vô khuẩn cho thấy hoạt tính kháng khuẩn của BLL phụ thuộc chặt chẽ vào nồng độ và đặc điểm chủng vi sinh vật, với sự nhạy cảm rõ rệt của vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*) so với các chủng Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Cơ chế của sự khác biệt này có thể được lý giải bởi cấu trúc vách tế bào đặc trưng. Vi khuẩn Gram dương chỉ sở hữu lớp peptidoglycan dày nhưng thiếu màng ngoài, tạo điều kiện thuận lợi cho các hợp chất phenolic và flavonoid trong BLL dễ dàng xâm nhập, gây tổn thương màng tế bào chất và ức chế các enzyme nội bào quan trọng. Ngược lại, vi khuẩn Gram âm được bao bọc bởi lớp màng ngoài lipopolysaccharide (LPS) phức tạp cùng hệ thống kênh porin chọn lọc. Lớp màng này đóng vai trò như một rào cản thẩm thấu hiệu quả, hạn chế đáng kể sự khuếch tán của các hợp chất kháng khuẩn có kích thước lớn hoặc tính kỵ nước từ thảo dược, làm giảm hiệu lực tác động của BLL so với nhóm Gram dương [202]. Đối với nấm men *C. albicans*, tính kháng thuốc tự nhiên cao nhờ cấu trúc tế bào nhân chuẩn phức tạp (vách tế bào chứa chitin và glucan) cùng hệ thống bơm đẩy thuốc (efflux pumps) hoạt động mạnh khiến BLL hầu như không thể hiện hiệu lực ức chế ở các nồng độ thử nghiệm [114].

Sự hiện diện của nhóm catechin (đặc biệt là EGCG) trong BLL được ghi nhận là nhân tố đóng góp vào hoạt tính kháng khuẩn thông qua cơ chế phá vỡ màng và ngăn chặn hình thành màng sinh học (biofilm) [203]. Hoạt tính kháng

khuẩn và kháng nấm yếu của BLL có thể một phần là do đây là sản phẩm bột đã qua sấy phun. Việc sấy phun ở nhiệt độ cao có thể làm giảm hoạt tính của một số hợp chất polyphenol nhạy nhiệt trong lá lúa, dẫn đến giảm hiệu quả kháng khuẩn [204,205]. Bên cạnh đó, việc sử dụng chất mang maltodextrin (MD) trong quá trình phối trộn và sấy phun giúp ổn định hoạt chất, bảo toàn tính chất hóa học và duy trì khả năng bảo quản, nhưng đồng thời có thể làm loãng hàm lượng hợp chất hoạt tính, dẫn đến giảm nồng độ tác động thực tế [206]. Ở nồng độ cao, MD còn có thể làm chậm quá trình giải phóng hoạt chất, làm tăng giá trị MIC [207]. Tuy nhiên, phương pháp sấy phun vẫn chứng minh hiệu quả trong việc bảo toàn độ ổn định của BLL, kéo dài thời gian bảo quản và hạn chế sự suy giảm hoạt tính theo thời gian.

Theo tiêu chuẩn phân loại MIC của Holetz và cs. (2002) [208], hoạt tính được xem là tốt khi MIC < 100 µg/mL, trung bình từ 100–500 µg/mL, yếu từ 500–1000 µg/mL và không đáng kể khi > 1000 µg/mL. Như vậy, BLL thể hiện hoạt tính kháng không đáng kể đối với cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, đồng thời hầu như không có hiệu quả kháng nấm.

Như vậy, BLL có tiềm năng kháng khuẩn hỗ trợ, đặc biệt trên *S. aureus* và *E. coli*, nhưng không hiệu quả trên nấm men *C. albicans* và kém nhạy với *P. aeruginosa*. Để nâng cao hiệu lực, cần nghiên cứu phân lập các phân đoạn giàu hoạt chất, tối ưu hóa quy trình chiết tách, cũng như điều chỉnh tỷ lệ chất mang MD nhằm tăng cường quá trình giải phóng hoạt chất. Việc kết hợp BLL với các tác nhân tăng tính thấm màng tế bào có thể mở ra khả năng ứng dụng như một thành phần hỗ trợ kháng khuẩn tự nhiên trong bảo quản thực phẩm hoặc hỗ trợ điều trị.

3.5. Tác động tiêu thụ BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột ở chuột

3.5.1. Khảo sát ảnh hưởng của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột

Thí nghiệm được thiết kế nhằm đánh giá sự thay đổi về thành phần và chức năng hệ vi sinh vật ruột qua ba hướng tiếp cận gồm (1) Sự thay đổi mật số vi khuẩn lactic acid (LAB) và vi khuẩn hiếu khí (AeB) bằng phương pháp nuôi cấy đĩa thạch; (2) Phân tích hệ gen vi sinh vật đường ruột bằng giải trình tự metagenomics vùng gen 16S rRNA; (3) An toàn của tiêu thụ BLL thông qua các chỉ số huyết học, hình thái mô học của ruột non, và sự thay đổi trọng lượng cơ thể chuột.

3.5.1.1. Chỉ số huyết học

Phân tích huyết học sau 14 ngày bổ sung bột lá lúa (BLL) cho thấy các chỉ số máu của chuột BALB/c có sự thay đổi đáng kể nhưng vẫn nằm trong giới hạn sinh lý bình thường Bảng 3.16.

Bảng 3.16. Chỉ số huyết học của chuột sau khi tiêu thụ BLL

Chỉ số	PCDC	PC150	PC300	Giới hạn tham chiếu*
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	8,78 ^a ±0,17	10,09 ^b ±0,51	9,68 ^b ±0,54	8,0 – 10,1
HCT (%)	46,2 ^b ±1,11	40,53 ^a ±0,63	39,29 ^a ±0,42	36,4 – 49,6
HGB (g/dL)	12,03 ^a ±0,76	13,59 ^b ±0,36	12,53 ^{ab} ±0,93	11,9 – 15,5
MCV ^{ns} (fL)	51,43±1,15	50,4±1,81	51,5±0,6	42,3 – 54,7
MCH ^{ns} (pg)	14,12±0,65	14,29±0,9	14,75±0,33	13,0 – 17,0
MCHC (g/dL)	30,03 ^a ±0,67	31,3 ^{ab} ±0,75	32,67 ^b ±0,75	28,4 – 36,4
RDW-CV (%)	13,67 ^a ±0,58	15 ^b ±1	14,67 ^{ab} ±0,58	13,2 – 17,6
RDW-SD (fL)	26,63 ^a ±0,31	28,03 ^b ±0,35	27 ^{ab} ±1,0	23,1 – 33,1
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	293,34 ^a ±8,95	342,36 ^b ±17,06	303,18 ^a ±8,09	80 – 1040
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	5,4 ^a ±0,1	7,6 ^b ±1,15	8,04 ^b ±0,48	2,3 – 9,3
NEU ($10^3/\mu\text{L}$)	0,98 ^a ±0,01	1,79 ^b ±0,08	1,7 ^b ±0,1	1,5 – 3,9
LYM ($10^3/\mu\text{L}$)	3,38 ^a ±0,03	4,7 ^b ±0,01	4,77 ^c ±0,06	5,4 – 8,4
MON ($10^3/\mu\text{L}$)	0,37 ^a ±0,01	0,47 ^b ±0,03	0,91 ^c ±0,01	0 – 5,8
EOS ($10^3/\mu\text{L}$)	0,13 ^a ±0,02	0,19 ^{ab} ±0,02	0,21 ^b ±0,07	0 – 3,6
BAS ($10^3/\mu\text{L}$)	0,31 ^b ±0,01	0,33 ^b ±0,01	0,19 ^a ±0,02	0 – 0,92

Ghi chú: () Khoảng biến thiên sinh lý bình thường (min–max $\approx$ mean $\pm$ 2SD), dựa trên dữ liệu chuột BALB/c [209]. Các giá trị trong cùng một hàng theo sau bởi chữ cái giống nhau thì không có khác biệt ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). ns = sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ($p > 0,05$). PCDC = đối chứng, PC150 = nhóm chuột bổ sung BLL liều 150 mg/kg, PC300 = nhóm chuột bổ sung BLL liều 300 mg/kg. MCV = thể tích hồng cầu trung bình, MCH = hemoglobin hồng cầu trung bình, MCHC = nồng độ hemoglobin hồng cầu trung bình, RDW-CV = Hệ số biến thiên độ rộng phân bố hồng cầu, RDW-SD = Độ lệch chuẩn độ rộng phân bố hồng cầu, PLT = số lượng tiểu cầu, WBC = số lượng bạch cầu, NEU = bạch cầu trung tính, LYM = tế bào lympho, MON = bạch cầu đơn nhân, EOS = bạch cầu ái toan, BAS = bạch cầu ái kiềm.*

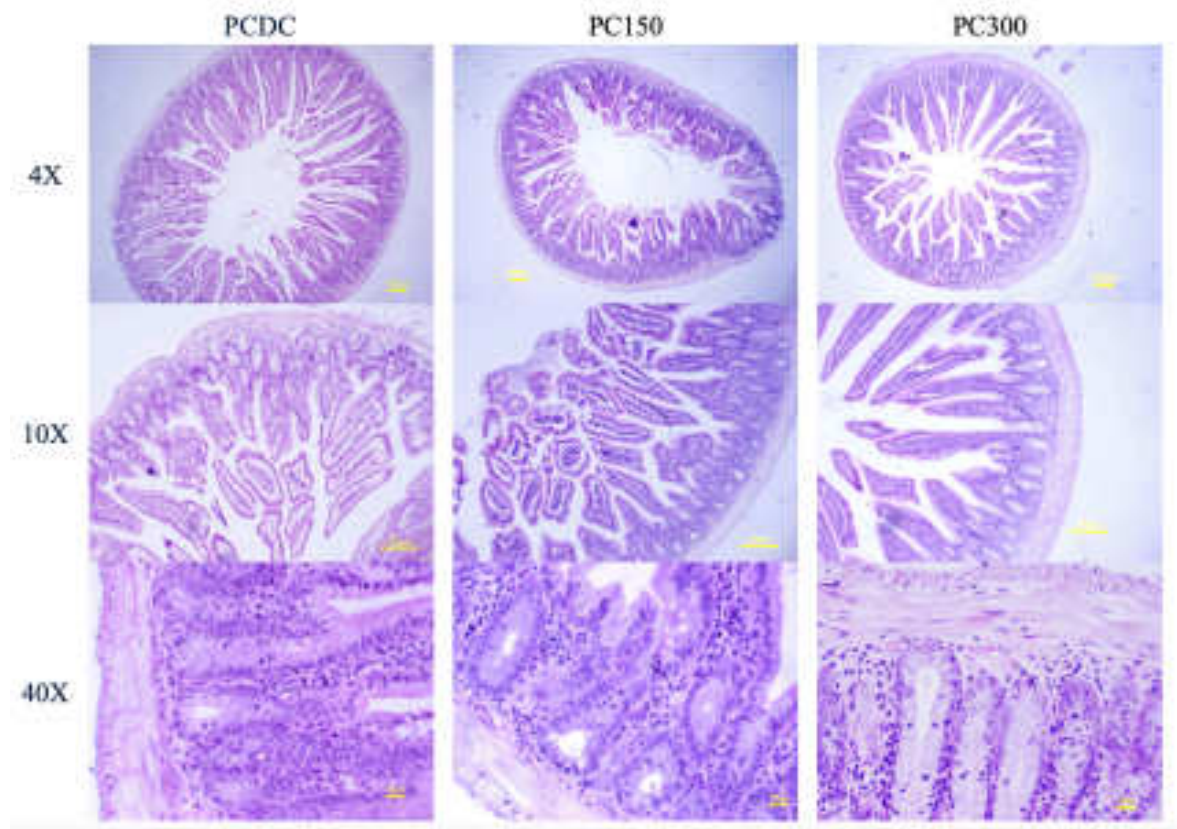
Số lượng hồng cầu (RBC), bạch cầu (WBC) và tiểu cầu (PLT) tăng đáng kể ở nhóm PC150 và PC300 so với nhóm đối chứng PCDC ($p < 0,05$), song không vượt ngoài khoảng tham chiếu, cho thấy không xuất hiện dấu hiệu rối loạn huyết học hay đáp ứng viêm bất thường.

Các phân nhóm bạch cầu (NEU, LYM, MON, EOS, BAS) cũng ghi nhận sự biến thiên giữa các nhóm, đặc biệt ở nhóm PC300; tuy nhiên, các giá trị này vẫn nằm trong giới hạn sinh lý của chuột BALB/c. Sự thay đổi này được xem là biến thiên sinh lý trong điều kiện thí nghiệm, không gợi ý tình trạng viêm, nhiễm trùng hay rối loạn miễn dịch.

Ngược lại, một số chỉ số liên quan đến hồng cầu như hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), MCV và MCH có tăng giảm nhẹ theo liều so với đối chứng, nhưng vẫn nằm trong giới hạn tham chiếu. Những thay đổi này không mang ý nghĩa bệnh lý và có thể liên quan đến sự thích nghi sinh lý của cơ thể động vật khi bổ sung các hợp chất thực vật, như đã được ghi nhận trong một số nghiên cứu trước đây [210].

3.5.1.2. Hình thái mô học ruột non

Mô ruột non được nhuộm hematoxylin–eosin (H&E) để quan sát hình thái lớp biểu mô, độ dài nhung mao và dấu hiệu viêm hoặc tổn thương (Hình 3.33).



Hình 3.33. Hình thái lớp cắt ruột non nhuộm hematoxylin và eosin

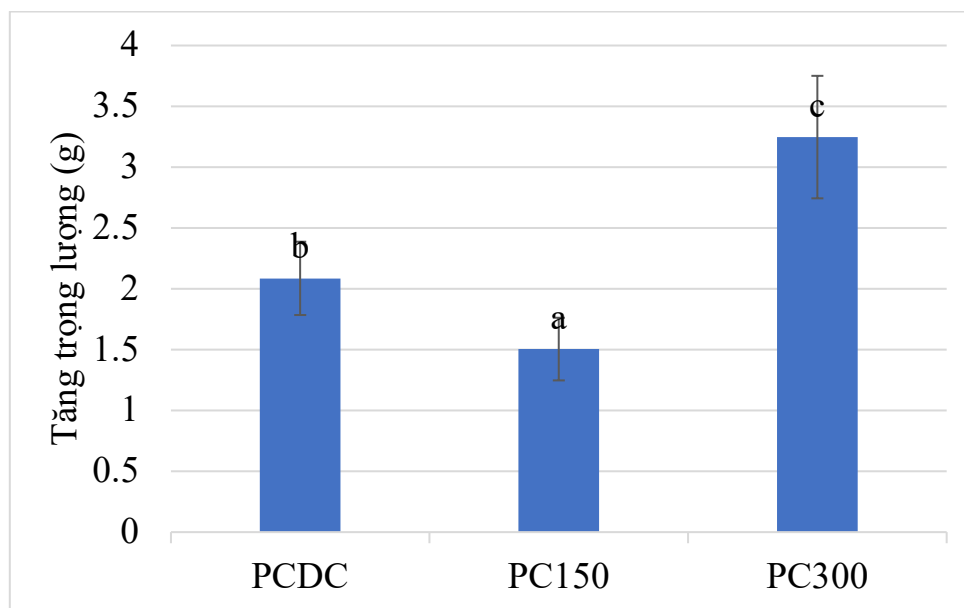
Ghi chú: Quan sát ở các vật kính 4X, 10X và 40X, PCDC = đối chứng. PCDC = Đối chứng, PC150 = nhóm chuột bổ sung BLL liều 150 mg/kg, PC300 = nhóm chuột bổ sung BLL liều 300 mg/kg.

Kết quả cho thấy cả ba nhóm chuột (PCDC, PC150, PC300) đều có cấu trúc ruột non nguyên vẹn, với nhung mao đều, không phát hiện xâm nhập viêm, hoại

tử hay mất biểu mô. Không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm về độ dài nhung mao hoặc mật độ tế bào tiết nhầy, chứng tỏ BLL không gây tác động bất lợi đến hàng rào niêm mạc ruột. Kết quả này khẳng định tính an toàn của BLL đối với niêm mạc ruột, một yếu tố quan trọng khi đánh giá các sản phẩm thực phẩm chức năng tiềm năng.

3.5.1.3. Trọng lượng chuột

Trọng lượng cơ thể được theo dõi trong suốt thời gian thí nghiệm (14 ngày) (Hình 3.34). Nhóm PC150 có mức tăng trọng thấp hơn đáng kể so với PCDC (trung bình tăng 1,5 g so với 2,0 g; $p < 0,05$), trong khi nhóm PC300 có mức tăng cao hơn đáng kể (3,2 g; $p < 0,05$) (Bảng P1.5.2).



Hình 3.34. Gia tăng trọng lượng chuột sau 14 ngày

Ghi chú: Các giá trị trong hình được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ SD. Các chữ cái in thường (a, b, c) trên đầu cột chỉ ra sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm ($p < 0,05$). PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

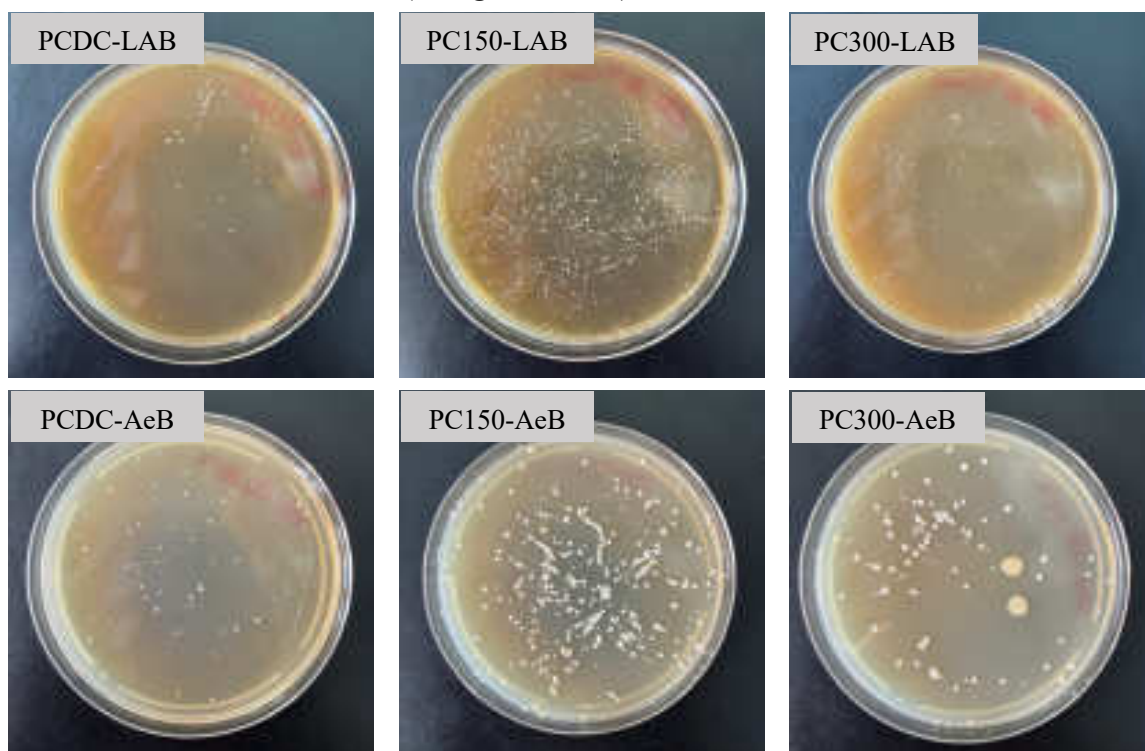
Nhìn chung, tác động của BLL phụ thuộc vào liều lượng: liều thấp có thể hỗ trợ kiểm soát cân nặng, trong khi liều cao có thể thúc đẩy tăng cân.

3.5.1.4. Mật số vi khuẩn LAB và AeB

Sau 14 ngày thí nghiệm, mật số vi khuẩn đường ruột của chuột được phân tích bằng phương pháp nuôi cấy chọn lọc trên môi trường MRS agar (cho LAB) và TSA agar (cho AeB) (Hình 3.35). Mật số vi khuẩn LAB và AeB được biểu diễn ở dạng logCFU/mL trong biểu đồ hình 3.36 và được quy đổi về CFU/mL trong bảng P2.13.

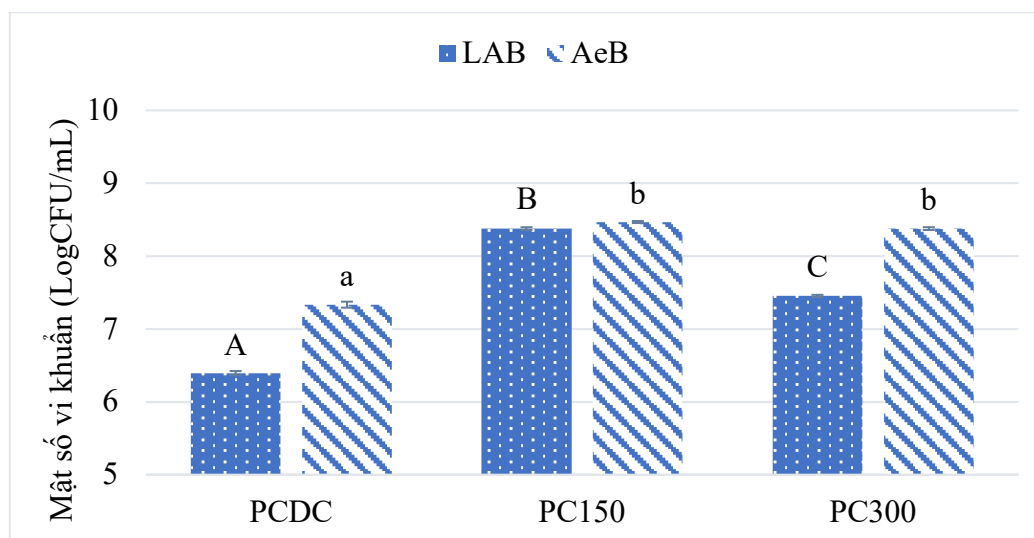
Ở nhóm đối chứng không tiêu thụ BLL, mật số AeB ghi nhận ở mức 7,33 logCFU/mL, tương đương $2,15 \times 10^7$ CFU/mL, trong khi vi khuẩn LAB chỉ đạt 6,39 logCFU/mL, tương đương $2,47 \times 10^6$ CFU/mL. Đây được xem là mức nền của hệ vi sinh vật đường ruột khi không bổ sung BLL.

Ở nhóm PC150, mật số vi sinh vật tăng mạnh so với đối chứng. Cụ thể, AeB đạt 8,47 logCFU/mL ($2,94 \times 10^8$ CFU/mL), cao hơn PCDC 1,14 log đơn vị, tương đương tăng gấp khoảng 13,8 lần, trong khi LAB tăng đột biến lên 8,38 logCFU/mL ($2,38 \times 10^8$ CFU/mL), cao hơn đối chứng 1,99 log đơn vị, tương đương tăng gần 98 lần. Sự gia tăng này có ý nghĩa thống kê rõ rệt ($p < 0,05$), cho thấy liều 150 mg/kg BLL có tác dụng trong việc kích thích sự phát triển của cả vi khuẩn hiếu khí và đặc biệt là LAB (Bảng P1.5.3-4).



Hình 3.35. Nuôi cấy vi khuẩn LAB và AeB trong phân chuột sau 24 giờ.

Khi tăng liều BLL lên 300 mg/kg (PC300), mật số AeB vẫn được duy trì ở mức cao 8,38 logCFU/mL ($2,38 \times 10^8$ CFU/mL) và không có sự khác biệt đáng kể so với PC150 ($p > 0,05$). Tuy nhiên, LAB ở nhóm PC300 chỉ đạt 7,45 logCFU/mL ($2,84 \times 10^7$ CFU/mL), thấp hơn PC150 là 0,93 log đơn vị, tương đương giảm khoảng 8,5 lần, mặc dù vẫn cao hơn PCDC 1,06 log đơn vị (~gấp 11,5 lần), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nhóm PC150.



Hình 3.36. Mật số vi khuẩn LAB và AeB trong phân

Ghi chú: Các giá trị trong hình được biểu thị dưới dạng trung bình $\pm$ SD. Các chữ cái in thường và in hoa khác nhau trên đầu cột chỉ ra sự khác biệt đáng kể về mật số LAB (A, B, C) và AeB (a, b, c) giữa các nhóm ($p < 0,05$). PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Như vậy, việc bổ sung BLL liều 150 mg/kg giúp gia tăng tối đa LAB đồng thời cải thiện AeB, trong khi liều 300 mg/kg vẫn có tác dụng nhưng kém hiệu quả hơn đối với LAB.

3.5.1.5. Thành phần và dự đoán chức năng hệ vi sinh vật đường ruột

Phân tích giải trình tự gen 16S rRNA được thực hiện nhằm đánh giá tác động của việc bổ sung BLL đến độ đa dạng, thành phần và chức năng của hệ vi sinh vật đường ruột.

Đa dạng alpha và beta

Các chỉ số đa dạng alpha cho thấy sự khác biệt rõ rệt về cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột giữa các nhóm sau 14 ngày thử nghiệm (Bảng 3.17). Đáng chú ý, nhóm PC300 thể hiện ưu thế vượt trội so với PC150 trên tất cả các phương diện đánh giá:

- Độ phong phú loài: Các chỉ số Ace và Chao1 ở nhóm PC300 cao hơn hẳn so với PC150, cho thấy liều cao BLL giúp cải thiện số lượng loài vi sinh vật hiệu quả hơn.
- Độ đa dạng và tính cân bằng: Chỉ số Shannon và Simpson của nhóm PC300 đều cao hơn nhóm PC150. Kết quả này chứng minh ở liều 300 mg/kg, quần thể vi sinh vật không chỉ đa dạng hơn mà còn có sự phân bố đồng đều, ít bị chi phối bởi các loài ưu thế so với liều thấp.

Độ tin cậy: Chỉ số Goods coverage ở tất cả các nhóm đều đạt 0,999, khẳng định dữ liệu giải trình tự đủ độ sâu để phản ánh chính xác trạng thái của hệ vi sinh vật.

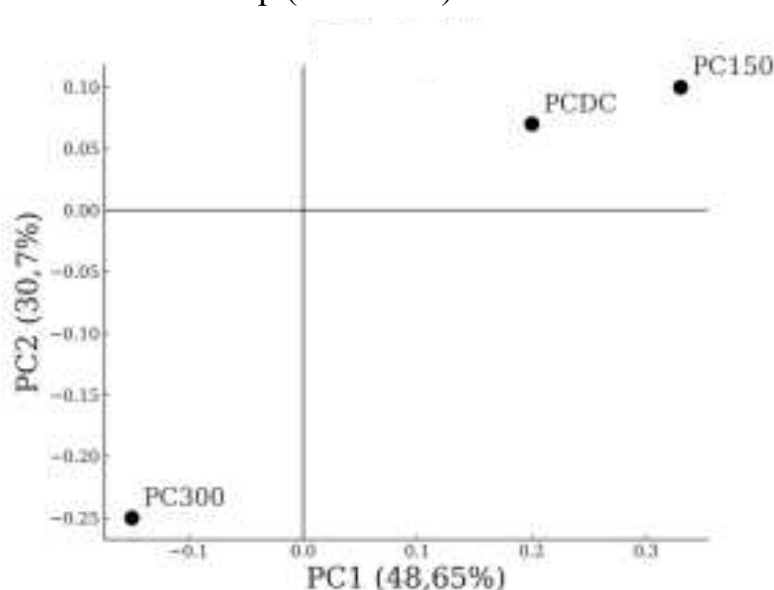
Vì vậy, việc bổ sung BLL ở liều 300 mg/kg mang lại hiệu quả cải thiện độ phong phú và tính đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột tốt hơn rõ rệt so với liều 150 mg/kg.

Bảng 3.17. Chỉ số đa dạng alpha và beta

Nhóm	Ace	Chao1	Shannon	Simpson	Goods_coverage
PCDC	544,32	538,50	6,13	0,968	0,999
PC150	487,58	490,45	5,37	0,945	0,999
PC300	559,79	560,14	6,43	0,969	0,999

Ghi chú: PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Phân tích tọa độ chính (PCoA) dựa trên khoảng cách Bray-Curtis cho thấy liều lượng bổ sung BLL có vai trò quyết định trong việc điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột. Việc phân cụm rõ ràng của PC300 chứng minh hiệu lực sinh học mạnh hơn của liều cao so với liều thấp (Hình 3.37).



Hình 3.37. Biểu đồ phân tích tọa độ chính (PCoA) về sự đa dạng beta

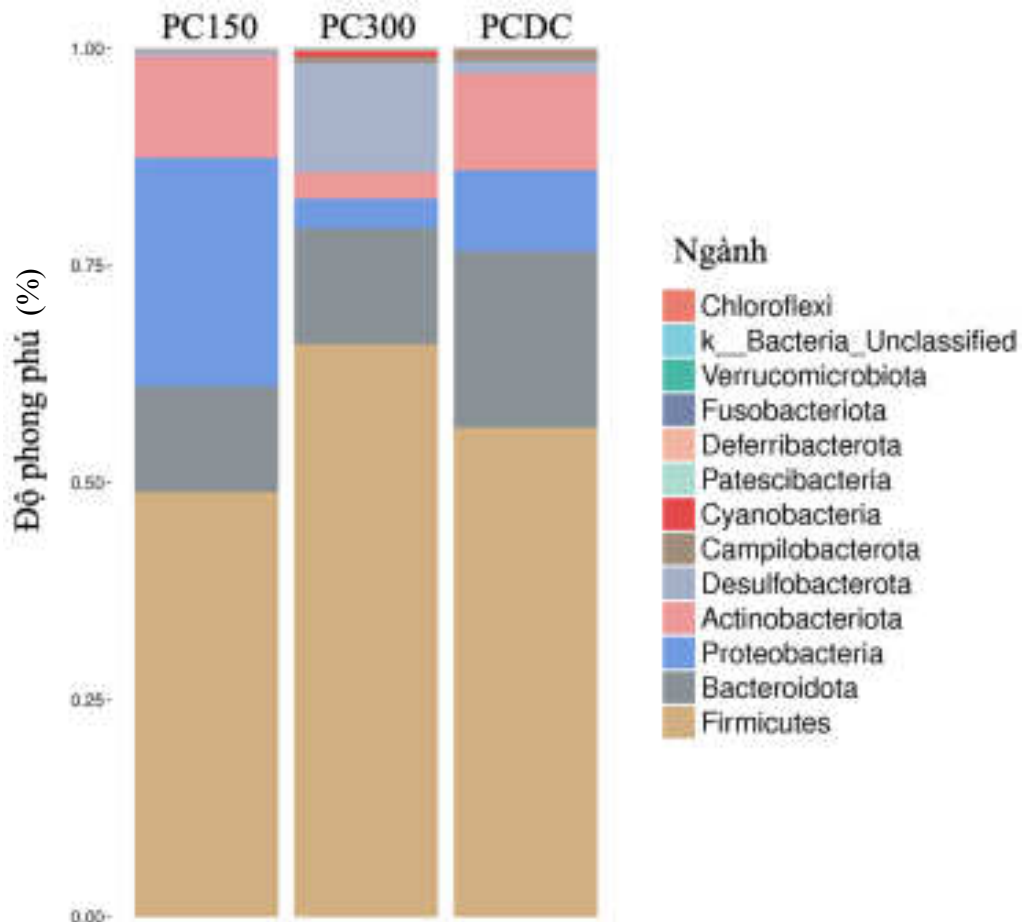
Ghi chú: PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Nhìn chung, việc bổ sung BLL liều cao (PC300) có tác động tích cực đến việc cải thiện sự phong phú, đồng đều và đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột so với liều thấp (PC150) và nhóm đối chứng (PCDC). Dù không có kiểm định thống

kê, xu hướng quan sát này cho thấy tiềm năng của BLL trong việc điều hòa vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi.

Thành phần hệ vi sinh vật đường ruột

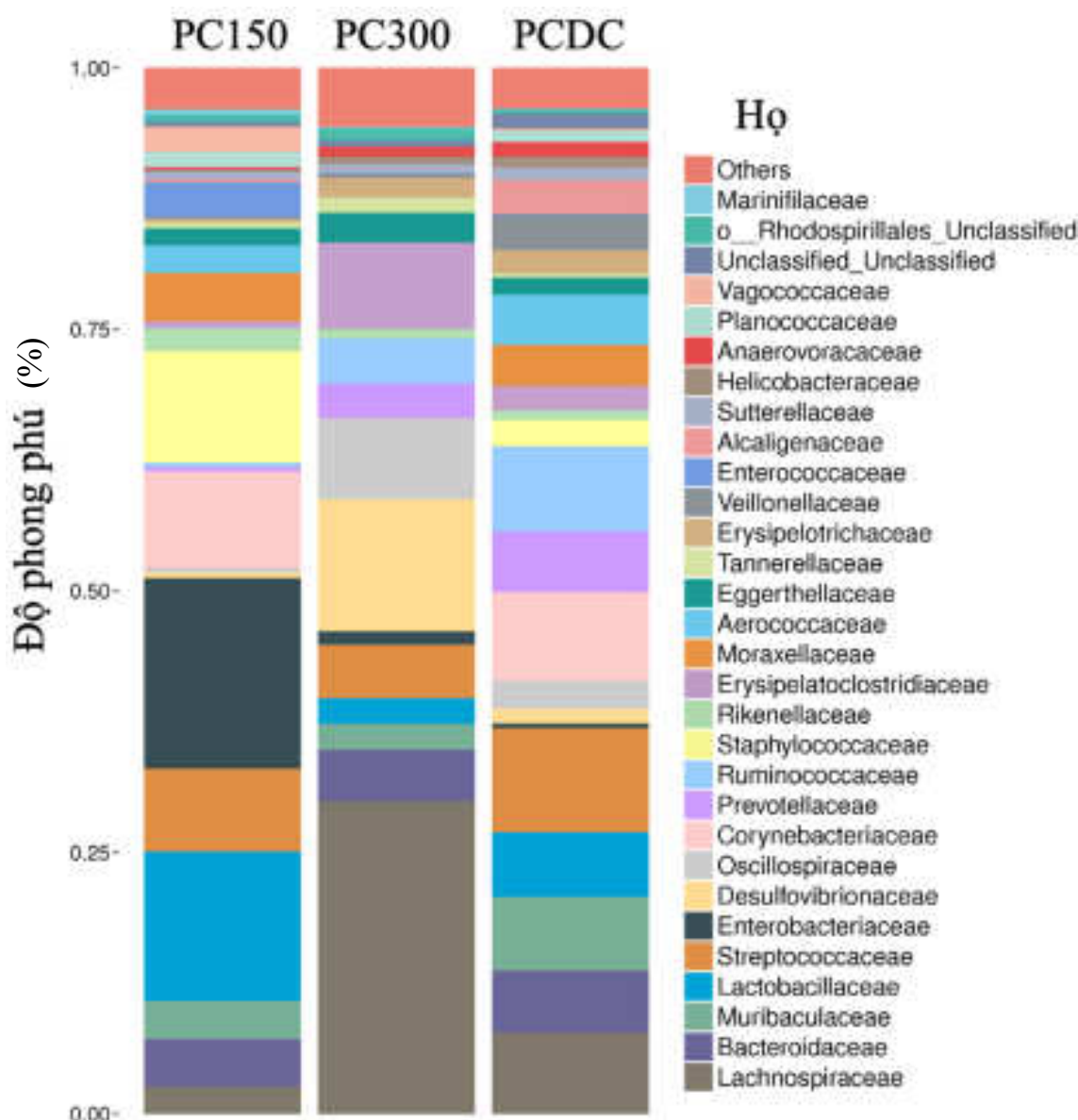
Những thay đổi trong thành phần vi sinh vật đường ruột ở mỗi nhóm chuột được so sánh ở cấp độ ngành, họ và chi (Hình 3.38-3.40).



Hình 3.38. Sự phong phú thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp ngành

Ghi chú: PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Ở cấp ngành, sự phong phú tương đối của *Firmicutes* trong nhóm PC150 giảm (48,92%) trong khi ở nhóm PC300 tăng (65,93%) khi so sánh với PCDC (56,36%). Tương tự, sự phong phú của *Proteobacteria* tăng đáng kể ở nhóm PC150 (gấp 2,8 lần) và giảm ở nhóm PC300 (gấp 2,7 lần) khi so sánh với PCDC.. Ngược lại, *Bacteroidota* có sự phong phú giảm ở PC150 và PC300, thấp hơn 1,5 lần so với nhóm đối chứng. Độ phong phú tương đối của *Actinobacteriota* giảm mạnh ở nhóm PC300 (3,02%) nhưng ổn định ở nhóm PC150 (11,67%) khi so sánh với PCDC (11,11%). Ngược lại, *Desulfobacterota* tăng mạnh ở nhóm PC300 (12,61%) nhưng giảm mạnh ở nhóm 150 (0,57%) khi so sánh với nhóm đối chứng (1,4%), đây là ngành vi khuẩn liên quan đến chuyển hóa lưu huỳnh.

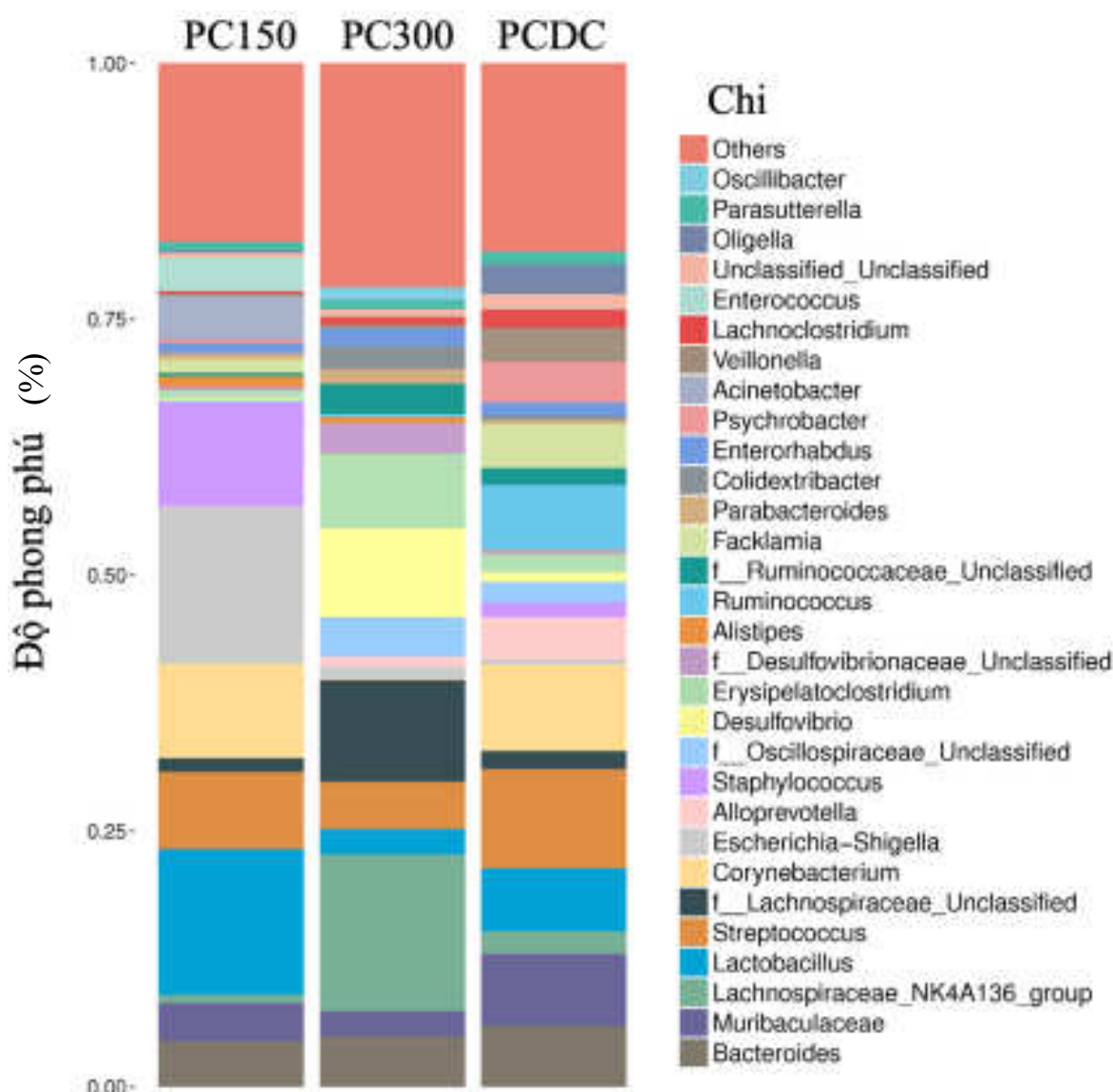


Hình 3.39. Sự phong phú về thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp họ

Ghi chú: PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Ở cấp độ họ, hai liều bổ sung 150 mg/kg và 300 mg/kg có sự khác biệt về nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế. Cụ thể, *Lachnospiraceae* (*Firmicutes*) chiếm ưu thế ở PC300 (29,9%), nhưng thấp ở PC150 (2,65%) so với PCDC (15,4%). Ngược lại, *Lactobacillaceae* (*Firmicutes*) chiếm ưu thế ở PC150 (18,2%) nhưng thấp ở PC300 (3,1%) so với PCDC (7,8%). *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) tăng mạnh ở PC150 (18,22%) nhưng thấp ở PC300 (1,28%) so với PCDC (0,45%). *Desulfovibrionaceae* cao ở nhóm PC300 (12,61%) so với PCDC (1,4%) và PC150 (0,57%). *Bacteroidaceae* và *Muribaculaceae* (*Bacteroidota*) giảm ở cả PC150 và PC300 so với PCDC, chứng tỏ tác động ức chế của BLL lên nhóm này.

Ở cấp độ chi, *Lachnospiraceae* NK4A136 group: Chiếm ưu thế ở PC300 (15,0%, gấp 7 lần PCDC: 2,1%), nhưng thấp ở PC150 (0,3%). Nhóm này sản xuất acetic acid, hỗ trợ tăng cân [211]. *Lactobacillus* chiếm ưu thế ở PC150 (16,8%, gấp 5,8 lần PC300: 2,9% và 2,3 lần PCDC: 7,3%), liên quan đến giảm hấp thu lipid. *Escherichia-Shigella*, *Staphylococcus* tăng ở PC150 (15,31% và 10,11%) so với PC300 (1,27% và 0,03%) và PCDC (0,45% và 1,43%). *Muribaculaceae*, *Streptococcus*, *Desulfovibrio*, *Bifidobacterium* tăng ở PC300. *Corynebacterium*, *Acinetobacter* và *Enterococcus* tăng ở PC150.



Hình 3.40. Sự phong phú về thành phần hệ vi sinh vật đường ruột cấp chi
 Ghi chú: PCDC = đối chứng, PC150 = bột lá lúa liều 150 mg/kg, PC300 = bột lá lúa liều 300 mg/kg.

Dự đoán chức năng sinh học của hệ vi sinh vật đường ruột ở chuột

Phân tích dự đoán chức năng vi sinh vật bằng công cụ PICRUST dựa trên dữ liệu OTUs với kết quả tổng cộng có 369 con đường thuộc MetaCyc, 5992 con

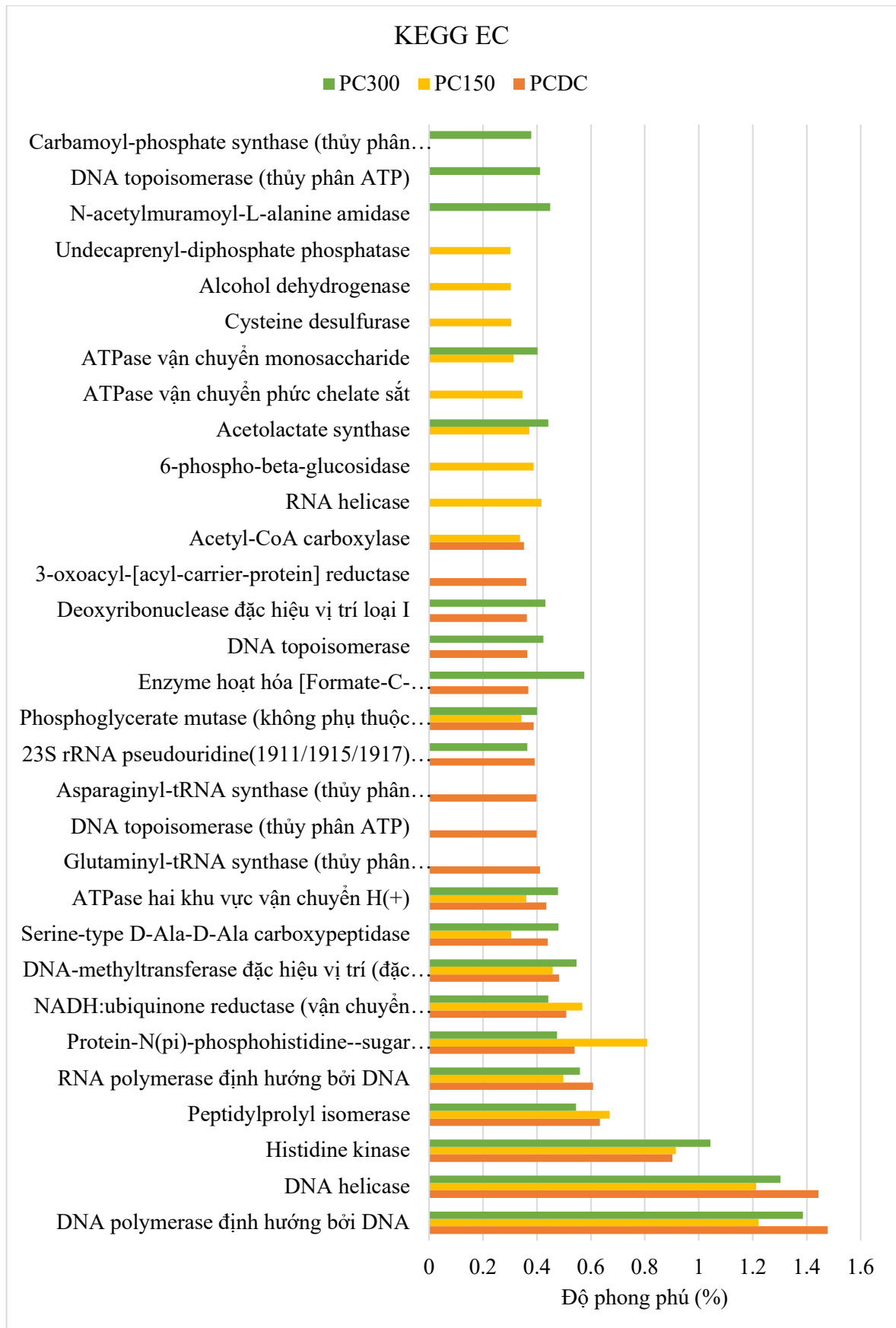
đường KO (KEGG Orthology) và 1915 enzyme EC (Enzyme Commission) được xác định.

Dựa vào mức độ biểu hiện cao nhất trong 20 con đường/chức năng (MetaCyc, KO, EC) trong mỗi nhóm chuột (PCDC, PC150 và PC300) cho thấy có sự giống nhau và khác nhau khi tiêu thụ BLL (Hình 3.41-3.43).

KEGG EC (Enzyme Commission): Cả ba nhóm chuột PCDC, PC150 và PC300 chia sẻ nhiều con đường enzyme cơ bản, đồng thời thể hiện sự khác biệt rõ rệt về mức độ phong phú tương đối của các enzyme liên quan đến quá trình sao chép, sửa chữa DNA, chuyển hóa năng lượng và thích nghi sinh lý.

Về điểm giống nhau, các enzyme liên quan đến sao chép và sửa chữa DNA như DNA polymerase định hướng bởi DNA (EC:2.7.7.7), DNA helicase (EC:3.6.4.12), và RNA polymerase định hướng bởi DNA đứng đầu bảng ở cả ba nhóm, chứng tỏ sự bảo tồn cao của chức năng sao chép và sửa chữa DNA. Bên cạnh đó, histidine kinase, peptidylprolyl isomerase và RNA polymerase cũng xuất hiện phổ biến, nhấn mạnh tầm quan trọng của cơ chế điều hòa tín hiệu và phiên mã gen, đảm bảo khả năng thích nghi của vi sinh vật trong hệ sinh thái đường ruột. Một số enzyme chuyển hóa năng lượng cơ bản, điển hình là NADH:ubiquinone reductase và phosphoglycerate mutase, cũng được bảo tồn, đảm bảo khả năng sản xuất ATP và trung gian chuyển hóa cần thiết cho hoạt động sống.

Về điểm khác biệt, nhóm PC300 nổi bật với các enzyme liên quan đến tổng hợp protein như acetolactate synthase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, carbamoyl-phosphate synthase, đồng thời tăng cường enzyme về chuyển hóa năng lượng, như acetolactate synthase (EC:2.2.1.6), enzyme hoạt hóa formate-C-acetyltransferase (EC:1.97.1.4) và ATPase vận chuyển monosaccharide, thể hiện mức độ chuyển hóa nâng cao nhằm đáp ứng nhu cầu sinh trưởng và sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp. Trong khi đó, PC150 nổi bật với enzyme phân giải đường (6-phospho- β -glucosidase) và vận chuyển ion (iron-chelate-transporting ATPase), cùng sự gia tăng biểu hiện của acyl-CoA oxidase, triacylglycerol lipase và phospholipase, chứng minh sự tăng cường phân giải lipid và carbohydrate [212]. Trong khi đó, nhóm PCDC thiên về các enzyme bảo tồn ổn định di truyền như DNA topoisomerase, deoxyribonuclease đặc hiệu vị trí loại I, và DNA-methyltransferase đặc hiệu adenine, phản ánh hệ vi sinh vật ở trạng thái cân bằng, ưu tiên duy trì cấu trúc bộ gen và hoạt động cơ bản hơn là thích nghi chuyển hóa nâng cao.

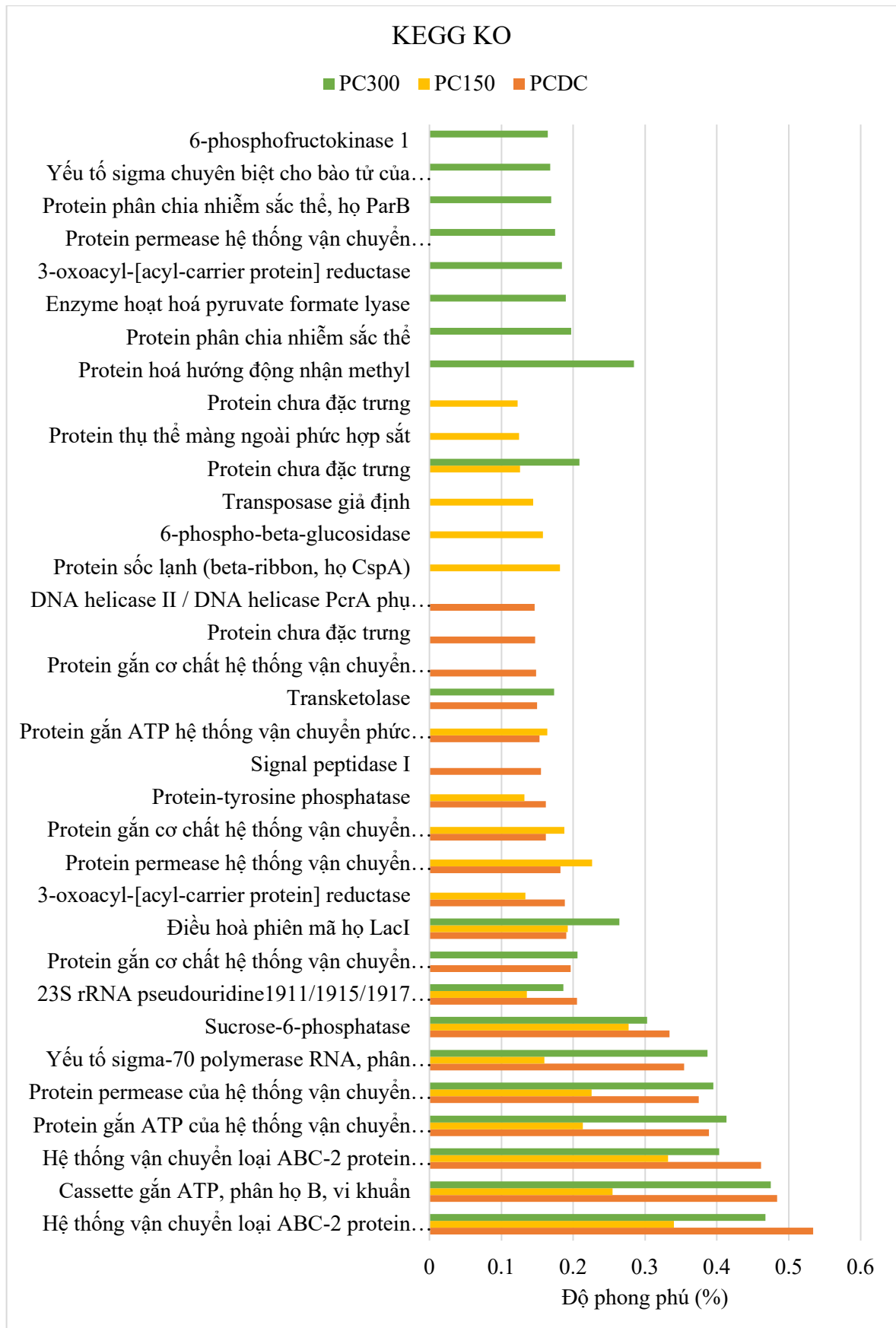


Hình 3.41. Hồ sơ dự đoán chức năng trong 20 con đường enzyme biểu hiện cao nhất (KEGG EC)

KEGG KO (KEGG Orthology): Sự phân bố các gen chức năng trong cộng đồng vi sinh vật đường ruột của ba nhóm chuột PCDC, PC150 và PC300 có nhiều điểm tương đồng nhưng vẫn tồn tại các khác biệt rõ rệt liên quan đến chuyển hóa và điều hòa sinh học.

Về điểm giống nhau, cả ba nhóm đều có sự hiện diện phổ biến của hệ thống vận chuyển ABC như ABC-2.A, ABC-2.P, ABC.CD.A, ABC.CD.P (nằm trong nhóm top 5 của cả ba nhóm), phản ánh vai trò trung tâm của các protein vận chuyển trong việc cung cấp dinh dưỡng, ion và các phân tử thiết yếu. Ngoài ra, các gen liên quan đến tổng hợp và sửa chữa DNA/RNA như *rpoE* (RNA polymerase sigma-70), *rluD* (23S rRNA pseudouridine synthase) và transketolase (*tktA*, *tktB*) cũng xuất hiện ở cả ba nhóm, cho thấy các quá trình phiên mã và ổn định bộ gen (thuộc về chức năng cơ bản) được duy trì. Một số enzyme chuyển hóa như sucrose-6-phosphatase (SPP) và các gen mã hóa enzyme tham gia đường phân (*pfkA*, transketolase) và tổng hợp fatty acid (*fabG*) cũng được phát hiện phổ biến ở cả ba nhóm, nhấn mạnh sự duy trì các quá trình chuyển hóa năng lượng và sinh tổng hợp chất béo (lipid) cơ bản.

Về điểm khác biệt, nhóm PC300 có biểu hiện nổi bật của các gen liên quan đến phân chia nhiễm sắc thể (*parA/soj* và *parB/spo0J* chromosome partitioning protein) và đáp ứng stress môi trường (*sigH*/RNA polymerase sporulation-specific sigma factor; *mcp*/methyl-accepting chemotaxis protein), chuyển hoá năng lượng (*pfkA*/6-phosphofructokinase 1), điều này có nghĩa liều cao BLL có thể kích thích khả năng thích nghi và điều hòa chu trình tế bào của vi sinh vật. Trong khi đó, PC150 tăng cường biểu hiện các gen liên quan đến phân giải đường như *bglA* (6-phospho-beta-glucosidase) và sucrose-6-phosphatase và gen phản ứng căng thẳng (*cspA*/cold shock protein), phản ánh sự thúc đẩy phân giải đường nhằm cung cấp năng lượng. Ngược lại, PCDC nổi bật ở các gen liên quan đến tái tạo và sửa chữa DNA (DNA helicase *uvrD/pcrA*), vận chuyển sắt và phức hợp sắt (ABC.FEV.P, ABC.FEV.S, ABC.FEV.A), gợi ý rằng cộng đồng vi sinh vật trong nhóm này chủ yếu duy trì ổn định di truyền, trao đổi chất và hoạt động sinh trưởng cơ bản mà chưa có sự điều chỉnh mạnh mẽ về chuyển hóa.



Hình 3.42. Hồ sơ dự đoán chức năng trong 20 gen biểu hiện cao nhất (KEGG KO)

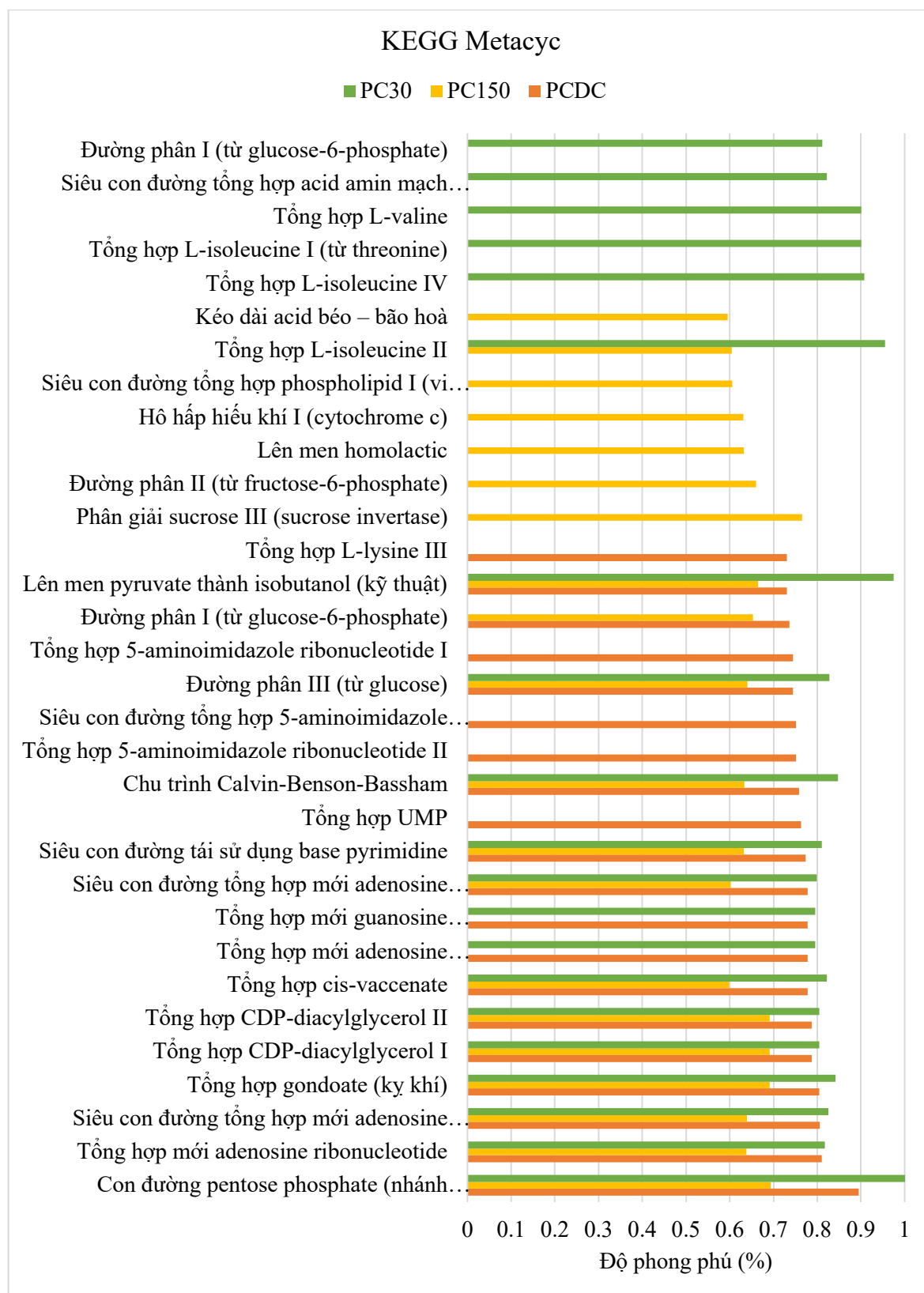
MetaCyc pathways: Sự phân bố đa dạng của các con đường chuyển hóa vật chất thể hiện sự khác biệt đặc trưng về mặt chức năng trao đổi chất trong cộng đồng vi sinh vật đường ruột giữa các nhóm chuột.

Về điểm giống nhau, cả ba nhóm đều duy trì các con đường chuyển hóa cơ bản, đặc biệt là con đường pentose phosphate (nhánh không oxy hóa), đường phân (glycolysis I, II, III), chu trình Calvin-Benson-Bassham, cũng như các con đường tổng hợp nucleotide như tổng hợp de novo adenosine ribonucleotide, siêu con đường tổng hợp de novo adenosine nucleotide I & II, và siêu con đường tái chế pyrimidine nucleobase. Các con đường này đóng vai trò thiết yếu trong việc cung cấp năng lượng, trung gian chuyển hóa và tiền chất cho tổng hợp DNA/RNA, phản ánh tính bảo tồn cao của các quá trình trao đổi chất nền tảng trong hệ vi sinh vật đường ruột.

Về điểm khác biệt, nhóm PC300 gia tăng rõ rệt các con đường liên quan đến tổng hợp amino acid chuỗi nhánh, bao gồm tổng hợp L-isoleucine (I, II, IV), tổng hợp L-valine, và siêu con đường tổng hợp amino acid chuỗi nhánh, đồng thời tăng cường lên men pyruvate thành isobutanol, biểu hiện chuyển hóa nâng cao hướng đến sản xuất amino acid, các chất chuyển hóa thứ cấp và thu nhận năng lượng. Điều này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, sự gia tăng các con đường chuyển hóa amino acid chuỗi nhánh đóng vai trò quan trọng trong hỗ trợ tăng khối lượng cơ và phục hồi chuyển hóa [213,214].

Thêm vào đó, nhóm PC150 ưu tiên các con đường phân giải carbohydrate như phân giải sucrose III, đường phân glycolysis II, cùng các quá trình lên men lactic acid và hô hấp hiếu khí I (cytochrome c), phản ánh nhu cầu cung cấp năng lượng nhanh và trực tiếp hơn. Ngược lại, nhóm PCDC nổi bật với các con đường tái tạo nucleotide và sửa chữa DNA như tổng hợp UMP, tổng hợp L-lysine III, và các con đường liên quan đến ổn định cấu trúc di truyền, cho thấy hệ vi sinh vật ở trạng thái cân bằng, chủ yếu duy trì chức năng cơ bản thay vì điều chỉnh chuyển hóa nâng cao.

Tóm lại, PCDC phản ánh hoạt động vi sinh vật nền ổn định, nghiêng về sao chép, sửa chữa và tổng hợp cơ bản. PC150 kích hoạt các con đường tiêu hóa carbohydrate và lên men, hỗ trợ chuyển hóa năng lượng ngắn hạn. Nhóm PC300 điều hòa chuyển hóa toàn diện hơn, bao gồm tăng sinh protein, chuyển hóa amino acid, cải thiện năng lượng và khả năng thích nghi.



Hình 3.43. Hồ sơ dự đoán chức năng của hệ vi khuẩn đường ruột trong 20 con đường biểu hiện cao nhất (KEGG MetaCyc)

3.5.2. Đánh giá tác động tiêu thụ BLL trên mô hình chuột

3.5.2.1. Huyết học và mô học

Kết quả phân tích huyết học và mô học khẳng định tính an toàn cao của BLL. Việc tiêu thụ sản phẩm không gây độc tính cấp, không làm thay đổi cấu trúc nhung mao ruột non và duy trì các chỉ số huyết cầu trong giới hạn sinh lý bình thường. Sự gia tăng nhẹ số lượng bạch cầu và tiểu cầu gợi ý khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch tự nhiên mà không gây viêm, phù hợp với các nghiên cứu trước đây về tính an toàn của chiết xuất lá lúa [39,209].

3.5.2.2. Mật số vi khuẩn LAB và AeB

Sau 14 ngày bổ sung BLL, mật số vi khuẩn LAB tăng đáng kể ở cả hai liều PC150 và PC300 so với đối chứng, cho thấy BLL có đặc tính prebiotic, cung cấp cơ chất lên men và tạo vi môi trường thuận lợi cho lợi khuẩn phát triển [139]. LAB đóng vai trò quan trọng trong sản sinh SCFA, giảm pH đường ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh và tăng cường hàng rào biểu mô [138].

Tuy nhiên, mức tăng LAB ở nhóm PC150 cao hơn PC300, gợi ý khi liều cao có thể gây ức chế nhẹ LAB do nồng độ polyphenol và hợp chất thứ cấp cao, vốn có đặc tính kháng khuẩn không chọn lọc [215]. Catechin (đặc biệt EGCG) trong BLL có thể ức chế vi khuẩn gây bệnh, đồng thời kích thích *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* [203,216]. Song ở nồng độ cao, catechin có thể ảnh hưởng đến một số chủng LAB nhạy cảm. Ngoài ra, sự lên men mạnh mẽ làm giảm pH ruột quá mức cũng tạo môi trường kém thuận lợi cho các chủng nhạy cảm [217]. Hiện tượng “liều thấp tối ưu – liều cao kém hiệu quả” tương tự được ghi nhận với chiết xuất rễ *Imperata cylindrica* L., khi liều thấp (90 mg/kg) tạo mật số LAB cao hơn liều cao (115 mg/kg) [138].

Mật số vi khuẩn hiếu khí tổng số (AeB) cũng tăng rõ rệt ở cả hai liều bổ sung, phản ánh sự cải thiện môi trường đường ruột và cân bằng hệ vi sinh thông qua sự gia tăng LAB song song. Điều này chứng tỏ BLL có khả năng điều hòa quần thể vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi, thúc đẩy quá trình lên men carbohydrate, cạnh tranh với vi khuẩn gây hại và hỗ trợ sức khỏe đường ruột.

3.5.2.3. Hệ vi sinh vật đường ruột

Phân tích giải trình tự 16S rRNA cho thấy BLL làm thay đổi đáng kể đa dạng và cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột. Nhóm PC300 có đa dạng alpha cao nhất, phản ánh hệ vi sinh vật phong phú và ổn định hơn, trong khi PC150 có chỉ số thấp hơn, cho thấy liều thấp chưa đủ để điều chỉnh cấu trúc vi sinh vật [218]. Phân tích PCoA về đa dạng beta ghi nhận PC300 phân tách rõ với PC150 và

PCDC, chứng tỏ liều cao tác động mạnh đến cộng đồng vi sinh vật, trong khi PC150 gần với PCDC hơn, thể hiện sự biến đổi nhẹ.

Ở cấp ngành, PC300 có sự gia tăng phong phú nhóm *Firmicutes*, tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidota* cùng với giảm *Proteobacteria*, tương ứng tăng khả năng hấp thu năng lượng, dẫn đến tăng trọng [219]. Tương tự, nghiên cứu bổ sung chất xơ đậu nành trong 8 tuần đã gia tăng đáng kể độ phong phú của *Firmicutes*, tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes*, kích thích chuột tăng cường thu nhận nhiều năng lượng hơn từ chế độ ăn và phát triển nhanh hơn, dẫn đến tăng trọng lượng cơ thể đáng kể [220]. Ngược lại, nhóm PC150 ghi nhận sự gia tăng của *Proteobacteria* và *Actinobacteriota*, với tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes* thấp hơn so với PCDC, phản ánh xu hướng kiểm soát trọng lượng. Giống với nghiên cứu trước đây, bổ sung chiết xuất hạt *Moringa oleifera* trong 12 tuần đã làm giảm *Bacteroidetes* và tăng *Proteobacteria*, tương ứng có biểu hiện giảm béo phì, cải thiện dung nạp glucose, tăng tiêu hao năng lượng, dẫn đến giảm trọng lượng cơ thể [221]. Đối chứng PCDC duy trì hệ vi sinh vật ổn định với *Firmicutes* (56,36%), *Bacteroidota* (14,7%) và *Proteobacteria* (10,5%), phản ánh trạng thái cân bằng sinh lý giữa hấp thu năng lượng và bảo vệ niêm mạc ruột. *Actinobacteriota* ở mức tương đương PC150 (11,11%), gợi ý vai trò duy trì chức năng enzyme và tổng hợp vitamin. Mặc dù *Proteobacteria* ở PCDC không vượt ngưỡng bất thường, sự hiện diện tương đối vẫn cho thấy nguy cơ viêm nhẹ tiềm ẩn trong trạng thái bình thường. PCDC là nền so sánh sinh học quan trọng, giúp xác định rõ tác động liều phụ thuộc của BLL.

Ở cấp họ và chi, sự thay đổi phụ thuộc liều rõ rệt. PC150 ưu thế *Lactobacillaceae*, *Enterobacteriaceae* và các chi *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* – những lợi khuẩn hỗ trợ hàng rào niêm mạc ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh và cải thiện miễn dịch [222,223]. Một số chủng *Lactobacillus* như *L. reuteri* còn có khả năng điều hòa chuyển hóa lipid, ức chế tích tụ mỡ, giảm hấp thu chất béo và chống tăng trọng thông qua bất hoạt muối mật [224]. Liều này tương ứng xu hướng kiểm soát trọng lượng thông qua điều hòa chuyển hóa lipid và giảm hấp thu chất béo. Trong khi đó, PC300 làm phong phú *Lachnospiraceae*, *Desulfovibrionaceae* và các chi *Lachnospiraceae* NK4A136, UCG-006, FCS020 group – những vi khuẩn sinh acetic acid (một SCFA thúc đẩy tăng trọng và điều hòa chuyển hóa năng lượng) [211,213,214]. Các SCFA như acetic acid được xem là cầu nối sinh học giữa hệ vi sinh vật đường ruột và mô cơ xương, với vai trò điều hòa chuyển hóa và tổng hợp cơ [225]. Ngoài ra, nhóm PC300 còn ghi nhận mức

độ cao của *Erysipelotrichaceae* và *Ruminococcaceae* – các nhóm vi khuẩn đã được chứng minh có mối tương quan nghịch với tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (Feed conversion rate - FCR) [226], tương ứng làm tăng hiệu quả hấp thu và chuyển hóa dinh dưỡng, gợi ý vai trò prebiotic của BLL trong gia tăng hiệu suất hấp thu năng lượng. Điều này có ý nghĩa quan trọng trong chăn nuôi, nơi tối ưu FCR là mục tiêu then chốt để tăng hiệu quả sản xuất. Do đó, các nhóm vi khuẩn trên có tiềm năng được phát triển như nguồn probiotic ứng viên nhằm tăng cường hiệu suất tăng trưởng ở gia cầm, cá và tôm. Nhóm PCDC duy trì mức độ trung bình của các nhóm vi khuẩn này, chứng minh rằng BLL là yếu tố chính định hình lại cấu trúc vi sinh vật.

Cơ chế tác động tích cực của BLL lên cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột có thể được lý giải thông qua mối liên hệ mật thiết giữa thành phần hóa học đặc trưng và đặc tính sinh lý của vi khuẩn. Hàm lượng xơ hòa tan trong BLL đóng vai trò là nguồn cơ chất prebiotic thiết yếu. Chúng không bị tiêu hóa ở dạ dày mà đi xuống ruột già, tạo điều kiện thuận lợi cho sự lên men của nhóm vi khuẩn phân giải carbohydrate (như *Lactobacillus* ở liều thấp và *Lachnospiraceae* ở liều cao), từ đó thúc đẩy sản sinh các axit béo chuỗi ngắn (SCFA). Sự hiện diện của nhóm catechin (EGCG, ECG) và các hợp chất trong BLL tạo ra tác động chọn lọc (selective antimicrobial effect). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng vi khuẩn gây bệnh thường nhạy cảm hơn với sự phá vỡ màng tế bào do polyphenol gây ra so với vi khuẩn commensal (lợi khuẩn). Hơn nữa, BLL chứa hàm lượng xơ hòa tan đáng kể (khoảng 500 mg/g), đóng vai trò là nguồn prebiotic cung cấp cơ chất lên men cho các nhóm vi khuẩn *Lachnospiraceae* và *Lactobacillaceae* phát triển, lấn át tác động ức chế của polyphenol ở liều lượng sinh lý. Do đó, trong môi trường đường ruột phức tạp, tác động tổng thể của BLL là hỗ trợ cân bằng hệ vi sinh chứ không đơn thuần là diệt khuẩn như trong đĩa thạch.

Mặc dù hoạt tính kháng khuẩn của BLL không đủ mạnh để tiêu diệt hoàn toàn mầm bệnh như kháng sinh, nhưng nồng độ này đủ để tạo áp lực ức chế nhẹ lên nhóm vi khuẩn Gram âm cơ hội (Proteobacteria). Ngược lại, các lợi khuẩn như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* có khả năng chống chịu tốt hơn và sở hữu hệ enzyme (như tannase, decarboxylase) giúp chuyển hóa catechin thành các chất chuyển hóa thứ cấp (như catechol).

Tóm lại, BLL điều chỉnh hệ vi sinh vật theo hướng phụ thuộc liều: liều thấp (150 mg/kg) ưu tiên lợi khuẩn kiểm soát tăng trọng và tăng cường miễn dịch, trong khi liều cao (300 mg/kg) thúc đẩy vi khuẩn sinh SCFA, cải thiện hiệu suất chuyển

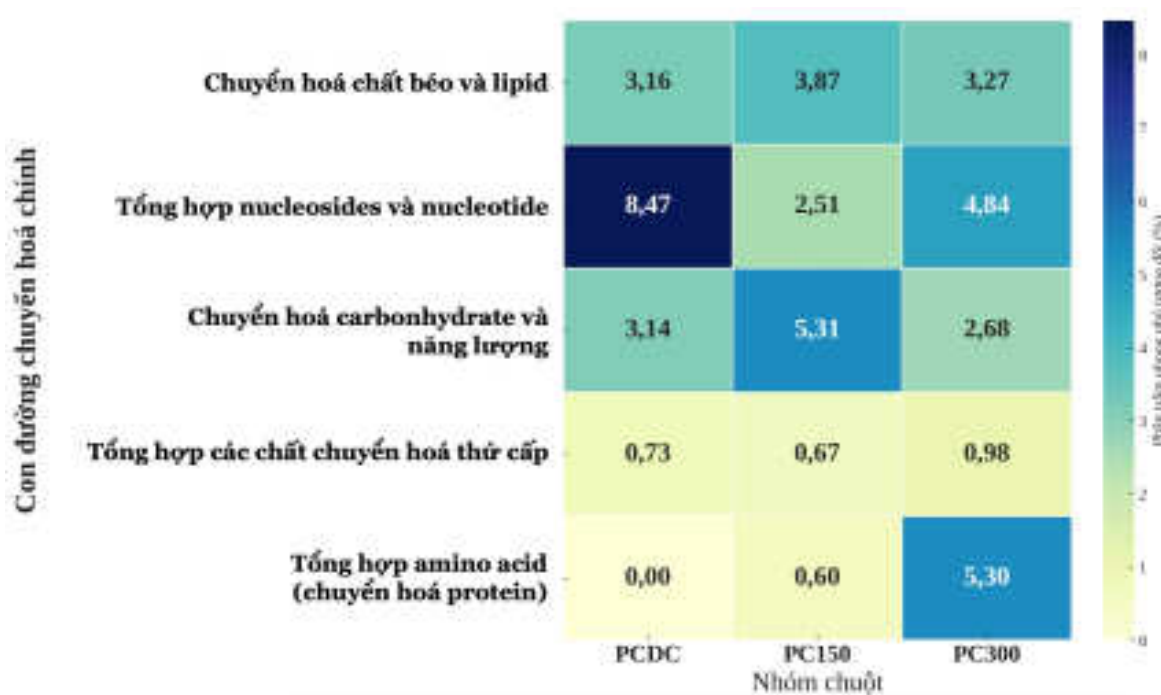
hóa năng lượng và tăng hấp thu. Những kết quả này cung cấp cơ sở sinh học cho việc ứng dụng BLL vào các mục tiêu sức khỏe hoặc dinh dưỡng khác nhau.

3.5.2.4. Dự đoán chức năng hệ vi sinh vật đường ruột

Bổ sung BLL làm thay đổi đáng kể hệ vi sinh vật đường ruột, kéo theo sự dịch chuyển các con đường chuyển hóa chính. Dựa trên 20 con đường có mức biểu hiện cao nhất (KO, EC, MetaCyc), cả ba nhóm đều duy trì hoạt động mạnh ở các trục chuyển hóa lipid, carbohydrate, protein và nucleic acid (Bảng P2.14). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện chức năng khác biệt rõ theo liều (Hình 3.44).

Nhóm PC150 tăng cường các con đường phân giải carbohydrate và lipid như phân giải sucrose, đường phân, lên men lactic đồng hình, kéo dài chuỗi fatty acid, tổng hợp phospholipid và hô hấp hiếu khí. Các enzyme chủ chốt liên quan đến oxy hóa chất béo (acyl-CoA oxidase, acyl-CoA dehydrogenase, 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase, triacylglycerol lipase và phospholipase (carboxylesterase), biểu hiện mạnh, thúc đẩy tiêu hao năng lượng và kiểm soát trọng lượng (Bảng P2.15 và 16). Ngoài ra, các gen liên quan đến phân giải lipid (glycerol dehydrogenase, glycerol oxidase, glycerol acyltransferase, triacylglycerol lipase, diacylglycerol kinase) biểu hiện cao hơn so với các nhóm khác (Bảng P2.17), trong khi các con đường liên quan đến tổng hợp chất béo gồm sinh tổng hợp CDP-diacylglycerol và sinh tổng hợp phosphatidylglycerol và các enzyme liên quan như glycerol kinase (phosphotransferase) tham gia vào quá trình tổng hợp triglyceride và glycerophospholipid, có biểu hiện giảm ở nhóm chuột tiêu thụ liều 150 mg/kg (Bảng P2.18). Điều này phản ánh tác dụng điều hòa chuyển hóa lipid (thúc đẩy quá trình oxy hóa chất béo, tiêu hao năng lượng) của BLL liều thấp.

Nhóm PC300 ưu tiên các con đường tổng hợp amino acid, đặc biệt là L-isoleucine, L-valine và siêu tổng hợp amino acid chuỗi nhánh – đóng vai trò thiết yếu trong sinh trưởng và chuyển hóa của vật chủ [227]. Biểu hiện các con đường này tương quan thuận với BMI và tăng trọng, gắn với sự phong phú của *Lachnospiraceae* và *Ruminococcus* [213,227]. Nghiên cứu trước đây trên heo con cũng ghi nhận việc bổ sung chiết xuất thực vật giúp gia tăng mức độ sản xuất các amino acid từ hệ vi sinh, cải thiện hiệu suất trọng lượng [228]. Kết quả này phù hợp với thành phần hệ vi sinh vật của nhóm PC300, trong đó các thành viên thuộc *Lachnospiraceae* chiếm ưu thế và có liên quan đến khả năng tổng hợp SCFA và amino acid – yếu tố thúc đẩy tăng trưởng.



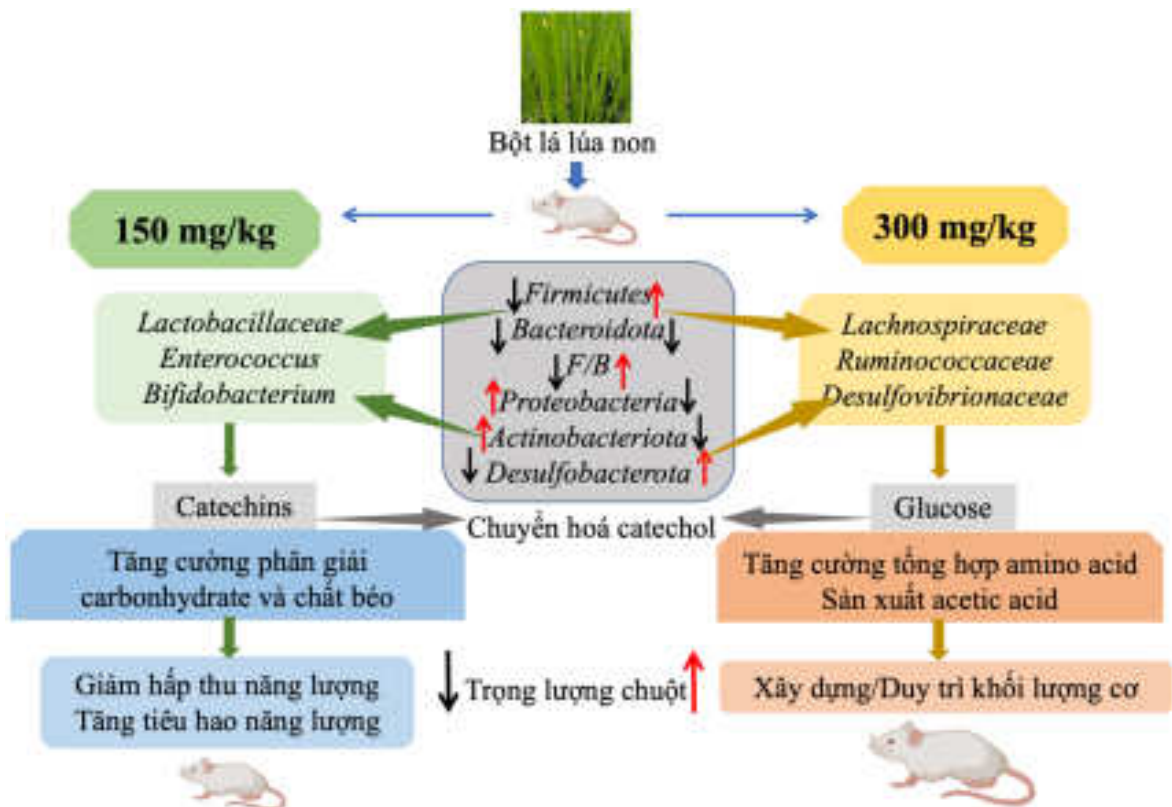
Hình 3.44. Mức độ biểu hiện các con đường chuyển hoá chính (KEGG Metacyc) cao nhất giữa các nhóm chuột

Ở nhóm đối chứng (PCDC), các con đường chức năng có mức biểu hiện tương đối trung gian, với xu hướng ưu tiên tổng hợp nucleic acid và glucose hơn là tổng hợp amino acid hoặc phân giải lipid. Điều này phản ánh trạng thái cân bằng và sinh lý nền ổn định của cộng đồng vi sinh vật chưa bị can thiệp.

Đặc biệt, phân tích KEGG Metacyc phát hiện sự khác biệt trong con đường chuyển hóa catechol giữa các nhóm, tương ứng phản ánh cơ chế sử dụng catechin trong BLL phụ thuộc vào hệ vi sinh vật. Ở liều 150 mg/kg, biểu hiện gen liên quan đến chuyển hóa catechol từ polyphenol (catechin) tăng cao (Bảng P2.19), tương ứng với sự hiện diện phong phú của các chi *Lactobacillus*, *Acinetobacter* và *Bifidobacterium* – là các vi khuẩn được biết có khả năng lên men catechin [229]. Trong khi đó, nhóm PC300 và PCDC biểu hiện cao hơn con đường chuyển hóa catechol từ glucose thông qua con đường 3-dehydroquinate (Bảng P2.20), liên quan đến các chi *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Enterobacter* [230].

Catechol là chất chống oxy hóa mạnh, có vai trò trung gian điều hòa tín hiệu insulin và chuyển hóa carbohydrate [229]. Sự ưu tiên con đường phân giải catechin thành catechol ở PC150 có thể góp phần làm giảm hấp thu glucose, tăng tiêu hao năng lượng và kiểm soát trọng lượng – phù hợp với biểu hiện mạnh của các gen thủy phân glucose và lipid. Ngược lại, con đường tổng hợp catechol từ glucose ở PC300 và PCDC phản ánh xu hướng chuyển hóa nội sinh từ dinh dưỡng cơ bản.

Về mặt chức năng vi sinh vật, nhóm PC300 vượt trội với sự phong phú của *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Desulfovibrio*, *Oscillospiraceae* và *Roseburia* – các vi khuẩn sinh fatty acid chuỗi ngắn (SCFA) giúp duy trì hàng rào niêm mạc, điều hòa miễn dịch và cân bằng nội môi glucose [231,232]. *Lachnospiraceae* NK4A136 group có khả năng bảo vệ biểu mô ruột, cải thiện viêm và nâng cao hiệu suất tăng trưởng [233]. Một số thành viên *Lachnospiraceae* như *Blautia producta* và *Clostridium bolteae* hỗ trợ kháng khuẩn, loại trừ *Enterococci* gây bệnh [234], song một số chủng khác như *Blautia*, *Coprococcus*, *Dorea* và *Roseburia* được ghi nhận có liên quan với béo phì và tiểu đường, cho thấy vai trò của họ này vẫn còn gây tranh cãi [235]. Nhóm PC300 cũng ghi nhận mức cao của *Desulfovibrio vulgaris* – một loài có khả năng cải thiện gan nhiễm mỡ không do rượu [236], cùng *Ruminococcaceae* và *Roseburia*, các vi khuẩn sinh butyrate có vai trò nuôi dưỡng tế bào biểu mô ruột, bảo vệ khỏi viêm và ung thư đại tràng [237]. *Oscillospiraceae* là chỉ dấu hệ vi sinh khỏe mạnh [238], trong khi *Lactococcus* tiết peptide kháng khuẩn và acid hữu cơ, duy trì cân bằng nội môi ruột [239].



Hình 3.45. Mô tả sự khác biệt trong thành phần hệ vi sinh đường ruột và con đường chuyển hóa ở chuột được bổ sung BLL

Bổ sung BLL 150 mg/kg làm tăng rõ rệt *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Enterococcus* – các chủng đã được chứng minh cải thiện hội chứng ruột kích thích,

viêm ruột, dị ứng, kháng khuẩn và chống ung thư [240,241]. *Bifidobacterium* còn tổng hợp vitamin nhóm B giúp hỗ trợ hoạt động tiêu hóa [241], trong khi nhiều chủng LAB tạo bacteriocin có tác dụng điều hòa miễn dịch [242]. Bên cạnh đó, liều 150 mg/kg cũng ghi nhận sự phong phú cao của *Rikenellaceae* - liên quan trạng thái chuyển hóa lành mạnh [243] và hai nhóm vi khuẩn *Streptococcus* và *Staphylococcus* - góp phần cân bằng miễn dịch [244].

Tổng thể, PC150 thể hiện cấu trúc vi sinh vật điều hòa miễn dịch và chuyển hóa năng lượng cân bằng, hỗ trợ kiểm soát trọng lượng, phù hợp sinh lý nhóm chuột có tốc độ tăng trưởng thấp. Trong khi đó, PC300 ưu tiên vi khuẩn sinh SCFA thúc đẩy hấp thu năng lượng và tăng trọng. Mô hình tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột và các con đường chuyển hóa liên quan được minh họa trong Hình 3.45.

Tóm lại, BLL an toàn trên mô hình chuột, không gây tổn thương huyết học hay mô học, đồng thời điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột theo hướng có lợi. Liều 150 mg/kg kích thích gia tăng phong phú *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Enterococcus*, hỗ trợ miễn dịch và kiểm soát trọng lượng. Ngược lại, liều 300 mg/kg làm phong phú các vi khuẩn sinh SCFA như *Lachnospiraceae* và *Ruminococcaceae*, thúc đẩy hấp thu năng lượng và tăng trưởng. Phân tích chức năng vi sinh vật cho thấy liều thấp tăng cường phân giải carbohydrate và lipid, trong khi liều cao ưu tiên tổng hợp amino acid chuỗi nhánh. Kết quả khẳng định BLL có tiềm năng sinh học, có thể ứng dụng linh hoạt cho các mục tiêu sức khỏe hoặc tăng trưởng tùy liều bổ sung.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và đạt được các mục tiêu đề ra với những kết quả chính như sau:

1. Đã xác định được điều kiện thu hoạch phù hợp để thu nhận lá lúa có hàm lượng hợp chất sinh học cao nhất là giống lúa IR50404, thu hoạch ở thời điểm tuần thứ 5 sau khi gieo và canh tác trong điều kiện ánh sáng tự nhiên (không che sáng). Ngoài ra, luận án cũng đề xuất cơ chế thích nghi chuyển hóa của cây lúa, trong đó phytol từ quá trình phân giải chlorophyll được tái sử dụng để tổng hợp vitamin E và các fatty acid ester dưới tác động của điều kiện ánh sáng.

2. Đã thiết lập được quy trình thu nhận BLL ổn định với các thông số kỹ thuật bao gồm: Bất hoạt enzyme bằng phương pháp chần ở nhiệt độ 100°C trong 4 phút; Chiết xuất sử dụng dung môi ethanol 60% với tỷ lệ dung môi/nguyên liệu là 10:1; Sấy phun ở nhiệt độ sấy đầu vào 120°C với chất mang maltodextrin 10%; Bảo quản sản phẩm duy trì độ ổn định tốt nhất về hàm lượng chất màu và hoạt tính sinh học ở nhiệt độ thấp (5°C hoặc -18°C) trong thời gian 6 tháng. Sản phẩm BLL thu được đạt các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm về vi sinh và kim loại nặng.

3. Đã xác định rõ hoạt tính chống oxy hóa, phổ kháng khuẩn và cơ chế điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột của sản phẩm bột lá lúa non.

- Hoạt tính chống oxy hóa: BLL thể hiện tiềm năng chống oxy hóa thông qua các thử nghiệm DPPH, ABTS, FRAP và RP với giá trị IC₅₀ dao động từ 36,67 đến 80,90 mg/mL^{14,15}. Hoạt tính này có mối tương quan chặt chẽ với hàm lượng polyphenol và chlorophyll trong sản phẩm.

- Khả năng kháng khuẩn: Sản phẩm có hoạt tính kháng khuẩn đối với các chủng *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Pseudomonas aeruginosa* với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) trong khoảng 3,9 – 4,8 mg/mL. Tuy nhiên, hoạt tính kháng nấm *Candida albicans* của sản phẩm không đáng kể (MIC > 8.000 µg/mL).

- Tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột và sinh lý chuột: BLL được xác định là an toàn, không gây độc tính cấp hay tổn thương mô học trên chuột thí nghiệm. Tác động điều hòa hệ vi sinh vật phụ thuộc vào liều lượng: Liều 150 mg/kg thúc đẩy sự phát triển của lợi khuẩn *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và kích hoạt các gen liên quan đến phân giải lipid và glucose, hỗ trợ kiểm soát cân nặng;

Liều 300 mg/kg làm gia tăng nhóm vi khuẩn *Lachnospiraceae* và *Ruminococcaceae* (sinh fatty acid chuỗi ngắn - SCFA), thúc đẩy các con đường tổng hợp amino acid, giúp tăng cường hấp thu năng lượng và tăng trọng.

Kết quả nghiên cứu khẳng định tiềm năng của bột lá lúa non như một nguồn nguyên liệu chức năng (functional ingredient) có giá trị, có thể ứng dụng linh hoạt trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe hoặc phụ gia thức ăn chăn nuôi tùy theo mục đích điều hòa chuyển hóa mong muốn.

KIẾN NGHỊ

Từ kết quả nghiên cứu của luận án, để nâng cao giá trị thực tiễn của sản phẩm bột lá lúa non (BLL), các hướng nghiên cứu tiếp theo cần tập trung vào:

1. Hoàn thiện quy trình công nghệ thu nhận BLL non: Để nâng cao khả năng chuyển giao công nghệ và sản xuất thương mại, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung tối ưu hóa đa mục tiêu các thông số kỹ thuật sấy phun (như áp lực vòi phun, tốc độ nhập liệu) nhằm cải thiện hiệu suất thu hồi bột, kiểm soát độ ẩm (<5%), và đồng nhất kích thước hạt. Đồng thời, cần đánh giá các đặc tính công nghệ thực phẩm như độ hòa tan, khả năng hút ẩm và độ chảy (flowability) để đảm bảo chất lượng và tính ổn định của sản phẩm trong quá trình bảo quản và lưu thông phân phối.

2. Làm rõ cơ chế và an toàn dài hạn: Mở rộng thời gian thử nghiệm *in-vivo* (trên 14 ngày) để khẳng định tính an toàn bán trường diễn. Để khắc phục hạn chế của phương pháp lấy mẫu gộp (pooling) trong phân tích hệ vi sinh vật (metagenomics), các nghiên cứu tiếp theo nên thực hiện phân tích trên từng cá thể chuột. Đồng thời, cần phân tích chuyên sâu (metabolomics) để làm rõ cơ chế chuyển hóa của polyphenol và các thay đổi mức độ phân tử liên quan đến quá trình điều hòa năng lượng.

3. Đa dạng hóa ứng dụng: Dựa trên tác động phụ thuộc liều lượng của BLL, cần nghiên cứu phát triển hai dòng sản phẩm chuyên biệt: (1) Thực phẩm chức năng hỗ trợ kiểm soát cân nặng và miễn dịch (dựa trên hiệu quả của liều 150 mg/kg); (2) Phụ gia thức ăn chăn nuôi kích thích tăng trưởng tự nhiên (dựa trên hiệu quả của liều 300 mg/kg).

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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* L.) during vegetative stages using ethanolic extract analysis based on gas chromatography-mass spectrometry. *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.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ito, V.C. and Lacerda, L.G. (2019) Black rice (*Oryza sativa* L.): A review of its historical aspects, chemical composition, nutritional and functional properties, and applications and processing technologies. *Food Chemistry*. 301 125304.
- [2] Tho, L.C.B. and Umetsu, C. (2022) Rice variety and sustainable farming: A case study in the Mekong Delta, Vietnam. *Environmental Challenges*. 8 100532.
- [3] Deshwal, V.K. and Deepshikha, D. (2018) Antimicrobial investigation of wheat grass (*Triticum aestivum* L.) against *Escherichia coli*. *European Journal of Molecular Biology and Biochemistry*. 5 (1), 9–12.
- [4] Avisar, A., Cohen, M., Katz, R., Shentzer Kutiel, T., Aharon, A., and Bar-Sela, G. (2020) Wheatgrass juice administration and immune measures during adjuvant chemotherapy in colon cancer patients: Preliminary results. *Pharmaceuticals*. 13 (6), 129.
- [5] Borkar, S. (2021) Product development of wheat grass powder and its nutritional analysis. *International Journal of Multidisciplinary Education Research*. 10 (4), 114–116.
- [6] Chomchan, R., Siripongvutikorn, S., Puttarak, P., and Rattanapon, R. (2016) Investigation of phytochemical constituents, phenolic profiles and antioxidant activities of ricegrass juice compared to wheatgrass juice. *Functional Foods in Health and Disease*. 6 (12), 822.
- [7] Wangcharoen, W. and Phimphilai, S. (2016) Chlorophyll and total phenolic contents, antioxidant activities and consumer acceptance test of processed grass drinks. *Journal of Food Science and Technology*. 53 (12), 4135–4140.
- [8] Thepthanee, C., Liu, C.C., Yu, H.S., Huang, H.S., Yen, C.H., Li, Y.H., et al. (2021) Evaluation of phytochemical contents and *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of black rice leaf (*Oryza sativa* L.) extract and its fractions. *Foods*. 10 (12), 2987.
- [9] Yang, C., Shen, S., Zhou, S., Li, Y., Mao, Y., Zhou, J., et al. (2022) Rice metabolic regulatory network spanning the entire life cycle. *Molecular Plant*. 15 (2), 258–275.
- [10] Ishikawa, R., Castillo, C.C., and Fuller, D.Q. (2020) Genetic evaluation of domestication-related traits in rice: implications for the archaeobotany of rice origins. *Archaeological and Anthropological Sciences*. 12 (8), 197.
- [11] Sangeetha, J., Thangadurai, D., Fayeun, L.S., Akinwale, J.A., Habeeb, J., Maxim, S.S., et al. (2020) Origin and evolution of rice as domesticated food crop. in: A. Roychoudhury (Ed.), *Rice Research for Quality Improvement*:

- Genomics and Genetic Engineering: Volume 1: Breeding Techniques and Abiotic Stress Tolerance, Springer, Singaporepp. 1–14.
- [12] World Agricultural Production (2023) Rice Production by Country | World Agricultural Production 2023/2024.
- [13] Nghị Quyết Quốc Hội (2021) Nghị quyết 39/2021/QH15 về quy hoạch sử dụng đất quốc gia thời kỳ 2021 - 2030, tầm nhìn đến năm 2050, kế hoạch sử dụng đất quốc gia 5 năm 2021 - 2025.
- [14] Statista (2024) Vietnam: Rice production in the Mekong Delta 2024. *Statista*.
- [15] Khanh, T.D., Duong, V.X., Nguyen, P.C., Xuan, T.D., Trung, N.T., Trung, K.H., et al. (2021) Rice breeding in Vietnam: Retrospects, challenges and prospects. *Agriculture*. 11 (5), 397.
- [16] Lai, D.Q., Ngo, T.A., Nguyen, Q.L., Nguyen, H.D., and Pham, D.T. (2022) Physical and chemical properties of rice varieties grown in Mekong Delta. *Vietnam Journal of Science and Technology*. 60 (5), 767–784.
- [17] IRRI (2024) Crop calendar - IRRI Rice Knowledge Bank.
- [18] Nawaz, A. and Farooq, M. (2017) Rice physiology. in: B.S. Chauhan, K. Jabran, G. Mahajan (Eds.), *Rice Production Worldwide*, Springer International Publishing, Champp. 455–485.
- [19] Hussain, S., Khaliq, A., Ali, B., Hussain, H.A., Qadir, T., and Hussain, S. (2019) Temperature extremes: Impact on rice growth and development. in: M. Hasanuzzaman, K.R. Hakeem, K. Nahar, H.F. Alharby (Eds.), *Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches*, Springer International Publishing, Champp. 153–171.
- [20] Phuoc, L.H., Suliansyah, I., Arlius, F., Chaniago, I., Xuan, N.T.T., and Quan, P.V. (2022) Responses of growth and grain yield of IR50404 rice to temperature stress. *International Journal of Agricultural Sciences*. 6 (1), 9–18.
- [21] Lam T.G., Pham Q.N., and Do T.K. (2015) Đa dạng dấu phân tử indel của các dòng lúa thơm ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*. 38 (2), 23–29.
- [22] Ta H.L. and Chu D.H. (2022) Study on the cultivation practices for “Huyet Rong” herbal rice variety in Quang Tri province. *TNU Journal of Science and Technology*. 227 (01), 3–9.
- [23] Chomchan, R., Siripongvutikorn, S., Maliyam, P., Saibandith, B., and Puttarak, P. (2018) Protective effect of selenium-enriched ricegrass juice against cadmium-induced toxicity and DNA damage in HEK293 kidney cells. *Foods*. 7 (6), 81.
- [24] Chomchan, R., Puttarak, P., Brantner, A., and Siripongvutikorn, S. (2018a) Selenium-rich ricegrass juice improves antioxidant properties and nitric oxide inhibition in macrophage cells. *Antioxidants*. 7 (4), 57.

- [25] Thepthanee, C., Liu, C.C., Yu, H.S., Huang, H.S., Yen, C.H., Li, Y.H., et al. (2022) Antioxidant activity and inhibitory effects of black rice leaf on the proliferation of human carcinoma cells. *BioMed Research International*. 2022 1–17.
- [26] Khanthapok, P., Muangprom, A., and Sukrong, S. (2015) Antioxidant activity and DNA protective properties of rice grass juices. *ScienceAsia*. 41 (2), 119.
- [27] Yao, W., Gong, Y., Li, L., Hu, X., and You, L. (2022) The effects of dietary fibers from rice bran and wheat bran on gut microbiota: An overview. *Food Chemistry: X*. 13 100252.
- [28] Swann, O.G., Kilpatrick, M., Breslin, M., and Oddy, W.H. (2020) Dietary fiber and its associations with depression and inflammation. *Nutrition Reviews*. 78 (5), 394–411.
- [29] Tamprasit, K., Weerapreeyakul, N., Sutthanut, K., Thukhammee, W., and Wattanathorn, J. (2019) Harvest age effect on phytochemical content of white and black glutinous rice cultivars. *Molecules*. 24 (24), 4432.
- [30] Sakulnarmrat, K., Dalar, A., Sukru Bengu, A., and Konczak, I. (2018) Phytochemical composition and health-enhancing properties of *Oryza sativa* L. leaf tea. *Integrative Food, Nutrition and Metabolism*. 5 (6), 1–11.
- [31] Kusumah, D., Wakui, M., Murakami, M., Xie, X., Yukihiro, K., and Maeda, I. (2020) Linoleic acid, α -linolenic acid, and monolinolenins as antibacterial substances in the heat-processed soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 84 (6), 1285–1290.
- [32] Barbacariu, C.A., Burducea, M., Dirvariu, L., Oprea, E., Lupu, A.C., Teliban, G.C., et al. (2021) Evaluation of diet supplementation with wheat grass juice on growth performance, body composition and blood biochemical profile of Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Animals*. 11 (9), 2589.
- [33] Cuong, D.X. (2020) Antioxidant chlorophyll purification from maize leaves by liquid-to-liquid extraction method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 10 (3), 152–158.
- [34] Li, Y., Cui, Y., Lu, F., Wang, X., Liao, X., Hu, X., et al. (2019) Beneficial effects of a chlorophyll-rich spinach extract supplementation on prevention of obesity and modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed mice. *Journal of Functional Foods*. 60 103436.
- [35] Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., and Restani, P. (2021) Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*. 13 (1), 273.
- [36] Phonsakhan, W. and Kong, N.K. (2015) A comparative proteomic study of white and black glutinous rice leaves. *Electronic Journal of Biotechnology*. 18 (1), 29–34.

- [37] Adhikary, M., Mukhopadhyay, K., and Sarkar, B. (2021) Flavonoid-rich wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) diet attenuates diabetes by modulating antioxidant genes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Food Biochemistry*. 45 (4), e13643.
- [38] Eissa, H.A., Mohamed, S.S., and Hussein, A.M.S. (2020) Nutritional value and impact of wheatgrass juice (Green blood therapy) on increasing fertility in male albino rats. *Bulletin of the National Research Centre*. 44 (1), 30.
- [39] Phimphilai, S., Koonyosying, P., Hutachok, N., Kampoun, T., Daw, R., Chaiyasut, C., et al. (2021) Identifying chemical composition, safety and bioactivity of Thai rice grass extract drink in cells and animals. *Molecules*. 26 (22), 6887.
- [40] Khoo, H.E., Azlan, A., Tang, S.T., and Lim, S.M. (2017) Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*. 61 (1), 1361779.
- [41] Semaming, Y., Pannengpetch, P., Chattipakorn, S.C., and Chattipakorn, N. (2015) Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015 593902.
- [42] Brimson, J.M., Onlamoon, N., Tencomnao, T., and Thitilertdecha, P. (2019) *Clerodendrum petasites* S. Moore: The therapeutic potential of phytochemicals, hispidulin, vanillic acid, verbascoside, and apigenin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 118 109319.
- [43] Ganeshpurkar, A. and Saluja, A.K. (2017) The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 25 (2), 149–164.
- [44] Roland, B., Bernard, G.C., Fernand, G., and Coffi, A.A. (2017) Phytochemical screening and quantitative variation of some secondary metabolites in five cultivated rice varieties. *Journal of Applied Biosciences*. 113 11146–11157.
- [45] Du, S., Huang, X., Cai, Y., Hao, Y., Qiu, S., Liu, L., et al. (2021) Differential antioxidant compounds and activities in seedlings of two rice cultivars under chilling treatment. *Frontiers in Plant Science*. 12 631421.
- [46] Nayeem, S., Venkidasamy, B., Sundararajan, S., Kuppuraj, S.P., and Ramalingam, S. (2021) Differential expression of flavonoid biosynthesis genes and biochemical composition in different tissues of pigmented and non-pigmented rice. *Journal of Food Science and Technology*. 58 (3), 884–893.
- [47] Kumbar, M., Mirajkar, K.K., and Arvind, K. (2021) Phytochemical response in rice (*Oryza sativa* L.) genotype during the vegetative and reproductive stage under drought stress and non-stress conditions. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 30 (1), 1–12.

- [48] Dong, X., Chen, W., Wang, W., Zhang, H., Liu, X., and Luo, J. (2014) Comprehensive profiling and natural variation of flavonoids in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. 56 (9), 876–886.
- [49] Mollaei, S., Hazrati, S., Lotfizadeh, V., Dastan, D., and Asgharian, P. (2020) Phytochemical variation and biological activities of *Zosima absinthifolia* during various stages of growth. *International Journal of Food Properties*. 23 (1), 1556–1567.
- [50] Song, H.H., Ryu, H.W., Lee, K.J., Jeong, Y., Kim, D.S., and Oh, S.R. (2014) Metabolomics investigation of flavonoid synthesis in soybean leaves depending on the growth stage. *Metabolomics*. 10 (5), 833–841.
- [51] Niroula, A., Khatri, S., Khadka, D., and Timilsina, R. (2019a) Total phenolic contents and antioxidant activity profile of selected cereal sprouts and grasses. *International Journal of Food Properties*. 22 (1), 427–437.
- [52] Bian, Z.H., Yang, Q.C., and Liu, W.K. (2015) Effects of light quality on the accumulation of phytochemicals in vegetables produced in controlled environments: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95 (5), 869–877.
- [53] Stirbet, A., Lazár, D., Guo, Y., and Govindjee, G. (2020) Photosynthesis: basics, history and modelling. *Annals of Botany*. 126 (4), 511–537.
- [54] Wimalasekera, R. (2019) Effect of light intensity on photosynthesis. in: *Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 65–73.
- [55] Cui, L., Gao, R., Dong, S., Zhang, J., Liu, P., Zhang, H., et al. (2012) Effects of ear shading on the anthocyanin contents and quality of kernels in various genotypes of maize. *Australian Journal of Crop Science*. 6 (4), 704–710.
- [56] Idris, A., Linatoc, A.C., Bakar, M.F.A., Ibrahim, Z.T., and Audu, Y. (2018) Effect of light quality and quantity on the accumulation of flavonoid in plant species. *Journal of Science and Technology*. 10 (3), 32–45.
- [57] Wang, D., Yang, T., Li, Y., Deng, F., Dong, S., Li, W., et al. (2022) Light intensity-A key factor affecting flavonoid content and expression of key enzyme genes of flavonoid synthesis in Tartary buckwheat. *Plants*. 11 (16), 2165.
- [58] Ye, J.H., Lv, Y.Q., Liu, S.R., Jin, J., Wang, Y.F., Wei, C.L., et al. (2021) Effects of light intensity and spectral composition on the transcriptome profiles of leaves in shade grown tea plants (*Camellia sinensis* L.) and regulatory network of flavonoid biosynthesis. *Molecules*. 26 (19), 5836.
- [59] Karimi, E., Jaafar, H.Z.E., Ghasemzadeh, A., and Ibrahim, M.H. (2013) Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth. *Australian Journal of Crop Science*. 7 (7), 1016–1023.

- [60] Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., and Zhang, Y. (2022) A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communications*. 17 (1), 1–14.
- [61] Radoeva, R., Karsheva, M., and Enchev, B. (2022) Extraction of valuable components from winery's by-products through soxhlet extraction: Effect of operational parameters on product yield and quality. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 57 (2), 271–278.
- [62] Zeroual, A., Sakar, E.H., Mahjoubi, F., Chaouch, M., Chaqroune, A., and Taleb, M. (2022) Effects of extraction technique and solvent on phytochemicals, antioxidant, and antimicrobial activities of cultivated and wild Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Taounate region (Northern Morocco). *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12 (6), 8441–8452.
- [63] Ermi, N.P.H., Fatmawati, S., and Asri, A.W. (2021) The effect of ethanol concentrations as the extraction solvent on antioxidant activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) leaves extracts. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 755 (1), 012060.
- [64] Berwal, M., Haldhar, S., Ram, C., Shil, S., and Gora, J.S. (2021) Effect of extraction solvent on total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity of flower bud and foliage of *Calligonum polygonoides* L. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*. 34 61–67.
- [65] Iqbal, A., Murtaza, A., Hu, W., Ahmad, I., Ahmed, A., and Xu, X. (2019) Activation and inactivation mechanisms of polyphenol oxidase during thermal and non-thermal methods of food processing. *Food and Bioproducts Processing*. 117 170–182.
- [66] Selvarajan, E., Veena, R., and Manoj Kumar, N. (2018) Polyphenol oxidase, beyond enzyme browning. in: J. Singh, D. Sharma, G. Kumar, N.R. Sharma (Eds.), *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*, Springer, Singaporepp. 203–222.
- [67] Aggarwal, S. and Jain, T. (2018) Modern pretreatment techniques for phytochemical extraction. *Nutrition & Food Science*. 49 (3), 441–454.
- [68] Adetoro, A.O., Opara, U.L., and Fawole, O.A. (2021) Effect of blanching on enzyme inactivation, physicochemical attributes and antioxidant capacity of hot-air dried pomegranate (*Punica granatum* L.) Arils (cv. Wonderful). *Processes*. 9 (1), 25.
- [69] Magangana, T.P., Makunga, N.P., Fawole, O.A., and Opara, U.L. (2022) Effect of blanching pretreatment on the phytochemical properties, and bioactivities of 'Herskawitz' pomegranate peel extracts at three different harvest maturities. *Acta Horticulturae*. (1349), 619–628.

- [70] Sayed, A., Chys, M., and Sampers, I. (2023) Characterization of blanching water from the potato processing industry and the influence of processing conditions. *Journal of Cleaner Production*. 388 135977.
- [71] Nguyen, N.H.K., An, N.T.D., Anh, P.K., and Truc, T.T. (2021) Microwave-assisted extraction of chlorophyll and polyphenol with antioxidant activity from *Pandanus amaryllifolius* Roxb. in Vietnam. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 1166 (1), 012039.
- [72] Saetan, P., Usawakesmanee, W., and Siripongvutikorn, S. (2016) Influence of hot water blanching process on phenolic profile and antioxidant activity of *Cinnamomum porrectum* herbal tea. *Functional Foods in Health and Disease*. 6 (12), 836–854.
- [73] Le, N.L., Le, T.T.H., and Ma, N.B. (2021) Effects of air temperature and blanching pre-treatment on phytochemical content, antioxidant activity and enzyme inhibition activities of Thai basil leaves (*Ocimum basilicum* var. *thrysiflorum*). *Food Research*. 5 (1), 337–342.
- [74] Anaya-Esparza, L.M., Velázquez-Estrada, R.M., Sayago-Ayerdi, S.G., Sánchez-Burgos, J.A., Ramírez-Mares, M.V., García-Magaña, M. de L., et al. (2017) Effect of thermosonication on polyphenol oxidase inactivation and quality parameters of soursop nectar. *LWT*. 75 545–551.
- [75] Xin, Y., Zhang, M., Yang, H., and Adhikari, B. (2015) Kinetics of argy wormwood (*Artemisia argyi*) leaf peroxidase and chlorophyll content changes due to thermal and thermosonication treatment. *Journal of Food Science and Technology*. 52 (1), 249–257.
- [76] Kandasamy, S. and Naveen, R. (2022) A review on the encapsulation of bioactive components using spray-drying and freeze-drying techniques. *Journal of Food Process Engineering*. 45 (8), e14059.
- [77] Bartkowiak, A., Krawczyńska, W., and Federowicz, A. (2016) Novel polymer systems and additives to protect bioactive substances applied in spray-drying. in: J.C.R. Ruiz, M.R.S. Campos (Eds.), *New Polymers for Encapsulation of Nutraceutical Compounds*, 1st ed., Wiley, pp. 97–119.
- [78] Wijayanti, N., Widyaningsih, T.D., Wulan, S.N., and Rifai, M. (2024) Influence of spray drying inlet temperature on the physical properties and antioxidant activity of black garlic extract powder. *Trends in Sciences*. 21 (2), 7247–7247.
- [79] Buratto, A.P., Carpes, S.T., Pereira, E.A., Diedrich, C., Oldoni, T.L.C., and Silva, L.D. (2019) Effect of drying method in the maintenance of bioactive compounds and antioxidant activity of Feijoa pulp (*Acca sellowiana*). *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*. 11 (6), 386–393.
- [80] Silva Júnior, M.E., Araújo, M.V.R.L., Martins, A.C.S., dos Santos Lima, M., da Silva, F.L.H., Converti, A., et al. (2023) Microencapsulation by spray-

- drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific Reports*. 13 (1), 15222.
- [81] Iturri, M.S., Calado, C.M.B., and Prentice, C. (2021) Microparticles of *Eugenia stipitata* pulp obtained by spray-drying guided by DSC: An analysis of bioactivity and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 334 127557.
- [82] Rezende, Y.R.R.S., Nogueira, J.P., and Narain, N. (2018) Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata*) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chemistry*. 254 281–291.
- [83] Tchabo, W. (2019) Process analysis of mulberry (*Morus alba*) leaf extract encapsulation: Affects of spray drying conditions on bioactive encapsulated powder quality. *Food and Bioprocess Technology*. 12 122–146.
- [84] Saavedra-Leos, M.Z., Leyva-Porras, C., Toxqui-Terán, A., and Espinosa-Solis, V. (2021) Physicochemical properties and antioxidant activity of spray-dry broccoli (*Brassica oleracea* var Italica) stalk and floret juice powders. *Molecules*. 26 (7), 1973.
- [85] Marques, T.M., Ganda-Mall, J.P., Forsgård, R., Wall, R., Brummer, R.J., and de Vos, W.M. (2024) Chapter 1 - Correlating the gut microbiome to health and disease. in: N. Hyland, C. Stanton (Eds.), *The Gut-Brain Axis* (Second Edition), Academic Press, pp. 1–36.
- [86] Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., et al. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*. 57 (1), 1–24.
- [87] Pérez-Burillo, S., Hinojosa-Nogueira, D., Pastoriza, S., and Rufián-Henares, J.A. (2020) Plant extracts as natural modulators of gut microbiota community structure and functionality. *Heliyon*. 6 (11), e05474.
- [88] Mandal, R.S., Saha, S., and Das, S. (2015) Metagenomic surveys of gut microbiota. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 13 (3), 148–158.
- [89] Qi, C., Wang, P., Fu, T., Lu, M., Cai, Y., Chen, X., et al. (2021) A comprehensive review for gut microbes: Technologies, interventions, metabolites and diseases. *Briefings in Functional Genomics*. 20 (1), 42–60.
- [90] Jovandaric, M.Z., Jovanović, K., Raus, M., Babic, S., Igic, T., Kotlica, B., et al. (2024) The significance of plant nutrition in the creation of the intestinal microbiota-prevention of chronic diseases: A narrative review. *Medicina*. 60 (12), 1969.
- [91] Plamada, D. and Vodnar, D.C. (2022) Polyphenols-Gut microbiota interrelationship: A transition to a new generation of prebiotics. *Nutrients*. 14 (1), 137.

- [92] Jia, M., Li, D., Wang, R., Wang, A., Strappe, P., Wu, Q., et al. (2022) Gut microbiota derived structural changes of phenolic compounds from colored rice and its corresponding fermentation property. *Food & Function*. 13 (20), 10759–10768.
- [93] Liang, J., Li, X., Lei, W., Tan, P., Han, M., Li, H., et al. (2023) Serum metabolomics combined with 16S rRNA sequencing to reveal the effects of *Lycium barbarum* polysaccharide on host metabolism and gut microbiota. *Food Research International*. 165 112563.
- [94] Kasprzak-Drozd, K., Oniszczuk, T., Stasiak, M., and Oniszczuk, A. (2021) Beneficial effects of phenolic compounds on gut microbiota and metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (7), 3715.
- [95] Song, H., Shen, X., Zhou, Y., and Zheng, X. (2021) Black rice anthocyanins alleviate hyperlipidemia, liver steatosis and insulin resistance by regulating lipid metabolism and gut microbiota in obese mice. *Food & Function*. 12 (20), 10160–10170.
- [96] Li, H., Christman, L.M., Li, R., and Gu, L. (2020) Synergic interactions between polyphenols and gut microbiota in mitigating inflammatory bowel diseases. *Food & Function*. 11 (6), 4878–4891.
- [97] Chaves, N., Santiago, A., and Alías, J.C. (2020) Quantification of the antioxidant activity of plant extracts: Analysis of sensitivity and hierarchization based on the method used. *Antioxidants*. 9 (1), 76.
- [98] Christodoulou, M.C., Orellana Palacios, J.C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J.M., Domínguez, R., et al. (2022) Spectrophotometric methods for measurement of antioxidant activity in food and pharmaceuticals. *Antioxidants*. 11 (11), 2213.
- [99] Bibi Sadeer, N.B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., and Mahomoodally, M.F. (2020) The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*. 9 (8), 709.
- [100] Vasyliiev, G.S., Vorobyova, V.I., and Linyucheva, O.V. (2020) Evaluation of reducing ability and antioxidant activity of fruit pomace extracts by spectrophotometric and electrochemical methods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2020 e8869436.
- [101] Moradali, M.F., Ghods, S., and Rehm, B.H.A. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7 39.
- [102] Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A.M., Malone, M., Nicolaisen, M.H., et al. (2020) The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*. 128 (3), 220–231.

- [103] Reynolds, D. and Kollef, M. (2021) The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: An update. *Drugs*. 81 (18), 2117–2131.
- [104] Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., and Guery, B. (2018) How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*. 7 212527.
- [105] Bhunia, A.K. (2018) *Staphylococcus aureus*. in: A.K. Bhunia (Ed.), *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*, Springer, New York, NYpp. 181–192.
- [106] Dayan, G.H., Mohamed, N., Scully, I.L., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J., et al. (2016) *Staphylococcus aureus*: The current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Review of Vaccines*. 15 (11), 1373–1392.
- [107] Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015) *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28 (3), 603–661.
- [108] Martinson, J.N.V. and Walk, S.T. (2020) *Escherichia coli* residency in the gut of healthy human adults. *EcoSal Plus*. 9 (1), 1–19.
- [109] Bonten, M., Johnson, J.R., Biggelaar, A.H.J., Georgalis, L., Geurtsen, J., Palacios, P.I., et al. (2021) Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: A systematic literature review. *Clinical Infectious Diseases*. 72 (7), 1211–1219.
- [110] Pakbin, B., Brück, W.M., and Rossen, J.W.A. (2021) Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (18), 9922.
- [111] Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J.R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., et al. (2016) *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*. 40 (4), 437–463.
- [112] Macias-Paz, I.U., Pérez-Hernández, S., Tavera-Tapia, A., Luna-Arias, J.P., Guerra-Cárdenas, J.E., and Reyna-Beltrán, E. (2023) *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Revista Argentina de Microbiología*. 55 (2), 189–198.
- [113] Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., et al. (2021) *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*. 7 (2), 79.
- [114] Lopes, J.P. and Lionakis, M.S. (2022) Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 13 (1), 89–121.
- [115] Fan, F., Liu, Y., Liu, Y., Lv, R., Sun, W., Ding, W., et al. (2022) *Candida albicans* biofilms: antifungal resistance, immune evasion, and emerging therapeutic strategies. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 60 (5), 106673.

- [116] Hui, B.Y.P., Bhave, M., and Hwang, S.S. (2019) Potential protective effects of rice seedling extracts of a Malaysian rice variety, Biris, against doxorubicin-induced cytotoxicity. *Tropical Life Sciences Research*. 30 (2), 71–90.
- [117] Do T.K., Tran N.D., and Tran D.X. (2018) Khả năng chống oxy hóa của phân đoạn dịch chiết từ gạo mầm và gạo lức. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. 60 (6), 70–72.
- [118] Hien L.T., Nhung T.T.M., Trang N.T., and Phuong Đ.M.N. (2017) Ảnh hưởng của quá trình trích ly đến hàm lượng polyphenol và khả năng chống oxy hóa từ cây lá đắng (*Vernonia amygdalina*). *Tạp chí Khoa học Đại học Văn Hiến*. 5 (4), 93–99.
- [119] Anh V.T.T., Qui Đ.P., Thi T.T.T., and Linh T.C. (2017) Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxy hoá của các cao chiết từ thân và lá cây Bộ Mắm (*Pouzolzia zeylanica* L.). *Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ*. 52 (A), 29–36.
- [120] Anh, N. and Thanh, M.T.H. (2019) Study on the effect of spray drying method on the quality of noni powder. *Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ - Đại Học Đà Nẵng*. 17 (1), 16–21.
- [121] Anh L.T.H., Nhon H.T.N., Kien N.M., and Kien T.T. (2016) Nghiên cứu thu nhận bột màu chlorophyll từ rong nước lợ *Cheatomorpha* sp. Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*. 10 30–38.
- [122] Tất T.Q., Liễu P.T.T., Trang N.T.P., and Khánh N.D. (2021) Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến hàm lượng hợp chất polyphenol, sắc tố carotenoids, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa của cây rau càng cua (*Peperomia pellucida* L.) thu ở tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí khoa học Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh - kỹ thuật và công nghệ*. 16 (1), 25–33.
- [123] Nguyễn N.M.P. and Nguyễn H.N. (2022) Khảo sát các điều kiện thích hợp cho quá trình trích ly chlorophyll bằng ethanol từ cây lá dứa (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) và ổn định các hợp chất chống oxy hóa trong sản phẩm khô. *Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ*. 58 (6), 117–125.
- [124] Ji, D., Wang, Q., Lu, T., Ma, H., and Chen, X. (2022) The effects of ultrasonication on the phytochemicals, antioxidant, and polyphenol oxidase and peroxidase activities in coffee leaves. *Food Chemistry*. 373 (B), 131480.
- [125] Krakowska-Sieprawska, A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., and Buszewski, B. (2022) Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*. 27 (3), 730.
- [126] Bộ Khoa học và Công nghệ (2023) Tiêu chuẩn Quốc gia TCVN ISO/TS 22002-5:2023: Chương trình tiên quyết về an toàn thực phẩm - Phần 5: Vận chuyển và bảo quản.

- [127] Kim, K., Park, J., Sohn, Y., Oh, C.-E., Park, J.-H., Yuk, J.-M., et al. (2022) Stability of plant leaf-derived extracellular vesicles according to preservative and storage temperature. *Pharmaceutics*. 14 (2), 457.
- [128] Yao, G., Zhang, H., Luo, G., Wang, Z., Zhao, H., Zhang, J., et al. (2021) Effect of *Senecio scandens* ethanol extract on gut microbiota composition in mice. *Archives of Microbiology*. 203 (4), 1477–1488.
- [129] Rajalakshmi, K. and Banu, N. (2015) Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *International Journal of Science and Research*. 4 (11), 209–212.
- [130] Sen, S., De, B., Devanna, N., and Chakraborty, R. (2013) Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 11 (2), 149–157.
- [131] McCleary, B.V. (2023) Measurement of dietary fiber: Which AOAC official method of analysis to use. *Journal of AOAC International*. 106 (4), 917–930.
- [132] Tram, N.N., Hien, P.P., and Oanh, H.N. (2015) Change of polyphenol oxidase activity during oolong tea process. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. 3 (1), 88–93.
- [133] Sobuj, M.K.A., Islam, M.A., Islam, M.S., Islam, M.M., Mahmud, Y., and Rafiquzzaman, S.M. (2021) Effect of solvents on bioactive compounds and antioxidant activity of *Padina tetrastrum* and *Gracilaria tenuistipitata* seaweeds collected from Bangladesh. *Scientific Reports*. 11 (1), 19082.
- [134] Salleh, W.M.N.H.W. and Khamis, S. (2021) Composition of essential oil from *Actinodaphne sesquipedalis* and its lipoxygenase activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 57 (3), 553–555.
- [135] Zielinski, A.A.F., Granato, D., Alberti, A., Nogueira, A., Demiate, I.M., and Haminiuk, C.W.I. (2015) Modelling the extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). *Journal of Food Science and Technology*. 52 (11), 6966–6977.
- [136] Syeda, A.M. and Riazunnisa, K. (2020) Data on GC-MS analysis, *in-vitro* anti-oxidant and anti-microbial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. *Data in Brief*. 29 105258.
- [137] Berkow, E.L., Lockhart, S.R., and Ostrosky-Zeichner, L. (2020) Antifungal susceptibility testing: current approaches. *Clinical Microbiology Reviews*. 33 (3), e00069-19.
- [138] Pradini, G.W., Fauziah, N., Asarina, S., Anggareni, N., Widyastuti, R., and Syamsunarno, M.R.A. (2024) Prebiotic effect of cogon grass root extract on stimulating lactic acid bacteria growth in mice intestine. *Journal of Medicine and Health*. 6 (1), 34–44.

- [139] Berendika, M., Domjanić Drozdek, S., Odeh, D., Oršolić, N., Dragičević, P., Sokolović, M., et al. (2022) Beneficial effects of laurel (*Laurus nobilis* L.) and myrtle (*Myrtus communis* L.) extract on rat health. *Molecules*. 27 (2), 581.
- [140] Lodovico, S.D., Dotta, T.C., Cellini, L., Iezzi, G., D'Ercole, S., and Petrini, M. (2023) The antibacterial and antifungal capacity of eight commercially available types of mouthwash against oral microorganisms: an in vitro study. *Antibiotics*. 12 (4), 675.
- [141] Sun, Y., Zhang, M., Shi, D., Dai, X., and Li, X. (2024) Effects of designed herbal formula on growth performance, blood indices, organ traits, and cecum microbiology in broilers. *Veterinary Sciences*. 11 (3), 107.
- [142] Fan, S., Raychaudhuri, S., Page, R., Shahinozzaman, M., and Obanda, D.N. (2021) Metagenomic insights into the effects of *Urtica dioica* vegetable on the gut microbiota of C57BL/6J obese mice, particularly the composition of *Clostridia*. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 91 108594.
- [143] Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., et al. (2017) Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*. 23 (7), 859–868.
- [144] Abulfaraj, A.A., Shami, A.Y., Alotaibi, N.M., Alomran, M.M., Aloufi, A.S., Al-Andal, A., et al. (2024) Exploration of genes encoding KEGG pathway enzymes in rhizospheric microbiome of the wild plant *Abutilon fruticosum*. *AMB Express*. 14 (1), 27.
- [145] Thi, N.D. and Hwang, E.-S. (2014) Bioactive compound contents and antioxidant activity in aronia (*Aronia melanocarpa*) leaves collected at different growth stages. *Preventive Nutrition and Food Science*. 19 (3), 204–212.
- [146] Santanoo, S., Lontom, W., Dongsansuk, A., Vongcharoen, K., and Theerakulpisut, P. (2023) Photosynthesis performance at different growth stages, growth, and yield of rice in saline fields. *Plants*. 12 (9), 1903.
- [147] Yu, X., Yang, T., Qi, Q., Du, Y., Shi, J., Liu, X., et al. (2021) Comparison of the contents of phenolic compounds including flavonoids and antioxidant activity of rice (*Oryza sativa*) and Chinese wild rice (*Zizania latifolia*). *Food Chemistry*. 344 128600.
- [148] Dong, C., Fu, Y., Liu, G., and Liu, H. (2014) Low light intensity effects on the growth, photosynthetic characteristics, antioxidant capacity, yield and quality of wheat (*Triticum aestivum* L.) at different growth stages in BLSS. *Advances in Space Research*. 53 (11), 1557–1566.
- [149] Muhidin, Syam'un, E., Kaimuddin, Musa, Y., Sadimantara, G.R., Usman, et al. (2018b) Shading effect on generative characters of upland red rice of Southeast Sulawesi, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 157 (1), 012017.

- [150] Song, S., He, A., Zhao, T., Yin, Q., Mu, Y., Wang, Y., et al. (2022) Effects of shading at different growth stages with various shading intensities on the grain yield and anthocyanin content of colored rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crops Research*. 283 108555.
- [151] Dou, H., Niu, G., Gu, M., and Masabni, J.G. (2017) Effects of light quality on growth and phytonutrient accumulation of herbs under controlled environments. *Horticulturae*. 3 (2), 36.
- [152] Zhang, D., Duan, X., Wang, Y., Shang, B., Liu, H., Sun, H., et al. (2021) A comparative investigation on physicochemical properties, chemical composition, and in vitro antioxidant activities of rice bran oils from different japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15 (2), 2064–2077.
- [153] Dorp, K., Hölzl, G., Plohm, C., Eisenhut, M., Abraham, M., Weber, A.P.M., et al. (2015) Remobilization of phytol from chlorophyll degradation is essential for tocopherol synthesis and growth of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 27 (10), 2846–2859.
- [154] Wang, G., Zeng, F., Song, P., Sun, B., Wang, Q., and Wang, J. (2022) Effects of reduced chlorophyll content on photosystem functions and photosynthetic electron transport rate in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*. 272 153669.
- [155] Liu, C., Liu, Y., Lu, Y., Liao, Y., Nie, J., Yuan, X., et al. (2019) Use of a leaf chlorophyll content index to improve the prediction of above-ground biomass and productivity. *PeerJ*. 6 e6240.
- [156] Bhat, M.A., Lone, H.A., and Mehraj, S.S. (2019) Chapter 14 - Nutrient remobilization during senescence. in: M. Sarwat, N. Tuteja (Eds.), *Senescence Signalling and Control in Plants*, Academic Press, pp. 227–237.
- [157] Hu, X., Gu, T., Khan, I., Zada, A., and Jia, T. (2021) Research progress in the interconversion, turnover and degradation of chlorophyll. *Cells*. 10 (11), 3134.
- [158] Durrett, T.P. and Welti, R. (2021) The tail of chlorophyll: Fates for phytol. *Journal of Biological Chemistry*. 296 100802.
- [159] Rontani, J.F., Nassiry, M., and Mouzdahir, A. (2007) Free radical oxidation (autooxidation) of α -tocopherol (vitamin E): A potential source of 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide in the environment. *Organic Geochemistry*. 38 (1), 37–47.
- [160] Xiao, R., Zou, Y., Guo, X., Li, H., and Lu, H. (2022) Fatty acid desaturases (FADs) modulate multiple lipid metabolism pathways to improve plant resistance. *Molecular Biology Reports*. 49 (10), 9997–10011.
- [161] Yu, L., Zhou, C., Fan, J., Shanklin, J., and Xu, C. (2021) Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. 107 (1), 37–53.

- [162] Wang, R., Ma, J., Huang, R., Wang, Y., Jiang, Y., Ling, Y., et al. (2024) The effects of shading on the photosynthetic performance of endangered plant *Horsfieldia hainanensis* seedlings. *Forests*. 15 (1), 3.
- [163] Fan, J., Yu, L., and Xu, C. (2017) A central role for triacylglycerol in membrane lipid breakdown, fatty acid β -oxidation, and plant survival under extended darkness. *Plant Physiology*. 174 (3), 1517–1530.
- [164] Xu, B., You, S., Zhou, L., Kang, H., Luo, D., Ma, H., et al. (2020) Simultaneous determination of free phytosterols and tocopherols in vegetable oils by an improved SPE–GC–FID method. *Food Analytical Methods*. 13 (2), 358–369.
- [165] Rogowska, A. and Szakiel, A. (2021) Enhancement of phytosterol and triterpenoid production in plant hairy root cultures-simultaneous stimulation or competition? *Plants*. 10 (10), 2028.
- [166] Manghwar, H., Hussain, A., Ali, Q., and Liu, F. (2022) Brassinosteroids (Brs) role in plant development and coping with different stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 (3), 1012.
- [167] Liu, J., Huang, Y., Liu, S., Cheng, L., Xu, D., Ling, Y., et al. (2024) Combining transcriptome and untargeted metabolome analysis to reveal the potential mechanism of 24-epibrassinolide alleviating low light stress in tomato. *Current Plant Biology*. 38 100327.
- [168] Chen, J., Wu, S., Mao, K., Li, J., Dong, F., Tang, J., et al. (2023) Adverse effects of shading on the tea yield and the restorative effects of exogenously applied brassinolide. *Industrial Crops and Products*. 197 116546.
- [169] Ma, L. and Li, G. (2019) Auxin-dependent cell elongation during the shade avoidance response. *Frontiers in Plant Science*. 10 914.
- [170] Iglesias, M.J., Sellaro, R., Zurbriggen, M.D., and Casal, J.J. (2018) Multiple links between shade avoidance and auxin networks. *Journal of Experimental Botany*. 69 (2), 213–228.
- [171] Wang, C., Zhang, B., Song, L., Li, P., Hao, Y., and Zhang, J. (2020) Assessment of different blanching strategies on quality characteristics and bioactive constituents of *Toona sinensis*. *LWT*. 130 109549.
- [172] Tang, M., Sun, H., Zhang, Z., Zhao, J., Cao, J., Thakur, K., et al. (2019) Evaluation of hot water and microwave blanching on qualities and sensory characteristics of water dropwort (*Oenanthe javanica*). *Journal of Food Processing and Preservation*. 43 (10), e14104.
- [173] Li, R., Shang, H., Wu, H., Wang, M., Duan, M., and Yang, J. (2018) Thermal inactivation kinetics and effects of drying methods on the phenolic profile and antioxidant activities of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. *Scientific Reports*. 8 (1), 9529.

- [174] Kalse, S.B. and Khobragade, C.B. (2021) Chapter 4: Blanching treatments in food processing. in: Food Processing, Dash Kshirod Kumar&Chakraborty Sourav, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Ratonp. 14.
- [175] Oliveira, P.P., Schmidt, V.C.R., de Santana, R.C., and Zotarelli, M.F. (2024) Production and characterization of mint (*Mentha spicata* L.) by spray drying. *Journal of Food Process Engineering*. 47 (1), e14508.
- [176] Plaskova, A. and Mlcek, J. (2023) New insights of the application of water or ethanol-water plant extract rich in active compounds in food. *Frontiers in Nutrition*. 10 1118761.
- [177] Abd El-Salam, E.A. and Morsy, N.F.S. (2019) Optimization of the extraction of polyphenols and antioxidant activity from *Malva parviflora* L. leaves using Box-Behnken design. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 49 (9), 876–883.
- [178] El Mannoubi, I. (2021) Effect of extraction solvent on phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of skin and pulp of Tunisian red and yellow–orange *Opuntia ficus Indica* fruits. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15 (1), 643–651.
- [179] Gallo, L. and Bucalá, V. (2019) A review on influence of spray drying process parameters on the production of medicinal plant powders. *Current Drug Discovery Technologies*. 16 (4), 340–354.
- [180] Nouri, E., Abbasi, H., and Rahimi, E. (2018) Effects of processing on stability of water- and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycocyanin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis*. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*. 10 (4), 335–349.
- [181] Nguyen, Q.V., Nguyen, M.T., Bui, B.H., Doan, M.D., Nguyen, A.D., Le, T., et al. (2022) Impact of different drying temperatures on in vitro antioxidant and antidiabetic activities and phenolic compounds of wild guava leaves collected in the central highland of Vietnam. *Natural Product Communications*. 17 (4), 1934578X221095349.
- [182] Tran, T.A.T. and Nguyen, V.H.H. (2018) Effects of spray-drying temperatures and carriers on physical and antioxidant properties of lemongrass leaf extract powder. *Beverages*. 4 (4), 84.
- [183] Dong, T.A.D., Hoang, V.T., Do, V.H., and Nguyen, D.V. (2021) Optimization of spray-drying process to manufacture green tea powder and its characters. *Food Science & Nutrition*. 9 (12), 6566–6574.
- [184] Rahmati, E., Sharifian, F., and Fattahi, M. (2020) Process optimization of spray-dried Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract powder. *Food Science & Nutrition*. 8 (12), 6580–6591.

- [185] Papalia, T., Sidari, R., and Panuccio, M.R. (2019) Impact of different storage methods on bioactive compounds in *Arthrospira platensis* biomass. *Molecules*. 24 (15), 2810.
- [186] Nguyen, Q.V., Doan, M.D., Bui, T.B.H., Nguyen, M.T., Tran, D.M., Nguyen, A.D., et al. (2023) The effect of drying methods on chlorophyll, polyphenol, flavonoids, phenolic compounds contents, color and sensory properties, and in vitro antioxidant and anti-diabetic activities of dried wild guava leaves. *Drying Technology*. 41 (8), 1291–1302.
- [187] Dong, R., Yu, Q., Liao, W., Liu, S., He, Z., Hu, X., et al. (2021) Composition of bound polyphenols from carrot dietary fiber and its *in vivo* and *in vitro* antioxidant activity. *Food Chemistry*. 339 127879.
- [188] Navarro-Flores, M.J., Ventura-Canseco, L.M.C., Meza-Gordillo, R., Ayora-Talavera, T. del R., and Abud-Archila, M. (2020) Spray drying encapsulation of a native plant extract rich in phenolic compounds with combinations of maltodextrin and non-conventional wall materials. *Journal of Food Science and Technology*. 57 (11), 4111–4122.
- [189] Duan, X., Yang, X., Ren, G., Pang, Y., Liu, L., and Liu, Y. (2016) Technical aspects in freeze-drying of foods. *Drying Technology*. 34 (11), 1271–1285.
- [190] Östbring, K., Sjöholm, I., Rayner, M., and Erlanson-Albertsson, C. (2020) Effects of storage conditions on degradation of chlorophyll and emulsifying capacity of thylakoid powders produced by different drying methods. *Foods*. 9 (5), 669.
- [191] Cheng, A.W., Xie, H.-X., Qi, Y., Liu, C., Guo, X., Sun, J.Y., et al. (2017) Effects of storage time and temperature on polyphenolic content and qualitative characteristics of freeze-dried and spray-dried bayberry powder. *LWT-Food Science and Technology*. 78 235–240.
- [192] Sathya, R., Rasane, P., Singh, J., Kaur, S., Bakshi, M., Gunjal, M., et al. (2024) Strategic advances in the management of browning in fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*. 17 (2), 325–350.
- [193] Kim, J.M., Kang, J.Y., Park, S.K., Han, H.J., Lee, K.Y., Kim, A.N., et al. (2020) Effect of storage temperature on the antioxidant activity and catechins stability of Matcha (*Camellia sinensis*). *Food Science and Biotechnology*. 29 (9), 1261–1271.
- [194] Ganeshpurkar, A. and Saluja, A. (2020) The pharmacological potential of catechin. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 57 (5), 505–511.
- [195] Baranwal, A., Aggarwal, P., Rai, A., and Kumar, N. (2022) Pharmacological actions and underlying mechanisms of catechin: A review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 22 (5), 821–833.

- [196] Shikha, D., Singh, A., Rangra, N.K., Monga, V., and Bhatia, R. (2024) Insights to therapeutic potentials, pharmaceutical formulations, chemistry and analytical methods of catechin. *Phytochemistry Reviews*. 23 (5), 1557–1598.
- [197] Mita, S.R., Husni, P., Putriana, N.A., Maharani, R., Hendrawan, R.P., and Dewi, D.A. (2024) A recent update on the potential use of catechins in cosmeceuticals. *Cosmetics*. 11 (1), 23.
- [198] Jabeen, N.M., Yadav, P., Naika, M., and Devanna, N. (2020) Nutritional and antioxidant potential of lyophilized wheat grass juice and shoot powders. *The Journal of Research Angraui*. 48 (2), 7–22.
- [199] Ferreira, R.M., Queffelec, J., Flórez-Fernández, N., Saraiva, J.A., Torres, M.D., Cardoso, S.M., et al. (2023) Production of betalain-rich *Opuntia ficus Indica* peel flour microparticles using spray-dryer: A holist approach. *LWT-Food Science and Technology*. 186 115241.
- [200] Thaiudom, S., Oonsivilai, R., and Thaiwong, N. (2021) Production of colorant powder from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel: Bioactivity, heavy metal contamination, antimutagenicity, and antioxidation aspects. *Journal of Food Processing and Preservation*. 45 (1), e15044.
- [201] Panthi, M., Subba, R.K., Raut, B., Khanal, D.P., and Koirala, N. (2020) Bioactivity evaluations of leaf extract fractions from young barley grass and correlation with their phytochemical profiles. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 20 (1), 64.
- [202] Panda, S.K., Mohanta, Y.K., Padhi, L., and Luyten, W. (2019) Antimicrobial activity of select edible plants from Odisha, India against food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*. 113 108246.
- [203] Alkufeidy, R.M., Ameer Altuwijri, L., Aldosari, N.S., Alsakabi, N., and Dawoud, T.M. (2024) Antimicrobial and synergistic properties of green tea catechins against microbial pathogens. *Journal of King Saud University - Science*. 36 (8), 103277.
- [204] Chauhan, A. (2014) Determination of antioxidant capacity, total phenolics and antimicrobial properties of spray-dried guava extract for value-added processing. *Journal of Food Processing & Technology*. 5 (9), 368.
- [205] Vamanu, E., Vamanu, A., Nita, S., and Colceriu, S. (2011) Antioxidant and antimicrobial activities of ethanol extracts of *Cynara scolymus* (*Cynarae folium*, *Asteraceae* Family). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10 (6), 777–783.
- [206] Silva, M.C., Souza, V.B.D., Thomazini, M., Da Silva, E.R., Smaniotto, T., Carvalho, R.A.D., et al. (2014) Use of the jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) depulping residue to produce a natural pigment powder with functional properties. *LWT - Food Science and Technology*. 55 (1), 203–209.

- [207] Fujita, A., Sarkar, D., Wu, S., Kennelly, E., Shetty, K., and Genovese, M.I. (2015) Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. *Food Research International*. 77 194–203.
- [208] Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Cortez, D.A.G., Nakamura, C.V., and Dias Filho, B.P. (2002) Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 97 (7), 1027–1031.
- [209] Silva-Santana, G., Bax, J.C., Fernandes, D.C.S., Bacellar, D.T.L., Hooper, C., Dias, A.A.S.O., et al. (2020) Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1 *Mus musculus*. *Animal Models and Experimental Medicine*. 3 (4), 304–315.
- [210] Niama, W., Ben Said, S., Rame, C., Aroua, M., Mahouachi, M., Froment, P., et al. (2024) Evaluation of acute toxicity of *Scabiosa arthropurpurea* var. Maritima aqueous extracts in Swiss mice. *Toxicon*. 239 107614.
- [211] Molino, S., Lerma-Aguilera, A., Jiménez-Hernández, N., Rufián Henares, J.Á., and Francino, M.P. (2022) Evaluation of the effects of a short supplementation with tannins on the gut microbiota of healthy subjects. *Frontiers in Microbiology*. 13 848611.
- [212] Yin, D., Du, E., Yuan, J., Gao, J., Wang, Y., Aggrey, S.E., et al. (2017) Supplemental thymol and carvacrol increases ileum *Lactobacillus* population and reduces effect of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringes* in chickens. *Scientific Reports*. 7 (1), 7334.
- [213] Ottosson, F., Brunkwall, L., Ericson, U., Nilsson, P.M., Almgren, P., Fernandez, C., et al. (2018) Connection between BMI-related plasma metabolite profile and gut microbiota. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 103 (4), 1491–1501.
- [214] Kobayashi, S., Morino, K., Okamoto, T., Tanaka, M., Ida, S., Ohashi, N., et al. (2024) Acetate derived from the intestinal tract has a critical role in maintaining skeletal muscle mass and strength in mice. *Physiological Reports*. 12 (11), e16047.
- [215] Filannino, P., Di Cagno, R., and Gobbetti, M. (2018) Metabolic and functional paths of lactic acid bacteria in plant foods: Get out of the labyrinth. *Current Opinion in Biotechnology*. 49 64–72.
- [216] Sharma, N., Tiwari, V., Vats, S., Kumari, A., Chunduri, V., Kaur, S., et al. (2020) Evaluation of anthocyanin content, antioxidant potential and antimicrobial activity of black, purple and blue colored wheat flour and wheat-grass juice against common human pathogens. *Molecules*. 25 (24), 5785.

- [217] Othman, M., Ariff, A.B., Rios-Solis, L., and Halim, M. (2017) Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. *Frontiers in Microbiology*. 8 2285.
- [218] Zouiouich, S., Loftfield, E., Huybrechts, I., Viallon, V., Louca, P., Vogtmann, E., et al. (2021) Markers of metabolic health and gut microbiome diversity: Findings from two population-based cohort studies. *Diabetologia*. 64 (8), 1749–1759.
- [219] Sutoyo, D.A., Atmaka, D.R., and G. B. Sidabutar, L.M. (2020) Dietary factors affecting *Firmicutes* and *Bacteroidetes* ratio in solving obesity problem: A literature review. *Media Gizi Indonesia*. 15 (2), 94–109.
- [220] Li, S., Zhang, C., Gu, Y., Chen, L., Ou, S., Wang, Y., et al. (2015) Lean rats gained more body weight than obese ones from a high-fibre diet. *British Journal of Nutrition*. 114 (8), 1188–1194.
- [221] Jaja-Chimedza, A., Zhang, L., Wolff, K., Graf, B.L., Kuhn, P., Moskal, K., et al. (2018) A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. *Journal of Functional Foods*. 47 376–385.
- [222] Cao, S.Y., Zhao, C.N., Xu, X.Y., Tang, G.Y., Corke, H., Gan, R.-Y., et al. (2019) Dietary plants, gut microbiota, and obesity: Effects and mechanisms. *Trends in Food Science & Technology*. 92 194–204.
- [223] Sarita, B., Samadhan, D., Hassan, M.Z., and Kovaleva, E.G. (2025) A comprehensive review of probiotics and human health-current prospective and applications. *Frontiers in Microbiology*. 15 1487641.
- [224] Fåk, F. and Bäckhed, F. (2012) *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. *PloS One*. 7 (10), e46837.
- [225] Lahiri, S., Kim, H., Garcia-Perez, I., Reza, M.M., Martin, K.A., Kundu, P., et al. (2019) The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Science Translational Medicine*. 11 (502), ean5662.
- [226] Stanley, D., Hughes, R.J., Geier, M.S., and Moore, R.J. (2016) Bacteria within the gastrointestinal tract microbiota correlated with improved growth and feed conversion: Challenges presented for the identification of performance enhancing probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 7 187.
- [227] Zhu, N., Wang, J., Yu, L., Zhang, Q., Chen, K., and Liu, B. (2019) Modulation of growth performance and intestinal microbiota in chickens fed plant extracts or virginiamycin. *Frontiers in Microbiology*. 10 1333.
- [228] Li, Y., Fu, X., Ma, X., Geng, S., Jiang, X., Huang, Q., et al. (2018a) Intestinal microbiome-metabolome responses to essential oils in piglets. *Frontiers in Microbiology*. 9 1988.

- [229] Knezevic, S., Ghafoor, A., Mehri, S., Barazi, A., Dziura, M., Trant, J.F., et al. (2021) Catechin and other catechol-containing secondary metabolites: Bacterial biotransformation and regulation of carbohydrate metabolism. *PharmaNutrition*. 17 100273.
- [230] Song, G., Wu, F., Peng, Y., Jiang, X., and Wang, Q. (2022) High-level production of catechol from glucose by engineered *Escherichia coli*. *Fermentation*. 8 (7), 344.
- [231] Akhtar, M., Chen, Y., Ma, Z., Zhang, X., Shi, D., Khan, J.A., et al. (2022) Gut microbiota-derived short chain fatty acids are potential mediators in gut inflammation. *Animal Nutrition*. 8 350–360.
- [232] Facchin, S., Bertin, L., Bonazzi, E., Lorenzon, G., De Barba, C., Barberio, B., et al. (2024) Short-chain fatty acids and human health: From metabolic pathways to current therapeutic implications. *Life*. 14 (5), 559.
- [233] Zhong, Y.-B., Kang, Z.-P., Wang, M.-X., Long, J., Wang, H.-Y., Huang, J.-Q., et al. (2021) Curcumin ameliorated dextran sulfate sodium-induced colitis via regulating the homeostasis of DCs and Treg and improving the composition of the gut microbiota. *Journal of Functional Foods*. 86 104716.
- [234] Caballero, S., Kim, S., Carter, R.A., Leiner, I.M., Sušac, B., Miller, L., et al. (2017) Cooperating commensals restore colonization resistance to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Cell Host & Microbe*. 21 (5), 592–602.
- [235] Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F.M., Portincasa, P., Gobetti, M., and De Angelis, M. (2020) The controversial role of human gut *Lachnospiraceae*. *Microorganisms*. 8 (4), 573.
- [236] Hong, Y., Sheng, L., Zhong, J., Tao, X., Zhu, W., Ma, J., et al. (2021) *Desulfovibrio vulgaris*, a potent acetic acid-producing bacterium, attenuates nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Gut Microbes*. 13 (1), 1–20.
- [237] Sheridan, P.O., Martin, J.C., Lawley, T.D., Browne, H.P., Harris, H.M.B., Bernalier-Donadille, A., et al. (2016) Polysaccharide utilization loci and nutritional specialization in a dominant group of butyrate-producing human colonic *Firmicutes*. *Microbial Genomics*. 2 (2), e000043.
- [238] Raimondi, S., Musmeci, E., Candeliere, F., Amaretti, A., and Rossi, M. (2021) Identification of mucin degraders of the human gut microbiota. *Scientific Reports*. 11 (1), 11094.
- [239] Kakade, A., Salama, E.S., Usman, M., Arif, M., Feng, P., and Li, X. (2022) Dietary application of *Lactococcus lactis* alleviates toxicity and regulates gut microbiota in *Cyprinus carpio* on exposure to heavy metals mixture. *Fish & Shellfish Immunology*. 120 190–201.
- [240] Zálán, Z., Hudáček, J., Tóth-Markus, M., Husová, E., Solichová, K., Hegyi, F., et al. (2011) Sensorically and antimicrobially active metabolite production

of *Lactobacillus* strains on *Jerusalem artichoke* juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91 (4), 672–679.

- [241] Singh, R.P., Shadan, A., and Ma, Y. (2022) Biotechnological applications of probiotics: A multifarious weapon to disease and metabolic abnormality. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 14 (6), 1184–1210.
- [242] Huang, F., Teng, K., Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Ma, C., et al. (2021) Bacteriocins: Potential for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 (1), 5518825.
- [243] Lippert, K., Kedenko, L., Antonielli, L., Kedenko, I., Gemeier, C., Leitner, M., et al. (2017) Gut microbiota dysbiosis associated with glucose metabolism disorders and the metabolic syndrome in older adults. *Beneficial Microbes*. 8 (4), 545–556.
- [244] Chávez-Carbajal, A., Nirmalkar, K., Pérez-Lizaur, A., Hernández-Quiroz, F., Ramírez-del-Alto, S., García-Mena, J., et al. (2019) Gut microbiota and predicted metabolic pathways in a sample of Mexican women affected by obesity and obesity plus metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (2), 438.

PHỤ LỤC 1. Kết quả phân tích thống kê

1. Kết quả phân tích thống kê nghiên cứu ảnh hưởng của giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa.

1.1. Kết quả phân tích thống kê nghiên cứu ảnh hưởng giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa

Bảng P1.1.1. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng tổng chlorophyll trong lá lúa

Analysis of Variance for CHLO - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DKCS	3.75385E6	2	1.87692E6	2375.15	0.0000
B:TGST	1.47764E6	5	295529.	373.98	0.0000
C:GIONG LUA	308513.	5	61702.5	78.08	0.0000
INTERACTIONS					
AB	273306.	10	27330.6	34.59	0.0000
AC	26853.1	10	2685.31	3.40	0.0004
BC	379476.	25	15179.1	19.21	0.0000
ABC	243094.	50	4861.88	6.15	0.0000
RESIDUAL	170691.	216	790.235		
TOTAL (CORRECTED)	6.63342E6	323			

Multiple Range Tests for CHLO by GIONG LUA

Method: 95.0 percent Duncan

GIONG LUA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
TNG	54	1177.56	3.82544	X
NTH	54	1205.44	3.82544	X
HRO	54	1217.79	3.82544	X
IR504	54	1247.6	3.82544	X
NTI	54	1249.61	3.82544	X
HLA	54	1269.29	3.82544	X

Multiple Range Tests for CHLO by TGST

Method: 95.0 percent Duncan

TGST	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	54	1108.58	3.82544	X
2	54	1178.52	3.82544	X
3	54	1229.4	3.82544	X
6	54	1253.25	3.82544	X
5	54	1298.76	3.82544	X
4	54	1298.77	3.82544	X

Multiple Range Tests for CHLO by DKCS

Method: 95.0 percent Duncan

DKCS	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	108	1075.66	2.70499	X
0	108	1303.08	2.70499	X
1	108	1304.9	2.70499	X

Bảng P1.1.2. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến tỷ lệ chlorophyll a/b trong lá lúa

Analysis of Variance for TY LE A:B - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DKCS	0.0227837	2	0.0113918	9.15	0.0002
B:TGST	0.272812	5	0.0545623	43.83	0.0000
C:GIONG LUA	0.184586	5	0.0369171	29.66	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.224529	10	0.0224529	18.04	0.0000
AC	0.153161	10	0.0153161	12.30	0.0000
BC	0.401374	25	0.0160549	12.90	0.0000
ABC	0.595654	50	0.0119131	9.57	0.0000
RESIDUAL	0.268895	216	0.00124488		

TOTAL (CORRECTED)	2.12379	323			
-------------------	---------	-----	--	--	--

Multiple Range Tests for TY LE A:B by GIONG LUA

Method: 95.0 percent Duncan

<i>GIONG LUA</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
NTI	54	0.546163	0.0048014	X
HLA	54	0.562044	0.0048014	X
IR504	54	0.575376	0.0048014	XX
NTH	54	0.58499	0.0048014	X
TNG	54	0.605921	0.0048014	X
HRO	54	0.615339	0.0048014	X

Multiple Range Tests for TY LE A:B by TGST

Method: 95.0 percent Duncan

<i>TGST</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1	54	0.533335	0.0048014	X
4	54	0.563687	0.0048014	X
5	54	0.569771	0.0048014	X
6	54	0.595808	0.0048014	X
2	54	0.611406	0.0048014	X
3	54	0.615826	0.0048014	X

Multiple Range Tests for TY LE A:B by DKCS

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DKCS</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1	108	0.573883	0.0033951	X
0	108	0.577747	0.0033951	X
2	108	0.593286	0.0033951	X

Bảng P1.1.3. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng tổng polyphenol trong lá lúa

Analysis of Variance for POLYPHENOL - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:DKCS	762.023	2	381.012	9755.12	0.0000
B:TGST	40.3755	5	8.07511	206.75	0.0000
C:GIONG LUA	15.7073	5	3.14145	80.43	0.0000
INTERACTIONS					
AB	34.5995	10	3.45995	88.59	0.0000
AC	9.41664	10	0.941664	24.11	0.0000
BC	23.6354	25	0.945417	24.21	0.0000
ABC	25.6289	50	0.512579	13.12	0.0000
RESIDUAL	8.43644	216	0.0390576		
TOTAL (CORRECTED)	919.823	323			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by DKCS

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DKCS</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
2	108	2.03639	0.019017	X
1	108	3.46363	0.019017	X
0	108	5.75931	0.019017	X

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by TGST

Method: 95.0 percent Duncan

<i>TGST</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
1	54	3.06643	0.026894	X
2	54	3.63158	0.026894	X
4	54	3.79227	0.026894	X
6	54	3.85302	0.026894	X
3	54	3.97368	0.026894	X
5	54	4.2017	0.026894	X

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by GIONG LUA

Method: 95.0 percent Duncan

<i>GIONG LUA</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
HRO	54	3.40745	0.026894	X
HLA	54	3.53873	0.026894	X
TNG	54	3.76946	0.026894	X
NTI	54	3.86098	0.026894	X

NTH	54	3.87468	0.026894	X
IR504	54	4.06736	0.026894	X

Bảng P1.1.4. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng xơ hòa tan trong lá lúa

Analysis of Variance for XO TAN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DKCS	176431.	2	88215.6	110.59	0.0000
B:TGST	8.99689E6	5	1.79938E6	2255.79	0.0000
C:GIONG LUA	263676.	5	52735.2	66.11	0.0000
INTERACTIONS					
AB	48519.3	10	4851.93	6.08	0.0000
AC	45965.3	10	4596.53	5.76	0.0000
BC	202771.	25	8110.84	10.17	0.0000
ABC	81245.5	50	1624.91	2.04	0.0003
RESIDUAL	172297.	216	797.671		
TOTAL (CORRECTED)	9.9878E6	323			

Multiple Range Tests for XO TAN by DKCS

Method: 95.0 percent Duncan

DKCS	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0	108	416.926	2.71769	X
1	108	440.362	2.71769	X
2	108	473.794	2.71769	X

Multiple Range Tests for XO TAN by TGST

Method: 95.0 percent Duncan

TGST	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	54	196.819	3.84339	X
2	54	261.86	3.84339	X
3	54	412.145	3.84339	X
4	54	576.67	3.84339	X
5	54	593.843	3.84339	X
6	54	620.825	3.84339	X

Multiple Range Tests for XO TAN by GIONG LUA

Method: 95.0 percent Duncan

GIONG LUA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
TNG	54	402.479	3.84339	X
HLA	54	427.465	3.84339	X
NTI	54	430.828	3.84339	XX
IR504	54	441.363	3.84339	X
NTH	54	472.544	3.84339	X
HRO	54	487.483	3.84339	X

Bảng P1.1.5. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hoạt tính DPPH trong lá lúa

Analysis of Variance for DPPH - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DKCS	190.55	2	95.2748	939.65	0.0000
B:TGST	123.827	5	24.7655	244.25	0.0000
C:GIONG LUA	17.0661	5	3.41322	33.66	0.0000
INTERACTIONS					
AB	2.24875	10	0.224875	2.22	0.0179
AC	18.9969	10	1.89969	18.74	0.0000
BC	14.3082	25	0.57233	5.64	0.0000
ABC	16.7267	50	0.334535	3.30	0.0000
RESIDUAL	21.9012	216	0.101394		
TOTAL (CORRECTED)	405.625	323			

Multiple Range Tests for DPPH by GIONG LUA

Method: 95.0 percent Duncan

GIONG LUA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
-----------	-------	---------	----------	--------------------

HLA	54	7.92182	0.0433321	X
NTI	54	8.06996	0.0433321	X
TNG	54	8.1857	0.0433321	X
NTH	54	8.3934	0.0433321	X
HRO	54	8.47717	0.0433321	XX
IR504	54	8.56924	0.0433321	X

Multiple Range Tests for DPPH by TGST

Method: 95.0 percent Duncan

TGST	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	54	7.23598	0.0433321	X
2	54	7.75571	0.0433321	X
3	54	8.21379	0.0433321	X
6	54	8.57448	0.0433321	X
4	54	8.81377	0.0433321	X
5	54	9.02356	0.0433321	X

Multiple Range Tests for DPPH by DKCS

Method: 95.0 percent Duncan

DKCS	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
2	108	7.33931	0.0306404	X
1	108	8.2518	0.0306404	X
0	108	9.21754	0.0306404	X

Bảng P1.1.6. Phân tích cụm (cluster analysis) và mối tương quan Spearman (Spearman rank correlation) ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng

Spearman Rank Correlations

	CHLO	DPPH	POLYPHENOL	TY LE A:B	XO TAN
CHLO		0.7196 (324)	0.6346 (324)	-0.1697 (324)	0.2998 (324)
		0.0000	0.0000	0.0023	0.0000
DPPH	0.7196 (324)		0.7524 (324)	-0.0340 (324)	0.4155 (324)
	0.0000		0.0000	0.5409	0.0000
POLYPHENOL	0.6346 (324)	0.7524 (324)		-0.0842 (324)	0.0049 (324)
	0.0000	0.0000		0.1301	0.9302
TY LE A:B	-0.1697 (324)	-0.0340 (324)	-0.0842 (324)		0.0828 (324)
	0.0023	0.5409	0.1301		0.1368
XO TAN	0.2998 (324)	0.4155 (324)	0.0049 (324)	0.0828 (324)	
	0.0000	0.0000	0.9302	0.1368	

Icicle Plot

Clustering Method: Group Average; Distance Metric: Squared Euclidean

Number of Clusters

Variable Column 12345

CHLO	1	XXX XXX
DPPH	2	XXXX XXXX
POLYPHENOL	3	XXXX XX
XO TAN	5	XX X
TY LE A:B	4	X

Agglomeration Schedule

	Combined	Combined		Previous Stage	Previous Stage	Next
Stage	Cluster 1	Cluster 2	Distance	Cluster 1	Cluster 2	Stage
1	2	3	162.325	0	0	2
2	1	2	218.98	0	1	3
3	1	5	468.882	2	0	4
4	1	4	657.86	3	0	0

1.2. Kết quả phân tích thống kê nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sinh trưởng đến sự tổng hợp các hợp chất trong trong lá lúa (sử dụng kết quả từ GC-MS)

Bảng P1.1.7. Bảng số liệu phân nhóm hợp chất từ kết quả chạy GC-MS của sáu giống lúa ở tuần 1

Số tt	Phân loại hoá học/Bản chất	IR504	HRO	TNG	HLA	NTH	NTI
1	Cyclic hydrocarbon	-	3.179	-	-	-	-
2	Diterpenoid	32.907	29.056	13.793	48.787	26.169	29.776
3	Fatty acid amide	1.448	-	-	1.06	-	-
4	Fatty acid ester	6.008	-	22.598	2.925	19.054	-
5	Fatty nitrile	-	-	-	-	-	0.761
6	Heterocyclic compound	-	-	-	-	-	1.093
7	Meroterpenoid	1.649	-	0.897	1.498	4.237	2.767
8	Monoterpenoid	2.652	2.634	1.91	1.906	1.178	0.881
9	Phenol	-	2.407	7.251	0.679	-	0.945
10	Phthalate ester	55.336	51.100	40.724	32.282	48.915	46.244
11	Steroid	-	6.354	12.828	10.863	-	17.533
12	Aliphatic hydrocarbon	-	2.205	-	-	0.447	-
13	Organosulfate	-	3.065	-	-	-	-

Bảng P1.1.8. Bảng số liệu phân nhóm hợp chất từ kết quả chạy GC-MS của sáu giống lúa ở tuần 3

Số tt	Phân loại hoá học/Bản chất	IR504	HRO	TNG	HLA	NTH	NTI
1	Cyclic hydrocarbon	0.728	-	-	-	-	-
2	Diterpenoid	6.629	2.246	8.971	21.533	22.473	25.680
3	Fatty acid amide	1.113	0.394	3.931	1.66	1.818	1.722
4	Fatty acid ester	15.569	0.162	2.965	-	0.550	-
5	Meroterpenoid	-	0.812	8.84	12.176	6.966	5.820
6	Monoterpenoid	0.693	-	31.741	0.585	0.488	-
7	Phenol	-	0.205	-	-	-	-
8	Phthalate ester	51.507	92.080	-	-	47.731	53.618
9	Sesquiterpenoid	3.072	-	-	-	-	-
10	Steroid	20.689	3.572	20.636	19.054	19.972	12.554
11	Triterpenoid	-	-	-	-	-	0.606
12	Aliphatic hydrocarbon	-	0.348	22.583	44.992	-	-
13	Organosulfate	-	0.181	0.335	-	-	-

Bảng P1.1.9. Bảng số liệu phân nhóm hợp chất từ kết quả chạy GC-MS của sáu giống lúa ở tuần 5

Số tt	Phân loại hoá học/Bản chất	IR504	HRO	TNG	HLA	NTH	NTI
1	Cyclic hydrocarbon	1.809	3.400	2.967	5.641	2.895	5.168
2	Diterpenoid	24.925	44.517	34.435	44.073	26.851	38.765
3	Fatty acid	2.375	-	-	-	-	-
4	Fatty acid amide	0.631	-	0.541	1.147	-	0.877
5	Fatty acid ester	7.234	2.194	3.426	1.525	6.772	2.927
6	Fatty alcohol	0.922	-	-	-	-	-
7	Fatty aldehyde	1.967	-	-	0.397	-	-
8	Fatty nitrile	1.143	2.164	1.509	2.523	1.515	1.644
9	Heterocyclic compound	1.498	-	0.923	0.494	-	0.932
10	Meroterpenoid	2.489	-	1.528	2.444	1.394	2.530
11	Monoterpenoid	-	-	0.595	0.411	-	-
12	Phenol	0.569	0.854	0.785	0.622	0.538	-
13	Phthalate ester	43.635	39.397	46.896	31.815	50.216	38.302
14	Steroid	5.491	4.100	4.62	3.332	3.285	5.321
15	Triterpenoid	5.309	-	0.665	0.38	-	-
16	Aliphatic Amine	-	0.878	-	0.669	-	-

17	Benzaldehyde	-	2.495	-	1.745	0.714	2.031
18	Alkyl alcohol	-	-	0.519	-	-	-
19	Carbonitrile	-	-	0.593	-	-	-
20	Aliphatic hydrocarbon	-	-	-	1.514	0.558	-
21	Carboxylic acid ester	-	-	-	0.852	-	-
22	Terpene ketone	-	-	-	0.418	-	-
23	Cyclic ether	-	-	-	-	5.263	1.502

Bảng P1.1.10. Kết quả phân tích tương ứng (CA) của sáu giống lúa ở ba thời gian sinh trưởng 1, 3 và 5 tuần

IR504	F1	F2	TNG	F1	F2
Eigenvalue	0.203	0.103	Eigenvalue	0.636	0.172
Inertia %	66.316	33.684	Inertia %	78.678	21.322
Cumulative %	66.316	100.000	Cumulative %	78.678	100.000
HLA	F1	F2	NTH	F1	F2
Eigenvalue	0.530	0.080	Eigenvalue	0.179	0.092
Inertia %	86.894	13.106	Inertia %	66.151	33.849
Cumulative %	86.894	100.000	Cumulative %	66.151	100.000
NTI	F1	F2	HRO	F1	F2
Eigenvalue	0.121	0.033	Eigenvalue	0.246	0.072
Inertia %	78.843	21.157	Inertia %	77.410	22.590
Cumulative %	78.843	100.000	Cumulative %	77.410	100.000

1.3. Kết quả phân tích thống kê nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện che sáng đến sự tổng hợp các hợp chất trong trong lá lúa (sử dụng kết quả từ GC-MS)

Bảng P1.1.12. Tổng hợp phân loại các nhóm chất trong lá lúa của sáu giống lúa trong điều kiện không che sáng của sáu giống lúa

Số tt	Phân loại hoá học/Bản chất	Điều kiện không che sáng					
		IR504	HRO	NTI	HLA	TNG	NTH
1	Aliphatic Hydrocarbon	-	-	-	1.514	-	0.558
2	Cyclic hydrocarbon	1.809	3.4	5.168	5.641	2.967	2.895
3	Diterpenoid	24.925	44.517	38.765	44.073	34.435	26.851
4	Fatty acid	2.375	-	-	-	-	-
5	Fatty acid amide	0.631	-	0.877	1.147	0.541	-
6	Fatty acid ester	7.234	2.194	2.927	1.525	3.426	6.772
7	Fatty alcohol	0.922	-	-	-	-	-
8	Fatty aldehyde	1.967	-	-	0.397	-	-
9	Fatty nitrile	1.143	2.164	1.644	2.523	1.509	1.515
10	Heterocyclic compound	1.498	-	0.932	0.494	0.923	-
11	Meroterpenoid	2.489	-	2.53	2.444	1.528	1.394
12	Phenol	0.569	0.854	-	0.622	0.785	0.538
13	Phthalate ester	43.635	39.397	38.302	31.815	46.896	50.216
14	Steroid	5.491	4.1	5.321	3.332	4.62	3.285
15	Terpene ketone	-	-	-	0.418	-	-
16	Triterpenoid	5.309	-	-	0.38	0.665	-
17	Aliphatic Amine	-	0.878	-	0.669	-	-
18	Benzaldehyde	-	2.495	2.031	1.745	-	0.714
19	Cyclic ether	-	-	1.502	-	-	5.263
20	Carboxylic acid ester	-	-	-	0.852	-	-
21	Monoterpenoid	-	-	-	0.411	0.595	-
22	Alkyl alcohol	-	-	-	-	0.519	-
23	Carbonitrile	-	-	-	-	0.593	-

Bảng P1.1.13. Tổng hợp phân loại các nhóm chất trong lá lúa của sáu giống lúa trong điều kiện che sáng 2 lớp lưới của sáu giống lúa

Số tt	Phân loại hoá học/Bản chất	Điều kiện che sáng hai lớp lưới					
		IR504	HRO	NTI	HLA	TNG	NTH
1	Aliphatic Hydrocarbon	39.867	13.521	19.166	-	29.137	-
2	Fatty acid	-	-	-	-	-	8.793
3	Fatty acid amide	3.181	2.941	-	-	3.514	-
4	Fatty acid ester	24.995	15.428	75.725	17.224	52.884	25.055
5	Fatty aldehyde	-	-	-	-	1.817	4.178
6	Morphinan alkaloid	2.485	-	-	-	-	-
7	Organosiloxane	15.311	2.93	-	-	-	-
8	Phthalate ester	2.179	-	-	-	-	-
9	Terpene ketone	2.38	-	-	-	1.946	-
10	Triterpenoid	9.602	7.77	5.109	35.779	6.628	18.018
11	Phthalate ester derivative	-	57.411	-	46.997	-	43.957
12	Benzaldehyde	-	-	-	-	4.074	-

Bảng P1.1.14. Kết quả thống kê PCA của 6 giống lúa theo điều kiện che sáng

IR504	F1	F2	NTH	F1	F2
Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.110	0.890	Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.200	0.800
Phần trăm biến thiên (%)	55.508	44.492	Phần trăm biến thiên (%)	59.993	40.007
Phần trăm tích lũy (%)	55.508	100.000	Phần trăm tích lũy (%)	59.993	100.000
Hệ số tải nhân tố			Hệ số tải nhân tố		
Không che bóng	0.745	0.667	Không che bóng	0.775	0.633
Che bóng	-0.745	0.667	Che bóng	-0.775	0.633
Điểm nhân tố			Điểm nhân tố		
Aliphatic Hydrocarbon	-2.658	1.932	Aliphatic hydrocarbon	0.056	-0.703
Cyclic hydrocarbon	0.127	-0.617	Benzaldehyde	0.064	-0.695
Diterpenoid	1.638	0.895	Cyclic ether	0.305	-0.454
Fatty acid	0.164	-0.580	Cyclic hydrocarbon	0.180	-0.579
Fatty acid amide	-0.163	-0.481	Diterpenoid	1.449	0.689
Fatty acid ester	-1.190	1.410	Fatty Acid	-0.474	-0.232
Fatty alcohol	0.069	-0.675	Fatty acid ester	-1.042	1.053
Fatty aldehyde	0.137	-0.606	Fatty aldehyde	-0.211	-0.495
Fatty nitrile	0.083	-0.660	Fatty nitrile	0.107	-0.652
Heterocyclic compound	0.106	-0.637	Meroterpenoid	0.100	-0.659
Meroterpenoid	0.171	-0.572	Phenol	0.055	-0.704
Morphinan alkaloid	-0.158	-0.569	Phthalate ester	2.686	1.927
Organosiloxane	-1.016	0.289	Phthalate ester derivative	-2.477	1.770
Phenol	0.045	-0.698	Steroid	0.201	-0.559
Phthalate ester	2.716	2.264	Triterpenoid	-0.999	0.293
Steroid	0.367	-0.376			
Terpene ketone	-0.151	-0.576			
Triterpenoid	-0.287	0.255			

TNG	F1	F2
Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.122	0.878
Phần trăm biến thiên (%)	56.092	43.908
Phần trăm tích lũy (%)	56.092	100.000
Hệ số tải nhân tố		
Không che bóng	0.749	0.663
Che bóng	-0.749	0.663
Điểm nhân tố		
Aliphatic hydrocarbon	-1.567	0.946
Alkyl alcohol	0.014	-0.578
Benzaldehyde	-0.232	-0.390
Carbonitrile	0.019	-0.573
Cyclic hydrocarbon	0.151	-0.441
Diterpenoid	1.911	1.319
Fatty acid amide	-0.172	-0.389
Fatty acid ester	-2.641	2.403
Fatty aldehyde	-0.111	-0.510
Fatty nitrile	0.070	-0.522
Heterocyclic compound	0.037	-0.555
Meroterpenoid	0.071	-0.521
Monoterpenoid	0.019	-0.573
Phenol	0.029	-0.563
Phthalate ester	2.607	2.015
Steroid	0.244	-0.348
Terpene ketone	-0.118	-0.503
Triterpenoid	-0.331	-0.216

NTI	F1	F2
Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.157	0.843
Phần trăm biến thiên (%)	57.831	42.169
Phần trăm tích lũy (%)	57.831	100.000
Hệ số tải nhân tố		
Không che bóng	0.760	0.649
Che bóng	-0.760	0.649
Điểm nhân tố		
Aliphatic hydrocarbon	-0.810	-0.011
Benzaldehyde	-0.034	-0.570
Cyclic ether	-0.063	-0.598
Cyclic hydrocarbon	0.133	-0.403
Diterpenoid	1.927	1.391
Fatty acid amide	-0.096	-0.632
Fatty acid ester	-2.624	2.115
Fatty nitrile	-0.055	-0.591
Heterocyclic compound	-0.093	-0.629
Meroterpenoid	-0.008	-0.543

HRO	F1	F2
Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.229	0.771
Phần trăm biến thiên (%)	61.452	38.548
Phần trăm tích lũy (%)	61.452	100.000
Hệ số tải nhân tố		
Không che bóng	0.784	0.621
Che bóng	-0.784	0.621
Điểm nhân tố		
Aliphatic Amine	0.031	-0.650
Aliphatic hydrocarbon	-0.657	-0.049
Benzaldehyde	0.111	-0.570
Cyclic hydrocarbon	0.156	-0.526
Diterpenoid	2.188	1.507
Fatty acid ester	-0.640	0.150
Fatty nitrile	0.094	-0.587
Fatty acid amide	-0.153	-0.553
Organosiloxane	-0.152	-0.554
Phenol	0.030	-0.651
Phthalate ester	1.935	1.254
Phthalate ester derivative	-2.749	2.043
Steroid	0.190	-0.491
Triterpenoid	-0.383	-0.323

HLA	F1	F2
Giá trị riêng (Eigenvalue)	1.171	0.829
Phần trăm biến thiên (%)	58.53 0	41.470
Phần trăm tích lũy (%)	58.53 0	100.00 0
Hệ số tải nhân tố		
Không che bóng	0.765	0.644
Che bóng	-0.765	0.644
Điểm nhân tố		
Aliphatic Amine	0.001	-0.568
Aliphatic hydrocarbon	0.053	-0.516
Benzaldehyde	0.067	-0.501
Carboxylic acid ester	0.012	-0.556
Cyclic hydrocarbon	0.307	-0.261
Diterpenoid	2.679	2.111
Fatty acid amide	0.030	-0.538
Fatty acid ester	-0.876	0.415
Fatty aldehyde	-0.016	-0.584
Fatty nitrile	0.115	-0.453
Heterocyclic compound	-0.010	-0.578
Meroterpenoid	0.110	-0.458

Phthalate ester	1.902	1.366
Steroid	0.141	-0.394
Triterpenoid	-0.321	-0.501

Monoterpenoid	-0.015	-0.584
Phenol	-0.002	-0.571
Phthalate ester	1.923	1.354
Phthalate ester derivative	-2.578	1.928
Steroid	0.165	-0.403
Terpene ketone	-0.015	-0.583
Triterpenoid	-1.949	1.346

Bảng P1.1.15. Kết quả thống kê CA của 06 giống lúa theo điều kiện che sáng

Chi-square (Observed value)	2164.515
Chi-square (Critical value)	314.678
DF	275
p-value	<0.0001
alpha	0.05

Eigenvalues and percentages of inertia		
	F1	F2
Eigenvalue	0.871	0.479
Inertia %	48.300	26.567
Cumulative %	48.300	74.868

Bảng P1.1.16. Kết quả phân tích cụm (AHC) của 06 giống lúa theo điều kiện che sáng

Dissimilarity: Euclidean distance
 Agglomeration method: Ward's method
 Center: Yes / Reduce: Yes

Agglomerative hierarchical clustering (AHC) / Number of clusters = 2:
 Inertia decomposition for the optimal classification:

	Absolute	Percent
Within-cluster	9590.567	38.75%
Between-clusters	15160.351	61.25%
Total inertia	24750.918	100.00%

Results by cluster:

Cluster	1	2
Number of objects by cluster	6	6
Sum of weights	6	6
Within-cluster variance	137.541	1780.572
Minimum distance to centroid	5.465	29.238
Average distance to centroid	10.142	38.068
Maximum distance to centroid	13.675	48.469
	IR504-KC	IR504-C
	HRO-KC	HRO-C
	NTI-KC	NTI-C
	HLA-KC	HLA-C
	TNG-KC	TNG-C
	NTH-KC	NTH-C

Results by object:

Observation	Cluster	Distance to centroid
IR504-KC	1	12.735
IR504-C	2	37.762
HRO-KC	1	9.870
HRO-C	2	38.916
NTI-KC	1	5.465
NTI-C	2	48.469
HLA-KC	1	13.675
HLA-C	2	40.069
TNG-KC	1	5.769
TNG-C	2	33.953
NTH-KC	1	13.339
NTH-C	2	29.238

2. Kết quả phân tích thống kê ảnh hưởng của các điều kiện chế biến BLL (phương pháp bất hoạt enzyme, dung môi ly trích, sấy phun và thời gian bảo quản)

Bảng P1.2.1. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của các điều kiện xử lý enzyme lên tổn thất chlorophyll trong trong lá lúa

ANOVA Table for CHLOROPHYLL by DK XU LY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1363.78	14	97.4128	313.39	0.0000
Within groups	9.32492	30	0.310831		
Total (Corr.)	1373.1	44			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by DK XU LY

Method: 95.0 percent Duncan

DK XU LY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Chan 1p	3	5.84076	X
Chan 2p	3	5.91641	X
Chan 3p	3	6.02176	X
Chan 4p	3	6.44324	X
Vi song 1p	3	7.42152	X
Vi song 2p	3	9.81306	X
Chan 5p	3	10.8321	X
Vi song 3p	3	12.1091	X
Sieu am 5p	3	14.987	X
Sieu am 10p	3	16.9172	X
Vi song 4p	3	18.7282	X
Sieu am 15p	3	18.8038	X
Vi song 5p	3	18.8815	X
Sieu am 20p	3	19.4028	XX
Sieu am 25p	3	20.3322	X

Bảng P1.2.2. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của các điều kiện xử lý enzyme lên tổn thất polyphenol trong lá lúa

ANOVA Table for POLYPHENOL by DK XU LY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	800.242	14	57.1601	366.67	0.0000
Within groups	4.67664	30	0.155888		
Total (Corr.)	804.918	44			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by DK XU LY

Method: 95.0 percent Duncan

DK XU LY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Sieu am 5p	3	2.2	X
Sieu am 10p	3	3.15676	X
Vi song 1p	3	3.19113	X
Vi song 2p	3	3.35104	X
Chan 1p	3	3.48229	XX
Chan 2p	3	3.75305	XX
Vi song 3p	3	4.14972	X
Chan 3p	3	5.20563	X
Sieu am 15p	3	5.55124	X
Vi song 4p	3	6.39351	X
Vi song 5p	3	7.55655	X
Chan 4p	3	7.87569	X
Sieu am 20p	3	8.79608	X
Chan 5p	3	14.8366	X
Sieu am 25p	3	17.1639	X

Bảng P1.2.3. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của các điều kiện xử lý enzyme lên tỷ lệ ức chế enzyme polyphenol oxidase trong trong lá lúa

ANOVA Table for PPO by DK XU LY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	20615.9	14	1472.57	580.31	0.0000
Within groups	76.1266	30	2.53755		

Total (Corr.)	20692.1	44			
---------------	---------	----	--	--	--

Multiple Range Tests for PPO by DK XU LY

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DK XU LY</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Vi song 1p	3	16.5722	X
Sieu am 5p	3	22.1259	X
Sieu am 15p	3	26.0516	X
Sieu am 10p	3	26.6081	X
Vi song 2p	3	29.7457	X
Sieu am 25p	3	33.4527	X
Vi song 3p	3	34.8478	X
Sieu am 20p	3	34.9697	X
Chan 1p	3	39.2019	X
Vi song 4p	3	39.9781	X
Vi song 5p	3	43.3081	X
Chan 2p	3	57.1171	X
Chan 3p	3	75.7217	X
Chan 4p	3	83.9833	X
Chan 5p	3	85.5679	X

Bảng P1.2.4. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của sử dụng dung môi ethanol ly trích lên hàm lượng tổng chlorophyll trong lá lúa

Analysis of Variance for CHLOROPHYLL - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO	109167.	4	27291.7	148.37	0.0000
B:TY LE	34961.0	2	17480.5	95.03	0.0000
INTERACTIONS					
AB	10140.8	8	1267.61	6.89	0.0000
RESIDUAL	5518.3	30	183.943		
TOTAL (CORRECTED)	159787.	44			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by NONG DO

Method: 95.0 percent Duncan

<i>NONG DO</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
0%	9	1160.06	4.52086	X
20%	9	1234.01	4.52086	X
40%	9	1252.53	4.52086	X
60%	9	1290.46	4.52086	X
80%	9	1296.83	4.52086	X

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by TY LE

Method: 95.0 percent Duncan

<i>TY LE</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
5:1	15	1208.7	3.50184	X
15:1	15	1256.98	3.50184	X
10:1	15	1274.64	3.50184	X

Bảng P1.2.5. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của sử dụng dung môi ethanol ly trích lên hàm lượng polyphenol trong lá lúa

Analysis of Variance for POLYPHENOL - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO	0.683774	4	0.170944	21.97	0.0000
B:TY LE	5.59858	2	2.79929	359.70	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.377861	8	0.0472326	6.07	0.0001
RESIDUAL	0.23347	30	0.00778232		
TOTAL (CORRECTED)	6.89368	44			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by NONG DO

Method: 95.0 percent Duncan

<i>NONG DO</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
0%	9	4.21678	0.0294058	X
20%	9	4.39828	0.0294058	X
40%	9	4.49411	0.0294058	X

60%	9	4.52795	0.0294058	x
80%	9	4.55727	0.0294058	x

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by TY LE

Method: 95.0 percent Duncan

TY LE	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5:1	15	3.941	0.0227777	x
15:1	15	4.6612	0.0227777	x
10:1	15	4.71443	0.0227777	x

Bảng P1.2.6. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng tổng chlorophyll của bột lá lúa non

ANOVA Table for CHLOROPHYLL by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	629266.	6	104878.	241.50	0.0000
Within groups	6079.77	14	434.27		
Total (Corr.)	635345.	20			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	921.803	x
Say 150	3	1148.77	x
Say 140	3	1190.54	x
Say 130	3	1262.68	x
Say 120	3	1309.15	x
Say dong kho	3	1427.87	x
Truoc khi say	3	1480.16	x

Bảng P1.2.7. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng chlorophyll a của bột lúa non

ANOVA Table for CHLOROPHYLL A by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	123085.	6	20514.2	106.22	0.0000
Within groups	2703.78	14	193.127		
Total (Corr.)	125789.	20			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL A by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	364.514	x
Say 130	3	427.46	x
Say 150	3	451.06	xx
Say 140	3	451.496	xx
Say 120	3	471.678	x
Say dong kho	3	565.097	x
Truoc khi say	3	606.647	x

Bảng P1.2.8. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng chlorophyll b của bột lúa non

ANOVA Table for CHLOROPHYLL B by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	238864.	6	39810.6	112.31	0.0000
Within groups	4962.56	14	354.468		
Total (Corr.)	243826.	20			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL B by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	557.605	x
Say 150	3	698.1	x
Say 140	3	739.454	x
Say 130	3	835.669	x
Say 120	3	837.937	x
Say dong kho	3	863.263	x
Truoc khi say	3	874.009	x

Bảng P1.2.9. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng tổng polyphenol của bột lúa non

ANOVA Table for POLYPHENOL by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	18.8772	6	3.1462	427.87	0.0000
Within groups	0.102944	14	0.00735315		
Total (Corr.)	18.9802	20			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	1.54597	x
Say 150	3	1.84577	x
Say 140	3	2.01953	x
Say 130	3	2.46979	x
Say 120	3	3.33458	x
Say dong kho	3	3.64894	x
Truoc khi say	3	4.25519	x

Bảng P1.2.10. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng tổng flavonoid của bột lá lúa non

ANOVA Table for FLAVONOID by DK SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.30117	6	0.383528	480.06	0.0000
Within groups	0.0111849	14	0.00079892		
Total (Corr.)	2.31236	20			

Multiple Range Tests for FLAVONOID by DK SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DK SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	0.961945	x
Say 150	3	1.29482	x
Say 140	3	1.37353	x
Say 130	3	1.45245	x
Say 120	3	1.51806	x
Say dong kho	3	1.60958	x
Truoc khi say	3	2.13884	x

Bảng P1.2.11. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hoạt tính DPPH của bột lá lúa non

ANOVA Table for DPPH by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11.2652	6	1.87754	5501.60	0.0000
Within groups	0.00477779	14	0.000341271		
Total (Corr.)	11.27	20			

Multiple Range Tests for DPPH by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN SAY	Count	Mean	Homogeneous Groups
Say 160	3	0.944984	x
Say 150	3	1.03543	x
Say 140	3	1.20679	x
Say 130	3	1.4165	x
Say 120	3	2.21521	x
Say dong kho	3	2.27471	x
Truoc khi say	3	3.05379	x

Bảng P1.2.12. Phân tích phương sai và so sánh Duncan ảnh hưởng của nhiệt độ sấy phun lên hàm lượng xơ hòa tan của bột lúa non

ANOVA Table for XO TAN by DIEU KIEN SAY

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	49328.8	6	8221.47	6.14	0.0025
Within groups	18750.8	14	1339.34		

Total (Corr.)	68079.6	20			
---------------	---------	----	--	--	--

Multiple Range Tests for XO TAN by DIEU KIEN SAY

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DIEU KIEN SAY</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Truoc khi say	3	381.433	X
Say 140	3	442.425	XX
Say 130	3	451.049	XXX
Say 160	3	461.257	XXX
Say 150	3	461.749	XXX
Say 120	3	499.317	XX
Say dong kho	3	551.936	X

Bảng P1.2.13. Phân tích đa nhân tố Multiple Variable Analysis và phân tích cụm Cluster Analysis về mối tương quan giữa các giá trị sau chế biến bột lá lúa

Spearman Rank Correlations

	CHLORO PHYLL	CHLOROP HYLL A	CHLORO PHYLL B	POLYPHE NOL	FLAVON OID	DPPH	XO TAN
CHLOROPHYLL		0.8351	0.9688	0.9805	0.9844	0.9792	0.2532
		(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
		0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2574
CHLOROPHYLL A	0.8351		0.7312	0.8078	0.8221	0.8286	0.2325
	(21)		(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
	0.0002		0.0011	0.0003	0.0002	0.0002	0.2985
CHLOROPHYLL B	0.9688	0.7312		0.9571	0.9532	0.9364	0.2377
	(21)	(21)		(21)	(21)	(21)	(21)
	0.0000	0.0011		0.0000	0.0000	0.0000	0.2878
POLYPHENOL	0.9805	0.8078	0.9571		0.9909	0.9766	0.1961
	(21)	(21)	(21)		(21)	(21)	(21)
	0.0000	0.0003	0.0000		0.0000	0.0000	0.3805
FLAVONOID	0.9844	0.8221	0.9532	0.9909		0.9792	0.2130
	(21)	(21)	(21)	(21)		(21)	(21)
	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000		0.0000	0.3408
DPPH	0.9792	0.8286	0.9364	0.9766	0.9792		0.2481
	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)		(21)
	0.0000	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	DPPH	XO TAN
XO TAN	0.2532	0.2325	0.2377	0.1961	0.2130	0.9792	0.2532
	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)	(21)
	0.2574	0.2985	0.2878	0.3805	0.3408	0.0000	0.2574

Bảng P1.2.14. Phân tích cụm Cluster Analysis về mối tương quan giữa các giá trị sau chế biến bột lá lúa

Number of complete cases: 21; Clustering Method: Group Average; Distance Metric: Squared Euclidean; Clustering: variables; Standardized: yes

Cluster Summary

<i>Cluster</i>	<i>Members</i>	<i>Percent</i>
1	6	85.71
2	1	14.29

Membership Table

<i>Variable</i>	<i>Cluster</i>
CHLOROPHYLL	1
CHLOROPHYLL A	1
CHLOROPHYLL B	1
POLYPHENOL	1
FLAVONOID	1
DPPH	1
XO TAN	2

Icicle Plot

Variable	Column	Number of Clusters
-----	-----	-----
CHLOROPHYL	1	XXXX
		XXXX
CHLOROPHYL	3	XXXX

		X
CHLOROPHYL	2	XX
		XX
POLYPHENOL	4	XXXXX
		XXXXX
DPPH	6	XXXXX
		XXX
FLAVONOID	5	XXX

XO TAN 7

Agglomeration Schedule

	<i>Combined</i>	<i>Combined</i>		<i>Previous Stage</i>	<i>Previous Stage</i>	<i>Next</i>
<i>Stage</i>	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	<i>Distance</i>	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	<i>Stage</i>
1	4	6	0.540269	0	0	3
2	1	3	1.70915	0	0	5
3	4	5	3.42249	1	0	4
4	2	4	4.11688	0	3	5
5	1	2	5.68658	2	4	0

Bảng P1.2.15. Phân tích phương sai và so sánh Duncan nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản lên hàm lượng tổng chlorophyll trong bột lá lúa non

Analysis of Variance for CHLOROPHYLL - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:DIEU KIEN	291144.	2	145572.	2394.24	0.0000
B:THANG	6.88286E6	6	1.14714E6	18867.20	0.0000
INTERACTIONS					
AB	108472.	12	9039.3	148.67	0.0000
RESIDUAL	2553.64	42	60.801		
TOTAL (CORRECTED)	7.28503E6	62			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by DIEU KIEN

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DIEU KIEN</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
T PHONG	21	679.943	1.70155	X
5 C	21	745.502	1.70155	X
(-18 C)	21	845.284	1.70155	X

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by THANG

Method: 95.0 percent Duncan

<i>THANG</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Thang 6	9	337.357	2.59917	X
Thang 5	9	432.373	2.59917	X
Thang 4	9	552.327	2.59917	X
Thang 3	9	767.841	2.59917	X
Thang 2	9	841.945	2.59917	X
Thang 1	9	995.301	2.59917	X
Thang 0	9	1371.22	2.59917	X

Bảng P1.2.16. Phân tích phương sai và so sánh Duncan nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản lên hàm lượng tổng polyphenol trong bột lá lúa non

Analysis of Variance for POLYPHENOL - Type III Sums of Squares

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:DIEU KIEN	1.00362	2	0.501812	1160.20	0.0000
B:THANG	17.1556	6	2.85927	6610.71	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.320156	12	0.0266797	61.68	0.0000
RESIDUAL	0.0181659	42	0.000432521		
TOTAL (CORRECTED)	18.4976	62			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by DIEU KIEN

Method: 95.0 percent Duncan

<i>DIEU KIEN</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
T PHONG	21	1.1555	0.00453831	X
5 C	21	1.29242	0.00453831	X

(-18 C)	21	1.46402	0.00453831	X
---------	----	---------	------------	---

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by THANG

Method: 95.0 percent Duncan

THANG	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Thang 6	9	0.810212	0.00693238	X
Thang 5	9	0.914415	0.00693238	X
Thang 4	9	0.994632	0.00693238	X
Thang 3	9	1.10237	0.00693238	X
Thang 2	9	1.24877	0.00693238	X
Thang 1	9	1.6283	0.00693238	X
Thang 0	9	2.42916	0.00693238	X

Bảng P1.2.17. Phân tích phương sai và so sánh Duncan nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản lên hàm lượng xơ hòa tan trong bột lá lúa non

Analysis of Variance for XO TAN - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DIEU KIEN	921.116	2	460.558	0.51	0.6023
B:THANG	182102.	6	30350.4	33.82	0.0000
INTERACTIONS					
AB	20649.9	12	1720.83	1.92	0.0599
RESIDUAL	37695.6	42	897.514		
TOTAL (CORRECTED)	241369.	62			

Multiple Range Tests for XO TAN by DIEU KIEN

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
5 C	21	523.751	6.53749	X
T PHONG	21	531.347	6.53749	X
(-18 C)	21	532.295	6.53749	X

Multiple Range Tests for XO TAN by THANG

Method: 95.0 percent Duncan

THANG	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Thang 3	9	431.981	9.98618	X
Thang 2	9	498.902	9.98618	X
Thang 0	9	501.64	9.98618	XX
Thang 6	9	529.186	9.98618	XX
Thang 5	9	553.559	9.98618	X
Thang 4	9	590.536	9.98618	X
Thang 1	9	598.113	9.98618	X

Bảng P1.2.18. Phân tích phương sai và so sánh Duncan nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản lên hoạt tính bắt gốc tự do DPPH trong bột lá lúa non

Analysis of Variance for DPPH - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:DIEU KIEN	1.17787	2	0.588934	1549.65	0.0000
B:THANG	4.22832	6	0.70472	1854.32	0.0000
INTERACTIONS					
AB	0.355238	12	0.0296032	77.89	0.0000
RESIDUAL	0.0159618	42	0.000380042		
TOTAL (CORRECTED)	5.77739	62			

Multiple Range Tests for DPPH by DIEU KIEN

Method: 95.0 percent Duncan

DIEU KIEN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
T PHONG	21	1.83657	0.00425409	X
5 C	21	2.06038	0.00425409	X
(-18 C)	21	2.16427	0.00425409	X

Multiple Range Tests for DPPH by THANG

Method: 95.0 percent Duncan

THANG	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Thang 6	9	1.61442	0.00649823	X
Thang 5	9	1.77698	0.00649823	X
Thang 4	9	1.91528	0.00649823	X

Thang 3	9	2.05005	0.00649823	X
Thang 2	9	2.1176	0.00649823	X
Thang 1	9	2.21735	0.00649823	X
Thang 0	9	2.45118	0.00649823	X

3. Kết quả phân tích thống kê đánh giá hoạt tính chống oxy hoá của bột lá lúa

Bảng P1.3.1. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của chlorophyll theo nồng độ bột

ANOVA Table for CHLOROPHYLL by NONG DO BOT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	445727.	9	49525.2	45.33	0.0000
Within groups	21848.8	20	1092.44		
Total (Corr.)	467576.	29			

Multiple Range Tests for CHLOROPHYLL by NONG DO BOT

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO BOT	Count	Mean	Homogeneous Groups
1%	3	491.825	X
2%	3	556.907	X
3%	3	606.471	XX
4%	3	660.235	XX
5%	3	702.043	XX
6%	3	734.124	X
7%	3	792.035	X
8%	3	805.421	XX
9%	3	860.987	XX
10%	3	868.467	X

Bảng P1.3.2. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hàm lượng tổng polyphenol theo nồng độ bột

ANOVA Table for POLYPHENOL by NONG DO BOT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.18361	9	0.353735	98.91	0.0000
Within groups	0.0715283	20	0.00357642		
Total (Corr.)	3.25514	29			

Multiple Range Tests for POLYPHENOL by NONG DO BOT

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO BOT	Count	Mean	Homogeneous Groups
1%	3	0.85808	X
2%	3	1.02809	X
3%	3	1.114	XX
4%	3	1.16766	XX
5%	3	1.244	XX
6%	3	1.34558	X
7%	3	1.45089	X
8%	3	1.54205	X
9%	3	1.79496	X
10%	3	1.95855	X

Bảng P1.3.3. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hàm lượng tổng polyphenol theo nồng độ bột

ANOVA Table for XO TAN by NONG DO BOT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4281.58	9	475.732	0.26	0.9792
Within groups	36891.9	20	1844.59		
Total (Corr.)	41173.5	29			

Multiple Range Tests for XO TAN by NONG DO BOT

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO BOT	Count	Mean	Homogeneous Groups
1%	3	590.717	X
5%	3	596.396	X
2%	3	599.598	X
3%	3	599.747	X
8%	3	600.785	X

6%	3	603.397	X
4%	3	608.243	X
7%	3	611.569	X
9%	3	625.205	X
10%	3	630.205	X

Bảng P1.3.4. Phân tích đa nhân tố Multiple Variable Analysis mối tương quan giữa các giá trị theo nồng độ bột

Spearman Rank Correlations

	CHLOROPHYLL	POLYPHENOL	ABTS	DPPH	FRAP	RP	XO TAN
CHLOROPHYLL		0.9666 (30)	0.9577 (30)	0.9648 (30)	0.9524 (30)	0.9715 (30)	0.3931 (30)
		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0343
POLYPHENOL	0.9666 (30)		0.9711 (30)	0.9835 (30)	0.9804 (30)	0.9826 (30)	0.4291 (30)
	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0208
ABTS	0.9577 (30)	0.9711 (30)		0.9840 (30)	0.9875 (30)	0.9915 (30)	0.3691 (30)
	0.0000	0.0000		0.0000	0.0000	0.0000	0.0469
DPPH	0.9648 (30)	0.9835 (30)	0.9840 (30)		0.9884 (30)	0.9875 (30)	0.4082 (30)
	0.0000	0.0000	0.0000		0.0000	0.0000	0.0279
FRAP	0.9524 (30)	0.9804 (30)	0.9875 (30)	0.9884 (30)		0.9889 (30)	0.3962 (30)
	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		0.0000	0.0329
RP	0.9715 (30)	0.9826 (30)	0.9915 (30)	0.9875 (30)	0.9889 (30)		0.3677 (30)
	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		0.0477
XO TAN	0.3931 (30)	0.4291 (30)	0.3691 (30)	0.4082 (30)	0.3962 (30)	0.3677 (30)	
	0.0343	0.0208	0.0469	0.0279	0.0329	0.0477	

Bảng P1.3.5. Phân tích cụm Cluster Analysis về mối tương quan giữa các giá trị theo nồng độ bột

Number of complete cases: 30; Clustering Method: Median; Distance Metric: Squared Euclidean; Clustering: variables; Standardized: yes

Cluster Summary

Cluster	Members	Percent
1	7	100.00

Icicle Plot

Variable	Column	Number of Clusters
		1234567
ABTS	1	XXXXX
		XXXXX
DPPH	3	XXXXXX
		XXXXXX
RP	6	XXXXXX
		XXXX
POLYPHENOL	5	XXXX
		XX
CHLOROPHYLL	2	XXX
		XXX
FRAP	4	XXX
		X
XO TAN	7	X

Agglomeration Schedule

	Combined	Combined		Previous Stage	Previous Stage	Next
Stage	Cluster 1	Cluster 2	Distance	Cluster 1	Cluster 2	Stage
1	3	6	0.665583	0	0	2
2	1	3	0.619689	0	1	3
3	1	5	1.73932	2	0	5

4	2	4	1.93112	0	0	5
5	1	2	2.21757	3	4	6
6	1	7	41.2859	5	0	0

4. Kết quả phân tích thống kê đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm của bột lá lúa

Bảng P1.4.1. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hoạt tính kháng vi khuẩn *P. aeruginosa*

ANOVA Table for DKVKK by NONG DO

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2699.78	5	539.956	335.14	0.0000
Within groups	19.3333	12	1.61111		
Total (Corr.)	2719.11	17			

Multiple Range Tests for DKVKK by NONG DO

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO	Count	Mean	Homogeneous Groups
LL 500 mg/mL	3	0.0	X
LL 1000 mg/mL	3	3.66667	X
LL 2000 mg/mL	3	9.33333	X
LL 4000 mg/mL	3	15.6667	X
LL 8000 mg/mL	3	19.3333	X
Ampicillin 100 ug/mL	3	37.3333	X

Bảng P1.4.2. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hoạt tính kháng vi khuẩn *S. aureus*

ANOVA Table for DKVKK by NONG DO

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1170.94	5	234.189	301.10	0.0000
Within groups	9.33333	12	0.777778		
Total (Corr.)	1180.28	17			

Multiple Range Tests for DKVKK by NONG DO

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO	Count	Mean	Homogeneous Groups
LL 500 mg/mL	3	5.33333	X
LL 1000 mg/mL	3	12.6667	X
LL 2000 mg/mL	3	16.0	X
LL 4000 mg/mL	3	18.6667	X
LL 8000 mg/mL	3	21.3333	X
Ampicillin 100 ug/mL	3	31.6667	X

Bảng P1.4.3. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hoạt tính kháng vi khuẩn *E. coli*

ANOVA Table for DKVKK by NONG DO

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	466.938	5	93.3877	122.52	0.0000
Within groups	9.14667	12	0.762222		
Total (Corr.)	476.085	17			

Multiple Range Tests for DKVKK by NONG DO

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO	Count	Mean	Homogeneous Groups
LL 500 mg/mL	3	4.8	X
LL 1000 mg/mL	3	8.56224	X
LL 2000 mg/mL	3	12.2437	X
LL 4000 mg/mL	3	16.2433	X
LL 8000 mg/mL	3	20.24	X
Ampicillin 100 ug/mL	3	25.0133	X

Bảng P1.4.4. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của hoạt tính kháng nấm *C. albicans*

ANOVA Table for DKVKN by NONGDO

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	121.0	5	24.2	186.15	0.0000
Within groups	1.56	12	0.13		
Total (Corr.)	122.56	17			

Multiple Range Tests for DKVKN by NONGDO

Method: 95.0 percent Duncan

<i>NONGDO</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
LL 500 mg/mL	3	0.0	X
LL 1000 mg/mL	3	0.0	X
LL 2000 mg/mL	3	1.5	X
LL 4000 mg/mL	3	3.5	X
LL 8000 mg/mL	3	5.0	X
Metronidazole	3	7.0	X

5. Kết quả phân tích thống kê đánh giá tác động của bột lá lúa đối với hệ vi sinh vật đường ruột

Bảng P1.5.1. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của các chỉ số huyết học

ANOVA Table for RED BLOOD CELL by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	4.73483	3	1.57828	10.42	0.0039
Within groups	1.21173	8	0.151467		
Total (Corr.)	5.94657	11			

Multiple Range Tests for RED BLOOD CELL by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	8.57	X
PCDC	3	8.78	X
PC300	3	9.68333	X
PC150	3	10.0933	X

ANOVA Table for HEMATOCRIT by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	82.7228	3	27.5743	56.08	0.0000
Within groups	3.93347	8	0.491683		
Total (Corr.)	86.6563	11			

Multiple Range Tests for HEMATOCRIT by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
PC300	3	39.2933	X
PC150	3	40.5333	X
Day 0	3	42.7667	X
PCDC	3	46.2033	X

ANOVA Table for HEMOGLOBIN by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	6.94789	3	2.31596	5.22	0.0275
Within groups	3.5502	8	0.443775		
Total (Corr.)	10.4981	11			

Multiple Range Tests for HEMOGLOBIN by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	11.5333	X
PCDC	3	12.0333	X
PC300	3	12.5267	XX
PC150	3	13.59	X

ANOVA Table for MCV by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	6.15	3	2.05	1.42	0.3079
Within groups	11.5867	8	1.44833		
Total (Corr.)	17.7367	11			

Multiple Range Tests for MCV by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	49.8	X
PC150	3	50.4	X
PCDC	3	51.4333	X
PC300	3	51.5	X

ANOVA Table for MCH by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1.60503	3	0.535008	1.16	0.3836

Within groups	3.69407	8	0.461758		
Total (Corr.)	5.29909	11			

Multiple Range Tests for MCH by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	13.7333	X
PCDC	3	14.1233	X
PC150	3	14.2867	X
PC300	3	14.7533	X

ANOVA Table for MCHC by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	18.5292	3	6.17639	11.94	0.0025
Within groups	4.14	8	0.5175		
Total (Corr.)	22.6692	11			

Multiple Range Tests for MCHC by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	29.4333	X
PCDC	3	30.0333	XX
PC150	3	31.3	X
PC300	3	32.6667	X

ANOVA Table for PLT by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	6003.24	3	2001.08	16.91	0.0008
Within groups	946.826	8	118.353		
Total (Corr.)	6950.07	11			

Multiple Range Tests for PLT by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	283.379	X
PCDC	3	293.337	X
PC300	3	303.18	X
PC150	3	342.357	X

ANOVA Table for WBC by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	24.6026	3	8.20087	20.54	0.0004
Within groups	3.19427	8	0.399283		
Total (Corr.)	27.7969	11			

Multiple Range Tests for WBC by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	4.65	X
PCDC	3	5.4	X
PC150	3	7.6	X
PC300	3	8.04333	X

ANOVA Table for NEU by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1.8387	3	0.6129	142.53	0.0000
Within groups	0.0344	8	0.0043		
Total (Corr.)	1.8731	11			

Multiple Range Tests for NEU by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	0.95	X
PCDC	3	0.98	X
PC300	3	1.7	X
PC150	3	1.79	X

ANOVA Table for LYM by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	8.97982	3	2.99328	2477.19	0.0000
Within groups	0.00966667	8	0.00120833		
Total (Corr.)	8.98949	11			

Multiple Range Tests for LYM by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	2.75	x
PCDC	3	3.37667	x
PC150	3	4.7	x
PC300	3	4.77	x

ANOVA Table for MON by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0.640625	3	0.213542	640.62	0.0000
Within groups	0.00266667	8	0.000333333		
Total (Corr.)	0.643292	11			

Multiple Range Tests for MON by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	0.33	x
PCDC	3	0.37	x
PC150	3	0.466667	x
PC300	3	0.91	x

ANOVA Table for EOS by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0.0105583	3	0.00351944	2.48	0.1350
Within groups	0.0113333	8	0.00141667		
Total (Corr.)	0.0218917	11			

Multiple Range Tests for EOS by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
PCDC	3	0.133333	x
Day 0	3	0.16	xx
PC150	3	0.193333	xx
PC300	3	0.21	x

ANOVA Table for BAS by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0.0327333	3	0.0109111	34.46	0.0001
Within groups	0.00253333	8	0.000316667		
Total (Corr.)	0.0352667	11			

Multiple Range Tests for BAS by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
PC300	3	0.193333	x
Day 0	3	0.273333	x
PCDC	3	0.31	x
PC150	3	0.33	x

ANOVA Table for RDW CV by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	7.58333	3	2.52778	3.79	0.0585
Within groups	5.33333	8	0.666667		
Total (Corr.)	12.9167	11			

Multiple Range Tests for RDW CV by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	13.0	x
PCDC	3	13.6667	xx
PC300	3	14.6667	x
PC150	3	15.0	x

ANOVA Table for RDW SD by Nhom

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	7.92917	3	2.64306	6.69	0.0143
Within groups	3.16	8	0.395		
Total (Corr.)	11.0892	11			

Multiple Range Tests for RDW SD by Nhom

Method: 95.0 percent Duncan

<i>Nhom</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Day 0	3	25.7667	x
PCDC	3	26.6333	x
PC300	3	27.0	xx

PC150	3	28.0333	X
-------	---	---------	---

Bảng P1.5.2. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của trọng lượng chuột
ANOVA Table for Weight gain by Nhóm

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	23.6177	2	11.8088	26.48	0.0000
Within groups	18.7292	42	0.445934		
Total (Corr.)	42.3469	44			

Multiple Range Tests for Weight gain by Nhóm

Method: 95.0 percent Duncan

Nhóm	Count	Mean	Homogeneous Groups
150mg	15	1.50467	X
DC	15	2.086	X
300mg	15	3.24733	X

Bảng P1.5.3 Phân tích phương sai và so sánh Duncan của mật số vi khuẩn lactic acid
ANOVA Table for LACTIC by Nhóm

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.36125	2	2.68063	127.43	0.0000
Within groups	0.126216	6	0.021036		
Total (Corr.)	5.48747	8			

Multiple Range Tests for LACTIC by Nhóm

Method: 95.0 percent Duncan

NHOM	Count	Mean	Homogeneous Groups
Đoi chung	3	6.39309	X
Nhóm BLL 300mg/kg	3	7.45367	X
Nhóm BLL 150mg/kg	3	8.3769	X

Bảng P1.5.4. Phân tích phương sai và so sánh Duncan của mật số vi khuẩn hiếu khí
ANOVA Table for HIEU KHI by Nhóm

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.59019	2	0.795093	135.61	0.0000
Within groups	0.0351794	6	0.00586323		
Total (Corr.)	1.62536	8			

Multiple Range Tests for HIEU KHI by Nhóm

Method: 95.0 percent Duncan

NHOM	Count	Mean	Homogeneous Groups
Đoi chung	3	7.3331	X
Nhóm BLL 300mg/kg	3	8.3769	X
Nhóm BLL 150mg/kg	3	8.46771	X

PHỤ LỤC 2. Hình ảnh, số liệu và các kết quả phân tích chỉ tiêu lá lúa

2.1. Ảnh hưởng của giống lúa, thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng đến hàm lượng các hợp chất và hoạt tính chống oxy hoá của lá lúa

2.1.1. Kết quả đo cường độ ánh sáng



Hình P2.1. Điều kiện không che sáng

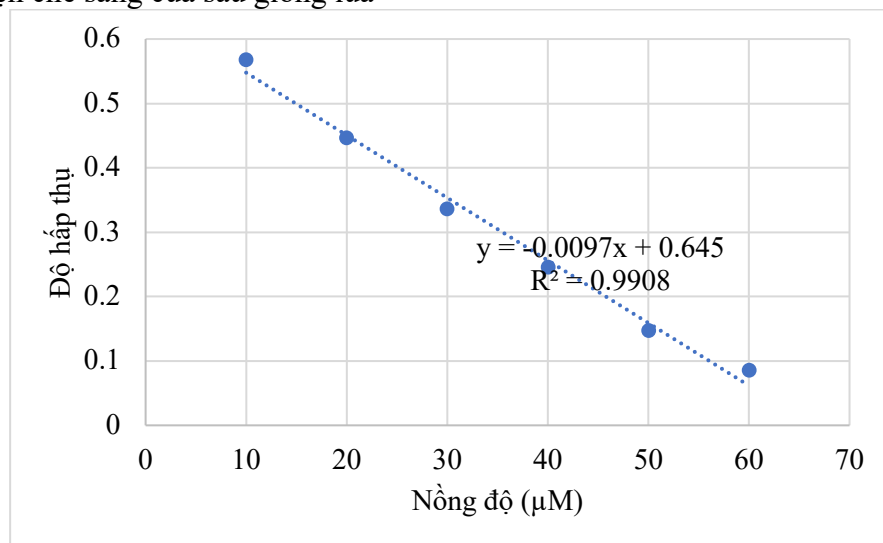


Hình P2.2. Điều kiện che sáng 1 lớp lưới

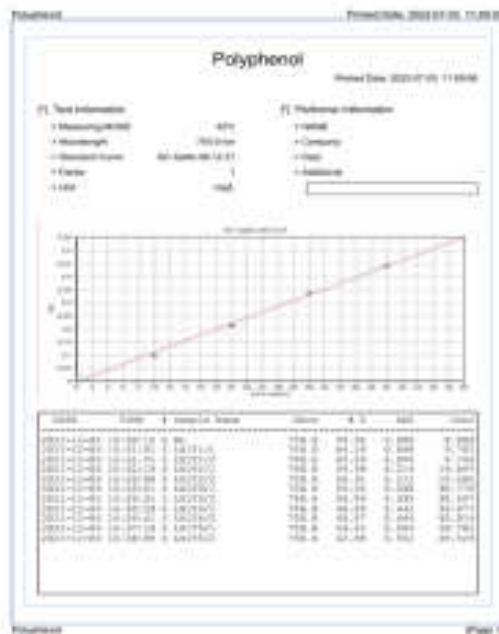


Hình P2.3. Điều kiện che sáng 2 lớp lưới

2.1.2. Một số hình ảnh bố trí thí nghiệm và phân tích các chỉ tiêu về thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng của sáu giống lúa



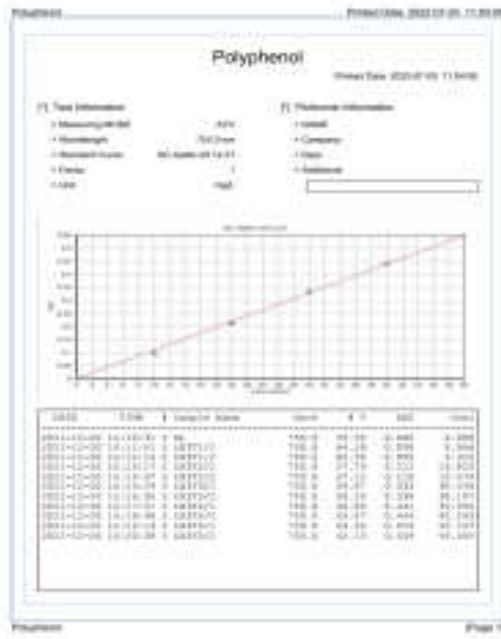
Hình P2.4. Xây dựng đường chuẩn Trolox



Hình P2.5. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 1)



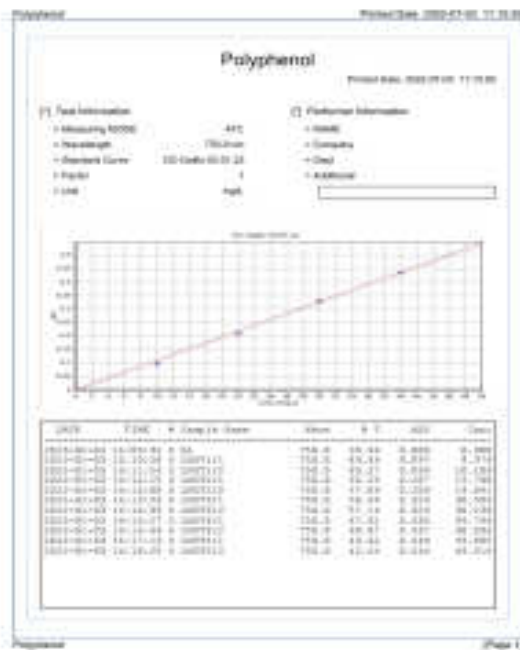
Hình P2.6. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 2)



Hình P2.7. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 3)



Hình P2.8. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 4)



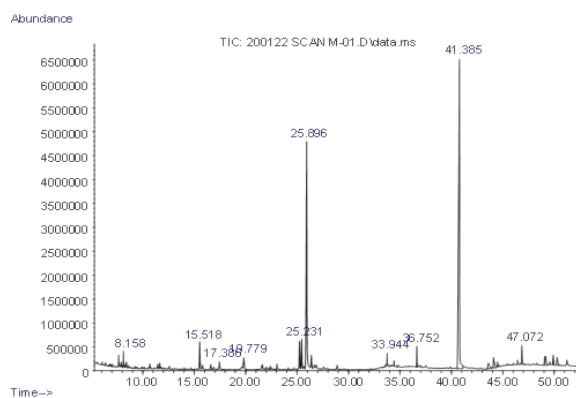
Hình P2.9. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 5)



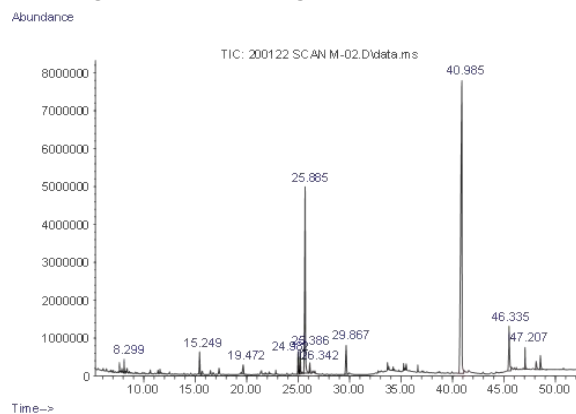
Hình P2.10. Đường chuẩn gallic acid (Tuần 6)

2.1.3. Biểu đồ sắc ký của các giống lúa theo thời gian sinh trưởng và điều kiện che sáng

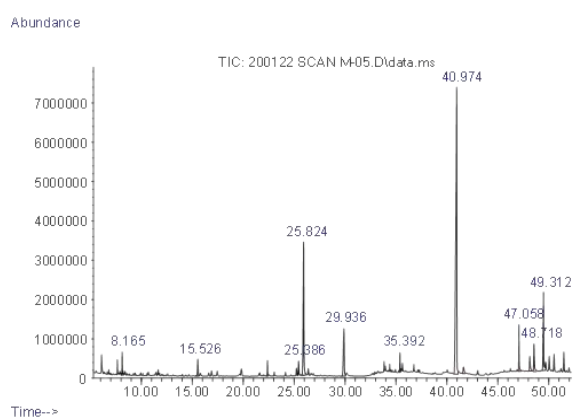
2.1.3.1. Biểu đồ sắc ký của các giống lúa theo thời gian sinh trưởng 1, 3 và 5 tuần



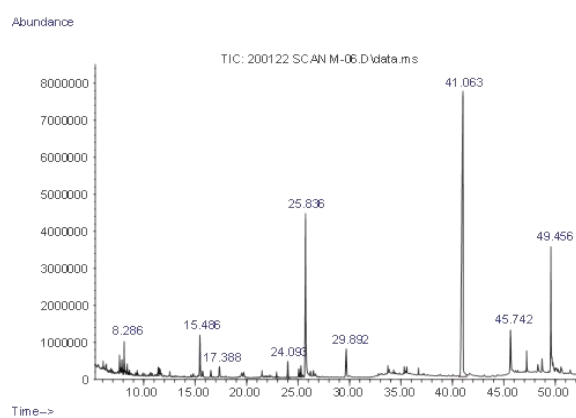
IR504



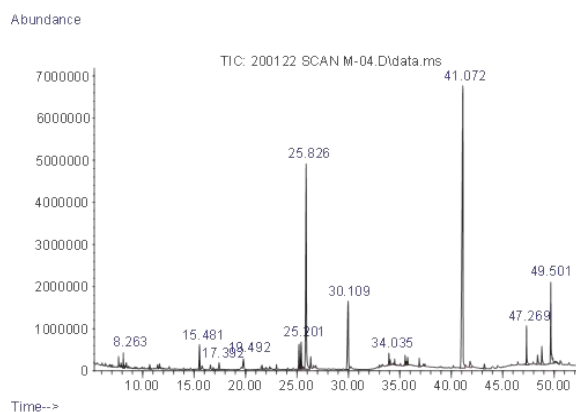
NTH



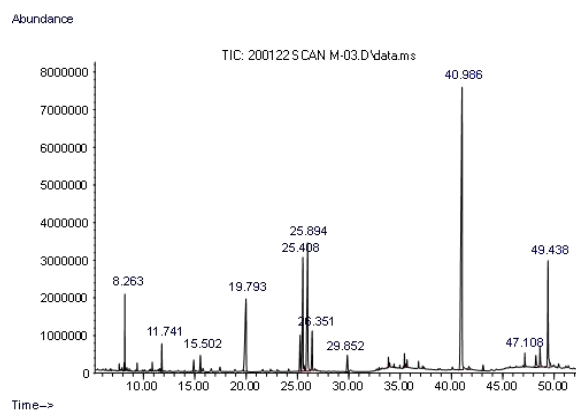
NTI



HRO

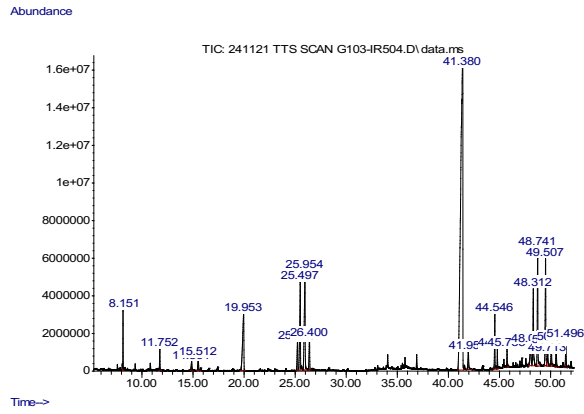
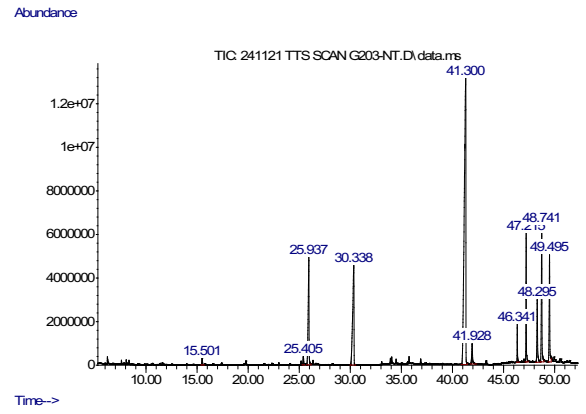
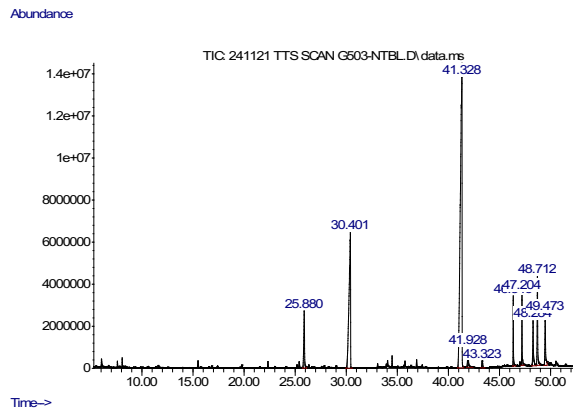
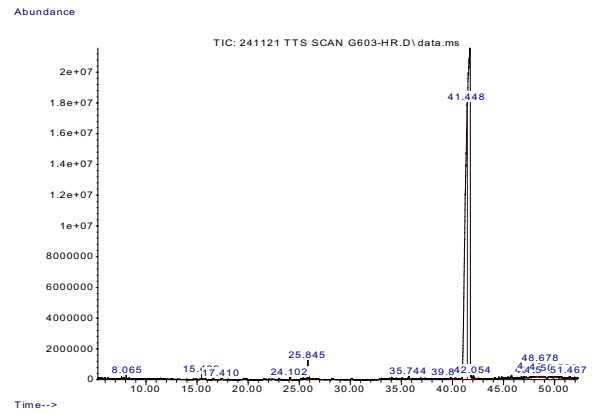
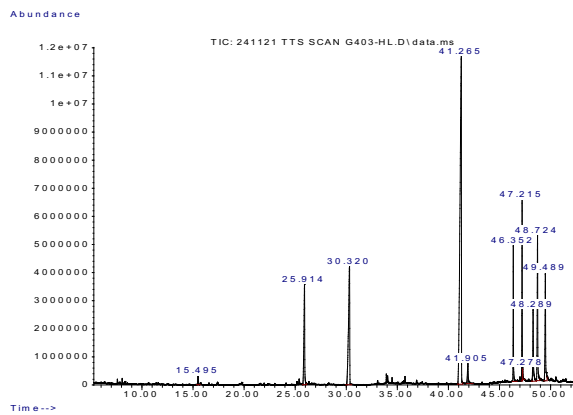
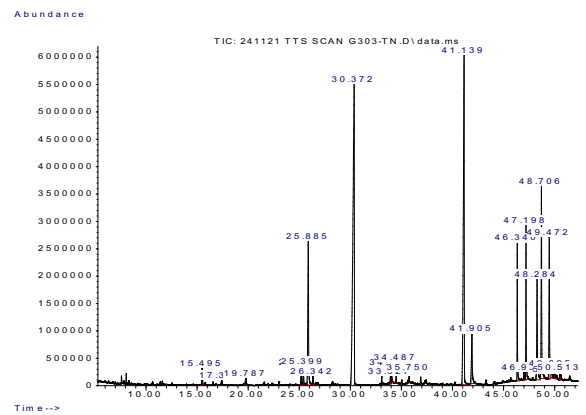


HLA

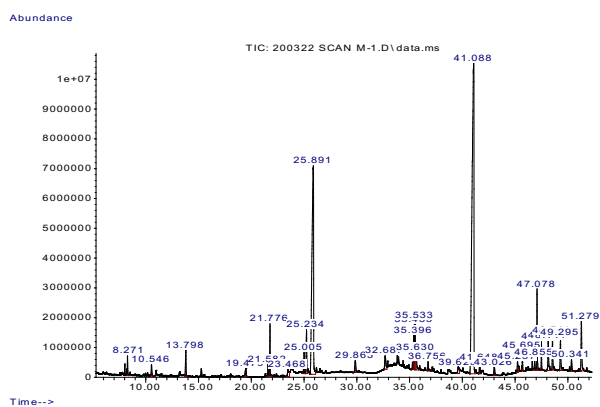
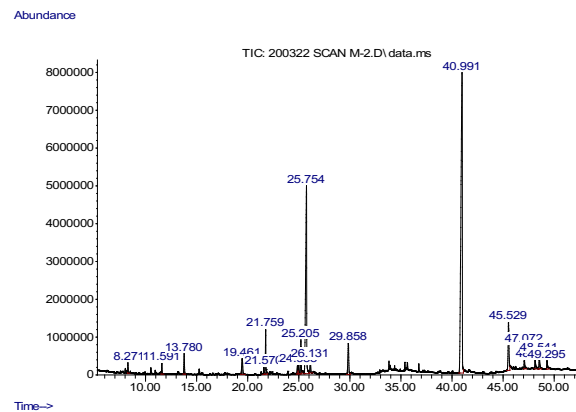
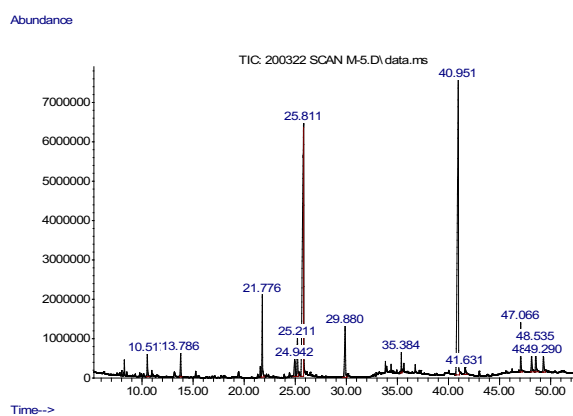
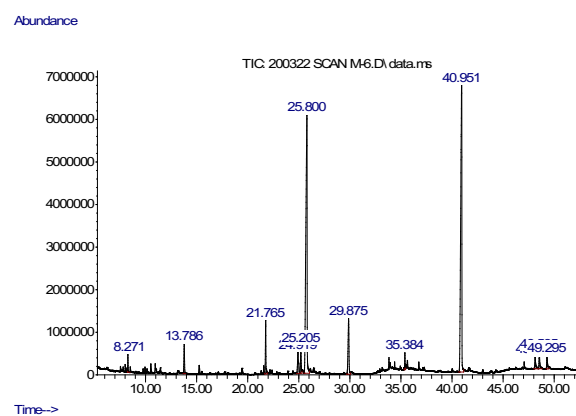
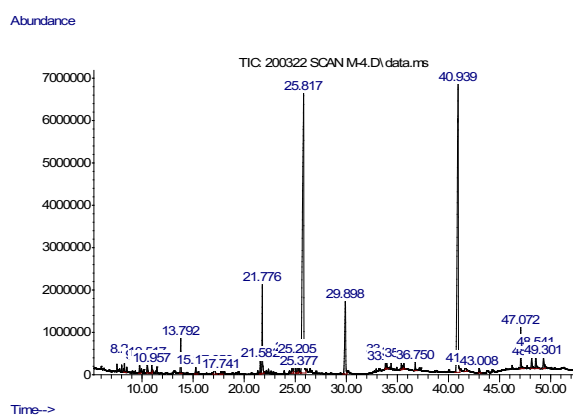
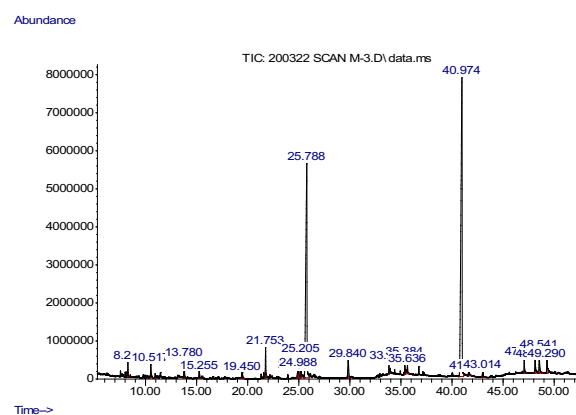


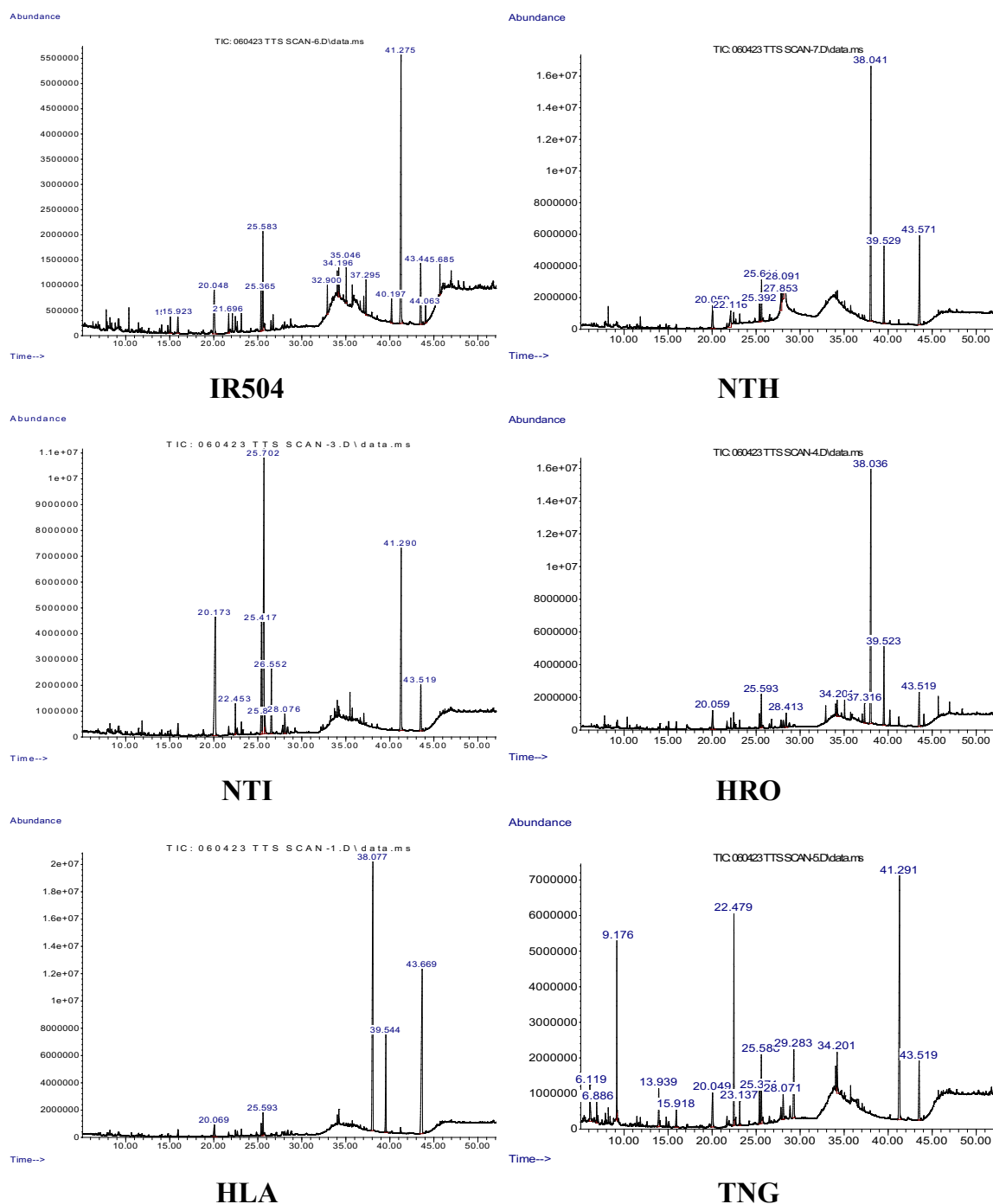
TNG

Hình P2.11. Sắc ký đồ của sáu giống lúa tuần 1

**IR504****NTH****NTI****HRO****HLA****TNG**

Hình P2.12. Sắc ký đồ của sáu giống lúa tuần 3

**IR504****NTH****NTI****HRO****HLA****TNG****Hình P2.13. Sắc ký đồ của sáu giống lúa tuần 5****2.1.3.2. Biểu đồ sắc ký của các giống lúa tuần 5 theo điều kiện che sáng 2 lớp lưới**



Hình P2.14. Sắc ký đồ của sáu giống lúa tuần 5 che sáng 2 lớp lưới

2.1.4. Bảng thành phần hợp chất từ kết quả GC-MS

Bảng P2.1. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa IR504 giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094			1,809	Cyclic hydrocarbon
2	Bicyclo[10.1.0]tridec-1-ene	178,172		0,728		Cyclic hydrocarbon

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
3	Phytol	296,308	31,898	6,629	24,925	Diterpenoid
4	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296,308	1,009			Diterpenoid
5	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280,24			0,816	Fatty acid
6	6-Octadecenoic acid, (Z)-	282,256			1,107	Fatty acid
7	2-Chloroethyl linoleate	342,233			0,452	Fatty acid
8	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		1,113		Fatty acid amide
9	Dodecanoic acid, methyl ester	214,193	1,37	1,243		Fatty acid ester
10	Methyl tetradecanoate	242,225		0,737		Fatty acid ester
11	7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	266,225			0,642	Fatty acid ester
12	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	1,17	5,462	0,586	Fatty acid ester
13	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	3,468		2,11	Fatty acid ester
14	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	2942,56		1,458	1,778	Fatty acid ester
15	9-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272		5,074		Fatty acid ester
16	Octadecanoic acid, methyl ester	298,287		1,595		Fatty acid ester
17	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	354,277			2,118	Fatty acid ester
18	9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z)-	264,245			0,922	Fatty alcohol
19	9-Octadecenal, (Z)-	266,261			1,967	Fatty aldehyde
20	Tetradecanenitrile	209,214			1,143	Fatty nitrile
21	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272	1,448		0,631	Fatty acid amide
22	1-Oxaspiro[4.5]decan-2-one, 6-isopropenyl-9-methyl-	208,146			0,483	Heterocyclic compound
23	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115			1,015	Heterocyclic compound
24	Vitamin E	430,381	1,649		2,489	Meroterpenoid
25	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	2,652	0,693		Monoterpene
26	Benzene, 1-methyl-3-[(2-methylpropyl)thio]-	180,097			0,569	Phenol
27	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	278,152	1,772			Phthalate ester

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
28	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277			43,163	Phthalate ester
29	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	390,277	53,564	51,507	0,472	Phthalate ester
30	(-)-Spathulenol	220,183		0,534		Sesquiterpe noid
31	Bicyclo[4.3.0]nonane, 7- methylene-2,4,4-trimethyl-2- vinyl-	204,188		0,574		Sesquiterpe noid
32	Cyclohexane, 1-ethenyl-1- methyl-2,4-bis(1- methylethenyl)-, [1S- (1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	204,188		1,964		Sesquiterpe noid
33	Pregn-4-ene-3,20-dione, (8.alpha.,10.alpha.)-	314,225		1,086		Steroid
34	Ergosta-5,8,22-trien-3-ol, (3.beta.,22E)-	396,339		1,755		Steroid
35	Campesterol	400,371		4,017	1,78	Steroid
36	4,22-Stigmastadiene-3-one	410,355		1,19		Steroid
37	Stigmasterol	412,371		5,386	1,397	Steroid
38	Stigmast-4-en-3-one	412,371		1,362		Steroid
39	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386		5,201	1,675	Steroid
40	Cholest-5-en-3-ol, 24- propylidene-, (3.beta.)-	426,386		0,692		Steroid
41	Cholest-5-en-24-one, 3- (acetyloxy)-, (3.beta.)-	442,345			0,639	Steroid
42	Squalene	410,391			0,502	Triterpenoid
43	9,19-Cyclolanostan-3-ol, 24- methylene-, (3.beta.)-	440,402			3,693	Triterpenoid
44	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, acetate, (3.beta.)-	468,397			1,114	Triterpenoid

Bảng P2.2. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa HRO giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	Ethanamine, 2,2'-oxybis[N,N- dimethyl-	160,158			0,878	Aliphatic Amine
2	Eicosane	282,329		0,181		Aliphatic hydrocarbon
3	1,4-Eicosadiene	278,297	2,205	0,167		Aliphatic hydrocarbon
4	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969			2,495	Benzaldehyde
5	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094			3,4	Cyclic hydrocarbon

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
6	Bicyclo[10.1.0]tridec-1-ene	178,172	3,179			Cyclic hydrocarbon
7	Phytol	296,308	29,056	2,246	44,517	Diterpenoid
8	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		0,394		Fatty acid amide
9	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24		0,162	2,194	Fatty acid ester
10	Tetradecanenitrile	209,214			2,164	Fatty nitrile
11	3-Cyclohexene-1- carboxaldehyde, 4-methyl-	124,089		0,331		Monoterpenoid
12	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6- trimethyl-	138,141		0,481		Monoterpenoid
13	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6- trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	2,634			Monoterpenoid
14	Sulfurous acid, 2-ethylhexyl tridecyl ester	376,301	3,065	0,181		Organosulfate
15	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115			0,854	Phenol
16	Phenol, 2,4-bis(1,1- dimethylethyl)-	206,167	2,407	0,205		Phenol
17	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	51,1		39,397	Phthalate ester
18	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	390,277		92,08		Phthalate ester
19	Ergosterol	396,339		0,274		Steroid
20	Campesterol	400,371		0,592	1,263	Steroid
21	Spinasterone	410,355		0,564		Steroid
22	Stigmasterol	412,371		1,286	1,547	Steroid
23	Stigmast-4-en-3-one	412,371		0,288		Steroid
24	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	6,354	0,568	1,29	Steroid

Bảng P2.3. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa TNG giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	3-Octene, (E)-	112,125		22,583		Aliphatic hydrocarbon
2	1-Pentanol, 5- (methylenecyclopropyl)-	140,12			0,519	Alkyl alcohol
3	1,3,6,9b-Tetraazaphenalene- 4-carbonitrile, 7-bromo-2- (bromomethyl)-	364,891			0,593	Carbonitrile
4	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094			1,927	Cyclic hydrocarbon
5	Cyclododecane	168,188			1,04	Cyclic hydrocarbon
6	Phytol	296,308	11,776	8,658	32,317	Diterpenoid

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
7	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296,308	2,017	0,313	2,118	Diterpenoid
8	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		3,343	0,541	Fatty acid amide
9	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272		0,588		Fatty acid amide
10	Methyl tetradecanoate	242,225	2,77			Fatty acid ester
11	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	7,09	0,546		Fatty acid ester
12	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	270,256			0,738	Fatty acid ester
13	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24			1,953	Fatty acid ester
14	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	294,256		0,764		Fatty acid ester
15	10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester	294,256			0,735	Fatty acid ester
16	9-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272	9,294	0,868		Fatty acid ester
17	Octadecanoic acid, methyl ester	298,287	3,444	0,398		Fatty acid ester
18	9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,Z,Z)-	306,256		0,389		Fatty acid ester
19	Tetradecanenitrile	209,214			1,509	Fatty nitrile
20	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115			0,923	Heterocyclic compound
21	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	324,303		0,329	0,554	Meroterpenoid
22	.gamma.-Tocopherol	416,365		3,837		Meroterpenoid
23	Vitamin E	430,381	0,897	4,674	0,974	Meroterpenoid
24	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	1,91	0,846	0,595	Monoterpenoid
25	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)]-	138,141		30,895		Monoterpenoid
26	Octasiloxane, 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-	578,171		0,335		Organosiloxane
27	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115	7,251		0,785	Phenol
28	1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	390,277	40,724		46,896	Phthalate ester
29	Androst-5,15-dien-3ol acetate	314,225		0,648		Steroid
30	Cholest-4-en-3-one, 14-methyl-	398,355		0,335		Steroid
31	Campesterol	400,371			1,391	Steroid

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
32	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl-	400,371		5,223		Steroid
33	Spinasterone	410,355		0,386		Steroid
34	Stigmasterol	412,371		7,983	1,908	Steroid
35	Stigmasterol, 22,23-dihydro-2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene,	414,386	12,828	6,061	1,321	Steroid
36	2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	410,391			0,665	Triterpenoid

Bảng P2.4. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa NTH giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	Decane, 3,8-dimethyl-	170,203	0,447			Aliphatic hydrocarbon
2	7-Tetradecyne	194,203			0,558	Aliphatic hydrocarbon
3	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969			0,714	Benzaldehyde
4	Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane, 1(22),7(16)-diepoxy-	444,397			5,263	Cyclic ether
5	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094			2,895	Cyclic hydrocarbon
6	Phytol	296,308	26,169	22,473	26,851	Diterpenoid
7	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		1,818		Fatty acid amide
8	Methyl tetradecanoate	242,225			0,623	Fatty acid ester
9	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	17,003		1,873	Fatty acid ester
10	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	294,256	0,641		0,658	Fatty acid ester
11	9-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272	0,967		2,573	Fatty acid ester
12	10-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272		0,55		Fatty acid ester
13	Octadecanoic acid, methyl ester	298,287	0,443		1,045	Fatty acid ester
14	Tetradecanenitrile	209,214			1,515	Fatty nitrile
15	.gamma.-Tocopherol	416,365	2,899	1,463		Meroterpenoid
16	Vitamin E	430,381	1,338	5,503	1,394	Meroterpenoid
17	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	1,178	0,488		Monoterpenoid

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
18	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115			0,538	Phenol
19	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	48,915	47,731	50,216	Phthalate ester
20	Campesterol	400,371		4,549	1,039	Steroid
21	Stigmasterol	412,371		8,664	1,357	Steroid
22	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386		6,759	0,889	Steroid

Bảng P2.5. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa HLA giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	Benzenamine, N-phenyl-	169,089			0,669	Aliphatic Amine
2	3-Octene, (Z)-	112,125		44,992		Aliphatic hydrocarbon
3	8-Hexadecyne	222,235			0,709	Aliphatic hydrocarbon
4	7-Hexadecene, (Z)-	224,25			0,805	Aliphatic hydrocarbon
5	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4- trichloromethylbenzaldehyd e	401,969			1,745	Benzaldehyde
6	Trichloroacetic acid, tetradecyl ester	358,123			0,852	Carboxylic acid ester
7	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094			4,617	Cyclic hydrocarbon
8	Cyclohexadecane	224,25			1,024	Cyclic hydrocarbon
9	Phytol	296,308	48,104	21,533	44,073	Diterpenoid
10	3,7,11,15-Tetramethyl-2- hexadecen-1-ol	296,308	0,683			Diterpenoid
11	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		1,66	0,771	Fatty acid amide
12	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272	1,06		0,376	Fatty acid amide
13	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	1,178			Fatty acid ester
14	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	1,747		1,525	Fatty acid ester
15	cis,cis,cis-7,10,13- Hexadecatrienal	234,198			0,397	Fatty aldehyde
16	Tetradecanenitrile	209,214			2,103	Fatty nitrile
17	Octadecanenitrile	265,277			0,42	Fatty nitrile
18	S-[2-[N,N- Dimethylamino]ethyl]morp holine-N-	261,115			0,494	Heterocyclic compound

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
	carbonylthiocarbohydroxim ate					
19	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	324,303			0,454	Meroterpenoid
20	.gamma.-Tocopherol	416,365		4,65		Meroterpenoid
21	Vitamin E	430,381	1,498	7,526		Meroterpenoid
22	Vitamin E	430,381			1,99	Meroterpenoid
23	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	1,906	0,585	0,411	Monoterpenoid
24	Benzene, 1-methyl-3-[(2-methylpropyl)thio]-	180,097	0,679		0,622	Phenol
25	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	278,152			0,43	Phthalate ester
26	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	32,282		31,385	Phthalate ester
27	Campesterol	400,371		4,676		Steroid
28	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl-	400,371			0,9	Steroid
29	Stigmasterol	412,371		7,928	1,394	Steroid
30	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	10,863	6,45	1,038	Steroid
31	1-{2-[3-Methyl-3-(5-methyl-furan-2-yl)-butyl]-oxiran-2-yl}-ethanone	236,141			0,418	Terpene ketone
32	Squalene	410,391			0,38	Triterpenoid

Bảng P2.6. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa NTI giai đoạn tuần 1, 3 và 5

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
1	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969			2,031	Benzaldehyde
2	8-Oxabicyclo[5.1.0]oct-5-en-2-ol, 1,4,4-trimethyl-	168,115			1,502	Cyclic ether
3	Cyclooctene, 3-ethenyl-	136,125			5,168	Cyclic hydrocarbon
4	Phytol	296,308	29,776	4,605	38,765	Diterpenoid
5	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296,308		21,075		Diterpenoid
6	13-Docosenamide, (Z)-	337,334		1,722	0,877	Fatty acid amide

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak			Phân loại hoá học/Bản chất
			Tuần 1	Tuần 3	Tuần 5	
7	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24			2,927	Fatty acid ester
8	Tetradecanenitrile	209,214			1,644	Fatty nitrile
9	Octadecanenitrile	265,277	0,761			Fatty nitrile
10	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115	1,093		0,932	Heterocyclic compound
11	.gamma.-Tocopherol	416,365		2,623		Meroterpenoid
12	Vitamin E	430,381	2,767	3,197	2,53	Meroterpenoid
13	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	0,881			Monoterpenoid
14	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115	0,945			Phenol
15	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	46,244	53,618	38,302	Phthalate ester
16	Campesterol	400,371		3,407		Steroid
17	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl-	400,371			1,507	Steroid
18	Stigmasterol	412,371	7,122	5,273		Steroid
19	Stigmasta-4,22-dien-3.beta.-ol	412,371			2,24	Steroid
20	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	10,411	3,874	1,574	Steroid
21	Squalene	410,391		0,606		Triterpenoid

Bảng P2.7. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa IR504 trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	3-Octene, (E)-	112,125		39,867	Alkene
2	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094	1,809		Cyclic hydrocarbon
3	Phytol	296,308	24,925		Diterpenoid
4	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280,24	0,816		Fatty acid
5	6-Octadecenoic acid, (Z)-	282,256	1,107		Fatty acid
6	2-Chloroethyl linoleate	342,233	0,452		Fatty acid
7	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272	0,631	3,181	Fatty acid amide
8	7,10-Hexadecadienoic acid, methyl ester	266,225	0,642		Fatty acid ester
9	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	0,586	8,534	Fatty acid ester
10	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	2,11		Fatty acid ester

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
11	9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	294,256		4,854	Fatty acid ester
12	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	294,256	1,778		Fatty acid ester
13	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-	296,272		11,607	Fatty acid ester
14	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	354,277	1,471		Fatty acid ester
15	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester	354,277	0,647		Fatty acid ester
16	9,12,15-Octadecatrien-1-ol, (Z,Z,Z)-	264,245	0,922		Fatty alcohol
17	9-Octadecenal, (Z)-	266,261	1,967		Fatty aldehyde
18	Tetradecanenitrile	209,214	1,143		Fatty nitrile
19	1-Oxaspiro[4.5]decan-2-one, 6-isopropenyl-9-methyl-	208,146	0,483		Heterocyclic compound
20	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115	1,015		Heterocyclic compound
21	Vitamin E	430,381	2,489		Meroterpenoid
22	Morphinan, 7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methyl-3,6-bis[(trimethylsilyl)oxy]-, (5.alpha.,6.alpha.)-	429,216		2,485	Morphinan alkaloid
23	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	666,169		15,311	Organosiloxane
24	Benzene, 1-methyl-3-[(2-methylpropyl)thio]-	180,097	0,569		Phenol
25	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester	278,152		2,179	Phthalate ester
26	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	43,163		Phthalate ester
27	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	390,277	0,472		Phthalate ester
28	Campesterol	400,371	1,78		Steroid
29	Stigmasterol	412,371	1,397		Steroid
30	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	1,675		Steroid
31	Cholest-5-en-24-one, 3-(acetyloxy)-, (3.beta.)-	442,345	0,639		Steroid
32	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268,277		2,38	Terpene ketone
33	Squalene	410,391	0,502	9,602	Triterpenoid
34	9,19-Cyclolanostan-3-ol, 24-methylene-, (3.beta.)-	440,402	3,693		Triterpenoid
35	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, acetate, (3.beta.)-	468,397	1,114		Triterpenoid

Bảng P2.8. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa NTH trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	7-Tetradecyne	194,203	0,558		Aliphatic hydrocarbon
2	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969	0,714		Benzaldehyde
3	Tricyclo[20.8.0.0(7,16)]triacontane, 1(22),7(16)-diepoxy-	444,397	5,263		Cyclic ether
4	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094	2,895		Cyclic hydrocarbon
5	Phytol	296,308	26,851		Diterpenoid
6	n-Hexadecanoic acid	256,24		4,649	Fatty Acid
7	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280,24		4,144	Fatty Acid
8	Methyl tetradecanoate	242,225	0,623		Fatty acid ester
9	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256	1,873		Fatty acid ester
10	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	270,256		5,699	Fatty acid ester
11	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	294,256	0,658	2,741	Fatty acid ester
12	9-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272	2,573		Fatty acid ester
13	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	296,272		6,386	Fatty acid ester
14	Octadecanoic acid, methyl ester	298,287	1,045		Fatty acid ester
15	2-Butenedioic acid (E)-, bis(2-ethylhexyl) ester	340,261		10,229	Fatty acid ester
16	9,17-Octadecadienal, (Z)-	264,245		4,178	Fatty aldehyde
17	Tetradecanenitrile	209,214	1,515		Fatty nitrile
18	Vitamin E	430,381	1,394		Meroterpenoid
19	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115	0,538		Phenol
20	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	50,216		Phthalate ester
21	1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	396,324		43,957	Phthalate ester derivative
22	Campesterol	400,371	1,039		Steroid
23	Stigmasterol	412,371	1,357		Steroid
24	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	0,889		Steroid
25	Squalene	410,391		18,018	Triterpenoid

Bảng P2.9. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa TNG trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	3-Octene, (Z)-	112,125		29,137	Aliphatic hydrocarbon
2	1-Pentanol, (methylenecyclopropyl)-	5- 140,12	0,519		Alkyl alcohol

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
3	Benzaldehyde, 4-propyl-	148,089		4,074	Benzaldehyde
4	1,3,6,9b-Tetraazaphenalene-4-carbonitrile, 7-bromo-2-(bromomethyl)-	364,891	0,593		Carbonitrile
5	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094	1,927		Cyclic hydrocarbon
6	Cyclododecane	168,188	1,04		Cyclic hydrocarbon
7	Phytol	296,308	32,317		Diterpenoid
8	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296,308	2,118		Diterpenoid
9	13-Docosenamide, (Z)-	337,334	0,541		Fatty acid amide
10	Decanoic acid, ethyl ester	200,178		1,478	Fatty acid ester
11	Dodecanoic acid, ethyl ester	228,209		8,331	Fatty acid ester
12	Tetradecanoic acid, ethyl ester	256,24		3,554	Fatty acid ester
13	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256		4,885	Fatty acid ester
14	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	270,256	0,738		Fatty acid ester
15	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284,272		14,524	Fatty acid ester
16	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	1,953		Fatty acid ester
17	10,13-Octadecadienoic acid, methyl ester	294,256	0,735		Fatty acid ester
18	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	294,256		2,882	Fatty acid ester
19	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	296,272		6,235	Fatty acid ester
20	Ethyl Oleate	310,287		2,929	Fatty acid ester
21	Octadecanoic acid, ethyl ester	312,303		8,066	Fatty acid ester
22	Octadecanal	268,277		1,817	Fatty aldehyde
23	Tetradecanenitrile	209,214	1,509		Fatty nitrile
24	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272		3,514	Fatty acid amide
25	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115	0,923		Heterocyclic compound
26	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olide	324,303	0,554		Meroterpenoid
27	Vitamin E	430,381	0,974		Meroterpenoid
28	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	0,595		Monoterpenoid
29	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115	0,785		Phenol
30	1,3-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	390,277	46,896		Phthalate ester
31	Campesterol	400,371	1,391		Steroid
32	Stigmasterol	412,371	1,908		Steroid

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
33	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	1,321		Steroid
34	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268,277		1,946	Terpene ketone
35	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	410,391	0,665		Triterpenoid
36	Squalene	410,391		6,628	Triterpenoid

Bảng P2.10. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa HLA trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	Benzenamine, N-phenyl-	169,089	0,669		Aliphatic Amine
2	8-Hexadecyne	222,235	0,709		Aliphatic hydrocarbon
3	7-Hexadecene, (Z)-	224,25	0,805		Aliphatic hydrocarbon
4	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4- trichloromethylbenzaldehyde	401,969	1,745		Benzaldehyde
5	Trichloroacetic acid, tetradecyl ester	358,123	0,852		Carboxylic acid ester
6	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094	4,617		Cyclic hydrocarbon
7	Cyclohexadecane	224,25	1,024		Cyclic hydrocarbon
8	Phytol	296,308	44,073		Diterpenoid
9	13-Docosenamide, (Z)-	337,334	0,771		Fatty acid amide
10	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	270,256		2,383	Fatty acid ester
11	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	1,525		Fatty acid ester
12	11-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	296,272		2,949	Fatty acid ester
13	2-Butenedioic acid (E)-, bis(2- ethylhexyl) ester	340,261		11,892	Fatty acid ester
14	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	234,198	0,397		Fatty aldehyde
15	Tetradecanenitrile	209,214	2,103		Fatty nitrile
16	Octadecanenitrile	265,277	0,42		Fatty nitrile
17	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272	0,376		Fatty acid amide
18	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N- carbonylthiocarbohydroximate	261,115	0,494		Heterocyclic compound
19	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4- olide	324,303	0,454		Meroterpenoid
20	Vitamin E	430,381	1,99		Meroterpenoid

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
21	Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha.)-	138,141	0,411		Monoterpenoid
22	Benzene, 1-methyl-3-[(2-methylpropyl)thio]-	180,097	0,622		Phenol
23	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono(2-ethylhexyl) ester	278,152	0,43		Phthalate ester
24	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	31,385		Phthalate ester
25	1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	396,324		46,997	Phthalate ester derivative
26	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl-	400,371	0,9		Steroid
27	Stigmasterol	412,371	1,394		Steroid
28	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	1,038		Steroid
29	1-{2-[3-Methyl-3-(5-methyl-furan-2-yl)-butyl]-oxiran-2-yl}-ethanone	236,141	0,418		Terpene ketone
30	Squalene	410,391	0,38		Triterpenoid
31	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-	410,391		35,779	Triterpenoid

Bảng P2.11. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa NTI trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	3-Octene, (Z)-	112,125		19,166	Aliphatic hydrocarbon
2	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969	2,031		Benzaldehyde
3	8-Oxabicyclo[5.1.0]oct-5-en-2-ol, 1,4,4-trimethyl-	168,115	1,502		Cyclic ether
4	Cyclooctene, 3-ethenyl-	136,125	5,168		Cyclic hydrocarbon
5	Phytol	296,308	38,765		Diterpenoid
6	13-Docosenamide, (Z)-	337,334	0,877		Fatty acid amide
7	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	270,256		20,52	Fatty acid ester
8	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284,272		1,99	Fatty acid ester
9	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	2,927		Fatty acid ester
10	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	294,256		11,4	Fatty acid ester
11	8-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272		32,11	Fatty acid ester
12	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	296,272		1,802	Fatty acid ester
13	Octadecanoic acid, methyl ester	298,287		5,903	Fatty acid ester
14	Ethyl Oleate	310,287		2	Fatty acid ester
15	Tetradecanenitrile	209,214	1,644		Fatty nitrile

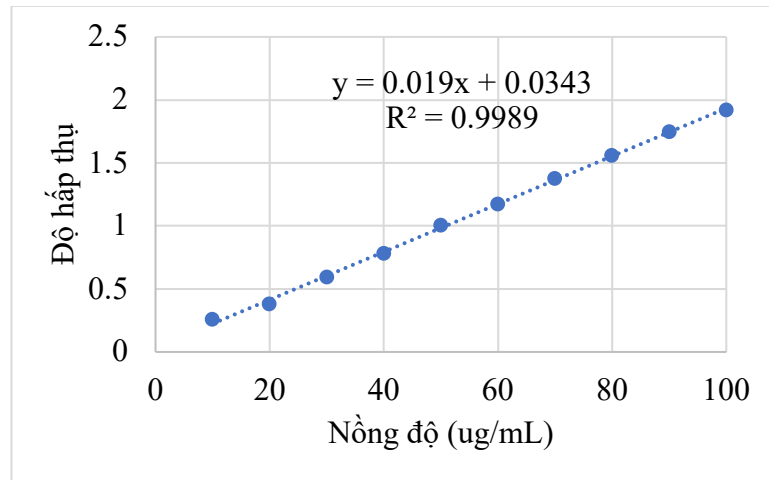
Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
16	S-[2-[N,N-Dimethylamino]ethyl]morpholine-N-carbonylthiocarbohydroximate	261,115	0,932		Heterocyclic compound
17	Vitamin E	430,381	2,53		Meroterpenoid
18	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	38,302		Phthalate ester
19	5-Cholestene-3-ol, 24-methyl-	400,371	1,507		Steroid
20	Stigmasta-4,22-dien-3.beta.-ol	412,371	2,24		Steroid
21	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	1,574		Steroid
22	Squalene	410,391		5,109	Triterpenoid

Bảng P2.12. Kết quả phân tích GC-MS của giống lúa Huyết Rồng trong điều kiện che sáng và không che sáng

Số tt	Tên hợp chất thu được	Trọng lượng phân tử (amu)	% diện tích peak		Phân loại hoá học/Bản chất
			Không che	Che 2 lớp	
1	Ethanamine, 2,2'-oxybis[N,N-dimethyl-	160,158	0,878		Aliphatic Amine
2	1-Hexene, 4-ethyl-	112,125		13,521	Aliphatic hydrocarbon
3	2,4-Dinitrophenyl hydrazone of 4-trichloromethylbenzaldehyde	401,969	2,495		Benzaldehyde
4	Bicyclo[5.1.0]oct-3-ene	108,094	3,4		Cyclic hydrocarbon
5	Phytol	296,308	44,517		Diterpenoid
6	Hexadecanoic acid, methyl ester	270,256		5,705	Fatty acid ester
7	Propanedioic acid, 1,3-dithiolan-2-ylidene-, bis(1-methylethyl) ester	290,065		3,611	Fatty acid ester
8	9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)-	292,24	2,194		Fatty acid ester
9	9-Octadecenoic acid, methyl ester	296,272		6,112	Fatty acid ester
10	Tetradecanenitrile	209,214	2,164		Fatty nitrile
11	9-Octadecenamide, (Z)-	281,272		2,941	Fatty acid amide
12	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	666,169		2,93	Organosiloxane
13	1,3-Benzenediol, 5-pentyl-	180,115	0,854		Phenol
14	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390,277	39,397		Phthalate ester
15	1,2-Cyclohexanedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	396,324		57,411	Phthalate ester derivative
16	Campesterol	400,371	1,263		Steroid
17	Stigmasterol	412,371	1,547		Steroid
18	Stigmasterol, 22,23-dihydro-	414,386	1,29		Steroid
19	Squalene	410,391		7,77	Triterpenoid

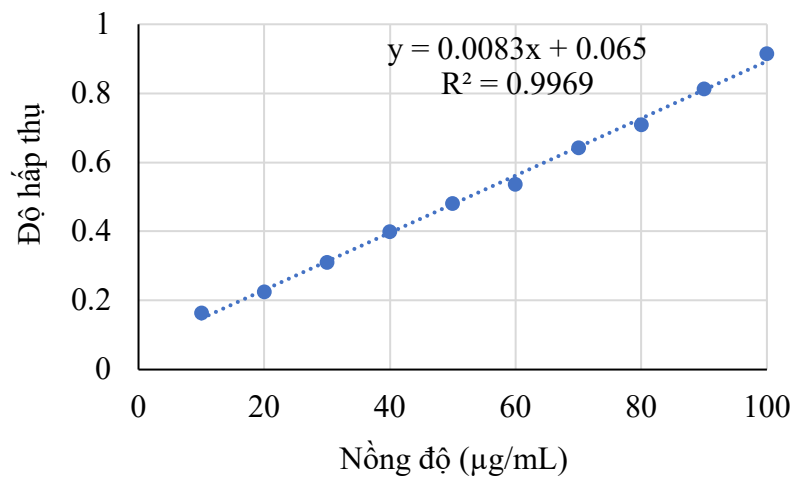
2.2. Các hình ảnh và số liệu về quá trình chế biến bột lá lúa

Định lượng Flavonoids tổng



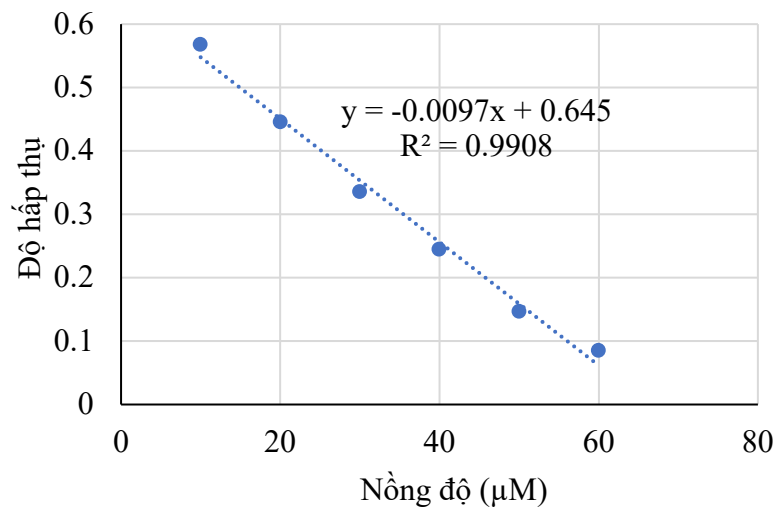
Hình P2.20. Đường chuẩn Quercetin

Định lượng polyphenol tổng

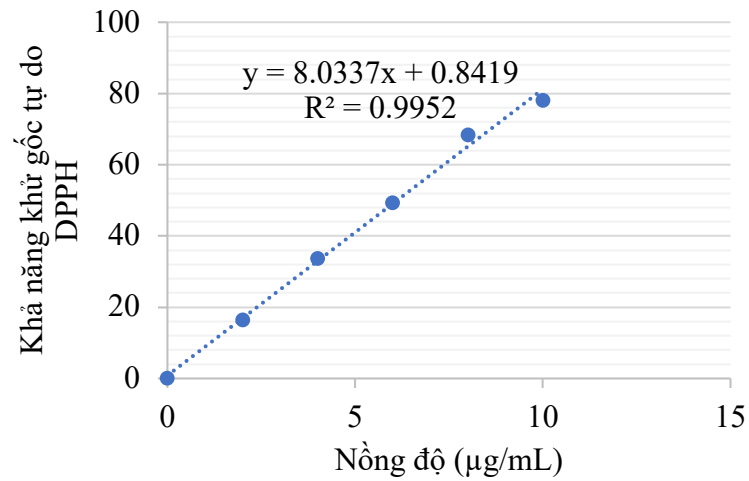


Hình P2.21. Phương trình đường chuẩn gallic acid định lượng polyphenol

Phân tích hoạt tính DPPH



Hình P2.22 Phương trình đường chuẩn Trolox phân tích hoạt tính DPPH



Hình P2.23. Phương trình đường chuẩn ascorbic acid trong thử nghiệm DPPH



Hình P2.24. Bột lá lúa non (2kg)

2.1. Số liệu thô đo OD hoạt tính kháng khuẩn/kháng nấm

	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3
8000	0	0	0	0.014	0.025	0.02
4000	0.024	0.02	0.017	0.057	0.054	0.055
2000	0.097	0.1	0.093	0.121	0.126	0.125
1000	0.166	0.161	0.155	0.16	0.164	0.162
500	0.303	0.329	0.317	0.341	0.359	0.376
0	0.366	0.368	0.362	0.396	0.407	0.37
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Candida albicans</i>		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 1	Lần 2	Lần 3

8000	0.004	0.015	0.01	0.329	0.319	0.349
4000	0.047	0.044	0.045	0.319	0.301	0.309
2000	0.111	0.116	0.115	0.369	0.377	0.43
1000	0.15	0.154	0.152	0.432	0.43	0.506
500	0.231	0.229	0.226	0.54	0.536	0.538
0	0.316	0.327	0.32	0.729	0.719	0.728

2.4. Đánh giá tác động của bột lá lúa lên hệ vi sinh vật đường ruột ở chuột

Bảng P2.13. Mật số vi khuẩn LAB và AeB theo đơn vị CFU/mL

Nhóm	VK lactic (CFU/mL) $\pm$ SD	VK hiếu khí (CFU/mL) $\pm$ SD
PCDC	$2.47 \times 10^6 \pm 1.65 \times 10^5$	$2.15 \times 10^7 \pm 2.05 \times 10^6$
PC150	$2.38 \times 10^8 \pm 1.06 \times 10^7$	$2.94 \times 10^8 \pm 9.40 \times 10^6$
PC300	$2.84 \times 10^7 \pm 9.49 \times 10^5$	$2.38 \times 10^8 \pm 1.06 \times 10^7$

Bảng P2.14. Sự giống nhau và khác nhau về mức độ biểu hiện trong 20 con đường chuyển hóa (KEGG Metacyc) cao nhất giữa nhóm đối chứng và nhóm BLL

Mã số	Con đường trao đổi chất	Phân loại
Con đường chung (PCDC, PC150 & PC300)		
PWY-7663	Tổng hợp gondooate (kỵ khí)	Tổng hợp lipid và acid béo (Chuyển hoá lipid)
PWY-5667	Tổng hợp CDP-diacylglycerol I	Tổng hợp lipid và acid béo (Chuyển hoá lipid)
PWY0-1319	Tổng hợp CDP-diacylglycerol II	Tổng hợp lipid và acid béo (Chuyển hoá lipid)
PWY-5973	Tổng hợp cis-vaccenate	Tổng hợp lipid và acid béo (Chuyển hoá lipid)
PWY-7111	Lên men pyruvate thành isobutanol (biến đổi)	Tổng hợp hợp chất thứ cấp
NONOXIPEN T-PWY	Con đường pentose phosphate (nhánh không oxy hóa)	Chuyển hoá carbohydrate và năng lượng
GLYCOLYSIS	Đường phân I (từ glucose 6-phosphate)	Đường phân/Tân tạo glucose mới (Chuyển hóa carbohydrate)
CALVIN-PWY	Chu trình Calvin-Benson-Bassham	Tổng hợp đường (Chuyển hóa carbohydrate)
ANAGLYCOLYSIS-PWY	Đường phân III (từ glucose)	Đường phân/Tân tạo glucose mới (Chuyển hóa carbohydrate)
PWY-7229	Siêu con đường tổng hợp de novo nucleotide adenosine I	Tổng hợp nucleoside và nucleotide

Mã số	Con đường trao đổi chất	Phân loại
PWY-7219	Tổng hợp de novo adenosine ribonucleotide	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-7208	Siêu con đường tái chế pyrimidine nucleobase	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-6126	Siêu con đường tổng hợp de novo nucleotide adenosine II	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-5101	Tổng hợp L-isoleucine II	Tổng hợp amino acid (chuyển hoá protein)
Con đường biểu hiện tăng cường ở PC150		
PWY-621	Phân giải sucrose III (sucrose invertase)	Phân giải carbohydrate (Chuyển hóa carbohydrate)
PWY-5484	Đường phân II (từ fructose 6-phosphate)	Đường phân/Tân tạo glucose mới (Chuyển hóa carbohydrate)
ANAEROFRU CAT-PWY	Lên men lactic đồng hình	Chuyển hoá carbohydrate và năng lượng
PWY-3781	Hô hấp hiếu khí I (cytochrome c)	Chuyển hoá carbohydrate và năng lượng
PHOSLIPSYN -PWY	Siêu con đường tổng hợp phospholipid I (vi khuẩn)	Chuyển hoá lipid
FASYN- ELONG-PWY	Kéo dài acid béo – bão hòa	Chuyển hoá lipid
Con đường biểu hiện tăng cường ở PC300		
PWY-5104	Tổng hợp L-isoleucine IV	Tổng hợp amino acid (chuyển hoá protein)
ILEUSYN- PWY	Tổng hợp L-isoleucine I (từ threonine)	Tổng hợp amino acid (chuyển hoá protein)
VALSYN- PWY	Tổng hợp L-valine	Tổng hợp amino acid (chuyển hoá protein)
BRANCHED- CHAIN-AA- SYN-PWY	Siêu con đường tổng hợp amino acid chuỗi nhánh	Tổng hợp amino acid (chuyển hoá protein)
Con đường biểu hiện tăng cường ở PCDC		
PWY-5686	Tổng hợp UMP	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-6122	Tổng hợp 5-aminoimidazole ribonucleotide II	Tổng hợp nucleoside và nucleotide

Mã số	Con đường trao đổi chất	Phân loại
PWY-6277	Siêu con đường tổng hợp 5-aminoimidazole ribonucleotide	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-6121	Tổng hợp 5-aminoimidazole ribonucleotide I	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
Con đường trao đổi chung (PC300 và PCDC)		
PWY-7220	Tổng hợp de novo adenosine deoxyribonucleotide II	Tổng hợp nucleoside và nucleotide
PWY-7222	Tổng hợp de novo guanosine deoxyribonucleotide II	Tổng hợp nucleoside và nucleotide

Bảng P2.15. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến quá trình oxy hóa lipid và phân hủy acid béo

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K00232	E1.3.3.6, ACOX1, ACOX3; acyl-CoA oxidase [EC:1.3.3.6]	225,33	0	3
K00249	ACADM, acd; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.7]	2815,39	286	263
K00255	ACADL; long-chain-acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.8.8]	2038,84	0	10
EC:1.3.8.7	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	2815,39	286	263
K01782	fadJ; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3]	6127,47	570,33	119,86
K01825	fadB; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase [EC:1.1.1.35 4.2.1.17 5.1.2.3 5.3.3.8]	6228,47	570,33	88,86
K06445	fadE; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-]	6162,47	570,33	160,86

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K06446	DCAA; acyl-CoA dehydrogenase [EC:1.3.99.-]	537	447,5	259
K07516	fadN; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [EC:1.1.1.35]	3120,19	934,5	1038,75
K09456	aidB; putative acyl-CoA dehydrogenase	5489,97	577,83	134,86
EC:1.1.1.3 5	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	15602,13	2466,16	1698,47

Bảng P2.16. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến sự phân hủy glycogen và sự phân hủy lipid

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K00627	DLAT, aceF, pdhC; pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase) [EC:2.3.1.12]	16103,94	6678,5	7962,52
K00638	catB; chloramphenicol O- acetyltransferase type B [EC:2.3.1.28]	990,16	69	374
K00641	metX; homoserine O- acetyltransferase/O- succinyltransferase [EC:2.3.1.31 2.3.1.46]	4968,6	757,67	4773,91
K00663	aacA; aminoglycoside 6'-N- acetyltransferase [EC:2.3.1.82]	67	0	0
K00675	nhoA; N-hydroxyarylamine O- acetyltransferase [EC:2.3.1.118]	4563,8	674,33	136,86
K00680	ytmI; uncharacterized N- acetyltransferase [EC:2.3.1.-]	9796,01	8142,75	9724,42
EC:2.3.1.178	Diaminobutyrate acetyltransferase	259,83	0	10
K04844	ycjT; hypothetical glycosyl hydrolase [EC:3.2.1.-]	4281,63	2642,62	2075,88

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K03928	yvaK; carboxylesterase [EC:3.1.1.1]	7053,54	4448,5	3584
K06999	K06999; phospholipase/carboxylesterase	11549,12	1143,66	722,86

Bảng P2.17. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến sự phân hủy lipid

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K00005	gldA; glycerol dehydrogenase [EC:1.1.1.6]	12524,09	11846,98	12168,57
GOLPDL AT-PWY	superpathway of glycerol degradation to 1,3-propanediol	1657,18	2,4	124,55
K00112	glpB; glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B [EC:1.1.5.3]	5039,16	4268,5	3713,65
K00113	glpC; glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C [EC:1.1.5.3]	5061,16	4323,5	3713,65
EC:1.1.1.94	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)(+))	21176,49	26193,7	46971,1
EC:1.1.3.21	Glycerol-3-phosphate oxidase	1077,5	46	61
PWY-7003	glycerol degradation to butanol	8894,81	4770,74	3191,93
K00631	plsB; glycerol-3-phosphate O- acyltransferase [EC:2.3.1.15]	6976,47	571,5	149,52
K00635	E2.3.1.20; diacylglycerol O- acyltransferase [EC:2.3.1.20]	1106,17	0	9
K00712	tagE; poly(glycerol-phosphate) alpha-glucosyltransferase [EC:2.4.1.52]	5776,36	246,25	610
K00980	tagD; glycerol-3-phosphate cytidyltransferase [EC:2.7.7.39]	5785,05	4231,25	2818,75

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K01046	lip, TGL2; triacylglycerol lipase [EC:3.1.1.3]	3243,82	993,75	1762,67
EC:2.3.1.20	Diacylglycerol O-acyltransferase	1524,02	10	11,75
K01521	cdh; CDP-diacylglycerol pyrophosphatase [EC:3.6.1.26]	4482,3	570,33	52,86
EC:2.7.1.10 7	Diacylglycerol kinase (ATP)	18919,08	15125,7	18606,55
EC:2.7.7.39	Glycerol-3-phosphate cytidyltransferase	5785,05	4231,25	2818,75
EC:2.7.8.20	Phosphatidylglycerol-- membrane-oligosaccharide glycerophosphotransferase	15639,83	6382,48	2269,66
EC:3.1.1.3	Triacylglycerol lipase	3243,82	993,75	1762,67
EC:3.1.3.81	Diacylglycerol diphosphate phosphatase	5864,97	571,5	149,52
EC:3.6.1.26	CDP-diacylglycerol diphosphatase	4482,3	570,33	52,86
EC:4.2.1.30	Glycerol dehydratase	1039,02	0	66
K05813	ugpB; sn-glycerol 3-phosphate transport system substrate- binding protein	5489,36	2669,14	2486,87
K05814	ugpA; sn-glycerol 3-phosphate transport system permease protein	5476,36	3613,14	4249,87
K05815	ugpE; sn-glycerol 3-phosphate transport system permease protein	5476,36	3148,64	3435,87
K05816	ugpC; sn-glycerol 3-phosphate transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.20]	4797,2	1054,83	300,86
K06120	dhaB; glycerol dehydratase large subunit [EC:4.2.1.30]	346,34	0	33
K06121	dhbC; glycerol dehydratase medium subunit [EC:4.2.1.30]	346,34	0	33

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K06122	dhbE; glycerol dehydratase small subunit [EC:4.2.1.30]	346,34	0	0
K07029	dagK; diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]	9205,86	4513,25	858
K13498	trpCF; indole-3-glycerol phosphate synthase / phosphoribosylanthranilate isomerase [EC:4.1.1.48 5.3.1.24]	5478,71	984,5	852,27

Bảng P2.18. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến sự tổng hợp acid béo và lipid

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
PWY0-1319	CDP-diacylglycerol biosynthesis II	28125,37	31930,83	53876,32
PWY4FS-7	phosphatidylglycerol biosynthesis I (plastidic)	23408	27992,1	42857,27
PWY4FS-8	phosphatidylglycerol biosynthesis II (non-plastidic)	23408	27992,1	42857,27
K00864	glpK, GK; glycerol kinase [EC:2.7.1.30]	19294,91	26067,71	37172,73
K00901	dgkA, DGK; diacylglycerol kinase (ATP) [EC:2.7.1.107]	9675,22	10443,45	16960,55
K00995	pgsA, PGS1; CDP-diacylglycerol---glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase [EC:2.7.8.5]	18686,76	22959,01	30516,29
K01002	mdoB; phosphoglycerol transferase [EC:2.7.8.20]	4761,8	3742,33	1214,86
EC:2.3.1.15	Glycerol-3-phosphate 1-O-acyltransferase	41978,56	46794,2	65484,22
EC:2.3.1.51	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase	24908,09	31772,6	59427,32

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K03621	plsX; glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsX [EC:2.3.1.15]	16846,99	22328,85	31671,85
K00057	gpsA; glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)+) [EC:1.1.1.94]	21176,49	26193,7	46971,1

Bảng P2.19. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến quá trình chuyển hóa catechol từ polyphenol (catechin và phenolic acid)

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
PWY-5415	Phân hủy catechol I (con đường cắt meta)	1165,41	1037,18	292,25
PWY-5417	Phân hủy catechol III (con đường cắt ortho)	2283,45	0	92,13
PWY-5419	Phân hủy catechol thành 2- oxopent-4-enoate II	157,26	0	33,65
PWY-5420	Phân hủy catechol II (con đường cắt meta)	248,74	0	57,95
PWY-5430	Con đường cắt meta của các hợp chất thơm	70,74	0	51,99
PWY-5431	Phân hủy các hợp chất thơm qua β -ketoadipate	2283,45	0	92,13
CATECHOL				
-ORTHO- CLEAVAGE	Phân hủy catechol thành β - ketoadipate	2105,13	2	96,86
-PWY				
PWY-5178	Phân hủy toluen IV (hiếu khí) (thông qua catechol)	416,69	0	64,03
EC:1.13.11.1	Catechol 1,2-dioxygenase	1923,61	2	93,75
EC:1.13.11.2	Catechol 2,3-dioxygenase	7609,34	1414,5	131,75
PWY-6185	Phân hủy 4-methylcatechol (cắt ortho)	1856,09	0	20,3
K00446	dmpB, xylE; catechol 2,3- dioxygenase [EC:1.13.11.2]	426,6	2	37,75
K03381	catA; catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	1923,61	2	93,75
K07104	catE; catechol 2,3-dioxygenase [EC:1.13.11.2]	7182,74	1412,5	94
K15973	mhqR; Bộ điều hòa phiên mã họ MarR, chất ức chế regulon kháng 2-MHQ và catechol	4962,05	993,56	1763,01

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K16090	fii; thụ thể siderophore dạng catecholate	7185,16	583,66	183
PROTOCAT ECHUATE- ORTHO- CLEAVAGE -PWY	Phân hủy protocatechuate II (con đường cắt ortho)	2251,68	3,2	165,85
EC:1.13.11.3	Protocatechuate 3,4-dioxygenase	1474,22	4	113,5
K00448	pcaG; protocatechuate 3,4-dioxygenase, tiểu đơn vị alpha [EC:1.13.11.3]	720,11	2	56,75
K00449	pcaH; protocatechuate 3,4-dioxygenase, tiểu đơn vị beta [EC:1.13.11.3]	748,11	2	56,75
K00216	entA; 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase [EC:1.3.1.28]	4513,8	570,33	55,86
EC:1.13.11.1 4	2,3-dihydroxybenzoate 3,4-dioxygenase	14	0	0
EC:1.3.1.28	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	4513,8	570,33	55,86
K02363	entE, dhbE, vibE, mxoE; 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [EC:6.3.2.14 2.7.7.58]	4513,8	570,33	56,86
K10621	cmtC, dhbA; 2,3-dihydroxy-p-cumate/2,3-dihydroxybenzoate 3,4-dioxygenase [EC:1.13.11.-1.13.11.14]	14	0	0
K14333	DHBD; 2,3-dihydroxybenzoate decarboxylase [EC:4.1.1.46]	0	0	33
K09483	quiC; 3-dehydroshikimate dehydratase [EC:4.2.1.118]	30,17	0	0
EC:4.2.1.118	3-dehydroshikimate dehydratase	30,17	0	0
K08172	shiA; Bộ vận chuyển MFS, họ MHS, protein vận chuyển shikimate và dehydroshikimate	4449,63	583,66	52,86

Bảng P2.20. Hồ sơ dự đoán chức năng liên quan đến quá trình chuyển hóa catechol từ glucose

Mã số	Hồ sơ dự đoán chức năng (KEGG)	Độ phong phú (%)		
		PC150	PC300	PCDC
K13832	aroDE, DHQ-SDH; 3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase [EC:4.2.1.10 1.1.1.25]	0	17	0
K03785	aroD; 3-dehydroquinate dehydratase I [EC:4.2.1.10]	12086,99	8242,92	4818,7
K13832	aroDE, DHQ-SDH; 3-dehydroquinate dehydratase / shikimate dehydrogenase [EC:4.2.1.10 1.1.1.25]	0	17	0
EC:1.4.1.24	3-dehydroquinate synthase II	150	4178,5	3467,5
K01735	aroB; 3-dehydroquinate synthase [EC:4.2.3.4]	18293,74	22328,2	43338,52
EC:4.2.1.10	3-dehydroquinate dehydratase	19703,75	25988,2	46578,77
EC:4.2.3.4	3-dehydroquinate synthase	18445,74	22495,45	43348,52
K03786	aroQ, qutE; 3-dehydroquinate dehydratase II [EC:4.2.1.10]	7817,75	18140,28	42000,07
K11646	K11646; 3-dehydroquinate synthase II [EC:1.4.1.24]	150	4178,5	3467,5
K13829	aroKB; shikimate kinase / 3-dehydroquinate synthase [EC:2.7.1.71 4.2.3.4]	67,5	22,25	60,75
PWY-6163	chorismate biosynthesis from 3-dehydroquinate	20111,41	28469,9	50951,96

PHỤ LỤC 3. Kết quả phân tích các chỉ số

1. Kết quả phân tích mẫu đất trồng lúa



PHÒNG TNCS
Đường 3 tháng 2 TP. Cần Thơ
ĐT: 02923.834127

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập-Tự do-Hạnh phúc

PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM

Số: 24/29/06/2022

1. Nơi gởi mẫu (đơn vị, cá nhân) : **Đặng Chí Thiện**
 2. Loại mẫu : Đất ruộng
 3. Số lượng mẫu : 01
 4. Ngày nhận mẫu : 07/06/22
 5. Tình trạng mẫu : ướt
 6. Ngày thử nghiệm : 08/06/22
 7. Lưu mẫu : không
 8. Lấy mẫu thử nghiệm tại hiện trường : không
 9. Kết quả thử nghiệm :

STT	TÊN CHỈ TIÊU	PHƯƠNG PHÁP THỬ	KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM	
			Đơn vị	Kết quả
1	pH	Soil analysis procedures	-	5.47
2	EC		µS/cm	92
3	CHC		%	3.04
4	N tổng		%	0.31
5	P tổng		%	0.06
6	K tổng		%	1.06
7	Cá trao đổi		mg/kg	1029.02
8	Mg trao đổi		mg/kg	282.75

Phụ trách bộ phận vô cơ



Nguyễn Quốc Trụ

Ngày 29 tháng 06 năm 2022

Phòng thí nghiệm chuyên sâu

TRƯỜNG ĐẠI HỌC CẦN THƠ
PHÒNG THÍ NGHIỆM CHUYÊN SÂU
Trần Kim Tinh

1. Các kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị đối với mẫu gởi đến 2. Tên mẫu nơi gởi ghi theo yêu cầu khách hàng
3. Không được trích sao một phần phiếu kết quả nếu không có sự đồng ý của trưởng phòng TNCS

BMI 5.10-44

2. Kết quả phân tích sản phẩm bột lá lúa



TESTING REPORT/ BÁO CÁO KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Form code/ Mã biểu mẫu: MKL-TT04-BM03 LBH.07

Code/ Mã mẫu: YC112415060/1				
Sample name/ Tên mẫu: IR504 dạng bột 15/12/2022				
Test Parameter/ Chỉ tiêu phân tích	Test Method/ Phương pháp	Unit/ Đơn vị	LOD	Result/ Kết quả
Định lượng nấm men, mốc ⁽¹⁾	ISO 21527-1:2008 ISO 21527-2:2008	CFU/g	10 CFU/g	<10
Clostridium parfringens ⁽²⁾	ISO 7937:2004	CFU/g	10 CFU/g	<10
Định lượng E.Coli ⁽¹⁾	TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)	CFU/g	10 CFU/g	<10
Định lượng Bacillus cereus ⁽¹⁾	ISO 7932:2004 (TCVN 4992:2005)	CFU/g	10 CFU/g	<10
Định lượng vi sinh vật hiếu khí (TPC) ⁽¹⁾	TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013)	CFU/g	10 CFU/g	2.2x10 ³
Asen (As) ⁽³⁾	AOAC 986.15	mg/kg	0.010	ND
Thủy ngân (Hg) ⁽³⁾	AOAC 971.21	mg/kg	0.010	ND
Chì (Pb) ⁽³⁾	AOAC 999.11	mg/kg	0.015	ND
Kẽm (Zn) ⁽³⁾	AOAC 999.11	mg/kg	0.200	ND
Cadimi (Cd) ⁽³⁾	AOAC 999.11	mg/kg	0.002	ND
Đồng (Cu) ⁽³⁾	AOAC 999.11	mg/kg	0.200	ND
Aflatoxin tổng số ⁽⁴⁾	MKL-HH307 Ref: TCVN 7595:2007 (ISO 16050: 2003)	µg/kg	0.500	ND
Aflatoxin B1 ⁽⁴⁾	MKL-HH307 Ref: TCVN 7595:2007 (ISO 16050: 2003)	µg/kg	0.500	ND
Code/ Mã mẫu: YC112415060/5				
Sample name/ Tên mẫu: IR504 dạng bột 15/12/2022				
Test Parameter/ Chỉ tiêu phân tích	Test Method/ Phương pháp	Unit/ Đơn vị	LOD	Result/ Kết quả
Định lượng Coliforms	TCVN 8846:2007 (ISO 4832:2005)	CFU/g	10 CFU/g	<10



019/2017/ĐNN-KNTP
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN
422/QĐ-CN-TẮC
CƠ QUAN THỰC HIỆN TÁC NGUYÊN THỰC PHẨM
TN 99-20 ĐNN
CƠ QUAN THỰC HIỆN TÁC NGUYÊN THỰC PHẨM
1814/QĐ-BVTV-KH
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN

49/2021/BYT-KNTP
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN
137/QĐ-QLD
CƠ QUAN THỰC HIỆN TÁC NGUYÊN THỰC PHẨM
11/2022/BCT-KNTP
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN
VN20008
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN

LAJ - XD 1521
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN
VIMCERTS 238
CƠ QUAN THỰC HIỆN TÁC NGUYÊN THỰC PHẨM
102/TN-TĐC
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN
73/QĐ-TĐC
CƠ QUAN THỰC HIỆN THỰC PHẨM AN TOÀN

TESTING REPORT/ BÁO CÁO KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Form code/ Mã biểu mẫu: MKL-TT04-BM03 LBH.07

I. CLIENT INFORMATION/ THÔNG TIN KHÁCH HÀNG:

Applicant/ ref. (Khách hàng/ số yêu cầu) : TRUNG TÂM ỨNG DỤNG TIỀN BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Address (Địa chỉ) : Số 166 Nguyễn Văn Cừ, Phường An Bình, Quận Ninh Kiều, Thành phố Cần Thơ

II. SAMPLE INFORMATION AND TESTING REQUISITION/ THÔNG TIN MẪU VÀ YÊU CẦU:

JOB No. (Số phiếu yêu cầu phân tích) : YC112415080
Information provided by applicant (Thông tin được khách hàng cung cấp) : IR504 dạng dung dịch
Sample description (Mô tả mẫu) : Mẫu được chứa trong túi zip
Seal No (Số niêm) : Không niêm
Source of sample (Nguồn mẫu) : Khách hàng gửi mẫu
Sample received on (Ngày nhận mẫu) : 15/12/2022
Sample tested on (Ngày phân tích) : 15/12/2022
Report date (Ngày trả kết quả) : 21/12/2022

Note / Ghi chú:

- Testing parameter is sent to subcontractor accredited by MekongLAB / Chỉ tiêu gửi nhà thầu phụ và được giám sát bởi MekongLAB.
- Parameter is accredited ISO/IEC 17025 / Chỉ tiêu được công nhận ISO/IEC 17025
- Parameter is designated by Ministry of Agriculture and Rural Development / Chỉ tiêu được chỉ định bởi Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn
- Parameter is designated by Ministry of Industry and Trade / Chỉ tiêu được chỉ định bởi Bộ Công Thương
- Parameter is designated by Ministry of Health / Chỉ tiêu được chỉ định bởi Bộ Y tế
- Parameter is designated by Ministry of Natural Resources and Environment / Chỉ tiêu được chỉ định bởi Bộ Tài nguyên và Môi trường
- ND: Not detected/ Không phát hiện D: Detected/ Phát hiện <1, <3, <10: Not detected/g sample/ Không phát hiện/g mẫu
LOD: limit of detection/ Giới hạn phát hiện LOD: Limit of Quantitation/ Giới hạn định lượng
- This testing result is only valid on tested sample. It is issued under our NHO Terms and Conditions / Kết quả phân tích chỉ có giá trị trên mẫu thử. Báo cáo này được ban hành theo những điều khoản kinh doanh của NHO
- The above result shall not be reproduced, partly or fully, unless written approval of NHO is granted/ Không được sao chép kết quả này, một phần hay toàn bộ, nếu không được sự đồng ý bằng văn bản của đại diện NHO

Authorized Technical Representative
Phụ trách kỹ thuật

PHẠM THỊ HỒNG TRANG

On behalf of NHO
Đại diện NHO

HOÀNG BÁ NGHI



NHONHO TECHNOLOGY COMPANY LIMITED

Hai office: 11, National Highway 21, Thới Bình district, Ho Chi Minh City
HCM office: 1, Tân Đại lộ, street 1, Tân Bình Industrial Park, Tân Phú district, HCM city
HCM office: 3, B17, street 12, Phong Phú 4 EDC, Bình Chánh district, HCM city

Hotline: +84 2811 338 668

Website: www.nho.com.vn

Can Tho office: 1, K1 - 11, Nguyễn Văn Cừ, Cần Thơ district, Cần Thơ city
Can Tho office: 1, Area 8, Hưng Thạnh ward, Cần Thơ district, Cần Thơ city
Thai Nguyen office: 07 Thới Bình street, Thái Nguyên city, Thái Nguyên province

Email: info@nho.com.vn

Page/ Trang: 1 / 2



TESTING REPORT/ BÁO CÁO KẾT QUẢ PHÂN TÍCH

Form code/ Mã biểu mẫu: MKL-TT04-BM03 LBH 07

Code/ Mã mẫu: YC112415060/3				
Sample name/ Tên mẫu: IR504 dạng dung dịch		14/12/2022		
Test Parameter/ Chỉ tiêu phân tích	Test Method/ Phương pháp	Unit/ Đơn vị	LOD	Result/ Kết quả
Định lượng nấm men, mốc ⁽¹⁾	ISO 21527-1:2008 ISO 21527-2:2008	CFU/ml	1 CFU/ml	<1
Clostridium perfringens ⁽²⁾	ISO 7937:2004	CFU/ml	1 CFU/ml	<1
Định lượng Coliforms ⁽³⁾	TCVN 6848:2007 (ISO 4832:2006)	CFU/ml	1 CFU/ml	<1
Định lượng E. Coli ⁽⁴⁾	TCVN 7924-2:2008 (ISO 16649-2:2001)	CFU/ml	1 CFU/ml	<1
Định lượng Bacillus cereus ⁽⁵⁾	ISO 7932:2004 (TCVN 4992:2005)	CFU/ml	1 CFU/ml	<1
Định lượng vi sinh vật hiếu khí (TPC) ⁽⁶⁾	TCVN 4884-1:2015 (ISO 4833-1:2013)	CFU/ml	1 CFU/ml	5.7x10 ⁴ 1
Asen (As) ⁽⁷⁾	AOAC 986.15	mg/L	0.010	ND
Thủy ngân (Hg) ⁽⁸⁾	AOAC 971.21	mg/L	0.010	ND
Chì (Pb) ⁽⁹⁾	AOAC 999.11	mg/L	0.016	ND
Kẽm (Zn) ⁽¹⁰⁾	AOAC 999.11	mg/L	0.200	ND
Cadimi (Cd) ⁽¹¹⁾	AOAC 999.11	mg/L	0.002	ND
Đồng (Cu) ⁽¹²⁾	AOAC 999.11	mg/kg	0.200	ND
Aflatoxin tổng số ⁽¹³⁾	MKL-HH307 Ref: TCVN 7596:2007(ISO 16050: 2003)	µg/kg	0.500	ND
Aflatoxin B1 ⁽¹⁴⁾	MKL-HH307 Ref: TCVN 7596:2007(ISO 16050: 2003)	µg/kg	0.500	ND



CÔNG TY CỔ PHẦN CHỨNG NHẬN VÀ KIỂM NGHIỆM FAO
FAO CERTIFICATION AND TESTING JOINT STOCK COMPANY

TRUNG TÂM KIỂM NGHIỆM FAO/ FAO TESTING CENTER

- **TELUNG 1 số cước miễn phí 1 số tín thoại có phí**
- 1 số 8 (Việt Nam): 01 - hướng dẫn công việc, 02 - 10.000, 7 ngày và 24/24 (Việt Nam)
- 1 số 055 - 090 000 - 24/24 (Việt Nam) và 055 - 090 000 000 000 (Việt Nam)
- **TELUNG 1 số cước miễn phí 1 số tín thoại có phí**
- 1 số 10 (Việt Nam): 01 - hướng dẫn công việc, 02 - 10.000, 7 ngày và 24/24 (Việt Nam)
- 1 số 055 - 090 000 - 24/24 (Việt Nam) và 055 - 090 000 000 000 (Việt Nam)
- 1 số 055 - 090 000 - 24/24 (Việt Nam) và 055 - 090 000 000 000 (Việt Nam)

- 01 **PAK FISHING CHARTER - JIM AND KIMMICH**
 02 475, Highway 17, Phu Luang Road, Na Dong District, Na Haeung, Chiang
 03 Mai, 50450. Tel: 085-444. e-mail: imkimmich@hotmail.com
 04 **PAK TRADING COMPANY - JIAN YU ANGRON**
 05 82/2, 1st Km Dong, 10th Roadside, Km 10, Phu Muang, Laung Nam
 06 Khe, Luang Prabang, Laos
 07 Tel: 0855-444-588. e-mail: imkimmich@hotmail.com



BẢO CẢO KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TEST REPORT

SS/No.: 230428.02.01
Ngày/Date: 03/05/2023

Tên khách hàng/ Client's name: TRUNG TÂM ỨNG DỤNG TIẾN BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
Địa chỉ/ Address: 166, Nguyễn Văn Cừ, P. An Bình, Q. Ninh Kiều, TP. Cần Thơ
Tên mẫu/ Name of sample: IIR504
Mô tả mẫu/ Sample description: Mẫu dạng lỏng chứa trong túi PE, dán kín, bảo quản lạnh
Ngày nhận mẫu/ Date of sample receipt: 28/04/2023
Ngày bắt đầu phân tích/ Date of analysis commencement: 28/04/2023

KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TEST RESULTS

Sth/ No	Chỉ tiêu/ Parameter	Đơn vị tính/ Unit	Kết quả/ Result	LOQ	Phương pháp/ Method
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CFU/100 mL	<1	-	ISO 16266:2006 (**)
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	CFU/mL	<1	-	ISO 6888-1:1999/ Amd1:2003 (*)
3	<i>Candida albicans</i>	CFU/mL	<1	-	ISO 21527-2:2008 (*)

Phòng kiểm nghiệm/ Laboratory

[Signature]

Nguyễn Hồng Nhung

Quản đốc/ Director



Trần Như Ý

GM Oil Name:

BPH: <20; <1; <1. Không phát hiện! Nợ được trả

(*) Phương pháp được công nhận theo TCVN ISO/IEC 17025:2017. The method is accredited according to ISO/IEC 17025:2017

(**): Chỉ tiêu được thí nghiệm dịch vụ bên ngoài/Targets for external service testing

Kết quả này chỉ có giá trị trên mẫu thử. Phòng thí nghiệm sẽ cung cấp độ đo không đảm bảo với năng suất thử khi khách hàng yêu cầu. Test result is valid only on the test sample. The laboratory will provide measurement uncertainty with each specification as requested by the customer.

Tên mẫu và tên khách hàng được ghi theo yêu cầu của khách hàng/ Name of sample and Client's name are recorded at the request of the customer

Không được sao chép một phần hay toàn bộ báo cáo kết quả thí nghiệm này khi không có sự đồng ý bằng văn bản của Ban Giám đốc Công ty Cổ phần Chứng nhận và Kiểm nghiệm TAO / Do not copy such separate or full part of the test report without the written approval of the Board of Directors of TAO

Energy Page 3/4



ISO/IEC 17025

TRUNG TÂM KỸ THUẬT
TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG CẦN THƠ
CANTHO TECHNICAL CENTER OF STANDARDS METROLOGY AND QUALITY

Địa chỉ: 45 đường 301 - TP. Cần Thơ
 Add: No 45 - 302 Street Cantho City
 Tel: 0292.2630353 - Fax: 0292.3633978
 Email: catech@cantho.gov.vn
 Website: catech.vn

Số: 0402/HL/0219/0423

PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TEST REPORT

Ngày: 17/04/2023
 Trang: 1/1

1. Tên mẫu và ký hiệu : Dịch chiết lá lúa (IR504)
2. Số lượng mẫu : 01 mẫu (khoảng 250ml.)
3. Ngày nhận mẫu : 11/04/2023
4. Tình trạng mẫu : Mẫu đựng trong túi nyon
5. Ngày thử nghiệm : Từ 11/04/2023 đến 15/04/2023
6. Nơi gửi mẫu / Yêu cầu : TRUNG TÂM ỨNG DỤNG TIẾN BỘ KH&CN TP.CẦN THƠ
166 Nguyễn Văn Cừ, P. An Bình, Q. Ninh Kiều, TP. Cần Thơ
7. Lưu mẫu : Không ☒ Có ☐ Đến ngày:
8. Lấy mẫu, TN tại hiện trường : Không
9. Kết quả thử nghiệm :

STT	Chỉ tiêu	Đơn vị	Phương pháp thử	Kết quả
1	Hàm lượng Etanol (%)	% v/v	HD 15-TP-1.3.2	1,50

Ghi chú: (*) chỉ tiêu được công nhận ISO/IEC 17025.

TRƯỞNG PHÒNG THỬ NGHIỆM
HÓA SINH



17. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



Nguyễn Chí Tâm
Nguyễn Chí Tâm

1. Các kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị đối với mẫu gửi đến.
Test results are valid for the sample submitted sample(s) only.
2. Tên mẫu, nơi gửi được ghi theo yêu cầu của khách hàng.
Name of sample and client are reported as the client's request.
3. Không được trích, sao chép phần mềm kết quả nếu không có sự đồng ý của Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng Cần Thơ (CATECH).
This Test Report shall not be reproduced except in full, without the written approval of CATECH.

2. Phiếu chấp thuận của Hội đồng Y đức



TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC CẦN THƠ
HỘI ĐỒNG TRONG NHÀ TRÊN ĐVTN

Số: 25.002.GV.NT/PCT-HĐĐD

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

Cần Thơ, ngày 02 tháng 04 năm 2025



PHIẾU CHẤP THUẬN
CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU TRÊN ĐỘNG VẬT
THỰC NGHIỆM TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y DƯỢC CẦN THƠ

- Căn cứ Quyết định số 1483/QĐ-ĐHYDCT ngày 14 tháng 04 năm 2025 của Hiệu trưởng Trường Đại học Y Dược Cần Thơ về việc Ban hành Quy chế Tổ chức và hoạt động của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu trên động vật thí nghiệm tại trường Đại học Y Dược Cần Thơ;

- Căn cứ trên hồ sơ phân biệt, phiếu tổng hợp của thư ký hội đồng và tờ trình;

Nay Hội đồng đạo đức chấp thuận (cho phép) về các khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu đối với:

- Đề tài: Evaluation of the effects of rice leaf extract on the intestinal microbiota in mice (Research under the doctoral thesis "Evaluation of antioxidant, antibacterial activities and effects on some intestinal microorganisms of young rice leaf powder (*Oryza sativa*)")
- Chủ nhiệm đề tài: Nguyen Thi To Uyen
- Mã số đề tài: 25.002.GV.NT
- Đơn vị chủ trì: Dong Thap Medical College
- Địa điểm triển khai nghiên cứu: 179 Đ. Nguyễn Văn Cừ, P. Ninh Kiều, Cần Thơ
- Thời gian nghiên cứu: 1/8/2024 – 22/5/2025

Ngày chấp thuận (cho phép): tháng 04 năm 2025.



TM. HỘI ĐỒNG
CHỦ TỊCH

HIỆU TRƯỞNG
GS.TS. Nguyễn Trung Kiên



Trường Đại học Y Dược Cần Thơ (Can Tho University of Medicine and Pharmacy)

Số 179, đường Nguyễn Văn Cừ, P. An Khánh, Q. Ninh Kiều, TP. Cần Thơ.

Điện thoại: (94-0292) 3 739 720 (Phòng Hành chính tổng hợp).

Fax: (94-0292) 3 740221 ; Email: ctump@ctump.edu.vn

Số: 1238 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 12 tháng 11 năm 2025

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 364/QĐ-VHL ngày 01/03/2025 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 18/2021/TT-BGDĐT ngày 28/06/2021 của Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1968/QĐ-HVKHCN ngày 28/12/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Quyết định số 2031/QĐ-HVKHCN ngày 30/11/2022 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận nghiên cứu sinh đợt 2 năm 2022 Chương trình Chất lượng quốc tế;

Xét đề nghị của Trưởng phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Tố Uyên với đề tài:

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*)

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận án kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án tiến sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ.

Quyết định có hiệu lực kể từ ngày ký đến trước ngày 01/02/2026. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Đào tạo, Trưởng phòng Kế toán, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. *[Chữ ký]*

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ NCS;
- Lưu: VT, ĐT, MT15.

GIÁM ĐỐC



GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIỀN SĨ CẤP HỌC VIỆN



(Kèm theo Quyết định số 1238/QĐ-HVKHCN ngày 12/11/2025
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Chợ luận án của nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Tố Uyên

Về đề tài: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số
vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*)

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Thầy hướng dẫn: 1. TS. Nguyễn Hữu Thanh

- Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP.HCM

2. PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

- Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Chức trách trong Hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa	Hóa hữu cơ	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2	PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp	Hóa sinh học	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1
3	TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan	Hóa hữu cơ	Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2
4	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	Công nghệ sinh học	Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5	PGS.TS. Hoàng Kim Anh	Công nghệ thực phẩm	Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn, Ủy ban Nhân dân TP.HCM	Ủy viên
6	PGS.TS. Nguyễn Thúy Hương	Vi sinh vật học	Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên
7	PGS.TS. Huỳnh Xuân Phong	Công nghệ sinh học	Trường Đại học Cần Thơ, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên

(Hội đồng gồm 07 thành viên)./.



DANH SÁCH HỘI ĐỒNG **ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Tố Uyên

Đề tài: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*)

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Thời gian: Bắt đầu từ 09h00, Thứ Năm, ngày 08 tháng 01 năm 2026.

TT	CHỨC DANH KHOA HỌC HỌ VÀ TÊN	ĐƠN VỊ CÔNG TÁC	TRÁCH NHIỆM	CHỮ KÝ
1.	GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa	Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch	
2.	PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP.HCM	Phản biện 1	
3.	TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan	Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2	
4.	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	Viện Khoa học sự sống, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký	
5.	PGS.TS. Hoàng Kim Anh	Trường Đại học Công nghệ Sài Gòn, Ủy ban Nhân dân TP.HCM	Ủy viên	
6.	PGS.TS. Nguyễn Thủy Hương	Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP.HCM	Ủy viên	
7.	PGS.TS. Huỳnh Xuân Phong	Trường Đại học Cần Thơ, Bộ Giáo dục và Đào tạo	Ủy viên	

Danh sách này gồm 07 thành viên./.

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN

Người nhận xét luận án: GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa

Cơ quan công tác của người nhận xét: Học Viện Khoa học và Công nghệ, Viện
HL KHCN VN

Họ và tên nghiên cứu sinh: NGUYỄN THỊ TÓ UYÊN

Đề tài: **Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa* L.)**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Trong thời gian qua, rất nhiều công trình nghiên cứu về giống, chế độ canh tác để tăng năng suất cây lúa đã được nghiên cứu thành công và đưa Việt Nam trở thành nước có sản lượng lúa, gạo xuất khẩu hàng đầu thế giới. Với mục tiêu tăng thêm hiệu quả sử dụng cây lúa, nhiều công trình nghiên cứu sử dụng các phụ phẩm của cây lúa như trấu thóc làm chất đốt; rơm rạ làm giá trồng nấm... Tuy nhiên các nghiên cứu sử dụng lá lúa non vẫn còn rất ít trên thế giới, cũng như ở trong nước.

Đề tài luận án tập trung vào nghiên cứu một số thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa* L.) là cần thiết. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo đưa các chế phẩm từ lá lúa non có tiềm năng vào cuộc sống, góp phần nâng cao hiệu quả sử dụng cây lúa. Điều này sẽ góp phần tăng thu nhập cho người nông dân.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong các trích dẫn tài liệu tham khảo

- Đề tài nghiên cứu không trùng lặp so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước.
- Các tài liệu tham khảo được trích dẫn trung thực, rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành đào tạo

- Tên đề tài hoàn toàn phù hợp với nội dung nghiên cứu.
- Nội dung nghiên cứu của đề tài luận án phù hợp với chuyên ngành Hóa hữu cơ.

11/01/2024

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu.

NCS đã sử dụng các phương pháp chiết xuất thường quy với dung môi ethanol- nước. Các hợp chất Chlorophyll, polyphenol và xơ tan thu được được phân tích hàm lượng bằng GC-MS và HPLC.

Khả năng kháng oxy hóa được khảo sát bằng các phương pháp bắt gốc tự do DPPH, ABTS, RP và FRAP với đối chứng dương là Vitamin C.

Khả năng kháng vi khuẩn (*P. aeruginosa*; *S. aureus*; *E. coli* và nấm *Candida albicans* được khảo sát thông qua chỉ tiêu đường kính kháng khuẩn và kháng nấm (mm) và giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Khảo sát tác động của bột lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột (*Lactobacillus*, *Enterococcus*; *Bifidobacterium*) của chuột với các tiêu chí là các chỉ số huyết học và mô học.

Do đó các phương pháp nghiên cứu của đề tài là khoa học, hợp lý và có độ chính xác và tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả, nêu những đóng góp mới và giá trị của các đóng góp đó.

Qua khảo sát ban đầu, NCS đã lựa chọn được đối tượng nghiên cứu là lá lúa 5 tuần tuổi với điều kiện không che ánh sáng của giống IR504.

NCS đã sử dụng các phương pháp chiết xuất thường quy với dung môi ethanol- nước. Bằng phân tích GC-MS cho thấy lá lúa không che ánh sáng có chứa nhiều hơn các hợp chất Chlorophyll, polyphenol và xơ tan; trong khi lá lúa che 2 lớp chứa nhiều ester béo, aliphatic hydrocarbon, triterpenoid và dẫn xuất phthalate.

Khảo sát khả năng kháng oxy hóa của các bột lúa non bằng các phương pháp bắt gốc tự do DPPH, ABTS, RP và FRAP với đối chứng dương là Vitamin C cho thấy bột lá lúa cho hoạt tính kháng khuẩn cao đối với *S. aureus* (đường kính vòng kháng 5,33-21,33 mm; MIC $3939,16 \pm 100,52 \mu\text{g/mL}$); với *E. coli* (4,8 - 20,24 mm; MIC $4817,16 \pm 313,40 \mu\text{g/mL}$) và *P. aeruginosa* (3,67 - 19,33 mm; MIC $4787,56 \pm 191,64 \mu\text{g/mL}$). Hoạt tính kháng nấm *C. albicans* (1,5 - 5,0 mm; $> 8000 \mu\text{g/mL}$).

Khảo sát tác động của bột lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột của chuột với các tiêu chí là các chỉ số huyết học và mô học. Sau khi thử nghiệm trên chuột trong 14 ngày cho thấy: Ở liều 150 mg/kg bột lúa non kích thích sự phát triển của các lợi khuẩn (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*), là các vi khuẩn phân giải hydrocarbon, lipid và chuyển hóa, dẫn đến thay đổi trong hấp thu dinh dưỡng, trao đổi chất và trọng lượng cơ thể; ở liều 300 mg/kg bột lúa non kích thích các vi khuẩn *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Desulfovibrionaceae*, là các vi khuẩn tăng cường tổng hợp acid amin, hỗ trợ xây dựng khối lượng cơ, thúc đẩy tăng trọng.

6 Những ưu điểm và thiếu sót về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Các kết luận của luận án phù hợp với cách đặt vấn đề ở đầu luận án và đủ sức thuyết phục.

- Ưu điểm:

- + Luận án có cấu trúc hợp lý.
- + Mục tiêu của đề tài luận án rõ ràng và thông qua kết quả của nội dung thực hiện thì mục tiêu của đề tài đã đạt được.
- + Hình thức trình bày tốt, văn phong mạch lạc. Kết quả nghiên cứu được giải trình, biện luận khoa học, hợp lý. Từ các kết quả nghiên cứu, NCS đã rút ra được các quy luật khoa học.
- + Kết luận đã nêu bật được các kết quả chính của luận án đã đạt được.

- Thiếu sót cần sửa chữa:

- + Luận án vẫn còn vài lỗi chính tả và lỗi in ấn.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

- Nội dung luận án đã được công bố:
 - + 02 báo khoa học trên tạp chí trong nước.
 - + 05 báo khoa học trên tạp chí khoa học quốc tế.

- Các báo cáo khoa học của các công trình đã công bố mang tính khoa học có nội dung phù hợp nội dung nghiên cứu của luận án, đáp ứng yêu cầu đối với luận án tiến sĩ.

8. Kết luận:

- a. Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án Tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học.
- b. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của Luận án.
- c. Đồng ý cho NCS được bảo vệ tại hội đồng cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

Tp HCM, ngày 15 tháng 12 năm 2025
Người nhận xét



GS.TS. NGUYỄN CỬU KHOA

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên nghiên cứu sinh: NGUYỄN THỊ TÓ UYÊN

Đề tài: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa* L.)

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học Mã số: 9420201

Người nhận xét luận án: GS.TS. Ngô Đại Nghiệp

Cơ quan công tác của người nhận xét: Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG-HCM

NHẬN XÉT LUẬN ÁN

1. Sự cần thiết và tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Trong bối cảnh hiện nay, việc khai thác và gia tăng giá trị phụ phẩm nông nghiệp theo hướng kinh tế tuần hoàn và phát triển bền vững đang được quan tâm rộng rãi trên thế giới. Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chính của nhiều quốc gia châu Á, cung cấp thực phẩm cho hơn một nửa dân số toàn cầu. Tuy nhiên, bên cạnh vai trò là cây lương thực, tiềm năng sinh học của các bộ phận khác của cây lúa, đặc biệt là lá lúa non, vẫn chưa được khai thác tương xứng, nhất là tại Việt Nam.

Lá lúa non, đặc biệt của các giống lúa phổ biến như IR50404 tại Đồng bằng sông Cửu Long, là nguồn sinh khối dồi dào, giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như chlorophyll và polyphenol. Mặc dù vậy, các nghiên cứu trong nước về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng khuẩn) cũng như tác động của lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột còn hạn chế và thiếu tính hệ thống. Xuất phát từ thực tiễn đó, việc thực hiện nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non là cần thiết.

Về mặt khoa học, luận án cung cấp thêm các dữ liệu đáng tin cậy về thành phần hóa học (chlorophyll, polyphenol) và các hoạt tính sinh học của lá lúa non (chống oxy hóa, kháng khuẩn, kích thích lợi khuẩn đường ruột). Trong khi cây lúa

(*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chính của nhiều quốc gia châu Á và nguồn cung cấp thực phẩm cho hơn một nửa dân số thế giới, các nghiên cứu chuyên sâu về hoạt tính sinh học của lá lúa non tại Việt Nam vẫn còn hạn chế. Luận án đã góp phần làm rõ vấn đề chưa nghiên cứu này, thể hiện tính mới và giá trị khoa học rõ rệt.

Về mặt thực tiễn, nghiên cứu đề xuất được quy trình tối ưu sản xuất bột lá lúa non bảo toàn các hoạt tính sinh học, mở ra tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực như thực phẩm hỗ trợ sức khỏe, mỹ phẩm, dược phẩm và nông nghiệp. Kết quả nghiên cứu góp phần nâng cao giá trị sử dụng của cây lúa, đặc biệt là các phụ phẩm nông nghiệp, phù hợp với định hướng phát triển kinh tế tuần hoàn và bền vững.

Cách đặt vấn đề của luận án rõ ràng, logic và phù hợp, tạo cơ sở để đạt được các kết quả nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án không trùng lặp với các luận án, công trình khoa học đã được công bố trong và ngoài nước. Các nội dung nghiên cứu được thực hiện độc lập, bảo đảm tính mới và tính trung thực khoa học. Hệ thống trích dẫn trong luận án được trình bày đầy đủ, rõ ràng; các trích dẫn trong nội dung và danh mục tài liệu tham khảo thống nhất, trùng khớp và tuân thủ đúng quy định trích dẫn khoa học.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với tên đề tài đã đăng ký. Nội dung nghiên cứu chính được triển khai đúng định hướng, bám sát mục tiêu đề ra và phù hợp với chuyên ngành Công nghệ sinh học, mã số 9 42 02 01.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng hệ thống phương pháp nghiên cứu đa dạng, kết hợp hài hòa giữa các phương pháp kinh điển trong lĩnh vực vi sinh, sinh hóa với các kỹ thuật phân tích

hiện đại, tiên tiến như HPLC, GC-MS và phân tích metagenomics dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA. Các phương pháp được lựa chọn phù hợp chặt chẽ với mục tiêu và nội dung nghiên cứu, đáp ứng yêu cầu đánh giá toàn diện từ thành phần hóa học, hoạt tính sinh học đến tác động ở mức độ hệ vi sinh vật đường ruột.

Thiết kế thí nghiệm được xây dựng khoa học, có đối chứng rõ ràng, quy trình thực hiện mạch lạc và logic. Các phép thử hoạt tính sinh học được tiến hành theo các phương pháp tiêu chuẩn, đã được kiểm chứng và sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu thực phẩm, dược liệu. Việc xử lý và phân tích số liệu được thực hiện bằng các phương pháp thống kê phù hợp, đảm bảo độ chính xác và độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

Nhìn chung, các phương pháp nghiên cứu được áp dụng trong luận án có tính hiện đại, độ tin cậy cao và phù hợp với xu hướng nghiên cứu hiện nay, góp phần bảo đảm tính khoa học và giá trị của các kết quả thu được.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án tiếp cận vấn đề nghiên cứu một cách có hệ thống và toàn diện, bắt đầu từ khảo sát thành phần hóa học, đánh giá các hoạt tính sinh học cơ bản cho đến nghiên cứu tác động của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột. Hướng tiếp cận này thể hiện tính liên ngành rõ nét, kết hợp giữa công nghệ sinh học, sinh hóa và sinh học hệ vi sinh vật, là hướng nghiên cứu tương đối mới tại Việt Nam. Việc triển khai đồng thời các cấp độ nghiên cứu từ *in vitro* đến *in vivo*, từ phân tích hóa học đến đánh giá tác động sinh học ở mức hệ sinh thái vi sinh vật, đã góp phần làm rõ hơn giá trị sinh học và tiềm năng ứng dụng của bột lá lúa non.

Về kết quả nghiên cứu, luận án đã xác định được các điều kiện sinh trưởng và thu hoạch phù hợp đối với lá lúa giống IR50404 nhằm thu nhận hàm lượng cao các hợp chất có hoạt tính sinh học. Cụ thể, lá lúa thu hoạch ở giai đoạn 5 tuần tuổi, trong điều

kiện không che sáng, cho hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, đồng thời thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tối ưu. Trên cơ sở đó, luận án đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình chế biến bột lá lúa non với các thông số công nghệ cụ thể, bao gồm chần lá lúa ở 100°C trong 4 phút, chiết xuất bằng dung môi etanol 60% với tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 10:1 và sấy phun ở 120°C. Quy trình này cho phép thu được sản phẩm bột lá lúa có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao nhất.

Các nghiên cứu về bảo quản cho thấy điều kiện bảo quản ở 5°C hoặc -18°C giúp duy trì ổn định các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của bột lá lúa non trong thời gian từ 3 đến 6 tháng, qua đó khẳng định tính khả thi của sản phẩm trong điều kiện lưu trữ thực tế. Bột lá lúa non thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 45,69 mg/mL (DPPH), 80,9 mg/mL (ABTS), 36,67 mg/mL (FRAP) và 46,49 mg/mL (RP), cho thấy tiềm năng ứng dụng rõ rệt trong các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe.

Bên cạnh đó, sản phẩm bột lá lúa non còn thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với một số vi sinh vật gây hại như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và khả năng kháng nấm *Candida albicans* từ ATCC. Đặc biệt, các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình chuột BALB/c cho thấy bột lá lúa non có khả năng điều chỉnh tích cực hệ vi sinh vật đường ruột, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của lợi khuẩn và ức chế các vi khuẩn hiếu khí gây hại, từ đó góp phần cải thiện sức khỏe đường ruột và tối ưu hóa trạng thái sinh lý của vật chủ.

Phân tích tương quan giữa hàm lượng polyphenol, chlorophyll và các chỉ tiêu hoạt tính chống oxy hóa cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa các hợp chất này và tác dụng sinh học của bột lá lúa non, qua đó khẳng định vai trò trung tâm của các hợp chất phenolic và sắc tố trong hiệu quả sinh học của sản phẩm. Trên cơ sở kết quả phân tích khối phổ, luận án cũng đề xuất các con đường chuyển hóa liên quan, góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác động của các hợp chất sinh học trong bột lá lúa non.

Về phương pháp và độ tin cậy, luận án lựa chọn đối tượng nghiên cứu phù hợp với mục tiêu đề tài; phạm vi nghiên cứu được xác định rõ ràng, tập trung vào bột lá lúa non và các tác động sinh học liên quan. Hệ thống phương pháp nghiên cứu được sử dụng đa dạng và hiện đại, bao gồm các phương pháp phân tích hóa học (HPLC, GC-MS/MS, UV-Vis), các phép thử sinh học *in vitro* (DPPH, ABTS, FRAP, RP, MIC) và các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình chuột BALB/c. Đặc biệt, việc ứng dụng giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp với công cụ dự đoán chức năng PICRUST2 để đánh giá tác động của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột là một điểm mạnh nổi bật, thể hiện cách tiếp cận nghiên cứu hiện đại, có chiều sâu và phù hợp với xu hướng nghiên cứu quốc tế hiện nay.

Luận án có những đóng góp mới đáng ghi nhận, bao gồm việc xây dựng quy trình công nghệ sản xuất bột lá lúa non theo hướng ứng dụng; cung cấp dữ liệu khoa học về thành phần hóa học và các hoạt tính sinh học của bột lá lúa; đồng thời làm rõ tác động phụ thuộc liều của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột thông qua tiếp cận metagenomics.

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu của luận án có độ tin cậy cao, được xây dựng trên cơ sở phương pháp nghiên cứu phù hợp và thiết kế thí nghiệm chặt chẽ. Luận án đã đóng góp những kết quả mới có ý nghĩa cho sự phát triển của chuyên ngành Công nghệ sinh học, đồng thời có giá trị thực tiễn trong việc phát triển sản phẩm từ phụ phẩm nông nghiệp, góp phần nâng cao giá trị cây lúa và phục vụ cho các lĩnh vực sản xuất, kinh tế và đời sống xã hội. Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung, chất lượng và giá trị khoa học của một luận án tiến sĩ.

6. Ưu và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm

Luận án được trình bày với bố cục rõ ràng, logic; hình thức trình bày nghiêm túc, các bảng biểu và hình ảnh minh họa tương đối đầy đủ và trực quan, góp phần làm rõ

nội dung nghiên cứu. Luận án sử dụng nhiều kỹ thuật nghiên cứu hiện đại, có tính mới, phù hợp với xu hướng nghiên cứu hiện nay trong lĩnh vực công nghệ sinh học, đặc biệt là việc kết hợp các phân tích hóa học, sinh học và sinh học hệ vi sinh vật. Nội dung nghiên cứu được triển khai có hệ thống, bám sát mục tiêu đề tài và thể hiện được năng lực nghiên cứu độc lập của nghiên cứu sinh.

Hạn chế:

Bên cạnh những ưu điểm nêu trên, luận án vẫn còn một số hạn chế nhất định. Luận văn còn xuất hiện một số lỗi nhỏ về chính tả và trình bày, cần được rà soát và chỉnh sửa để nâng cao chất lượng hình thức. Rà soát lại các hình ảnh minh họa để biên tập lại rõ ràng hơn, bổ sung đầy đủ hơn nhằm tăng tính trực quan và khả năng truyền tải thông tin.

Luận án nên bổ sung và làm sâu sắc hơn phần biện luận cơ chế tác động tích cực của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột, đặc biệt là mối liên hệ giữa thành phần hóa học trong bột lá lúa non với các hoạt tính sinh học đã được ghi nhận. Ngoài ra, thời gian thí nghiệm *in vivo* còn tương đối ngắn, do đó chưa đánh giá đầy đủ được các tác động sinh lý dài hạn của bột lá lúa non. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của bột lá lúa non chưa thật sự mạnh, điều này phần nào hạn chế khả năng ứng dụng trực tiếp sản phẩm như một tác nhân kháng khuẩn, nấm.

Bên cạnh đó, một số chỉ tiêu công nghệ chưa được nhắc đến như độ hòa tan, kích thước hạt. Quy trình chưa thấy có lưu đồ khối kỹ thuật và thuyết minh cụ thể.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố.

Luận án đã được công bố trong 07 công trình khoa học trong và ngoài nước, bao gồm 01 bài báo tổng quan. Trong số đó, nghiên cứu sinh là tác giả chính của 01 bài báo thuộc tạp chí Q1 và 02 bài báo thuộc tạp chí Q3; đồng thời là đồng tác giả của 02 bài báo Q3. Ngoài ra, nghiên cứu sinh là tác giả chính của 02 bài báo đăng trên *Tạp chí*

Dinh dưỡng và Thực phẩm, được tính điểm theo quy định của Hội đồng Giáo sư Nhà nước.

Các công trình khoa học đã công bố có giá trị khoa học cao, nội dung phù hợp và gắn chặt với các kết quả nghiên cứu của luận án, thể hiện tính mới, tính nhất quán và đóng góp thực chất của nghiên cứu sinh trong lĩnh vực nghiên cứu.

8. Kết luận chung:

Luận án hoàn toàn đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học.

Nghiên cứu sinh cần điều chỉnh theo góp ý của Hội đồng để luận án hoàn thiện hơn.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Luận án đủ điều kiện bảo vệ cấp Học viện để nghiên cứu sinh nhận bằng tiến sĩ.

TP Hồ Chí Minh, ngày 17 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét



Ngô Đại Nghiệp



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Đề tài luận án: **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*)**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học.

Mã số: 9 42 02 01

Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Tố Uyên

Người nhận xét: TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan

Cơ quan công tác: Viện Khoa học sự sống

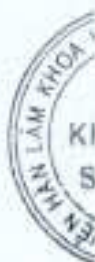
Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

Cây lúa (*Oryza sativa*) là cây lương thực chủ lực, cung cấp lương thực cho hơn một nửa dân số toàn cầu. Lá lúa non là nguồn sinh khối dồi dào, thường bị bỏ đi hoặc chưa được khai thác hết giá trị. Việc nghiên cứu biến lá lúa thành sản phẩm có giá trị sẽ giúp tăng giá trị thương mại cho cây lúa và đa dạng hóa nguồn thu nhập cho nông dân. Các nghiên cứu quốc tế đã chứng minh giá trị dược liệu của lá non ngũ cốc khác như lúa mì và đã được thương mại hóa rộng rãi. Trong khi đó, nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy lá lúa gạo có thành phần và hoạt tính sinh học tương tự lá lúa mì. Do đó, việc nghiên cứu sâu về lá lúa non Việt Nam là cần thiết để phát triển sản phẩm bản địa có tính cạnh tranh cao.

Các nghiên cứu trước đây về lá lúa non chủ yếu tập trung vào hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ tế bào. Tuy nhiên, vẫn còn thiếu các nghiên cứu hệ thống về thành phần hóa học, đặc biệt là hoạt tính kháng khuẩn và ảnh hưởng lên hệ vi sinh vật đường ruột (VSVĐR) của bột lá lúa non (BLL). Trong khi, theo xu hướng nghiên cứu và nhu cầu chăm sóc sức khỏe hiện nay thì việc tìm kiếm chất chống oxy hóa tự nhiên, kháng sinh và kháng nấm cũng như tác động của các hợp chất thực vật lên hệ VSVĐR mang tính thời sự và ý nghĩa khoa học cao.

Bên cạnh việc nghiên cứu chuyên sâu về thành phần hóa học, hoạt tính kháng khuẩn và lợi khuẩn đường ruột của lá lúa non, đề tài cũng tập trung xác định các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng (như giống lúa, điều kiện sinh trưởng, thời điểm thu hoạch và quy trình chế biến) để làm rõ tiềm năng sinh học của lá lúa non cũng như xây dựng quy trình sản xuất phù hợp để tạo ra sản phẩm có giá trị ứng dụng cao.



Các kết quả của luận án có thể ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành như nông nghiệp, thực phẩm chức năng, dược phẩm và phụ gia chăn nuôi.

Cho nên việc thực hiện luận án “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*)” là cần thiết, vừa có ý nghĩa khoa học, vừa đáp ứng yêu cầu thực tiễn.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước, tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài và nội dung của luận án không trùng lặp với các nghiên cứu khác đã công bố trong và ngoài nước.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài hoàn toàn phù hợp với nội dung của Luận án; nội dung đề tài phù hợp với chuyên ngành Công nghệ sinh học, mã số 9420201.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong Luận án là hiện đại và có độ tin cậy cao, phù hợp với lĩnh vực nghiên cứu trong nước và thế giới. Các phương pháp chính được sử dụng bao gồm:

1. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để định lượng các hợp chất polyphenol thuộc nhóm catechin (Catechin, EGCG, ECG) trong BLL và Phương pháp sắc ký khí ghép khối phổ (GC-MS/MS) để phân tích thành phần hóa học của dịch chiết lá lúa non.

2. Luận án sử dụng các phương pháp đo quang phổ (UV-Vis) đã được thiết lập và kiểm chứng rộng rãi trong nghiên cứu thực phẩm và dược liệu:

- Phân tích Chlorophyll tổng: Được xác định theo mô tả của Tamprasit et al. (2019) và Rajalakshmi và Banu (2015) với một số điều chỉnh. Phương pháp dựa trên việc đo độ hấp thụ ánh sáng tại bước sóng 645 nm (A_{645}) và 663 nm (A_{663}) và tính toán theo công thức chuẩn hóa.

- Phân tích Polyphenol tổng: Được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu, đo độ hấp thụ tại bước sóng 750 nm, tính theo đường chuẩn acid gallic (GAE). Đây là phương pháp phổ biến và tin cậy để đánh giá tổng hàm lượng phenolic trong mẫu chiết thực vật.

- Phân tích Flavonoid tổng: Xác định bằng phương pháp dùng NaNO_2 , AlCl_3 , NaOH , đo quang phổ tại 510 nm, tính theo quercetin tương đương (QE).

- Xác định hoạt tính enzyme PPO: Dựa trên phản ứng oxy hóa pyrocatechol, đo hấp thụ tại 420 nm, theo phương pháp của Tram và cs. (2015).

- Phân tích Xơ tan: Sử dụng phương pháp kết tủa ethanol lạnh và cân khối lượng, một kỹ thuật tiêu chuẩn để định lượng chất xơ không hòa tan và hòa tan.

3. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

- Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa (*In-vitro*): Luận án sử dụng bốn phép thử chống oxy hóa phổ biến nhất thuộc cơ chế chuyển electron đơn (SET), phản ánh một cách toàn diện khả năng chống oxy hóa của BLL: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl); ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)); FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) và RP (Reducing Power). Việc kết hợp nhiều phép thử là một phương pháp khoa học tin cậy để xác nhận chéo hoạt tính chống oxy hóa, vì mỗi phép thử đo lường một khía cạnh khác nhau của cơ chế chống oxy hóa. Các kết quả đều được quy đổi về giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50%) và so sánh với vitamin C (chất chuẩn dương), tăng cường độ tin cậy của việc đánh giá hiệu quả.

- Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm (*In-vitro*): Luận án sử dụng phương pháp khuếch tán trên giếng thạch (xác định đường kính vòng ức chế - IZ) và phương pháp pha loãng dịch (xác định nồng độ ức chế tối thiểu - MIC). Các phương pháp này là tiêu chuẩn cơ bản được sử dụng rộng rãi trong vi sinh học để đánh giá hiệu lực của các chất kháng khuẩn/kháng nấm tự nhiên, sử dụng chủng chuẩn ATCC (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6432, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 và *Candida albicans* ATCC 10231), đảm bảo tính thống nhất và khả năng so sánh với các nghiên cứu khác trên thế giới.

4. Các phương pháp dùng trong nghiên cứu *in-vivo*: Phương pháp nghiên cứu tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột chuột là điểm nhấn hiện đại và đột phá của luận án.

- Phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA (vùng V3-V4) trên hệ thống Illumina MiSeq. Đây là kỹ thuật hàng đầu trong lĩnh vực metagenomics, cho phép phân tích chi tiết và định lượng cấu trúc hệ vi sinh vật (độ đa dạng alpha, đa dạng beta, thành phần vi khuẩn ở cấp ngành, họ, chi) trong mẫu phân chuột. Phương pháp này cung cấp dữ liệu khách quan, vượt trội so với phương pháp nuôi cấy truyền thống (chỉ xác định được LAB và AcB).

- Dự đoán chức năng sinh học dựa trên công cụ PICRUST2 (công cụ sinh học tin học tiên tiến) cho phép dự đoán các con đường chuyển hóa chính (KEGG Pathways, KO, EC) của hệ vi sinh vật dựa trên thành phần loài đã được xác định.

- Mô hình động vật và đánh giá an toàn dựa trên phân tích các chỉ số sinh lý (trọng lượng cơ thể, chỉ số huyết học - WBC, RBC, PLT... và hình thái mô học ruột non nhuộm H&E) là các kỹ thuật tiêu chuẩn để đánh giá tính an toàn và độc tính cấp của BLL trên mô hình sống. Việc tất cả các chỉ số đều nằm trong giới hạn tham chiếu bình thường đã củng cố tính an toàn của sản phẩm.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả, đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống, ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy các kết quả đó.

Các kết quả mới của luận án có giá trị khoa học, có độ tin cậy cao, cụ thể như sau:

5.1. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả

Luận án đã đạt được nhiều kết quả thực nghiệm và cơ chế mới, đặc biệt trong việc tối ưu hóa quy trình sản xuất và làm rõ cơ chế tác động sinh học của bột lá lúa non (BLL).

a. Tối ưu hóa điều kiện trồng, thu hoạch và chế biến

- Tác giả đã xác định giống IR50404 thu hoạch ở tuần thứ 5 và trồng trong điều kiện không che sáng là tối ưu để thu nhận lá lúa có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa (DPPH) cao nhất.

- Xây dựng quy trình công nghệ thu nhận BLL:

+ Bất hoạt enzyme: Xác định phương pháp chấn nhiệt ở 100°C trong 4 phút giúp ức chế hiệu quả enzyme polyphenol oxidase (PPO) trên 80%, đồng thời hạn chế tối đa tổn thất chlorophyll và polyphenol.

+ Chiết xuất: Tối ưu hóa chiết xuất bằng etanol 60% với tỷ lệ dung môi/lá lúa non là 10/1 để đạt hiệu suất cao nhất trong việc thu nhận chlorophyll và polyphenol.

+ Sấy phun: Nhiệt độ sấy phun 120°C được xác định là tối ưu để bảo toàn hàm lượng chlorophyll, polyphenol, flavonoid và duy trì hoạt tính chống oxy hóa (DPPH) ở mức cao nhất so với các mức nhiệt khác.

- Bảo quản sản phẩm: Sản phẩm BLL duy trì độ ổn định cao nhất khi được bảo quản ở 5°C hoặc -18°C trong 6 tháng, giúp bảo toàn hàm lượng chlorophyll và polyphenol tốt hơn đáng kể so với nhiệt độ phòng.

- Sản phẩm BLL đạt tiêu chuẩn vệ sinh an toàn thực phẩm theo Quyết định 46/2007/QĐ-BYT, không phát hiện vi sinh vật gây bệnh hay kim loại nặng độc hại (Asen, Thủy ngân, Chì, Cadimi).

b. Khám phá cơ chế sinh tổng hợp:

- Định danh nhóm chất: Sử dụng HPLC, tác giả đã định lượng được ba hợp chất polyphenol chính thuộc nhóm catechin trong BLL là Catechin (1,23 mg/L), Epigallocatechin gallate (EGCG) (0,90 mg/L) và Epicatechin gallate (ECG) (2,59 mg/L).

- Đề xuất con đường chuyển hóa Chlorophyll-Phytol: Dựa trên phân tích GC-MS, đề xuất cơ chế tái sử dụng phytol (sản phẩm thủy phân chlorophyll) làm tiền chất để tổng hợp vitamin E (tocopherol) và este axit béo, giúp cây lúa thích nghi và phát triển trong giai đoạn sinh dưỡng.

- Đề xuất cơ chế thích nghi ánh sáng: Dưới ánh sáng đầy đủ (không che sáng), cây lúa ưu tiên tổng hợp các hợp chất chống oxy hóa (diterpenoid, steroid, Vitamin E) để bảo vệ tế bào. Ngược lại, điều kiện che sáng thúc đẩy cây chuyển hướng sinh tổng hợp este

axit béo và brassinosteroid, giúp điều chỉnh thành phần lipid màng và kéo dài thân lá để thích nghi với ánh sáng yếu.

c. Hoạt tính sinh học và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột:

- Hoạt tính chống oxy hóa: BLL thể hiện hoạt tính chống oxy hóa qua bốn phép thử (DPPH, ABTS, FRAP, RP). Phân tích tương quan cho thấy polyphenol và chlorophyll là hai nhóm hợp chất chính đóng góp vào hoạt tính này.

- Tác động phụ thuộc liều lên VSVĐR: Đây là đóng góp mới quan trọng nhất. Tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột chuột phụ thuộc rõ rệt vào liều lượng:

+ Liều thấp (150 mg/kg): Kích thích sự gia tăng của *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* và *Enterococcus*. Dự đoán chức năng (PICRUST) cho thấy liều này thúc đẩy phân giải glucose, lipid (tăng enzyme oxy hóa chất béo như acyl-CoA oxidase) và chuyển hóa catechin thành catechol, hỗ trợ kiểm soát tăng trọng và tiêu hao năng lượng.

+ Liều cao (300 mg/kg): Tăng đáng kể các nhóm vi khuẩn sinh SCFA như Lachnospiraceae, Ruminococcaceae và Desulfovibrio. Dự đoán chức năng cho thấy liều này ưu tiên tổng hợp amino acid chuỗi nhánh (L-isoleucine, L-valine), liên quan đến thúc đẩy tăng trưởng và tích lũy khối lượng cơ.

- An toàn sinh lý: BLL không gây độc tính cấp, không gây tổn thương mô học ruột non, và các chỉ số huyết học (RBC, WBC, PLT) đều nằm trong giới hạn sinh lý bình thường của chuột BALB/c sau 14 ngày sử dụng.

5.2. Những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành

Luận án đã đóng góp vào sự phát triển của ngành Công nghệ sinh học ứng dụng và hóa học thực vật theo hướng tích hợp:

a. Xây dựng cơ sở dữ liệu tích hợp: Luận án là công trình tiên phong trong nước và quốc tế đánh giá toàn diện hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng khuẩn, lợi khuẩn) của bột cao chiết lá lúa non trong cùng một nghiên cứu. Trước đây, các nghiên cứu chỉ tập trung vào dịch chiết lỏng hoặc các hoạt tính cơ bản (*in-vitro*).

b. Đưa ra mô hình chuyển hóa mới: Đề xuất cơ chế sinh tổng hợp và chuyển hóa hợp chất thứ cấp dưới tác động của điều kiện sinh trưởng và ánh sáng là đóng góp đáng kể vào sinh lý thực vật của cây lúa.

C. Áp dụng Metagenomics trong nghiên cứu prebiotic bản địa: Việc sử dụng giải trình tự gen 16S rRNA và công cụ PICRUST2 để dự đoán chức năng chuyển hóa của hệ vi sinh vật đường ruột dưới tác động của BLL là một bước tiến hiện đại. Điều này không chỉ xác định thành phần vi khuẩn mà còn giải thích cơ chế phân tử liên quan đến kiểm soát cân nặng và thúc đẩy tăng trưởng thông qua các con đường chuyển hóa amino acid mạch nhánh và phân giải lipid.

5.3. Đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống

a. Đóng góp phục vụ sản xuất và kinh tế

- Nâng cao giá trị cây trồng chủ lực: Luận án mở rộng tiềm năng khai thác kinh tế của cây lúa, biến phụ phẩm nông nghiệp (lá non) thành nguyên liệu sinh học giá trị cao. Điều này góp phần vào mô hình kinh tế tuần hoàn và tăng thu nhập cho nông dân tại Đồng bằng sông Cửu Long (nơi trồng giống IR50404 phổ biến).

- Quy trình sản xuất công nghiệp hóa: Xây dựng quy trình chế biến tối ưu (chăn, chiết ethanol 60%, sấy phun 120°C) cho sản phẩm dạng bột có chất lượng cao, tiết kiệm chi phí hơn so với sấy đông khô, giúp sản phẩm dễ dàng thương mại hóa ở quy mô công nghiệp.

b. Đóng góp phục vụ xã hội và đời sống

- Phát triển thực phẩm chức năng an toàn: Sản phẩm BLL với hoạt tính chống oxy hóa và đặc tính an toàn được kiểm nghiệm (đạt tiêu chuẩn VSTP và không độc tính cấp), có tiềm năng ứng dụng cao trong ngành thực phẩm chức năng, dược phẩm và mỹ phẩm.

- Ứng dụng linh hoạt theo mục tiêu sức khỏe: Phát hiện về tác động phụ thuộc liều cho phép định hướng ứng dụng linh hoạt:

+ Sản phẩm hỗ trợ kiểm soát cân nặng và miễn dịch (liều thấp 150 mg/kg, tăng lợi khuẩn *Lactobacillus* và thúc đẩy tiêu hao lipid).

+ Sản phẩm ứng dụng làm phụ gia prebiotic tự nhiên trong chăn nuôi (liều cao 300 mg/kg), nhằm cải thiện hiệu suất chuyển hóa năng lượng và thúc đẩy tăng trưởng/tăng tích lũy khối cơ ở gia súc, gia cầm.

- Hỗ trợ kháng khuẩn: Hoạt tính kháng khuẩn đã được chứng minh, đặc biệt đối với vi khuẩn Gram dương *S. aureus* và *E. coli* ở nồng độ cao, gợi mở tiềm năng sử dụng BLL như một thành phần hỗ trợ kháng khuẩn tự nhiên trong bảo quản thực phẩm hoặc sản phẩm chăm sóc sức khỏe.

5.4. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của kết quả thu được

a. Ý nghĩa khoa học và giá trị

- Khẳng định giá trị tài nguyên: Luận án cung cấp bằng chứng khoa học vững chắc về tiềm năng sinh học của lá lúa non Việt Nam, đặc biệt là giống IR50404, như một nguồn nguyên liệu tự nhiên dồi dào, thay thế cho các nguồn nguyên liệu nhập khẩu như lúa mì non.

- Cơ sở cho nghiên cứu sâu hơn: Các đề xuất về con đường chuyển hóa (chlorophyll-phytol) và cơ chế thích nghi ánh sáng tạo tiền đề cho các nghiên cứu sinh học phân tử và di truyền nhằm chọn tạo giống lúa có khả năng tích lũy hợp chất chức năng cao hơn trong tương lai.

- Định hướng ứng dụng chính xác: Việc làm rõ tác động phụ thuộc liều của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột và các con đường chuyển hóa liên quan cho thấy giá trị thực tiễn cao, giúp các nhà sản xuất có thể thiết kế công thức sản phẩm với liều lượng chính xác cho các mục tiêu sức khỏe cụ thể (kiểm soát cân nặng hoặc tăng trưởng).

b. Độ tin cậy

Độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu là cao nhờ việc sử dụng kết hợp các phương pháp khoa học tiêu chuẩn và kỹ thuật hiện đại:

- Sử dụng phương pháp tiêu chuẩn quốc tế: Các chỉ tiêu hóa phân tích và hoạt tính sinh học (*in-vitro*) đều được thực hiện bằng các phương pháp đã được kiểm chứng rộng rãi (Folin–Ciocalteu, DPPH, ABTS, FRAP, RP, khuếch tán giếng thạch, MIC).

- Áp dụng kỹ thuật phân tích hiện đại: Định danh và định lượng hợp chất được xác nhận bằng các kỹ thuật có độ chính xác cao như GC-MS/MS và HPLC.

- Xác nhận bằng mô hình *in-vivo* tiên tiến: Hoạt tính sinh học được xác nhận trên mô hình chuột BALB/c (mô hình chuẩn) và sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA trên hệ thống Illumina MiSeq cùng công cụ PICRUST2 để dự đoán chức năng vi sinh vật. Kỹ thuật này cung cấp bằng chứng sinh học phân tử rõ ràng, củng cố tính khách quan và tin cậy của kết quả về tác động prebiotic.

- Đánh giá an toàn toàn diện: Các kết quả an toàn được xác nhận qua ba mặt: phân tích chất lượng sản phẩm (kim loại nặng, vi sinh vật), xét nghiệm huyết học và phân tích mô học ruột non chuột. Tất cả đều khẳng định tính an toàn của BLL.

Những kết quả mới của luận án không chỉ thiết lập một quy trình sản xuất BLL tối ưu và kinh tế mà còn cung cấp một bức tranh toàn diện về tiềm năng sinh học, từ cơ chế hóa học ở cây lúa đến tác động chức năng ở cấp độ vi sinh vật, mang lại giá trị khoa học và thực tiễn cao.

5.5. Công bố của Luận án: Các kết quả nghiên cứu đã được công bố trong 07 bài báo (05 quốc tế và 02 tạp chí chuyên ngành trong nước):

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. DOI: 10.1007/s44187-024-00187-4

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. DOI: 10.26538/tjnpr/v8i5.21

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. DOI: 10.1134/S102144372460630X

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* L.) during vegetative stages using ethanolic extract analysis based on gas chromatography-mass spectrometry. *Agriculture and Natural Resources*. 59 (3), 590312. DOI: 10.34044/j.anres.2025.59.3.12

6. Nguyễn Thị Tổ 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. DOI: 10.56283/1859-0381/394

7. Nguyễn Thị Tổ 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. DOI: 10.56283/1859-0381/708.

Các bài báo trên đã sử dụng các kết quả nghiên cứu trong Luận án để công bố thành các công bố khoa học độc lập, tập trung vào từng khía cạnh cụ thể trong ba mục tiêu chính của Luận án.

6. Ưu và nhược điểm về nội dung, kết cấu luận án. Chỉ ra các vấn đề cần phải điều chỉnh, làm rõ.

6.1. Ưu điểm

a. Nội dung

- Nội dung luận án có tính toàn diện cao, không chỉ dừng lại ở việc khảo sát thành phần hóa học cơ bản mà còn đi sâu vào đánh giá các hoạt tính sinh học ở nhiều cấp độ.

+ Tối ưu hóa đa yếu tố: Nghiên cứu đã tối ưu hóa đồng thời các yếu tố từ khâu canh tác (giống lúa, thời điểm thu hoạch, điều kiện che sáng) đến chế biến (bất hoạt enzyme, chiết xuất, sấy phun, bảo quản). Điều này cung cấp một quy trình công nghệ hoàn chỉnh để tạo ra sản phẩm bột lá lúa non (BLL) có hoạt tính sinh học cao nhất.

+ Ứng dụng kỹ thuật hiện đại: Luận án sử dụng các phương pháp phân tích tiên tiến như HPLC (định lượng catechin), GC-MS/MS (phân tích thành phần hóa học) và đặc biệt là giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp PICRUSt2 (dự đoán chức năng vi sinh vật), cung cấp cái nhìn sâu sắc ở cấp độ phân tử và hệ gen.

+ Khám phá cơ chế sinh học mới: Tác giả đã đề xuất các cơ chế chuyển hóa quan trọng, bao gồm con đường tái sử dụng phytol từ chlorophyll để tổng hợp vitamin E và

este axit béo, cùng với cơ chế thích nghi chuyển hóa của cây lúa dưới điều kiện che sáng (tăng tổng hợp brassinosteroid và axit béo ester).

- Giá trị ứng dụng thực tiễn cao: Kết quả nghiên cứu có thể được áp dụng trực tiếp để sản xuất BLL quy mô công nghiệp. Việc xác định tác động phụ thuộc liều lên hệ vi sinh vật đường ruột (liều thấp kiểm soát cân nặng, liều cao thúc đẩy tăng trưởng) mở ra khả năng ứng dụng linh hoạt trong ngành thực phẩm chức năng và phụ gia chăn nuôi.

b. Kết cấu của Luận án

+ Luận án có kết cấu hợp lý gồm 149 trang và phần phụ lục, trong đó phần tổng quan (23 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (24 trang), kết quả và thảo luận (73 trang), kết luận và kiến nghị (2 trang), tài liệu tham khảo (22 trang, sử dụng 252 tài liệu tham khảo).

+ Các mục tiêu và nội dung nghiên cứu được liệt kê rõ ràng. Luận án có trình tự hợp lý bắt đầu bằng việc xác định vật liệu tối ưu (giống, thời điểm, điều kiện sinh trưởng), sau đó đến tối ưu hóa quy trình chế biến sản phẩm (BLL), và cuối cùng là đánh giá hoạt tính sinh học toàn diện của sản phẩm cuối cùng (*in-vitro* và *in-vivo*).

- Luận án tuân thủ đúng các yêu cầu về hình thức theo quy định

- Sử dụng phong phú các bảng biểu, hình vẽ, đồ thị và sơ đồ để trực quan hóa dữ liệu và kết quả phức tạp.

- Luận án liệt kê đầy đủ danh mục tài liệu tham khảo rộng rãi và các công trình khoa học đã được công bố liên quan đến luận án (bài báo khoa học trên các tạp chí chuyên ngành), củng cố uy tín và tính xác thực của nghiên cứu.

6.2. Hạn chế

- Hoạt tính kháng khuẩn yếu: Mặc dù luận án khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kết quả cho thấy BLL chỉ có hoạt tính kháng khuẩn/kháng nấm rất yếu (MIC cao; đặc biệt với *C. albicans* MIC > 8.000 µg/mL). Tác giả cũng tự đánh giá BLL “hầu như không hiệu quả kháng nấm”. Điều này có thể làm giảm tiềm năng ứng dụng trực tiếp BLL như một tác nhân kháng khuẩn mạnh, mà chỉ có thể là thành phần hỗ trợ.

- Hoạt tính chống oxy hóa không cao.

- Hạn chế về mô hình *in-vivo*:

+ Thời gian can thiệp ngắn: Thời gian can thiệp BLL trên chuột chỉ là 14 ngày. Mặc dù đủ để khảo sát độc tính cấp và thay đổi vi sinh vật ban đầu, thời gian này quá ngắn để rút ra kết luận vững chắc về các tác động sinh lý lâu dài (như chống béo phì, điều chỉnh lipid máu, hoặc thay đổi chuyển hóa năng lượng).

+ Sử dụng mẫu gộp: Tác giả sử dụng mẫu phân gộp cho phân tích 16S rRNA. Việc này giúp tiết kiệm chi phí nhưng không phản ánh được sự biến thiên cá thể trong hệ vi sinh vật và giảm sức mạnh thống kê của kết quả. Tác giả cũng đã kiến nghị cần chuyển sang mẫu đơn để tăng độ chính xác.

- Mặc dù đã tối ưu hóa nhiệt độ sấy phun, tác giả kiến nghị cần bổ sung đánh giá các chỉ tiêu công nghệ khác như hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm, kích thước hạt và độ hòa tan nhằm hoàn thiện quy trình ở quy mô ứng dụng. Đây là những thông số quan trọng để chuyển giao công nghệ vào sản xuất thực tế.

7. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ quy định tại Điều 20 Quy chế; luận án có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Tiến sĩ hay không

Bản dự thảo luận án đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học. Với khối lượng và kết quả nghiên cứu tốt, đề nghị cho NCS bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Học viện để nhận học vị Tiến sĩ.

Lâm Đồng, ngày 15 tháng 12 năm 2025

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN

NGƯỜI VIẾT NHẬN XÉT



Nguyễn Thị Như Quỳnh

TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên nghiên cứu sinh: NGUYỄN THỊ TÓ UYÊN

Đề tài: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa* L.)

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học Mã số: 9420201

Người nhận xét luận án: TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Cơ quan công tác của người nhận xét: Viện Khoa học sự sống

NHẬN XÉT LUẬN ÁN

1. Sự cần thiết và tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Ý nghĩa khoa học: cây lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chính ở các nước ở các nước châu Á và là nguồn cung cấp thực phẩm cho hơn một nửa dân số thế giới. Bên cạnh là cây lương thực, hoạt tính sinh học từ cây lúa đặc biệt lá lúa non cũng đang nhận được nhiều sự quan tâm. Tuy nhiên, các nghiên cứu về đánh giá hoạt tính sinh học, thành phần hóa học cũng như điều kiện chăm sóc chưa có nhiều nghiên cứu ở Việt Nam. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa* L.) đối với một số giống lúa phổ biến ở Việt Nam. Nghiên cứu góp phần xác định các thành phần hóa học như chlorophyll, polyphenol, các hoạt tính như chống oxy hóa, kháng khuẩn và kích thích phát triển lợi khuẩn đường ruột từ lá lúa non; đề xuất quy trình tối ưu cho sản xuất bột lá lúa non. Nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và tính mới cao.

Ý nghĩa thực tiễn: nghiên cứu góp phần đề xuất quy trình sản xuất sản phẩm bột lá lúa non đảm bảo các hoạt tính có tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực như thực phẩm hỗ trợ sức khỏe, mỹ phẩm, dược phẩm và nông nghiệp; góp phần làm tăng giá trị của cây lúa. Nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn.

Cách đặt vấn đề của luận án rõ ràng, hợp lý giúp luận án đạt được các kết quả tốt có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án không trùng lặp so với các luận án hay công trình khoa học đã công bố trong và ngoài nước .

Các trích dẫn trong luận án được trích dẫn đầy đủ, rõ ràng, trích dẫn và danh mục tài liệu tham khảo trùng khớp với nhau.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với tên đề tài. Các nội dung nghiên cứu chính của đề tài luận án phù hợp với chuyên ngành và mã số chuyên ngành công nghệ sinh học (Mã số: 9 42 02 01).

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp sử dụng trong nghiên cứu là các phương pháp thương quy trong nghiên cứu vi sinh, sinh hóa kết hợp với các phương pháp phân tích hiện đại như HPLC, GC-MS, phân tích metagenomics. Các phương pháp phù hợp với mục tiêu và nội dung nghiên cứu.

Các thí nghiệm được thiết kế chặt chẽ, có nhóm chứng, theo tiến trình rõ ràng. Phương pháp xử lý số liệu phù hợp, tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống; ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Kết quả nghiên cứu cho thấy Lá lúa IR50404 thu hoạch ở giai đoạn 5 tuần tuổi, trong điều kiện không che sáng, đạt hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, đồng thời thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tối ưu. Quy trình chế biến được tối ưu hóa bao gồm chần lá lúa ở 100°C trong 4 phút, chiết xuất bằng dung môi etanol 60% với tỷ lệ dung môi: lá lúa là 10:1, và sấy phun ở 120°C. Sản phẩm bột lá lúa thu được có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao nhất. Điều kiện bảo quản ở 5°C hoặc -18°C giúp duy trì ổn định các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa, đảm bảo chất lượng sản phẩm trong thời 3- 6 tháng. Bột lá lúa thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh mẽ, với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 45,69 mg/mL (DPPH),

80,9 mg/mL (ABTS), 36,67 mg/mL (FRAP) và 46,49 mg/mL (RP). Sản phẩm cũng có khả năng kháng khuẩn đối với *Escherichia coli* (MIC = $4817,50 \pm 313,40$ µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = $4787,56 \pm 191,64$ µg/mL), *Staphylococcus aureus* (MIC = $3939,16 \pm 100,52$ µg/mL) và kháng nấm *Candida albicans* (MIC > 8000 µg/mL). Bột lá lúa có khả năng điều chỉnh tích cực hệ vi sinh vật đường ruột, tạo môi trường thuận lợi cho lợi khuẩn và ức chế vi khuẩn hiếu khí gây hại, từ đó cải thiện sức khỏe đường ruột và tối ưu hóa trạng thái sinh lý của vật chủ. Phân tích tương quan cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa hàm lượng polyphenol, chlorophyll và hoạt tính chống oxy hóa, khẳng định vai trò của các hợp chất này trong tác dụng sinh học của bột lá lúa. Con đường chuyển hóa các hợp chất này cũng được đề xuất dựa trên kết quả khối phổ. Nhìn chung các kết quả đạt được nhiều, phù hợp với luận án tiến sĩ.

Những đóng góp mới của luận án:

Xây dựng được quy trình trồng, chăm sóc và chế biến để thu bột lá lúa non từ giống lúa IR50404 nhằm bảo tồn tối đa các hợp chất có lợi như polyphenol, flavonoid và chlorophyll.

Xác định được hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, cải thiện hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình chuột theo hướng tích cực của bột lá lúa.

6. Ưu và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Ưu điểm :

Hình thức luận án trình bày rõ ràng, hình ảnh đẹp.

Nghiên cứu sử dụng các kỹ thuật hiện đại, có tính mới.

Một số thiếu sót, chỉnh sửa, bổ sung:

Luận văn còn mắc một số lỗi nhỏ chính tả, trình bày.

Một số hình ảnh (Hình 3.29 trang 90, Hình 3.30 trang 92) nên biên tập rõ ràng hơn.

Cần bổ sung thêm phần biện luận cơ chế bột lá lúa tác động tích cực lên hệ vi sinh đường ruột, mối liên hệ giữa thành phần hóa học trong bột lá lúa và các hoạt tính sinh học từ nó.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố.

Kết quả của luận án đã được công bố 7 công trình khoa học (1 bài tổng quan),

trong đó NCS là tác giả chính 1 bài báo Q1 và 2 báo Q3, đồng tác giả 2 bài báo Q3 và là tác giả chính 2 bài báo công bố trên Tạp chí dinh dưỡng và Thực phẩm được tính điểm Hội đồng Giáo sư Nhà nước.

Các bài báo NCS công bố có giá trị khoa học cao, nội dung các bài báo phù hợp với nội dung của luận án.

8. Kết luận chung:

Luận án hoàn toàn đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung và hình thức đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học.

Nghiên cứu sinh cần điều chỉnh theo góp ý của Hội đồng để luận án hoàn thiện hơn.

Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Luận án đủ điều kiện bảo vệ cấp Học viện để nghiên cứu sinh nhận bằng tiến sĩ.

TP Hồ Chí Minh, ngày 20 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét



Nguyễn Hoàng Dũng

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên đề tài luận án: **“Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lúa non”.**

Chuyên ngành đào tạo: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án.

- Bột lá lúa non là nguồn nguyên liệu giàu chlorophyll và polyphenol, các hợp chất sinh học đã được ghi nhận với nhiều lợi ích như hoạt tính chống oxy hóa, kháng viêm và tiềm năng phòng ngừa ung thư. Tuy nhiên, cho đến nay, các nghiên cứu chuyên sâu về thành phần và hoạt tính sinh học của các hợp chất này trong bột lá lúa non vẫn còn hạn chế.

- Xuất phát từ thực tiễn đó, đề tài được thực hiện như một hướng nghiên cứu mới, có ý nghĩa về khoa học và thực tiễn. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp hệ thống dữ liệu toàn diện liên quan đến giống lúa, thời điểm thu hoạch lá lúa non, các điều kiện công nghệ trong quá trình thu nhận bột lá lúa non, cũng như đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa, kháng vi sinh vật và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình chuột.

- Những dữ liệu này góp phần làm rõ giá trị của bột lá lúa non và mở ra tiềm năng ứng dụng nguyên liệu này trong phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng.

2. Sự không trùng lặp của đề tài:

- Kết quả của đề tài không trùng lặp với các công trình đã công bố trong và ngoài nước
- Luận án đã tham khảo 252 TLTK. Các tài liệu tham khảo được trích dẫn rõ ràng và đầy đủ.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành.

Tên đề tài luận án: **“Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lúa non”** nhìn chung phù hợp với nội dung nghiên cứu cũng như phù hợp với chuyên ngành đào tạo Công nghệ sinh học, mã số: 9 42 02 01

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu.

- Đề tài được xây dựng với mục tiêu nghiên cứu cụ thể, rõ ràng và có tính định hướng cao. Cách tiếp cận vấn đề, cùng với kế hoạch và phương pháp nghiên cứu được lựa chọn một cách hợp lý, khoa học, đảm bảo khả năng giải quyết hiệu quả các mục tiêu đã đề ra.
- Các phương pháp phân tích được sử dụng trong luận án đều là những phương pháp tiêu chuẩn và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực hóa sinh và vi sinh. Bên cạnh đó, luận án còn áp dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại như HPLC và GC-MS/MS nhằm xác định thành phần hóa học và các hợp chất polyphenol trong dịch chiết lá lúa non, cũng như sử dụng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA để phân tích cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột.

- Nhìn chung, phương pháp nghiên cứu được lựa chọn phù hợp với đối tượng và nội dung nghiên cứu; các thí nghiệm *in vitro* và *in vivo* được thiết kế và triển khai một cách bài bản. Dữ liệu thực nghiệm được xử lý bằng các phương pháp thống kê thích hợp, góp phần nâng cao độ tin cậy và giá trị khoa học của các kết quả thu được.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả.

- Xây dựng được 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 nhằm bảo toàn chlorophyll và polyphenol.

- Chứng minh hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và khả năng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non thông qua các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* trên chuột.

- Phân tích thành phần và mức độ đa dạng của hệ vi sinh vật đường ruột ở các cấp phân loại từ ngành, họ đến chi. Nghiên cứu được mở rộng bằng phân tích dự đoán chức năng, tập trung vào 20 con đường liên quan đến biểu hiện enzyme cao nhất và 20 gen có mức biểu hiện cao nhất, qua đó làm rõ tiềm năng chuyển hóa của hệ vi sinh vật đường ruột.

- Xác định liều sử dụng hiệu quả giúp tăng vi khuẩn có lợi và thúc đẩy biểu hiện các gen liên quan đến kiểm soát tăng trọng và tiêu hao năng lượng, làm cơ sở định hướng ứng dụng trong thực phẩm chức năng.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án.

Ưu điểm của luận án:

- Luận án có bố cục khá hợp lý, hình thức trình bày rõ ràng, mạch lạc và dễ theo dõi.

- Phần tổng quan tài liệu được trình bày súc tích, có hệ thống và bao quát đầy đủ các nội dung liên quan đến đề tài nghiên cứu.

- Cách tiếp cận vấn đề nhìn chung khoa học và logic; phương pháp nghiên cứu được lựa chọn phù hợp với mục tiêu đề ra.

- Luận án thu thập được hệ thống số liệu thực nghiệm phong phú, các kết quả thu được có độ tin cậy cao.

- Các kết luận rút ra có tính mới, giá trị khoa học và tiềm năng ứng dụng thực tiễn.

Một số vấn đề cần lưu ý và chỉnh sửa:

Về hình thức:

- Luận án vẫn còn một số lỗi chính tả và ngữ pháp cần rà soát lại.

- Về từ ngữ sử dụng, nên thống nhất dùng “xây dựng quy trình công nghệ thu nhận bột lá lúa non” trong toàn bài, thay vì “xây dựng quy trình công nghệ sản xuất bột lá lúa non”, do quy mô nghiên cứu của luận án nhỏ, chưa ở mức quy trình sản xuất.

Tổng quan tài liệu

- Mục 1.2.1, Bảng 1.1 (Thành phần dinh dưỡng của lá lúa non): nên lưu ý chất xơ cũng là một thành phần carbohydrate. Nếu hàm lượng carbohydrate được tính bằng phương pháp chênh lệch (lấy 100% trừ đi các thành phần khác như ẩm, protein, lipid, tro) thì sẽ bao gồm hàm lượng chất xơ. Chú ý chỉnh lại điểm này trong phần chú thích của bảng.

Nguyên liệu và phương pháp:

- Lưu ý mô tả kỹ hơn các quá trình xử lý như chần, vi sóng hoặc siêu âm: công suất siêu âm là bao nhiêu, cách kiểm soát nhiệt độ trong các quá trình này.
- Đối với nghiên cứu thu nhận bột lá lúa non, cần làm rõ hơn cơ sở lựa chọn các thông số khảo sát. Cần chú ý thêm các điều kiện như nhiệt độ và thời gian trích ly, các thông số trong quá trình sấy phun như loại và tỷ lệ chất mang so với nguyên liệu, tốc độ nhập liệu, hiệu suất thu hồi sản phẩm bột trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả và bàn luận:

- Phần bàn luận về tác động của các điều kiện xử lý như chần, vi sóng hoặc siêu âm, hay ảnh hưởng của dung môi ethanol đến quá trình trích ly hoạt chất còn khá sơ sài so với phần bàn luận liên quan đến thử nghiệm *in vivo* trên chuột, nên điều chỉnh lại cho cân đối hơn.
- Trong các nghiên cứu tiếp theo, nên lưu ý thêm về hiệu suất thu hồi BLL sau khi sấy phun (liên quan đến số lượng), bên cạnh những kết quả và bàn luận về thành phần các hoạt chất sinh học trong BLL (liên quan đến chất lượng), làm cơ sở để lựa chọn điều kiện sấy.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố.

- Luận án đã công bố 01 bài review trên tạp chí *Discover Food* (ESCI, Q1) và 04 bài trên các tạp chí Scopus Q3, 02 bài trên tạp chí khoa học trong nước (*Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*).
- Nhìn chung, các bài báo có chất lượng khá tốt và có nội dung phù hợp với các nội dung nghiên cứu của đề tài.

8. Kết luận chung

- Luận văn đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ sinh học.
- Bản tóm tắt luận án được trình bày ngắn gọn, đầy đủ và phản ánh trung thực nội dung của luận án.
- Luận án có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Học viện.

Người nhận xét



Hoàng Kim Anh

NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Tên đề tài: ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA, KHÁNG KHUẨN VÀ TÁC ĐỘNG LÊN MỘT SỐ VI SINH VẬT ĐƯỜNG RUỘT CỦA BỘT LÁ LÚA NON

Họ và tên nghiên cứu sinh: NGUYỄN THỊ TÔ UYÊN

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số:

9 42 02 01

Họ tên người nhận xét: NGUYỄN THÚY HƯƠNG

Chức danh: PGS Năm bổ nhiệm: 2010 Học vị: TS

Năm bảo vệ: 2006

Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Bách Khoa TP HCM

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Sự cần thiết và tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài:

Nghiên cứu nhằm mục đích nghiên cứu và phát triển sản phẩm bột cao chiết lá lúa non. Để đạt được mục tiêu tổng quát này, luận án giải quyết các nội dung chính:

- Tối ưu hóa điều kiện thu hoạch lá lúa có hàm lượng cao các hợp chất sinh học
- Xây dựng quy trình thu nhận bột lá lúa non
- Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột.

Kết quả của luận án tạo tiền đề quan trọng cho hướng nghiên cứu góp phần bổ sung cơ sở khoa học về khả năng chống oxy hóa, kháng khuẩn hỗ trợ lợi khuẩn đường ruột của lá lúa non; góp phần nâng cao giá trị thương mại cây lúa

2. Sự không trùng lặp của đề tài:

Đề tài không có sự trùng lặp với các nghiên cứu, công bố trước đây. Chưa thấy công bố về nghiên cứu này tại Việt nam.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành:

Tên đề tài với phù hợp với nội dung luận án.

Nội dung luận án phù hợp với chuyên ngành Công nghệ Sinh học và mã số chuyên ngành Công nghệ sinh học 9 42 02 01.

4. Sự hợp lý và độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu:

Các phương pháp nghiên cứu sử dụng để giải quyết nội dung và mục tiêu của luận án là các phương pháp vi sinh, sinh hóa và sinh học hiện đại, bao gồm:

- Phương pháp ly trích dịch lá lúa

- Phương pháp phân tích chlorophyll
- Phương pháp phân tích polyphenol tổng
- Phương pháp phân tích flavonoid tổng
- Phương pháp phân tích xơ tan
- Xác định hoạt tính enzyme PPO
- Phân tích DPPH, ABTS, năng lực khử RP, FRAP
- Phân tích thành phần hợp chất GC-MS/MS
- Phân tích catechin bằng HPLC
- Các phương pháp vi sinh bao gồm phương pháp khuếch tán giếng thạch, MIC, định lượng LAB, vi khuẩn hiếu khí
- Các xét nghiệm huyết học và phân tích mô học ruột non
- Phương pháp Sinh học phân tử giải trình tự 16SrRNA, metagenomics

Bổ trợ thí nghiệm chặt chẽ và logic để giải quyết mục tiêu và nội dung. Phương pháp nghiên cứu hợp lý và số liệu có độ tin cậy và ý nghĩa tham khảo.

5. Những đóng góp mới của luận án:

Kết quả luận án đã cung cấp một số dẫn liệu khoa học mới có ý nghĩa về nghiên cứu và phát triển sản phẩm bột cao chiết lá lúa non giàu hoạt tính sinh học

Kết quả cũng đóng góp và mở ra ý nghĩa cho hướng thực tiễn ứng dụng.

6. Ưu nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án:

Ưu điểm nổi bật của luận án là kết cấu nội dung và hình thức rất logic, mạch lạc để thể hiện mục tiêu chính của đề tài.

CÁC VẤN ĐỀ GÓP Ý:

- Tên luận án: chưa bao quát được 2 nội dung đầu của luận án. 2 nội dung này là 2 nội dung lớn
- Sấy phun: cần tối ưu các thông số kỹ thuật sấy phun (nhiệt độ đầu vào, nhiệt độ đầu ra, áp lực phun, tốc độ phun...) và chất mang (chất hỗ trợ phun) trong quá trình sấy phun cũng như tăng cường biện luận trong kỹ thuật sấy phun song song với việc giữ hoạt tính sinh học cho chế phẩm BLL.
- Các chỉ tiêu chất lượng của BLL cần được biện luận và xây dựng dựa trên bản chất của chế phẩm BLL. Phần này tác giả chưa đề cập, các chỉ tiêu nào là chỉ tiêu đại diện? Các yếu tố cấu thành chất lượng chế phẩm BLL?

- Các hoạt tính sinh học của BLL khảo sát sau thời gian bảo quản như thế nào? Hoạt tính sinh học thay đổi rất nhanh theo thời gian và điều kiện bảo quản.
- Cần làm rõ bản chất của chất kháng khuẩn nào có trong BLL và dựa vào lý thuyết để biện luận cơ chế kháng khuẩn của BLL.
- Với hoạt tính kháng khuẩn cao của BLL tại sao lại ảnh hưởng tốt đến hệ vi sinh đường ruột. Cần bổ sung thêm phần biện luận cơ chế BLL tác động tích cực lên hệ vi sinh đường ruột trong khi BLL lại có tính kháng khuẩn cao
- Phần Kết luận cần chú ý bám sát mục tiêu. Những gì giải quyết được mục tiêu đưa vào Kết luận, những gì chưa giải quyết đưa vào Kiến nghị. Kết luận hiện nay còn mang tính liệt kê các việc thực hiện được

7. Các công trình đã công bố có liên quan đến luận án:

Luận án có chất lượng khá tốt thể hiện qua 5 công trình bài báo được đăng trên tạp chí chuyên ngành có ISI và 2 bài báo trong nước

Chất lượng bài viết đạt chuẩn và phản ánh phần lớn nội dung của luận án.

8. Tóm tắt luận án có phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án:

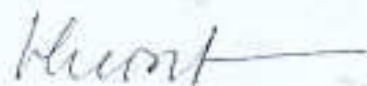
Tóm tắt luận án phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án. Sự thống nhất của luận án- tóm tắt luận án- các bài báo công bố là khá chặt chẽ.

9. Kết luận về việc luận án có đáp ứng yêu cầu của một LATS và có thể đưa ra bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Học viện hay không?

- Luận án đáp ứng yêu cầu của một LATS và có thể đưa ra bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Học viện.
- Đề nghị nghiên cứu sinh bổ sung hoàn chỉnh luận án theo các góp ý.

Ngày 29 tháng 11 năm 2025

Người nhận xét



Nguyễn Thúy Hương

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người viết nhận xét luận án: Huỳnh Xuân Phong

Học hàm, học vị: Phó Giáo sư, Tiến sĩ

Cơ quan công tác: Đại học Cần Thơ

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Tố Uyên

Tên đề tài luận án: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*).

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Đề tài luận án tập trung vào khai thác bột lá lúa non (*Oryza sativa*) như một nguồn nguyên liệu có hoạt tính sinh học, phù hợp với xu hướng sử dụng hợp chất tự nhiên có nguồn gốc thực vật trong thực phẩm chức năng cũng như sản phẩm hỗ trợ sức khỏe đường ruột. Nội dung nghiên cứu đáp ứng tính thời sự trong bối cảnh nhu cầu phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ phụ phẩm nông nghiệp và các nguyên liệu tự nhiên ngày càng tăng, đặc biệt đối với Việt Nam là quốc gia có diện tích trồng và sản xuất lúa gạo lớn nên việc tận dụng và khai thác tiềm năng và ứng dụng của lá lúa thể hiện được tính cấp thiết của đề tài.

Về ý nghĩa khoa học, đề tài góp phần cung cấp dữ liệu khoa học về mối quan hệ giữa giống lúa, điều kiện sinh trưởng và giai đoạn thu lá lúa với hàm lượng các hợp chất sinh học (chlorophyll, polyphenol, flavonoid, chất xơ tan...) và hoạt tính chống oxy hóa. Nghiên cứu xác định được các điều kiện để thu nhận và bảo quản bột lá lúa non có hoạt tính sinh học cũng như đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình động vật, góp phần bổ sung bằng chứng thực nghiệm về khả năng ứng dụng của sản phẩm.

Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả luận án là cơ sở khoa học cho việc phát triển các dạng sản phẩm bột, chiết xuất hoặc chế phẩm từ lá lúa non ứng dụng trong phát triển các sản phẩm và thực phẩm chức năng, sản phẩm hỗ trợ tiêu hóa, cũng như định hướng ứng dụng trong mỹ phẩm thiên nhiên. Bên cạnh đó, việc chứng minh được giá trị sử dụng của lá lúa non góp phần nâng cao giá trị kinh tế của cây lúa, góp phần tận dụng phụ phẩm nông nghiệp theo hướng kinh tế tuần hoàn, phù hợp với định hướng phát triển nông nghiệp bền vững và gia tăng giá trị cho chuỗi sản xuất lúa gạo.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Một số nghiên cứu về điều kiện ly trích và thu nhận dịch chiết và bột nguyên liệu thực vật đã được thực hiện nhưng việc nghiên cứu trên đối tượng lá lúa non với các giống lúa đặc trưng ở Việt Nam cho thấy không trùng lặp với các công trình đã công bố. Nghiên cứu tập trung đồng thời vào việc xác định các điều kiện tăng trưởng và xây dựng quy trình công nghệ sản xuất bột cao chiết lá lúa non cũng như đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm kết hợp với tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột trên mô hình chuột đảm bảo được tính mới và không trùng lặp. Các tài liệu tham khảo sử dụng trong luận án được trích dẫn đầy đủ, bám sát các nội dung trình bày với nguồn trích dẫn được liệt kê ở danh mục tài

liệu tham khảo nên thể được tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với ngành và mã số ngành

Tên đề tài phản ánh được đầy đủ các nội dung chính và kết quả thu được trong luận án. Nội dung nghiên cứu bao gồm các kết quả liên quan đến công nghệ sinh học như xác định các điều kiện sinh trưởng cây lúa, thu nhận chiết xuất và xác định các hợp chất sinh học, thử nghiệm *in vitro* về hoạt tính sinh học, phân tích hệ vi sinh vật đường ruột bằng kỹ thuật metagenomics và xử lý bằng các công cụ tin sinh học, do đó phù hợp với phạm vi chuyên môn của ngành Công nghệ sinh học (mã số 9 42 02 01).

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Các phương pháp sử dụng trong luận án có độ tin cậy cao và đáp ứng yêu cầu hiện đại của nghiên cứu công nghệ sinh học với nguồn trích dẫn đầy đủ, rõ ràng và được mô tả một cách khoa học. Các phương pháp phân tích thành phần dịch chiết như định lượng polyphenol tổng số, flavonoid, chlorophyll, chất xơ tan cũng như xác định các hợp chất hóa học bằng GC-MS, HPLC và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP, RP) đều là những phương pháp chuẩn, đã được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu về hoạt tính sinh học của hợp chất tự nhiên. Các phân tích thống kê và tương quan như ANOVA, PCA, CA, Spearman... góp phần nâng cao độ tin cậy và tính khoa học của kết quả.

Luận án sử dụng các kỹ thuật phù hợp và cập nhật như bất hoạt enzyme polyphenol oxidase bằng xử lý nhiệt, vi sóng, siêu âm; tối ưu chiết xuất bằng ethanol ở các nồng độ khác nhau; sấy phun với bổ sung maltodextrin làm chất mang để thu bột lá lúa non ổn định, đây đều là những hướng tiếp cận hiện đại trong công nghệ chiết xuất và tạo bột sinh học. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm được đánh giá bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, xác định MIC là các kỹ thuật chuẩn trong vi sinh vật học thực nghiệm.

Trong nghiên cứu tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột, luận án sử dụng mô hình chuột, phân tích chỉ số huyết học, mô bệnh học ruột non, xác định một số nhóm vi khuẩn LAB, AeB, kết hợp giải trình tự gen 16S rRNA bằng kỹ thuật metagenomics và dự đoán chức năng bằng PICRUST2. Đây là các công cụ trong sinh học phân tử và tin sinh học hiện đại, qua đó khẳng định tính cập nhật và độ tin cậy của phương pháp luận án.

5. Kết quả nghiên cứu mới của tác giả; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học chuyên ngành; đóng góp mới phục vụ cho sản xuất, kinh tế, quốc phòng, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị và độ tin cậy của những kết quả đó.

Luận án có một số kết quả mới và đóng góp đáng kể cả về khoa học chuyên ngành lẫn tiềm năng ứng dụng thực tiễn. Các kết quả này được xây dựng trên hệ phương pháp tin cậy, xử lý thống kê đầy đủ, có đối chứng và lặp lại, nên bảo đảm độ tin cậy khoa học tốt. Các đóng góp mới của luận án bao gồm:

+ Xác định được điều kiện thu hoạch thích hợp của lá lúa giống IR504 (tuần 5, không che sáng) cho hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao nhất.

+ Xây dựng và tối ưu được quy trình công nghệ thu nhận bột cao chiết lá lúa non (BLL) gồm các bước chần 100°C trong 4 phút, chiết ethanol 60% với tỷ lệ nguyên liệu:dung môi 1:10, sấy phun ở 120°C với maltodextrin 10%, bảo quản 5°C hoặc -18°C để duy trì tốt nhất các hoạt chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa.

+ Xác định được thành phần các hợp chất catechin trong BLL (catechin, EGCG, ECG) và chứng minh BLL có hoạt tính chống oxy hóa (IC_{50} DPPH khoảng 36,67–80,9 mg/mL) và có khả năng ức chế các vi khuẩn gây bệnh (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) với MIC trong khoảng 3.939–4.817 µg/mL.

+ Xác định quan hệ giữa thành phần hóa học (polyphenol, flavonoid, chlorophyll, catechin) và hoạt tính sinh học thông qua phân tích tương quan, HPLC và các thử nghiệm chống oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP, RP), góp phần hoàn thiện cơ sở lý luận về cơ chế tạo hoạt tính của bột lá lúa non.

+ Cung cấp dữ liệu bước đầu về tác động của BLL lên hệ vi sinh vật đường ruột thông qua phân tích metagenomics với liều 150 mg/kg 300 mg/kg qua đó gợi ý cơ chế tác động hai mức liều sử dụng khác nhau.

Luận án không chỉ chứng minh hoạt tính của một chiết xuất thực vật mà thể hiện được mối quan hệ từ điều kiện xử lý nguyên liệu, công nghệ thu nhận, phân tích thành phần, đánh giá hoạt tính *in vitro* và đánh giá tác động *in vivo* và phân tích hệ vi sinh vật đường ruột bằng metagenomics. Độ tin cậy được bảo đảm nhờ sử dụng các phương pháp phân tích chuẩn (HPLC, GC-MS, chống oxy hóa, MIC, mô bệnh học, 16S rRNA-PICRUSt2), bố trí thí nghiệm có đối chứng, lặp lại, xử lý thống kê bằng ANOVA, PCA, CA, Spearman, cùng với cam đoan không trùng lặp và dữ liệu chưa công bố ngoài các bài báo liên quan.

6. Ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án

Về ưu điểm, luận án được trình bày công phu, đảm bảo đầy đủ các nội dung của một luận án tiến sĩ với kết cấu logic và hình thức trình bày thể hiện văn phong khoa học. Các nội dung nghiên cứu rõ ràng và kết quả được phân tích, thảo luận và đánh giá có sự tham khảo và đối chiếu với các công trình liên quan. Hình ảnh minh họa rõ đẹp với các chú giải rõ ràng, các số liệu nghiên cứu được trình bày thể hiện tinh khoa học và hỗ trợ tốt cho các nội dung thảo luận.

Về nhược điểm, luận án vẫn còn một vài lỗi nhỏ về hình thức trình bày nên cần điều chỉnh để hoàn thiện hơn cũng như một số lập luận chưa thể hiện rõ kết quả ở bảng/hình được phân tích và thảo luận. Một số nội dung đề xuất để nghiên cứu sinh tham khảo điều chỉnh:

- Hạn chế sử dụng từ “tối ưu” vì các thí nghiệm chỉ xác định được các điều kiện theo các mức bố trí trong phạm vi nghiên cứu.

- Cần lập luận sát hơn về thời gian thu nhận lá lúa và giống lúa ở Hình 3.1 (trang 51) và thảo luận để xác nhận điều kiện 4-5 tuần về hàm lượng chlorophyll đối với các giống lúa ở điều kiện không che sáng cũng như chưa rõ là hàm lượng các thành phần phân tích trình bày trong Bảng 3.1 (trang 52) là ở thời gian nào.

- Nếu được, có thể bổ sung thảo luận về hàm lượng polyphenol tổng của các giống lúa có khuynh hướng giảm vào tuần 4 (Hình 3.3, trang 54). Kiểm tra số liệu hàm lượng polyphenol tổng của 2 giống TNG và NTH cũng như nhận định giống IR504 có hàm lượng này là khác biệt có ý nghĩa ở đoạn dưới bảng này.

- Xơ tan cũng giảm ở tuần 5 (Hình 3.4, trang 56) và tăng ở tuần 6 nên có thể thảo luận thêm về khuynh hướng này.

- Bảng 3.10 (trang 85), xem xét sử dụng QCVN 8-3:2012/BYT thay cho Quyết định 46/2007/QĐ-BYT.

- Nội dung 3.2.5, đề nghị thay thế “Nhiệt độ phòng” bằng nhiệt độ “ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ” ở các Hình 3.25-3.28 để phù hợp hơn với phần thảo luận.

- Nội dung 3.3, chỉ phân tích HPLC thành phần nhóm chất catechin và đánh giá là thành phần chính ở thảo luận và kết luận về khả năng chống oxy hóa ở trang 96 chưa thể hiện được thật sự đây là hợp chất chính mang lại hoạt tính này của BLL hay không nên cần lập luận theo hướng chỉ là một phần đóng góp. Rõ ràng ở kết quả phân tích HPLC ở Hình 3.29 (trang 90) còn nhiều peak hiện diện cao hơn nhiều so với 3 chất thuộc nhóm catechin.

- Kết quả ở Bảng 3.15 xác giá trị MIC của BLL đối với nấm và vi khuẩn cần bổ sung số liệu thí nghiệm thô ở phần Phụ lục.

- Phần thảo luận đôi chỗ còn liệt kê dữ liệu lặp lại từ kết quả thay vì phân tích sâu cơ chế hay lý giải nguyên nhân.

7. Nội dung của luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị của các công trình đã công bố (cấp công bố WoS (SSCI, SCI/E, ESCI...), Scopus, quốc tế có phản biện, tạp chí trong nước được tính điểm theo Hội đồng Giáo sư nhà nước ... và xếp hạng SCImago).

Các kết quả của luận án được công bố thông qua 7 bài báo khoa học trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước có liên quan trực tiếp đến các nội dung nghiên cứu cùng với 1 bài báo khoa học tổng quan. Các công trình này được liệt kê cụ thể ở trang 126.

Về bài báo khoa học theo quy định trong đào tạo, nghiên cứu sinh là tác giả chính 2 bài báo trên tạp chí thuộc danh mục Scopus (xếp hạng SCImago Q3). Nghiên cứu sinh là tác giả chính 1 bài báo tổng quan (WoS, ESCI), đồng tác giả 2 bài thuộc Scopus/WoS và tác giả chính 2 bài báo khoa học trên tạp chí khoa học tiếng Việt. Về tổng thể, các công bố này bao quát đầy đủ nội dung luận án (từ tổng quan, phân tích GC-MS, hoạt tính sinh học), khẳng định giá trị khoa học quốc tế và tính mới của nghiên cứu.

8. Kết luận chung

- Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học (mã số 9 42 02 01), với tính mới về xác định quy trình sản xuất bột lá lúa non, đánh giá hoạt tính sinh học và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột; sử dụng các phương pháp hiện đại trong phân tích chỉ tiêu; kết quả đáng tin cậy qua thống kê chuyên sâu; các công bố quốc tế và trong nước theo quy định.

- Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản, trình bày rõ tính cấp thiết, mục tiêu, nội dung nghiên cứu, cơ sở khoa học/thực tiễn và những điểm mới, phù hợp với kết quả các chương của luận án.

- Luận án đủ điều kiện bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ với nội dung khoa học và đóng góp mới với các công bố theo quy định.

Hà Nội, ngày 15 tháng 12 năm 2025

Người viết nhận xét



Huỳnh Xuân Phong

Hà Nội, ngày 08 tháng 01 năm 2026

**QUYẾT NGHỊ CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Họ và tên NCS: **Nguyễn Thị Tố Uyên**

Tên đề tài luận án: **Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*)**

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học**

Mã số: **9 42 02 01**

Người hướng dẫn: **TS. Nguyễn Hữu Thanh**

PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

1. Hội đồng đã tiến hành bỏ phiếu và kết quả kiểm phiếu như sau

Tổng số phiếu phát ra:	7
Tổng số phiếu thu vào:	7
Số phiếu hợp lệ:	7
Số phiếu không hợp lệ:	0
Số phiếu tán thành:	7
Số phiếu không tán thành:	0
Trong đó số phiếu xếp loại xuất sắc là:	2

(Kết quả bỏ phiếu có biên bản riêng và được công bố tại Hội đồng)

2. Những kết luận khoa học cơ bản, những điểm mới, đóng góp mới của luận án

Những kết luận khoa học cơ bản của luận án gồm:

+ Luận án đã xác định được các điều kiện sinh trưởng và thu hoạch phù hợp đối với lá lúa giống IR50404 nhằm thu nhận hàm lượng cao các hợp chất có hoạt tính sinh học. Cụ thể, lá lúa thu hoạch ở giai đoạn 5 tuần tuổi, trong điều kiện không che sáng, cho hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, đồng thời thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tối ưu. Trên cơ sở đó, luận án đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình chế biến bột lá lúa non với các thông số công nghệ cụ thể, bao gồm chần lá lúa ở 100°C trong 4 phút, chiết xuất bằng dung môi etanol 60% với tỷ lệ dung môi: nguyên liệu là 10:1 và sấy phun ở 120°C. Quy trình này cho phép thu



được sản phẩm bột lá lúa có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính khử gốc tự do DPPH. Các nghiên cứu về bảo quản cho thấy điều kiện bảo quản ở 5°C hoặc -18°C giúp duy trì ổn định các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của bột lá lúa non trong thời gian từ 3 đến 6 tháng.

+ Sản phẩm bột lá lúa non còn thể hiện hoạt tính sinh học gồm: chống oxy hóa thông qua các xét nghiệm loại bỏ gốc tự do DPPH, ABTS, xét nghiệm khử FRAP và RP; Kháng khuẩn đối với một số vi sinh vật gây hại như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và khả năng kháng nấm *Candida albicans* từ ATCC. Đặc biệt, các thử nghiệm *in-vivo* trên mô hình chuột BALB/c cho thấy bột lá lúa non có khả năng điều chỉnh tích cực hệ vi sinh vật đường ruột, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của lợi khuẩn và ức chế các vi khuẩn hiếu khí gây hại, từ đó góp phần cải thiện sức khỏe đường ruột và tối ưu hóa trạng thái sinh lý của vật chủ.

+ Phân tích tương quan giữa hàm lượng polyphenol, chlorophyll và các chỉ tiêu hoạt tính chống oxy hóa cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa các hợp chất này và tác dụng sinh học của bột lá lúa non, qua đó khẳng định vai trò trung tâm của các hợp chất phenolic và sắc tố trong hiệu quả sinh học của sản phẩm. Trên cơ sở kết quả phân tích khối phổ, luận án cũng đề xuất các con đường chuyển hóa liên quan, góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác động của các hợp chất sinh học trong bột lá lúa non.

Luận án đạt được một số kết quả mới như sau:

+ Lần nghiên cứu đầu tiên có tính toàn diện về hoạt tính sinh học từ bột lá lúa non giống IR50404.

+ Đề xuất bước đầu quy trình thu nhận nguyên liệu bột lá lúa non có tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và hỗ trợ sức khỏe đường tiêu hóa.

3. Cơ sở khoa học, độ tin cậy của những luận điểm và những kết luận nêu trong luận án

Luận án lựa chọn đối tượng nghiên cứu phù hợp với mục tiêu đề tài; phạm vi nghiên cứu được xác định rõ ràng, tập trung vào bột lá lúa non và các tác động sinh học liên quan. Các phương pháp sử dụng phù hợp với mục tiêu và nội dung nghiên cứu. Số liệu được xử lý thống kê nên có độ tin cậy cao.

4. Ý nghĩa về lý luận, thực tiễn và những đề nghị sử dụng các kết quả nghiên cứu của luận án

Luận án đã đóng góp những kết quả mới có ý nghĩa cho sự phát triển của chuyên ngành Công nghệ sinh học, là công trình tiên phong trong nước và quốc tế đánh giá toàn diện hoạt tính sinh học của bột cao chiết lá lúa non trong cùng một nghiên cứu.

Nghiên cứu góp phần nâng cao giá trị cây trồng chủ lực, mở rộng tiềm năng khai thác kinh tế của cây lúa, biến phụ phẩm nông nghiệp thành nguyên liệu sinh học giá trị cao.

Nghiên cứu góp phần hướng phát triển thực phẩm hỗ trợ sức khỏe an toàn từ lá lúa non.

5. Những thiếu sót về nội dung và hình thức của luận án

Chỉnh sửa theo các góp ý của từng thành viên hội đồng (theo góp ý chi tiết trong các bản nhận xét luận án và biên bản chấm luận án của hội đồng cũng như một số góp ý trực tiếp trong quyển luận án). Lưu ý một số điểm cơ bản như sau:

- Hình thức: Luận văn còn xuất hiện một số lỗi nhỏ về chính tả và trình bày. Rà soát lại các hình ảnh minh họa để biên tập lại rõ ràng hơn, bổ sung đầy đủ hơn nhằm tăng tính trực quan và khả năng truyền tải thông tin

- Nội dung:

- + Phần tổng quan: rà soát các thông tin liên quan đến chất xơ trong dinh dưỡng của lá lúa non.

- + Vật liệu và phương pháp nghiên cứu: mô tả kỹ hơn các quá trình xử lý như chần, vi sóng hoặc siêu âm. Đối với nghiên cứu thu nhận bột lá lúa non, cần làm rõ hơn cơ sở lựa chọn các thông số khảo sát. Cần chú ý thêm các điều kiện như nhiệt độ và thời gian trích ly, các thông số trong quá trình sấy phun như loại và tỷ lệ chất mang so với nguyên liệu, tốc độ nhập liệu, hiệu suất thu hồi sản phẩm bột trong các nghiên cứu tiếp theo

- + Phần kết quả - thảo luận: bổ sung và làm sâu sắc hơn phần biện luận cơ chế tác động tích cực của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột, đặc biệt là mối liên hệ giữa thành phần hóa học trong bột lá lúa non với các hoạt tính sinh học đã được ghi nhận.

- + Kết luận: trình bày ngắn gọn theo mục tiêu nghiên cứu đề ra.

- + Phần phụ lục: bổ sung số liệu thô đối với thử nghiệm kháng khuẩn, kháng nấm.

6. Mức độ đáp ứng các yêu cầu của luận án

Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ nêu ở Quy chế đào tạo Sau đại học. Luận án cần chỉnh sửa để hoàn chỉnh theo kết luận của Hội đồng.

7. Những điểm cần bổ sung, sửa chữa (nếu có) trước khi nộp luận án cho Thư viện Quốc gia Việt Nam

Đề nghị nghiên cứu sinh chỉnh sửa, bổ sung và hoàn chỉnh theo các góp ý của hội đồng.

8. Kiến nghị của Hội đồng về việc công nhận trình độ và cấp bằng tiến sĩ cho nghiên cứu sinh

Đề nghị Học viện cấp bằng Tiến sĩ ngành Công nghệ sinh học cho NCS. Nguyễn Thị Tố Uyên.

9. Nghị quyết được 7/7 thành viên Hội đồng nhất trí thông qua bằng biểu quyết công khai

Chủ tịch hội đồng tuyên bố kết thúc buổi chấm luận án tiến sĩ lúc 11 giờ 45 phút cùng ngày.

THƯ KÝ



TS. Nguyễn Hoàng Dũng

CHỦ TỊCH



GS.TS Nguyễn Cửu Khoa

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



Nguyễn Thị Trung

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 08 tháng 01 năm 2026

**BIÊN BẢN CỦA
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP HỌC VIỆN**

Họ và tên NCS: **Nguyễn Thị Tố Uyên**

Tên đề tài luận án: **Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*)**

Chuyên ngành: **Công nghệ sinh học**

Mã số: **9 42 02 01**

Người hướng dẫn: **TS. Nguyễn Hữu Thanh**

PGS. TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Phần I:

- Đại diện cơ sở đào tạo tuyên bố lý do, đọc quyết định số 1238/QĐ-HVKHCN ngày 12/11/2025 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện và đề nghị Chủ tịch Hội đồng GS.TS Nguyễn Cửu Khoa điều khiển phiên họp.
- Chủ tịch Hội đồng công bố danh sách thành viên có mặt thông qua chương trình buổi bảo vệ, đề nghị Thư ký thông báo các điều kiện chuẩn bị cho buổi bảo vệ và đọc lý lịch khoa học của nghiên cứu sinh.

Danh sách hội đồng gồm 7 thành viên

TT	Họ và tên	Chức danh trong hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa	Chủ tịch
2	PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp	Phản biện 1
3	TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan	Phản biện 2
4	TS. Nguyễn Hoàng Dũng	Ủy viên – Thư ký
5	PGS.TS. Hoàng Kim Anh	Ủy viên
6	PGS.TS. Nguyễn Thúy Hương	Ủy viên
7	PGS.TS. Huỳnh Xuân Phong	Ủy viên

Số thành viên có mặt: 7 thành viên. Vắng: 0

- Thư ký thông báo các điều kiện cho buổi bảo vệ luận án.

Thư ký đọc lý lịch khoa học, bảng điểm của nghiên cứu sinh và các điều kiện cần thiết để nghiên cứu sinh bảo vệ luận án.

4. Các thành viên hội đồng và những người tham dự nêu câu hỏi hoặc ý kiến thắc mắc về lý lịch khoa học và quá trình đào tạo của nghiên cứu sinh: Không có
5. Nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Tố Uyên trình bày nội dung luận án trong thời gian 30 phút.
6. Các phản biện đọc nhận xét (biên bản kèm theo) và đặt câu hỏi

- PGS.TS Ngô Đại Nghiệp

+ Các kết quả tính có loại trừ maltodextrin hay không. Maltodextrin có tác động tới bột lá lúa non hay không?

+ Có đánh giá độ ẩm của nguyên liệu, bột lá lúa.

+ Giải thích thêm các vi sinh vật có liên hệ như thế nào, có vi khuẩn, nấm men; cơ sở luận chọn vi sinh vật, có hướng đến ứng dụng cụ thể?

- TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan

+ Hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm của bột lá lúa non chưa thật sự mạnh, điều này có hạn chế khả năng ứng dụng trực tiếp sản phẩm như một tác nhân kháng khuẩn, nấm?

7. Tác giả luận án trả lời các câu hỏi của phản biện

- PGS.TS. Ngô Đại Nghiệp

+ Về việc loại trừ Maltodextrin trong kết quả thử nghiệm:

Các kết quả thử nghiệm hoạt tính sinh học trong luận án được thực hiện trên chế phẩm Bột lá lúa non thành phẩm (đã bao gồm MD). NCS không thực hiện loại trừ MD bằng toán học hay hóa học trong kết quả cuối cùng, tuy nhiên, tính chính xác của kết quả được đảm bảo bởi vì bản chất hóa học của MD là một polyglucosaccharide thủy phân từ tinh bột, không chứa các nhóm chức hydroxyl. Trong các thử nghiệm đối chứng (blank) của nhiều nghiên cứu trước đây và thực nghiệm sơ bộ, MD không thể hiện khả năng bắt gốc tự do (DPPH, ABTS) hay kháng khuẩn đáng kể. Do đó, toàn bộ hoạt tính ghi nhận được của BLL (như khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn) là do các hợp chất hoạt tính từ dịch chiết lá lúa mang lại.

+ Về ảnh hưởng của Maltodextrin tới hoạt tính của BLL: MD có ảnh hưởng đến hoạt tính của sản phẩm theo hai khía cạnh trái ngược nhau:

Ảnh hưởng tích cực (Bảo vệ): MD đóng vai trò là vật liệu bao gói tạo lớp màng bảo vệ các hợp chất nhạy cảm khỏi tác động của nhiệt độ cao trong quá trình sấy phun và sự oxy hóa trong quá trình bảo quản. Nhờ có MD, hoạt tính sinh học của BLL được duy trì ổn định hơn theo thời gian so với dịch chiết thô.

Ảnh hưởng về nồng độ (Pha loãng & Giải phóng): Việc bổ sung 10% MD đồng nghĩa với việc làm loãng nồng độ chất hoạt tính trong một đơn vị khối lượng bột so với cao chiết nguyên chất. Điều này giải thích tại sao giá trị MIC kháng khuẩn của BLL lại cao hơn so với các kháng sinh chuẩn, và hoạt tính kháng oxy hóa thấp hơn Vitamin C

nguyên chất. Ngoài ra, ở nồng độ cao, MD có thể tạo rào cản vật lý làm chậm quá trình giải phóng hoạt chất khi tiếp xúc với vi sinh vật.

+ Về vấn đề đánh giá độ ẩm của nguyên liệu bột lá lúa (BLL),

- Trong quá trình nghiên cứu thu nhận bột, NCS có thực hiện kiểm soát độ ẩm để đảm bảo sản phẩm đạt trạng thái bột khô, tơi xốp và bảo quản được. Cụ thể, trong thí nghiệm sấy đông khô (mẫu đối chứng), NCS đã xác định điểm dừng của quá trình sấy là khi sản phẩm đạt độ ẩm 5%. Đối với quá trình sấy phun, nhiệt độ đầu ra (outlet temperature) được kiểm soát để đảm bảo bột thu được có độ ẩm thấp tương đương nhằm tránh hiện tượng kết dính và vón cục.

- Tuy nhiên, do mục tiêu trọng tâm của luận án là tối ưu hóa quy trình để bảo toàn các hoạt chất sinh học và đánh giá hoạt tính (DPPH, kháng khuẩn, *in-vivo*), nên trong phần kết quả, NCS đã tập trung trình bày các dữ liệu về biến đổi hóa sinh và hoạt tính sinh học. Các chỉ tiêu vật lý như độ ẩm, kích thước hạt chưa được đưa vào thành một biến số khảo sát chi tiết trong các bảng số liệu chính. NCS đã chủ động đưa nội dung này vào phần Kiến nghị của luận án để xuất 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.

+ Cơ sở khoa học lựa chọn vi sinh vật: NCS đã lựa chọn 4 chủng vi sinh vật dựa trên nguyên tắc đại diện cho cấu trúc tế bào và ý nghĩa dịch tễ học: *S. aureus* (Gram dương): Đại diện cho nhóm vi khuẩn có vách peptidoglycan dày, là tác nhân chính gây ngộ độc thực phẩm và nhiễm trùng da. *E. coli* và *P. aeruginosa* (Gram âm): Đại diện cho nhóm vi khuẩn có màng ngoài lipopolysaccharide phức tạp, khó bị xâm nhập. Trong đó *E. coli* là chỉ thị vệ sinh an toàn thực phẩm và gây bệnh đường ruột phổ biến, còn *P. aeruginosa* là tác nhân gây bệnh cơ hội kháng thuốc cao. *C. albicans* (Nấm men): Đại diện cho nhóm vi sinh vật nhân thực (eukaryote) với thành tế bào chitin, thường gây bệnh cơ hội trên người. Sự lựa chọn đa dạng này tạo nên một hệ thống đánh giá phổ kháng khuẩn toàn diện. Việc lựa chọn các chủng này phục vụ trực tiếp cho định hướng ứng dụng BLL làm Thực phẩm chức năng hỗ trợ tiêu hóa và Nguyên liệu thực phẩm an toàn.

• TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan

NCS thừa nhận hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm yếu. Điều này phù hợp với bản chất của BLL là một sản phẩm tự nhiên dạng bột thô (chứa chất xơ và chất mang maltodextrin làm loãng nồng độ hoạt chất) chứ không phải là cao chiết tinh khiết. Hoạt tính chống oxy hóa của BLL thấp hơn so với chất chuẩn tinh khiết (Vitamin C) là điều dễ hiểu đối với các dịch chiết tự nhiên. Tuy nhiên, sự hiện diện đồng thời của đa dạng các chất (Chlorophyll, Polyphenol, Catechin) tạo ra tác dụng cộng hưởng, đủ để hỗ trợ bảo vệ tế bào và cải thiện sức khỏe đường ruột trong điều kiện sinh lý.

Kết quả này lại mang ý nghĩa tích cực ở khía cạnh ứng dụng làm thực phẩm bổ sung (prebiotic): BLL không gây chết hàng loạt hệ vi sinh vật đường ruột như kháng sinh, mà chỉ tạo áp lực ức chế nhẹ để điều hòa cân bằng hệ vi sinh.

8. Thư ký đọc phân biện kín và câu hỏi kèm theo

- + Tại sao tác giả lại thiết kế thí nghiệm trong điều kiện che sáng, có phù hợp với thực tế không?
- + Có đánh giá hiệu suất thu hồi bột lá lúa non?

9. Tác giả luận án trả lời các câu hỏi của phân biện kín

+ Về thiết kế thí nghiệm trong điều kiện che sáng: Bố trí thí nghiệm trong hai điều kiện chiếu sáng khác nhau được thực hiện có chủ đích khoa học nhằm đánh giá phản ứng sinh lý – sinh hóa của cây lúa non trước các mức cường độ ánh sáng khác nhau, qua đó xác định điều kiện sinh trưởng tích lũy hợp chất sinh học cao nhất. Mục tiêu này không nhằm mô phỏng điều kiện canh tác đại trà mà hướng đến việc phân tích cơ chế sinh tổng hợp chất chống oxy hóa và hợp chất thứ cấp dưới tác động của ánh sáng – yếu tố môi trường quan trọng điều tiết các con đường phenylpropanoid và flavonoid.

Thực tế, các vùng trồng lúa tại Việt Nam vẫn có sự dao động lớn về cường độ ánh sáng do điều kiện thời tiết, mật độ gieo trồng và mùa vụ, nên việc khảo sát điều kiện ánh sáng giúp mô phỏng các trạng thái sinh thái tự nhiên, đồng thời đánh giá khả năng thích ứng của cây lúa non. Hai mức che sáng (giảm 60% và 90% cường độ ánh sáng) được lựa chọn theo mô hình thực nghiệm phổ biến trong các nghiên cứu về sinh lý thực vật, stress ánh sáng và tích lũy hoạt chất, tương tự nhiều công bố quốc tế trên cây lúa mạch non, trà xanh, rau mầm và cây dược liệu. Kết quả cho thấy dưới các điều kiện stress ánh sáng khác nhau thì quá trình sinh tổng hợp sẽ khác nhau và hoạt chất thu được cũng khác nhau. Việc bố trí sản xuất trong thực tế cũng có thể diễn ra như thí nghiệm vì lúc này sản xuất lúa mạ để thu sinh khối nên sẽ sản xuất không giống sản xuất lúa thu hạt.

+ Về vấn đề đánh giá hiệu suất thu hồi bột, trong khuôn khổ luận án này, mục tiêu trọng tâm là chứng minh tiềm năng sinh học và xây dựng quy trình nhằm bảo toàn tối đa các hoạt chất nhạy cảm và hoạt tính sinh học (kháng oxy hóa, kháng khuẩn) của sản phẩm. Do đó, các thí nghiệm tối ưu hóa sấy phun được đánh giá dựa trên tiêu chí chất lượng hóa sinh thay vì hiệu suất thu hồi khối lượng.

NCS thừa nhận trong các bảng số liệu kết quả chưa trình bày cụ thể chỉ số hiệu suất thu hồi bột. Nhận thức rõ hiệu suất thu hồi là yếu tố kinh tế quyết định khi nâng cấp quy mô sản xuất, NCS đã chủ động đưa nội dung này vào phần Kiến nghị của luận án.

10. Các thành viên khác trong Hội đồng đưa ra ý kiến nhận xét (đính kèm biên bản) và đặt câu hỏi

- + Định hướng trồng lúa theo điều kiện thực tế như thế nào để thu bột lá lúa?
- + Tại sao che sáng lại có khả năng kháng khuẩn Gram âm và Gram dương khác nhau?

11. Tác giả luận án trả lời các câu hỏi nêu ra

+ Dựa trên kết quả nghiên cứu, định hướng canh tác thực tế để thu nguyên liệu làm bột lá lúa non hiệu quả và kinh tế nhất là:

Về giống lúa: Sử dụng giống IR50404. Đây là giống lúa cao sản phổ biến nhất tại ĐBSCL, sinh trưởng mạnh và cho kết quả tích lũy hoạt chất cũng như hoạt tính chống oxy hóa cao nhất trong các giống khảo sát.

Về điều kiện ánh sáng: Canh tác dưới ánh sáng tự nhiên (không che sáng). Kết quả thực nghiệm cho thấy điều kiện không che sáng giúp cây tích lũy hàm lượng Polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao vượt trội so với che lưới. Điều này rất thuận lợi cho sản xuất đại trà vì nông dân không cần tốn chi phí đầu tư nhà màng hay lưới che.

Thời điểm thu hoạch: Thu hoạch vào tuần thứ 5 (giai đoạn đẻ nhánh/sinh trưởng sinh dưỡng). Đây là thời điểm vàng giúp cân bằng giữa hàm lượng hoạt chất tối ưu và sinh khối thu được. Sự thay đổi thành phần hóa học theo điều kiện ánh sáng: Kết quả phân tích GC-MS cho thấy điều kiện ánh sáng định hình rõ rệt thành phần hoạt chất trong lá lúa. Đặc biệt ở điều kiện không che sáng, cây ưu tiên tổng hợp các hợp chất Polyphenol, Diterpenoid và Steroid. Đây là các hợp chất có tính phân cực hoặc lưỡng tính với nhiều nhóm hydroxyl (-OH). Điều kiện ánh sáng đầy đủ cây tổng hợp nhiều nhóm chất chống oxy hóa và có hoạt tính sinh học cao.

- Khi thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, có sự tương tác khác biệt về mức độ nhạy cảm với bột lá lúa đối với chủng vi khuẩn gram âm và dương. Đối với Vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*): Có vách peptidoglycan dày nhưng không có màng ngoài. Các hợp chất Polyphenol (ưu thế ở điều kiện không che sáng) dễ dàng thâm nhập và tương tác với lớp peptidoglycan, phá vỡ màng tế bào hiệu quả. Do đó, mẫu không che sáng thường thể hiện hoạt tính mạnh trên Gram dương. Đối với Vi khuẩn Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*): Có lớp màng ngoài Lipopolysaccharide (LPS) phức tạp. Lớp LPS này đóng vai trò là rào cản hiệu quả chống lại các hợp chất phân cực hoặc kích thước lớn (như một số polyphenol). Tuy nhiên, các Fatty acid ester (ưu thế ở điều kiện che sáng) với tính chất kỵ nước có khả năng tương tác và khuếch tán tốt hơn qua lớp màng lipid của vi khuẩn Gram âm so với polyphenol.

12. Đại diện tập thể hướng dẫn TS. Nguyễn Hữu Thanh phát biểu ý kiến (Đính kèm bản nhận xét)

Phần II: Hội đồng hợp riêng để bầu ban kiểm phiếu, bỏ phiếu kín và thảo luận thông qua quyết nghị của Hội đồng

1. Đề nghị thành lập ban kiểm phiếu gồm:

- PGS.TS Ngô Đại Nghiệp – Trưởng ban
- PGS.TS Hoàng Kim Anh - Ủy viên
- TS. Nguyễn Hoàng Dũng - Ủy viên

Hội đồng nhất trí với danh sách Ban kiểm phiếu và tiến hành bỏ phiếu

Kết quả bỏ phiếu như sau:

Tổng số phiếu phát ra:	7
Tổng số phiếu thu vào:	7
Số phiếu hợp lệ:	7
Số phiếu không hợp lệ:	0
Số phiếu tán thành:	7
Số phiếu không tán thành:	0
Trong đó số phiếu xếp loại xuất sắc là:	2

Sau khi thảo luận, Hội đồng thống nhất ra nghị quyết (kèm theo văn bản).

Phần III:

1. Trưởng ban kiểm phiếu PGS. TS Ngô Đại Nghiệp công bố kết quả đánh giá luận án.
2. Chủ tịch Hội đồng GS.TS Nguyễn Cửu Khoa đọc quyết nghị của Hội đồng.
3. Chủ tịch Hội đồng GS.TS Nguyễn Cửu Khoa tuyên bố Hội đồng đã hoàn thành nhiệm vụ và trao lại quyền điều khiển cho Cơ sở đào tạo.

THƯ KÝ


TS. Nguyễn Hoàng Dũng

CHỦ TỊCH


GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



Nguyễn Thị Trung

Ý KIẾN CỦA CÁC THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG

PGS. TS. Ngô Đại Nghiệp

Lá lúa non, đặc biệt của các giống lúa phổ biến như IR50404 tại Đồng bằng sông Cửu Long, là nguồn sinh khối dồi dào, giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như chlorophyll và polyphenol. Mặc dù vậy, các nghiên cứu trong nước về thành phần hóa học, hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng khuẩn) cũng như tác động của lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột còn hạn chế và thiếu tính hệ thống. Xuất phát từ thực tiễn đó, việc thực hiện nghiên cứu đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non là cần thiết.

Về mặt khoa học, luận án cung cấp thêm các dữ liệu đáng tin cậy về thành phần hóa học (chlorophyll, polyphenol) và các hoạt tính sinh học của lá lúa non (chống oxy hóa, kháng khuẩn, kích thích lợi khuẩn đường ruột). Trong khi cây lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chính của nhiều quốc gia châu Á và nguồn cung cấp thực phẩm cho hơn một nửa dân số thế giới, các nghiên cứu chuyên sâu về hoạt tính sinh học của lá lúa non tại Việt Nam vẫn còn hạn chế. Luận án đã góp phần làm rõ vấn đề chưa nghiên cứu này, thể hiện tính mới và giá trị khoa học rõ rệt.

Về mặt thực tiễn, nghiên cứu đề xuất được quy trình tối ưu sản xuất bột lá lúa non bảo toàn các hoạt tính sinh học, mở ra tiềm năng ứng dụng trong các lĩnh vực như thực phẩm hỗ trợ sức khỏe, mỹ phẩm, dược phẩm và nông nghiệp. Kết quả nghiên cứu góp phần nâng cao giá trị sử dụng của cây lúa, đặc biệt là các phụ phẩm nông nghiệp, phù hợp với định hướng phát triển kinh tế tuần hoàn và bền vững.

Cách đặt vấn đề của luận án rõ ràng, logic và phù hợp, tạo cơ sở để đạt được các kết quả nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

Luận án không trùng lặp với các luận án, công trình khoa học đã được công bố trong và ngoài nước. Các nội dung nghiên cứu được thực hiện độc lập, bảo đảm tính mới và tính trung thực khoa học. Hệ thống trích dẫn trong luận án được trình bày đầy đủ, rõ ràng; các trích dẫn trong nội dung và danh mục tài liệu tham khảo thống nhất, trùng khớp và tuân thủ đúng quy định trích dẫn khoa học.

Các nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với tên đề tài đã đăng ký. Nội dung nghiên cứu chính được triển khai đúng định hướng, bám sát mục tiêu đề ra và phù hợp với chuyên ngành Công nghệ sinh học, mã số 9 42 02 01.

Luận án sử dụng hệ thống phương pháp nghiên cứu đa dạng, kết hợp hài hòa giữa các phương pháp kinh điển trong lĩnh vực vi sinh, sinh hóa với các kỹ thuật phân tích hiện đại, tiên tiến như HPLC, GC-MS và phân tích metagenomics dựa trên giải trình tự gen 16S rRNA. Các phương pháp được lựa chọn phù hợp chặt chẽ với mục tiêu và nội dung nghiên cứu, đáp ứng yêu cầu đánh giá toàn diện từ thành phần hóa học, hoạt tính sinh học đến tác động ở mức độ hệ vi sinh vật đường ruột.

Thiết kế thí nghiệm được xây dựng khoa học, có đối chứng rõ ràng, quy trình

thực hiện mạch lạc và logic.

Về kết quả nghiên cứu, luận án đã xác định được các điều kiện sinh trưởng và thu hoạch phù hợp đối với lá lúa giống IR50404 nhằm thu nhận hàm lượng cao các hợp chất có hoạt tính sinh học. Cụ thể, lá lúa thu hoạch ở giai đoạn 5 tuần tuổi, trong điều kiện không che sáng, cho hàm lượng chlorophyll và polyphenol cao nhất, đồng thời thể hiện hoạt tính chống oxy hóa tối ưu. Trên cơ sở đó, luận án đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình chế biến bột lá lúa non với các thông số công nghệ cụ thể, bao gồm chần lá lúa ở 100°C trong 4 phút, chiết xuất bằng dung môi ethanol 60% với tỷ lệ dung môi:nguyên liệu là 10:1 và sấy phun ở 120°C. Quy trình này cho phép thu được sản phẩm bột lá lúa có hàm lượng chlorophyll, polyphenol và hoạt tính khử gốc tự do DPPH cao nhất.

Các nghiên cứu về bảo quản cho thấy điều kiện bảo quản ở 5°C hoặc -18°C giúp duy trì ổn định các hợp chất sinh học và hoạt tính chống oxy hóa của bột lá lúa non trong thời gian từ 3 đến 6 tháng, qua đó khẳng định tính khả thi của sản phẩm trong điều kiện lưu trữ thực tế. Bột lá lúa non thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 45,69 mg/mL (DPPH), 80,9 mg/mL (ABTS), 36,67 mg/mL (FRAP) và 46,49 mg/mL (RP), cho thấy tiềm năng ứng dụng rõ rệt trong các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe.

Bên cạnh đó, sản phẩm bột lá lúa non còn thể hiện khả năng kháng khuẩn đối với một số vi sinh vật gây hại như *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và khả năng kháng nấm *Candida albicans* từ ATCC. Đặc biệt, các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình chuột BALB/c cho thấy bột lá lúa non có khả năng điều chỉnh tích cực hệ vi sinh vật đường ruột, tạo điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của lợi khuẩn và ức chế các vi khuẩn hiếu khí gây hại, từ đó góp phần cải thiện sức khỏe đường ruột và tối ưu hóa trạng thái sinh lý của vật chủ.

Phân tích tương quan giữa hàm lượng polyphenol, chlorophyll và các chỉ tiêu hoạt tính chống oxy hóa cho thấy mối liên hệ chặt chẽ giữa các hợp chất này và tác dụng sinh học của bột lá lúa non, qua đó khẳng định vai trò trung tâm của các hợp chất phenolic và sắc tố trong hiệu quả sinh học của sản phẩm. Trên cơ sở kết quả phân tích khối phổ, luận án cũng đề xuất các con đường chuyển hóa liên quan, góp phần làm sáng tỏ cơ chế tác động của các hợp chất sinh học trong bột lá lúa non.

Luận án có những đóng góp mới đáng ghi nhận, bao gồm việc xây dựng quy trình công nghệ sản xuất bột lá lúa non theo hướng ứng dụng; cung cấp dữ liệu khoa học về thành phần hóa học và các hoạt tính sinh học của bột lá lúa; đồng thời làm rõ tác động phụ thuộc liều của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột thông qua tiếp cận metagenomics.

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu của luận án có độ tin cậy cao, được xây dựng trên cơ sở phương pháp nghiên cứu phù hợp và thiết kế thí nghiệm chặt chẽ. Luận án đã đóng góp những kết quả mới có ý nghĩa cho sự phát triển của chuyên ngành Công

nghệ sinh học, đồng thời có giá trị thực tiễn trong việc phát triển sản phẩm từ phụ phẩm nông nghiệp, góp phần nâng cao giá trị cây lúa và phục vụ cho các lĩnh vực sản xuất, kinh tế và đời sống xã hội. Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu về nội dung, chất lượng và giá trị khoa học của một luận án tiến sĩ.

Một số góp ý chỉnh sửa:

Mục tiêu nghiên cứu đang viết với văn phong nội dung, nên biên tập lại cho phù hợp.

Cần làm rõ hiệu quả sinh học cao là như thế nào

Trang 19, thông qua hiến tạng là văn dịch, thống nhất thuật ngữ thực phẩm bảo vệ sức khỏe

Trang 27, thêm địa điểm thu mẫu, công ty, cập nhật theo đơn vị hành chính mới.

Làm rõ thông số maltodextrin, làm rõ chỉ số DE, làm rõ cách bổ sung maltodextrin.

Chưa có quy trình, thuyết minh quy trình sản xuất bột lá lúa nên bổ sung

Các kết quả tính có loại trừ maltodextrin hay không. Maltodextrin có tác động tới bột lá lúa non hay không?

Một số thông tin về tháng năm, nơi thí nghiệm nên bổ sung đầy đủ.

Làm rõ độ ẩm của nguyên liệu, cao chiết; có quy về hàm ẩm tuyệt đối hay không.

Thay từ "xơ tan" thành "chất xơ hòa tan"

Giải thích thêm các vi sinh vật có liên hệ như thế nào, có vi khuẩn, nấm men; cơ sở luận chọn vi sinh vật, có hướng đến hướng dụng cụ thể?

Trang 49, cần mô tả rõ hơn, Trang 90, trích dẫn chưa khớp; Trang 92, hình hơi nhòe

Luận án đã được công bố trong 07 công trình khoa học trong và ngoài nước, bao gồm 01 bài báo tổng quan.

Luận án Đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành công nghệ sinh học. Bản tóm tắt thể hiện tốt nội dung cơ bản của luận án. Luận án có thể đưa ra bảo vệ cấp Học viện để nhận bằng Tiến sĩ.

TS. Nguyễn Hữu Toàn Phan

Đồng ý với các nhận xét của thầy PGS.TS Ngô Đại Nghiệp.

Hạn chế chính của luận án: hoạt tính kháng khuẩn, kháng oxy hóa chưa cao nếu hướng tới ứng dụng; tuy nhiên cũng mở ra cơ hội cho các nghiên cứu tiếp theo để tăng hoạt tính.

Một số góp ý chỉnh sửa bổ sung:

Nên có nghiên cứu thời gian dài hơn để rõ hoạt tính.

Bổ sung quy trình công nghệ ban đầu; cần chuẩn hóa quy trình để đưa ra quy mô ứng dụng.

Cần có biện luận, kiến nghị về các chỉ tiêu chưa đánh giá trong quá trình sấy phun tạo bột lá lúa non như hiệu suất thu hồi, độ ẩm, kích thước hạt,

PGS.TS Hoàng Kim Anh

Đồng ý với các nhận xét của các thầy phản biện.

Luận án có tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Luận sử dụng phương pháp mới, đa dạng.

Một số góp ý chỉnh sửa bổ sung:

Chất xơ hòa tan chiếm tỷ lệ cao trong carbohydrate tổng; hoạt tính prebiotic thể hiện tốt, nên thể hiện và làm rõ hướng này trong luận án

Nên có biện luận, làm rõ các thông số lựa chọn

Cần bổ sung thông số các quá trình chần, vi sóng, siêu âm.

PGS.TS Nguyễn Thúy Hương

Đồng ý với các nhận xét của các thầy, cô trong hội đồng.

Một số góp ý, nhận xét:

Sấy phun: cần tối ưu các thông số kỹ thuật sấy phun (nhiệt độ đầu vào, nhiệt độ đầu ra, áp lực phun, tốc độ phun...) và chất mang (chất hỗ trợ phun) trong quá trình sấy phun cũng như tăng cường phần biện luận trong kỹ thuật sấy phun song song với việc giữ hoạt tính sinh học cho chế phẩm BLL.

Các chỉ tiêu chất lượng của BLL cần được biện luận và xây dựng dựa trên bản chất của chế phẩm BLL. Phần này tác giả chưa đề cập, các chỉ tiêu nào là chỉ tiêu đại diện? Các yếu tố cấu thành chất lượng chế phẩm BLL?

Các hoạt tính sinh học của BLL khảo sát sau thời gian bảo quản như thế nào? Hoạt tính sinh học thay đổi rất nhanh theo thời gian và điều kiện bảo quản.

Cần làm rõ bản chất của chất kháng khuẩn nào có trong BLL và dựa vào lý thuyết để biện luận cơ chế kháng khuẩn của BLL.

Với hoạt tính kháng khuẩn cao của BLL tại sao lại ảnh hưởng tốt đến hệ vi sinh đường ruột. Cần bổ sung thêm phần biện luận cơ chế BLL tác động tích cực lên hệ vi sinh đường ruột trong khi BLL lại có tính kháng khuẩn cao

Phần Kết luận cần chú ý bám sát mục tiêu

PGS. TS. Huỳnh Xuân Phong

Đồng ý với các nhận xét của các thầy, cô trong hội đồng.

Một số góp ý, nhận xét:

Hạn chế sử dụng từ "tối ưu" vì các thí nghiệm chỉ xác định được các điều kiện theo các mức bố trí trong phạm vi nghiên cứu.

Cần lập luận sát hơn về thời gian thu nhận lá lúa và giồng lúa ở Hình 3.1 (trang 51) và thảo luận để xác nhận điều kiện 4-5 tuần về hàm lượng chlorophyll đối với các giồng lúa ở điều kiện không che sáng cũng như chưa rõ là hàm lượng các thành phần phân tích trình bày trong Bảng 3.1 (trang 52) là ở thời gian nào.

Nếu được, có thể bổ sung thảo luận về hàm lượng polyphenol tổng của các giồng lúa có khuynh hướng giảm vào tuần 4 (Hình 3.3, trang 54).

Xơ tan cũng giảm ở tuần 5 (Hình 3.4, trang 56) và tăng ở tuần 6 nên có thể thảo luận thêm về khuynh hướng này.

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Đồng ý với các nhận xét của các thầy, cô trong hội đồng.

Một số góp ý, nhận xét:

Một số hình ảnh (Hình 3.29 trang 90, Hình 3.30 trang 92) nên biên tập rõ ràng hơn.

Cần bổ sung thêm phần biện luận cơ chế bột lá lúa tác động tích cực lên hệ vi sinh đường ruột, mối liên hệ giữa thành phần hóa học trong bột lá lúa và các hoạt tính sinh học từ nó.

GS.TS Nguyễn Cửu Khoa

Đồng ý với các nhận xét của các thầy, cô trong hội đồng.

Hướng nghiên cứu là hướng mới, mở ra hướng tạo đa dạng sản phẩm từ lúa, cần tập trung vào theo hướng đặc trị các bệnh liên quan đường ruột.

Cần có biện luận thêm và việc che sáng và không che sáng khi trồng lúa trong nghiên cứu theo hướng ứng dụng.

Luận án đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ và nghiên cứu sinh cần chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng.

VIỆN HÀN LÂM
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VN
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA, BỔ SUNG LUẬN ÁN TIẾN SĨ
CẤP HỌC VIỆN**

Ngày 08 tháng 01 năm 2026, Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Tố Uyên theo Quyết định số 1238/QĐ-HVKHCN ngày 12 tháng 11 năm 2025 của Giám đốc Học viện.

Đề tài: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và tác động lên một số vi sinh vật đường ruột của bột lá lúa non (*Oryza sativa*).

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 9 42 02 01

Người hướng dẫn khoa học:

- TS. Nguyễn Hữu Thanh, Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP.HCM.
- PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo, Viện Khoa học Sự sống, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Theo Biên bản của Hội đồng, NCS phải bổ sung và chỉnh sửa luận án các điểm sau đây:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, bổ sung	Nội dung đã được chỉnh sửa, bổ sung (Ghi rõ số trang/chương/mục... đã được chỉnh sửa)
I	Về hình thức	
1	Hạn chế sử dụng từ "tối ưu" vì các thí nghiệm chỉ xác định được các điều kiện theo các mức bố trí trong phạm vi nghiên cứu.	NCS tiếp thu và chỉnh sửa: đã thay thế từ "tối ưu" bằng "lựa chọn" hoặc "xác định" trong các tiêu đề mục 3.2 và các phần liên quan.
2	Về từ ngữ sử dụng, nên thống nhất dùng "xây dựng quy trình công nghệ thu nhận bột lá lúa non" trong toàn bài, thay vì "xây dựng quy trình công nghệ sản xuất bột lá lúa non", do quy mô nghiên cứu của luận án nhỏ, chưa ở mức quy trình sản xuất.	NCS đã rà soát và thay thế cụm từ "quy trình sản xuất" thành "quy trình thu nhận" trên toàn văn luận án.

Lưu ý: Các chữ ký xác nhận cần gắn với nội dung trên cùng một trang giấy. Học viện sẽ không xác nhận nếu phần chữ ký tách rời với nội dung



3	Luận văn còn xuất hiện một số lỗi nhỏ về chính tả và trình bày, cần được rà soát và chỉnh sửa để nâng cao chất lượng hình thức. Rà soát lại các hình ảnh minh họa để biên tập lại rõ ràng hơn, bổ sung đầy đủ hơn nhằm tăng tính trực quan và khả năng truyền tải thông tin.	NCS đã rà soát và chỉnh sửa lại toàn bộ luận án theo góp ý.
4	Tên luận án chưa bao quát 2 nội dung đầu (thu hoạch, quy trình).	NCS xin phép được giải trình về việc đặt tên đề tài như sau: Mặc dù luận án bao gồm 3 nội dung lớn: (1) Tối ưu hóa điều kiện thu hoạch, (2) Xây dựng quy trình chế biến, và (3) Đánh giá hoạt tính sinh học; tuy nhiên, NCS xác định trọng tâm và điểm mới nhất của luận án nằm ở phần đánh giá hoạt tính sinh học và tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột. Hai nội dung đầu (thu hoạch và quy trình) đóng vai trò là bước chuẩn bị nguyên liệu nhằm mục đích tạo ra sản phẩm bột lá lúa non có chất lượng ổn định và hàm lượng hoạt chất cao nhất để phục vụ cho nội dung chính là đánh giá hoạt tính. Nếu đưa tất cả các nội dung vào, tên đề tài sẽ trở nên quá dài và dàn trải. Do đó, NCS đã lựa chọn tên đề tài tập trung vào mục tiêu cuối cùng và quan trọng nhất của nghiên cứu là các đặc tính chức năng của sản phẩm.
II	Về Nội dung	
A	<i>Phần Tổng quan nghiên cứu</i>	
1	Mục 1.2.1, Bảng 1.1 (Thành phần dinh dưỡng của lá lúa non): nên lưu ý chất xơ cũng là một thành phần carbohydrate. Nếu hàm lượng carbohydrate được tính bằng phương pháp chênh lệch (lấy 100% trừ đi các	NCS tiếp thu góp ý và giải trình như sau: Số liệu tại Bảng 1.1 là kết quả được trích dẫn nguyên văn từ công trình công bố của Tamprasit và cộng sự (2019). Trong nghiên cứu gốc này,

	thành phần khác như ẩm, protein, lipid, tro) thì sẽ bao gồm hàm lượng chất xơ. Chú ý chỉnh lại điểm này trong phần chú thích của bảng.	các tác giả đã xác định riêng biệt hàm lượng chất xơ (Crude fiber/Dietary fiber) và tính hàm lượng Carbohydrate còn lại (thường được hiểu là carbohydrate khả dụng) bằng cách lấy 100% trừ đi tổng các thành phần gồm ẩm, protein, lipid, tro và cả chất xơ. Để đảm bảo tính trung thực trong trích dẫn tài liệu tham khảo, NCS xin phép được giữ nguyên các con số theo tài liệu gốc. Tuy nhiên, để tránh gây hiểu lầm cho người đọc và tuân thủ đúng bản chất hóa học như góp ý của Phản biện, NCS đã bổ sung và chỉnh sửa phần ghi chú (Note) ngay dưới Bảng 1.1 (trang 8) để làm rõ phương pháp tính toán của tác giả gốc.
B	<i>Phần Thời gian, địa điểm và phương pháp nghiên cứu</i>	
1	Lưu ý mô tả kỹ hơn các quá trình xử lý như chần, vi sóng hoặc siêu âm: công suất siêu âm là bao nhiêu, cách kiểm soát nhiệt độ trong các quá trình này.	NCS đã thêm chi tiết model máy, công suất vi sóng, tần số siêu âm vào chương 2 phương pháp nghiên cứu tại Thí nghiệm 2.1. Khảo sát quy trình công nghệ thu nhận BLL (trang 31-32).
C	<i>Phần Kết quả và thảo luận</i>	
1	Cần lập luận sát hơn về thời gian thu nhận lá lúa và giống lúa ở Hình 3.1 (trang 51) và thảo luận để xác nhận điều kiện 4-5 tuần về hàm lượng chlorophyll đối với các giống lúa ở điều kiện không che sáng cũng như chưa rõ là hàm lượng các thành phần phân tích trình bày trong Bảng 3.1 (trang 52) là ở thời gian nào.	NCS đã làm rõ dữ liệu Bảng 3.1 (mục 3.1.1 trang 52) là kết quả phân tích ở tuần thứ 5. Bổ sung lập luận chọn tuần 5 do cân bằng giữa sinh khối và hoạt chất.
2	Bổ sung thảo luận về hàm lượng polyphenol tổng của các giống lúa có khuynh hướng giảm vào tuần 4 (Hình 3.3, trang 54). Kiểm tra số liệu hàm	NCS đã thêm đoạn thảo luận giải thích xu hướng giảm polyphenol ở tuần 4 và biến động chất xơ tan do quá trình chuyển hóa sinh lý của cây giai đoạn

	lượng polyphenol tổng của 2 giống TNG và NTH cũng như nhận định giống IR504 có hàm lượng này là khác biệt có ý nghĩa ở đoạn dưới bảng này. Xơ tan cũng giảm ở tuần 5 (Hình 3.4, trang 56) và tăng ở tuần 6 nên có thể thảo luận thêm về khuynh hướng này.	đề nhánh tại mục 3.1.1 phần Chương 3. Kết quả và Thảo luận (trang 51).
3	Bảng 3.10 (trang 85), xem xét sử dụng QCVN 8-3:2012/BYT thay cho Quyết định 46/2007/QĐ-BYT.	NCS đã cập nhật lại các tiêu chuẩn so sánh trong Bảng 3.10 gồm: QCVN 8-2:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm kim loại nặng trong thực phẩm; QCVN 8-3:2012/BYT đối với ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm; QCVN 8-1:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm để thay thế cho Quyết định 46/2007/QĐ-BYT (trang 86).
4	Nội dung 3.2.5, đề nghị thay thế “Nhiệt độ phòng” bằng nhiệt độ “ $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ” ở các Hình 3.25-3.28 để phù hợp hơn với phần thảo luận.	NCS điều chỉnh theo góp ý tại các hình 3.25-3.28 (trang 87-89).
5	Nội dung 3.3, chỉ phân tích HPLC thành phần nhóm chất catechin và đánh giá là thành phần chính ở thảo luận và kết luận về khả năng chống oxy hóa ở trang 96 chưa thể hiện được thật sự đây là hợp chất chính mang lại hoạt tính này của BLL hay không nên cần lập luận theo hướng chỉ là một phần đóng góp. Rõ ràng ở kết quả phân tích HPLC ở Hình 3.29 (trang 90) còn nhiều peak hiện diện cao hơn nhiều so với 3 chất thuộc nhóm catechin.	NCS đã điều chỉnh phần Bàn luận mục 3.3, khẳng định catechin là một trong những nhóm chất đóng góp vào hoạt tính, bên cạnh các hợp chất khác chưa định danh. Các nội dung đã cập nhật lại gồm Mục 3.3.1. Phân tích HPLC xác định nhóm chất catechin (Trang 91); Mục 3.3.4. Đánh giá khả năng chống oxy hóa của BLL. (Đoạn mở đầu - Trang 97).
6	Kết quả ở Bảng 3.15 xác giá trị MIC của BLL đối với nấm và vi khuẩn cần bổ sung số liệu thí nghiệm thô ở phần Phụ lục	NCS đã bổ sung bảng số liệu OD đo hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm nhằm xác định giá trị MIC vào Phụ lục 2.

7	Phần thảo luận đôi chỗ còn liệt kê dữ liệu lặp lại từ kết quả thay vì phân tích sâu cơ chế hay lý giải nguyên nhân.	NCS đã điều chỉnh lượt bỏ tránh các đoạn lặp lại trong phần chương 3 kết quả và thảo luận gồm: Mục 3.2.3.3. Đánh giá ảnh hưởng nhiệt độ sấy phun (Trang 83); Mục 3.1.1.7. Đánh giá ảnh hưởng thời gian sinh trưởng (Trang 60); Mục 3.4.2. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn (Trang 99-100); Mục 3.5.2. Đánh giá tác động tiêu thụ BLL (Trang 117-119).
8	Phần bản luận về tác động của các điều kiện xử lý như chân, vi sóng hoặc siêu âm, hay ảnh hưởng của dung môi ethanol đến quá trình trích ly hoạt chất còn khá sơ sài so với phần bản luận liên quan đến thử nghiệm <i>in-vivo</i> trên chuột, nên điều chỉnh lại cho cân đối hơn.	NCS đã bổ sung thêm phần bản luận tại mục 3.2.2.3 (trang 80) về cơ chế ảnh hưởng của nhiệt độ và dung môi đến hiệu suất trích ly để cân đối với phần đánh giá tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột.
9	Đối với nghiên cứu thu nhận bột lá lúa non, cần làm rõ hơn cơ sở lựa chọn các thông số khảo sát. Cần chú ý thêm các điều kiện như nhiệt độ và thời gian trích ly, các thông số trong quá trình sấy phun như loại và tỷ lệ chất mang so với nguyên liệu, tốc độ nhập liệu, hiệu suất thu hồi sản phẩm bột trong các nghiên cứu tiếp theo. Trong các nghiên cứu tiếp theo, nên lưu ý thêm về hiệu suất thu hồi BLL sau khi sấy phun (liên quan đến số lượng), bên cạnh những kết quả và bản luận về thành phần các hoạt chất sinh học trong BLL (liên quan đến chất lượng), làm cơ sở để lựa chọn điều kiện sấy.	-NCS hoàn toàn đồng ý rằng các thông số như nhiệt độ/thời gian trích ly, loại chất mang, tốc độ nhập liệu và hiệu suất thu hồi bột là các yếu tố quan trọng cần tối ưu hóa để hoàn thiện quy trình sản xuất ở quy mô lớn. Tuy nhiên, trong khuôn khổ của luận án này, mục tiêu trọng tâm là đánh giá hoạt tính sinh học của sản phẩm. Do đó, NCS đã tập trung khảo sát nồng độ ethanol, tỷ lệ dung môi - hai yếu tố quyết định trực tiếp đến khả năng hòa tan và thu nhận các nhóm chất mục tiêu (chlorophyll, polyphenol); và nhiệt độ sấy - yếu tố ảnh hưởng mạnh nhất đến sự suy giảm các hợp chất nhạy nhiệt. -Nhiệt độ và thời gian trích ly được NCS cố định dựa trên các nghiên cứu trước đó nhằm đảm bảo sự ổn định của

		quy trình nền. Tương tự, các thông số kỹ thuật khác (tốc độ nhập liệu, loại chất mang Maltodextrin) được thiết lập cố định dựa trên thông số chuẩn của thiết bị và các nghiên cứu tham khảo để giảm thiểu biến số, tập trung làm rõ tác động của nhiệt độ. -Tiếp thu ý kiến của Phản biện, NCS đã bổ sung các nội dung này vào phần Kiến nghị (trang 125) của luận án để định hướng cho các nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ tiếp theo.
10	Luận án nên bổ sung và làm sâu sắc hơn phần biện luận cơ chế tác động tích cực của bột lá lúa non lên hệ vi sinh vật đường ruột, đặc biệt là mối liên hệ giữa thành phần hóa học trong bột lá lúa non với các hoạt tính sinh học đã được ghi nhận.	NCS đã bổ sung đoạn thảo luận chi tiết tại Mục 3.5.2 (trang 117) để làm rõ cơ chế tác động kép gồm: Cơ chế Prebiotic (vai trò của chất xơ tan trong việc cung cấp cơ chất cho nhóm vi khuẩn lên men sinh SCFA); Cơ chế chọn lọc vi sinh (vai trò của nhóm Catechin/EGCG). Mặc dù hoạt tính kháng khuẩn trực tiếp không mạnh (MIC cao), nhưng các hợp chất này tạo ra tác động ức chế chọn lọc đối với nhóm vi khuẩn Gram âm cơ hội (<i>Proteobacteria</i>), đồng thời đóng vai trò là tiền chất để các lợi khuẩn (<i>Lactobacillus</i>) chuyển hóa thành các chất điều hòa sinh học (như catechol), giải thích cho các thay đổi tích cực về chuyển hóa năng lượng quan sát được trên chuột.
11	Thời gian thí nghiệm <i>in-vivo</i> còn tương đối ngắn, do đó chưa đánh giá đầy đủ được các tác động sinh lý dài hạn của bột lá lúa non.	NCS xin thừa nhận hạn chế này. Thời gian 14 ngày trong nghiên cứu này được thiết kế như một thử nghiệm thăm dò ngắn hạn (short-term intervention) để đánh giá tính an toàn cấp tính và các thay đổi nhanh của hệ vi sinh vật. NCS nhận thức rõ rằng để

		đánh giá đầy đủ tác động sinh lý dài hạn (như thay đổi cấu trúc mô bên vững hay hiệu quả tăng trưởng lâu dài), cần có các nghiên cứu kéo dài hơn (4-8 tuần). NCS đã bổ sung nội dung này vào phần Kiến nghị (trang 125) để định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.
12	Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của bột lá lúa non chưa thật sự mạnh, điều này phần nào hạn chế khả năng ứng dụng trực tiếp sản phẩm như một tác nhân kháng khuẩn, nấm. Hoạt tính kháng khuẩn yếu: Mặc dù luận án khảo sát hoạt tính kháng khuẩn, kết quả cho thấy BLL chỉ có hoạt tính kháng khuẩn/kháng nấm rất yếu (MIC cao, đặc biệt với <i>C. albicans</i> MIC >8.000 ug/mL). Tác giả cũng tự đánh giá BLL “hầu như không hiệu quả kháng nấm”. Điều này có thể làm giảm tiềm năng ứng dụng trực tiếp BLL như một tác nhân kháng khuẩn mạnh, mà chỉ có thể là thành phần hỗ trợ. Hoạt tính chống oxy hóa không cao.	NCS thừa nhận hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm yếu. Điều này phù hợp với bản chất của BLL là một sản phẩm tự nhiên dạng bột thô (chứa chất xơ và chất mang maltodextrin làm loãng nồng độ hoạt chất) chứ không phải là cao chiết tinh khiết. Tuy nhiên, kết quả này lại mang ý nghĩa tích cực ở khía cạnh ứng dụng làm thực phẩm bổ sung (prebiotic): BLL không gây chết hàng loạt hệ vi sinh vật đường ruột như kháng sinh, mà chỉ tạo áp lực ức chế nhẹ để điều hòa cân bằng hệ vi sinh. Do đó, NCS đã điều chỉnh phần kết luận để khẳng định tiềm năng ứng dụng của BLL thiên về hướng “hỗ trợ cân bằng hệ vi sinh và sức khỏe đường ruột” hơn là một tác nhân điều trị nhiễm khuẩn trực tiếp. Hoạt tính chống oxy hóa của BLL thấp hơn so với chất chuẩn tinh khiết (Vitamin C) là điều dễ hiểu đối với các dịch chiết tự nhiên. Tuy nhiên, sự hiện diện đồng thời của đa dạng các chất (Chlorophyll, Polyphenol, Catechin) tạo ra tác dụng cộng hưởng, đủ để hỗ trợ bảo vệ tế bào và cải thiện sức khỏe đường ruột trong điều kiện sinh lý.

13	Bên cạnh đó, một số chỉ tiêu công nghệ chưa được nhắc đến như độ hòa tan, kích thước hạt. Mặc dù đã tối ưu hóa nhiệt độ sấy phun, tác giả kiến nghị cần bổ sung đánh giá các chỉ tiêu công nghệ khác như hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm, kích thước hạt và độ hòa tan nhằm hoàn thiện quy trình ở quy mô ứng dụng. Đây là những thông số quan trọng để chuyển giao công nghệ vào sản xuất thực tế.	NCS hoàn toàn đồng ý rằng độ hòa tan và kích thước hạt là các thông số vật lý quan trọng quyết định khả năng ứng dụng của sản phẩm bột thực phẩm. Tuy nhiên, mục tiêu trọng tâm của luận án là đánh giá hoạt tính sinh học (chống oxy hóa, kháng khuẩn) và hiệu quả sinh học trên mô hình động vật (tác động lên hệ vi sinh vật đường ruột). Do đó, trong khuôn khổ giới hạn của đề tài, NCS đã tập trung tối ưu hóa các thông số ảnh hưởng trực tiếp đến sự bảo toàn các hoạt chất sinh học (chlorophyll, polyphenol). Tiếp thu ý kiến của Hội đồng, NCS đã bổ sung nội dung này vào phần Kiến nghị (trang 125) để định hướng cho việc hoàn thiện tiêu chuẩn kỹ thuật sản phẩm trong các nghiên cứu triển khai sản xuất tiếp theo.
14	Quy trình chưa thấy có lưu đồ khối kỹ thuật và thuyết minh cụ thể.	NCS đã bổ sung sơ đồ khối kỹ thuật chi tiết (Hình 3.29) tóm tắt toàn bộ quy trình thu nhận bột lá lúa non (từ khâu thu hoạch, xử lý nguyên liệu đến sấy phun và bảo quản) kèm theo thuyết minh cụ thể các thông số vận hành tại Mục 3.2.5.5 (Kết luận về quy trình công nghệ) trong luận án chỉnh sửa (trang 90).
15	Biên tập lại hình ảnh (Hình 3.29, 3.30) cho rõ ràng.	NCS đã biên tập lại hình ảnh (Hình 3.29, 3.30) rõ ràng hơn.
16	Sấy phun: cần tối ưu các thông số kỹ thuật sấy phun (nhiệt độ đầu vào, nhiệt độ đầu ra, áp lực phun, tốc độ phun...) và chất mang (chất hỗ trợ phun) trong quá trình sấy phun cũng như tăng cường phần biện luận trong kỹ thuật	NCS xin tiếp thu và đã bổ sung đoạn biện luận sâu tại mục thảo luận (Mục 3.2.3.3 trang 83) để làm rõ cơ chế bảo vệ của quá trình vi bao (encapsulation) trong sấy phun và mối tương quan giữa nhiệt độ sấy với sự bảo toàn hoạt tính sinh học của BLL.

	sấy phun song song với việc giữ hoạt tính sinh học cho chế phẩm BLL.	
17	Các chỉ tiêu chất lượng của BLL cần được biện luận và xây dựng dựa trên bản chất của chế phẩm BLL. Phần này tác giả chưa đề cập, các chỉ tiêu nào là chỉ tiêu đại diện? Các yếu tố cấu thành chất lượng chế phẩm BLL?	NCS xin tiếp thu và đã bổ sung phần biện luận về các chỉ tiêu chất lượng đặc trưng của BLL dựa trên bản chất là một sản phẩm bột thực vật giàu hoạt tính sinh học. Theo đó, bộ chỉ tiêu chất lượng của BLL được xây dựng dựa trên 3 nhóm yếu tố cấu thành: 1. Chỉ tiêu chất lượng cảm quan và vật lý: Do bản chất sản phẩm là bột sấy phun từ dịch chiết lá, màu xanh tự nhiên (đại diện bởi Chlorophyll) và trạng thái bột mịn, khô tơi là yếu tố quan trọng nhất. NCS xác định Độ ẩm (cần <5% để bảo quản) và Màu sắc là chỉ tiêu đại diện. 2. Chỉ tiêu chất lượng hóa sinh: Vì mục tiêu ứng dụng của BLL là thực phẩm bảo vệ sức khỏe/chức năng, nên hàm lượng các hoạt chất sinh học chính là thước đo chất lượng. NCS đề xuất Hàm lượng Polyphenol tổng, Flavonoid và Chlorophyll là các chỉ tiêu đại diện cho "phẩm cấp" của sản phẩm, tương quan trực tiếp với hoạt tính chống oxy hóa (DPPH) và kháng khuẩn đã chứng minh. 3. Chỉ tiêu an toàn (Vệ sinh thực phẩm): Đảm bảo giới hạn vi sinh vật và kim loại nặng theo quy chuẩn Việt Nam (QCVN 8-2:2011/BYT và QCVN 8-3:2012/BYT) để chứng minh độ an toàn khi tiêu thụ.
18	Các hoạt tính sinh học của BLL khảo sát sau thời gian bảo quản như thế nào? Hoạt tính sinh học thay đổi rất nhanh theo thời gian và điều kiện bảo quản.	NCS hoàn toàn đồng ý rằng các hợp chất tự nhiên rất nhạy cảm và dễ bị suy giảm hoạt tính trong quá trình bảo quản. Nhận thức được vấn đề này,

		trong luận án (Mục 3.2.5, Trang 86-88), NCS đã thực hiện khảo sát độ ổn định của BLL trong thời gian 6 tháng tại 3 điều kiện nhiệt độ: $27\pm 2^{\circ}\text{C}$, 5°C và -18°C. Về các chỉ tiêu hoạt tính được khảo sát sau bảo quản, NCS xin giải trình như sau: 1. Lựa chọn chỉ tiêu đại diện: NCS đã lựa chọn Hoạt tính kháng oxy hóa (DPPH) làm chỉ tiêu sinh học đại diện để theo dõi định kỳ hàng tháng. Lý do là kết quả nghiên cứu (Mục 3.3.3) đã chứng minh hoạt tính DPPH có mối tương quan rất chặt chẽ ($R > 0,97$) với hàm lượng Polyphenol và Chlorophyll – hai nhóm hoạt chất chính của sản phẩm. Sự suy giảm DPPH sẽ phản ánh chính xác sự suy giảm chất lượng chung của BLL. 2. Kết quả khảo sát: Kết quả cho thấy hoạt tính DPPH giảm dần theo thời gian. Tại nhiệt độ phòng, hoạt tính giảm nhanh và rõ rệt từ tháng thứ 5. Tuy nhiên, tại điều kiện -18°C, hoạt tính này được duy trì ổn định nhất (giảm chậm trong 4 tháng đầu). 3. Về hoạt tính kháng khuẩn/hệ vi sinh vật: Do giới hạn về nguồn lực và thời gian, NCS chưa thực hiện lặp lại các thử nghiệm <i>in-vivo</i> (trên chuột) và kháng khuẩn sau thời gian bảo quản. NCS xin tiếp thu ý kiến và đưa nội dung này vào phần Kiến nghị để đánh giá hạn sử dụng (shelf-life) chính xác hơn cho sản phẩm thương mại sau này.
19	Cần làm rõ bản chất của chất kháng khuẩn nào có trong BLL và dựa vào lý	NCS đã bổ sung phần giải thích cơ chế tại mục 3.4.2. Đánh giá hoạt tính

	thuyết để biện luận cơ chế kháng khuẩn của BLL	kháng khuẩn và kháng nấm của BLL (trang 99).
20	Với hoạt tính kháng khuẩn cao của BLL tại sao lại ảnh hưởng tốt đến hệ vi sinh đường ruột. Cần bổ sung thêm phần biện luận cơ chế BLL tác động tích cực lên hệ vi sinh đường ruột trong khi BLL lại có tính kháng khuẩn cao	NCS đã bổ sung lập luận về tác động chọn lọc (selective modulation): Polyphenol ức chế mạnh vi khuẩn Gram âm gây bệnh (<i>E. coli</i>) nhưng ít ảnh hưởng hoặc thậm chí kích thích vi khuẩn Gram dương có lợi (<i>Lactobacillus</i>) và vi khuẩn kỵ khí sinh SCFA. NCS đã bổ sung ở mục 3.5.2.3 trang 117.
21	Tác giả sử dụng mẫu phân gộp cho phân tích 16S rRNA. Việc này giúp tiết kiệm chi phí nhưng không phản ánh được sự biến thiên cá thể trong hệ vi sinh vật và giảm sức mạnh thống kê của kết quả. Tác giả cũng đã kiến nghị cần chuyển sang mẫu đơn để tăng độ chính xác.	NCS thừa nhận hạn chế này và đề xuất khắc phục như là một hướng nghiên cứu tiếp theo trong phần Kiến nghị trang 125.
22	Thời gian can thiệp ngắn: Thời gian can thiệp BLL trên chuột chỉ là 14 ngày. Mặc dù đủ để khảo sát độc tính cấp và thay đổi vi sinh vật ban đầu, thời gian này quá ngắn để rút ra kết luận vững chắc về các tác động sinh lý lâu dài (như chống béo phì, điều chỉnh lipid máu, hoặc thay đổi chuyển hóa năng lượng).	NCS xin giải trình như sau: 1. Về mục tiêu thí nghiệm: Thử nghiệm 14 ngày trong luận án được thiết kế như một nghiên cứu sàng lọc bước đầu nhằm xác định tính an toàn cấp tính và đánh giá khả năng điều hòa nhanh của BLL đối với cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột. 2. Giá trị của kết quả hiện tại: Mặc dù thời gian ngắn, kết quả đã đủ để chứng minh BLL an toàn (các chỉ số huyết học/mô học bình thường) và ghi nhận những thay đổi rõ rệt về thành phần vi sinh vật (tăng lợi khuẩn <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>) cũng như dự đoán được các thay đổi về chức năng chuyển hóa. Đây là tiền đề khoa học quan trọng để lựa chọn liều lượng tối

		ưu cho các nghiên cứu chuyên sâu sau này. 3. Hướng phát triển: NCS hoàn toàn đồng ý rằng để kết luận vững chắc về hiệu quả sinh lý dài hạn (như giảm béo, điều chỉnh lipid), cần thời gian can thiệp dài hơn. NCS đã bổ sung nội dung này vào mục Kiến nghị (Trang 125) để định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.
D	<i>Phần Kết luận và kiến nghị</i>	
1	Phần Kết luận cần chú ý bám sát mục tiêu. Những gì giải quyết được mục tiêu đưa vào Kết luận, những gì chưa giải quyết đưa vào Kiến nghị. Kết luận hiện nay còn mang tính liệt kê các việc thực hiện được	NCS đã viết lại phần Kết luận cô đọng theo 3 mục tiêu chính (trang 124).

Nghiên cứu sinh chân thành cảm ơn Quý thầy, cô trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện đã góp ý và tạo cơ hội cho NCS hoàn thiện luận án của mình.

Xin trân trọng cảm ơn./.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 12 tháng 01 năm 2026

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

NGƯỜI HƯỚNG DẪN 1



TS. Nguyễn Hữu Thanh

NGƯỜI HƯỚNG DẪN 2



PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

NGHIÊN CỨU SINH



Nguyễn Thị Tố Uyên

XÁC NHẬN CỦA HỌC VIỆN
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Nguyễn Thị Trung

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



GS.TS. Nguyễn Cửu Khoa