

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM



NGUYỄN NGỌC THUẦN

**TÁCH CHIẾT, TINH SẠCH VÀ ỨNG DỤNG HỢP CHẤT
CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TỪ NẤM VÂN CHI
(*Coriolopsis aspera*)**

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9.54.01.01

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

Cán bộ hướng dẫn: PGS.TS. Đàm Sao Mai

PGS.TS. Lê Trung Thiên

TP.HCM – Năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Đàm Sao Mai và PGS.TS. Lê Trung Thiên. Các số liệu, kết quả trong luận án hoàn toàn trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả luận án

Nguyễn Ngọc Thuận

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình thực hiện đề tài “Tách chiết, tinh sạch và ứng dụng hợp chất có hoạt tính sinh học từ nấm vân chi *Coriolopsis aspera*”, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, tạo điều kiện của tập thể lãnh đạo, các nhà khoa học, cán bộ, giảng viên, chuyên viên Khoa Công nghệ Hóa học và Thực phẩm – Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM; tập thể Ban Ban Giám hiệu, Ban lãnh đạo - Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM; tập thể Ban Giám hiệu, Phòng Sau Đại học, cán bộ các phòng, ban chức năng Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành về sự giúp đỡ đó.

Xin gửi lời cảm ơn sâu sắc đến cô PGS. TS Đàm Sao Mai và thầy PGS. TS Lê Trung Thiên. Cô và thầy đã truyền đạt cho tôi nhiều kiến thức, nhiều kinh nghiệm và đặc biệt có những ý kiến đóng góp, trao đổi thật sự bổ ích, thiết thực về luận án tiến sĩ của tôi.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới bạn bè, đồng nghiệp của tôi đang công tác tại Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM và gia đình đã động viên, khích lệ, tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận án này.

Nghiên cứu sinh

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm tìm ra điều kiện trích ly, tinh sạch các thành phần trong dịch cao chiết từ nấm *Coriolopsis aspera* để định danh và làm giàu các chất có hoạt tính sinh học trong dịch trích ly từ nấm. Từ đó nghiên cứu ứng dụng tạo sản phẩm bột hòa tan từ dịch trích ly được làm giàu các chất có hoạt tính sinh học theo hướng có lợi cho sức khỏe. Luận án bao gồm 4 nội dung:

Nội dung đầu tiên là khảo sát 5 phương pháp xử lý nguyên liệu như phương pháp siêu âm, vi sóng, đun nước nóng, kết hợp hóa học và siêu âm, kết hợp nitơ lỏng và siêu âm. Kết quả đạt được phương pháp kết hợp nitơ lỏng và siêu âm trích ly thu được thành phần TPC, TFC, TTC cao. Tiếp theo là khảo sát ảnh hưởng 3 loại dung môi như acetone, methanol, ethanol đến hàm lượng TPC, TFC, TTC và RSA. Kết quả thu được dung môi ethanol và methanol 80% trích ly được hàm lượng TPC, TFC, TTC và RSA cao. Do dung môi ethanol phù hợp trong chế biến thực phẩm nên đã được lựa chọn để tiến hành thực hiện tối ưu hóa điều kiện trích ly. Kết quả tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken thu được thông số nhiệt độ trích ly 40°C, tỷ lệ dung môi ethanol với nguyên liệu 53:1, thời gian trích ly 8,04 giờ, nồng độ ethanol 79,6% thì cho hàm mục tiêu tương ứng TPC 7,8407 mg GAE/g DW, TFC 1,3307 mgQE/g DW, TTC 2,0843 mgOAE/g DW, RSA 4,5940 µgVitC/g DW.

Nội dung tiếp theo là định tính nhóm chất có hoạt tính sinh học của dịch cao CoAEO theo phương pháp thay đổi màu sắc và hiện tượng của dịch cao CoAEO sau khi cho thuốc thử. Kết quả thu được các chất chuyển hóa bậc 2 nhiều như nhóm chất phenolic, tannin, alkaloid, terpenoid, và steroid. Còn nhóm chất flavonoid và saponin ở mức trung bình, chỉ có nhóm chất coumarin ít. Cuối cùng là tinh sạch để xác định chất trong dịch cao CoAEO. Kết quả đã tinh sạch được 9 chất sạch, trong đó từ cao chiết ethyl acetate thu được 4 hợp chất là trametenolic B, cerevisterol, ergosterol, ergosterol peroxit và từ cao nước thu được 5 hợp chất như trans- p-hydroxycoumaric acid, methyl ferulat, methyl (2-hydroxyphenyl) acetat, umbelliferone, 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin.

Nội dung thứ 3 là thử hoạt tính chống oxy hóa của dịch cao CoAEO theo phương pháp DPPH. Kết quả đã đo được IC₅₀ (mg/l) bằng 0,064 với chứng (+) là axit ascorbic bằng

0,035 mg/ml. Tiếp theo là thử khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) của cao CoAEO theo phương pháp MTT. Kết quả thu được IC₅₀ bằng 98,3µg/ml với chứng (-) DMSO bằng 0 và chứng (+) là Ellipticine bằng 3,63 (µg/ml) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) được đo theo IC₅₀ bằng 88,6 (µg/ml) với chứng (-) DMSO bằng 0 và chứng (+) là Ellipticine bằng 3,98 (µg/ml). Kế tiếp là thử khả năng kháng VSV của cao CoAEO theo phương pháp đồ đĩa thạch và đo đường kính vòng tròn kháng khuẩn. Kết quả thu được cao CoAEO có khả năng kháng trên 5 chủng VSV như *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212. Sau cùng là thử độc tính cấp và bán trường diễn của dịch cao CoAEO trên chuột theo phương pháp Lorke và theo hướng dẫn 407 (2001) của tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) về thử nghiệm hóa chất. Thí nghiệm độc tính cấp cho chuột uống dịch cao chiết CoAEO ở mức liều cao (0, 2000, 4000 và 6000 mg /kg thể trọng) trong 14 ngày kết quả không thấy chuột chết trên các lô thí nghiệm, còn thí nghiệm độc tính bán trường diễn cho chuột uống dịch cao chiết CoAEO ở mức liều (100, 200, 300 và 400mg/kg) trong 90 ngày kết quả không thấy dấu hiệu bất thường trên các lô thí nghiệm. Điều đó có thể kết luận rằng với hàm lượng TTC trong dịch cao 781,8 mg oleanolic/kg thể trọng và 52,12 mg oleanolic/ kg thì không gây độc trên chuột.

Nội dung cuối cùng là khảo sát lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp chất mang bao gồm maltodextrin:gum arabic:gelatin. Kết quả thu được ở tỷ lệ 94:5:1 phù hợp để nghiên cứu tối ưu hóa trong công đoạn sấy phun. Thực hiện tối ưu hóa trong công đoạn sấy phun theo phương pháp đáp ứng bề mặt với mô hình Box-Behnken. Kết quả thu được thông số dự đoán như nhiệt độ sấy đầu vào 133°C, hàm lượng chất mang 16% (w/w), lưu lượng nạp liệu 22,5ml/phút khi đó phần mềm cho kết quả dự đoán các hàm mục tiêu lần lượt là hiệu suất thu hồi bột 42,201%, độ ẩm bột 2,936% và độ giảm chống oxy hóa khả 9,224%, độ giảm TFC 2,358%, độ giảm TPC 4,124%, độ giảm TTC 0,909%. Kết quả kiểm chứng đối với các hàm mục tiêu hoàn toàn giống với kết quả dự đoán. Cuối cùng nghiên cứu thời gian bảo quản bột theo phương pháp Q₁₀. Kết quả thu được thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan ở nhiệt độ mát 20°C (khả năng chống oxy hóa giảm 20% so với ban đầu) sẽ là: 45,2 ngày tương tự thời gian bảo quản

ở nhiệt độ mát 20°C (hàm lượng triterpene tổng giảm 20% so với ban đầu) sẽ là: 69,5 ngày. Tính toán về độ an toàn sinh học trên 100g sản phẩm bột CoAEO hòa tan dựa trên kết quả thực nghiệm độc tính cấp và bán trường diễn. Kết quả cho thấy hàm lượng TTC (mg oleanolic) nằm dưới mức 781,8 mg oleanolic/kg thể trọng và 52,12 mg oleanolic/ kg.

Từ khóa: Cao chiết CoAEO, *Coriolopsis aspera*, nấm vân chi, tách chiết, tinh sạch.

ABSTRACT

The study aimed to investigate the extraction and purification conditions of the components in the extract from the fungus *Coriolopsis aspera* to identify and enrich the biologically active substances in mushroom extract. Accordingly, the study on production of soluble healthy products from the extracts enriched with biologically active substances was conducted. The thesis consists of 4 topics:

The first content was to investigate five methods of raw material processing, including the methods using ultrasonic, microwave, hot water, combination of chemical and ultrasonic combination and combination of liquid nitrogen and ultrasound. High contents of TPC, TFC, TTC was obtained from the extraction method of combining liquid nitrogen and ultrasonic. Subsequently, the influence of solvents such as acetone, methanol, ethanol on the contents of TPC, TFC, TTC and RSA was carried out. And as a result, 80% ethanol and methanol were the solvents help efficiently extract the components when high amounts of TPC, TFC, TTC and RSA were obtained. However, only Ethanol was chosen to optimize the extraction conditions due to its suitability for food processing. Optimization conditions obtained using surface response method with Box-Behnken model included the extraction temperature of 40°C, ratio of ethanol to raw materials of 53:1, the extraction time of 8.04 hours and the ethanol concentration of 79.6% with the corresponding objective functions of TPC 7.8407 mg GAE/g DW, TFC 1.3307 mgQE/g DW, TTC 2.0843 mgOAE/g DW, RSA 4.5940 µgVitC/g DW.

The next content was the qualification study on the biologically active substances in the CoAEO extract using the method of color change and phenomenon of CoAEO solution after adding the reagent. As a result, a large number of secondary metabolites such as phenolic compounds, tannins, alkaloids, terpenoids, and steroids were obtained. And the amounts of flavonoids and saponins were moderate while that of coumarins was low. Finally, the extract was subject to purification to determine the substances present in the CoAEO extract. As a result, 9 substances were purified, of which 4 compounds were obtained from ethyl acetate extract (trametenolic B, cerevisterol, ergosterol, ergosterol peroxide) and 5 compounds were from the aqueous

extract (trans-p-hydroxycoumaric acid, methyl ferulat, methyl (2-hydroxyphenyl) acetate, umbelliferone, 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin).

The third content was to characterize the CoAEO extract in terms of certain bioactivities, including antioxidant, anticancer and antibacterial activities. The antioxidant activities were evaluated based on free radical scavenging capacity with the IC₅₀ value 0.064 (mg/l), compared to 0.035 (mg/ml) of the positive control (+) (ascorbic acid). Notably, the CoAEO extract was demonstrated to be able to inhibit cervical cancer cells (HeLa) with the IC₅₀ value of 98.3 µg/ml compared to 3,63 (µg/ml) of the positive control (+) (Ellipticine) and liver cancer cells (Hep-G2) with IC₅₀ values of 88.6 (µg/ml) compared to 3,98 (µg/ml) of Ellipticine. In addition, the CoAEO extract was also resistant against five strains of microorganisms, including *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 with inhibition zone diameters of 0.82±0.02cm; 0.75±0.03cm; 0.52±0.02cm; 0.25±0.05cm; 0.40±0.06cm, respectively. To ensure the safety of the extract, the acute and sub-chronic toxicity tests were performed using Lorke method and the guideline 407 (2001) on chemical testing of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). The acute toxicity test for rats administered with CoAEO extract at high doses (0, 2000, 4000 and 6000 mg/kg body weight) for 14 days resulted in no death, while sub-chronic toxicity tests of CoAEO extract in rats at doses (100, 200, 300 and 400mg/kg) for 90 days did not show any abnormality. Therefore, it could be concluded that high TTC concentrations of 781.8 mg oleanolic/kg and 52.12 mg oleanolic/kg body weight were not toxic to rats.

The last content was to determine to the optimal ratio of carrier mixture of maltodextrin:gum arabic:gelatin. As a result, a mixture of maltodextrin:gum arabic:gelatin (94:5:1) was confirmed to be optimal for spray drying process. The optimization conditions of spray drying predicted by response surface method with Box-Behnken model included: the input drying temperature of 1330C, the carrier content of 16% (w/w) and the feed flow rate of 22.5 ml/min. Given this conditions, the objective functions were predicted by software to be recovery efficiency of 42,201%,

powder moisture content of 2.936% and reducing/antioxidant capacity of 9.224%, TFC reduction of 2.358%, TPC reduction of 4.124% and TTC reduction of 0.909%. The test results for the objective functions were the same as the predicted results. The storage time of soluble CoAEO powder product at a cool temperature of 200C (oxidation resistance reduced by 20%) were 45.2 days while the storage time at a cool temperature of 200C (total triterpene content reduced by 20%) were 69.5 days. The biosafety of the CoAEO powder (100g) tested using the acute and sub-chronic toxicity showed that the TTC content (mg oleanolic) was less than 781,8 mg oleanolic/kg and 52,12 mg oleanolic/ kg body weight.

Key words: CoAEO extract, *Corioloopsis aspera*, extraction, purification.

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	ii
LỜI CẢM ƠN	iii
TÓM TẮT	iv
MỤC LỤC.....	x
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	xiii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	xv
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ	xvii
MỞ ĐẦU.....	1
□ Mục tiêu của luận án	2
□ Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án.....	2
□ Những điểm mới của luận án	2
Chương 1 TỔNG QUAN	3
1.1. Giới thiệu năm vân chi.....	3
1.2. Thành phần hóa học của năm vân chi.....	5
1.2.1. Polysaccharide	5
1.2.2. Terpenoid và steroid	5
1.2.3. Hợp chất phenolic.....	7
1.2.4. Các hợp chất khác.....	8
1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly.....	8
1.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ.....	8
1.3.2. Ảnh hưởng thời gian.....	9
1.3.3. Ảnh hưởng loại dung môi.....	9
1.3.4. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi với nguyên liệu.....	9
1.3.5. Ảnh hưởng kỹ thuật chiết xuất	10
1.3.6. Một số ảnh hưởng khác	16
1.4. Tinh sạch định danh chất	16
1.4.1. Kỹ thuật sắc ký lọc gel	17
1.4.2. Kỹ thuật sắc ký bảng mỏng (TLC).....	17
1.5. Hoạt tính sinh học	18
1.5.1. Hoạt tính chống oxy hóa.....	18
1.5.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật.....	19

1.5.3.	Hoạt tính ức chế tế bào ung thư.....	19
1.6.	Kỹ thuật sấy phun tạo sản phẩm bột hòa tan	20
1.7.	Thời gian bảo quản	22
1.8.	Mục tiêu và nội dung nghiên cứu	23
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU		24
2.1.	Vật liệu và phương pháp nghiên cứu	24
2.1.1.	Đối tượng nghiên cứu	24
2.1.2.	Thiết bị và hóa chất	24
2.2.	Địa điểm nghiên cứu	25
2.3.	Phương pháp nghiên cứu	25
2.3.1.	Phương pháp lấy và xử lý mẫu	26
2.3.2.	Phương pháp xử lý mẫu nguyên liệu	26
2.3.3.	Nghiên cứu điều kiện trích ly	30
2.3.4.	Tinh sạch, định danh chất trong dịch trích ly	31
2.3.5.	Xác định thành phần hoạt tính tổng (TFC, TTC, TFC).....	32
2.3.6.	Thử hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol	34
2.3.7.	Nghiên cứu ứng dụng tạo sản phẩm bột theo phương pháp sấy phun.....	39
2.4.	Phương pháp xử lý số liệu	42
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		43
3.1.	Kết quả xử lý mẫu	43
3.2.	Điều kiện trích ly.....	51
3.2.1.	Ảnh hưởng loại dung môi để trích ly các hợp chất có HTSH	51
3.2.2.	Tối ưu hóa trong công đoạn trích ly TPC, TFC và TTC.	52
3.3.	Định tính thành phần hoạt tính sinh học	63
3.4.	Phân lập và tinh sạch hợp chất từ cao CoAEO	64
3.5.	Hoạt tính sinh học từ cao CoAEO	65
3.5.1.	Xác định khả năng khử gốc tự do.....	65
3.5.2.	Xác định hoạt tính gây độc và ức chế tế bào ung thư của cao CoAEO.....	66
3.5.3.	Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao CoAEO.....	67
3.6.	Đánh giá độc tính dịch cao CoAEO trên chuột	69
3.6.1.	Độc tính cấp.....	69
3.6.2.	Độc tính bán trường diễn.....	75
3.7.	Ứng dụng tạo sản phẩm thực phẩm dạng bột hòa tan từ cao CoAEO.....	86

3.7.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp các chất mang (maltodextrin:gum arabic: gelatin) đến độ nhớt dịch sấy phun, hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm bột và thời gian hòa tan của bột.	86
3.7.2. Thí nghiệm một yếu tố độc lập.....	87
3.7.3. Tối ưu hóa.....	92
3.8. Xác định thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.	101
3.8.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chống oxy hóa (RSA) trong thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.	101
3.8.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng TTC trong thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.	102
3.9. Đánh giá sản phẩm bột CoAEO hòa tan.....	104
3.9.1. Tỷ trọng bột CoAEO	104
3.9.2. Khả năng hòa tan của bột trong nước.....	104
3.9.3. Hình dạng của bột CoEAO hòa tan	104
3.9.4. Khả năng thấm ướt của bột.....	105
3.9.5. Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO hòa tan	105
3.9.6. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung và tế bào ung thư gan của bột CoAEO hòa tan.	105
3.9.7. Độ an toàn sinh học của sản phẩm bột CoAEO hòa tan.....	106
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	107
KẾT LUẬN	107
KIẾN NGHỊ	108
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	108
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CHỜ ONLINE.....	109
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	109

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ABTS	: 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid
<i>B. cereus</i>	: <i>Bacillus cereus</i>
BBD	: Mô hình Box-Behnken (Box–Behnken design)
<i>C. albicans</i>	: <i>Candida albicans</i>
CCC	: Sắc ký pha đảo (Countercurrent chromatography)
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
DMSO	: Dimethyl Sulphoxide
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
FT-IR	: Đo phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (Fourier transform infrared spectrometry)
GAEs	: Giá trị acid gallic (Gallic acid equivalents)
GC-MS	: Sắc ký khí-khối phổ (Gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	: Sắc ký lỏng cao áp (High performance liquid chromatography)
HepG2	: Ung thư biểu mô tế bào gan ở người (Human hepatocellular carcinoma)
HTSH	: Hoạt tính sinh học
IC ₅₀	: Nồng độ ức chế 50% (Inhibitory concentration 50%)
<i>K. pneumonia</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LLE	: Trích ly lỏng-lỏng (Liquid–liquid extraction)
<i>L. monocytogenes</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
MAE	: Trích ly hỗ trợ vi sóng (Microwave-assisted extraction)
MIC	: Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum inhibitory concentration)
MPLC	: Sắc ký lỏng áp trung bình (Medium pressure liquid chromatography)
MEY	: Hiệu suất vi bao (Microencapsulation yield)
NMR	: Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear magnetic resonance)
ND	: Không được phát hiện (Not detected)
ND _{1,2,3,4}	: Nội dung 1,2,3,4
PDA	: Đầu dò diode (Photodiode array)
PSP	: Polysaccharidepeptide
PSK	: Polysaccharopeptide Krestin
PLE	: Chiết chất lỏng có áp suất (Pressurized liquid extraction)
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QEs	: Giá trị quercetin (Quercetin equivalents)
DW	: Khối lượng khô (Dry weight)
EtOAc	: Ethyl acetate
RSA	: Khả năng khử gốc tự do (Radical-scavenging activity)
SPE	: Trích ly pha rắn (Solid phase extraction)
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
TQ	: Trung Quốc
TAA	: Chống oxy hóa tổng số (Total antioxidant activity)

TPC	: Polyphenol tổng số (Total polyphenol content)
TFC	: Flavonoid tổng số (Total flavonoid content)
TEs	: Giá trị triterpene (Triterpeneoid equivalents)
TLC	: Sắc ký lớp mỏng (Thin layer chromatography)
TLTK	: Tài liệu tham khảo
TN	: Thí nghiệm
UAE	: Trích ly hỗ trợ siêu âm (Ultrasonic-assisted extraction)
<i>V. parahaemolyticus</i>	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
VSV	: Vi sinh vật
VN	: Việt Nam
VMAE	: Chiết xuất có sự hỗ trợ của vi sóng và chân không (Vacuum microwave-assisted extraction)
WSI	: Chỉ số hòa tan trong nước (Water solubility index)
CoAEO	: Cao chiết ethanol nấm <i>Coriolopsis aspera</i> đã được trích ly tối ưu hóa
MIC	: Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration)
MBC Concentration)	: Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimum Bactericidal Concentration)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Thị trường sản phẩm nấm dược liệu.....	4
Bảng 1. 2. Tổng hợp thông số kỹ thuật UAE trích ly chất hoạt tính sinh học	12
Bảng 1. 3. Thông số trích ly theo phương pháp MAE.....	14
Bảng 1.4. Ưu và nhược điểm của một số kỹ thuật trích ly.	15
Bảng 1.5. Tổng hợp khả năng chống oxy hóa của một số loài vên chi	18
Bảng 1. 6. Tổng hợp một số chất mang trong kỹ thuật sấy phun	21
Bảng 2. 1. Thiết bị sử dụng nghiên cứu	24
Bảng 2. 2. Hóa chất sử dụng nghiên cứu	25
Bảng 3.1. Kết quả khảo sát công suất siêu âm xử lý mẫu nấm nguyên liệu.....	43
Bảng 3. 2. Khảo sát thời gian siêu âm xử lý mẫu nấm nguyên liệu.....	44
Bảng 3. 3. Kết quả khảo sát công suất vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu.....	44
Bảng 3. 4. Kết quả khảo sát thời gian vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu.....	45
Bảng 3. 5. Kết quả khảo sát nhiệt độ đun phá mẫu nấm nguyên liệu	46
Bảng 3. 6. Kết quả khảo sát thời gian đun phá mẫu xử lý mẫu nấm nguyên liệu.....	46
Bảng 3. 7. Kết quả khảo sát nồng độ NaOH (%) xử lý mẫu nấm nguyên liệu	47
Bảng 3. 8. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm sau khi sử dụng NaOH xử lý mẫu nấm nguyên liệu	48
Bảng 3. 9. Kết quả khảo sát tỷ lệ nitơ lỏng với nấm nguyên liệu	48
Bảng 3. 10. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm sau khi xử lý nitơ lỏng nấm nguyên liệu	49
Bảng 3. 11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng các loại dung môi đến các chất hoạt tính sinh học (HTSH).....	52
Bảng 3. 12. Ma trận thực nghiệm với mô hình thiết kế BBD.....	57
Bảng 3. 13. Kiểm chứng thực nghiệm	63
Bảng 3. 14. Định tính hợp chất thứ cấp trong cao chiết nấm vên chi	64
Bảng 3. 15. Hợp chất thứ cấp được phân lập	64
Bảng 3. 16. Khả năng khử gốc tự do của cao CoAEO.....	66
Bảng 3. 17. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) của cao CoAEO	66

Bảng 3. 18. Đường kính vòng tròn kháng vi sinh vật của cao CoAEO	68
Bảng 3. 19. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết CoAEO	68
Bảng 3.20. Các phản ứng hành vi và ngoại hình chung của chuột được điều trị bằng CoAEO trong khảo sát độc tính cấp tính trên chuột sau 14 ngày	69
Bảng 3. 21. Ảnh hưởng của CoAEO đến thành phần huyết học máu ngoại vi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính	71
Bảng 3. 22. Ảnh hưởng của CoAEO đến thành phần sinh hóa máu ngoại vi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính.....	71
Bảng 3. 23. Các phản ứng hành vi và ngoại hình chung của chuột được điều trị bằng EtCA trong khảo sát độc tính bán mãn tính trên chuột sau 14 ngày.....	75
Bảng 3. 24. Ảnh hưởng tỷ lệ các chất mang đến độ nhớt dịch sấy, hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm bột và thời gian hòa tan.	87
Bảng 3. 25. Kết quả hàm mục tiêu	93
Bảng 3. 26. Kết quả so sánh thực nghiệm với dự đoán.....	101
Bảng 3. 27. Kiểm chứng mô hình thời hạn sử dụng ở 20°C	104
Bảng 3. 28. Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO hòa tan	105
Bảng 3. 29. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) của bột CoAEO hòa tan	106

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1. 1. Sự xâm thực của bột bong bóng vào tế bào thực vật khi siêu âm.....	12
Hình 1. 2. Hình thái các loại vi bao khác nhau	20
Hình 2.1. Nấm vân chi <i>Coriolopsis aspera</i>	24
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu.....	26
Hình 2.3. Quy trình kháng vsv	35
Hình 3. 1. Sợi tế bào nấm vân chi <i>Coriolopsis aspera</i> qua chụp SEM	51
Hình 3. 2. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hàm lượng TPC, TFC, TTC	53
Hình 3. 3. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu đến hàm lượng.....	54
Hình 3. 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng TPC, TFC, TTC	55
Hình 3. 5. Ảnh hưởng nồng độ dung môi đến hàm lượng TPC, TFC và TTC	56
Hình 3. 6. Đồ thị bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D của hàm mục tiêu Y_{1-4} với ảnh hưởng các biến độc lập X_{1-4}	61
Hình 3. 7. Kết quả dự đoán	62
Hình 3. 8. Kháng vi sinh vật của cao CoAEO	69
Hình 3. 9. Hình thái đại thể gan, tim, thận của chuột nhóm đối chứng và thí nghiệm cao CoAEO.	73
Hình 3. 10. Mô bệnh học tim, gan, thận của chuột nhóm chứng và uống CoAEO	73
Hình 3. 11. Hình thái đại thể tim, gan, thận, lách, ức chuột trong thử nghiệm độc bán mãn tính.....	83
Hình 3. 12. Mô bệnh học tim, gan, thận, lách, ức chuột trong thử nghiệm độc bán mãn tính.....	84
Hình 3. 13. Ảnh hưởng của nhiệt sấy phun đến hiệu suất bột thu hồi	88
Hình 3. 14. Ảnh hưởng của nhiệt sấy phun đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC,TPC,TTC) của bột thu hồi	89
Hình 3. 15. Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến hiệu suất của bột thu hồi	90
Hình 3. 16. Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC,TPC,TTC) của bột thu hồi	90
Hình 3. 17. Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến hiệu suất thu hồi bột	91

Hình 3. 18. Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC,TPC,TTC) của bột thu hồi	92
Hình 3. 19. Đồ thị bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D của các hàm mục tiêu Y_{1-6} với ảnh hưởng của các biến độc lập X_{1-3}	98
Hình 3. 20. Kết quả dự đoán của mô hình tối ưu	100
Hình 3. 21. Thay đổi RSA trong sản phẩm ở các nhiệt độ bảo quản 60°C và 50°C. 102	
Hình 3.22. Thay đổi hàm lượng TTC trong sản phẩm ở các nhiệt độ bảo quản 60°C và 0°C.	103
Hình 3. 23. Ảnh chụp SEM của bột CoEAO ở độ phóng đại 1000x	104

MỞ ĐẦU

Hiện nay, xu thế sử dụng nguồn thực phẩm tự nhiên có chứa các chất có hoạt tính sinh học ngày càng nhiều. Đặc biệt là đối với thực phẩm bổ sung các chất có lợi cho sức khỏe theo chủ đích. Việc ứng dụng dịch chiết thô từ nguồn gốc thực vật nói chung và nấm nói riêng có chứa các thành phần có hoạt tính sinh học trong chế biến làm thực phẩm hiện đang là một xu hướng trong nghiên cứu ứng dụng tại Việt Nam và Thế giới. Nấm vân chi là một loại nấm dược liệu, trong thành phần có nhiều chất có hoạt tính sinh học có khả năng hỗ trợ trong chữa bệnh và chế biến thực phẩm có lợi cho sức khỏe (Ferreira và ctv, 2016). Cho tới nay, những công trình nghiên cứu về nấm vân chi trong nước không nhiều, thường chỉ tập trung nghiên cứu về cách nuôi trồng. Ví dụ một số nghiên cứu như : nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự phát triển của nấm vân chi nuôi cấy trong môi trường dịch thể (Trang, 2016); nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển và năng suất nấm vân chi (*Trametes Versicolor* (L.) Pilat) trồng trên các loại giá thể tại Thừa Thiên Huế (V. T. Minh, 2017); nghiên cứu đặc điểm sinh học và công nghệ nhân giống, nuôi trồng nấm Sò vua (*pleurotus eryngii*) và nấm vân chi (*Trametes versicolor*) ở Việt Nam (Thùy, 2014). Đối với những công trình nghiên cứu về nấm Vân chi ở nước ngoài đa phần tập trung nghiên cứu về loài *Trametes versicolor* và thường tập trung vào phương pháp chiết tách các hợp chất có hoạt tính và các enzyme để ứng dụng vào trong các ngành công nghiệp thực phẩm (Asgher và ctv, 2009). Nấm *Coriolopsis aspera* (Jungh) Teng (Polyporaceae) đã được phát hiện lần đầu tiên ở Đài Loan và đã được mô tả đặc điểm loài vào năm 1992 (Briffa, 2001; Kumar và ctv, 2014) (Chang và Tschu, 1992). Ở Châu Âu, nó được ghi nhận đầu tiên vào năm 2001 tại Malta bởi giáo sư Leif Ryvarden (Briffa, 2002). Tại Việt Nam, loài này được phát hiện ở rừng, mọc trên thân cây dương (*Casuarina equisetifolia*). Đặc điểm của loài *Coriolopsis aspera* là dễ trồng, nguyên liệu khi sấy khô (độ ẩm 5%) bảo quản khoảng 1 năm mà không bị biến màu và cho năng suất cao khi trồng. Cho tới hiện nay, ngoài các nghiên cứu ở trên, chưa thấy chưa thấy có công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của dịch chiết từ quả thể loài *Coriolopsis aspera*. Vì lý do này, chúng tôi đề xuất đề tài

‘Tách chiết, tinh sạch và ứng dụng hợp chất có hoạt tính sinh học từ nấm vân chi (*Coriolopsis aspera*)’.

– **Mục tiêu của luận án**

Nghiên cứu điều kiện trích ly, tinh sạch các thành phần trong dịch chiết nấm *Coriolopsis aspera* để xác định thành phần và làm giàu hoạt tính sinh học trong dịch trích ly. Từ đó nghiên cứu ứng dụng tạo sản phẩm bột hòa tan từ dịch trích ly đã làm giàu hoạt tính sinh học theo hướng có lợi cho sức khỏe.

– **Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án**

• **Ý nghĩa khoa học**

Đề tài đã thu được một số kết quả nghiên cứu mới có ý nghĩa khoa học liên quan đến các thành phần hóa học và tính chất sinh học của một số hoạt chất từ nấm Vân chi, cũng như điều kiện để thu nhận và làm giàu các chất có hoạt tính sinh học của dịch chiết.

• **Ý nghĩa thực tiễn**

Đề tài đã đề xuất được thông số quy trình trích ly các hoạt chất sinh học từ nấm vân chi và thông số sấy phun thu bột hòa tan có hàm lượng TTC cao, có thể ứng dụng trong các sản phẩm thực phẩm bổ sung có lợi cho sức khỏe.

– **Những điểm mới của luận án**

Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên về đặc điểm, tính chất và khả năng ứng dụng của loài *Coriolopsis aspera* trong lĩnh vực chế biến thực phẩm như:

- Xác định phương pháp xử lý nguyên liệu nấm *Coriolopsis aspera* để phá vỡ tơ nấm tăng hiệu quả trích ly các chất TPC, TFC, TTC và RSA cao
- Tối ưu hóa điều kiện trích ly làm giàu các chất TPC, TFC, TTC và RSA cao từ nấm *Coriolopsis aspera*.
- Tinh sạch để xác định tên chất trong dịch cao chiết từ nấm *Coriolopsis aspera*.
- Xác định hoạt tính chống oxy hóa, hoạt tính ức chế tế bào ung thư gan và cổ tử cung của dịch cao chiết từ nấm *Coriolopsis aspera*.
- Tối ưu hóa điều kiện sấy phun để thu bột có hàm lượng TPC, TFC, TTC và RSA cao.

Chương 1 TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu nấm vân chi

Nấm vân chi *Coriolopsis aspera* thuộc giới *Fungi*, ngành *Basidiomycota*, lớp *Agaricomycetes*, bộ *Polyporales*, họ *Polyporaceae*, chi *Coriolopsis*. Mối liên quan giữa các chi *Artolenzites*, *Coriolus*, *Cubamyces*, *Cyclomycetella*, *Lenzites*, *Poronidulus*, *Pseudotrampetes*, *Pycnoporus*, *Coriolopsis* và chi *Trametes* giống nhau (Justo và Hibbett, 2011). Theo nghiên cứu thành phần loài nấm lớn của tác giả Trần Thị Phú, luận án tiến sĩ thực vật học, năm 2018 (Phú, 2018) đã thống kê ngành *Basidiomycota* 108 chi/38 họ/282 loài, họ *Polyporaceae* có 24, chi *Trametes* có 18 loài ở Việt Nam và trên Thế Giới có khoảng 50 loài (Knežević, 2015; Soković và ctv, 2018) đã được Fries ghi nhận vào năm 1835. Chi *Coriolopsis sp* thường được phân bố ở vùng nhiệt đới và thường được tìm thấy nhiều ở Nam và Trung Mỹ, Tây Ấn, Mexico và các bang phía nam của Hoa Kỳ. Đặc điểm loài này là quả thể mỏng, dẻo, không có chân nấm, bề mặt trên của nấm lúc nhỏ có viền trắng bên ngoài, bên trong đen và màu nâu nhạt lúc trưởng thành, sần sùi, có lông, viền mỏng, phía dưới nấm có lỗ nhỏ, đều, kích thước bào tử nhỏ và mịn (Zoberi, 1972).

Theo thống kê về số lượng nấm trong tự nhiên trên Trái đất ước tính khoảng 140,000 loài, nhưng chỉ có khoảng 10% loài được tuyên bố. Trong số khoảng 14,000 loài được đặt tên, thì có khoảng 2000 loài được chứng minh an toàn cho con người (Ghosh, 2015; Wasser, 2002). Hiện nay, ngành nấm đang phát triển bao gồm nấm ăn và nấm dược liệu. Nấm ăn có giá trị thương mại và ẩm thực cao, còn với nấm dược liệu sử dụng nhằm mục đích có lợi cho sức khỏe và có khả năng hỗ trợ trong điều trị bệnh như nấm *Coriolopsis aspera*. Theo nhận định của một số tác giả trên thế giới thì nấm thường được cho là thực phẩm chức năng do chứa các chất có hoạt tính sinh học có khả năng chữa một số bệnh. Trong nhiều thập kỷ qua, các bệnh liên quan đến rối loạn chức năng miễn dịch như ung thư, HIV, viêm gan đang được quan tâm và được đặt lên hàng đầu. Theo báo cáo tổ chức Ung thư Thế Giới năm 2020, ước tính mỗi năm sẽ có 15 triệu ca mắc mới. Tỷ lệ tử vong do bệnh ung thư trên Thế Giới chiếm 12% (Eliza và ctv, 2012). Theo thống kê của tổ chức Globocan năm 2018 trên Thế Giới,

ung thư gan được dự đoán phổ biến và là nguyên nhân gây tử vong cao, với khoảng 841,000 trường hợp phát hiện mới và 78,000 ca tử vong hàng năm (Bray và ctv, 2018). Chính vì vậy mà các nhà nghiên cứu không ngừng tập trung nghiên cứu những nguyên liệu có tác dụng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị ung thư đặc biệt là đối với các loài nấm có chứa các hợp chất triterpeneoid có khả năng ức chế tế bào ung thư, kháng viêm, kháng oxy hóa, kháng vi-rút và vi khuẩn tốt. Trong đó, nấm vân chi *Coriolopsis aspera* đã được biết đến là khả năng chống ung thư, chống oxy hóa và tăng cường miễn dịch của cơ thể (Hobbs, 2004; Zhou và ctv, 2007). Những công trình nghiên cứu về nấm vân chi trên Thế Giới thường tập trung vào khả năng kháng u, khả năng tăng cường miễn dịch và khả năng chống oxy hóa của dịch trích ly từ quả thể nấm.

Bảng 1. 1.Thị trường sản phẩm nấm dược liệu

Hình thức	ứng dụng	Thành phần	TLTK
Thuốc	Chống ung thư Miễn dịch Chống oxy hóa Hạ đường máu Kháng sinh Rối loạn tim mạch Viêm khớp dạng thấp	β -D-1,3-glucan, Ganopoly, Ganoderans, Terpenoid Ganoderan A,B Pilatin Hợp chất triterpeneoid Proteoglycan	(Cheuk và ctv, 2007; Yuen và Gohel, 2005) (Mizuno, 2000) (Zhu và ctv, 1999) (Gao và ctv, 2004) (Heim và ctv, 1988) (Ho và ctv, 2007) (Boh và ctv, 2000) (Fujiwara và Sawai, 1993)
Thực phẩm	Thực phẩm chứa chất xơ Sữa chua Thực phẩm hay đồ uống Thực phẩm lên men Viên nang hữu cơ	Bột trích ly Bột tơ nấm Dịch chiết Tơ nấm Dịch chiết từ quả thể nấm	(Ahmad và ctv, 2011)
Thực phẩm chức năng	Thực phẩm bổ sung Bột hữu cơ Trà túi lọc Trà có lợi sức khỏe	Dịch chiết từ quả thể nấm	(Ahmad và ctv, 2013) (Liang, 1993)
Thức uống	Nước dấm Nước bổ dưỡng	Protein- polysaccharide	

Ở Bảng 1.1 cho thấy các sản phẩm chế biến từ nấm dược liệu hiện nay rất đa dạng như viên nang, trà túi lọc, bột nấm, sản phẩm nước uống bổ dưỡng có lợi cho sức khỏe. Chủ yếu các sản phẩm chế biến làm từ nguyên liệu nấm linh chi, riêng loài vân chi *Coriolopsis aspera* cho tới hiện nay chưa thấy công trình nghiên cứu đánh giá về khả năng sử dụng trong thực phẩm.

1.2. Thành phần hóa học của nấm vân chi

1.2.1. Polysaccharide

Polysaccharide có trong thành tế bào của nấm vân chi (Kozarski và ctv, 2011; Wu và ctv, 2004). Thông thường polysaccharide trong nấm vân chi ở dạng kết hợp với peptide, protein, terpenoide làm cho polysaccharide này có hoạt tính sinh học rất đa dạng. Sự kết hợp với peptide (proteoglycan) hoặc steroid làm cho polysaccharide có khả năng chống ung thư. Các phức polysaccharide với protein có trọng lượng phân tử trên 10.000 kDa sẽ làm tăng khả năng hỗ trợ trong điều trị bệnh ung thư (Y. Patel và ctv, 2012; Roupas và ctv, 2012). Các hợp chất này được sử dụng trong điều trị ung thư hoặc các bệnh do virus. Polysaccharide có trong các loài vân chi có cấu trúc thường là các chuỗi glucose liên kết β (1, 3) với đường acid, galactose và mannose trong các nhánh (Yoshioka và ctv, 1975). Trong đó β -glucans thuộc nhóm polysaccharide có hoạt tính sinh học quan trọng (Falch và ctv, 2000), có thể được tách ra bằng cách sử dụng nước nóng để chiết xuất từ quả thể nấm, sợi tơ nấm, bào tử hoặc từ môi trường nuôi cấy và cho kết tủa bằng ethanol. Tùy thuộc vào loại monosaccharide, trọng lượng phân tử, độ hòa tan, liên kết, hình dạng và liên kết với các phân tử khác như protein để cho ra nhiều loại polysaccharide có hoạt tính khác nhau trong nấm vân chi (Gargano và ctv, 2017).

Tóm lại, các nghiên cứu cho thấy rằng các polysaccharide tác động gián tiếp đến hoạt động chống ung thư thông qua hệ thống miễn dịch của cơ thể thay vì tác dụng gây độc tế bào trực tiếp. Polysaccharide giúp cơ thể giảm các căng thẳng sinh học và tăng khả năng miễn dịch chống lại sự phát triển của các tế bào ung thư.

1.2.2. Terpenoid và steroid

Terpene có cấu trúc đa dạng được phân lập từ vi khuẩn, thực vật, biển sinh vật và trong nấm (Osborn và Lanzotti, 2009). Terpene thuộc nhóm chất tự nhiên lớn, bao

gồm ít nhất 30,000 hợp chất, sự đa dạng về các terpene là do nguyên nhân enzyme xúc tác tạo nên hàng trăm loại monoterpene (C10), sesquiterpene (C15), diterpene (C20), và triterpene đã được biết đến (Connolly và ctv, 2005; Connolly và ctv, 1991). Theo kết quả nghiên cứu của Leliebre và ctv. (2015) cho thấy nhóm chất terpenoid và steroid trong nấm vân chi nhiều (Leliebre và ctv, 2015). Terpene trong thực vật có vai trò chống lại các bệnh gây ra do nấm và vi khuẩn (Gershenzon và Dudareva, 2007; Lenzion và ctv, 2021). Terpenoid đại diện cho nấm vân chi là trametenolic acid B, . Đây là chất có tiềm năng để tổng hợp các hợp chất có hoạt tính chống ung thư và nhiều hoạt tính khác (Leliebre-Lara và ctv, 2016). Hoạt tính sinh học của hợp chất này đa dạng như khả năng chống vi-rút (Grienke và ctv, 2019), khả năng kháng nấm (Lee và ctv, 2007), khả năng chống oxy hóa do ức chế *enzyme luciferase* và khử gốc tự do (Asatiani và ctv, 2010; Cui và ctv, 2005; Kahlos và ctv, 1989), khả năng ức chế enzyme *α -glucosydase* nên có khả năng làm giảm lượng đường trong máu cho những người bị bệnh tiểu đường (Luo và ctv, 2012), khả năng chống viêm và gây độc tế bào ung thư biểu mô tuyến tiền liệt ở người PC3 và tế bào ung thư vú MDA-MB-231 (Ding và ctv, 2013; Ma và ctv, 2013). Ngoài ra, trong nấm *Coriolopsis sp* còn có hai tremulane sesquiterpenes là coriolopsin A và coriolopsin B có hoạt tính sinh học cao đặc trưng cho loài (Chen và ctv, 2017).

Steroid có nhiều trong nấm lớn đặc biệt là trong nấm vân chi có tác dụng kháng viêm và kháng u rất mạnh. Trong đó, ergosterol (tiền chất của vitamin D), ergocalciferol và các sterol khác (bao gồm ergosta-7,22-dienol, ergosta-5,7-dienol, ergosta-7-enol, cerevisterol, ergosterol peroxide, sitosterol hoặc 7-dehydrostigmasterol) đã được phát hiện trong nhiều loại nấm trong đó có vân chi. Trong một số loài nấm, quả thể có chứa ergosterol và ergocalciferol cao khoảng 61,5mg/100g (Muszyńska và ctv, 2017). Một trong những cơ chế tác dụng chống viêm của cerevisterol, ergosterol và các dẫn xuất của nó là ức chế chuyển dịch NF-B vào nhân tế bào và do đó ngăn ngừa sự biểu hiện của gen gây viêm (Phillips và ctv, 2011). Một số nghiên cứu các đặc tính chống viêm trên chuột khi sử dụng dịch chiết nấm được làm giàu chất cerevisterol và ergosterol. Các kết quả nghiên cứu cho thấy ở chuột C57B1/6 bị viêm gan, làm giảm đáng kể tổn thương gan. Ngoài ra, tác dụng chống viêm của vitamin D và dịch chiết

xuất từ nấm có tác dụng như nhau (Drori và ctv, 2016). Steroid ức chế quá trình tạo mạch, liên quan đến khối u rắn, ngăn ngừa sự phát triển của khối u và ngăn chặn sự di chuyển và tăng sinh của các tế bào bị ảnh hưởng bởi bệnh ung thư (Novaes và ctv, 2011; Shao và ctv, 2010). Hàm lượng ergosterol trong các loài nấm được trồng thường dao động trong khoảng 3,7–5,1 mg/g DM. Trong khi đó nấm tự nhiên có hàm lượng ergosterol thấp hơn một chút, dao động trong khoảng 1,4–4,0 mg/g DM. Tác dụng bảo vệ của ergosterol đối với nồng độ tế bào lympho ở bệnh nhân trải qua hóa trị liệu rất hiệu quả. Liệu pháp này là an toàn và bệnh nhân dung nạp tốt (Roupas và ctv, 2012; Shao và ctv, 2010). Các hợp chất dẫn xuất của ergosterol, bao gồm cả ergosterol peroxide, cũng có hoạt tính chống oxy hóa và chống ung thư khá tốt (Hong và ctv, 2007). Ergosterol peroxide với liều trên 10 μ M có tác dụng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư bạch cầu promyelocytic (HL60) (Takei và ctv, 2005). Cerevisterol và ergosterol có hoạt tính kháng VSV tốt trên các chuẩn *S. typhi*, *S. aureus* và *A. niger*, *E. faecalis*, *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum*, *Bacillus subtilis* (Appiah và ctv, 2018; Liu và ctv, 2013; Mallavadhani và ctv, 2006; Zhou và ctv, 2013). Trong dịch chiết từ nấm có chứa nhiều nhóm chất terpenoid và steroid là nhóm chất chính trong thành phần của nấm vân chi, tạo nên đặc tính kháng viêm, ức chế tế bào ung thư và khả năng chống oxy hóa.

1.2.3. Hợp chất phenolic

Phenolic thuộc nhóm chất đặc biệt quan trọng của các chất chuyển hóa thứ cấp được tìm thấy trong quả thể nấm vân chi với các đặc tính chống oxy hóa và chống viêm. Hơn nữa, nhóm chất phenolic thể hiện thêm một số các đặc tính sinh lý, chẳng hạn như tác dụng chống dị ứng, kháng khuẩn, bảo vệ tim mạch (Mohsen và Ammar, 2009). Flavonoid trong nấm vân chi thuộc nhóm các hợp chất polyphenolic với các đặc tính có lợi cho sức khỏe chẳng hạn như loại bỏ gốc tự do, ức chế thủy phân và hoạt tính chống viêm (Smolibowska và ctv, 2016). Theo kết quả nghiên cứu của Melappa và ctv. (2015) cho thấy nhóm chất phenolic và flavonoid trong nấm vân chi nhiều (Melappa và ctv, 2015). Một số chất thuộc nhóm phenolic như acid caffeic, acid syringic, acid trans- p-hydroxycoumaric, methyl ferulat trong nấm có hoạt tính chống oxy hóa, kháng VSV mạnh (Dang và ctv, 2017; Eman và ctv, 2018; Moon và

ctv, 2009; Palacios và ctv, 2011). Riêng acid syringic có khả năng ức chế hoạt động COX-2 trong các đại thực bào RAW 264,7 (Stanikunaite và ctv, 2009). Umbelliferone trong nấm có khả năng ức chế VSV tốt nhất là nấm *Penicillium expansum* và được ứng dụng làm chất chống nấm trong bảo quản trái cây (Sanzani và ctv, 2009). Nhìn chung trong dịch chiết nấm vân chi ngoài các hợp chất polysaccharide, terpenoid và steroid ra các hợp chất phenolic cũng chứa nhiều và đóng vai trò góp phần tăng hoạt tính sinh học giúp cho nấm có được đặc tính có lợi để có thể ứng dụng trong chế biến thực phẩm bổ sung.

1.2.4. Các hợp chất khác

Ngoài các thành phần có hoạt tính quan trọng trên, trong nấm còn có chứa một số chất lectin, chitin, chitosan, amino acid, protein và acid béo (Bowman và Free, 2006; Li và ctv, 2008; Singh và ctv, 2015; Varrot và ctv, 2013). Trong đó lectin, chitin và chitosan không được tiêu hóa trong cơ thể người và được xem như chất xơ (Cheung, 2013). Còn lại amino acid, protein và acid béo, các chất này có thể hỗ trợ kết hợp với các chất khác để có hoạt tính sinh học cao (Ayaz và ctv, 2011; Gdula và ctv, 2015; Öztürk và ctv, 2011).

Tóm lại, thành phần hóa học của dịch cao chiết từ nấm vân chi có chứa các hợp chất terpenoid, phenolic, polysaccharide, flavonoid nhiều và có hoạt tính sinh học cao. Cho tới hiện nay chưa thấy có công trình nghiên cứu nào được công bố về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của dịch trích ly từ nấm *Coriolopsis aspera*.

1.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly

1.3.1. Ảnh hưởng nhiệt độ

Theo nghiên cứu của Cacace và ctv. (2003) thì nhiệt độ ảnh hưởng nhiều đến quá trình trích ly các thành phần có trong nguyên liệu vào dung môi. Nguyên nhân là nhiệt độ trích ly tăng dẫn đến tính thấm thấu của thành tế bào cao hơn, độ hòa tan của các hợp chất trong nguyên liệu cao hơn, dẫn đến động học của các quá trình chiết xuất cao (Cacace và Mazza, 2003). Mặt khác, theo nhận định của Li và ctv. (2006) nhiệt độ cao sẽ làm phá vỡ liên kết giữa các chất tan với các thành phần khác trong nguyên liệu và làm tăng hiệu quả chiết xuất (Li và ctv, 2006). Trong thành phần của nấm lớn nói chung và nấm *Coriolopsis aspera* nói riêng các thành phần chính thuộc nhóm

phenolic, flavonoid, triterpene và polysaccharide nếu trích ly ở nhiệt độ cao hoạt tính sinh học ít nhiều sẽ bị ảnh hưởng.

1.3.2. Ảnh hưởng thời gian

Thời gian ảnh hưởng rất nhiều đến quá trình chiết xuất các chất có hoạt tính sinh học. Nếu thời gian càng lâu thì hiệu suất chiết xuất càng cao nhưng nếu lâu quá thì có thể làm giảm hiệu suất do các chất hoạt tính bị biến đổi làm giảm hoạt tính sinh học, ví dụ như các chất có trong dịch chiết xuất bị oxy hóa (Aboshora và ctv, 2014; Ksouri và ctv, 2009). Thời gian lâu thì dung môi trích ly bị bay hơi nhiều làm tổn dung môi trích ly. Thời gian ngắn thì các chất hòa tan có trong nguyên liệu chưa khuếch tán ra dung môi hết. Vì vậy, việc xác định thời gian chiết xuất phù hợp là rất cần thiết đối với nấm vân chi *Coriolopsis aspera*.

1.3.3. Ảnh hưởng loại dung môi

Dung môi được sử dụng thường xuyên nhất để chiết xuất và phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, hiệu suất và chất lượng các chất chiết xuất phụ thuộc nhiều vào bản chất của dung môi chiết xuất. Dung môi phân cực thường được sử dụng để thu hồi các chất có hoạt tính sinh học có trong nguyên liệu thực vật. Hỗn hợp nước với etanol, metanol, acetone và etyl acetate thông thường được lựa chọn để nghiên cứu (Peschel và ctv, 2006; Sultana và ctv, 2009). Lựa chọn các dung môi nên tuân theo các đặc tính phù hợp như độ phân cực, độ chọn lọc, độ hòa tan, khả năng thu hồi, nồng độ, sức căng bề mặt, và phản ứng hóa học (Cacace và Mazza, 2003).

1.3.4. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi với nguyên liệu

Theo nhận định của Vinatoru và Mircea. (2001) tỷ lệ dung môi với nguyên liệu thay đổi sẽ làm thay đổi hiệu suất quá trình trích ly các thành phần trong nguyên liệu (Pandey và ctv, 2018; Vinatoru và Mircea, 2001). Nếu lượng dung môi ít dẫn đến trích ly các chất trong nguyên liệu không hoàn toàn, trong khi lượng dung môi lớn hơn có thể gây ra lãng phí và ô nhiễm môi trường. Khi lượng dung môi tăng, làm tăng các hoạt chất sinh học tiếp xúc với dung môi dẫn đến khả năng thẩm thấu cao hơn. Tác động chính của thay đổi tỷ lệ dung môi so với chất rắn là làm thay đổi độ hòa tan và hằng số cân bằng, do đó làm tăng hiệu quả trích ly các chất tan có trong nguyên

liệu, khi tỷ lệ dung môi/ nguyên liệu lớn, nghĩa là sự khác biệt về nồng độ giữa dung môi và các chất hòa tan trở nên lớn (Cacace và Mazza, 2003; Linh và Thủy, 2014).

1.3.5. Ảnh hưởng kỹ thuật chiết xuất

Mục đích của tất cả kỹ thuật chiết xuất là để tách các chất chuyển hóa hòa tan trong thực vật, để lại phần khối lượng tế bào không hòa tan. Các chất trong dịch chiết xuất thô ban đầu chứa hỗn hợp phức tạp như alkaloid, glycoside, phenolic, terpenoid và flavonoid (Mason và ctv, 2011).

Một số phương pháp trích xuất không có hỗ trợ thường được sử dụng như: ngâm, hãm nước nóng và sắc thuốc. Đối với các phương pháp trên thì ngâm là một kỹ thuật sử dụng được áp dụng rộng rãi. Ví dụ: ngâm cây dược liệu trong dung môi, ở nhiệt độ phòng trong thời gian tối thiểu 3 ngày với khuấy trộn thường xuyên, phương pháp này cho khả năng chiết xuất tốt nhưng thời gian kéo dài (Oreopoulou và ctv, 2019). Còn phương pháp hãm nước nóng và sắc thuốc thì cần nhiệt độ cao trong vài giờ chỉ thích hợp cho những chất bền nhiệt. Hiện nay, có nhiều phương pháp chiết xuất có hỗ trợ áp suất, siêu âm, vi sóng, enzyme đã và đang được ứng dụng nhiều trong nghiên cứu tách chiết các hợp chất tự nhiên để ứng dụng trong lĩnh vực y dược, thực phẩm, mỹ phẩm và hóa học (Mason và ctv, 2011). Theo nguyên tắc trích ly nguyên liệu có thể sử dụng dạng tươi hay khô và được nghiền nhỏ để tăng diện tích bề mặt tiếp xúc với dung môi. Đối với nguyên liệu dạng tươi thì chuẩn bị nhanh và ít qua khâu xử lý do đó, giảm tối thiểu sự hao hụt hoạt tính sinh học của chất tự nhiên. Tuy nhiên, có một vấn đề là mẫu tươi có thể chứa hơn 70% nước sẽ làm loãng dung môi chiết và khó nghiền hoặc băm nhỏ (Mason và ctv, 2011). Đối với nấm dược liệu vân chi thì quả thể được hình thành từ những sợi tơ khi già nó hóa thành cellulose rất bền và cứng khó phá vỡ những chất có hoạt tính sinh học nằm phía bên trong các chất cellulose, hemicellulose, protein, pectin, lignin chính vì vậy cần những kỹ thuật hỗ trợ để mục đích làm tế bào bị phá vỡ để tăng hiệu quả trong trích ly (Acosta và ctv, 2014; Chaiyasut và ctv, 2010; Ma và ctv, 2007).

1.3.5.1. Kỹ thuật chiết xuất thông thường

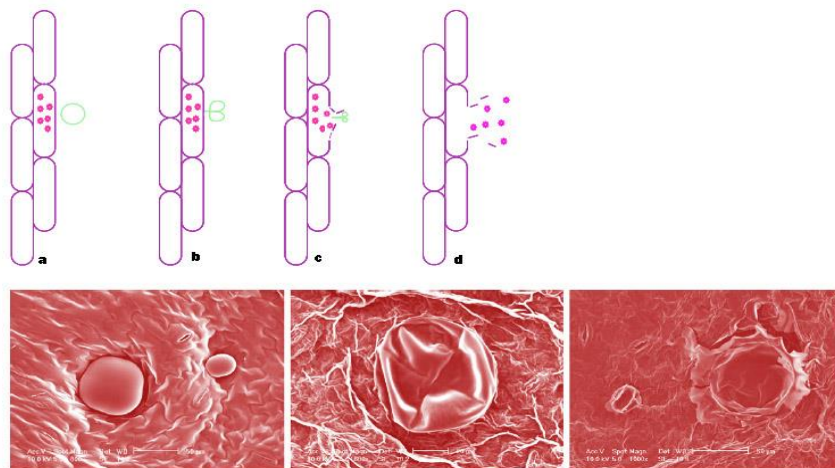
Phương pháp thông thường dựa trên chiết xuất rắn-lỏng được thực hiện với các dung môi khác nhau. Các phương pháp chiết xuất thông thường có những hạn chế đáng kể,

đáng chú ý là thời gian chiết xuất lâu và lượng dung môi hữu cơ sử dụng tương đối lớn. Tuy nhiên, chúng vẫn được sử dụng nhiều với nhiều lý do khác nhau như đơn giản và chi phí đầu tư thấp (Oreopoulou và ctv, 2019). Một số kỹ thuật chiết xuất thông thường như chiết xuất Soxhlet, chiết xuất bằng cách ngâm chiết cũng thường được sử dụng nhiều trong thực tế.

1.3.5.2. Kỹ thuật siêu âm

Phương pháp sử dụng siêu âm được phân biệt thành hai nhóm: siêu âm cường độ cao và cường độ thấp (Soria và Villamiel, 2010). Siêu âm cường độ thấp - công suất thấp, tần số cao (100 kHz - 1 MHz) (thường $< 1 \text{ W/m}^3$) – thường sử dụng trong phân tích không phá hủy, đặc biệt là để đánh giá chất lượng. Kỹ thuật này được áp dụng phổ biến nhất như kỹ thuật phân tích để cung cấp thông tin về các tính chất hóa lý của thực phẩm (ví dụ: độ cứng, độ chín, hàm lượng đường và độ acid). Tuy nhiên, siêu âm mật độ cao - công suất cao, tần số thấp (16 - 100 kHz) (thường là 10 - 1000 W/m^3) - có thể làm thay đổi tính chất thực phẩm về mặt vật lý hoặc hóa học, siêu âm cường độ cao được sử dụng nhằm để rút ngắn thời gian và nâng cao hiệu quả chuẩn bị mẫu (Awad và ctv, 2012; Mason và ctv, 1996).

Trong Hình 1.3 vi bọt có thể được tạo ra gần bề mặt vật liệu thực vật (a), sau đó, trong một chu kỳ nén, bong bóng này bị vỡ (b) và hướng vào nguyên liệu thực vật (b và c). Áp suất và nhiệt độ cao làm phá hủy thành tế bào của nguyên liệu thực vật và chất chiết được giải phóng vào môi trường (d). Đây là một công cụ rất hữu ích để chiết xuất các chất hoạt tính sinh học từ nguyên liệu nấm *Coriolopsis aspera* (Chemat và ctv, 2011).



Hình 1. 1. Sự xâm thực của bọt bong bóng vào tế bào thực vật khi siêu âm

Nguồn: (Chemat và ctv, 2011)

- a: micro bong bóng chưa xâm thực vào mô thực vật
- b: micro bong bóng bắt đầu xâm thực vào mô thực vật
- c: micro bong bóng xâm thực vào mô thực vật
- d: micro bong bóng vỡ tan ra và giải phóng các chất

Chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (UAE) có ưu điểm giảm nhiệt độ và rút ngắn thời gian chiết xuất. Do dung môi thâm nhập sâu vào trong tế bào của nguyên liệu, cải thiện chuyển khối và giải phóng các chất do sự phá vỡ thành tế bào (Albu và ctv, 2004; Mason và ctv, 1996). Các điều kiện bao gồm nhiệt độ chiết, thời gian chiết, công suất siêu âm và tỷ lệ nước với mẫu được tối ưu hóa để cải thiện hiệu suất trích ly. Theo nghiên cứu của Riera và ctv. (2010) với điều kiện tối ưu là công suất 350 W, thời gian 35 phút ở 90°C và tỷ lệ nguyên liệu với nước 1:5, thì hiệu quả tách các chất hoạt tính sinh học từ nấm rất cao (Komura và ctv, 2010).

Bảng 1. 2. Tổng hợp thông số kỹ thuật UAE trích ly chất hoạt tính sinh học

Nguyên liệu	Công suất (w)	Tỷ lệ rắn:lỏng (g/ml)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (phút)	Hiệu suất (%)	TLTK
<i>Agaricus Bisporus</i>	400	1:10	25	15	4,70	(Aguiló-Aguayo và ctv, 2017)
<i>Ganoderma lucidum</i>	671	1:12,5	28	45	15,00	(Chen và ctv, 2014)
<i>Paecilomyces hepiali</i>	300	1:160	25	11	9,48	(Yu và ctv, 2011)

<i>Tuber huidongense</i>	99,65	1:24,65	70.1	40,39	7,17	(Chen và ctv, 2016)
Nấm vân chi	30	1:40	40	48	5,95	(Pan và ctv, 2010)
<i>Trametes orientalis</i>	109,8	1:30	40,2	42,2	7,49	(Zheng và ctv, 2014)

Trong các kỹ thuật chiết xuất hiện đại như chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (UAE), chiết xuất có hỗ trợ vi sóng và chiết xuất chất lỏng siêu tới hạn thì chiết xuất có hỗ trợ siêu âm (UAE) rẻ tiền, dễ sử dụng. Siêu âm làm tăng hiệu quả trích ly là do tác động sóng âm trong dung môi lên thành tế bào làm cho cấu trúc thành tế bào bị phá vỡ và khuếch tán chất qua màng được nhanh hơn.

Trên Bảng 1.2 cho thấy thông số công suất siêu âm đối với nguyên liệu nấm vân chi của nhóm tác giả Pan và ctv. (2010) và Zheng và ctv. (2014) thấp. Từ 30W-109,8W, với công suất thấp này thì sợi tơ nấm chưa bị phá vỡ để tăng hiệu suất trích ly các thành phần hoạt tính sinh học.

1.3.5.3. Kỹ thuật vi sóng

Trong số các kỹ thuật mới được nghiên cứu, với tiềm năng công nghiệp hóa cao, chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (MAE) đã nhận được sự chú ý nhiều để chiết xuất các hoạt chất sinh học từ cây thuốc (C.-H. Chan và ctv, 2011; Mandal và ctv, 2007). So với một số kỹ thuật thông thường thì MAE cho được hiệu quả xử lý cao, bảo vệ được chất kém bền nhiệt, năng lượng tổn thất ít và tổn ít dung môi xử lý (C.-H. Chan và ctv, 2011). Cơ chế hoạt động MAE là làm nóng dung môi bằng năng lượng vi sóng. Kỹ thuật này rất hiệu quả trong quá trình truyền nhiệt, gia tăng nhiệt nhanh, giảm sự chênh lệch nhiệt độ và kích thước thiết bị. Dưới tác dụng của vi sóng làm hóa hơi và tạo áp suất bên trong tế bào đột ngột làm phá vỡ thành tế bào và nguyên sinh chất bị chảy ra và dễ hòa tan với dung môi (Li và ctv, 2013).

Trong xử lý nhiệt thông thường, năng lượng được truyền đến vật liệu do chênh lệch nhiệt thông qua sự đối lưu, dẫn truyền, và bức xạ và phần lớn năng lượng nhiệt bị tổn thất vào môi trường; trong khi đó, trong lò vi sóng, năng lượng được truyền trực tiếp đến vật liệu thông qua tương tác phân tử với trường điện từ và thực tế không bị tổn thất nhiệt vào môi trường (Venkatesh và Raghavan, 2004).

Các phương pháp chiết xuất thông thường có những nhược điểm như hiệu quả thấp, yêu cầu dung môi lớn, phát sinh chất thải, tổn thất chất nhạy cảm nhiệt độ, thời gian và năng lượng tiêu thụ cao (Li và ctv, 2013). Sự thay đổi hướng điện trường gây ra sự quay, rung và lắc của các phân tử, tăng cường sự chuyển động và va chạm, làm suy yếu các liên kết hydro do đó tạo điều kiện cho sự phá vỡ thành tế bào, giúp cải thiện cấu trúc xốp của các mô và chất dễ dàng khuếch tán nhanh vào dung môi (Chemat và ctv, 2005; Teo và ctv, 2009).

Trong các quy trình MAE, kích thước hạt của nguyên liệu trích ly cũng ảnh hưởng đến tốc độ truyền khối, gia nhiệt, khả năng thâm sâu dung môi vào vật liệu. Hàm lượng nước trong nguyên liệu cũng phải được kiểm soát bởi vì nó liên quan đến vấn đề phá vỡ cấu trúc của mô, của thành tế bào để chất dễ dàng hòa tan vào trong dung môi. Nguyên liệu không đồng nhất thì hằng số điện môi cũng khác nhau và trong toàn bộ vật liệu cũng có thể gây ra sự hình thành các điểm nóng và lạnh khi xử lý vi sóng. Do đặc tính hấp thụ năng lượng, nước đóng vai trò quan trọng trong quy trình trích ly hỗ trợ vi sóng do đó tỷ lệ dung môi và nguyên liệu phải được kiểm soát. Khả năng hấp thụ mạnh của nước làm tăng nhiệt độ bên trong mẫu, dẫn đến trong nguyên liệu nóng lên, bay hơi và tạo áp suất bên trong làm vỡ các tế bào (Li và ctv, 2013; Lucchesi và ctv, 2007; Spigno và De Faveri, 2009).

Bảng 1. 3. Thông số trích ly theo phương pháp MAE

Nguyên liệu nấm	Công suất vi sóng (w)	Tỷ lệ rắn:lỏng (g:ml)	Nhiệt độ (độ C)	Thời gian (phút)	Hiệu suất (%)	TLTK
<i>Agaricus blazei Murrill</i>	400	1:32,7	74,64	29,37	12,35	(Z. Zhang và ctv, 2011)
<i>Cordyceps militaris</i>	744,8	1:31,1	65	4.2	5,94	(Song và ctv, 2009)
<i>Cordyceps sinensis</i>	1300	1:60	-	5	6.2	(Cheong và ctv, 2016)
<i>Ganoderma lucidum</i>	284	1:11,6	-	11,68	3,27	(Huang và Ning, 2010)

<i>Fomitopsis ulmaria</i>	400	1:40	-	2.5	8,36	(Zhao và ctv, 2015)
<i>Nấm chaga (Inonotus obliquus)</i>	90	1:20	85	19	3,25	(Y. Chen và ctv, 2010)
<i>Nấm Tremella</i>	750	1:20	-	1	6,507	(Chen và ctv, 2012)
<i>Nấm Lentinus edodes</i>	450	1:30	-	10	9,38	(Yin và ctv, 2018)
<i>Trametes orientalis</i>	114	1:28	-	11	7,52	(Y. Zheng và ctv, 2019)

Theo Bảng 1.3 tổng hợp các thông số xử lý mẫu ở các loại nấm khác nhau, công suất vi sóng dao động từ 90-1300W, sự dao động này lớn với lý do các sợi tơ của mỗi loại nấm rất khác biệt, còn tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu lớn nhất là 60:1, tỷ lệ này phụ thuộc vào độ ẩm của nguyên liệu nấm, nhiệt độ xử lý từ 65-85°C, thời gian xử lý từ 1-29,37 phút.

Bảng 1.4. Ưu và nhược điểm của một số kỹ thuật trích ly.

Tên kỹ thuật trích ly	Trích ly hỗ trợ siêu âm	Trích ly hỗ trợ vi sóng	Trích ly chất lỏng siêu tới hạn	Trích ly có tác động dung môi
Mô tả ngắn gọn	Mẫu được ngâm trong dung môi và siêu âm trong bể hay đầu probe	Mẫu được ngâm trong dung môi và cho vào thiết bị vi sóng	Mẫu được đặt trong bình cao áp và được truyền liên tục bởi chất lỏng siêu tới hạn	Mẫu được gia nhiệt thông thường và cho dung môi chiết dưới tác động của áp suất
Thời gian trích ly	10-60 phút	3-30 phút	10-60 phút	10-20 phút
Lượng mẫu	1-30g	1-10g	1-5g	1-30g
Dung môi sử dụng	50-200ml	10-40ml	2-5ml (trap rắn), 30-60ml (trap lỏng)	15-60ml
Mức đầu tư	Thấp	Vừa phải	Cao	Cao
Ưu điểm	Đễ sử dụng	Nhanh	Nhanh	Nhanh Không cần lọc

	Lượng lớn dung môi tiêu dùng	Dễ dàng xử lý Dung môi sử dụng vừa phải	Tiêu thụ dung môi thấp Chất trích ly không cần lọc và khả năng chọn lọc cao	Tiêu thụ dung môi thấp Giảm chất lượng chất chiết
Hạn chế	Cần thiết phải lọc	Dung môi chiết phải hấp thụ năng lượng vi sóng Cần thiết phải lọc	Nhiều tham số để tối ưu hóa	

Nguồn: (Chemat và ctv, 2011)

1.3.6. Một số ảnh hưởng khác

Một số yếu tố khác như áp suất, kích thước nguyên liệu, pH dung môi trích ly đều có ảnh hưởng đến hiệu suất trích ly. Trong đó áp suất ảnh hưởng lớn đến hiệu suất trích ly nhưng vì lý do về chi phí đầu tư thiết bị, kỹ thuật cao... Kích thước nguyên liệu cũng ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất trích ly. Nếu kích thước nhỏ thì diện tích tiếp xúc giữa nguyên liệu với dung môi cao và làm tăng tốc độ cũng như hiệu suất trích ly và ngược lại. Trong một số nguyên cứu thông thường sẽ cố định yếu tố này và lựa chọn kích thước tối ưu để trích ly. Trong một nghiên cứu của nhóm tác giả Trần Thị Thùy Linh và ctv. (2014) đã chỉ ra rằng pH trích ly có ảnh hưởng đến quá trình trích ly các hợp chất có giá trị sinh học (Linh và Thủy, 2014).

1.4. Tinh sạch định danh chất

Để tinh sạch một chất có nhiều phương pháp như phương pháp kết tủa và hòa tan, phương pháp ly tâm, phương pháp thẩm tích, phương pháp sắc ký (lọc gel, trao đổi ion,...). Tùy theo loại nhóm chất muốn tách mà cần dùng phương pháp thích hợp và hiệu quả. Nếu sử dụng một số phương pháp cũ khác thì có thể không đạt hiệu quả về độ tinh sạch. Chất có thể bị lẫn thêm gốc đường hoặc acid hữu cơ (Castaneda-Ovando và ctv, 2009; Coutinho và ctv, 2004). Trước khi tinh sạch một chất thì thông thường phải dùng kỹ thuật chiết xuất từ pha rắn SPE và lỏng-lỏng LLE (Donner và ctv, 1997),

sau đó sử dụng các kỹ thuật sắc ký như sắc ký pha đảo CCC (Schwarz và ctv, 2003), sắc ký lỏng áp trung bình MPLC (Vivar-Quintana và ctv, 2002), và sắc ký lỏng cao áp HPLC (Alcalde-Eon và ctv, 2004) để tách một chất sạch từ các hợp chất khác nhau thì có thể làm theo phương pháp tăng độ phân cực khác nhau (Costa Da và ctv, 2000). Sắc ký pha đảo CCC và MPLC được sử dụng làm phương pháp tinh chế sau đó phân tích tiếp theo bằng HPLC để làm sáng tỏ cấu trúc, với ưu điểm là giảm thiểu thời gian tách và dung môi pha động (Vivar-Quintana và ctv, 2002). Hiện nay, phương pháp phổ biến nhất được sử dụng để phân tách chất là HPLC với đầu dò UV- Vis hoặc photodiode array (PDA) (Ella Missang và ctv, 2003; Mikanagi và ctv, 2000). Sắc ký là một công cụ hoàn hảo để phân tích các thành phần thực vật (Choma và I Jesionek, 2014).

1.4.1. Kỹ thuật sắc ký lọc gel

Tùy theo chất trong mẫu cần tách mà trước khi tinh sạch cần phải xử lý trước. Điển hình như tách pyranoanthocyanin trong rượu vang bằng sắc ký cột thì phải acid hóa bằng HCL 3M cho tới pH bằng 1 và tẩy màu bằng NaHSO₃ 400g/l trong thời gian 15 phút. Sau khi xử lý xong cho lên cột sắc ký Toyopearl® HW-40(s)(Tosoh, Japan). Dung môi rửa giải là ethanol 95%, với tốc độ dòng chảy 0,2ml/phút sử dụng bơm nhu động. Với dung môi ethanol 95% các chất màu được giữ lại trong cột, sau đó rửa giải bằng methanol 100% cho đến khi rửa giải hoàn toàn các sắc tố không được rửa giải bằng ethanol. Các dải màu sắc khác nhau được hình thành trong quá trình rửa giải. Các chất rửa giải ngay lập tức được acid hóa đến pH = 1 để thu được bisulfite-anthocyanin (Alcalde-Eon và ctv, 2004).

1.4.2. Kỹ thuật sắc ký bảng mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng (TLC) được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm trên toàn thế giới để phân tích thực phẩm và kiểm soát chất lượng. Nhiều ứng dụng của TLC đã được nghiên cứu trong các lĩnh vực thành phần thực phẩm, phụ gia, chất độn và các sản phẩm nông nghiệp thực vật (Sherma, 2000). Phương pháp sắc ký bảng mỏng (TLC) đơn giản, hiệu quả và dễ vận hành, đã được sử dụng trong các phòng thí

nghiệm hóa học nói chung trong nhiều thập kỷ nhằm để tách các hợp chất hóa học và sinh học (Ciura và ctv, 2017).

1.5. Hoạt tính sinh học

1.5.1. Hoạt tính chống oxy hóa

Trong nấm vân chi có nhiều thành phần chống oxy hóa như các hợp chất polyphenol, flavonoid, polysaccharide và hợp chất acid hữu cơ (Bains và Chawla, 2020; Kamiyama và ctv, 2013). Theo đánh giá của nhóm tác giả người Nhật về hoạt tính chống oxy hóa của các chất chiết dịch nấm vân chi *Trametes versicolor* với nhiều loại dung môi khác nhau theo phương pháp chiết Soxhlet đã cho được kết quả là chiết xuất từ acetone thể hiện hoạt tính chống oxy hóa cao nhất (50,9%), tiếp theo là các chiết xuất từ metanol (33,9%), n-hexane (29,5%) và chloroform (15,2%) ở nồng độ 500 µg / mL (Kamiyama và ctv, 2013). Một nghiên cứu khác của nhóm tác giả người Trung Quốc đã cho thấy các polysaccharide trong nấm vân chi *Trametes orientalis* có khả năng chống oxy hóa với thử nghiệm trên DPPH, năng lực khử Fe⁺³ thành Fe⁺² và thử nghiệm trên gốc tự do superoxide (Zheng và ctv, 2014). Theo nghiên cứu của nhóm người Romania năm 2018 về hoạt tính chống oxy hóa trên 2 loài nấm vân chi *Trametes versicolor* và *Trametes gibbosa* nhận xét rằng hoạt tính chống oxy hóa cao nhất được xác định trên cao chiết methanolic khi đó hàm lượng polyphenol tổng là cao nhất. Các kết quả thu được cho thấy các loài *Trametes* có thể được coi là nguồn hợp chất hoạt tính sinh học quan trọng, thành phần và hàm lượng phenolic của chúng bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như nguồn gốc địa lý và yếu tố di truyền (Puia và ctv, 2018).

Bảng 1.5. Tổng hợp khả năng chống oxy hóa của một số loài vân chi

	Thử nghiệm			TLTK
	DPPH	ABTS	Fe ⁺²	
<i>Trametes versicolor</i> (cao methanol)	0,213 (mM TE)	-	-	(Puia và ctv, 2018)
<i>Trametes gibbosa</i> (cao methanol)	0,534 (mM TE)	-	-	(Puia và ctv, 2018)

<i>Trametes versicolor</i>	0,52 mg/mL (IC ₅₀)	0,14 mg/mL (IC ₅₀)	0,83 mg/mL (IC ₅₀)	(Jhan và ctv, 2016)
<i>Trametes pubescens</i>	2mg/ml (IC ₅₀)	-	-	(Im và ctv, 2016)
<i>Trametes hirsuta</i>	0,908mg/ml	-	-	(Vazirian và ctv, 2014)

Ký hiệu:

mM TE (miliMol Trolox)

(-): chưa thử

Theo kết quả tổng hợp ở Bảng 1.5 cho thấy dịch chiết từ nấm vân chi có hoạt tính chống oxy hóa tốt trên DPPH, ABTS và năng lực khử Fe⁺² thành Fe⁺³.

1.5.2. Hoạt tính kháng vi sinh vật

Trong thành phần của nấm vân chi có chứa các nhóm chất phenolic có khả năng kháng VSV cao (Bains và Chawla, 2020). Theo nghiên cứu của nhóm tác giả Sivaprakasam và ctv. (2011) nghiên cứu trên đối tượng nấm vân chi *Trametes hirsuta* kết quả cho thấy dịch trích ly bằng dung môi nước và methanol từ quả thể có khả năng kháng 5 loại nấm *Penicillium sps.*, *Aspergillus fumigatous*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* và *Mucour* và 5 loại vi khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, và *Streptococcus mutans* (Bains và Chawla, 2020; Ricciardi và ctv, 2017; Sivaprakasam và ctv, 2011). Một nghiên cứu khác của Canli và ctv. (2019) trên đối tượng nấm vân chi *Trametes versicolor* cũng cho kết quả kháng VSV của dịch trích ly bằng dung môi ethanol tốt (Canli và ctv, 2019).

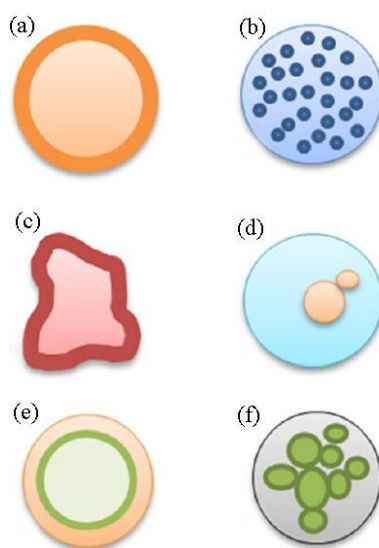
1.5.3. Hoạt tính ức chế tế bào ung thư

Nhóm các chất terpenoid, steroid, PSP và PSK trong nấm vân chi tác động rất mạnh đến tế bào ung thư đặc biệt là ung thư gan, ung thư phổi, ung thư vú, ung thư xương và ung thư cổ tử cung đã được một số nước như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc... nghiên cứu trên ba cấp độ in vitro, in vivo và kết quả lâm sàng (Habtemariam, 2020; Hobbs, 2004; Ricciardi và ctv, 2017; Standish và ctv, 2008). Theo nghiên cứu gần đây của nhóm tác giả Ricciardi và ctv. (2017) chất tramesan trong các loài nấm vân chi có khả năng ức chế tế bào ung thư tạo cơ chế miễn dịch tự nhiên trong cơ thể người (Ricciardi và ctv, 2017). Theo báo cáo gần đây nhất của nhóm tác giả Winder

và ctv. (2021) cho thấy dịch trích ly từ nấm vân chi *Trametes versicolor* có thể ứng dụng hỗ trợ trong điều trị ung thư (Winder và ctv, 2021). Còn đối với loài *Coriolopsis aspera* thì chưa thấy báo cáo về hoạt tính ức chế tế bào ung thư.

1.6. Kỹ thuật sấy phun tạo sản phẩm bột hòa tan

Kích thước và hình dạng bột sản phẩm hòa tan phụ thuộc vào vật liệu chất mang và phương pháp tạo ra hạt (Gharsallaoui và ctv, 2007).



Hình 1. 2. Hình thái các loại vi bao khác nhau

Nguồn: (Bakry và ctv, 2016)

(a) Vi bao đơn giản; (b) vi bao hợp chất; (c) vi bao không đều;
(d) vi bao nhiều lõi; (e) vi bao nhiều vách; (f) vi bao kết hợp

Việc lựa chọn phương pháp vi bao phụ thuộc vào các ứng dụng và thông số cụ thể như kích thước hạt yêu cầu, tính chất hóa lý của lõi và vật liệu phủ, cơ chế giải phóng, chi phí xử lý, v.v. Sấy phun là công nghệ được sử dụng phổ biến nhất, vì nó là một quá trình liên tục, chi phí thấp, tạo ra các vi hạt khô có chất lượng tốt (S. A. Mahdavi và ctv, 2014). Theo tác giả Cal và ctv, (2010) thì kỹ thuật sấy phun được phân loại thông qua đầu phun. Cho tới hiện nay, có 4 loại đầu phun thông dụng nhất là đầu phun theo cơ chế ly tâm (rotary atomizers) loại này phù hợp với quy mô sản xuất lớn, loại thứ 2 là đầu phun nhờ cơ chế thủy lực (hydraulic (pressure) nozzles), đường kính đầu phun từ 0,4-4mm loại này thường không ổn định trong nghiên cứu và đầu phun thứ 3 hoạt động theo cơ chế khí động học (pneumatic Nozzles) loại này phù hợp

trong nghiên cứu do tính ổn định cao, loại đầu phun thứ 4 dựa theo cơ chế siêu âm (ultrasonic nozzles) đây là loại đầu phun chuyên sấy những chất lỏng có độ nhớt cao thuộc dạng chất lỏng phi Newton. Thông thường nhiệt độ sấy dao động từ 120°C-170°C tùy thuộc theo từng loại nguyên liệu sấy (Cal và Sollohub, 2010; Sollohub và Cal, 2010). Ưu điểm của kỹ thuật sấy phun là hạt bột mịn và thời gian sấy nhanh trong khoảng vài giây do đó sẽ ít làm ảnh hưởng nhiệt độ lên hoạt tính sinh học của các chất trong nguyên liệu (Cal và Sollohub, 2010). Các loại chất mang khác nhau đã được sử dụng cho vi bao gồm polysaccharide (tinh bột, maltodextrin, gum arabic), lipid (acid stearic, mono- và diglyc-erides), và protein (gelatin, casein, huyết thanh sữa, đậu nành và lúa mì) (Desai và ctv, 2005). Việc sử dụng các chất mang khác nhau để sản xuất bột có các tính chất hóa lý khác nhau, tùy thuộc vào cấu trúc và đặc điểm của từng tác nhân (Idham và ctv, 2012). Maltodextrin thường được sử dụng làm chất mang bởi độ hòa tan trong nước cao, độ nhớt thấp, hàm lượng đường thấp và dung dịch không màu. Những đặc tính này phù hợp để tạo sản phẩm bột hòa tan (Robert và ctv, 2010). Gelatin cũng được sử dụng làm chất mang trong sấy phun do các đặc tính tốt của quá trình nhũ hóa, tạo màng, hòa tan trong nước, hoạt động ổn định cao và có xu hướng hình thành mạng lưới dày đặc, v.v. (B. Shu và ctv, 2006). Gum arabic, một loại polysaccharide thực vật không màu có nguồn gốc từ cây keo là một vật liệu chất mang được biết đến nhiều vì có tính nhũ hóa giúp ổn định và giữ được các chất có hoạt tính sinh học (Hosseini và ctv, 2015).

Bảng 1. 6. Tổng hợp một số chất mang trong kỹ thuật sấy phun

Chất mang	Tính chất và đặc điểm	Ứng dụng	Trích dẫn
Maltodextrin	Bản chất là polysaccharide hòa tan trong nước, bột trắng. Maltodextrin thường được phân loại theo giá trị DE (4, 10, 15, 20, 25, 30 và 42) có sẵn trên thị trường. Bổ sung maltodextrin trong quá (A) sấy làm tăng nhiệt độ chuyển thủy tinh và giảm độ dính của sản phẩm.	Maltodextrin thường được sử dụng làm chất vi bao, nhất là thực phẩm giàu đường khác nhau như quả lý chua đen, mâm xôi và nước quả mơ.	(Quek và ctv, 2007)

Gum arabic	Bản chất là các polysaccharide và glycoprotein, khả năng nhũ hóa tốt và độ nhớt thấp trong dung dịch nước. Khi kết hợp với maltodextrin, tinh bột biến tính sẽ làm tăng hiệu quả vi bao.	Tính ổn định cao khi vi bao các thành phần hoạt tính sinh học.	(Barbosa và ctv, 2005), (S. Krishnan và ctv, 2005)
Gelatin	Bản chất protein khả năng tiêu hóa tốt trong ruột non	Đặc tính nhũ hóa tốt, tạo màng cao, tan trong nước tốt.	(Mahdavi và ctv, 2016; Shu và ctv, 2006)

Ở Bảng 1.6 tổng hợp một số chất mang trong kỹ thuật sấy phun, cho thấy được tính chất và đặc điểm của một số chất mang thường được ứng dụng trong kỹ thuật sấy phun. Ở mỗi loại chất mang khác nhau sẽ cho được tính chất của sản phẩm bột sau sấy phun cũng khác nhau. Theo nhận định của Krishnan và ctv. (2005) cho biết nếu trộn hỗn hợp nhiều chất mang sẽ tăng khả năng bảo quản các chất có hoạt tính sinh học tốt (Krishnan và ctv, 2005; Tran và ctv, 2018).

Do đó, để lựa chọn chất mang phù hợp để tạo vi bao bằng công nghệ sấy phun cần phải lưu ý các tiêu chí lựa chọn như nguyên liệu rẽ và phong phú, hiệu suất thu hồi bột sau khi sấy cao, chất lượng sản phẩm bột (độ ẩm, màu sắc, khả năng tiêu hóa, cơ chế giải phóng thành phần hạt trung tâm, thời gian bảo quản lâu).

1.7. Thời gian bảo quản

Các cơ chế chính liên quan đến sự hư hỏng của thực phẩm chế biến như sau: Sự hư hỏng do vi sinh vật. Hoạt động hóa học và enzyme gây ra sự phân hủy lipid, màu sắc, mùi, hương vị và thay đổi kết cấu. Sự thay đổi ẩm tạo ra những thay đổi về kết cấu, hoạt động của nước và hương vị (Sewald và ctv, 2003). Để đáp ứng mong đợi của người tiêu dùng, các sản phẩm chất lượng cao, ngành công nghiệp thực phẩm phải

tiến hành nghiên cứu thời hạn sử dụng bao gồm đánh giá một số tính chất hóa lý và cảm quan. Đối với các sản phẩm có thời hạn sử dụng ước tính dài, các nghiên cứu tăng tốc phải được tiến hành để ước lượng được thời gian bảo quản trên thị trường (Minh và ctv, 2013). Thực phẩm dạng bột hòa tan với độ ẩm của bột thấp, ít chất béo sự hư hỏng xảy ra có thể dự đoán được một số nguyên nhân như thay đổi màu sắc, thay đổi mùi, bột bị hút ẩm tan chảy những biến đổi này làm thay đổi tính chất cảm quan. Bên cạnh đó còn có biến đổi các thành phần hoạt tính (TPC, TFC, TTC) và RSA có trong bột làm ảnh hưởng đến chất lượng của bột sản phẩm.

1.8. Mục tiêu và nội dung nghiên cứu

Tóm lại, nấm *Coriolopsis aspera* có chứa thành phần polyphenol, flavonoid, triterpene có hoạt tính sinh học cao. Quả thể nấm được cấu tạo bởi những sợi tơ nấm rất bền, do đó cần phải được xử lý trước khi trích ly. Những công trình xử lý sợi tơ nấm cũng như xác định hàm lượng polyphenol, flavonoid, polysaccharide, triterpene trong nấm *Coriolopsis aspera* và ứng dụng tạo sản phẩm bột trong nấm chưa thấy được báo cáo trong và ngoài nước. Từ đó, đã đề xuất mục tiêu và nội dung nghiên cứu của luận án như sau:

Mục tiêu và nội dung nghiên cứu:

- Mục tiêu 1: Nghiên cứu điều kiện trích ly, tinh sạch các thành phần trong dịch chiết nấm *Coriolopsis aspera* để xác định thành phần và làm giàu các hợp chất TPC, TFC, TTC và trong dịch trích ly.
 - Nội dung 1: Khảo sát phương pháp xử lý nguyên liệu, khảo sát ảnh hưởng dung môi trích ly, tối ưu hóa điều kiện trích ly.
 - Nội dung 2: Định tính thành phần hoạt tính, tinh sạch chất.
 - Nội dung 3: Thử hoạt tính chống oxy hóa, thử khả năng gây độc và ức chế tế bào ung thư, thử khả năng kháng VSV, thử độc tính cấp và bán trường diễn.
- Mục tiêu 2: Ứng dụng tạo sản phẩm bột hòa tan từ dịch trích ly đã làm giàu hoạt tính sinh học theo hướng có lợi cho sức khỏe.
 - Nội dung 4: Khảo sát lựa chọn tỷ lệ hỗn hợp chất mang, tối ưu hóa điều kiện sấy phun, nghiên cứu thời gian bảo quản sản phẩm bột hòa tan, đánh giá sản phẩm bột hòa tan.

Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Nấm vân chi *Coriolopsis aspera* tự nhiên được thu nhận tại vườn Quốc Gia Pù Mát nằm ở 18°46' vĩ độ Bắc và 104°24' độ kinh Đông thuộc tỉnh Nghệ An. Sau đó nấm được nuôi trồng tại vườn sinh học của trường Đại Học Công Nghiệp Tp HCM. Nguyên liệu nấm đem nghiên cứu được thu hoạch có kích thước trung bình của quả thể từ 5-7 cm, thời gian thu hoạch khoảng 50-60 ngày. Tên loài được xác định bởi tiến sĩ sinh học Văn Hồng Thiện thuộc trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM (Phụ lục A). Mẫu nấm được lưu tại đơn vị Viện Sinh học-Thực phẩm thuộc trường Đại học Công nghiệp Tp. HCM.



Hình 2.1. Nấm vân chi *Coriolopsis aspera*

2.1.2. Thiết bị và hóa chất

Thiết bị sử dụng và hóa chất chính chi tiết được liệt kê trong 2 bảng sau:

Bảng 2. 1. Thiết bị sử dụng nghiên cứu

STT	Tên dụng cụ và thiết bị	Xuất xứ
1	Thiết bị cô quay chân không RV 10	Đức
2	Tủ âm Shellab, Model 1525-2E	Mỹ
3	Thiết bị sấy SHELLAB-USA-CE3F-2	Mỹ
4	Máy ly tâm EBA200S	Đức
5	Máy siêu âm Ultrasonic processor model GE 750	Mỹ
6	Bể ổn nhiệt lạnh Bibby - R000100032	Anh
7	Tủ sấy Memmert	Đức
8	Máy sấy phun (LabPlant SD-Basic)	Anh
9	Máy nghiền búa kích thước lỗ sàng 20mesh	Việt Nam
10	Thiết bị đo độ nhớt Brookfield (Model DIGITAL DV – III Ultra Rheometer)	Mỹ
11	Máy đo độ Brix điện tử atago model pal-1	Nhật
12	Máy đo quang phổ UV-VIS Model: UVS-2800 LABOMED – UVS9060	Mỹ

Bảng 2. 2. Hóa chất sử dụng nghiên cứu

STT	Tên hóa chất	Xuất xứ	STT	Tên hóa chất	Xuất xứ
1	Folin	Đức	13	Maltodextrin (DE 16-19)	Mỹ
2	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)	Đức	14	Phenol	TQ
3	2,2'-azino-bis(3-ethybenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	Đức	15	Gum arabic	Ấn Độ
4	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic (Trolox)	Đức	16	Etanol 99%	VN
5	K ₂ S ₂ O ₈	TQ	17	n-Hexan	VN
6	Na ₂ CO ₃	TQ	18	Metanol	VN
7	NaNO ₂	TQ	19	Ethyl acetate	VN
8	AlCl ₃	TQ	20	Chloroform	VN
9	NaOH	TQ	21	Silicagel	Đức
10	Vanillin	TQ	22	Bản mỏng (TLC)	Đức
11	Acid acetic	TQ	23	H ₂ SO ₄	VN
12	Perchloric Acid	Hàn Quốc			

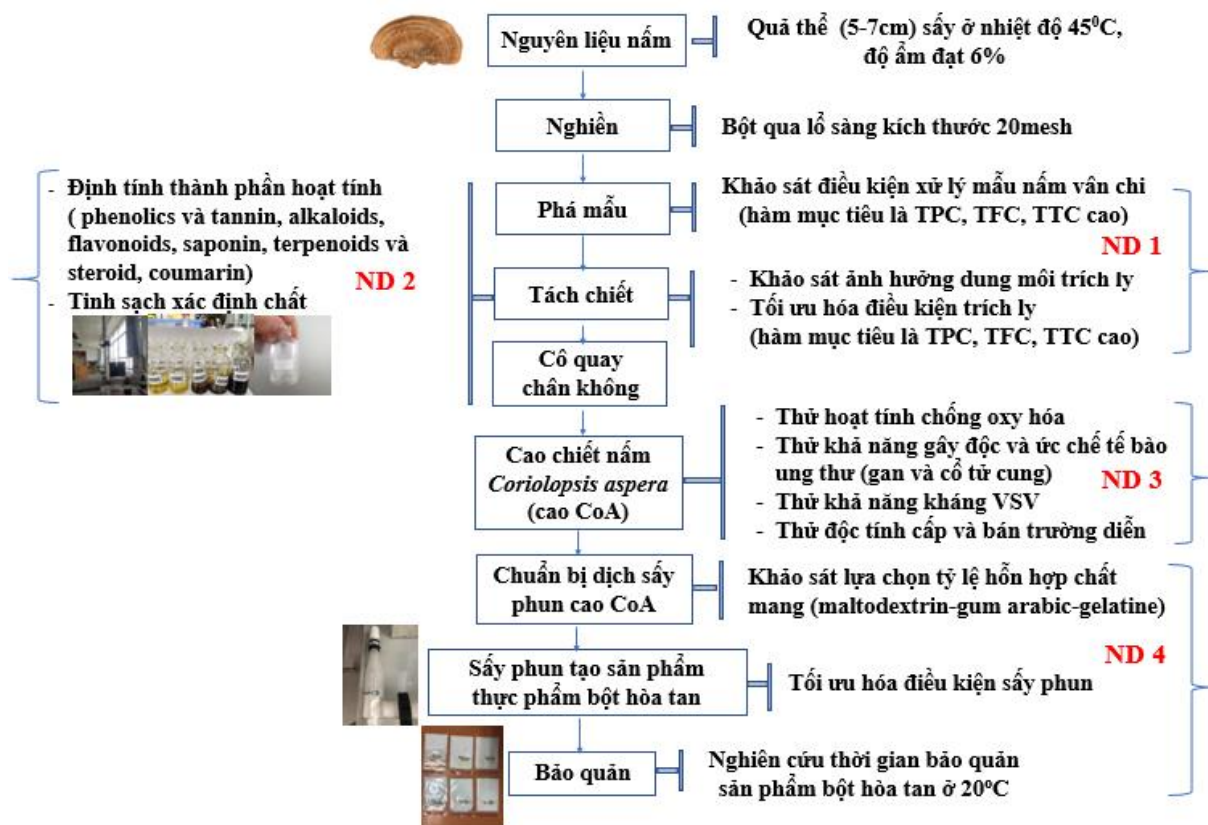
2.2. Địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện ở hệ thống phòng thí nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học & Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp TP. Hồ Chí Minh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Sử dụng phương pháp cổ điển và phương pháp quy hoạch thực nghiệm.

Sơ đồ nghiên cứu tổng quát:



Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp lấy và xử lý mẫu

Nguyên liệu dạng tươi, sau đó đem sấy ở nhiệt độ 45°C đến độ ẩm khoảng 6%. Mẫu nấm sau khi khô sẽ đem xay nhỏ qua thiết bị nghiền búa và sàng qua rây với kích thước lưới 20 mesh. Sau đó chia đều 2g vào các túi PE có hút chân không, để trong tủ mát ở nhiệt độ 4°C. Các mẫu được bảo quản và sử dụng trong thời gian trước 30 ngày.

2.3.2. Phương pháp xử lý mẫu nguyên liệu

Mục đích: Phá vỡ tế bào của sợi tơ nấm vân chi bằng các phương pháp khác nhau nhằm để tăng tính hiệu quả trong công đoạn trích ly. Dựa theo phương pháp của Erdogan và Saavedra Plazas có sửa đổi (Erdogan và ctv, 2017; Macrae và Elspeth, 2007; Saavedra Plazas và ctv, 2020).

Bước 1: Thực hiện sàng lọc 5 phương pháp để nhằm lựa chọn các mẫu (Mo, M1, M2, M3, M4, M5) có những thông số trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao.

- Phương pháp siêu âm

Thực hiện khảo sát một yếu tố độc lập để tìm thông số công suất siêu âm và thời gian siêu âm. Siêu âm nguyên liệu trong dung môi nước với tỷ lệ nước so với nguyên liệu là 60:1, sau đó đem lọc ly tâm thu được chất rắn và dịch, chất rắn đem đi sấy đến độ ẩm 6% và cho dung môi ethanol 96% vào trích ly trong thời gian 30 phút. Mẫu đối chứng khác với mẫu xử lý là không siêu âm còn lại quy trình trích ly giống như mẫu đã xử lý.

Thí nghiệm 1:

Công suất siêu âm khảo sát: từ (150-525) W/g nguyên liệu (6%), bước nhảy 75W.

Thời gian siêu âm cố định: 10 phút

Vị trí thanh siêu âm được đặt cố định.

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Lượng dung môi cố định

Thí nghiệm 2:

Thời gian siêu âm khảo sát: từ (5-35 phút), bước nhảy là 5 phút.

Công suất siêu âm cố định: Kết quả từ TN1

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Mẫu M1 là mẫu có thông số trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao.

– *Phương pháp vi sóng*

Thực hiện khảo sát một yếu tố độc lập để tìm thông số công suất vi sóng và thời gian vi sóng. Xử lý vi sóng nguyên liệu trong dung môi nước với tỷ lệ nước so với nguyên liệu là 60:1, sau đó đem lọc ly tâm thu được chất rắn và dịch, chất rắn đem đi sấy đến độ ẩm 6% và cho dung môi ethanol 96% vào trích ly trong thời gian 30 phút. Mẫu đối chứng khác với mẫu xử lý là không xử lý vi sóng còn lại quy trình trích ly giống như mẫu đã xử lý.

Thí nghiệm 1:

Công suất vi sóng khảo sát: từ (110-140)W/g nguyên liệu (6%), bước nhảy 10W.

Thời gian vi sóng cố định: 10 phút.

Lượng dung môi cố định

Thí nghiệm 2:

Thời gian vi sóng khảo sát: từ (5-20 phút), bước nhảy là 5 phút.

Công suất vi sóng cố định: Kết quả từ TN1

Mẫu M2 là mẫu có thông số trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao.

– *Phương pháp đun nước nóng*

Xử lý đun nóng nguyên liệu trong dung môi nước với tỷ lệ nước so với nguyên liệu là 60:1, sau đó đem lọc ly tâm thu được chất rắn và dịch, chất rắn đem đi sấy đến độ ẩm 6% và cho dung môi ethanol 96% vào trích ly trong thời gian 30 phút. Mẫu đối chứng khác với mẫu xử lý là không xử lý đun nóng còn lại quy trình trích ly giống như mẫu đã xử lý.

Thí nghiệm 1:

Nhiệt độ đun khảo sát: từ (70-100°C), bước nhảy 10°C.

Thời gian đun cố định: 10 phút

Lượng nước cố định

Thí nghiệm 2:

Thời gian đun khảo sát: từ (5-20 phút), bước nhảy là 5 phút.

Nhiệt độ đun cố định: Kết quả từ TN1

Mẫu M3 là mẫu có thông số trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao.

– *Phương pháp kết hợp hóa học và siêu âm*

Xử lý ngâm nguyên liệu trong dung dịch NaOH trong thời gian 20 phút, kế đó đem siêu âm, sau đó đem lọc ly tâm thu được chất rắn và dịch, chất rắn đem đi sấy đến độ ẩm 6% và cho dung môi ethanol 96% vào trích ly trong thời gian 30 phút. Mẫu đối chứng khác với mẫu xử lý là không ngâm dung dịch NaOH và siêu âm còn lại quy trình trích ly giống như mẫu đã xử lý.

Thí nghiệm 1:

Nồng độ NaOH khảo sát: từ 3%-9%, bước nhảy là 2%.

Thời gian siêu âm cố định: 15 phút

Công suất siêu âm cố định: 375W/2g nguyên liệu (6%)

Lượng dung dịch NaOH cố định

Vị trí thanh siêu âm được đặt cố định.

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Thí nghiệm 2:

Thời gian siêu âm từ (5-20 phút), bước nhảy là 5 phút.

Nồng độ NaOH cố định: Kết quả từ TN1

Công suất siêu âm cố định: 375W

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Mẫu M4 là mẫu có thông số trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao.

- *Phương pháp kết hợp nitơ lỏng và siêu âm*

Xử lý nguyên liệu với nitơ lỏng trước, kế đó đem siêu âm trong nước với tỷ lệ nước với nguyên liệu là 60:1, rồi đem lọc ly tâm thu được chất rắn và dịch, chất rắn đem đi sấy đến độ ẩm 6% và cho dung môi ethanol 96% vào trích ly trong thời gian 30 phút. Mẫu đối chứng khác với mẫu xử lý là không xử lý nitơ và siêu âm còn lại quy trình trích ly giống như mẫu đã xử lý.

Thí nghiệm 1:

Tỷ lệ nitơ lỏng so với nguyên liệu khảo sát: từ 2:1-8:1, bước nhảy là 2.

Thời gian siêu âm cố định: 15 phút

Công suất siêu âm cố định: 375W/g nguyên liệu (6%)

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Vị trí thanh siêu âm được đặt cố định.

Thí nghiệm 2:

Thời gian siêu âm từ (5-20 phút), bước nhảy là 5 phút.

Tỷ lệ nitơ lỏng so với nguyên liệu cố định: Kết quả từ TN1

Công suất siêu âm cố định: 375W

Nhiệt độ cố định 30°C bằng hệ thống ổn nhiệt nóng lạnh.

Vị trí thanh siêu âm được đặt cố định.

Sau khi lựa chọn các mẫu Mo, M1, M2, M3, M4, M5 ở từng phương pháp kế đó thực hiện thống kê xem các mẫu nào trích ly các thành phần TPC, TFC, TTC và RSA cao

Bước 2: Thực hiện thống kê so sánh 5 mẫu Mo, M1, M2, M3, M4, M5 để đánh giá phương pháp nào cho được kết quả trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao và hình ảnh chụp SEM để xem sự phá hủy các sợi tơ ở từng phương pháp nào cao nhất.

2.3.3. Nghiên cứu điều kiện trích ly

2.3.3.1. Khảo sát loại dung môi để trích ly hợp chất có hoạt tính sinh học

Chuẩn bị mẫu: Mẫu nguyên liệu sau khi được xử lý phá mẫu ở mục 2.3.2 được đem nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng loại dung môi trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Mục đích: nhằm chọn loại dung môi phù hợp để thực hiện công đoạn trích ly các thành phần hoạt tính sinh học. Trên cơ sở dựa trên độ phân cực khác nhau của các loại dung môi để trích ly các thành phần TPC, TFC, TTC chọn 3 loại dung môi để trích ly như acetone, methanol, ethanol.

Thực hiện khảo sát một yếu tố độc lập các loại dung môi khảo sát bao gồm aceton, methanol, ethanol với nồng độ dung môi khảo sát cố định 98%. Hàm mục tiêu theo dõi là TPC, hàm lượng TFC, hàm lượng TTC và RSA.

Chế độ xử lý các mẫu trích ly giống nhau như nguyên liệu xử lý nitơ lỏng, sau đó cho nước cất vào nguyên liệu với tỷ lệ 60:1, siêu âm trong thời gian 15 phút, công suất siêu âm 375W, lượng nguyên liệu 2g. Siêu âm xong đem tách dịch (dung dịch 1) và phần rắn. Đem phần rắn sấy khô và cho dung môi vào với tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu là 60:1, trích ly trong thời gian cố định 24 giờ. Sau đó tách phần dịch sau trích ly (dung dịch 2). Trộn dung dịch 1 và dung dịch 2 lại đem xác định thành phần.

2.3.3.2. Định tính thành phần hoạt tính sinh học

Chuẩn bị mẫu: Dịch cao chiết được trích ly ở mục 2.3.3.1.

Nguyên tắc: Dựa trên dấu hiệu thay đổi màu sắc, kết tủa, sự hình thành bọt khi cho cao chiết nấm vân chi với các dung dịch thuốc thử phù hợp (Deka và ctv, 2017; Doris, 2018).

Định tính các thành phần:

- Phenolic và tannin: 0,5g cao chiết được hòa tan trong 5mL nước cất, sau đó đun sôi nhẹ và làm lạnh. Sau đó cho 3 giọt dung dịch ferric chloride 0,1% vào và quan sát thấy màu xanh nâu hoặc xanh đen (Deka và ctv, 2017).
- Alkaloid: 0,5g cao chiết được khuấy với 5mL dung dịch acid clohydric 1% (HCl) trong hai phút trên nồi cách thủy hấp. Hỗn hợp được lọc và cho vài giọt thuốc

thử Dragendorff vào. Các mẫu sau đó được quan sát thấy sự thay đổi màu sắc hoặc độ đục rút ra kết luận (Awala và Oyetayo, 2015).

- Flavonoid: Thử nghiệm định tính flavonoid dựa trên phản ứng của các flavonoid với chì acetate để tạo kết tủa vàng. Lấy 0,1g cao chiết được pha loãng với 0.5mL nước cất cho vào ống nghiệm sau đó cho 5mL chì acetate (10%) và lắc đều chờ phản ứng (Độ và ctv, 2017).
- Saponin: Thử nghiệm tạo bọt liên tục cho saponin được mô tả bởi Odebiyi và ctv. (1978). Nước cất 30 mL được thêm vào 1g chiết xuất cao. Hỗn hợp được lắc mạnh và được đun nóng. Các mẫu được quan sát sự hình thành bọt để rút ra kết luận (Odebiyi và Sofowora, 1978).
- Kiểm tra terpenoid và steroid : lấy 5ml dịch chiết sau đó cho 2 ml chloroform và 3 ml H₂SO₄ đậm đặc. Chú ý khi cho vào cẩn thận để tạo thành một lớp. Khi thấy giao diện có màu nâu đỏ được hình thành thì xem như có sự hiện diện của terpenoid (Llauradó và ctv, 2013).
- Kiểm tra coumarin dựa trên phản ứng giữa 0,1g cao chiết được pha với 0.5mL nước cất được cho vào ống nghiệm sau đó thêm 7mL NaOH (10%), lắc đều và chờ màu vàng xuất hiện (Ngân và ctv, 2017).

2.3.4. Tinh sạch, định danh chất trong dịch trích ly

Mục đích tách chiết phân lập hợp chất từ cao chiết nấm *Coriolopsis aspera* để tinh sạch tạo chất sạch và định danh.

Chuẩn bị mẫu: Cao chiết được chuẩn bị giống cách làm ở mục 2.3.4.1. Sau đó thực hiện phương pháp chiết rắn-lỏng với thông số trích ly tối ưu. Dịch trích ly được đem lọc qua giấy lọc còn bã đem trích ly lại. Quá trình trích ly được lặp lại 3 lần. Dịch trích ly được dồn lại và đem cô đặc chân không bằng thiết bị cô quay IKA của Đức.

2.3.4.1. Tách chiết phân đoạn

Cao chiết thu được được pha với nước và đem tiến hành tách chiết lỏng – lỏng bằng phễu chiết lần lượt với các dung môi hexane, ethylacetat, chloroform. Cuối cùng thu được 4 loại cao (cao hexane, cao ethylacetat, cao chloroform, cao nước) để tách thành các phân đoạn khác nhau.

2.3.4.2. Tinh sạch

- Sắc ký cột thường (CC)

Sắc ký cột được thực hiện với chất hấp thụ silicagel pha thường có cỡ hạt 400 - 630 nm/mesh (Merck). Kích thước cột thay đổi từ to đến nhỏ để thu được chất có độ tinh sạch cao.

- Sắc ký lớp mỏng (TLC)

Sắc ký lớp mỏng phân tích được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 105715), độ dày 0,2 mm; RP18 F254s (Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 368 nm; dùng hơi Iot (I₂) hiện màu những chất có trên bản mỏng hoặc dùng dung dịch acid sunfuric (H₂SO₄) 20% trong cồn phun lên bản mỏng rồi hơi nóng trên bếp điện từ đến khi hiện màu. Đèn soi bản mỏng UV-VIS GENESYS hai bước sóng 254nm và 368nm xuất xứ tại Đức.

- Phương pháp kết tinh

Phương pháp kết tinh mẫu sau khi chạy sắc ký cột là bay hơi dung môi ở nhiệt độ phòng đối với mẫu có dung môi dễ bay hơi. Mẫu khó bay dung môi sẽ kết hợp chênh lệch ẩm bằng cách kết tinh ở nhiệt độ thấp 5-12⁰C trong tủ lạnh.

- Phương pháp xác định cấu trúc phân tử.

Cấu trúc của các hợp chất được khảo sát nhờ sự kết hợp các phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR.

Sử dụng 2 phổ phân tích chính là: phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³C-NMR. Ngoài ra, để xác định chi tiết và chính xác cần đo tất cả các phổ: phổ DEPT, phổ HMBC, phổ HSQC, phổ COSY, phổ NOESY.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR được đo trên máy Bruker 500MHz, phổ ¹³C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC, COSY và NOESY được đo trên máy Bruker 125 MHz (Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học Công nghệ Việt Nam).

2.3.5. Xác định thành phần hoạt tính tổng (TFC, TTC, TFC)

2.3.5.1. Phương pháp xác định hàm lượng flavonoid

Nguyên tắc: Hàm lượng flavonoid tổng được xác định bằng phương pháp UV-VIS với thuốc thử nhôm clorua dựa theo cách làm của (Nardini và Garaguso, 2018) có sửa đổi bổ sung. Flavonoid trong nấm Vân chi tạo phức màu vàng với dung dịch nhôm

clorua. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng flavonoid được xác định ở bước sóng 510nm. Làm mẫu trắng đối chứng bằng nước cất. Đồ thị đường chuẩn được trình bày ở PLC1.

2.3.5.2. Phương pháp xác định hàm lượng triterpene

Nguyên tắc: Hàm lượng triterpene tổng (TTC) được xác định bằng đường chuẩn acid oleanolic, được biểu thị bằng miligam oleanolic acid tương đương/ gram chất khô dựa vào độ hấp thụ đo ở bước sóng 550 nm. Cách làm dựa theo nhóm tác giả (Chen và ctv, 2007) có sửa đổi bổ sung. Đồ thị đường chuẩn được trình bày ở PLC2.

2.3.5.3. Phương pháp xác định hàm lượng polyphenols

Hàm lượng polyphenols tổng số được xác định bằng phương pháp UV-VIS với thuốc thử Folin – Ciocalteu dựa theo nhóm tác giả (Scroccarello và ctv, 2019) có sửa đổi.

Nguyên tắc: Phương pháp này dựa trên khả năng phản ứng với các hợp chất phenolic của thuốc thử Folin – Ciocalteu của hãng Sigma Mỹ, là hỗn hợp muối phức sodium tungstene (Na_2WO_4) và sodium molybdate (Na_2MoO_4) rất nhạy đối với chất khử, nên khi có mặt hợp chất phenolic trong môi trường kiềm nhẹ thì sẽ bị khử thành hợp chất có màu xanh có độ hấp thụ mạnh nhất ở bước sóng 765nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỷ lệ thuận với nồng độ các hợp chất phenolic có trong dịch trích. Dùng acid gallic làm chất chuẩn với đơn vị tính là gam GAE/g chất khô nấm Vân chi. Đồ thị đường chuẩn được trình bày ở PLC3

2.3.5.4. Tối ưu hóa trong công đoạn trích ly TPC, TFC và TTC

Chuẩn bị mẫu: Mẫu nguyên liệu sau khi được xử lý phá mẫu ở mục 2.3.2 và lựa chọn dung môi trích ly phù hợp ở mục 2.3.3.1. Sau đó thực hiện tối ưu hóa công đoạn trích ly.

Để thực hiện quá trình tối ưu hóa chúng tôi thực hiện 3 bước.

Bước 1: Khảo sát độc lập một yếu tố để tìm ra mức giới hạn thấp và mức giới hạn cao của các yếu tố (Chen và ctv, 2007). Các yếu tố bao gồm X_1 : nhiệt độ, X_2 : tỷ lệ dung môi -nguyên liệu X_3 : thời gian, X_4 : nồng độ dung môi ethanol. Các hàm mục tiêu Y_1 : hàm lượng polyphenol tổng, Y_2 : hàm lượng flavonoid tổng, Y_3 : hàm lượng triterpene tổng

Bước 2: Lựa chọn mô hình toán học Box-Bohnken để thực hiện tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM)(Box và Behnken, 1960). Sử dụng phần mềm JMP 10.0.0

Bước 3: Kiểm chứng thực nghiệm.

2.3.6. Thử hoạt tính sinh học của cao chiết ethanol

Chuẩn bị mẫu: Dịch sau khi trích ly với các thông số tối ưu được cô đặc chân không và sấy đông khô. Cô đặc chân không, nhiệt độ cô đặc 45°C, áp suất chân không 200millibars. Sấy đông khô với thiết bị Home Freeze Dryer Harvest Right™ của Mỹ. Nhiệt độ làm lạnh ban đầu -35°C, thời gian làm lạnh 9h; nhiệt độ nâng nhiệt tối đa 50°C, thời gian sấy tổng cộng 24h, áp suất chân không sau thời gian làm lạnh đạt 6,5. Độ ẩm của bột sau khi sấy đạt 1,3%.

2.3.6.1. Xác định khả năng khử gốc tự do

Sử dụng phương pháp DPPH

Nguyên tắc: Phương pháp DPPH là phương pháp dùng thuốc thử 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, chất có khả năng kháng oxy hóa sẽ trung hòa gốc DPPH bằng cách cho hydrogen làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và làm mất màu tím ban đầu của dung dịch, chuyển dần sang màu vàng nhạt. Hàm lượng DPPH còn lại trong dung dịch sau phản ứng được xác định bằng phương pháp so màu ở bước sóng 517nm. Phương pháp thực hiện dựa vào nhóm nghiên cứu (Akgul và ctv, 2017) có thay đổi.

2.3.6.2. Xác định hoạt tính gây độc và ức chế sự tăng sinh tế bào của cao chiết.

Dựa trên phương pháp MTT nhằm để sàng lọc nhanh có hoạt tính gây độc hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào (L. Yang và ctv, 2017).

Nguyên tắc: gián tiếp xác định hoạt tính của chất thử qua khả năng ức chế enzyme *oxidoreductase* phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme trong ty thể này xúc tác phản ứng khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT thành dạng formazan không hòa tan, có màu tím, qua đó có thể phản ánh tương quan số lượng tế bào đang phát triển khi đo bước sóng $\lambda=540/720\text{nm}$.

Thử trên 2 dòng tế bào ung thư gan Hep-G2 và ung thư cổ tử cung HeLa. Tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5% trong môi trường phù hợp: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minium Essential Medium, Sigma-

Aldrich, Mỹ) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, Đức) có bổ sung L-glutamine 2mM, kháng sinh (Penicillin+Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 5-10%. Dịch tế bào sau đó được nhỏ lên phiến vi lượng 96 giếng ($1,5 \times 10^5$ tế bào/giếng), sau đó tiến hành thực hiện ủ với mẫu thử ở dải nồng độ từ 100-6,25 $\mu\text{g/ml}$, mỗi nồng độ được lặp lại 3 lần. Ellipticine hoặc Paclitaxel (Taxol) trong DMSO được dùng làm chất chuẩn dương tính (+). Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) và đo mật độ quang ở $\lambda=540/720\text{nm}$ trên thiết bị Infinite F50 (Tecan, Mannedorf, Thụy Sĩ) (J. Zhang và ctv, 2017).

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = [1 - (\text{OD}_{(\text{mẫu})} / \text{OD}_{[\text{đối chứng(-)}]})] \times 100\%$$

Các mẫu có biểu hiện hoạt tính (% ức chế $\geq 50\%$) được xác định có giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ hoặc μM) là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế 50% sự sống sót của tế bào, sử dụng phần mềm TableCuve AISN Software.

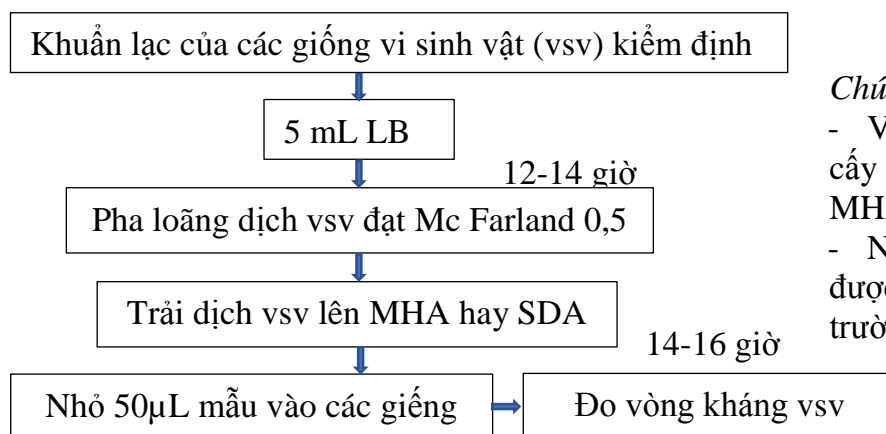
2.3.6.3. Phương pháp phân tích vi sinh

Chuẩn bị mẫu: cao chiết nấm đã được tối ưu hóa ở mục 2.3.5.5 được đem cô đặc chân không ở nhiệt độ 40°C .

Dựa theo phương pháp của Hadacek và ctv. (2000) có thay đổi (Hadacek và Greger, 2000).

2.3.6.3.1. Quy trình

Mẫu: nồng độ 100mg/mL: cân 0,1 g mẫu/ 1mL DMSO 5%



Chú ý:

- Vi khuẩn được nuôi cấy bằng môi trường MHA.
- Nấm *Candida albicans* được nuôi cấy bằng môi trường SDA.

Hình 2.3. Quy trình kháng vsv

2.3.6.3.2. Phương pháp chuẩn bị độ đục chuẩn 0.5 McFarland

Pha 0,05mL dung dịch BaCl₂.2H₂O 1% với 9,95mL dung dịch H₂SO₄ 1%, đo quang ở bước sóng 600nm, độ đục đạt chuẩn McFarland 0.5 khi OD₆₀₀ = 0,08 – 0,1. Dịch vi sinh vật có cùng độ đục với McFarland 0,5 sẽ có mật độ 1-3×10⁸ CFU/mL (Hadacek và Greger, 2000; Hannan, 2000).

2.3.6.3.3. Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn kiểm định

Các chủng vi sinh vật kiểm định *B. cereus* ATCC 11778, *C. albicans* ATCC 26790, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *K. pneumonia* ATCC 13883, *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* ATCC 13311, *P. aeruginosa* ATCC 27853 và *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 được hoạt hóa trong môi trường LB. Dịch nuôi cấy của các chủng này được pha loãng cho đến khi có độ đục tương tự độ đục McFarland 0,5.

2.3.6.3.4. Khảo sát sơ bộ hoạt tính của cao chiết ethanol

Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao được đánh giá bởi phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với 2 nồng độ 10mg/mL và 100mg/mL. Dịch vi sinh vật có độ đục McFarland 0,5 được trải đều lên đĩa thạch MHA đối với vi khuẩn hay SDA đối với nấm. Mỗi lỗ thạch được nhỏ 50μL cao với các nồng độ khác nhau. Đối chứng (+): đĩa kháng sinh Gentamicin (10μg). Đối chứng (-): DMSO 5%. Các đĩa đã cấy được ủ 24 giờ, ở 37°C. Quan sát vòng kháng vi sinh vật xung quanh giếng thạch để đánh giá sơ bộ khả năng kháng vi sinh vật của cao với các chủng vi sinh vật kiểm định. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi chủng vi sinh vật. Đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo với công thức sau: $A = D - d$ (Akyuz và ctv, 2010).

Trong đó: A: đường kính vùng ức chế

D: đường kính vùng ức chế từ 2 điểm đối xứng nhau trên đường tròn đi qua tâm giếng thạch

d: đường kính giếng thạch

2.3.6.3.5. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch cao chiết CoEAO

Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) được xác định dựa theo cách làm của Hleba và ctv. (2014) có chỉnh sửa. Dịch cao chiết CoEAO

được hòa tan trong DMSO đến nồng độ thấp nhất có thể ức chế hay tiêu diệt VSV mà muốn kiểm tra (Hleba và ctv, 2014; Wayne, 2011). Phương pháp dựa vào sự thay đổi màu của chất chỉ thị resazurin là cơ sở để xác định giá trị MIC và MBC (Ngan và ctv, 2012). Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng, trong mỗi giếng có chứa 50µl cao chiết CoEAO và 50µl dịch vi khuẩn. Còn giếng đối chứng trong đó chứa dịch vi khuẩn, môi trường nuôi cấy và DMSO 10%. Các giếng được ủ ở nhiệt độ 37°C. Sau 24 giờ cho 20 µl dung dịch thuốc thử resazurin 0,01% vào mỗi giếng. Lấy 10 µl dịch ở các giếng không đổi màu cho lên đĩa môi trường LB và ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C để xác định MBC. Điểm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ mẫu thấp nhất mà tại đó màu xanh lam vẫn còn (cho thấy không có sự phát triển) hoặc nồng độ pha loãng đầu tiên mà màu sắc chuyển từ xanh lam sang hơi tím. Tất cả các thử nghiệm được lặp lại ba lần.

2.3.6.4. Đánh giá độc tính dịch chiết đã được tối ưu hóa trên chuột

Chuẩn bị mẫu: cao chiết nấm đã được tối ưu hóa ở mục 2.3.5.5 được đem cô đặc chân không ở nhiệt độ 40°C qua thiết bị cô quay chân không IKA của Đức.

2.3.6.4.1. Đánh giá độc tính cấp

Đánh giá độc tính cấp được thực hiện theo phương pháp Lorke, Miller và cộng sự (Lorke, 1983; Miller và Tainter, 1944) có chỉnh sửa. Quy trình thử độc tính cấp tính trên chuột được tiến hành theo hướng dẫn 423 (2002) của OECD và hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế, Việt Nam.

Thử nghiệm trên chuột Swiss albino và sắp xếp thành 5 nhóm, mỗi nhóm 6 con. Những con chuột đối chứng được cho uống nước lọc (10 ml/kg/trọng lượng cơ thể) (Iserhienrhen và Okolie, 2020), 4 nhóm còn lại được uống cao CoAEO với liều lần lượt là 1000, 3000, 5000 và 7000 mg/kg thể trọng (Saleem và ctv, 2017; Tsai và ctv, 2020). Nước lọc và thuốc thử được đưa vào dạ dày chuột bằng kim cong đầu tù, cho uống liên tục trong một ngày (Kouadio và ctv, 2014). Chuột được ăn thức ăn viên nhân tạo dành cho động vật gặm nhấm - Sản phẩm Pilmico feeds (Pilmico Animal Nutrition JointStock Company). Tất cả chuột sau khi uống thảo dược được phép tiếp

cận tự do với thức ăn và nước uống. Việc quan sát các dấu hiệu nhiễm độc được thực hiện liên tục 1, 2 và 4 giờ sau khi điều trị và định kỳ trong 24 giờ đầu tiên. Tỷ lệ tử vong và các phát hiện trong phòng thí nghiệm bao gồm sự thay đổi về màu sắc của da, mắt, màng nhầy được ghi lại trong vòng 4 giờ đầu tiên. Trong 7 ngày tiếp theo, quan sát tư thế cơ thể, chuyển động, đứng, nằm, chấn động, sự hấp thụ, cơn đau, phản ứng chậm, phản xạ đi lại, hành vi (tiết nước bọt, hôn mê), bất kỳ thương tích hoặc bệnh tật nào, tỷ lệ tử vong v.v. được tiến hành quan sát một lần/ngày trong 14 ngày và được ghi lại cẩn thận. Ngoài ra, chế độ ăn uống cũng được quan sát và ghi chép (Pal và Mishra, 2019). Hàng ngày trong hai tuần sau khi điều trị được quan sát liên tục và ghi chép đầy đủ. Những thay đổi về trọng lượng cơ thể, huyết học, sinh hóa máu, phân tích nước tiểu, trọng lượng cơ quan tương đối, mô học cơ quan đã được ghi nhận trong thời gian thử nghiệm. Theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 14 sau khi uống thuốc thử lần đầu. Vào ngày thứ 15, tất cả các con vật được gây mê bằng hỗn hợp thuốc an thần Xylazil:Ketamil:NaCl theo tỷ lệ 2:3:3 (XKN-2:3:3), với liều 1.67 μ L, các mẫu máu, mẫu mô của tim, gan, thận, lá lách, tuyến ức được thu nhận và gửi đến cơ sở xét nghiệm để phân tích và đọc kết quả. Các khuyến nghị được tuân theo về số lượng và giới tính của động vật được sử dụng (Olaya và ctv, 2010).

2.3.6.4.2. Đánh giá độc tính bán mãn tính

Quy trình thử độc tính bán mãn tính trên chuột được tiến hành theo hướng dẫn 408 (2018) của tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (OECD) về thử nghiệm hóa chất (Kim và ctv, 2008), hướng dẫn của tổ chức Y tế Thế giới (WHO) (Organization, 2000) và Hướng dẫn thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng thuốc đông y, thuốc từ dược liệu theo quyết định số 141/QĐ-K2ĐT ngày 27/10/2015 của Cục trưởng Cục Khoa học Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế, Việt Nam (OECD, 2001a). Nghiên cứu bán mãn tính với các liều uống cao CoAEO được lặp lại hàng ngày trong 90 ngày. 30 con chuột được phân phối ngẫu nhiên thành 5 nhóm (6 con/nhóm). Mỗi nhóm nhận được liều uống cao CoAEO tương ứng là 100, 200, 300 và 400 mg/kg w.b, nhóm đối chứng nhận nước lọc (5 ml /kg w.b) (Chen và ctv, 2018). Tất cả động vật được cân khi bắt đầu điều trị và mỗi tuần một lần. Các phép đo mức tiêu thụ thực phẩm và nước

uống đã được thực hiện hàng tuần. Bất kỳ dấu hiệu nhiễm độc và tử vong cũng được ghi hàng ngày trong suốt thời gian nghiên cứu (Park và ctv, 2014). Vào cuối cuộc thử nghiệm (ngày thứ 90), tất cả những con chuột đều được gây mê khi hít phải chloroform. Mẫu máu được thu thập bằng cách lấy máu đuôi, chứa vào ống EDTA, ống lấy huyết thanh và ống NaF (xét nghiệm huyết học và sinh hóa). Sau khi lấy máu, những con vật đã bị gây mê và phẫu thuật, nội tạng của chúng đã bị cô lập. Tim, gan, thận, lá lách và tuyến ức đã được cắt bỏ, cân để xác định trọng lượng nội tạng tương đối và được kiểm tra vĩ mô bất kỳ tổn thương tổng thể nào. Trọng lượng cơ quan tương đối của các cơ quan bị cắt bỏ đã được xác định. Tim, gan, thận, lá lách và tuyến ức sau đó được cố định trong dung dịch đệm formaldehyde 10% để kiểm tra mô học (Pongri và Igbe, 2017).

2.3.7. Nghiên cứu ứng dụng tạo sản phẩm bột theo phương pháp sấy phun

2.3.7.1. Chuẩn bị dịch chiết sấy phun

Chuẩn bị cao chiết: Dịch chiết nấm đã được tối ưu hóa ở mục 2.3.5.5 được đem cô đặc chân không ở nhiệt độ 40⁰C qua thiết bị cô quay chân không IKA của Đức để thu được cao chiết có hàm lượng chất tan (Bx) 8%. Sau đó định mức và bổ sung chất mang gồm hỗn hợp (maltodextrin: gum arabic: gelatin). Mẫu trước khi sấy phun được đồng hóa và xác định hàm lượng TPC, TFC, TTA và khả năng khử gốc tự do RSA. Độ nhớt của dịch sấy phun ở nhiệt độ 28⁰C, spindles số 6, tốc độ quay spindles 100 vòng/phút, độ nhớt dịch 1,72cP được đo bởi thiết bị Brookfield (model DIGITAL DV – III Ultra Rheometer) của Mỹ.

2.3.7.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp chất mang đến độ nhớt dịch sấy phun, hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm bột và thời gian hòa tan của sản phẩm bột.

Mục đích của khảo sát này để tìm ra tỷ lệ phối trộn hỗn hợp các chất mang (maltodextrin: gum arabic: gelatin) phù hợp cho quá trình sấy phun dịch trích ly nấm *Coriolopsis aspera*.

Dựa vào nghiên cứu của nhóm tác giả Rajabi và ctv. (2015) để lựa chọn tỷ lệ các chất maltodextrin, gum arabic và gelatin để sấy phun (Rajabi và ctv, 2015). Chúng tôi triển khai các tỷ lệ lân cận để khảo sát.

Tỷ lệ các chất mang khảo sát: 88:11:1; 90:9:1; 92:7:1; 94:5:1 dựa trên cơ sở là thay đổi hàm lượng maltodextrin và gum arabic. Và tỷ lệ 94:4:2; 94:3:3; 94:2:4; 94:1:5 dựa trên cơ sở cố định hàm lượng maltodextrin, thay đổi gum arabic và gelatin. Dịch đem sấy có hàm lượng chất mang 20%. Dịch trích ly nấm có hàm lượng chất tan 4%. Hàm mục tiêu là độ nhớt (cP), hiệu suất thu hồi bột (%), độ ẩm của bột sau sấy (%), thời gian (phút) hòa tan bột sau sấy phun. Trong đó hiệu suất thu hồi bột được tính theo phần trăm hao hụt chất khô trước và sau quá trình sấy.

Hiệu suất thu hồi bột (%) hay hiệu suất vi bao được tính theo công thức:

$$\% \text{ Hiệu suất thu hồi bột} = \frac{\text{Tổng hàm lượng bột khô thu được}}{\text{Tổng hàm lượng chất khô đem sấy}} \times 100 \text{ (Roccia và ctv,}$$

2014)

2.3.7.3. Tối ưu hóa quá trình sấy phun

Chất mang là hỗn hợp maltodextrin: gum arabic:gelatin phối theo tỷ lệ đã được khảo sát ở mục 2.3.7.2.

Bước 1: Khảo sát yếu tố độc lập để tìm mức giới hạn trên và mức giới hạn dưới của các yếu tố như X_1 : nhiệt độ đầu vào (°C), X_2 : hàm lượng chất mang (%), X_3 : lưu lượng nạp liệu (phút) ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y_1 : hiệu suất (%), Y_2 : độ ẩm bột (%), Y_3 : khả năng kháng oxy hóa (mgVitC/g).

Bước 2: Lựa chọn mô hình toán học Box-Bohnken để thực hiện tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Sử dụng phần mềm JMP 10.0.0 để phân tích dữ liệu.

Bước 3: Kiểm chứng thực nghiệm.

2.3.7.4. Đánh giá một số chỉ tiêu của bột CoEAO hòa tan

2.3.7.4.1. Tỷ trọng của bột CoEAO

Tỷ trọng của bột được tính theo công thức

$$d = P / P_1$$

Trong đó: d là tỷ trọng của bột CoEAO, P khối lượng riêng của bột, P1 khối lượng riêng của nước

2.3.7.4.2. Khả năng hòa tan bột trong nước

Khả năng hòa tan của bột sấy phun dựa theo cách tính của (Behboudi và ctv, 2013) có sửa đổi. Một gram bột được thêm vào 50mL nước cất và dùng máy khuấy từ (Ika GmbH, Đức) tại 892 vòng / phút sử dụng cá từ 2 mmx7mm. Xác định thời gian hòa tan.

2.3.7.4.3. Khả năng thấm ướt của bột

Tham số này được tính dựa theo phương pháp của Freudig và ctv. (1999) có thay đổi. Cho 1g bột CoEAO vào phễu thủy tinh đổ từ trên cao vào 100ml nước cất được chứa trong cốc (250ml) ở nhiệt độ phòng. Sau đó, đợi toàn bộ khối lượng bột chìm ở dưới mặt nước và ghi lại thời gian (giây).

2.3.7.4.4. Hình dạng của bột CoEAO hòa tan

Xác định hình dạng của bột CoEAO theo phương pháp chụp SEM

2.3.7.5. Xác định thời gian bảo quản sản phẩm bột sấy phun

Sử dụng mô hình Q10 theo cách làm của nhóm tác giả (Minh và ctv, 2013).

Thông số thí nghiệm:

-Kiểm tra khả năng khử gốc tự do RSA và TTC khi bắt đầu, sau 1 ngày, 2 ngày, ... vv cho đến khi RSA và TTC giảm > 80% so với bắt đầu ở nhiệt độ 50°C, 60°C để xác định thời gian bảo quản thực sự.

Thông số cố định:

- Bảo quản nhiệt độ: 50°C, 60°C.

- Độ ẩm của môi trường cố định 85%.

- Đóng gói: mẫu được đóng gói trong túi PE (kích thước 4cmx6,5cm) có ziplock đáy phẳng có ghép mí và bao bởi túi PE lớn (kích thước 15cmx 20cm) có ziplock đáy phẳng.

Hàm mục tiêu:

- Khả năng khử gốc tự do RSA (%), hàm lượng triterpene tổng TTC (%).

Áp dụng phương trình của Labuza đã phát triển $F_2 = f_1 \times Q_{10}^{\Delta/10}$

Trong đó: f_1 là thời gian giữa các lần kiểm tra ở nhiệt độ cao hơn, f_2 ở nhiệt độ thấp hơn và " Δ " là sự khác biệt về độ C giữa hai nhiệt độ trên.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

- Sử dụng phần mềm GMP10.0.0 để thiết kế thí nghiệm tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt.
- Sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XV để phân tích phương sai (Anova) và độ lệch chuẩn.
- Sử dụng phần mềm Microsoft Excel để vẽ đồ thị.

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xử lý mẫu

Kết quả thực hiện khảo sát sơ bộ các phương pháp xử lý mẫu

Phương pháp siêu âm:

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.1 khảo sát thông số công suất siêu âm xử lý mẫu. Nhận thấy với công suất siêu âm 375W, hàm lượng trích ly TPC, TFC, TTC và RSA cao nhất và khi tăng công suất siêu âm lên cao hơn 375W thì nhận thấy hàm lượng các chất chiết như TPC, TFC, TTC không có dấu hiệu tăng lên. Điều đó cho thấy công suất siêu âm có ảnh hưởng đến quá trình trích ly các chất hoạt tính sinh học. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chavan và ctv. (2013) trên đối tượng nấm *Trametes orientalis* (Chavan và ctv, 2013).

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát công suất siêu âm xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu	Công suất siêu âm (W)						
	Mo	150	225	300	375	450	525
TPC ¹	1,12 ±0,01 ^a	2,60 ±0,01 ^b	2,70 ±0,01 ^c	2,81 ±0,01 ^d	3,13 ±0,01 ^e	3,14 ±0,03 ^e	3,15 ±0,01 ^e
TFC ²	0,15 ±0,01 ^a	0,18 ±0,01 ^b	0,21 ±0,02 ^c	0,23 ±0,01 ^d	0,26 ±0,02 ^e	0,27 ±0,01 ^e	0,27 ±0,01 ^e
TTC ³	0,11 ±0,02 ^a	0,36 ±0,01 ^b	0,48 ±0,01 ^c	0,49 ±0,01 ^c	0,54 ±0,01 ^d	0,54 ±0,02 ^d	0,55 ±0,01 ^d
RSA ⁴	0,37 ±0,02 ^a	1,52 ±0,05 ^b	1,61 ±0,01 ^c	1,68 ±0,01 ^c	1,71 ±0,03 ^d	1,71 ±0,01 ^d	1,71 ±0,01 ^d

• Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

• ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.2 khảo sát thông số thời gian siêu âm mẫu nấm nguyên liệu cho thấy thời gian siêu âm mẫu trong 30 phút, sau đó trích ly thu được các chất chiết có hoạt tính sinh học TPC, TFC, TTC và RSA cao nhất. Nhưng khi tăng thời gian siêu âm trên 35 phút thì hàm lượng các chất chiết và RSA không thấy tăng thêm. Như vậy cho thấy thời gian siêu âm nguyên liệu nấm có ảnh hưởng đến hàm lượng các chất chiết trong dịch chiết trong nấm *Coriolopsis aspera*. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chavan và ctv. (2013) trên đối tượng nấm *Trametes orientalis*. Trong hai thí nghiệm trên đã lựa chọn được mẫu xử lý M1 có thông số

công suất siêu âm 375W và thời gian siêu âm 30 phút sẽ cho hàm lượng các chất chiết có hoạt tính sinh học TPC, TFC, TTC và RSA cao nhất.

Bảng 3. 2. Khảo sát thời gian siêu âm xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu	Thời gian siêu âm (phút)							
	M ₀	5	10	15	20	25	30	35
TPC ¹	1,19 ±0,02 ^a	2,12 ±0,01 ^b	2,13 ±0,01 ^b	2,26 ±0,01 ^c	2,31 ±0,04 ^d	3,35 ±0,01 ^e	3,41 ±0,03 ^f	3,42 ±0,02 ^f
TFC ²	0,08 ±0,01 ^a	0,12 ±0,02 ^b	0,26 ±0,02 ^c	0,26 ±0,01 ^c	0,26 ±0,01 ^c	0,27 ±0,01 ^c	0,30 ±0,01 ^d	0,30 ±0,02 ^d
TTC ³	0,17 ±0,02 ^a	0,31 ±0,01 ^b	0,54 ±0,01 ^c	0,54 ±0,01 ^c	0,55 ±0,02 ^c	0,59 ±0,02 ^e	0,66 ±0,02 ^f	0,66 ±0,01 ^f
RSA ⁴	0,40 ±0,02 ^a	1,58 ±0,01 ^b	1,71 ±0,03 ^c	2,28 ±0,02 ^d	2,37 ±0,02 ^e	2,38 ±0,01 ^e	2,43 ±0,02 ^f	2,44 ±0,02 ^f

- Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e,f,g) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.
- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Phương pháp vi sóng:

Theo kết quả ở Bảng 3.3 khảo sát thông số công suất vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu cho thấy công suất vi sóng 130W sẽ trích ly hàm lượng các chất hoạt tính cao. Khi tăng công suất vi sóng cao hơn 130W thì thấy hàm lượng các chất trích ly không tăng và có dấu hiệu ổn định. Điều đó cho thấy công suất vi sóng có ảnh hưởng nhiều đến quá trình trích ly các chất hoạt tính sinh học. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Maeng và ctv. (2017) và Chan và ctv. (2014) (Chan và ctv, 2014; Maeng và ctv, 2017).

Bảng 3. 3. Kết quả khảo sát công suất vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Công suất vi sóng (W)				
	M ₀	110	120	130	140
TPC ¹	1,12 ±0,01 ^a	1,73 ±0,03 ^b	1,96 ±0,02 ^c	2,08 ±0,01 ^d	2,10 ±0,01 ^d
TFC ²	0,05 ±0,01 ^a	0,19 ±0,02 ^b	0,24 ±0,01 ^c	0,27 ±0,02 ^d	0,28 ±0,01 ^d
TTC ³	0,11 ±0,02 ^a	0,39 ±0,02 ^b	0,47 ±0,03 ^c	0,57 ±0,03 ^d	0,59 ±0,01 ^d
RSA ⁴	0,37 ±0,02 ^a	1,89 ±0,04 ^b	2,02 ±0,01 ^c	2,10 ±0,02 ^d	2,18 ±0,02 ^d

- Các giá trị được thể hiện \pm SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: μ g acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả khảo sát thời gian vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu ở Bảng 3.4 cho thấy trong thời gian 15 phút hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA cao nhất và khi tăng thời gian thực hiện vi sóng thì hàm lượng các chất hoạt tính sinh học ổn định không tăng nữa. Điều đó cho thấy thời gian vi sóng có ảnh hưởng đến hàm lượng các chất chiết có hoạt tính sinh học và RSA trong nấm. Kết quả này phù hợp với công trình nghiên cứu của Jing và ctv. (2010) trên nấm *Ganoderma lucidum* (Jing và ctv, 2010). Trong hai thí nghiệm trên đã lựa chọn được mẫu xử lý M2 với các thông số như công suất vi sóng 130W và thời gian vi sóng 15 phút.

Bảng 3. 4. Kết quả khảo sát thời gian vi sóng xử lý mẫu nấm nguyên liệu

C hỉ tiêu xác định	Thời gian vi sóng (phút)					
	M ₀	5	10	15	20	25
TPC ¹	1,13 $\pm 0,04^a$	2,0 $\pm 0,01^b$	2,08 $\pm 0,01^c$	3,17 $\pm 0,01^d$	3,17 $\pm 0,03^d$	3,19 $\pm 0,02^d$
TFC ²	0,06 $\pm 0,01^a$	0,19 $\pm 0,01^b$	0,27 $\pm 0,02^c$	0,29 $\pm 0,01^c$	0,29 $\pm 0,01^c$	0,30 $\pm 0,02^c$
TTC ³	0,12 $\pm 0,02^a$	0,46 $\pm 0,01^b$	0,57 $\pm 0,03^c$	0,66 $\pm 0,02^d$	0,66 $\pm 0,01^d$	0,67 $\pm 0,01^d$
RSA ⁴	0,38 $\pm 0,03^a$	1,65 $\pm 0,01^b$	2,10 $\pm 0,02^c$	2,21 $\pm 0,01^d$	2,21 $\pm 0,02^d$	2,22 $\pm 0,01^d$

- Các giá trị được thể hiện \pm SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: μ g acid ascorbic/g DW.

Phương pháp đun nước nóng:

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.5 khảo sát thông số nhiệt độ đun để xử lý mẫu cho thấy ở nhiệt độ 100°C cho được hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA cao nhất. Khi tăng nhiệt độ hơn 100°C thì hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA ổn định không tăng nữa. Điều đó cho thấy nhiệt độ xử lý mẫu có ảnh hưởng đến quá trình trích ly. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wang và ctv. (2014) trên đối tượng nấm vân chi *Trametes robiniophila* (Wang và ctv, 2014).

Bảng 3. 5. Kết quả khảo sát nhiệt độ đun phá mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Nhiệt độ đun (°C)				
	Mo	70	80	90	100
TPC ¹	1,12 ±0,01 ^a	1,55 ±0,01 ^b	1,66 ±0,01 ^c	1,81 ±0,02 ^d	2,08 ±0,01 ^e
TFC ²	0,05 ±0,01 ^a	0,08 ±0,01 ^b	0,12 ±0,01 ^c	0,16 ±0,01 ^d	0,19 ±0,02 ^e
TTC ³	0,11 ±0,02 ^a	0,23 ±0,01 ^b	0,31 ±0,02 ^c	0,31 ±0,01 ^c	0,36 ±0,01 ^d
RSA ⁴	0,37 ±0,02 ^a	1,04 ±0,02 ^b	1,14 ±0,01 ^c	1,28 ±0,02 ^d	1,34 ±0,02 ^e

• Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

• ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả ở Bảng 3.6 khảo sát thời gian đun phá mẫu nấm nguyên liệu cho thấy thời gian 15 phút cho được kết quả hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA cao nhất. Khi tăng thời gian nữa thì hàm lượng các chất chiết và RSA ổn định. Điều đó cho thấy thời gian đun mẫu có ảnh hưởng tới quá trình trích ly hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Salamatullah và ctv. (2021) (Salamatullah và ctv, 2021). Trong hai thí nghiệm trên chọn được mẫu xử lý M3 với các thông số như nhiệt độ đun 100°C và thời gian 15 phút.

Bảng 3. 6. Kết quả khảo sát thời gian đun phá mẫu xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Thời gian đun mẫu (phút)				
	Mo	5	10	15	20
TPC ¹	1,13 ±0,04 ^a	1,43 ±0,01 ^b	2,08 ±0,02 ^e	2,35 ±0,01 ^d	2,37 ±0,01 ^d
TFC ²	0,06 ±0,01 ^a	0,09 ±0,02 ^b	0,19 ±0,01 ^{de}	0,24 ±0,02 ^c	0,25 ±0,01 ^c
TTC ³	0,12 ±0,02 ^a	0,24 ±0,02 ^b	0,34 ±0,01 ^d	0,38 ±0,01 ^c	0,39 ±0,01 ^c
RSA ⁴	0,38 ±0,03 ^a	1,20 ±0,01 ^b	1,34 ±0,01 ^e	1,51 ±0,01 ^c	1,52 ±0,02 ^c

• Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Phương pháp kết hợp hóa học và siêu âm:

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.7 khảo sát thông số nồng độ NaOH xử lý mẫu nấm nguyên liệu cho thấy ở nồng độ NaOH 5%, dịch trích ly nguyên liệu có hàm lượng chất hoạt tính sinh học cao nhất. Khi tăng nồng độ NaOH cao hơn 5% thì hàm lượng các chất trích ly ổn định không tăng thêm. Điều đó cho thấy rằng nồng độ NaOH có ảnh hưởng đến quá trình xử lý mẫu, dẫn đến quá trình lý ly thay đổi. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ospina Álvarez và ctv. (2014) trên đối tượng nấm *Ganoderma lucidum* (Ospina Álvarez và ctv, 2014).

Bảng 3. 7. Kết quả khảo sát nồng độ NaOH (%) xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Nồng độ NaOH (%)				
	M ₀	3	5	7	9
TPC ¹	1,19 ±0,02 ^a	2,19 ±0,01 ^b	2,48 ±0,01 ^c	2,49 ±0,01 ^c	2,49 ±0,02 ^c
TFC ²	0,08 ±0,01 ^a	0,16 ±0,01 ^b	0,21 ±0,02 ^c	0,22 ±0,02 ^c	0,22 ±0,01 ^c
TTC ³	0,17 ±0,02 ^a	0,53 ±0,01 ^b	0,88 ±0,02 ^c	0,89 ±0,02 ^c	0,90 ±0,02 ^c
RSA ⁴	0,40 ±0,02 ^a	1,23 ±0,01 ^b	2,15 ±0,01 ^c	2,15 ±0,02 ^c	2,16 ±0,02 ^c

- Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.
- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.8 khảo sát thời gian siêu âm sau khi sử dụng NaOH xử lý mẫu nấm nguyên liệu cho thấy thời gian siêu âm 15 phút hàm lượng các chất hoạt tính sinh học trích ly cao nhất. Khi tăng thời gian lên 20 phút thì hàm lượng các chất chiết ổn định không tăng nữa. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Chavan và ctv. (2013 và Benito-Román và ctv. (2013) (Benito-Román và ctv, 2013). Trong hai thí nghiệm trên chọn được mẫu xử lý M4 với các thông số như nồng độ NaOH 5% và thời gian siêu âm 15 phút.

Bảng 3. 8. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm sau khi sử dụng NaOH xử lý mẫu nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Thời gian siêu âm (phút)				
	M ₀	5	10	15	20
TPC ¹	1,19 ±0,02 ^a	2,12 ±0,03 ^b	2,22 ±0,02 ^c	2,48 ±0,01 ^d	2,49 ±0,01 ^d
TFC ²	0,08 ±0,01 ^a	0,11 ±0,01 ^b	0,17 ±0,02 ^c	0,21 ±0,01 ^d	0,22 ±0,01 ^d
TTC ³	0,17 ±0,02 ^a	0,22 ±0,02 ^b	0,61 ±0,01 ^c	0,88 ±0,02 ^d	0,89 ±0,01 ^d
RSA ⁴	0,40 ±0,02 ^a	1,29 ±0,01 ^b	1,46 ±0,02 ^c	2,15 ±0,02 ^d	2,15 ±0,01 ^d

- Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.
- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: µg acid ascorbic/g DW.

Phương pháp kết hợp nitor lỏng và siêu âm:

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.9 về khảo sát thông số tỷ lệ nitor lỏng so với nấm nguyên liệu cho thấy với tỷ lệ 6:1 hiệu quả xử lý mẫu tốt và thu hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA cao. Khi tăng tỷ lệ lên 8:1 thì thấy hàm lượng các chất chiết ổn định không tăng nữa. Điều đó cho thấy tỷ lệ nitor lỏng so với nguyên liệu có ảnh hưởng đến hàm lượng các chất chiết và RSA. Kết quả này phù hợp với nhận định của Macrae và Elspeth. (2007) về tỷ lệ nitor so với nguyên liệu (Macrae và Elspeth, 2007).

Bảng 3. 9. Kết quả khảo sát tỷ lệ nitor lỏng với nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Tỷ lệ nitor : nguyên liệu (w:w)				
	M ₀	2:1	4:1	6:1	8:1
TPC ¹	1,13 ±0,04 ^a	2,43 ±0,02 ^b	3,59 ±0,01 ^c	4,69 ±0,02 ^d	4,72 ±0,01 ^d
TFC ²	0,06 ±0,01 ^a	0,39 ±0,01 ^b	0,61 ±0,03 ^c	0,88 ±0,01 ^d	0,89 ±0,01 ^d
TTC ³	0,12 ±0,02 ^a	0,56 ±0,01 ^b	0,82 ±0,02 ^c	1,18 ±0,01 ^d	1,19 ±0,01 ^d
RSA ⁴	0,38 ±0,03 ^a	2,96 ±0,02 ^b	3,18 ±0,02 ^c	3,48 ±0,01 ^d	3,49 ±0,01 ^d

- Các giá trị được thể hiện \pm SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.
- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: μ g acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả thí nghiệm ở Bảng 3.10 về khảo sát thời gian siêu âm sau khi xử lý nitơ lỏng cho thấy siêu âm trong 15 phút hàm lượng các chất hoạt tính sinh học và RSA cao nhất và ổn định khi thời gian siêu âm ở 20 phút. Điều đó cho thấy rằng thời gian siêu âm của mẫu sau khi xử lý nitơ lỏng có ảnh hưởng đến quá trình trích ly các chất hoạt tính sinh học và RSA. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zheng và ctv. (2014) trên đối tượng là nấm *Trametes orientalis* (Zheng và ctv, 2014). Trong hai thí nghiệm trên chọn được mẫu xử lý M5 với các thông số như tỷ lệ nitơ lỏng so với nguyên liệu 6:1 và thời gian siêu âm 15 phút.

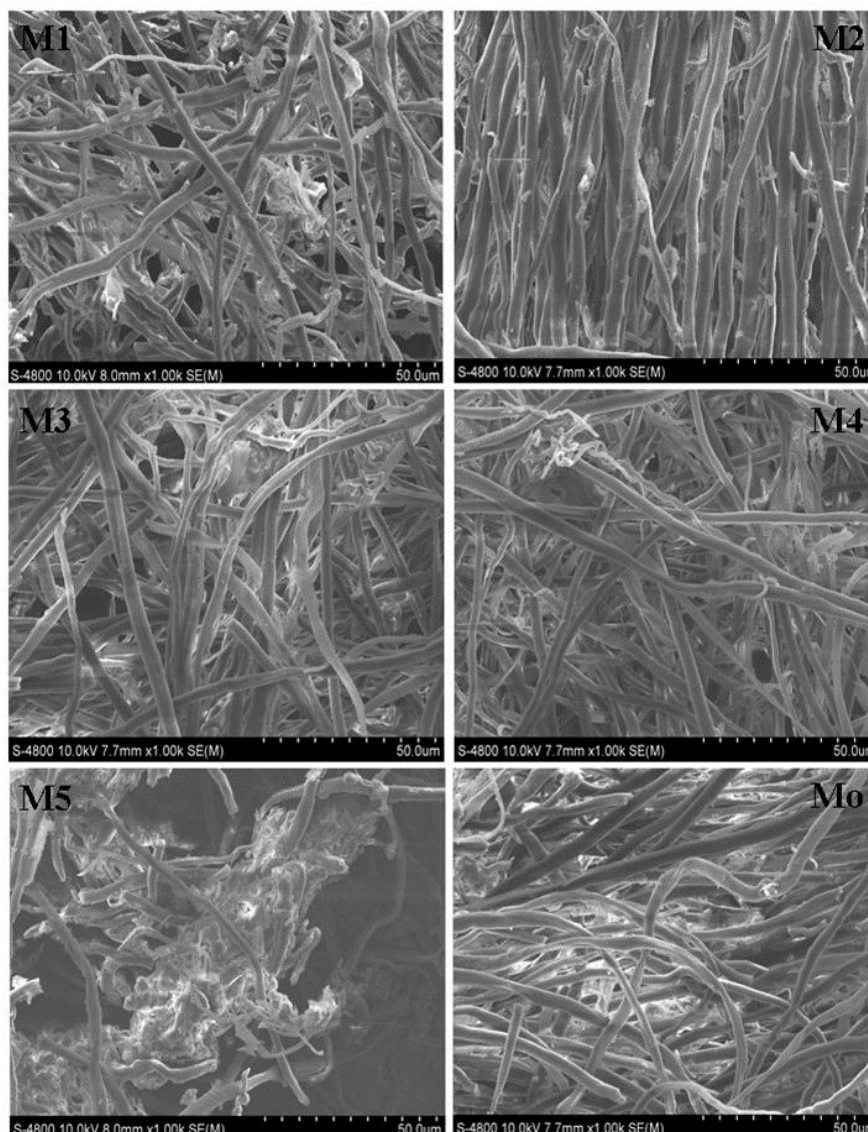
Bảng 3. 10. Kết quả khảo sát thời gian siêu âm sau khi xử lý nitơ lỏng nấm nguyên liệu

Chỉ tiêu xác định	Thời gian siêu âm (phút)				
	M ₀	5	10	15	20
TPC ¹	1,13 $\pm 0,04^a$	3,10 $\pm 0,02^b$	4,01 $\pm 0,01^c$	4,69 $\pm 0,02^d$	4,71 $\pm 0,01^d$
TFC ²	0,06 $\pm 0,01^a$	0,38 $\pm 0,01^b$	0,64 $\pm 0,02^c$	0,88 $\pm 0,01^d$	0,87 $\pm 0,01^d$
TTC ³	0,12 $\pm 0,02^a$	0,60 $\pm 0,02^b$	0,96 $\pm 0,01^c$	1,28 $\pm 0,01^d$	1,29 $\pm 0,01^d$
RSA ⁴	0,38 $\pm 0,03^a$	2,91 $\pm 0,02^b$	3,24 $\pm 0,02^c$	3,48 $\pm 0,01^d$	3,48 $\pm 0,02^d$

- Các giá trị được thể hiện \pm SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.
- ¹TPC: mgGAE/gDW, ²TFC: mgQE/gDW, ³TTC: mgOAE/gDW, ⁴RSA: μ g acid ascorbic/g DW.

Theo kết quả thống kê ở PLF2 ở các mẫu M₀, M₁, M₂, M₃, M₄, M₅ cho thấy mẫu M₅ dịch trích ly các chất chiết TPC, TFC, TTC và RSA cao hơn mẫu đối chứng và các mẫu khác. Còn mẫu M₀ chưa xử lý thì cho kết quả thấp nhất. Từ kết quả chụp SEM ở Hình 3.1 cho thấy các mẫu có xử lý siêu âm M₁, có xử lý vi sóng M₂, xử lý nhiệt độ đun sôi M₃, xử lý hóa chất NaOH và siêu âm M₄ so với mẫu không xử lý để đối chứng M₀ thì không thấy có sự phá vỡ tế bào mô của sợi tơ nấm. Còn đối với mẫu có xử lý nitơ lỏng và siêu âm để hỗ trợ phá vỡ tế bào M₅ thì thấy tỷ lệ sợi tơ nấm bị

phá vỡ nhiều hơn so với mẫu đối chứng M₀ và các mẫu thí nghiệm khác. Khi cho nito lỏng vào mẫu nguyên liệu có độ ẩm khoảng 6% thì lượng nước có trong tế bào sợi nấm sẽ bị đông đá và dưới tác dụng nghiền sẽ làm phá vỡ dễ dàng tế bào sợi nấm sau đó cộng với tác dụng siêu âm làm tăng tế bào bị phá vỡ. Điều đó dẫn đến làm tăng hiệu quả trích ly các thành phần có hoạt tính trong nguyên liệu nấm *Coriolopsis aspera* của mẫu M5. Cho tới hiện nay chưa thấy báo cáo nghiên cứu về phương pháp phá vỡ tế bào mô nấm *Coriolopsis aspera*. Nhưng bên cạnh đó có một số công trình nghiên cứu của Fu và ctv. (2009) phá vỡ bào tử của nấm *Ganoderma lucidum* cho thấy bào tử muốn được phá vỡ thì cần áp suất cao từ 30-35MPa từ 2-4 giờ (Fu và ctv, 2009). Điều đó có thể nhận định rằng kết quả xử lý mẫu M5 đạt hiệu quả cao đối với các sợi tơ nấm.



Hình 3. 1. Sợi tế bào nấm vân chi *Coriopsis aspera* qua chụp SEM

3.2. Điều kiện trích ly

3.2.1. Ảnh hưởng loại dung môi để trích ly các hợp chất có HTSH

Mẫu nguyên liệu sau khi được xử lý phá mẫu (M5) đã được đem nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng loại dung môi trích ly các hợp chất có hoạt tính sinh học.

Theo kết quả phân tích ở Bảng 3.11 khảo sát ảnh hưởng các loại dung môi đến các chất hoạt tính sinh học cho thấy với 3 loại dung môi aceton, methanol, ethanol thì sẽ trích ly hàm lượng TPC, TFC với hàm lượng cao và khả năng chống oxy hóa RSA cao. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Arya và ctv. (2022) (Arya và ctv, 2022). Còn riêng đối với hàm lượng TTC thì 2 dung môi methanol và ethanol trích ly với

hàm lượng cao. Kết quả này tương đối phù hợp với kết quả nghiên cứu của Abugria và ctv. (2013) trên đối tượng nấm vân chi *Trametes versicolor*. Mục đích hướng tới trích ly hàm lượng TTC cao, ít độc hại và có thể ứng dụng an toàn trong lĩnh vực thực phẩm do đó lựa chọn dung môi ethanol để trích ly các hoạt chất sinh học như TPC, TFC, TTC là phù hợp .

Bảng 3. 11. Kết quả khảo sát ảnh hưởng các loại dung môi đến các chất hoạt tính sinh học (HTSH)

Hàm mục tiêu	Loại dung môi		
	Aceton	Methanol	Ethanol
TPC (mg GAE/gDW)	6,70±0,30 ^a	7,23±0,14 ^b	7,34±0,23 ^b
TFC (mg QE/gDW)	1,34±0,02 ^a	1,42±0,04 ^b	1,48±0,01 ^b
TTC (mg OAE/gDW)	1,75±0,01 ^a	2,10±0,03 ^b	2,13±0,04 ^b
RSA (µg acid ascorbic/ g DW)	4,01±0,07 ^a	5,62±0,12 ^b	5,83±0,11 ^b

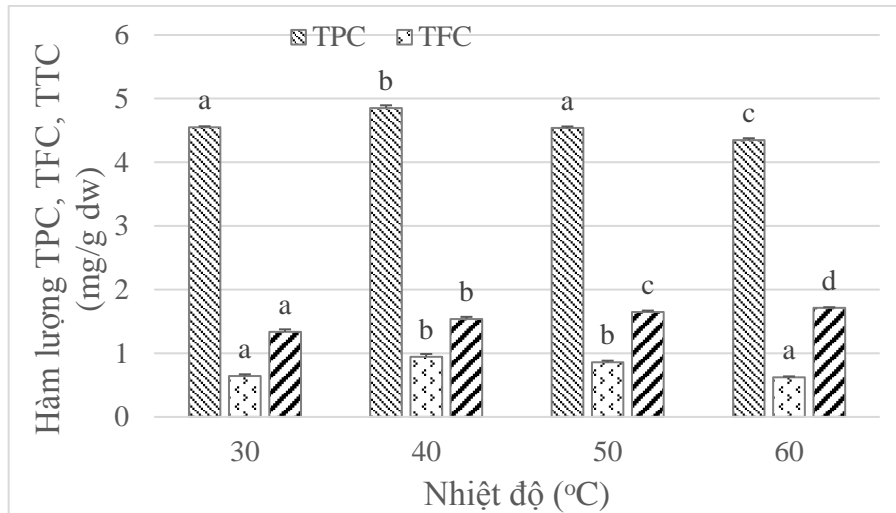
Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b) trong cùng một hàng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

3.2.2. Tối ưu hóa trong công đoạn trích ly TPC, TFC và TTC.

3.2.2.1. Thí nghiệm một yếu tố

Thực nghiệm một yếu tố độc lập để tìm mức trên và mức dưới của thông số nhiệt độ, tỷ lệ dung môi với nguyên liệu, thời gian và nồng độ dung môi trích ly. Sau đó thực hiện phương pháp đáp ứng bề mặt để tối ưu hóa các yếu tố và hàm mục tiêu.

- Ảnh hưởng nhiệt độ trích ly đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

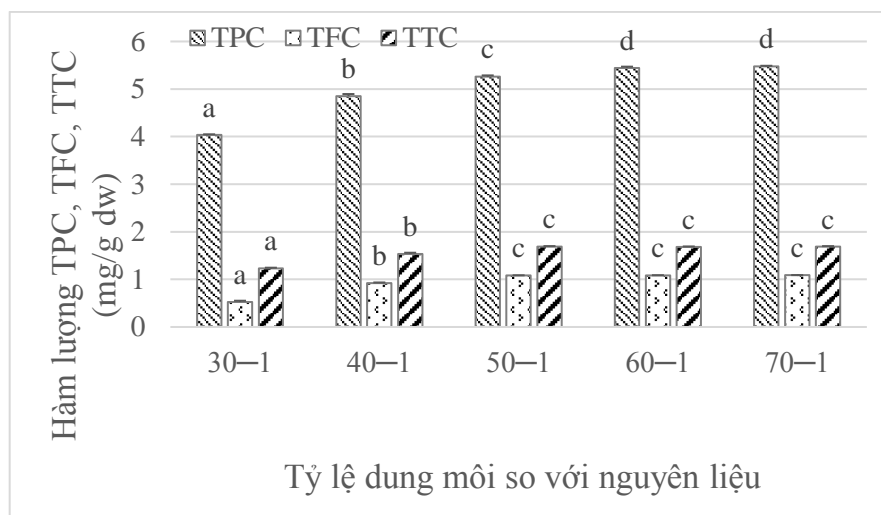


Hình 3. 2. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD ($n = 3$), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét ở Hình 3.2 ảnh hưởng nhiệt độ đến hàm lượng TPC, TFC, TTC trích ly cho thấy hàm lượng TPC và TFC cao ở nhiệt độ trích ly 40°C và sau đó có dấu hiệu giảm xuống đến nhiệt độ trích ly 60°C. Nguyên nhân do hợp chất polyphenol và flavonoid nhạy cảm với nhiệt độ, trong khi đó đối với hàm lượng TTC thì có dấu hiệu tăng là do TTC khả năng chịu nhiệt cao hơn so với hợp chất phenolic. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Yim và ctv. (2012) về trích ly hàm lượng TPC trên nấm phá gỗ *Pleurotus porrigens* (Yim và ctv, 2012). Để lựa chọn nhiệt độ cho thí nghiệm kế tiếp, chúng tôi chọn nhiệt độ 40°C để khảo sát với lý do giảm năng lượng xử lý, hạn chế giảm hàm lượng các hoạt chất tự nhiên và bay hơi dung môi trích ly.

- Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi với nguyên liệu đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

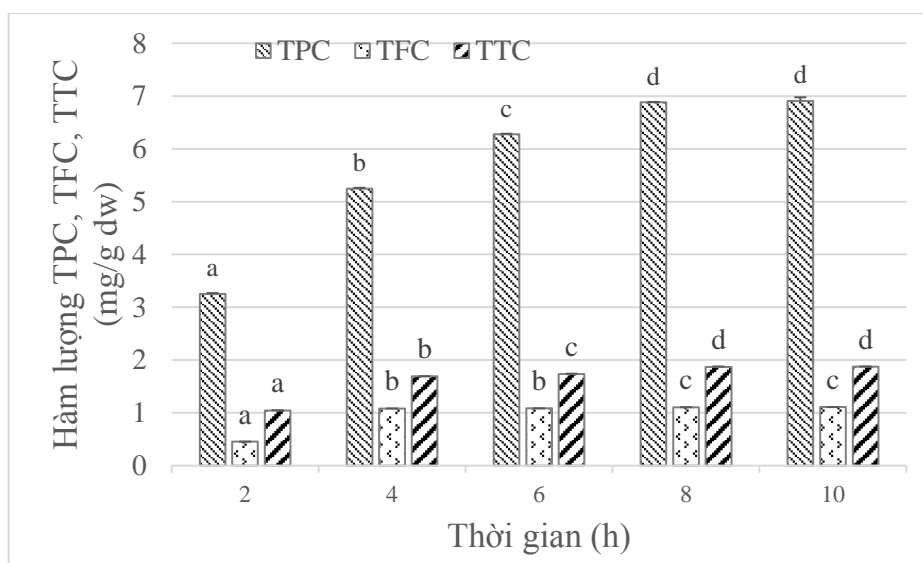


Hình 3. 3. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu đến hàm lượng TPC, TFC, TTC trích ly

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD ($n = 3$), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét ở Hình 3.3 ảnh hưởng tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu đến hàm lượng TPC, TFC, TTC trích ly là khi tăng tỷ lệ dung môi với nguyên liệu đến 60-1 thì hàm lượng TPC đạt giá trị cao nhất. Còn riêng đối với hàm lượng TFC và TTC trích ly ở tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu từ 50-1 thì đạt giá trị cao nhất. Điều đó có thể giải thích tỷ lệ dung môi với nguyên liệu có ảnh hưởng đến hàm lượng trích ly các chất polyphenol tổng số, flavonoid tổng số và triterpene tổng số. Khi lượng dung môi trích ly nhiều thì có sự chênh lệch gradien nồng độ các hợp chất tự nhiên có trong nấm vân chi sẽ khếch tán vào dung môi, theo nhận định của Mandal và ctv. (2010) thì tỷ lệ dung môi và nguyên liệu thích hợp sẽ kích thích làm tăng tốc độ truyền khối, nếu tỷ lệ thấp sẽ làm giảm tốc độ truyền khối còn cao quá thì sẽ làm lãng phí dung môi và sẽ có công đoạn cô đặc ở công đoạn phía sau (Mandal và ctv, 2010; Shen và ctv, 2020). Kết quả này phù hợp với công trình nghiên cứu của Bach và ctv. (2019) trên đối tượng là nấm *Agaricus bisporus* với dung môi trích ly là ethanol (Bach và ctv, 2019). Trong trường hợp tỷ lệ dung môi với nguyên liệu từ 50-1 đến 70-1 hàm lượng TFC và TTC không thay đổi có thể là do một số nguyên nhân như sau: trường hợp thứ nhất là các hợp chất trích ly đạt trạng thái cân bằng về nồng độ, trường hợp thứ hai là thời gian trích ly chưa đủ. Chính vì vậy khảo sát sự ảnh hưởng của yếu tố thời gian và chọn tỷ lệ dung môi với nguyên liệu 50-1 cho lần khảo sát tiếp theo.

- Ảnh hưởng thời gian đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

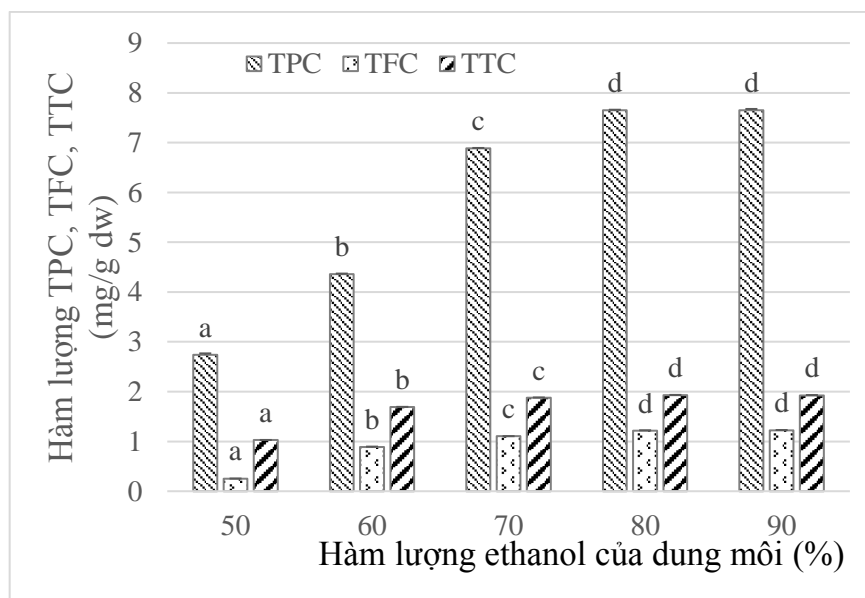


Hình 3. 4. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD ($n = 3$), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét ở Hình 3.4 ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng TPC, TFC, TTC, cho thấy trong thời gian 8 giờ trích ly hàm lượng TPC, TFC và TTC cao nhất và sau 8 giờ thì hàm lượng các chất chiết không tăng thêm. Nguyên nhân là trước thời gian 8 giờ trích ly thì các chất chiết vẫn còn dịch chuyển từ trong nguyên liệu nhưng sau thời gian 8 giờ các chất polyphenol tổng, flavonoid tổng và triterpene tổng không tan vào dung môi thêm nữa. Điều này phù hợp với nhận định của Yang và ctv. (2009) rằng các chất hoạt tính nếu trích ly trong thời gian ngắn thì hàm lượng các chất chiết có trong nguyên liệu tan vào dung môi ít, cần phải có thêm thời gian để các chất chiết hòa tan vào trong dung dịch (Yang và ctv, 2009; Yim và ctv, 2012). Do đó chọn thời gian 8 giờ để tiếp tục thí nghiệm kế tiếp để xem sự ảnh hưởng của nồng độ ethanol đến quá trình trích ly các hợp chất.

- Ảnh hưởng nồng độ dung môi đến hàm lượng TPC, TFC, TTC



Hình 3. 5. Ảnh hưởng nồng độ dung môi đến hàm lượng TPC, TFC và TTC
 Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét ở Hình 3.5 cho thấy ảnh hưởng của nồng độ dung môi ethanol đến hàm lượng TPC, TFC và TTC. Hàm lượng các chất chiết tăng cao nhất ở nồng độ dung môi từ 80-90%. Điều này có thể giải thích rằng các chất chiết trong nấm có độ hòa tan trong dung môi có độ phân cực khác nhau khi thay đổi nồng độ dung môi. Độ hòa tan sẽ giảm khi đạt đến nồng độ chất hòa tan bão hòa. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shen và ctv. (2020) trích ly TTC trên đối tượng là nấm linh chi *Ganoderma Lucidum* (Shen và ctv, 2020). Từ kết quả khảo sát một yếu tố trên, đã chọn được giá trị mức trung tâm của các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng trích ly của các hợp chất tự nhiên TPC, TFC và TTC để tiến hành thực hiện tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt như nhiệt độ trích ly từ 30-50°C, tỷ lệ dung môi với nguyên liệu 40:1 đến 60:1, thời gian từ 6-10 giờ, nồng độ dung môi từ 70-90%.

3.2.2.2. Tối ưu hóa thiết kế theo mô hình Box Behnken (BBD)

Dựa trên kết quả của các thí nghiệm một yếu tố độc lập, lựa chọn mô hình BBD, chọn mô hình đa thức bậc hai với 27 nghiệm thức để tối ưu hóa bốn biến độc lập, bao gồm X₁: nhiệt độ, X₂: tỷ lệ dung môi-nguyên liệu X₃: thời gian, X₄: nồng độ dung môi ethanol và 4 biến phụ thuộc Y₁: hàm lượng polyphenol tổng, Y₂: hàm lượng flavonoid

tổng, Y₃: hàm lượng triterpene tổng, Y₄: khả năng kháng oxy hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Sử dụng phần mềm JMP 10.0.0 để phân tích dữ liệu.

Bảng 3. 12. Ma trận thực nghiệm với mô hình thiết kế BBD

Thí nghiệm thứ	Mã hóa	Yếu tố				Hàm mục tiêu			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	0-0+	40	40	8	90	6,642	0,838	1,827	3,127
2	0+0-	40	60	8	70	6,716	0,977	1,627	3,218
3	+00-	50	50	8	70	5,972	0,914	1,969	3,108
4	-0+0	30	50	10	80	5,396	0,779	1,308	3,012
5	0000	40	50	8	80	7,076	1,295	2,078	3,989
6	00+-	40	50	10	70	7,031	1,021	1,788	3,986
7	0-0-	40	40	8	70	7,806	0,956	1,796	4,258
8	-00+	30	50	8	90	5,297	0,739	1,865	3,012
9	-+00	30	60	8	80	5,387	0,786	2,006	3,108
10	00--	40	50	6	70	6,078	0,857	1,787	3,254
11	+--00	50	40	8	80	6,518	0,925	1,865	3,581
12	++00	50	60	8	80	7,109	1,019	1,707	3,478
13	0000	40	50	8	80	8,127	1,388	2,114	4,865
14	00-+	40	50	6	90	6,546	0,927	1,649	3,021
15	0++0	40	60	10	80	8,109	1,196	2,047	4,634
16	-0-0	30	50	6	80	5,171	0,706	1,606	3,002
17	+0+0	50	50	10	80	7,729	1,106	1,727	4,167
18	0000	40	50	8	80	8,169	1,304	1,988	4,892
19	00++	40	50	10	90	7,967	1,048	1,205	4,023
20	--00	30	40	8	80	5,272	0,788	1,327	3,076
21	0-+0	40	40	10	80	6,267	0,821	1,144	3,871
22	-00-	30	50	8	70	4,983	0,776	1,327	2,986
23	0+-0	40	60	6	80	6,896	0,784	1,606	3,875
24	0--0	40	40	6	80	6,346	0,711	1,687	3,321
25	+00+	50	50	8	90	7,764	1,125	1,084	4,321
26	0+0+	40	60	8	90	8,138	1,119	1,897	4,923
27	+0-0	50	50	6	80	6,212	1,027	1,406	3,832

Ghi chú: X₁: nhiệt độ (°C), X₂: tỷ lệ dung môi so với nguyên liệu
X₃: thời gian (giờ), X₄: nồng độ dung môi ethanol (%)
Y₁: hàm lượng polyphenol tổng (mg GAE/g dw)
Y₂: hàm lượng flavonoid tổng (mg QE/g dw)
Y₃: hàm lượng triterpene tổng (mg OAE/g dw)
Y₄: khả năng kháng oxy hóa (µgVit C/g dw))

- Phân tích thống kê và mô hình thích hợp:

$$Y_1 = 7,72 + 0,82X_1 + 0,29X_2 + 0,44X_3 + 0,31X_4 - 1,31X_1^2 - 0,26X_2^2 - 0,45X_3^2 - 0,30X_4^2 + 0,12X_1X_2 + 0,32X_1X_3 + 0,37X_1X_4 + 0,32X_2X_3 + 0,65X_2X_4 + 0,12X_3X_4 \quad (1)$$

Phương trình Y_1 rút gọn:

$$Y_1 = 7,72 + 0,82X_1 + 0,29X_2 + 0,44X_3 + 0,31X_4 - 1,31X_1^2 - 0,26X_2^2 - 0,45X_3^2 - 0,30X_4^2 + 0,65X_2X_4 \quad (1')$$

Trong phương trình (1) Y_1 là hàm lượng polyphenol tổng và X_1 : nhiệt độ, X_2 : tỷ lệ dung môi-nguyên liệu X_3 : thời gian, X_4 : nồng độ dung môi. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9158$ (≥ 8) chấp nhận được (Lundstedt và ctv, 1998), $R^2_{Adj} = 0,8177$ cho thấy mức độ tin cậy cao của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan giữa các giá trị quan sát và dự đoán cao, thông số đo độ nhiễu > 4 (Adeq precision = 10,248) cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn (Zheng và ctv, 2014). Mô hình này có thể được sử dụng để điều hướng không gian thiết kế. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,001$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ là phù hợp. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Có thể thấy rằng các hệ số X_1, X_1^2 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_3 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Các hệ số X_2, X_4, X_2X_4, X_3 có ảnh hưởng không nhiều ($p < 0,05$). Còn lại hệ số $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1X_4, X_3X_4$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_2 = 1,33 + 0,13X_1 + 0,070X_2 + 0,080X_3 + 0,025X_4 - 0,25X_1^2 - 0,22X_2^2 - 0,21X_3^2 - 0,17X_4^2 + 0,024X_1X_2 + 1,500E-03X_1X_3 + 0,062X_1X_4 + 0,075X_2X_3 + 0,065X_2X_4 - 0,011X_3X_4 \quad (2)$$

Phương trình Y_2 rút gọn:

$$Y_2 = 1,33 + 0,13X_1 + 0,070X_2 + 0,080X_3 - 0,25X_1^2 - 0,22X_2^2 - 0,21X_3^2 - 0,17X_4^2 \quad (2')$$

Trong phương trình (2) Y_2 là hàm lượng flavonoid tổng và X_1 : nhiệt độ, X_2 : tỷ lệ dung môi-nguyên liệu X_3 : thời gian, X_4 : nồng độ dung môi. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9321$, $R^2_{Adj} = 0,8529$, cho thấy mức độ tin cậy cao của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan giữa các giá trị quan sát và dự đoán cao, thông số đo độ nhiễu > 4 (Adeq precision = 13,115) cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,001$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ rằng mô hình lựa chọn rất phù hợp. Có thể thấy rằng các hệ số $X_1, X_1^2, X_2^2, X_3^2, X_4^2$ có ảnh

hường rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_2, X_3 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Còn lại các hệ số $X_4, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1X_4, X_2X_4, X_3X_4$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_3 = 2,07 + 0,027X_1 + 0,10X_2 - 0,043X_3 - 0,064X_4 - 0,27X_1^2 - 0,11X_2^2 - 0,30X_3^2 - 0,20X_4^2 - 0,21X_1X_2 + 0,15X_1X_3 - 0,36X_1X_4 + 0,25X_2X_3 + 0,060X_2X_4 - 0,11X_3X_4 \quad (3)$$

Phương trình Y_3 rút gọn:

$$Y_3' = 2,07 - 0,27X_1^2 - 0,30X_3^2 - 0,20X_4^2 - 0,21X_1X_2 + 0,25X_2X_3 \quad (3')$$

Trong phương trình (3) Y_2 hàm lượng triterpene tổng và X_1 : nhiệt độ, X_2 : tỷ lệ dung môi-nguyên liệu X_3 : thời gian, X_4 : nồng độ dung môi. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,8561$, $R^2_{Adj} = 0,6883$, cho thấy mức độ tin cậy cao của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan giữa các giá trị quan sát và dự đoán cao, thông số đo độ nhiễu > 4 ($Adeq\ precision = 7,787$) cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,01$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn phù hợp. Có thể thấy rằng các hệ số X_1^2, X_3^2 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Hệ số X_1X_2, X_2X_3, X_4^2 có ảnh hưởng ($p < 0,05$). Còn lại các hệ số $X_1, X_2, X_3, X_4, X_1X_3, X_1X_4, X_2X_4, X_3X_4, X_2^2$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_4 = 4,52 + 0,36X_1 + 0,17X_2 + 0,28X_3 + 0,13X_4 - 0,77X_1^2 - 0,29X_2^2 - 0,35X_3^2 - 0,45X_4^2 - 0,034X_1X_2 + 0,081X_1X_3 + 0,30X_1X_4 + 0,052X_2X_3 + 0,71X_2X_4 + 0,068X_3X_4 \quad (4)$$

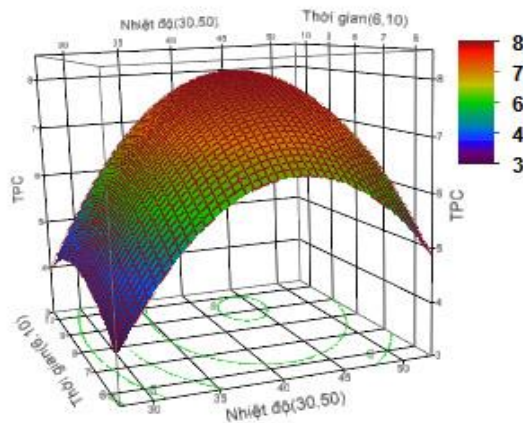
Phương trình Y_4 rút gọn:

$$Y_4' = 4,52 + 0,36X_1 + 0,28X_3 - 0,77X_1^2 - 0,35X_3^2 - 0,45X_4^2 + 0,71X_2X_4 \quad (4')$$

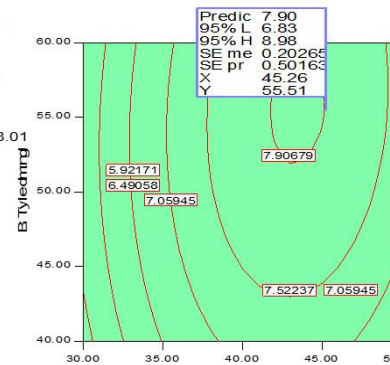
Trong phương trình (4) Y_4 khả năng khử gốc tự do và X_1 : nhiệt độ, X_2 : tỷ lệ dung môi-nguyên liệu X_3 : thời gian, X_4 : nồng độ dung môi. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,8418$, $R^2_{Adj} = 0,6573$, cho thấy mức độ tin cậy cao của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo độ nhiễu > 4 ($Adeq\ precision = 7,139$) cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,01$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn phù hợp. Có thể thấy rằng các hệ số X_1^2 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_1, X_2X_4 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Các hệ số X_3, X_3^2, X_4^2 có ảnh hưởng không

hiều ($p < 0,05$). Còn lại hệ số $X_2, X_4, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1X_4, X_3X_4, X_2^2$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

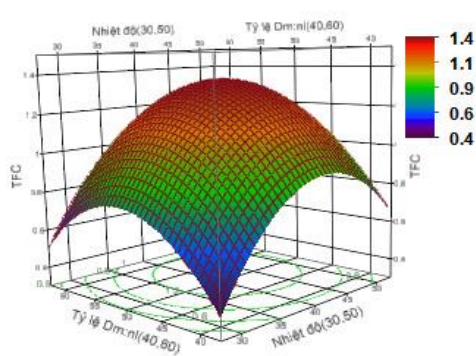
- Tối ưu hóa các điều kiện trích ly



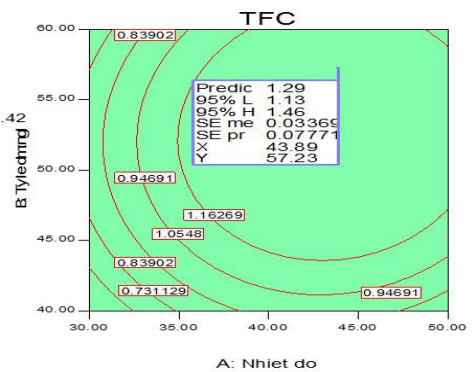
(a)



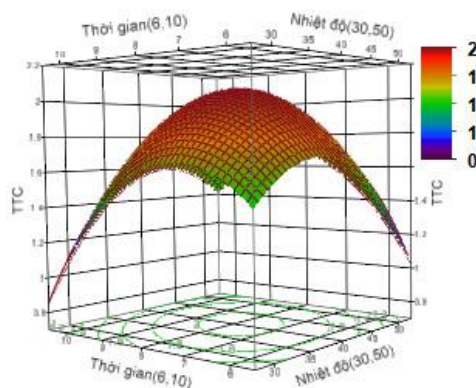
(a')



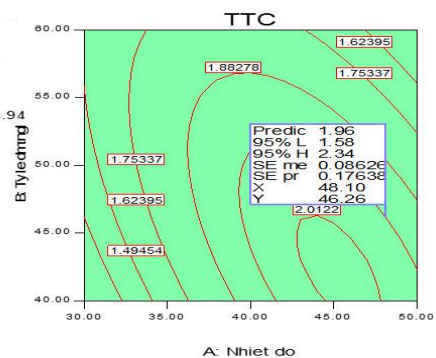
(b)



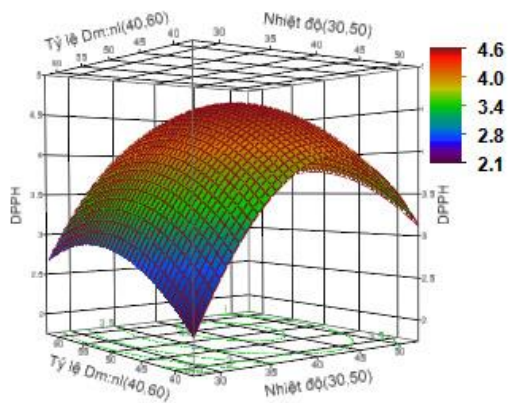
(b')



(c)

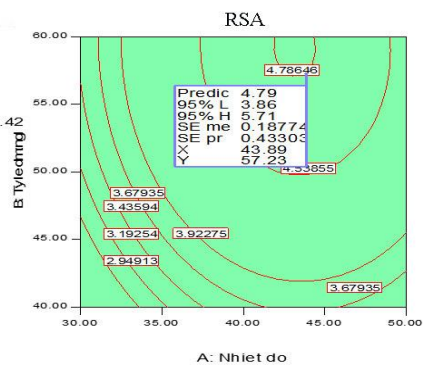


(c')



(d)

RSA
 X = A: Nhiệt độ
 Y = B: Tỷ lệ dm:ngl
 Actual Factors
 C: Thời gian = 8.01
 D: Nồng độ dm = 85.42

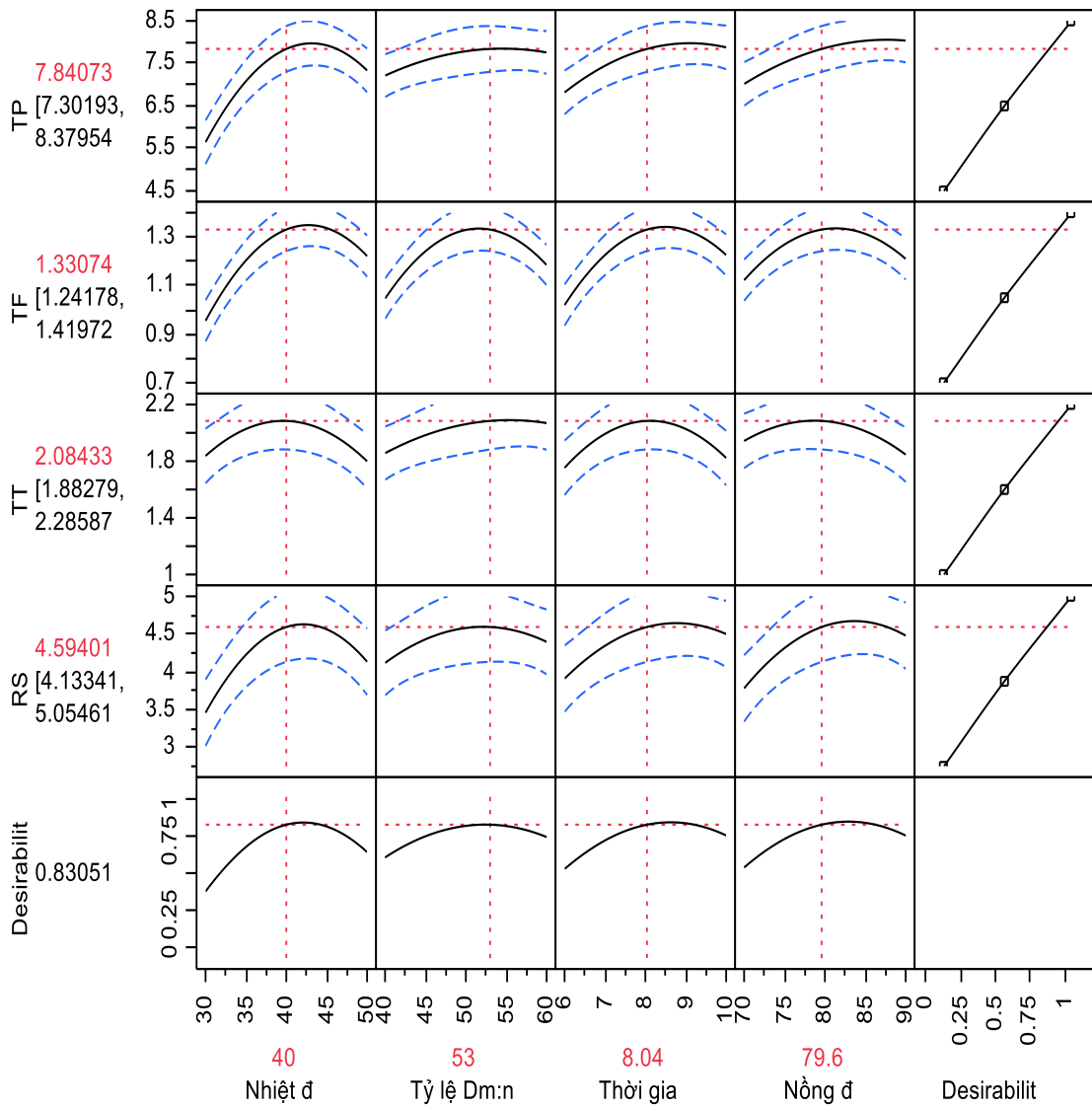


(d')

Hình 3. 6. Đồ thị bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D của hàm mục tiêu Y_{1-4} với ảnh hưởng các biến độc lập X_{1-4}

Nhận xét trên đồ thị 3D của các Hình 3.6 (a,b,c,d) cho thấy các giá trị TPC, TFC, TTC và RSA có giá trị cực trị, do đó có thể tìm được giá trị tối ưu của các giá trị đó. Bên cạnh đó cho thấy sự

Theo đường đồng mức Hình 3.6 (a', b',c',d') cho thấy được xu hướng. Khi nhiệt độ trích ly tăng trên 50°C thì hàm lượng các chất hoạt tính sinh học TPC, TFC, TTC có dấu hiệu giảm và đồng thời khả năng chống oxy hóa RSA cũng giảm theo.



Hình 3. 7. Kết quả dự đoán

Kết quả dự đoán tối ưu hóa được thực hiện trên phần mềm JMP trong Hình 3.7 cho thấy thông số của 4 yếu tố lần lượt là nhiệt độ trích ly 40⁰C, tỷ lệ dung môi ethanol với nguyên liệu 53:1, thời gian trích ly 8,04 giờ, nồng độ ethanol 79,6% thì cho hàm mục tiêu tương ứng TPC 7,8407 mg GAE/g DW, TFC 1,3307 mgQE/g DW, TTC 2,0843 mgOAE/g DW, RSA 4,5940 µgVitC/g DW.

- **Kiểm chứng thực nghiệm**

Bảng 3. 13. Kiểm chứng thực nghiệm

Hàm mục tiêu	Giá trị dự đoán	Giá trị thực nghiệm	Giá trị P-value
TPC(mg GAE/g DW)	7,8407 ^a	7,8832±0,1844 ^a	0,7102
TFC(mgQE/g DW)	1,3307 ^b	1,3521±0,0150 ^b	0,3621
TTC(mgOAE/g DW)	2,0843 ^c	2,0900±0,0139 ^c	0,5180
RSA(μgVitC/g DW)	4,5940 ^d	4,5832±0,0455 ^d	0,7040

• Sử dụng trắc nghiệm t-test với độ tin cậy 95%

Những số liệu trong cùng một hàng có các chữ cái (a,b,c,d) khác nhau là khác nhau và ngược lại.

Kết quả kiểm chứng đối ở Bảng 3.13 cho thấy với các hàm mục tiêu hoàn toàn giống với kết quả dự đoán. Điều đó có nghĩa là các giá trị dự đoán phù hợp với các giá trị tối ưu.

Dịch chiết ethanol từ nấm *Coriolopsis aspera* đã được tối ưu hóa trích ly được mã hóa là dịch chiết CoAEO. Trong thành phần dịch chiết CoAEO có chứa các chất TPC, TFC, TTC cao và hoạt tính chống oxy hóa cao. Dịch chiết CoAEO được cô đặc chân không tạo ra cao CoAEO sau đó đem đi tinh sạch hợp chất để xác định thêm thành phần chất chưa được phát hiện trong phân tích LC-MS.

3.3. Định tính thành phần hoạt tính sinh học

Từ kết quả Bảng 3.14 định tính hợp chất thứ cấp trong cao chiết nấm vân chi cho thấy trong thành phần dịch cao chiết ethanol của nấm vân chi *Coriolopsis aspera* có chứa các chất chuyển hóa bậc 2 nhiều như nhóm chất phenolic, tannin, alkaloid, terpenoid, và steroid. Còn nhóm chất flavonoid và saponin ở mức trung bình chỉ có nhóm chất coumarin là cho kết quả ít. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nhóm tác giả Fakoya và ctv. (2012) trên loài nấm vân chi *Coriolopsis gallica* (Fakoya và Folarin Oloketuyi, 2012) và nấm vân chi *Trametes versicolor*, *Trametes gibbosa* (T. Appiah và ctv, 2017; Leliebre và ctv, 2015).

Bảng 3. 14. Định tính hợp chất thứ cấp trong cao chiết nấm vân chi

Chất chuyển hóa thứ cấp	Nhận xét kết quả
Phenolic	+++
Tannin	+++
Flavonoid	++
Coumarin	+
Alkaloid	+++
Terpenoid	+++
Steroid	+++
Saponin	++

(+) có ít, (++) trung bình, (++++) có nhiều

3.4. Phân lập và tinh sạch hợp chất từ cao CoAEO

Từ cao chiết tổng ethanol tổng thực hiện tách chiết lỏng lỏng với các loại dung môi tăng dần độ phân cực như hexane, chloroform, ethyl acetate, nước. Thu được 4 loại cao như cao hexane, cao chloroform, cao ethylacetate và cao nước.

Qua sơ đồ tách chất trong phụ lục PLD10 từ 2 cao chiết ethyl acetate và cao nước đã tách được 9 chất sạch trong đó có từ cao chiết cao ethyl acetate thu được hợp chất trametenolic B (1), cerevisterol (2), ergosterol (3), ergosterol peroxit (4). Từ cao nước thu được hợp chất trans- p-hydroxycoumaric acid (5), methyl ferulat (6), methyl (2-hydroxyphenyl) acetat (7), umbelliferone (8), 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin (9). Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ hiện đại trong PLD.

Bảng 3. 15. Hợp chất thứ cấp được phân lập

STT	Hợp chất thứ cấp	Cao
1	Trametenolic B	ethyl acetate
2	Cerevisterol	ethyl acetate
3	Ergosterol	ethyl acetate
4	Ergosterol peroxit	ethyl acetate
5	Trans- p-hydroxycoumaric acid	nước
6	Methyl ferulat	nước
7	Methyl (2-hydroxyphenyl) acetat	nước
8	Umbelliferone	nước
9	8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin	nước

Trong Bảng 3.15 hợp chất thứ cấp được phân lập, có 9 chất sạch trên đã được tinh sạch và xác định tên. Trong đó có 1 chất thuộc nhóm triterpene (trametenolic B), 3 chất thuộc nhóm steroid (cervisterol, ergosterol, ergosterol peroxit) và 5 chất còn lại thuộc phenolic (trans- p-hydroxycoumaric acid, methyl ferulat, methyl (2-hydroxyphenyl) acetat, umbelliferone, 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin). Tất cả các chất trên dạng bột có màu trắng. Theo nghiên cứu của Ma và ctv.(2013) thì trametenolic B, ergosterol, ergosterol peroxit có tính kháng viêm, ức chế tế bào ung thư mạnh và chống oxy hóa cao có thể được ứng dụng trong sản xuất thực phẩm bổ sung ở nhiều dạng khác nhau như dạng uống, dạng bột hòa tan hay viên nén (Ma và ctv, 2013).

3.5. Hoạt tính sinh học từ cao CoAEO

3.5.1. Xác định khả năng khử gốc tự do

Kết quả phân tích ở Bảng 3.16 khả năng khử gốc tự do của cao CoAEO, cho thấy trong thành phần của dịch cao chiết ethanol của nấm *Coriolopsis aspera* chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có khả năng chống oxy hóa mạnh. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kamiyama và cộng sự. (2013) trên đối tượng nấm vân chi *Trametes versicolor* trên dung môi acetone (khả năng khử gốc tự do 50,9%) và trên dung môi methanol (33,9%)(Kamiyama và ctv, 2013). Trong dịch chiết dung môi phân cực các chất hòa tan trong nguyên liệu nấm chủ yếu là các hợp chất phenolic có khả năng khử gốc tự do cao. Nhận định này phù hợp với nhóm tác giả Yamaç và ctv. (2006) (Yamaç và Bilgili, 2006).

Bảng 3. 16. Khả năng khử gốc tự do của cao CoAEO

Kí hiệu mẫu	Khả năng trung hòa gốc tự do (SC,%)	Nồng độ đầu thử nghiệm (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/mL)
Chứng (+) [Acid ascorbic]	93,82 ± 2,95	0,035	0,019
Chứng (-) [DPPH/EtOH + DMSO]	0,0	-	
Cao CoAEO	68,21 ^a ±3,23	0,1	0,064

3.5.2. Xác định hoạt tính gây độc và ức chế tế bào ung thư của cao CoAEO

Theo nhận định của Hobbs và ctv. (2004) nấm vân chi có khả năng ức chế tế bào ung thư như kết quả ở Bảng 3.17 cho thấy dịch chiết ethanol của nấm vân chi *Coriolopsis aspera* có khả năng ức chế tế bào ung thư. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Knežević và ctv. (2015) trên 3 loài nấm vân chi *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes gibbosa* và nghiên cứu của Milovanovic và ctv. (2015) trên nấm vân chi *Trametes hirsuta* (N Milovanovic và ctv, 2015). Hàm lượng TTC trong cao chiết có khả năng ức chế quá trình tổng hợp DNA trong giai đoạn phân bào của tế bào ung thư gan và ung thư cổ tử cung (Chang và ctv, 2006; M. Zhou và ctv, 2021). Mặt khác trong dịch cao chiết có chứa hàm lượng TTC có khả năng ức chế enzyme kinase C kích hoạt làm gia tăng tế bào ung thư gan và ung thư cổ tử cung (Lin và ctv, 2003; M. Zhou và ctv, 2021).

Bảng 3. 17. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) của cao CoAEO

Kí hiệu mẫu	Nồng độ thử cao nhất	Tế bào HeLa		Tế bào Hep-G2	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀
Chứng (-) [DMSO]	0,1%	0	-	0	-
Chứng (+) [Ellipticine]	5µg/ml	89,6±2,4	3,63µM	81,2±1,6	3,98µM
Cao CoAEO	150µg/ml	67,7±4,1	98,3µg/ml	69,4±3,2	88,6 µg/ml

IC₅₀: nồng độ tại đó ức chế 50% tế bào ung thư.

3.5.3. Hoạt tính kháng vi sinh vật của cao CoAEO

Dịch pha loãng cao ở nồng độ 10mg/mL không có khả năng kháng với 10 chủng vi khuẩn kiểm định với mật độ nuôi cấy khoảng 10^8 CFU/mL. Tuy nhiên khi khảo sát dịch cao pha loãng ở nồng độ 100mg/mL với các chủng vi khuẩn kiểm định ở nồng độ tương tự, cao chiết CoAEO thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh được thể hiện ở Bảng 3.18 với 5 chủng *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 có đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là $0,82 \pm 0,02$ cm; $0,75 \pm 0,03$ cm; $0,52 \pm 0,02$ cm; $0,25 \pm 0,05$ cm; $0,40 \pm 0,06$ cm. Với các chủng còn lại thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu với đường kính vòng kháng khuẩn từ 0,02-0,05cm. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Melappa và ctv. (2015) trên nấm vân chi *Trametes ochracea* và nghiên cứu của Bains và ctv. (2020) của dịch cao chiết methanol trên đối tượng nấm *Trametes versicolor* có chứa hàm lượng TPC và TFC cao (Adongbede và ctv, 2019; Akgul và ctv, 2021; Bains và Chawla, 2020). Trong thành phần của cao CoAEO có chứa hàm lượng TPC, TFC và TTC cao do đó phù hợp với kết quả nghiên cứu. Đối với những dạng thực phẩm sử dụng lâu và khi sử dụng không hâm nóng lại thì dễ bị nhiễm vi khuẩn *B. cereus* loại này thường sẽ tiết ra độc tố trong thực phẩm và gây ngộ độc lên người sử dụng (Dietrich và ctv, 2021). *E. faecalis* là cầu khuẩn đường ruột nếu phát triển trong đường ruột nhiều có thể gây ra các bệnh nhiễm trùng cho người, như viêm nội tâm mạc, nhiễm trùng trong ổ bụng, viêm mô tế bào có thể gây bệnh ung thư đại trực tràng (Almeida de và ctv, 2018). *L. monocytogenes* là một tác nhân gây bệnh cho người thông qua đường thực phẩm gây nên ra bệnh Listeriosis là một loại bệnh nhiễm trùng có thể dẫn đến tử vong ở người (Carlton và ctv, 2005). *S. aureus* tụ cầu khuẩn vàng có thể có trong thực phẩm và gây bệnh nhiễm trùng ở người (Alexander và Hudson, 2001). *V. parahaemolyticus* gây bệnh viêm ruột khi người ăn những thực phẩm có nhiễm nó (Ritchie và ctv, 2012).

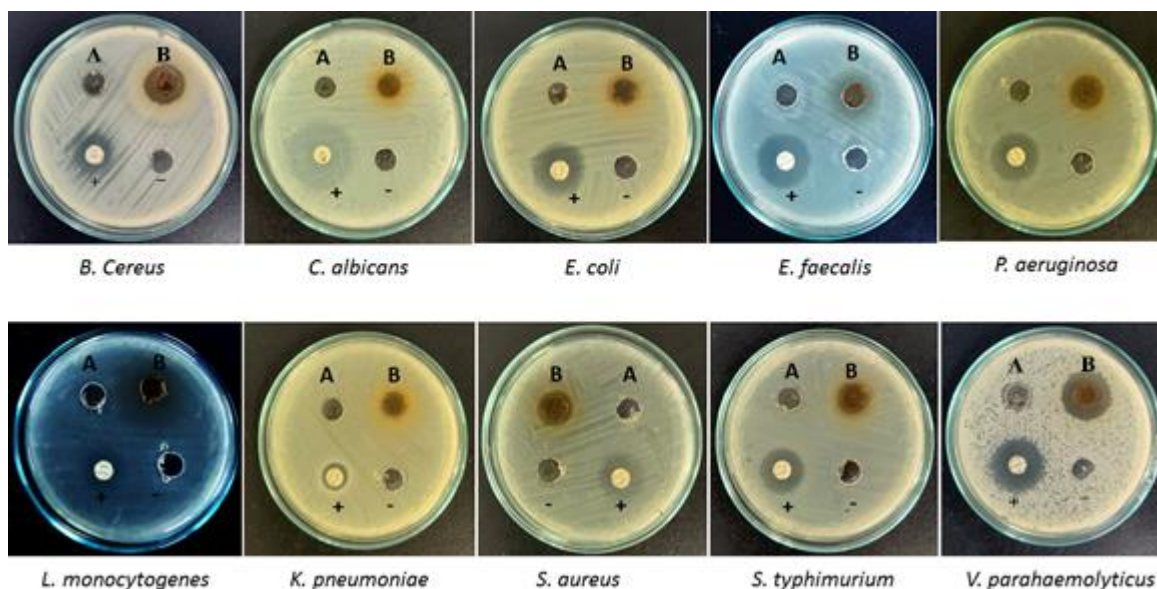
Bảng 3. 18. Đường kính vòng tròn kháng vi sinh vật của cao CoAEO

Chủng VSV	ĐK vòng kháng (cm)	Chủng VSV	ĐK vòng kháng (cm)
<i>B. cereus</i> (G+)	0,52±0,02	<i>K. pneumoniae</i>	0,02
<i>C. albican</i>	0,05±0,03	<i>S. aureus</i> (G+)	0,25±0,05
<i>E. coli</i>	0,02	<i>S. typhimurium</i>	0,02
<i>E. faecalis</i> (G+)	0,40±0,06	<i>P. aeruginosa</i>	0,03±0,02
<i>L. monocytogenes</i> (G+)	0,75±0,03	<i>V. parahaemolyticus</i> (G-)	0,82±0,02

Bảng 3. 19. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của cao chiết CoAEO

Mẫu	Giá trị	Nồng độ ức chế VSV				
		<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Cao	MIC	2,5	2,5	5,0	5,0	2,5
CoEAO (mg/ml)	MBC	2,5	3,5	7,0	7,0	3,5
Gentamicin (µg/ml)	MIC	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
	MBC	0,2	0,6	0,6	0,3	0,3

Kết quả Bảng 3.19 cho thấy nồng độ ức chế tối thiểu của dịch cao chiết CoEAO cao hơn dịch cao chiết methanol của nấm vân chi *Trametes versicolor* (Hleba và ctv, 2014). Khả năng kháng vsv cao chiết CoEAO so với kháng sinh thương mại Gentamicin vẫn thấp hơn.



A: nồng độ mẫu - 100mg/mL B: nồng độ mẫu -10mg/mL

(+) Gentamicin (10µg) (-): DMSO 5%

Hình 3. 8. Kháng vi sinh vật của cao CoAEO

Theo kết quả nghiên cứu của Ga và ctv. (2011) thì dịch chiết của cao methanol của nấm vân chi *Trametes gibbosa* có hoạt tính ức chế nhiều VSV cao hơn so với dịch chiết cao CoAEO. Nhìn chung khả năng kháng VSV của cao CoAEO khá tốt để tạo sản phẩm có khả năng ức chế một số VSV gây hại cho sức khỏe.

3.6. Đánh giá độc tính dịch cao CoAEO trên chuột

3.6.1. Độc tính cấp

3.6.1.1. Kiểm tra thể chất

Bảng 3.20. Các phản ứng hành vi và ngoại hình chung của chuột được điều trị bằng CoAEO trong khảo sát độc tính cấp tính trên chuột sau 14 ngày

Quan sát	Nhóm kiểm soát	1000 mg/kg	3000 mg/kg	5000 mg/kg	7000 mg/kg
Nhiệt độ	Bình thường (36,5 – 38oC)	Bình thường (36,5 – 38oC)	Bình thường (36,5 – 38oC)	Bình thường (36,5 – 38oC)	Bình thường (36,5 – 38oC)
Thay đổi làn da	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi
Thay đổi màu mắt	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi

Vóc dáng chung	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Bệnh tiêu chảy	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Hôn mê	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Buồn ngủ	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Nhịp hô hấp	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút
Nhịp thở	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút
Vận động	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt
Phản xạ	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát
Tử vong	Sống sót	Sống sót	Sống sót	Sống sót	Sống sót

Thử nghiệm độc tính cấp tính đánh giá các tác dụng phụ xảy ra trong thời gian ngắn sau khi dùng liều cao chất thử nghiệm. Thử nghiệm này được thực hiện chủ yếu ở loài gặm nhấm và thường được thực hiện sớm trong quá trình phát triển một hóa chất hoặc sản phẩm mới để cung cấp thông tin về độc tính tiềm ẩn của nó (Chambers, 1987). Dịch cao CoAEO được đem đánh giá độc tính có hàm lượng triterpene tổng (TTC) bằng 2,09 mg acid oleanolic/g DW. Dung dịch này được đem cô đặc làm giàu TTC đến 130,3 mg acid oleanolic/g DW. Dựa vào triệu chứng lâm sàng ở các lô thí nghiệm cho thấy không có hiện tượng chuột chết. Sau 3 giờ cho uống chuột có dấu hiệu mệt mỏi nhưng sau đó đến 72 giờ thì nhận thấy chuột hoạt động hô hấp, chạy nhảy, ăn uống của chuột đều bình thường, lông chuột mượt, đi ngoài phân khô.

3.6.1.2. Huyết học và sinh hóa máu

Đánh giá các thông số huyết học có thể được sử dụng để xác định mức độ ảnh hưởng có hại của các hợp chất lạ bao gồm nguyên liệu thực vật đối với máu (Yakubu và ctv, 2008). Trong các nghiên cứu độc tính cấp tính, những thay đổi trong các thông số huyết học cũng như sinh hóa thường được sử dụng làm chỉ số của độc tính. Đo số

lượng RBC và HGB có thể được sử dụng để xác định thiếu máu (Adebayo và ctv, 2003).

Bảng 3. 21. Ảnh hưởng của CoAEO đến thành phần huyết học máu ngoại vi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	2000mg/kg	4000 mg/kg	6000 mg/kg
RBC ($\times 10^6$ tb/mm ³)	8,20 ^a ± 0,4	7,90 ^b ± 0,5	7,70 ^b ± 0,3	8,10 ^c ± 0,4
HGB (g/dl)	12,50 ^a ± 0,5	12,60 ^b ± 0,4	12,50 ^b ± 0,6	12,90 ^c ± 0,6
PLT ($\times 10^3$ tb/mm ³)	603 ^a ± 69	605 ^a ± 51	617 ^a ± 59	641 ^b ± 66
WBC ($\times 10^3$ /mm ³)	2,20 ^a ± 0,8	2,60 ^a ± 1,1	2,90 ^a ± 0,6	3,80 ^b ± 0,4

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các số mũ a,b,c biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

Hiệu quả của điều trị cấp tính trong 14 ngày bằng dịch cao CoAEO đối với các thông số huyết học của chuột được thể hiện trong Bảng 3.21 trong điều trị cấp tính với hàm lượng 2000 và 4000 mg/kg cao CoAEO không ảnh hưởng đáng kể đến bất kỳ thông số huyết học nào được khảo sát. Tuy nhiên, điều trị mãn tính với 6000 mg/kg dịch chiết đã làm tăng đáng kể ($P < 0,05$) lượng RBC và HGB khi so sánh với đối chứng. Tương tự, sự gia tăng đáng kể ($P < 0,05$) về số lượng WBC đã được quan sát thấy với 6000 mg/kg cao CoAEO. Tuy nhiên, sự gia tăng các thông số trên vẫn nằm trong mức giới hạn về lượng RBC và WBC của chuột Swiss albino.

Bảng 3. 22. Ảnh hưởng của CoAEO đến thành phần sinh hóa máu ngoại vi chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Chỉ tiêu	Đối chứng	2000 mg/kg	4000 mg/kg	6000 mg/kg
Protein tổng (g/dl)	5,30 ^a ± 0,3	5,10 ^a ± 0,2	5,50 ^{ab} ± 0,3	6,50 ^b ± 0,1
Albumin (g/dl)	3,20 ^a ± 0,4	3,10 ^a ± 0,5	3,40 ^b ± 0,4	3,40 ^b ± 0,4
Creatinine (μ mol/l)	0,49 ^a ± 0,02	0,48 ^a ± 0,01	0,45 ^{bc} ± 0,01	0,47 ^{bc} ± 0,02
Uric acid (mg/l)	12,40 ^a ± 0,2	12,70 ^c ± 0,1	12,60 ^{ab} ± 0,2	12,30 ^a ± 0,1
BUN(mg %)	15,70 ^a ± 0,3	15,90 ^a ± 0,4	15,40 ^{ab} ± 0,2	15,60 ^c ± 0,5

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các số mũ a,b biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%.

Ảnh hưởng của điều trị cấp tính bằng đường miệng với dịch cao CoAEO đối với các thông số sinh hóa huyết thanh của chuột được thể hiện trong Bảng 3.22 cho thấy tất cả các thông số đo được không khác biệt đáng kể. Không có sự khác biệt đáng kể về

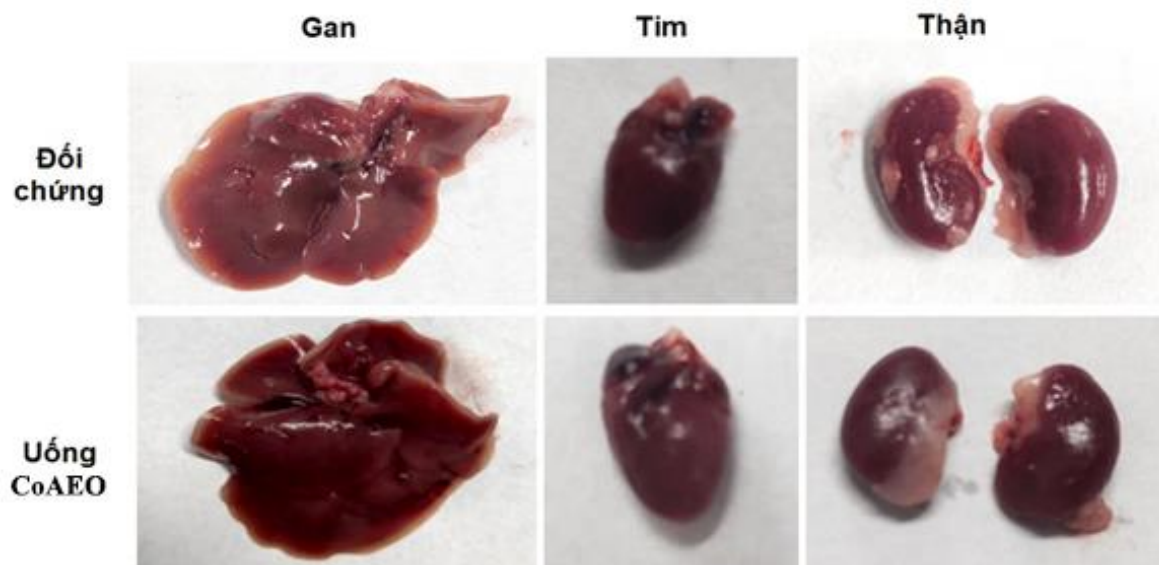
các thông số sinh hóa huyết thanh của chuột ở liều 2000 và 4000 mg/kg bw CoAEO. Mức protein tổng số trong huyết thanh dường như tăng ($P < 0,05$) ở liều 6000 mg/kg CoAEO. Điều trị bằng dịch chiết cũng làm giảm ($P < 0,05$) nồng độ BUN và Uric acid huyết thanh ở 4000 và 6000 mg/kg CoAEO, tăng ($P < 0,05$) mức độ creatinin huyết thanh ở liều 6000 mg/kg CoAEO mặc dù không đáng kể.

3.6.1.3. Trọng lượng cơ quan tương đối

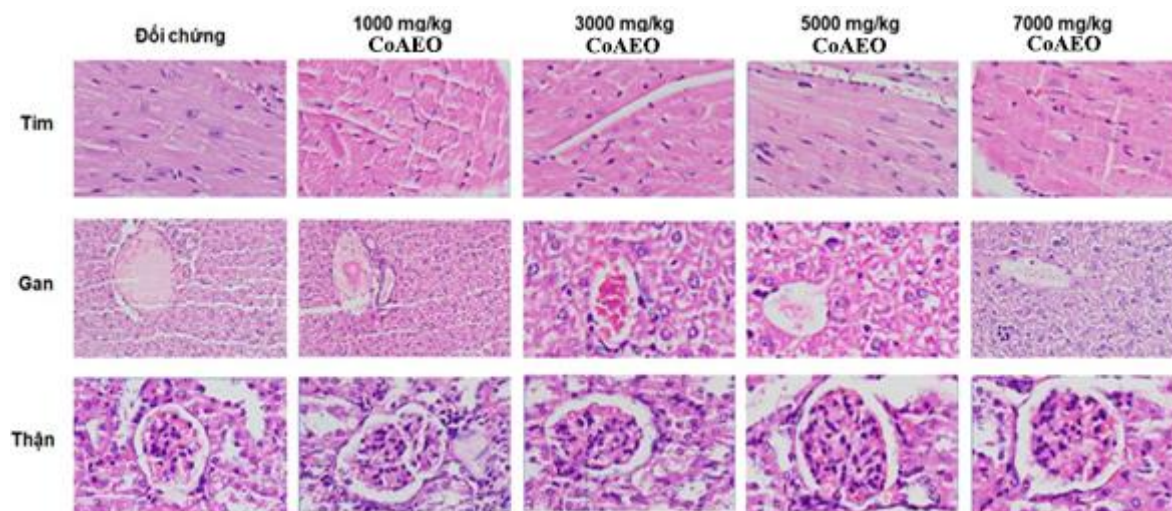
Các tác nhân độc hại được biết là ảnh hưởng đến gan, thận, tim và làm suy giảm chức năng sinh lý của chúng. Do vai trò chính của thận trong việc bài tiết các chất thải như urê và creatinin máu, cũng như khả năng lọc và tái hấp thu chất ngưỡng cần thiết của cơ thể như chất điện giải, mức độ của các thông số sinh hóa huyết thanh này có thể được sử dụng làm xét nghiệm chức năng thận (Adedapo và ctv, 2007). Trong phần lớn các trường hợp, sự thay đổi trọng lượng cơ quan tỷ lệ thuận với tổng trọng lượng cơ thể. Do đó, chúng thường được điều tra để xác định xem kích thước của cơ quan có thay đổi hay không, đặc biệt là so với trọng lượng của cả con vật như một dấu hiệu cho thấy tác động bất lợi của hóa chất đối với cơ quan đó.

Kiểm tra vĩ mô cơ thể giải phẫu đối với tất cả các cơ quan nội tạng được nghiên cứu, cụ thể là dạ dày, ruột non, ruột già, lá lách, gan và thận để tìm bất kỳ thay đổi nào có thể xảy ra về vị trí, hình dạng, kích thước và màu sắc không cho thấy bất thường tổng thể. Trọng lượng nội tạng tương đối (tính bằng g trên 100 g trọng lượng cơ thể) của gan, thận và tim của cả nhóm dịch chiết được xử lý và nhóm đối chứng được thể hiện trong phụ lục PLE.1, Bảng e.3. Không có sự khác biệt đáng kể nào được quan sát thấy về trọng lượng cơ quan tuyệt đối và tương đối của dịch chiết chuột được xử lý và đối chứng.

3.6.1.4. Hình thái ngoài và mô học cơ quan



Hình 3. 9. Hình thái đại thể gan, tim, thận của chuột nhóm đối chứng và thí nghiệm cao CoAEO.



Hình 3. 10. Mô bệnh học tim, gan, thận của chuột nhóm chứng và uống CoAEO
Kiểm tra hình thái và mô học các phần gan, thận, tim của chuột được điều trị bằng dịch chiết 2000, 4000 và 6000 mg/kg bw cao CoAEO trong Hình 3.9 cho thấy cấu trúc bình thường của gan với sự xuất hiện bình thường của tĩnh mạch trung tâm và hình sinh thiết gan được lót bởi các tế bào nội mô và Kupffer tương tự như đối chứng. Các tế bào gan có kích thước và hình dạng bình thường, và không có không bào nào được ghi nhận trong tế bào chất của chúng. Mặt khác, cấu trúc tiểu thùy bình thường của gan không bị ảnh hưởng; tế bào gan và tế bào Kupffer cũng bình

thường. Ngoài ra, không có thay đổi liên quan đến điều trị về đường kính và hình dạng của các tĩnh mạch trung tâm, xoang gan và tĩnh mạch cửa. Đánh giá hình thái và mô bệnh học các phần thận của chuột được điều trị bằng CoAEO trong 14 ngày ở liều uống 2000, 4000 và 6000 mg/kg thể trọng cho thấy không có thay đổi mô bệnh học so với đối chứng. Mô học thận của cả động vật được điều trị đối chứng và dịch chiết cho thấy các đặc điểm bình thường, cấu trúc cầu thận và ống thận còn nguyên vẹn. Các búi mao mạch và kích thước của không gian Bowman cũng bình thường. Hơn nữa, các ống xoắn gần, ống lượn xa, quai Henle, ống góp, điểm vàng và tế bào trung bì đường như bình thường sau khi dùng cả hai liều so với thận đối chứng. Các đặc điểm mô học của tim cho thấy các tế bào tim bình thường với nhân nổi rõ, cấu trúc tế bào cơ tim và mô liên kết vẫn bình thường ở cả nhóm điều trị và nhóm chứng.

Như vậy: Không có sự khác biệt nào về tổng số lượng bạch cầu và tổng số protein huyết thanh ở nhóm chứng và nhóm được điều trị sau khi sử dụng cao CoAEO cấp tính ở cả ba liều. Không có sự khác biệt về trọng lượng tương đối của gan, thận, tim được phát hiện giữa nhóm đối chứng và nhóm được điều trị. Các thay đổi mô bệnh học nhẹ được quan sát thấy ở chuột của nhóm dùng liều cao không kèm theo bất kỳ thay đổi đáng kể nào trong các dấu hiệu sinh hóa của tổn thương gan đo được. Không quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về các dấu hiệu sinh hóa của nhiễm độc gan (tổng protein huyết thanh). Không có sự khác biệt đáng kể về trọng lượng tương đối của thận, tim được quan sát thấy ở những con chuột được điều trị đối chứng và trích ly ở cả ba mức liều. Không có giá trị nào của các xét nghiệm chức năng thận đo được (nồng độ urê và creatinin huyết thanh) khác biệt đáng kể ở động vật được điều trị và đối chứng. Bên cạnh đó, kiểm tra mô học so sánh các phần thận, tim của chuột được điều trị và chuột đối chứng trong Hình 3.10 cho thấy không có thay đổi đáng kể nào liên quan đến việc điều trị bằng dịch chiết.

Kết luận: Kết quả đánh giá độ an toàn và điều tra độc tính cấp tính đối với cao CoAEO đã được thử nghiệm ở liều mức liều cao (2000, 4000 và 6000 mg/kg thể trọng) trong 14 ngày không gây tác dụng phụ nghiêm trọng đối với sự phát triển cơ thể, trọng lượng cơ quan tương đối, các thông số huyết học, sinh hóa cũng như hình thái ngoài,

mô bệnh học của tim, gan và thận ở chuột. Do đó, dịch cao CoAEO không có độc tính đối với chuột Swiss albino ở mức liều khảo sát.

3.6.2. Độc tính bán trường diễn

3.6.2.1. Kiểm tra thể chất

Bảng 3. 23. Các phản ứng hành vi và ngoại hình chung của chuột được điều trị bằng EtCA trong khảo sát độc tính bán mãn tính trên chuột sau 14 ngày.

Quan sát	Nhóm kiểm soát	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg	400 mg/kg
Nhiệt độ	Bình thường (36,5 – 38 ⁰ C)	Bình thường (36,5 – 38 ⁰ C)	Bình thường (36,5 – 38 ⁰ C)	Bình thường (36,5 – 38 ⁰ C)	Bình thường (36,5 – 38 ⁰ C)
Thay đổi làn da	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi
Thay đổi màu mắt	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi	Không thay đổi
Vóc dáng chung	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường	Bình thường
Bệnh tiêu chảy	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Hôn mê	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Buồn ngủ	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện	Không hiện diện
Nhịp hô hấp	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút	Bình thường 80-230 nhịp/phút
Nhịp tim	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút	Bình thường 310-840 nhịp/phút
Vận động	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt	Linh hoạt
Phản xạ	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát	Nhanh, hoạt bát
Tử vong	Sống sót	Sống sót	Sống sót	Sống sót	Sống sót

Kết quả được trình bày ở Bảng 3.23 cho thấy hình thái của chuột giữa nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm có sự giống nhau về màu mắt, độ mượt của lông, tỉ lệ kích thước giữa cơ thể chuột và chiều dài đuôi, lượng nước uống, ... Tuy nhiên, ở các nhóm thí nghiệm chuột sử dụng lượng thức ăn nhiều hơn so với nhóm đối chứng nên trọng lượng tăng mạnh. Hành vi giữa các cá thể chuột trong nhóm với nhau có sự tương quan hòa đồng không có biểu hiện bất thường ở từng cá thể như cắn nhau. Vận động, leo trèo của chuột ở các nhóm thí nghiệm năng động, linh hoạt hơn nhóm đối chứng. Sau khi uống cao CoAEO ta quan sát thấy chuột không có biểu hiện gì khác lạ, mắt sáng, lông mượt, phân khô, linh hoạt, chuột ăn uống, bài tiết, hoạt động bình thường. Đặc biệt là không có chuột nào có biểu hiện bất thường như co giật, thờ ơ, ... ở các nhóm và quan sát không thấy có dấu hiệu ngộ độc nào ở chuột trong thời gian uống, theo dõi này giống với kết quả nghiên cứu của Mai Khanh và ctv.(2017), Cristiani và ctv.(2005) (Burger và ctv, 2005; Khanh và ctv, 2017). Với khảo sát thử độc tính bán mãn tương tự như khảo sát độc tính cấp các cá thể chuột có nhịp hô hấp ổn định và trong mức bình thường là 80-230 nhịp/phút tương tự như nhóm đối chứng. Đây là khoảng giới hạn về nhịp hô hấp ổn định của chuột bình thường chứng minh chúng hoàn toàn khỏe mạnh. Nhịp thở là giá trị đo về số lần thở trong một phút của người khỏe mạnh được kiểm soát bởi trung tâm hô hấp. Nhịp thở bất thường liên quan đến các bệnh lý hô hấp và thần kinh, mất cân bằng pH, rối loạn nồng độ O₂ và nồng độ CO₂. Trong nghiên cứu của chúng tôi về hình thái của chuột trước, trong và sau khi uống cao CoAEO ở mô hình thử độc tính bán mãn tính tương đương với kết quả nghiên cứu của Sook và ctv. (2011) (Hor và ctv, 2011) khi thử độc tính của nấm *Trametes versicolor* với thành phần chứa saponin, tannin, flavonoid, steroid, terpenoid và glycoside.... (Awala và Oyetayo, 2015).

3.6.2.2. Huyết học và sinh hóa máu

Kết quả Bảng e.6 và e.7 trong phụ lục PLE.2 cho thấy hàm lượng RBC của chuột nhóm 300 mg/kg ($8,2 \pm 0,4 \times 10^6$ tb/mm³) trong tại thời điểm 0 tuần cao hơn các nhóm còn lại ($7,3 \pm 0,2 \times 10^6$ tb/mm³ – nhóm 100 mg/kg, $7,5 \pm 0,3 \times 10^6$ tb/mm³- nhóm 200 mg/kg, $7,6 \pm 0,4 \times 10^6$ tb/mm³ – nhóm 400 mg/kg) ($P < 0,05$). Ở tuần thứ 12 lượng RBC của nhóm 200 mg/kg là $8,3 \pm 0,2 \times 10^6$ tb/mm³ khác biệt so với nhóm 400 mg/kg

là $9,1 \pm 0,2 \times 10^6$ tb/mm³. Mặc dù có sự khác biệt về lượng RBC giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, tất cả các giá trị RBC trong nghiên cứu này đều nằm trong khoảng giới hạn về giá trị RBC trung bình của chuột bình thường theo kết quả nghiên cứu của Wilson và ctv. (2016) và Wolford và ctv. (1998) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Nguyên nhân là do số lượng RBC trong máu chuột tăng cao vì sau khi uống cao chiết CoAEO đã di chuyển từ ruột qua gan, vào máu và thải ra ngoài qua nước tiểu. Vì vậy, trong thời gian này, cao chiết CoAEO bắt đầu tích trữ trong máu và gây ảnh hưởng lên RBC. Trong 12 tuần chúng tôi nhận thấy lượng HgB dao động mạnh ở các nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Vào tuần thứ 8 tuần, lượng HgB nhóm 100 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng (lượng HgB của nhóm 100 mg/kg là $12,4 \pm 0,4$ g/dL, nhóm đối chứng là $11,9 \pm 0,3$ g/dL). Và ở thời điểm 12 tuần lượng HgB của nhóm 300 mg/kg tăng lên so với nhóm đối chứng (lượng HgB của nhóm 300 mg/kg là $14,9 \pm 0,4$ g/dL, nhóm đối chứng là $12,3 \pm 0,4$ g/dL). Mặc dù, lượng HgB trong các nhóm thí nghiệm (nhóm được uống cao chiết CoAEO) tăng cao hơn so với nhóm đối chứng, nhưng chúng vẫn nằm trong khoảng giới hạn về HgB của chuột bình thường (11,6 - 15,8 g/dL) theo công bố của Ed Wilson và ctv. (2016), và Wolford và ctv. (1986) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Trong 12 tuần chúng tôi nhận thấy lượng HCT cũng tăng đáng kể ở các nhóm cho thử cao chiết CoAEO với liều lượng 100, 200, 300, 400 mg/kg so với nhóm đối chứng đặc biệt biểu hiện rõ ở tuần thứ 8 và tuần thứ 12. Cụ thể tại tuần thứ 8 lượng HCT của nhóm 400 mg/kg lên đến 47,9% so với nhóm đối chứng chỉ 41%. Tại tuần thứ 12 là 50,1% ở nhóm nhóm 400 mg/kg so với nhóm đối chứng chỉ đạt 41,9% ($P < 0,05$). Mặc dù lượng HCT tăng mạnh nhưng vẫn nằm trong khoảng giới hạn cho phép (37,4 – 51,7) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Sự thay đổi lượng HCT trong máu cho thấy khi uống cao chiết CoAEO, chuột thí nghiệm tăng cường trao đổi chất mạnh nhưng vẫn trong tầm kiểm soát. HCT trong máu của chuột được uống cao chiết CoAEO ở mô hình thử độc tính bán mãn tính trên chuột Swiss albino cho kết quả tương đương với nghiên cứu của Sook và ctv.(2011) (Hor và ctv, 2011) khi khảo sát độc tính của nấm vân chi (*C. versicolor*) trong thành phần chứa flavonoit, saponin, tecpenoit, tannin, steroid và glycosit (Leliebre-Lara và ctv, 2015). Hàm lượng MCH

của nhóm 200 mg/kg ở thời điểm 4 tuần là $14,7 \pm 0,02$ pg cao hơn 0,4 pg so với nhóm 100 mg/kg cùng thời điểm là $14,3 \pm 0,03$ pg và sau 12 tuần thì lượng MCH lần lượt là $16,5 \pm 0,03$ pg ở nhóm 200mg/kg là $15,8 \pm 0,02$ pg ở nhóm 100 mg/kg cao hơn 0,7 pg ($P < 0,05$). Nếu so với nhóm đối chứng thì lượng MCH tăng khá nhiều khi ở thời điểm 4 tuần nhóm 400 mg/kg là $16,7 \pm 0,03$ pg cao hơn 3,7 pg so với nhóm đối chứng là $13 \pm 0,03$ pg và sau 12 tuần thì lượng MCH lần lượt là $18,4 \pm 0,03$ pg ở nhóm 400 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng ($14,4 \pm 0,03$ pg) là 4 pg ($P < 0,05$). Tuy nhiên lượng MCH của các nhóm thí nghiệm tăng cao hơn so với nhóm đối chứng, nhưng không vượt quá lớn và nằm trong khoảng giới hạn về MCH bình thường (14,1 - 18,4 pg) theo nghiên cứu của Ed Wilso và ctv. (2016) và Wolford và ctv. (1986). Hàm lượng MCHC của nhóm 300 mg/kg là cao nhất và cao hơn so với nhóm đối chứng là 2,23 g/dl ($P < 0,05$). Sau 12 tuần lượng MCHC ở nhóm 400 mg/kg tăng cao hơn so với nhóm đối chứng là 3,07 g/dl. Bên cạnh đó thì lượng MCHC ở nhóm đối chứng lại thấp hơn so với nhóm 200 mg/kg là 1,39 g/dl ($P < 0,05$). Mặc dù có khác biệt về lượng MCHC giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, các giá trị MCHC đều nằm trong khoảng giới hạn về giá trị MCHC trung bình của chuột bình thường theo kết quả nghiên cứu của Ed Wilson và ctv. (2016) và Wolford và ctv. (1998). Nguyên nhân là do khi uống cao chiết CoAEO vào trong máu chuột tăng lên vì sau khi được uống cao chiết CoAEO, dịch chiết đã di chuyển từ ruột qua gan, thấm vào máu và thải ra ngoài qua nước tiểu ở thời gian đầu. Hàm lượng PLT của các nhóm 100, 200, 300 và 400 mg/kg so với nhóm đối chứng có nhiều sự khác nhau rõ rệt ($P < 0,05$). Sau 4 tuần uống cao chiết CoAEO, lượng PLT của nhóm 200 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là $60,8 \times 10^3$ tb/mm³. Sau 12 tuần uống cao chiết CoAEO, hàm lượng PLT của nhóm 400 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là 85×10^3 tb/mm³. Tuy các nhóm chuột thí nghiệm được uống cao chiết CoAEO có lượng PLT tăng cao hơn so với nhóm đối chứng, nhưng nằm trong khoảng giới hạn về lượng PLT của chuột bình thường ($325 - 888 \times 10^3$ tb/mm³) (Loha và ctv, 2019; Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Vì thế cao chiết CoAEO an toàn với các nhóm chuột thí nghiệm. Hàm lượng WBC khác biệt rõ rệt so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Ở tuần thứ 8 lượng WBC nhóm đối chứng lên đến $3,9 \times 10^3$ tb/mm³ so với nhóm 400 mg/kg

là $3,0 \times 10^3$ tb/mm³, thấp nhất là nhóm 300 mg/kg chỉ $2,8 \times 10^3$ tb/mm³ ($P < 0,05$). Mặc dù lượng WBC biến động mạnh trong quá trình khảo nghiệm nhưng nằm trong khoảng giới hạn WBC chuột bình thường (từ $1,5 - 4,8 \times 10^3$ tb/mm³) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). CoAEO không gây độc đối với chuột được khảo nghiệm ở mức liều bán mãn tính. Chỉ số lymphocyte của nhóm 100 mg/kg ở thời điểm 4 tuần cao hơn 4,4% so với nhóm đối chứng và thấp hơn 9,9% so với nhóm 300 mg/kg ($P < 0,05$). Sau 12 tuần chỉ số Lymphocyte ở nhóm 100 mg/kg cao hơn 4,2% so với nhóm đối chứng, thấp hơn 9,6% so với nhóm 300 mg/kg ($P < 0,05$). Chỉ số Lymphocyte ở các nhóm thí nghiệm vẫn nằm trong khoảng giới hạn về chỉ số Lymphocyte ở chuột bình thường (65 - 87%) theo kết quả nghiên cứu của Ed Wilso và ctv. (2016) và Wolford và ctv. (1986). Hàm lượng monocyte ở thời điểm tuần thứ 4 của nhóm 200 mg/kg cao hơn nhóm 100 mg/kg là 1,77% ($P < 0,05$). Sau 12 tuần nhóm 400 mg/kg cao hơn hẳn so với nhóm đối chứng với lượng monocyte là 3,32% ($P < 0,05$). Mặc dù có sự thay đổi về lượng monocyte giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, các giá trị monocyte trong nghiên cứu này đều nằm trong khoảng giới hạn (0 - 6 %) về giá trị monocyte trung bình của chuột bình thường theo kết quả nghiên cứu của Ed Wilson và ctv.(2016) và Wolford và ctv. (1998). Hàm lượng neutrophil có sự dao động mạnh về giữa các nhóm thí nghiệm 100, 200, 300 và 400 mg/kg so với nhóm đối chứng. Sau 4 tuần uống CoAEO, nhóm 400 mg/kg có lượng Neutrophil là $19,5 \pm 0,9\%$ cao hơn là 5,4% so với nhóm đối chứng là $14,1 \pm 1,3\%$ và thấp hơn 1,6% nhóm 300 mg/kg là $21,1 \pm 1,3\%$. Sau 12 tuần, lượng Neutrophil của nhóm 400 mg/kg là $22,8 \pm 1,2\%$ cao hơn 5,4% so với nhóm đối chứng là $17,4 \pm 1,0\%$, thấp hơn 1,8% so với nhóm 300 mg/kg có lượng Neutrophil $24,6 \pm 1,2\%$. Tuy rằng lượng Neutrophil trong máu ở nhóm thí nghiệm cao hơn so đối chứng, nhưng vẫn nằm trong khoảng giới hạn Neutrophil của chuột bình thường (11 - 29%) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Hàm lượng eosinophil đã tăng đáng kể và giữa các nhóm thí nghiệm với nhau và sự khác biệt được thể hiện rõ ràng. Ở tuần thứ 8, lượng eosinophil tăng dần từ nhóm đối chứng là $2,7 \pm 0,09\%$, đến nhóm 100 mg/kg là $3,5 \pm 0,12\%$ và cao nhất là ở nhóm 400 mg/kg lượng Eosinophil tăng lên đến $4,3 \pm 0,05\%$ ($P < 0,05$). Tuần thứ 12, khác biệt về lượng Eosinophil của nhóm 400 mg/kg so với nhóm đối chứng lại

càng thể hiện rõ $4,9 \pm 0,05\%$ so với $3,2 \pm 0,10\%$ ($P < 0,05$). Trong suốt quá trình khảo nghiệm chúng tôi nhận thấy lượng eosinophil tuy có tăng cao và biến động nhưng vẫn luôn trong khoảng giới hạn về mức biến động eosinophil của chuột bình thường (Từ 0 - 5%) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986). Chỉ số basophil thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng. Ở nhóm 300 mg/kg thời điểm 4 tuần cao hơn 0,47% so với nhóm đối chứng và sau 12 tuần thì ở nhóm 300 mg/kg cao hơn 0,64% so với nhóm đối chứng cùng thời điểm. Tuy vậy chỉ số basophil vẫn nằm trong ngưỡng cho phép và phù hợp với khoảng giới hạn về chỉ số eosinophil trong máu theo kết quả nghiên cứu của Ed Wilso và ctv. (2016) và Wolford và ctv. (1986).

Từ kết quả phân tích ở Bảng e.7 trong phụ lục PLE.2 cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về hàm lượng protein trong huyết thanh giữa các nhóm thí nghiệm. Ở tuần thứ 8 nhóm 400 mg/kg có lượng protein tổng là 5,7 g/dl cao hơn so với nhóm đối chứng (5,1 g/dl) ($P < 0,05$); cho đến tuần thứ 12 lượng protein tổng của các nhóm đều tăng. Nhóm đối chứng là 5,2 g/dl thấp hơn so với lượng protein của nhóm 400 mg/kg là 5,8 g/dl ($P < 0,05$). Có thể thấy được trong 2 mô hình khảo sát độc tính cấp và bán mãn tính lượng protein tổng lúc tăng, lúc giảm thể hiện rõ sự tác động của CoAEO gây ảnh hưởng đến protein tổng trong huyết tương. Tuy nhiên, sự khác biệt ở các nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng không ảnh hưởng đến sinh lí của chuột. Chỉ số albumin ở thời điểm 4 tuần đầu tiên, của nhóm đối chứng là $1,0 \pm 0,2$ g/dl thấp hơn 1,5 g/dl so với nhóm 400 mg/kg là $2,5 \pm 0,1$ g/dl ($P < 0,05$). Và sau 12 tuần, chỉ số albumin của nhóm đối chứng là $1,6 \pm 0,2$ g/dl thấp hơn 1,4 g/dl so với nhóm 400 mg/kg là $3,0 \pm 0,2$ g/dl ($P < 0,05$). Tuy có khác biệt ở các nhóm thí nghiệm nhưng chỉ số albumin ở hai mô hình đều nằm trong khoảng giới hạn về chỉ số albumin (1,3 - 3,2) theo nghiên cứu của Ed Wilson và ctv. (2016) và Wolford và ctv.(1986).

Hàm lượng glucose tại thời điểm 4 tuần ở nhóm đối chứng là thấp nhất ($78,33 \pm 1,37$ mol/l), cao nhất là ở nhóm 400 mg/kg ($113,74 \pm 1,27$ mol/l) ($P < 0,05$). Đến thời điểm là 12 tuần thì lượng glucose ở nhóm 300 mg/kg cao hơn nhóm 200 mg/kg là 10,89 mol/l ($P < 0,05$) và cao hơn nhóm đối chứng là 27,78 mol/l ($P < 0,05$). Tuy nhiên, tất cả các giá trị glucose trong nghiên cứu này đều nằm trong khoảng giới hạn (75 - 128 mol/l) về giá trị của glucose trung bình của chuột bình thường theo kết quả nghiên

cứu của Ed Wilson và ctv. (2016), Wolford và ctv. (1998). Hàm lượng cholesterol trong 12 tuần khảo sát của các nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng có biến động nhẹ. Vào tuần thứ 8, tuy lượng cholesterol của nhóm 200 mg/kg cao hơn nhóm 300, 100 mg/kg và nhóm đối chứng, nhưng vẫn thấp hơn nhóm 400 mg/kg ở cùng thời điểm (lượng cholesterol của nhóm đối chứng là $133,2 \pm 3,0$ mg/dl, nhóm 100 mg/kg là $136,6 \pm 2,3$ mg/dl, nhóm 200 mg/kg là $142,5 \pm 3,0$ mg/dl, nhóm 300 mg/kg là $139,7 \pm 2,4$ mg/dl và nhóm 400 mg/kg là $145,5 \pm 2,2$ mg/dl) ($P < 0,05$). Sang tuần thứ 12, nhóm 400 mg/kg lượng cholesterol cao hơn nhóm đối chứng là 12,2 mg/dl, cao hơn nhóm 300 mg/kg là 6 mg/dl. Mặc dù lượng cholesterol trong máu giữa nhóm đối chứng và nhóm thí nghiệm tăng nhưng vẫn nằm trong khoảng giới hạn cholesterol trong máu chuột bình thường (117 - 150 mg/dl). Chỉ số triglycerid có biến động trong 12 tuần của các nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Sau 4 tuần uống cao chiết CoAEO, các nhóm chuột thí nghiệm đều cao hơn nhóm đối chứng về chỉ số triglycerit, nhóm 100 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là 4,9 mg/dl, nhóm 200 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là 6 mg/dl, nhóm 300 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là 11,5 mg/dl, nhóm 400 mg/kg cao hơn nhóm đối chứng là 15,1 mg/dl ($P < 0,05$). Sang tuần thứ 12, nhóm có chỉ số triglycerit cao nhất vẫn là nhóm 400 mg/kg ($97,2 \pm 1,5$ mg/dl) và nhóm có lượng triglycerid thấp nhất vẫn là nhóm đối chứng ($82,9 \pm 1,5$ mg/dl). Mặc dù chỉ số triglycerit trong máu chuột uống chiết xuất CoAEO tăng nhẹ nhưng chưa vượt khoảng giới hạn an toàn về chỉ số triglycerid của chuột bình thường (62 - 155 mg/dl) (Santos và ctv, 2016; Wolford và ctv, 1986).

Kết quả phân tích huyết học và sinh hóa máu cho thấy giữa các lô thí nghiệm và đối chứng có kết quả không có sự khác biệt nhiều. Điều đó cho thấy cao CoAEO không có làm ảnh hưởng có hại tới chỉ tiêu máu.

3.6.2.3. Trọng lượng cơ quan tương đối

Cơ quan tim: trong Bảng e.8 của Phụ lục PLE.2 sau 8 tuần cho chuột uống cao CoAEO trọng lượng tương đối của tim ở nhóm đối chứng là $0,65 \pm 0,02$ (%), nhóm cao nhất 400 mg/kg là $0,85 \pm 0,02$ (%) ($P < 0,05$). Đến tuần thứ 12 trọng lượng tương đối tim của các nhóm tiếp tục tăng với nhóm đối chứng là $0,72 \pm 0,04$ (%), nhóm 400 mg/kg tăng lên $0,92 \pm 0,02$ (%) ($P < 0,05$). Số liệu từ các nhóm thí nghiệm cho thấy

rõ sự khác biệt về trọng lượng tương đối của các nhóm thí nghiệm sau khi sử dụng các liều lượng cao CoAEO khác nhau so với nhóm đối chứng. Mặc dù kết quả thu được có sự biến động liên tục nhưng dao động trong giới hạn về trọng lượng tương đối của tim ở chuột bình thường (Michael và ctv, 2007; Webster và Liljegren, 1955). Điều đó thể hiện rằng cao chiết CoAEO không gây độc cho tim.

Cơ quan gan: sau 4 tuần đầu, trọng lượng tương đối của gan, nhóm đối chứng là $6,3 \pm 0,04$ % cao hơn nhóm 300 mg/kg là $6,2 \pm 0,04$ % và xấp xỉ nhóm 400 mg/kg là $6,3 \pm 0,04$ % ($P < 0,05$). Sau 12 tuần thì trọng lượng tương đối của gan ở nhóm đối chứng là $6,5 \pm 0,03$ % xấp xỉ nhóm 300 mg/kg là $6,5 \pm 0,03$ % và thấp hơn nhóm 400 mg/kg là $6,6 \pm 0,03$ %. Kết quả cho thấy khi chuột được uống cao CoAEO không ảnh hưởng tới gan, vì vậy trọng lượng tương đối của gan có dao động và khác biệt ở các nhóm, tuy nhiên vẫn trong khoảng giới hạn về trọng lượng tương đối của gan bình thường ($5,7 - 6,7$ %) ($P < 0,05$) (Michael và ctv, 2007; Webster và Liljegren, 1955).

Cơ quan thận: tại thời điểm tuần 4 ở nhóm 400 mg/kg có trọng lượng tương đối của gan cao nhất là $1,9 \pm 0,02$ % và cao hơn nhóm 300 mg/kg là $0,5$ % ($P < 0,05$); Đến thời điểm tuần 8 thì trọng lượng tương đối của thận có sự tăng lên qua các nhóm, nhóm đối chứng nhỏ hơn so với nhóm 100 mg/kg ($0,1$ %) và cũng nhỏ hơn so với nhóm 200 mg/kg ($0,2$ %) ($P < 0,05$). Mặc dù có sự khác biệt về trọng lượng tương đối giữa các nhóm thí nghiệm và nhóm đối chứng. Tuy nhiên, tất cả các giá trị trong nghiên cứu này đều nằm trong khoảng giới hạn về giá trị trung bình của chuột bình thường theo kết quả nghiên cứu của Atilla và ctv. (2014) (Yoldas và Dayan, 2014).

Cơ quan lá lách: trong 12 tuần, trọng lượng tương đối của lá lách giữa các nhóm thí nghiệm với nhóm đối chứng thay đổi không nhiều. Vào tuần thứ 8, trọng lượng tương đối của lá lách cao nhất là nhóm 200, 300 và 400 mg/kg đều bằng $0,8$ %, thấp nhất là nhóm đối chứng ($0,6 \pm 0,02$ %) ($P < 0,05$). Qua tuần thứ 12, trọng lượng tương đối của các nhóm thí nghiệm đều cao hơn nhóm đối chứng (trọng lượng tương đối của nhóm đối chứng là $0,5 \pm 0,05$ %, nhóm 100 mg/kg là $0,8 \pm 0,06$ %, nhóm 200 mg/kg là $0,6 \pm 0,08$ %, nhóm 300 mg/kg là $0,7 \pm 0,05$ %, nhóm 400 mg/kg là $0,9 \pm 0,04$ %). Tuy rằng trọng lượng tương đối của lá lách có thay đổi nhẹ sau khi chuột uống cao chiết CoAEO, nhưng nó vẫn nằm trong giới hạn an toàn về trọng lượng tương

đôi của cơ quan lá lách của chuột bình thường (0,2 - 0,9 %) (Michael và ctv, 2007; Webster và Liljegren, 1955). Do đó cao chiết CoAEO không gây hại gì tới trọng lượng tương đối của lá lách chuột.

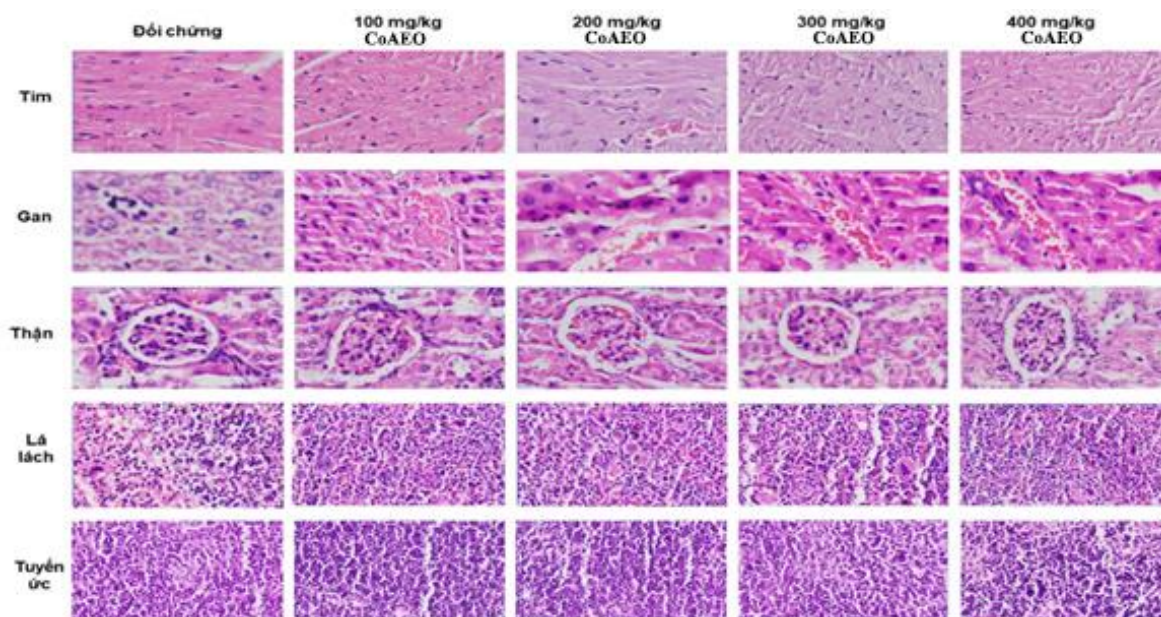
Cơ quan tuyến ức: tại thời điểm tuần thứ 4 nhóm đối chứng có trọng lượng tương đối của tuyến ức là $0,04 \pm 0,01$ % khác biệt so với nhóm 400 mg/kg là $0,05 \pm 0,01$ %, cho đến sau 12 tuần kết quả thu được như sau nhóm đối chứng tăng lên $0,05 \pm 0,01$ %, nhóm 400 mg/kg cũng tăng đến $0,07 \pm 0,01$ % ($P < 0,05$). Trong suốt quá trình nghiên cứu và thu thập số liệu khảo sát độc tính bán mãn tính của cao chiết CoAEO, trọng lượng tương đối của tuyến ức luôn biến động và khác biệt theo từng liều lượng cho uống, thế nhưng kết quả chúng tôi thu được lại hoàn toàn khả quan bởi kết quả luôn nằm trong khoảng giới hạn về trọng lượng tương đối tuyến ức ở chuột bình thường (Michael và ctv, 2007; Webster và Liljegren, 1955).

3.6.2.4. Hình thái ngoài và mô học cơ quan

3.6.2.4.1. Hình thái ngoài các cơ quan



Hình 3. 11. Hình thái đại thể tim, gan, thận, lách, ức chuột trong thử nghiệm độc bán mãn tính



Hình 3. 12. Mô bệnh học tim, gan, thận, lách, ức chuột trong thử nghiệm độc bán mãn tính

Kết quả thu nhận các mẫu cơ quan (tim, gan, thận, lá lách, tuyến ức) của nhóm đối chứng và các nhóm thí nghiệm ở Hình 3.11 cho thấy:

Cơ quan tim: kết quả màu sắc tim của các nhóm thí nghiệm hơi màu đỏ đậm hơn tim của nhóm đối chứng, còn hình thái cũng không có thay đổi đặc biệt vẫn hình tháp, đỉnh tháp nằm dưới đáy hướng lên trên.

Cơ quan gan: gan của các nhóm thí nghiệm không thay đổi nhiều so với nhóm đối chứng, gan nhóm đối chứng có màu tươi hơn các nhóm thí nghiệm, bề mặt ngoài gan của các nhóm thí nghiệm vẫn nhẵn và mềm giống nhóm đối chứng. Hình dạng gan của các nhóm thí nghiệm ko có thay đổi đặc biệt hơn đối chứng, đủ bốn thùy và hai mặt không bị ảnh hưởng bởi cao CoAEO.

Cơ quan thận: kết quả thu được các trạng thái bình thường về thận ở các nhóm thí nghiệm so với nhóm đối chứng. Ở các nhóm thí nghiệm hai quả thận không bị teo hay hoại tử, giữ được màu tươi như thận nhóm đối chứng, mặt trước nhẵn bóng mặt sau sần sùi, kích thước khá tương đồng nhau cho thấy cao CoAEO không gây độc lên thận.

Cơ quan lá lách: lá lách của các nhóm thí nghiệm vẫn giữ được màu đỏ thẫm như nhóm đối chứng, không có khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm về hình dạng tháp ba mặt, một đáy một đỉnh.

Cơ quan tuyến ức: tuyến ức ở các nhóm nghiên cứu không có thay đổi đặc biệt về màu sắc và hình thái, kích thước khá tương đồng với nhóm đối chứng.

3.6.2.4.2. Hình thái mô học các cơ quan

Kết quả trong Hình 3.12 cho thấy các mô cơ tim bình thường, có các vân ngang và vạch bậc thang trên bề mặt sợi cơ, giữa trung tâm của các sợi cơ tồn tại 1 hoặc 2 nhân tế bào. Sợi cơ tim gồm sợi dày, sợi mỏng và tơ cơ, liên kết thông qua hệ thống đĩa đệm xem kẽ để tạo thành các sợi cơ dài có khả năng co bóp; giữa các sợi cơ tồn tại các tế bào nội mô, có hình bầu dục. Trong cơ tim có những tế bào cơ tim hợp nhất hoặc những tế bào cơ tim riêng lẻ. Tế bào cơ tim chứa một nhân cùng nhiều ti thể, các ống T (ống ngang), các túi màng chạy đến bên trong tế bào từ bề mặt; Mỗi tế bào có các sợi protein riêng biệt, nhiều tơ cơ, tổ hợp tạo thành đơn vị co bóp của tế bào cơ. Mô gan có cấu trúc ổn định, tế bào gan, khoảng cửa và các mạch máu bình thường. Tế bào gan có hình khối đa diện bao bọc bởi màng tế bào, giữa là nhân được bao bọc bởi màng nhân, phân biệt rõ với phần tế bào chất bao quanh nhân. Các tế bào nội mô (EC) hình “hạt đậu”, bắt màu đậm hơn, bám vào thành mao mạch, lan tỏa giữa các tế bào gan, các tế bào nội mô có số lượng ít hơn nhiều so với số lượng các tế bào gan. Bề gan và tiểu thùy gan không thay đổi về cấu trúc. Tĩnh mạch trung tâm (CV) có lòng rộng hơn động mạch gan, hình dạng không đều, thành mỏng, được lọc bởi các tế bào nội mô (EC), phía ngoài là một áo xơ, tĩnh mạch trung tâm không giãn, không xung huyết. Cầu thận không thay đổi hình dạng, được bao quanh bởi chất nền trung bì. Có xuất hiện u hạt ở kẽ thận, có thể bị viêm kẽ thận. Nối với cầu thận là ống thận để vận chuyển các chất từ cầu thận đưa qua bể thận. Ống lượn gần có tế bào trụ đơn hình thành và tế bào chất chứa dày đặc ty lạp thể. Quai Henle có hai nhánh mỏng và dày nằm ở vùng túy thận chứa nhiều bào quan và ty thể. Ống lượn xa nằm ở vùng vỏ, đường kính khoảng 40 micron, được các tế bào vuông cao cấu thành, chứa nhiều bào quan và ty thể làm tăng khả năng tái hấp thu và bài tiết các ion dễ dàng. Cấu trúc mô lách bình thường. Các lympho bào bao quanh động mạch rõ ràng. Phân bố của túy trắng và túy đỏ dày đặc, rõ ràng, dễ nhận ra. Ở túy đỏ có tế bào nhu mô lách, xen kẽ xoang tĩnh mạch nối nhau chằng chịt, dài và bám gần các mao mạch. Ở túy trắng các lympho B hay T tập trung đồng đều ở các động mạch hay trung tâm sinh sản. Các tế

bào tập trung nhiều ở vùng rìa nơi chuyển tiếp giữa tủy trắng và tủy đỏ. Mô tuyến ức cấu trúc bình thường. Các tế bào lympho và tế bào võng-biểu mô xếp xen lẫn trong mỗi liên kết sợi. Rải rác xuất hiện một vài tiểu thể Hassall. Tế bào lưới có hình sao lớn, có nhánh bào tương dài. Có nhiều vách liên kết tỏa vào trong nhu mô của tuyến ức và phân chia thành nhiều tiểu thùy. Nổi bật nhất của vùng vỏ là sự tập trung dày đặc của các tế bào lympho nhỏ, còn gọi là tế bào tuyến ức. Ngoài ra còn có một tỉ lệ nhỏ các lympho bào lớn có khuynh hướng tập trung ở lớp ngoại vi vùng vỏ và một số ít các đại thực bào. Các tế bào tuyến ức ở vùng vỏ được ngăn cách với máu trong hệ tuần hoàn nhờ một hàng rào được gọi là hàng rào máu - tuyến ức. Vùng tủy không có hàng rào máu - tuyến ức như ở vùng vỏ mặc dù có tế bào lưới biểu mô nhiều hơn vùng vỏ.

Trong mô hình khảo sát độc tính bán mãn tính cao CoAEO, hình thái ngoài và mô học của các cơ quan nội tạng như tim, gan, thận, lá lách, tuyến ức, ... trong cơ thể có đặc điểm hình thái và chức năng không thay đổi đặc biệt giữa nhóm đối chứng với các nhóm thí nghiệm, chứng minh cho sự an toàn của cao CoAEO không gây ảnh hưởng tới các cơ quan nội tạng. Mẫu vật chúng tôi thu được trong nghiên cứu phù hợp với nghiên cứu của Natalia S và ctv. (2018), Subramanion L.J và ctv. (2011) (Fekih Hassen và ctv, 2013; Jothy và ctv, 2011).

3.7. Ứng dụng tạo sản phẩm thực phẩm dạng bột hòa tan từ cao CoAEO.

3.7.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ hỗn hợp các chất mang (maltodextrin:gum arabic:gelatin) đến độ nhớt dịch sấy phun, hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm bột và thời gian hòa tan của bột.

Theo kết quả số liệu ở Bảng 3.23 ảnh hưởng tỷ lệ các chất mang, cho thấy độ nhớt của tỷ lệ hỗn hợp các chất mang 94:5:1 có độ nhớt thấp hơn so với các tỷ lệ khác khi pha cùng hàm lượng và cùng thời gian hòa tan. Nguyên nhân là tỷ lệ gum arabic và gelatin thấp. Hiệu suất thu hồi bột sau khi sấy ở các tỷ lệ cho thấy tỷ lệ pha trộn các chất mang có hàm lượng maltodextrin 94:x:y cho kết quả cao và không thấy có sự thay đổi về hiệu suất thu hồi bột khi thay đổi hàm lượng gum arabic và gelatin. Trong khi đó, nếu thay đổi hàm lượng maltodextrin 88:11:1; 90:9:1; 92:7:1 thì hiệu suất thu hồi bột sẽ bị giảm xuống. Điều này cũng dễ hiểu là trong các chất mang maltodextrin,

gum arabic và gelatin thì chất mang maltodextrin là dễ sấy hơn so với 2 chất mang còn lại trong quá trình thực nghiệm. Nguyên nhân là dung dịch maltodextrin có độ nhớt thấp hơn nếu hòa tan cùng một nồng độ, chính vì độ nhớt cao của dịch sấy sẽ tạo sương khó hơn và hình thành những giọt sương dài, kích thước lớn ảnh hưởng đến tốc độ thoát ẩm (Rosenberg và ctv, 1990). Độ ẩm của bột sau khi sấy ở tỷ lệ hỗn hợp chất mang 94:5:1 và 94:4:2 thấp hơn các tỷ lệ khác nhưng nhìn chung với giá trị độ ẩm của các tỷ lệ được đánh giá phù hợp cho chế độ bảo quản. Thực hiện kiểm tra thời gian hòa tan của bột sau khi sấy để xem tính khả dụng của sản phẩm bột hòa tan cho thấy thời gian hòa tan thấp nhất ở tỷ lệ hỗn hợp chất mang 94:5:1; 94:4:2 và 94:3:3.

Kết luận: từ các kết quả kiểm tra trên cho thấy tỷ lệ hỗn hợp chất mang 94:5:1 phù hợp để lựa chọn để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả này phù hợp với công trình nghiên cứu của nhóm tác giả Rajabi và ctv. (2015).

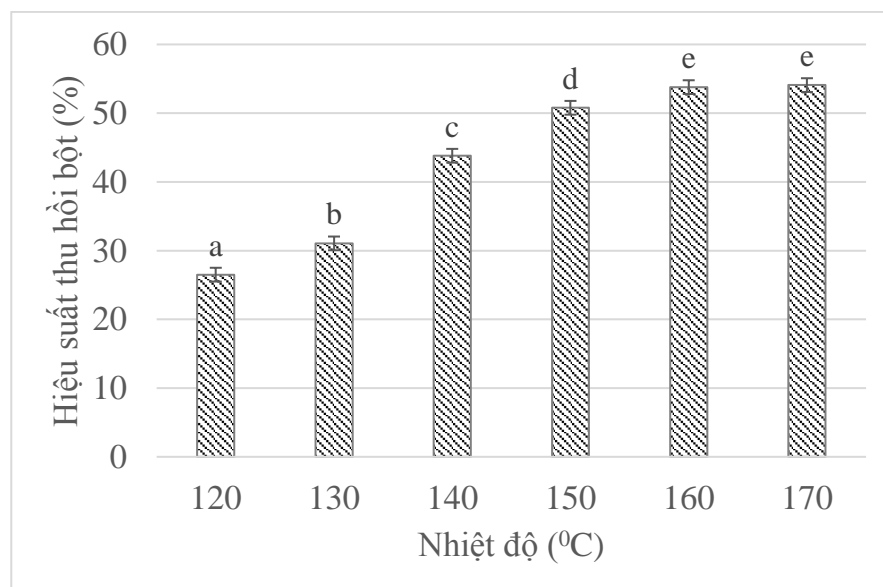
Bảng 3. 24. Ảnh hưởng tỷ lệ các chất mang đến độ nhớt dịch sấy, hiệu suất thu hồi bột, độ ẩm bột và thời gian hòa tan.

Hàm mục tiêu	Tỷ lệ hỗn hợp các chất mang (maltodextrin:gum arabic:gelatin)							
	88:11:1	90:9:1	92:7:1	94:5:1	94:4:2	94:3:3	94:2:4	94:1:5
Độ nhớt (cP)	4,73 ±0,02 ^a	4,16 ±0,01 ^b	3,32 ±0,02 ^c	3,10 ±0,01 ^d	3,12 ±0,01 ^{de}	3,16 ±0,01 ^{ef}	3,18 ±0,01 ^{fg}	3,22 ±0,01 ^g
Hiệu suất (%)	38,33 ±0,15 ^a	43,23 ±0,14 ^b	50,35 ±0,25 ^c	58,10 ±1,21 ^{de}	57,46 ±1,20 ^d	58,06 ±0,40 ^d	58,63 ±0,05 ^{de}	58,50 ±0,20
Độ ẩm (%)	3,60 ±0,13 ^a	3,46 ±0,05 ^{ab}	3,40 ±0,02 ^{bc}	3,20 ±0,15 ^d	3,23 ±0,03 ^{de}	3,26 ±0,10 ^{de}	3,27 ±0,04 ^{de}	3,25 ±0,25 ^{de}
Thời gian hòa tan (phút)	2,76 ±0,05 ^a	2,46 ±0,15 ^b	2,06 ±0,05 ^c	1,43 ±0,12 ^f	1,53 ±0,10 ^{fe}	1,56 ±0,05 ^{fe}	1,60 ±0,10 ^{ed}	1,73 ±0,05 ^d

Các giá trị được thể hiện ± SD của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e,f,g) trong cùng một hàng cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

3.7.2. Thí nghiệm một yếu tố độc lập

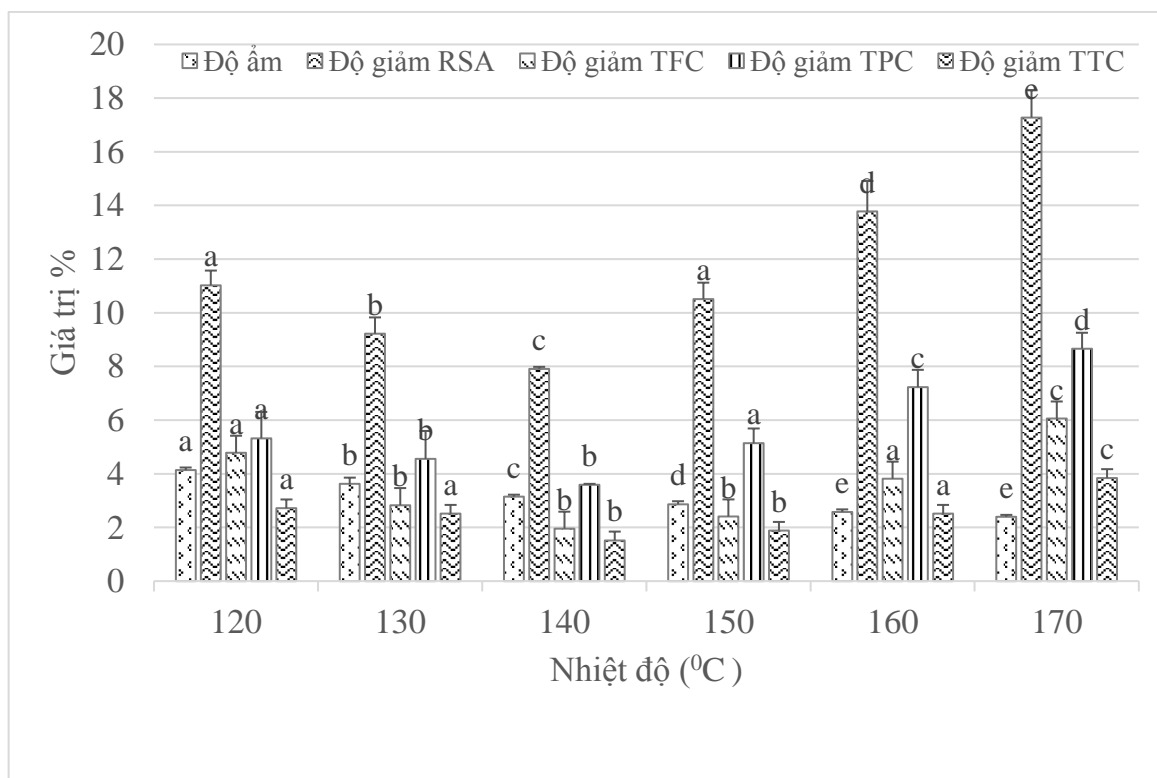
- Ảnh hưởng nhiệt độ đến hiệu suất, độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột sấy phun



Hình 3. 13. Ảnh hưởng của nhiệt sấy phun đến hiệu suất bột thu hồi

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD ($n = 3$), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét Hình 3.13 ảnh hưởng của nhiệt sấy phun đến hiệu suất bột thu hồi, khi nhiệt độ tăng đến 160°C thì hiệu suất thu hồi bột không tăng nữa và đồng thời độ ẩm của bột càng giảm. Ở nhiệt độ 120-130°C bột bị dính trên buồng sấy và cyclone do đó làm hiệu suất thu hồi bột giảm phù hợp với nhận định của tác giả Maury và ctv. (2005) (Maury và ctv, 2005).

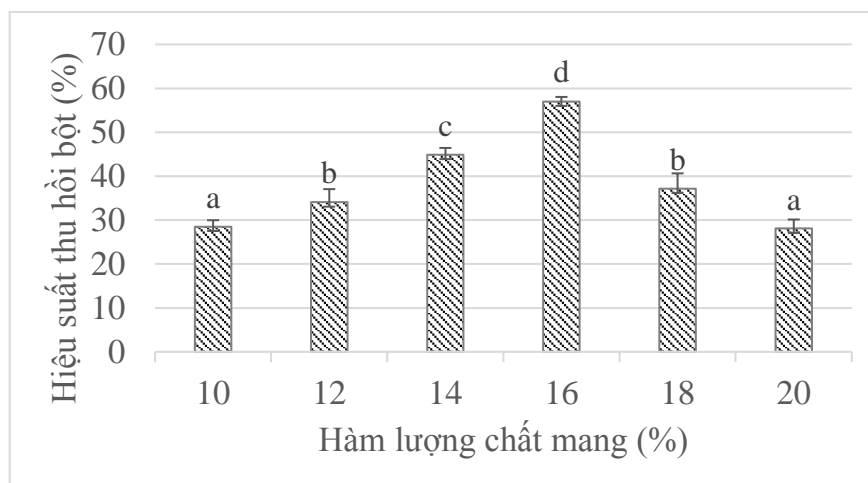


Hình 3. 14. Ảnh hưởng của nhiệt sấy phun đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC,TPC,TTC) của bột thu hồi

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d,e,f) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

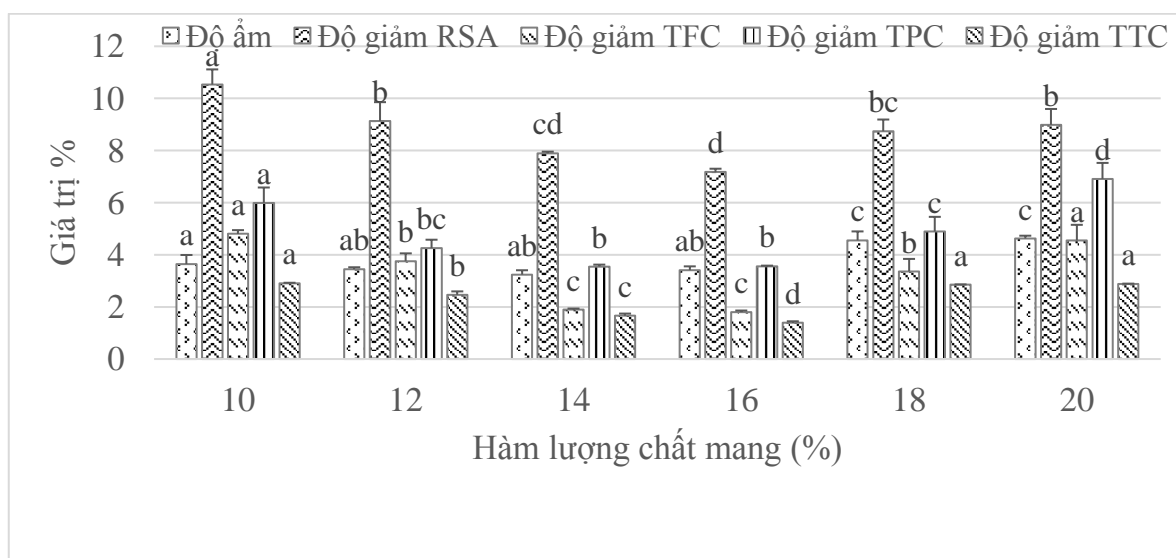
Trên Hình 3.14 ảnh hưởng của nhiệt sấy phun, cho thấy nhiệt độ sấy tăng thì độ giảm (RSA, TFC, TPC) cao và độ ẩm của bột thu hồi thấp. Đối với độ giảm hàm lượng TTC ở nhiệt độ sấy từ 120⁰C -150⁰C có dấu hiệu giảm và từ nhiệt độ sấy 160⁰C-170⁰C thì độ giảm hàm lượng TTC có tăng lên. Theo nghiên cứu của Fang và ctv. (2011) khi sấy ở nhiệt độ 150⁰C phần trăm TFC giảm 6% và TPC giảm 4% (Fang và ctv, 2011), kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu trên. Với độ ẩm của bột sau khi sấy ở nhiệt độ 140⁰C trở lên thì độ ẩm nhỏ hơn 3% phù hợp với nhận định của Tzannis và ctv. (1997) (Ameri và ctv, 2006; Tzannis và ctv, 1997). Từ Hình 3.9 và 3.10 chọn nhiệt độ 140⁰C để thí nghiệm tiếp theo vì độ giảm hàm lượng TTC ít và dễ sấy (bột không bị bám nhiều trên buồng sấy và cyclone).

- **Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến hiệu suất, độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột sấy phun**



Hình 3. 15. Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến hiệu suất của bột thu hồi
 Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét Hình 3.15 khi tăng hàm lượng chất mang lên 16% thì hiệu suất thu hồi bột đạt giá trị cao nhưng sau đó có dấu hiệu giảm ở hàm lượng chất mang lớn hơn 18%. Nguyên nhân là do hàm lượng chất mang cao độ nhớt của dịch sấy phun tăng làm ảnh hưởng quá trình sấy, bột sấy phun dính nhiều lên thành của buồng sấy và cyclone. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nambiar và ctv. (2017) (Nambiar và ctv, 2017).

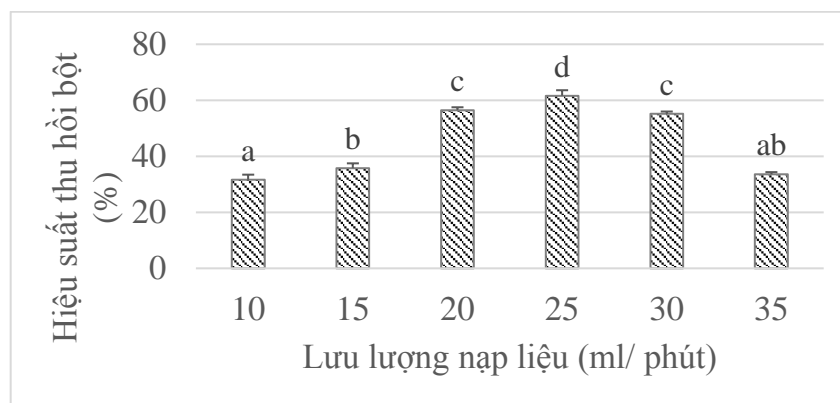


Hình 3. 16. Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột thu hồi

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét trên Hình 3.16 ở hàm lượng chất mang 14 và 16% thì độ ẩm của bột sấy phun có độ ẩm thấp nhất và độ giảm RSA, TFC, TPC, TTC là thấp nhất. Nguyên nhân là quá trình sấy đạt kết quả tốt, bột không bám trên thành của buồng sấy và cyclone do đó ít bị ảnh hưởng ở nhiệt độ cao. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nambiar và ctv. (2017). Vì mong muốn độ giảm TTC là nhỏ nhất do đó lựa chọn hàm lượng chất mang 16% phù hợp cho thí nghiệm kế tiếp.

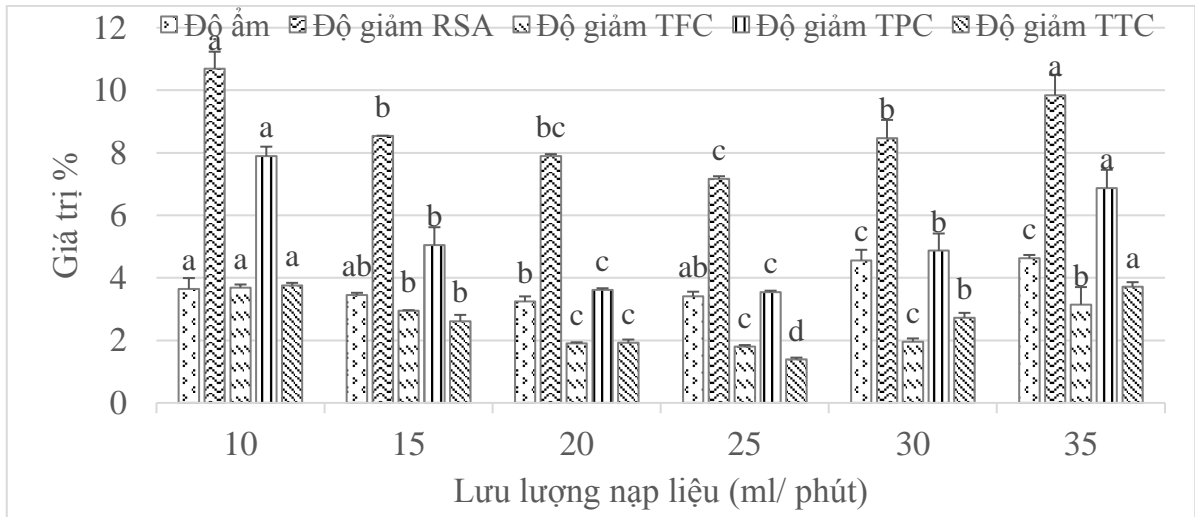
- **Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến hiệu suất, độ ẩm và độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC)**



Hình 3. 17. Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến hiệu suất thu hồi bột

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét trên Hình 3.17 cho thấy lưu lượng 25 ml/phút thì cho được hiệu suất thu hồi bột cao nhất, sau đó hiệu suất thu hồi có dấu hiệu giảm ở khoảng lưu lượng nạp liệu từ 30-35ml/phút. Điều đó phù hợp với quá trình sấy thực tế là lưu lượng nạp liệu cao đồng nghĩa với tốc độ sấy sẽ cao lúc đó bột chưa thoát ẩm tốt, dễ dàng bám lên cyclone và không rơi xuống lọ hứng sản phẩm. Kết quả này phù hợp với nhận định của Maury và ctv. (2005) về ảnh hưởng của lưu lượng nạp liệu đến hiệu suất thu hồi bột.



Hình 3. 18. Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC,TPC,TTC) của bột thu hồi

Kết quả được biểu diễn dưới dạng trung bình \pm SD (n = 3), các chữ cái khác nhau (a,b,c,d) trong cùng một chỉ tiêu cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với $p \leq 0,05$.

Nhận xét trên Hình 3.18 ở lưu lượng nạp liệu từ 10-25ml/ phút thì độ ẩm giảm và độ giảm RSA, TFC, TPC, TTC ít nhưng sau đó có dấu hiệu tăng trở lại. Điều đó cho thấy nếu lưu lượng nạp liệu thấp thì các có sự ảnh hưởng của nhiệt độ lên các chất chuyển hóa bậc 2 nhiều và ngược lại, nhưng nếu lưu lượng nạp liệu cao quá thì tốc độ sấy cao và sẽ làm cho bột sản phẩm có độ ẩm tăng lên (do chưa thoát ẩm kịp) và bột bị dính lên cyclone không xuống lọ hứng mẫu dẫn đến hiệu suất thu hồi giảm.

Từ các kết quả khảo sát các yếu tố độc lập trên chúng tôi chọn ra các mức giới hạn dưới và trên của các yếu tố như sau: nhiệt độ đầu vào từ 130-160°C, hàm lượng chất mang từ 14-18%, lưu lượng nạp liệu 15-30 ml/phút.

3.7.3. Tối ưu hóa

Dựa trên kết quả của các thí nghiệm một yếu tố độc lập, chúng tôi lựa chọn mô hình BBD, chọn mô hình đa thức bậc hai với 15 nghiệm thức để tối ưu hóa bốn biến độc lập, bao gồm X₁: nhiệt độ sấy (°C), X₂: hàm lượng chất mang (%), X₃: lưu lượng nạp liệu (ml/phút). Y₁: hiệu suất (%), Y₂: độ ẩm bột (%), Y₃: độ giảm khả năng kháng oxy hóa (%), Y₄: độ giảm TPC (%), Y₅: độ giảm TFC (%), Y₆: độ giảm TTC (%) theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Sử dụng phần mềm JMP 10.0.0 để phân tích dữ liệu.

Bảng 3. 25. Kết quả hàm mục tiêu

Nghiem thuc	Mã hoa	Yeu to			Hàm mục tiêu					
		X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆
1	-0-	130	16	15	28,87	3,72	9,69	4,09	2,61	1,10
2	0+-	145	18	15	50,37	3,32	11,30	5,41	3,29	1,83
3	-0+	130	16	30	29,78	3,98	9,92	4,87	2,83	1,25
4	000	145	16	22.5	58,06	2,28	9,43	4,49	2,42	1,02
5	+0-	160	16	15	56,72	2,56	13,49	8,51	5,49	2,74
6	000	145	16	22.5	57,89	2,29	9,96	4,37	2,89	1,43
7	0+-	145	14	30	49,06	3,89	10,46	5,42	3,06	2,46
8	0--	145	14	15	46,81	3,02	11,35	6,29	3,35	2,26
9	0++	145	18	30	39,45	3,79	9,98	4,90	2,98	1,58
10	++0	160	18	22.5	57,82	3,05	11,37	6,27	3,86	2,35
11	000	145	16	22.5	59,26	2,47	9,53	4,76	2,35	1,24
12	-+0	130	18	22.5	29,76	3,82	10,17	5,05	2,81	2,01
13	+ -0	160	14	22.5	54,58	2,95	14,32	8,32	5,87	3,43
14	--0	130	14	22.5	31,41	3,52	10,02	5,02	3,11	0,94
15	+0+	160	16	30	42,13	3,67	13,21	8,21	5,19	2,99

X₁: nhiệt độ sấy (°C), X₂: hàm lượng chất mang (%), X₃: lưu lượng nạp liệu (ml/phút).

Y₁: hiệu suất (%), Y₂: độ ẩm bột (%), Y₃: phần trăm giảm khả năng kháng oxy hóa (%), Y₄: phần trăm giảm TPC (%), Y₅: phần trăm giảm TFC (%), Y₆: phần trăm giảm TTC(%).

- Phân tích thống kê và mô hình thích hợp

$$Y_1 = 58,40 + 11,43X_1 - 0,55X_2 - 2,79X_3 - 11,02X_1^2 - 3,98X_2^2 - 7,99X_3^2 + 1,22X_1X_2 - 3,87X_1X_3 - 3,29X_2X_3 \quad (1)$$

Phương trình Y₁ rút gọn:

$$Y_{1'} = 58,40 + 11,43X_1 - 2,79X_3 - 11,02X_1^2 - 3,98X_2^2 - 7,99X_3^2 - 3,87X_1X_3 - 3,29X_2X_3 \quad (1')$$

Trong phương trình (1) Y₁ hiệu suất của bột thu hồi và X₁: nhiệt độ sấy phun, X₂: hàm lượng chất mang, X₃: lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê R² = 0,9859, R²_{Adj} = 0,9607, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng (Adeq precision=20,951) > 4 cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với p < 0,001, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với p=0,0619 > 0,05 là mong

muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 , X_1^2 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Các hệ số X_3^2 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Hệ số X_3 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_2^2 có ảnh hưởng ($p < 0,05$). Còn lại các hệ số X_2 , X_1X_2 , không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_2 = 2,28 - 0,35X_1 + 0,07X_2 + 0,33X_3 + 0,51X_1^2 + 0,53X_2^2 + 0,68X_3^2 - 0,05X_1 X_2 + 0,21X_1X_3 - 0,10X_2X_3 \quad (2)$$

Phương trình Y_2 rút gọn:

$$Y_{2'} = 2,28 - 0,35X_1 + 0,07X_2 + 0,33X_3 + 0,51X_1^2 + 0,53X_2^2 + 0,68X_3^2 + 0,21X_1X_3 - 0,10X_2X_3 \quad (2')$$

Trong phương trình (2) Y_2 độ ẩm của bột thu hồi và X_1 : nhiệt độ sấy phun, X_2 : hàm lượng chất mang, X_3 : lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9985$, $R^2_{Adj} = 0,9836$, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng ($Adeq\ precision = 23,667$) > 4 cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,001$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p = 0,8824 > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 , X_3 , X_1X_3 , X_1^2 , X_2^2 , X_3^2 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Các hệ số X_2 , X_2X_3 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Còn lại các hệ số X_1X_2 , không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_3 = 9,64 + 1,5737X_1 - 0,4162X_2 - 0,2825X_3 + 1,3175X_1^2 + 0,5125X_2^2 + 0,62X_3^2 - 0,775X_1 X_2 - 0,1275X_1X_3 - 0,1075X_2X_3 \quad (3)$$

Phương trình Y_3 rút gọn:

$$Y_{3'} = 9,64 + 1,5737X_1 + 1,3175X_1^2 - 0,775X_1 X_2 \quad (3')$$

Trong phương trình (3) Y_3 phần trăm giảm khả năng chống oxy hóa của bột và X_1 : nhiệt độ sấy phun, X_2 : hàm lượng chất mang, X_3 : lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9499$, $R^2_{Adj} = 0,8597$, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng ($Adeq\ precision = 12,274$) > 4 cho

thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,01$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p=0,1365 > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_1^2 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Hệ số X_1X_2 có ảnh hưởng ít ($p < 0,05$). Còn lại các hệ số $X_2, X_3, X_1X_3, X_2X_3, X_2^2, X_3^2$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_4 = 4,5466 + 1,535X_1 - 0,4275X_2 - 0,1125X_3 + 1,266X_1^2 + 0,3516X_2^2 + 0,6066X_3^2 - 0,52X_1 X_2 - 0,27X_1X_3 + 0,09X_2X_3 \quad (4)$$

Phương trình Y_4 rút gọn:

$$Y_{4'} = 4,5466 + 1,535X_1 + 1,266X_1^2 \quad (4')$$

Trong phương trình (4) Y_4 phần trăm giảm TPC của bột và X_1 : nhiệt độ sấy phun, X_2 : hàm lượng chất mang, X_3 : lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9392$, $R^2_{Adj} = 0,8297$, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng (Adeq precision=10,421) > 4 cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,05$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p=0,0632 > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_1^2 có ảnh hưởng ($p < 0,05$). Còn lại các hệ số $X_1X_2, X_2, X_3, X_1X_3, X_2X_3, X_2^2, X_3^2$ không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_5 = 2,5533 + 1,1312X_1 - 0,3062X_2 - 0,085X_3 + 1,1095X_1^2 + 0,2495X_2^2 + 0,3670X_3^2 - 0,4275X_1 X_2 - 0,13X_1X_3 - 0,005X_2X_3 \quad (5)$$

Phương trình Y_5 rút gọn:

$$Y_{5'} = 2,5533 + 1,1312X_1 + 1,1095X_1^2 \quad (5')$$

Trong phương trình (5) Y_5 phần trăm giảm TFC của bột và X_1 : nhiệt độ sấy phun, X_2 : hàm lượng chất mang, X_3 : lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9410$, $R^2_{Adj} = 0,8348$, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng (Adeq precision=10,922) > 4 cho thấy tín hiệu đầy đủ

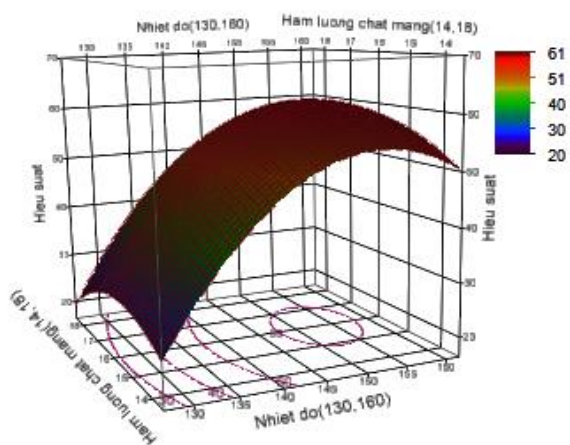
và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,05$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p=0,2359 > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_1^2 có ảnh hưởng nhiều ($p < 0,01$). Còn lại các hệ số X_1X_2 , X_2 , X_3 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_2^2 , X_3^2 không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).

$$Y_6 = 1,23 + 0,7762X_1 - 0,165X_2 + 0,0437X_3 + 0,47X_1^2 + 0,4825X_2^2 + 0,32X_3^2 - 0,5375X_1X_2 + 0,025X_1X_3 - 0,1125X_2X_3 \quad (6)$$

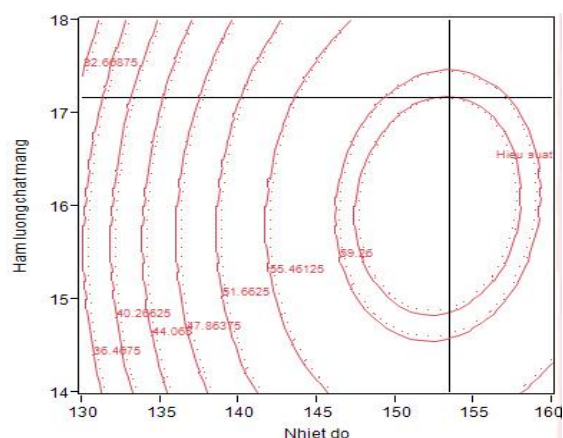
Phương trình Y_5 rút gọn:

$$Y_6' = 1,23 + 0,7762X_1 + 0,47X_1^2 + 0,4825X_2^2 - 0,5375X_1X_2 \quad (6')$$

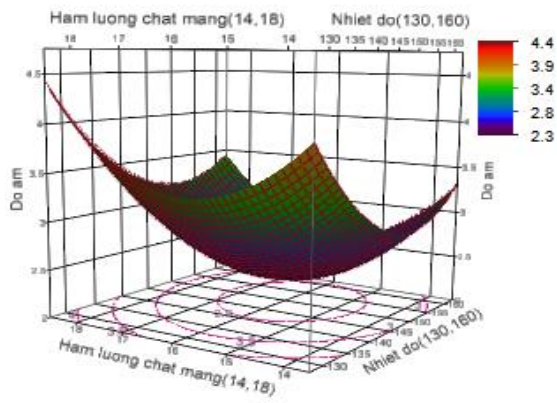
Trong phương trình (6) Y_6 phần trăm giảm TTC của bột và X_1 : nhiệt độ sấy phun, X_2 : hàm lượng chất mang, X_3 : lưu lượng nạp liệu. Kết quả phân tích thống kê $R^2 = 0,9573$, $R^2_{Adj} = 0,8806$, cho thấy mức độ chính xác cao về độ tin cậy của các giá trị thử nghiệm và mức độ tương quan cao giữa các giá trị quan sát và dự đoán, thông số đo tỷ số tín hiệu / nhiễu bằng ($Adeq\ precision = 14,215$) > 4 cho thấy tín hiệu đầy đủ và mong muốn. Giá trị F của mô hình có ý nghĩa với $p < 0,01$, còn lỗi không tương thích thì không đáng kể và không có ý nghĩa thống kê với $p=0,3307 > 0,05$ là mong muốn. Điều đó chứng tỏ mô hình lựa chọn rất phù hợp. Từ phương trình trên có thể thấy rằng các hệ số X_1 có ảnh hưởng rất nhiều ($p < 0,001$). Hệ số X_1^2 , X_2^2 , X_1X_2 có ảnh hưởng ($p < 0,05$). Còn lại các hệ số X_2 , X_3 , X_1X_3 , X_2X_3 , X_3^2 không có ảnh hưởng ($p > 0,05$).



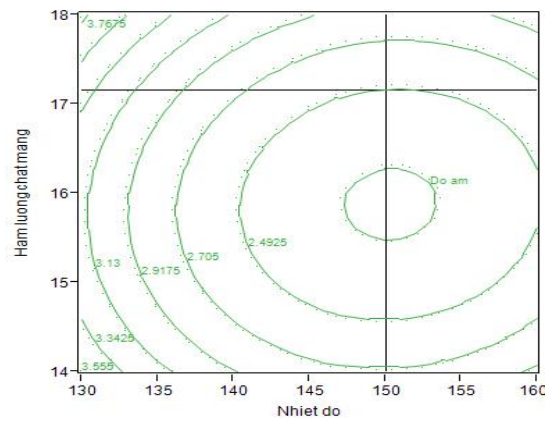
(a)



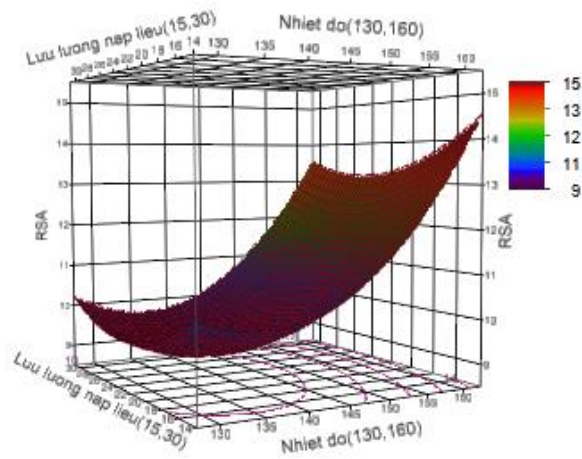
(a')



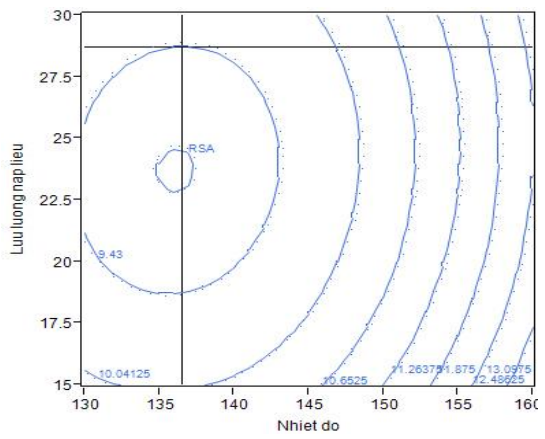
(b)



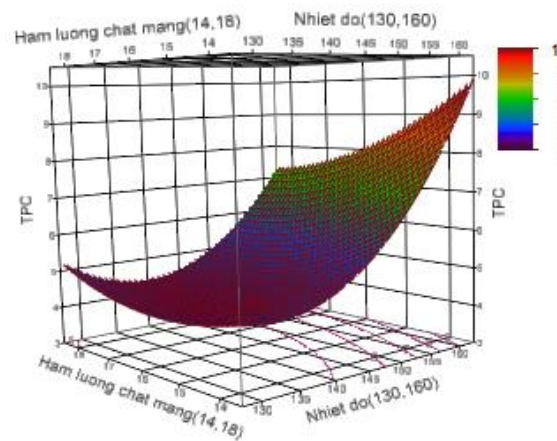
(b')



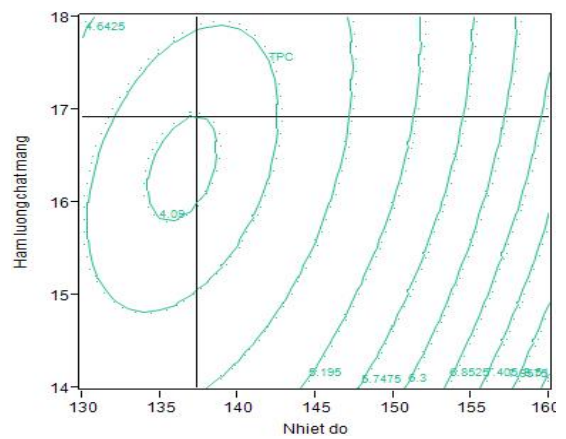
(c)



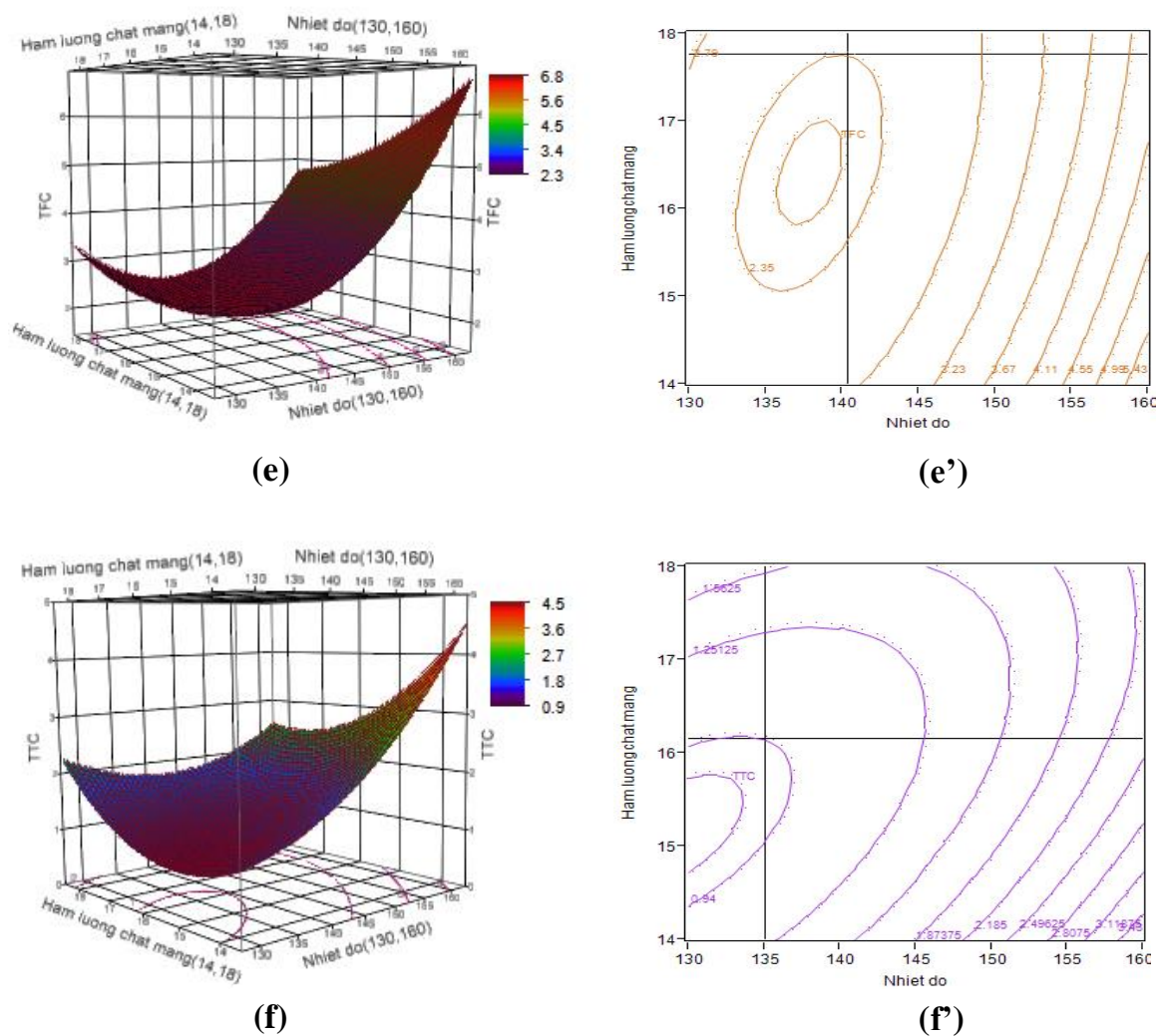
(c')



(d)



(d')

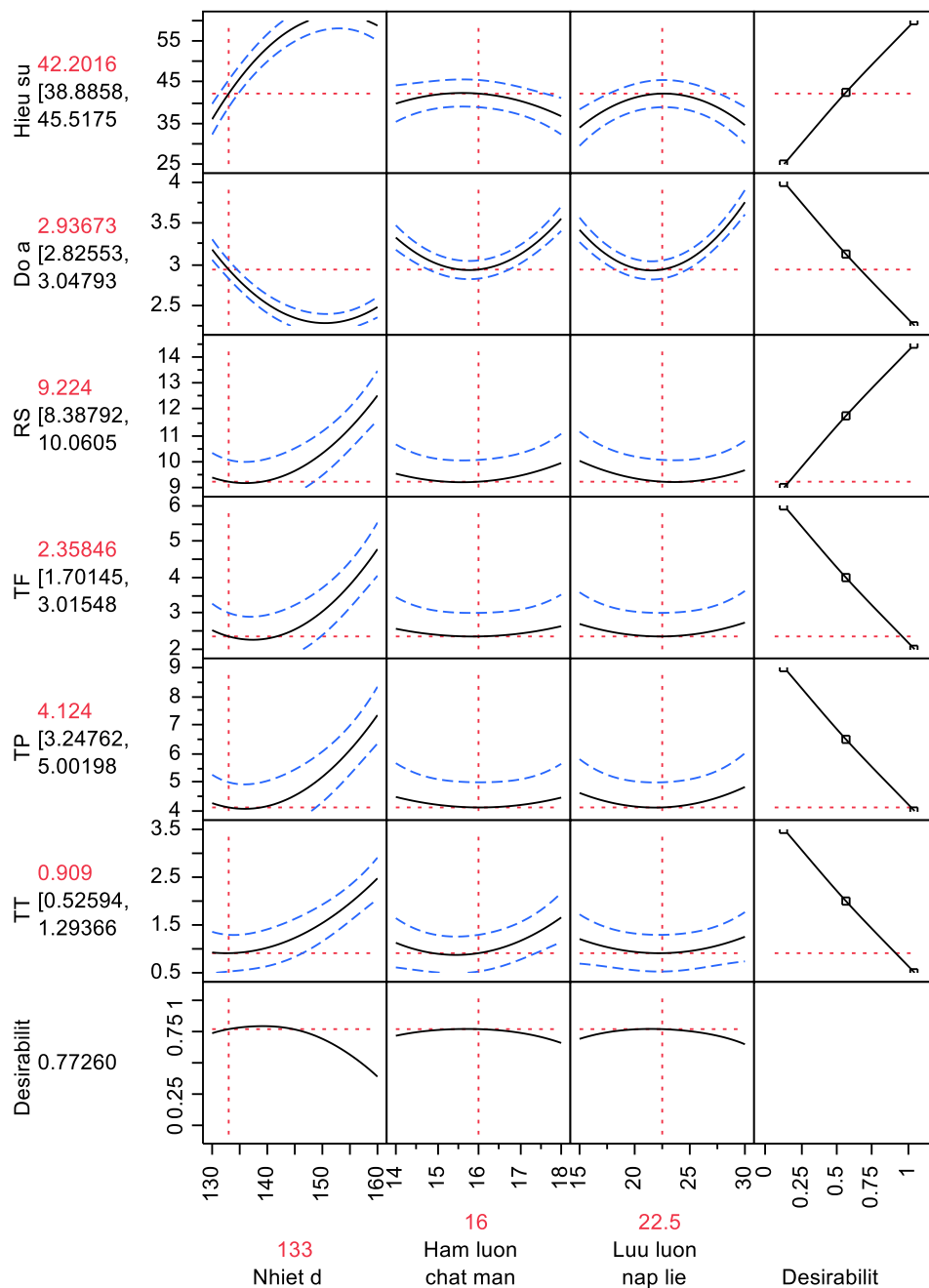


Hình 3. 19. Đồ thị bề mặt đáp ứng 3D và đường đồng mức 2D của các hàm mục tiêu Y_{1-6} với ảnh hưởng của các biến độc lập X_{1-3}

Nhận xét trên đồ thị 3D Hình 3.18 (a) cho thấy hiệu suất thu hồi bột có giá trị cực đại do đó có thể xác định được giá trị tối ưu. Bên cạnh đó, các đồ thị 3D Hình 3.18 (b,c,d,e,f) cho thấy các giá trị cực tiểu do đó có thể xác định các giá trị tối ưu phần trăm giảm của các chất có hoạt tính sinh học.

Nhận xét trên đường đồng mức Hình 3.19 (a') của hiệu suất thu hồi bột cho thấy nếu tăng nhiệt độ từ 130°C đến 153°C thì hiệu suất thu hồi bột sẽ tăng cao nhất và sau đó giảm. Trong cùng nhiệt độ khi hàm lượng chất mang từ 13% đến 16% thì hiệu suất thu hồi bột tăng và sau đó giảm cho đến hàm lượng chất mang 18%. Trên đường đồng mức Hình 3.19(b') cho thấy nhiệt độ tăng từ 130°C-150°C thì độ ẩm của bột thu hồi giảm. Sau đó từ nhiệt tăng từ 150°C-160°C thì độ ẩm tăng do lưu lượng nạp liệu cao

30ml/phút bột thoát ẩm không tốt và có hiện tượng bột dính vào thành bình hứng khi thu hồi sản phẩm bột. Trên đường đồng mức ở Hình 3.19(c') cho thấy từ nhiệt độ tăng từ 136°C- 160°C thì khả năng chống oxy hóa giảm do độ giảm chống oxy hóa tăng lên. Còn lưu lượng nạp liệu từ 23-25ml/phút thì khả năng chống oxy hóa của bột giảm ít nhất do độ giảm chống oxy hóa thấp nhất. Điều này cũng được giải thích nếu lưu lượng nạp liệu thấp thì thời gian sấy lâu do đó thời gian tiếp xúc nhiệt lâu và làm cho bột dễ bị thay đổi. Kết quả này phù hợp với nhận định của Maury và ctv. (2005). Qua kết quả thực nghiệm nếu lưu lượng nạp liệu cao thì quá trình thoát ẩm không tốt làm cho bột có độ ẩm cao và dễ dính vào cyclone (nhiệt độ cao) một thời gian dài và sau đó rơi vào lọ chứa sản phẩm (nhiệt độ thấp). Trên đồ thị đường đồng mức ở Hình 3.19(d') của đồ thị đường đồng mức độ giảm TPC cho thấy nhiệt độ từ 135°C-160°C thì hàm lượng TPC giảm do độ giảm TPC tăng lên. Điều đó cho thấy trong quá trình sấy phun nhiệt độ có ảnh hưởng đến hàm lượng TPC và có xu hướng giảm khi nhiệt độ sấy tăng. Trên đồ thị đường đồng mức ở Hình 3.19(e') cho thấy nhiệt độ từ 137°C-160°C thì hàm lượng TFC giảm do độ giảm TFC tăng lên. Điều đó cho thấy trong quá trình sấy phun nhiệt độ có ảnh hưởng đến hàm lượng TFC và có xu hướng giảm giảm khi nhiệt độ sấy tăng. Sự thay đổi TFC nó giống như sự thay đổi TPC. Trên đường đồng mức Hình 3.19(f') thấy nhiệt độ tăng lên từ 130°C-160°C thì hàm lượng TTC giảm do độ giảm TTC tăng. Điều đó cho thấy nhiệt độ sấy có ảnh hưởng đến hàm lượng TTC và có xu hướng giảm khi nhiệt độ sấy tăng. Kết quả này phù hợp với nhận định của Patel và ctv. (2009)(R. Patel và ctv, 2009).



Hình 3. 20. Kết quả dự đoán của mô hình tối ưu

Theo kết quả chạy tối ưu hóa trên phần mềm JMP đã đưa ra thông số tối ưu dự đoán ở Hình 3.20 cho quá trình sấy phun dịch cao chiết ethanol để hàm lượng TTC giảm ít nhất như sau nhiệt độ sấy đầu vào 133°C, hàm lượng chất mang 16% (w/w), lưu lượng nạp liệu 22,5ml/phút khi đó phần mềm cho kết quả dự đoán các hàm mục tiêu lần lượt là hiệu suất thu hồi bột 42,201%, độ ẩm bột 2,936% và độ giảm chống oxy hóa khả 9,224%, độ giảm TFC 2,358%, độ giảm TPC 4,124%, độ giảm TTC 0,909%.

- **Kiểm chứng thực nghiệm**

Thực hiện kiểm chứng với thông số sấy phun như nhiệt độ sấy đầu vào 133°C, hàm lượng chất mang 16% (w/w), lưu lượng nạp liệu 22,5ml/phút thu được kết quả ở Bảng 3.25 như sau:

Bảng 3. 26. Kết quả so sánh thực nghiệm với dự đoán

Hàm mục tiêu	Giá trị dự đoán	Giá trị thực nghiệm	Giá trị P-value
Hiệu suất (%)	42,201 ^a	42,040±0,262 ^a	0,349
Độ ẩm (%)	2,936 ^a	2,871±0,058 ^a	0,129
% RSA giảm	9,224 ^a	9,192±0,040 ^a	0,252
%TPC giảm	4,124 ^a	4,191±0,049 ^a	0,076
%TFC giảm	2,358 ^a	2,298±0,066 ^a	0,195
% TTC giảm	0,909 ^a	0,883±0,230 ^a	0,126

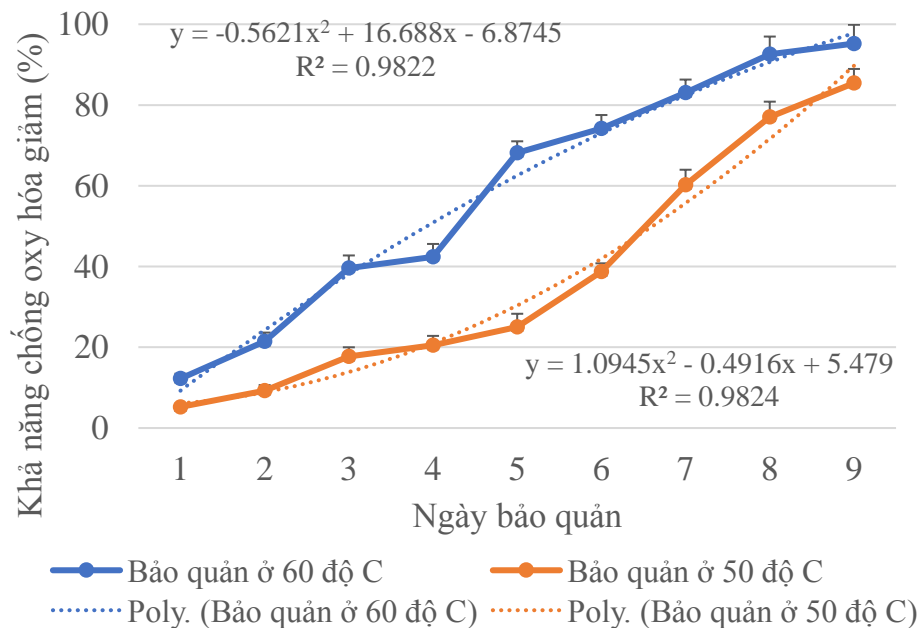
Kết quả kiểm chứng đối với các hàm mục tiêu hoàn toàn giống với kết quả dự đoán. Điều đó có nghĩa là các giá trị dự đoán phù hợp với các giá trị tối ưu.

Kết luận: Dịch cao CoAEO được sấy phun với các điều kiện nhiệt độ sấy đầu vào 133°C, hàm lượng chất mang 16% (w/w), lưu lượng nạp liệu 22,5ml/phút thu được sản phẩm bột cao CoAEO có chứa các thành phần TPC, TFC, TTC cao và khả năng chống oxy hóa cao. Sản phẩm bột CoAEO hòa tan được đem nghiên cứu tiếp thời gian bảo quản để xem sự biến đổi các thành phần TPC, TFC, TTC và khả năng chống oxy hóa.

3.8. Xác định thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.

3.8.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng chống oxy hóa (RSA) trong thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.

Nhận xét ở Hình 3.21 khả năng chống oxy hóa (RSA) của sản phẩm giảm theo từng ngày ở nhiệt độ 60°C và 50°C. Ở nhiệt độ bảo quản 60°C trong 7 ngày, khả năng chống oxy hóa (RSA) của bột giảm hơn 80%. Còn ở nhiệt độ bảo quản 50°C thì đến ngày thứ 8, khả năng chống oxy hóa (RSA) của bột giảm hơn 80% điều đó cho thấy chất lượng của bột có sự biến đổi mạnh khi bảo quản bột ở nhiệt độ cao.



Hình 3. 21. Thay đổi RSA trong sản phẩm ở các nhiệt độ bảo quản 60°C và 50°C. Xác định thời hạn sử dụng của sản phẩm bột nấm vân chi sấy phun.

Với giả thuyết khả năng chống oxy hóa (RSA) giảm 20% so với ban đầu. Từ Hình 3.21 ta thấy ở nhiệt độ 60°C thời gian bảo quản 1,708 ngày, còn ở nhiệt độ 50°C thời gian bảo quản 3,874 ngày.

Giá trị của Q_{10} :

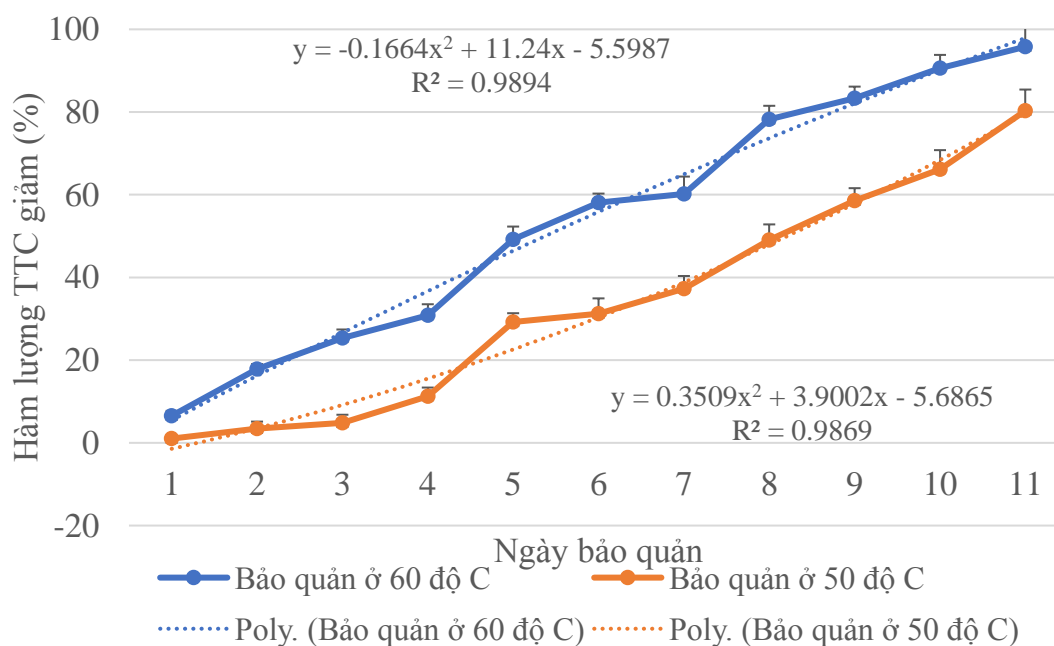
$$Q_{10} = \frac{3,874}{1,708} = 2,268$$

Thời gian bảo quản ở nhiệt độ mát 20°C (khả năng chống oxy hóa giảm 20% so với ban đầu) sẽ là:

$$F_2 = f_1 \times Q_{10}^{\Delta/10} = 1,708 \times 2,268^{40/10} = 45,2 \text{ ngày}$$

3.8.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng TTC trong thời gian bảo quản sản phẩm bột CoAEO hòa tan.

Nhận xét ở Hình 3.22 hàm lượng TTC của sản phẩm giảm theo thời gian bảo quản. Ở nhiệt độ 60°C đến ngày thứ 10 thì hàm lượng giảm hơn 80%. Còn ở nhiệt độ bảo quản 50°C thì đến ngày thứ 11 thì hàm lượng TTC giảm hơn 80%.



Hình 3.22. Thay đổi hàm lượng TTC trong sản phẩm ở các nhiệt độ bảo quản 60°C và 0°C.

Tương tự với giả thuyết hàm lượng TTC giảm 20% so với ban đầu. Từ Hình 3.20 thay đổi hàm lượng chất chiết TTC trong sản phẩm ở các nhiệt độ bảo quản 60°C và 0°C, ta thấy ở nhiệt độ 60°C thời gian bảo quản 1,885 ngày, còn ở nhiệt độ 50°C thời gian bảo quản 4,645 ngày.

Giá trị của Q_{10} :

$$Q_{10} = \frac{4,645}{1,885} = 2,464$$

Thời gian bảo quản ở nhiệt độ mát 20°C (hàm lượng TTC giảm 20% so với ban đầu) sẽ là:

$$F_2 = f_1 \times Q_{10}^{\Delta/10} = 1,885 \times 2,464^{40/10} = 69,5 \text{ ngày}$$

Kiểm chứng mô hình:

Kết quả Bảng 3.27 kiểm chứng mô hình thời hạn sử dụng ở 20°C, cho thấy độ giảm RSA thực nghiệm giống như mô hình dự đoán trong thời gian 45,2 ngày và tương tự độ giảm TTC thực nghiệm cũng giống như dự đoán. Điều đó cho thấy kết quả dự đoán số ngày bảo quản 45,2 ngày đối với hàm mục tiêu là khả năng chống oxy hóa

giảm 20% và 69,5 ngày đối với hàm mục tiêu là hàm lượng TTC giảm 20%, ở cùng điều kiện nhiệt độ 20°C là phù hợp.

Bảng 3. 27. Kiểm chứng mô hình thời hạn sử dụng ở 20°C

Ngày kiểm tra	Độ giảm RSA (%) thực nghiệm	Độ giảm RSA(%) dự đoán	Độ giảm TTC (%) thực nghiệm	Độ giảm TTC(%) dự đoán	P _{value}
45,2	19,32 ^a ±0,54	20 ^a	-	-	0,099
69,5	-	-	19,79 ^b ±0,14	20 ^b	0,066

Các chữ cái ký tự khác nhau trong cùng một hàng biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

“ - “: không kiểm tra.

3.9. Đánh giá sản phẩm bột CoAEO hòa tan

3.9.1. Tỷ trọng bột CoAEO

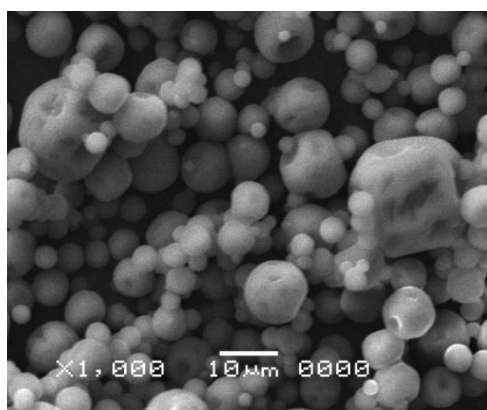
Kết quả đo tỷ trọng của bột $p = 1,108 \pm 0,023$, với kết quả này cho thấy bột CoEAO nặng hơn nước có khả năng tự lắng chìm. Nhưng với tác động lực khuấy thì sẽ làm gia tăng khả năng hòa tan của bột cao.

3.9.2. Khả năng hòa tan của bột trong nước

Khả năng hòa tan của bột CoAEO 1,4 phút/1gram trong 50ml nước ở nhiệt độ 28°C. Điều đó cho thấy bột có khả năng hòa tan nhanh thích hợp với sản phẩm thức uống dạng bột hòa tan.

3.9.3. Hình dạng của bột CoEAO hòa tan

Nhận thấy kích thước của bột nằm trong khoảng từ 1-30 μm , có dạng hạt đồng nhất, hình cầu phù hợp với kết quả nghiên cứu của Quoc và ctv. (2018) nhưng có ít nếp nhăn trên bề mặt phù hợp hơn (Quoc và Muoi, 2018).



Hình 3. 23. Ảnh chụp SEM của bột CoEAO ở độ phóng đại 1000x

3.9.4. Khả năng thấm ướt của bột

Kết quả khả năng thấm ướt của bột CoEAO là 227 ± 12 giây. So với kết quả nghiên cứu của Quoc và ctv. (2018) về bột sấy phun từ quả thơm thì bột CoEAO có khả năng thấm ướt nhanh hơn đồng nghĩa thời gian hòa tan trong nước cũng tốt hơn.

3.9.5. Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO hòa tan

Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO được thể hiện trong Bảng 3.28. Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO hòa tan, cho thấy bột CoAEO hòa tan có tính chống oxy hóa giảm không nhiều so với dịch ban đầu.

Bảng 3. 28. Khả năng khử gốc tự do của bột CoAEO hòa tan

Kí hiệu mẫu	Khả năng trung hòa gốc tự do (SC,%)	Nồng độ đầu thử nghiệm (mg/ml)	IC ₅₀ (mg/mL)
Chứng (+) [Acid ascorbic]	$93,82 \pm 2,95$	0,035	0,019
Chứng (-) [DPPH/EtOH + DMSO]	0,0	-	
Bột CoAEO	$61,43 \pm 4,71$	0,5	0,31

3.9.6. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung và tế bào ung thư gan của bột CoAEO hòa tan.

Qua quá trình sấy phun hàm lượng các chất chiết TPC, TFC và TTC trong bột có giảm so với dịch chiết ban đầu, do đó khả năng ức chế ung thư so với dịch ban đầu cũng thấy giảm. Kết quả ở Bảng 3.29 cho thấy bột CoAEO có khả năng ức chế dòng tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và ức chế tế bào ung thư gan (Hep-G2). Trong thành phần của bột cao CoAEO có chứa hàm lượng TPC, TFC và TTC, có thể đây là những chất có khả năng ức chế tế bào ung thư theo 2 cơ chế sau:

Cơ chế thứ 1: Các chất trên làm tăng quá trình chết theo lập trình (apoptosis) của tế bào, đồng thời làm giảm phosphor-STAT3 (Blaskovich và ctv, 2003). Phosphor-STAT3 là một yếu tố phiên mã của tế bào, đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của tế bào ung thư.

Cơ chế thứ 2: Các chất trên làm giảm COX-2 (Jayaprakasam và ctv, 2003). COX-2 có vai trò thúc đẩy sự tăng sinh, hình thành mạch, viêm, xâm lấn và di căn của tế bào ung thư.

Điều này cho thấy sản phẩm bột CoAEO có thể sử dụng tạo ra sản phẩm có lợi cho sức khỏe có khả năng hỗ trợ trong điều trị ung thư.

Bảng 3. 29. Khả năng ức chế tế bào ung thư cổ tử cung (HeLa) và tế bào ung thư gan (Hep-G2) của bột CoAEO hòa tan

Kí hiệu mẫu	Nồng độ thử cao nhất	Tế bào HeLa		Tế bào Hep-G2	
		Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀	Tỷ lệ ức chế tế bào (%)	IC ₅₀
Chứng (-) [DMSO]	0,1%	0	-	0	-
Chứng (+) [Ellipticine]	5µg/ml	90,2±3,7	3,46µM	84,2±2,4	3,23µM
Bột CoAEO	200µg/ml	60,9±3,1	77,5µg/ml	57,4±6,2	76,2 µg/ml

3.9.7. Độ an toàn sinh học của sản phẩm bột CoAEO hòa tan

Trong Phụ lục PLI.3 ở Bảng i.1 cho thấy trong 100g sản phẩm bột cao CoAEO hòa tan có hàm lượng chất chiết TTC 10,35 mg oleanolic. Hàm lượng này nằm trong giới hạn an toàn khi kiểm tra độc tính cấp và mãn tính là 781,8 mg oleanolic/kg thể trọng và 52,12 mg oleanolic/ kg thể trọng trong phần tính toán ở Phụ lục PLI.2. Vì vậy có thể nói hàm lượng chất chiết TTC (mg oleanolic) trong 100g bột cao CoAEO hòa tan nằm trong mức an toàn.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu đã xác định được phương pháp phá mẫu nguyên liệu nấm (phương pháp kết hợp nitơ lỏng và siêu âm) cho kết quả phá vỡ sợi tơ nấm tốt từ đó dẫn đến gia tăng hiệu quả trích ly các thành phần hoạt tính sinh học. Trong nghiên cứu điều kiện trích ly đã lựa chọn được dung môi ethanol dùng để trích ly thu được hàm lượng TTC cao. Kết quả định tính thành phần của dịch cao chiết ethanol cho thấy có sự hiện diện của nhiều hợp chất như phenolic, tannin, alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, saponin và coumarin. Kết quả tối ưu hóa điều kiện trích ly đã tìm ra các thông số của các yếu tố để thu được dịch trích ly CoAEO được làm giàu các chất hoạt tính sinh học trong đó mong muốn lượng TTC cao nhất. Quá trình phân lập hợp chất trong cao chiết CoAEO đã xác định được 9 chất sạch là trametenolic B, cerevisterol, ergosterol, ergosterol peroxit. Từ cao nước thu được hợp chất trans- p-hydroxycoumaric acid, methyl ferulat, methyl (2-hydroxyphenyl) acetat, umbelliferone, 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin. Kết quả xác định hoạt tính sinh học cho thấy dịch cao chiết CoAEO có khả năng khử gốc tự do và hoạt tính gây độc ức chế tế bào ung thư tốt trên 2 tế bào ung thư cổ tử cung và tế bào ung thư gan, khả năng kháng vi sinh vật cao trên 5 chủng *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 những chủng này rất có ý nghĩa trong đánh giá trong an toàn thực phẩm. Kết quả đánh giá độ an toàn của dịch cao chiết CoAEO trong nghiên cứu độc tính cấp tính và độc tính bán trường diễn đối với cao chiết CoAEO đã được thử nghiệm ở liều mức liều cao (2000, 4000 và 6000 mg/kg thể trọng) trong 14 ngày không gây tác dụng phụ nghiêm trọng đối với sự phát triển cơ thể, trọng lượng cơ quan tương đối, các thông số huyết học, sinh hóa cũng như hình thái ngoài, mô bệnh học của tim, gan và thận ở chuột. Tương tự đối với khả năng sát độc tính bán mãn tính trong 90 ngày cho được kết quả tốt. Do đó, cao CoAEO không có độc tính đối với chuột Swiss albino ở mức liều khảo sát. Mặt khác, nghiên cứu ứng dụng dịch cao CoAEO để tạo thành sản phẩm bột hòa tan theo phương pháp sấy phun đã xác định các thông số tối ưu của các yếu tố để tạo ra sản phẩm bột có phần trăm độ giảm TTC

là thấp nhất. Sản phẩm bột sấy phun được bảo quản và xác định được mô hình thời gian bảo quản của sản phẩm là 45,2 ngày, ở điều kiện nhiệt độ 20°C, RSA giảm 20%. Còn thời gian bảo quản 69,5 ngày, ở điều kiện nhiệt độ 20°C thì phần trăm TTC giảm 20%. Độ an toàn sinh học của sản phẩm bột CoAEO hòa tan trong 100g bột cao CoAEO hòa tan nằm trong mức an toàn được tính theo hàm lượng TTC (mg oleanolic).

KIẾN NGHỊ

- Trong thành phần của dịch trích ly còn những chất chưa tách được, nên nghiên cứu chuyên sâu vào từng loại chất khác ở các nghiên cứu tiếp theo.
- Khảo sát thêm một số ức chế tế bào ung thư khác, từ đó xác định khả năng ứng dụng mới cho các chiết xuất này.
- Khảo sát thêm khả năng ức chế vi sinh vật ở sản phẩm bột, từ đó xác định thêm khả năng ứng dụng mới trong lĩnh vực thực phẩm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyen, N.-T., Nguyen, N.-T., Dam, S.-M., Le, T.-T., Nguyen, T.-N., Van, H.-T., Le, T.-Q.P., Tran, G.-B., Nguyen, H.-N. và Tran, T.-H. (2020). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY, AND

ANTICANCER EFFECTS OF EXTRACT FROM YUNZHI MUSHROOM (*CORIOLOPSIS ASPERA*) IN VIETNAM. *Pharmacophore*, 11(4).

2. Thuan, N.N., Ngan, N.T., Kuo, P.-C., Trinh, N.T.N., Thien, L.T., Mai, D.S., Tuan, N.N., Tan, L.V. và Thang, T.D. (2021). Secondary Metabolites from the Fruiting Bodies of *Coriolopsis aspera* in Vietnam and their Bioactivities. *Chemistry of Natural Compounds*, 57(6), 1104-1106. doi: <https://doi.org/10.1007/s10600-021-03559-9>
3. Nguyễn Ngọc Thuần , T.T.P.N., Nguyễn Ngọc Tuấn , Nguyễn Thị Ngân , Đào Thị Huệ , Võ Dương Mỹ Duyên , Bùi Thanh Hòa , Trần Thành Đạt , Lê Trung Thiên , Đàm Sao Mai (2021). Đánh giá độc tính cấp tính dịch cao chiết ethanol từ quả thể nấm vân chi (*Coriolopsis aspera*) ở Việt Nam trên chuột Swiss albino. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Trường Đại học Công nghiệp TP.HCM*, 49, 77-83.
4. Nguyễn Ngọc Thuần, Đ.S.M., Lê Trung Thiên, Nguyễn Thị Nữ Trinh, Nguyễn Ngọc Tuấn, Trịnh Ánh Nguyệt. (2021). TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN SẤY PHUN DỊCH TRÍCH LY NẤM VÂN CHI (*Coriolopsis aspera*) TẠI VIỆT NAM *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ CHỜ ONLINE

5. Nguyen Ngoc Thuan, D.S.M., Le Trung Thien,, Nguyen Thi Nu Trinh, L.T.C.T., Le Ngoc Anh, Tran Dinh, Thang, N.T.T., Nguyen Thi Thu Thuy, Nguyen Ngoc và Tuan*. (2022). Optimization of the extraction process of bioactive compounds from the fruiting body of yunzhi mushroom (*Coriolopsis aspera*) in Vietnam by responses surface methodology. *ARTICLE IN MALAYSIAN JOURNAL OF CHEMISTRY*.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aboshora, W., Lianfu, Z., Dahir, M., Qingran, M., Qingrui, S., Jing, L., Al-Haj, N.Q.M. và Ammar, A. (2014). Effect of extraction method and solvent power on polyphenol and flavonoid levels in Hyphaene Thebaica L Mart (Arecaceae)(Doum) fruit, and its antioxidant and antibacterial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(12), 2057-2063.

2. Acosta, Estrada, A., B., Gutierrez-Uribe, J.A. và Serna-Saldivar, S.O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem*, 152, 46-55. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.093
3. Adebayo, J.O., Yakubu, M.T., Egwim, E.C., Owoyele, V.B. và Enaibe, B.U. (2003). Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. *Journal of Ethnopharmacology*, 88(1), 69-72.
4. Adedapo, A.A., Abatan, M.O. và Olorunsogo, O.O. (2007). Effects of some plants of the spurge family on haematological and biochemical parameters in rats. *Vet Arhiv*, 77(1), 29-38.
5. Adongbede, E.M., Jaiswal, Y.S., Davis, S.S., Randolph, P.D., Huo, L.-N. và Williams, L.L. (2019). Antioxidant and antibacterial activity of *Trametes polyzona* (Pers.) Justo. *Food Science and Biotechnology*, 1-7.
6. Aguiló-Aguayo, I., Walton, J., Viñas, I. và Tiwari, B.K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT-Food science and Technology*, 77, 92-99.
7. Ahmad, M.F., Ahmad, F.A., Azad, Z., Ahmad, A., Alam, M.I., Ansari, J.A. và Panda, B.P. (2013). Edible mushrooms as health promoting agent. *Advanced Science Focus*, 1(3), 189-196.
8. Ahmad, M.F., Ashraf, S.A., Ahmad, F.A., Ansari, J.A. và Siddiquee, M.R.A. (2011). Nutraceutical market and its regulation. *Am J Food Technol*, 6(5), 342-347.
9. Akgul, H., Aslan, A., Akata, I., Gunal, S., Bal, C. và Baba, H. (2021). Phenolic content and biological activities of *Trametes hirsuta*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(4 A), 4130-4135.
10. Akgul, H., Sevindik, M., Coban, C., Alli, H. và Selamoglu, Z. (2017). New approaches in traditional and complementary alternative medicine practices: *Auricularia auricula* and *Trametes versicolor*. *J Tradit Med Clin Natur*, 6(239), 2.
11. Akyuz, M., ONGANER, A., ERECEVIT, P. và Kirbag, S. (2010). Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of Turkey. *Gazi University Journal of Science*, 23(2), 125-130.
12. Abu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. và Mason, T.J. (2004). Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4), 261-265.
13. Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M., Santos-Buelga, C. và Rivas-Gonzalo, J.C. (2004). Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 305-318.
14. Alexander, E. và Hudson, M. (2001). Factors influencing the internalization of *Staphylococcus aureus* and impacts on the course of infections in humans. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3), 361-366.
15. Almeida de, C.V., Taddei, A. và Amedei, A. (2018). The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 11, 1756284818783606.

16. Ameri, Mahmoud và Maa, Y.-F. (2006). Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations. *Drying technology*, 24(6), 763-768.
17. Appiah, Theresa, Agyare, C., Luo, Y., Boamah, V.E. và Boakye, Y.D. (2018). Antimicrobial and Resistance Modifying Activities of Cerevisterol Isolated from Trametes Species.
18. Appiah, T., Boakye, Y.D. và Agyare, C. (2017). Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected ghanaiian mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
19. Arya, Prakash, O., Adhikari, P., Pandey, A., Bhatt, I.D. và Mohanty, K. (2022). Health promoting bioactive phenolic compounds in different solvent extracts of Curcuma caesia Roxb. rhizome from North-East India. *Journal of Food Processing and Preservation*, e16805.
20. Asatiani, M.D., Elisashvili, V., Songulashvili, G., Reznick, A.Z. và Wasser, S.P. (2010). Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants *Progress in mycology* (pp. 311-326): Springer.
21. Asgher, M., Azim, N. và Bhatti, H.N. (2009). Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus Coriolus versicolor IBL-04. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 61-65.
22. Awad, T., Moharram, H., Shaltout, O., Asker, D. và Youssef, M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
23. Awala, S.I. và Oyetayo, V.O. (2015). The Phytochemical and Antimicrobial Properties of the Extracts Obtained from Trametes elegans Collected from Osengere in Ibadan, Nigeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(4).
24. Ayaz, F.k.A., Chuang, L.T., Torun, H., Colak, A., Sesli, E., Presley, J., Smith, B.R. và Glew, R.H. (2011). Fatty acid and amino acid compositions of selected wild-edible mushrooms consumed in Turkey. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(4), 328-335.
25. Bach, F., Zielinski, A.A.F., Helm, C.V., Maciel, G.M., Pedro, A.C., Stafussa, A.P., Ávila, S. và Haminiuk, C.W.I. (2019). Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*, 107, 214-220.
26. Bains, A. và Chawla, P. (2020). In vitro bioactivity, antimicrobial and anti-inflammatory efficacy of modified solvent evaporation assisted Trametes versicolor extract. *3 Biotech*, 10(9), 1-11.
27. Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A. và Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143-182.
28. Barbosa, M., Borsarelli, C. và Mercadante, A. (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparations. *Food Research International*, 38(8-9), 989-994.
29. Behboudi, Solmaz, Soukoulis, C., Yonekura, L. và Fisk, I. (2013). Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated L. acidophilus NCIMB 701748. *Drying technology*, 31(11), 1274-1283.

30. Benito-Román, Ó, Alonso, E. và Cocero, M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of β -glucans from barley. *LWT-Food science and Technology*, 50(1), 57-63.
31. Blaskovich, M.A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R. và Sebti, S.d.M. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer research*, 63(6), 1270-1279.
32. Boh, B., Hodžar, D., Dolničar, D., Berovič, M. và Pohleven, F. (2000). Isolation and quantification of triterpenoid acids from *Ganoderma applanatum* of Istrian origin. *Food technology and Biotechnology*, 38(1), 11-18.
33. Bowman, S.M. và Free, S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808.
34. Box, G.E. và Behnken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.
35. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. và Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.
36. Briffa, M. (2001). Polypores recorded in Malta: additions and updated checklist.
37. Briffa, M. (2002). First European record of *Coriolopsis aspera* (Jungh) Teng (Polyporaceae) from Malta. *Mycologist*, 16(4), 178-178.
38. Burger, C., Fischer, D.R., Cordenunzi, D.A., Batschauer Filho, A. và VC, S.A. (2005). Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acemela brasiliensis*)(Asteraceae) in mice. *J Pharm Sci*, 8(2), 370-373.
39. Cacace, J. và Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389.
40. Cal, K. và Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(2), 575-586.
41. Canli, Kerem, BENEK, A., ŞENTURAN, M., AKATA, İ. và ALTUNER, E.M. (2019). In vitro Antimicrobial Activity of *Morchella esculenta* and *Trametes versicolor*. *Mantar Dergisi*, 10(3), 28-33.
42. Carlton, R., Noordman, W., Biswas, B., De Meester, E. và Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 43(3), 301-312.
43. Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A. và Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
44. Chaiyasut, C., Kruatama, C. và Sirilun, S. (2010). Breaking the spores of *Ganoderma lucidum* by fermentation with *Lactobacillus plantarum*. *African Journal of Biotechnology*, 9(43), 7379-7382.

45. Chambers, F. (1987). A textbook of modern toxicology: Edited by Ernest Hodgson and Patricia E. Levi, Elsevier, 1987. \$39.50 (xx+ 386 pages) ISBN 0 444 01131 5: Elsevier Current Trends.
46. Chan, Chung-Hung, Yusoff, R. và Ngoh, G.-C. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction based on absorbed microwave power and energy. *Chemical Engineering Science*, 111, 41-47.
47. Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C. và Kung, F.W.-L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
48. Chang và Tschu, T. (1992). Some lignicolous Aphyllophorales (Basidiomycetes) from Taiwan. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 33, 277-284.
49. Chang, Ue-Min, Li, C.-H., Lin, L.-I., Huang, C.-P., Kan, L.-S. và Lin, S.-B. (2006). Ganoderiol F, a ganoderma triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. *Life sciences*, 79(12), 1129-1139.
50. Chavan, Yogita và Singhal, R.S. (2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 106-113.
51. Chemat, Farid và Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
52. Chemat, Smain, Aït-Amar, H., Lagha, A. và Esveld, D. (2005). Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(12), 1320-1326.
53. Chen, Guangjing, Zhang, S., Ran, C., Wang, L. và Kan, J. (2016). Extraction, characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Tuber huidongense*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 431-442.
54. Chen, Liang-Liang, Kong, F.-D., Wang, P., Yuan, J.-Z., Guo, Z.-K., Wang, H., Dai, H.-F. và Mei, W.-L. (2017). Two new tremulane sesquiterpenes from a mangrove endophytic fungus, *Corilopsis* sp. J5. *Chinese Chemical Letters*, 28(2), 222-225.
55. Chen, Ti-Qiang, Wu, Y.-B., Wu, J.-G., Ma, L., Dong, Z.-H. và Wu, J.-Z. (2014). Efficient extraction technology of antioxidant crude polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), ultrasonic-circulating extraction integrating with superfine-pulverization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 45(1), 57-62. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2013.05.010>
56. Chen, Yi, Xie, M.-Y. và Gong, X.-F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.018>
57. Chen, Yuzhen, Zhao, L., Liu, B. và Zuo, S. (2012). Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of polysaccharide from *Tremella*. *Physics Procedia*, 24, 429-433.

58. Chen, Y., Gu, X., Huang, S.-q., Li, J., Wang, X. và Tang, J. (2010). Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(4), 429-435.
59. Cheong, K.L., Wang, L.Y., Wu, D.T., Hu, D.J., Zhao, J. và Li, S.P. (2016). Microwave-Assisted Extraction, Chemical Structures, and Chain Conformation of Polysaccharides from a Novel *Cordyceps Sinensis* Fungus UM01. *Journal of food science*, 81(9), C2167-C2174.
60. Cheuk, W., Chan, J.K., Nuovo, G., Chan, M.K. và Fok, M. (2007). Regression of gastric large B-Cell lymphoma accompanied by a florid lymphoma-like T-cell reaction: immunomodulatory effect of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi)? *International journal of surgical pathology*, 15(2), 180-186.
61. Cheung, P.C. (2013). Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2(3-4), 162-166.
62. Choma và I Jesionek, W. (2014). Effects-Directed Biological Detection: Bioautography. In *instrumental Thin-Layer Chromatography*: Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
63. Ciura, K., Dziomba, S., Nowakowska, J. và Markuszewski, M.J. (2017). Thin layer chromatography in drug discovery process. *Journal of Chromatography A*, 1520, 9-22.
64. Connolly, D, J. và Hill, R.A. (2005). Triterpenoids. *Natural product reports*, 22(2), 230-248.
65. Connolly, JD và Hill, R. (1991). Dictionary of Terpenoids. Vol. 1: Mono- and Sesquiterpenoids, Vol. 2: Diand higher Terpenoids, Vol. 3: Indexes: New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall London.
66. Costa Da, C.T., Horton, D. và Margolis, S.A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 403-410.
67. Coutinho, M., Quadri, M., Moreira, R. và Quadri, M.G.N. (2004). Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). *Separation science and technology*, 39(16), 3769-3782.
68. Cui, Y., Kim, D.-S. và Park, K.-C. (2005). Antioxidant effect of *Inonotus obliquus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 79-85.
69. Dang, Tam và Süßmuth, R.D. (2017). Bioactive peptide natural products as lead structures for medicinal use. *Accounts of chemical research*, 50(7), 1566-1576.
70. Deka, A., Sarma, I., Dey, S. và Sarma, T. (2017). Antimicrobial properties and phytochemical screening of some wild macrofungi of Rani-Garbhangra reserve forest area of Assam, India. *Advances in Applied Science Research*, 8, 17-22.
71. Desai, H, K.G. và Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
72. Dietrich, R., Jessberger, N., Ehling-Schulz, M., Märtlbauer, E. và Granum, P.E. (2021). The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 98.

73. Ding, M.R., Zhang, Q.Y., Hu, F., Huang, N.Y. và Wang, J.Z. (2013). *Synthesis and in vitro Anti-breast Cancer Activity of Trametenolic acid B Derivatives*. Paper presented at the Advanced Materials Research.
74. Độ, N.Đ., Thanh, V.N., Bãn, N.V., Khiêm, P.T., Tâm, N.T. và Tâm, H.N.T. (2017). Khảo sát đặc tính sinh hóa và khả năng kháng khuẩn của cao chiết từ cây môn ngọt (*colocasia esculenta*). *tạp chí khoa học & công nghệ nông nghiệp*, 265-274.
75. Donner, H., Gao, L. và Mazza, G. (1997). Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International*, 30(8), 637-643.
76. Doris, O.Y. (2018). Comparative Phytochemical Screening of Trametes species: A Wild Mushroom Collected from Ondo State Nigeria. *SF J Mycology*, 1(4).
77. Eliza, W., K Fai, C. và P Chung, L. (2012). Efficacy of Yun Zhi (*Coriolus versicolor*) on survival in cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 6(1), 78-87.
78. Ella Missang, C., Guyot, S. và Renard, C.M. (2003). Flavonols and anthocyanins of bush butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) HJ Lam, fruit. Changes in their composition during ripening. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7475-7480.
79. Eman, Elsharkawy, R., Abdelaziz, E.-d., Emad, M.A. và Ahmed, M.A. (2018). Antioxidant, antimicrobial and antifeedant activity of phenolic compounds accumulated in *Hyoscyamus muticus* L. *African Journal of Biotechnology*, 17(10), 311-321.
80. Erdogan, S, Kaya, M. và Akata, I. (2017). *Chitin extraction and chitosan production from cell wall of two mushroom species (Lactarius vellereus and Phyllophora ribis)*. Paper presented at the AIP Conference Proceedings.
81. Fakoya, S. và Folarin Oloketuyi, S. (2012). Antimicrobial Efficacy and Phytochemical Screening of Mushrooms, *Lenzites Betulinus*, and *Coriolopsis Gallica* Extracts. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 11(6).
82. Falch, B.H., Espevik, T., Ryan, L. và Stokke, B.T. (2000). The cytokine stimulating activity of (1→3)-β-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*, 329(3), 587-596.
83. Fang, Zhongxiang và Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, 129(3), 1139-1147.
84. Fekih Hassen, M., Dalla Ayed, S., Ben Sik Ali, H., Gharbi, R. và Elatrous, S. (2013). Acute heart failure following severe chloralose poisoning: A case report. *Egyptian Journal of Anaesthesia*, 29(1), 87-88.
85. Ferreira, I.C., Morales, P. và Barros, L. (2016). *Wild plants, mushrooms and nuts: functional food properties and applications*: John Wiley & Sons.
86. Fu, Y.-J., Liu, W., Zu, Y.-G., Shi, X.-G., Liu, Z.-G., Schwarz, G. và Efferth, T. (2009). Breaking the spores of the fungus *Ganoderma lucidum* by supercritical CO₂. *Food Chemistry*, 112(1), 71-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.044>
87. Fujiwara, H. và Sawai, T. (1993). Food or beverage for improving saccharide metabolism. *JP patent*, 5124974.

88. Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J. và Zhou, S. (2004). A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae) extract in patients with type II diabetes mellitus. *International journal of medicinal mushrooms*, 6(1).
89. Gargano, M.L., van Griensven, L.J., Isikhuemhen, O.S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S.P. và Zervakis, G.I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151(3), 548-565.
90. Gdula, Joanna, Czepiel, J., Woźniakiewicz, A., Wojtoń, K., Grzywacz, A., Woźniakiewicz, M., Jurczyszyn, A., Perucki, W. và Librowski, T. (2015). n-3 Fatty acids as resolvers of inflammation in the A549 cells. *Pharmacological Reports*, 67(3), 610-615.
91. Gershenzon, J. và Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology*, 3(7), 408.
92. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. và Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
93. Ghosh, K. (2015). Review mushrooms: a source of immunomodulating and antitumor polysaccharides.
94. Grienke, U., Zwirchmayr, J., Peintner, U., Urban, E., Zehl, M., Schmidtke, M. và Rollinger, J.M. (2019). Lanostane Triterpenes from *Gloeophyllum odoratum* and Their Anti-Influenza Effects Authors.
95. Habtemariam, S. (2020). *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. *Biomedicines*, 8(5), 135.
96. Hadacek, F. và Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11(3), 137-147.
97. Hannan, P.C. (2000). Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Veterinary research*, 31(4), 373-395.
98. Heim, J., Anke, T., Mocek, U., Steffan, B. và Steglich, W. (1988). Antibiotics from basidiomycetes. XXIX: Pilatin, a new antibioticly active marasmane derivative from cultures of *Flagelloscypha pilatii* Agerer. *The Journal of antibiotics*, 41(12), 1752-1757.
99. Hleba, L., Vuković, N., Petrová, J. và Kačániová, M. (2014). Antimicrobial activity of crude methanolic extracts from *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnology*, 47, 89-93.
100. Ho, Y., Yeung, J., Chiu, P., Tang, W., Lin, Z., Man, R. và Lau, C. (2007). *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide reduced the production of proinflammatory cytokines in activated rheumatoid synovial fibroblast. *Molecular and cellular biochemistry*, 301(1-2), 173-179.

101. Hobbs, C. (2004). Medicinal value of turkey tail fungus *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetideae). A literature review. *International journal of medicinal mushrooms*, 6(3).
102. Hor, S.Y., Ahmad, M., Farsi, E., Lim, C.P., Asmawi, M.Z. và Yam, M.F. (2011). Acute and subchronic oral toxicity of *Coriolus versicolor* standardized water extract in Sprague-Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1067-1076.
103. Hosseini, A., Jafari, S.M., Mirzaei, H., Asghari, A. và Akhavan, S. (2015). Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. *Carbohydrate Polymers*, 126, 1-8.
104. Huang, S.-q. và Ning, Z.-x. (2010). Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(3), 336-341. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.019>
105. Idham, Z., Muhamad, I.I. và Sarmidi, M.R. (2012). Degradation kinetics and color stability of spray-dried encapsulated anthocyanins from hibiscus sabdariffa l. *Journal of Food Process Engineering*, 35(4), 522-542.
106. Im, K.H., Nguyen, T.K., Choi, J. và Lee, T.S. (2016). In vitro antioxidant, anti-diabetes, anti-dementia, and inflammation inhibitory effect of *Trametes pubescens* fruiting body extracts. *Molecules*, 21(5), 639.
107. Jayaprakasam, B., Seeram, N.P. và Nair, M.G. (2003). Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from *Cucurbita andreana*. *Cancer letters*, 189(1), 11-16.
108. Jhan, M.-H., Yeh, C.-H., Tsai, C.-C., Kao, C.-T., Chang, C.-K. và Hsieh, C.-W. (2016). Enhancing the antioxidant ability of *Trametes versicolor* polysaccharopeptides by an enzymatic hydrolysis process. *Molecules*, 21(9), 1215.
109. Jing, Wang, K.X.H.J. và Peilong, S. (2010). The Study on the Microwave Extraction of the Triterpenoid Saponins from *Ganoderma Lucidum* [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2, 021.
110. Jothy, S.L., Zakaria, Z., Chen, Y., Lau, Y.L., Latha, L.Y. và Sasidharan, S. (2011). Acute oral toxicity of methanolic seed extract of *Cassia fistula* in mice. *Molecules*, 16(6), 5268-5282.
111. Justo, A. và Hibbett, D.S. (2011). Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon*, 60(6), 1567-1583.
112. Kahlos, K., Kangas, L. và Hiltunen, R. (1989). Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiatus*. *Planta medica*, 55(04), 389-390.
113. Kamiyama, M., Horiuchi, M., Umamo, K., Kondo, K., Otsuka, Y. và Shibamoto, T. (2013). Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(2), 85-91.
114. Khanh, Đ.N.M.K., Hạ, V.T.C. và Huyền, N.T.T. (2017). Khảo sát ảnh hưởng của asen lên số lượng tế bào máu chuột nhắt trắng (*Mus musculus* var. albino). *Tạp chí Khoa học*, 14(12), 91.

115. Knežević, A.Z. (2015). Ligninolitčki potencijal i medicinska svojstva ekstraktata vrsta roda *Trametes* fr. *Универзитет у Београду*.
116. Komura, D.L., Carbonero, E.R., Gracher, A.H.P., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marcon, R., Santos, A.R., Gorin, P.A. và Iacomini, M. (2010). Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Bioresource technology*, 101(15), 6192-6199.
117. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J.P. và Van Griensven, L.J. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667-1675.
118. Krishnan, Savitha, Bhosale, R. và Singhal, R.S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61(1), 95-102.
119. Krishnan, S., Bhosale, R. và Singhal, R.S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, 61(1), 95-102.
120. Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C. và Abdelly, C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 2083-2091.
121. Kumar, N.P., Bhavani, J. và Arya, A. (2014). New Records of Lignicolous Fungi from Krishna District, Andhra Pradesh, India. *International Letters of Natural Sciences*.
122. Lee, In-Young, Kim, Y.-S., Jang, Y.-W., Jung, J.-Y. và Yun, B.-S. (2007). New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(24), 6678-6681.
123. Leliebre-Lara, V., Monzote Fidalgo, L., Pferschy-Wenzig, E.-M., Kunert, O., Nogueiras Lima, C. và Bauer, R. (2016). In vitro antileishmanial activity of sterols from *Trametes versicolor* (Bres. Rivarden). *Molecules*, 21(8), 1045.
124. Leliebre, Vivian, García, M., Nogueiras, C. và Monzote, L. (2015). Qualitative analysis of an ethanolic extract from *Trametes versicolor* and biological screening against *Leishmania amazonensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 592-595.
125. Lenzion, Karolina, Gornowicz, A., Bielawski, K. và Bielawska, A. (2021). Phytochemical composition and biological activities of *Scorzonera* species. *International journal of molecular sciences*, 22(10), 5128.
126. Li, BB, Smith, B. và Hossain, M.M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188.
127. Li, Ying, Fabiano-Tixier, A.S., Vian, M.A. và Chemat, F. (2013). Solvent-free microwave extraction of bioactive compounds provides a tool for green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 1-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.02.007>

128. Li, YR, Liu, Q., Wang, H. và Ng, T. (2008). A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1780(1), 51-57.
129. Liang, F. (1993). Production of health tonic. *CN patent*, 1069738.
130. Lin, S.-B., Li, C.-H., Lee, S.-S. và Kan, L.-S. (2003). Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life sciences*, 72(21), 2381-2390.
131. Linh, T.T.T. và Thủy, N.M. (2014). ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC YẾU TỐ ĐẾN QUÁ TRÌNH TRÍCH LY CÁC HOẠT CHẤT SINH HỌC TỪ CÂY THUỐC DÒI (*POUZOLZIA ZEYLANICA* L. BENN). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 68-75.
132. Liu, Tao-Fang, Lu, X., Tang, H., Zhang, M.-M., Wang, P., Sun, P., Liu, Z.-Y., Wang, Z.-L., Li, L. và Rui, Y.-C. (2013). 3β , 5α , 6β -Oxygenated sterols from the South China Sea gorgonian *Muriceopsis flavida* and their tumor cell growth inhibitory activity and apoptosis-inducing function. *Steroids*, 78(1), 108-114.
133. Llauradó, G., Morris, H.J., Lebeque, Y., Gutiérrez, A., Fontaine, R., Bermúdez, R.C. và Perraud-Gaime, I. (2013). Phytochemical screening and effects on cell-mediated immune response of *Pleurotus* fruiting bodies powder. *Food and Agricultural Immunology*, 24(3), 295-304.
134. Lucchesi, M.E., Smadja, J., Bradshaw, S., Louw, W. và Chemat, F. (2007). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*, 79(3), 1079-1086.
135. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, Å., Pettersen, J. và Bergman, R. (1998). Experimental design and optimization. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 42(1), 3-40. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)
136. Luo, Hua-Jun, Wang, J.-Z., Zhou, Y. và Zou, K. (2012). Docking study on trametenolic acid B as a α -glucosidase inhibitor. *Medicinal Chemistry Research*, 21(9), 2141-2144.
137. Ma, Jingjing, Fu, Z., Ma, P., Su, Y. và Zhang, Q. (2007). Breaking and characteristics of *Ganoderma lucidum* spores by high speed centrifugal shearing pulverizer. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 22(4), 617-621.
138. Ma, Lishuai, Chen, H., Dong, P. và Lu, X. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139(1-4), 503-508.
139. Macrae và Elspeth. (2007). Extraction of plant RNA *Protocols for nucleic acid analysis by nonradioactive probes* (pp. 15-24): Springer.
140. Maeng, Jeong-Hwan, Muhammad Shahbaz, H., Ameer, K., Jo, Y. và Kwon, J.H. (2017). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from *Coriolus versicolor* Mushroom Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Process Engineering*, 40(2), e12421.

141. Mahdavi, Akhavan, S., Jafari, S.M., Assadpoor, E. và Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379-385.
142. Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Ghorbani, M. và Assadpoor, E. (2014). Spray-drying microencapsulation of anthocyanins by natural biopolymers: a review. *Drying technology*, 32(5), 509-518.
143. Mallavadhani, V, U., Sudhakar, A.V., Satyanarayana, K., Mahapatra, A. và Li, W. (2006). Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chemistry*, 95(1), 58-64.
144. Mandal, Vivekananda và Mandal, S.C. (2010). Design and performance evaluation of a microwave based low carbon yielding extraction technique for naturally occurring bioactive triterpenoid: Oleanolic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 50(1-2), 63-70.
145. Mandal, Vivekananda, Mohan, Y. và Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 7-18.
146. Mason, J, T., Chemat, F. và Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237-247.
147. Mason, TJ, Paniwnyk, L. và Lorimer, J. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
148. Maury, Michael, Murphy, K., Kumar, S., Shi, L. và Lee, G. (2005). Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), 565-573.
149. Melappa, Govindappa, Roshan, A., Nithi, C., Mohummed, T.S., Ramachandra, Y.L. và Poojari, C.C. (2015). Phytochemical analysis and in vitro antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of wood rotting fungi, *Trametes ochracea*. *Pharmacognosy Journal*, 7(2).
150. Michael, B., Yano, B., Sellers, R.S., Perry, R., Morton, D., Roome, N., Johnson, J.K. và Schafer, K. (2007). Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic pathology*, 35(5), 742-750.
151. Mikanagi, Y., Saito, N., Yokoi, M. và Tatsuzawa, F. (2000). Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (= *Rosa*), *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(9), 887-902.
152. Minh, NP và Dao, D. (2013). Effect of different antioxidant ratios supplemented into mixture of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) seed membrane-carrier to total carotene; accelerated temperature to shelf-life of Gac powder. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 2(11), 1005-1018.
153. Minh, V.T. (2017). Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển và năng suất nấm Vân chi (*Trametes Versicolor* (L.) Pilat) trồng trên các loại giá thể tại Thừa Thiên

- Huế. *Tạp chí Khoa học & công nghệ nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 1(1), 77-86.
154. Mizuno, T. (2000). Development of an antitumor biological response modifier from *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (Aphyllphoromycetidae). *International journal of medicinal mushrooms*, 2(1).
 155. Mohsen, S.M. và Ammar, A.S. (2009). Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112(3), 595-598.
 156. Moon, M.K., Lee, Y.J., Kim, J.S., Kang, D.G. và Lee, H.S. (2009). Effect of caffeic acid on tumor necrosis factor-alpha-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(8), 1371-1377.
 157. N Milovanovic, I., P Stanojkovic, T., M Stajic, M., D Brceskic, I., Z Knezevic, A., Lj Cilerdzic, J. và B Vukojevic, J. (2015). Effect of selenium enrichment of *Lenzites betulinus* and *Trametes hirsuta* mycelia on antioxidant, antifungal and cytostatics potential. *Current pharmaceutical biotechnology*, 16(10), 920-926.
 158. Nambiar, B, R., Sellamuthu, P.S. và Perumal, A.B. (2017). Microencapsulation of tender coconut water by spray drying: effect of *Moringa oleifera* gum, maltodextrin concentrations, and inlet temperature on powder qualities. *Food and Bioprocess Technology*, 10(9), 1668-1684.
 159. Nardini, M. và Garaguso, I. (2018). Effect of sulfites on antioxidant activity, total polyphenols, and flavonoid measurements in white wine. *Foods*, 7(3), 35.
 160. Ngan, L.T.M., Moon, J.-K., Kim, J.-H., Shibamoto, T. và Ahn, Y.-J. (2012). Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(4), 1575-1583.
 161. Ngăn, V.T.K., Mai, N.T.N. và Hoàng, N.T. (2017). Khảo sát hàm lượng phenolic tổng, flavonoid tổng, hoạt tính chống oxy hóa và hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết ethanol và methanol của lá và thân rễ cây Cỏ Tranh (*Imperata cylindrica*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 16-22.
 162. Odebiyi, O. và Sofowora, E. (1978). Phytochemical screening of Nigerian medicinal plants II. *Lloydia*, 41(3), 234-246.
 163. Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D. và Oreopoulou, V. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. *Polyphenols in plants*, 243-259.
 164. Osbourn, A.E. và Lanzotti, V. (2009). *Plant-derived natural products*: Springer.
 165. Ospina Álvarez, Patricia, S., Ramírez Cadavid, D.A., Escobar Sierra, D.M., Ossa Orozco, C.P., Rojas Vahos, D.F., Zapata Ocampo, P. và Atehortúa, L. (2014). Comparison of extraction methods of chitin from *Ganoderma lucidum* mushroom obtained in submerged culture. *BioMed Research International*, 2014.
 166. Öztürk, M., Duru, M.E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A. và Özler, M.A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1353-1360.

167. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M., Martínez, J., García-Lafuente, A., Guillamón, E. và Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128(3), 674-678.
168. Pan, Y., Hao, Y., Chu, T., Li, C., Zhang, Z. và Zhou, Y. (2010). Ultrasonic-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from Yunzhi mushroom and its effect on osteoblast cells. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 922-926.
169. Pandey, Aseesh, Belwal, T., Sekar, K.C., Bhatt, I.D. và Rawal, R.S. (2018). Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products*, 119, 218-225.
170. Patel, R., Patel, M. và Suthar, A. (2009). Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(10), 44-47.
171. Patel, Y., Naraiyan, R. và Singh, V. (2012). Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3(1), 1-12.
172. Peschel, W., Sánchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I., Jiménez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S. và Codina, C. (2006). An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97(1), 137-150.
173. Phú, T.T. (2018). *Nghiên cứu thành phần nấm lớn thuộc ngành Myxomycota, Ascomycota, Basidiomycota ở núi Ngọc Linh, Tỉnh Quảng Nam* (Luận án tiến sĩ Thực vật học), Học viện Khoa học Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
174. Puia, Cosmin, I., Aida, P., CHEDEA, V.S., LEOPOLD, N., BOCSAN, I.C. và BUZOIANU, A.D. (2018). Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal Mushroom with Important Health Benefits. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 343-349.
175. Quek, S.Y., Chok, N.K. và Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386-392.
176. Quoc, L.P.T. và Muoi, N.V. (2018). Physicochemical properties of *Polygonum multiflorum* Thunb. root powder produced with different carrier agents. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 24(2), 93-100.
177. Rajabi, H., Ghorbani, M., Jafari, S.M., Mahoonak, A.S. và Rajabzadeh, G. (2015). Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. *Food Hydrocolloids*, 51, 327-337.
178. Ricciardi, M., Licchetta, R., Mirabilii, S., Scarpari, M., Parroni, A., Fabbri, A., Cescutti, P., Reverberi, M., Fanelli, C. và Tafuri, A. (2017). Preclinical Antileukemia Activity of Tramesan: A Newly Identified Bioactive Fungal Metabolite. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017.
179. Ritchie, J.M., Rui, H., Zhou, X., Iida, T., Kodoma, T., Ito, S., Davis, B.M., Bronson, R.T. và Waldor, M.K. (2012). Inflammation and disintegration of

- intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS pathogens*, 8(3), e1002593.
180. Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. và Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International journal of food science & technology*, 45(7), 1386-1394.
 181. Roccia, P., Martínez, M.L., Llabot, J.M. và Ribotta, P.D. (2014). Influence of spray-drying operating conditions on sunflower oil powder qualities. *Powder Technology*, 254, 307-313.
 182. Rosenberg, M., Kopelman, I. và Talmon, Y. (1990). Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. *Journal of agricultural and food chemistry*, 38(5), 1288-1294.
 183. Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C. và Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of functional foods*, 4(4), 687-709.
 184. Saavedra Plazas, Carolina, D., Soccol, C.R., Nosedá, M.D., de Andrade Tanobe, V.O., Marin, O., Karp, S.G., de Melo Pereira, G.V., de Carvalho, J.C. và Soccol, V.T. (2020). A comparative study of extraction techniques for maximum recovery of bioactive compounds from *Ganoderma lucidum* spores. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 49(1), 70-88.
 185. Salamatullah, Mohammad, A., Hayat, K., Arzoo, S., Alzahrani, A., Ahmed, M.A., Yehia, H.M., Alsulami, T., Al-Badr, N., Al-Zaied, B.A.M. và Althbiti, M.M. (2021). Boiling technique-based food processing effects on the bioactive and antimicrobial properties of basil and rosemary. *Molecules*, 26(23), 7373.
 186. Sanzani, M. S., De Girolamo, A., Schena, L., Solfrizzo, M., Ippolito, A. và Visconti, A. (2009). Control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on apples by quercetin and umbelliferone. *European Food Research and Technology*, 228(3), 381-389.
 187. Schwarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A. và Winterhalter, P. (2003). Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 179-189.
 188. Scroccarello, A., Della Pelle, F., Neri, L., Pittia, P. và Compagnone, D. (2019). Silver and gold nanoparticles based colorimetric assays for the determination of sugars and polyphenols in apples. *Food Research International*, 119, 359-368.
 189. Sewald, Mark và De Vries, J. (2003). Food product shelf life. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 1-10.
 190. Shen, S.-F., Zhu, L.-F., Wu, Z., Wang, G., Ahmad, Z. và Chang, M.-W. (2020). Extraction of triterpenoid compounds from *Ganoderma Lucidum* spore powder through a dual-mode sonication process. *Drug development and industrial pharmacy*, 46(6), 963-974.
 191. Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 129-147.
 192. Shu, Bo, Yu, W., Zhao, Y. và Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 664-669.

193. Shu, B., Yu, W., Zhao, Y. và Liu, X. (2006). Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 76(4), 664-669.
194. Singh, S., Wang, H., Chan, Y., Pan, W., Dan, X., Yin, C., Akkouch, O. và Ng, T. (2015). Lectins from edible mushrooms. *Molecules*, 20(1), 446-469.
195. Sivaprakasam, E., Kavitha, D., Balakumar, R., Sridhar, S. và Kumar, J.S. (2011). Antimicrobial activity of whole fruiting bodies of *Trametes hirsuta* (Wulf. Fr.) Pil. against some common pathogenic bacteria and fungus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(3), 219-221.
196. Smolibowska, J., Szymański, M. và Szymański, A. (2016). Medicinal properties of fungi occurring on *Betula* sp. trees. A review. *Herba Polonica*, 62(3), 63-76.
197. Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Petrović, J. và Stojković, D. (2018). Mushrooms as sources of therapeutic foods *Therapeutic Foods* (pp. 141-178): Elsevier.
198. Sollohub, K. và Cal, K. (2010). Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(2), 587-597.
199. Song, J.F., Li, D.J. và Liu, C.Q. (2009). Response surface analysis of microwave-assisted extraction of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(11), 1669-1673.
200. Soria, A.C. và Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
201. Spigno, G. và De Faveri, D. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 210-217.
202. Standish, L.J., Wenner, C.A., Sweet, E.S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Novack, J. và Torkelson, C. (2008). *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 6(3), 122.
203. Stanikunaite, R., Khan, S.I., Trappe, J.M. và Ross, S.A. (2009). Cyclooxygenase-2 inhibitory and antioxidant compounds from the truffle *Elaphomyces granulatus*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(4), 575-578.
204. Sultana, B., Anwar, F. và Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, 14(6), 2167-2180.
205. Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S. và Ong, E.S. (2009). Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of separation science*, 32(4), 613-622.
206. Thùy, N.T.B. (2014). *Nghiên cứu đặc điểm sinh học và công nghệ nhân giống, nuôi trồng nấm Sò vua (pleurotus eryngii) và nấm Vân chi (trametes versicolor) ở Việt Nam*. VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM.

207. Tran, T.A., T. và Nguyen, H.V. (2018). Effects of spray-drying temperatures and carriers on physical and antioxidant properties of lemongrass leaf extract powder. *Beverages*, 4(4), 84.
208. Trang, N.T.T. (2016). *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự phát triển của nấm vân chi (Trametes versicolor) nuôi cấy trong môi trường dịch thể*. Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng.
209. Tzannis, S.T., Meyer, J. và Prestrelski, S. (1997). *Secondary structure considerations during protein spray-drying*. Paper presented at the ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.
210. Varrot, A., Basheer, S.M. và Imberty, A. (2013). Fungal lectins: structure, function and potential applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(5), 678-685.
211. Vazirian, M., Dianat, S., Manayi, A., Ziari, R., Mousazadeh, A., Habibi, E., Saeidnia, S. và Amanzadeh, Y. (2014). Anti-inflammatory effect, total polysaccharide, total phenolics content and antioxidant activity of the aqueous extract of three basidiomycetes. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(1), 15-21.
212. Venkatesh, M. và Raghavan, G. (2004). An overview of microwave processing and dielectric properties of agri-food materials. *Biosystems engineering*, 88(1), 1-18.
213. Vinatoru và Mircea. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313. doi: [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
214. Vivar-Quintana, A., Santos-Buelga, C. và Rivas-Gonzalo, J. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 147-155.
215. Wang, Yanping, Liu, Y. và Hu, Y. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 111, 324-332.
216. Wasser, S. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274.
217. Wayne, P. (2011). Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
218. Webster, S.H. và Liljegren, E.J. (1955). Organ: Body-weight ratios for certain organs of laboratory animals. III. White Swiss mouse. *American Journal of Anatomy*, 97(1), 129-153.
219. Winder, M., Bulska-Będkowska, W. và Chudek, J. (2021). The use of *Herichium erinaceus* and *Trametes versicolor* extracts in supportive treatment in oncology. *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 1-16.
220. Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F.A. và Sams, C.E. (2004). Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7905-7910.

221. Yakubu, A., Adua, M. và Adamude, H. (2008). *Welfare and haematological indices of weaner rabbits as affected by stocking density*. Paper presented at the Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy, 10-13 June 2008.
222. Yamaç, M. và Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical biology*, 44(9), 660-667.
223. Yang, Bin, Liu, X. và Gao, Y. (2009). Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) fruits with response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 610-615.
224. Yang, L., Tu, D., Zhao, Z. và Cui, J. (2017). Cytotoxicity and apoptosis induced by mixed mycotoxins (T-2 and HT-2 toxin) on primary hepatocytes of broilers in vitro. *Toxicon*, 129, 1-10.
225. Yim, H.S., Chye, F.Y., Koo, S.M., Matanjun, P., How, S.E. và Ho, C.W. (2012). Optimization of extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food and bioproducts processing*, 90(2), 235-242.
226. Yin, C., Fan, X., Fan, Z., Shi, D. và Gao, H. (2018). Optimization of enzymes-microwave-ultrasound assisted extraction of *Lentinus edodes* polysaccharides and determination of its antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 446-454.
227. Yoldas, A. và Dayan, M.O. (2014). Morphological characteristics of renal artery and kidney in rats. *The Scientific World Journal*, 2014.
228. Yoshioka, Y., Emori, M., Ikekawa, T. và Fukuoka, F. (1975). Isolation, purification, and structure of components from acidic polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quél. *Carbohydrate Research*, 43(2), 305-320.
229. Yu, SJ, Zhang, Y., Li, C., Zhang, Q., Ma, Z. và Fan, M. (2011). Optimization of ultrasonic extraction of mycelial polysaccharides from *Paecilomyces hepiali* using response surface methodology and its antioxidant activity. *African Journal of Biotechnology*, 10(75), 17241-17250.
230. Yuen, J.W. và Gohel, M.D.I. (2005). Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence. *Nutrition and cancer*, 53(1), 11-17.
231. Zhang, J., Ma, L., Wu, Z.-F., Yu, S.-L., Wang, L., Ye, W.-C., Zhang, Q.-W. và Yin, Z.-Q. (2017). Cytotoxic and apoptosis-inducing activity of C21 steroids from the roots of *Cynanchum atratum*. *Steroids*, 122, 1-8.
232. Zhang, Z., Lv, G., Pan, H., Shi, L. và Fan, L. (2011). Optimization of the microwave-assisted extraction process for polysaccharides in himematsutake (*Agaricus blazei* Murrill) and evaluation of their antioxidant activities. *Food Science and Technology Research*, 17(6), 461-470.
233. Zhao, Y.T., Tang, Y.Q., Liu, K.Z. và Zhang, Y. (2015). *A study about microwave-assisted extraction of polysaccharides form medicinal mushrooms *Fomitopsis ulmaria* (sor.: for.) bond. Et sing.* Paper presented at the Advanced Materials Research.
234. Zheng, Yi, Li, Y. và Wang, W.-d. (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes*

- orientalis. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 315-323. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.034>
235. Zheng, Y., Cui, J., Chen, A.-H., Zong, Z.-M. và Wei, X.-Y. (2019). Optimization of ultrasonic-microwave assisted extraction and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Trametes orientalis*. *Molecules*, *24*(1), 147.
236. Zhou, Feng, Zhang, H., Liu, R. và Zhang, D. (2013). Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Astragalus membranaceus*. *Chemistry of Natural Compounds*, *49*(3), 568-570.
237. Zhou, Xuanwei, Jiang, H., Lin, J. và Tang, K. (2007). Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extracts on human liver cancer and breast cancer cell line. *African Journal of Biotechnology*, *6*(15).
238. Zhou, M., Quek, S.Y., Shang, X. và Fang, S. (2021). Geographical variations of triterpenoid contents in *Cyclocarya paliurus* leaves and their inhibitory effects on HeLa cells. *Industrial Crops and Products*, *162*, 113314.
239. Zhu, M., Chang, Q., Wong, L.K., Chong, F.S. và Li, R.C. (1999). Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, *13*(6), 529-531.
240. Zoberi, M. (1972). *Tropical Macrofungi: some common species*: Springer.

Phụ lục

Danh mục các phụ lục

Phụ lục A. Xác định tên loài

Phụ lục B. Định tính hợp chất chuyển hóa bậc 2

Phụ lục C. Xây dựng đường chuẩn

Phụ lục D. Tinh sạch và tách chất

Phụ lục E. Kết quả thống kê

Phụ lục F. Xử lý mẫu

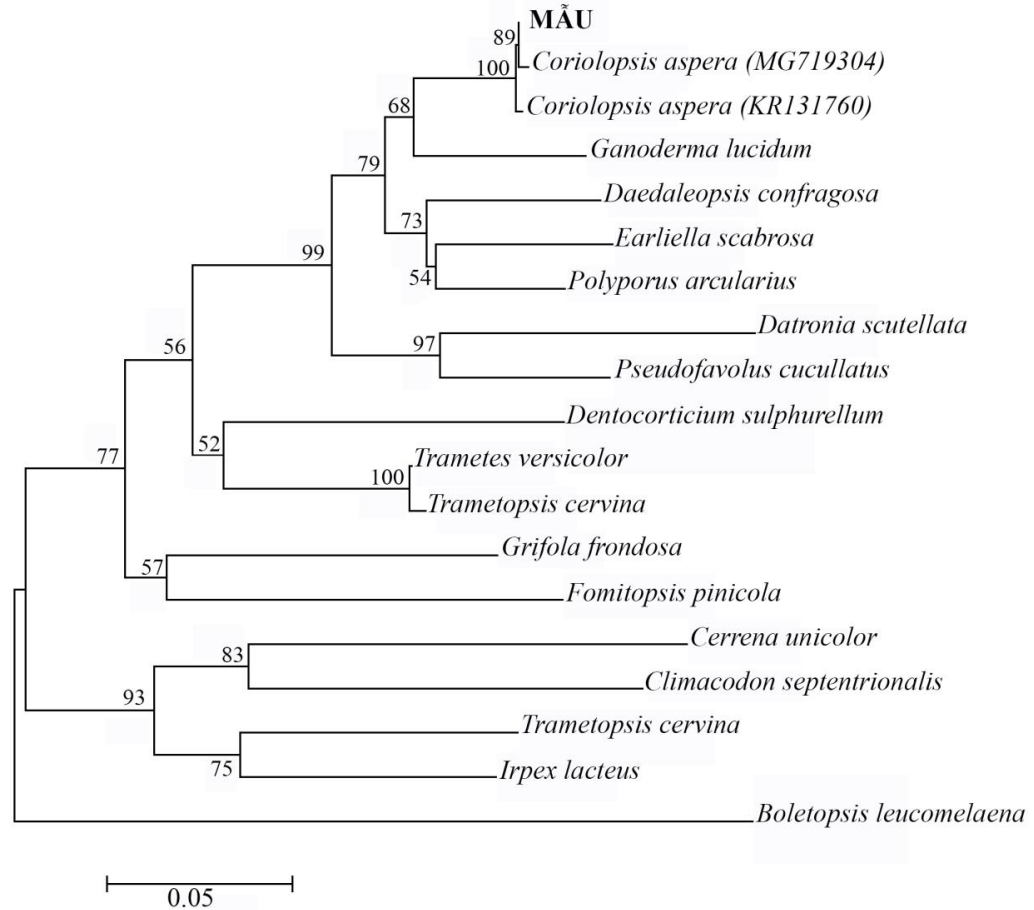
Phụ lục G. Bảo quản

Phụ lục H. Công thức

Phụ lục I. Độ an toàn

Phụ lục A

PLA1. Kết quả xây dựng cây phả hệ



Hình a.1. Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA5 với các nhánh có giá trị bootstrap > 50% được giữ lại.

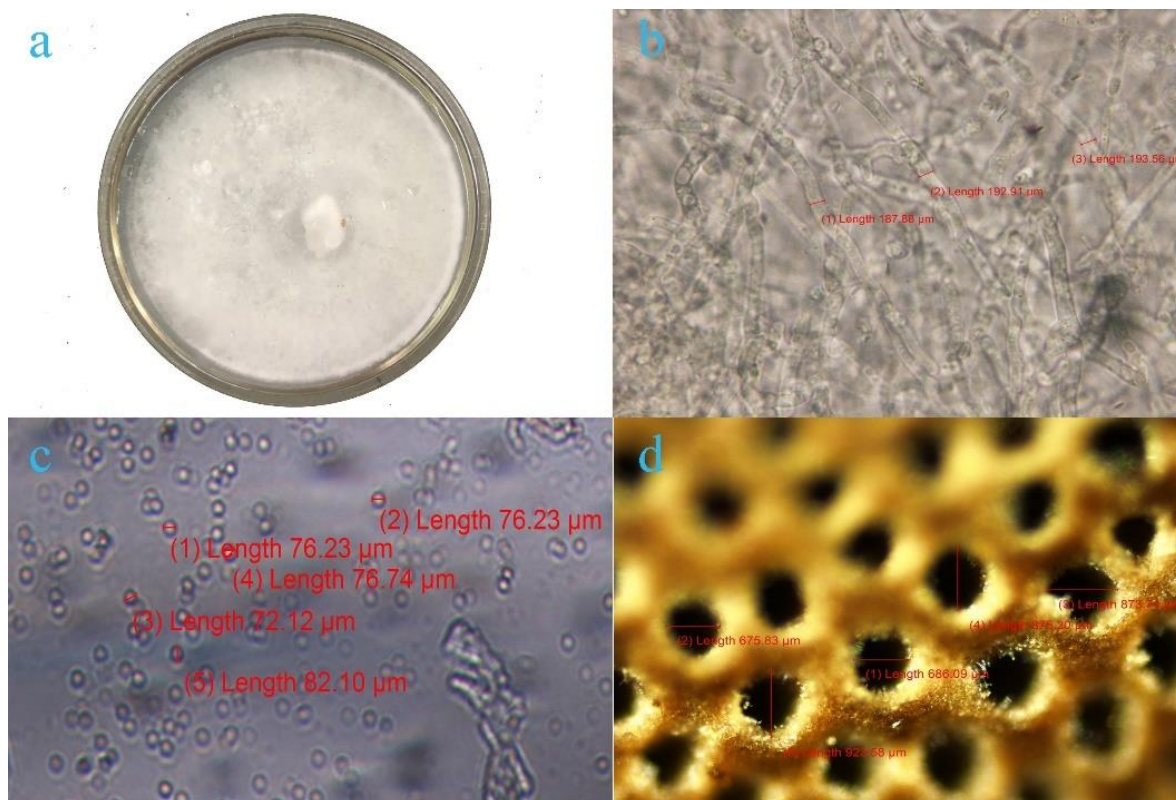
Cây phả hệ Hình a.1 cho thấy, mẫu nghiên cứu có đặc điểm di truyền (vùng ITS) gần nhất với 2 taxa thuộc loài *Coriolopsis aspera* (Mã số MG719304 và KR131760). Theo đó, các taxa này xếp cùng nhau trên cây phả hệ (Hình 1) với bootstrap tuyệt đối là 100%.

PLA2. Hình thái nấm *Coriolopsis aspera*



Hình a.2. Sự phát triển nấm *Coriolopsis aspera*

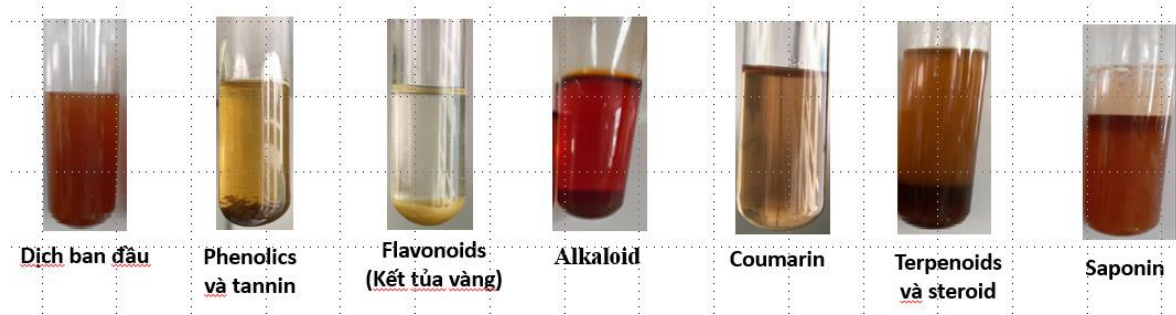
Trên Hình a.2 cho thấy sự phát triển của nấm vân chi trong tự nhiên, Hình a.2(a) tơ nấm phát triển trong thời điểm tháng 6 của năm. Trong thời điểm này có mưa nên tơ nấm bắt đầu phát triển. Sau 3 ngày, từ tơ nấm bắt đầu phát triển hình thành nấm vân chi nhưng hình dạng chưa rõ hình 2(b). Ở Hình a.2(c), nấm vân chi phát triển được 7 ngày. Trên mặt nấm lúc này phân biệt rõ màu đen phía trong và màu trắng phía ngoài. Sau 10 ngày, nấm vân chi có kích thước khoảng 3,5 cm và đã xuất hiện các đường vân đen, nâu xem kẽ nhau ở bên trong, viền ngoài có màu trắng, những đường vân còn ít và chưa rõ ở Hình a.2(d). Hình a.2(e), 2(f), nấm vân chi phát triển được 15 đến 18 ngày đường vân của nấm vân chi rõ ràng, màu sắc các đường vân vẫn còn màu đen và viền trắng ở ngoài. Khi đến 25 ngày thì nấm vân chi mới xuất hiện màu nâu và đường viền màu trắng phía ngoài ít và mờ Hình a.2(g). Ở Hình a.2(h), 2(i), cho thấy nấm vân chi đã trưởng thành và đạt kích thước khoảng 7cm.



Hình a.3. Ảnh vãn chi *Corilopsis aspera* chụp dưới kính hiển vi Olympus BX51

Trên Hình a.3(a) tơ nấm vãn chi được phát triển 7 ngày trên đĩa petri ở môi trường dịch chiết khoai tây với aga. Hình a.3(b) là sợi tơ nấm vãn chi có kích thước trung bình đường kính sợi tơ 191,45 μ m. Hình a. 3(c) là bào tử nấm vãn chi có đường kính trung bình 77,29 μ m. Hình a.3(d) là mặt dưới quả thể nấm vãn chi có lỗ đường kính trung bình 807,50 μ m.

Phụ lục B



Hình b.1. Sự thay đổi màu và hiện tượng kết tủa của dịch thử

Phụ lục C

PLC1. Xây dựng đường chuẩn quercetin để xác định TFC

Lấy 1 ml mẫu cho vào ống nghiệm, thêm 0.3 ml dung dịch NaNO₂ vào lắc đều và để yên trong 5 phút. Sau đó, cho thêm 0.3 ml dung dịch AlCl₃ vào lắc đều và để yên 5 phút, bổ sung thêm 2 ml dung dịch NaOH 1M lắc đều và thêm nước cất cho đủ 10 ml rồi đem đo quang ở bước sóng $\lambda = 510\text{nm}$. Làm mẫu trắng đối chứng bằng nước cất. Tổng hàm lượng flavonoids được biểu thị bằng gam quercetin tương đương (QE) (Bains và Tripathi, 2017).

Bảng c.1. Xây dựng đường chuẩn quercetin và đo mẫu.

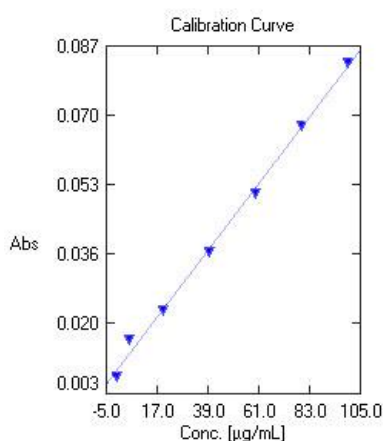
Số ống	1	2	3	4	5	6	7	M ₁	M ₂	M ₃
Nồng độ Quercetin (ppm)	0	5	20	40	60	80	100			
Thể tích Quercetin (1000ppm)	0	0,05	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0	0	0
Dịch mẫu (ml)	0							1	1	1
NaNO ₂ 5% (ml)	0,3									
	Lắc đều, để yên 5 phút									
AlCl ₃ 10% (ml)	0,3									
	Lắc đều, để yên 5 phút									
NaOH 2M (ml)	2									
Nước cất (ml)	7.4	7.35	7.2	7.0	6.8	6.6	6.4	6.4	6.4	6.4

M₁, M₂, M₃ là mẫu đem phân tích

Hàm lượng flavonoids tổng được tính theo công thức:

$$\text{TFC (mgQE/g DW)} = C_x \times \frac{V_{dm}}{10^3} \times \frac{100}{a \times (100 - W)} \times K$$

Trong đó : TFC: hàm lượng flavonoids tổng số, C_x: nồng độ quercetin đo được (ppm), V_{dm}: thể tích định mức mẫu đo (ml), 10³: hệ số qui đổi, W: độ ẩm mẫu (%), a: khối lượng mẫu ban đầu (g), K: hệ số pha loãng.



Measure Mode Single wavelength
 Curve Evaluate
 Principle Abs = f(Conc)
 Order of Curve 1st
 Equation Abs = K1*(Conc) + K0
 Calibration Method Concentrator
 K0 0.00882
 K1 0.00073
 R 0.9977

Hình c.1. Đường chuẩn quercetin

PLC2. Xây dựng đường chuẩn oleanolic để xác định TTC

Hút 0.2ml dung dịch mẫu cho vào bình định mức 10ml, hút thêm 0.2ml dung dịch acid acetic 5% và 1,2ml acid perchloric (70-72%) được thêm vào, trộn và ủ trong bể điều nhiệt 15 phút. Sau đó, dung dịch hỗn hợp được làm lạnh và pha loãng đến 5ml bằng ethyl acetat. Độ hấp thụ được đo ở 550 nm so với mẫu trắng bằng máy quang phổ.

Bảng c.2. Các bước xây dựng đường chuẩn acid oleanolic

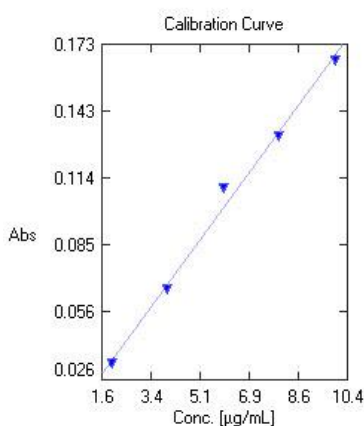
Số ống nghiệm	1	2	3	4	5	6	M ₁	M ₂	M ₃
Nồng độ acid oleanolic (ppm)	0	2	4	6	8	10			
Acid oleanolic (100ppm)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0	0	0
Dịch mẫu (ml)							1	1	1
Acid acetic 5% (ml)	0,2								
HClO ₄ (ml)	1,2								
Lắc đều ủ ở 70°C trong 15 phút sau đó làm lạnh nhanh trong 2 phút									
Etyl Acetat (ml)	3,6	3,5	3,4	3,3	3,2	3,1	2,6	2,6	2,6
Lắc đều rồi đem đo quang ở bước sóng λ = 550 nm.									

M₁, M₂, M₃ là mẫu đem phân tích

Hàm lượng triterpene tổng được tính theo công thức:

$$TTC \text{ (mg acid oleanolic/g DW)} = C_x \times \frac{V_{dm}}{10^3} \times \frac{100}{a \times (100 - W)} \times K$$

Trong đó : TTC: hàm lượng triterpene tổng, C_x: nồng độ acid oleanolic đo được (ppm), V_{dm}: thể tích định mức mẫu (ml), 10³: hệ số qui đổi, W: độ ẩm mẫu (%), a: khối lượng mẫu ban đầu (g), K: hệ số pha loãng.



Measure Mode Single wavelength
 Curve Evaluate
 Principle Abs = f(Conc)
 Order of Curve 1st
 Equation Abs = K1*(Conc) + K0
 Calibration Method Concentrator
 K0 0.0017
 K1 0.01665
 R 0.9960

PLC3. Xây dựng đường chuẩn acid galic để xác định TPC

Cho vào ống nghiệm 1 ml dịch chiết pha loãng, thêm 0.5 ml Folin-Ciocalteu, lắc đều và để yên trong 3-8 phút. Thêm 2.5ml dung dịch bão hòa Na₂CO₃ để trung hòa phản ứng, thêm đủ thể tích 10 ml bằng nước cất, rồi lắc mạnh dung dịch. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 765 nm, mẫu trắng làm đối chứng. Hàm lượng polyphenol tổng trong dịch trích ly được xác định bằng đường chuẩn acid gallic, thể hiện bằng gam GAE/g chất khô nguyên liệu (Izadiyan và Hemmateenejad, 2016).

Bảng c.3. Các bước xây dựng đường chuẩn acid galic

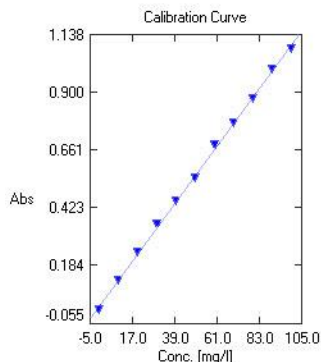
Số ống	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	M1	M2	M3
Nồng độ acid gallic (ppm)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			
Thể tích acid gallic (1000ppm)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0	0	0
Dịch mẫu (ml)												1	1	1
Folin 10% (ml)	5													
Lắc đều, để yên 5 phút														
Na ₂ CO ₃ 7.5%	4													
Nước cất (ml)	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0	0	0
Để yên 60 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 765 nm														

M₁, M₂, M₃ là mẫu đem phân tích

Hàm lượng polyphenol tổng được tính theo công thức:

$$\text{TPC (mgGAE/g DW)} = C_x \times \frac{V_{dm}}{10^3} \times \frac{100}{a \times (100 - W)} \times K$$

Trong đó : TPC: hàm lượng polyphenol tổng, C_x : nồng độ acid gallic đo được (ppm), V_{dm} : thể tích định mức mẫu đo (ml), 10^3 : hệ số qui đổi, W : độ ẩm mẫu (%), a : khối lượng mẫu ban đầu (g), K : hệ số pha loãng.



Measure Mode Single wavelength
 Curve Evaluate
 Principle Abs = f(Conc)
 Order of Curve 1st
 Equation Abs = K1*(Conc) + K0
 Calibration Method Concentrator
 K0 0.01768
 K1 0.0108
 R 0.9995

PLC5. Xây dựng đường chuẩn vitamin C

Cách tiến hành: Hút 0,1 ml dịch chiết mẫu vào ống nghiệm. Mẫu đối chứng thay dịch chiết bằng nước cất. Tiếp theo, hút thêm 4 ml dung dịch DPPH vào ống nghiệm, sau đó thêm cồn vào ống nghiệm cho đủ 5 ml và ủ tối trong 30 phút. Đo độ hấp thụ quang học ở 517 nm. Chất chuẩn vitamin C được dùng làm chất chuẩn. Hoạt tính kháng oxy hóa được xác định dựa trên đồ thị chuẩn giữa nồng độ Vitamin C và phần trăm độ giảm hấp thụ, được biểu diễn bằng ($\mu\text{mol Vit C /g}$) (W.-J. Li và ctv 2012).

Bảng C5. Xây dựng đường chuẩn vitamin C (VitC) bằng phương pháp DPPH

Số ống	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M ₁	M ₂	M ₃
DD VitC 100ppm (ml)	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0	0	0
DD mẫu(ml)	0											0,1	0,1	0,1
DPPH 0,1mM (ml)	4													
ethanol 99.5% (ml)	1	0,95	0,9	0,85	0,8	0,75	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,9	0,9	0,9
Nồng độ (ppm)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C _x		
Lắc đều và ủ ở điều kiện bóng tối, nhiệt độ phòng trong 30 phút rồi đem đo quang ở bước sóng $\lambda = 517\text{nm}$														

M₁, M₂, M₃ là mẫu đem phân tích

Dung dịch DPPH 0,1 mM dùng làm thí được chuẩn bị bằng cách hòa tan 3.94 mg DPPH trong 100 ml ethanol 99,5% và dùng ngay trong ngày.

Xác định hoạt tính kháng oxy hóa của mẫu: Lấy 0,1 ml dịch chiết với các nồng độ khác nhau được cho vào trong những ống nghiệm riêng biệt, hút 4 ml dung dịch DPPH 0,1 mM cho vào ống nghiệm và cuối cùng bổ sung thêm 0,9 ml ethanol. Các

ống nghiệm này được giữ tại nhiệt độ phòng trong 30 phút để các phản ứng xảy ra. Sự thay đổi độ hấp thụ ở bước sóng 517 nm được đo bằng thiết bị đo quang UV- VIS. Dựa vào phương trình đường chuẩn VitC, tính được hoạt tính kháng oxy hóa của nguyên liệu theo công thức sau:

$$\text{RSA (mg VitC/g DW)} = C_x \times \frac{V_{dm}}{10^3} \times \frac{100}{a \times (100 - W)} \times K$$

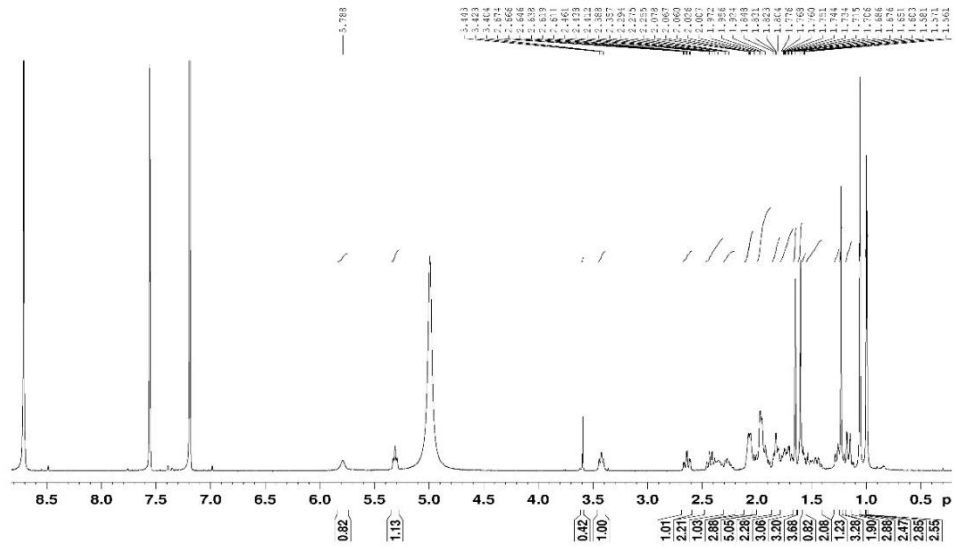
Trong đó: RSA: khả năng khử gốc tự do, C_x : Hàm lượng VitC đo được (ppm), V_{dm} : thể tích định mức mẫu đo, a: khối lượng mẫu kiểm tra (g), W: Độ ẩm mẫu đo (%), K: hệ số pha loãng.

Phụ lục D

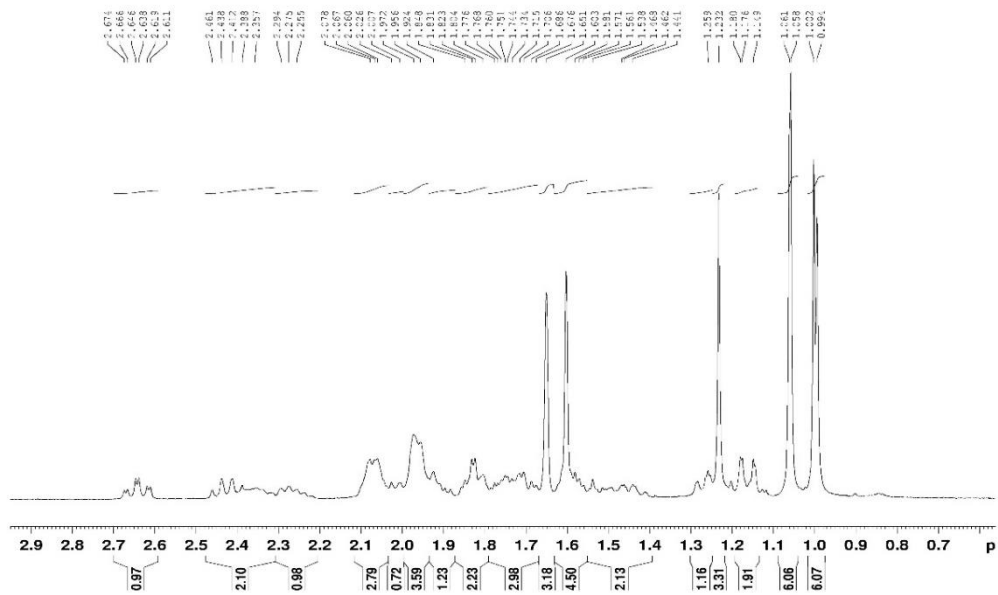
PLD1. Tinh sạch tách chất 1

Trametenolic B (1): tinh thể không màu, m.p. 258-260°C; IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3200 (-OH), 1718, 1632; ESI-MS m/z 455 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, pyridine- d_5) (δ ppm): 5.32 (1H, *t*, H-24); 3.40 (1H, *t*, $J = 9.5$ Hz, H-3); 2.61 (1H, *td*, $J = 9.5, 4.0$ Hz, H-20), 2.46-2.35 (2H, *m*, H-16, 17, 23a), 2.29-2.25 (1H, *m*, H-23b), 2.06 (2H, *t*, $J = 5.5, 3.5$ Hz, H-7), 1.97-1.92 (2H, *m*, H-11, 12, 22a), 1.85-1.44 (1H, *m*, H-1b), 1.81 (2H, *dt*, $J = 9.5, 4.0$ Hz, H-2), 1.80 (1H, *dt*, $J = 9.5, 4.0$ Hz, H-1a), 1.78-1.68 (1H, *m*, H-6, 15a, 22b), 1.65 (3H, *s*, H-27), 1.60 (3H, *s*, H-26), 1.26 (1H, *td*, H-15), 1.23 (3H, *s*, H-30), 1.15 (1H, *t*, H-5), 1.06 (3H, *s*, H-18, 28), 1.00 (3H, *s*, H-19), 0.99 (3H, *s*, H-29); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, pyridine- d_5) (δ ppm): 178.7 (C-21), 135.0 (C-8), 134.3 (C-9), 131.7 (C-25), 124.9 (C-24), 77.8 (C-3), 50.9 (C-5), 49.8 (C-14), 49.1 (C-20), 47.7 (C-17), 44.9 (C-13), 39.5 (C-4), 37.4 (C-10), 36.1 (C-1), 33.3 (C-22), 30.9 (C-15), 29.4 (C-12), 28.7 (C-2), 28.6 (C-28), 27.5 (C-16), 26.8 (C-7), 26.7 (C-23), 25.8 (C-26), 24.5 (C-30), 21.2 (C-11), 19.4 (C-19), 18.7 (C-6), 17.7 (C-27), 16.4 (C-29), 16.4 (C-18).

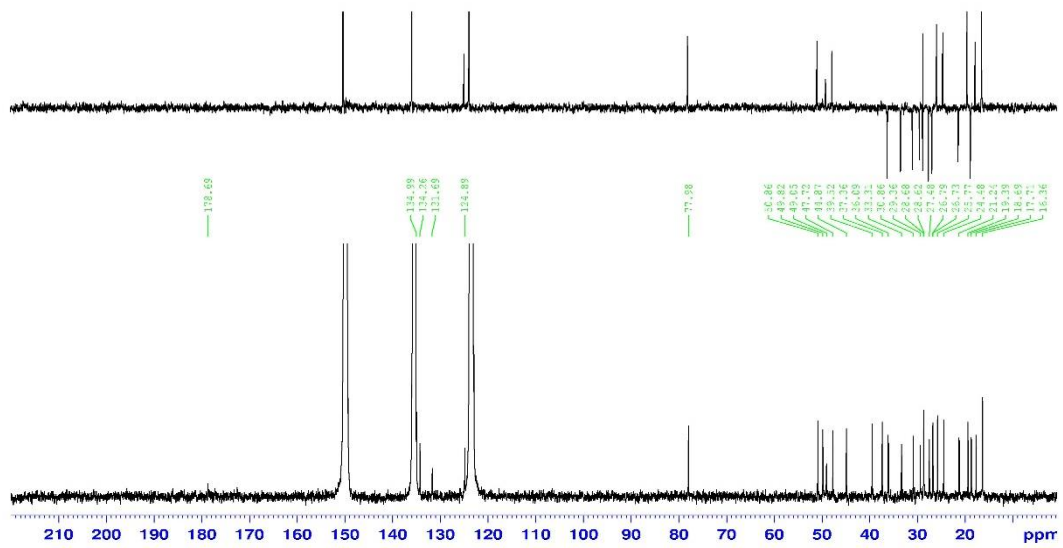
Hợp chất (1) thu được tinh thể không màu. Dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy hợp chất (1) có sự hiện diện của 30 tín hiệu carbon, bao gồm 4 carbon metin, 10 carbon metilen, 7 carbon methyl, 4 carbon olefinic, 1 carbonyl và 4 carbon bậc 4. Các tín hiệu phổ cho thấy cấu trúc chất có hệ thống bốn vòng, trong đó có một liên kết đôi tại vị trí C-8 (δ_{C} 135,0 ppm) và C-9 (δ_{C} 134,3 ppm). Hợp chất (1) có sự xuất hiện tín hiệu một carbonyl tại C-21 ở δ_{C} 178,7 ppm và hai carbon olefinic tại C-24 ở δ_{C} 124,9 ppm và C-25 δ_{C} 134,6 ppm. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ thể hiện 7 nhóm methyl đơn ở δ_{H} 1,23 (H-30), δ_{H} 1,06 (H-18), δ_{H} 0,99 (H-29), δ_{H} 1,00 (H-19), δ_{H} 1,06 (H-28), δ_{H} 1,60 (H-26) và δ_{H} 1,65 (H-27), một nhóm hydroxymethine tại 3,40. Ngoài ra còn tín hiệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất cho thấy tín hiệu proton olefinic tại 5,32 (1H, *t*, H-24). Kết hợp phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT, HSQC, HMBC, NOESY, COSY cho thấy hợp chất (1) này là một dẫn xuất của lanosterol kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo (Leliebre-Lara và ctv 2016) cho thấy hợp chất steroid có tên gọi là axit Trametenolic B (Axit 3β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic).



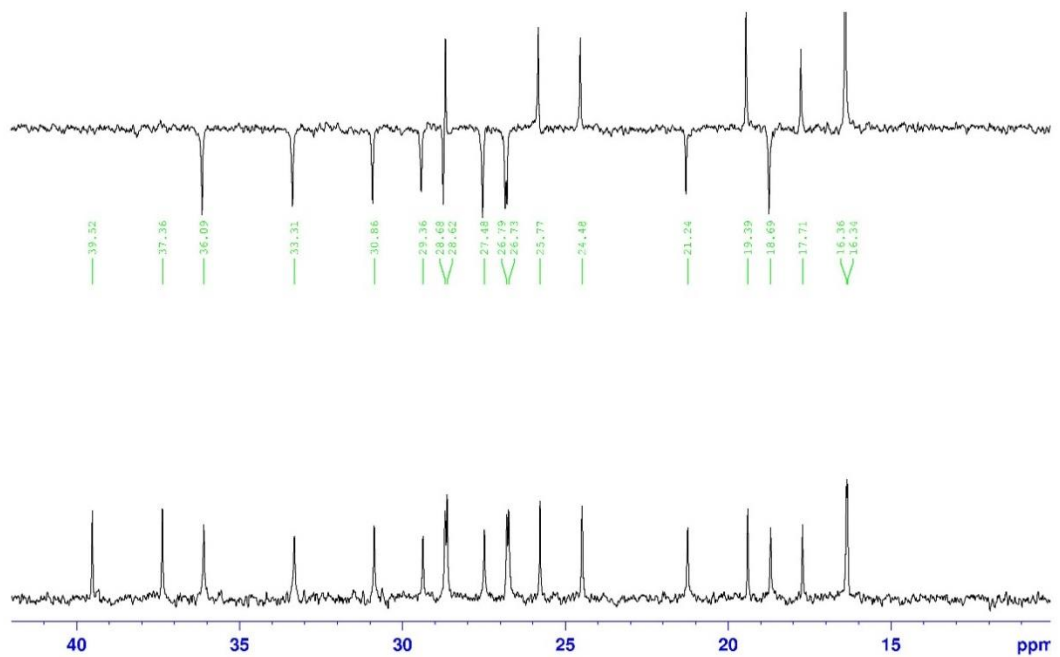
Hình d.1. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất axit 3β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



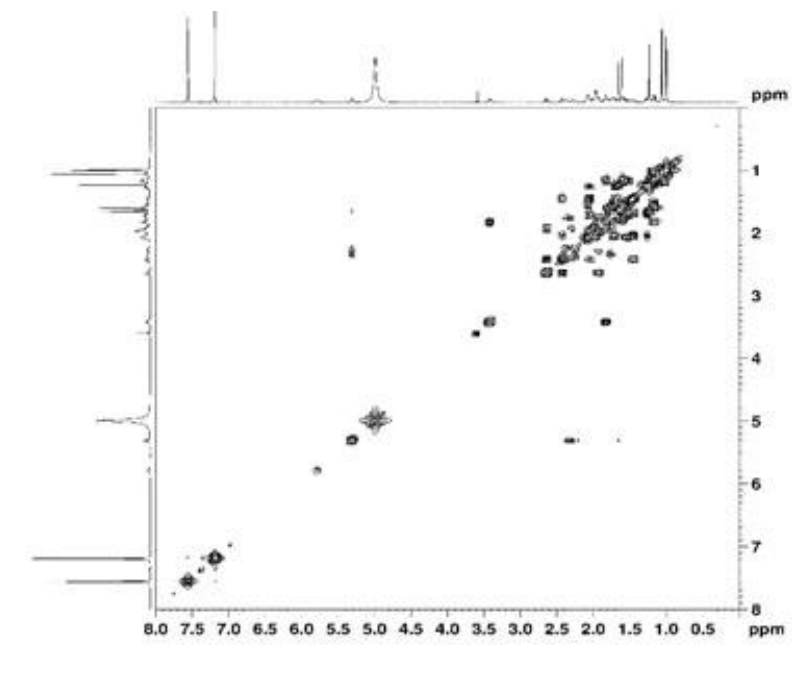
Hình d.2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất axit 3β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



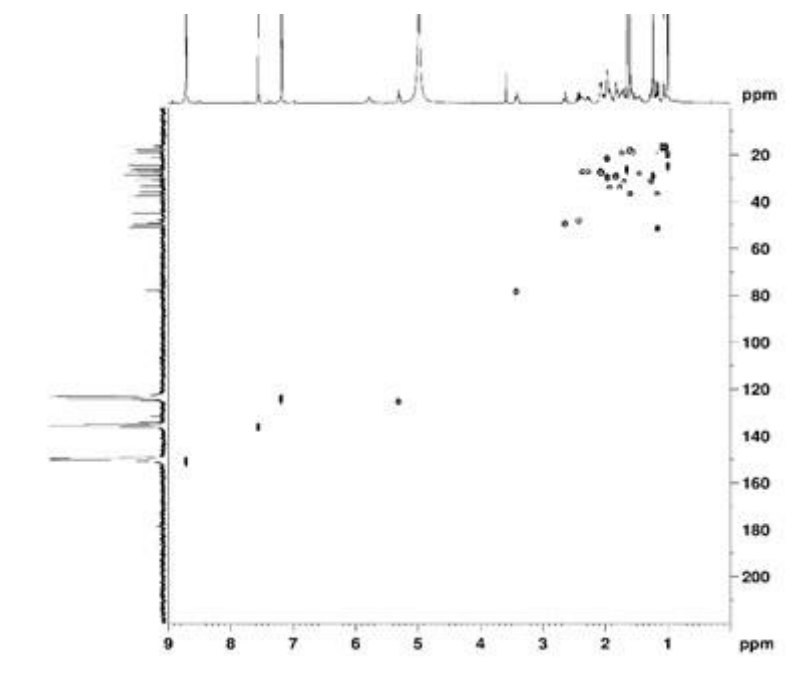
Hình d.3. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất axit 3β -hydroxyloganosta-8,24-dien-21-oic



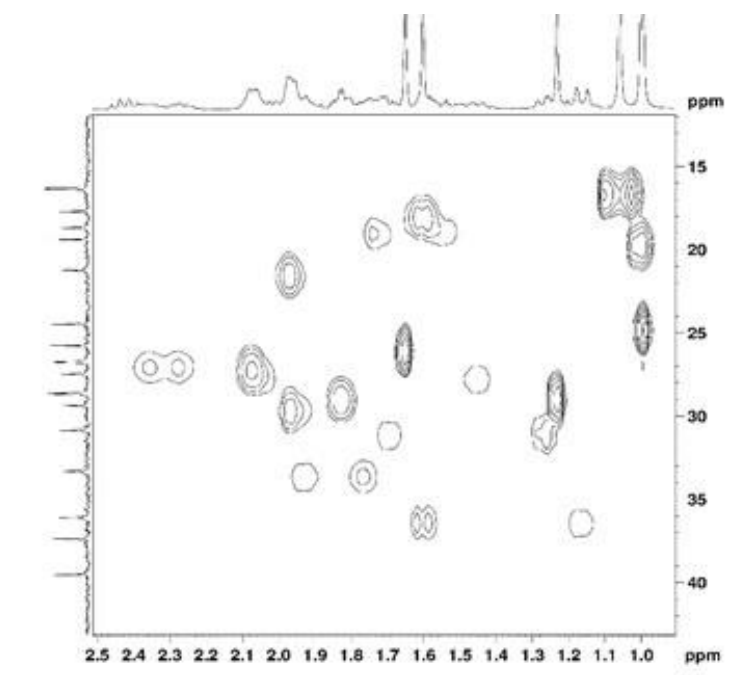
Hình d.4. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất axit 3β -hydroxyloganosta-8,24-dien-21-oic



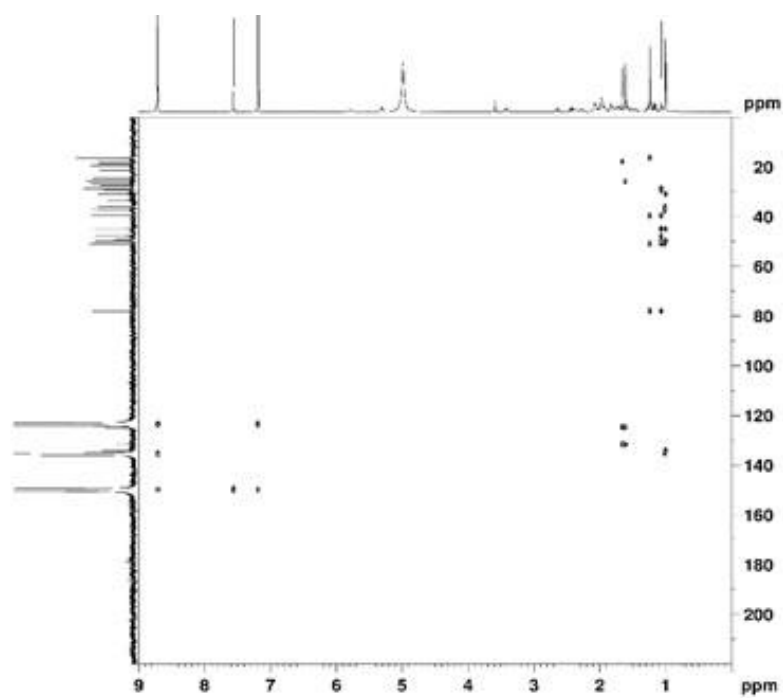
Hình d.5. Phổ COSY của hợp chất axit 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



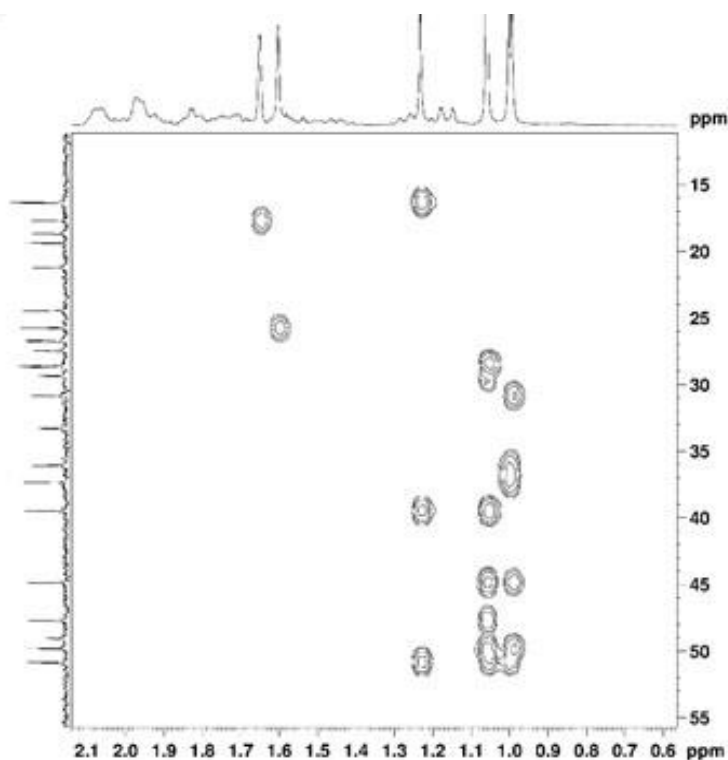
Hình d.6. Phổ HSQC của hợp chất axit 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



Hình d.7. Phổ HSQC của hợp chất axit 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



Hình d.8. Phổ HMBC của hợp chất axit 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic



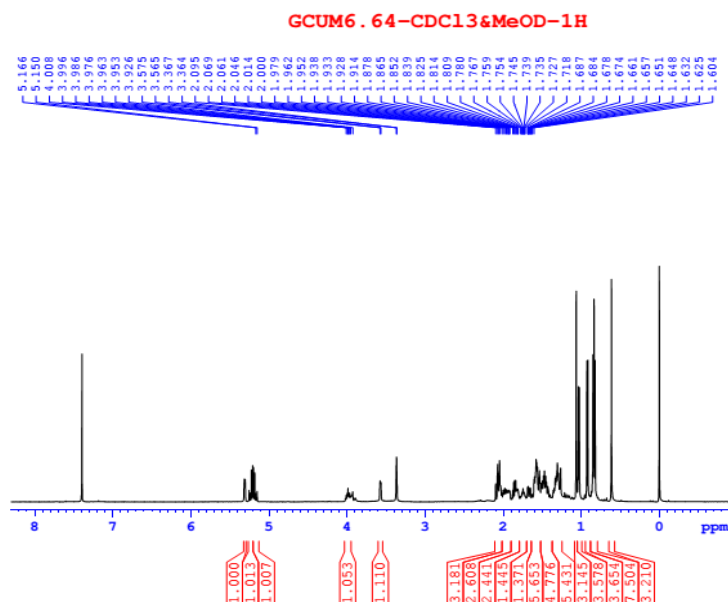
Hình d.9. Phổ HMBC của hợp chất axit 3 β -hydroxylanosta-8,24-dien-21-oic

PLD2. Tinh sạch tách chất 2

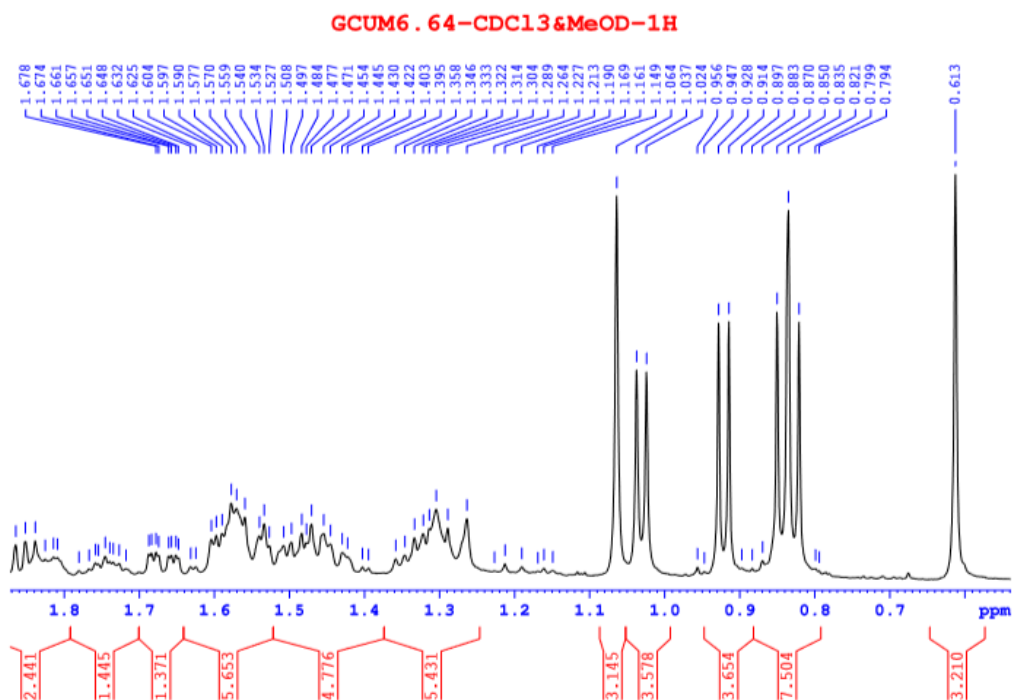
Cerevisterol (2): tinh thể không màu, m.p. 254-256⁰C; EI-MS m/z : 412 [M-H₂O]⁺ (13) , 397(6) , 394(19), 383(10), 379(21), 376(15), 26(15), 251(57) , 69(100); ¹H-NMR (pyridine-d₅) (δ ppm): 5.74 (1H, *br d*, $J = 4.8$ Hz, H-7), 5.23 (1H, *dd*, $J = 15.2, 7.2$ Hz, H-23), 5.16(1H, *dd*, $J = 15.2, 8.0$ Hz, H-22), 4.84(1H, *m*, H-3), 4.33 (1H, *br d*, $J = 4.8$ Hz, H-6), 3.04(1H, *dd*, $J=13.0, 11.6$ Hz, H-4 β), 1.53(3H, *s*, CH₃-19), 1.05 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz, CH₃-21), 0.94 (3H, *d*, $J=6.8$ Hz, CH₃-28), 0.85 (3H, *d*, $J = 6.7$ Hz , CH₃-27), 0.84 (3H, *d*, $J = 6.7$ Hz, CH₃-26), 0.65 (3H, *s*, CH₃-18); ¹³C-NMR (pyridine-d₅) (δ ppm): 141.6(C-8), 136.6(C-22), 132.1(C-23), 120.5(C-7), 76.2(C-5), 74.3(C-6), 67.6(C-3), 56.2(C-17), 55.3(C-14), 43.8(C-13), 43.8 (C-9), 43.1 (C-24), 42.0 (C-4), 40.8 (C-20), 39.9 (C-12), 38.1(C-10), 33.8 (C-1), 33.4 (C-25), 32.6 (C-2), 28.5 (C-16), 23.5 (C-15), 22.4 (C-11), 21.4 (C-21), 20.1 (C-27), 19.8 (C-26), 18.8 (C-19), 17.8 (C-28), 12.5 (C-18).

Phổ EI-MS cho các tín hiệu pic m/z : 412 [M-H₂O]⁺ (13), 397(6), 394(19), 383(10), 379(21), 376(15), 26(15), 251(57), 69(100) khẳng định công thức phân tử của hợp chất (2) là C₂₇H₄₃O₃. Phổ ¹H-NMR cho các tín hiệu đặc trưng của proton olefinic tại 5,23 (1H, *dd*, $J = 15,2, 7,2$ Hz), 5,16(1H, *dd*, $J=15,2, 8,0$ Hz) tương ứng với vị trí H-22, -23; 5,74 (1H, *br d*, $J = 4,8$ Hz) tại vị trí H-7. Ngoài ra, còn xuất hiện 2 tín hiệu

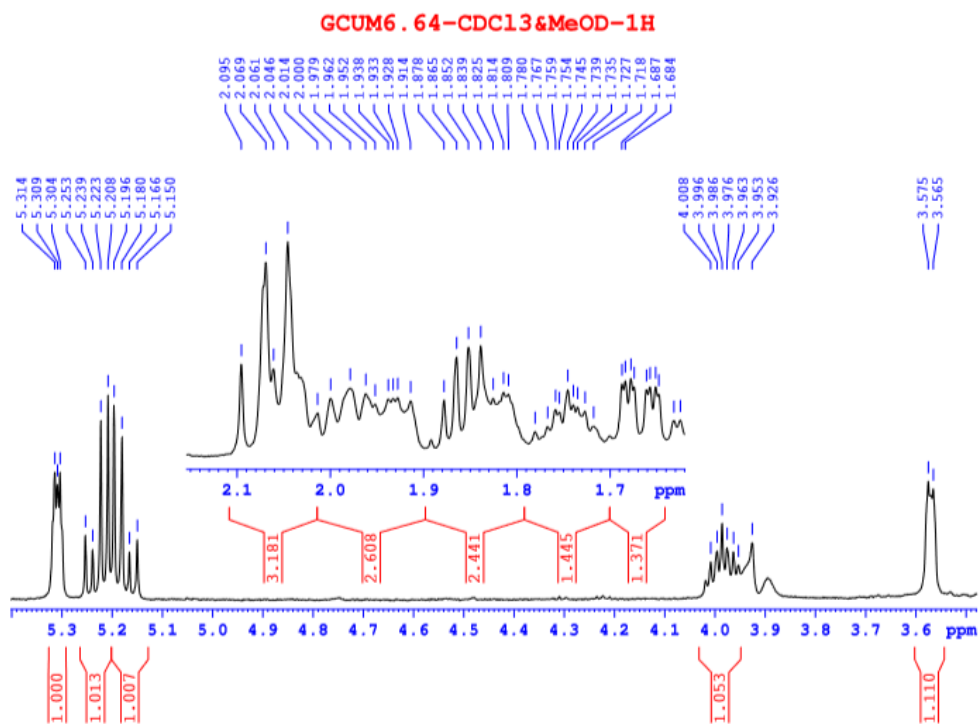
proton oxygenat metin H-3 tại 4,84 (1H, *m*) và H-6 tại 4,33 (1H, *br d*, $J = 4,8$ Hz), 3,04(1H, *dd*, $J=13,0, 11,6$ Hz, H-4 β). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất (2) có sự xuất hiện tín hiệu singlet đặc trưng của 2 nhóm metyl tại 1,53(3H, *s*, CH₃-19), 0,65 (3H, *s*, CH₃-18); tín hiệu double của 4 nhóm metyl ở δ 1,05 (3H, *d*, $J=6,6$ Hz, CH₃-21), 0,94 (3H, *d*, $J=6,8$ Hz, CH₃-28), 0,85 (3H, *d*, $J = 6,7$ Hz, CH₃-27), 0,84 (3H, *d*, $J = 6,7$ Hz, CH₃-26). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và kết hợp với phổ HSQC thấy xuất hiện tín hiệu của 34 cacbon gồm : 6 nhóm metyl trong đó có 6 nhóm metyl ở (δ_{C} 21,4; 20,1; 19,8; 17,8; 12,5 ppm), 7 nhóm metylen (δ_{C} 42,0; 39,9; 33,8; 32,6; 28,5; 22,4; 23,5 ppm), 12 nhóm metin (δ_{C} 136,6; 132,1; 120,5; 74,3; 67,6; 56,2; 55,3; 43,8; 43,8; 43,1; 40,8; 33,4 ppm) và 3 cacbon bậc bốn (δ_{C} 141,6; 76,2; 38,1 ppm). Tín hiệu của 2 nhóm metin gắn với oxy (δ_{C} 74,3; 67,6) và 1 cacbon bậc bốn gắn oxy (δ_{C} 76,2), tín hiệu của 2 liên kết đôi (C=C) tại δ_{C} 136,6 và 132,1 ppm; 120,5 và 141,6 ppm. Kết hợp phổ MS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HMBC, HSQC và COSY và so với tài liệu tham khảo (Kawagishi và ctv 1988) cho phép xác định cấu trúc của hợp chất (2) là Cerevisterol.



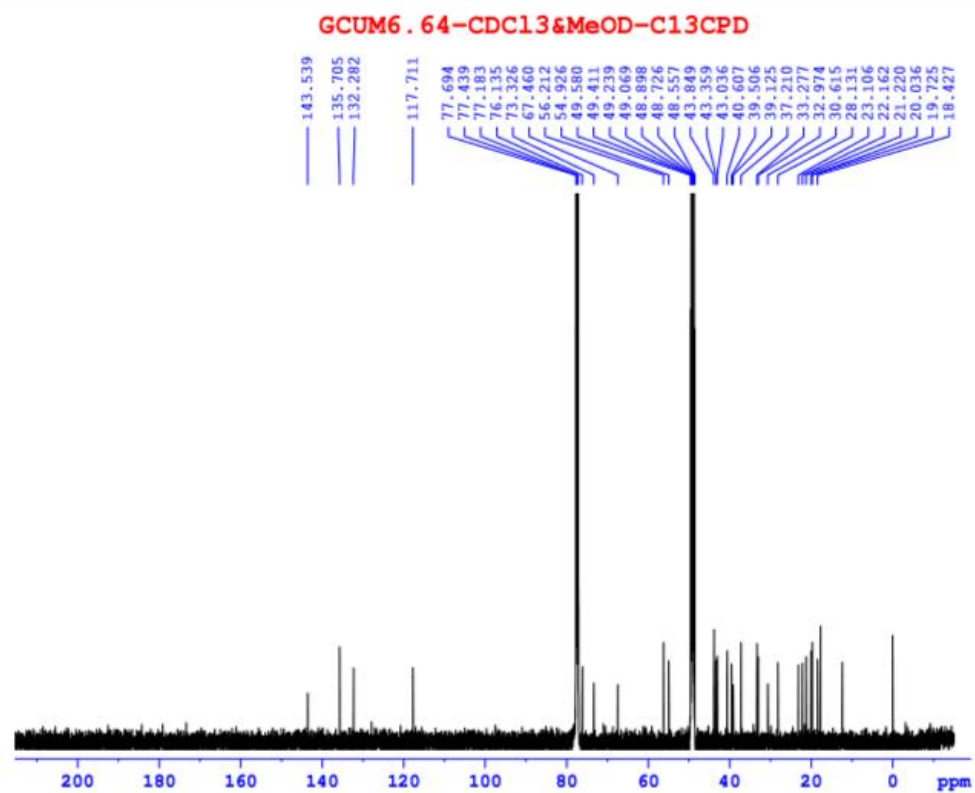
Hình d.10. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất cerevisterol



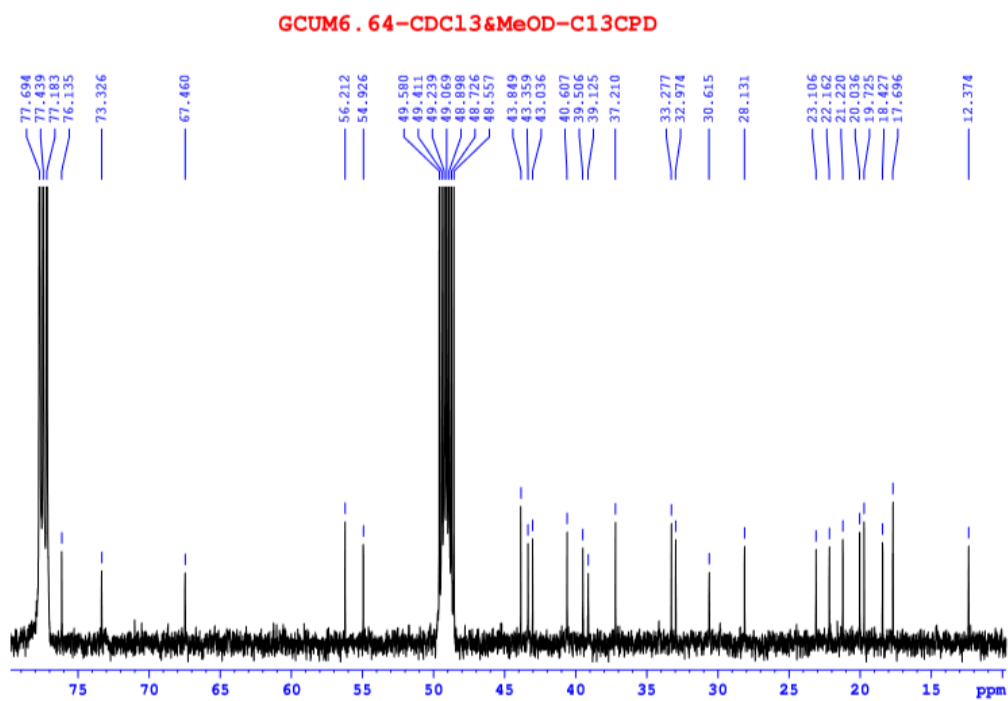
Hình d.11. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất cerevisterol



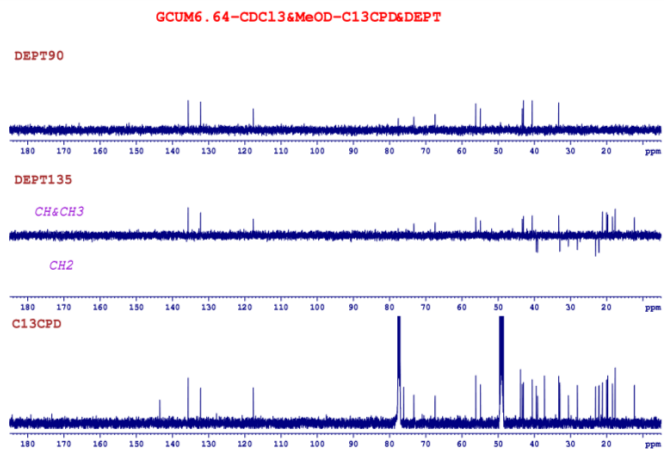
Hình d.12. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất cerevisterol



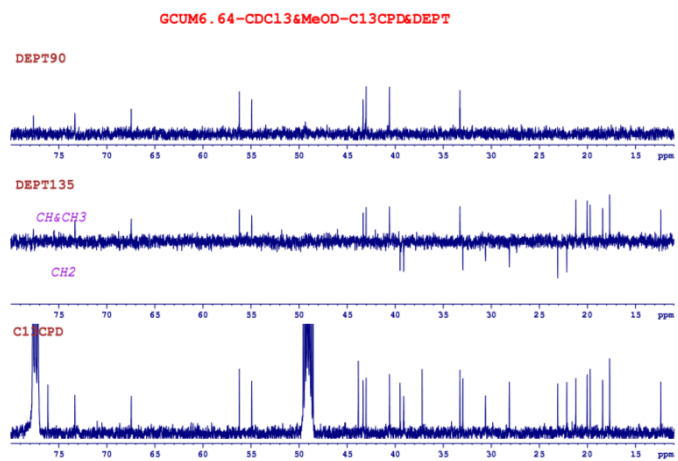
Hình d.13. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất cerevisterol



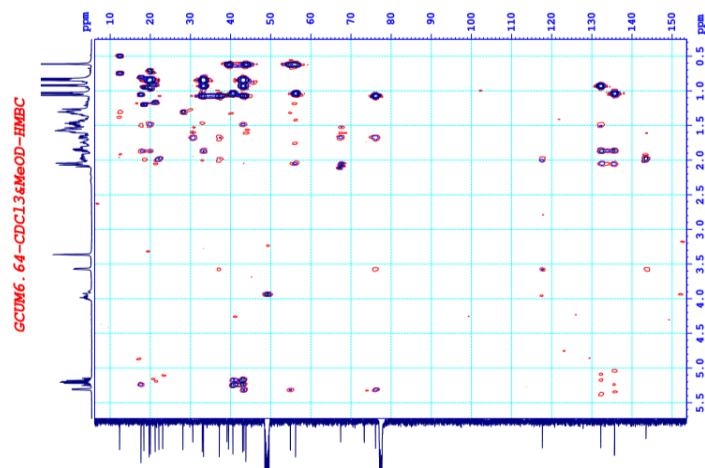
Hình d.14. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất cerevisterol



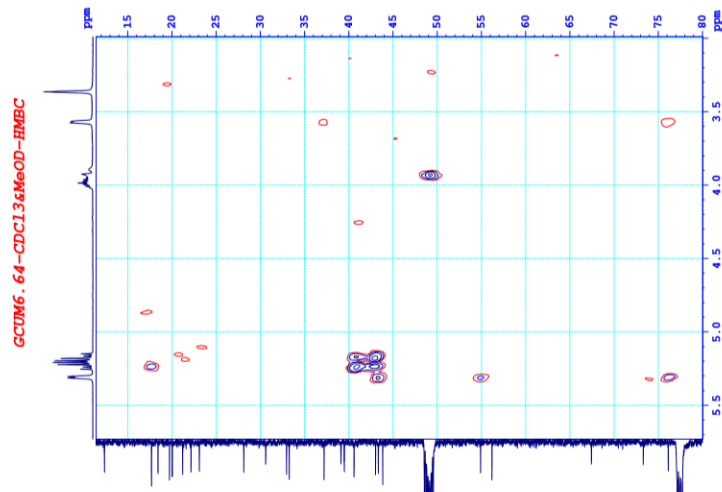
Hình d.15. Phổ DEPT của hợp chất cerevisterol



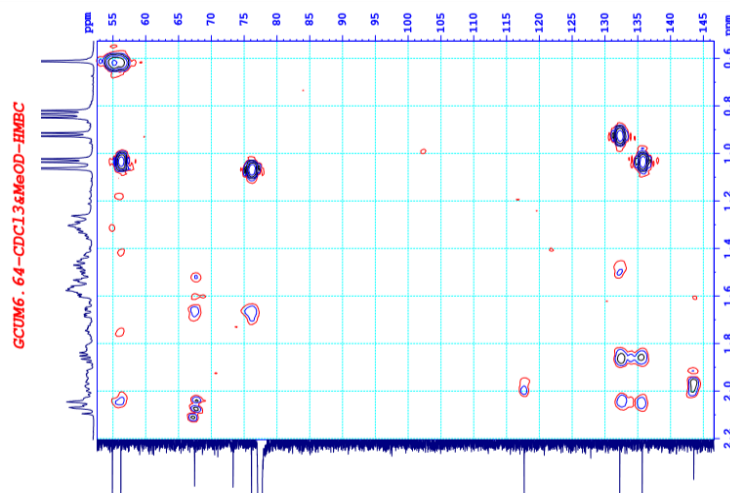
Hình d.16. Phổ DEPT của hợp chất cerevisterol



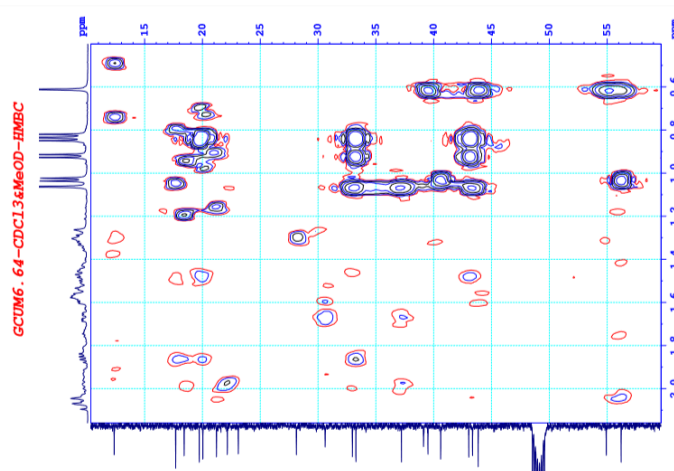
Hình d.17. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



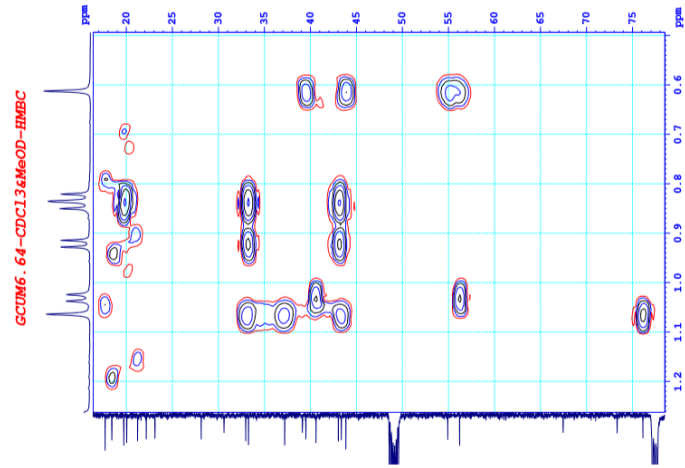
Hình d.18. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



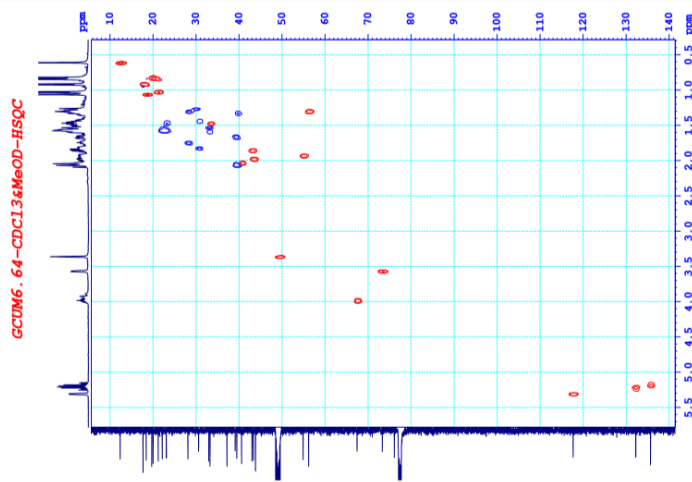
Hình d.19. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



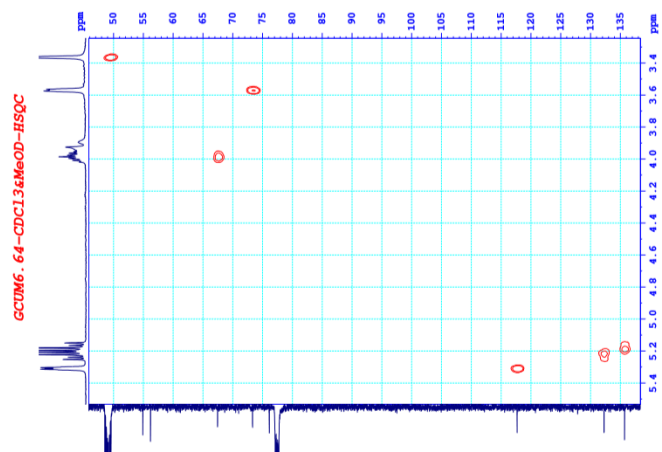
Hình d.20. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



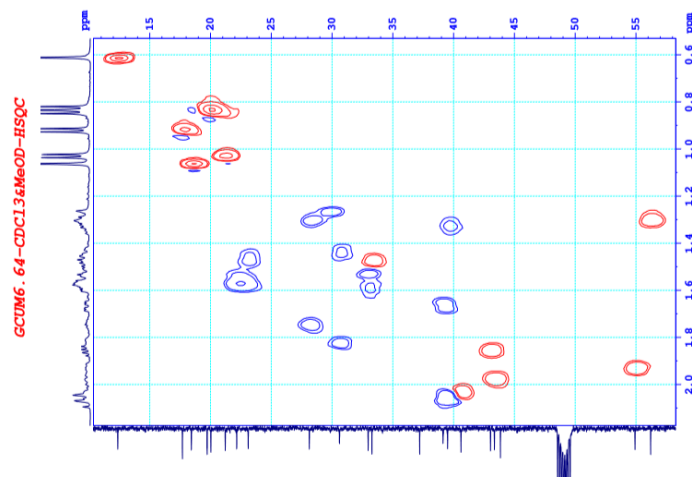
Hình d.21. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



Hình d.22. Phổ HMBC của hợp chất cerevisterol



Hình d.23. Phổ HSQC của hợp chất cerevisterol



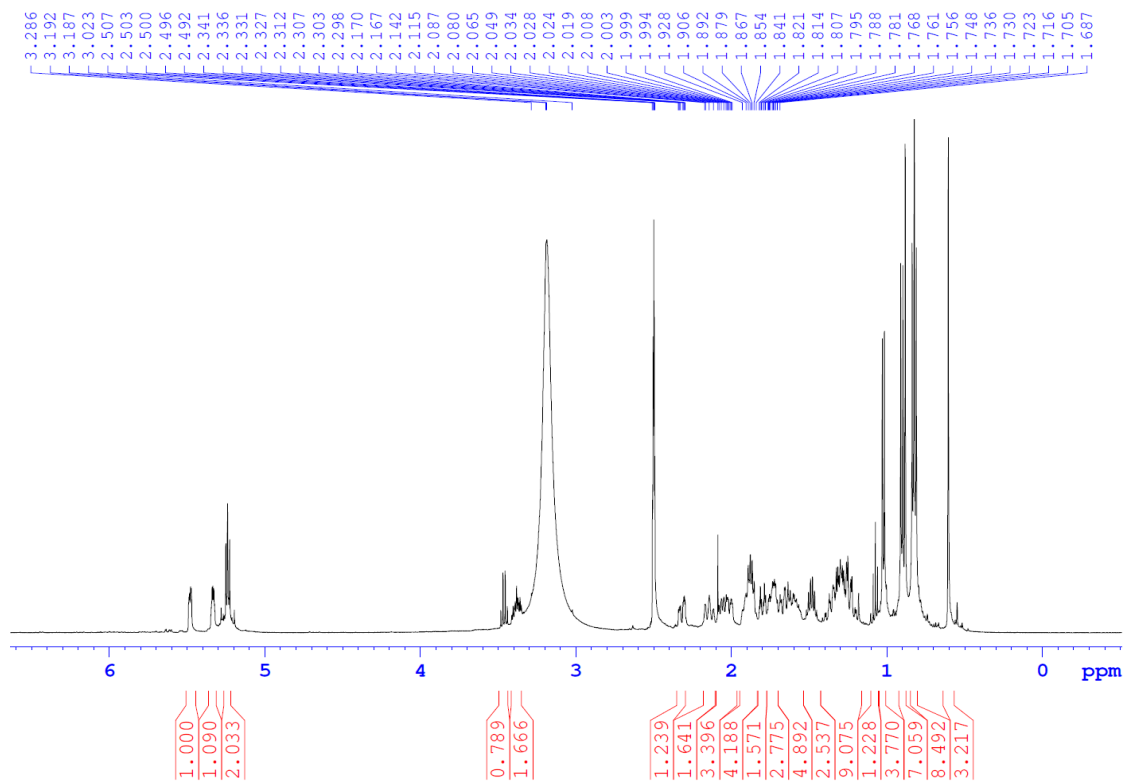
Hình d.23. Phổ HSQC của hợp chất cerevisterol

PLD3. Tinh sạch tách chất 3

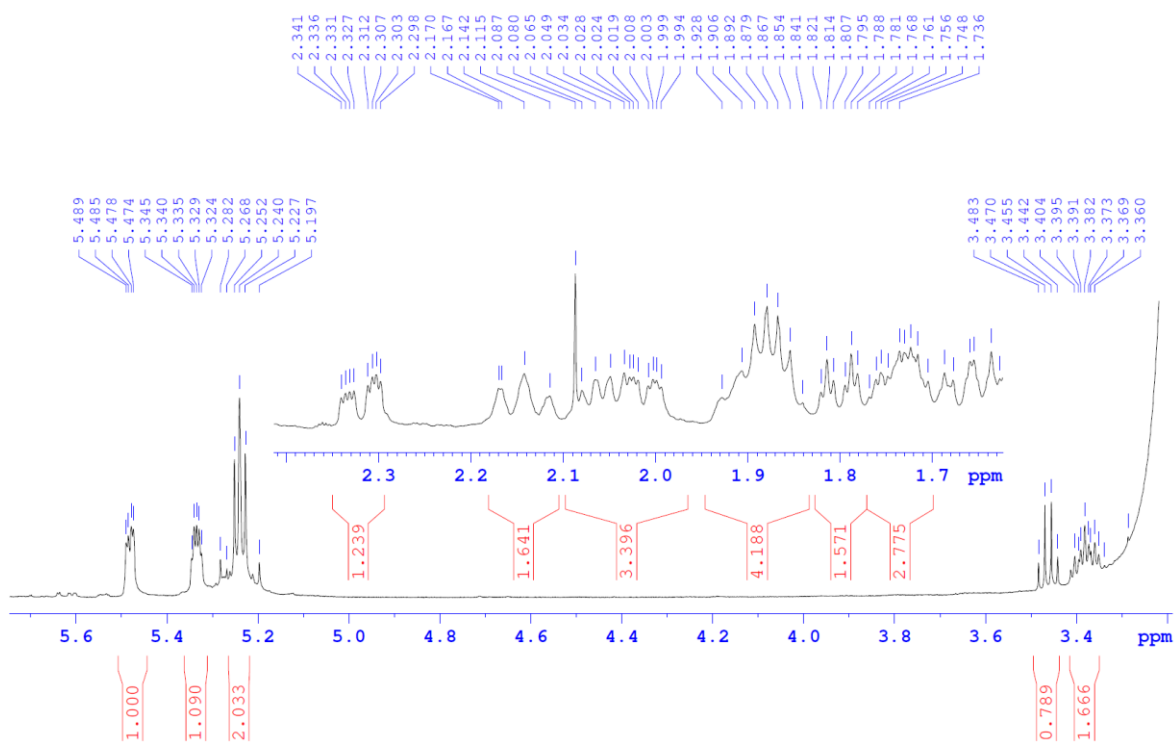
Ergosterol (3): bột trắng, m.p. 165-167⁰C; UV (MeOH) λ_{\max} nm: 211, 285; IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3433, 2959, 1726, 1464, 1090; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) (δ ppm): 5.49 (1H, *m*, H-6), 5.35 (1H, *dd*, *J* = 2.5, 5.0 Hz, H-7), 5.28 (1H, *dd*, *J* = 15.5, 7.5 Hz, H-22), 5.25 (1H, *dd*, *J* = 8.0, 14.0 Hz, H-23), 3.48 (1H, *m*, H-3), 2.33 (2H, *m*, H-4), 2.08 (1H, *m*, H-20), 2.02 (2H, *m*, H-12), 1.93 (1H, *m*, H-9), 1.90 (1H, *m*, H-24), 1.88 (1H, *m*, H-14), 1.81 (1H, *m*, H-1b), 1.76 (1H, *m*, H-2b), 1.76 (1H, *m*, H-16b), 1.68 (1H, *m*, H-11b), 1.64 (1H, *m*, H-15b), 1.60 (1H, *m*, H-11a), 1.50 (1H, *m*, H-25), 1.36 (1H, *m*, H-2a), 1.33 (1H, *m*, H-15a), 1.32 (1H, *m*, H-16a), 1.30 (1H, *m*, H-17), 1.23 (1H, *m*, H-1a), 1.05 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, H-21), 0.96 (3H, *s*, H-19), 0.93 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-28), 0.85 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-27), 0.82 (3H, *d*, *J* = 6.5 Hz, H-26), 0.61 (3H, *s*, H-18); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) (δ ppm): 140.3 (C-5), 139.8 (C-8), 135.0 (C-22), 131.2 (C-23), 118.2 (C-6), 115.8 (C-7), 68.3 (C-3), 55.0 (C-17), 53.6 (C-14), 45.5 (C-9), 42.2 (C-13), 41.8 (C-24), 40.4 (C-4), 40.0 (C-20), 39.0 (C-1), 38.2 (C-12), 37.7 (C-10), 32.2 (C-25), 31.5 (C-2), 27.4 (C-16), 22.2 (C-15), 20.6 (C-11), 20.4 (C-27), 19.4 (C-26), 19.1 (C-21), 17.0 (C-28), 15.8 (C-19), 11.5 (C-18).

Phổ tử ngoại (UV) của hợp chất (3) hấp thụ bước sóng cực đại tại 211, 258 nm chứng tỏ trong hợp chất (3) có chứa hệ liên hợp olefinic (-CH=CH-) hấp thụ bước sóng cực đại tại 211 nm và hệ liên hợp π vòng hấp thụ bước sóng cực đại tại 258 nm. Phổ hồng ngoại (IR) của hợp chất (3) cho tín hiệu đặc trưng của nhóm hydroxyl tại 3433 cm⁻¹. Phổ ¹H-NMR (phụ lục 51-53) cho thấy có tín hiệu proton của 6 nhóm methyl [δ_{H} 0,61 (3H, *s*); 0,82 (3H, *d*, *J* = 6,5 Hz); 0,85 (3H, *d*, *J* = 6,5 Hz); 0,96 (3H, *s*), 0,93 (3H, *d*, *J*=8,0 Hz) và 1,05 (3H, *d*, *J* = 7,0 Hz)], 1 tín hiệu của proton cacbinol (-CH-OH)

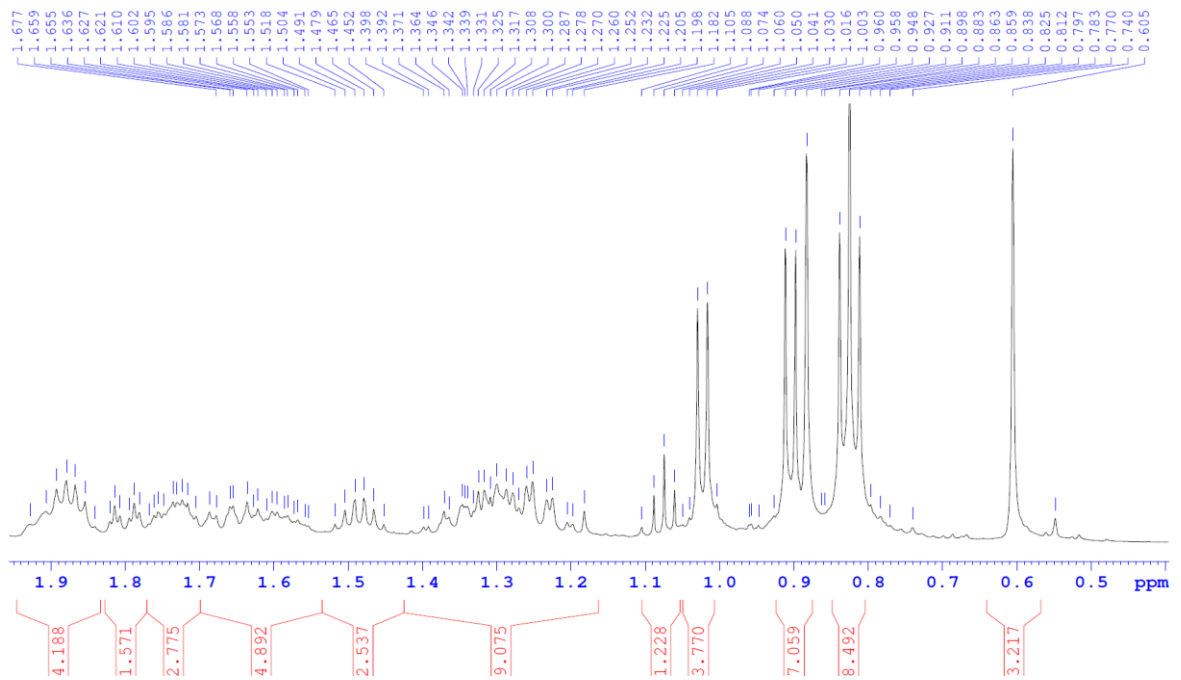
[δ_H 3,48 (1H, m)] và 4 tín hiệu của proton olefinic [δ_H 5,25 (1H, dd, $J = 8,0, 14,0$ Hz); 5,28 (1H, dd, $J = 15,5, 7,5$ Hz); 5,35 (1H, dd, $J = 2,5, 5,0$ Hz) và 5,49 (1H, m)]. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho thấy tín hiệu 28 nguyên tử carbon, trong đó có 6 nhóm methyl (δ_C 11,5, 15,8, 17,0, 19,1, 19,4, 20,4 ppm), 7 nhóm metilen, 11 nhóm metin và 4 nguyên tử C bậc 4 được xác định bằng phổ. Sự tương tác trực tiếp trên HSQC giữa C-18 (δ_C 11,5) với H-18 (δ_H 0,61); C-19 (δ_C 15,8) với H-19 (δ_H 0,96); C-27 (δ_C 20,4) với H-27 (δ_H 0,93); C-26 (δ_C 19,4) với H-26 (δ_H 0,82) và C-21 (δ_C 19,1) với H-21 (δ_H 1,05) chứng tỏ **hợp chất (3)** có khung sterol. Phổ HMBC của hợp chất **(3)** xuất hiện các tín hiệu tương tác xa H-4 với C-10/C-2/C-6; H-7 với C-5/C-9; H-6 với C-10; H-19 với C-1/C-5/C-9 và H-9 với C-19 cho phép xác định phần cấu trúc vòng A và B. Ngoài ra, phổ HSQC cho thấy tương quan giữa δ_C 68,3 với δ_H 3,48 và tương tác HMBC giữa H-3 với C-1 chứng tỏ trong vòng A có vị trí C-3 mang nhóm hydroxyl. Các tương tác trên HSQC giữa C-6 (δ_C 118,2) với H-6 (δ_H 5,49); C-7 (δ_C 115,8) với H-7 (δ_H 5,35) chứng tỏ trong phần cấu trúc này có chứa hai liên kết đôi tại vị trí C-5, C-6 và C-7, C-8. Tương tự, sự gắn kết vòng B và C được chứng tỏ thông qua các tương tác xa H-7 với C-14; H-11 với C-8; H-12 với C-9/C-14; H-18 với C-12/C-14. Sự gắn kết giữa cấu trúc vòng C và D được xác định dựa trên các tương tác xa giữa H-16 với C-13; H-15 với C-8; H-15 với C-17/C-13 và H-18 với C-17. Ngoài ra, phổ HMBC cho thấy cấu trúc của mạch carbon dài dựa trên các tương tác xa của H-20 với C-23; H-22 với C-24; H-24 với C-27/C-26 và H-25 với C-28, và trong cấu trúc mạch thẳng này có chứa một liên kết đôi tại vị trí C-22 và C-23. Cấu trúc mạch carbon này gắn kết với khối cấu trúc vòng tại vị trí C-17 thông qua tương tác xa H-21 với C-17/C-22. Từ số liệu phổ 1D-NMR (^1H -, ^{13}C -NMR, DEPT), 2D-NMR (COSY, HMBC và HSQC) và so sánh với tài liệu (McEwen và Gutteridge, 2007) cho phép xác định hợp chất **(3)** là ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol).



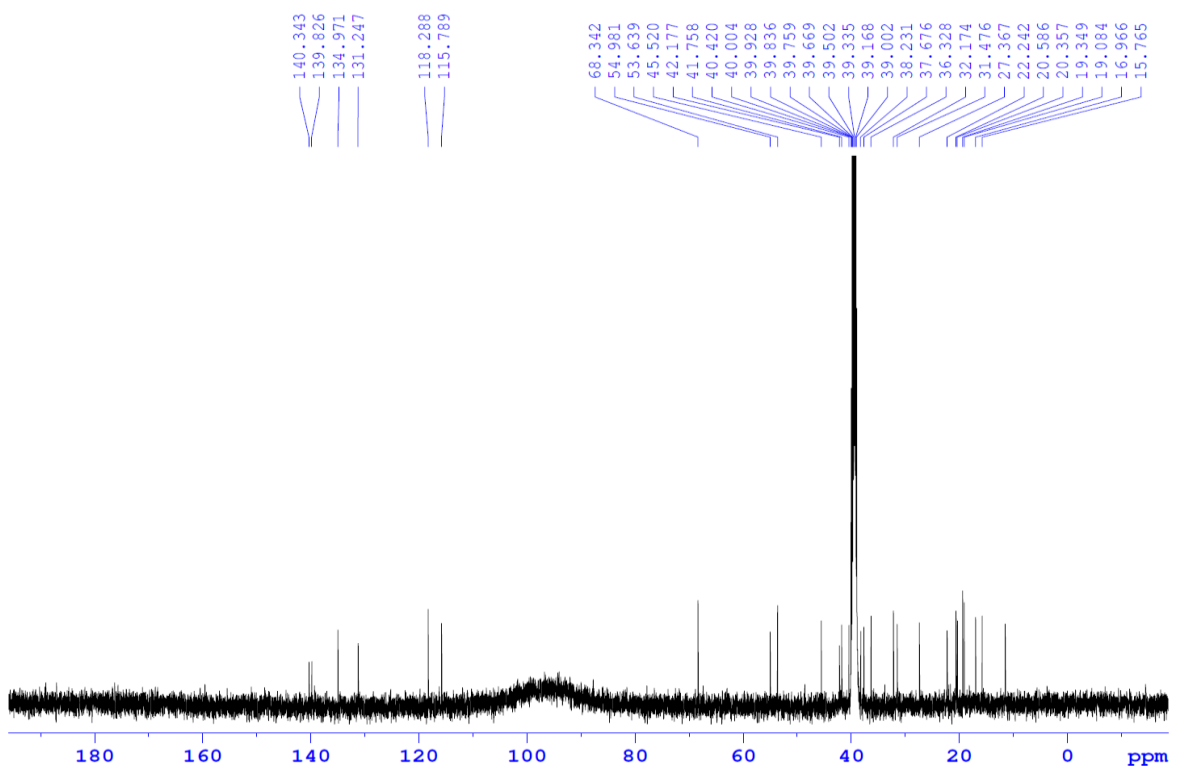
Hình d.24. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất ergosterol



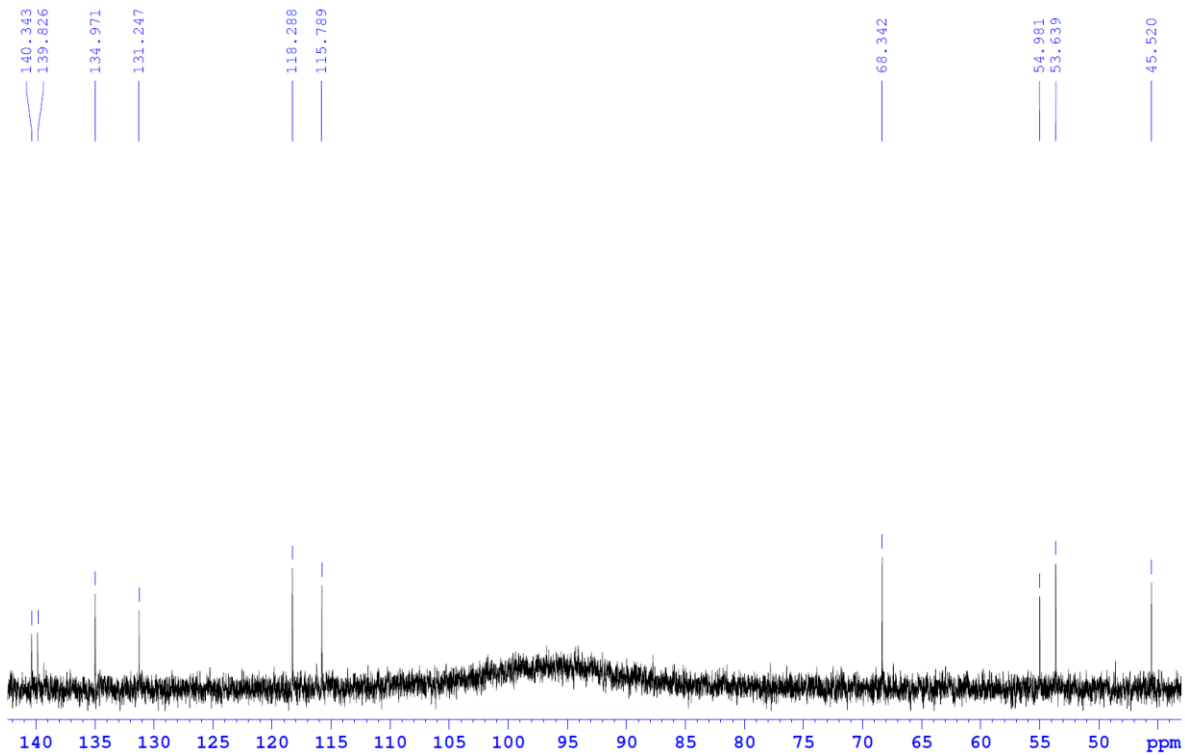
Hình d.25. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất ergosterol



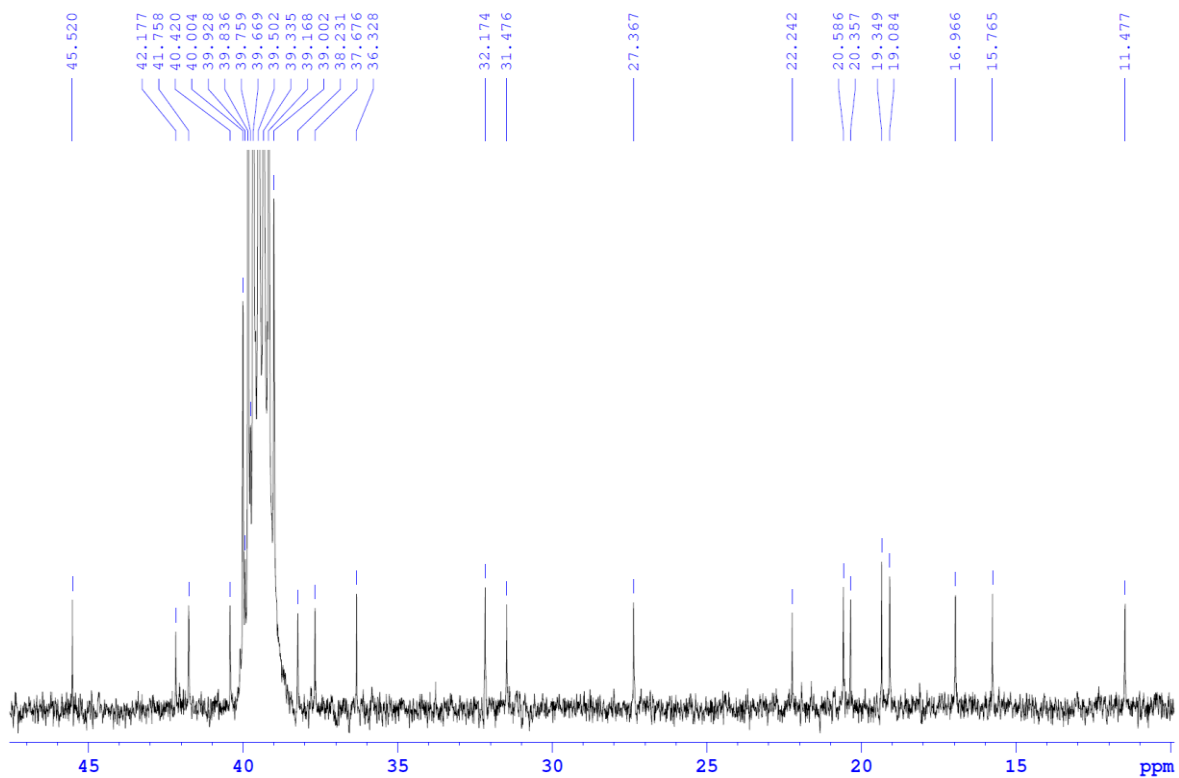
Hình d.26. Phổ ^1H -NMR của hợp chất ergosterol



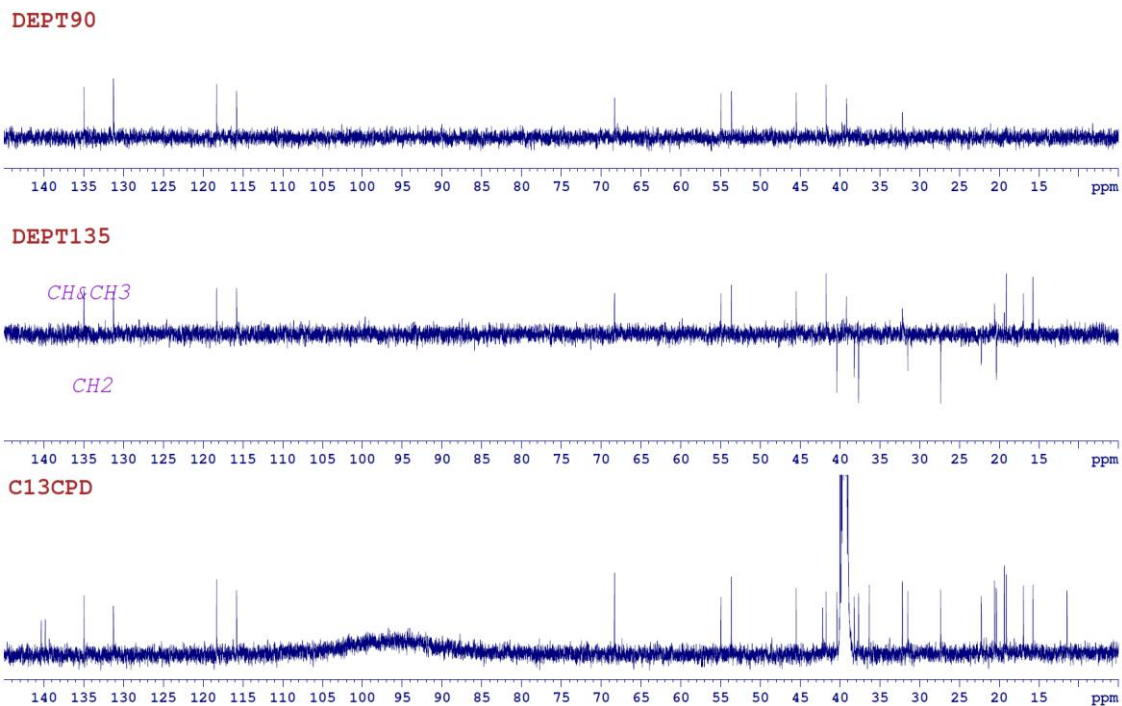
Hình d.27. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất ergosterol



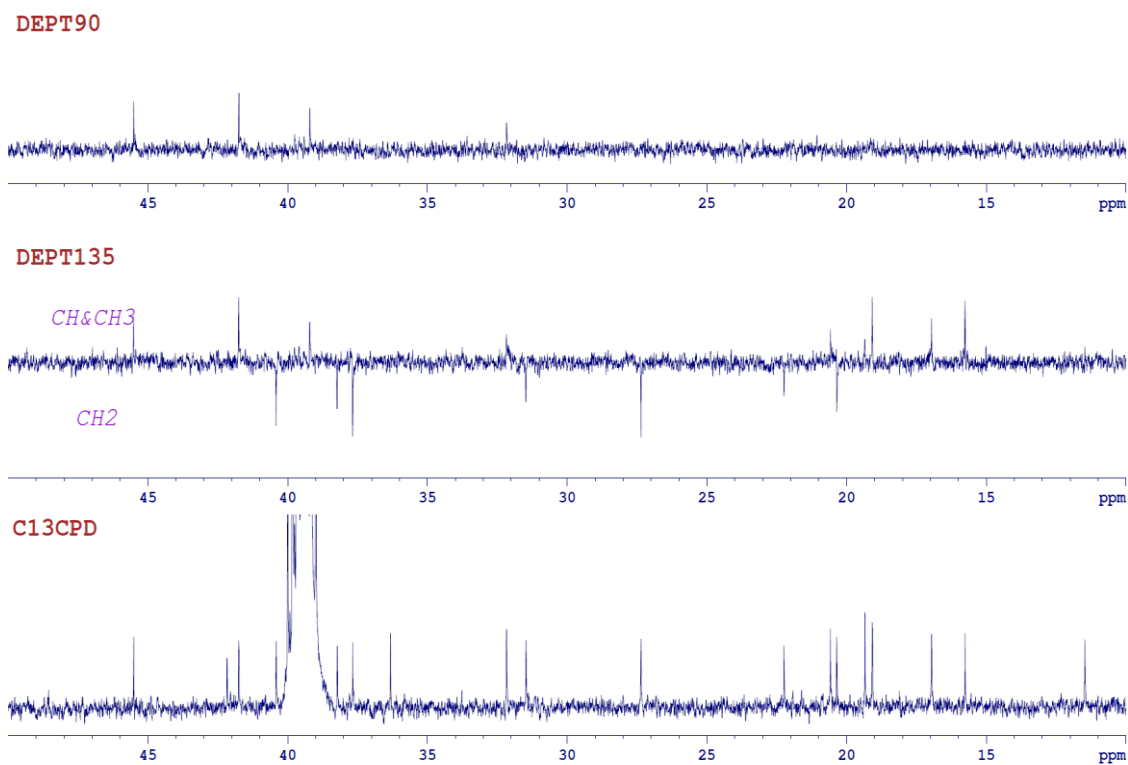
Hình d.28. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất ergosterol



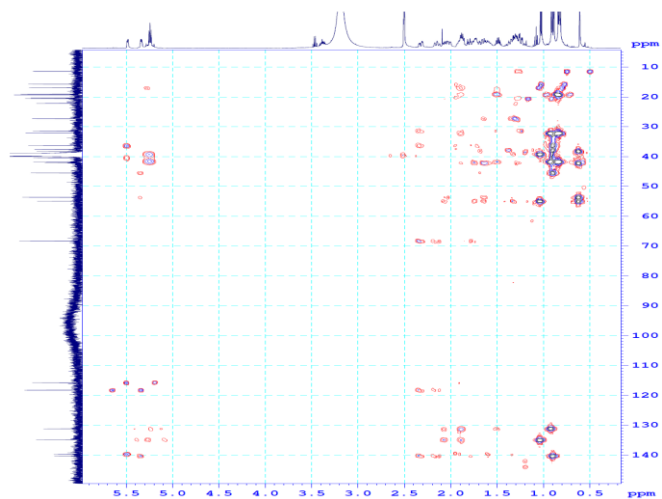
Hình d.29. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất ergosterol



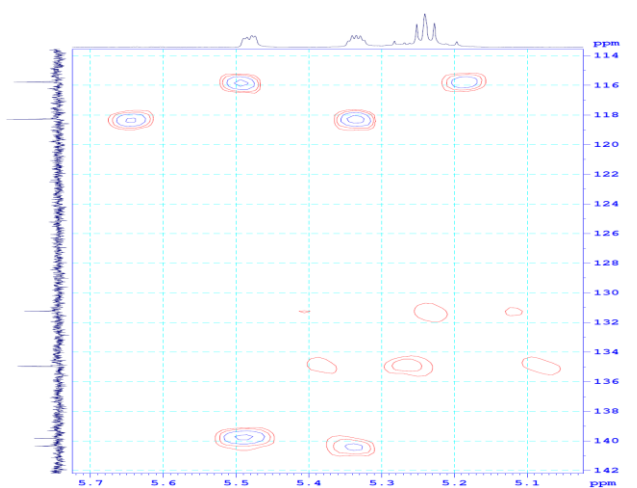
Hình d.30. Phổ DEPT của hợp chất ergosterol



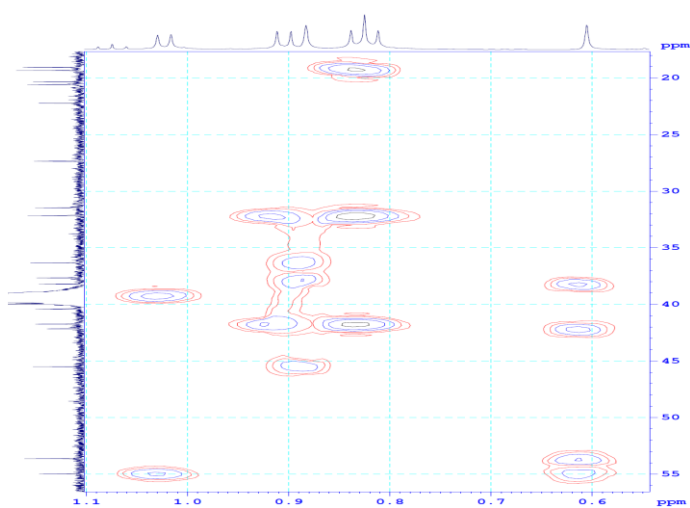
Hình d.31. Phổ DEPT của hợp chất ergosterol



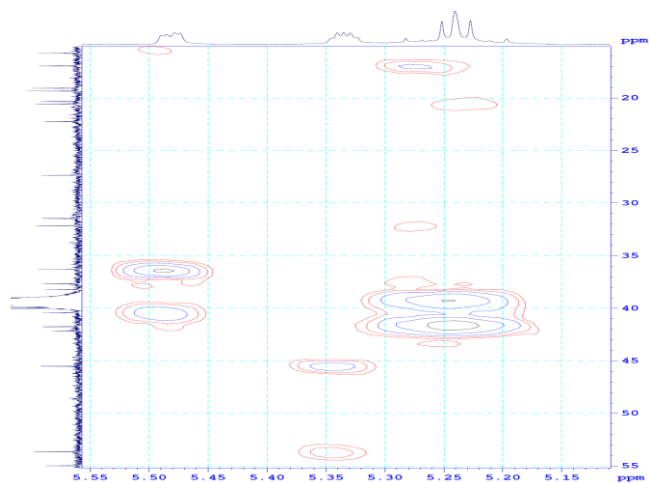
Hình d.32. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



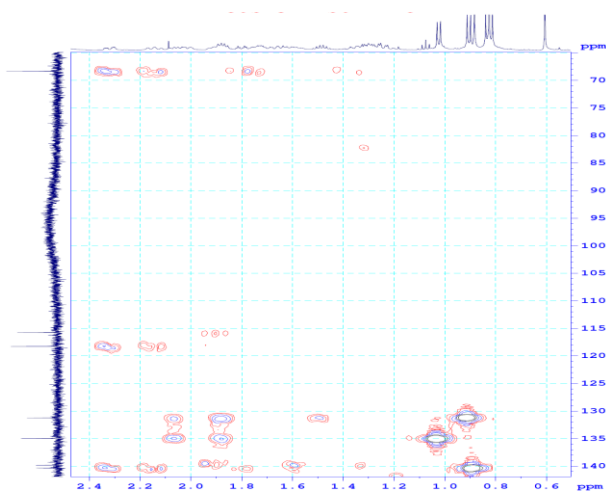
Hình d.33. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



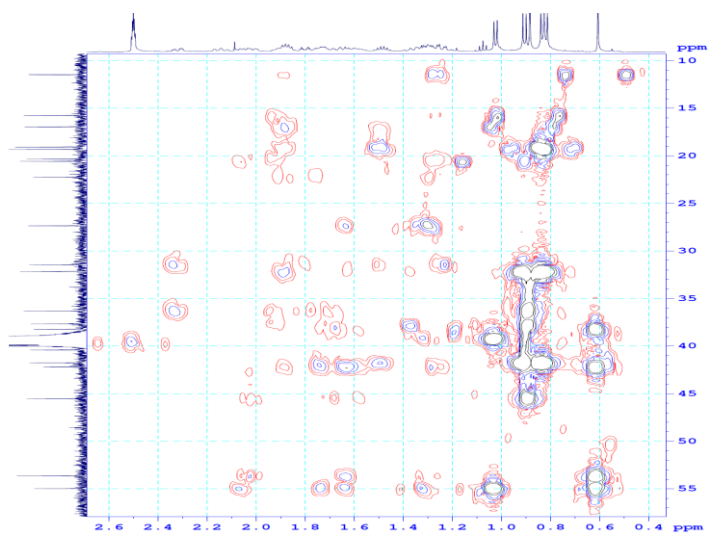
Hình d.34. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



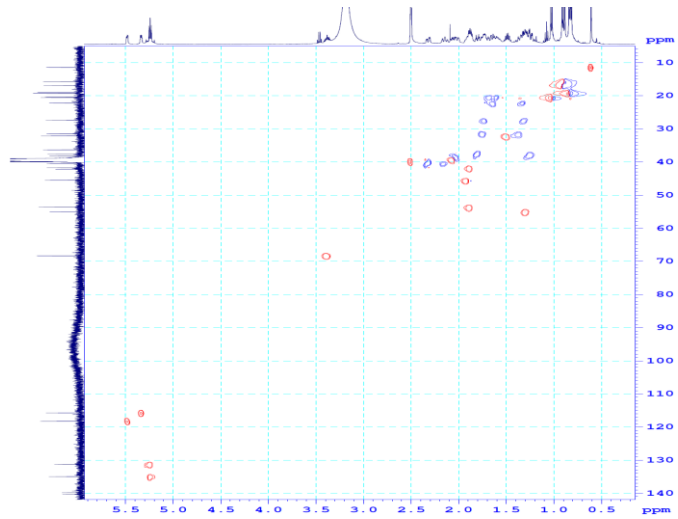
Hình d.35. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



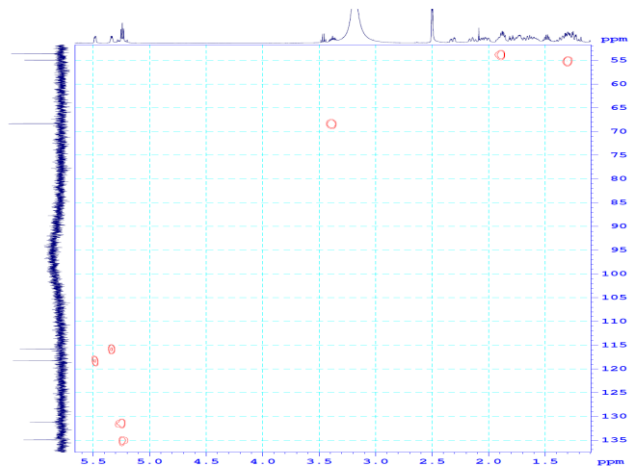
Hình d.36. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



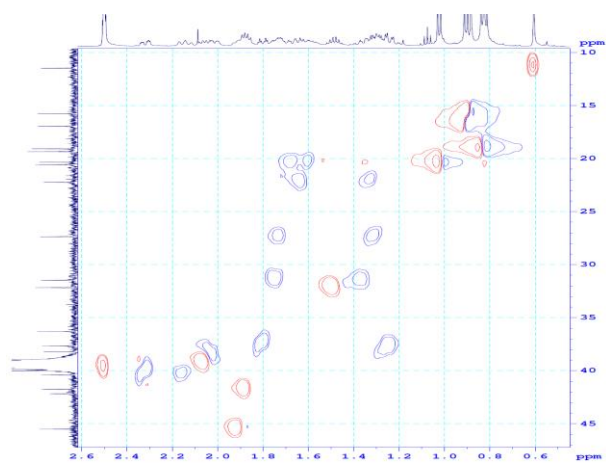
Hình d.37. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol



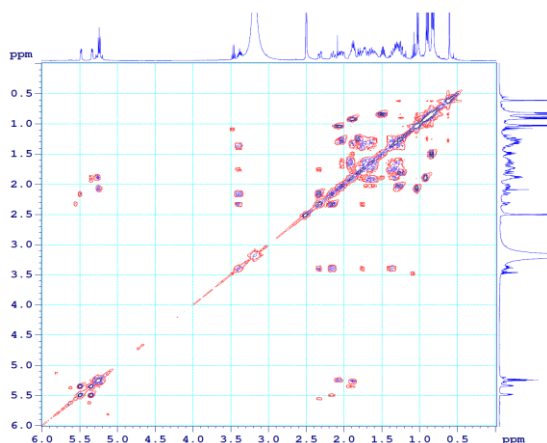
Hình d.38. Phổ HSQC của hợp chất ergosterol



Hình d.39. Phổ HSQC của hợp chất ergosterol



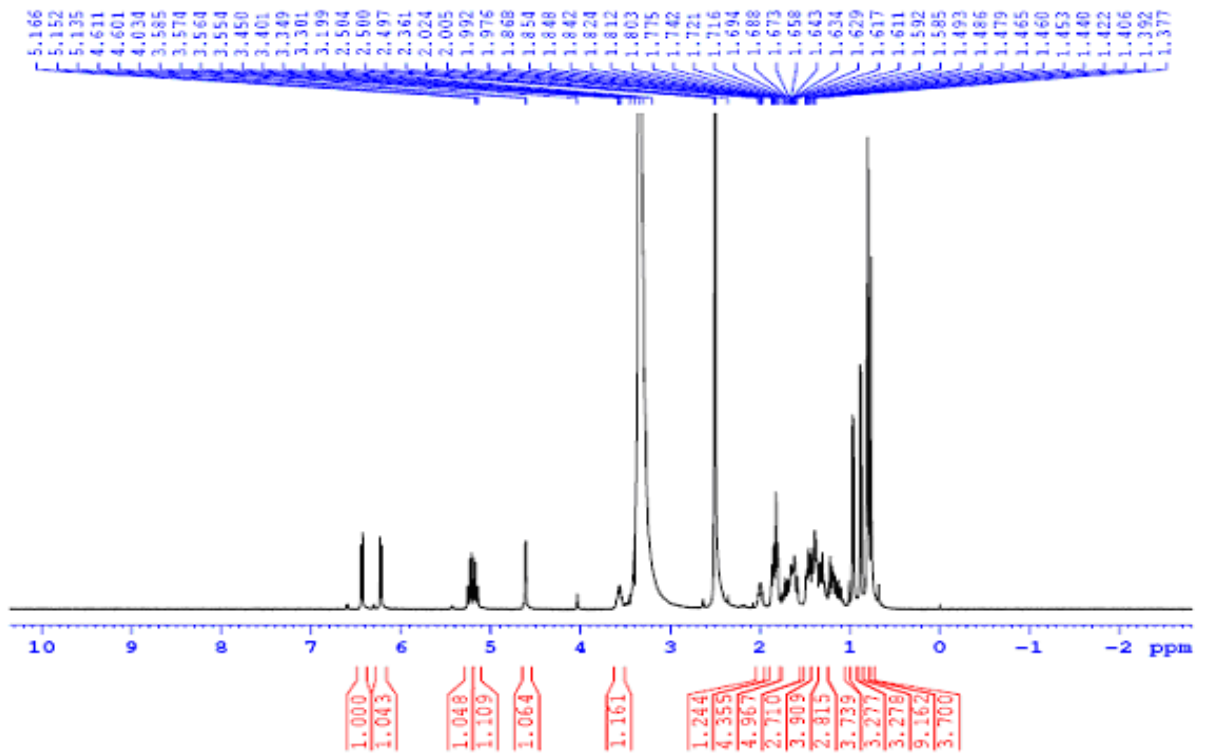
Hình d.40. Phổ HSQC của hợp chất ergosterol



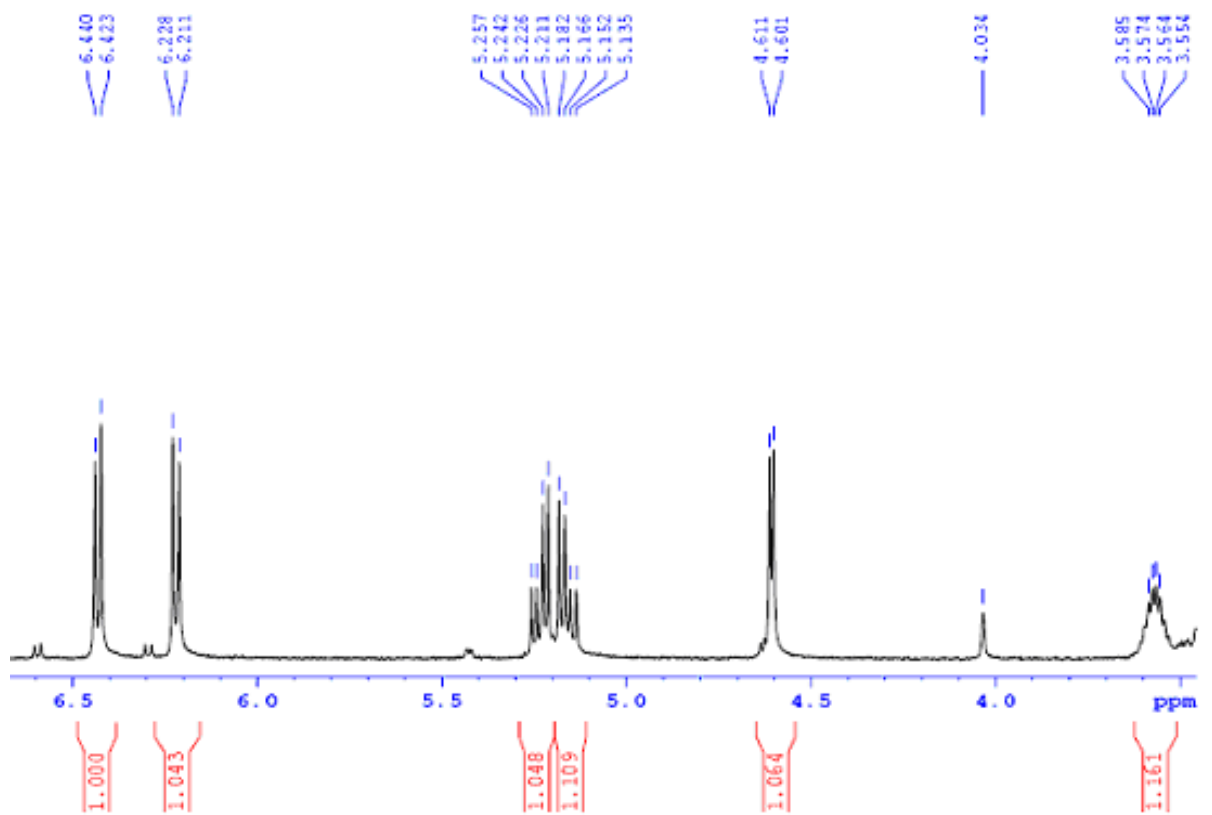
Hình d.41. Phổ COSY của hợp chất ergosterol

PLD4. Tinh sạch tách chất 4

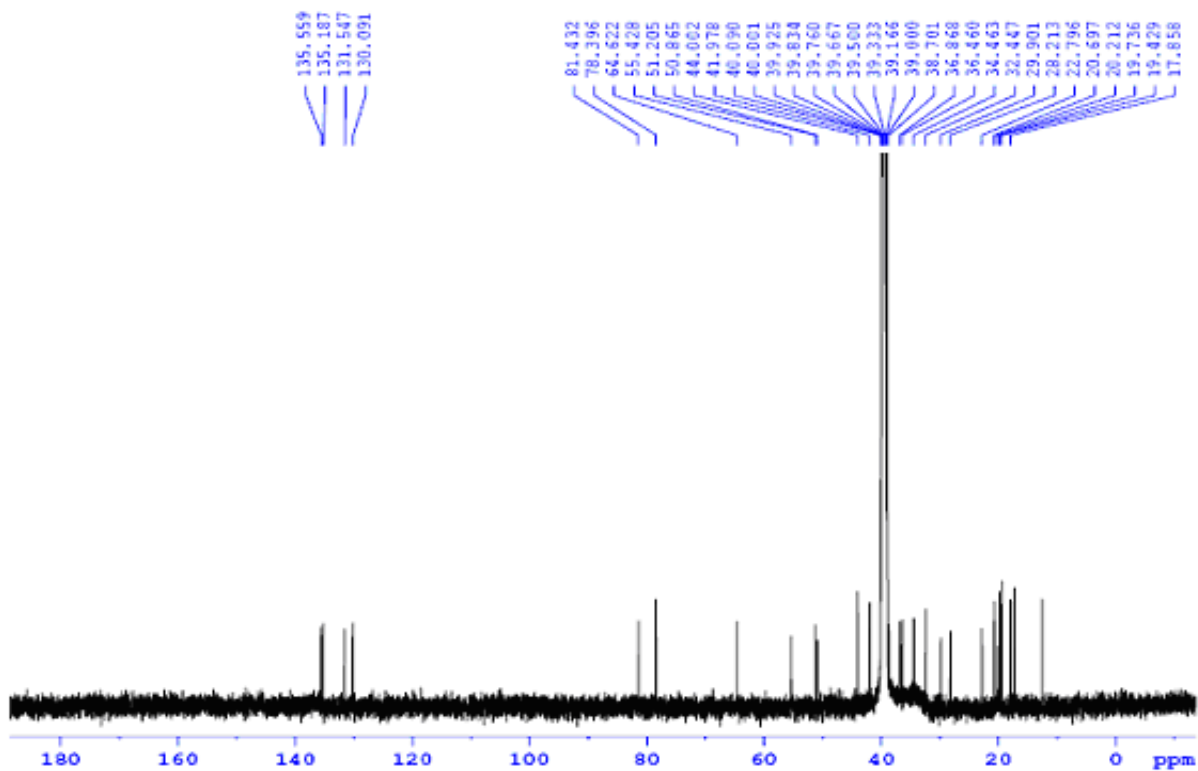
Ergosterol peroxit (4): tinh thể không màu, m.p. 176-178⁰C; ¹H-NMR (500MHz, CDCl₃) (δ ppm): 6.50 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-6), 6.24 (1H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-7), 5.24 (1H, *dd*, *J* = 16.5, 7.5 Hz, H-23), 5.14 (1H, *dd*, *J* = 15.0, 8.0 Hz, H-22), 3.96 (1H, *m*, H-3), 1.23 (2H, *m*, H-17), 2.11 (1H, *dd*, *J* = 5.0, 3.0 Hz, H-4b), 2.02 (1H, *m*, H-20), 1.97 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 3.5 Hz, H-1b), 1.95 (1H, *m*, H-12b), 1.94 (1H, *dd*, *J* = 5.0, 3.0 Hz, H-4a), 1.85 (1H, *m*, H-24), 1.84 (1H, *dd*, *J* = 13.0, 5.0 Hz, H-2b), 1.79 (1H, *m*, H-16b), 1.70 (1H, *dd*, *J* = 7.0, 3.5 Hz, H-1a), 1.64 (1H, *m*, H-15b), 1.57 (1H, *m*, H-14), 1.52 (1H, *dd*, *J* = 10.0, 4.5 Hz, H-2a), 1.52 (1H, *m*, H-11b), 1.50 (1H, *m*, H-25), 1.49 (1H, *dd*, *J* = 12.5, 5.5 Hz, H-9), 1.39 (1H, *m*, H-15a), 1.34 (1H, *m*, H-16a), 1.24 (1H, *m*, H-12a), 1.21 (1H, *m*, H-11a), 0.99 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, H-21), 0.91 (3H, *d*, *J* = 8.5Hz, H-28), 0.88 (3H, *s*, H-19), 0.84 (3H, *d*, *J* = 6.5Hz, H-27), 0.82 (3H, *d*, *J* = 6.5Hz, H-26); ¹³C-NMR (125MHz, CDCl₃) (δ ppm): 135.6 (C-22), 135.2 (C-6), 131.5 (C-23), 130.1 (C-7), 81.4 (C-5), 78.4 (C-8), 64.6 (C-3), 55.4 (C-17), 51.2 (C-14), 50.9 (C-9), 44.0 (C-13), 42.0 (C-24), 40.1 (C-20), 38.7 (C-12), 36.9 (C-4), 36.5 (C-10), 34.5 (C-1), 32.4 (C-25), 29.9 (C-2), 28.2 (C-16), 22.8 (C-15), 21.7 (C-11), 20.2 (C-21), 19.7 (C-27), 19.4 (C-26), 17.9 (C-19), 17.2 (C-28), 12.5 (C-18). Dựa vào tài liệu xác định (Takaishi và ctv 1991) hợp chất (4) là ergosterol peroxit.



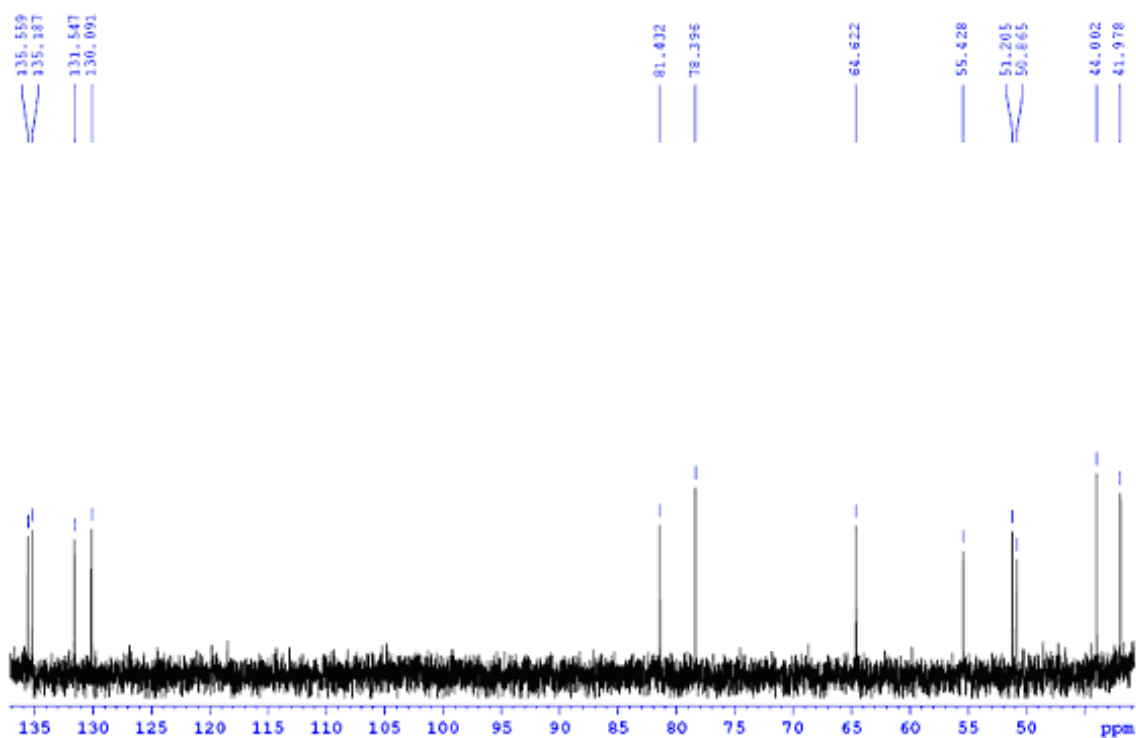
Hình d.42. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất ergosterol peoxit



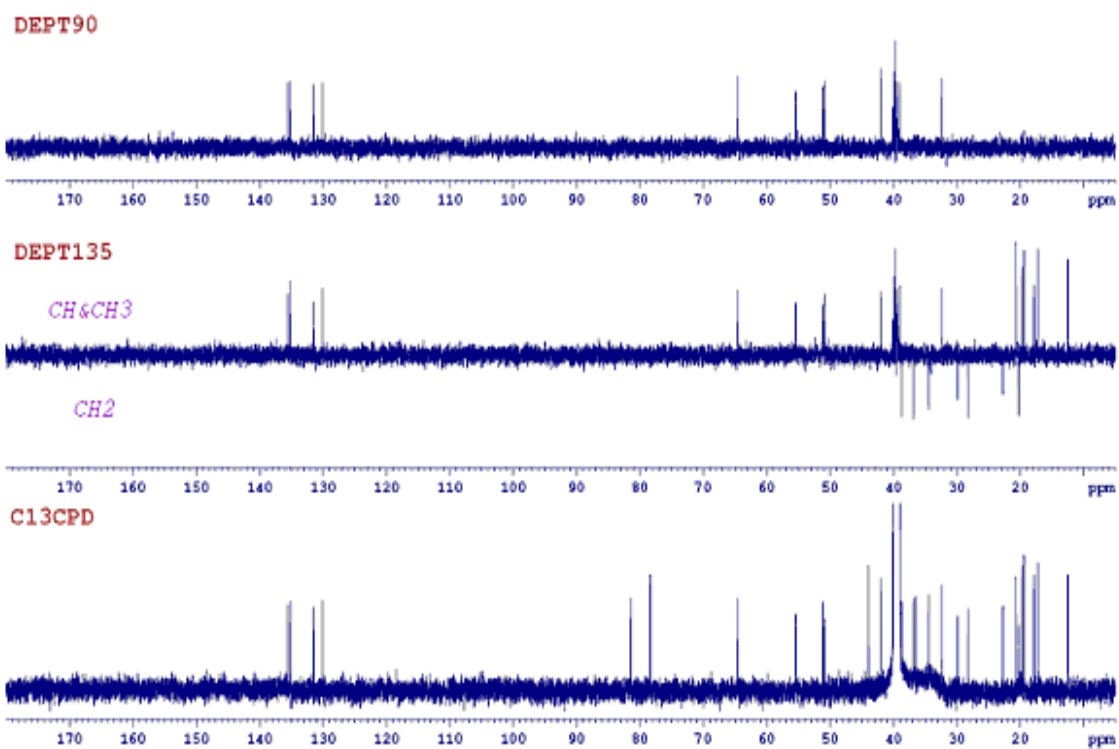
Hình d.43. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất ergosterol peoxit



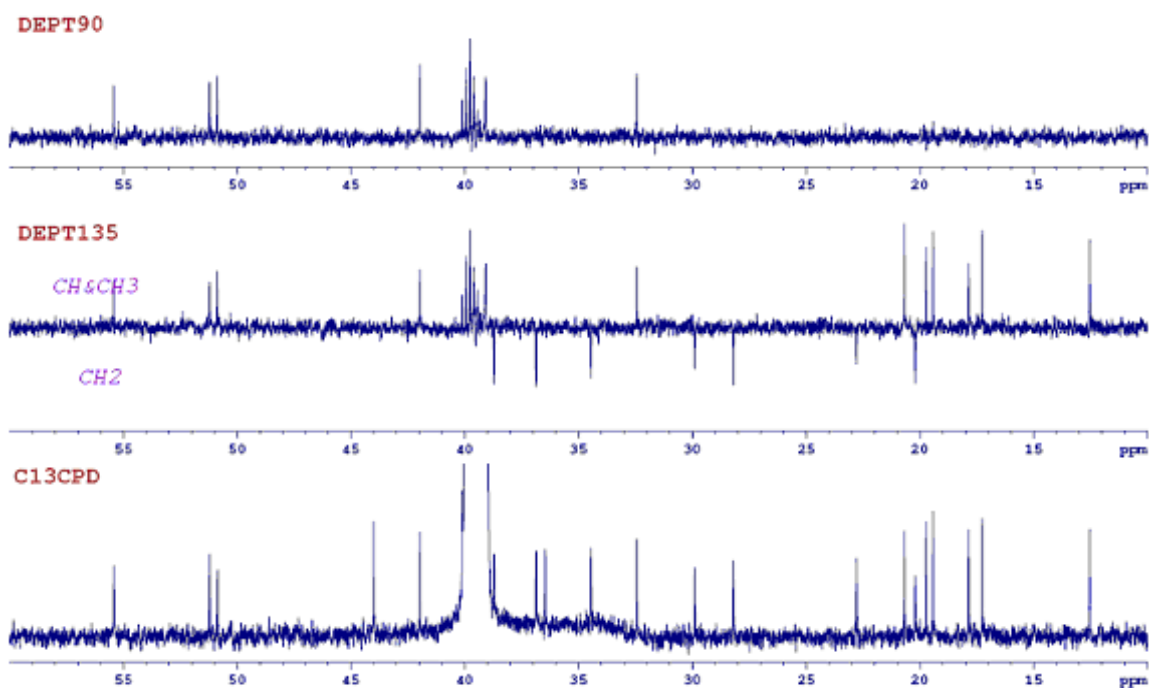
Hình d.43. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất ergosterol peoxit



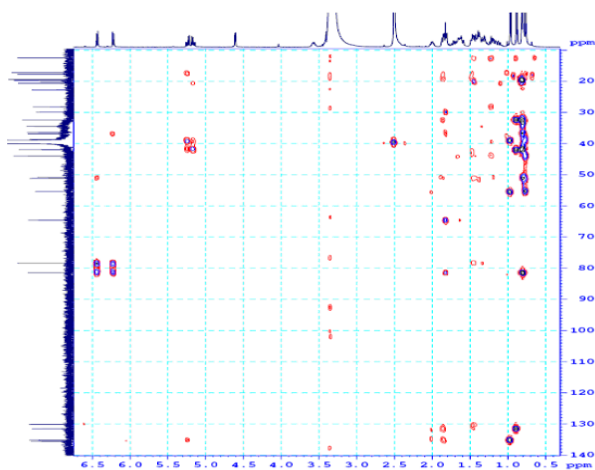
Hình d.44. Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất ergosterol peoxit



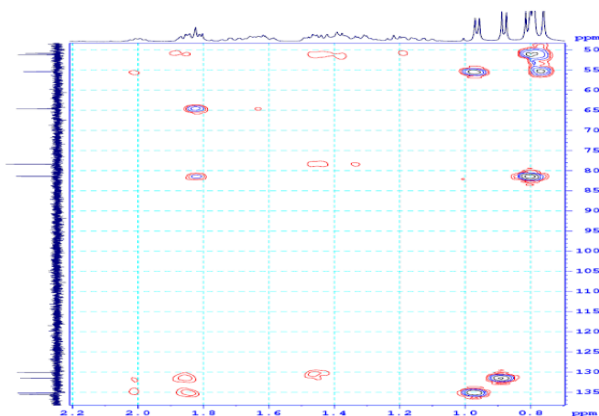
Hình d.45. Phổ DEPT của hợp chất ergosterol peoxit



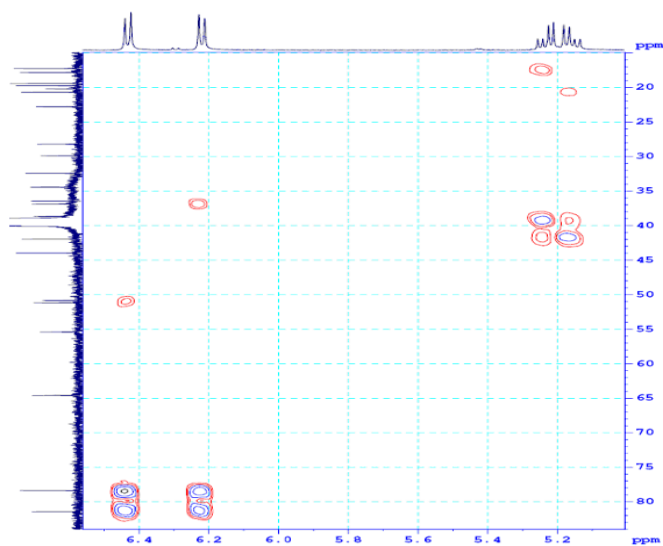
Hình d.46. Phổ DEPT của hợp chất ergosterol peoxit



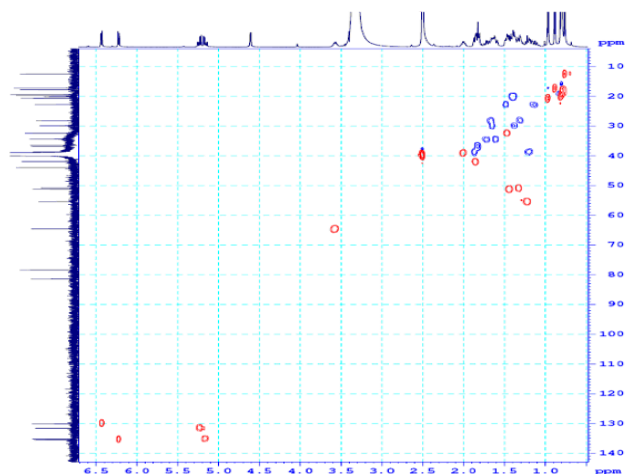
Hình d.47. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol peoxit



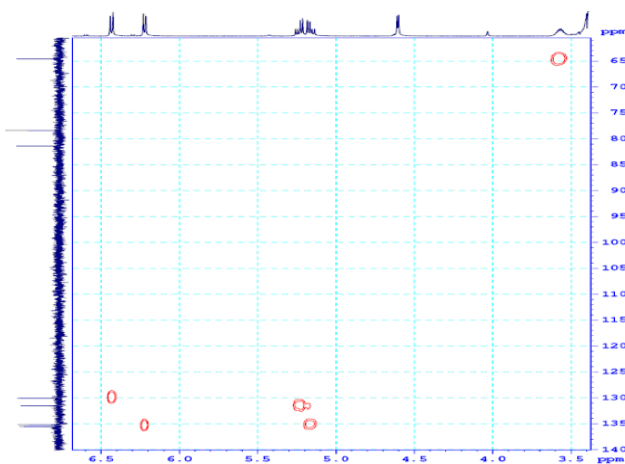
Hình d.48. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol peoxit



Hình d.49. Phổ HMBC của hợp chất ergosterol peoxit



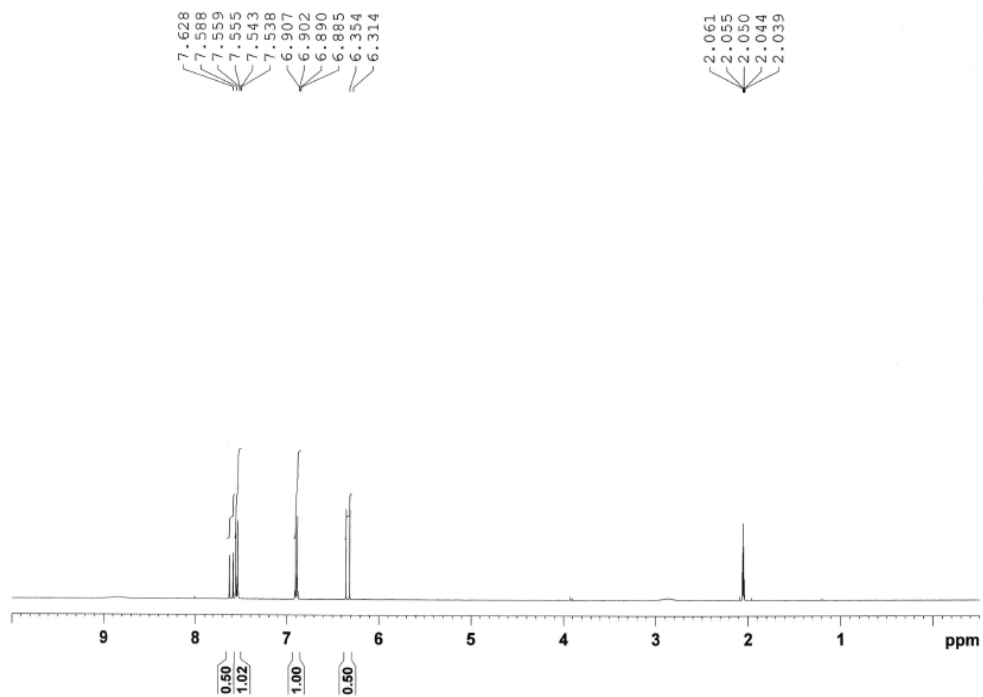
Hình d.50. Phổ HSQC của hợp chất ergosterol peoxit



Hình d.51. Phổ HSQC của hợp chất ergosterol peoxit

PLD 5. Tinh sạch tách chất 5

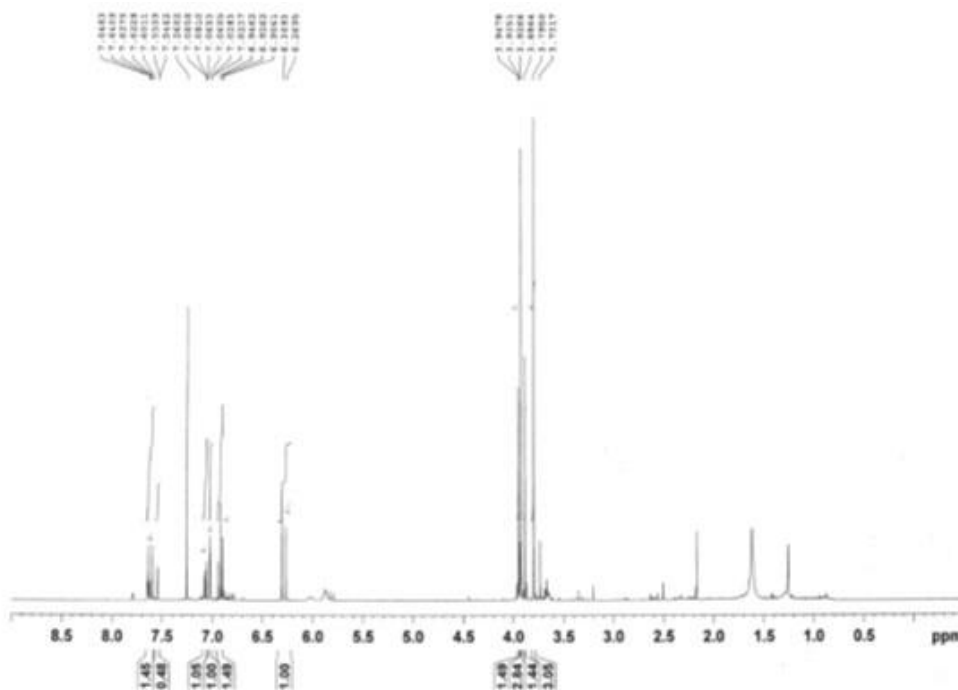
Trans-p-hydroxycoumaric acid (5): bột không màu, IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}): 3354, 1673; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.63 (1H, *d*, $J = 20.0$ Hz, H-7), 7.56 (2H, *dd*, $J = 6.0$ Hz, H-2, 6), 6.90 (2H, *dd*, $J = 6$ Hz, H-3, 5), 6.35 (1H, *d*, $J = 20.0$ Hz, H-8). Hợp chất (5) là chất bột không màu. Phổ hồng ngoại (IR) của 5 xuất hiện các pic hấp thụ cực đại tại 3354 cm^{-1} (OH), 1673 cm^{-1} (C=O). Ngoài ra, phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy hai tín hiệu doublet tại δ_{H} 7,63 (1H, $J=20$ Hz, H-7), 6,35 (1H, $J = 20$ Hz, H-8) đặc trưng cho hai proton có cấu dạng *trans* của liên kết đôi tại vị trí 7 và 8. Các tín hiệu δ 7,56 (2H, *dd*, $J = 6$ Hz, H-2, 6); 6,90 (2H, *dd*, $J = 6$ Hz, H-3, 5) đặc trưng cho hệ thống aromatic A_2B_2 có trong hợp chất 5. Kết hợp dữ liệu phổ IR, $^1\text{H-NMR}$ và so sánh với tài liệu tham khảo (Sumitra và ctv 2013) cho thấy hợp chất 5 là axit *trans*-p-hydroxy coumaric.



Hình d.52. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất *trans-p*-hydroxycoumaric

PLD6. Tinh sạch tách chất 6

Methyl ferulat (6): chất keo không màu, m.p. 165-167 $^{\circ}\text{C}$; UV (MeOH) λ_{max} nm: 211, 285; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3406, 1711; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.64 (1H, *d*, $J = 19.9$ Hz, H-7), 7.08 (1H, *dd*, $J = 10.3$ Hz, H-6), 7.03 (1H, *d*, H-2), 6.93 (1H, *d*, $J = 13.2$ Hz, H-5), 6.30 (3H, *d*, $J = 19.9$ Hz, H-8), 3.95(3H, *s*, $-\text{OCH}_3$), 3.79 (3H, *s*, $-\text{COOCH}_3$). Hợp chất (6) ở dạng keo không màu. Các pic hấp thụ cực đại trong phổ hồng ngoại (IR) của hợp chất (6) cho thấy các nhóm chức OH và C=O tại 3406 cm^{-1} , 1711 cm^{-1} . Các proton *trans*-olefin được thể hiện rõ nét thông qua tín hiệu trên phổ $^1\text{H-NMR}$ tại δ_{H} 7,64 (1H, *d*, $J = 19,9$ Hz, H-7), 6,30 (3H, *d*, $J = 19,9$ Hz, H-8) liên hợp với nhóm C=O của phần este $-\text{COOCH}_3$. Sự khác biệt về cấu trúc của hợp chất (6) so với hợp chất (5) còn thể hiện qua sự xuất hiện của ba nhóm thế trên vòng benzen ở vị trí 1,3,4 trong đó có nhóm thế $-\text{OCH}_3$. Từ các số liệu phổ và kết hợp so sánh với tài liệu (Steinkraus và ctv 2007) cho thấy hợp chất (6) là methyl ferulat.

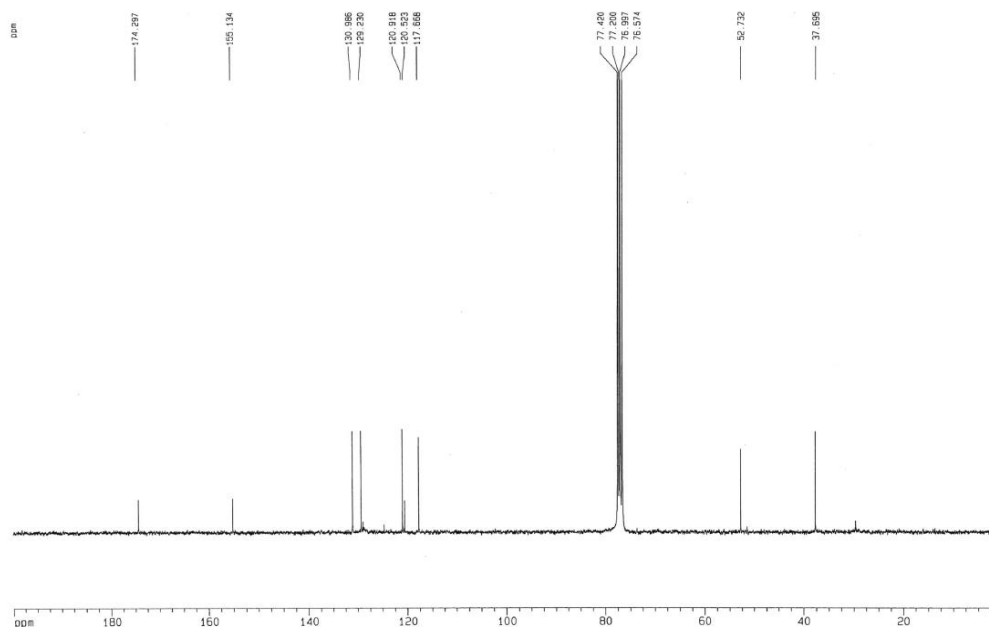


Hình d.53. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất methyl ferulat

PLD7. Tinh sạch tách chất 7

Methyl (2-hydroxyphenyl) acetat (7): tinh thể không màu, m.p. $69-71^\circ\text{C}$; IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3433, 1723, 1646, 1456; UV (MeOH) λ_{max} nm: 295, 275, 217; EI-MS m/z 166 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.35 (1H, *brs*, -OH), 7.08 (1H, *d*, $J = 11.9$ Hz, H-3), 6.85 (1H, *d*, $J=7.9$ Hz, H-4), 6.89 (1H, *t*, $J=7.3$ Hz, H-6), 3.75 (3H, *s*, H-9), 3.69 (2H, *s*, H-7), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 174.3 (C-8), 155.1 (C-1), 130.9 (C-3), 129.2 (C-5), 120.9 (C-2), 120.5 (C-4), 117.7 (C-6), 52.7 (C-9), 37.7 (C-7). Hợp chất (7) thu được dưới dạng tinh thể không màu. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất phenolic cho thấy ba tín hiệu proton thơm của hệ ABX trên dịch chuyển hóa học δ_{H} (ppm). Đó là tín hiệu ở δ_{H} 6,85 ppm cho thấy là H trong vòng thơm. Tín hiệu δ_{H} 7,31 ppm cho thấy sự xuất hiện của 1 nhóm OH. Cấu trúc của chất có các nhóm thế gắn với hạt nhân thơm. Tín hiệu ở δ_{H} 3,69 ppm cho thấy sự có nhóm CH_2 gắn với nhân thơm. Cùng với đó có tín hiệu proton singlet ở độ dịch chuyển δ_{H} 3,75 ppm với bội số proton đơn cho một nhóm thế methoxyl (OCH_3). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất cho thấy 9 tín hiệu carbon tách biệt. Trong đó có bốn tín hiệu carbon metin (CH) ở δ_{C} (ppm) 130.9, 120.5, 129.2 117.6 xác nhận rằng hợp chất có 2 nhóm thế gắn với hạt nhân thơm, carbon methyl ở δ_{C} 52,73 ppm và nhóm hydroxyl -OH ở δ_{C} 155,13

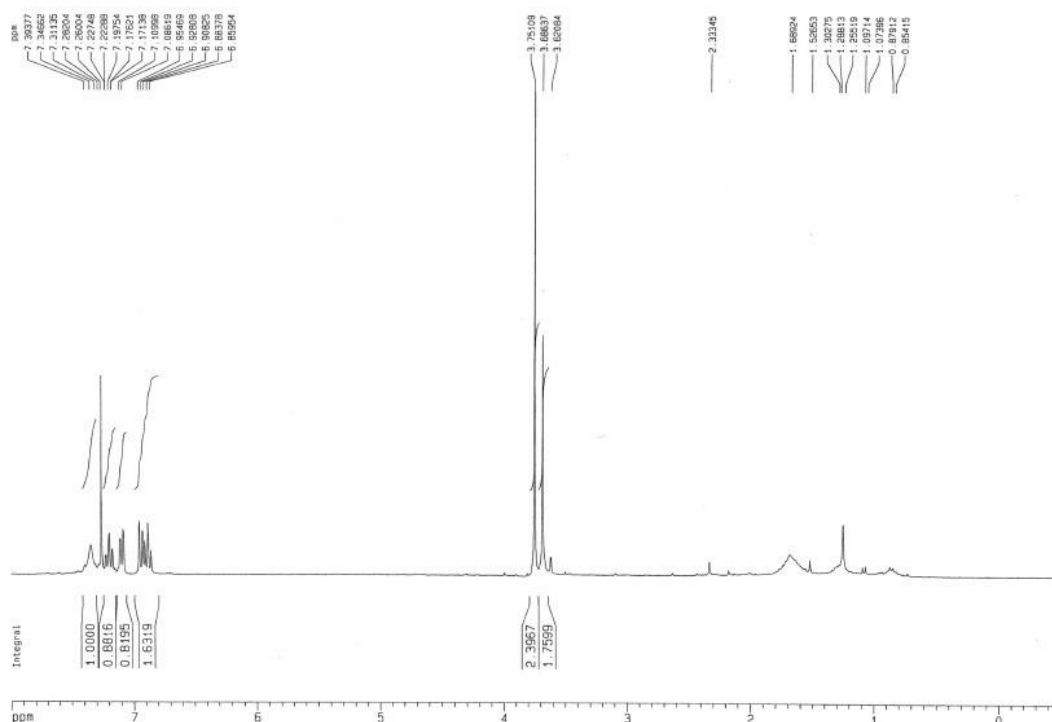
ppm ngoài ra còn có nhóm CH₂ ở δ_C 37,69 ppm cùng với nhóm C=O ở δ_C 174,29 ppm. Dựa trên phổ ¹H, ¹³C-NMR dữ liệu phổ và kết hợp so sánh với tài liệu tham khảo (Nussbaumer và Bilban, 2000) cho thấy hợp chất phenolic nhóm hydroxyl các nhóm gắn liền với hạt nhân thơm có tên gọi là methyl (2-hydroxyphenyl) axetat.



Hình d.54. Phổ ¹H-NMR của hợp chất methyl(2-hydroxyphenyl) axetat

PLD8. Tinh sạch tách chất 8

Umbelliferone (8): tinh thể màu vàng, m.p. 224–227⁰C; IR (KBr) ν_{max} (cm⁻¹): 3165, 1715–1690, 1628–1603, 1575, 1109, 835; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): 7.62 (1H, *d*, *J* = 15.9 Hz, H-4), 7.34 (1H, *d*, *J* = 10.4 Hz, H-5), 6.79 (2H, *m*, H-6, 8), 6.24 (1H, *d*, *J* = 11.8 Hz, H-3). Hợp chất **8** là dạng tinh thể màu vàng nhạt, tan tốt trong nước nóng và ethanol. Hợp chất **8** có công thức phân tử là C₉H₆O₃ và được kết tinh lại bằng chloroform, nhiệt độ nóng chảy là 224–227⁰C. Phổ IR của hợp chất **8** cho thấy pic hấp thụ tại 3165 (Ar-OH), 1715–1690 và 1628–1603 (lactone), 1575, 1109 (C=C) và 835 (CH) cm⁻¹. Phổ ¹H-NMR của hợp chất **8** cho 4 tín hiệu ở vùng trường thấp 7,62 (1H, *d*, *J* = 15.85 Hz,); 7,34 (1H, *d*, *J* = 10.4 Hz); 6,79 (2H, *m*), 6,24 (1H, *d*, *J* = 11.8 Hz). Cấu trúc hóa học của hợp chất **8** được xác định dựa trên sự so sánh với tài liệu (Farshori và ctv 2011) có thể kết luận **8** chính là umbelliferone.

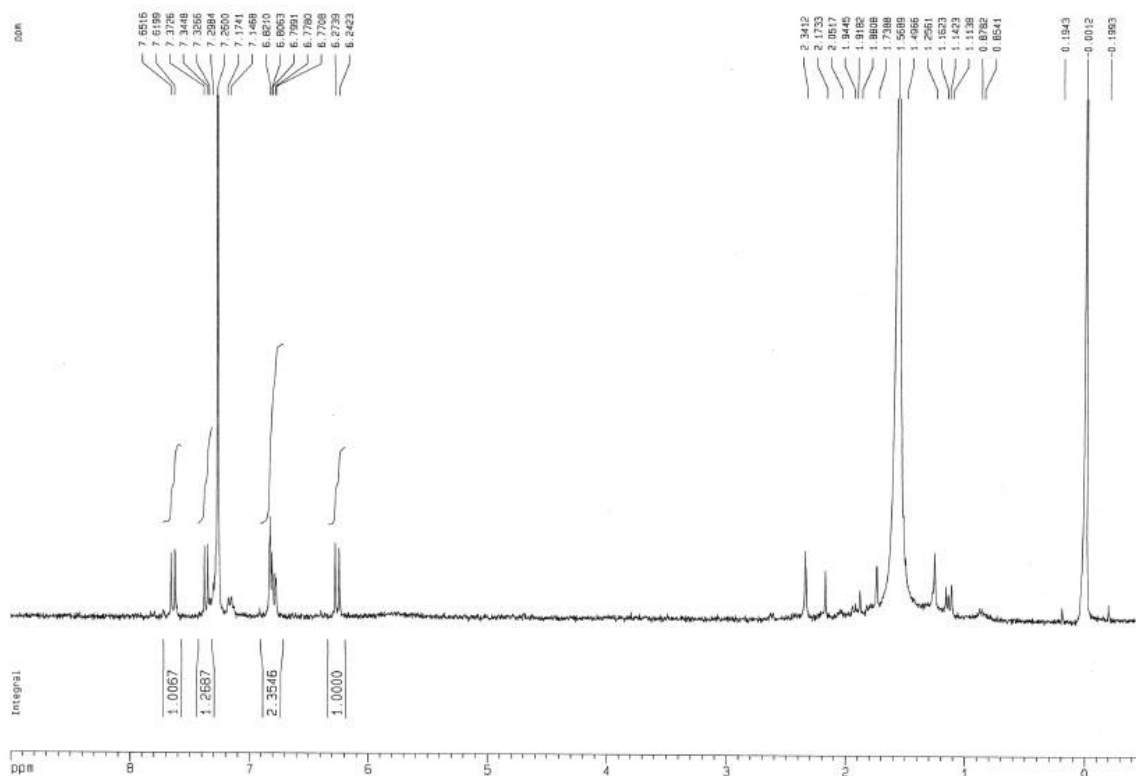


Hình d.55. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất umbelliferone

PLD9. Tinh sạch tách chất **9**

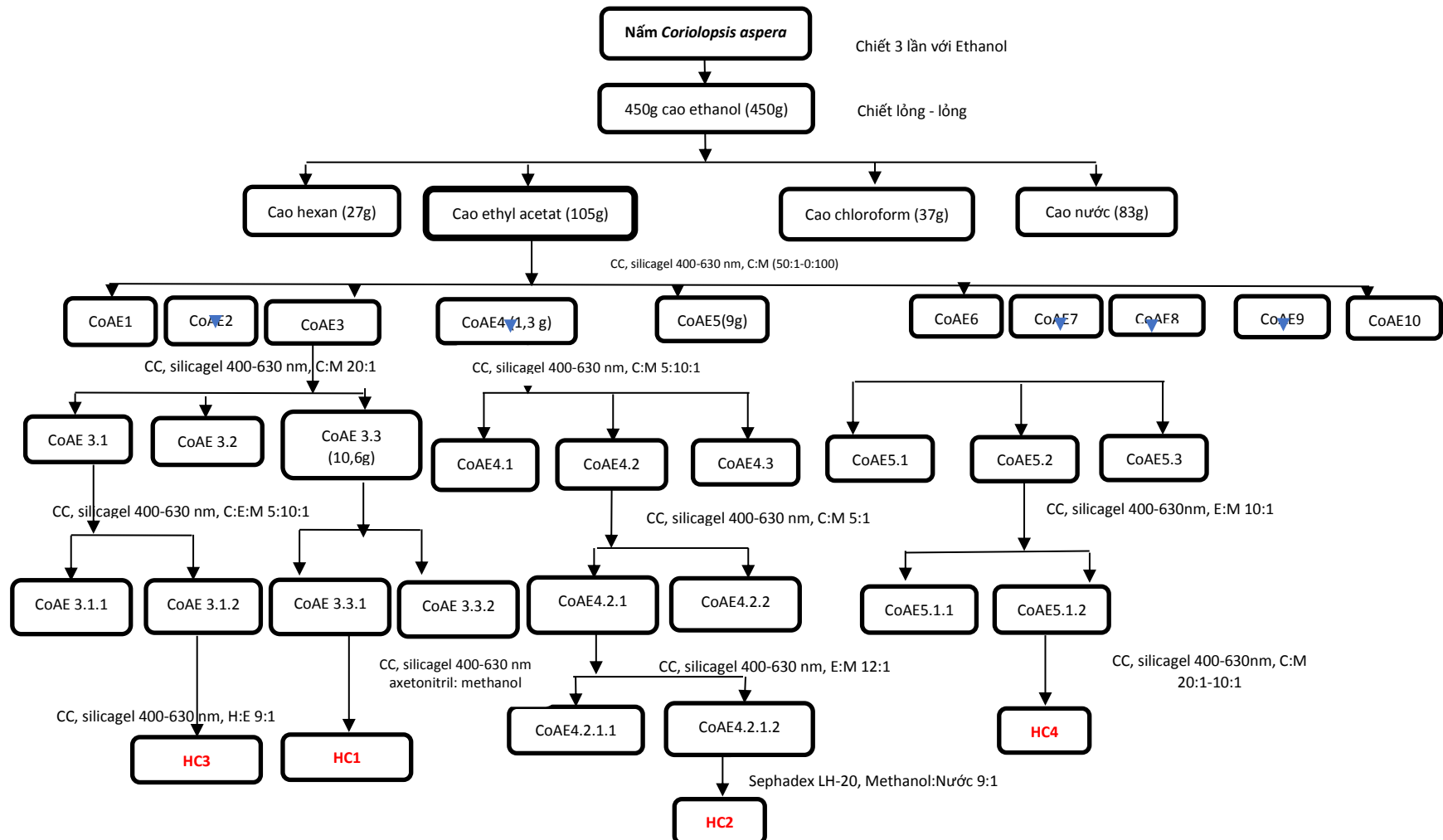
8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin (9): tinh thể màu trắng, m.p. 128-129°C; UV (EtOH) λ_{max} nm: 230, 237, 260, 342; EI-MS m/z : 220 $[\text{M}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 7.58 (1H, *t*, $J = 10.0$ Hz, H-6), 6.90 (1H, *t*, $J = 9.5$ Hz, H-5, 7), 2.30 (3H, *s*, H-9), 2.11 (3H, *s*, H-10); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) (δ ppm): 166.8 (C-1), 162.2 (C-8), 149.8 (C-8^a), 139.4 (C-4^a), 137.4 (C-6), 114.7 (C-7), 113.0 (C-5), 109.4 (C-4), 106.2 (C-3), 17.4 (C-9), 12.8 (C-10). Hợp chất **9** là tinh thể hình kim không màu, phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT cho tín hiệu của 11 carbon trong đó có một carbon carbonyl (C=O) tại 166,84 ppm; 6 tín hiệu của carbon thơm ở (δ_{C} 162,2-113,0 ppm), 6 tín hiệu carbon thơm này thì có 3 nhóm metin (CH) ở δ_{C} (ppm) 137,4 (C-6), 114,7 (C-7), 114,0 (C-5) và 3 carbon bậc bốn ở độ dịch chuyển trường thấp hơn δ_{C} (ppm) 162,16 (C-8), 149,82 (C-8a), 139,4 (C-4a); có tín hiệu của 2 carbon nối đôi (C=C) ở δ_{C} 109,4 ppm (C-4), 106,18 ppm (C-3), 2 tín hiệu này là hai tín hiệu carbon bậc 4; tín hiệu của hai nhóm methyl (CH_3) liên kết với carbon của nối đôi ở δ_{C} 17,4 ppm (C-9), 12,8 ppm (C-10). Phổ $^1\text{H-NMR}$ hợp chất **9** cho thấy tín hiệu proton của một nhóm OH tại δ_{H} 11,29 ppm; tín hiệu của 3 nhóm CH thuộc vòng thơm ở 7,58 ppm (H-6), J

= 10,0 Hz; 6,90 (*t*, *J*= 9,5 Hz) (H-5, H-7); 2 tín hiệu của hai nhóm methyl (δ_{H} 2,30 ppm; 2,11 ppm). Dựa vào các dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT kết hợp so sánh với các tài liệu (Farshori và ctv 2011; Okada và Minamishima, 1987) khẳng định hợp chất **9** có tên 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin.

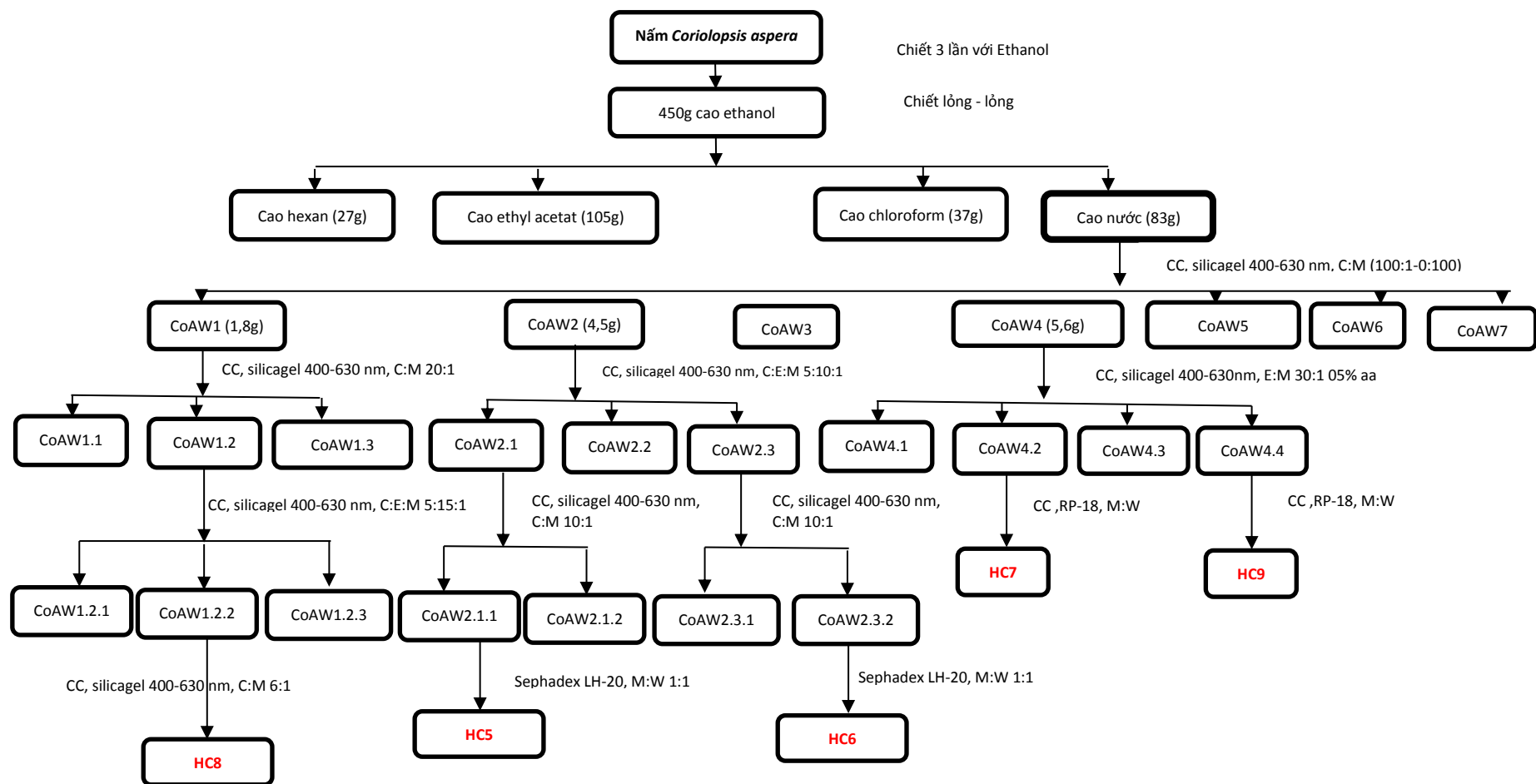


Hình d.56. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 8-hydroxy-3,4-dimethylisocoumarin

PLD10 Sơ đồ tách hợp chất



Hình d.1. Sơ đồ tách hợp chất từ 1-4



Hình d.2. Sơ đồ tách hợp chất từ 5-9

Phụ lục E

PLE.1. Độc tính cấp

Bảng e.3. Ảnh hưởng của EtCA trọng lượng tương đối của tim, gan, thận chuột trong thử nghiệm độc tính cấp tính

Nhóm thí nghiệm	Tim (%)	Gan (%)	Thận (%)
Đối chứng	0,43 ^a ± 0,02	7,82 ^a ± 1,19	1,81 ^a ± 0,13
2000 mg/kg	0,42 ^a ± 0,04	7,83 ^b ± 1,25	1,79 ^a ± 0,08
4000 mg/kg	0,44 ^a ± 0,05	7,85 ^b ± 1,88	1,83 ^b ± 0,11
6000 mg/kg	0,43 ^{ab} ± 0,02	7,88 ^c ± 2,01	1,82 ^b ± 0,9

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean ± SD. Các số mũ a,b,c,d,e biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa của các nghiệm thức khảo sát theo kiểm định LSD ở mức độ tin cậy 95%

PLE.2. Độc tính mãn tính

Bảng e.6. Thông số huyết học của chuột cho uống cao EtCA trong khảo sát độc tính bán mãn tính

Chỉ tiêu	Thời gian	Nhóm kiểm soát	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg	400 mg/kg
RBC (x10 ⁶ tb/mm ³)	0 tuần	7,6 ^a ±0,3	7,3 ^a ±0,2	7,5 ^a ±0,3	8,2 ^a ±0,4	7,6 ^a ±0,4
	4 tuần	8,1 ^b ±0,1	9,1 ^b ±0,2	7,9 ^b ±0,2	7,2 ^b ±0,2	8,1 ^b ±0,1
	8 tuần	8,6 ^c ±0,2	8,3 ^c ±0,2	8,8 ^c ±0,3	9,1 ^c ±0,2	8,6 ^c ±0,4
	12 tuần	7,2 ^{dA} ±0,2	8,7 ^{dB} ±0,3	8,3 ^{dC} ±0,2	7,6 ^{dD} ±0,3	9,1 ^{dE} ±0,2
Hgb (g/dl)	0 tuần	10,8 ^a ± 0,4	11,4 ^a ± 0,3	12,1 ^a ± 0,3	13,3 ^a ± 0,4	12,7 ^a ± 0,3
	4 tuần	11,3 ^b ± 0,3	11,9 ^b ± 0,3	12,5 ^b ± 0,3	13,8 ^b ± 0,3	13,2 ^b ± 0,3
	8 tuần	11,9 ^c ± 0,3	12,4 ^c ± 0,4	13,0 ^c ± 0,3	14,4 ^c ± 0,3	13,8 ^c ± 0,3
	12 tuần	12,3 ^{dA} ± 0,4	12,9 ^{dB} ± 0,4	13,6 ^{dC} ± 0,4	14,9 ^{dD} ± 0,4	14,2 ^{dE} ± 0,3
HCT (%)	0 tuần	37,8 ^a ± 0,30	37,8 ^a ± 0,20	37,8 ^a ± 0,20	37,1 ^a ± 0,20	37,1 ^a ± 0,20
	4 tuần	39,0 ^b ± 0,30	39,4 ^b ± 0,20	40,7 ^b ± 0,40	41,1 ^b ± 0,40	41,8 ^b ± 0,70
	8 tuần	41,0 ^c ± 0,10	41,1 ^c ± 0,30	44,5 ^c ± 0,40	45,5 ^c ± 0,50	47,9 ^c ± 0,60
	12 tuần	41,9 ^{dA} ± 0,80	45,3 ^{dA} ± 0,60	46,1 ^{dA} ± 0,20	48,3 ^{dA} ± 0,50	50,1 ^{dA} ± 0,90
MCH (pg)	0 tuần	12,2 ^a ± 0,03	13,7 ^a ± 0,03	14,1 ^a ± 0,03	15,2 ^a ± 0,03	15,9 ^a ± 0,03
	4 tuần	13,0 ^b ± 0,03	14,3 ^b ± 0,03	14,7 ^b ± 0,02	15,8 ^b ± 0,03	16,7 ^b ± 0,03
	8 tuần	13,7 ^c ± 0,04	15,2 ^c ± 0,02	15,9 ^c ± 0,03	16,5 ^c ± 0,03	17,5 ^c ± 0,03
	12 tuần	14,4 ^{dA} ± 0,03	15,8 ^{dB} ± 0,02	16,5 ^{dC} ± 0,03	17,2 ^{dD} ± 0,03	18,4 ^{dE} ± 0,03
MCHC (g/dl)	0 tuần	32,8 ^a ±0,55	31,09 ^a ±0,47	30,9 ^a ±0,29	32,11 ^a ±0,47	31,01 ^a ±0,35
	4 tuần	31,8 ^b ±0,5	32,07 ^b ±0,58	33,11 ^b ±0,27	34,03 ^b ±0,24	32,1 ^b ±0,47
	8 tuần	33,86 ^c ±0,33	33,69 ^c ±0,41	33,95 ^c ±0,15	33,19 ^c ±0,55	33,31 ^c ±0,42
	12 tuần	30,86 ^{dA} ±0,28	32,97 ^{dB} ±0,26	32,25 ^{dC} ±0,31	31,49 ^{dD} ±0,48	33,93 ^{dE} ±0,28
PLT (x10 ³ tb/mm ³)	0 tuần	602,7 ^a ± 21,3	628,0 ^a ± 17,9	665,6 ^a ± 17,1	722,1 ^a ± 17,0	687,4 ^a ± 20,3
	4 tuần	632,1 ^b ± 21,5	657,4 ^b ± 21,9	692,9 ^b ± 16,5	749,7 ^b ± 18,7	716,2 ^b ± 19,1
	8 tuần	660,6 ^c ± 19,3	686,2 ^c ± 17,8	719,0 ^c ± 17,7	775,9 ^c ± 16,3	745,3 ^c ± 21,2
	12 tuần	689,1 ^{dA} ± 22,2	716,9 ^{dB} ± 19,5	745,3 ^{dC} ± 19,3	892,2 ^{dD} ± 19,0	774,1 ^{dE} ± 22,7
0 tuần	2,3 ^a ± 0,30	1,8 ^a ± 0,38	1,8 ^a ± 0,18	2,0 ^a ± 0,30	1,9 ^a ± 0,24	

WBC ($\times 10^3$ tb/mm ³)	4 tuần	3,3 ^b ± 0,30	2,5 ^b ± 0,35	3,8 ^b ± 0,51	4,0 ^b ± 0,36	3,5 ^b ± 0,41
	8 tuần	3,9 ^c ± 0,26	3,5 ^c ± 0,38	3,2 ^c ± 0,28	2,8 ^c ± 0,51	3,0 ^c ± 0,30
	12 tuần	1,8 ^{dA} ± 0,20	3,0 ^{dA} ± 0,16	2,4 ^{dA} ± 0,34	3,5 ^{dA} ± 0,39	4,2 ^{dA} ± 0,27
Lymphocyte (%)	0 tuần	59,2 ^a ± 1,4	63,6 ^a ± 1,4	67,8 ^a ± 1,4	73,3 ^a ± 1,1	78,5 ^a ± 1,5
	4 tuần	61,8 ^b ± 1,9	66,2 ^b ± 1,4	70,4 ^b ± 1,9	76,1 ^b ± 1,5	80,7 ^b ± 1,6
	8 tuần	64,1 ^c ± 1,7	68,8 ^c ± 1,5	72,8 ^c ± 1,6	78,5 ^c ± 1,6	83,0 ^c ± 1,6
Monocyte (%)	0 tuần	2,53 ^a ± 0,5	3,54 ^a ± 0,76	3,32 ^a ± 0,3	2,64 ^a ± 0,61	3,12 ^a ± 0,37
	4 tuần	3,17 ^b ± 0,35	2,65 ^b ± 0,37	4,42 ^b ± 0,27	1,9 ^b ± 0,46	4 ^b ± 0,63
	8 tuần	3,87 ^c ± 0,59	1,72 ^c ± 0,64	2,13 ^c ± 0,45	4,2 ^c ± 0,35	2,44 ^c ± 0,48
Neutrophil (%)	0 tuần	12,4 ^a ± 1,2	14,4 ^a ± 0,9	15,9 ^a ± 0,9	19,5 ^a ± 1,0	17,8 ^a ± 1,0
	4 tuần	14,1 ^b ± 1,3	15,9 ^b ± 0,8	17,6 ^b ± 1,4	21,1 ^b ± 1,3	19,5 ^b ± 0,9
	8 tuần	15,8 ^c ± 1,2	17,6 ^c ± 0,8	19,4 ^c ± 1,2	22,9 ^c ± 1,4	21,1 ^c ± 1,1
Eosinophil (%)	0 tuần	2,2 ^a ± 0,07	2,4 ^a ± 0,08	2,5 ^a ± 0,03	2,5 ^a ± 0,05	2,7 ^a ± 0,05
	4 tuần	2,4 ^b ± 0,07	3,0 ^b ± 0,05	3,5 ^b ± 0,08	3,5 ^b ± 0,09	3,7 ^b ± 0,07
	8 tuần	2,7 ^c ± 0,09	3,5 ^c ± 0,12	4,1 ^c ± 0,04	4,1 ^c ± 0,08	4,3 ^c ± 0,05
Basophil (%)	0 tuần	0,03 ^a ± 0,004	0,05 ^a ± 0,038	0,23 ^a ± 0,032	0,36 ^a ± 0,018	0,65 ^a ± 0,030
	4 tuần	0,05 ^b ± 0,004	0,17 ^b ± 0,024	0,35 ^b ± 0,028	0,52 ± 0,032	0,72 ^b ± 0,030
	8 tuần	0,07 ^c ± 0,003	0,23 ^c ± 0,032	0,41 ^c ± 0,024	0,65 ^c ± 0,016	0,85 ^c ± 0,024
	12 tuần	0,10 ^{dA} ± 0,012	0,35 ^{dB} ± 0,029	0,55 ^{dC} ± 0,024	0,74 ^{dD} ± 0,026	0,94 ^{dE} ± 0,024

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái (a, b, c, d, e và A, B, C, D, E) trong cùng cột và hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau ($p < 0,05$).

Bảng e.7. Thông số sinh hóa huyết thanh của chuột được uống cao chiết EtCA trong khảo sát độc tính bán mãn tính.

Chỉ tiêu	Thời gian	Nhóm kiểm soát	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg	400 mg/kg
Protein tổng (g/dl)	0 tuần	0,48 ^a ± 0,02	0,49 ^a ± 0,03	0,49 ^a ± 0,05	0,49 ^a ± 0,05	0,49 ^a ± 0,05
	4 tuần	0,49 ^b ± 0,03	0,50 ^b ± 0,04	0,52 ^b ± 0,05	0,53 ^b ± 0,05	0,54 ^b ± 0,04
	8 tuần	0,51 ^c ± 0,04	0,52 ^c ± 0,04	0,53 ^c ± 0,03	0,55 ^c ± 0,17	0,57 ^c ± 0,07
	12 tuần	0,52 ^{dA} ± 0,06	0,53 ^{dB} ± 0,04	0,54 ^{dC} ± 0,05	0,56 ^{dD} ± 0,06	0,59 ^{dE} ± 0,6
Albumin (g/dl)	0 tuần	0,8 ^a ± 0,2	1,0 ^a ± 0,1	1,5 ^a ± 0,2	2,0 ^a ± 0,2	2,1 ^a ± 0,1
	4 tuần	1,0 ^b ± 0,2	1,3 ^b ± 0,1	1,8 ^b ± 0,1	2,2 ^b ± 0,1	2,5 ^b ± 0,1
	8 tuần	1,3 ^c ± 0,2	1,5 ^c ± 0,1	2,1 ^c ± 0,2	2,4 ^c ± 0,2	2,7 ^c ± 0,1
	12 tuần	1,6 ^{dA} ± 0,2	1,8 ^{dB} ± 0,1	2,3 ^{dC} ± 0,2	2,7 ^{dD} ± 0,2	3,0 ^{dE} ± 0,2
Glucose (mol/l)	0 tuần	75,93 ^a ± 0,57	82,31 ^a ± 1	91,12 ^a ± 0,93	101,96 ^a ± 1,24	111,62 ^a ± 1,16
	4 tuần	78,33 ^b ± 1,37	84,46 ^b ± 0,59	93,35 ^b ± 1,05	104,07 ^b ± 1,46	113,74 ^b ± 1,27
	8 tuần	83,82 ^c ± 0,86	86,6 ^c ± 0,69	95,43 ^c ± 0,73	106,14 ^c ± 1,22	115,94 ^c ± 1,17
	12 tuần	80,77 ^{dA} ± 1,75	88,94 ^{dB} ± 1,55	97,66 ^{dC} ± 1,95	108,55 ^{dD} ± 1,84	118,26 ^{dE} ± 1,28
Cholesterolon (mg /dl)	0 tuần	126,1 ^a ± 2,1	129,7 ^a ± 2,4	134,6 ^a ± 2,7	132,6 ^a ± 2,6	138,2 ^a ± 2,2
	4 tuần	129,7 ^b ± 2,4	133,1 ^b ± 2,4	138,7 ^b ± 2,1	136,1 ^b ± 2,0	142 ^b ± 2,1
	8 tuần	133,2 ^c ± 3,0	136,6 ^c ± 2,3	142,5 ^c ± 3,0	139,7 ^c ± 2,4	145,5 ^c ± 2,2

	12 tuần	137,1 ^{dA} ± 2,1	140,3 ^{dB} ± 2,0	146,3 ^{dC} ± 2,5	143,3 ^{dD} ± 2,5	149,3 ^{dE} ± 2,1
Tryglicerit (mg/dl)	0 tuần	71,5 ^a ± 2,0	77,0 ^a ± 1,5	76,4 ^a ± 2,0	82,1 ^a ± 1,8	86,4 ^a ± 1,8
	4 tuần	75,2 ^b ± 1,2	80,1 ^b ± 1,2	81,2 ^b ± 1,2	86,7 ^b ± 2,0	90,3 ^b ± 1,6
	8 tuần	78,9 ^c ± 2,2	83,4 ^c ± 1,7	85,8 ^c ± 2,2	90,7 ^c ± 2,5	93,8 ^c ± 2,0
	12 tuần	82,9 ^{dA} ± 1,5	86,8 ^{dB} ± 1,2	89,9 ^{dC} ± 1,5	94,6 ^{dD} ± 2,0	97,2 ^{dE} ± 1,5

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái (a, b, c, d, e và A, B, C, D, E) trong cùng cột và hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau (p < 0,05).

Kết quả bảng e.5 khảo sát mô hình độc bán mãn tính cho thấy, chuột được uống EtCA trong 12 tuần lượng WBC khác biệt rõ rệt so với nhóm đối chứng (P < 0,05). Cụ thể: Ở tuần thứ 8 lượng WBC nhóm đối chứng lên đến $3,9 \times 10^3$ tb/mm³ so với nhóm 400mg/kg là $3,0 \times 10^3$ tb/mm³, thấp nhất là nhóm 300mg/kg chỉ $2,8 \times 10^3$ tb/mm³ (P < 0,05). Mặc dù lượng WBC biến động mạnh trong quá trình khảo nghiệm nhưng nằm trong khoảng giới hạn WBC chuột bình thường (từ $1,5 - 4,8 \times 10^3$ tb/mm³).

Bảng e.8. Trọng lượng tương đối cơ quan của chuột được điều trị bằng EtCA trong khảo sát độc tính bán mãn tính

Chỉ tiêu	Thời gian	Nhóm kiểm soát	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg	400 mg/kg
Tim (%)	0 tuần	0,51 ^a ± 0,03	0,57 ^a ± 0,05	0,62 ^a ± 0,02	0,68 ^a ± 0,03	0,71 ^a ± 0,03
	4 tuần	0,59 ^b ± 0,04	0,63 ^b ± 0,03	0,69 ^b ± 0,03	0,74 ^b ± 0,02	0,78 ^b ± 0,02
	8 tuần	0,65 ^c ± 0,02	0,70 ^c ± 0,04	0,75 ^c ± 0,03	0,81 ^c ± 0,02	0,85 ^c ± 0,02
	12 tuần	0,72 ^{dA} ± 0,04	0,76 ^{dB} ± 0,03	0,81 ^{dC} ± 0,03	0,87 ^{dD} ± 0,02	0,92 ^{dE} ± 0,02
Gan (%)	0 tuần	6,1 ^a ± 0,05	5,8 ^a ± 0,05	5,9 ^a ± 0,03	6,1 ^a ± 0,03	6,2 ^a ± 0,04
	4 tuần	6,3 ^b ± 0,04	5,9 ^b ± 0,04	6,1 ^b ± 0,03	6,2 ^b ± 0,04	6,3 ^b ± 0,04
	8 tuần	6,4 ^c ± 0,06	6,1 ^c ± 0,05	6,2 ^c ± 0,03	6,3 ^c ± 0,03	6,5 ^c ± 0,04
	12 tuần	6,5 ^{dA} ± 0,03	6,2 ^{dB} ± 0,03	6,3 ^{dC} ± 0,02	6,5 ^{dD} ± 0,03	6,6 ^{dE} ± 0,03
Thận (%)	0 tuần	1,4 ^a ± 0,03	1,6 ^a ± 0,03	1,7 ^a ± 0,02	1,3 ^a ± 0,03	1,8 ^a ± 0,05
	4 tuần	1,5 ^b ± 0,03	1,7 ^b ± 0,03	1,8 ^b ± 0,02	1,4 ^b ± 0,02	1,9 ^b ± 0,02
	8 tuần	1,7 ^c ± 0,03	1,8 ^c ± 0,02	1,9 ^c ± 0,03	1,5 ^c ± 0,04	2,0 ^c ± 0,05
	12 tuần	1,8 ^{dA} ± 0,09	1,9 ^{dB} ± 0,05	2,0 ^{dC} ± 0,06	1,7 ^{dD} ± 0,07	2,1 ^{dE} ± 0,08
Lá lách (%)	0 tuần	0,4 ^a ± 0,02	0,5 ^a ± 0,03	0,5 ^a ± 0,03	0,6 ^a ± 0,02	0,6 ^a ± 0,02
	4 tuần	0,5 ^b ± 0,03	0,6 ^b ± 0,03	0,7 ^b ± 0,03	0,5 ^b ± 0,03	0,7 ^b ± 0,03
	8 tuần	0,6 ^c ± 0,02	0,7 ^c ± 0,02	0,8 ^c ± 0,03	0,8 ^c ± 0,05	0,8 ^c ± 0,05
	12 tuần	0,5 ^{dA} ± 0,05	0,8 ^{dB} ± 0,06	0,6 ^{dC} ± 0,08	0,7 ^{dD} ± 0,05	0,9 ^{dE} ± 0,04
Tuyến ức (%)	0 tuần	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01
	4 tuần	0,04 ^b ± 0,01	0,03 ^b ± 0,01	0,04 ^b ± 0,01	0,04 ^b ± 0,01	0,05 ^b ± 0,01
	8 tuần	0,06 ^c ± 0,01	0,04 ^c ± 0,01	0,06 ^c ± 0,01	0,05 ^c ± 0,01	0,05 ^c ± 0,01
	12 tuần	0,05 ^{dA} ± 0,01	0,06 ^{dB} ± 0,01	0,06 ^{dC} ± 0,01	0,03 ^{dD} ± 0,01	0,07 ^{dE} ± 0,01

Dữ liệu được biểu thị dưới dạng Mean ± SD. Các chữ cái (a, b, c, d, e và A, B, C, D, E) trong cùng cột và hàng biểu thị sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khác nhau (p < 0,05).

Phụ lục F

PLF1. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu nguyên liệu

PLF1.1. Phương pháp siêu âm

Kết quả xử lý thống kê TN1

TPC

ANOVA Table for TPC by CONG SUAT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9.27171	6	1.54529	7211.33	0.0000
Within groups	0.003	14	0.000214286		
Total (Corr.)	9.27471	20			

Multiple Range Tests for TPC by CONG SUAT

Method: 95.0 percent LSD

CONG SUAT	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.12	x
150	3	2.6	x
225	3	2.7	x
300	3	2.81	x
375	3	3.13	x
450	3	3.14	x
525	3	3.15	x

TFC

ANOVA Table for TFC by CONG SUAT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0395143	6	0.00658571	35.46	0.0000
Within groups	0.0026	14	0.000185714		
Total (Corr.)	0.0421143	20			

Multiple Range Tests for TFC by CONG SUAT

Method: 95.0 percent LSD

CONG SUAT	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.15	x
150	3	0.18	x
225	3	0.21	x
300	3	0.23	x
375	3	0.26	x
525	3	0.27	x
450	3	0.27	x

TTC

ANOVA Table for TTC by CONG SUAT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.454457	6	0.0757429	331.37	0.0000
Within groups	0.0032	14	0.000228571		
Total (Corr.)	0.457657	20			

Multiple Range Tests for TTC by CONG SUAT

Method: 95.0 percent LSD

CONG SUAT	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.11	x
150	3	0.36	x
225	3	0.48	x
300	3	0.49	x
450	3	0.54	x
375	3	0.54	x
525	3	0.55	x

RSA

ANOVA Table for RSA by CONG SUAT

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.34683	6	0.724471	1207.45	0.0000
Within groups	0.0084	14	0.0006		
Total (Corr.)	4.35523	20			

Multiple Range Tests for RSA by CONG SUAT

Method: 95.0 percent LSD

CONG SUAT	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.37	x
150	3	1.52	x
225	3	1.61	x
300	3	1.68	x
525	3	1.71	x
450	3	1.71	x
375	3	1.71	x

Kết quả xử lý thống kê TN2

TPC

ANOVA Table for TPC by THOI GIAN

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	13.4508	7	1.92154	4154.68	0.0000
Within groups	0.0074	16	0.0004625		
Total (Corr.)	13.4582	23			

Multiple Range Tests for TPC by THOI GIAN

Method: 95.0 percent LSD

THOI GIAN	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.19	x
5	3	2.12	x
10	3	2.13	x
15	3	2.26	x
20	3	2.31	x
25	3	3.35	x
30	3	3.41	x
35	3	3.42	x

TFC

ANOVA Table for TFC by THOI GIAN

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.146063	7	0.0208661	98.19	0.0000
Within groups	0.0034	16	0.0002125		
Total (Corr.)	0.149463	23			

Multiple Range Tests for TFC by THOI GIAN

Method: 95.0 percent LSD

THOI GIAN	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.08	X
5	3	0.12	X
10	3	0.26	X
15	3	0.26	X
20	3	0.26	X
25	3	0.27	X
30	3	0.3	X
35	3	0.3	X

TTC

ANOVA Table for TTC by THOI GIAN

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.633729	7	0.0905327	339.50	0.0000
Within groups	0.00426667	16	0.000266667		
Total (Corr.)	0.637996	23			

Multiple Range Tests for TTC by THOI GIAN

Method: 95.0 percent LSD

THOI GIAN	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.17	X
5	3	0.306667	X
10	3	0.54	X
15	3	0.54	X
20	3	0.55	X
25	3	0.59	X
35	3	0.66	X
30	3	0.66	X

RSA

ANOVA Table for RSA by THOI GIAN

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	10.6131	7	1.51615	284.06	0.0000
Within groups	0.0854	16	0.0053375		
Total (Corr.)	10.6985	23			

Multiple Range Tests for RSA by THOI GIAN

Method: 95.0 percent LSD

THOI GIAN	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.4	X
5	3	1.58	X
10	3	1.71	X
15	3	2.28	X
20	3	2.37	XX
25	3	2.38	XX
30	3	2.43	X
35	3	2.44	X

PLF1.2. Phương pháp vi sóng

Kết quả xử lý thống kê TN1

TPC

ANOVA Table for TPC by Cong suat vi song

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.98384	4	0.49596	1549.87	0.0000
Within groups	0.0032	10	0.00032		
Total (Corr.)	1.98704	14			

Multiple Range Tests for TPC by Cong suat vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.12	×
110	3	1.73	×
120	3	1.96	×
130	3	2.08	×
140	3	2.1	×

TFC**ANOVA Table for TFC by Cong suat vi song**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.10596	4	0.02649	120.41	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	0.10816	14			

Multiple Range Tests for TFC by Cong suat vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.05	×
110	3	0.19	×
120	3	0.24	×
130	3	0.27	×
140	3	0.28	×

TTC**ANOVA Table for TTC by Cong suat vi song**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.45216	4	0.11304	209.33	0.0000
Within groups	0.0054	10	0.00054		
Total (Corr.)	0.45756	14			

Multiple Range Tests for TTC by Cong suat vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.11	×
110	3	0.39	×
120	3	0.47	×
130	3	0.57	×
140	3	0.59	×

RSA**ANOVA Table for RSA by Cong suat vi song**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.89124	4	1.72281	2970.36	0.0000
Within groups	0.0058	10	0.00058		
Total (Corr.)	6.89704	14			

Multiple Range Tests for RSA by Cong suat vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.37	×
110	3	1.89	×

120	3	2.02	x
130	3	2.1	x
140	3	2.18	x

Kết quả xử lý thống kê TN2

TPC

ANOVA Table for TPC by Thoi gian vi song

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	11.7863	5	2.35726	56.10	0.0000
Within groups	0.504267	12	0.0420222		
Total (Corr.)	12.2906	17			

Multiple Range Tests for TPC by Thoi gian vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.13	x
5	3	1.76333	x
10	3	2.08	x
20	3	3.17	x
15	3	3.17	x
25	3	3.19	x

TFC

ANOVA Table for TFC by Thoi gian vi song

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.1324	5	0.02648	132.40	0.0000
Within groups	0.0024	12	0.0002		
Total (Corr.)	0.1348	17			

Multiple Range Tests for TFC by Thoi gian vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.06	x
5	3	0.19	x
10	3	0.27	x
20	3	0.29	xx
15	3	0.29	xx
25	3	0.3	x

TTC

ANOVA Table for TTC by Thoi gian vi song

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.6832	5	0.13664	409.92	0.0000
Within groups	0.004	12	0.000333333		
Total (Corr.)	0.6872	17			

Multiple Range Tests for TTC by Thoi gian vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.12	x
5	3	0.46	x

10	3	0.57	x
20	3	0.66	x
15	3	0.66	x
25	3	0.67	x

RSA

ANOVA Table for RSA by Thời gian vi song

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7.92405	5	1.58481	4754.43	0.0000
Within groups	0.004	12	0.000333333		
Total (Corr.)	7.92805	17			

Multiple Range Tests for RSA by Thời gian vi song

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.38	x
5	3	1.65	x
10	3	2.1	x
20	3	2.21	x
15	3	2.21	x
25	3	2.22	x

PLF1.3. Phương pháp đun nước nóng

Kết quả xử lý thống kê TN1

TPC

ANOVA Table for TPC by Nhiệt độ đun

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.50396	4	0.37599	2349.94	0.0000
Within groups	0.0016	10	0.00016		
Total (Corr.)	1.50556	14			

Multiple Range Tests for TPC by Nhiệt độ đun

Method: 95.0 percent LSD

Nhiệt độ đun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.12	x
70	3	1.55	x
80	3	1.66	x
90	3	1.81	x
100	3	2.08	x

TFC

ANOVA Table for TFC by Nhiệt độ đun

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.039	4	0.00975	60.94	0.0000
Within groups	0.0016	10	0.00016		
Total (Corr.)	0.0406	14			

Multiple Range Tests for TFC by Nhiệt độ đun

Method: 95.0 percent LSD

Nhiệt độ đun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.05	x
70	3	0.08	x
80	3	0.12	x
90	3	0.16	x
100	3	0.19	x

TTC

ANOVA Table for TTC by Nhiet do dun

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.11496	4	0.02874	130.64	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	0.11716	14			

Multiple Range Tests for TTC by Nhiet do dun

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.11	x
70	3	0.23	x
80	3	0.31	x
90	3	0.31	x
100	3	0.36	x

RSA**ANOVA Table for RSA by Nhiet do dun**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.81896	4	0.45474	1337.47	0.0000
Within groups	0.0034	10	0.00034		
Total (Corr.)	1.82236	14			

Multiple Range Tests for RSA by Nhiet do dun

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.37	x
70	3	1.04	x
80	3	1.14	x
90	3	1.28	x
100	3	1.34	x

Kết quả xử lý thống kê TN2**TPC****ANOVA Table for TPC by Thoi gian dun**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.79704	4	0.94926	2063.61	0.0000
Within groups	0.0046	10	0.00046		
Total (Corr.)	3.80164	14			

Multiple Range Tests for TPC by Thoi gian dun

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.13	x
5	3	1.43	x
10	3	2.08	x
15	3	2.35	x
20	3	2.37	x

TFC**ANOVA Table for TFC by Thoi gian dun**

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.09036	4	0.02259	102.68	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	0.09256	14			

Multiple Range Tests for TFC by Thoi gian dun

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
---------------	-------	------	--------------------

Mo	3	0.06	X
5	3	0.09	X
10	3	0.19	X
15	3	0.24	X
20	3	0.25	X

TTC

ANOVA Table for TTC by Thoi gian dun

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.15576	4	0.03894	177.00	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	0.15796	14			

Multiple Range Tests for TTC by Thoi gian dun

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.12	X
5	3	0.24	X
10	3	0.34	X
15	3	0.38	X
20	3	0.39	X

RSA

ANOVA Table for RSA by Thoi gian dun

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.67	4	0.6675	2085.94	0.0000
Within groups	0.0032	10	0.00032		
Total (Corr.)	2.6732	14			

Multiple Range Tests for RSA by Thoi gian dun

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian dun	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.38	X
5	3	1.2	X
10	3	1.34	X
15	3	1.51	X
20	3	1.52	X

PLF1.4. Phương pháp kết hợp hóa chất NaOH và siêu âm

Kết quả xử lý thống kê TN1

TPC

ANOVA Table for TPC by Nong do NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.78504	4	0.94626	4301.18	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	3.78724	14			

Multiple Range Tests for TPC by Nong do NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Nong do NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.19	X
3	3	2.19	X
5	3	2.48	X
7	3	2.49	X
9	3	2.49	X

TFC

ANOVA Table for TFC by Nong do NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.04344	4	0.01086	49.36	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	0.04564	14			

Multiple Range Tests for TFC by Nong do NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Nong do NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.08	x
3	3	0.16	x
5	3	0.21	x
7	3	0.22	x
9	3	0.22	x

TTC

ANOVA Table for TTC by Nong do NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.24931	4	0.312327	1018.46	0.0000
Within groups	0.00306667	10	0.000306667		
Total (Corr.)	1.25237	14			

Multiple Range Tests for TTC by Nong do NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Nong do NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.17	x
3	3	0.53	x
5	3	0.88	x
7	3	0.89	x
9	3	0.903333	x

RSA

ANOVA Table for RSA by Nong do NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	7.48164	4	1.87041	228.10	0.0000
Within groups	0.082	10	0.0082		
Total (Corr.)	7.56364	14			

Multiple Range Tests for RSA by Nong do NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Nong do NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.4	x
3	3	1.23	x
7	3	2.15	x
5	3	2.15	x
9	3	2.16	x

Kết quả xử lý thống kê TN2

TPC

ANOVA Table for TPC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.4182	4	0.85455	2248.82	0.0000
Within groups	0.0038	10	0.00038		

Total (Corr.)	3.422	14			
---------------	-------	----	--	--	--

Multiple Range Tests for TPC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.19	X
5	3	2.12	X
10	3	2.22	X
15	3	2.48	X
20	3	2.49	X

TFC

ANOVA Table for TFC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.04524	4	0.01131	70.69	0.0000
Within groups	0.0016	10	0.00016		
Total (Corr.)	0.04684	14			

Multiple Range Tests for TFC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.08	X
5	3	0.11	X
10	3	0.17	X
15	3	0.21	X
20	3	0.22	X

TTC

ANOVA Table for TTC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.44396	4	0.36099	1289.25	0.0000
Within groups	0.0028	10	0.00028		
Total (Corr.)	1.44676	14			

Multiple Range Tests for TTC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.17	X
5	3	0.22	X
10	3	0.61	X
15	3	0.88	X
20	3	0.89	X

RSA

ANOVA Table for RSA by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.3006	4	1.57515	192.09	0.0000
Within groups	0.082	10	0.0082		
Total (Corr.)	6.3826	14			

Multiple Range Tests for RSA by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.4	X
5	3	1.29	X
10	3	1.46	X
15	3	2.15	X
20	3	2.15	X

PLF1.5. Phương pháp kết hợp nito lỏng và siêu âm

Kết quả xử lý thống kê TN1

TPC

ANOVA Table for TPC by Ty le nito

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	28.493	4	7.12326	13698.58	0.0000
Within groups	0.0052	10	0.00052		
Total (Corr.)	28.4982	14			

Multiple Range Tests for TPC by Ty le nito

Method: 95.0 percent LSD

Ty le nito	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.13	x
2:1	3	2.43	x
4:1	3	3.59	x
6:1	3	4.69	x
8:1	3	4.72	x

TFC

ANOVA Table for TFC by Ty le nito

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.47756	4	0.36939	1420.73	0.0000
Within groups	0.0026	10	0.00026		
Total (Corr.)	1.48016	14			

Multiple Range Tests for TFC by Ty le nito

Method: 95.0 percent LSD

Ty le nito	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.06	x
2:1	3	0.39	x
4:1	3	0.61	x
6:1	3	0.88	x
8:1	3	0.89	x

TTC

ANOVA Table for TTC by Ty le nito

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.44056	4	0.61014	2773.36	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		
Total (Corr.)	2.44276	14			

Multiple Range Tests for TTC by Ty le nito

Method: 95.0 percent LSD

Ty le nito	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.12	x
2:1	3	0.56	x
4:1	3	0.82	x
6:1	3	1.18	x
8:1	3	1.19	x

RSA

ANOVA Table for RSA by Ty le nito

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	20.7386	4	5.18466	13643.84	0.0000
Within groups	0.0038	10	0.00038		
Total (Corr.)	20.7424	14			

Multiple Range Tests for RSA by Ty le nito

Method: 95.0 percent LSD

Ty le nito	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.38	X
2:1	3	2.96	X
4:1	3	3.18	X
6:1	3	3.48	X
8:1	3	3.49	X

Kết quả xử lý thống kê TN2

TPC

ANOVA Table for TPC by Thoi gian NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	26.7398	4	6.68496	12855.69	0.0000
Within groups	0.0052	10	0.00052		
Total (Corr.)	26.745	14			

Multiple Range Tests for TPC by Thoi gian NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.13	X
5	3	3.1	X
10	3	4.01	X
15	3	4.69	X
20	3	4.71	X

TFC

ANOVA Table for TFC by Thoi gian NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.46136	4	0.36534	2283.37	0.0000
Within groups	0.0016	10	0.00016		
Total (Corr.)	1.46296	14			

Multiple Range Tests for TFC by Thoi gian NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.06	X
5	3	0.38	X
10	3	0.64	X
20	3	0.87	X
15	3	0.88	X

TTC

ANOVA Table for TTC by Thoi gian NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.958	4	0.7395	3361.36	0.0000
Within groups	0.0022	10	0.00022		

Total (Corr.)	2.9602	14			
---------------	--------	----	--	--	--

Multiple Range Tests for TTC by Thoi gian NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.12	X
5	3	0.6	X
10	3	0.96	X
15	3	1.28	X
20	3	1.29	X

RSA

ANOVA Table for RSA by Thoi gian NaOH

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	20.8046	4	5.20116	11820.82	0.0000
Within groups	0.0044	10	0.00044		
Total (Corr.)	20.809	14			

Multiple Range Tests for RSA by Thoi gian NaOH

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian NaOH	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.38	X
5	3	2.91	X
10	3	3.24	X
20	3	3.48	X
15	3	3.48	X

PLF2. So sánh các mẫu Mo, M1, M2, M3, M4, M5

TPC

Summary Statistics for TPC

Mau xu ly	Coun t	Avera ge	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimu m	Maximu m	Rang e	Std. skewness	Mau xu ly	Std. kurtosis
M1	3	3.41	0.03	0.879765%	3.38	3.44	0.06	0.0	M1	
M2	3	3.17	0.01	0.315457%	3.16	3.18	0.02	0.0	M2	
M3	3	2.08	0.02	0.961538%	2.06	2.1	0.04	0.0	M3	
M4	3	2.48	0.01	0.403226%	2.47	2.49	0.02	0.0	M4	
M5	3	4.69	0.02	0.426439%	4.67	4.71	0.04	0.0	M5	
Mo	3	1.19	0.02	1.68067%	1.17	1.21	0.04	0.0	Mo	
Total	18	2.83667	1.13403	39.9775%	1.17	4.71	3.54	0.388675	Total	-0.54405

ANOVA Table for TPC by Mau xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	21.8578	5	4.37156	11404.07	0.0000
Within groups	0.0046	12	0.000383333		
Total (Corr.)	21.8624	17			

Multiple Range Tests for TPC by Mau xu ly

Method: 95.0 percent LSD

Mau xu ly	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	1.19	X
M3	3	2.08	X
M4	3	2.48	X
M2	3	3.17	X

M1	3	3.41	x
M5	3	4.69	x

TFC

Summary Statistics for TFC

Mau xu ly	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Mau xu ly	Std. kurtosis
M1	3	0.3	0.01	3.33333%	0.29	0.31	0.02	0.0	M1	
M2	3	0.29	0.01	3.44828%	0.28	0.3	0.02	0.0	M2	
M3	3	0.19	0.01	5.26316%	0.18	0.2	0.02	0.0	M3	
M4	3	0.21	0.01	4.7619%	0.2	0.22	0.02	0.0	M4	
M5	3	0.88	0.01	1.13636%	0.87	0.89	0.02	0.0	M5	
Mo	3	0.08	0.01	12.5%	0.07	0.09	0.02	0.0	Mo	
Total	18	0.325	0.266265	81.9277%	0.07	0.89	0.82	2.77256	Total	1.16747

ANOVA Table for TFC by Mau xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.20405	5	0.24081	2408.10	0.0000
Within groups	0.0012	12	0.0001		
Total (Corr.)	1.20525	17			

Multiple Range Tests for TFC by Mau xu ly

Method: 95.0 percent LSD

Mau xu ly	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.08	x
M3	3	0.19	x
M4	3	0.21	x
M2	3	0.29	x
M1	3	0.3	x
M5	3	0.88	x

TTC

Summary Statistics for TTC

Mau xu ly	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Mau xu ly	Std. kurtosis
M1	3	0.66	0.02	3.0303%	0.64	0.68	0.04	0.0	M1	
M2	3	0.66	0.02	3.0303%	0.64	0.68	0.04	0.0	M2	
M3	3	0.34	0.01	2.94118%	0.33	0.35	0.02	0.0	M3	
M4	3	0.88	0.02	2.27273%	0.86	0.9	0.04	0.0	M4	
M5	3	1.28	0.01	0.78125%	1.27	1.29	0.02	0.0	M5	
Mo	3	0.17	0.02	11.7647%	0.15	0.19	0.04	0.0	Mo	
Total	18	0.665	0.370139	55.66%	0.15	1.29	1.14	0.588295	Total	-0.610216

ANOVA Table for TTC by Mau xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.32545	5	0.46509	1550.30	0.0000
Within groups	0.0036	12	0.0003		
Total (Corr.)	2.32905	17			

Multiple Range Tests for TTC by Mau xu ly

Method: 95.0 percent LSD

Mau xu ly	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.17	x
M3	3	0.34	x
M1	3	0.66	x
M2	3	0.66	x

M4	3	0.88	x
M5	3	1.28	x

RSA

Summary Statistics for RSA

Mau xu ly	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Mau xu ly	Std. kurtosis
M1	3	2.43	0.02	0.823045%	2.41	2.45	0.04	0.0	M1	
M2	3	2.21	0.02	0.904977%	2.19	2.23	0.04	0.0	M2	
M3	3	1.34	0.01	0.746269%	1.33	1.35	0.02	0.0	M3	
M4	3	2.15	0.02	0.930233%	2.13	2.17	0.04	0.0	M4	
M5	3	3.48	0.01	0.287356%	3.47	3.49	0.02	0.0	M5	
Mo	3	0.4	0.2	50.0%	0.2	0.6	0.4	0.0	Mo	
Total	18	2.00167	0.982052	49.0617%	0.2	3.49	3.29	-0.43716	Total	-0.319304

ANOVA Table for RSA by Mau xu ly

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16.3125	5	3.26249	472.82	0.0000
Within groups	0.0828	12	0.0069		
Total (Corr.)	16.3953	17			

Multiple Range Tests for RSA by Mau xu ly

Method: 95.0 percent LSD

Mau xu ly	Count	Mean	Homogeneous Groups
Mo	3	0.4	x
M3	3	1.34	x
M4	3	2.15	x
M2	3	2.21	x
M1	3	2.43	x
M5	3	3.48	x

PLF3. Nghiên cứu điều kiện trích ly

Ảnh hưởng dung môi

Summary Statistics for TPC

Dung moiTNI	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
acetone	3	6.7	0.3	4.47761%	6.4	7.0	0.6	0.0
ethanol	3	7.34	0.23	3.13351%	7.11	7.57	0.46	0.0
methanol	3	7.23	0.14	1.93638%	7.09	7.37	0.28	0.0
nuoc	3	4.45	0.21	4.7191%	4.24	4.66	0.42	0.0
Total	12	6.43	1.23573	19.2182%	4.24	7.57	3.33	-1.58828

ANOVA Table for TPC by Dung moiTNI

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	16.3842	3	5.4614	105.74	0.0000
Within groups	0.4132	8	0.05165		
Total (Corr.)	16.7974	11			

MultiPLF Range Tests for TPC by Dung moiTNI

Method: 95.0 percent LSD

Dung moiTNI	Count	Mean	Homogeneous Groups
nuoc	3	4.45	x
acetone	3	6.7	x

methanol	3	7.23	X
ethanol	3	7.34	X

Summary Statistics for TFC

Dung moi TN2	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
aceton	3	1.34	0.02	1.49254%	1.32	1.36	0.04	0.0
ethanol	3	1.48	0.01	0.675676%	1.47	1.49	0.02	0.0
methanol	3	1.42	0.04	2.8169%	1.38	1.46	0.08	0.0
nuoc	3	0.93	0.02	2.15054%	0.91	0.95	0.04	0.0
Total	12	1.2925	0.225676	17.4604%	0.91	1.49	0.58	-1.55718

ANOVA Table for TFC by Dung moi TN2

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.555225	3	0.185075	296.12	0.0000
Within groups	0.005	8	0.000625		
Total (Corr.)	0.560225	11			

MultiPLF Range Tests for TFC by Dung moi TN2

Method: 95.0 percent LSD

Dung moi TN2	Count	Mean	Homogeneous Groups
nuoc	3	0.93	X
aceton	3	1.34	X
methanol	3	1.42	X
ethanol	3	1.48	X

Summary Statistics for TTC

Dung moi TN3	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
aceton	3	1.75	0.01	0.571429%	1.74	1.76	0.02	0.0
ethanol	3	2.13	0.04	1.87793%	2.09	2.17	0.08	0.0
methanol	3	2.1	0.03	1.42857%	2.07	2.13	0.06	0.0
nuoc	3	0.78	0.02	2.5641%	0.76	0.8	0.04	0.0
Total	12	1.69	0.57098	33.7858%	0.76	2.17	1.41	-1.48639

ANOVA Table for TTC by Dung moi TN3

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3.5802	3	1.1934	1591.20	0.0000
Within groups	0.006	8	0.00075		
Total (Corr.)	3.5862	11			

MultiPLF Range Tests for TTC by Dung moi TN3

Method: 95.0 percent LSD

Dung moi TN3	Count	Mean	Homogeneous Groups
nuoc	3	0.78	X
aceton	3	1.75	X
methanol	3	2.1	X
ethanol	3	2.13	X

Summary Statistics for TPcC

Dung moi TN4	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
aceton	3	19.34	1.12	5.79111%	18.22	20.46	2.24	0.0
ethanol	3	28.71	1.62	5.64263%	27.09	30.33	3.24	0.0
methanol	3	26.17	1.78	6.80168%	24.39	27.95	3.56	0.0
nuoc	3	61.74	2.13	3.44995%	59.61	63.87	4.26	0.0
Total	12	33.99	17.1738	50.5259%	18.22	63.87	45.65	1.62076

ANOVA Table for TPcC by Dung moi TN4

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	3221.15	3	1073.72	370.76	0.0000
Within groups	23.1682	8	2.89602		
Total (Corr.)	3244.32	11			

MultiPLF Range Tests for TPcC by Dung moi TN4

Method: 95.0 percent LSD

Dung moi TN4	Count	Mean	Homogeneous Groups
aceton	3	19.34	X
methanol	3	26.17	X
ethanol	3	28.71	X
nuoc	3	61.74	X

Summary Statistics for RSA

Dung moi TN5	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
aceton	3	4.01	0.07	1.74564%	3.94	4.08	0.14	0.0
ethanol	3	5.83	0.11	1.88679%	5.72	5.94	0.22	0.0
methanol	3	5.62	0.12	2.13523%	5.5	5.74	0.24	0.0
nuoc	3	2.12	0.05	2.35849%	2.07	2.17	0.1	0.0
Total	12	4.395	1.55852	35.4613%	2.07	5.94	3.87	-0.853806

ANOVA Table for RSA by Dung moi TN5

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	26.6511	3	8.8837	1048.22	0.0000
Within groups	0.0678	8	0.008475		
Total (Corr.)	26.7189	11			

MultiPLF Range Tests for RSA by Dung moi TN5

Method: 95.0 percent LSD

Dung moi TN5	Count	Mean	Homogeneous Groups
nuoc	3	2.12	X
aceton	3	4.01	X
methanol	3	5.62	X
ethanol	3	5.83	X

PLF4. Xác định thành phần tổng của nguyên liệu

Summary Statistics for data

Chi tiêu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
TFC	3	1.49	0.02	1.34228%	1.47	1.51	0.04	0.0
TPC	3	8.25	0.03	0.363636%	8.22	8.28	0.06	0.0
TPcC	3	78.73	3.12	3.96291%	75.61	81.85	6.24	0.0
TTC	3	2.13	0.21	9.85915%	1.92	2.34	0.42	0.0
Total	12	22.65	33.9558	149.915%	1.47	81.85	80.38	1.84844

PLF5. Tối ưu hóa trong công đoạn trích ly

PLF5.1. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Summary Statistics for Xu ly trích ly mot yeu to.TPC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
30	3	4.54883	0.0164746	0.362173%	4.5351	4.5671	0.032	0.809289
40	3	4.8537	0.0415495	0.856037%	4.8061	4.8827	0.0766	-1.13899
50	3	4.5397	0.022795	0.502125%	4.5213	4.5652	0.0439	0.894948
60	3	4.34867	0.0289139	0.664891%	4.3234	4.3802	0.0568	0.657252
Total	12	4.57272	0.190487	4.16572%	4.3234	4.8827	0.5593	0.764455

ANOVA Table for Xu ly trich ly mot yeu to.TPC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.392432	3	0.130811	156.03	0.0000
Within groups	0.00670679	8	0.000838349		
Total (Corr.)	0.399138	11			

MultiPLF Range Tests for Xu ly trich ly mot yeu to.TPC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	3	4.34867	X
50	3	4.5397	X
30	3	4.54883	X
40	3	4.8537	X

Summary Statistics for Xu ly trich ly mot yeu to.TFC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
30	3	0.6427	0.026004	4.04606%	0.6231	0.6722	0.0491	1.03583
40	3	0.9448	0.0438213	4.63816%	0.9083	0.9934	0.0851	0.811624
50	3	0.8575	0.0255094	2.97486%	0.8324	0.8834	0.051	0.0996919
60	3	0.62	0.0161703	2.60812%	0.6024	0.6342	0.0318	-0.639469
Total	12	0.76625	0.146969	19.1803%	0.6024	0.9934	0.391	0.295339

ANOVA Table for Xu ly trich ly mot yeu to.TFC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.230581	3	0.0768603	87.62	0.0000
Within groups	0.00701746	8	0.000877182		
Total (Corr.)	0.237598	11			

MultiPLF Range Tests for Xu ly trich ly mot yeu to.TFC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
60	3	0.62	X
30	3	0.6427	X
50	3	0.8575	X
40	3	0.9448	X

Summary Statistics for Xu ly trich ly mot yeu to.TTC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
30	3	1.3339	0.0413307	3.09849%	1.3028	1.3808	0.078	1.03865
40	3	1.53907	0.0322708	2.09678%	1.5023	1.5627	0.0604	-1.0805
50	3	1.64953	0.0205456	1.24554%	1.6329	1.6725	0.0396	0.887663
60	3	1.71537	0.00727622	0.424179%	1.7098	1.7236	0.0138	1.00953
Total	12	1.55947	0.153027	9.81277%	1.3028	1.7236	0.4208	-0.99091

ANOVA Table for Xu ly trich ly mot yeu to.TTC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.25114	3	0.0837133	103.84	0.0000
Within groups	0.0064494	8	0.000806175		
Total (Corr.)	0.257589	11			

MultiPLF Range Tests for Xu ly trich ly mot yeu to.TTC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiệt độ	Count	Mean	Homogeneous Groups
30	3	1.3339	X
40	3	1.53907	X
50	3	1.64953	X
60	3	1.71537	X

PLF5.2. Ảnh hưởng tỷ lệ dung môi-nguyên liệu đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Summary Statistics for Ty le dung moi nguyen lieu.TPC

Ty le dung moi voi nguyen lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
30:01	3	4.0376	0.0109777	0.271887%	4.0262	4.0481	0.0219
40:01	3	4.8537	0.0415495	0.856037%	4.8061	4.8827	0.0766
50:01	3	5.26307	0.0240504	0.456966%	5.2391	5.2872	0.0481
60:01	3	5.4438	0.0267445	0.491284%	5.4207	5.4731	0.0524
70:01	3	5.4747	0.0146666	0.267898%	5.4578	5.4841	0.0263
Total	15	5.01457	0.555549	11.0787%	4.0262	5.4841	1.4579

ANOVA Table for Ty le dung moi nguyen lieu.TPC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	4.31417	4	1.07854	1607.04	0.0000
Within groups	0.00671135	10	0.000671135		
Total (Corr.)	4.32089	14			

MultiPLF Range Tests for Ty le dung moi nguyen lieu.TPC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
30:01	3	4.0376	X
40:01	3	4.8537	X
50:01	3	5.26307	X
60:01	3	5.4438	X
70:01	3	5.4747	X

Summary Statistics for Ty le dung moi nguyen lieu.TFC

Ty le dung moi voi nguyen lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
30:01	3	0.5276	0.0247364	4.68848%	0.5048	0.5539	0.0491
40:01	3	0.924	0.0113212	1.22524%	0.9112	0.9327	0.0215
50:01	3	1.08397	0.00176163	0.162517%	1.0821	1.0856	0.0035
60:01	3	1.08527	0.00291947	0.26901%	1.0819	1.0871	0.0052
70:01	3	1.09067	0.000404145	0.0370549%	1.0903	1.0911	0.0008
Total	15	0.9423	0.224563	23.8314%	0.5048	1.0911	0.5863

ANOVA Table for Ty le dung moi nguyen lieu.TFC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.704498	4	0.176124	1171.27	0.0000
Within groups	0.0015037	10	0.00015037		
Total (Corr.)	0.706001	14			

MultiPLF Range Tests for Ty le dung moi nguyen lieu.TFC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
30:01	3	0.5276	X
40:01	3	0.924	X
50:01	3	1.08397	X
60:01	3	1.08527	X
70:01	3	1.09067	X

Summary Statistics for Ty le dung moi nguyen lieu.TTC

Ty le dung moi voi nguyen lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
30:01	3	1.2286	0.0177305	1.44315%	1.2082	1.2403	0.0321
40:01	3	1.5363	0.0242378	1.57767%	1.5102	1.5581	0.0479
50:01	3	1.69153	0.00802268	0.474284%	1.6823	1.6968	0.0145
60:01	3	1.68537	0.00727622	0.431729%	1.6798	1.6936	0.0138
70:01	3	1.68897	0.0101746	0.602418%	1.678	1.6981	0.0201
Total	15	1.56615	0.185509	11.8449%	1.2082	1.6981	0.4899

ANOVA Table for Ty le dung moi nguyen lieu.TTC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.479546	4	0.119886	533.93	0.0000
Within groups	0.00224534	10	0.000224534		
Total (Corr.)	0.481791	14			

MultiPLF Range Tests for Ty le dung moi nguyen lieu.TTC by Ty le dung moi voi nguyen lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
30:01	3	1.2286	X
40:01	3	1.5363	X
60:01	3	1.68537	X
70:01	3	1.68897	X
50:01	3	1.69153	X

PLF5.3. Ảnh hưởng thời gian trích ly đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Summary Statistics for Anh huong thoi gian.TPC

Thoi gian	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
2	3	3.2513	0.0169921	0.522623%	3.2382	3.2705	0.0323	0.995089
4	3	5.24763	0.0147842	0.281731%	5.2361	5.2643	0.0282	0.971639
6	3	6.2782	0.00848587	0.135164%	6.2693	6.2862	0.0169	-0.33368
8	3	6.88323	0.00480139	0.0697548%	6.8791	6.8885	0.0094	0.709236
10	3	6.90827	0.068018	0.984588%	6.8502	6.9831	0.1329	0.736708
Total	15	5.71373	1.41907	24.8362%	3.2382	6.9831	3.7449	-1.57853

ANOVA Table for Anh huong thoi gian.TPC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	28.1823	4	7.04557	6737.26	0.0000
Within groups	0.0104576	10	0.00104576		
Total (Corr.)	28.1927	14			

MultiPLF Range Tests for Anh huong thoi gian.TPC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	3	3.2513	X
4	3	5.24763	X
6	3	6.2782	X
8	3	6.88323	X
10	3	6.90827	X

Summary Statistics for Anh huong thoi gian.TFC

Thoi gian	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
2	3	0.454267	0.000472582	0.104032%	0.4539	0.4548	0.0009	0.982621
4	3	1.08147	0.00170098	0.157285%	1.0802	1.0834	0.0032	1.05555

6	3	1.08397	0.00176163	0.162517%	1.0821	1.0856	0.0035	-0.41407
8	3	1.1057	0.00226053	0.204443%	1.1031	1.1072	0.0041	-1.18174
10	3	1.10843	0.000776745	0.070076%	1.1078	1.1093	0.0015	0.869606
Total	15	0.966767	0.265489	27.4616%	0.4539	1.1093	0.6554	-2.6316

ANOVA Table for Anh huong thoi gian.TFC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.98676	4	0.24669	103361.76	0.0000
Within groups	0.0000238667	10	0.00000238667		
Total (Corr.)	0.986784	14			

MultiPLF Range Tests for Anh huong thoi gian.TFC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	3	0.454267	X
4	3	1.08147	X
6	3	1.08397	X
8	3	1.1057	X
10	3	1.10843	X

Summary Statistics for Anh huong thoi gian.TTC

Thoi gian	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
2	3	1.04717	0.00200333	0.19131%	1.0451	1.0491	0.004	-0.210841
4	3	1.69127	0.00263122	0.155577%	1.6889	1.6941	0.0052	0.546596
6	3	1.7382	0.00360971	0.207669%	1.7355	1.7423	0.0068	1.04847
8	3	1.8687	0.00962341	0.514979%	1.8627	1.8798	0.0171	1.2127
10	3	1.87187	0.00606987	0.324268%	1.8661	1.8782	0.0121	0.294472
Total	15	1.64344	0.317298	19.307%	1.0451	1.8798	0.8347	-2.29624

ANOVA Table for Anh huong thoi gian.TTC by Thoi gian

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.40919	4	0.352297	11481.46	0.0000
Within groups	0.00030684	10	0.000030684		
Total (Corr.)	1.4095	14			

MultiPLF Range Tests for Anh huong thoi gian.TTC by Thoi gian

Method: 95.0 percent LSD

Thoi gian	Count	Mean	Homogeneous Groups
2	3	1.04717	X
4	3	1.69127	X
6	3	1.7382	X
8	3	1.8687	X
10	3	1.87187	X

PLF5.4. Ảnh hưởng nồng độ dung môi trích ly đến hàm lượng TPC, TFC, TTC

Summary Statistics for Anh huong nong do toi uu hoa t.TPC

Nong do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
50	3	2.74193	0.025832	0.94211%	2.7216	2.771	0.0494	0.95281
60	3	4.35763	0.0129817	0.297906%	4.347	4.3721	0.0251	0.857673
70	3	6.88407	0.00941134	0.136712%	6.8756	6.8942	0.0186	0.545829
80	3	7.64823	0.0127222	0.166341%	7.6351	7.6605	0.0254	-0.215759
90	3	7.6517	0.0246055	0.321569%	7.6238	7.6703	0.0465	-1.03086
Total	15	5.85671	2.04086	34.8465%	2.7216	7.6703	4.9487	-0.964517

ANOVA Table for Anh huong nong do toi uu hoa t.TPC by Nong do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	58.3082	4	14.5771	43084.72	0.0000
Within groups	0.00338335	10	0.000338335		

Total (Corr.)	58.3116	14		
---------------	---------	----	--	--

MultiPLF Range Tests for Anh huong nong do toi uu hoa t.TPC by Nong do

Method: 95.0 percent LSD

Nong do	Count	Mean	Homogeneous Groups
50	3	2.74193	X
60	3	4.35763	X
70	3	6.88407	X
80	3	7.64823	X
90	3	7.6517	X

Summary Statistics for Anh huong nong do toi uu hoa t.TFC

Nong do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
50	3	0.254267	0.000472582	0.185861%	0.2539	0.2548	0.0009	0.982621
60	3	0.8848	0.0108282	1.2238%	0.8723	0.8913	0.019	-1.22181
70	3	1.10463	0.00104083	0.0942243%	1.1038	1.1058	0.002	0.914531
80	3	1.2154	0.00790759	0.650616%	1.2073	1.2231	0.0158	-0.160546
90	3	1.2225	0.00672904	0.550433%	1.2173	1.2301	0.0128	0.990526
Total	15	0.93632	0.374962	40.0463%	0.2539	1.2301	0.9762	-1.98321

ANOVA Table for Anh huong nong do toi uu hoa t.TFC by Nong do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.9679	4	0.491974	10866.75	0.0000
Within groups	0.000452733	10	0.0000452733		
Total (Corr.)	1.96835	14			

MultiPLF Range Tests for Anh huong nong do toi uu hoa t.TFC by Nong do

Method: 95.0 percent LSD

Nong do	Count	Mean	Homogeneous Groups
50	3	0.254267	X
60	3	0.8848	X
70	3	1.10463	X
80	3	1.2154	X
90	3	1.2225	X

Summary Statistics for Anh huong nong do toi uu hoa t.TTC

Nong do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
50	3	1.02717	0.00200333	0.195035%	1.0251	1.0291	0.004	-0.210841
60	3	1.69127	0.00263122	0.155577%	1.6889	1.6941	0.0052	0.546596
70	3	1.87647	0.00550848	0.293556%	1.8703	1.8809	0.0106	-0.902123
80	3	1.9283	0.00602246	0.31232%	1.9241	1.9352	0.0111	1.13983
90	3	1.92223	0.00924626	0.481017%	1.9125	1.9309	0.0184	-0.362194
Total	15	1.68909	0.354041	20.9605%	1.0251	1.9352	0.9101	-2.26411

ANOVA Table for Anh huong nong do toi uu hoa t.TTC by Nong do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.7545	4	0.438626	13451.21	0.0000
Within groups	0.000326087	10	0.0000326087		
Total (Corr.)	1.75483	14			

MultiPLF Range Tests for Anh huong nong do toi uu hoa t.TTC by Nong do

Method: 95.0 percent LSD

Nong do	Count	Mean	Homogeneous Groups
50	3	1.02717	X
60	3	1.69127	X
70	3	1.87647	X
90	3	1.92223	X

80	3	1.9283	x
----	---	--------	---

PLF5.5. Phương pháp đáp ứng bề mặt

Response TPC Summary of Fit

RSquare	0.915881
RSquare Adj	0.817742
Root Mean Square Error	0.442784
Mean of Response	6.693481
Observations (or Sum Wgts)	27

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	14	25.615858	1.82970	9.3325
Error	12	2.352691	0.19606	Prob > F
C. Total	26	27.968549		0.0002*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	10	1.5856863	0.158569	0.4135
Pure Error	2	0.7670047	0.383502	Prob > F
Total Error	12	2.3526910		0.8609
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	7.7906667	0.255641	30.47	<.0001*
Nhiệt độ(30,50)	0.8165	0.127821	6.39	<.0001*
Tỷ lệ Dm:nl(40,60)	0.292	0.127821	2.28	0.0413*
Thời gian(6,10)	0.4375	0.127821	3.42	0.0051*
Nồng độ(70,90)	0.314	0.127821	2.46	0.0302*
Nhiệt độ*Tỷ lệ Dm:nl	0.119	0.221392	0.54	0.6007
Nhiệt độ*Thời gian	0.323	0.221392	1.46	0.1703
Tỷ lệ Dm:nl*Thời gian	0.323	0.221392	1.46	0.1703
Nhiệt độ*Nồng độ	0.3695	0.221392	1.67	0.1210
Tỷ lệ Dm:nl*Nồng độ	0.6465	0.221392	2.92	0.0128*
Thời gian*Nồng độ	0.117	0.221392	0.53	0.6068
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-1.350417	0.191731	-7.04	<.0001*
Tỷ lệ Dm:nl*Tỷ lệ Dm:nl	-0.300917	0.191731	-1.57	0.1425
Thời gian*Thời gian	-0.483167	0.191731	-2.52	0.0269*
Nồng độ*Nồng độ	-0.334167	0.191731	-1.74	0.1069

Response TFC Summary of Fit

RSquare	0.932123
RSquare Adj	0.852933
Root Mean Square Error	0.073114
Mean of Response	0.960444
Observations (or Sum Wgts)	27

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	14	0.88090542	0.062922	11.7708
Error	12	0.06414725	0.005346	Prob > F
C. Total	26	0.94505267		<.0001*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	10	0.05888525	0.005889	2.2381
Pure Error	2	0.00526200	0.002631	Prob > F
Total Error	12	0.06414725		0.3482
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1.329	0.042212	31.48	<.0001*
Nhiệt độ(30,50)	0.1285	0.021106	6.09	<.0001*
Tỷ lệ Dm:nl(40,60)	0.0701667	0.021106	3.32	0.0061*
Thời gian(6,10)	0.0799167	0.021106	3.79	0.0026*
Nồng độ(70,90)	0.0245833	0.021106	1.16	0.2668
Nhiệt độ*Tỷ lệ Dm:nl	0.024	0.036557	0.66	0.5239
Nhiệt độ*Thời gian	0.0015	0.036557	0.04	0.9679
Tỷ lệ Dm:nl*Thời gian	0.0755	0.036557	2.07	0.0612
Nhiệt độ*Nồng độ	0.062	0.036557	1.70	0.1157
Tỷ lệ Dm:nl*Nồng độ	0.065	0.036557	1.78	0.1007
Thời gian*Nồng độ	-0.01075	0.036557	-0.29	0.7737
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-0.242625	0.031659	-7.66	<.0001*
Tỷ lệ Dm:nl*Tỷ lệ Dm:nl	-0.213875	0.031659	-6.76	<.0001*
Thời gian*Thời gian	-0.206	0.031659	-6.51	<.0001*
Nồng độ*Nồng độ	-0.16675	0.031659	-5.27	0.0002*

Response TTC

Summary of Fit

RSquare	0.856141
RSquare Adj	0.688305
Root Mean Square Error	0.165622
Mean of Response	1.682852
Observations (or Sum Wgts)	27

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	14	1.9589623	0.139926	5.1011
Error	12	0.3291691	0.027431	Prob > F
C. Total	26	2.2881314		0.0037*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	10	0.32074508	0.032075	7.6150
Pure Error	2	0.00842400	0.004212	Prob > F
Total Error	12	0.32916908		0.1216
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	2.06	0.095622	21.54	<.0001*
Nhiệt độ(30,50)	0.0265833	0.047811	0.56	0.5884
Tỷ lệ Dm:nl(40,60)	0.1036667	0.047811	2.17	0.0510
Thời gian(6,10)	-0.0435	0.047811	-0.91	0.3808
Nồng độ(70,90)	-0.063917	0.047811	-1.34	0.2061
Nhiệt độ*Tỷ lệ Dm:nl	-0.20925	0.082811	-2.53	0.0266*
Nhiệt độ*Thời gian	0.15475	0.082811	1.87	0.0863
Tỷ lệ Dm:nl*Thời gian	0.246	0.082811	2.97	0.0117*
Nhiệt độ*Nồng độ	-0.35575	0.082811	-4.30	0.0010*
Tỷ lệ Dm:nl*Nồng độ	0.05975	0.082811	0.72	0.4844
Thời gian*Nồng độ	-0.11125	0.082811	-1.34	0.2040
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-0.266083	0.071717	-3.71	0.0030*
Tỷ lệ Dm:nl*Tỷ lệ Dm:nl	-0.098708	0.071717	-1.38	0.1938
Thời gian*Thời gian	-0.295708	0.071717	-4.12	0.0014*
Nồng độ*Nồng độ	-0.188083	0.071717	-2.62	0.0223*

Response RSA

Summary of Fit

RSquare	0.841832
RSquare Adj	0.657302
Root Mean Square Error	0.378513
Mean of Response	3.701481
Observations (or Sum Wgts)	27

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	14	9.150572	0.653612	4.5620
Error	12	1.719261	0.143272	Prob > F
C. Total	26	10.869833		0.0061*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	10	1.1914226	0.119142	0.4514
Pure Error	2	0.5278380	0.263919	Prob > F
Total Error	12	1.7192606		0.8402
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	4.582	0.218534	20.97	<.0001*
Nhiệt độ(30,50)	0.3575833	0.109267	3.27	0.0067*
Tỷ lệ Dm:nl(40,60)	0.1668333	0.109267	1.53	0.1527
Thời gian(6,10)	0.2823333	0.109267	2.58	0.0239*
Nồng độ(70,90)	0.13475	0.109267	1.23	0.2411
Nhiệt độ*Tỷ lệ Dm:nl	-0.03375	0.189256	-0.18	0.8614
Nhiệt độ*Thời gian	0.08125	0.189256	0.43	0.6753
Tỷ lệ Dm:nl*Thời gian	0.05225	0.189256	0.28	0.7872
Nhiệt độ*Nồng độ	0.29675	0.189256	1.57	0.1429
Tỷ lệ Dm:nl*Nồng độ	0.709	0.189256	3.75	0.0028*
Thời gian*Nồng độ	0.0675	0.189256	0.36	0.7275
Nhiệt độ*Nhiệt độ	-0.797042	0.163901	-4.86	0.0004*
Tỷ lệ Dm:nl*Tỷ lệ Dm:nl	-0.323667	0.163901	-1.97	0.0718
Thời gian*Thời gian	-0.382667	0.163901	-2.33	0.0377*
Nồng độ*Nồng độ	-0.477792	0.163901	-2.92	0.0130*

PLF6. Nghiên cứu ứng dụng sấy phun dịch chiết ethanol tạo sản phẩm bột hòa tan.

PLF6.1. Ảnh hưởng nhiệt độ đến hiệu suất, độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột sấy phun

One-Way ANOVA - Hiệu suất by Nhiệt độ

Dependent variable: Hiệu suất

Factor: Nhiệt độ

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Hiệu suất

Nhiệt độ	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	26.5033	1.45548	5.4917%	25.07	27.98	2.91	0.0946514
130	3	31.05	1.72549	5.55712%	29.09	32.34	3.25	-1.04926
140	3	43.8033	1.69954	3.87993%	42.48	45.72	3.24	0.97548
150	3	50.7833	1.3202	2.59968%	49.45	52.09	2.64	-0.0642464
160	3	53.7867	1.33167	2.47583%	52.92	55.32	2.4	1.19374
170	3	54.0833	1.12767	2.08505%	52.84	55.04	2.2	-0.756624
Total	18	43.335	11.2971	26.0692%	25.07	55.32	30.25	-0.924616

ANOVA Table for Hiệu suất by Nhiệt độ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2144.06	5	428.812	201.45	0.0000
Within groups	25.5441	12	2.12868		

Total (Corr.)	2169.61	17			
---------------	---------	----	--	--	--

MultiPLF Range Tests for Hieu suat by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
120	3	26.5033	X
130	3	31.05	X
140	3	43.8033	X
150	3	50.7833	X
160	3	53.7867	X
170	3	54.0833	X

One-Way ANOVA - Do am by Nhiet do

Dependent variable: Do am

Factor: Nhiet do

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do am

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	4.13333	0.100664	2.43543%	4.04	4.24	0.2	0.41407
130	3	3.62333	0.232881	6.42725%	3.46	3.89	0.43	1.13392
140	3	3.14667	0.0737111	2.34252%	3.09	3.23	0.14	1.00049
150	3	2.85667	0.120554	4.2201%	2.73	2.97	0.24	-0.347623
160	3	2.57667	0.0960902	3.72925%	2.49	2.68	0.19	0.535305
170	3	2.39333	0.0750555	3.13603%	2.32	2.47	0.15	0.141038
Total	18	3.12167	0.62867	20.1389%	2.32	4.24	1.92	0.897878

ANOVA Table for Do am by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.52045	5	1.30409	78.88	0.0000
Within groups	0.1984	12	0.0165333		
Total (Corr.)	6.71885	17			

MultiPLF Range Tests for Do am by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
170	3	2.39333	X
160	3	2.57667	X
150	3	2.85667	X
140	3	3.14667	X
130	3	3.62333	X
120	3	4.13333	X

One-Way ANOVA - Do giam RSA by Nhiet do

Dependent variable: Do giam RSA

Factor: Nhiet do

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam RSA

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	7.69	0.0791644	1.02945%	7.637	7.781	0.144	1.17546
130	3	7.884	0.0347707	0.441028%	7.852	7.921	0.069	0.448105
140	3	7.91233	0.0728309	0.920473%	7.834	7.978	0.144	-0.536667
150	3	8.171	0.0420357	0.51445%	8.137	8.218	0.081	0.889944

160	3	8.774	0.137328	1.56517%	8.649	8.921	0.272	0.496672
170	3	9.275	0.0545252	0.587873%	9.231	9.336	0.105	0.895646
Total	18	8.28439	0.580594	7.00829%	7.637	9.336	1.699	1.3608

ANOVA Table for Do giam RSA by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.65776	5	1.13155	186.63	0.0000
Within groups	0.0727587	12	0.00606322		
Total (Corr.)	5.73052	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam RSA by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
120	3	7.69	X
130	3	7.884	X
140	3	7.91233	X
150	3	8.171	X
160	3	8.774	X
170	3	9.275	X

One-Way ANOVA - Do giam TFC by Nhiet do

Dependent variable: Do giam TFC

Factor: Nhiet do

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TFC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	1.77967	0.0410528	2.30677%	1.745	1.825	0.08	0.770952
130	3	1.82967	0.020108	1.099%	1.813	1.852	0.039	0.825502
140	3	1.95	0.0469361	2.40698%	1.896	1.981	0.085	-1.18484
150	3	2.04067	0.030271	1.48339%	2.013	2.073	0.06	0.478885
160	3	2.14767	0.0218251	1.01622%	2.124	2.167	0.043	-0.606872
170	3	2.39033	0.0295014	1.2342%	2.369	2.424	0.055	1.09776
Total	18	2.023	0.212994	10.5286%	1.745	2.424	0.679	1.03091

ANOVA Table for Do giam TFC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.758117	5	0.151623	138.77	0.0000
Within groups	0.0131113	12	0.00109261		
Total (Corr.)	0.771228	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TFC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
120	3	1.77967	X
130	3	1.82967	X
140	3	1.95	X
150	3	2.04067	X
160	3	2.14767	X
170	3	2.39033	X

One-Way ANOVA - Do giam TPC by Nhiet do

Dependent variable: Do giam TPC
 Factor: Nhiet do

Number of observations: 18
Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TPC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	3.32467	0.0832126	2.50288%	3.232	3.393	0.161	-0.850919
130	3	3.552	0.0953939	2.68564%	3.462	3.652	0.19	0.329897
140	3	3.59133	0.0332916	0.926999%	3.563	3.628	0.065	0.746586
150	3	3.802	0.0777882	2.04598%	3.747	3.891	0.144	1.12509
160	3	3.89667	0.0726659	1.86482%	3.827	3.972	0.145	0.24663
170	3	4.33133	0.0142945	0.330026%	4.319	4.347	0.028	0.701656
Total	18	3.74967	0.33252	8.868%	3.232	4.347	1.115	0.976324

ANOVA Table for Do giam TPC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1.82235	5	0.36447	76.28	0.0000
Within groups	0.0573367	12	0.00477806		
Total (Corr.)	1.87969	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TPC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiet do	Count	Mean	Homogeneous Groups
120	3	3.32467	X
130	3	3.552	X
140	3	3.59133	X
150	3	3.802	X
160	3	3.89667	X
170	3	4.33133	X

One-Way ANOVA - Do giam TTC by Nhiet do

Dependent variable: Do giam TTC
 Factor: Nhiet do

Number of observations: 18
Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TTC

Nhiet do	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
120	3	0.815667	0.00503322	0.617069%	0.811	0.821	0.01	0.41407
130	3	0.813333	0.00404145	0.4969%	0.809	0.817	0.008	-0.510608
140	3	0.819	0.002	0.2442%	0.817	0.821	0.004	0.0
150	3	0.845333	0.0113725	1.34533%	0.836	0.858	0.022	0.85253
160	3	0.856	0.00608276	0.710603%	0.852	0.863	0.011	1.18761
170	3	0.911667	0.0609617	6.68684%	0.874	0.982	0.108	1.21548
Total	18	0.8435	0.0413952	4.90755%	0.809	0.982	0.173	4.10835

ANOVA Table for Do giam TTC by Nhiet do

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.0212738	5	0.00425477	6.50	0.0038
Within groups	0.00785667	12	0.000654722		
Total (Corr.)	0.0291305	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TTC by Nhiet do

Method: 95.0 percent LSD

Nhiệt độ	Count	Mean	Homogeneous Groups
130	3	0.813333	X
120	3	0.815667	X
140	3	0.819	X
150	3	0.845333	X
160	3	0.856	X
170	3	0.911667	X

PLF6.2. Ảnh hưởng hàm lượng chất mang đến hiệu suất, độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột sẩy phun

One-Way ANOVA - Hiệu suất by Hàm lượng chất mang

Dependent variable: Hiệu suất (%)

Factor: Hàm lượng chất mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Hiệu suất

Hàm lượng chất mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	28.5133	1.46029	5.12141%	27.13	30.04	2.91
12	3	34.0633	2.98758	8.77066%	31.31	37.24	5.93
14	3	44.8833	1.54727	3.44731%	43.29	46.38	3.09
16	3	54.6333	4.5584	8.34363%	49.37	57.31	7.94
18	3	44.8467	10.2018	22.7482%	37.64	56.52	18.88
20	3	28.08	2.06036	7.33748%	25.89	29.98	4.09
Total	18	39.17	10.8056	27.5865%	25.89	57.31	31.42

ANOVA Table for Hiệu suất by Hàm lượng chất mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	1699.84	5	339.967	14.31	0.0001
Within groups	285.106	12	23.7589		
Total (Corr.)	1984.94	17			

Multiple Range Tests for Hiệu suất by Hàm lượng chất mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
20	3	28.08	X
10	3	28.5133	X
12	3	34.0633	X
18	3	44.8467	X
14	3	44.8833	X
16	3	54.6333	X

One-Way ANOVA - Độ ẩm by Hàm lượng chất mang

Dependent variable: Độ ẩm (%)

Factor: Hàm lượng chất mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Độ ẩm

Hàm lượng chất mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	3.64667	0.345591	9.47691%	3.29	3.98	0.69
12	3	3.44667	0.0750555	2.17763%	3.36	3.49	0.13
14	3	3.24	0.166433	5.13683%	3.12	3.43	0.31
16	3	3.41333	0.142945	4.18785%	3.29	3.57	0.28

18	3	4.55667	0.340196	7.4659%	4.21	4.89	0.68
20	3	4.62667	0.10504	2.27031%	4.52	4.73	0.21
Total	18	3.82167	0.603599	15.7941%	3.12	4.89	1.77

ANOVA Table for Do am by Ham luong chat mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.59372	5	1.11874	22.38	0.0000
Within groups	0.599933	12	0.0499944		
Total (Corr.)	6.19365	17			

MultiPLF Range Tests for Do am by Ham luong chat mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
14	3	3.24	X
16	3	3.41333	XX
12	3	3.44667	XX
10	3	3.64667	X
18	3	4.55667	X
20	3	4.62667	X

One-Way ANOVA - Do giam TPC by Ham luong chat mang

Dependent variable: Do giam TPC (%)

Factor: Ham luong chat mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TPC

Ham luong chat mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	5.993	0.588771	9.82431%	5.624	6.672	1.048
12	3	4.26067	0.318002	7.46367%	3.942	4.578	0.636
14	3	3.54833	0.0739617	2.08441%	3.463	3.594	0.131
16	3	3.55767	0.0264071	0.742258%	3.529	3.581	0.052
18	3	4.89567	0.560696	11.4529%	4.562	5.543	0.981
20	3	6.91033	0.615663	8.90931%	6.539	7.621	1.082
Total	18	4.86094	1.33038	27.3687%	3.463	7.621	4.158

ANOVA Table for Do giam TPC by Ham luong chat mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	27.7937	5	5.55874	29.07	0.0000
Within groups	2.29473	12	0.191228		
Total (Corr.)	30.0884	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TPC by Ham luong chat mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
14	3	3.54833	X
16	3	3.55767	X
12	3	4.26067	XX
18	3	4.89567	X
10	3	5.993	X
20	3	6.91033	X

One-Way ANOVA - Do giam TFC by Ham luong chat mang

Dependent variable: Do giam TFC (%)

Factor: Ham luong chat mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TFC

Ham luong chat mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	4.80333	0.142521	2.96713%	4.652	4.935	0.283
12	3	3.75567	0.298634	7.95156%	3.496	4.082	0.586
14	3	1.89867	0.0387857	2.04279%	1.871	1.943	0.072
16	3	1.803	0.058	3.21686%	1.745	1.861	0.116
18	3	3.36567	0.476324	14.1524%	2.874	3.825	0.951
20	3	4.552	0.598185	13.1411%	3.872	4.997	1.125
Total	18	3.36306	1.2381	36.8148%	1.745	4.997	3.252

ANOVA Table for Do giam TFC by Ham luong chat mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	24.661	5	4.93221	42.33	0.0000
Within groups	1.39814	12	0.116512		
Total (Corr.)	26.0592	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TFC by Ham luong chat mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
16	3	1.803	X
14	3	1.89867	X
18	3	3.36567	X
12	3	3.75567	X
20	3	4.552	X
10	3	4.80333	X

One-Way ANOVA - Do giam TTC by Ham luong chat mang

Dependent variable: Do giam TTC (%)

Factor: Ham luong chat mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TTC

Ham luong chat mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	2.911	0.0155242	0.533294%	2.895	2.926	0.031
12	3	2.46333	0.132198	5.36663%	2.324	2.587	0.263
14	3	1.65867	0.0852311	5.13853%	1.562	1.723	0.161
16	3	1.38867	0.0594082	4.27807%	1.322	1.436	0.114
18	3	2.856	0.00608276	0.212982%	2.852	2.863	0.011
20	3	2.885	0.00793725	0.275121%	2.879	2.894	0.015
Total	18	2.36044	0.635751	26.9335%	1.322	2.926	1.604

ANOVA Table for Do giam TTC by Ham luong chat mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	6.81383	5	1.36277	285.78	0.0000
Within groups	0.057222	12	0.0047685		
Total (Corr.)	6.87105	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TTC by Ham luong chat mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
16	3	1.38867	X
14	3	1.65867	X
12	3	2.46333	X

18	3	2.856	×
20	3	2.885	×
10	3	2.911	×

One-Way ANOVA - Do giam RSA by Ham luong chat mang

Dependent variable: Do giam RSA (%)

Factor: Ham luong chat mang (%)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam RSA

Ham luong chat mang	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range
10	3	10.5327	0.580509	5.51151%	9.863	10.893	1.03
12	3	9.13133	0.725463	7.94476%	8.552	9.945	1.393
14	3	7.89567	0.0612726	0.776028%	7.825	7.934	0.109
16	3	7.179	0.124012	1.72743%	7.092	7.321	0.229
18	3	8.74267	0.447362	5.11699%	8.471	9.259	0.788
20	3	8.98633	0.609401	6.78142%	8.283	9.357	1.074
Total	18	8.74461	1.15399	13.1966%	7.092	10.893	3.801

ANOVA Table for Do giam RSA by Ham luong chat mang

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	19.7309	5	3.94618	16.28	0.0001
Within groups	2.90784	12	0.24232		
Total (Corr.)	22.6388	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam RSA by Ham luong chat mang

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
16	3	7.179	×
14	3	7.89567	XX
18	3	8.74267	XX
20	3	8.98633	×
12	3	9.13133	×
10	3	10.5327	×

PLF6.3. Ảnh hưởng lưu lượng nạp liệu đến hiệu suất, độ ẩm, độ giảm (RSA, TFC, TPC, TTC) của bột sấy phun

One-Way ANOVA - Hieu suat by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Hieu suat

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Hieu suat

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	31.5967	1.8516	5.86012%	30.03	33.64	3.61	0.764865
15	3	35.76	1.72711	4.82972%	33.83	37.16	3.33	-0.884506
20	3	56.4667	1.04242	1.84608%	55.36	57.43	2.07	-0.429253
25	3	61.62	1.9803	3.21373%	59.98	63.82	3.84	0.82786
30	3	55.1567	0.837636	1.51865%	54.36	56.03	1.67	0.288799
35	3	33.5833	0.770541	2.29441%	32.75	34.27	1.52	-0.583723
Total	18	45.6972	12.6848	27.7584%	30.03	63.82	33.79	0.0948687

ANOVA Table for Hieu suat by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
--------	----------------	----	-------------	---------	---------

Between groups	2709.95	5	541.99	255.76	0.0000
Within groups	25.4299	12	2.11916		
Total (Corr.)	2735.38	17			

MultiPLF Range Tests for Hieu suat by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
10	3	31.5967	X
35	3	33.5833	XX
15	3	35.76	X
30	3	55.1567	X
20	3	56.4667	X
25	3	61.62	X

One-Way ANOVA - Do am by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Do am

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do am

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	3.64667	0.345591	9.47691%	3.29	3.98	0.69	-0.213859
15	3	3.44667	0.0750555	2.17763%	3.36	3.49	0.13	-1.22474
20	3	3.24	0.166433	5.13683%	3.12	3.43	0.31	1.10157
25	3	3.41333	0.142945	4.18785%	3.29	3.57	0.28	0.701656
30	3	4.55667	0.340196	7.4659%	4.21	4.89	0.68	-0.12452
35	3	4.62667	0.10504	2.27031%	4.52	4.73	0.21	-0.100875
Total	18	3.82167	0.603599	15.7941%	3.12	4.89	1.77	1.07333

ANOVA Table for Do am by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	5.59372	5	1.11874	22.38	0.0000
Within groups	0.599933	12	0.0499944		
Total (Corr.)	6.19365	17			

MultiPLF Range Tests for Do am by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
20	3	3.24	X
25	3	3.41333	XX
15	3	3.44667	XX
10	3	3.64667	X
30	3	4.55667	X
35	3	4.62667	X

One-Way ANOVA - Do giam RSA by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Do giam RSA

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam RSA

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	10.684	0.949504	8.88715%	9.733	11.632	1.899	-0.0100535

15	3	8.53767	0.0090185	0.105632%	8.529	8.547	0.018	0.233933
20	3	7.89567	0.0612726	0.776028%	7.825	7.934	0.109	-1.21155
25	3	7.16867	0.0808352	1.12762%	7.121	7.262	0.141	1.2239
30	3	8.46333	0.588609	6.95481%	8.123	9.143	1.02	1.22474
35	3	9.84233	0.653188	6.63651%	9.098	10.32	1.222	-1.08254
Total	18	8.76528	1.28886	14.7042%	7.121	11.632	4.511	1.23176

ANOVA Table for Do giam RSA by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	24.8697	5	4.97395	17.71	0.0000
Within groups	3.37008	12	0.28084		
Total (Corr.)	28.2398	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam RSA by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
25	3	7.16867	X
20	3	7.89567	XX
30	3	8.46333	X
15	3	8.53767	X
35	3	9.84233	X
10	3	10.684	X

One-Way ANOVA - Do giam TFC by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Do giam TFC

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TFC

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	3.68367	0.103886	2.82018%	3.575	3.782	0.207	-0.313373
15	3	2.94667	0.0181751	0.616801%	2.932	2.967	0.035	0.895646
20	3	1.89867	0.0387857	2.04279%	1.871	1.943	0.072	1.11485
25	3	1.79633	0.0531445	2.9585%	1.738	1.842	0.104	-0.715323
30	3	1.95467	0.10666	5.45668%	1.837	2.045	0.208	-0.761883
35	3	3.14133	0.562658	17.9114%	2.773	3.789	1.016	1.19036
Total	18	2.57022	0.770643	29.9835%	1.738	3.789	2.051	0.79051

ANOVA Table for Do giam TFC by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	9.40931	5	1.88186	32.88	0.0000
Within groups	0.686824	12	0.0572353		
Total (Corr.)	10.0961	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TFC by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
25	3	1.79633	X
20	3	1.89867	X
30	3	1.95467	X
15	3	2.94667	X
35	3	3.14133	X
10	3	3.68367	X

One-Way ANOVA - Do giam TPC by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Do giam TPC

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TPC

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	7.891	1.00456	12.7305%	6.893	8.902	2.009	0.041171
15	3	5.04733	0.571315	11.3191%	4.712	5.707	0.995	1.22423
20	3	3.61033	0.056359	1.56105%	3.546	3.651	0.105	-1.10058
25	3	3.54167	0.0467582	1.32023%	3.498	3.591	0.093	0.379963
30	3	4.87	0.548506	11.263%	4.535	5.503	0.968	1.21848
35	3	6.87067	0.585732	8.52512%	6.529	7.547	1.018	1.22455
Total	18	5.30517	1.71664	32.3579%	3.498	8.902	5.404	1.13821

ANOVA Table for Do giam TPC by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	46.1267	5	9.22534	27.89	0.0000
Within groups	3.9697	12	0.330809		
Total (Corr.)	50.0964	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TPC by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
25	3	3.54167	X
20	3	3.61033	X
30	3	4.87	X
15	3	5.04733	X
35	3	6.87067	X
10	3	7.891	X

One-Way ANOVA - Do giam TTC by Luu luong nap lieu

Dependent variable: Do giam TTC

Factor: Luu luong nap lieu (ml/phut)

Number of observations: 18

Number of levels: 6

Summary Statistics for Do giam TTC

Luu luong nap lieu	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness
10	3	3.759	0.0808764	2.15154%	3.674	3.835	0.161	-0.349709
15	3	2.61333	0.201535	7.7118%	2.414	2.817	0.403	0.0683862
20	3	1.922	0.10413	5.41778%	1.821	2.029	0.208	0.182738
25	3	1.38867	0.0594082	4.27807%	1.322	1.436	0.114	-0.925851
30	3	2.72267	0.157068	5.7689%	2.553	2.863	0.31	-0.573527
35	3	3.71167	0.149721	4.03379%	3.579	3.874	0.295	0.605744
Total	18	2.68622	0.895984	33.3548%	1.322	3.874	2.552	-0.137771

ANOVA Table for Do giam TTC by Luu luong nap lieu

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	13.4301	5	2.68603	148.38	0.0000
Within groups	0.217233	12	0.0181027		
Total (Corr.)	13.6474	17			

MultiPLF Range Tests for Do giam TTC by Luu luong nap lieu

Method: 95.0 percent LSD

Level	Count	Mean	Homogeneous Groups
-------	-------	------	--------------------

25	3	1.38867	X
20	3	1.922	X
15	3	2.61333	X
30	3	2.72267	X
35	3	3.71167	X
10	3	3.759	X

Response Hieu suat

Summary of Fit

RSquare	0.985997
RSquare Adj	0.960791
Root Mean Square Error	2.313292
Mean of Response	46.13133
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	1884.0022	209.334	39.1181
Error	5	26.7566	5.351	Prob > F
C. Total	14	1910.7588		0.0004*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	25.641325	8.54711	15.3275
Pure Error	2	1.115267	0.55763	Prob > F
Total Error	5	26.756592		0.0619
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	58.403333	1.33558	43.73	<.0001*
Nhiet do(130,160)	11.42875	0.817872	13.97	<.0001*
Ham luong chat mang(14,18)	-0.5575	0.817872	-0.68	0.5257
Luu luong nap lieu(15,30)	-2.79375	0.817872	-3.42	0.0189*
Nhiet do*Ham luong chat mang	1.2225	1.156646	1.06	0.3389
Nhiet do*Luu luong nap lieu	-3.875	1.156646	-3.35	0.0203*
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	-3.2925	1.156646	-2.85	0.0360*
Nhiet do*Nhiet do	-11.02917	1.203875	-9.16	0.0003*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	-3.981667	1.203875	-3.31	0.0213*
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	-7.999167	1.203875	-6.64	0.0012*

Response Do am

Summary of Fit

RSquare	0.994159
RSquare Adj	0.983647
Root Mean Square Error	0.077578
Mean of Response	3.222
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	5.1221483	0.569128	94.5656
Error	5	0.0300917	0.006018	Prob > F
C. Total	14	5.1522400		<.0001*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	0.00722500	0.002408	0.2106
Pure Error	2	0.02286667	0.011433	Prob > F
Total Error	5	0.03009167		0.8824
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	2.3466667	0.04479	52.39	<.0001*
Nhiet do(130,160)	-0.35125	0.027428	-12.81	<.0001*
Ham luong chat mang(14,18)	0.075	0.027428	2.73	0.0411*
Luu luong nap lieu(15,30)	0.33875	0.027428	12.35	<.0001*
Nhiet do*Ham luong chat mang	-0.05	0.038789	-1.29	0.2538
Nhiet do*Luu luong nap lieu	0.2125	0.038789	5.48	0.0028*
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	-0.1	0.038789	-2.58	0.0495*
Nhiet do*Nhiet do	0.4829167	0.040373	11.96	<.0001*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	0.5054167	0.040373	12.52	<.0001*
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	0.6529167	0.040373	16.17	<.0001*

Response RSA

Summary of Fit

RSquare	0.949921
RSquare Adj	0.859778
Root Mean Square Error	0.583425
Mean of Response	10.94667
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	32.282608	3.58696	10.5379
Error	5	1.701925	0.34039	Prob > F
C. Total	14	33.984533		0.0092*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	1.5433250	0.514442	6.4873
Pure Error	2	0.1586000	0.079300	Prob > F
Total Error	5	1.7019250		0.1365
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	9.64	0.336841	28.62	<.0001*
Nhiet do(130,160)	1.57375	0.206272	7.63	0.0006*
Ham luong chat mang(14,18)	-0.41625	0.206272	-2.02	0.0996
Luu luong nap lieu(15,30)	-0.2825	0.206272	-1.37	0.2291
Nhiet do*Ham luong chat mang	-0.775	0.291713	-2.66	0.0451*
Nhiet do*Luu luong nap lieu	-0.1275	0.291713	-0.44	0.6803
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	-0.1075	0.291713	-0.37	0.7276
Nhiet do*Nhiet do	1.3175	0.303624	4.34	0.0074*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	0.5125	0.303624	1.69	0.1522
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	0.62	0.303624	2.04	0.0966

Response TFC

Summary of Fit

RSquare	0.941028
RSquare Adj	0.834878
Root Mean Square Error	0.458365
Mean of Response	3.474
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	16.762868	1.86254	8.8651

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Error	5	1.050492	0.21010	Prob > F
C. Total	14	17.813360		0.0135*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	0.8780250	0.292675	3.3940
Pure Error	2	0.1724667	0.086233	Prob > F
Total Error	5	1.0504917		0.2359
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	2.5533333	0.264637	9.65	0.0002*
Nhiet do(130,160)	1.13125	0.162056	6.98	0.0009*
Ham luong chat mang(14,18)	-0.30625	0.162056	-1.89	0.1174
Luu luong nap lieu(15,30)	-0.085	0.162056	-0.52	0.6223
Nhiet do*Ham luong chat mang	-0.4275	0.229182	-1.87	0.1211
Nhiet do*Luu luong nap lieu	-0.13	0.229182	-0.57	0.5951
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	-0.005	0.229182	-0.02	0.9834
Nhiet do*Nhiet do	1.1095833	0.238541	4.65	0.0056*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	0.2495833	0.238541	1.05	0.3433
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	0.3670833	0.238541	1.54	0.1845

Response TPC

Summary of Fit

RSquare	0.939211
RSquare Adj	0.829791
Root Mean Square Error	0.611964
Mean of Response	5.732
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	28.930740	3.21453	8.5835
Error	5	1.872500	0.37450	Prob > F
C. Total	14	30.803240		0.0145*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	1.7927000	0.597567	14.9766
Pure Error	2	0.0798000	0.039900	Prob > F
Total Error	5	1.8725000		0.0632
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	4.54	0.353318	12.85	<.0001*
Nhiet do(130,160)	1.535	0.216362	7.09	0.0009*
Ham luong chat mang(14,18)	-0.4275	0.216362	-1.98	0.1051
Luu luong nap lieu(15,30)	-0.1125	0.216362	-0.52	0.6253
Nhiet do*Ham luong chat mang	-0.52	0.305982	-1.70	0.1500
Nhiet do*Luu luong nap lieu	-0.27	0.305982	-0.88	0.4180
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	0.09	0.305982	0.29	0.7805
Nhiet do*Nhiet do	1.27	0.318476	3.99	0.0104*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	0.355	0.318476	1.11	0.3157
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	0.61	0.318476	1.92	0.1136

Response TTC Summary of Fit

RSquare	0.957381
RSquare Adj	0.880668
Root Mean Square Error	0.267797
Mean of Response	1.908667
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	8.0549983	0.895000	12.4800
Error	5	0.3585750	0.071715	Prob > F
C. Total	14	8.4135733		0.0063*

Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	3	0.27437500	0.091458	2.1724
Pure Error	2	0.08420000	0.042100	Prob > F
Total Error	5	0.35857500		0.3307
				Max RSq

Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	1.23	0.154612	7.96	0.0005*
Nhiet do(130,160)	0.77625	0.09468	8.20	0.0004*
Ham luong chat mang(14,18)	-0.165	0.09468	-1.74	0.1418
Luu luong nap lieu(15,30)	0.04375	0.09468	0.46	0.6634
Nhiet do*Ham luong chat mang	-0.5375	0.133898	-4.01	0.0102*
Nhiet do*Luu luong nap lieu	0.025	0.133898	0.19	0.8592
Ham luong chat mang*Luu luong nap lieu	-0.1125	0.133898	-0.84	0.4391
Nhiet do*Nhiet do	0.47	0.139366	3.37	0.0198*
Ham luong chat mang*Ham luong chat mang	0.4825	0.139366	3.46	0.0180*
Luu luong nap lieu*Luu luong nap lieu	0.32	0.139366	2.30	0.0701

PL5.4. Kiểm chứng thực nghiệm

Tối ưu hóa công đoạn trích ly

Comparison of Means TPC

95.0% confidence interval for mean of Du doan TPC: 7.8407 +/- 0.0 [7.8407, 7.8407]

95.0% confidence interval for mean of Thuc nghiem TPC: 7.8832 +/- 0.458184 [7.42502, 8.34138]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: -0.0425 +/- 0.295661 [-0.338161, 0.253161]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -0.399103 P-value = 0.710207

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TFC

95.0% confidence interval for mean of Du doan TFC: 1.361 +/- 0.0 [1.361, 1.361]

95.0% confidence interval for mean of Thuc nghiem TFC: 1.3521 +/- 0.0372621 [1.31484, 1.38936]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: 0.0089 +/- 0.0240448 [-0.0151448, 0.0329448]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = 1.02768$ P-value = **0.36218**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TTC

95.0% confidence interval for mean of Du doan TTC: 2.0843 +/- 0.0 [2.0843, 2.0843]
95.0% confidence interval for mean of Thuc nghiem TTC: 2.09 +/- 0.0346384 [2.05536, 2.12464]
95.0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: -0.0057 +/- 0.0223517 [**-0.0280517, 0.0166517**]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = -0.708034$ P-value = **0.518001**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means RSA

95.0% confidence interval for mean of Du doan RSA: 4.594 +/- 0.0 [4.594, 4.594]
95.0% confidence interval for mean of Thuc nghiem RSA: 4.58327 +/- 0.11314 [4.47013, 4.69641]
95.0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: 0.0107333 +/- 0.0730078 [**-0.0622744, 0.0837411**]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = 0.408184$ P-value = **0.704044**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Tối ưu hóa công đoạn sấy phun

Comparison of Means Hieu suat

95.0% confidence interval for mean of Hieu suat du doan: 42.201 +/- 0.0 [42.201, 42.201]
95.0% confidence interval for mean of Hieu suat TN: 42.0407 +/- 0.650978 [41.3897, 42.6916]
95.0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: 0.160333 +/- 0.420069 [**-0.259736, 0.580402**]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = 1.05973$ P-value = **0.349018**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means Do am

95.0% confidence interval for mean of Do am du doan: 2.936 +/- 0.0 [2.936, 2.936]
95.0% confidence interval for mean of Do am TN: 2.87133 +/- 0.146213 [2.72512, 3.01755]
95.0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: 0.0646667 +/- 0.0943495 [**-0.0296828, 0.159016**]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = 1.90297$ P-value = **0.129794**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means RSA

95.0% confidence interval for mean of RSA du doan: 9.224 +/- 0.0 [9.224, 9.224]
95.0% confidence interval for mean of RSA TN: 9.19267 +/- 0.100916 [9.09175, 9.29358]
95.0% confidence interval for the difference between the means
assuming equal variances: 0.0313333 +/- 0.0651202 [**-0.0337869, 0.0964535**]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2
Alt. hypothesis: mean1 NE mean2
assuming equal variances: $t = 1.33592$ P-value = **0.252515**
Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TPC

95.0% confidence interval for mean of TPC du doan: 4.124 +/- 0.0 [4.124, 4.124]
95.0% confidence interval for mean of TPC TN: 4.19167 +/- 0.122565 [4.0691, 4.31423]
95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: -0.0676667 +/- 0.0790897 [-0.146756, 0.011423]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = -2.37545 P-value = 0.0763657

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TFC

95.0% confidence interval for mean of TFC du doan: 2.358 +/- 0.0 [2.358, 2.358]

95.0% confidence interval for mean of TFC TN: 2.29833 +/- 0.165197 [2.13314, 2.46353]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: 0.0596667 +/- 0.1066 [-0.0469329, 0.166266]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = 1.55406 P-value = 0.195138

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TTC

95.0% confidence interval for mean of TTC du doan: 0.909 +/- 0.0 [0.909, 0.909]

95.0% confidence interval for mean of TTC TN: 0.883 +/- 0.0582052 [0.824795, 0.941205]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: 0.026 +/- 0.0375592 [-0.0115592, 0.0635592]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = 1.92198 P-value = 0.126982

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Shelf-life

Comparison of Means RSA

95.0% confidence interval for mean of RSA giam du doan: 20.0 +/- 0.0 [20.0, 20.0]

95.0% confidence interval for mean of RSA giam thuc nghiem: 19.3233 +/- 1.36567 [17.9577, 20.689]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: 0.676667 +/- 0.881254 [-0.204587, 1.55792]

t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

assuming equal variances: t = 2.13189 P-value = 0.0999942

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

Comparison of Means TTC

95.0% confidence interval for mean of TTC du doan: 20.0 +/- 0.0 [20.0, 20.0]

95.0% confidence interval for mean of TTC giam thuc nghiem: 19.7967 +/- 0.34896 [19.4477, 20.1456]

95.0% confidence interval for the difference between the means

assuming equal variances: 0.203333 +/- 0.22518 [-0.0218468, 0.428513]

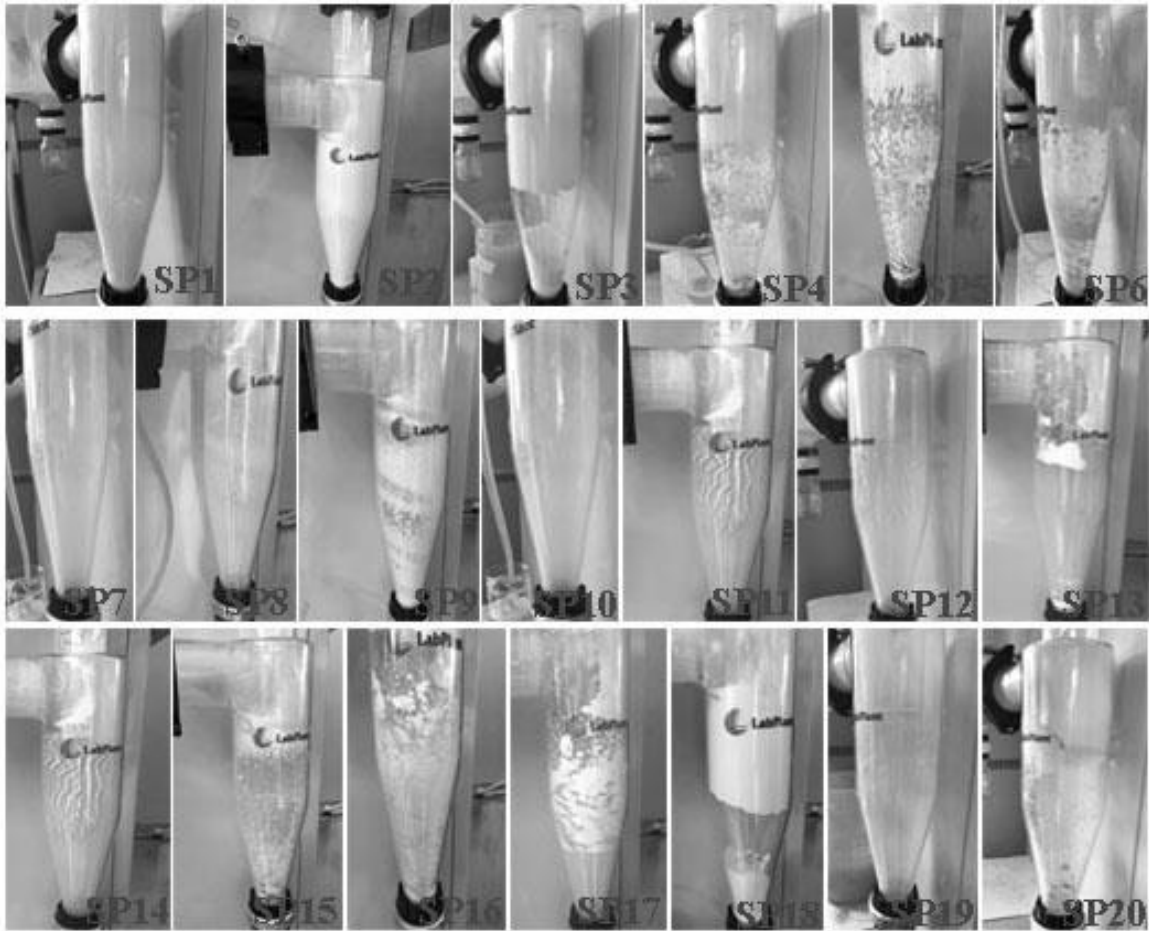
t test to compare means

Null hypothesis: mean1 = mean2

Alt. hypothesis: mean1 NE mean2

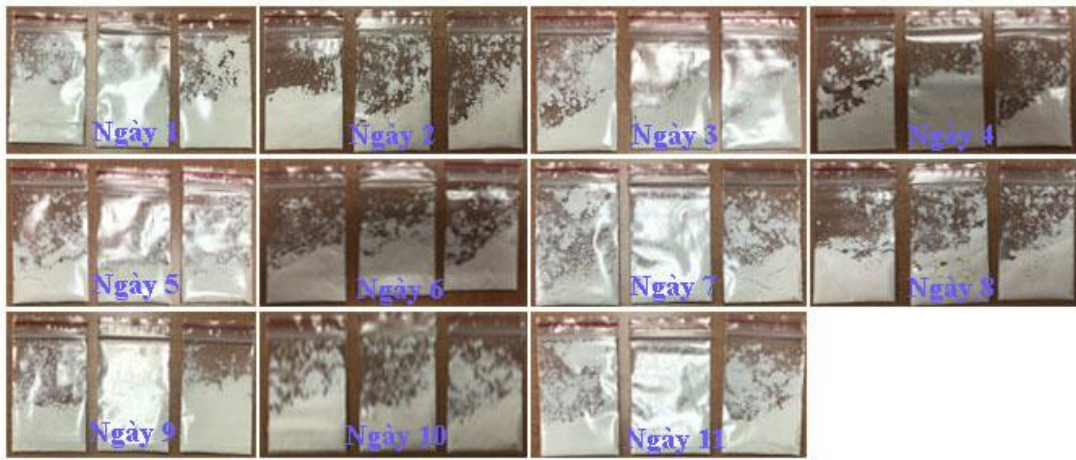
assuming equal variances: t = 2.50708 P-value = 0.0662624

Do not reject the null hypothesis for alpha = 0.05.

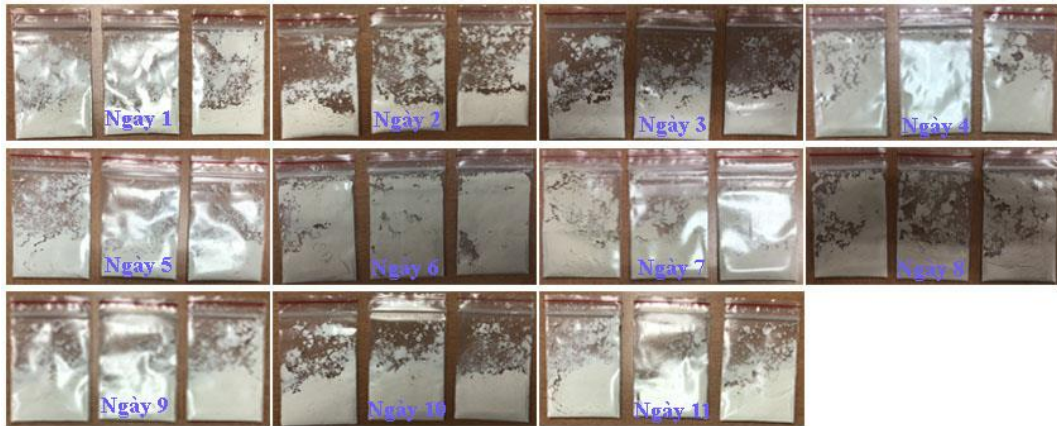


Hình f1. Bột bám trên thành cyclon sấy phun

Phụ lục G



Hình g.1. Shelf life bột ở nhiệt độ 50°C



Hình g.2. Shelf life bột ở nhiệt độ 60°C



Hình g.3. Shelf life bột ở nhiệt độ 70°C

Phụ lục H

Công thức tính

$$P_B = \frac{w \cdot C \cdot (T_2 - T_1)}{t} \quad [W]$$

P_B : công suất vi sóng

w: khối lượng dung môi cho vào bình

C: nhiệt dung riêng của nước (4200 [J / (kg · K)])

T_2 : nhiệt độ sau khi vi sóng

T_1 : nhiệt độ trước khi vi sóng

t: thời gian vi sóng

$$4200 \text{ (J/kg.K)} = 4200 / (1+273.15) = 15.32 \text{ (J/kg. } ^\circ\text{C)}$$

Phụ lục I

PLI.1. Hàm lượng chất khô trước và sau tối ưu hóa

Dịch ban đầu trích ly có độ Bx = 0,3%

Dịch sau khi chiết tối ưu hóa có hàm lượng chất tan Bx=1,5%

Giá trị độ Bx tăng 4,3 lần sau khi tối ưu

PLI.2. Hàm lượng TTC (mg oleanolic) an toàn

Dịch trích ly CoAEO được cô đặc lên khoảng 62 lần (dựa vào bài báo độc tính cấp).

Hàm lượng dịch CoAEO ban đầu có hàm lượng TTC 2,09 mg oleanolic/g DW. Sau đó cô đặc chân không tạo ra cao CoAEO có hàm lượng TTC 130,3 mg oleanolic/g DW.

Độc tính cấp

Trong 6000mg (6g cao) cao CoAEO có 6x130,3 (781,8) mg oleanolic trong một kg thể trọng cho kết quả an toàn khi kiểm tra độc tính cấp.

Độc tính mãn

Liều sử dụng an toàn 400mg cao /kg thể trọng tương đương 0,4g cao CoAEO có 0,4x130,3 (52,12) mg oleanolic trên kg thể trọng cho kết quả an toàn khi kiểm tra độc tính mãn.

PLI.3. Hàm lượng các chất còn lại trong bột cao CoAEO hòa tan sau khi sấy phun

Bảng i.1 Hàm lượng các chất còn lại sau khi sấy phun tạo ra sản phẩm bột cao CoAEO hòa tan

Hàm mục tiêu	Giá trị giảm	Hàm lượng các chất ban đầu trong 100ml dịch sấy phun	Hàm lượng các chất còn lại trong 42 g bột cao CoAEO	Hàm lượng các chất còn lại trong 100 g bột cao CoAEO
TPC (mg GAE)	4,191 (%)	39	15.692	37,35
TFC (mgQE)	2,298(%)	6,75	2,769	6,59
TTC (mg oleanolic)	0,883(%)	10,45	4,349	10,35

