ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ BÍCH HẰNG

THU NHẬN, ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PREBIOTIC CỦA POLYSACCHARIDE TỪ SỢI NẤM (*Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH KHỐI TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM BỔ SUNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

Đà Nẵng, 2026

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ BÍCH HẰNG

THU NHẬN, ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PREBIOTIC CỦA POLYSACCHARIDE TỪ SỢI NẤM (*Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH KHỐI TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM BỔ SUNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9540101

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. Đặng Minh Nhật

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Đà Nẵng, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi cam đoan luận án này được hoàn thành là công trình nghiên cứu của bản thân. Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án chưa từng được công bố trong bất kỳ luận án cùng cấp nào trước đây.

Đà Nẵng, ngày 05 tháng 11 năm 2026

Nghiên cứu sinh thực hiện

Nguyễn Chị Bích Hằng

LỜI CẢM ƠN

Sau hơn 3 năm học tập và nghiên cứu, luận án tiến sĩ của tôi đã được hoàn thành. Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến PGS.TS. Đặng Minh Nhật và TS. Nguyễn Hoàng Dũng – những người thầy đã tận tâm hướng dẫn, dìu dắt tôi từ những ngày đầu nhận đề tài.

Đặc biệt, tôi xin gửi lời tri ân sâu sắc đến PGS.TS. Đặng Minh Nhật. Thầy đã dành nhiều thời gian và tâm huyết không chỉ để truyền đạt kiến thức chuyên môn, kỹ năng nghiên cứu, mà còn truyền cảm hứng về tinh thần trách nhiệm và đạo đức trong công bố khoa học. Nhờ sự định hướng của Thầy, tôi không chỉ hoàn thiện được luận án này mà còn trưởng thành hơn rất nhiều trên con đường nghiên cứu.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô thuộc Bộ môn Công nghệ Thực phẩm, Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng đã luôn hỗ trợ nhiệt tình về mặt chuyên môn, tinh thần cũng như tạo điều kiện tốt nhất về cơ sở vật chất trong suốt quá trình tôi thực hiện các thực nghiệm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng, cùng Ban Chủ nhiệm Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường đã luôn quan tâm, tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi yên tâm công tác, học tập và nghiên cứu. Cùng với đó, xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các thành viên trong nhóm nghiên cứu Công nghệ sinh học nấm của Khoa đã luôn sát cánh, đồng hành và hỗ trợ tôi gặt hái được những kết quả nghiên cứu giá trị.

Tôi cũng xin dành tình cảm tri ân sâu sắc đến gia đình, những người thân yêu, bạn bè và đồng nghiệp – những người đã luôn là điểm tựa tinh thần vững chắc, động viên và khích lệ tôi vượt qua mọi khó khăn trong suốt chặng đường vừa qua.

Cuối cùng, tôi xin trân trọng cảm ơn Quý thầy cô trong Hội đồng đánh giá luận án đã dành thời gian quý báu để đọc, phản biện và đóng góp những ý kiến vô cùng giá trị, giúp luận án của tôi được hoàn thiện ở mức tốt nhất.

Xin trân trọng cảm ơn!

Đà Nẵng, ngày 05 tháng 11 năm 2026

Nghiên cứu sinh thực hiện

Nguyễn Thị Bích Hằng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN ..... **i**
LỜI CẢM ƠN ..... **ii**
MỤC LỤC ..... **iii**
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT ..... **vi**
DANH MỤC BẢNG ..... **viii**
DANH MỤC HÌNH ẢNH ..... **x**
MỞ ĐẦU **1**
1. Đặt vấn đề **1**
2. Mục tiêu nghiên cứu **3**
2.1. Mục tiêu tổng quát ***3***
2.2. Mục tiêu cụ thể ***3***
3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu **3**
3.1. Đối tượng nghiên cứu ***3***
3.2. Phạm vi nghiên cứu ***3***
4. Phương pháp nghiên cứu **4**
4.1. Phương pháp nghiên cứu lý thuyết ***4***
4.2. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm ***4***
5. Ý nghĩa **5**
5.1. Ý nghĩa khoa học ***5***
5.2. Ý nghĩa thực tiễn ***5***
6. Bố cục của luận án **6**
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU **7**
1.1. Giới thiệu về nấm Cordyceps militaris và Trametes versicolor **7**
1.1.1. Đặc điểm phân loại và giá trị truyền thống ***7***
1.1.2. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của Cordyceps militaris ***8***
1.1.3. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của Trametes versicolor ***10***
1.2. Tổng quan về hoạt tính prebiotic **12**
1.2.1. Lịch sử và định nghĩa của prebiotic ***12***
1.2.2. Tiêu chí phân loại và cơ chế hoạt động của prebiotic ***13***

1.2.3. Tiềm năng prebiotic của Cordyceps militaris và Trametes versicolor.....15

1.2.4. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic 16

1.3. Tổng quan về polysaccharide trong nấm và các phương pháp chiết xuất 20

1.3.1. Polysaccharide trong quả thể và hệ sợi nấm 20

1.3.2. Các phương pháp chiết xuất polysaccharide từ nấm.....25

1.4. Phương pháp nuôi cấy dịch thể 30

1.4.1. Giới thiệu về nuôi cấy dịch thể.....30

1.4.2. Ưu điểm của nuôi cấy dịch thể.....31

1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình nuôi cấy dịch thể.....34

1.5. Tổng quan về khả năng kháng oxi hóa 40

1.5.1. Khái niệm và cơ chế.....40

1.5.2. Khả năng kháng oxi hóa của một số hợp chất có trong Cordyceps militaris và Trametes versicolor 41

1.6. Cơ sở lựa chọn nấm bào ngư và vai trò của Lactiplantibacillus plantarum trong lên men lactic 42

1.6.1. Cơ sở lựa chọn nấm bào ngư làm nguyên liệu lên men 42

1.6.2. Lên men lactic nấm bào ngư và những biến đổi trong quá trình lên men 43

1.6.3. Vai trò của Lactiplantibacillus plantarum trong lên men 44

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 47

2.1. Đối tượng 47

2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ 48

2.2.1. Hóa chất 48

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ 48

2.3. Phạm vi.....48

2.4. Sơ đồ nghiên cứu 50

2.5. Phương pháp thực hiện các nội dung nghiên cứu 51

2.5.1. Nội dung 1: Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm 51

2.5.2. Nội dung 2: Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS 57

2.5.3. Nội dung 3: Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung 65

2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu 69

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....70

3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm.....70

3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm C. militaris.....70

3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm T. versicolor.....78

3.2. Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS.....86

3.2.1. Phân tích cấu trúc bề mặt PS bằng kính hiển vi điện tử quét.....86

3.2.2. Hàm lượng polysaccharide tách chiết tuần tự từ hệ sợi nấm.....90

3.2.3. Khả năng trung hoà gốc tự do ABTS của các chiết xuất PS từ hệ sợi nấm.....92

3.2.4. Tiềm năng prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm.....95

3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung.....118

3.3.1. Đánh giá an toàn bột sợi nấm.....118

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng bột sợi nấm bổ sung đến chất lượng nước lên men từ nấm Bào ngư.....119

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....133

A. KẾT LUẬN.....133

B. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....134

C. KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO.....135

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC.....137

TÀI LIỆU THAM KHẢO.....139

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BBD	Box-Behnken Design	Mô hình quy hoạch thực nghiệm Box-Behnken
CNM	Yeast extract	Cao nấm men
Cs	Collaborator	Cộng sự
CT	Formula	Công thức
DO	Dissolved Oxygen	Oxi hòa tan trong nước
DNS	3,5 – Dinitrosalicylic acid	3,5 – Dinitrosalicylic acid
FOS	Fructo-oligosaccharides	Fructo-oligosaccharide
GOS	Galacto-oligosaccharide	Galacto-oligosaccharide
ISAPP	International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics	Hiệp hội Khoa học Quốc tế về Probiotic và Prebiotic
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysaccarit
OD	Optical density	Mật độ quang
OFAT	One – Factor – at – a - Time	Phương pháp thử nghiệm thay đổi một yếu tố riêng lẻ
PDB	Potato Dextrose Borth	Môi trường lỏng khoai tây đường
PI	Prebiotic index	Chỉ số prebiotic
PS	Polysaccharides	Polysaccharide
PSK	Polysaccharide Krestin	Polysaccharide Krestin
PSP	Polysaccharide peptide	Peptide polysaccharide
RS	Resistant starch	Tinh bột kháng tiêu hóa
RSM	Response Surface Methodology	Phương pháp bề mặt đáp ứng
SCFA	Short-chain fatty acid	Acid béo mạch ngắn
SEM	Scanning electron microscopy	Kính hiển vi điện tử quét
SmF	Submerged fermentation	Lên men chìm
TAN	Total acid number	Hàm lượng acid tổng số
TLTK	Reference	Tài liệu tham khảo

TPCN	Functional food	Thực phẩm chức năng
UV-VIS	Ultraviolet-visible spectroscopy	Phổ tử ngoại - khả kiến
VSV	Microorganism	Vi sinh vật

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Các hợp chất chính của nấm *C. militaris* 8
Bảng 1.2. Các hợp chất chính của nấm *T. versicolor* 10
Bảng 1.3. Cấu trúc của glucan phân lập từ một số loại nấm 23
Bảng 2.1. Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất 27
Bảng 2.2. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *C. militaris* 52
Bảng 2.3. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *T. versicolor* 53
Bảng 2.4. Xây dựng đường chuẩn D-glucose bằng thuốc thử DNS 63
Bảng 3.1. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm *C. militaris* 73
Bảng 3.2. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* 74
Bảng 3.3. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng polysaccharide từ hệ sợi nấm *C. militaris* 74
Bảng 3.4. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu sinh khối sợi nấm *T. versicolor* 81
Bảng 3.5. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor* 83
Bảng 3.6. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor* 83
Bảng 3.7. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS từ *C. militaris* 93
Bảng 3.8. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS của PS từ *T. versicolor* 93
Bảng 3.9. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm) 113
Bảng 3.10. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm) 115
Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm các chỉ tiêu an toàn sinh học hệ sợi nấm 118
Bảng 3.12. Khả năng trung hoà gốc tự do $ABTS^+$ của dịch chiết nấm Bào ngư bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* lên men (%) 120
Bảng 3.13. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* trong nước nấm bào ngư lên men (logCFU/mL) 121
Bảng 3.14. Đường kính vùng ức chế (mm) của đồ uống lên men đối với *E. coli* và *S. aureus* ở các thời gian lên men khác nhau 126

Bảng 3.15. Sự thay đổi pH của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men 129
Bảng 3.16. Sự thay đổi hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men 130
Bảng 3.17. Kết quả đánh giá an toàn vi sinh và hoá học sản phẩm nước lên men 131

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Quả thể nấm *C. militaris* 7
Hình 1.2. Quả thể nấm *T. versicolor* 8
Hình 1.3. Sơ đồ biểu diễn sinh lý hệ sợi nấm.....21
Hình 2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu 50
Hình 2.2. Quy trình tách polysaccharide thô từ sinh khối nấm.....55
Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide (PS) từ sinh khối hệ sợi nấm.....57
Hình 3.1. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris. A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men*.....71
Hình 3.2. Ảnh hưởng kết hợp của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *C. militaris*.....75
Hình 3.3. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu 77
Hình 3.4. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide 77
Hình 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor. A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men*.....79
Hình 3.6. Ảnh hưởng kết hợp của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *T. versicolor*.....84
Hình 3.7. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu 85
Hình 3.8. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide 85
Hình 3.9. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D) 87
Hình 3.10. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *T. versicolor* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D) 88
Hình 3.11. Hàm lượng PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* 91
Hình 3.12. Hình thái các phân đoạn Polysaccharide tách chiết từ sợi nấm 92

C. militaris và *T. versicolor*.....92
Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của probiotic trên môi trường bổ sung PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris* 96
Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic trên môi trường bổ sung chiết xuất PS nấm *T. versicolor* 97
Hình 3.15. Chỉ số prebiotic (PI) của các phân đoạn polysaccharide đối với các chủng probiotic khảo sát. (A) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm *C. militaris*; (B) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm T. *versicolor*. 101
Hình 3.16. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. *A: Butyric acid; B: Propionic acid; C: Acetic acid* 106
Hình 3.17. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. *A: Acetic acid, B: Propionic acid; C: Butyric acid*.....109
Hình 3.18. Phần trăm PS bị phân giải bởi α-amylase.....111
Hình 3.19. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023.....114
Hình 3.20. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023.....116
Hình 3.21. Khả năng kháng khuẩn của đồ uống lên men đối với *E. coli* ATCC 85922 (A) và *S. aureus* ATCC 25023 (B).....125
Hình 3.22. Đánh giá cảm quan của đồ uống lên men 24 giờ từ các công thức thí nghiệm 128

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Trong những năm gần đây, vai trò của hệ vi sinh vật đường ruột đối với sức khỏe con người ngày càng được quan tâm, đặc biệt trong việc duy trì chức năng tiêu hóa và chuyển hóa bình thường của cơ thể. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sự mất cân bằng hệ vi sinh có liên quan mật thiết đến các rối loạn trao đổi chất và suy giảm chức năng đường ruột. Do đó, việc tìm kiếm các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên có khả năng điều hòa hệ vi sinh đường ruột, đặc biệt là các hoạt chất prebiotic, đang trở thành xu hướng nghiên cứu và ứng dụng quan trọng trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm và công nghệ sinh học.

Prebiotic đóng vai trò là nguồn cơ chất chọn lọc thúc đẩy sự sinh trưởng của các lợi khuẩn (probiotic), từ đó góp phần thiết lập và duy trì sự cân bằng của hệ vi sinh vật đường ruột. Bên cạnh đó, cấu trúc đặc thù của một số prebiotic còn có khả năng cản trở sự bám dính của các vi sinh vật gây hại. Đặc biệt, quá trình lên men prebiotic bởi lợi khuẩn tại ruột già sẽ sản sinh ra các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs). Các SCFAs này là nguồn năng lượng chủ yếu giúp duy trì hoạt động của tế bào biểu mô đại tràng, đồng thời góp phần làm giảm pH môi trường ruột, từ đó ức chế sự phát triển của vi khuẩn tạp nhiễm và hỗ trợ quá trình hấp thu khoáng chất [1].

Trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng prebiotic, các hợp chất có nguồn gốc thực vật như Fructo-oligosaccharides (FOS/inulin) và Galacto-oligosaccharides (GOS) hiện đang chiếm ưu thế chủ đạo. Xuất phát từ những lợi ích sức khỏe thiết yếu mà prebiotic mang lại, các nỗ lực nghiên cứu hiện nay đang tập trung khai phá những nguồn nguyên liệu mới có hiệu suất cao và tính an toàn sinh học đảm bảo. Trong bối cảnh đó, nấm nổi lên như một đối tượng tiềm năng nhờ thành phần cấu tạo giàu carbohydrate không tiêu hóa được như chitin, hemicellulose, β- và α-glucans, mannan, xylan và galactan [2]. Các polysaccharide này, cùng với các đường chuỗi ngắn (glucose, galactose, fructose và N-acetylglucosamine), đóng vai trò là chất nền đặc hiệu kích thích sự tăng trưởng của hệ vi sinh vật có lợi, đặc biệt là *Bifidobacteria* và *Lactobacillus* [3]. Về mặt hoạt tính, bên cạnh các tác dụng dược lý kinh điển, các nghiên cứu gần đây bắt đầu hé lộ tiềm năng to lớn của nấm dược liệu trong vai trò là prebiotic – nguồn thức ăn chọn lọc cho hệ vi sinh vật đường ruột [1]. Polysaccharide từ nấm ăn và nấm dược liệu như *Cordyceps militaris*

và *Trametes versicolor* sở hữu cấu trúc bền vững, không bị tiêu hóa ở dạ dày và có khả năng kích thích chọn lọc các lợi khuẩn như *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* rất hiệu quả [4,5]. *C. militaris* từ lâu đã nổi tiếng trong y học cổ truyền với khả năng tăng cường sinh lực, hỗ trợ chức năng phổi và điều hòa miễn dịch [6,7]. Trong khi đó, *T. versicolor* được biết đến như một nguồn của β-glucan và các phức hợp polysaccharide-peptide (như PSP, PSK), đã được ứng dụng rộng rãi trong hỗ trợ điều trị ung thư và kích thích miễn dịch [8,9]. Tuy nhiên, thực tế cho thấy việc khai thác và sử dụng hai loài nấm này hiện nay chủ yếu vẫn tập trung vào quả thể. Phương pháp nuôi trồng quả thể truyền thống trên cơ chất rắn thường tốn nhiều thời gian, phụ thuộc vào yếu tố thời tiết, khó kiểm soát chất lượng đồng nhất và chi phí sản xuất cao, gây trở ngại cho việc ứng dụng đại trà trong công nghiệp [10,11]. Trước thách thức đó, việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy chìm (SmF) để sản xuất sinh khối hệ sợi nấm đang trở thành một xu hướng nghiên cứu mới. So với nuôi trồng quả thể hay lên men rắn (SSF), SmF cho phép rút ngắn đáng kể thời gian sinh trưởng, dễ dàng kiểm soát các thông số môi trường như pH, nhiệt độ, oxy hòa tan và thuận lợi cho việc mở rộng quy mô công nghiệp để thu nhận sinh khối hữu cơ sợi nấm. Quan trọng hơn, nhiều nghiên cứu đã chứng minh hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể không chỉ có năng suất sinh khối cao mà còn tích lũy các polysaccharide với hoạt tính sinh học đặc trưng. Cụ thể, Kim và cs. (2003) đã chứng minh việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy lỏng giúp *C. militaris* đạt năng suất sinh khối và exo-polysaccharide rất cao [12]. Tiếp nối hướng đi này Shih và cs. (2007) đã làm rõ vai trò của việc kiểm soát các thông số vận hành trong hệ thống bioreactor, cho thấy sự tương tác giữa nguồn nitrogen và tốc độ khuấy trộn là chìa khóa để duy trì sự ổn định của hàm lượng cordycepin trong sản xuất quy mô lớn [13].

Tuy nhiên, đa số các nghiên cứu hiện nay mới chỉ dừng lại ở việc tách chiết hoạt chất từ quả thể và một số hoạt tính sinh học của sợi nấm trong khi tiềm năng prebiotic của sinh khối hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể vẫn là một hướng nghiên cứu lớn chưa được khai phá tương xứng. Xuất phát từ thực tiễn và các luận điểm khoa học nêu trên, đề tài "**Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm *(Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**" được thực hiện. Đề tài không chỉ hướng đến việc làm chủ công nghệ sản xuất sinh khối nấm chất lượng cao bằng phương pháp lên men dịch thể, mà còn cung cấp những dẫn liệu khoa học mới về hoạt tính prebiotic của hệ sợi nấm, tạo tiền đề phát

triển các sản phẩm thực phẩm chức năng thế hệ mới chủ động nguồn nguyên liệu, hiệu quả cao và bền vững.

2. Mục tiêu nghiên cứu

2.1. Mục tiêu tổng quát

Xác lập cơ sở khoa học về điều kiện nuôi cấy, đặc điểm hình thái và hoạt tính sinh học (kháng oxi hóa, prebiotic) của các phân đoạn polysaccharide từ hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; từ đó đánh giá khả năng ứng dụng sinh khối nấm trong chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung dạng nước uống lên men giàu hoạt tính sinh học.

2.2. Mục tiêu cụ thể

- Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể sợi nấm nhằm thu nhận tối đa hiệu suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide cao nhất từ hai chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*.

- Đánh giá, so sánh hiệu suất thu nhận, đặc điểm hình thái và các hoạt tính sinh học invitro (prebiotic và kháng oxi hóa) của các phân đoạn polysaccharide được chiết xuất tuần tự bằng nước nóng (HWE), kiềm (AE) và acid (AEc).

- Đánh giá tiềm năng sử dụng sinh khối hệ sợi nấm trong chế biến nước nấm bào ngư lên men lactic giàu probiotic và có các hoạt tính sinh học hỗ trợ sức khỏe như kháng oxi hóa và kháng khuẩn.

3. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Sợi nấm: bao gồm 2 chủng *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*

3.2. Phạm vi nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu của luận án được giới hạn trong các phạm vi sau:

- Tối ưu các điều kiện pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong quá trình lên men thu sinh khối và polysaccharide.

- Chiết xuất, đánh giá khả năng trung hoà gốc tự do ABTS, tiềm năng prebiotic *in vitro* của 3 loại PS khác nhau chiết bằng nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE) và chiết acid (AEc) từ 2 chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* thông qua các đánh giá *in vitro*.

- Ứng dụng sợi nấm vân chi phát triển sản phẩm nước uống lên men lactic từ nấm bào ngư.

- Các hệ vi sinh vật sử dụng đánh giá hoạt tính prebiotic bao gồm: Các chủng lợi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1, *Lactiplantibacillus casei* – 01, *Bifidobacterium animalis* YC381, *Lactiplantibacillus pentosus* NH1, *Pediococcus acidilactici* NBD8 và Các chủng hại khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

- Quả thể nấm Bào ngư tím (*Pleurotus ostreatus*) thu mua tại trại nấm Quỳnh Tâm-Hòa Phong – Hòa Vang – Thành phố Đà Nẵng để chế biến nước nấm bào ngư lên men.

- Các thí nghiệm được tiến hành tại các phòng thí nghiệm của Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng và Khoa Hóa, Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng.

- Thời gian thực hiện: từ năm 2021 đến năm 2025.

4. Phương pháp nghiên cứu

4.1. Phương pháp nghiên cứu lý thuyết

Tìm kiếm và thu thập các tài liệu, tư liệu, sách báo, cùng các công trình nghiên cứu liên quan đến nuôi cấy, tối ưu điều kiện nuôi cấy hệ sợi nấm, nghiên cứu tách chiết phân đoạn PS nói chung từ các nguồn thực vật cũng như từ sợi nấm, các nghiên cứu đánh giá hoạt tính kháng oxi hoá và prebiotic của PS, các loại prebiotic khác và các nghiên cứu chế biến sản phẩm lên men… từ nguồn tài liệu trong nước và quốc tế.

4.2. Phương pháp nghiên cứu thực nghiệm

- Tối ưu điều kiện nuôi cấy thu sinh khối từ sợi nấm giàu Polysaccharide

+ Phương pháp thực nghiệm cổ điển (OFAT)

+ Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM)

- Tách chiết tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hóa, prebiotic của các chiết xuất PS

- Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung

- Thu thập và xử lý số liệu

5. Ý nghĩa

5.1. Ý nghĩa khoa học

- Luận án cung cấp bộ dữ liệu khoa học đầy đủ và có hệ thống về ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng (C, N) và môi trường (pH) đến sinh khối và sự tích lũy polysaccharide của hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* trong điều kiện nuôi cấy chìm.

- Luận án đi sâu phân tích, so sánh các phân đoạn polysaccharide được chiết xuất tuần tự (nước, kiềm, acid). Việc xác lập sự khác biệt về hoạt tính kháng oxy hóa và đặc tính prebiotic của từng phân đoạn đối với các chủng lợi khuẩn khác nhau đã mang lại một góc nhìn mới mang tính hệ thống. Đây là cơ sở khoa học giúp định hướng lựa chọn tác nhân chiết tách phù hợp nhằm tối ưu hóa hoạt tính sinh học mong muốn, thay vì chỉ tập trung vào phương pháp chiết nước nóng truyền thống.

- Kết quả nghiên cứu cung cấp các bằng chứng định lượng cụ thể về khả năng kháng tiêu hóa (kháng α-amylase), chỉ số prebiotic (PI) và đặc biệt là lượng acid béo chuỗi ngắn (SCFAs - Acetate, Propionate, Butyrate) được sản sinh từ PS nấm do các chủng lợi khuẩn đặc hiệu (*L. plantarum, L. casei, B. animalis, L. pentosus, P. acidilactici*) lên men. Điều này góp phần củng cố cơ sở lý luận cho việc sử dụng sợi nấm dược liệu như một nguồn prebiotic.

- Cung cấp nền tảng khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về đặc tính phân tử, cấu trúc hóa học và tương tác sinh học của PS đối với hệ sinh thái đường ruột cũng như việc tìm kiếm phát hiện các phân tử PS mới từ sợi nấm.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

- Thiết lập được các điều kiện tối ưu cho quy trình nuôi cấy dịch thể nấm *C. militaris* và *T. versicolor* để đạt hiệu suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide cao. Đây là giải pháp để tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ, giúp chủ động nguồn nguyên liệu ổn định cho công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, đồng thời nuôi cấy dịch thể cũng là phương thức nhân giống nhanh, nâng cao năng suất hiệu quả nuôi trồng nấm, hiện đại hóa công nghệ nuôi trồng nấm.

- Đa dạng hóa sản phẩm thực phẩm từ nấm: Kết quả nghiên cứu ứng dụng đã tạo ra sản phẩm "Nước nấm Bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*" với chất lượng cảm quan tốt, đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và sở hữu hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, prebiotic) đã được kiểm chứng. Đây là mô hình sản phẩm thực tế,

khả năng ứng dụng ban đầu trong thực phẩm bổ sung, đáp ứng xu hướng tiêu dùng thực phẩm xanh và hỗ trợ sức khỏe đường ruột.

6. Bố cục của luận án

Luận án gồm 136 trang (không kể phần phụ lục và TLTK), kết cấu bao gồm: Mở đầu có 5 trang trình bày tính cấp thiết, mục tiêu, nội dung, phương pháp nghiên cứu, ý nghĩa khoa học, ý nghĩa thực tiễn của luận án.

Nội dung chính gồm 3 chương:

Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu gồm 39 trang;

Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, gồm có 23 trang;

Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận gồm có 61 trang;

Phần kết luận và kiến nghị gồm 4 trang; Danh mục các công trình nghiên cứu đã công bố 2 trang. Ngoài ra, phần tài liệu tham khảo gồm 22 trang. Trong luận án tổng cộng có 24 bảng, 28 hình vẽ và đồ thị. Có 221 tài liệu tham khảo gồm tiếng Anh và tiếng Việt là các bài báo được công bố trong tạp chí khoa học và sách.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về nấm Cordyceps militaris và Trametes versicolor

1.1.1. Đặc điểm phân loại và giá trị truyền thống

C. militaris là một loài nấm ký sinh côn trùng thuộc ngành Ascomycota, lớp Sordariomycetes, họ *Cordycipitaceae*. Từ lâu, nấm đã được sử dụng trong y học cổ truyền Trung Hoa (dưới tên gọi "đông trùng hạ thảo") để hỗ trợ điều trị các bệnh về thận, phổi, gan, sinh lý nam và nhiều loại ung thư khác nhau, cũng như tăng cường năng lượng và sức khỏe tổng thể [14]. So với loài họ hàng là *Cordyceps sinensis*, *C. militaris* được ưa chuộng hơn trong sản xuất công nghiệp do khả năng nuôi trồng dễ dàng, thời gian phát triển ngắn và khả năng tổng hợp cordycepin với năng suất cao hơn [15,16].



Hình 1.1. Quả thể nấm *C. militaris*

(Ảnh: Nguyễn Thị Bích Hằng, 2022)

Ngược lại, *T. versicolor* là một loài nấm mục gỗ thuộc ngành Basidiomycota, họ *Polyporaceae*, thường mọc trên thân cây gỗ mục. Trong y học phương Đông, nó được biết đến với tên gọi "Vân chi", dùng trong trà hoặc chiết xuất làm thuốc bổ, đặc biệt trong điều trị ung thư tại Trung Quốc và Nhật Bản [17,18]. Với hình dạng giống đuôi gà tây đặc trưng, *T. versicolor* cũng dễ nhận diện và khai thác trong tự nhiên.



Hình 1.2. Quả thể nấm *T. versicolor*

(Ảnh: Nguyễn Thị Bích Hằng, 2022)

1.1.2. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của Cordyceps militaris

Trong những thập kỷ gần đây *C. militaris* đã thu hút sự chú ý đáng kể trong giới khoa học và ngành công nghiệp dược phẩm nhờ chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học phong phú với tiềm năng ứng dụng trong y học cổ truyền và hiện đại. Nấm này nổi bật không chỉ nhờ khả năng tăng cường hệ miễn dịch, kháng oxi hóa và chống ung thư mà còn nhờ khả năng hỗ trợ điều hòa chuyển hóa năng lượng và hệ vi sinh vật đường ruột [19].

Bảng 1.1. Các hợp chất chính của nấm *C. militaris*

Hợp chất	**Đặc điểm cấu tạo**	**Hoạt tính sinh học nổi bật**	**Cơ chế tác động chính**	**TLTK**
Cordycepin (3'-deoxyadenosine)	Tương tự adenosine nhưng thiếu nhóm -OH ở vị trí 3'.	- Chống ung thư - Kháng viêm -Kháng virus và vi khuẩn	- Can thiệp vào quá trình tổng hợp RNA. - Điều hòa các con đường tín hiệu PI3K/Akt và MAPK. - Ức chế nhân tố phiên mã NF-κB.	[19,20]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động chính	TLTK
Polysaccharide (PS)	Bao gồm cả homopolysaccharide (β-glucan) và heteropolysaccharide.	- Tăng cường miễn dịch - Prebiotic - Kháng oxi hóa - Điều hòa đường huyết và lipid máu	- Kích thích đại thực bào, tế bào NK, sản xuất cytokine. - Hỗ trợ sự phát triển của lợi khuẩn đường ruột. - Quét gốc tự do, tăng hoạt tính enzyme kháng oxi hóa nội sinh (SOD, CAT).	[21] [22]
Adenosine và Nucleoside	Adenosine, uridine, guanosine, inosine.	- Điều hòa tim mạch (nhịp tim, giãn mạch) - Chống viêm, chống mệt mỏi - Cải thiện giấc ngủ và nhận thức	- Tác động lên các thụ thể purinergic trong cơ thể. - Hiệp đồng tác dụng với cordycepin.	[21]
Sterol và Ergosterol	Ergosterol và các dẫn xuất oxi hóa của nó (ví dụ: ergosterol peroxide).	- Kháng oxi hóa và chống viêm - Chống ung thư - Là tiền chất của vitamin D2	- Tạo ra các loại oxi phản ứng (ROS) để cảm ứng quá trình apoptosis (chết tế bào theo chương trình). - Ức chế sự hấp thu cholesterol tại ruột non.	[20]
Hợp chất phenolic và flavonoid	Các acid phenolic (caffeic, ferulic) và flavonoid.	- Kháng oxi hóa mạnh - Chống viêm và chống lão hóa - Bảo vệ gan	- Bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do gốc tự do gây ra. - Điều hòa các enzyme chuyển hóa xenobiotic.	[22,23]

Tóm lại, nấm *Cordyceps militaris* là nguồn dược liệu quý với phổ hợp chất hoạt tính sinh học đa dạng và nhiều tiềm năng ứng dụng trong y học hiện đại và thực phẩm chức năng. Các nhóm hợp chất chính gồm cordycepin, polysaccharide, adenosine, sterol và polyphenol đều đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học nổi bật như chống ung thư, tăng cường miễn dịch, Kháng oxi hóa, điều hòa chuyển hóa và hỗ trợ sức khỏe đường ruột. Tuy nhiên, để ứng dụng rộng rãi, cần có thêm các nghiên cứu lâm sàng và tối ưu quy trình chiết tách, nuôi cấy nhằm đảm bảo hiệu quả và độ an toàn cho người sử dụng.

1.1.3. Các hợp chất hoạt tính sinh học chính của Trametes versicolor

T. versicolor nổi bật với hai hợp chất polysaccharide gắn protein có hoạt tính mạnh là PSK (polysaccharide-K, hay còn gọi là Krestin) và PSP (polysaccharide peptide). Cả hai đều có khả năng kích hoạt miễn dịch mạnh mẽ, tăng sản xuất cytokine (IL-2, TNF-α, IFN-γ), thúc đẩy hoạt động của tế bào T, tế bào sát tự nhiên (NK) và đại thực bào. Tại Nhật Bản, PSK đã được cấp phép sử dụng như một tác nhân hỗ trợ điều trị ung thư đường tiêu hóa, vú, phổi và gan trong liệu pháp kết hợp với hóa trị [8,17].

Bảng 1.2. Các hợp chất chính của nấm *T. versicolor*

Hợp chất	**Đặc điểm cấu tạo**	**Hoạt tính sinh học nổi bật**	**Cơ chế tác động và ứng dụng chính**	**TL TK**
PSK (Polysaccharide-K)	Glycoprotein (Polysaccharide liên kết protein)	- Hỗ trợ điều trị ung thư (Đã được cấp phép lâm sàng) - Điều hòa miễn dịch	- Kích hoạt tế bào T, tế bào NK; tăng sản xuất IL-2, IFN-γ. - Ứng dụng: Kết hợp với hóa trị, kéo dài thời gian sống cho bệnh nhân ung thư dạ dày, đại tràng, phổi, gan.	[17] [24]
PSP (Polysaccharide Peptide)	Polysaccharide liên kết peptide (hàm lượng peptide cao)	- Điều hòa miễn dịch - Kháng oxi hóa - Kháng virus,	- Ức chế NF-κB, giảm các cytokine tiền viêm TNF-α, IL-6. - Ức chế virus viêm gan B và vi	[25] [26] [27]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động và ứng dụng chính	TL TK
		kháng khuẩn - Chống viêm	khuẩn *Staphylococcus aureus*. - Cải thiện thời gian sống của bệnh nhân ung thư.	
Polysaccharide (β-glucan)	β-glucan (các liên kết β-1→3 và β-1→6)	- Tăng cường miễn dịch - Prebiotic	- Hoạt hóa đại thực bào và tế bào lympho. - Hỗ trợ hệ vi sinh đường ruột, làm tăng các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) như acetate, propionate, butyrate.	[28]
Hợp chất phenolic & flavonoid	Gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, quercetin, kaempferol	- Kháng oxi hóa mạnh - Chống viêm - Bảo vệ gan, giảm lipid máu	- Quét gốc tự do, chelat hóa ion kim loại. - Ức chế các enzyme gây viêm COX-2 và 5-LOX, giảm PGE2 và LTB4.	[29] [30]
Terpenoid & Sterol	Triterpenoid (Trametenolic acid), Ergosterol, Ergosterol peroxide	- Chống ung thư - Kháng khuẩn, kháng virus - Điều hòa miễn dịch	- Cảm ứng quá trình apoptosis (tự chết tế bào) qua con đường ty thể, ức chế proteasome. - Điều hòa các gen liên quan đến apoptosis như Bax và Bcl-2.	[31] [32]
Enzyme (Laccase, Peroxidase)	Laccase, Manganese Peroxidase	- Phân hủy sinh học - Khử độc	- Phân hủy lignin, thuốc trừ sâu, chất màu công nghiệp.	[33]

Hợp chất	Đặc điểm cấu tạo	Hoạt tính sinh học nổi bật	Cơ chế tác động và ứng dụng chính	TL TK
	(MnP), Lignin Peroxidase (LiP)	- Hỗ trợ chiết xuất	- Phá vỡ cấu trúc môi trường nuôi cấy, tạo điều kiện thuận lợi cho việc chiết xuất polysaccharide.	
Các hợp chất nhỏ khác	Quinone, Aldehyde, Acid hữu cơ	- Kháng oxi hóa, kháng viêm - Hiệp đồng bảo vệ tế bào	- Cảm ứng các gen chống ung thư (Nrf2, HO-1). - Hỗ trợ sửa chữa DNA và tăng cường hoạt tính của các enzyme giải độc.	[34]

Có thể nói rằng nấm *T. versicolor* là một kho tàng hợp chất hoạt tính sinh học có giá trị cao với các ứng dụng tiềm năng trong y học, thực phẩm chức năng và công nghệ sinh học. Các nhóm hợp chất chính bao gồm PS (PSK, PSP), phenolic, flavonoid, terpenoid, sterol và enzyme oxi hóa đã được chứng minh có hoạt tính chống ung thư, điều hòa miễn dịch, kháng oxi hóa, kháng khuẩn và hỗ trợ hệ vi sinh đường ruột.

Nhìn chung, *C. militaris* và *T. versicolor* đều là những loài nấm dược liệu quan trọng, thể hiện tiềm năng dược lý đa dạng thông qua các hợp chất hoạt tính sinh học phong phú. *C. militaris* nổi bật với cordycepin và polysaccharide có hoạt tính chống ung thư, kháng viêm và hỗ trợ chuyển hóa, trong khi *T. versicolor* được chứng minh hiệu quả lâm sàng rõ rệt thông qua PSK và PSP. Cả hai loài đều là ứng cử viên sáng giá cho nghiên cứu ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và tiền sinh học. Việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chìm nhằm nâng cao hiệu suất sinh khối và hoạt tính sinh học của hệ sợi hai loài này là một hướng nghiên cứu mang tính thực tiễn và triển vọng.

1.2. Tổng quan về hoạt tính prebiotic

1.2.1. Lịch sử và định nghĩa của prebiotic

Khái niệm "prebiotic" lần đầu tiên được giới thiệu vào năm 1995 bởi Gibson và Roberfroid, nhằm phân biệt các hợp chất có khả năng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột mà không phải là vi khuẩn sống, tức khác với probiotic. Trong công bố này, các tác giả

định nghĩa prebiotic là "một chất không tiêu hóa được, có ảnh hưởng có lợi đối với vật chủ thông qua việc kích thích chọn lọc sự phát triển và/hoặc hoạt động của một hoặc một số vi sinh vật có lợi trong đại tràng". Khái niệm này đã tạo tiền đề cho một lĩnh vực nghiên cứu mới về các hợp chất chức năng trong thực phẩm, đặc biệt là các carbohydrate không tiêu hóa được, như fructooligosaccharide (FOS), inulin, galactooligosaccharide (GOS), và gần đây là PS có nguồn gốc từ nấm và thực vật [35].

Theo thời gian, khái niệm prebiotic đã được mở rộng và làm rõ hơn nhờ vào sự tiến bộ trong khoa học vi sinh vật, sinh học phân tử và công nghệ "multi-omics" (metagenomics, metabolomics, transcriptomics). Năm 2010, Tổ chức Khoa học Quốc tế về Probiotic và Prebiotic (ISAPP) đã đề xuất một định nghĩa điều chỉnh, theo đó prebiotic là "một thành phần thực phẩm không tiêu hóa, được lên men chọn lọc, dẫn đến sự thay đổi có lợi trong thành phần và/hoặc hoạt động của hệ vi sinh vật đường ruột". Tuy nhiên, định nghĩa này vẫn mang tính đặc thù cho hệ vi sinh vật ruột và thiếu sự bao hàm cho các tiềm năng prebiotic ngoài hệ tiêu hóa [36].

Vào năm 2017, một nhóm chuyên gia của ISAPP tiếp tục cập nhật định nghĩa chính thức của prebiotic để phản ánh những phát hiện mới nhất, đồng thời mở rộng phạm vi khái niệm. Theo đó, prebiotic được định nghĩa là "một chất nền được sử dụng chọn lọc bởi các vi sinh vật của vật chủ, đem lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ" [37].

Nhìn chung, khái niệm prebiotic đã trải qua quá trình phát triển từ một định nghĩa ban đầu tập trung vào hệ vi sinh vật đường ruột, đến một định nghĩa toàn diện hơn mang tính liên ngành và liên hệ thống. Sự phát triển này phản ánh mối liên kết ngày càng rõ rệt giữa vi sinh vật và sức khỏe vật chủ, cũng như tiềm năng ứng dụng to lớn của prebiotic trong các lĩnh vực y học, thực phẩm chức năng, và công nghệ sinh học hiện đại.

1.2.2. Tiêu chí phân loại và cơ chế hoạt động của prebiotic

Trong những năm gần đây, khái niệm prebiotic không chỉ dừng lại ở các hợp chất oligosaccharide truyền thống mà đã mở rộng để bao hàm nhiều loại chất nền khác như PS có trọng lượng phân tử cao, polyphenol, acid béo không tiêu hóa và thậm chí là peptide. Tuy nhiên, bất chấp sự đa dạng về cấu trúc và nguồn gốc, để một hợp chất được công nhận là prebiotic, nó phải đáp ứng ba tiêu chí cơ bản, được xây dựng trên cơ sở nghiên cứu vi sinh vật học, sinh hóa và sinh lý học đường tiêu hóa [37].

Tiêu chí thứ nhất là không bị tiêu hóa hay hấp thu tại ruột non. Điều này có nghĩa là hợp chất phải vượt qua quá trình tiêu hóa enzyme tuyến tụy và enzyme ruột một cách nguyên vẹn. Khác với các carbohydrate thông thường như tinh bột hay đường đơn, prebiotic không bị phân giải bởi α-amylase, maltase, sucrase hay lactase. Tính kháng tiêu hóa này cho phép các hợp chất prebiotic di chuyển đến đại tràng – nơi sinh sống của quần thể vi sinh vật cộng sinh – mà không bị biến đổi đáng kể. Đây là điều kiện tiên quyết để prebiotic có thể tương tác với microbiota ruột và phát huy tác dụng sinh học đặc hiệu.

Tiêu chí thứ hai là được lên men chọn lọc bởi một số nhóm vi sinh vật có lợi trong hệ vi sinh đường ruột. Các vi khuẩn như *Bifidobacterium, Lactobacillus, Akkermansia muciniphila* và *Faecalibacterium prausnitzii* có khả năng sử dụng prebiotic như một nguồn carbon chính để phát triển, tạo ra lợi ích sinh học đa dạng. Quá trình lên men này không chỉ giúp tăng sinh số lượng vi khuẩn có lợi mà còn ức chế sự phát triển của vi khuẩn gây hại như *Clostridium perfringens, Escherichia coli,* và *Salmonella spp.,* nhờ vào sự cạnh tranh dinh dưỡng và thay đổi môi trường vi mô. Việc tác động chọn lọc là yếu tố phân biệt prebiotic với các chất xơ thông thường, bởi không phải tất cả các chất xơ đều có tính đặc hiệu đối với microbiota.

Tiêu chí thứ ba, đồng thời là mục tiêu cuối cùng của prebiotic, là mang lại lợi ích sinh lý rõ rệt cho vật chủ. Lợi ích này có thể biểu hiện ở nhiều cấp độ khác nhau, từ cải thiện tiêu hóa, hấp thu dinh dưỡng, tăng cường miễn dịch niêm mạc, đến tác dụng kháng viêm và kháng oxi hóa. Một trong những cơ chế sinh lý học quan trọng của prebiotic là sự sản sinh các acid béo chuỗi ngắn (short-chain fatty acids – SCFAs) trong quá trình lên men. Các SCFAs chính như acetate, propionate và butyrate đóng vai trò là nguồn năng lượng cho tế bào biểu mô ruột (đặc biệt là butyrate), điều hòa pH đường ruột, và hoạt hóa các thụ thể miễn dịch như GPR41, GPR43 – từ đó ảnh hưởng đến các con đường tín hiệu liên quan đến viêm, chuyển hóa lipid và insulin. Butyrate còn được chứng minh là có khả năng làm giảm biểu hiện của các cytokine tiền viêm (như TNF-α, IL-6), hỗ trợ điều trị các bệnh lý viêm ruột mạn tính như viêm loét đại tràng và Crohn.

Bên cạnh đó, một số prebiotic còn thể hiện tính chất synbiotic khi được kết hợp cùng probiotic, giúp nâng cao khả năng định cư và sinh trưởng của vi khuẩn có lợi. Trong hệ sinh thái đường ruột, prebiotic không chỉ đóng vai trò là "nguồn thức ăn" mà còn là yếu tố điều tiết hoạt động gen của microbiota, ảnh hưởng đến biểu hiện enzym chuyển hóa, tạo enzyme thủy phân PS, và tương tác với hệ thống miễn dịch ruột thông

qua các receptor như TLR (Toll-like receptors) hay NOD-like receptors [38].

Như vậy, prebiotic là các hợp chất đặc biệt với ba đặc điểm cốt lõi: không bị tiêu hóa, lên men chọn lọc bởi vi sinh vật có lợi, và mang lại lợi ích sinh lý đáng kể. Cơ chế hoạt động của prebiotic, đặc biệt là thông qua quá trình sản sinh SCFAs và điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột, đã mở ra nhiều hướng nghiên cứu và ứng dụng tiềm năng trong y học, dinh dưỡng và công nghệ thực phẩm.

1.2.3. Tiềm năng prebiotic của Cordyceps militaris và Trametes versicolor

Trong số hàng trăm loài nấm dược liệu đã được nghiên cứu, nấm *C. militaris* và nấm *T. versicolor* nổi bật như hai đại diện tiêu biểu nhờ sự đa dạng cấu trúc PS, khả năng sinh tổng hợp hợp chất sinh học có giá trị, và tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực thực phẩm chức năng và dược phẩm hiện đại. Việc lựa chọn hai loài nấm này làm đối tượng nghiên cứu không chỉ dựa trên giá trị truyền thống mà còn dựa vào những bằng chứng khoa học đương đại về hoạt tính sinh học, đặc biệt là tiềm năng prebiotic của PS được chiết xuất từ hệ sợi và quả thể của chúng.

C. militaris là một loài nấm ký sinh thuộc lớp Ascomycetes, có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo, khác với loài *C. sinensis* vốn đòi hỏi điều kiện tự nhiên phức tạp. Nấm này đã được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để tăng cường sinh lực, cải thiện chức năng phổi, gan và thận. Thành phần hóa học chính của nấm *C. militaris* gồm có cordycepin (3’-deoxyadenosine), adenosine, D-mannitol, và đặc biệt là PS hòa tan trong nước có trọng lượng phân tử từ vài chục đến hàng trăm kilodalton. Các PS từ *C. militaris* (CMPs) được chứng minh có cấu trúc đa dạng như glucan, galactomannan và heteropolysaccharide, chứa các monosaccharide như glucose, mannose, galactose, fucose, xylose và arabinose. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy CMPs có khả năng điều biến miễn dịch, kháng oxi hóa, kháng viêm, đồng thời có tác dụng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột, làm tăng các vi khuẩn có lợi như *Lactobacillus* và *Akkermansia muciniphila*. Đặc biệt, CMPs thúc đẩy sản xuất SCFAs mà đặc biệt là butyrate, từ đó cải thiện hàng rào biểu mô ruột và làm giảm viêm đại tràng trên mô hình chuột, gợi mở tiềm năng lớn trong ứng dụng prebiotic.

Ngược lại, *T. versicolor*, hay còn gọi là “nấm đuôi gà tây”, là một loài nấm mục gỗ phổ biến thuộc lớp Basidiomycetes, nổi tiếng với khả năng sản sinh các hợp chất polysaccharide–protein như PSK (Polysaccharide-K) và PSP (Polysaccharide-Peptide). Tại Nhật Bản, PSK đã được công nhận như một dược phẩm bổ trợ điều trị ung thư từ

những năm 1970. Cấu trúc của PSK và PSP chứa nhiều phân tử β-glucan phức hợp với protein, tạo nên hoạt tính sinh học mạnh mẽ trong việc kích hoạt miễn dịch bẩm sinh và thích ứng, thông qua việc tăng biểu hiện cytokine, tăng hoạt động tế bào NK và đại thực bào. Gần đây, các nghiên cứu bắt đầu chú ý đến khả năng điều biến hệ vi sinh vật ruột của PSP, cho thấy nó có thể làm tăng tỷ lệ vi khuẩn sinh SCFAs như *Roseburia*, *Bacteroides*, và *Faecalibacterium*, đồng thời làm giảm *Clostridium* và *Enterococcus* – hai nhóm vi khuẩn liên quan đến viêm đường ruột. Điều này cho thấy *T. versicolor* không chỉ có giá trị dược lý mà còn là nguồn prebiotic tiềm năng, đặc biệt trong phòng ngừa bệnh viêm đường ruột và rối loạn chuyển hóa.

Việc lựa chọn *C. militaris* và *T. versicolor* làm mô hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic là hợp lý vì cả hai đều có thể nuôi trồng nhân tạo ổn định, chiết xuất PS dễ dàng, và được chứng minh có tác dụng điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột thông qua nhiều cơ chế khác nhau. Hơn nữa, chúng đại diện cho hai nhóm nấm có hệ sinh học và sinh hóa khác biệt: *C. militaris* thuộc Ascomycetes với hệ sợi tơ nhỏ mảnh, còn *T. versicolor* thuộc Basidiomycetes với quả thể lớn và chứa nhiều β-glucan. Sự khác biệt này cho phép so sánh trực tiếp hiệu quả prebiotic của PS theo nguồn gốc phân loại và cấu trúc phân tử, từ đó xác định được các đặc tính hóa học liên quan đến hoạt tính sinh học.

1.2.4. Tình hình nghiên cứu về hoạt tính prebiotic

1.2.4.1. Tại Việt Nam

Ở Việt Nam, các nghiên cứu tập trung vào nghiên cứu nuôi trồng và đánh giá chất lượng và hoạt tính quả thể và một số ít hệ sợi nấm. Các công trình nghiên cứu và công bố về prebiotic còn hạn chế. Hiện nay, trên thị trường chủ yếu các sản phẩm có chức năng cải thiện đường ruột được bổ sung prebiotic là từ thực vật như FOS, GOS. Prebiotic vẫn còn khá mới ở nước ta vì vậy cần nhiều hơn các nghiên cứu về nó.

Liều Mỹ Đông và Nguyễn Thúy Hương đã khảo sát ảnh hưởng của Whey Protein và Prebiotic lên tỉ lệ sống sót của *Bifidibacterium bifidum* vi gói trong sữa chua Synbiotic. Kết quả khảo sát cho thấy, pH của mẫu chứa *B. bifidum* tự do có giá trị pH thấp nhất và lượng tế bào sống sót cũng đạt thấp nhất so với mẫu chứa sản phẩm vi gói. Khi canxi-anginat được bao phủ bởi whey protein đã cải thiện hơn 3 log (CFU/g) so với khi không bao phủ. Prebiotic FOS được bổ sung vào sữa chua cũng đã giúp nâng cao sự sống sống của *B. bifidum* trong quá trình bảo quản. Kết quả cũng cho thấy rằng, chế phẩm vi gói canxi-anginat 2%, FOS 2% bao phủ bởi whey protein 10% cho hiệu quả

bảo vệ tốt nhất và đạt tỉ lệ sống sót 97% sau 9 tuần bảo quản và 54% sau khi ủ 5h trong môi trường dạ dày và muối mật [39].

Năm 2017, Vũ Thị Kim Hoa và các cộng sự đã nghiên cứu hiệu quả của việc bổ sung các sản phẩm dinh dưỡng có Probiotic và Prebiotic đến chỉ số miễn dịch, tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp của trẻ 25 – 36 tháng tuổi. Sau 5 tháng nghiên cứu, kết quả chỉ ra rằng: đối với các trẻ được sử dụng sản phẩm Synbiotic thì tình trạng miễn dịch được cải thiện rõ rệt: nồng độ IgA trong máu tăng cao hơn (3,64 mg/mL) và IgA trong phân (48 mg/mL) so với đối chứng. Nhóm Synbiotic giảm số lần cũng như số ngày mắc bệnh tiêu chảy; số ngày mắc nhiễm khuẩn hô hấp ở nhóm dùng Synbiotic cũng giảm đáng kể. Như vậy, sản phẩm có chứa probiotic và prebiotic đã giúp điều hòa miễn dịch và ổn định hệ vi sinh đường ruột của trẻ em [40].

Theo tác giả Trần Hữu Dũng và Nguyễn Hải Thúy đã thực hiện đề tài "Tổng quan về vai trò tinh bột kháng trong kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường type 2". Qua nghiên cứu đã cho thấy với sự hạn chế giải phóng glucose trong ruột non, RS đã tham gia rất hiệu quả trong sự làm giảm đường huyết sau ăn, góp phần hạn chế sự hấp thu cholesterol trong huyết tương và nồng độ thấp hơn, cải thiện độ nhạy cảm insulin thụ thể, tăng cảm giác no, giảm lưu trữ chất béo. Sự lên men và chuyển hóa thành các acid béo mạch ngắn tạo ra nguồn năng lượng thấp trong ruột già đã cho thấy RS có bản chất không phải là các sợi cellulose thông thường. Nghiên cứu về RS ứng dụng trong lĩnh vực khoa học và công nghệ ở nước ta đang vẫn là một tiềm năng rất lớn nhưng cũng đầy thách thức, đặc biệt là các loại RS sử dụng như một nguyên liệu trong chế biến các loại thực phẩm chức năng [41].

1.2.4.2. Trên thế giới

Với những lợi ích sức khỏe thiết thực mà prebiotic mang lại đã có rất nhiều nghiên cứu về phương thức sản xuất, công dụng, khả năng kích thích sinh trưởng của probiotic, cũng như các nguồn nguyên liệu để sản xuất prebiotic. Nhưng những nghiên cứu về nguồn nguyên liệu sản xuất prebiotic chủ yếu là về thực vật, chưa có nhiều nghiên cứu về nấm. Hiện nay, nấm đang được quan tâm như nguồn nguyên liệu sản xuất prebioic mới, an toàn, hiệu quả.

Polysaccharide chiếm 3-8% trong toàn bộ trọng lượng khô và được xem là thành phần chính góp phần tạo nên hoạt tính sinh học của *Cordyceps*, được chia làm hai loại dựa vào vị trí của chúng trong nấm: PS nội bào và PS ngoại bào hay còn gọi là

exopolysaccharide – EPS. PS tham gia tích cực trong việc ngăn chặn sự hình thành và lây lan các khối u, gây ức chế hoạt động của các gốc tự do, kích thích và điều hòa miễn dịch, tham gia phản ứng viêm, kháng oxi hóa v.v…Trong đó hoạt tính kháng oxi hóa đang được quan tâm và nghiên cứu nhiều nhất. PS hiện diện ở thành tế bào và tham gia vào cấu trúc thành phần trong tế bào chất của *Cordyceps* [42]. Các nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định PS chính là thành phần quyết định hoạt tính kháng oxi hóa của *C. militaris*. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã cho thấy rằng dịch nuôi cấy *C. militaris* cũng chứa một lượng lớn exopolysaccharide có hoạt tính sinh học.

Lin và cộng sự (2012) đã nghiên cứu hoạt tính của exopolysaccharide từ *Cordyceps militaris* SU5 – 08, kết quả cho thấy rằng PS có khả năng bắt gốc tự do hydroxyl, superoxide anion và DPPH. Từ đó có thể kết luận rằng PS của *C. militaris* SU5 – 08 là một chất kháng oxi hóa và tăng cường phản ứng miễn dịch tiềm năng [43]. Wei-Ting Chou và cộng sự đã nghiên cứu ứng dụng phần gốc và phần thân nấm như là một nguồn prebiotic. Từ những kết quả nghiên cứu cho thấy các phần thải của nấm như gốc nấm hoặc thân nấm rẻ hơn các nguồn khác và là nguồn mới để khai thác prebiotic [44].

Thornthan Sawangwan và cộng sự đã nghiên cứu đặc tính của prebiotic chiết xuất từ 7 loại nấm ăn khác nhau cho thấy tổng số cacbohydrate và tổng lượng đường khử của nấm *Pleurotus ostreatus* đạt cao nhất lần lượt là 6,7325 ± 0,0261 mg/mL và 2,6737 ± 0,0027 mg/mL. Các đặc tính của prebiotic xác định dựa trên sự kích thích tăng trưởng của probiotic với nhóm vi khuẩn có lợi trong đường ruột, ức chế gây bệnh đối với vi khuẩn có hại và dung nạp đường tiêu hóa. Sự ức chế gây bệnh thể hiện qua đường kính vòng và vùng ức chế rộng nhất của *Salmonella typhi* trong môi trường có bổ sung dịch chiết từ nấm *P. ostreatus* [45].

Ganoderma lucidum (nấm Linh chi) và *Poria cocos* (nấm Phục linh) là các loại nấm dược liệu được sử dụng phổ biến trong Y học cổ truyền Trung Quốc và được tiêu thụ như các loại thực phẩm chức năng. Các polysaccharide (PS) chiết xuất từ thể quả và hệ sợi nấm được cấp cho chuột C57BL/6J (6 tuần tuổi) qua đường uống mỗi ngày với liều lượng 750 mg/kg trong vòng 15 ngày. Sau đó, hệ vi sinh vật đường ruột (Gut microbiota - GM) của chuột được phân tích thông qua kỹ thuật ERIC-PCR và giải trình tự amplicon rRNA 16S. Tổng cộng có 2,59 triệu đoạn đọc chất lượng cao (> 200 bp) đã được xử lý để lập hồ sơ cấu trúc hệ vi sinh vật. Kết quả cho thấy việc bổ sung PS làm giảm đáng kể ($p < 0,01$) số lượng đơn vị phân loại hoạt động (OTU) và mức độ đa dạng sinh học của hệ vi sinh vật đường ruột. Đáng chú ý, sự phong phú của các chủng vi

khuẩn liên quan đến khả năng chống béo phì, sinh tổng hợp SCFA, phân giải polysaccharide/xylan và sản sinh acid lactic đã tăng lên một cách có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở nhóm chuột được điều trị bằng PS. Nghiên cứu này kết luận rằng các PS từ hai loại nấm trên đóng vai trò như các prebiotic, giúp điều hòa cấu trúc hệ vi sinh vật đường ruột, từ đó góp phần tạo nên các đặc tính nâng cao sức khỏe của *G. lucidum* và *P. cocos* [46]. Gần đây, Mitsou và cs. (2020) đã nghiên cứu về tác động của β-glucan trong nấm ăn tới hệ vi sinh vật đường ruột lão hóa. Kết quả thấy rằng β-glucan có thể phát huy tác dụng có lợi trong việc khôi phục hệ vi sinh vật đường ruột và SCFAs ở người cao tuổi [28].

Polysaccharide là một trong những thành phần hoạt tính sinh học chủ yếu làm nên dược tính của nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*). Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá khả năng hệ vi sinh vật đường ruột ở người lên men PS chiết xuất từ *G. lucidum* (GLP), đồng thời khảo sát tiềm năng prebiotic của hợp chất này thông qua hệ thống Mô phỏng Hệ sinh thái vi sinh vật đường ruột người (SHIME). Hợp chất GLP được chiết xuất từ thể quả của *G. lucidum* có trọng lượng phân tử trung bình đạt 133,1 kDa. Quá trình lên men GLP in vitro mô phỏng môi trường ruột kết trong thời gian ngắn cho thấy sự sụt giảm liên tục của hàm lượng carbohydrate tổng số, đường khử cũng như giá trị pH. Phân tích bằng sắc ký khí (GC) chỉ ra rằng GLP thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFA), cụ thể là acid axetic, acid propionic và acid butyric. Bên cạnh đó, phân tích giải trình tự amplicon 16S rDNA cho thấy GLP giúp cải thiện mức độ đa dạng của quần xã vi sinh vật, làm gia tăng tỷ lệ ngành Bacteroidetes so với Firmicutes, đồng thời làm tăng đáng kể sự phong phú của các chủng *Bacteroides ovatus* và *Bacteroides uniformis*. Tóm lại, GLP có khả năng được hệ vi sinh vật đường ruột ở người sử dụng làm cơ chất, từ đó điều biến cấu trúc quần thể và chức năng trao đổi chất của hệ vi sinh vật này. Do đó, GLP mang tiềm năng lớn để được ứng dụng như một prebiotic mới nhằm nâng cao sức khỏe con người [44].

Hiện nay, các nhà khoa học trong và ngoài nước đang tập trung nghiên cứu điều kiện nuôi cấy nhằm thu sinh khối sợi nấm với hiệu suất cao. Bên cạnh đó, việc phân tích, đánh giá tầm quan trọng của các hợp chất trong hệ sợi và quả thể nấm thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học. Chính vì vậy, đã có nhiều công bố có tính khoa học và thực tiễn để tiến tới sản xuất công nghiệp tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cũng như nhu cầu sức khỏe của con người. Hiện nay, các sản phẩm bổ sung nhằm cải thiện sức khỏe đường ruột chủ yếu chiết xuất từ thực vật. Nhiều nghiên

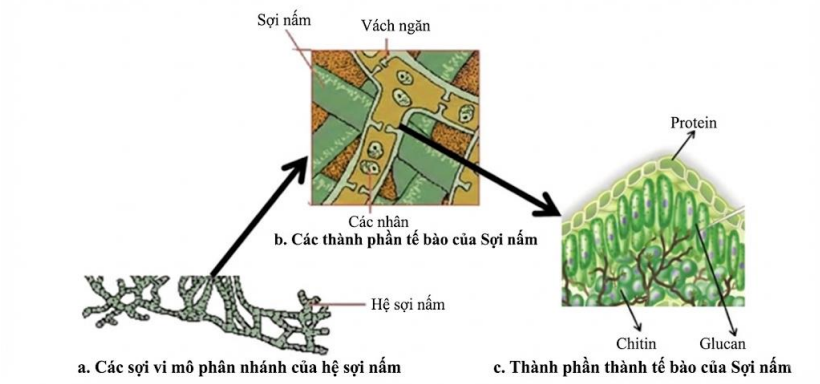
cứu trên thế giới cho thấy PS chiết xuất từ nấm có khả năng kích thích probiotic và ức chế vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là ß-glucan từ sợi nấm. Vì vậy, việc đa dạng nguồn cơ chất sản xuất, tạo ra sản phẩm có hoạt tính sinh học cao cải thiện sức khỏe sinh vật chủ là vấn đề hết sức cấp thiết. Kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính prebiotic từ sợi nấm là một trong những giải pháp hữu ích làm đa dạng nguồn prebiotic cung cấp cho công nghệ dược phẩm, thực phẩm và ứng dụng trong chăn nuôi. Tăng sự đa dạng và nâng cao hoạt tính các loại prebiotic, đồng thời giảm thời gian nuôi trồng và chi phí sản xuất là mục tiêu mà các nhà khoa học đang hướng đến.

1.3. Tổng quan về polysaccharide trong nấm và các phương pháp chiết xuất

1.3.1. Polysaccharide trong quả thể và hệ sợi nấm

Trong giới tự nhiên, nấm dược liệu là kho tàng sinh học phong phú với nhiều hoạt chất, trong đó PS đóng vai trò nổi bật. Đặc biệt, các PS có nguồn gốc từ *Trametes versicolor* (nấm Vân chi) và *Cordyceps militaris* (Đông trùng hạ thảo) đã được nghiên cứu rộng rãi nhờ các đặc tính sinh học đa dạng như tăng cường miễn dịch, chống viêm, Kháng oxi hóa, chống ung thư và điều hòa chuyển hóa. Trên thế giới, nghiên cứu về PS nấm đã phát triển thành một hệ thống toàn diện, bao phủ từ tách chiết, xác định cấu trúc phân tử phức tạp bằng các kỹ thuật cao cấp (NMR, HPSEC), đến đánh giá cơ chế tác động lên tế bào thông qua các thụ thể miễn dịch như Dectin-1 và TLR2/4 [47,48]. Với tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm, hai loài nấm này đã trở thành trọng tâm của nhiều công trình khoa học trên toàn thế giới. Tại Việt Nam, nghiên cứu về PS từ nấm trong những năm gần đây đã có nhiều khởi sắc, tập trung vào các loài có giá trị như *Ganoderma lucidum* (linh chi) và *Cordyceps militaris*.

Hệ sợi nấm là một dạng vật liệu sinh học tự nhiên, được cấu thành chủ yếu từ mạng lưới các polymer sinh học như chitin, glucan và protein [49]. Sinh lý sợi nấm ở các giai đoạn khác nhau được thể hiện ở hình sau:



Hình 1.3. Sơ đồ biểu diễn sinh lý hệ sợi nấm

(Nguồn: Rathore và cs. (2019) [49])

Trong *T. versicolor*, các PS chủ yếu tồn tại dưới dạng phức hợp protein-polysaccharide, nổi bật nhất là PSK (Polysaccharide-Krestin) và PSP (Polysaccharide Peptide). PSK là một β-glucan liên kết với protein, có cấu trúc mạch chính β-(1→4) glucopyranose và nhánh β-(1→3), β-(1→6). PSP có cấu trúc tương tự và được biết đến như một chất kích thích miễn dịch mạnh mẽ, đây là minh chứng rõ ràng cho mối quan hệ giữa cấu trúc (liên kết với protein, độ phân nhánh) và chức năng sinh học, một hướng nghiên cứu then chốt trên thế giới [50]. PSK đã được phê duyệt như một liệu pháp bổ trợ trong điều trị ung thư tại Nhật Bản từ những năm 1970, được sử dụng kết hợp với hóa trị cho bệnh nhân ung thư đường tiêu hóa và phổi. Nhiều nghiên cứu lâm sàng đã cho thấy PSK có khả năng kéo dài thời gian sống và giảm tái phát ung thư thông qua việc kích hoạt các tế bào miễn dịch như tế bào T, tế bào NK và đại thực bào, đồng thời điều hòa sản xuất cytokine [51].

Bên cạnh đó, PSP cũng thể hiện tác dụng sinh học ấn tượng. Nó đã được chứng minh có khả năng bảo vệ tế bào khỏi tổn thương do stress oxi hóa, đồng thời làm giảm các chỉ số viêm trong mô hình chuột thí nghiệm. Một polysaccharide khác từ nấm *T. versicolor* có tên Tramesan được chiết xuất từ dịch nuôi cấy và cho thấy khả năng kháng oxi hóa mạnh, thông qua việc trung hòa các gốc tự do và làm tăng hoạt động của enzyme kháng oxi hóa nội sinh [52]. Ngoài ra, các nghiên cứu gần đây còn ghi nhận khả năng của PS từ nấm vân chi trong việc giảm lipid máu, cải thiện chuyển hóa lipid thông qua ức chế biểu hiện các gene như SREBP-1c và FAS trong mô hình chuột tăng lipid máu [53].

Ngược lại, *C. militaris* cũng sở hữu hệ PS phong phú không kém, mặc dù có cấu trúc khác biệt. Các PS của loài nấm này chủ yếu là β-(1→3)-glucan và α-(1→4)-glucan, với nhiều phân tử có trọng lượng phân tử cao và cấu trúc phân nhánh phức tạp. Một trong những PS được nghiên cứu nhiều là CM1, được phân lập từ quả thể và sợi nấm, thể hiện hoạt tính chống viêm và điều hòa chuyển hóa lipid. CM1 đã được chứng minh có khả năng giảm cholesterol và triglyceride máu trong mô hình chuột mắc hội chứng chuyển hóa, đồng thời làm giảm biểu hiện các yếu tố phiên mã liên quan đến tích lũy mỡ như PPARγ và C/EBPα [54]. Các nghiên cứu quốc tế đã chứng minh PS từ nấm *C. militaris* có khả năng kích hoạt mạnh mẽ đại thực bào RAW 264.7 thông qua các con

đường NF-κB và MAPK [8,55]. Tại Việt Nam, các nghiên cứu cũng đã khảo sát điều kiện nuôi cấy chìm tối ưu để sản xuất PS từ *C. militaris* và *T. versicolor*, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nước [56].

Ngoài ra, polysaccharide CP2-S được chiết xuất từ bào tử của *C. militaris* cho thấy khả năng kích hoạt miễn dịch rất mạnh mẽ. Trong các thí nghiệm in vitro, CP2-S làm tăng sản xuất nitric oxide (NO), TNF-α và IL-6 từ đại thực bào RAW264.7, chứng tỏ tác động rõ rệt đến hệ miễn dịch bẩm sinh [57]. Đặc biệt, CP2-S còn được đánh giá có khả năng kháng oxi hóa thông qua việc ức chế các con đường tín hiệu viêm như NF-κB và MAPK, giúp làm giảm tổn thương mô do viêm mãn tính gây ra. Cũng giống như *T. versicolor*, các PS từ *C. militaris* thể hiện khả năng ức chế mạnh các cytokine viêm như IL-1β, IL-6 và TNF-α trong mô hình gây viêm bằng LPS, từ đó cho thấy triển vọng trong việc hỗ trợ điều trị các bệnh viêm mãn tính như viêm đại tràng, viêm khớp và xơ vữa động mạch [57].

Không chỉ dừng lại ở các đặc tính dược lý, PS từ hai loài nấm trên còn đang được khai thác trong lĩnh vực công nghệ thực phẩm và mỹ phẩm. Trong một nghiên cứu gần đây, chiết xuất PS từ *C. militaris* đã được ứng dụng vào sản phẩm kem dưỡng da và thử nghiệm trên người tình nguyện. Kết quả cho thấy chiết xuất có tính ổn định, không gây kích ứng da và giúp cải thiện độ ẩm cũng như độ đàn hồi của da. Trong khi đó, PS từ *T. versicolor* đang được nghiên cứu như một thành phần có thể tích hợp vào thực phẩm chức năng dạng bột hoặc viên nang nhằm tăng cường miễn dịch và chống lão hóa [58].

Một điểm chung đáng lưu ý là cả hai loài đều cho thấy hoạt tính sinh học phụ thuộc rất lớn vào cấu trúc phân tử của PS. Trọng lượng phân tử, mức độ phân nhánh, loại liên kết glycosidic và tỷ lệ kết hợp với protein đều ảnh hưởng mạnh đến hiệu quả sinh học. Ví dụ, các PS có nhánh β-(1→6) thường hoạt hóa miễn dịch mạnh hơn so với dạng chuỗi β-(1→3) đơn thuần. Bên cạnh đó, việc tối ưu hóa quy trình chiết tách như chiết nước nóng, chiết kiềm, hoặc chiết xuất có hỗ trợ của enzyme đóng vai trò thiết yếu để thu nhận sản phẩm có hoạt tính cao và độ tinh sạch phù hợp cho ứng dụng công nghiệp [59]. Tuy nhiên, trong khi nghiên cứu quốc tế đã đi sâu vào phân tích các mối quan hệ cấu trúc-chức năng này, thì phần lớn nghiên cứu trong nước vẫn còn thiếu các phân tích cấu trúc chi tiết (thành phần monosaccharide, liên kết glycosidic, NMR) và mới dừng lại ở đánh giá hoạt tính sơ bộ [60].

Bảng 1.3. Cấu trúc của glucan phân lập từ một số loại nấm

Tên loài nấm	Đơn vị lặp lại của glucan	Tài liệu tham khảo
Pleurotus florida	→3)-α-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→ 6 ↑ 1 α-D-Glcp	[61]
Lentinus squarrosulus	→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→ 6 ↑ 1 β-D-Glcp	[62]
Calocybe indica	→[6)-β-D-Glcp-(1]$_2$→4)-β-D-Glcp-(1→[4]-α-D-Glcp-(1]$_2$→ 6 ↑ 1 β-D-Glcp	[63]
Russula albonigra	→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→ 6 ↑ 1 α-D-Glcp-(3→1)-α-D-Glsp	[64]
Ramaria botrytis	→6)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→ 3 ↑ 1 β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glsp	[65]
Tricholoma crassum	→3)-β-D-Glcp-(1→3)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→6)-β-D-Glcp-(1→ 6 ↑ 1 β-D-Glsp	[66]

Từ những nghiên cứu về polysaccharide trong nấm, có thể nhận thấy rằng hoạt tính của nấm phần lớn do các PS đảm nhận. Quả thể nấm và sợi nấm như một nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất các sản phẩm bảo vệ sức khỏe với những công dụng đã được chứng minh: Kháng oxi hóa, kháng khuẩn, hạ đường huyết, giảm cholesterol, chống ung thư, kháng viêm…

Polysaccharide từ *T. versicolor* và *C. militaris* là những hợp chất tự nhiên đầy tiềm năng, không chỉ trong lĩnh vực y học cổ truyền mà còn trong công nghệ thực phẩm hiện đại. Các nghiên cứu hiện tại đã làm rõ nhiều khía cạnh về cấu trúc và cơ chế tác dụng của các hợp chất này, nhưng vẫn còn nhiều khoảng trống trong việc đánh giá lâm sàng, độc tính lâu dài và hiệu quả phối hợp với các liệu pháp điều trị khác. Với sự hỗ trợ của công nghệ sinh học và phân tích hiện đại, tương lai của các PS nấm trong lĩnh vực chăm sóc sức khỏe và phòng bệnh hứa hẹn sẽ ngày càng mở rộng.

Polysacchride từ nấm dược liệu đã thu hút sự quan tâm sâu rộng của cộng đồng khoa học toàn cầu nhờ vào tiềm năng dược lý đa dạng như kháng oxi hóa, kháng viêm, tăng cường miễn dịch và hỗ trợ điều trị ung thư. Tuy nhiên, khi so sánh tình hình nghiên cứu về PS từ nấm tại Việt Nam với các nước phát triển, có thể thấy rõ những khoảng cách nhất định về chiều sâu khoa học, kỹ thuật phân tích và khả năng thương mại hóa. Ở cấp độ quốc tế, các nghiên cứu đã phát triển một hệ thống nghiên cứu toàn diện, bao phủ toàn bộ chuỗi giá trị từ tách chiết, tinh chế, xác định cấu trúc phân tử, đánh giá cơ chế sinh học đến ứng dụng lâm sàng và công nghiệp hóa. Các nghiên cứu không chỉ chiết xuất PS từ *C. militaris* và *G. lucidum* mà còn đi sâu vào phân tích cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), sắc ký phân tử cao áp (HPSEC), và xác định cơ chế tác động lên tế bào miễn dịch thông qua các thụ thể như TLR4 hoặc Dectin-1. Nhiều nghiên cứu quốc tế còn tiến hành thử nghiệm *in vivo*, *in vitro*, đánh giá độc tính và tiềm năng điều trị trên mô hình động vật và người. Hơn thế nữa, các sản phẩm PS đã được ứng dụng thành công trong dược phẩm, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm tại thị trường châu Á, châu Âu và Bắc Mỹ.

Ngược lại, tại Việt Nam, phần lớn các nghiên cứu vẫn tập trung ở mức cơ bản hoặc trung gian, chủ yếu xoay quanh việc tối ưu hóa điều kiện chiết xuất (như nhiệt độ, pH, thời gian, tỷ lệ dung môi), sử dụng một số kỹ thuật mới như hỗ trợ enzyme, siêu âm, hoặc kết hợp cả hai. Các hoạt tính sinh học được kiểm định chủ yếu là khả năng kháng oxi hóa (DPPH, ABTS), kháng khuẩn và chống viêm sơ cấp. Tuy nhiên, các phân tích chuyên sâu về cấu trúc phân tử như xác định liên kết glycosidic, khối lượng phân tử, hoặc chuỗi phân tử vẫn còn hiếm hoi. Các công bố chủ yếu xuất hiện tại hội nghị khoa học hoặc tạp chí trong nước, ít được quốc tế hóa, điều này làm hạn chế khả năng lan tỏa và đối thoại khoa học toàn cầu. Một điểm yếu khác là sự thiếu vắng mối liên kết giữa nghiên cứu và doanh nghiệp trong nước, dẫn đến kết quả nghiên cứu khó được ứng dụng vào quy trình sản xuất thực tế. Trong khi đó, ở nhiều nước phát triển, các công trình

khoa học thường gắn với dự án R&D của các công ty dược phẩm, mỹ phẩm hoặc thực phẩm chức năng, từ đó rút ngắn thời gian thương mại hóa sản phẩm và tạo ra chuỗi giá trị rõ ràng. Vì vậy, việc nghiên cứu cơ sở lí luận, tìm kiếm các dung môi, phương pháp tách chiết PS sợi nấm phù hợp với điều kiện thực tiễn là hướng đi phù hợp, đáp ứng việc khai thác hiệu quả các nguồn PS tự nhiên phục vụ cho nghiên cứu và phát triển sản phẩm giàu PS là thật sự cần thiết.

1.3.2. Các phương pháp chiết xuất polysaccharide từ nấm

Hiện nay, các kỹ thuật chiết xuất rất đa dạng, từ các phương pháp truyền thống như chiết nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE), chiết acid (AEc) đến các phương pháp hiện đại hỗ trợ bởi công nghệ như enzyme (EAE), siêu âm (UAE) và vi sóng (MAE). Sự lựa chọn phương pháp phụ thuộc vào đặc tính cấu trúc của polysaccharide mục tiêu (độ tan, liên kết), quy mô sản xuất và yêu cầu về độ tinh khiết cũng như hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng. Mỗi phương pháp đều hoạt động dựa trên nguyên lý riêng biệt nhằm phá vỡ tế bào nấm, tuy nhiên, quy trình tổng thể thường tuân theo một trình tự logic chung để đảm bảo thu hồi tối đa lượng polysaccharide thô.

Các nghiên cứu trên thế giới thường áp dụng linh hoạt và so sánh nhiều phương pháp để tìm ra giải pháp tối ưu cho từng loại nấm. Trong khi đó, nghiên cứu tại Việt Nam đã bắt đầu tiếp cận các phương pháp hiện đại. Ví dụ, Do và cộng sự (2021) đã kết hợp siêu âm và enzyme (UAEE) để chiết PS từ *G. lucidum*, cho hiệu suất cao hơn 42% so với HWE truyền thống. Tương tự, nghiên cứu của Suong và cộng sự (2015) cũng tối ưu hóa chiết xuất PS từ linh chi bằng EAE [67]. Tuy nhiên, dù sử dụng tác nhân phá vỡ tế bào khác nhau, quy trình chiết tách polysaccharide từ sợi nấm đều tuân theo các bước cơ bản sau [68–71].

Bước 1: Chuẩn bị và xử lý nguyên liệu

Quả thể hoặc hệ sợi nấm được làm sạch, sấy khô (thường sấy ở 40–60°C hoặc sấy thăng hoa) để loại bỏ nước.

Nghiền nguyên liệu thành bột mịn (kích thước < 1 mm) nhằm gia tăng diện tích tiếp xúc bề mặt giữa bột nấm và dung môi. Các nghiên cứu trong nước như của Phạm Châu Huỳnh và cộng sự (2021) đã chỉ ra tầm quan trọng của việc tối ưu kích thước bột (≤ 2 mm) và tỷ lệ dung môi để tăng hiệu suất [72].

Tùy chọn: Loại bỏ chất béo và sắc tố bằng cách ngâm với ethanol hoặc ether trước khi chiết (nếu cần sản phẩm có độ tinh khiết cao).

Bước 2: Quá trình chiết xuất: Tại giai đoạn này, sinh khối bột nấm được xử lý bằng hệ dung môi và các tác nhân xúc tác phù hợp nhằm phá vỡ cấu trúc vách tế bào, qua đó giải phóng và thu hồi tối đa hàm lượng polysaccharide.

HWE: Đun với nước nóng (90–100°C)

AE/AEc: Ngâm trong dung dịch kiềm hoặc acid (kèm gia nhiệt).

EAE: Ủ với enzyme đặc hiệu (Cellulase, Protease...) ở nhiệt độ và pH thích hợp.

UAE/MAE: Xử lý bằng sóng siêu âm hoặc vi sóng trong dung môi nước.

Bước 3: Tách cặn và xử lý dịch chiết

Ly tâm (4000–8000 rpm) hoặc lọc để loại bỏ phần bã rắn (chitin, tế bào chưa vỡ). Thu lấy phần dịch trong.

Lưu ý: Đối với chiết kiềm/acid, cần trung hòa dịch chiết về pH 7,0. Đối với chiết enzyme, cần gia nhiệt nhanh (100°C) để bất hoạt enzyme.

Bước 4: Cô đặc và kết tủa

Cô quay chân không dịch chiết ở nhiệt độ thấp (40–60°C) để giảm thể tích (còn 1/3 hoặc 1/4 thể tích ban đầu).

Thêm Ethanol 96% (hoặc Methanol) lạnh vào dịch cô đặc với tỷ lệ 3–5 lần thể tích dịch (đạt nồng độ cồn cuối khoảng 80%).

Ủ lạnh ở 4°C qua đêm (8–12 giờ) để polysaccharide kết tủa hoàn toàn.

Bước 5: Thu hồi Polysaccharide thô

Ly tâm hoặc lọc lấy phần kết tủa.

Rửa tủa 2–3 lần bằng ethanol, acetone để loại bỏ nước, muối dư và các tạp chất phân tử lượng thấp.

Sấy khô (ưu tiên sấy đông khô) để thu được chế phẩm polysaccharide thô dạng bột, sẵn sàng cho các bước tinh sạch hoặc phân tích tiếp theo.

Bước 6: Tinh sạch (Tùy chọn)

Loại protein (phương pháp Sevag), loại muối (thẩm tích), hoặc tách phân đoạn (sắc ký).

- Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất

Bảng 2.1. Ưu nhược điểm của các phương pháp chiết xuất

Phương pháp	Nguyên lý hoạt động	Ưu điểm	Nhược điểm
Chiết nước nóng (HWE)	Phá vỡ tế bào bằng nhiệt, hòa tan PS tan trong nước.	- Thiết bị đơn giản, chi phí thấp. - An toàn, không độc hại. - Dễ triển khai quy mô công nghiệp.	- Thời gian chiết dài, tiêu tốn năng lượng. - Hiệu suất thấp với các PS liên kết chặt. - Độ chọn lọc thấp.
Chiết Kiềm (AE)	Dùng OH^- phá vỡ liên kết hydro/ester trong thành tế bào.	- Hiệu suất cao, thu hồi tốt các β-glucan không tan trong nước. - Phù hợp chiết kiệt sau bước HWE.	- Dễ gây đứt gãy mạch, giảm khối lượng phân tử. - Cần trung hòa (gây nhiễm muối). - Hóa chất gây ăn mòn, xử lý thải phức tạp.
Chiết Acid (AEc)	Dùng H^+ thủy phân một phần thành tế bào.	- Thu hồi tốt các PS acid hoặc sulfat hóa. - Hỗ trợ thủy phân tạo oligosaccharide cho nghiên cứu cấu trúc.	- Nguy cơ thủy phân quá mức làm mất hoạt tính. - Kém chọn lọc, lẫn nhiều tạp chất. - Ít được dùng làm phương pháp chính.
Hỗ trợ enzyme (EAE)	Enzyme thủy phân đặc hiệu thành phần vách tế bào.	- Điều kiện êm dịu, bảo toàn cấu trúc tự nhiên. - Tính chọn lọc cao, ít tạp chất. - Thân thiện môi trường.	- Chi phí enzyme cao. - Quy trình phức tạp (cần kiểm soát pH, nhiệt độ chặt chẽ).

Phương pháp	Nguyên lý hoạt động	Ưu điểm	Nhược điểm
			- Khó áp dụng đại trà quy mô lớn.
Hỗ trợ siêu âm (UAE)	Hiệu ứng xâm thực (cavitation) phá vỡ cơ học tế bào.	- Rút ngắn thời gian đáng kể. - Nhiệt độ thấp, bảo vệ hoạt chất. - Tiết kiệm dung môi.	- Sóng siêu âm mạnh có thể cắt mạch polymer. - Khó đồng nhất năng lượng khi mở rộng quy mô lớn. - Chi phí thiết bị cao hơn HWE.
Hỗ trợ vi sóng (MAE)	Gia nhiệt nội tại nhanh chóng do ma sát phân tử.	- Thời gian cực nhanh (tính bằng phút). - Hiệu suất cao, gia nhiệt đồng đều từ bên trong. - Tiết kiệm năng lượng.	- Nguy cơ quá nhiệt cục bộ gây phân hủy PS. - Thiết bị chuyên dụng đắt tiền. - Chưa phù hợp cho quy mô sản xuất lớn.

Trên cơ sở phân tích các ưu nhược điểm của các phương pháp chiết ở trên, để phân đoạn được các loại polysaccharide từ nấm, kỹ thuật chiết tuần tự bằng nước nóng, acid và kiềm được sử dụng vì những lý do sau:

- Các phương pháp chiết truyền thống – chiết bằng nước nóng (HWE), chiết kiềm (AE) và chiết acid (AEc) – đã được áp dụng phổ biến trong nhiều thập kỷ trong lĩnh vực hóa sinh và công nghệ dược liệu. Chúng là những phương pháp kinh điển được trích dẫn rộng rãi trong các công bố quốc tế về chiết tách polysaccharide từ nấm (*Ganoderma*, *Pleurotus*, *Cordyceps*, *Tremella*...). Việc lựa chọn các phương pháp này đảm bảo tính khả lặp và độ tin cậy, giúp kết quả nghiên cứu dễ dàng được so sánh, đối chiếu với các công trình trước, đồng thời tăng giá trị khoa học khi công bố. Trong khi đó, các phương pháp hiện đại như EAE, UAE hay MAE dù có tiềm năng nhưng còn tương đối mới, dữ liệu so sánh và chuẩn hóa chưa nhiều, khiến kết quả nghiên cứu khó đặt trong hệ quy chiếu rộng [71].

Đây là các phương pháp kinh điển được sử dụng và trích dẫn rộng rãi trong các công bố quốc tế về PS nấm. Việc áp dụng chúng đảm bảo tính khả lặp, giúp kết quả dễ dàng được so sánh, đối chiếu với các công trình trước đó.

Việc chiết tuần tự bằng HWE, AE và AEc cho phép chiết tách toàn diện hơn các loại polysaccharide. Tuy nhiên, quá trình chiết acid (HCl) và kiềm (Na_2CO_3) tuy tăng hiệu suất nhưng có nguy cơ gây đứt gãy mạch phân tử polymer, làm giảm khối lượng phân tử và thay đổi cấu trúc không gian của PS thô.

HWE thu hồi hiệu quả các polysaccharide tan trong nước, thường là β-glucan và heteropolysaccharide – nhóm có hoạt tính sinh học chính.

AE giúp giải phóng các β-glucan gắn chặt trong thành tế bào, vốn không thể chiết ra bằng nước nóng. Các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ rõ *T. versicolor* và *C. militaris* có chứa cả PS tan trong nước (như β-glucan hoạt tính miễn dịch) và các PS liên kết chặt trong thành tế bào cần kiềm để giải phóng.

AEc đặc biệt phù hợp để tách các polysaccharide mang tính acid (chứa nhóm uronic acid hoặc sulfate), vốn ít tan trong dung môi trung tính hoặc kiềm.

Sự kết hợp ba phương pháp này cho phép khai thác hầu như toàn bộ phổ polysaccharide (water-soluble, alkali-soluble, acid-soluble) của nấm. Ngược lại, EAE, UAE và MAE thường chỉ ưu tiên tăng hiệu suất thu hồi ở một dạng nhất định, nhưng chưa đủ sức bao quát toàn bộ các phân đoạn quan trọng này.

- So với các phương pháp hiện đại (EAE, UAE, MAE) đòi hỏi chi phí cao cho enzyme, thiết bị chuyên dụng và quy trình tối ưu phức tạp, ba phương pháp truyền thống có ưu thế rõ rệt về tính ứng dụng thực tế. Chúng chỉ yêu cầu hóa chất phổ thông và thiết bị cơ bản, phù hợp với điều kiện trang thiết bị và nguồn lực tại nhiều phòng thí nghiệm, viện nghiên cứu và có tiềm năng mở rộng sản xuất tại Việt Nam.

- Một lý do quan trọng để lựa chọn HWE, AE và AEc là chúng cho phép kiểm soát tốt quá trình chiết, hạn chế nguy cơ phân mảnh polysaccharide. Các phương pháp hiện đại như UAE và MAE, do sử dụng cavitation hoặc vi sóng công suất cao, dễ gây cắt mạch polysaccharide, làm giảm khối lượng phân tử và thay đổi đặc tính sinh học. Trong khi đó, EAE có thể gây thủy phân quá mức nếu không tối ưu hóa điều kiện, làm biến đổi hoạt tính tự nhiên của polysaccharide. Với HWE, AE và AEc, mặc dù vẫn có nguy cơ biến tính khi đun lâu, nhưng quá trình thủy phân có thể kiểm soát tốt bằng điều chỉnh nhiệt độ, nồng độ dung môi và thời gian.

- Ngoài ra HWE, AE và AEc có chi phí thấp và không phụ thuộc vào nguồn cung đặc biệt. Chúng chỉ cần hóa chất và thiết bị cơ bản, phù hợp với điều kiện nghiên cứu tại nhiều phòng thí nghiệm trong nước.

* Tóm lại, việc áp dụng hệ thống chiết xuất tuần tự bằng nước nóng (HWE), dung dịch kiềm (AE) và dung dịch acid (AEc) là một hướng tiếp cận bám sát mục tiêu của luận án. Các phương pháp này cho phép phân lập được các phân đoạn polysaccharide có bản chất liên kết khác nhau trong màng tế bào. Do đó, việc lựa chọn hệ dung môi này đóng vai trò then chốt trong việc xây dựng một quy trình thu nhận polysaccharide chuẩn hóa, tạo tiền đề vững chắc cho các ứng dụng thực tiễn ở quy mô công nghiệp.

1.4. Phương pháp nuôi cấy dịch thể

1.4.1. Giới thiệu về nuôi cấy dịch thể

Kỹ thuật nuôi cấy dịch thể (SmF) hay còn gọi là lên men dịch thể là một phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng dinh dưỡng, được khuấy trộn và sục khí nhằm tối ưu hóa sự phát triển của tế bào và/hoặc sự tạo thành các hợp chất chuyển hóa. Đây là kỹ thuật phổ biến và được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất các sản phẩm sinh học như enzyme, acid hữu cơ, kháng sinh, PS, các hợp chất hoạt tính sinh học và sinh khối vi sinh vật, đặc biệt là nấm dược liệu [73].

Khác với phương pháp lên men thể rắn (SSF), nuôi cấy dịch thể cho phép kiểm soát tốt hơn các yếu tố môi trường như pH, nhiệt độ, oxy hòa tan, tốc độ khuấy trộn và thông khí. Sự kiểm soát chính xác này giúp tối ưu hóa sự sinh trưởng của vi sinh vật cũng như năng suất sản phẩm [74]. Ngoài ra, quá trình lên men dịch thể thường có thời gian nuôi cấy ngắn hơn, hiệu suất thu hồi sinh khối cao hơn, và dễ dàng mở rộng quy mô công nghiệp nhờ vào hệ thống bioreactor hiện đại [75]. Trong lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng dược liệu, kỹ thuật nuôi cấy dịch thể đã được áp dụng để sản xuất sinh khối và các hợp chất thứ cấp từ nấm dược liệu như *G. lucidum*, *C. militaris* và *T. versicolor* [76]. Quá trình này không chỉ tạo ra sinh khối nấm giàu hoạt chất mà còn có thể điều chỉnh điều kiện nuôi cấy để tăng cường sản sinh PS, triterpenoid hay các hợp chất kháng oxi hóa.

Một trong những lợi ích quan trọng của nuôi cấy dịch thể là tính khả thi trong việc tự động hóa và kiểm soát quá trình. Việc ứng dụng các công nghệ cảm biến, hệ thống điều khiển tự động và phân tích theo thời gian thực đã giúp cải thiện hiệu suất sản xuất và giảm thiểu sai sót trong quy trình. Bên cạnh đó, SmF còn thuận lợi trong việc thu hoạch sinh khối và chiết tách các hợp chất sinh học nhờ môi trường lỏng đồng nhất,

giảm chi phí sản xuất và nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm [77]. Tuy nhiên, kỹ thuật này cũng có một số hạn chế như chi phí đầu tư ban đầu cao, yêu cầu thiết bị phức tạp và cần kiểm soát nghiêm ngặt các điều kiện môi trường. Ngoài ra, một số loài vi sinh vật hoặc chủng nấm đặc thù có thể không thích nghi tốt với điều kiện nuôi cấy lỏng, làm ảnh hưởng đến hiệu suất sản xuất. Do đó, việc lựa chọn chủng giống, thiết kế môi trường nuôi cấy và tối ưu hóa các thông số kỹ thuật là những yếu tố then chốt trong thành công của SmF.

Có thể nói rằng kỹ thuật nuôi cấy dịch thể là một công cụ mạnh mẽ trong sinh học công nghiệp và công nghệ sinh học, với tiềm năng lớn trong việc sản xuất quy mô lớn các sản phẩm sinh học có giá trị cao. Trong bối cảnh phát triển công nghệ và nhu cầu sản phẩm tự nhiên ngày càng tăng, việc tiếp tục nghiên cứu, cải tiến và tối ưu hóa kỹ thuật SmF là rất cần thiết.

1.4.2. Ưu điểm của nuôi cấy dịch thể

Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng các loại nấm dược liệu như *C. militaris, G. lucidum, T. versicolor* và *L. edodes* ngày càng tăng mạnh do tiềm năng sinh học đa dạng như kháng oxi hóa, tăng cường miễn dịch, chống ung thư, và điều hòa chuyển hóa. Tuy nhiên, việc sản xuất quả thể tự nhiên hoặc trên cơ chất rắn gặp nhiều thách thức về thời gian, năng suất, và kiểm soát chất lượng. Trong bối cảnh đó, kỹ thuật nuôi cấy dịch thể đã nổi lên như một giải pháp ưu việt, đặc biệt trong việc sản xuất sinh khối hệ sợi và hợp chất hoạt tính từ nấm dược liệu ở quy mô công nghiệp.

Một trong những ưu điểm lớn nhất của nuôi cấy dịch thể là khả năng kiểm soát chính xác các điều kiện môi trường như pH, nhiệt độ, nồng độ oxy hòa tan, tốc độ khuấy và sục khí. Điều này giúp tối ưu hóa sự sinh trưởng và chuyển hóa của nấm dược liệu. Theo Papagianni (2004), sự kiểm soát này không chỉ đảm bảo sự ổn định của quá trình lên men mà còn ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất sinh khối và chất lượng của các hợp chất thứ cấp như polysaccharide, triterpenoid, và sterol [77].

So với nuôi cấy trên cơ chất rắn, SmF cho hiệu suất sinh khối cao hơn trong thời gian ngắn hơn. Trong một nghiên cứu của Zhou et al. (2009), nuôi cấy dịch thể *C. militaris* cho thấy sinh khối tăng trưởng nhanh và PS hòa tan trong nước đạt nồng độ cao hơn so với nuôi cấy bề mặt [76] . Tương tự, Wang et al. (2022) báo cáo rằng SmF giúp tăng hiệu suất sản xuất ganoderic acid từ *G. lucidum* nhờ điều chỉnh điều kiện nuôi

cấy phù hợp . Điều này đặc biệt quan trọng khi cần sản xuất nhanh và ổn định các hợp chất dược liệu trong quy mô thương mại [78].

Một lợi thế nổi bật khác của nuôi cấy dịch thể là khả năng thu sinh khối và chiết tách hoạt chất dễ dàng hơn. Trong môi trường lỏng, hệ sợi phát triển phân tán, không bị kết khối như trong nuôi cấy rắn, giúp quá trình lọc, ly tâm và chiết xuất diễn ra hiệu quả hơn. Ngoài ra, môi trường lỏng sạch hơn về vi sinh và ít chứa tạp chất từ cơ chất, giúp nâng cao độ tinh khiết của sản phẩm thu được [79].

Khả năng nhân rộng là yếu tố then chốt để đưa nghiên cứu vào ứng dụng thương mại. SmF cho phép dễ dàng mở rộng quy mô thông qua hệ thống bioreactor với thể tích từ vài lít đến hàng nghìn lít, đồng thời duy trì được độ lặp lại và ổn định của sản phẩm. Theo Palladino et al. (2024), sự phát triển của công nghệ bioreactor và cảm biến sinh học đã giúp giám sát quá trình lên men theo thời gian thực, từ đó tối ưu hóa quy trình sản xuất tự động và tiết kiệm chi phí nhân công [80].

Trong nghiên cứu công nghệ sinh học hiện đại, việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy bằng công cụ thiết kế thí nghiệm (Design of Experiment – DoE) như mô hình đáp ứng bề mặt (RSM) hay thuật toán di truyền (genetic algorithm) ngày càng phổ biến. Nuôi cấy dịch thể là nền tảng lý tưởng cho các nghiên cứu tối ưu hóa này nhờ tính linh hoạt và khả năng phản ứng nhanh của hệ thống [81]. Nhờ đó, các nhà nghiên cứu có thể điều chỉnh nồng độ chất cảm ứng, glucose, nitơ, hoặc oxi để định hướng sinh tổng hợp các hợp chất mục tiêu từ nấm.

SmF không chỉ giới hạn ở một vài loài mà đã được chứng minh hiệu quả trên nhiều chủng nấm dược liệu khác nhau như *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune*, *Phellinus linteus*, và *Hericium erinaceus*. Điều này mở ra triển vọng ứng dụng rộng rãi cho ngành công nghiệp thực phẩm chức năng và dược phẩm từ nấm [82].

Nhìn chung, nuôi cấy dịch thể là một chiến lược nuôi cấy tiên tiến, đem lại nhiều lợi thế so với các phương pháp truyền thống trong sản xuất sinh khối và hợp chất hoạt tính từ nấm dược liệu. Từ khả năng kiểm soát môi trường, hiệu suất cao, dễ thu hồi sản phẩm, đến khả năng mở rộng và tối ưu hóa quy trình, SmF đã và đang đóng vai trò trung tâm trong xu hướng công nghiệp hóa sản phẩm nấm dược liệu. Việc tiếp tục nghiên cứu, tối ưu và ứng dụng SmF hứa hẹn sẽ góp phần quan trọng vào phát triển công nghệ sinh học xanh, bền vững và hiệu quả.

1.4.3. Các yếu tố ảnh hưởng trong quá trình nuôi cấy dịch thể

Lên men dịch thể là một phương pháp nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường lỏng, được áp dụng rộng rãi trong công nghiệp sinh học nhằm sản xuất sinh khối, enzyme, PS, và các hợp chất có hoạt tính sinh học. Trong nuôi cấy nấm dược liệu, đặc biệt là các loài nấm như *C. militaris*, *T. versicolor*, hệ sợi nấm không chỉ là nguồn sinh khối mà còn là "nhà máy" tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị cao như polysaccharide, triterpenoid, và các alkaloid. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình này phụ thuộc vào nhiều yếu tố sinh học và môi trường. Bài viết này sẽ phân tích các yếu tố chính ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm và khả năng tổng hợp các hoạt chất sinh học trong nuôi cấy dịch thể.

1.4.3.1. Thành phần môi trường nuôi cấy

a. Nguồn carbon

Carbon là nguồn năng lượng và vật liệu xây dựng cho tế bào. Loại và nồng độ carbon có ảnh hưởng đáng kể đến tốc độ sinh trưởng và quá trình tổng hợp hoạt chất. Glucose là nguồn carbon phổ biến trong nuôi cấy dịch thể vì khả năng hấp thu nhanh và hiệu quả chuyển hóa cao. Tuy nhiên, nồng độ glucose quá cao có thể gây ra hiện tượng ức chế do áp suất thẩm thấu hoặc hiệu ứng catabolite repression [83]. Các nguồn carbon thay thế như lactose, maltose, hoặc sucrose cũng được sử dụng để điều chỉnh quá trình chuyển hóa. Chẳng hạn, trong nuôi cấy *G. lucidum*, nguồn carbon ảnh hưởng đến hàm lượng PS tổng hợp, với glucose và maltose cho kết quả tốt nhất [84].

Nghiên cứu Cui và cs. (2015) đã tập trung đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon thay thế đến sinh trưởng và tổng hợp triterpenoid trong quá trình nuôi cấy dịch thể *G. lucidum* [85]. Bakratsas và cs. (2021) đã phân tích sâu ảnh hưởng của loại và tỷ lệ nguồn carbon đến quá trình nuôi cấy dịch thể nấm dược liệu. Tác giả nhấn mạnh rằng nguồn carbon không chỉ cung cấp năng lượng mà còn đóng vai trò điều tiết quá trình sinh trưởng và tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp như polysaccharide, triterpenoid, và alkaloid. Các loại đường đơn (glucose, fructose), đường đôi (sucrose, lactose), và carbon phức (molasses, malt extract) đều ảnh hưởng khác nhau đến tốc độ tăng sinh khối, hình thái hệ sợi và năng suất hoạt chất. Ngoài ra, nồng độ carbon cao có thể gây ức chế sinh trưởng hoặc tích tụ sản phẩm phụ không mong muốn, trong khi nồng độ thấp kéo dài thời gian pha lag [86]. Kachrimanidou và cs. (2023) đã đánh giá hiệu quả của việc sử dụng nguồn carbon hỗn hợp (glucose và xylose) trong nuôi cấy dịch thể nấm *P. ostreatus*. Kết quả cho thấy sự kết hợp này không chỉ giúp tăng tốc độ tiêu thụ đường

mà còn cải thiện rõ rệt năng suất sinh khối, PS ngoại bào (EPS) và enzyme laccase so với khi dùng từng loại đường đơn lẻ. Sử dụng tỷ lệ glucose:xylose là 2:1 mang lại hiệu quả cao nhất, với hàm lượng EPS tăng 28% và hoạt tính laccase tăng 35% [87]. Trong khi đó, Wang và cs. (2025) đã nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon đến quá trình tổng hợp PS và biểu hiện gene liên quan trong nuôi cấy dịch thể nấm *I. obliquus*. Kết quả cho thấy các loại carbon khác nhau (glucose, fructose, sucrose) không chỉ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng mà còn điều tiết rõ rệt hoạt tính enzyme và biểu hiện các gene tổng hợp PS như PGI, UGP, và UGE. Đặc biệt, glucose thúc đẩy mạnh biểu hiện gene UGE, làm tăng hàm lượng PS tan trong nước [88].

Như vậy, những công bố trên minh chứng rằng nguồn carbon là một đầu mối quan trọng có thể điều chỉnh để tối ưu hóa cả sinh khối và sản lượng hoạt chất trong quá trình lên men dịch thể nấm dược liệu.

b. Nguồn nitrogen

Nitrogen là thành phần thiết yếu trong tổng hợp protein, acid nucleic và enzyme. Nguồn nitrogen có thể ở dạng vô cơ (NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$) hoặc hữu cơ (peptone, yeast extract). Hàm lượng và loại nitrogen ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sinh khối và sự tích lũy hoạt chất. Ví dụ, *C. militaris* khi được nuôi cấy trong môi trường có yeast extract cho hàm lượng cordycepin cao hơn so với ammonium sulfate [89]. Sự cân đối giữa carbon và nitrogen (tỷ lệ C/N) cũng quan trọng. Tỷ lệ C/N cao thường thúc đẩy sinh trưởng hệ sợi, trong khi tỷ lệ thấp có thể kích thích sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp.

Nghiên cứu của Zhang và cs. (2014) đã tập trung khảo sát ảnh hưởng của các loại nguồn nitơ đến quá trình tổng hợp ganoderic acids trong nuôi cấy dịch thể. Kết quả cho thấy nguồn nitơ khác nhau (ammonium sulfate, nitrate, peptone, yeast extract) không chỉ ảnh hưởng đến sinh khối mà còn điều tiết mạnh mẽ biểu hiện các gene liên quan đến sinh tổng hợp triterpenoid, như *hmgr, sqs* và *ls*. Nghiên cứu khẳng định rằng điều tiết nguồn nitơ là công cụ sinh học quan trọng để tối ưu hóa quá trình sản xuất hoạt chất từ *G. lucidum* [90]. Nghiên cứu của Serody và cs. (2024) đã cung cấp bằng chứng rõ ràng về ảnh hưởng của nguồn và hàm lượng nitơ đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp PS trong nuôi cấy dịch thể nấm dược liệu. Kết quả cho thấy, khi tăng gấp đôi hàm lượng nitơ trong môi trường (so với mức chuẩn), *G. tsugae* không chỉ tăng sinh khối mà còn kích hoạt một pha sinh trưởng thứ hai sau pha log, giúp tăng đáng kể năng suất exopolysaccharide (EPS). Trong các nguồn nitơ khảo sát, peptone và ammonium sulfate

mang lại hiệu quả tốt nhất. Nghiên cứu này có thể mở rộng ứng dụng cho các loài nấm dược liệu khác như *T. versicolor* và *P. ostreatus*, nhấn mạnh rằng tối ưu hóa nguồn nitơ không chỉ cải thiện sinh trưởng mà còn là yếu tố điều tiết mạnh mẽ quá trình tổng hợp hoạt chất sinh học trong nuôi cấy dịch thể [91].

c. Vi chất và khoáng

Các ion kim loại như Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} đóng vai trò là đồng yếu tố của enzyme, ảnh hưởng đến hoạt động sinh hóa nội bào. Thiếu hụt hoặc dư thừa vi chất đều có thể ức chế sinh trưởng hoặc làm thay đổi lộ trình chuyển hóa [92]. Một số nghiên cứu ghi nhận rằng bổ sung Mg^{2+} và Zn^{2+} có thể tăng tổng hợp PS trong *G. lucidum* [93].

Khi đánh giá ảnh hưởng của ion sắt Fe^{2+} (dưới dạng ferrous sulfate – $FeSO_4$) đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp cordycepin trong nuôi cấy dịch thể *C. militaris*. Fan và cs. (2012) cho rằng việc bổ sung $FeSO_4$ ở nồng độ tối ưu (0.3 g/L) giúp tăng sinh khối hệ sợi lên 26% và tăng hàm lượng cordycepin đến 42% so với lô đối chứng. Nghiên cứu khẳng định sắt là vi khoáng quan trọng, có thể ứng dụng như một chất bổ sung đơn giản nhưng hiệu quả để nâng cao hiệu suất nuôi cấy dịch thể *C. militaris* [94].

1.4.3.2. Các điều kiện vật lý

a. pH môi trường

pH là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến cấu trúc, ổn định và hoạt tính của nhiều enzyme, cũng như ảnh hưởng đến tính thấm của màng tế bào tế bào vi sinh. Trong quá trình lên men dịch thể (hay còn gọi là lên men dịch thể) mỗi loài nấm có khoảng pH tối ưu riêng. Ví dụ như trong nghiên cứu tối ưu hóa các điều kiện lên men dịch thể nhằm nâng cao hiệu suất sinh khối và PS có hoạt tính sinh học từ *C. militaris*. Yang và cs. (2007) đã bố trí thí nghiệm sử dụng thiết kế Box–Behnken để đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố như nhiệt độ, pH và thời gian lên men. Kết quả cho thấy pH ban đầu của môi trường có ảnh hưởng đáng kể đến sinh trưởng hệ sợi và năng suất PS, với giá trị pH tối ưu được xác định là 6,0 [95]. Trong nghiên cứu của Showkat và cs. (2022), các tác giả đã tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể để nâng cao năng suất cordycepin – một hoạt chất sinh học chủ lực của *C. militaris*. Thí nghiệm sử dụng phương pháp một yếu tố thay đổi và thiết kế phản hồi bề mặt (RSM) để khảo sát ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, thời gian nuôi và nồng độ nguồn carbon. Kết quả cho thấy giá trị pH ban đầu lý tưởng để sản xuất cordycepin là khoảng 6,5, giúp tối ưu hóa cả sinh khối hệ sợi và hàm lượng cordycepin trong môi trường lỏng [96].

Nghiên cứu của Fang và cs. (2002) nhằm đánh giá ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng sinh trưởng và sản xuất hợp chất hoạt tính sinh học của *G. lucidum* trong điều kiện nuôi cấy dịch thể. Kết quả cho thấy pH ban đầu là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sinh khối hệ sợi, hàm lượng ganoderic acid và PS [97]. Trong nghiên cứu của Cui và cs. (2015), các tác giả đã khảo sát quá trình sản xuất và đặc trưng hóa triterpenoid nội bào từ *G. lucidum* trong điều kiện nuôi cấy dịch thể với mục tiêu là tối ưu hóa các điều kiện lên men nhằm nâng cao sinh khối hệ sợi và hàm lượng triterpenoid. Kết quả cho thấy giá trị pH ban đầu có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất sinh học, trong đó pH 5.5 là tối ưu cho cả sự phát triển mycelium và tích lũy triterpenoid [85]. Trong nghiên cứu tổng quan của Zhou và cs. (2021), các tác giả đã trình bày các tiến bộ trong công nghệ sinh học hiện đại nhằm tối ưu hóa nuôi cấy *Ganoderma* phục vụ sản xuất dược liệu. Tài liệu nhấn mạnh rằng pH ban đầu của môi trường nuôi cấy là yếu tố quan trọng ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng và khả năng tích lũy các hợp chất hoạt tính của nấm [98].

b. Nhiệt độ

Trong quá trình nuôi cấy dịch thể hệ sợi nấm dược liệu, nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng và hoạt tính enzyme. Đa số các loài nấm dược liệu phát triển tốt trong khoảng 25–28°C. Sự sai lệch khỏi nhiệt độ tối ưu có thể làm giảm sinh khối hoặc chuyển dịch quá trình chuyển hóa sang con đường phụ, ảnh hưởng đến chất lượng hoạt chất thu nhận được.

Nghiên cứu của Liu và cs. (2019) tập trung vào việc cải tiến điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm nâng cao sản xuất exopolysaccharide (EPS) từ *G. lucidum*. Nhóm nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy với hạt giống dạng bột mịn và áp dụng thiết kế thí nghiệm đáp ứng bề mặt (RSM) để tối ưu hóa các yếu tố môi trường, bao gồm nhiệt độ, pH, tỷ lệ giống và thời gian nuôi. Kết quả cho thấy nhiệt độ tối ưu để đạt được sản lượng EPS cao nhất là 28°C. Nhiệt độ cao hơn hoặc thấp hơn mức này đều dẫn đến giảm hiệu suất sinh tổng hợp EPS và làm chậm sự phát triển của hệ sợi nấm. Nghiên cứu khẳng định rằng kiểm soát nhiệt độ chính xác là một yếu tố then chốt để nâng cao hiệu quả và độ ổn định trong nuôi cấy dịch thể *G. lucidum* [99]. Trong nghiên cứu tổng quan của Camilleri và cs. (2025), các tác giả đã trình bày toàn diện về các ứng dụng và kỹ thuật nuôi cấy hệ sợi nấm để sản xuất vật liệu sinh học và các sản phẩm có giá trị cao. Nghiên cứu nhấn mạnh rằng nhiệt độ là yếu tố then chốt ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng của hệ sợi, cấu trúc tế bào và hoạt tính enzyme. Do đó, kiểm soát nhiệt độ chính

xác là điều kiện bắt buộc trong các hệ thống lên men dịch thể quy mô phòng thí nghiệm lẫn công nghiệp [100].

c. Oxi hòa tan và sự thông khí

Oxi là yếu tố giới hạn trong nuôi cấy dịch thể, đặc biệt là khi sinh khối tăng cao khiến độ nhớt tăng, cản trở sự khuếch tán oxi. Sự thông khí không đủ có thể gây ra quá trình lên men kỵ khí, dẫn đến giảm tổng hợp hoạt chất và làm thay đổi hình thái hệ sợi. Nghiên cứu của Fazenda và cs. (2010) đã phân tích ảnh hưởng của mức oxi hòa tan đến hình thái hệ sợi và hiệu quả lên men trong nuôi cấy dịch thể *G. lucidum*. Thí nghiệm được thực hiện trong chế độ fed-batch với hai phương pháp điều khiển DO: không kiểm soát (DO giảm tự nhiên) và kiểm soát tự động bằng hệ thống cascade (tăng tốc độ khuấy và cấp khí khi DO giảm). Kết quả cho thấy khi DO được duy trì ở mức ≥ 30% thông qua cascade, hệ sợi phát triển ở dạng phân tán đều và sinh khối đạt mức cao hơn đáng kể. Ngược lại, ở điều kiện DO không kiểm soát, hệ sợi hình thành các cụm lớn, làm tăng độ nhớt môi trường và giảm tốc độ truyền oxi, dẫn đến hiệu suất nuôi cấy thấp. Nghiên cứu khẳng định kiểm soát DO hiệu quả là yếu tố then chốt để tối ưu hóa hình thái và năng suất trong lên men dịch thể *G. lucidum* [101]. Trong nghiên cứu tổng quan của Thakur và cs. (2023) đã cung cấp cái nhìn toàn diện về vai trò của các yếu tố môi trường trong nuôi cấy dịch thể vi sinh vật, đặc biệt là nấm hiếu khí. Trong đó, DO được xác định là một yếu tố giới hạn quan trọng, đặc biệt khi sinh khối tăng cao trong môi trường lỏng. Đối với các loài nấm hiếu khí như *Aspergillus*, *Trichoderma* hay *Ganoderma*, mức DO ảnh hưởng trực tiếp đến sự tổng hợp enzyme ngoại bào, bao gồm cellulase, xylanase và protease. Khi DO thấp hơn mức tối ưu (<20–30%), hoạt tính enzyme giảm mạnh do quá trình chuyển hóa chuyển hướng hoặc enzyme bị ức chế tổng hợp. Ngược lại, duy trì DO ổn định bằng cách điều chỉnh tốc độ khuấy và thông khí giúp tối đa hóa năng suất enzyme, đồng thời cải thiện hình thái hệ sợi và độ ổn định của quá trình lên men [102].

1.4.3.3. Hình thái hệ sợi và khả năng trao đổi chất

Hình thái hệ sợi nấm trong môi trường nuôi cấy dịch thể có thể thay đổi từ dạng sợi rời, cụm hạt (pellet) đến dạng màng. Hình thái này ảnh hưởng đến sự khuếch tán chất dinh dưỡng, oxi và thải sản phẩm. Trong nghiên cứu tổng quan của Lu và cs. (2024) đã trình bày toàn diện về các dạng hình thái của nấm sợi trong nuôi cấy dịch thể và ảnh hưởng của chúng đến quá trình lên men. Theo nghiên cứu, hệ sợi nấm trong môi trường lỏng có thể tồn tại dưới ba dạng chính: sợi phân tán, cụm sợi hoặc pellet, và màng bề mặt (biofilm hoặc mat formation). Mỗi dạng morphology ảnh hưởng khác nhau đến khả

năng khuếch tán oxi, dinh dưỡng, và sự thải sản phẩm trao đổi chất. Việc điều chỉnh hình thái thông qua tốc độ khuấy, bọt khí, pH và thành phần môi trường là chiến lược hiệu quả để tối ưu hóa năng suất lên men [103]. Nghiên cứu của Veiter và cs. (2018) cũng chỉ ra rằng có mối liên hệ giữa hình thái hệ sợi nấm (đặc biệt là dạng pellet) và năng suất sinh học trong quá trình nuôi cấy dịch thể. Tác giả nhấn mạnh rằng hình thái là yếu tố quyết định đến hiệu quả khuếch tán oxi, chất dinh dưỡng và khả năng loại bỏ sản phẩm thải, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất enzyme và chất chuyển hóa thứ cấp. Pellet có kích thước vừa phải (~0.5–1.0 mm) thường cho kết quả tốt nhất, vì tối ưu hóa tỷ lệ bề mặt/khối lượng, giúp tăng cường trao đổi chất mà không làm tăng độ nhớt môi trường. Pellet quá lớn làm hạn chế khuếch tán vào vùng trung tâm, gây thiếu oxi cục bộ, trong khi dạng sợi tơi rời làm tăng độ nhớt và giảm hiệu quả trộn. Nghiên cứu kết luận rằng việc kiểm soát hình thái sợi nấm là một công cụ quan trọng để tối ưu hóa quá trình lên men công nghiệp [104].

1.4.3.4. Các yếu tố sinh học và điều kiện nuôi cấy

a. Chủng nấm

Mỗi loài và mỗi chủng nấm có tiềm năng sinh trưởng và tổng hợp hoạt chất khác nhau. Việc chọn lọc giống và cải biến di truyền có thể nâng cao năng suất đáng kể.

b. Tuổi cấy và tỷ lệ cấy

Tuổi và tỷ lệ của giống cấy ảnh hưởng đến khả năng thích nghi và tốc độ sinh trưởng ban đầu. Nếu tuổi giống quá già hoặc quá non sẽ kéo dài giai đoạn pha lag làm giảm năng suất. Tỷ lệ cấy quá thấp sẽ kéo dài pha lag, trong khi tỷ lệ cao có thể gây cạnh tranh chất dinh dưỡng và oxi [77].

Tóm lại, nuôi cấy dịch thể là công nghệ hiệu quả trong sản xuất sinh khối và hoạt chất sinh học từ nấm dược liệu. Tuy nhiên, hiệu quả của quá trình phụ thuộc vào nhiều yếu tố như thành phần môi trường, điều kiện vật lý, hình thái hệ sợi, giai đoạn phát triển, và đặc điểm chủng nấm. Việc hiểu rõ và tối ưu hóa các yếu tố này sẽ giúp nâng cao năng suất và chất lượng sản phẩm. Trong bối cảnh công nghiệp hóa sản xuất dược liệu, sự kết hợp giữa công nghệ nuôi cấy và kỹ thuật sinh học phân tử hứa hẹn mở ra hướng đi mới cho việc khai thác tiềm năng của nấm dược liệu. Tuy vậy, với xu hướng sử dụng nguyên liệu tái chế, kết hợp lên men dịch thể và công nghệ sinh học enzyme, SmF hứa hẹn sẽ trở thành nền tảng bền vững để sản xuất sinh khối và hợp chất chức năng từ *C. militaris* và *T. versicolor*. Xu hướng toàn cầu hiện nay cho thấy nuôi cấy dịch thể không còn chỉ

là giải pháp thay thế cho nuôi cấy truyền thống, mà đã trở thành một công nghệ chiến lược trong sản xuất dược liệu, thực phẩm chức năng, mỹ phẩm và prebiotic từ nấm. Việc chủ động kiểm soát môi trường nuôi, tối ưu hóa sinh khối và hoạt chất, kết hợp với khả năng mở rộng quy mô dễ dàng, đã giúp nuôi cấy dịch thể trở thành hướng đi có tiềm năng kinh tế – khoa học – công nghệ rất lớn. Những thành tựu quốc tế trong lĩnh vực này có thể trở thành hình mẫu cho các quốc gia như Việt Nam trong việc phát triển chuỗi giá trị nấm dược liệu công nghệ cao.

1.5. Tổng quan về khả năng kháng oxi hóa

1.5.1. Khái niệm và cơ chế

Khả năng kháng oxi hóa là thuật ngữ dùng để mô tả năng lực của một chất hoặc hệ thống sinh học trong việc vô hiệu hóa các gốc tự do (free radicals) và các loại oxi phản ứng (ROS), từ đó bảo vệ tế bào khỏi tổn thương oxi hóa. Gốc tự do là những phân tử hoặc nguyên tử có electron độc thân, rất dễ phản ứng và có khả năng gây tổn thương DNA, lipid, protein và các thành phần thiết yếu khác trong tế bào, dẫn đến lão hóa sớm và góp phần vào sự phát triển của nhiều bệnh lý như ung thư, tim mạch, thoái hóa thần kinh và tiểu đường [105].

Cơ chế kháng oxi hóa có thể được chia thành hai nhóm chính: Kháng oxi hóa enzyme (enzymatic antioxidants) và kháng oxi hóa không enzyme (non-enzymatic antioxidants). Các enzyme nội sinh như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và glutathione peroxidase (GPx) tham gia loại bỏ ROS sinh ra trong quá trình chuyển hóa tế bào.

Trong khi đó, các chất kháng oxi hóa không enzyme thường là các hợp chất có nguồn gốc ngoại sinh như polyphenol, flavonoid, vitamin C, vitamin E, carotenoid hoặc cordycepin chủ yếu hoạt động thông qua cơ chế quét gốc tự do trực tiếp. Cơ chế này bao gồm việc các phân tử kháng oxi hóa hiến tặng electron hoặc nguyên tử hydro để trung hòa các gốc tự do, qua đó ngăn chặn phản ứng dây chuyền gây tổn thương oxi hóa. Ví dụ, acid ascorbic (vitamin C) và các flavonoid có cấu trúc vòng thơm mang nhóm hydroxyl dễ bị oxi hóa, cho phép chúng loại bỏ các gốc như DPPH•, $O_2^{\bullet -}$, OH• hoặc H_2O_2 một cách hiệu quả [106,107]. Đây là cơ chế cốt lõi làm nền tảng cho các phương pháp đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa in vitro như DPPH, ABTS, và FRAP.

Ngoài việc trung hòa gốc tự do theo cách vật lý – hóa học, một cơ chế điều hòa di truyền quan trọng là con đường tín hiệu Nrf2–Keap1–ARE. Trong điều kiện bình thường, yếu tố phiên mã Nrf2 bị giữ lại trong bào tương bởi protein Keap1. Khi xuất

hiện stress oxi hóa, Nrf2 tách khỏi Keap1, di chuyển vào nhân và gắn vào vùng ARE (antioxidant response element), từ đó kích hoạt biểu hiện các gen mã hóa enzyme bảo vệ như HO-1, NQO1 và GST [108]. Vì vậy, các chất kháng oxi hóa không chỉ có vai trò trực tiếp quét gốc tự do mà còn có khả năng kích hoạt hệ thống bảo vệ nội sinh của cơ thể ở cấp độ phân tử.

1.5.2. Khả năng kháng oxi hóa của một số hợp chất có trong Cordyceps militaris và Trametes versicolor

Nấm dược liệu từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền và ngày càng được chú ý như những nguồn chất kháng oxi hóa tự nhiên phong phú. Trong số đó, *C. militaris* và *T. versicolor* nổi bật nhờ đa dạng các hợp chất hoạt tính sinh học có khả năng chống lại stress oxi hóa thông qua nhiều cơ chế bổ trợ nhau.

C. militaris chứa nhiều hợp chất hoạt tính như cordycepin (3′-deoxyadenosine), nucleotid, polysaccharide, sterol như ergosterol và lovastatin, cùng với ergothioneine [109]. Cordycepin – một phân tử nhỏ có cấu trúc tương tự adenosine là một chất kháng oxi hóa và kháng viêm chủ lực. Trong các mô hình in vitro, nó làm giảm sự hình thành ROS và MDA, đồng thời làm tăng hoạt tính của enzyme kháng oxi hóa như SOD và GPx trong các tế bào thần kinh được xử lý bằng 6-hydroxydopamine; chiết xuất n-hexane ở nồng độ thấp (5 μM) cũng ghi nhận hiệu quả tương tự (GPx tăng +25,6%, SOD tăng +20,5%) [110]. Ngoài ra, cordycepin còn bảo vệ thần kinh và chống mệt mỏi: ở mô hình chuột chạy trên máy, liều 10 mg/kg làm tăng biểu hiện BDNF, Nrf2 và HO1 ở hồi hải mã, ức chế Keap1 và cải thiện trí nhớ, gợi ý rõ vai trò điều hòa kháng oxi hóa [111].

Các PS chiết xuất từ *C. militaris* bao gồm nội bào, ngoại bào và từ chất nền nuôi trồng còn lại cũng cho thấy tiềm năng kháng oxi hóa mạnh. Một chiết xuất bằng enzyme (EPCMa) kích hoạt con đường Nrf2/HO-1, tăng cường các enzyme kháng oxi hóa nội sinh và ức chế ROS cũng như peroxid hóa lipid [22]. Nhiều nghiên cứu độc lập khác xác nhận hoạt tính quét gốc tự do phụ thuộc liều của các PS này, đặc biệt là khả năng giảm đáng kể gốc hydroxyl. Do đó, các phân tử nhỏ và đại phân tử hoạt động cùng nhau để loại bỏ ROS và điều hòa biểu hiện gen kháng oxi hóa. Bổ sung vào đó là các hợp chất phenolic và ergothioneine là một loại thiol tự nhiên có đặc tính ổn định sinh học – đóng vai trò bảo vệ thần kinh và trung hòa peroxide. Các nhóm chất này không chỉ có khả năng quét gốc tự do mà còn điều hòa biểu hiện gen liên quan đến cân bằng oxi hóa tế bào. Đáng chú ý, cơ chế kháng oxi hóa của cordycepin có thể góp phần vào lợi ích tim

mạch thông qua việc làm giảm viêm mãn tính và tổn thương oxi hóa tế bào. Tuy nhiên, các thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III quy mô lớn vẫn còn thiếu.

Trametes versicolor là một loài nấm mục sống hoại sinh có hoạt tính kháng oxi hóa mạnh mẽ. Thành phần hoạt chất gồm β-glucan gắn protein (như PSK, ~100 kDa) và polysaccharopeptide (PSP), cùng với các hợp chất phenolic, flavonoid, terpenoid và acid p-hydroxybenzoic, tất cả đều có khả năng trung hòa gốc tự do.

Trong các phân tích *in vitro* sử dụng phương pháp DPPH, ABTS, và FRAP, chiết xuất methanol của *T. versicolor* có IC_{50} khoảng 5,6 µg/mL, trong khi chiết xuất acetone đạt mức ức chế gốc tự do 50,9% ở 500 µg/mL [112]. Phân tích LC-MS cho thấy có tới 28 hợp chất phenolic khác nhau. Chiết xuất methanol và nước có hàm lượng phenol và flavonoid cao, tương quan mạnh với hoạt tính kháng oxi hóa tổng thể [113]. Trong số đó, acid p-hydroxybenzoic được xác định là hợp chất chính có khả năng quét gốc mạnh. Về khả năng điều hòa miễn dịch, PSK – một β-glucan được phê duyệt tại Nhật Bản như thuốc hỗ trợ điều trị ung thư – đã cho thấy hiệu quả trong việc kéo dài sống sót và kích thích các cơ chế bảo vệ kháng oxi hóa ở gan và tế bào miễn dịch [8]. Dù vậy, dữ liệu lâm sàng trực tiếp đánh giá chỉ dấu stress oxi hóa ở người còn hạn chế.

Các tổng quan gần đây xác nhận vai trò của các polyphenol, terpenoid và các hợp chất kháng oxi hóa trong *T. versicolor* [30]. Healthline nhấn mạnh rằng nấm này chứa hơn 35 loại hợp chất phenolic, bao gồm quercetin và baicalein, có khả năng ức chế hoạt động của COX và LOX, từ đó làm giảm stress oxi hóa do viêm. *C. militaris* và *T. versicolor* đều chứa tổ hợp đa hợp chất kháng oxi hóa, bao gồm phân tử nhỏ như cordycepin, phenol, ergothioneine và PS lớn như PSK, PSP có khả năng quét ROS, tăng cường enzyme nội sinh và điều hòa miễn dịch. Kết quả tiền lâm sàng rất hứa hẹn; để chuyển sang ứng dụng lâm sàng cần có dữ liệu từ thử nghiệm người, nghiên cứu cơ chế sâu hơn và chuẩn hóa chiết xuất.

1.6. Cơ sở lựa chọn nấm bào ngư và vai trò của *Lactiplantibacillus plantarum* trong lên men lactic

1.6.1. Cơ sở lựa chọn nấm bào ngư làm nguyên liệu lên men

Nấm bào ngư (*Pleurotus* spp.) là nhóm nấm ăn được nuôi trồng thương mại phổ biến, trong đó *P. ostreatus* được trồng quy mô lớn và dùng làm thực phẩm chức năng cũng như nguyên liệu cho các sản phẩm nutraceutical [114]. *Pleurotus* có hàm lượng protein cao với thành phần amino acid thiết yếu cân đối, chất xơ đặc trưng là β-glucan phân nhánh, giàu vitamin nhóm B, vitamin D và các khoáng vi lượng (Fe, Zn, Cu, Se),

trong khi hàm lượng natri và chất béo thấp [115]. Bên cạnh đó, quả thể và sinh khối sợi nấm chứa nhiều hợp chất sinh học như polysaccharide (β-glucan), ergothioneine, peptide, lectin, hợp chất phenolic, lovastatin và triterpenoid [114]. *P. ostreatus* có các hoạt tính chống oxy hóa, hạ lipid máu, kháng u, điều hòa miễn dịch và kháng khuẩn. Đối với mục tiêu lên men, đáng chú ý là hàm lượng phenolic tổng của nấm bào ngư cao hơn nấm chanterelle (*Cantharellus cibarius*) trong cùng một nghiên cứu [116].

Nấm bào ngư có nhiều đặc điểm thuận lợi khi làm cơ chất để lên men lactic. Đầu tiên, nấm tươi nhanh hư hỏng, trong khi lên men lactic là phương pháp truyền thống để bảo quản quả thể nấm và tạo ra sản phẩm có giá trị dinh dưỡng, cảm quan cao [117]. Thứ hai, hàm lượng natri và lipid thấp giúp chủ động điều chỉnh nồng độ muối trong dịch lên men [116]. Thứ ba, *Pleurotus* sinh trưởng hiệu quả trên phụ phẩm như rơm, bã bia [116], nên nguồn nguyên liệu dễ nuôi trồng và chi phí thấp. Cuối cùng, nghiên cứu trong nước cho thấy nấm bào ngư xám (*P. sajor-caju*) lên men bằng *L. plantarum* có thể trở thành thực phẩm nguồn gốc thực vật hữu ích cho người ăn chay [118].

1.6.2. Lên men lactic nấm bào ngư và những biến đổi trong quá trình lên men

Lên men lactic là quá trình LAB, nhóm vi khuẩn Gram dương, chuyển hóa đường thành acid lactic [119]. Sự tích lũy acid hữu cơ làm giảm pH, tạo môi trường bất lợi cho vi sinh vật gây hư hỏng. Trong lên men nấm, chủng khởi động cần sử dụng nhanh carbohydrate sẵn có để tạo lượng lớn acid lactic, vì vậy động học biến đổi đường tự do và acid hữu cơ là chỉ thị cho diễn biến đúng của quá trình [120]. Ở nấm mỡ lên men có kiểm soát, acid lactic chiếm ưu thế trong sản phẩm cuối, cùng với malic, succinic, citric, acetic và fumaric [120].

Khi lên men *P. ostreatus*, *A. bisporus* và *L. edodes* bằng chủng *L. plantarum* EK11, mật độ LAB trong sản phẩm cuối vượt 7 log CFU/mL; giá trị năng lượng và hàm lượng carbohydrate tiêu hóa được giảm ở cả ba loài; tỷ lệ acid béo không bão hòa đa tăng ở *P. ostreatus*; ngược lại, hàm lượng thiamin và riboflavin thấp hơn nấm tươi (trừ *L. edodes*) [121]. Như vậy lên men có thể làm sản phẩm ít năng lượng hơn và cải thiện cấu trúc acid béo, song gây hao hụt một số vitamin nhóm B. Về tính chất vật lý, màu sắc, độ cứng, chất rắn hòa tan và pH là các chỉ tiêu thường được theo dõi trong suốt quá trình [118].

Phenolic là nhóm hợp chất biến đổi rõ rệt nhất. Khi lên men nấm bào ngư và chanterelle bằng *L. plantarum* cho hiệu quả hạ pH tốt nhất, và các acid phenolic như

gallic, homogentisic, ferulic đạt nồng độ cao nhất ở mẫu lên men bằng *L. plantarum* [116]. Với nấm bào ngư xám, lên men cũng làm tăng TPC và hoạt tính bắt gốc tự do [118]. Cơ chế được cho là do enzyme của LAB thủy phân dạng liên kết và chuyển hóa các acid phenolic [122]. Tuy nhiên, chiều hướng biến đổi phụ thuộc vào chủng và loài nấm: ở nấm mỡ, chủng probiotic *L. plantarum* 299v cho hàm lượng phenolic và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn chủng đối chứng [116].

1.6.3. Vai trò của Lactiplantibacillus plantarum trong lên men

Lactiplantibacillus plantarum là loài được dùng rộng rãi để lên men trái cây, rau và sữa, phản ánh khả năng thích nghi với nhiều nền chất khác nhau [119]. Trên nấm, đặc tính này phụ thuộc chủng: Đối với chủng EK11 được phân lập từ thể quả *Agaricus bisporus* trải qua quá trình lên men lactic tự phát, cho thấy khả năng thích nghi tốt và tiềm năng làm giống khởi động cho quá trình lên men nấm. Khi được sử dụng để lên men *P. ostreatus*, chủng EK11 giúp duy trì pH sản phẩm ở mức ≤ 3,75 sau 7 ngày, đồng thời đạt mật độ vi khuẩn lactic trên 7 log CFU/mL, góp phần kiểm soát và ổn định sản phẩm lên men. Bên cạnh hiệu quả acid hóa, quá trình lên men bằng EK11 còn làm giảm hàm lượng calo và carbohydrate dễ tiêu hóa, cải thiện tỷ lệ acid béo không bão hòa đa ở *P. ostreatus*. Đặc biệt, chủng EK11 không có khả năng tổng hợp amin sinh học, đây là một đặc tính thuận lợi về mặt an toàn thực phẩm [119]. Về khả năng chịu điều kiện lên men, chủng *L. plantarum* dùng trên nấm bào ngư xám lên men thành công ở 15°C trong 25 ngày với 3,5–4,5% NaCl, mật độ ban đầu 10^4–10^6 CFU/mL [118].

L. plantarum là chủng hiệu quả nhất trong việc giảm pH khi lên men quả thể nấm bào ngư so với các chủng LAB khác được thử nghiệm; với nấm mỡ, chủng 299v hạ pH xuống 3,6 sau một tuần [116]. Sự acid hóa nhanh, nhờ acid lactic chiếm ưu thế, giúp LAB cạnh tranh và kìm hãm hệ vi sinh vật gây hư hỏng [123]. Ngọc và cộng sự (2024) nhận định lên men có bổ sung giống thuần phù hợp hơn cho bảo quản dài ngày, vì khi LAB mong muốn không chiếm ưu thế thì nguy cơ hư hỏng tăng [118]. Tuy nhiên, vai trò kiểm soát này chỉ hoàn chỉnh khi chủng được chọn không sinh amine sinh học [123].

Một trong những đóng góp đáng chú ý của *L. plantarum* trong quá trình lên men nấm là khả năng làm thay đổi hàm lượng và khả năng tiếp cận của các hợp chất phenolic, từ đó góp phần cải thiện hoạt tính chống oxy hóa. Nghiên cứu trên nấm sò xám cho thấy quá trình lên men với *L. plantarum* làm tăng tổng hàm lượng polyphenol (TPC), đồng thời làm gia tăng hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm [118]. Cơ chế này được làm rõ hơn qua nghiên cứu của Ayar-Sümer và cs. 2024, trong đó quá trình lên men bằng

L. plantarum làm gia tăng hàm lượng phenolic tự do, đặc biệt sau 24 giờ, trong khi hàm lượng phenolic liên kết giảm, cho thấy các hợp chất phenolic liên kết với nền nguyên liệu có thể được giải phóng trong quá trình lên men. Sự giải phóng này góp phần làm tăng khả năng tiếp cận và hoạt tính sinh học của các hợp chất phenolic. Tương tự, Jabłońska-Ryś et al. (2016) ghi nhận nấm lên men bằng *L. plantarum* có hàm lượng hợp chất phenolic và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn, đồng thời cho thấy điều kiện tiền xử lý như chần có thể ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng phenolic và hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm [116]. Như vậy, *L. plantarum* không chỉ thúc đẩy quá trình acid hóa mà còn có khả năng giải phóng và chuyển hóa các hợp chất phenolic trong nền nấm, qua đó góp phần nâng cao hàm lượng phenolic có khả năng tiếp cận và hoạt tính chống oxy hóa của sản phẩm lên men.

*Phân tích tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước có thể thấy rằng việc nghiên cứu các điều kiện nhằm thu sinh khối sợi nấm trong môi trường dịch thể, cũng như việc phân tích, đánh giá tầm quan trọng của các hợp chất trong quả thể nấm và hệ sợi nấm đang thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và đã có nhiều công bố có tính khoa học và thực tiễn cao để tiến tới sản xuất công nghiệp tạo ra nguồn sinh khối hữu cơ đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng cũng như nhu cầu sức khỏe của con người hiện nay. Tuy nhiên, các sản phẩm prebiotic hiện nay bổ sung và thực phẩm nhằm cải thiện sức khỏe đường ruột chủ yếu chiết xuất từ thực vật. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy PS kháng tiêu hoá chiết xuất từ nấm có khả năng kích thích probiotic và ức chế vi sinh vật gây bệnh, đặc biệt là beta glucan từ sợi nấm. Vì vậy, việc đa dạng nguồn cơ chất sản xuất prebiotic, tạo ra sản phẩm có hoạt tính sinh học cao cải thiện sức khỏe sinh vật chủ là vấn đề hết sức cấp thiết. Hơn tất cả, nấm và sợi nấm là nguồn cơ chất tiềm năng cho vấn đề này, trong đó việc lên men sinh khối sợi giúp rút ngắn thời gian nuôi cấy, chủ động điều khiển công nghệ tiến tới hiện đại hóa công nghiệp hóa sản xuất nguyên liệu cho thực phẩm và dược phẩm là vấn đề đang được quan tâm. Kết quả nghiên cứu đánh giá hoạt tính prebiotic từ sợi nấm là một trong những giải pháp hữu ích làm đa dạng nguồn prebiotic cung cấp cho công nghệ dược phẩm, thực phẩm và ứng dụng trong chăn nuôi nhằm tăng cường sự đa dạng và nâng cao hoạt tính các loại prebiotic, đồng thời giảm thời gian nuôi trồng và chi phí sản xuất.

Kết luận tổng quan

Cordyceps militaris và *Trametes versicolor* là hai loài nấm dược liệu sở hữu hệ polysaccharide phong phú với hoạt tính sinh học đa dạng. Tuy nhiên, phần lớn các

nghiên cứu trong nước hiện nay vẫn tập trung vào việc nuôi trồng và khai thác quả thể. Trong khi đó, tài liệu quốc tế đã khẳng định tiềm năng to lớn của công nghệ nuôi cấy dịch thể (SmF) trong việc thu nhận sinh khối hệ sợi chất lượng cao, giúp rút ngắn thời gian, kiểm soát tốt quy trình và dễ dàng mở rộng quy mô công nghiệp – một hướng đi phù hợp với xu thế hiện đại hóa ngành dược liệu. Mặc dù hoạt tính kháng oxi hóa của hai loài nấm này đã được chứng minh rộng rãi, nhưng tiềm năng prebiotic của polysaccharide từ hệ sợi nấm vẫn là một khoảng trống lớn trong bức tranh nghiên cứu tại Việt Nam. Trong bối cảnh nhu cầu tìm kiếm các nguồn prebiotic mới, an toàn và hiệu quả để thay thế nguồn gốc thực vật ngày càng tăng, việc đánh giá khả năng hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột của nấm là một hướng đi mới mẻ và cấp thiết. Các phương pháp chiết xuất truyền thống đơn lẻ thường bỏ sót các nhóm polysaccharide liên kết chặt trong thành tế bào (như β-glucan không tan). Việc áp dụng quy trình chiết xuất phân đoạn kết hợp (nước nóng, kiềm, acid) là cần thiết để tận thu tối đa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao.

Khác biệt với các nghiên cứu trước đây thường tập trung vào quả thể hoặc các hoạt tính dược lý cổ điển, đề tài này tập trung vào các điểm mới chính:

- Khai thác sinh khối hệ sợi thông qua nuôi cấy dịch thể thay vì quả thể, hướng tới quy trình sản xuất bền vững.

- Tập trung đánh giá chuyên sâu hoạt tính prebiotic của polysaccharide nấm – một hướng ứng dụng mới tại Việt Nam, bên cạnh hoạt tính kháng oxi hóa.

- So sánh song song tiềm năng sinh học giữa hai đại diện tiêu biểu của ngành Nấm túi (*C. militaris*) và Nấm đảm (*T. versicolor*) trên cùng một hệ điều kiện nuôi cấy và chiết xuất, từ đó cung cấp cơ sở khoa học tin cậy cho việc phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng thế hệ mới hỗ trợ sức khỏe đường ruột.

- Ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm vào quy trình chế biến thực phẩm thực tế "Nước nấm Bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*". Đây là mô hình sản phẩm mới, kết hợp lợi ích của nấm dược liệu và công nghệ lên men lactic, tạo ra sản phẩm đồ uống định hướng chức năng giàu hoạt tính sinh học (kháng khuẩn, prebiotic, kháng oxi hóa).

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Chủng nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được lưu trữ tại bộ sưu tập giống của phòng thí nghiệm Công nghệ Nấm, thuộc Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng. Danh pháp các chủng đã được kiểm chứng thông qua phân tích trình tự một chiều (gen ITS), với độ tương đồng 100% so với chủng chuẩn trên GenBank.

- Chủng *Lactiplantibacillus plantarum* WCFS1 (trước đây là *Lactobacillus plantarum* WCFS1) sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Đại học Khoa học Đời sống Na Uy (NMBU), Ås, Na Uy. Chủng được phân lập từ nước bọt người theo phương pháp mô tả trong nghiên cứu gốc của Kleerebezem (2003) [124].

- Chủng *Lactiplantibacillus casei* - 01 và *Bifidobacterum animalis* YC381 dạng bột sấy phun của Công ty Chr. Hansen (Đan Mạch), được cung cấp bởi chi nhánh công ty Chr. Hansen Malaysia Sdn. Bhd. Tại Việt Nam (địa chỉ: tầng 16 tòa nhà Bitexco, số 02 đường Hải Triều, Phường Bến Nghé, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh). Mật số vi khuẩn ban đầu là 10^{11} CFU/g được bảo quản ở nhiệt độ -18°C theo quy định của nhà sản xuất.

- Chủng *Lactiplantibacillus pentosus* NH1 và *Pediococcus acidilactici* NBD8 được cung cấp từ trường Đại học Bách Khoa – Đại học Đà nẵng. Chủng này đã được định danh bằng giải trình tự gene 16S rRNA (Genbank: PP064920 và PP064833) và lưu giữ trong bộ sưu tập giống vi sinh vật của phòng thí nghiệm.

- Chủng hại khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 và *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 hãng sản xuất: MicroBiologics - Mỹ, được cung cấp bởi viện Công nghệ sinh học – Đại học Huế.

- Prebiotic thương mại FOS được cung cấp bởi công ty CP Dược phẩm Novaco (Số 6P, đường Đặng Văn Ngữ, Nam Đồng, Đống Đa, Hà Nội).

- Quả thể nấm bào ngư tím (*Pleurotus ostreatus*) thu mua tại trại nấm Quỳnh Tâm-Hòa Phong – Hòa Vang – Thành phố Đà Nẵng.

2.2. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ

2.2.1. Hóa chất

- Enzyme α-amylase mua tại Công ty TNHH Công nghệ sinh học Aoboxing (Bắc Kinh, Trung Quốc), hoạt độ 3700 U/g; ABTS mua tại công ty Roche (Đức); DNS được sản xuất tại công ty hoá chất Zhongyu (Thượng Hải, Trung Quốc); Pepton và cao nấm men được sản xuất bởi HiMedia (Ấn Độ), Cồn 99,7% (Vietnam) và tất cả các hoá chất khác (K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, Na_2HPO_4, CH_3COONa, $K_2S_2O_8$…) được mua từ Guangdong Guanghua Sci-Tech Co.,Ltd (Quảng Đông, Trung Quốc).

- Các acid béo mạch ngắn chuẩn: acid propionic 99,2% (*CAS No*. *79-09-4*, *CPAchem Ltd*, Bulgaria); acid acetic 99,9% (CAS No. 64-19-7, CPAchem Ltd, Bulgaria), acid butyric 98,8% (*CAS No*. 107-92-6, CPAchem Ltd, Bulgaria).

2.2.2. Thiết bị và dụng cụ

- Máy ly tâm lạnh Hermle: Model Z 446 K (Đức)

- Máy lắc ổn nhiệt: Model: 1083, Nhà sản xuất: GFL (Đức)

- Máy khuấy từ gia nhiệt

- Máy quang phổ UV-VIS: Jacco 760

- Nồi hấp tiệt trùng: Model ALP MC-105L (Nhật Bản).

- Tủ ấm CO_2: Model ICO50med, Memmert (Đức).

- Sắc ký lỏng cao áp (HPCL) Ultimate 3000 - Dionex (Mỹ).

- Một số thiết bị cơ bản khác trang bị trong phòng thí nghiệm.

2.3. Phạm vi

- Về nội dung:

+ Đề tài tập trung tối ưu hóa quy trình nuôi cấy dịch thể để thu sinh khối hệ sợi nấm, không nghiên cứu nuôi trồng quả thể hay lên men trên cơ chất rắn.

+ Sử dụng phương pháp chiết xuất tuần tự phân đoạn bằng các dung môi theo trình tự: nước nóng (HWE), kiềm (AE) và acid (AEc) để thu nhận các phân đoạn polysaccharide (PS) đa dạng về cấu trúc và độ tan.

+ Đánh giá hoạt tính sinh học:

Hoạt tính kháng oxi hóa được đánh giá *in vitro* thông qua khả năng trung hòa gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$.

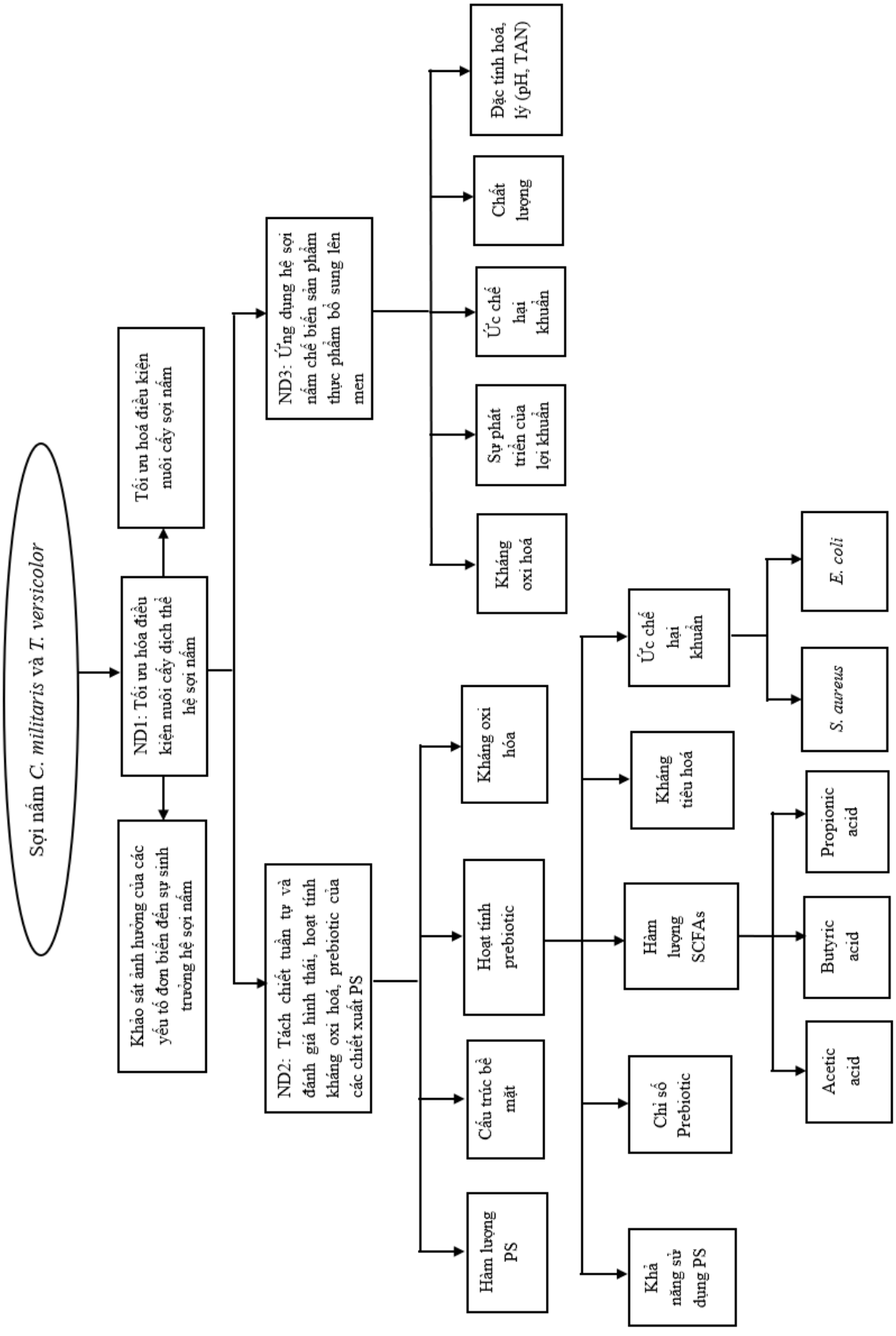
Tiềm năng prebiotic *in vitro* được đánh giá thông qua chỉ số prebiotic (PI), khả năng kháng enzyme tiêu hóa (α-amylase), khả năng sinh acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) và khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện nuôi cấy in vitro.

+ Ứng dụng sinh khối sợi nấm vào quy trình chế biến sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic, đánh giá các chỉ tiêu chất lượng cảm quan, hoá lý và vi sinh của sản phẩm.

- Về không gian: Nghiên cứu được thực hiện tại các phòng thí nghiệm Sinh học tại Khoa Sinh – Nông nghiệp – Môi trường, Trường Đại học Sư Phạm – Đại học Đà Nẵng và Khoa Hóa, Trường Đại học Bách Khoa – Đại học Đà Nẵng; các chỉ tiêu đánh giá an toàn thực phẩm (kim loại nặng và vi sinh) được gửi phân tích tại Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2).

- Về thời gian: Nghiên cứu được thực hiện trong khoảng thời gian 4 năm từ 2021 đến 2025.

2.4. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ tổng quát các nội dung nghiên cứu

2.5. Phương pháp thực hiện các nội dung nghiên cứu

2.5.1. Nội dung 1: Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm

Mục đích: Xác định điều kiện pH, glucose và cao nấm men phù hợp cho sự phát triển của sợi nấm nhằm thu nhận PS với hàm lượng cao nhất, qua đó nâng cao hiệu suất sản xuất.

2.5.1.1. Phương pháp nuôi cấy hệ sợi nấm

Nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được nhân giống cấp 1 trong các đĩa petri thủy tinh (90 mm × 15mm) với thành phần môi trường gồm: khoai tây (200 g/L), glucose (20 g/L) và agar (15 g/L), ủ ở 23 - 25ºC trong 10 ngày. Sau đó, từ các đĩa tiến hành nuôi cấy hệ sợi nấm cấp 2 trên môi trường dịch thể bằng 2 phương pháp nuôi cấy lắc và tĩnh. Môi trường nuôi trồng dịch thể với các thành phần tương ứng với từng điều kiện cụ thể như sau: Khoai tây 200g/L, glucose 20 – 40 g/L, cao nấm men: 2 – 5 g/L, pepton 2 – 3 g/L, pH: 5 – 6. Cho 150 mL môi trường trên vào các bình tam giác (250 mL). Hấp khử trùng bằng hơi nước nóng ở 121℃ trong vòng 20 phút, để nguội tự nhiên cho nhiệt độ hạ xuống dưới 30 ºC. Dùng que cấy chia nhỏ hệ sợi nấm trong đĩa thành phần bằng nhau 0,5 × 0,5 cm, sau đó cấy vào bình đựng môi trường dung dịch (gạt bỏ lớp thạch phía dưới hệ sợi). Giống sau khi cấy giống xong, được để tĩnh trong thời gian 24 giờ. Tiến hành nuôi hệ sợi nấm bằng hai phương pháp là nuôi tĩnh và nuôi lắc. Điều kiện nuôi lắc: cường độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 22℃ đối với nấm *C. militaris* và 27℃ đối với nấm *T. versicolor*, tối hoàn toàn và độ ẩm không khí 65 – 70%. Giống cấp 2 dịch thể phải được kiểm tra hàng ngày. Loại bỏ các trường hợp bị nhiễm khuẩn, nhiễm mốc, giữ lại các bình giống có hệ sợi sinh trưởng khỏe, khuẩn lạc cầu phát triển đồng đều. Sau 10 ngày nuôi lắc và 20 ngày nuôi tĩnh thì hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển tốt, tiến hành thu hoạch và sấy khô ở 50ºC.

2.5.1.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

a. Phương pháp thực nghiệm cổ điển (OFAT)

- Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS nấm C. militaris

+ Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của pH. Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB^+ với pH ở các giá trị: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0. Điều chỉnh pH dung dịch bằng

HCl 0,1 N và dung dịch NaOH 0,1 N. Các bước thí nghiệm tiến hành như phương pháp nuôi cấy dịch thể và thu sinh khối hệ sợi nấm. Kết thúc quá trình nuôi cấy, tiến hành thu hoạch, sấy khô sinh khối ở 50˚C đến khối lượng không đổi. Chỉ tiêu đánh giá bao gồm: Trọng lượng sinh khối khô (g/L) và hàm lượng PS (%).

+ Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng glucose. Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB^+ với pH tối ưu (tương ứng lượng sinh khối thu được lớn nhất) được điều chỉnh từ thí nghiệm 1, sau đó bổ sung glucose với hàm lượng lần lượt là 30, 35, 40, 45 và 50 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1

+ Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men với sự điều chỉnh pH tối ưu từ thí nghiệm 1 và bổ sung thêm glucose tối ưu được xác định từ thí nghiệm 2, sau đó bổ sung cao nấm men với hàm lượng lần lượt là 2, 3, 4, 5 và 6 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1 và 2.

Bảng 2.2. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *C. militaris*

Yếu tố khảo sát	Yếu tố cố định
pH ở các giá trị: 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0	Môi trường PDB^+ (glucose 20g/L, CNM 4g/L)
glucose với hàm lượng lần lượt là 30, 35, 40, 45 và 50 g/L	Môi trường PDB^+ (CNM 4g/L), pH đã chọn
cao nấm men với hàm lượng lần lượt là 2, 3, 4, 5 và 6 g/L	Môi trường PDB^+, pH đã chọn và glucose đã chọn

- Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS nấm T. versicolor

+ Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của pH.

Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB^+ với pH ở các giá trị: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 và 6,5. Điều chỉnh pH dung dịch bằng HCl 0,1 N và dung dịch NaOH 0,1 N. Các bước thí nghiệm tiến hành như phương pháp nuôi cấy dịch thể và thu sinh khối hệ sợi nấm.

+ Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng glucose.

Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB+ với pH tối ưu (tương ứng lượng sinh khối thu được lớn nhất) được điều chỉnh từ thí nghiệm 1, sau đó bổ sung glucose

với hàm lượng lần lượt là 10, 15, 20, 25 và 30 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1.

+ Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng cao nấm men.

Hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường PDB+ với sự điều chỉnh pH tối ưu từ thí nghiệm 1 và bổ sung thêm glucose tối ưu được xác định từ thí nghiệm 2, sau đó bổ sung cao nấm men với hàm lượng lần lượt là 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 g/L. Các bước thí nghiệm tiếp theo tiến hành như thí nghiệm 1 và 2.

Bảng 2.3. Tóm tắt bố trí thí nghiệm OFAT nấm *T. versicolor*

Yếu tố khảo sát	Yếu tố cố định
pH ở các giá trị: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5	Môi trường PDB^+ (glucose 20g/L, CNM 2g/L)
glucose với hàm lượng lần lượt là 10, 15, 20 và 25 và 30 g/L	Môi trường PDB^+ (CNM 2g/L), pH đã chọn
cao nấm men với hàm lượng lần lượt 1; 1,5; 2; 2,5 và 3 g/L	Môi trường PDB^+, pH đã chọn và glucose đã chọn

b. Phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM)

Dựa trên các khoảng giá trị tiềm năng thu được từ kết quả khảo sát đơn yếu tố, ba biến độc lập bao gồm pH, nồng độ glucose và hàm lượng cao nấm men được lựa chọn để tiến hành tối ưu hóa. Thiết kế Box-Behnken (BBD) thuộc mô hình bề mặt đáp ứng (RSM) được áp dụng với cấu trúc 3 mức mã hóa (-1, 0, +1) cho mỗi biến độc lập (**Bảng 2.4**). Mối liên hệ toán học biểu diễn sự phụ thuộc của các biến đáp ứng (năng suất sinh khối sợi nấm và hàm lượng PS) vào các biến độc lập được mô tả thông qua phương trình hồi quy đa thức bậc hai tổng quát có dạng:

$$Y = b_o + \sum_{i=1}^{3} b_i X_i + \sum_{i=1}^{3} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=1+1}^{3} b_{ij} X_i X_j$$

Trong đó:

Y: Giá trị dự đoán biến đáp ứng (năng suất sinh khối sợi nấm hoặc hàm lượng PS dự đoán thu được).

b_0 là hệ số tự do

X_i, X_j là nhân tố độc lập ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y

b_i là hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y (tuyến tính)

b_{ii} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y (phi tuyến)

b_{ij} là hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y

Bảng 2.4. Bố trí thí nghiệm tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy

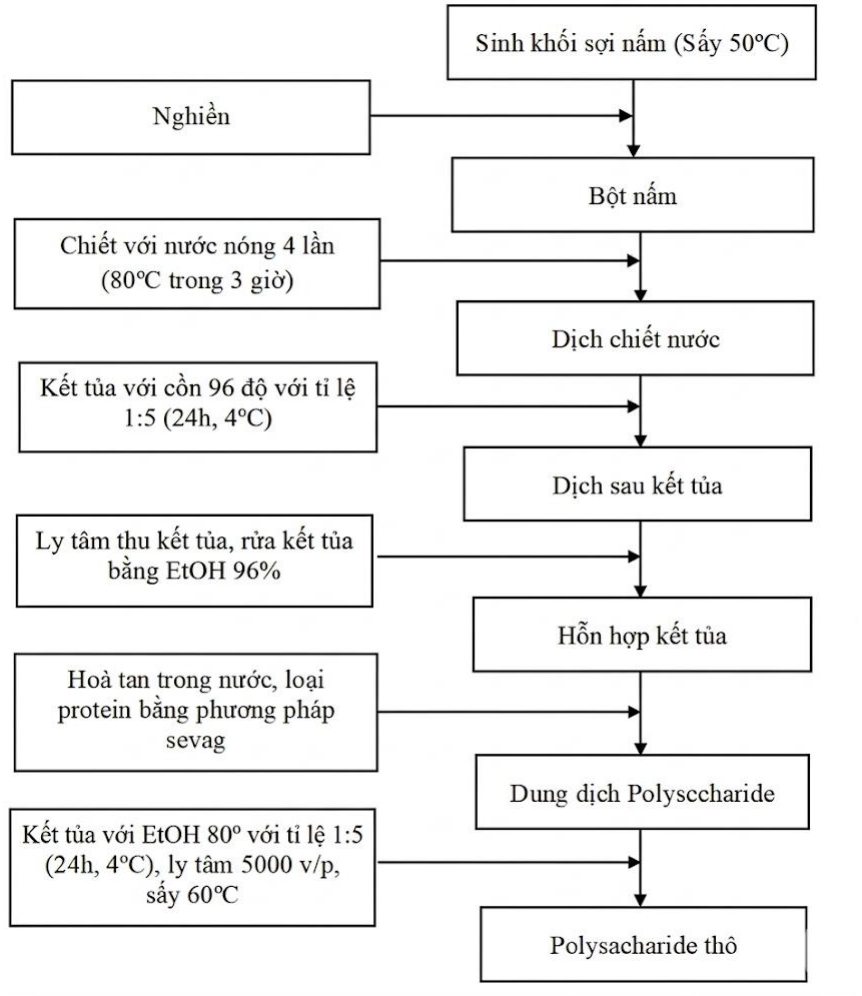
Nghiệm thức thí nghiệm	Các yếu tố độc lập		
	pH môi trường	Glucose (g/L)	Cao nấm men (g/L)
1	0	-1	-1
2	-1	1	0
3	0	-1	1
4	0	0	0
5	0	0	0
6	-1	0	1
7	1	-1	0
8	0	1	1
9	0	0	0
10	0	1	-1
11	-1	-1	0
12	-1	0	-1
13	1	0	1
14	1	1	0
15	1	0	-1

2.5.1.3. Phương pháp thu nhận và xác định năng suất sinh khối hệ sợi nấm

Kết thúc thời gian nuôi cấy tĩnh (20 ngày), tiến hành thu nhận sinh khối hệ sợi nấm bằng phương pháp lọc. Sinh khối thu được đem rửa nhiều lần bằng nước cất để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy dư thừa. Sau đó, mẫu được sấy khô ở 50°C cho đến khi đạt khối lượng không đổi (độ ẩm xấp xỉ 13%). Khối lượng sinh khối khô được xác định bằng cân phân tích và năng suất sinh khối được biểu diễn dưới dạng g/L (gam sinh khối khô/lít môi trường). Sợi nấm thành phẩm được bảo quản kín trong túi nilon hoặc lọ thủy tinh ở điều kiện tránh ánh sáng trực tiếp để phục vụ cho các phân tích tiếp theo.

2.5.1.4. Phương pháp tách chiết xác định hàm lượng PS hệ sợi nấm

Quy trình chiết PS để định lượng được thực hiện theo phương pháp của Sun và cs. (2005) và có một số sửa đổi. Sinh khối sợi nấm được sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi, sau đó nghiền thành bột mịn và ngâm với nước nóng 80°C với tỉ lệ 1:20 trong 3h (lặp lại 4 lần). Lọc hỗn hợp thu dịch lọc và tủa với ethanol 96% theo tỉ lệ 1:5 ở 4°C trong 24h. Tiến hành ly tâm hỗn hợp 5000 vòng/phút thu tủa và rửa tủa 2 lần với cồn 96%. Sau đó kết tủa được hòa tan trong nước cất và loại bỏ protein bằng phương pháp Sevag (sử dụng hệ dung môi chloroform:n-butanol với tỷ lệ 4:1, v/v), tủa lại trong ethanol 80% (v/v). Sau khi ly tâm, kết tủa được rửa bằng etanol, sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi thu được PS thô. Xác định hàm lượng PS thô bằng phương pháp phenol – sulfuric [125].



Hình 2.2. Quy trình tách polysaccharide thô từ sinh khối nấm

- PS được xác định bằng phương pháp phenol –sulfuric [126].

Nguyên tắc: Trong môi trường acid mạnh và nóng, thành phần oligosaccharide và PS bị thủy phân, giải phóng monosaccharide. Tiếp đó, chúng bị khử nước và tạo các dẫn

xuất furan. Kết quả thu được sản phẩm có màu vàng cam với phenol và độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490nm.

Các bước tiến hành

Bước 1: Lập đường chuẩn D-Glucose: 10-500 µg/mL

Dùng pipet chuyển 1ml mẫu (trong suốt) vào ống nghiệm, một mẫu trắng (nước cất) cũng được chuẩn bị. Thêm 1mL phenol 5% vào hỗn hợp mẫu. Thêm nhanh 5mL acid sulfuric đậm đặc (khi thêm acid H_2SO_4 vào nước sinh ra lượng nhiệt lớn). Sản phẩm phản ứng có màu vàng cam. Lắc đều mẫu và đợi phản ứng trong vòng 20 phút Đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm. Làm mẫu định lượng tương tự đường chuẩn.

Ghi chú: Thuốc thử Phenol-Sulfuric phản ứng với tất cả các loại carbohydrate (đường đơn, đường đôi, oligo và polysaccharide). Nếu mục tiêu là định lượng riêng Polysaccharide (EPS hoặc IPS), sự hiện diện của các đường tự do (glucose, fructose, sucrose) còn sót lại trong dịch lên men hoặc dịch chiết tế bào sẽ cộng gộp vào kết quả, gây sai số dương rất lớn.

+ Cách hiệu chỉnh**:** $OD_{thực\ tế} = OD_{mẫu\ thử} - OD_{mẫu\ nền}$

+ Mẫu trắng: Nước cất (thể tích bằng với thể tích mẫu thử) + dung dịch Phenol + H_2SO_4 đặc.

+ Mẫu nền: Dịch chiết mẫu + Nước cất (thay cho dung dịch Phenol) + H_2SO_4 đặc.

Bước 2: Xây dựng đường chuẩn D–Glucose (**Phụ lục 5.9**).

Bước 3: Tham chiếu đường chuẩn đã lập tính toán được hàm lượng PS tổng. Hàm lượng PS thô được tính theo phương trình:

$$\text{Hàm lượng \% PS} = \frac{OD+0{,}0356}{0{,}00912} \times V \times \frac{100}{m\times(1-w)} \times \frac{162}{180}$$

Trong đó:

% PS tính theo khối lượng khô sợi nấm

V: thể tích dung dịch sau khi hòa tan (mL)

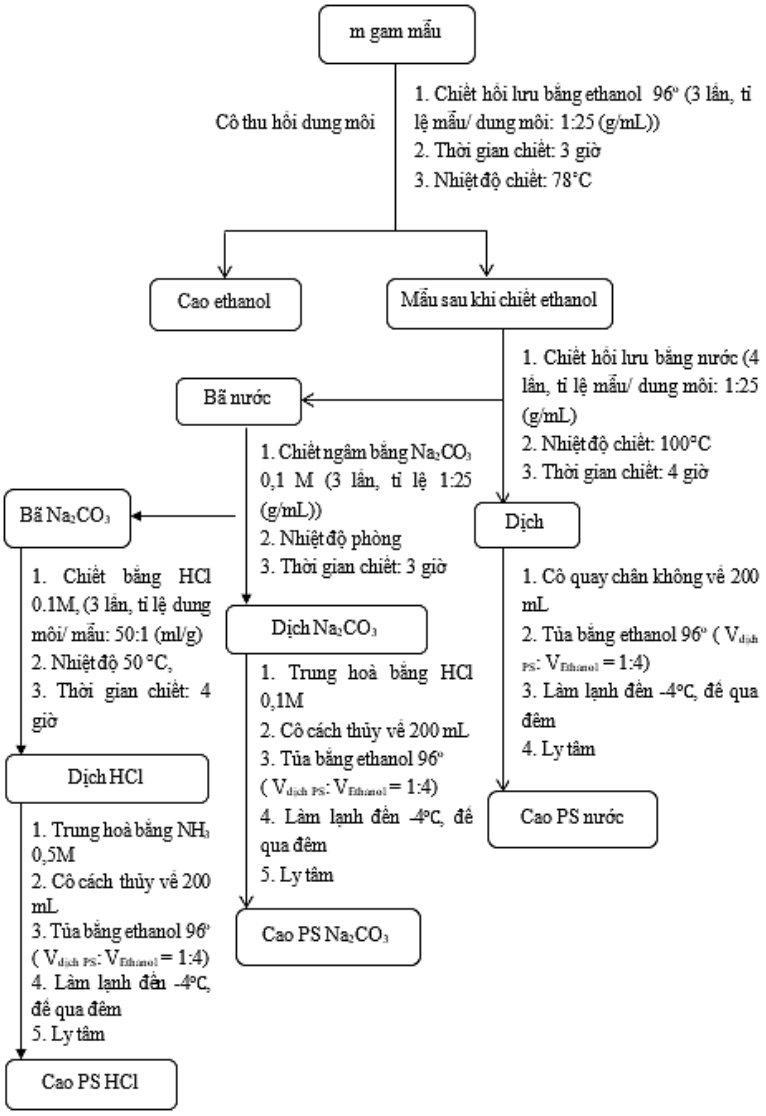
m: khối lượng mẫu ban đầu (g)

w: độ ẩm của mẫu (%)

2.5.2. Nội dung 2: Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS

2.5.2.1. Chiết xuất tuần tự và định lượng các phân đoạn polysaccharide hệ sợi nấm

Trong nghiên cứu này, một quy trình tách chiết PS tuần tự với 3 loại dung môi (H_2O, Na_2CO_3, HCl) khác nhau đã được thực hiện dựa trên các nghiên cứu trước của Peng và cs. (2023) Tian và cs. 2024 và Yu và cs. 2024 [127–129], và có một số điều chỉnh. Mục đích của quy trình này là nhằm xác định hàm lượng PS thu được ở từng giai đoạn dung môi, từ đó làm cơ sở để đánh giá toàn diện hơn về hoạt tính sinh học của các phân đoạn PS chiết xuất từ hệ sợi nấm.



Hình 2.3. Sơ đồ quy trình chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide (PS) từ sinh khối hệ sợi nấm

20 g mẫu bột sợi nấm *C. militaris* hoặc *T. versicolor* ban đầu được chiết hồi lưu bằng ethanol 96% ở 78˚C với tỉ lệ mẫu và ethanol là 1:25 (g/mL) trong 3 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết các hợp chất tan trong dung môi, sau đó ly tâm và lọc để loại bỏ phần dịch ethanol.

Mẫu còn lại sau khi loại bỏ ethanol tiếp tục được chiết hồi lưu bằng nước cất ở 100˚C với tỉ lệ mẫu (được tính theo khối lượng ban đầu) và nước là 1:25 (g/mL) trong 4 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để cho PS hòa tan hết vào trong nước.

Ly tâm và lọc để tách thành 2 phần: dịch chiết nước và bã chiết nước

- Dịch nước được cô quay chân không ở 55˚C đến khi về ~200 mL, tủa với ethanol 96º theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}}$: V_{Ethanol} = 1:4, làm lạnh đến -4˚C và để qua đêm, sau đó ly tâm, rửa lại kết tủa 2 lần với EtOH 70%, sấy khô ở 55˚C rồi thu PS nước. Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng nước.

Cho thêm dung dịch Na_2CO_3 0,1 M vào bã chiết nước theo tỷ lệ 25:1 (ml/g) (tính theo khối lượng mẫu ban đầu) ủ ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết PS tan trong dung dịch Na_2CO_3 0,1 M.

Ly tâm và lọc để tách thành 2 phần: dịch chiết Na_2CO_3 và bã chiết Na_2CO_3

- Dịch chiết Na_2CO_3 được trung hòa bằng HCl 0,1M (sao cho phản ứng xảy ra vừa đủ), cô quay chân không ở 55˚C đến khi về ~200mL, tủa với ethanol 96º theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}}$: V_{Ethanol} = 1:4, làm lạnh đến -4˚C và để qua đêm. Sau đó ly tâm, rửa lại kết tủa 2 lần với EtOH 70% và sấy khô ở 55˚C rồi thu được PS Na_2CO_3. Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng Na_2CO_3.

Cho thêm dung dịch HCl 0,1M vào bã chiết Na_2CO_3 theo tỷ lệ 25:1 (mL/g) (tính theo khối lượng mẫu ban đầu) ủ ở 50 ˚C trong 4 giờ, lặp lại quá trình chiết 3 lần để thu hết PS tan trong dung dịch HCl 0,1M.

Ly tâm và lọc để thu phần dịch chiết HCl, trung hòa dịch chiết HCl bằng dung dịch NH3 0.5M (sao cho phản ứng xảy ra vừa đủ). Cô quay chân không ở 55˚C đến khi về ~200ml, tủa với ethanol 96º theo tỷ lệ $V_{\text{dịch PS}}$: V_{Ethanol} = 1:4, làm lạnh đến -4˚C và để qua đêm. Sau đó ly tâm, rửa lại kết tủa 2 lần với EtOH 70%, sấy khô ở 55˚C thu được PS Na_2CO_3. Cân bằng cân phân tích để xác định hàm lượng PS chiết bằng HCl.

Các PS chiết xuất tuần từ nấm *C. militaris* bằng dung môi H_2O, Na_2CO_3 và HCl được ký hiệu lần lượt là: W-PSC; S-PSC và A-PSC. Các PS chiết xuất tuần từ sợi nấm

T. versicolor bằng dung môi H_2O, Na_2CO_3 và HCl được ký hiệu lần lượt là: W-PST; S-PST và A-PST.

Lưu ý: Các phân đoạn polysaccharide thu được trong nghiên cứu này (đặc biệt là phân đoạn kiềm và axit) đều là PS dạng thô. Quy trình hiện tại chưa bao gồm bước thẩm tách màng bán thấm để loại bỏ các muối vô cơ sinh ra trong quá trình trung hòa.

2.5.2.2. Phân tích hình thái bề mặt các phân đoạn polysaccharide

Bề mặt các phân đoạn polysaccharide chiết được bằng 3 loại dung môi được quan sát bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) sử dụng thiết bị FEI-Quanta FEG 250 USA với EDAX Element ở điện áp tăng tốc 5,00 kV. Lượng mẫu thích hợp được chuẩn bị bằng cách dán chúng trên một tấm nhôm phẳng bằng chất kết dính dẫn điện và sau đó phủ chúng bằng bột vàng. Mức độ phóng đại của hình ảnh là 1000 lần, 3000 lần, 5000 lần và 10.000 lần [128].

2.5.2.3. Đánh giá khả năng kháng oxi hóa bằng phương pháp ABTS

Hoạt động loại bỏ gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu $ABTS^+$ mô tả bởi Nenadis và cs. (2004) [130]. Dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ được chuẩn bị bằng cách cho 2mL dung dịch ABTS 7 mM và 2 mL dung dịch $K_2S_2O_8$ 2.45 mM. Ủ dung dịch trong bóng tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol (khoảng 50 lần), điều chỉnh độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 734 nm có mật độ quang là 0,7 ± 0,05. Tiến hành khảo sát hoạt động trung hòa gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ bằng cách cho 990 μL dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ vào 10 L PS nấm. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm. Chất đối chứng dương được sử dụng là vitamin C.

Khả năng bắt gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ được tính theo công thức:

$$\boldsymbol{I}(\%) = (\boldsymbol{A_0} - \boldsymbol{A_1})/\boldsymbol{A_0} \times \mathbf{100}\%$$

Trong đó: A0: giá trị mật độ quang của mẫu trắng.

A1: giá trị mật độ quang của mẫu thử.

Từ các giá trị I(%), giá trị IC50 được xác định bằng cách xây dựng đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa các nồng độ khảo sát của mẫu thử và phần trăm khả năng bắt gốc tự do tương ứng. Dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính của đường chuẩn, IC50 được tính toán là nồng độ mẫu thử tại điểm đạt giới hạn ức chế 50%. Giá trị IC50 thu được tỷ lệ nghịch với hoạt tính kháng oxy hóa; mẫu có IC50 càng nhỏ chứng tỏ khả năng trung hòa gốc tự do càng mạnh..

2.5.2.4. Đánh giá tiềm năng prebiotic của polysaccharide

a. Khả năng kích thích sinh trưởng vi sinh vật có lợi

Chuẩn bị mẫu

Các mẫu đánh giá là các chiết xuất PS chiết xuất từ nấm *C. militaris* bao gồm: W-PSC, S-PSC, A-PSC; các chiết xuất PS chiết xuất từ nấm *T. versicolor* bao gồm: W-PST, S-PST, A-PST và FOS.

Chuẩn bị vi sinh vật

Lactiplantibacillus plantarum WCFS1, *Lactiplantibacillus pentosus* NH1, *Pediococcus acidilactici* NBD8, *Lactiplantibacillus casei* 01 và *Bifidobacterium animalis* YC381 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy MRS ở 37ºC trong 24 giờ. Các khuẩn lạc thu được đưa vào 10 mL môi trường MRS dạng lỏng, nuôi cấy ở 37ºC trong 24 giờ để vi khuẩn tăng trưởng.

Chuẩn bị môi trường

Các công thức nghiên cứu được chuẩn bị như sau:

- Môi trường GF: môi trường MRS đã loại bỏ glucose.

- Môi trường PS: môi trường GF bổ sung 1 g/L PS (W-PSC, W-PST, S-PSC, S-PST, A-PSC, A-PST).

- Môi trường FOS: môi trường GF bổ sung 1g/L prebiotic thương mại (FOS)

- Môi trường Glu: môi trường GF bổ sung 1 g/L glucose.

Cấy 1% (v/v) các chủng lợi khuẩn vào các môi trường ở trên (~10^8 CFU/mL) rồi nuôi cấy ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó, xác định mật độ tế bào ở các công thức thí nghiệm thông qua mật độ quang đo ở bước sóng 600 nm ở thời điểm 0 giờ và 24 giờ [131]. Thí nghiệm này nhắm mục tiêu nghiên cứu khả năng vi khuẩn sử dụng các chiết xuất PS từ sợi nấm và FOS làm carbon do đó số lượng tế bào vi khuẩn được biểu thị bằng sự tích lũy tế bào thay vì đơn vị hình thành khuẩn lạc.

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 ống.

b. Chỉ số prebiotic

Tiềm năng prebiotic của PS được đánh giá tương tự nghiên cứu của Huebner và cs. (2008) và Phirom-on & Apiraksakorn, (2021) và có một số sửa đổi nhỏ [131,132].

Các chủng lợi khuẩn được nuôi trong các môi trường như thí nghiệm trên. Chủng vi khuẩn gây bệnh *E. coli* ATCC 85922 được nuôi cấy trong M9 lỏng đã loại bỏ glucose (E_{GF}), bổ sung 1 g/L Glucose (E_G), môi trường E_{GF} bổ sung 1 g/L PS của từng chiết xuất và bổ sung 1 g/L prebiotic thương mại (FOS) (E_P). Các chủng vi khuẩn được nuôi ở 37°C trong 24 giờ. Đo mật độ quang của các mẫu tại bước sóng 600 nm (OD_{600}) để xác định khả năng tích luỹ sinh khối. Các mẫu được thu thập ở thời điểm 0 và 24 nuôi cấy để đo sự phát triển của tế bào bằng OD_{600}. Chỉ số Prebiotic (PI) được xác định bằng công thức [133]:

$$PI = \left[\frac{(P_P^{24} - P_P^0) - ((P_{GF}^{24} - P_{GF}^0)}{(P_G^{24} - P_G^0) - ((P_{GF}^{24} - P_{GF}^0)}\right] - \left[\frac{(E_P^{24} - E_P^0) - ((E_{GF}^{24} - E_{GF}^0)}{(E_G^{24} - E_G^0) - ((E_{GF}^{24} - E_{GF}^0)}\right]$$

Trong đó:

P_p^0, P_p^{24} – Giá trị OD600 của Probiotic ở môi trường chứa 1 g/L prebiotic tại 0 giờ và 24 giờ.

P_{GF}^0, P_{GF}^{24} – Giá trị OD_{600} của Probiotic ở môi trường không bổ sung glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

P_G^0, P_G^{24}– Giá trị OD_{600} của Probiotic ở môi trường chứa 1 g/L glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

E_p^0, E_p^{24} – Giá trị OD_{600} của *E. coli* ở môi trường chứa 1g/L prebiotic tại 0 giờ và 24 giờ.

E_G^0, E_G^{24}– Giá trị OD_{600} của *E. coli* ở môi trường chứa 1g/L glucose tại 0 giờ và 24 giờ.

E_{GF}^0, E_{GF}^{24}– Giá trị OD_{600} của *E. coli* ở môi trường không bổ sung glucose tại 0 giờ và 24 giờ

c. Khả năng kháng tiêu hóa bởi α-amylase

+ **Chuẩn bị môi trường đệm mô phỏng khoang miệng**: Chuẩn bị dung dịch thuốc thử bằng cách hòa tan lần lượt: 0,764 g Sodium chloride (NaCl); 1,491 g Potassium chloride (KCl); 0,133 g Calcium chloride ($CaCl_2$) vào nước cất với tổng thể tích dung dịch là 1.000 mL. Điều chỉnh pH của dung dịch này về mức 6,9 bằng cách sử dụng dung dịch Sodium bicarbonate 1 M.

+ Chuẩn bị dung dịch enzyme α-amylase: Cân chính xác 0,345 g α-amylase và hòa tan vào 400 mL dung dịch thuốc thử tiêu hóa mô phỏng đã chuẩn bị ở trên, khuấy đều dung dịch này trong vòng 20 phút để đảm bảo enzyme α-Amylase được hòa tan hoàn toàn.

+ **Ủ mẫu thử và mô phỏng quá trình tiêu hóa:** Lấy mẫu thử lọc, sau đó thêm vào 400 mL dung dịch enzyme α-amylase đã chuẩn bị. Mẫu thử sẽ được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 (tức là 1 mg mẫu thử hòa với 1 mL dung dịch thuốc thử enzyme). Dung dịch mẫu sau đó được đặt vào bể ổn nhiệt ở 37°C để mô phỏng môi trường tiêu hóa trong miệng (tương tự điều kiện trong khoang miệng).

+ Thu thập mẫu phân tích: Mẫu phân tích được thu thập tại 0 giờ (trước khi tiêu hóa bắt đầu) và tại các khoảng thời gian 0,5 giờ sau khi bắt đầu. Sau đó, mỗi mẫu sẽ được đun sôi trong 5 phút để làm mất hoạt tính của enzyme α-amylase, tránh việc enzyme tiếp tục thủy phân khi thí nghiệm dừng lại. Sử dụng phương pháp DNS và Phenol – sulfuric acid để xác định lượng đường khử và đường tổng số.

Mức độ thuỷ phân (%) được tính theo công thức:

$$\text{Mức độ thuỷ phân} = \frac{\text{Đường khử thuỷ phân}}{\text{Đường tổng số} - \text{Đường khử không thuỷ phân}} \times 100$$

Đường khử thủy phân: Là lượng đường khử được tạo ra sau quá trình thủy phân (sau 0,5 giờ).

Đường tổng số: Được xác định từ tổng hàm lượng các loại đường có trong mẫu thử

Đường khử không thủy phân: Lượng đường khử có sẵn trong mẫu trước khi enzyme hoạt động (tại thời điểm 0 giờ).

d. Xác định đường tổng số

Đường tổng số được xác định bằng phương pháp phenol-sulfuric acid [126].

Nguyên tắc: Trong môi trường acid mạnh và nóng, thành phần oligosaccharide và PS bị thủy phân, giải phóng monosaccharide (glucose). Tiếp đó, chúng bị khử nước và tạo các dẫn xuất furan. Kết quả thu được sản phẩm có màu vàng cam với phenol và độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 490nm.

Các bước tiến hành

+ Lập đường chuẩn D-Glucose: 10-500 µg/mL

Dùng pipet chuyển 1ml mẫu (trong suốt) vào ống nghiệm, một mẫu trắng (nước cất) cũng được chuẩn bị. Thêm 1mL phenol 5% vào hỗn hợp mẫu. Thêm nhanh 5mL acid sulfuric đậm đặc (khi thêm acid H_2SO_4 vào nước sinh ra lượng nhiệt lớn). Sản phẩm phản ứng có màu vàng cam. Lắc đều mẫu và đợi phản ứng trong vòng 20 phút Đo độ hấp thụ ở bước sóng 490 nm.

+ Làm mẫu định lượng tương tự đường chuẩn.

+ Tham chiếu đường chuẩn đã lập (**Phụ lục 5.3**) tính toán được hàm lượng carbohydrate tổng.

- Xác định đường khử

Đường khử được xác định bằng phương pháp DNS (Miller, 1959) , các bước tiến hành như sau:

Bước 1. Hòa tan 300g muối Kali natri tartrate trong 500 mL nước cất (còn gọi là dung dịch muối Rochelle). Cho muối vào nước từ từ đến hết.

Bước 2. Chuẩn bị 200 mL dung dịch Sodium hydroxit 2N. Dùng đũa thủy tinh khuấy đến hòa tan hoàn toàn.

Bước 3. Hòa tan 10g DNS trong 200 mL natri hydroxit đã chuẩn bị ở bước 2 (sử dụng máy khuấy từ có gia nhiệt nhẹ).

Bước 4. Trộn dung dịch ở bước 1 và bước 3.

Bước 5. Định mức đến thể tích 1 L.

Bước 6. Bảo quản thuốc thử trong chai thủy tinh sẫm màu (Chuẩn 3 mL thuốc thử DNS bằng HCl 0,1 N với chỉ thị phenolphtalein. Nếu hết 5-6 mL là đạt. Nếu cần, bổ sung thêm NaOH).

Bước 7. Xây dựng đường chuẩn (dung dịch chuẩn glucose) theo **Bảng 2.4.**

Bảng 2.4. Xây dựng đường chuẩn D-glucose bằng thuốc thử DNS

STT	Nồng độ (µg/mL)	Dung dịch chuẩn (mL)	Nước cất (mL)	Thuốc thử DNS (mL)
1	10	0,3	2,7	1
2	20	0,6	2.4	1
3	30	0,9	2,1	1
4	40	1,2	1,8	1

5	50	1,5	1,5	1
6	60	1,8	1,2	1
7	70	2,1	0,9	1

Bước 8: Đặt các ống vào nồi cách thủy sôi trong 5 phút và làm nguội đến nhiệt độ phòng (màu đỏ cam hình thành).

Bước 9: Đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 540 nm so với mẫu trắng.

Bước 10: Thiết lập đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc của hàm lượng chất chuẩn và độ hấp thụ quang.

Bước 11: Định lượng mẫu thử

Dùng pipet chuyển 3 mL mẫu xác định đường khử vào ống nghiệm có nắp vặn. Thêm 1 mL thuốc thử DNS vào dung dịch mẫu (Mẫu Blank được chuẩn bị bằng cách thêm 1 mL thuốc thử DNS vào 3 mL nước cất). Đặt các ống vào nồi cách thủy sôi trong 5 phút. Làm nguội mẫu nhanh đến nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm. Tham chiếu đường chuẩn đã lập (**phụ lục 5.10**). Tính toán được hàm lượng đường khử của mẫu đo.

Ghi chú: DNS không đặc hiệu 100% cho đường. Các chất có tính khử mạnh trong dịch chiết thực vật hoặc nấm (như vitamin C, polyphenol, tannin, hoặc các protein có chứa nhóm thiol) cũng có thể khử DNS, làm tăng khống kết quả định lượng đường.

+ Cách hiệu chỉnh: Cách hiệu chỉnh: $OD_{\text{thực tế}} = OD_{\text{mẫu thử}} - OD_{\text{mẫu nền}}$

+ Mẫu trắng: Nước cất + Thuốc thử DNS. Hỗn hợp được đun sôi 5-10 phút và làm nguội tương tự như mẫu thử.

+ Mẫu nền: Dịch chiết mẫu + Nước cất (thay cho thuốc thử DNS). Hỗn hợp cũng phải được đun sôi và làm nguội như mẫu thử nghiệm.

c. Khả năng ức chế hại khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* bổ sung PS

Chủng *L. plantarum* WCFS1 được nuôi cấy tĩnh ở 37ºC trong các môi trường (Bảng 3). Sau 24 giờ và 48 giờ lên men tiến hành ly tâm (5000 vòng/phút ở 4ºC, trong 10 phút) rồi thu lấy phần dịch nổi để xác định sự ức chế sinh trưởng đối với *E. coli* và *S. aureus*. Lấy 50 µL dịch vi khuẩn *E. coli* và *S. aureus* mật độ 10^8 CFU/mL (0,5 MCFarland) cấy vào các đĩa môi trường NA bằng kỹ thuật cấy trãi đĩa. Tiến hành đục lỗ thạch có đường kính 7 mm trên các đĩa petri chứa 2 vi khuẩn ở trên. Cho vào các lỗ

thạch 300 µL phần chất nổi thu từ quá trình ly tâm ở trên và ủ ở 37^{o}C trong 24 giờ. Khả năng ức chế được xác định bằng cách đo đường kính vòng vô khuẩn trên các đĩa thạch) [134].

Bảng 2.5. Bố trí môi trường nuôi cấy đánh giá khả năng ức chế *E. coli* và *S. aureus*

TT	Công thức	Môi trường
1	CT1	MRS + 0,1% W-PS
2	CT2	MRS + 0,1% S-PS
3	CT3	MRS + 0,1% A-PS
4	CT4	MRS + 0,1% FOS
5	CT5 (Control)	MRS

d. Định lượng SCFAs

Acid lactic, acetic, propionic và butyric có thể được phát hiện trong môi trường tăng trưởng và được định lượng bằng HPLC. Môi trường lên men được ly tâm và phần nổi phía trên được thu hoạch để phân tích acid hữu cơ bằng HPLC sau khi lọc sử dụng màng acetate cellulose 0,20 µm. Hệ thống HPLC-UV, sử dụng cột Phenomenex C18, pha động acetonitrile/H_2SO_4 5mM, tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột duy trì ở 30°C.

2.5.3. Nội dung 3: Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung

2.5.3.1. Đánh giá an toàn bột sợi nấm

Sinh khối hệ sợi nấm sau khi sấy khô được đóng gói kín trong bao bì PE (polyethylene). Sau đó, các mẫu này được gửi đến Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2) để tiến hành đánh giá các chỉ tiêu an toàn, bao gồm: dư lượng kim loại nặng, vi sinh vật gây bệnh và độc tố nấm mốc (mycotoxins).

2.5.3.2. Quy trình sản xuất nước nấm bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm Trametes versicolor

Quả thể nấm bào ngư sau khi thu mua được tiến hành rửa sạch và được sấy khô đến khối lượng không đổi ở 40^{o}C, nghiền thành bột mịn. Sau đó, lấy 50g bột nấm cho vào 1 L nước cất rồi đun sôi trong 20 phút, thu lấy dịch chiết bằng giấy lọc Whatman 42; bổ sung 50 g/L glucose vào dịch chiết. Hệ sợi nấm *T. versicolor* được nuôi trong môi trường PDB^{+}, sau 20 ngày thu hệ sợi, sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi, nghiền nhỏ thành bột mịn. Sau đó, bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* 0% (w/v, CT1, control); 0,2% (w/v, CT2); 0,4% (w/v, CT3); 0,6% (w/v, CT4); 0,8% (w/v, CT5) và 1%

(w/v, CT6) vào dịch chiết nấm bào ngư ở trên rồi điều chỉnh pH của môi trường về 6,5 bằng dung dịch NaOH 1 N hoặc HCl 1 N ((hóa chất cấp thực phẩm - food grade). Tiếp theo, cho 300 mL dịch chiết vào các bình trụ dung tích 500 mL hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút (Hirayama HV-50, Manufacturing Corporation, Japan), để nguội ở nhiệt độ phòng. Sau đó bổ sung 1% (v/v) dịch vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (mật độ 10^8 CFU/mL) vào các công thức thí nghiệm, lắc đều, ủ ở 37°C trong 12, 24 và 48 giờ [135].

2.5.3.3. Các phương pháp đánh giá chất lượng sản phẩm đồ uống lên men

a. Xác định hàm lượng acid tổng số

Hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) được xác định theo phương pháp chuẩn độ Therner bằng dung dịch NaOH. Nhỏ 1 – 2 giọt phenolphthalein 0,1% vào mỗi bình Erlenmeyer chứa 2 mL dung dịch lên men từ nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm Vân Chi. Tiến hành chuẩn độ bằng cách cho từ từ dung dịch NaOH 0,1N vào trong bình tam giác đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng nhạt và bền màu trong 30 giây thì dừng lại [136]. Hàm lượng acid tổng số (TAN) được tính theo công thức sau:

$$\mathrm{TAN} = \frac{\mathrm{V} \times \mathrm{K} \times 100}{\mathrm{V_1}}$$

Trong đó, TAN (mg/100 mL) là hàm lượng acid tổng số tính theo acid lactic; V (mL) là thể tích dung dịch NaOH 0,1N đã sử dụng; V_1 (mL) là thể tích dung dịch lên men từ nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm Vân chi; K là hệ số khi tính theo acid lactic (K = 0,009).

b. Đánh giá khả năng trung hoà gốc tự do $ABTS^+$ của dịch chiết nấm bào ngư bổ sung sợi nấm *T. versicolor*

Hoạt động khử gốc tự do được xác định bằng phương pháp khử màu $ABTS^+$ được mô tả bởi Nenadis và cs., (2004) [130]. Dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ được chuẩn bị bằng cách cho 2 mL dung dịch ABTS 7 mM vào 2 mL dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,45 mM. Ủ dung dịch trong điều kiện tối 16 giờ, sau đó pha loãng bằng ethanol đến khi đạt độ hấp thụ quang ở bước sóng 734 nm là 0,70 ± 0,05. Để đánh giá hoạt tính kháng oxi hóa, hỗn hợp phản ứng được thiết lập bao gồm 990 µL dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ vào 10 µL nước uống lên men từ dịch chiết nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong thời gian 6 phút. Sau đó, đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 734 nm.

Khả năng bắt gốc tự do của $ABTS^{\bullet+}$ được tính theo công thức sau [137].

$$\text{SA}\ (\%) = \frac{(\text{A}_0\text{-A}_1)}{\text{A}_0} \times 100$$

A_0 – độ hấp thụ của dung dịch gốc $ABTS^{\bullet+}$ trước khi tương tác với hợp chất nghiên cứu; A_1 – độ hấp thụ của dung dịch gốc $ABTS^{\bullet+}$ sau khi phản ứng với hợp chất nghiên cứu.

c. Xác định mật độ tế bào vi khuẩn *L. plantarum*

Dịch chiết bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* được lên men bởi chủng vi sinh vật *L. plantarum* WCFS1 ở 37°C. Tại các mốc thời gian 0, 12, 24 và 48 giờ, mẫu dịch lên men được thu nhận, tiến hành pha loãng thập phân, cấy trải đĩa và đếm khuẩn lạc để xác định mật độ tế bào trong các công thức thí nghiệm. Mật độ tế bào (D) được tính theo công thức sau:

$$\text{D} = \frac{\sum \text{C}}{\text{V} \times (\text{n}_1 + 0.1\text{n}_2) \times \text{d}}$$

Trong đó: ΣC là tổng số khuẩn lạc trên hai đĩa petri có độ pha loãng liên tiếp; n_1, n_2 là số đĩa petri ở hai độ pha loãng liên tiếp đã chọn; V (mL) là thể tích mẫu được đưa vào mỗi đĩa petri; d là độ pha loãng tương ứng với n_1 (độ pha loãng nhỏ hơn).

d. Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng vi sinh vật có hại

Mẫu nước lên men từ dịch chiết nấm bào ngư có bổ sung hệ sợi nấm Vân chi ở các công thức thí nghiệm được li tâm (5000 vòng/20 phút ở 4°C) rồi thu lấy phần nổi để xác định khả năng ức chế sinh trưởng đối với *E. coli* và *S. aureus*. Lấy 50 dung dịch vi khuẩn đã pha loãng ở 10^8 CFU/mL cấy vào các đĩa môi trường MH bằng kỹ thuật cấy trãi đĩa. Tiến hành đục lỗ thạch có đường kính 6 mm trên các đĩa petri chứa 2 vi khuẩn ở trên. Cho vào các lỗ thạch phần chất nổi thu từ quá trình ly tâm ở trên và ủ ở 37 °C trong 24h. Khả năng ức chế được xác định bằng cách đo đường kính (mm) vùng ức chế trên các đĩa thạch. Đối với thí nghiệm kháng khuẩn này, đối chứng là công thức chỉ chứa dịch chiết nấm bào ngư (không bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* và chủng lợi khuẩn *L. plantarum*) [134].

e. Đánh giá cảm quan

Phương pháp đánh giá cảm quan sản phẩm nước nấm bào ngư lên men lactic được thực hiện bằng thang đo 9 điểm Hedonic theo mô tả của Adriana Gámbaro nhằm xác định mức độ ưa thích của người tiêu dùng đối với sản phẩm. Các chỉ tiêu cảm quan được

đánh giá bao gồm màu sắc, mùi, vị, trạng thái và mức độ chấp nhận tổng thể của sản phẩm [138]. Hội đồng đánh giá bao gồm 82 thành viên (độ tuổi từ 18 – 40 tuổi) thử chưa qua đào tạo chuyên sâu về đánh giá cảm quan. Các thành viên này được lựa chọn ngẫu nhiên, bao gồm sinh viên và giảng viên đang công tác và học tập tại Khoa Sinh - Nông nghiệp - Môi trường, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng. Người được mời tham gia đánh giá có sức khỏe bình thường, không dị ứng với nấm hoặc các sản phẩm lên men và được hướng dẫn ngắn gọn về cách sử dụng thang điểm Hedonic trước khi tiến hành đánh giá nhưng không được cung cấp thông tin chi tiết về công thức mẫu nhằm tránh ảnh hưởng đến kết quả cảm quan.

Mẫu nước nấm bào ngư lên men lactic được mã hóa bằng các ký hiệu ngẫu nhiên và trình bày theo thứ tự ngẫu nhiên cho người tham gia đánh giá nhằm hạn chế sai số cảm quan. Người thử được yêu cầu nếm từng mẫu độc lập và cho điểm theo thang Hedonic từ 1 đến 9, trong đó: 1 = cực kỳ không thích, 5 = không thích cũng không ghét và 9 = cực kỳ thích.

Quá trình đánh giá được tiến hành trong điều kiện đủ ánh sáng, không có mùi lạ ảnh hưởng đến cảm nhận. Người tham gia được cung cấp nước lọc để súc miệng giữa các lần thử mẫu nhằm giảm ảnh hưởng chéo giữa các mẫu. Kết quả cảm quan được tổng hợp và xử lý thống kê để xác định mức độ chấp nhận của người tiêu dùng đối với sản phẩm nước nấm bào ngư lên men lactic.

f. Đánh giá an toàn chất lượng sản phẩm

Mẫu sản phẩm nước lên men được gửi đến Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2 (QUATEST 2) để tiến hành đánh giá các chỉ tiêu an toàn, bao gồm:

- Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/mL) được thực hiện theo ISO 4833-1:2013
- Tổng số bào tử nấm men (CFU/mL) được thực hiện theo ISO 21527-1:2008
- Mật độ vi khuẩn *E. coli* (CFU/mL) được đếm theo ISO 16649-2: 2001
- Mật độ *S. aureus* (CFU/mL) được xác định theo ISO 6888-1:2021
- Hàm lượng Cd và Pb (mg/L) được xác định theo AOAC 999.11
- Hàm lượng Hg (mg/L) được xác định theo AOAC 971.21
- Vi khuẩn *Cl. perfringens* được định lượng theo ISO 7937: 2004

2.6. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại độc lập. Thí nghiệm so sánh, thống kê và phân tích sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm Minitab 19.0, sai khác có ý nghĩa thống kê được xác định với $P < 0,05$.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

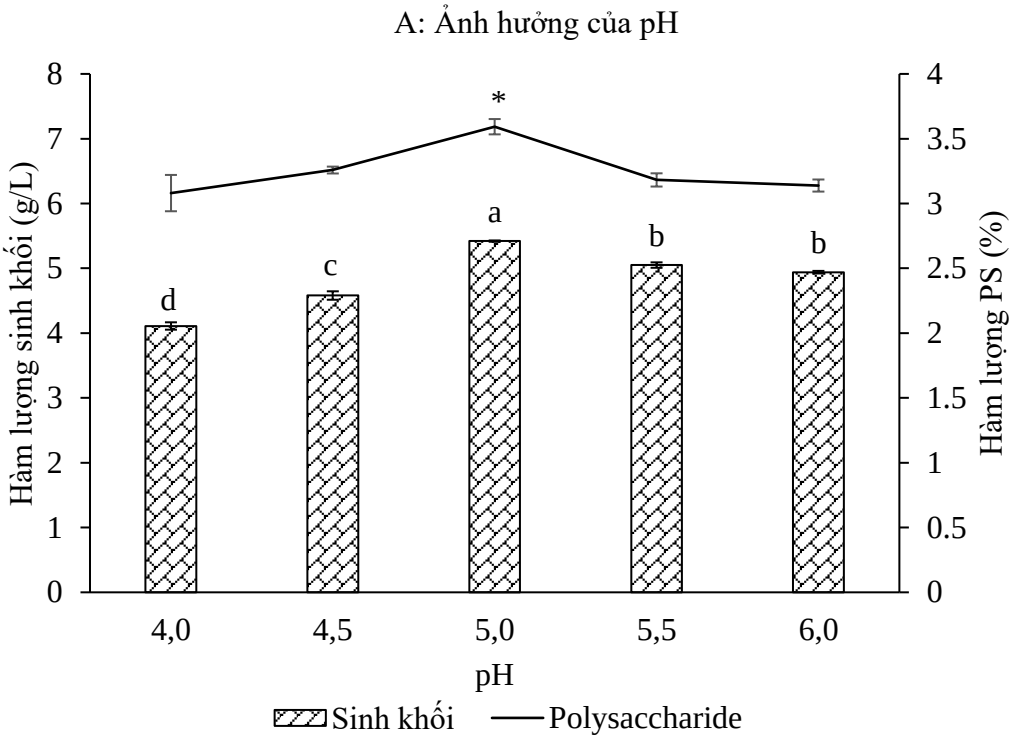
3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm

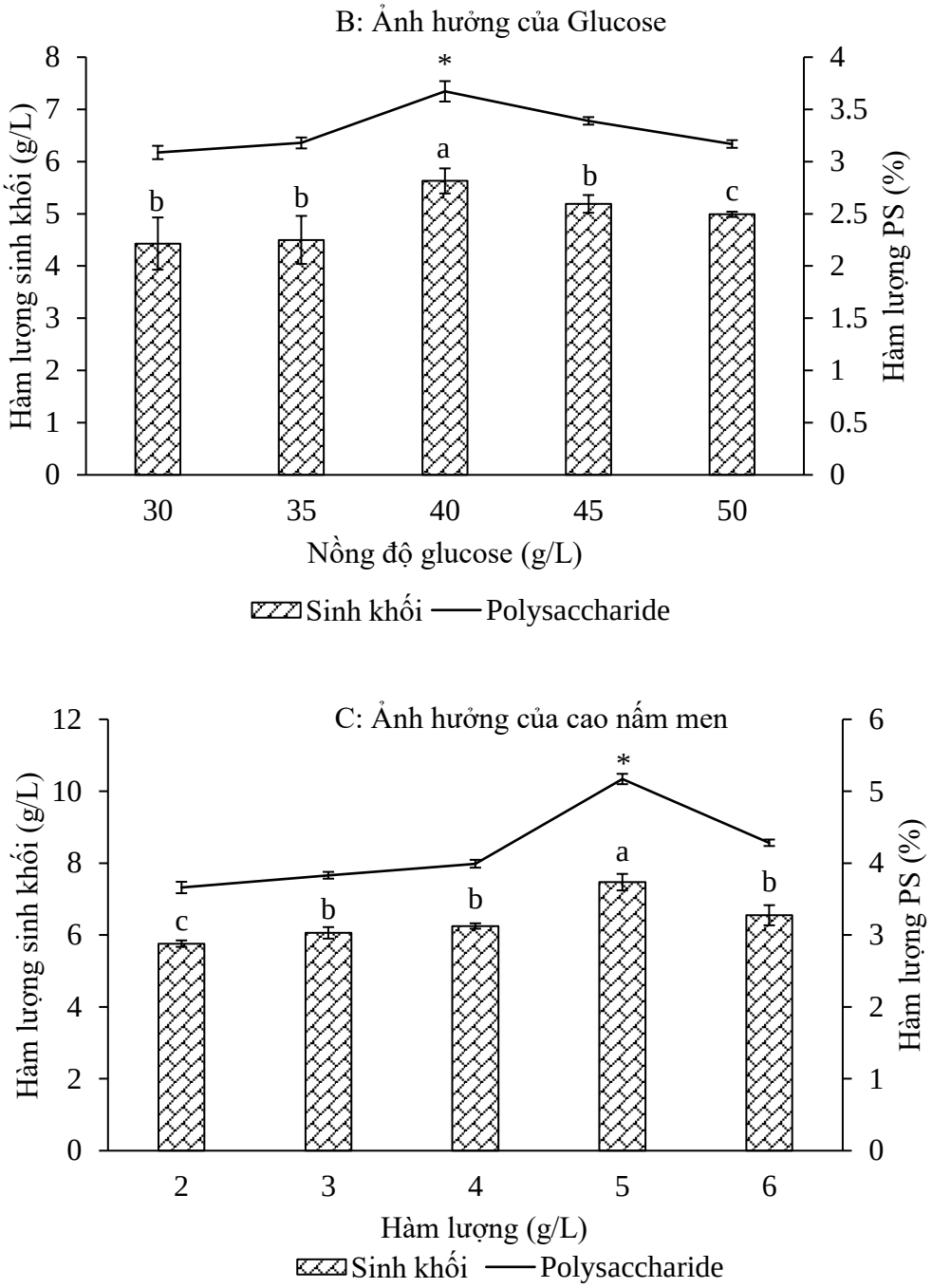
3.1.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm C. militaris

3.1.1.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm C. militaris

Glucose, cao nấm men, pH là những yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng và phát triển của nấm; đây những yếu tố dinh dưỡng và môi trường cơ bản cần được tối ưu hóa để đạt được sinh trưởng hệ sợi nấm hiệu quả nhất. Việc tìm ra tỷ lệ và giá trị tối ưu của từng yếu tố cho từng loài nấm cụ thể là chìa khóa để thành công trong nuôi cấy hệ sợi nấm.

Năng suất sinh khối và hàm lượng PS của hệ sợi nấm *C. militaris* khi được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ở các giá trị khác nhau về pH, hàm lượng glucose và cao nấm men được thể hiện **Hình 3.1.**





Hình 3.1. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*. *A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một điều kiện chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, p < 0,05).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tại pH 5, hệ sợi nấm *C. militaris* sinh trưởng tốt nhất, đạt hàm lượng sinh khối khô và hàm lượng polysaccharide (PS) cao nhất, tương

ứng là 5,42 g/L và 3,59%. Trong phạm vi khảo sát, khi tăng dần pH của môi trường nuôi cấy, sinh khối hệ sợi nấm tăng dần, đạt cực đại tại pH 5 và sau đó có xu hướng giảm. Điều này chứng tỏ nấm *C. militaris* phát triển tối ưu trong môi trường có tính acid nhẹ. Mức pH tối ưu này giúp đảm bảo hoạt động hiệu quả của các enzyme nội bào và tối ưu hóa quá trình hấp thu dinh dưỡng. Ngược lại, nếu môi trường quá acid hoặc quá kiềm, hoạt tính enzyme sẽ bị ức chế, làm giảm đáng kể khả năng sinh trưởng, thậm chí gây chết hệ sợi.

Đáng chú ý, lượng sinh khối thu được trong nghiên cứu này cao hơn so với kết quả công bố của Trần Thu Hà và cs. (2016) (đạt 4,86 g/L) khi nuôi cấy *C. militaris* trong môi trường dịch thể ở cùng điều kiện pH 5 [139]. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ sự không đồng nhất về chủng giống hoặc thành phần dinh dưỡng trong môi trường (như tỷ lệ C/N, nguồn khoáng chất và các vi lượng kích thích sinh tổng hợp) – những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình trao đổi chất của nấm. Ngoài ra, các thông số vật lý trong quá trình lên men như kiểu bình nuôi cấy, tốc độ khuấy hay cấu trúc hệ sợi nấm cũng là những yếu tố then chốt tác động đến hiệu suất tổng hợp sinh khối và PS.

Khi tăng hàm lượng glucose sinh khối khô hệ sợi nấm có xu hướng tăng lên và đạt cực đại tại mức hàm lượng glucose là 40 g/L. Ở giai đoạn này hệ sợi nấm sinh trưởng khỏe và khối lượng sinh khối khô và PS đạt được thu được cao nhất tương ứng với 5,63 g/L và PS đạt 3,673%. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng lượng glucose thì lượng sinh khối của hệ sợi nấm thu được có xu hướng giảm, ở hàm lượng glucose 45 và 50 g/L với khối lượng sinh khối dao động trong khoảng 4,99 - 5,19 g/L. Nồng độ glucose trong môi trường thấp sẽ không đủ nguồn cacbon dẫn đến sợi nấm sinh trưởng chậm, hệ sợi yếu, và sinh khối thấp; mặc khác, nồng độ glucose quá cao trong môi trường lỏng, có thể tạo áp suất thẩm thấu cao gây ức chế sinh trưởng của tế bào nấm. Nghiên cứu của Trần Thị Thu Hà và cs. (2016) cho rằng, hệ sợi nấm *C. militaris* sinh trưởng tốt trên môi trường bổ sung đồng thời sucrose và glucose với hàm lượng là 20 g/L [139].

Cao nấm men là nguồn cung cấp nitơ hữu cơ và vitamin nhóm B, giúp nấm phát triển mạnh mẽ và tạo ra sinh khối lớn hơn. Nghiên cứu này cho thấy khi tăng hàm lượng cao nấm men đến mức 6g/L sinh khối và PS hệ sợi nấm có xu hướng tăng lên, lượng sinh khối khô và PS thu được cao nhất (7,47 g/L và 5,17%) khi được nuôi cấy trên môi trường với hàm lượng cao nấm men là 5 g/L. Tuy nhiên, tiếp tục tăng lượng cao nấm men lên qua 6 g/L sinh khối lại giảm còn 6,55 ± 0,28 g/Lvà PS giảm còn 4,28%. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Trần Thu Hà và cs. (2016), (10, 85 g/L) [139]. Nghiên cứu của Deshmukh và Bhaskaran (2024) cho thấy trong điều kiện tối ưu, nhiệt độ 20°C, glucose 2,5% (w/v) và chiết xuất nấm men 0,8% (w/v), năng suất

sinh khối sợi nấm tối đa đạt 547 ± 2,09 mg/100 mL [140]. Dựa trên các kết quả khảo sát, các thông số môi trường dịch thể gồm pH 5, nồng độ glucose 40 g/L và cao nấm men 5 g/L được lựa chọn làm giá trị tâm cho các thí nghiệm tối ưu hóa tiếp theo.

3.1.1.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm C. militaris

Để đánh giá ảnh hưởng của các biến độc lập (X_1: pH; X_2: nồng độ glucose; X_3: nồng độ cao nấm men) cũng như sự tương tác giữa chúng đến các hàm mục tiêu (Y_1: sinh khối; Y_2: hàm lượng PS), thí nghiệm được thiết kế theo mô hình Box-Behnken. Các nghiệm thức và kết quả thực nghiệm tương ứng về sinh khối và PS được trình bày chi tiết tại **Bảng 3.1.** Tiếp theo, kết quả phân tích phương sai (ANOVA) ở **Bảng 3.2** được sử dụng để đánh giá mức độ ý nghĩa của các biến đơn lẻ và các tương tác hiệp đồng đối với hai hàm mục tiêu nêu trên.

Bảng 3.1. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm *C. militaris*

TT	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu	
	pH (X_1)	Glucose (g/L) (X_2)	Cao nấm men (g/L) (X_3)	Sinh khối (g/L) (Y_1)	PS (%) (Y_2)
1	4	40	4	5,20	3,86
2	4	30	5	3,78	3,54
3	6	40	6	5,23	4,13
4	5	30	6	6,82	4,15
5	5	30	4	4,93	3,66
6	5	40	5	8,97	5,29
7	6	50	5	5,37	3,18
8	5	40	5	9,17	5,37
9	4	40	6	4,07	3,89
10	6	30	5	5,43	3,31
11	6	40	4	5,70	3,50
12	5	50	6	5,43	4,20
13	5	40	5	8,76	5,19
14	5	50	4	5,18	4,38
15	4	50	5	3,85	3,32

Bảng 3.2. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	41,2573	6,8762	17,93	0,000
Linear	3	38,8168	12,9389	33,74	0,000
X_1	1	23,1543	23,1543	60,37	0,000
X_2	1	13,1216	13,1216	34,21	0,000
X_3	1	7,9835	7,9835	20,82	0,002
Square	3	38,1452	12,7151	33,15	0,000
X_1^2	1	22,1555	22,1555	57,77	0,000
X_2^2	1	13,4640	13,4640	35,10	0,000
X_3^2	1	7,9471	7,9471	20,72	0,002
Error	8	3,0684	0,3835		
Lack-of-Fit	6	2,9843	0,4974	11,83	0,080
Pure Error	2	0,0841	0,0420		
Total	14	44,3257			

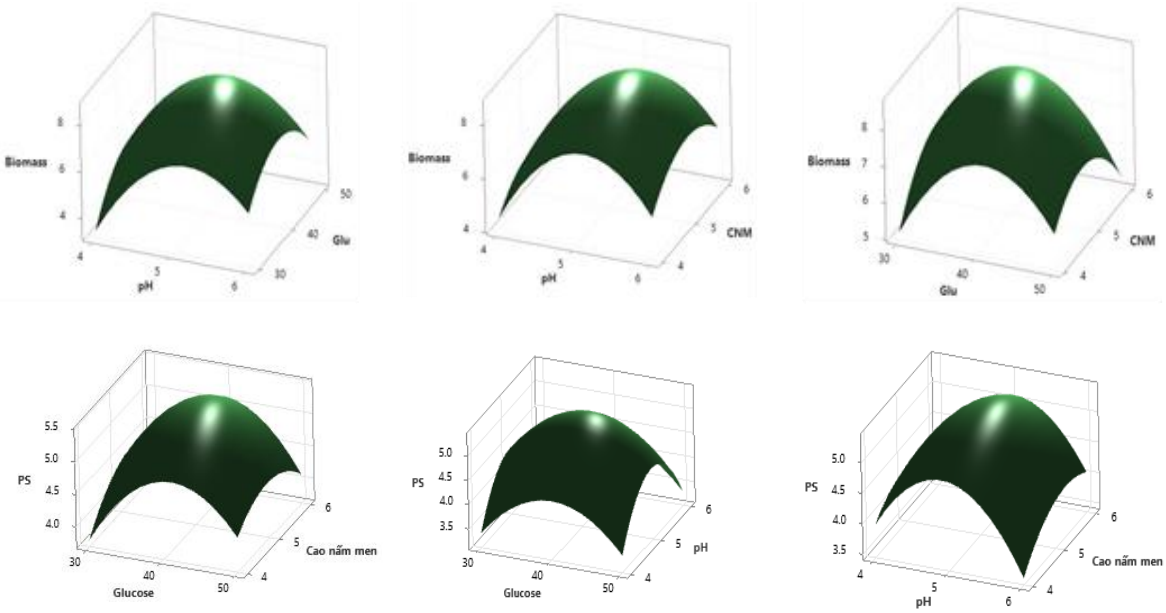
Bảng 3.3. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng polysaccharide từ hệ sợi nấm *C. militaris*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	6,93753	1,15626	23,10	0,000
Linear	3	6,74332	2,24777	44,91	0,000
X_1	1	4,39108	4,39108	87,72	0,000
X_2	1	2,66875	2,66875	53,32	0,000
X_3	1	0,45356	0,45356	9,06	0,017
Square	3	6,76786	2,25595	45,07	0,000
X_1^2	1	4,46093	4,46093	89,12	0,000
X_2^2	1	2,64681	2,64681	52,88	0,000
X_3^2	1	0,42474	0,42474	8,49	0,019
Error	8	0,40044	0,05006		
Lack-of-Fit	6	0,38417	0,06403	7,87	0,117
Pure Error	2	0,01627	0,00813		
Total	14	7,33797			

Phân tích phương sai (ANOVA) cho thấy cả hai mô hình hồi quy bậc hai mô tả năng suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide đều có ý nghĩa thống kê rất cao (giá

trị P của mô hình = 0,000 < 0,01). Đối với biến đáp ứng năng suất sinh khối, sự thay đổi của các yếu tố tuyến tính bậc nhất (X_1, X_2, X_3) và các tác động bậc hai (X_1^2, X_2^2, X_3^2) đều thể hiện mức độ ảnh hưởng cực kỳ rõ rệt đến hàm mục tiêu (p = 0,000). Trong khi đó, tác động tương tác kép giữa các biến độc lập đã được chứng minh là không có ý nghĩa thống kê (p > 0,05) và được tinh giản để tối ưu hóa mô hình.

Đặc biệt, chỉ số Lack-of-Fit (độ thiếu thích hợp) của mô hình sinh khối đạt giá trị p = 0,080 > 0,05 khẳng định sự sai lệch của mô hình dự đoán so với dữ liệu thực nghiệm là không có ý nghĩa, chứng tỏ mô hình toán học phản ánh đúng kết quả thực tế. Sự phù hợp và khả năng giải thích dữ liệu của các phương trình hồi quy được minh chứng rõ nét qua hệ số xác định R^2 đạt mức rất cao, lần lượt là 0,9308 đối với mô hình sinh khối và 0,9454 đối với mô hình hàm lượng PS. Dựa trên độ tin cậy này, mô hình đáp ứng được yêu cầu để tiến hành trích xuất các thông số vận hành tối ưu cho quá trình nuôi cấy hệ sợi nấm. Liu và cs (2012) đã nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy nấm *C. militaris* bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. Kết quả cho thấy, hàm lượng glucose thích hợp với sự sinh trưởng của hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể là 4,62%, tương đương 46,2 g/L trong môi trường nuôi cấy [141]. Điều này cho thấy, sự sinh trưởng sợi nấm *C. militaris* cần hàm lượng glucose từ 39,9 - 46,2 g/L như một nguồn dinh dưỡng carbon thiết yếu [141]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao nấm men là nguồn cung cấp thêm nitơ cho sự sinh trưởng của sợi nấm.



(A) **(B)** **(C)**

Hình 3.2. Ảnh hưởng kết hợp của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *C. militaris*

Ghi chú: (A) pH và glucose; (B) pH và cao nấm men; (C) glucose và cao nấm men

Từ các đồ thị bề mặt đáp ứng (**Hình 3.2**), có thể thấy dạng mặt cong paraboloid lồi hướng lên trên, minh chứng rõ nét cho việc tồn tại một điểm cực đại thực sự cho hàm mục tiêu. Tác động bậc hai của các yếu tố độc lập (pH, nồng độ glucose và cao nấm men) thể hiện sự ảnh hưởng mạnh mẽ nhất đến năng suất sinh khối. Theo mô hình dự đoán, năng suất sinh khối đạt cực đại là 9,02 g/L tại điều kiện tối ưu: pH 5,15; nồng độ glucose 39,9 g/L và cao nấm men 5,03 g/L. Để kiểm chứng độ tin cậy của mô hình, thí nghiệm thực tế đã được tiến hành lặp lại 3 lần tại bộ thông số tối ưu này. Kết quả thực nghiệm cho thấy năng suất sinh khối khô đạt 8,90 ± 0,25 g/L, rất tương đồng với giá trị dự đoán lý thuyết. Điều này khẳng định phương trình hồi quy mô tả sự tương quan là phù hợp và có độ tin cậy cao.

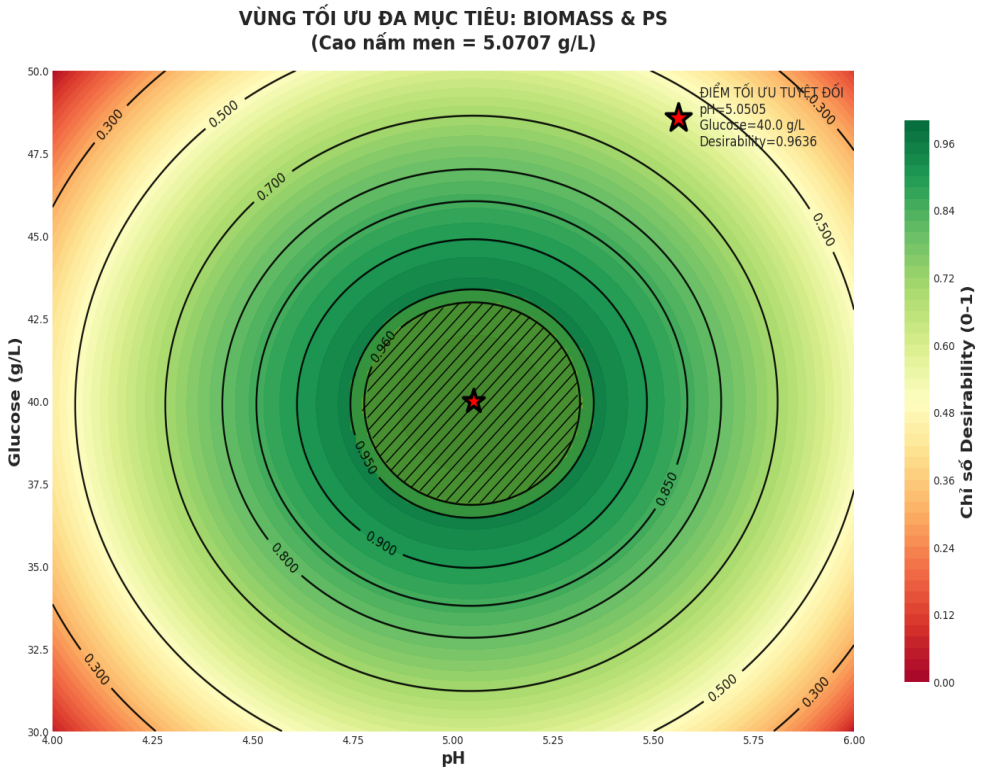
Trong nghiên cứu của Sugenendran Supramani và cs. (2019), đã tìm ra điều kiện tối ưu thu sinh khối sợi nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) bằng thiết kế phức hợp trung tâm (CCD) với điều kiện pH đầu vào 4,01; 32,09 g/L glucose và tốc độ lắc 102 vòng/phút cho sinh khối đạt 5,12 g/L [142]. Điều này cho thấy, lượng sinh khối sợi nấm *C. militaris* trong nghiên cứu này thu được cao hơn so với các nấm Linh chi. Vì vậy, việc làm chủ và tối ưu hóa hệ thống nuôi cấy dịch thể này mở ra triển vọng lớn trong việc sản xuất sinh khối nấm quy mô lớn, cung cấp nguồn nguyên liệu chất lượng cao phục vụ cho ngành công nghiệp thực phẩm định hướng chức năng. Nghiên cứu của Deshmukh & Bhaskaran, (2024) đã cho thấy trong điều kiện tối ưu, nhiệt độ 20°C, glucose 2,5% (w/v) và chiết xuất nấm men 0,8% (w/v), năng suất sinh khối sợi nấm tối đa đạt 547 ± 2,09 mg/100 mL, cao hơn 1,95 lần so với năng suất trong môi trường cơ bản. Những phát hiện này cho thấy việc tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy và dinh dưỡng có thể tăng cường sản xuất sinh khối sợi nấm của *Cordyceps militaris*, cung cấp nguồn nấm có giá trị này bền vững và tiết kiệm chi phí [140].

Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa khối lượng sinh khối và hàm lượng PS với các yếu tố ảnh hưởng như sau:

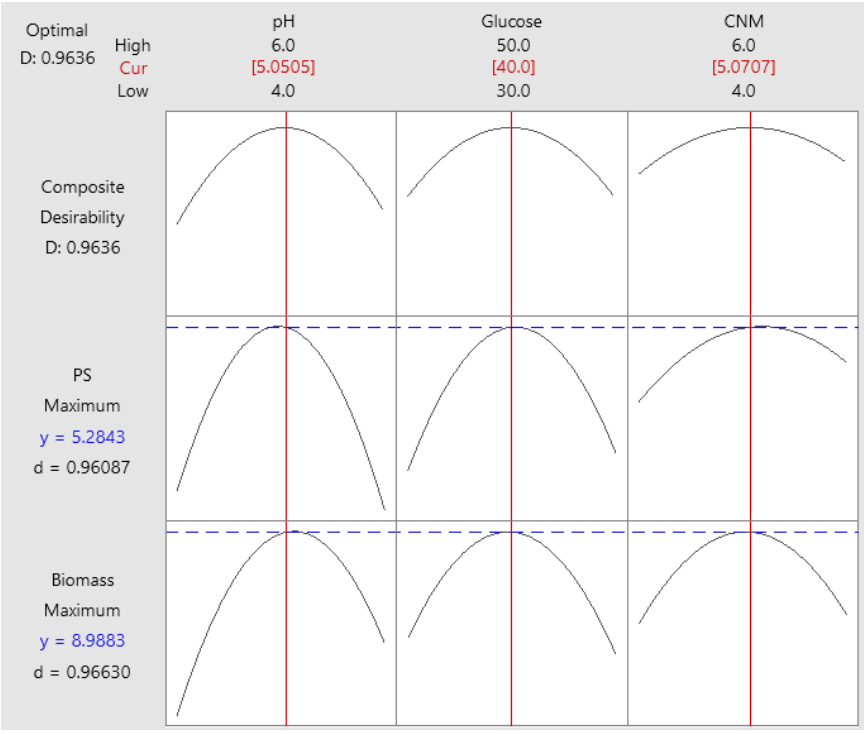
$$Y_1 = -122,3 + 25,10\ X_1 + 1,514\ X_2 + 14,74\ X_3 - 2,450\ X_1^2 - 0,01910\ X_2^2 - 1,467\ X_3^2$$

$$Y_2 = -44,73 + 10,93\ X_1 + 0,6826\ X_2 + 3,51\ X_3 - 1,099\ X_1^2 - 0,00847\ X_2^2 - 0,339\ X_3^2$$

Trong đó: X_1, X_2, X_3 lần lượt là: pH, Glucose và cao nấm men



Hình 3.3. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu



Hình 3.4. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide

3.1.1.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm C. militaris

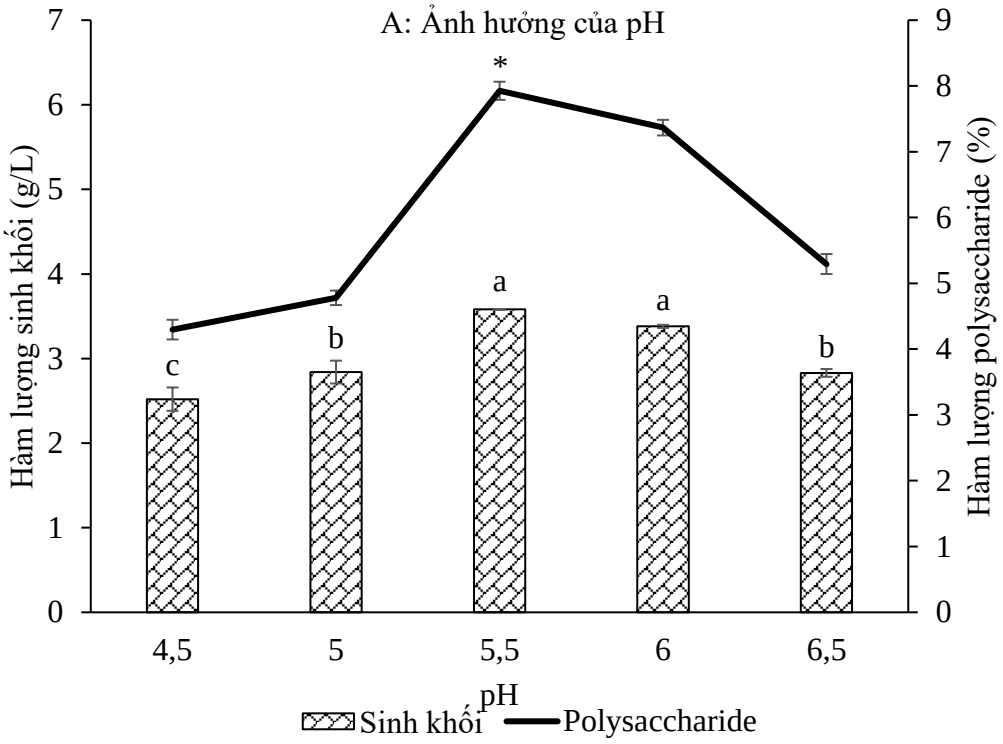
Mô hình dự đoán tại giá trị pH = 5,05, hàm lượng glucose 40 g/L và hàm lượng

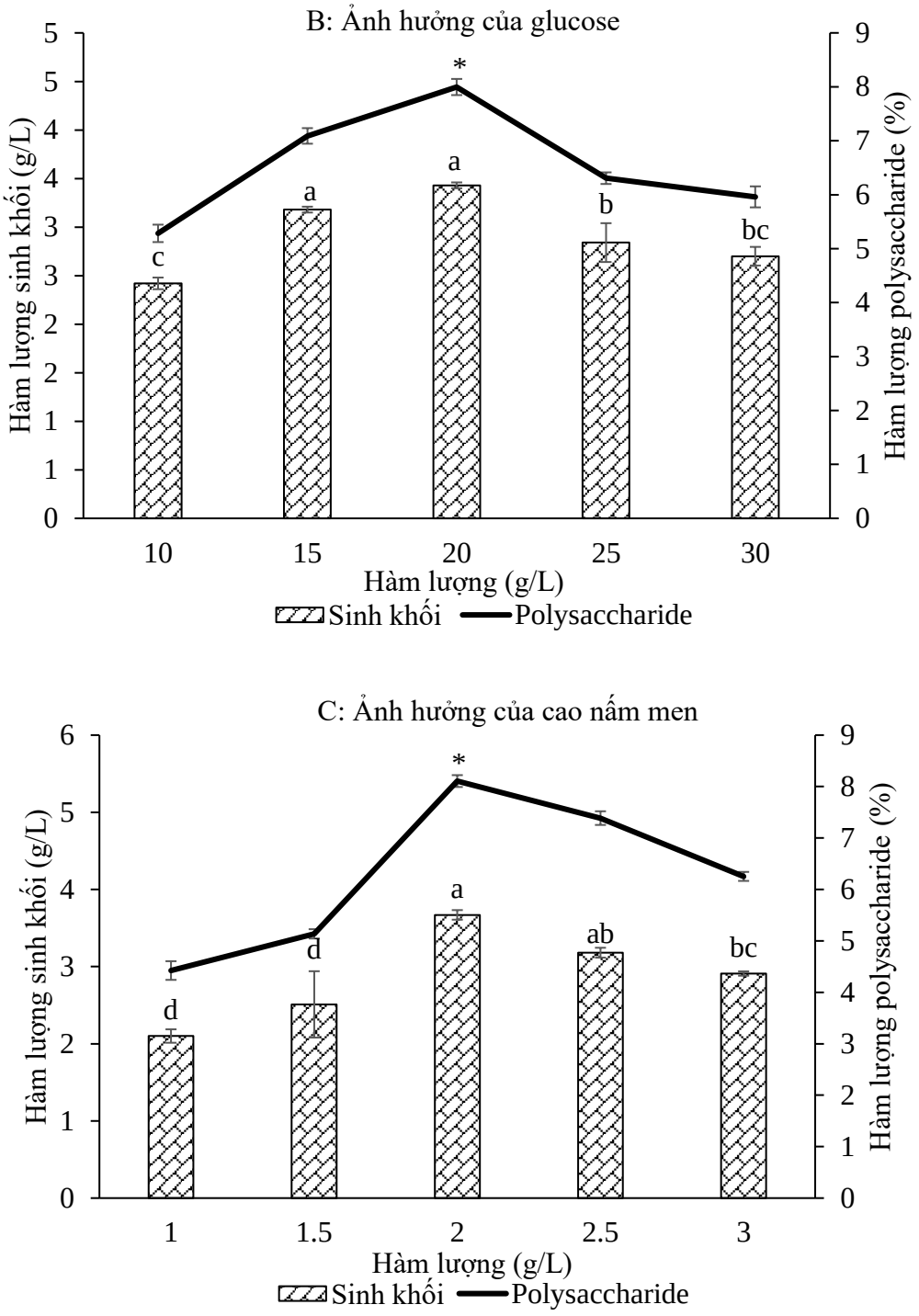
cao nấm men 5,07 g/L thì khối lượng sinh khối nấm đạt được cao nhất; tương ứng với sinh khối dự đoán đạt được là 8,98 g/L. Thực nghiệm để kiểm tra các điều kiện tối ưu, kết quả thực nghiệm cho thấy khối lượng sinh khối khô thu được tại điều kiện tối ưu là 8,90 ± 0,25 g/L; PS đạt 5,28 ± 0,16% tương đương với giá trị dự đoán. Sai số tuyệt đối với sinh khối và hàm lượng PS lần lượt là 0,09 g/L và 0,0%. Tương ứng, sai số tương đối ở mức rất thấp, đạt 1,0 % cho sinh khối và 0,00% cho hàm lượng PS. kết quả tối ưu hóa là cơ sở ban đầu cho nghiên cứu mở rộng quy mô nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối hệ sợi nấm giàu polysaccharide.

3.1.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy đối với hệ sợi nấm T. versicolor

3.1.2.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đơn biến đến năng suất sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm T. versicolor

Sinh khối và hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor* khi được nuôi cấy trong môi trường dịch thể ở các giá trị khác nhau về pH, hàm lượng glucose và cao nấm men được thể hiện ở **Hình 3.5.**





Hình 3.5. Ảnh hưởng điều kiện nuôi: pH, hàm lượng glucose và cao nấm men trong môi trường dịch thể đến sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor*. *A: Ảnh hưởng của pH, B: Ảnh hưởng của glucose, C: Ảnh hưởng của cao nấm men*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một điều kiện chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, p <0,05).

pH, hàm lượng glucose và cao nấm men ảnh hưởng đến sự sinh trưởng nấm Vân chi nuôi cấy dịch thể. Khi pH tăng từ 4,5 đến 5,5 sinh khối sợi nấm và hàm lượng PS tăng dần, ở pH 5,5 sợi nấm sinh trưởng tốt nhất khối lượng sinh khối khô và PS là 3,58±0,004 g/L và 7,93%, tiếp tục tăng pH sinh khối và cả PS lại có xu hướng giảm dần. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Yadav và Tripathi (1991) chỉ ra rằng điều kiện pH tối ưu để lên men sợi nấm Vân chi là pH = 5,5 [143]. Hoàng Thị Yến Dung và cs. (2023) đã khảo sát và cho thấy pH 6 là điều kiện tối ưu cho sinh khối sợi cao nhất (4,76 g/L) [144]. Veena & Pandey (2012) ghi nhận pH tối ưu cho tăng trưởng sợi là 4,5–6,0 [145].

Tại hàm lượng glucose 20 g/L sinh khối khô sợi nấm đạt giá tốt nhất 3,43 ± 0,03 g/L và hàm lượng PS cũng đạt cao nhất là 7,99±0,15%. Tuy nhiên, tiếp tục tăng hoặc giảm hàm lượng glucose, sinh khối sợi có xu hướng giảm dao động từ 2,42-3,18 g/L. Điều này có thể là do hàm lượng glucose quá cao gây chệnh lệch áp suất thẩm thấu, dẫn đến tế bào hấp thụ nước kém, còn hàm lượng glucose thấp thì không đủ nguồn dinh dưỡng cho nấm phát triển.

Bên cạnh nguồn Carbon và pH nguồn Nitơ hữu cơ bổ sung cũng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm. Khi tăng lượng cao nấm men thì lượng sinh khối và cả PS có xu hướng tăng, hàm lượng cao nấm men tốt nhất trong nghiên cứu này là 2 g/L với hàm lượng sinh khối là 3,67 ± 0,062 g/L và PS là 8,10 ± 0,115%. Tuy nhiên tiếp tục tăng lượng cao nấm men lên thì sinh khối nấm và cả PS có xu hướng giảm. Điều này là do nồng độ Nitơ cao gây ức chế hoạt tính của một số loại enzyme làm ảnh hưởng đến quá trình chuyển hoá các chất trong tế bào làm nấm sinh trưởng kém. Nghiên cứu của Adebayo-Tayo và Ugwu (20110 cho thấy cao nấm men cho sinh khối cao nhất của *T. versicolor* (khoảng 1,0 – 1,6 g/L khô) so với các nguồn nitrogen khác [146].

Như vậy sợi nấm phát triển tốt ở khoảng pH 5,5-6; nồng độ glucose từ 15-20 g/L; cao nấm men từ 2-2,5 g/L và pH 5,5; glucose 20 g/L; CNM 2 g/L thì sinh khối sợi nấm Vân chi đạt lượng sinh khối cao nhất.

Phân tích mối tương quan tuyến tính giữa năng suất sinh khối và hàm lượng PS của nấm *T. versicolor* khi nuôi cấy ở các khoảng pH, glucose và cao nấm men cho thấy có sự tương quan tuyến tính thuận rất chặt chẽ. Khi sinh khối tăng, hàm lượng PS cũng tăng. Giá trị p-value đều rất thấp ($p < 0,05$) cho thấy mối quan hệ này có ý nghĩa thống kê cao và ít khả năng xảy ra do sai số ngẫu nhiên. Dựa vào kết quả phân tích tương quan

có thể thấy trong quá trình nuôi cấy, thay vì phải đo hàm lượng qua đó có thể ước tính nhanh một cách tương đối chính xác thông qua việc đo sinh khối. Điều này giúp tối ưu hóa quy trình theo dõi và thu hoạch.

3.1.2.2. Xác định điều kiện tối ưu nhằm thu nhận sinh khối và polysaccharide từ hệ sợi nấm T. versicolor

Thực hiện quy hoạch thực nghiệm theo mô hình Box-Behnken. Bố trí các nghiệm thức theo Bảng 3.4, trên bảng cũng thể hiện kết quả định lượng sinh khối và PS sợi nấm từ các nghiệm thức. Bảng 3.5 trình bày kết quả phân tích phương sai để đánh giá mức ý nghĩa của các biến và sự tương tác của chúng đối với các hàm mục tiêu lần lượt là Y_1 và Y_2.

Bảng 3.4. Thực nghiệm khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu sinh khối sợi nấm *T. versicolor*

TT	Các yếu tố ảnh hưởng			Hàm mục tiêu	
	pH (X_1)	Glucose (g/L) (X_2)	Cao nấm men (g/L) (X_3)	Sinh khối (g/L) (Y_1)	PS (%) (Y_2)
1	5,5	20	2	3,67	8,21
2	5	15	2	2,12	4,42
3	6	20	2,5	2,33	6,55
4	6	25	2	2,48	6,52
5	5,5	25	1,5	2,41	6,67
6	5,5	15	1,5	2,30	5,53
7	5,5	20	2	3,68	8,34
8	5	25	2	2,30	5,34
9	6	20	1,5	2,32	5,94
10	6	15	2	2,21	5,47
11	5	20	2,5	2,20	5,53
12	5	20	1,5	2,32	4,93
13	5,5	20	2	3,59	8,15
14	5,5	15	2,5	2,77	5,46
15	5,5	25	2,5	2,41	7,28

Kết quả phân tích phương sai (ANOVA) từ Bảng 3.5 và Bảng 3.6 cho thấy cả hai mô hình hồi quy bậc hai mô tả năng suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide (PS)

của nấm *T. versicolor* đều đạt mức ý nghĩa thống kê cực kỳ cao ($p = 0,000 < 0,01$). Phân tích chi tiết chỉ ra rằng, tất cả các yếu tố tuyến tính bậc nhất (X_1, X_2, X_3) và tác động bậc hai (X_1^2, X_2^2, X_3^2) đều có ảnh hưởng rất rõ rệt đến hai hàm mục tiêu ($p = 0,000$). Trong đó, dựa trên giá trị kiểm định F, yếu tố X_1 (pH) là nhân tố có tác động tuyến tính mạnh mẽ nhất đến cả quá trình sinh trưởng ($F = 103,49$) và tích lũy PS ($F = 255,59$). Đáng chú ý, các tương tác hai chiều giữa các yếu tố độc lập không thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và đã được chủ động loại bỏ để tinh giản mô hình, cho thấy các thông số này tác động một cách độc lập lên hàm mục tiêu. Các tương tác hai chiều không có ý nghĩa thống kê có thể là do kết quả định vị tốt từ bước sàng lọc đơn yếu tố (OFAT) trước đó, tọa độ điểm tâm đã được bố trí rất sát với đỉnh tối ưu thực tế. Tại vùng không gian tiệm cận bão hòa này, các ảnh hưởng tuyến tính và ảnh hưởng bậc hai đã chi phối gần như hoàn toàn (đóng góp từ 96% - 98% vào sự biến thiên của mô hình). Bên cạnh đó về mặt sinh lý học, khi điều kiện môi trường đã ở trạng thái tối ưu, không có sự thiếu hụt dinh dưỡng hay stress cực đoan, nguồn carbon (glucose), nitrogen (cao nấm men) và pH đóng vai trò là các giới hạn độc lập. Chúng đi trực tiếp vào con đường sinh trưởng và sinh tổng hợp chuyển hóa thứ cấp của tế bào nấm mà không đòi hỏi sự bù trừ hay tạo ra các hiệu ứng hiệp đồng/đối kháng mạnh mẽ như ở các điều kiện nuôi cấy bất lợi.

Mặc dù giá trị p của Lack-of-Fit đạt 0,08 (sát ngưỡng 0,05), nhưng về nguyên tắc thống kê ($p > 0,05$), điều này vẫn khẳng định mô hình không bị thiếu sự phù hợp. Do đó, hàm mục tiêu vẫn đảm bảo độ tin cậy để dự đoán điểm tối ưu.

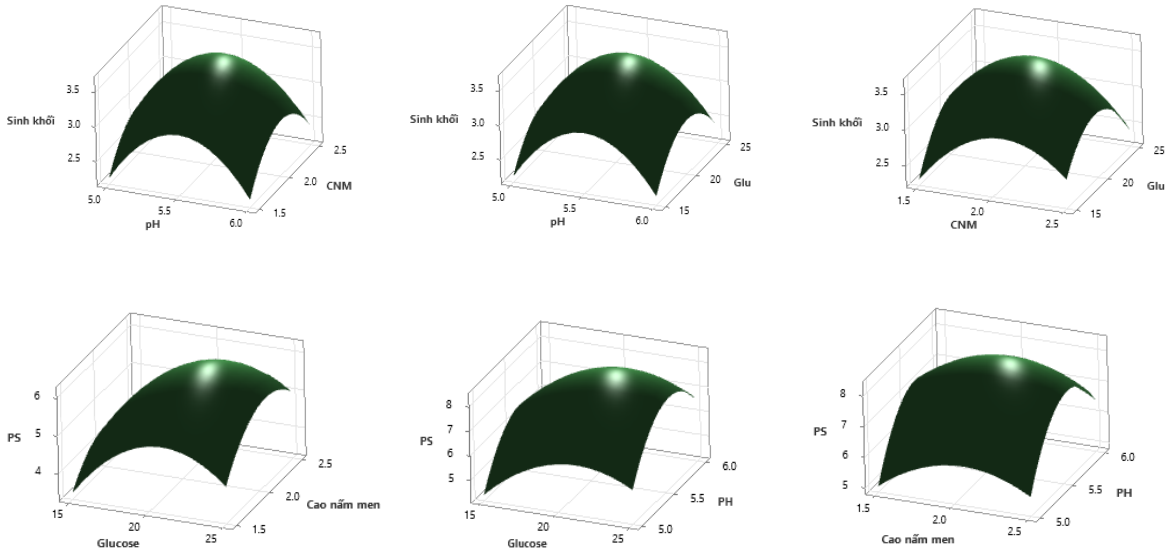
Giá tri $R^2 = 0,96$ chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X_1, X_2, X_3) ở dạng tuyến tính và bậc hai giải thích được giải thích được hơn 96% sự biến thiên của sinh khối nấm *T. versicolor* trong quá trình lên men chìm. Khoảng cách giữa R^2 và R^2_{adj} khá nhỏ (khoảng 0,03, nằm trong ngưỡng an toàn dưới 0,2), chứng tỏ mô hình không chứa các biến nhiễu hoặc biến thừa gây sai lệch. Sự phù hợp của mô hình toán học với dữ liệu thực nghiệm được khẳng định chắc chắn thông qua kiểm định độ thiếu thích hợp (Lack-of-Fit). Cụ thể, giá trị p của Lack-of-Fit đối với mô hình sinh khối và hàm lượng PS lần lượt là 0,082 và 0,166 (đều lớn hơn ngưỡng 0,05). Điều này minh chứng rằng sự sai lệch giữa giá trị dự báo từ mô hình và giá trị thực tế là không có ý nghĩa thống kê, đồng thời mức độ nhiễu (Pure Error) là thấp. Do đó, các phương trình hồi quy đa thức thu được đảm bảo độ tin cậy để biểu diễn không gian bề mặt đáp ứng và trích xuất bộ thông số vận hành tối ưu.

Bảng 3.5. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với năng suất sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	4,18620	0,69770	32,43	0,000
Linear	3	4,17382	1,39127	64,68	0,000
X1	1	2,22620	2,22620	103,49	0,000
X_2	1	1,30965	1,30965	60,88	0,000
X_3	1	1,25545	1,25545	58,36	0,000
Square	3	4,14500	1,38167	64,23	0,000
X_1^2	1	2,21531	2,21531	102,98	0,000
X_2^2	1	1,30534	1,30534	60,68	0,000
X_3^2	1	1,24031	1,24031	57,66	0,000
Error	8	0,17209	0,02151		
Lack-of-Fit	6	0,16722	0,02787	11,45	0,082
Pure Error	2	0,00487	0,00243		
Total	14	4,35829			

Bảng 3.6. Phân tích phương sai của mô hình hồi quy bậc hai đối với hàm lượng PS hệ sợi nấm *T. versicolor*

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	21,1592	3,5265	87,52	0,000
Linear	3	16,4073	5,4691	135,73	0,000
X1	1	10,2984	10,2984	255,59	0,000
X2	1	5,5119	5,5119	136,80	0,000
X3	1	2,8164	2,8164	69,90	0,000
Square	3	15,4698	5,1566	127,98	0,000
X_1^2	1	10,0117	10,0117	248,48	0,000
X_2^2	1	4,8760	4,8760	121,01	0,000
X_3^2	1	2,6625	2,6625	66,08	0,000
Error	8	0,3223	0,0403		
Lack-of-Fit	6	0,3035	0,0506	5,36	0,166
Pure Error	2	0,0189	0,0094		
Total	14	21,4815			



(A) (B) (C)

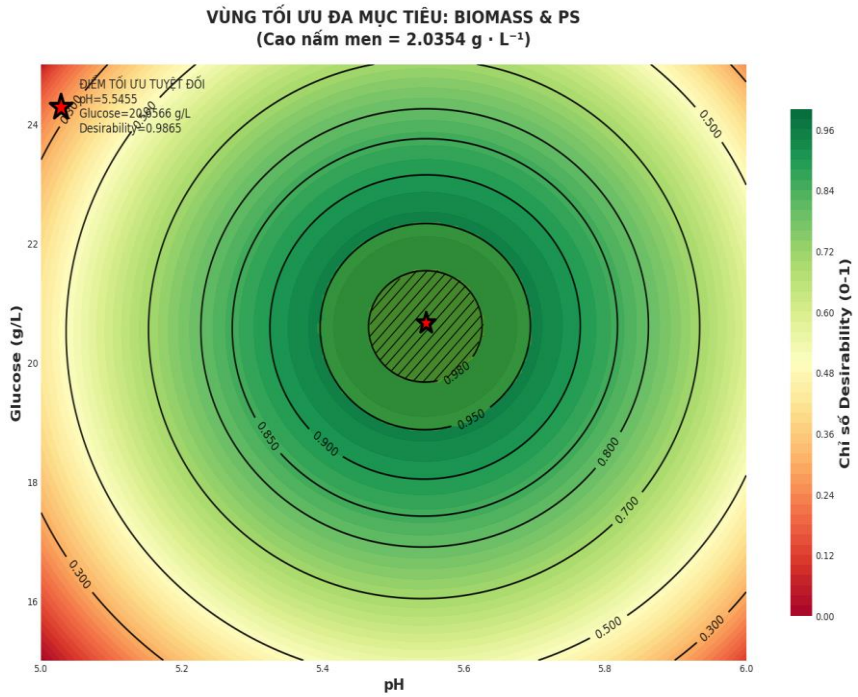
Hình 3.6. Ảnh hưởng kết hợp của các điều kiện nuôi cấy đến năng suất sinh khối (hàng trên) và hàm lượng polysaccharide (hàng dưới) của nấm *T. versicolor*

Ghi chú: (A) Cao nấm men và pH; (B) pH và glucose; (C) Glucose và cao nấm men

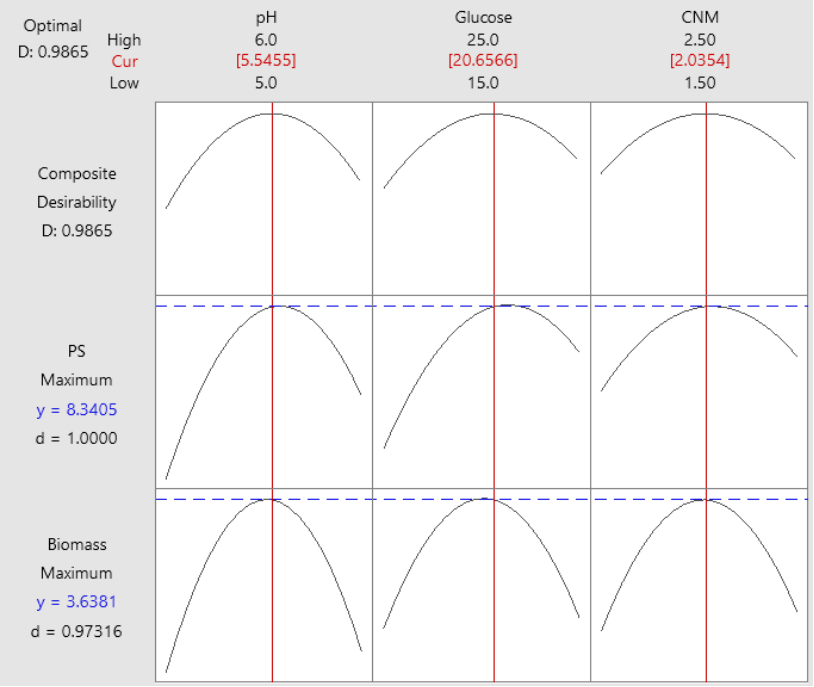
Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa năng suất sinh khối và hàm lượng PS với các yếu tố ảnh hưởng như sau:

Y_1 (g/L) = –109,69 + 34,18 X_1 + 0,956 X_2 + 9,36 X_3 – 3,098 X_1^2 – 0,02378 X_2^2 – 2,318 X_3^2

Y_2 (%) = –232,2 + 73,52 X_1 + 1,962 X_2 + 14,02 X_3 – 6,587 X_1^2 – 0.04597 X_2^2 – 3,397 X_3^2



Hình 3.7. Phân tích vùng tối ưu đa mục tiêu



Hình 3.8. Biểu đồ tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy thu nhận sinh khối và polysaccharide

3.1.2.3. Thực nghiệm kiểm tra các điều kiện tối ưu sợi nấm T. versicolor

Theo dự đoán của mô hình bề mặt đáp ứng, năng suất sinh khối và hàm lượng PS có thể đạt giá trị cực đại lần lượt là 3,638 g/L và 8,34% tại bộ thông số nuôi cấy lý: pH 5,55; nồng độ glucose 20,65 g/L và cao nấm men 2,035 g/L. Nhằm đánh giá độ chính

xác và khả năng ứng dụng thực tiễn của mô hình, một thí nghiệm kiểm chứng đã được tiến hành lặp lại 3 lần với các điều kiện tối ưu nêu trên.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, năng suất sinh khối khô thu được đạt 3,59 ± 0,12 g/L và hàm lượng PS đạt 8,23 ± 0,27%. Sai số tuyệt đối đối với sinh khối và hàm lượng PS lần lượt là 0,05 g/L và 0,11%. Tương ứng, sai số tương ở mức rất thấp, chỉ đạt 1,37% cho sinh khối và 1,32% cho hàm lượng PS. Các giá trị thực tế này hoàn toàn tương đồng và nằm trong vùng sai số cho phép (< 5%) so với giá trị dự báo lý thuyết. Điều này khẳng định rằng các phương trình hồi quy đã xây dựng là phù hợp, có độ tin cậy.

Qua nghiên cứu tối ưu điều kiện nuôi cấy nhằm thu sinh khối giàu PS đã xác định thành công điều kiện tối ưu để sản xuất sinh khối sợi nấm bằng phương pháp nuôi cấy dịch thể, đạt 8,9 ± 0,25 g/L cho *C. militaris* và 3,59 ± 0,12 g/L cho *T. versicolor*. Các mô hình tối ưu hóa cho thấy độ tin cậy cao và đây là cơ sở ban đầu cho việc mở rộng quy mô nuối cấy dịch thể.

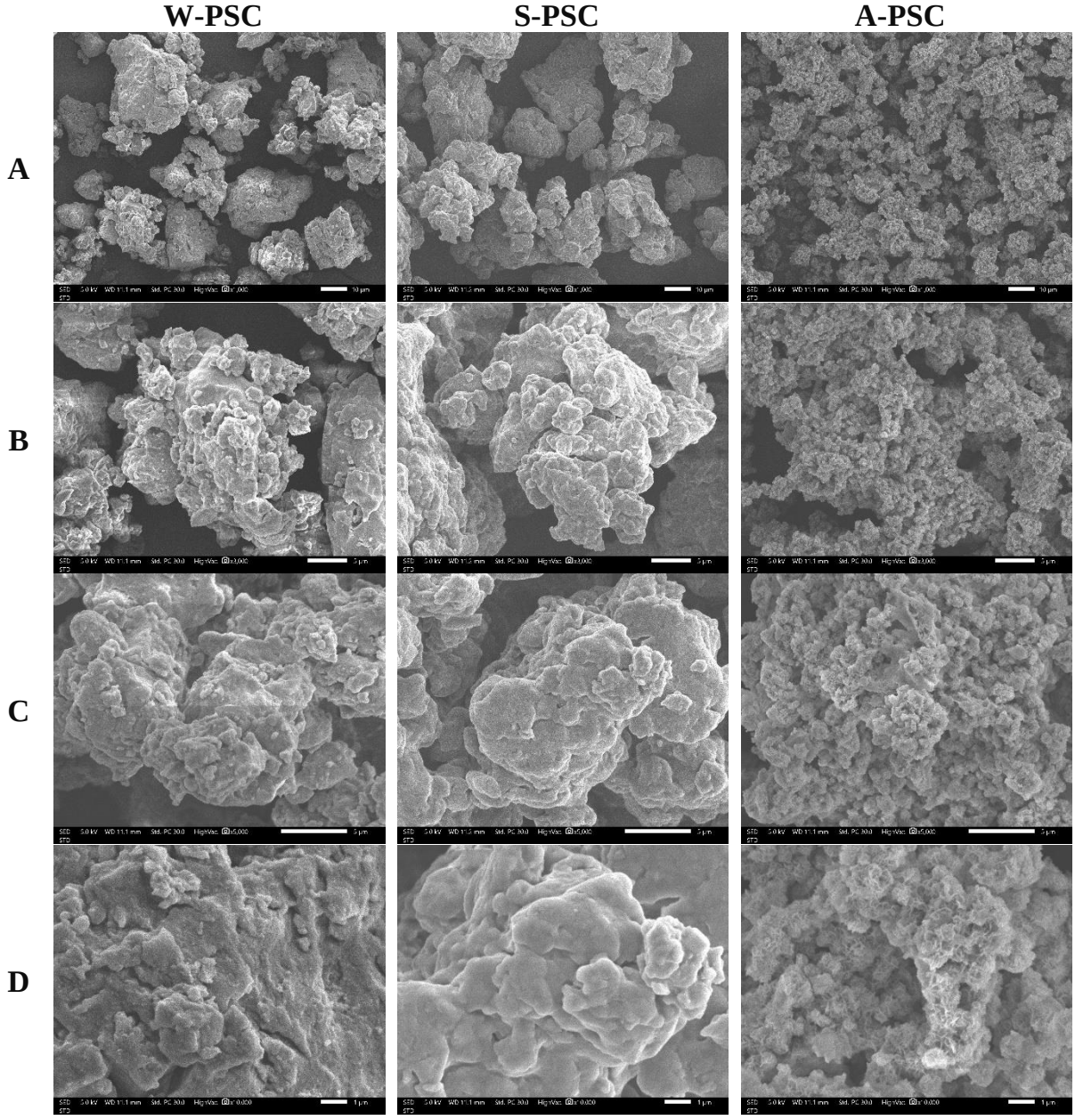
Dữ liệu thu được từ quá trình tối ưu hóa đã khẳng định tiềm năng to lớn của hệ thống nuôi cấy dịch thể trong việc thu nhận sinh khối nấm giàu polysaccharide (PS). Tuy nhiên, sinh khối hệ sợi nấm là một ma trận phức tạp, trong đó các phân đoạn PS thường liên kết chặt chẽ với vách tế bào và thể hiện các đặc tính hóa lý, sinh học khác biệt tùy thuộc vào dung môi hòa tan. Do đó, để khai thác triệt để và làm rõ bản chất của nguồn nguyên liệu này, nghiên cứu tiếp tục tiến hành phương pháp chiết xuất tuần tự (sử dụng lần lượt dung môi nước nóng, kiềm và acid). Định hướng tiếp cận này không chỉ nhằm nâng cao hiệu suất thu hồi các loại PS trong tế bào, mà còn đóng vai trò cốt lõi trong việc đánh giá sự ảnh hưởng của phương pháp phân lập đến đặc điểm hình thái, hoạt tính kháng oxi hóa và khả năng thể hiện hoạt tính prebiotic của từng phân đoạn PS chuyên biệt.

3.2. Chiết xuất tuần tự và đánh giá hình thái, hoạt tính kháng oxi hoá, prebiotic của các chiết xuất PS

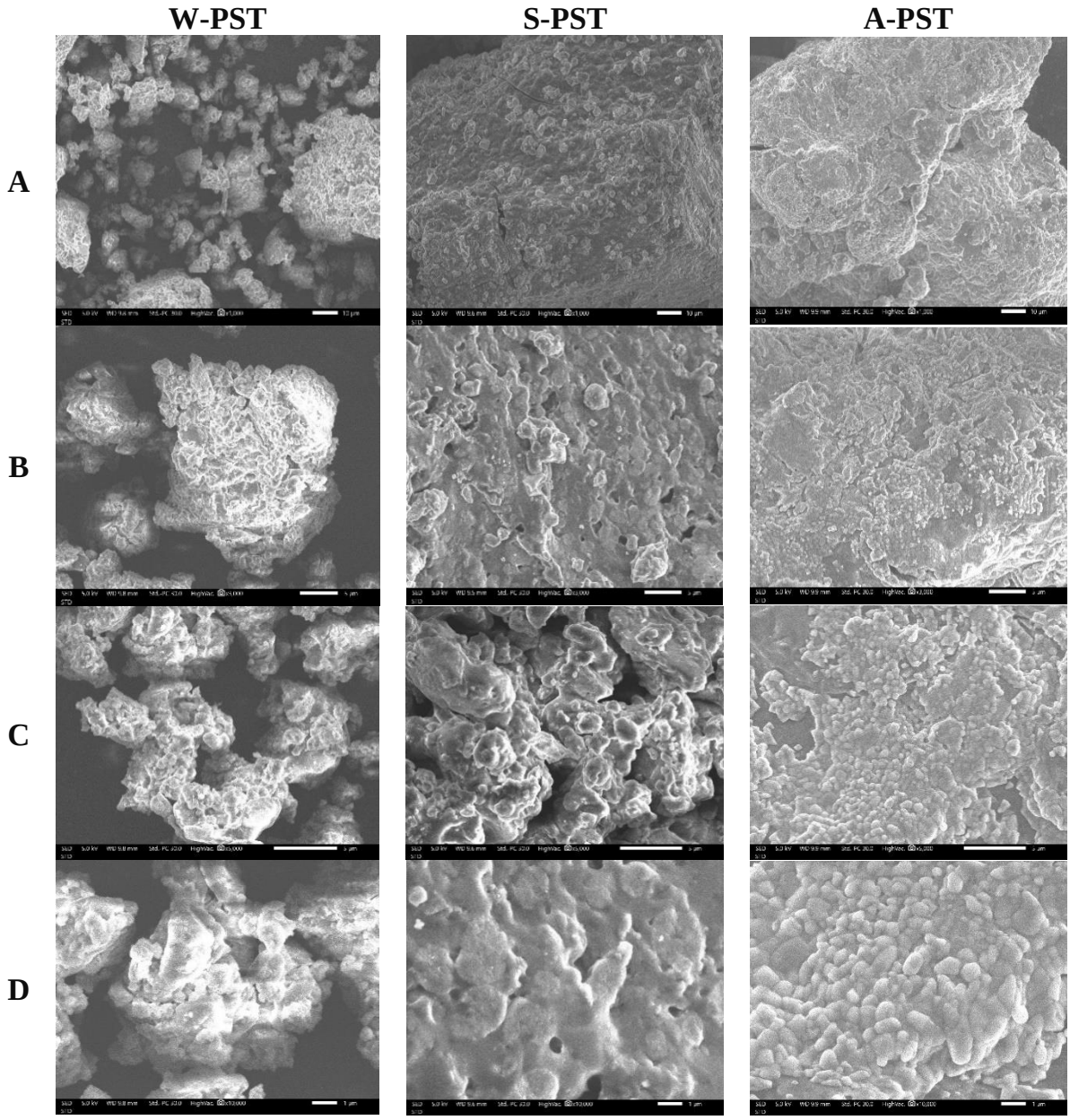
3.2.1. Phân tích cấu trúc bề mặt PS bằng kính hiển vi điện tử quét

Hiển vi điện tử quét (SEM – Scanning Electron Microscopy) là một công cụ quan trọng trong nghiên cứu cấu trúc vi mô của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm. Việc sử dụng SEM cho phép quan sát trực tiếp hình thái bề mặt của PS sau khi chiết tách, cung cấp thông tin chi tiết về hình dạng, độ xốp, kích thước hạt và mức độ kết tụ. Những đặc điểm này có mối liên hệ chặt chẽ với tính chất vật lý – hóa học, khả năng hòa tan, tính nhớt, và hoạt tính sinh học. Đặc biệt, việc so sánh hình thái học giữa các PS được chiết bằng

những điều kiện khác nhau (nhiệt độ, pH, loại dung môi…) sẽ giúp đánh giá ảnh hưởng của quy trình chiết xuất đến cấu trúc sản phẩm cuối cùng.



Hình 3.9. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)



Hình 3.10. Ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của các PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *T. versicolor* (1000×) (A), (3000×) (B) (5000×) (C) và (10.000×) (D)

Hình 3.9. và **Hình 3.10.** Hiển thị hình ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) của các chiết xuất PS từ 2 loại nấm ở độ phóng đại 1000×, 3000×, 5000x và 10.000×. Nhìn chung, các chiết xuất PS cho thấy hình dạng dày đặc và từng khối nhỏ dính nhau, có thể có lực tương tác mạnh do cấu hình phân nhánh cao hoặc tương tác tĩnh điện giữa các PS [147]. Sự khác biệt về cấu trúc vi mô thể hiện ở độ phân mảnh, độ mịn và sợi. A-PSC có hình dạng như tổ ong, nhiều khối nhỏ liên kết lại, kết cấu xốp. Ở 2 phân đoạn W-PSC và S-PSC có sự tương đồng cao về hình dạng, tuy nhiên cấu trúc bề mặt có một số điểm khác biệt, W-PSC bề mặt nhiều khối nhỏ. Mẫu W-PST có cấu trúc bề mặt gồ ghề, cấu trúc xốp và nhiều khoảng trống, trong khi mẫu A-PST có cấu trúc tổng thể có nhiều rãnh

nứt nẻ sâu và bị chia cắt mạnh do tác động thủy phân của môi trường axit mạnh, mặc khác mẫu S-PST cấu trúc khối kết dính chặt chẽ, ít xốp và ít khe nứt. Điều này chứng tỏ dung môi chiết xuất ảnh hưởng đáng kể đến hình thái bề mặt của PS. Acid HCl có thể đã thủy phân một số thành phần, dẫn đến bề mặt mịn hơn, trong khi môi trường kiềm của natri cacbonat có khả năng phá vỡ các liên kết chéo trong mạng lưới polymer, dẫn đến sự trương nở và hình thành cấu trúc xốp. Khi độ phóng đại tăng lên, chi tiết bề mặt trở nên rõ ràng hơn, cho thấy sự khác biệt về cấu trúc giữa các mẫu. Những khác biệt này có thể ảnh hưởng đến tính chất hóa lý và hoạt tính sinh học của PS.

Các nghiên cứu trước đây cũng đã chỉ ra rằng dung môi chiết xuất có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc và tính chất của PS [148]. Đã có nhiều báo cáo rằng chất xơ hòa tan trong cám kiều mạch tự nhiên có cấu trúc mịn, phẳng và đặc, ngược lại, chất xơ hòa tan được chiết xuất bằng phương pháp xử lý trước bằng hơi nước nóng có cấu trúc lỏng lẻo và bề mặt xốp [149].

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tùy thuộc vào đặc điểm cấu trúc các polysaccharide thể hiện các tính chất sinh học khác nhau [150,151]. Sự phụ thuộc này chủ yếu liên quan đến khối lượng phân tử (MW), thành phần hóa học, liên kết glycosidic, cấu trúc ba chiều, cấu hình phân nhánh và độ hòa tan thu được [151,152]. Các điều kiện chiết xuất cũng đóng vai trò quan trọng trong một số thông số, chẳng hạn như hiệu suất và chất lượng chiết xuất, cấu trúc hóa học và các đặc tính sinh học thu được [153]. Chẳng hạn nghiên cứu của Chen và cs. (2020) đã so sánh các polysaccharid được chiết xuất bằng nước nóng (HW), áp suất cao (HP), vi sóng (MA) và hỗ trợ siêu âm (UA) từ nấm *Schizophyllum commune* cho thấy pháp chiết đã ảnh hưởng đến hiệu suất polysaccharid, khối lượng phân tử (MW), thành phần monosaccharid và hoạt tính sinh học. Chiết xuất bằng sóng siêu âm mang lại khả năng chống oxy hóa và hạ đường huyết tốt nhất, mặc dù sản lượng thu được ít hơn và kích thước phân tử nhỏ hơn so với các phương pháp như dùng nước nóng, áp suất cao hay lò vi sóng. Các phương pháp chiết xuất này không làm thay đổi các liên kết hóa học cơ bản (theo phân tích quang phổ hồng ngoại), nhưng lại làm thay đổi rõ rệt tỷ lệ thành phần các loại đường đơn và cấu trúc vi mô bề mặt của polysaccharide. Song song đó, kính hiển vi điện tử quét (SEM) cho thấy sự khác biệt về cấu trúc vi mô của các chất chiết xuất polysaccharide [154].

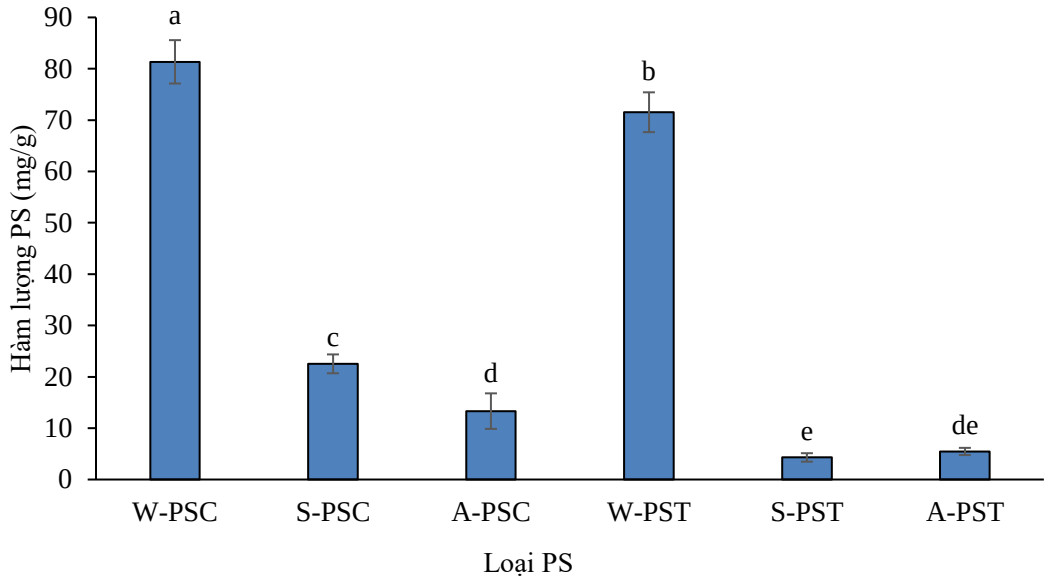
Tương tự, Shang et al. (2018) đã đánh giá tác động của các phương pháp chiết xuất khác nhau đến hiệu suất, khối lượng phân tử (MW) và thành phần monosaccharide của polysaccharide. Nghiên cứu đã so sánh bốn phương pháp khác nhau: HW, UA, hỗ trợ

enzyme và hỗ trợ enzyme-siêu âm và cho thấy phương pháp hỗ trợ enzyme tạo ra polysaccharide có tính chất chống oxy hóa cao hơn. Mặc dù trong nghiên cứu này đã chứng minh được cấu trúc xoắn ba của polysaccharide được chiết xuất, nhưng nghiên cứu này cũng thiếu phân tích về các loại liên kết và mức độ phân nhánh cũng như cách các phương pháp chiết xuất có thể ảnh hưởng đến các thông số này [155].

Tóm lại sự khác nhau cấu trúc trên bề mặt của PS sau khi chiết xuất bằng các dung môi khác nhau có thể ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng bộc lộ các vị trí phản ứng trên mạch polymer, do đó tác động đáng kể đến tương tác của chúng với các gốc tự do hay khả năng sử dụng của các chủng probiotic.

3.2.2. Hàm lượng polysaccharide tách chiết tuần tự từ hệ sợi nấm

Polysaccharide (PS) là một trong những thành phần cấu trúc chủ yếu của tế bào nấm, đồng thời là nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học trọng tâm đã được chứng minh mang lại nhiều lợi ích như: hạ đường huyết, kháng oxi hóa, điều hòa miễn dịch, kháng khối u, kháng khuẩn và chống viêm [156]. Thông thường, PS được phân lập bằng các dung môi phân cực, trong đó nước là dung môi phổ biến và lý tưởng nhất. Việc ứng dụng nhiệt độ cao trong quá trình chiết xuất bằng nước giúp đẩy nhanh tốc độ phá vỡ thành tế bào, từ đó gia tăng khả năng giải phóng và hòa tan PS [157]. Mặc dù chiết xuất bằng nước nóng là phương pháp truyền thống mang lại hiệu quả cao, một lượng lớn các phân đoạn PS không tan trong nước vẫn bị lưu giữ lại trong phần bã. Để khắc phục hạn chế này và khai thác toàn diện các dạng liên kết của PS, trong nghiên cứu này, quá trình chiết xuất tuần tự sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đã được tiến hành bằng ba dung môi lần lượt là: nước nóng (H_2O), dung dịch kiềm (Na_2CO_3) và dung dịch acid (HCl). Kết quả về hiệu suất thu hồi của các phân đoạn PS được trình bày chi tiết tại **Hình 3.11.**

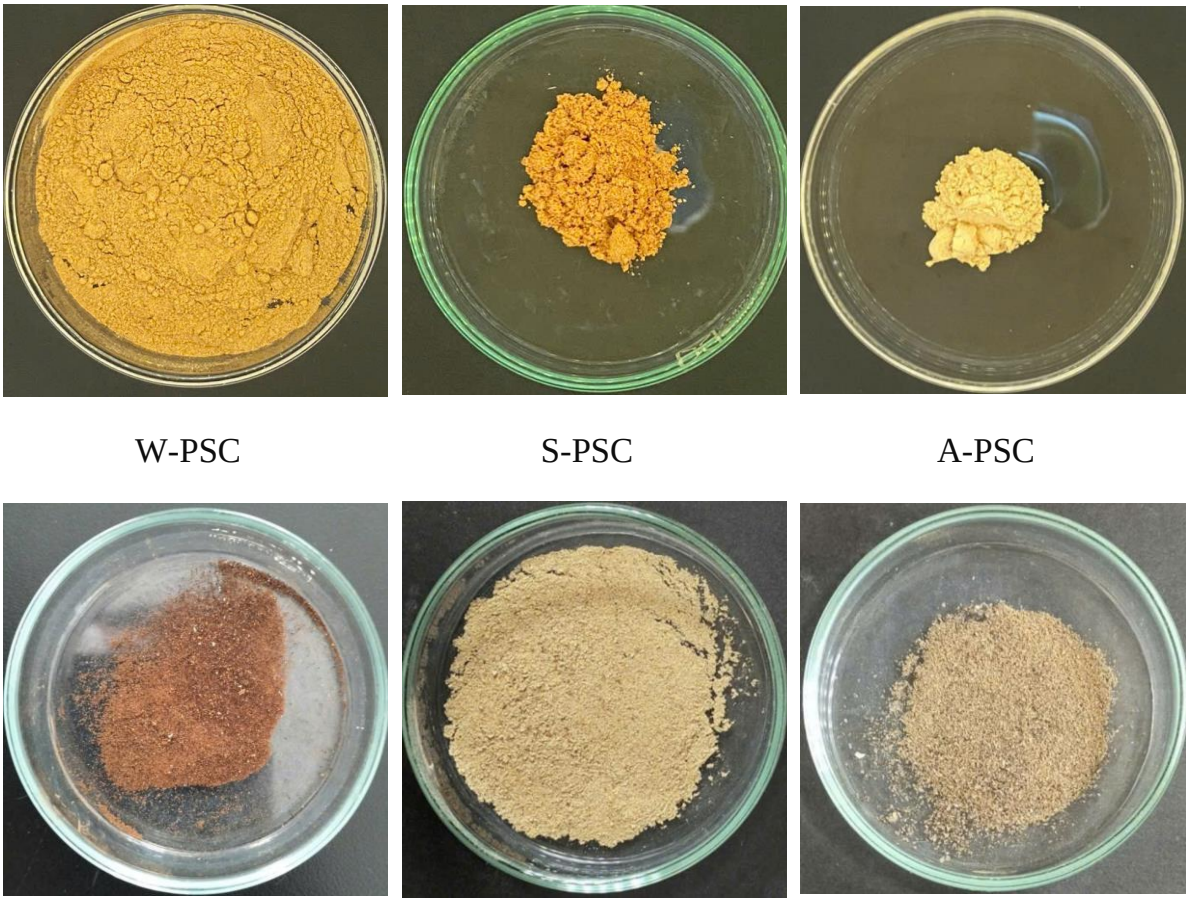


Hình 3.11. Hàm lượng PS chiết xuất từ hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). W-PS(C/T), S-PS(C/T), và A-PS(C/T) lần lượt là PS chiết xuất bằng H_2O, Na_2CO_3 và HCl từ hệ sợi nấm C. militaris và T. versicolor.

Kết quả chiết xuất tuần tự các phân đoạn PS từ sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* được trình bày tại **Hình 3.11**. Dữ liệu cho thấy hiệu suất chiết bằng nước (H_2O) cao hơn đáng kể so với hai tác nhân Na_2CO_3 và HCl. Điều này có thể giải thích do đặc tính của polysaccharide nấm phần lớn là các hợp chất dễ tan trong nước nóng; do đó, đa số các PS đã được giải phóng ngay từ giai đoạn đầu. Hệ quả là lượng PS còn lại trong bã nấm để chiết xuất bằng các dung môi tiếp theo đạt giá trị thấp.

Phương pháp xử lý bằng acid và kiềm giúp phá tế bào, gây ra sự phân hủy cấu trúc sợi thô và các liên kết thủy phân giữa glucan và protein thành tế bào (chẳng hạn như những loại có chuỗi bên liên kết O). Điều này giúp giải phóng PS nội bào và cho phép chiết xuất các thành phần hòa tan trong acid và kiềm cũng như chuyển đổi các thành phần không hòa tan trong nước thành các thành phần hòa tan trong nước. Chiết xuất nước nóng thường được sử dụng như một bước sơ bộ trước khi chiết xuất acid hoặc kiềm tiếp theo để tối đa hóa quá trình thu hồi PS [158]. Điều này là do một số PS có tính chất không hòa tan trong nước nóng. Do đó, dung dịch kiềm (Na_2CO_3) được sử dụng để tăng khả năng hòa tan PS và acid (HCl) được sử dụng để phá vỡ các liên kết glycosid của PS nhằm thu được các PS còn lại trong sợi nấm sau quá trình chiết suất bằng nước nóng [159] .



W-PSC S-PSC A-PSC

W-PST S-PST A-PST

Hình 3.12. Hình thái các phân đoạn Polysaccharide tách chiết từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*

3.2.3. Khả năng trung hoà gốc tự do ABTS của các chiết xuất PS từ hệ sợi nấm

Đặc tính chống oxi hóa của các PS từ thực vật và nấm đã được nghiên cứu khá phổ biến và được sử dụng như các chất chống oxi hóa tự nhiên. Hoạt động chống oxi hóa của một loại hợp chất bất kỳ phụ thuộc vào khá nhiều yếu tố như hàm lượng lipid, nồng độ chất chống oxi hóa.

$ABTS^{\bullet+}$ là một gốc tự do dạng cation tương đối ổn định. Khi tương tác với các chất kháng oxi hóa gốc tự do sẽ nhận điện tử hoặc hydrogen để bị khử thành phân tử trung hòa bền vững và nhạt màu. Trong nghiên cứu này các phân đoạn PS khác nhau được pha loãng nồng độ từ 100-5000 µg/mL với ascorbic acid được sử dụng làm đối chứng dương.

Bảng 3.7. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS từ *C. militaris*

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	khả năng trung hòa gốc tự do ABTS (%)		
	W-PSC	S-PSC	A-PSC
100	11,84±0,34^{a}	7,49±0,74^{b}	13,88±0,13^{a}
200	18,58±0,81^{a}	8,83±0,44^{b}	16,99±0,13^{a}
400	21,58±0,54^{a}	13,73±0,44^{b}	22,88±0,47^{b}
600	22,25±0,47^{b}	17,82±0,65^{c}	26,94±0,59^{a}
800	26,14±0,29^{b}	21,19±0,67^{c}	30,36±0,42^{a}
1000	31,37±0,91^{a}	24,54±0,34^{b}	32,59±0,37^{a}
2000	44,88±0,31a	36,70±0,18^{b}	46,91±0,27^{a}
5000	86,15±0,79^{a}	69,64±0,51^{b}	81,51±0,56^{a}
IC50 (µg/mL)	2474,24±2,78^{b}	3273,33±18,5^{a}	2446,51±24,34^{c}

Bảng 3.8. Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS của PS từ *T. versicolor*

Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Khả năng trung hòa gốc tự do ABTS (%)		
	W-PST	S-PST	A-PST
100	6,86±1,3^{b}	10,14±1,7^{ab}	11,45±1,1^{a}
200	9,61±0,3^{c}	14,27±1,3^{b}	17,93±1,0^{a}
400	20,38±1,9^{b}	21,36±3,3^{b}	29,09±2,2^{a}
600	27,13±2,2^{b}	28,73±1,7^{b}	36,72±1,4^{a}
800	37,83±2,9^{b}	34,81±0,5^{b}	43,43±0,3^{a}
1000	44,21±1,7^{b}	43,86±0,5^{b}	49,63±0,4^{a}
2000	84,64±3,1^{a}	71,78±1,6^{c}	79,08±0,5^{b}
IC50 (µg/mL)	1142,5±21,72^{b}	1279,1±18,04^{a}	1070,6±18,25^{c}

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một hàng biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05).

Kết quả cho thấy, khi nồng độ tăng lên khả năng trung hoà gốc tự do của các chiết xuất PS cũng tăng dần. Chiết xuất PS từ nấm *T. versicolor* cho hiệu quả trung hoà gốc tự do tốt hơn so với nấm *C. militaris*. Giá trị IC50 của 3 chiết xuất PS (W-PSC, S-PSC, A-PSC) nấm *C. militaris* được xác định lần lượt trong phương pháp này là 2474,24 ±

2,78 µg/mL, 3273,33 ± 18,54 µg/mL và 2446,51 ± 24,34 µg/mL còn ở nấm *T. versicolor* là 1142,50 ±2 1,72 µg/mL; 1279,10 ± 18 µg/mL; 1070,60 ± 18,30 µg/mL. IC50 của các chiết xuất PS của 2 loại nấm này đều cao hơn so với IC50 của acid ascorbic với IC50 là: 83,89 ± 0,39 µg/mL. Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự nghiên cứu của Hằng và cộng sự năm 2017, exopolysaccharide (EPS) chiết xuất từ *Cordyceps sinensis* được nuôi cấy ở môi trường M2 trong 20 ngày và được đánh giá khả năng bắt gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ và xác định giá trị IC50 đạt 2643,89 µg/mL, khả năng kháng oxi hoá thấp hơn so với cao chiết xuất PS trong nghiên cứu hiện tại. Điều này cho thấy sự tiềm năng của các PS được chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*. Tuy nhiên, đây là đặc điểm phổ biến ở các PS có nguồn gốc tự nhiên, do cấu trúc của chúng thường không chứa các nhóm chức có khả năng oxi hóa khử mạnh như phenol hoặc flavonoid, những thành phần chính trong các chất kháng oxi hóa chuẩn. So với một số các nghiên cứu khác về hoạt tính kháng oxi hoá của PS từ nấm *T. versicolor* cho thấy khá có sự tương quan, nghiên cứu của Petraglia (2023) hoạt tính kháng oxi hóa của PS tách chiết từ nấm *Pleurotus eryngi* là 1,15 ± 0,09 mg/mL [160]; nghiên cứu của Nesrine Teka và cs. (2022) cho thấy hoạt động kháng oxi hóa của các phân đoạn PS WPL, CPL và BPL chiết xuất từ lá *Allium roseum* lần lượt là 55,33%, 54,97% và 53,15%, ở nồng độ 3 mg/mL [161]. Cấu trúc xốp và lỏng lẻo, chẳng hạn như dạng tổ ong của mẫu A-PS (C/T) đã tạo điều kiện gia tăng đáng kể diện tích bề mặt tiếp xúc. Sự phân cắt không gian này giúp bộc lộ nhiều hơn các nhóm chức phân cực đang bị che khuất trong mạng lưới polymer (như các nhóm hydroxyl -OH tự do). Khi diện tích tiếp xúc tăng lên, các nhóm chức này dễ dàng tiếp cận và nhường hydrogen hoặc điện tử để trung hòa các gốc tự, từ đó làm tăng mạnh khả năng chống oxy hóa của dịch chiết.

Ở *C. militaris*, các PS từ môi trường rắn được tách thành bốn thành phần bằng phương pháp kết tủa phân đoạn ethanol cho thấy hoạt tính kháng oxi hóa mạnh hơn *in vitro* [162]. Theo Chen và cs. (2013), PS tinh khiết chủ yếu bao gồm Glc (47,5%), Man (34,3%), Gal (10,8%) và Ara (4,85%) trong liên kết glycosid loại α có thể loại bỏ các gốc tự do, hydroxyl và superoxide trong ống nghiệm [163]. Nghiên cứu này cũng chứng minh rằng Glc và cấu hình β có thể tăng cường hoạt động kháng oxi hóa. Thứ hai, các ion chứa trong PSs có thể góp phần vào hoạt động kháng oxi hóa.

Hoạt tính khử gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ của PS chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide, nhóm chức, phương pháp chiết xuất và đặc điểm cấu trúc. Các PS có khối lượng phân tử thấp hơn thường thể hiện hoạt tính kháng

oxi hóa mạnh hơn [164]. Loại và tỷ lệ monosaccharide trong PS ảnh hưởng đáng kể đến đặc tính kháng oxi hóa của chúng. Nghiên cứu trên Panax ginseng cho thấy các PS acid có hàm lượng acid uronic cao hơn thể hiện hoạt tính khử gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ mạnh hơn so với PS trung tính [165]. Sự hiện diện của các nhóm chức đặc biệt, như acid uronic và sulfate, ảnh hưởng đến hoạt tính kháng oxi hóa. Một nghiên cứu về PS từ *Cordyceps* nổi bật tác động của các nhóm chức lên hoạt tính khử gốc tự do ABTS. Quá trình sulfat hóa một exopolysaccharide (EPS-1) từ *Cordyceps sinensis* làm tăng đáng kể hoạt tính kháng oxi hóa, tăng TEAC từ 21,0 lên 66,5 μmol Trolox/g. Sự cải thiện này được cho là nhờ các nhóm sulfate, giúp tăng mật độ electron và khả năng khử gốc tự do [166]. Kỹ thuật chiết xuất PS cũng ảnh hưởng đến khả năng kháng oxi hóa của chúng. PS chiết xuất từ hạt và thịt chà là Ajwa bằng phương pháp siêu âm hỗ trợ thể hiện hoạt tính khử gốc tự do $ABTS^{+}$ cao hơn so với chiết xuất bằng nước nóng [167]. Cấu trúc tổng thể, bao gồm kiểu phân nhánh và liên kết glycosidic, đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính kháng oxi hóa. Ví dụ, PS từ Astragalus có khối lượng phân tử trung bình cho thấy khả năng khử gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ mạnh nhất, gợi ý rằng cả khối lượng phân tử và cấu hình cấu trúc đều là yếu tố quan trọng [168]. Những phát hiện này nhấn mạnh rằng hoạt tính kháng oxi hóa của PS, được đo bằng xét nghiệm khử gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$, là đa diện và chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố nội sinh và ngoại sinh.

Trong nghiên cứu này, PS chiết xuất tuần tự từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đã thấy được mối quan hệ giữa nồng độ PS và hoạt động kháng oxi hóa. Tuy khả năng kháng oxi hóa của PS không cao như Ascorbic acid trong các thử nghiệm trực tiếp, nhưng giá trị ứng dụng thực tiễn của PS còn được quyết định bởi nhiều cơ chế sinh học phức tạp khác. Ascorbic acid hoạt động như một chất kháng oxi hóa trực tiếp, nhanh chóng trung hòa các gốc tự do, còn điểm mạnh của PS là tính đa năng, độ an toàn cao và khả năng tương tác phức tạp với các hệ thống sinh học trong cơ thể. PS có khả năng góp phần duy trì cân bằng nội môi oxi hóa - khử một cách bền vững và toàn diện thông qua nhiều cơ chế khác nhau như: kích hoạt hệ thống enzyme nội sinh (tăng sản xuất SOD, catalase, glutathione peroxidase); điều hòa con đường tín hiệu (tác động lên Nrf2/ARE, NF-κB để kiểm soát biểu hiện gene liên quan đến stress oxi hóa); bảo vệ cấu trúc tế bào (ổn định màng tế bào, giảm rò rỉ electron từ ty thể); chelate ion Fe^{2+} [169].

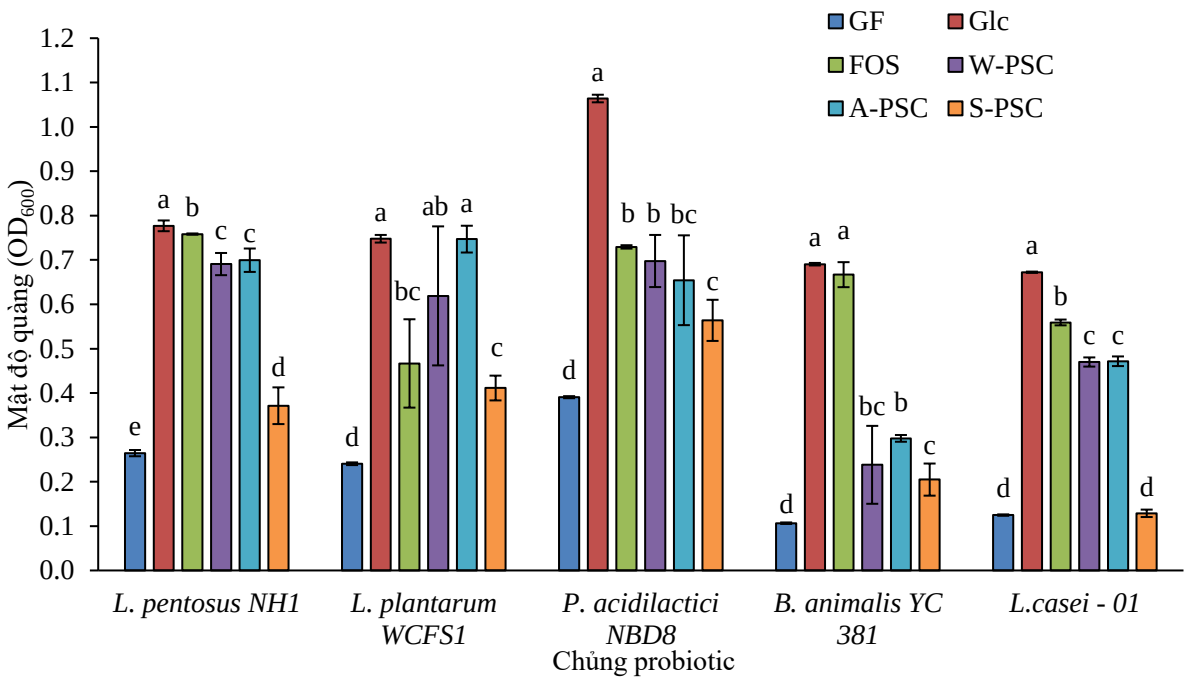
3.2.4. Tiềm năng prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm

Prebiotic, theo định nghĩa của ISAPP, là thành phần thực phẩm không tiêu hóa được sử dụng chọn lọc làm thức ăn cho vi sinh vật [170]. Hoạt tính prebiotic của

polysaccharide là do khả năng chuyển hóa có chọn lọc của các probiotic, do đó kích thích sự phát triển của chúng [171]. Trong nghiên cứu này đã đánh giá hoạt tính prebiotic của các PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* thông qua đánh giá khả năng các chủng probiotic sử dụng PS làm nguồn dinh dưỡng và đánh giá thông qua chỉ số hoạt động prebiotic.

3.2.4.1. Khả năng kích thích sự sinh trưởng probiotic

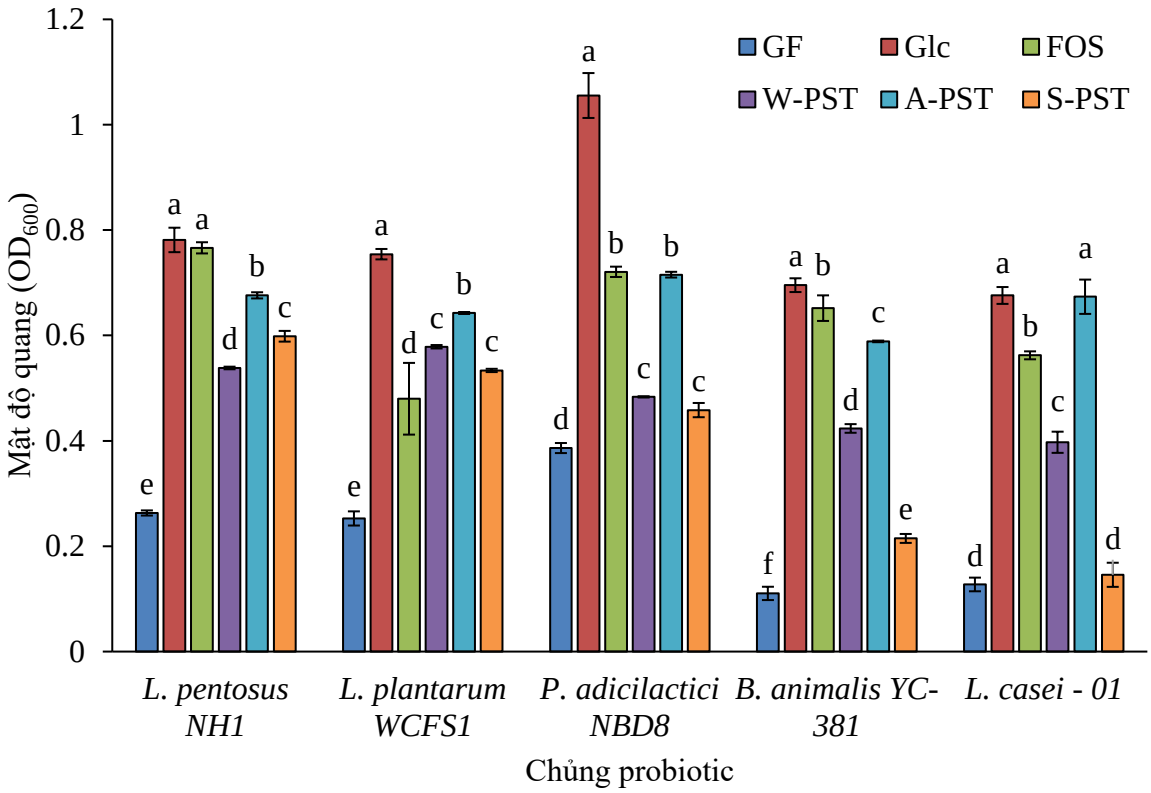
Để đánh giá một loại carbohydrate nhất định có hoạt tính prebiotic, đầu tiên, carbohydrate đó cũng phải được chuyển hóa bởi các chủng probiotic tương tự như quá trình chuyển hóa glucose. Trong nghiên cứu này đã sử dụng 5 chủng vi khuẩn *P. acidilactici* NBD8, *L. pentosus* NH1 và *L. plantarum* WCFS, *B. animalis* YC381 *và L. casei* – 01 để đánh giá khả năng sử dụng PS làm nguồn carbon. Đánh giá thông qua các môi trường không chứa glucose, môi trường kiểm soát glucose (1g/L), môi trường bổ sung 1g/L PS, và môi trường bổ sung 1g/L prebiotic thương mại (FOS). Kết quả được trình bày trong **Hình 3.13** và **Hình 3.14**.



Hình 3.13. Khả năng sinh trưởng của probiotic trên môi trường bổ sung PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một chủng probiotic thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, p < 0,05) GF: không chứa glucose, Glc: bổ sung glucose 1g/L; W-PSC: bổ sung chiết xuất PS từ nước 1g/L; A-PSC: bổ sung chiết xuất từ HCl

1g/L; S-PSC: bổ sung chiết xuất từ Na_2CO_3 1g/L, FOS: bổ sung FOS 1g/L.



Hình 3.14. Khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic trên môi trường bổ sung chiết xuất PS nấm *T. versicolor*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong cùng một chủng probiotic thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). GF: không chứa glucose; Glc: bổ sung glucose 1g/L; W-PST: bổ sung chiết xuất PS từ nước 1g/L; A-PST: bổ sung chiết xuất PS từ HCL 1g/L; S-PST: bổ sung chiết xuất PS từ Na_2CO_3 1g/L; FOS: bổ sung FOS 1g/L.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tất cả các chủng probiotic đều sinh trưởng trên các môi trường nghiên cứu. Tuy nhiên ở các môi trường khác nhau các chủng probiotic có sự sinh trưởng khác nhau đáng kể. Trên môi trường GF, khả năng sinh trưởng của các chủng probiotic rất thấp do thiếu nguồn carbon cần thiết cho quá trình trao đổi chất. Còn trên môi trường sử dụng glucose là nguồn carbon các chủng probiotic có đều tốc độ tăng trưởng cao điều này là do glucose dễ dàng được hấp thụ và chuyển hóa ngay lập tức thông qua các con đường trao đổi chất cơ bản. Trên các môi trường bổ sung phân đoạn PS, tất cả các chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh trưởng, tuy nhiên ở một số phân đoạn PS sự sinh trưởng này khá thấp. Việc sử dụng PS sinh trưởng không đồng đều ở các chủng, một số chủng có thể sử dụng chiết PS này phát triển tốt tuy nhiên lại sử dụng

kém chiết xuất PS khác. Chủng *B. animalis và L. casei* sinh trưởng kém trên môi trường bổ sung S-PSC và S-PST, chủng *P. acidilactici* sinh trưởng kém trên cả môi trường S-PST và W-PST, nhưng cả 3 chủng này lại sinh trưởng tốt trên A-PST. Nguyên nhân là do PS là nguồn carbon phức tạp hơn glucose, để sử dụng PS vi khuẩn cần tiết ra các enzyme ngoại bào. Tuy nhiên, không phải tất cả các chủng đều có khả năng sản xuất đủ lượng enzyme cần thiết để phân hủy PS. Chỉ những chủng có bộ gene mã hóa cho các enzyme phù hợp mới có thể sử dụng PS hiệu quả.

Hình thái vi mô cũng là yếu tố then chốt quyết định khả năng lên men của các chủng vi khuẩn probiotic. A-PS có cấu trúc xốp, có mức độ phân nhánh cao và kích thước hạt nhỏ nên có thể tạo ra nhiều không gian vi lỗ cho phép các enzyme ngoại bào của vi khuẩn đường ruột dễ dàng khuếch tán, thâm nhập và bám dính vào mạch polysaccharide để thực hiện quá trình cắt đứt liên kết glycosidic điều này giải thích nguyên nhân ở phân đoạn A-PS các chủng đều phát triển tốt. Các phân đoạn PS có kết cấu lỏng lẻo sẽ bị thủy phân nhanh hơn thành các oligosaccharide và đường đơn, cung cấp nguồn carbon tức thời cho sự sinh trưởng của vi khuẩn có lợi. Trong khi đó, các cấu trúc hạt lớn, đóng cục rắn chắc có thể làm chậm quá trình lên men.

Phần lớn các chủng có thể phát triển trên môi trường chiết xuất PS cho thấy các chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* có thể là nguồn dinh dưỡng cho các probiotic. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu Phirom-on & Apiraksakorn (2021), *L. plantarum* SKKL1, *L. plantarum* TISTR 2075 và *L. casei* TISTR 1463 có thể sử dụng nguồn cellodextrin chiết xuất từ vỏ chuối làm nguồn carbon [131]. Nghiên cứu của HongSong và cs. 2022 cũng cho thấy các ASP được tách chiết bằng các phương pháp khác nhau đều có hoạt tính prebiotic và điều này được giải thích là do chúng đều được cấu tạo từ glucose và galactose [172] . Synytsya và cs. (2009) đã nghiên cứu và cho thấy α-(1 3)- Glucan được phân lập từ thành tế bào của hai loài *P. ostreatus và P. eryngii* kích thích sự phát triển của vi khuẩn *bifidobacteria* và *lactobacillus*. Các đặc tính prebiotic của nhiều PS đã được nghiên cứu rộng rãi và được biết đến rộng rãi, trong khi ở nhóm α-(1 3)-glucan, hoạt tính prebiotic của chỉ một số loại α-(1 3)-glucan nhất định đã được chứng minh [173]. Một nghiên cứu khác của Cor và Cs. (2018) đã tổng quan về các PS từ nấm dược liệu và chỉ ra rằng beta-glucans, một loại PS phổ biến trong nấm, có thể có tác dụng prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của vi khuẩn đường ruột có lợi [174]. Tương tự, một nghiên cứu của Jayachandran và cs. (2017) đã xem xét các đặc tính prebiotic của PS từ nấm *Ganoderma lucidum* (Linh chi) và cho thấy nó có khả

năng tăng cường sự phát triển của *lactobacillus* và *bifidobacteria* trong các nghiên cứu in vitro [175].

Ở tất cả 5 chủng nuôi cấy trên môi trường bổ sung A-PSC và A-PST đều thấy có sự sinh trưởng khá tốt, có chủng cao hơn và có chủng gần tương đương như FOS. Trong quá trình tách chiết acid đã phá vỡ cấu trúc của PS thành các phân tử nhỏ hơn (oligosaccharide, đường đơn) nên các chủng có thể dễ dàng sử dụng hơn so với 2 chiết xuất còn lại. FOS là một prebiotic, có khả năng kích thích sự phát triển của các chủng probiotic, đặc biệt là các chủng *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*. FOS là các oligosaccharide, có cấu trúc đơn giản hơn so với PS nên dễ dàng bị phân hủy bởi các enzyme của vi khuẩn. Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng FOS là nguồn cacbon tốt nhất cho sự phát triển của vi khuẩn probiotic [176]. Hơn nữa, FOS giàu ketone làm giảm viêm da dị ứng bằng cách điều chỉnh hệ vi khuẩn đường ruột và nó đóng vai trò thiết yếu trong việc điều chỉnh sự phát triển của các vi sinh vật này. PS chiết xuất từ sợi nấm là PS thô chưa qua tinh sạch và còn một số không tan trong nước như S-PST nên khả năng sử dụng có thể kém hơn prebiotic thương mại, Prebiotic thương mại đã được tinh sạch và được nghiên cứu chứng minh có thể kích thích sinh trưởng một cách chọn lọc sự phát triển của các loài vi khuẩn có lợi.

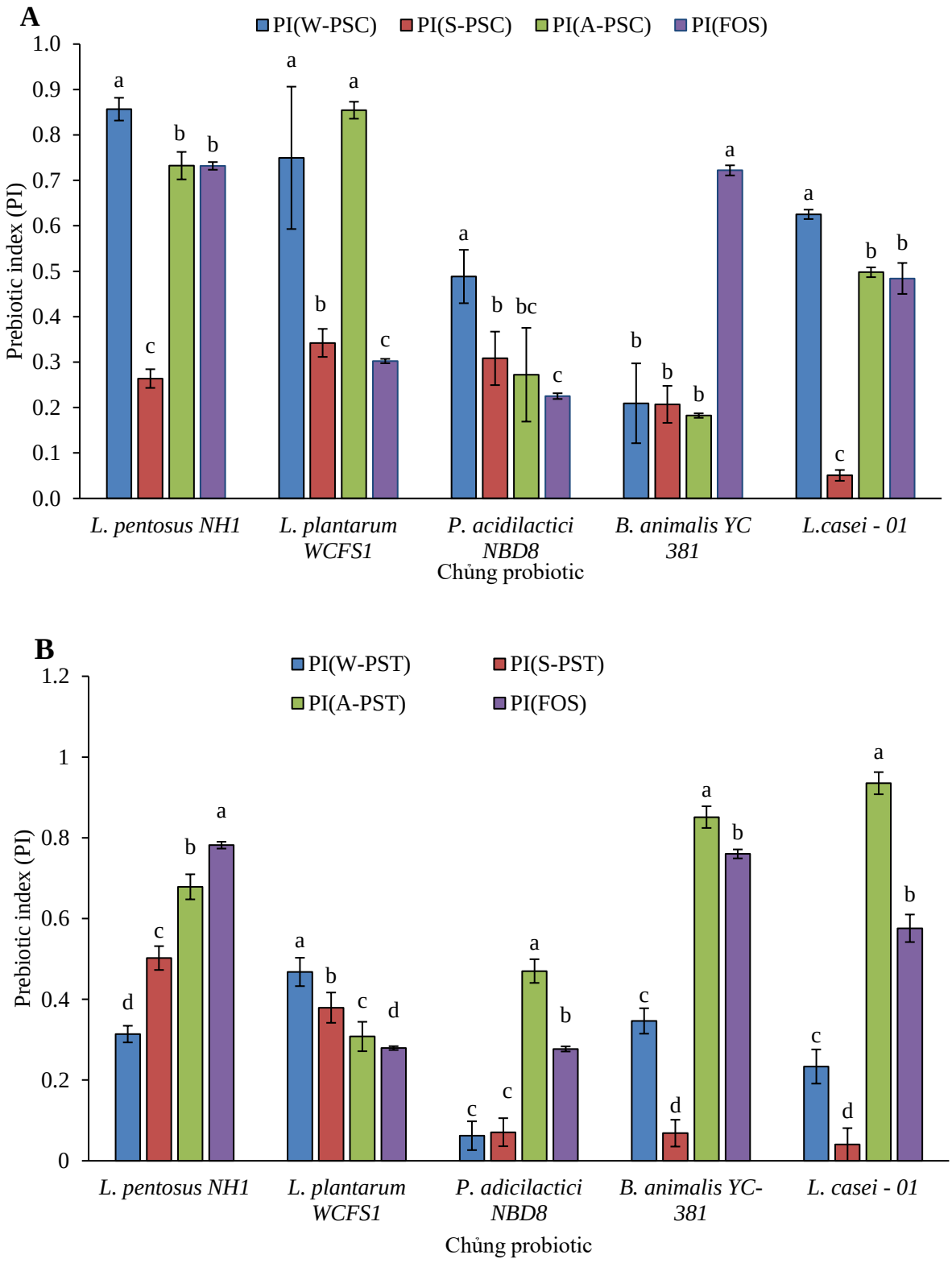
Yu và cs. (2013) nhận thấy rằng chiết xuất PS peptide (PSP) từ nấm Vân chi làm tăng đáng kể nồng độ *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* trong môi trường nuôi cấy hệ vi sinh vật phân người, tương tự như tác dụng của fructooligosaccharides (FOS), một prebiotic đã biết. Nghiên cứu cũng cho thấy sự giảm số lượng *Clostridium*, *Staphylococcus* và *Enterococcus* spp., giảm độ pH và tăng sản xuất acid hữu cơ (lactate và SCFAs) [177]. Trong những năm gần đây rất nhiều nghiên cứu đã cho thấy polysaccharide từ nấm có khả năng kích thích sự sinh trưởng của probiotic và ức chế mầm bệnh. Nghiên cứu của Zhou và cs. (2022) cho thấy polysaccharid từ nấm *Ramaria flava* , được phát hiện có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của *Lactobacillus rhamnosus* và tăng cường sản xuất SCFA. Quả thể nấm *P. ostreatus* đã được chứng minh là có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của các chủng vi khuẩn probiotic (*Lactobacillus acidophilus , Lactobacillus plantarum*) mạnh hơn các probiotic thương mại như inulin và fructo-oligosaccharide [178]. Các nghiên cứu lên men in vitro đã chỉ ra rằng polysaccharid nấm có thể đóng vai trò là chất nền có thể lên men cho vi sinh vật đường ruột, dẫn đến những thay đổi chọn lọc trong quần thể vi khuẩn [179]. Đặc biệt, một số nghiên cứu đã báo cáo sự gia tăng các chi vi khuẩn

thường liên quan đến sức khỏe đường ruột, bao gồm *Bifidobacterium* và *Lactobacillus* , đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng hàng rào ruột, sản xuất các chất chuyển hóa có lợi và ức chế sự phát triển của vi sinh vật gây bệnh [180].

Các thử nghiệm trên mô hình động vật đã củng cố thêm những nhận định này. Cụ thể, việc bổ sung chiết xuất nấm hoặc polysaccharid vào khẩu phần đã được chứng minh là có thể thay đổi thành phần vi khuẩn đường ruột và tăng tỷ lệ các chủng vi khuẩn có lợi [180]. Bên cạnh *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*, một số nghiên cứu còn ghi nhận sự gia tăng *Akkermansia* , một loại vi khuẩn phân hủy mucin có vai trò quan trọng trong việc tăng cường hàng rào bảo vệ niêm mạc ruột và cải thiện sức khỏe trao đổi chất. Đồng thời, việc sử dụng nấm cũng giúp điều chỉnh tỷ lệ *Firmicutes/Bacteroidetes*, một chỉ số vi sinh quan trọng có mối liên hệ mật thiết với các hội chứng rối loạn chuyển hóa và tình trạng viêm nhiễm [181].

3.2.4.2. Chỉ số prebiotic của các chiết xuất PS sợi nấm

Hoạt động của prebiotic được định nghĩa là khả năng của một chất nền cụ thể, thường là một chất prebiotic, trong việc hỗ trợ sự phát triển của các vi khuẩn có lợi trong đường ruột so với các vi khuẩn khác. Để đánh giá hoạt động của prebiotic, nó thường được so sánh với sự phát triển trên một chất nền không phải prebiotic, thường là glucose. Do đó, carbohydrate có điểm hoạt động prebiotic tích cực nếu chúng được chuyển hóa cũng như glucose bởi các chủng probiotic; và được chuyển hóa có chọn lọc bởi probiotic chứ không phải bởi các vi khuẩn đường ruột khác [133].



Hình 3.15. Chỉ số prebiotic (PI) của các phân đoạn polysaccharide đối với các chủng probiotic khảo sát. (A) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm *C. militaris*; (B) Các phân đoạn từ hệ sợi nấm T. *versicolor*.

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau ở cùng thời điểm lên men chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, p < 0,05).

Kết quả nghiên cứu cho thấy chỉ số PI của tất cả các PS đều lớn hơn 0, tuy nhiên có sự khác nhau khá lớn giữa các chiết xuất PS và giữa các chủng. Các chủng probiotic có khả năng sử dụng các chiết xuất PS khác nhau. PS chiết xuất ở loài nấm khác nhau cũng cho thấy chỉ số PI khác nhau. Ở nấm *C. militaris* chỉ số PI của S-PSC ở tất cả các chủng nghiên cứu đều rất thấp. Mặc khác, W-PSC và A-PSC chỉ số khá cao ở hầu hết các chủng trừ *B. animalis*. Còn ở nấm *T. versicolor* chỉ số PI của S-PST và W-PST ở chủng *P. acidilactici* và S-PST ở chủng *B. animalis* và *L. casei* rất thấp. Nguyên nhân là do ở các PS này các chủng sử dụng dể sinh trưởng rất kém so với Glucose. Tuy các chủng một số chủng sinh trưởng rất kém trên một số nguồn PS nhưng chỉ số PI không bị âm vì *E. coli* không hoặc sử dụng rất ít các PS này để sinh trưởng. Chỉ số hoạt động prebiotic của A-PST cao nhất đạt 0,935 ở chủng *L. casei* cao hơn khá lớn so với cả FOS. Trên các chủng *B. animalis* và *P. acidilactici* chỉ số PI của A-PST cũng đều cao hơn so với FOS; song song với đó W-PST cũng cho chỉ số PI cao hơn so với FOS, nguyên nhân là do A-PST và W-PST đã kích thích mạnh sự phát triển của chủng này hơn cả FOS. A-PST đều cho chỉ số PI khá cao ở tất cả các chủng nên đây có thể là nguồn prebiotic tiềm năng trong tương lai. Đối với phân đoạn A-PST là phân đoạn chiết cuối cùng bằng acid nên đây là các đoạn PS nằm sâu bên trong tế bào, theo hình ảnh SEM thì cấu trúc các PS mịn hơn, có độ phân nhánh, nhiều khối nhỏ nên các probiotic dễ dàng sử dụng làm thức ăn cho sự sinh trưởng và phát triển, dẫn đến chỉ số PI cao đối với *B. animalis và L. casei.*

Cùng một loại PS nhưng ở các chủng khác nhau và trong cùng một chủng giữa các loại PS khác nhau có chỉ số hoạt động prebiotic khác nhau khá lớn. Chỉ số PI ở các chiết xuất PS và FOS nuôi trên 2 chủng *L. pentosus* và *L. plantarum* WCFS1 có biên độ dao động nhỏ hơn so với các chủng còn lại. Nguyên nhân do 2 chủng này đều có thể sử dụng các nguồn PS này ở mức cao và vừa phải; ở các chủng còn lại có loại chiết xuất PS được sử dụng rất tốt còn có loại được sử dụng khá kém. Lý giải cho điều này là do các chủng vi sinh vật khác nhau có khả năng trao đổi chất khác nhau gây ra sự khác biệt về điểm hoạt động prebiotic. Các chủng probiotic cần có hệ thống enzyme thủy phân cụ thể để sử dụng prebiotic. Do đó, các gen mã hóa cho các hệ thống trao đổi chất này có thể có hoặc không có ở các chủng khác nhau, dẫn đến chỉ số hoạt động prebiotic khác nhau.

Mỗi chủng probiotic có thể có sự biến đổi gen và sự hoán vị trong các hệ thống này, điều này có thể tạo ra sự đa dạng trong khả năng chúng sử dụng và chuyển hóa prebiotic. Do đó, các chủng khác nhau có sự hoán vị và sự kết hợp khác giữa các đoạn gen trong hệ thống vận chuyển mã hóa gen phân giải PS gây ra sự khác biệt về điểm hoạt động prebiotic [182].

FOS là một prebiotic phổ biến, tuy nhiên hiệu quả của nó cũng thay đổi đáng kể giữa các chủng được thử nghiệm, chỉ số PI đều khá tốt nhưng có sự biến động tương đối giữa các chủng. Điều này củng cố thêm tính đặc hiệu trong tương tác prebiotic-probiotic.

Chỉ số PI của PS chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như cấu trúc phân tử và mức độ trùng hợp, khả năng hoà tan trong nước, tốc độ lên men và sản xuất SCFAs, tính chọn lọc của vi sinh vật, quá trình chế biến và biến đổi. Các oligosaccharide chuỗi ngắn (FOS, GOS) có PI cao hơn do dễ lên men, trong khi PS chuỗi dài (cellulose, tinh bột kháng) có PI thấp do lên men chậm. Chất xơ hòa tan (inulin, pectin, β-glucan) có PI cao hơn do thúc đẩy lên men và sản xuất acid béo chuỗi ngắn (SCFAs), trong khi chất xơ không hòa tan (cellulose) có khả năng lên men thấp và PI thấp [183]. Sản xuất nhiều butyrate, acetate và propionate tương quan với PI tốt hơn. Inulin, FOS và XOS thúc đẩy vi khuẩn sản xuất butyrate, cải thiện sức khỏe đường ruột [184]. Prebiotic tốt sẽ kích thích chọn lọc lợi khuẩn (*Lactobacillus, Bifidobacterium*) trong khi hạn chế vi khuẩn gây bệnh. Arabinoxylan, pectin và β-glucan có thể hỗ trợ một số chủng Bacteroides [185]. Thủy phân bằng enzyme có thể làm tăng PI bằng cách phá vỡ PS thành oligosaccharide dễ lên men hơn. Trong khi đó, xử lý nhiệt (ép đùn, hấp khử trùng) có thể làm giảm hoạt tính prebiotic ở một số chất xơ [183]. Nhiều nghiên cứu cho thấy việc bổ sung polysaccharid có nguồn gốc từ sợi nấm làm giảm đáng kể các triệu chứng bệnh lý viêm loét dạ dày, cải thiện tình trạng dinh dưỡng, giảm tỷ lệ tiêu chảy và giảm viêm. Quan trọng hơn, việc sử dụng polysaccharid giúp tăng cường chức năng ruột và định hình lại hệ vi sinh vật đường ruột [186]. Nghiên cứu của Larypoor và cs., (2025) đã đánh giá tiềm năng prebiotic và hoạt tính chống oxy hóa của polysaccharide (PS) chiết xuất từ sinh khối nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) và nấm Hương (*Lentinula edodes*) cho thấy PS từ nấm có cấu trúc carbohydrate phức tạp, khả năng kháng enzyme tiêu hóa ưu việt hơn inulin và thể hiện hoạt tính dọn gốc tự do (DPPH) đáng kể. Khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy không đường ở điều kiện tối ưu (pH 5.0, 37°C), PS của cả hai loại nấm đã kích thích hiệu quả sự sinh trưởng của các chủng probiotic theo một động học lên men đặc thù [187].

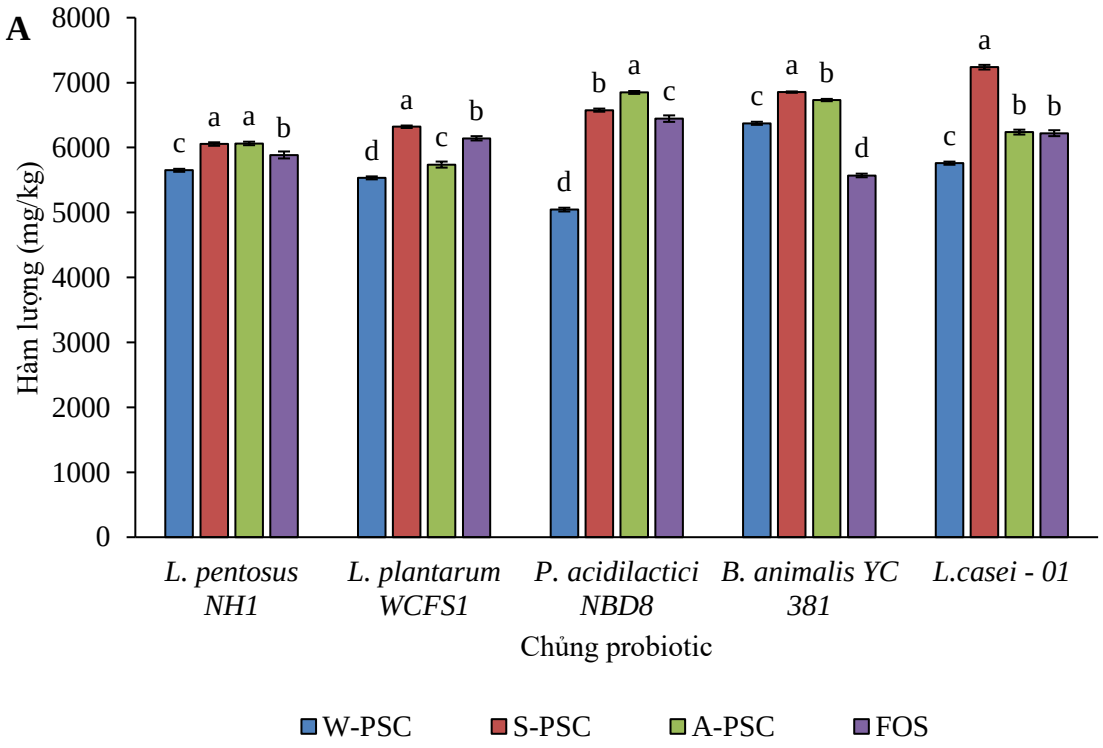
Thông qua chỉ số PI trong nghiên cứu này đã cho thấy được PS tách chiết tuần tự từ các dung môi khác nhau là ứng viên tiềm năng cho việc phát triển các thành phần prebiotic mới, có thể được ứng dụng trong các sản phẩm synbiotic để tăng cường hiệu quả của các chủng probiotic cụ thể.

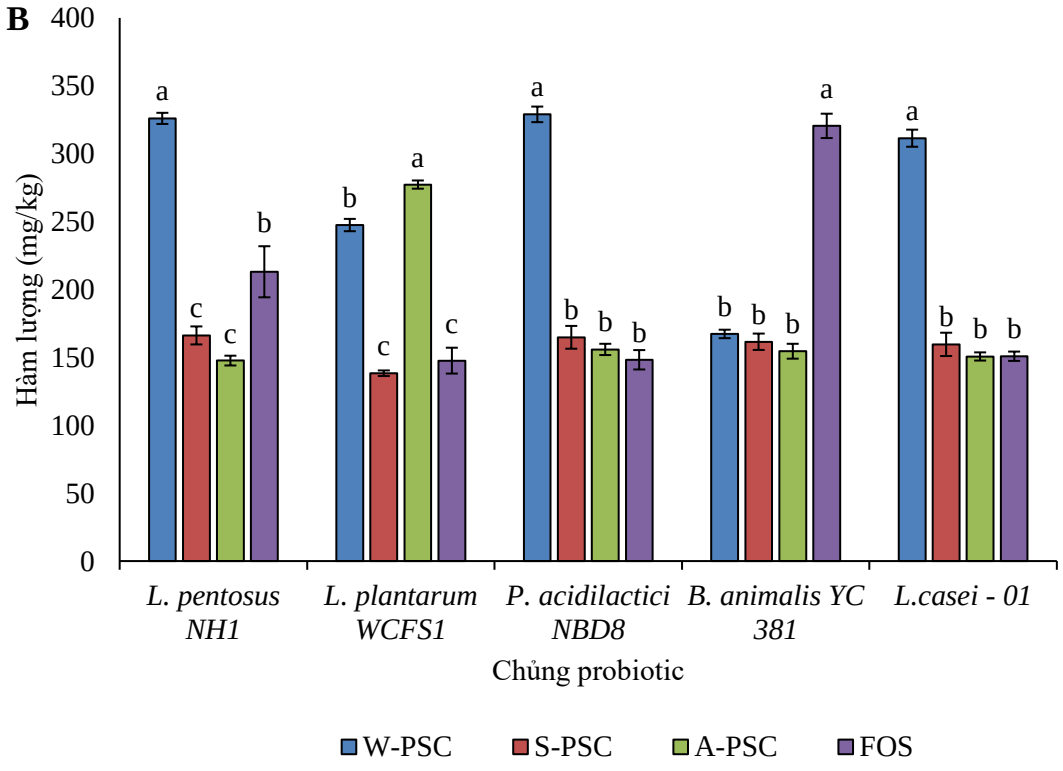
3.2.4.3. Ảnh hưởng của các chiết xuất PS đến hàm lượng acid béo chuỗi ngắn tạo thành

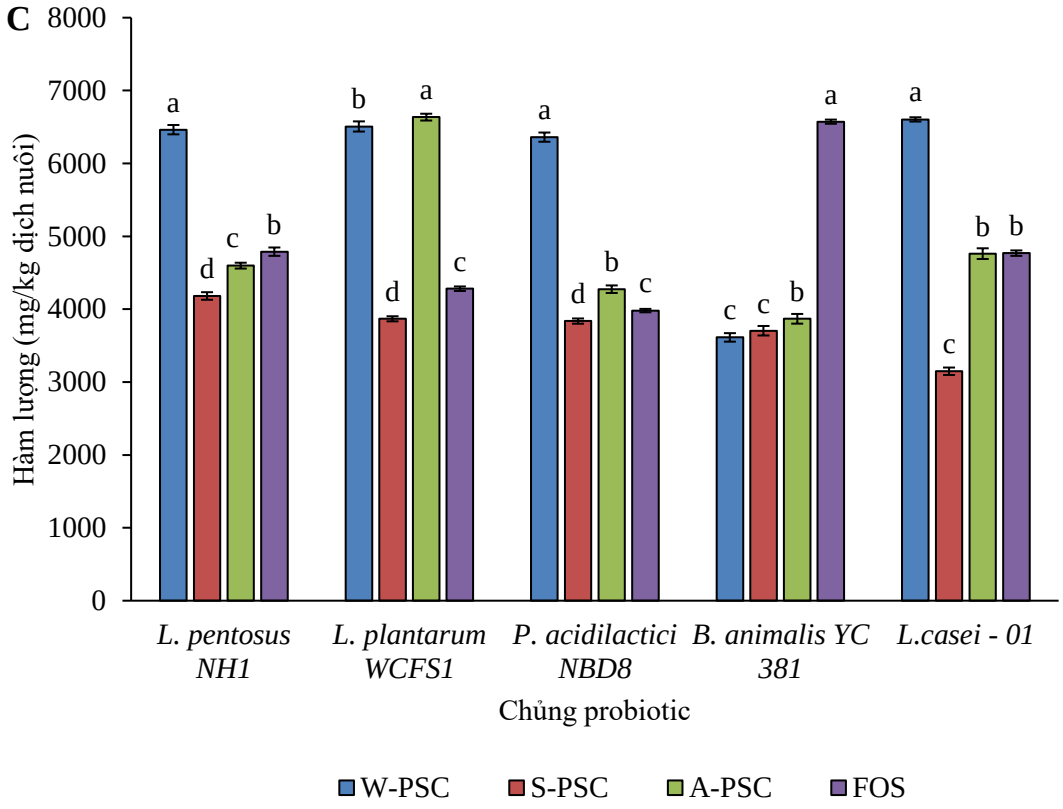
Acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) đang nổi lên như một số hợp chất được nghiên cứu nhiều nhất trong thập kỷ qua, do tác động có lợi đã được chứng minh của chúng đối với sức khỏe con người [188]. SCFAs, bao gồm acetate, propionate và butyrate, là các phân tử năng lượng và tín hiệu quan trọng, do đó ảnh hưởng đến nhiều quá trình sinh lý khác nhau [179]. Ngoài ra, có thể làm giảm nguy cơ mắc bệnh đường tiêu hóa, ung thư và bệnh tim mạch. SCFAs có thể được phát hiện trong môi trường tăng trưởng của 5 chủng *L. plantarum* WCFS1, *L. pentosus* NH1, *P. acidilactici* NBD8, *B. animalis* YC381, *L. casei*-01 sau 24 giờ nuôi cấy bằng hệ thống HPLC dòng Agilent 1200 với máy dò RI (Agilent, Đức) và cột Aminex HPX87H (BioRad, Hercules, CA, Mỹ) được sử dụng để thực hiện phân tích SCFAs. Các điều kiện phân tích như sau: pha động 3 mM H2SO4 ở 0,6 mL min-1, 50°C.

a. Hàm lượng SCFAs trong môi trường bổ sung PS chiết xuất nấm *C. militaris*

Kết quả định lượng các acetic acid, propionic acid và butyric acid được sinh ra trong quá trình sinh trưởng phát triển của các chủng probiotic ở các nghiệm thức bổ sung các PS chiết xuất khác nhau của sợi nấm *C. militaris* được thể hiện ở hình 3.16.


A
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Hàm lượng (mg/kg)
c a a b
d a c b
d b a c
c a b d
c a b b
L. pentosus NH1
L. plantarum WCFS1
P. acidilactici NBD8
B. animalis YC 381
L.casei - 01
Chủng probiotic
W-PSC
S-PSC
A-PSC
FOS


B
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Hàm lượng (mg/kg)
a c c b
b c a c
a b b b
b b b a
a b b b
L. pentosus NH1
L. plantarum WCFS1
P. acidilactici NBD8
B. animalis YC 381
L.casei - 01
Chủng probiotic
W-PSC
S-PSC
A-PSC
FOS



Hình 3.16. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. *A: Butyric acid; B: Propionic acid; C: Acetic acid*

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một nhóm cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05).

Acetic acid là SCFA cao nhất thu được, dao động từ 5044,35 - 7237,35 mg/kg, tiếp theo là acid butyric 3147,95 - 6634,99 mg/kg và thấp nhất là acid propionic 138,31-328,97 mg/kg. Hàm lượng acetic acid được sản xuất trong môi trường nuôi cấy probiotic được bổ sung các chiết xuất PS khác nhau không khác biệt đáng kể (**Hình 3.16A**). Trong khi đó, lượng propionic acid và butyric acid thu được cao hơn đáng kể khi probiotic (trừ chủng *B. animalis* YC381) được bổ sung chiết xuất W-PSC so với môi trường nuôi cấy được bổ sung chiết xuất A-PSC, S-PSC và FOS (**Hình 3.16B và Hình 3.16C**). *B. animalis* YC381 khi được nuôi cấy trong môi trường bổ sung FOS có hàm lượng butyric acid và propionic acid cao hơn nhiều so với môi trường bổ sung chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris.*

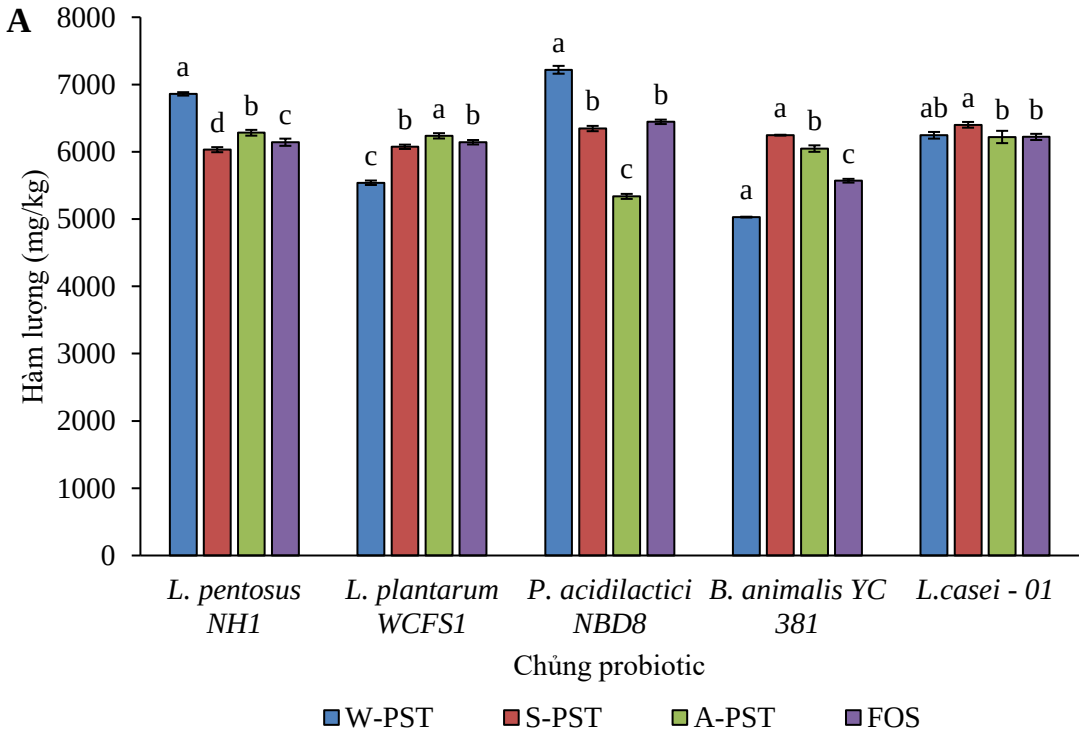
Loại và cấu trúc của PS có thể ảnh hưởng đến hiệu quả lên men. Ví dụ, các PS có cấu trúc phân nhánh cao có thể cần các enzyme vi khuẩn chuyên biệt hơn để lên men và

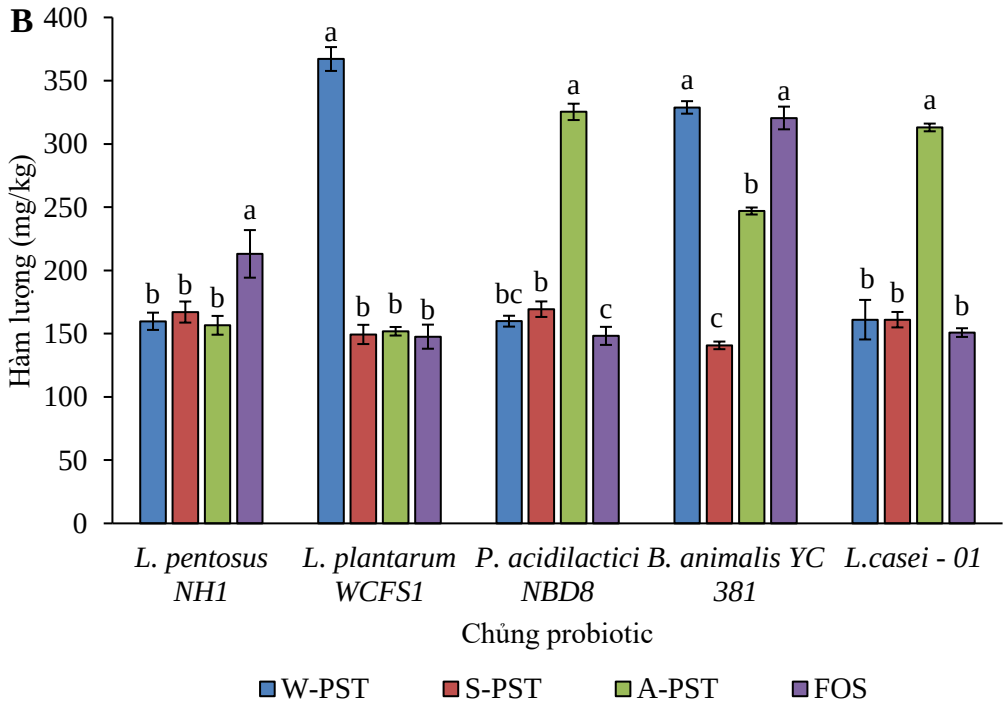
có thể dẫn đến năng suất SCFAs thấp hơn [189]. FOS là một prebiotic thương mại bao gồm các oligosaccharide, có cấu trúc đơn giản hơn PS, do đó dễ dàng bị phân hủy bởi các enzyme của vi khuẩn để sản xuất một lượng lớn SCFAs. Không phải tất cả các probiotic đều có hiệu quả như nhau trong việc sản xuất SCFAs. Các chủng cụ thể như *Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium longum* và *Bifidobacterium breve* đã được nghiên cứu về khả năng lên men PS và sản xuất một lượng đáng kể SCFAs. Chỉ những chủng có gen mã hóa các enzyme phù hợp mới có thể sử dụng PS một cách hiệu quả. Điều này giải thích tại sao các chủng khác nhau sản xuất lượng SCFAss khác nhau từ cùng một nguồn PS; hoặc tại sao cùng một chủng lại sản xuất lượng SCFA khác nhau khi được bổ sung các nguồn PS khác nhau. Sự đa dạng và thành phần của hệ vi sinh vật đường ruột ảnh hưởng đáng kể đến việc sản xuất SCFAs. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn cụ thể, chẳng hạn như *Lactobacillus faecis,* có thể ảnh hưởng đến hàm lượng SCFAs bằng cách điều hòa hệ vi sinh vật đường ruột và giảm rối loạn chuyển hóa lipid [190].

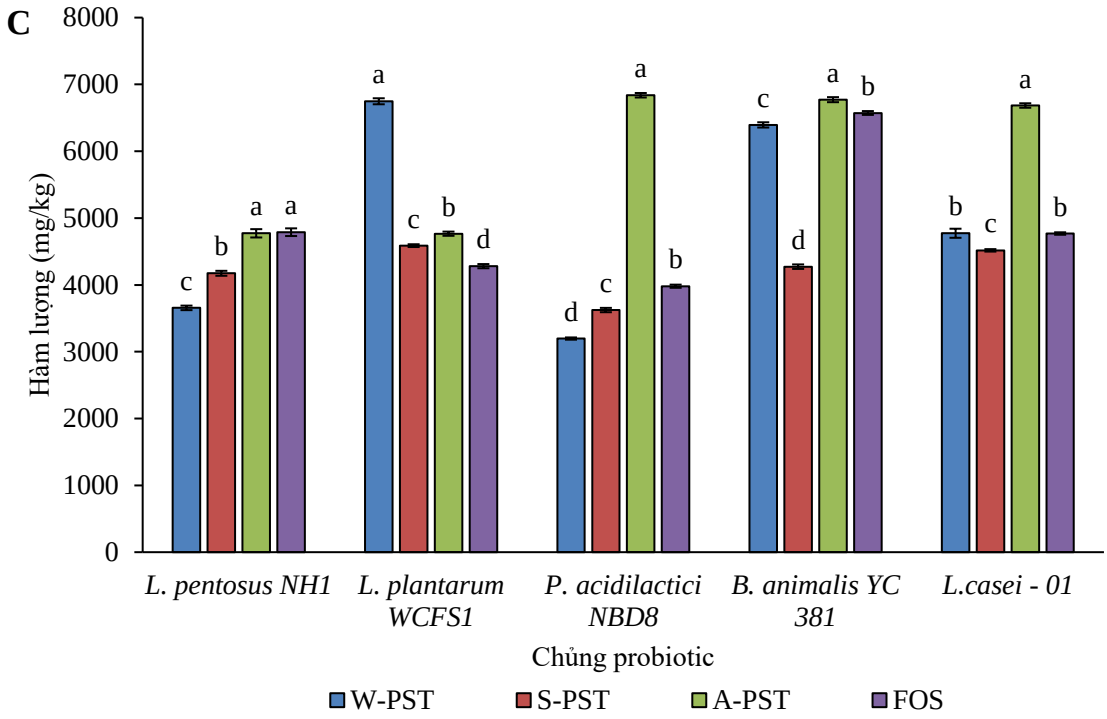
Việc nuôi cấy probiotic được bổ sung PS có ý nghĩa sâu sắc đối với việc sản xuất acid béo chuỗi ngắn (SCFA), vốn rất cần thiết để duy trì sức khỏe đường ruột, chức năng miễn dịch và các quá trình trao đổi chất. Sự tương tác giữa các chủng probiotic cụ thể và các PS như inulin, tinh bột kháng và pectin giúp tăng cường sản xuất SCFAs, với butyrate, acetate và propionate là các sản phẩm cuối cùng chính. Các SCFAs này hỗ trợ tính toàn vẹn của ruột, điều hòa các phản ứng miễn dịch và mang lại lợi ích trao đổi chất. Bằng cách tối ưu hóa việc lựa chọn probiotic và các chất bổ sung PS, có thể khai thác những lợi ích này để có kết quả sức khỏe tốt hơn. Nghiên cứu sâu hơn về các tương tác cụ thể theo chủng và ảnh hưởng của chúng đối với việc sản xuất SCFAs sẽ tiếp tục mở ra những con đường mới cho các liệu pháp dựa trên probiotic.

b. Hàm lượng SCFAs trong môi trường bổ sung PS chiết xuất nấm *T. versicolor*

Kết quả định lượng cho thấy hàm lượng tổng SCFAs và từng loại SCFA có sự khác nhau đáng kể trong các nghiệm thức khi bổ sung chiết xuất PS nuôi cấy 5 chủng probiotic khác nhau. Kết quả được thể hiện ở hình 3.17.


A
Hàm lượng (mg/kg)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
a d b c
c b a b
a b b
a a b c
ab a b b
L. pentosus NH1
L. plantarum WCFS1
P. acidilactici NBD8
B. animalis YC 381
L.casei - 01
Chủng probiotic
W-PST
S-PST
A-PST
FOS


B
Hàm lượng (mg/kg)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
b b b a
a b b b
bc b a c
a c b a
b b a b
L. pentosus NH1
L. plantarum WCFS1
P. acidilactici NBD8
B. animalis YC 381
L.casei - 01
Chủng probiotic
W-PST
S-PST
A-PST
FOS



Hình 3.17. Ảnh hưởng của PS đến hàm lượng SCFAs. ***A: Acetic acid, B: Propionic acid; C: Butyric acid***

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một nhóm cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05).

Nhìn chung, acetic acid là loại SCFA có hàm lượng cao và khá đồng đều so với các nghiệm thức nghiêm cứu, hàm lượng dao động trong khoảng 5800 – 7200 mg/kg, tiếp theo là butyric acid với mức từ 3200 – 7000 mg/kg, trong khi propionic acid có giá trị thấp nhất, chỉ khoảng 100 – 360 mg/kg. Điều này phản ánh quy luật sinh học phổ biến trong quá trình lên men chất xơ và PS bởi vi khuẩn ruột, trong đó acetic acid thường là sản phẩm chính do vai trò trung gian trong nhiều con đường chuyển hóa carbon [191].

Hàm lượng giữa 3 SCFAs trong từng nghiệm thức bổ sung có mức độ dao động không đồng đều. Khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung chiết xuất A-PST cho thấy khả năng tạo butyric acid cao so với các nghiệm thức khác, đặc biệt trên các chủng như *P. acidilactici, B. animalis, L. casei*. Kết quả này tương đồng với kết quả đánh giá chỉ số PI đây là loại PS có chỉ số PI cao ở hầu hết các chủng, các chủng probiotic đã sử dụng PS này sinh trưởng và tăng cường sản xuất butyric acid. Bên cạnh đó, chiết xuất W-PST cũng cho kết quả tăng sản xuất hàm lượng Butyric khá cao, đặc biệt ở một số chủng như

B. animalis, L. plantarum, W-PST cho thấy độ hòa tan tốt giúp quá trình lên men hiệu quả. Ngược lại, chiết xuất S-PST có xu hướng tạo butyric acid thấp hơn đáng kể, có thể do cấu trúc bị thay đổi bởi môi trường kiềm và khả năng hoà tan tương đối thấp làm giảm khả năng lên men. FOS, mặc dù là prebiotic phổ biến, nhưng hàm lượng butyric acid tạo ra từ FOS có xu hướng trung bình và không ổn định giữa các chủng.

Hàm lượng Propionic acid thay đổi giữa các nghiệm thức nghiên cứu có sự tương đồng với Butyric acid. Chiết xuất A-PST cũng cho thấy hiệu quả tốt trong việc kích thích tạo propionic acid, đặc biệt là cũng là chủng *L. casei, P. acidilactici, B. animalis*. Chiết xuất W-PST hàm lượng propionic acid cao nhất chủng *L. plantarum* và có sự khác biệt ($P<0,05$) so với FOS và 2 chiết xuất còn lại. Chủng *B. animalis* cũng cho hàm lượng SCFA này cao nhất tuy nhiên không có sự khác biệt so với FOS ($P > 0,05$). Trong khi đó, nuôi cấy probiotic trên môi trường bổ chiết xuất S-PST lại tạo propionic acid với hàm lượng trung bình và thấp nhất, điều này cho thấy là Na_2CO_3 không phải là dung môi chiết lý tưởng cho mục tiêu tạo nguồn prebiotic.

Trong các chủng vi khuẩn được khảo sát, *B. animalis* cho thấy khả năng lên men PS để tạo SCFAs (đặc biệt là acetic acid và butyric acid) cao hơn rõ rệt so với các chủng còn lại. Điều này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy *Bifidobacterium* có khả năng thủy phân tốt các loại PS có cấu trúc mạch ngắn đến trung bình, và tạo ra lượng lớn acetic acid như sản phẩm chuyển hóa chính [192]. Ngoài ra, *L. plantarum* và *L. pentosus* cũng thể hiện hoạt tính lên men khá cao, đặc biệt với PS chiết bằng nước, cho thấy chúng có thể sử dụng tốt PS tự nhiên chưa bị biến đổi mạnh – phù hợp với tính chất sinh lý của vi khuẩn acid lactic [193].

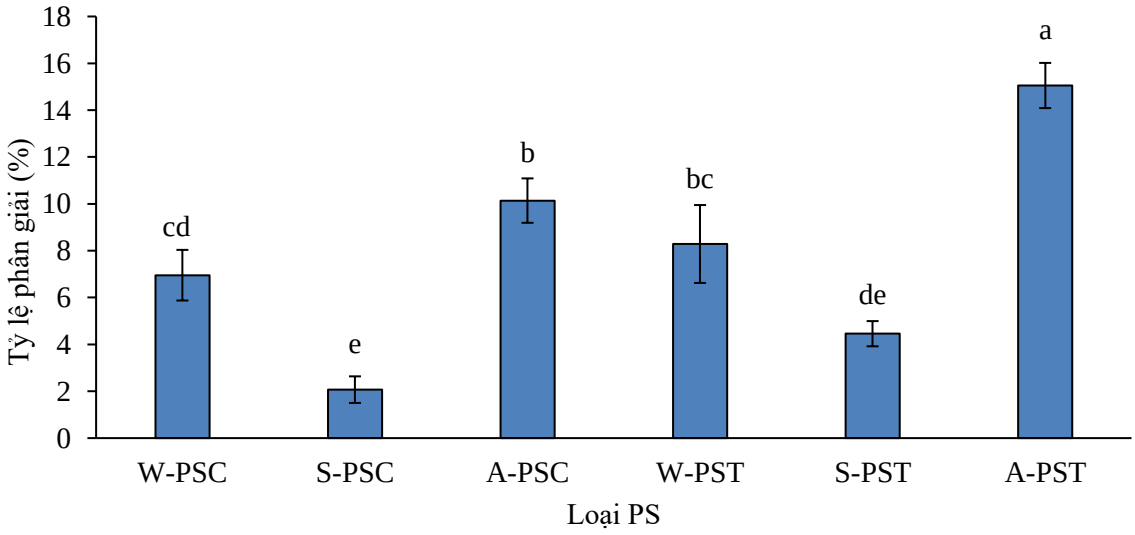
Miao et al. (2015) đã xác định nồng độ SCFAs trong các môi trường lên men theo mẻ so với 5 loại carbohydrate được thử nghiệm (α-D-glucan, dextran, FOS 95, GOS 55 và insulin) và phát hiện ra rằng chúng có thể tạo ra các thành phần và tỷ lệ SCFA khác nhau. Do đó, các thành phần khác nhau của chất xơ trong chế độ ăn uống bao gồm cả PS không tiêu hóa có thể dẫn đến các tỷ lệ khác nhau trong các thành phần SCFA [194]. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng quá trình lên men polysaccharide *invitro* có thể làm tăng đáng kể sản xuất tổng SCFAs [195].

Nội dung nghiên cứu đã chứng minh rằng các phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm có hoạt tính kháng oxi khá tương đồng với các nghiên cứu của các nấm khác trước đây. Mặc khác, Các chiết xuất PS thể hiện hoạt tính prebiotic rõ rệt (thể hiện qua khả năng

kích thích lợi khuẩn, kháng tiêu hóa, ức chế hại khuẩn và đặc biệt là sản sinh các acid béo mạch ngắn (SCFAs)). Tuy nhiên, hoạt tính này không đồng đều giữa các phân đoạn, phân đoạn A-PST (chiết bằng acid từ *T. versicolor*) cho thấy chỉ số PI cao và khả năng kích thích sinh Butyric acid vượt trội. Nghiên cứu này đã cung cấp cơ sở khoa học vững chắc để khẳng định rằng sợi nấm (*C. militaris* và *T. versicolor*) là nguồn nguyên liệu prebiotic đầy tiềm năng.

3.2.4.4. Khả năng bị phân giải bởi α-amylase của các chiết xuất PS sợi nấm

Nghiên cứu về khả năng kháng tiêu hóa PS được thực hiện dựa trên các xét nghiệm mô phỏng đường tiêu hóa của con người. Khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase *in vitro* được khảo sát bằng phương pháp mô phỏng nước bọt. Tỷ lệ kháng thủy phân bởi α-amylase *in vitro* được xác định dựa trên mức độ thủy phân. Sự khác biệt tối thiểu giữa các phân đoạn PS về mức độ thủy phân được thể hiện trong **Hình 3.18**, hầu hết các mẫu PS có mức độ kháng tiêu hóa ở mức độ cao.



Hình 3.18. Phần trăm PS bị phân giải bởi α-amylase

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 5). Các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chiết xuất PS bị phân giải bởi α-amylase khá thấp khoảng (2,07%-15,05%). Ở cả 2 chủng nấm S-PS đều ít bị tiêu hóa hơn so với 2 chiết xuất khác. Quá trình chiết kiềm đã chọn lọc hiệu quả phân đoạn β-glucan và loại bỏ phần lớn tạp chất glucan dạng α (glycogen/tinh bột), khiến S-PS trở nên trơ với enzyme tiêu hóa, bên cạnh đó S-PS cũng tan kém trong nước so với 2 PS khác. Chiết

xuất A-PS cho thấy tỷ lệ bị phân giải cao nhất tức là khả năng kháng tiêu hóa bởi enzyme α-amylase thấp nhất so với các mẫu khác. Điều này có thể giải thích là do môi trường acid thấp đã xúc tác quá trình phân cắt làm phá vỡ ma trận không gian phức tạp của đại phân tử PS. Sự bung tỏa cấu trúc vật lý này đã làm bộc lộ một lượng nhỏ các α-glucan nội bào dự trữ hoặc các oligosaccharide tạp chất mang liên kết α bị vùi lấp sâu bên trong mạng lưới polymer. Mặc dù vậy, phần khung mạch chính chứa các liên kết β mang hoạt tính prebiotic vẫn duy trì được sự nguyên vẹn và đề kháng tốt với enzyme tiêu hóa ở phần trên ống tiêu hóa đảm bảo khả năng tiến vào đại tràng làm cơ chất cho lợi khuẩn.

PS trong nấm chủ yếu là β-glucan với liên kết β-(1→3) ở mạch chính và một số nhánh β-(1→6) trong khi đó amylase chủ yếu tác động lên các liên kết α (1→4) glycoside. Đặc tính không bị amylase phân hủy giúp PS nấm trở thành nguồn prebiotic, kích thích lợi khuẩn đường ruột. Điều này phù hợp với các nghiên cứu khác cho thấy PS từ các nguồn tự nhiên có thể có khả năng kháng tiêu hóa khác nhau tùy thuộc vào phương pháp chế biến và chiết xuất [50]. Trong nghiên cứu của Yongjin Sun và cs. (2021) PS thô tan trong nước của vỏ *Passiflora edulis* (WPEP), xylan (XY) và pectin cam quýt (CP) có mức độ thuỷ phân bởi α-amylase khoảng từ 2-10% [196].

Từ những kết quả trên ta có thể thấy rằng S-PS và W-PS có khả năng bị tiêu hoá thấp và trung bình, có tiềm năng cao để ứng dụng trong lĩnh vực sản phẩm prebiotic thông thường như sữa lên men, bột dinh dưỡng đặc biệt là làm thực phẩm prebiotic, hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột mà không bị phân giải ở ruột non. Còn đối với A-PS với khả năng bị thuỷ phân mạnh nhất thì sẽ phù hợp với các sản phẩm prebiotic chọn lọc tác động chủ yếu ở đại tràng, đồng thời có thể ứng dụng làm chất mang thuốc hướng đích ruột già hoặc thành phần thực phẩm chức năng cho người tiểu đường.

3.2.4.5. Khảo sát khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy

Escherichia coli và *Staphylococcus aureus* là những tác nhân hàng đầu gây ra nhiều loại nhiễm trùng ở người và động vật. Bổ sung prebiotic vào môi trường nuôi cấy probiotic sẽ giúp kích thích sự sinh trưởng và sản sinh ra các acid béo mạch ngắn góp phần tăng cường khả năng chống lại các các mầm bệnh này. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài sử dụng dịch nuôi cấy chủng *L. plantarum* được bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác nhau từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor.*

a. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm *C. militaris*

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy PS chiết xuất từ nấm đặc biệt là nấm *C. militaris* đã cho thấy có khả năng kích thích sự tăng trưởng các chủng probotic đồng thời tăng cường sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs). Nghiên cứu này đã bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác từ nấm *C. militaris* vào môi trường nuôi cấy *L. plantarum* ở 5 CT (CT1: bổ sung W-PSC, CT2: bổ sung S-PSC, CT3: bổ sung A-PSC, CT4: bổ sung FOS và CT5: Môi trường MRS không bổ sung PS) và đánh giá hiệu quả ức chế *E. coli* và *S. aureus* sau 24 và 48 giờ. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.9 và Hình 3.19.**

Bảng 3.9. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm)

Công thức	*E. coli*		*S. aureus*	
	24h	48h	24h	48h
CT1	27,06±1,21^{a}	27,68±0,62^{ab}	26,93±0,50^{a}	25,01±0,35^{b}
CT2	25,67±0,67^{a}	27,21±0,40^{ab}	26,47±0,30^{a}	23,80±0,47^{c}
CT3	27,00±0,38^{a}	27,11±0,39^{b}	24,88±0,40^{b}	24,63±0,42^{bc}
CT4	26,49±0,92^{a}	28,66±0,82^{a}	27,22±0,66^{a}	26,27±0,38^{a}
CT5	22,47±0,54^{b}	25,56±0,48^{c}	23,42±0,38^{c}	22,35±0,49^{d}

Ghi chú: Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0,1% W-PSC, 0,1% S-PSC; 0,1% A-PSC; 0,1% FOS và không bổ sung PS.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở tất cả các công thức nghiên cứu đều cho thấy hiệu quả ức chế tốt 2 chủng vi khuẩn gây hại *E. coli* và *S. aureus*. Ở thời điểm 24 và 48 giờ dịch lên men bổ sung 3 loại PS và FOS đều tạo ra vòng kháng khuẩn có đường kính lớn hơn đáng kể so với CT không bổ sung, cho thấy việc bổ sung PS từ *C. militaris* (bằng các phương pháp chiết khác nhau) và FOS vào môi trường nuôi cấy đã kích thích *L. plantarum* tăng cường sản xuất các hợp chất có khả năng kháng khuẩn. Các PS và FOS đóng vai trò như các nguồn thức ăn ưu tiên cho *L. plantarum*, thúc đẩy sinh trưởng và hoạt động trao đổi chất của chúng.

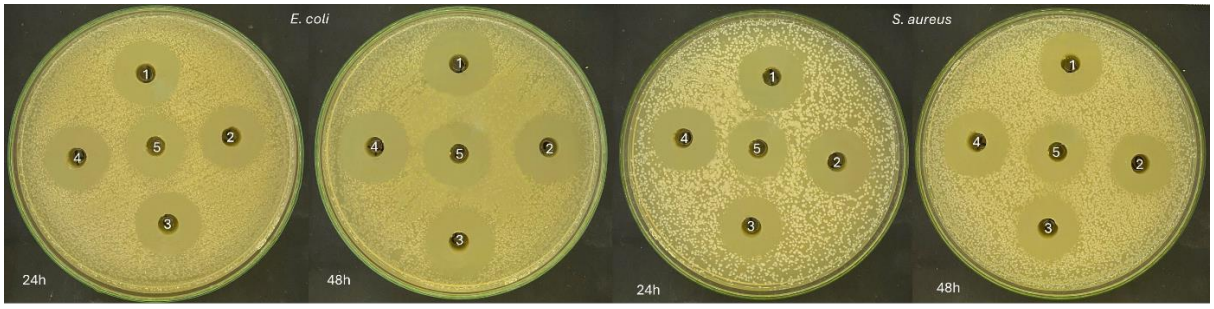
Ở chủng *E. coli* tại 24 giờ hiệu quả ức chế ở các CT bổ sung các chiết xuất PS và FOS không có sự khác biệt về ý nghĩa thống kê (P > 0,05). Tại 48 giờ hiệu quả ức chế *E. coli* hầu hết có sự tăng lên hiệu quả tốt nhất ở CT bổ sung W-PSC, S-PSC và FOS với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt là: 27,68±0,62 mm; 27,21±0,40 mm và

28,66±0,82 mm. CT bổ sung PS-HCL hiệu quả ức chế đạt 27,11±0,39 mm thấp hơn FOS, tuy nhiên không có sự khác biệt so với bổ sung W-PSC và S-PSC.

Khác với *E. coli*, ở chủng *S. aureus* tại 24 giờ CT bổ sung A-PSC cho hiệu quả ức chế thấp hơn so với bổ sung W-PSC, S-PSC và FOS. Tại 48 giờ hoạt tính kháng khuẩn chống *S. aureus* của tất cả các công thức lại có xu hướng giảm nhẹ và có sự khác biệt giữa các CT bổ sung các nguồn PS khác nhau. Điều này có thể là do các hợp chất kháng khuẩn nhạy cảm với *S. aureus* đã bị suy giảm sau 48h lên men.

Sự khác biệt về hiệu quả giữa các CT bổ sung PS khác nhau cho thấy phương pháp chiết (H_2O, Na_2CO_3, HCl) ảnh hưởng đến loại và cấu trúc của PS thu được. Các loại PS khác nhau này có thể được *L. plantarum* lên men với hiệu quả khác nhau, dẫn đến việc sản xuất lượng và loại chất kháng khuẩn cũng khác nhau. Hiệu quả kháng khuẩn ở *S. aureus* (Gram dương) và *E. coli* (Gram âm) khác nhau vì chúng có cấu trúc thành tế bào khác nhau. Malanovic và Lohner đã báo cáo rằng hoạt động kháng khuẩn của *Lactiplantibacillus* spp. rõ ràng hơn ở vi khuẩn Gram âm so với vi khuẩn Gram dương. Vi khuẩn Gram âm bao gồm màng ngoài có tính chọn lọc đối với chất kháng khuẩn [197]. Nghiên cứu này cho thấy *S. aureus* nhạy cảm hơn với các chất kháng khuẩn do *L. plantarum* tạo ra ở giai đoạn 24 giờ, mặc khác *E. coli* thể hiện sự nhạy cảm rõ rệt ở 48 giờ. Điều này, phản ánh phổ tác dụng khác nhau của các chất kháng khuẩn do *L. plantarum* sinh ra. Nghiên cứu của Madhavi Joshi đã cho thấy chiết xuất của nấm *C. militaris* bằng dung môi nước ở nồng độ 100% cao chiết cho đường kính vòng ức chế *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là 17,64 ± 0,01 mm và 15,52 ± 0,3 mm [198].

Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng việc bổ sung PS từ nấm *C. militaris* và FOS có khả năng cải thiện đáng kể hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* chống lại *E. coli* và *S. aureus* so với nuôi cấy không bổ sung. Các phương pháp chiết PS khác nhau cho thấy hiệu quả khác nhau trên từng loại vi khuẩn.



Hình 3.19. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli*

ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023

Ghi chú: 1, 2, 3, 4, 5 là CT1, CT2, CT3, CT4 và CT5 (Bổ sung 0,1% W-PSC, bổ sung 0,1% S-PSC, bổ sung 0,1% A-PSC, bổ sung 0,1% FOS và môi trường MRS không bổ sung PS)

b. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung phân đoạn PS chiết xuất từ sợi nấm *T. versicolor*

Nghiên cứu này đã bổ sung 0,1% các chiết xuất PS khác từ nấm *T. versicolor* vào môi trường nuôi cấy *L. plantarum* ở 5 CT (CT1: bổ sung W-PST, CT2: bổ sung S-PST, CT3: bổ sung A-PST, CT4: bổ sung FOS và CT5: môi trường MRS) và đánh giá hiệu quả ức chế *E. coli* và *S. aureus* sau 24 và 48 giờ. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.10** và **Hình 3.20.**

Bảng 3.10. Đường kính vòng vô khuẩn của *E. coli* và *S. aureus* (mm)

Công thức	*E. coli*		*S. aureus*	
	24h	48h	24h	48h
CT1	28,28±0,30^{a}	27,88±0,76^{a}	28,47±0,81^{a}	27,04±0,25^{b}
CT2	28,47±0,85^{a}	26,91±0,39^{a}	27,35±0,68^{ab}	26,05±0,35^{c}
CT3	28,48±0,62^{a}	27,74±0,29^{a}	26,60±0,56^{b}	27,49±0,50^{ab}
CT4	28,86±0,34^{a}	27,65±0,92^{a}	27,53±0,25^{ab}	28,19±0,15^{a}
CT5	23,86±0,74^{b}	24,33±0,34^{b}	23,57±0,50^{c}	24,21±0,20^{d}

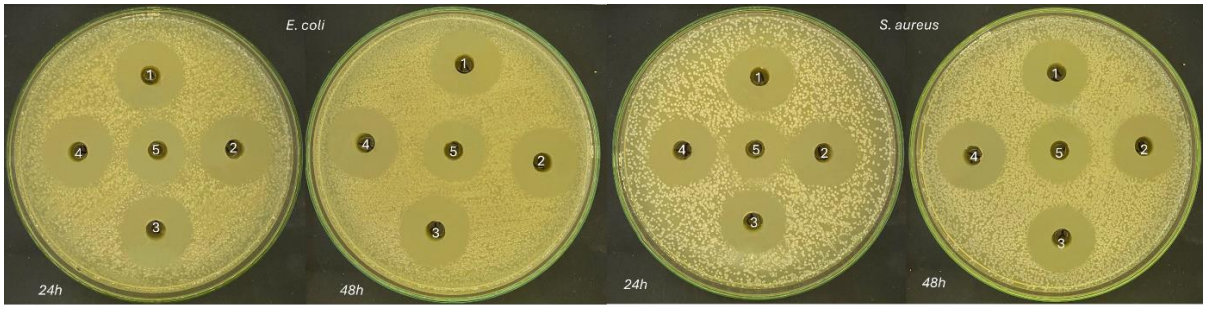
Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0,1% W-PST, 0,1% S-PST; 0,1% A-PST; 0,1% FOS và không bổ sung PS.

Ở cả hai chủng vi khuẩn thử nghiệm tại cả hai thời điểm 24h và 48h, tất cả các công thức bổ sung chiết xuất PS và FOS đều cho thấy hoạt tính kháng khuẩn cao hơn so với công thức đối chứng không bổ sung ($p < 0,05$). Nguyên nhân là do bổ sung PS và FOS đã đóng vai trò là nguồn prebiotic kích thích *L. plantarum* sinh trưởng và trao đổi chất tích cực hơn, dẫn đến việc sản xuất ra lượng lớn hơn các hợp chất kháng khuẩn hơn so với không bổ sung.

Chủng *E. coli* tại cả 2 thời điểm ở các công thức bổ sung chiết xuất PS và FOS

hiệu quả kháng khuẩn đều không có sự sai khác nhau. Mặc khác, ở chủng *S. aureus* tại 24 giờ CT bổ sung PS-H_2O cho hiệu quả kháng khuẩn cao nhất là: 28,47±0,81 mm tuy nhiên không có sự sai khác so với CT bổ sung PS (Na_2CO_3) và FOS; tại 48 giờ hiệu quả kháng khuẩn giữa các công thức có sự khác biệt đáng kể với nhau ($p < 0,05$). Hiệu quả kháng khuẩn ở CT1 và CT2 có xu hướng giảm, ngược lại ở 3 CT còn lại có sự tăng nhẹ. Sự khác biệt về hiệu quả giữa các công thức cho thấy rằng cấu trúc và tính chất của PS ảnh hưởng đến cách *L. plantarum* sử dụng chúng làm prebiotic. Các loại PS khác nhau có thể được lên men với tốc độ khác nhau, hoặc kích thích *L. plantarum* sản xuất các loại hợp chất kháng khuẩn với tỷ lệ khác nhau, hoặc ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen liên quan đến sản xuất bacteriocin. các bacteriocin hoặc các peptit kháng khuẩn khác có thể có phổ tác dụng hẹp hơn hoặc cơ chế khác nhau. Động học thay đổi theo thời gian có thể do sự thay đổi tỷ lệ các chất kháng khuẩn được sản xuất bởi *L. plantarum* theo giai đoạn phát triển của nó.

Nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi cấy probiotic được bổ sung PS thể hiện tiềm năng đáng kể như các tác nhân kháng khuẩn hiệu quả và an toàn chống lại cả *E. coli* và *S. aureus*. Các chiết xuất PS từ nấm *C. militaris* và *T. versicolor* đóng vai trò là một chất tăng cường sinh học quan trọng, không chỉ thúc đẩy sự tăng sinh của vi khuẩn có lợi mà còn khuếch đại hoạt động trao đổi chất của chúng, dẫn đến sản lượng hợp chất kháng khuẩn cao hơn trong dịch nuôi cấy. Hiệu ứng hiệp đồng này biến đổi dịch nuôi cấy probiotic từ một hỗn dịch vi sinh đơn giản thành một nhà máy sinh học mạnh mẽ hơn để sản xuất các chất kháng khuẩn tự nhiên, mang lại một cách hiệu quả về chi phí và bền vững để tăng cường tiềm năng điều trị của chúng.



Hình 3.20. Khả năng kháng khuẩn của dịch nuôi cấy *L. plantarum* đối với *E. coli* ATCC 85922 và *S. aureus* ATCC 25023

Ghi chú: 1, 2, 3, 4, 5 là CT1, CT2, CT3, CT4 và CT5 (Bổ sung 0,1% W-PST, bổ sung 0,1% S-PST, bổ sung 0,1% A-PST, bổ sung 0,1% FOS và môi trường MRS không bổ sung PS)

* Tiểu kết: Việc ứng dụng phương pháp chiết tuần tự với các dung môi khác nhau không chỉ giúp phân lập thêm các phân đoạn PS không tan trong nước mà còn tối ưu hóa hiệu suất thu hồi PS từ sinh khối hệ sợi nấm. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy sự ảnh hưởng của dung môi chiết đến cấu trúc bề mặt, hoạt tính kháng oxi hóa, hoạt tính prebiotic của mỗi phân đoạn PS. Hơn thế nữa mỗi PS tác động khác nhau đến mỗi loại probiotic khác nhau, dựa trên nghiên cứu này có thể khai thác sâu hơn tiềm năng kích thích mỗi loại probiotic đặc hiệu của từng chiết xuất PS. Kết quả cũng cho thấy không có sự tương quan thuận chiều chặt chẽ giữa hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính prebiotic của các mẫu khảo sát. PS từ sợi nấm *T. versicolor* thể hiện hoạt tính háng oxi hóa cao hơn từ nấm *C. militaris*. Đối với hoạt tính prebiotic thì mỗi loại chiết xuất PS từ mỗi loại nấm sẽ có hiệu quả khác nhau đối với mỗi chủng probiotic khác nhau.

Mặc dù các kết quả đánh giá *in vitro* trong nghiên cứu này cho thấy các chiết xuất PS từ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor* có tiềm năng đáng kể trong việc kích thích tăng sinh các chủng probiotic, thúc đẩy sản sinh axit béo chuỗi ngắn (SCFA), tuy nhiên những phát hiện này vẫn chỉ mang tính chất định hướng ban đầu. Mô hình *in vitro* là không thể mô phỏng hoàn toàn các điều kiện sinh lý và môi trường phức tạp bên trong hệ tiêu hóa của cơ thể sống. Cụ thể, các phép thử này chưa tính đến các yếu tố biến thiên như: sự phân hủy cấu trúc qua các rào cản tiêu hóa (dạ dày, ruột non), tỷ lệ hấp thu và sinh khả dụng thực tế của các hợp chất có hoạt tính sinh học, cũng như mạng lưới tương tác cạnh tranh của toàn bộ hệ vi sinh vật đường ruột. Do đó, các kết quả thu được ở giai đoạn này chưa đủ cơ sở để khẳng định chắc chắn về những lợi ích sức khỏe hay hiệu quả sinh lý trên cơ thể người. Để xác minh tiềm năng ứng dụng thực tế và làm rõ cơ chế tác động ở cấp độ tế bào và mô, các nghiên cứu tiếp theo cần bắt buộc mở rộng đánh giá trên các mô hình *in vivo* và tiến tới các thử nghiệm lâm sàng.

Tuy nhiên, quy trình chiết xuất tinh sạch PS phức tạp và tốn kém nên khó phù hợp cho ứng dụng thực phẩm đại trà. Một sản phẩm thực phẩm chức năng cần cân bằng giữa hiệu quả, chi phí và tính thực tiễn. Bột sinh khối thô là dạng nguyên liệu dễ sản xuất, giá thành hợp lý, và quan trọng hơn trong sợi nấm chứa đựng toàn bộ PS mà chúng ta đã khảo sát. Do đó, để đảm bảo tính kinh tế và tính khả thi trong sản xuất tạo ra sản

phẩm ứng dụng chúng tôi đã tập trung vào việc sử dụng toàn bộ sinh khối sợi nấm thô để phát triển một sản phẩm thực phẩm chức năng hoàn chỉnh nhằm chứng minh rằng những phát hiện khoa học có thể được hiện thực hóa thành một giải pháp hỗ trợ sức khỏe thiết thực.

Trên cơ sở đó, để chọn một loại sinh khối sợi nấm cho nghiên cứu ứng dụng chế biến thực phẩm vừa tạo ra sản phẩm có hoạt tính kháng oxi hóa vừa có hoạt tính prebiotic, vừa đảm bảo giá trị cảm quan nên chúng tôi đã chọn sinh khối sợi nấm Vân chi cho nghiên cứu ứng dụng chế biến thực phẩm.

3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung

Kết quả thực nghiệm cho thấy sinh khối sợi nấm *T. versicolor* và *C. militaris* đều là các nguyên liệu có tiềm năng ứng dụng chế biến các sản phẩm thực phẩm giàu hoạt tính prebiotic hoặc synbiotic. Sinh khối sợi nấm cà 2 chủng có thể ứng dụng làm bột dinh dưỡng sử dụng trực tiếp hoặc bổ sung vào các sản phẩm lên men nhằm kích thích sự sinh trưởng của lợi khuẩn, hoặc bổ sung vào các sản phẩm bánh kẹo, bột ngũ cốc để tăng hoạt tính prebiotic của sản phẩm. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài chúng tôi chọn sinh khối *T. versicolor* để ứng dụng chế biến nước nấm lên men vì trước hết, về mặt sản xuất, các chủng *C. militaris* thường có nhược điểm dễ bị thoái hóa giống qua các chu kỳ nuôi cấy, gây khó khăn cho việc duy trì chất lượng đồng đều [199,200]. Bên cạnh đó, *T. versicolor* có tính ổn định cao và khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ thuận lợi hơn, giúp tối ưu hóa chi phí, giảm thiểu rủi ro nhiễm chéo và dễ dàng kiểm soát khi mở rộng quy mô lên men công nghiệp. Về mặt giá trị sinh học, phân đoạn PS thu nhận từ *T. versicolor* thể hiện năng lực chống oxy hóa mạnh mẽ hơn so với *C. militaris* trong cùng hệ điều kiện. Vì vậy, sợi nấm *T. versicolor* được chọn làm nghiên cứu ứng dụng bổ sung vào quy trình chế biến nước nấm bào ngư lên men trong nghiên cứu này.

3.3.1. Đánh giá an toàn bột sợi nấm

Sinh khối sợi nấm khô được bảo quản trong túi PE và gửi mẫu phân tích an toàn kim loại nặng, vi sinh vật, độc tố nấm tại Quatest 2, kết quả được thể hiện ở **Bảng 3.11.**

Bảng 3.11. Kết quả thử nghiệm các chỉ tiêu an toàn sinh học hệ sợi nấm

TT	Tên tiêu chí	Đơn vị tính	Phương pháp thử	Kết quả thử nghiệm	Giới hạn tối đa cho phép
1	Pb	mg/kg	AOAC 999.11	0,13	5
2	Cd	mg/kg	AOAC 999.11	0,11	3

3	Hg	mg/kg	AOAC971.21	KPH (MDL=0,01)	0,1
4	As	mg/kg	AOAC986.15	KPH (MDL=0,01)	2
5	Aflatoxin tổng (B1, B2, G1, G2)	µg/kg	AOAC991.31	KPH (MDL=1,0)	10
6	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/g	TCVN4884-1:2015	KPH (<10)	10
7	Colifoms	CFU/g	TCVN 6848:2007	KPH (<10)	10
8	Tổng số bào tử nấm men nấm mốc	CFU/g	TCVN8275-2:2020	KPH (<10)	10
9	*Salmonella*	CFU/g	TCVN 10780-1:2017	Âm tính/25g	Không phát hiện

Kết quả phân tích an toàn vi sinh và kim loại nặng bột nấm cho thấy kim loại nặng, Coliform, nấm men, nấm mốc, *Salmonella*, độc tố aflatoxin tổng số, đều thấp hơn giới hạn cho phép theo quy định của QCVN 8-3: 2012/BYT, QCVN 8-2:2011/BYT, QCVN 8-1:2011/BYT về giới hạn ô nhiễm vi sinh vật, kim loại nặng, độc tố vi nấm trong thực phẩm. Như vậy, sản phẩm sợi nấm đảm bảo tiêu chuẩn về an toàn vi sinh, hóa học để làm thực phẩm hoặc bổ sung vào chế biến các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng bột sợi nấm bổ sung đến chất lượng nước lên men từ nấm Bào ngư

Phát triển đồ uống lên men lactic từ nấm Bào ngư là một hướng tiếp cận tiềm năng nhằm đa dạng hóa chuỗi giá trị của các loại nấm quả thể thương mại tại Việt Nam. Đồng thời, hướng đi này cũng góp phần tạo ra các dòng sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng mới, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng trong việc bảo vệ và nâng cao sức khỏe. Trong phạm vi đề tài, nghiên cứu đã tiến hành thử nghiệm sử dụng chủng *L. plantarum* lên men lactic dịch chiết quả thể nấm Bào ngư tím và bổ sung sinh khối sợi nấm *T. versicolor* như một nguyên liệu làm tăng hoạt tính prebiotic và hoạt tính kháng oxi hóa, kháng khuẩn của sản phẩm, bên cạnh đó chủng *L. plantarum* cũng là chủng lợi khuẩn phổ biến, thương mại rộng rãi, khả năng ứng dụng trong thực phẩm và các nguồn nguyên liệu rất đa dạng như thực vật, sữa nên cũng được chọn làm chủng probiotic ứng dụng trong nghiên cứu chế biến.

3.3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến hoạt tính kháng oxi hóa của đồ uống lên men

Hoạt tính kháng oxi hóa là một chỉ tiêu đánh giá không thể thiếu đối với các sản

phẩm đồ uống định hướng chức năng. Các hợp chất Kháng oxi hóa đóng vai trò phòng chống và ngăn chặn sự tổn hại của tế bào thông qua việc kiểm soát quá trình oxi hóa. Chúng có khả năng kìm hãm, trung hòa hoặc loại bỏ các gốc tự do như superoxide, hydroxyl, hydrogen peroxide và alkoxy trong cơ thể [201,202]. Xuất phát từ mục tiêu phát triển các dòng sản phẩm mang lại lợi ích bảo vệ sức khỏe, việc đánh giá hoạt tính oxi hóa trong thực phẩm có ý nghĩa quan trọng. Trong nghiên cứu này, khả năng trung hoà gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ của dịch chiết nấm bào ngư lên men được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* được trình bày tại **Bảng 3.12.**

Bảng 3.12. Khả năng trung hoà gốc tự do $ABTS^{+}$ của dịch chiết nấm Bào ngư bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* lên men (%)

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	$25,98 \pm 0,51^{f}$	$26,05 \pm 0,31^{f}$	$25,63 \pm 0,53^{f}$	$25,46 \pm 0,51^{f}$
CT2	$35,52 \pm 0,88^{e}$	$34,44 \pm 0,86^{e}$	$33,48 \pm 0,59^{e}$	$32,45 \pm 0,71^{e}$
CT3	$40,34 \pm 0,89^{d}$	$39,39 \pm 0,89^{d}$	$37,83 \pm 0,46^{d}$	$37,66 \pm 0,47^{d}$
CT4	$46,49 \pm 0,81^{c}$	$48,6 \pm 0,86^{c}$	$44,43 \pm 1,25^{c}$	$43,27 \pm 0,42^{c}$
CT5	$54,43 \pm 1,38^{b}$	$54,83 \pm 1,07^{b}$	$47,07 \pm 0,56^{b}$	$46,90 \pm 0,38^{b}$
CT6	$59,69 \pm 0,38^{a}$	$58,13 \pm 2,42^{a}$	$49,63 \pm 1,01^{a}$	$48,44 \pm 0,21^{a}$

Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% (v/v) hệ sợi nấm T. versicolor.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng kháng oxi hoá tăng tỉ lệ thuận với tỉ lệ hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư. Cụ thể, so sánh giữa CT1 và CT6, khả năng này lần lượt tăng từ 25,98 ± 0,51% lên 59,69 ± 0,38% khi vừa mới bổ sung hệ sợi nấm; từ 26,05 ± 0,31% lên 58,13 ± 2,42% sau 12 giờ; từ 25,63 ± 0,53% lên 49,63 ± 1,01% sau 24 giờ; và từ 25,46 ± 0,51% lên 48,44 ± 0,21% sau 48 giờ lên men. Tuy nhiên, khả năng kháng oxi hóa lại có xu hướng giảm dần theo thời gian lên men. Cụ thể, mức giảm này diễn ra từ 35,52 ± 0,88% xuống 32,45 ± 0,71% ở CT2; 40,34 ± 0,89% xuống 37,66 ± 0,47% ở CT3; 46,49 ± 0,81% xuống 43,27 ± 0,42% ở CT4; 54,43 ± 1,38% xuống 46,90 ± 0,38% ở CT5; và 59,69 ± 0,38% xuống 48,44 ± 0,21% ở CT6.

Sự suy giảm khả năng kháng oxi hoá ở các nghiệm thức khi kéo dài thời gian lên men có thể được giải thích là do sự phân hủy của một số hợp chất hữu cơ có hoạt tính sinh học theo thời gian hoặc sự bay hơi của một lượng nhỏ acid hữu cơ hoặc có thể là do vi khuẩn đã sử dụng các nguồn PS hoà tan trong dịch chiết làm nguồn dinh dưỡng cho quá trình sinh trưởng và phát triển của chúng.

Huaiqian-Dou đã báo cáo rằng, polysaccharopeptide (PSP) được xác định là thành phần hoạt tính sinh học chính, có thể thu được từ sợi nấm hoặc dịch lên men của *Trametes versicolor*. Trong đó hàm lượng polysaccharide và peptide lần lượt chiếm khoảng 60% và 10 – 30%. Các monosaccharide chủ yếu được tìm thấy trong PSP bao gồm glucose, mannose và một lượng nhỏ galactose, xylose và fucose. Trong đó β-glucan là một trong những thành phần được xác định có chức năng điều hòa miễn dịch [17,18]. Bên cạnh đó, nấm bào ngư cũng được chứng minh là nguồn thực phẩm rất giàu PS có hoạt tính sinh học [203]. Quá trình sử dụng PSs của hệ vi khuẩn đường ruột đã sản xuất ra các acid béo chuỗi ngắn (SCFA) có tác dụng ức chế stress oxi hóa và kháng viêm và tăng cường hệ miễn dịch [204,205]. Vì vậy, điều này giải thích cho khả năng kháng oxi hoá cao của dịch chiết nấm bào ngư khi được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* trong nghiên cứu này.

3.3.2.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ bổ sung sinh khối sợi nấm đến khả năng sinh trưởng của lợi khuẩn

Lợi khuẩn, hay còn được gọi là probiotic là các vi sinh vật sống khi bổ sung thức ăn có tác dụng có lợi cho vật chủ bằng cách cải thiện sự cân bằng vi khuẩn đường ruột [206]. Prebiotic là thành phần thực phẩm không tiêu hóa và có lợi cho vật chủ bằng cách kích thích chọn lọc sự phát triển và hoạt động của một số lượng giới hạn các loài vi khuẩn cư trú trong ruột già và có tác dụng cải thiện sức khỏe của vật chủ [207]. Ở ruột già, số lượng Lactobacillus chỉ bằng khoảng 1% so với Bifidobacterium, và ảnh hưởng đến môi trường ruột cũng ít hơn so với *Bifidobacterium* [208]. Trong nghiên cứu này, hệ sợi nấm *T. versicolor* (tỉ lệ từ 0,2% đến 1%) như nguồn prebiotic để bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư nhằm đánh giá sự kích thích tăng trưởng đối với lợi khuẩn *L. plantarum* sau 12 giờ, 24 giờ và 48 giờ lên men. Kết quả nghiên cứu được trình bày tại **Bảng 3.13.**

Bảng 3.13. Mật độ vi khuẩn *L. plantarum* trong nước nấm bào ngư lên men (logCFU/mL)

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	8,38 ± 0,04^{a}	10,90 ± 0,04^{d}	10,99 ± 0,12^{b}	10,97 ± 0,09^{c}
CT2	8,38 ± 0,06^{a}	11,19 ± 0,13^{c}	11,40 ± 0,15^{a}	11,21 ± 0,24^{b}
CT3	8,39 ± 0,01^{a}	11,21 ± 0,12^{c}	11,51 ± 0,18^{a}	11,50 ± 0,12^{a}
CT4	8,38 ± 0,03^{a}	11,50 ± 0,16^{a}	11,55 ± 0,17^{a}	11,51 ± 0,16^{a}
CT5	8,36 ± 0,02^{a}	11,41 ± 0,23^{ab}	11,52 ± 0,19^{a}	11,38 ± 0,15^{a}
CT6	8,36 ± 0,05^{a}	11,28 ± 0,26^{bc}	11,56 ± 0,12^{a}	11,46 ± 0,17^{a}

Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% (v/v) hệ sợi nấm T. versicolor.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, sau 12 giờ lên men, mật độ vi khuẩn ở tất cả các công thức thí nghiệm đều tăng nhanh so với ban đầu và mật độ vi khuẩn lớn nhất được ghi nhận ở CT4, 11,50 logCFU/mL. Sau 24 giờ nuôi cấy, mật độ vi khuẩn vẫn tiếp tục tăng nhưng tốc độ tăng trưởng chậm dần, mật độ vi khuẩn lớn nhất ghi nhận được ở CT6, 11,56 logCFU/mL. Tương tự kết quả sau 12 giờ, sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê so với CT2 bổ sung ít nhất hệ sợi nấm *T. versicolor* (0,2%). Sau 48 giờ lên men, mật độ vi khuẩn bắt đầu giảm xuống so với sau 12 và 24 giờ, mật độ vi khuẩn lớn nhất ghi nhận được ở CT3 bổ sung 0,4% hệ sợi nấm. Sự tăng trưởng chậm lại sau 24 giờ lên men có thể do nguyên nhân do sự giảm xuống về hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường và vi khuẩn đã bước vào pha cân bằng, và sau 48 giờ lên men, lúc này sự sinh trưởng của vi khuẩn đang ở pha suy thoái, nồng độ các chất dinh dưỡng cạn dần dẫn đến sự suy giảm về mật độ vi khuẩn.

Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, việc bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* ở tất cả các công thức thí nghiệm đã làm tăng mật độ lợi khuẩn *L. plantarum* so với công thức thí nghiệm không bổ sung. Sau 12 giờ lên men, mật độ tế bào đạt 10,90 logCFU/mL ở công thức thí nghiệm không bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* (CT1), và khi bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* từ 0,2 – 1% thì mật độ vi khuẩn tăng lên từ 11,19 – 11,50 logCFU/mL. Tương tự, sau 24 giờ lên men, mật độ vi khuẩn từ 10,99 logCFU/mL ở CT1 tăng lên từ 11,40– 11,56 logCFU/mL. Sau 48 giờ lên men, mật độ vi khuẩn từ 10,97 logCFU/mL ở CT1 tăng lên từ 11,21 – 11,51 logCFU/mL ở các công thức thí nghiệm được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Điều này có thể do hệ sợi nấm *T. versicolor* và dịch chiết nấm Bào ngư có chứa hàm lượng PS hoà tan cao nên đã góp phần kích thích sự sinh trưởng trưởng của vi khuẩn *L. plantarum*

thông qua sự sử dụng PS làm nguồn thức ăn trong quá trình lên men, cũng như các hoạt tính sinh học của sợi nấm tạo ra môi trường thuận lợi, ức chế hại khuẩn, giúp các lợi khuẩn sinh trưởng, phát triển nhanh hơn.

Điều này được báo cáo trong nghiên cứu của Robert-Hutkins, đó là việc bổ sung prebiotic góp phần làm tăng cường sự tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus* và *Bifidobacterium*, đồng thời là tác nhân làm giảm sự đa dạng của hệ vi khuẩn trong ruột già [209].

Chủng lợi khuẩn khác nhau thì nhu cầu và hiệu quả sử dụng nguồn prebiotic cũng không giống nhau. Điều này được nghiên cứu của Nieves-Corzo báo cáo rằng, việc bổ sung prebiotic lactulose đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể quần thể *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, và hàm lượng lactulose giảm khoảng 40% được quan sát thấy trong suốt quá trình lên men. Tuy nhiên, sự phát triển của *S. thermophilus* không bị ảnh hưởng khi có sự bổ sung của lactulose. Trong khi đó. sự bổ sung các prebiotic như GOS hoặc FOS vào quá trình lên men không có tác động đáng kể đến quần thể *S. thermophilus* và *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, hai chủng vi khuẩn thường kích thích sự phát triển của nhau thông qua trao đổi chất chuyển hóa thông qua một quá trình được gọi là hợp tác nguyên thủy. Đồng thời, fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) không được chuyển hóa bởi vi khuẩn acid lactic trong sữa chua [210].Chủng lợi khuẩn khác nhau thì nhu cầu và hiệu quả sử dụng nguồn prebiotic cũng không giống nhau. Điều này được nghiên cứu của Nieves-Corzo báo cáo rằng, việc bổ sung prebiotic lactulose đã dẫn đến sự gia tăng đáng kể quần thể *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, và hàm lượng lactulose giảm khoảng 40% được quan sát thấy trong suốt quá trình lên men. Tuy nhiên, sự phát triển của *S. thermophilus* không bị ảnh hưởng khi có sự bổ sung của lactulose. Trong khi đó. sự bổ sung các prebiotic như GOS hoặc FOS vào quá trình lên men không có tác động đáng kể đến quần thể *S. thermophilus* và *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, hai chủng vi khuẩn thường kích thích sự phát triển của nhau thông qua trao đổi chất chuyển hóa thông qua một quá trình được gọi là hợp tác nguyên thủy. Đồng thời, fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) không được chuyển hóa bởi vi khuẩn acid lactic trong sữa chua [210].

Polysaccharide chiết xuất từ nấm *T. versicolor* và *Pleurotus* spp. đã được chứng minh là có hoạt tính prebiotic bằng cách kích thích sự phát triển của các chủng vi khuẩn lactic như *L. acidophilus* và *L. plantarum* tương tự các chế phẩm sinh học thương mại như inulin và fructo-oligosacarit. Trong nghiên cứu này, mật độ vi khuẩn ở các mẫu bổ sung 0,8% và 1% sinh khối sợi nấm thấp hơn so với mẫu bổ sung 0,6%. Kết quả này

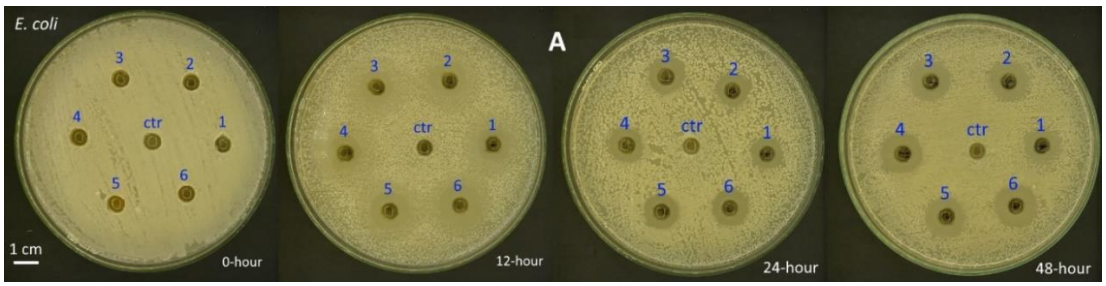
tương đồng với nghiên cứu của Mustafa Yamaç (2022), đó là mật độ vi khuẩn ghi nhận lớn nhất khi bổ sung 0,25% polysaccharide chiết xuất từ một số loại nấm ăn và dược liệu; khi tiếp tục tăng tỉ lệ polysacchride thì mật độ vi khuẩn bắt đầu có sự suy giảm [211].

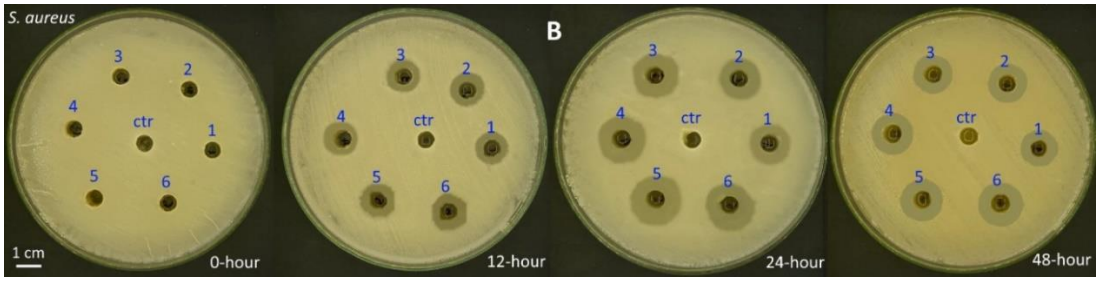
3.3.2.3. Ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn

Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* là những chủng vi sinh vật gây bệnh đường ruột, chúng thường gây ngộ độc, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy. Việc sử dụng các sản phẩm nước uống lên men không những mang lại những lợi ích tốt cho sức khoẻ mà còn giúp ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn gây bệnh này [212].

Đối với vi khuẩn *E. coli*, kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng ức chế sự sinh trưởng tăng lên khi tăng tỉ lệ bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor*. Đường kính vùng ức chế tăng lên từ 6,53 mm ở CT1 (không bổ sung hệ sợi nấm) đến 11,71 mm ở CT6 (bổ sung 1% hệ sợi nấm) sau 12 giờ; tăng từ 8,80 mm ở CT1 đến 10,97 mm ở CT6 sau 24 giờ; và tăng từ 6,95 mm ở CT1 đến 13,42 mm ở CT6 sau 48 giờ lên men. Tuy nhiên, khả năng ức chế không phải lúc nào cũng tỉ lệ thuận với thời gian lên men, ở CT1 khi thời gian lên men tăng từ 24 lên 48 giờ và ở CT6 khi thời gian lên men từ 12 lên 24 giờ khả năng ức chế giảm nhẹ (**Hình 3.21A**).

Đối với vi khuẩn *S. aureus*, nhìn chung, vùng ức chế sự sinh trưởng cũng tăng lên cùng với tỉ lệ tăng của hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào. Tuy nhiên, đường kính vùng ức chế sinh trưởng không giống nhau ở các thời gian lên men. Trong đó, dịch chiết nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm sau 24 giờ lên men ghi nhận có khả năng ức chế sinh trưởng đáng kể đến vi khuẩn *S. aureus*, tăng lên từ 7,55 mm ở CT1 sau 12 giờ lên đến 11,77 mm sau 24 giờ; từ 8,31 – 11,76 mm ở CT2; từ 7,81 – 13,97 mm ở CT3; từ 8,02 – 15,31 mm ở CT4; từ 8,62 – 16,13 mm ở CT5; và từ 9,41 –16,65 mm ở CT6 (**Hình 3.21B**).





Hình 3.21. Khả năng kháng khuẩn của đồ uống lên men đối với *E. coli* ATCC 85922 (A) và *S. aureus* ATCC 25023 (B)

Trong đó, ctr là mẫu đối chứng (không bổ sung hệ sợi nấm T. versicolor và chủng L. plantarum), các mẫu 1, 2, 3, 4, 5 và 6 lần lượt được bổ sung 0%; 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8% và 1,0% (v/v) hệ sợi nấm T. versicolor.

Nguyễn Thị Thơ (2024) đã báo cáo rằng, hàm lượng polysaccharids trong quả thể nấm *T. versicolor* khô (thu hoạch chính vụ) chiếm đến 13,4%. Dịch chiết từ quả thể nấm *T. versicolor* có khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn *S. aureus, Samonella* sp., *Shigella* sp. và *E. coli* ở mức trung bình (đường kính vùng ức chế trong khoảng 7,5 – 15 mm). Trong đó, đường kính vùng ức chế đối với *E. coli* và *S. aureus* lần lượt là 13 mm và 11,3 mm khi chiết bằng dung môi ethanol; và 12,43 mm và 6,67 mm khi chiết bằng dung môi metanol [213].

Nghiên cứu của Şule-İnci (2022) đã chỉ ra rằng, chiết xuất methanol của *Trametes versicolor* đã ức chế sự phát triển của *E. coli* và *S. aureus* với vùng ức chế là 15,66 mm, còn đối với các vi khuẩn như *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. megaterium*, *C. albicans*, và *Tricophyton* sp. thì vùng ức chế nằm trong khoảng 11,66 – 26,76 mm. Trong khi đó, chiết xuất ethanol của *T. versicolor* đã ức chế sự phát triển của *E. coli* và *S. aureus* với vùng ức chế lần lượt là 12,33 mm và 10,23 mm, còn đối với các vi khuẩn còn lại thì vùng ức chế nằm trong khoảng 10,23 – 24,74 mm [134].

Nghiên cứu của Raushan-Blieva (2022) về đánh giá tiềm năng kháng oxi hóa và kháng khuẩn của dịch chiết nước hệ sợi nấm *Trametes versicolor* bằng phương pháp nuôi cấy chìm cho thấy, vùng ức chế sinh trưởng đối với vi khuẩn gram âm *E. coli* ATCC 25922 là 7 mm, và đối với các chủng vi khuẩn gram dương như *S. aureus* FDA209P, *S. aureus* INA 00761 và *S. aureus* INA 00762 lần lượt là 15, 12, và 6 mm sau 21 ngày nuôi cấy. Còn đối với các chủng vi khuẩn khác như *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Rhodococcus rhodochrous* ATCC 13808, *Leuconostoc mesenteroides* VKPM B-

4177, *Micrococcus luteus* NCTC 8340, và *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 thì vùng ức chế nằm trong khoảng 5 – 26 mm [214].

Nghiên cứu của Prince-Chawla (2020) báo cáo rằng, đường kính vùng ức chế sinh trưởng đối với các hại khuẩn của chiết xuất metanol quả thể nấm *T. versicolor* nằm trong khoảng 24,14 - 30,18 mm. Trong đó, vùng ức chế cao hơn đáng kể được ghi nhận đối với *S. aureus* (29,14 mm), trong khi đối với *E. coli, K. pneumonia* và *P. aeruginosa* xấp xỉ 24,35 mm [215].

Trong nghiên cứu này, khả năng ức chế của dịch nấm bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* ở cùng thời gian lên men đối với *S. aureus* cao hơn so với *E. coli*. Hiện tượng này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Prince-Chawla (2020) và Silva (2010), khả năng nhạy cảm của dịch chiết hệ sợi nấm *T. versicolor* đối với vi khuẩn gram dương như *S. aureus* cao hơn đáng kể do chúng không có periplasm liên kết màng trong màng tế bào bao gồm peptidoglycan như acid teichoic hoặc teichuronic. Ngoài ra, thành tế bào bên ngoài của *S. aureus* tạo thành một cấu trúc xốp kỵ nước dày có thể liên kết với một số lượng lớn protein và lipid làm tăng tính thấm của các tác nhân hóa trị liệu và peptidoglycan có nguồn gốc từ nấm [216]. Ngược lại, màng ngoài của các vi khuẩn gram âm như *E. coli* có chứa lipopolysaccharide hoạt động như một rào cản thấm hiệu quả đối với các thành phần hoạt tính sinh học có nguồn gốc nấm; do đó, chúng ít nhạy cảm hơn đối với các vi khuẩn gram âm này [215].

Như vậy, khi so sánh kết quả thu được với các nghiên cứu trước đây cho thấy có sự khác biệt. Sự khác nhau này có thể tùy thuộc vào loài hại khuẩn được thử nghiệm, nguồn vật liệu nấm *T. versicolor* ban đầu (quả thể hoặc là hệ sợi nấm), thời gian thí nghiệm, và quan trọng nhất là dung môi và nồng độ của chúng được dùng để chiết PS (phương pháp tách chiết).

Bảng 3.14. Đường kính vùng ức chế (mm) của đồ uống lên men đối với *E. coli* và *S. aureus* ở các thời gian lên men khác nhau

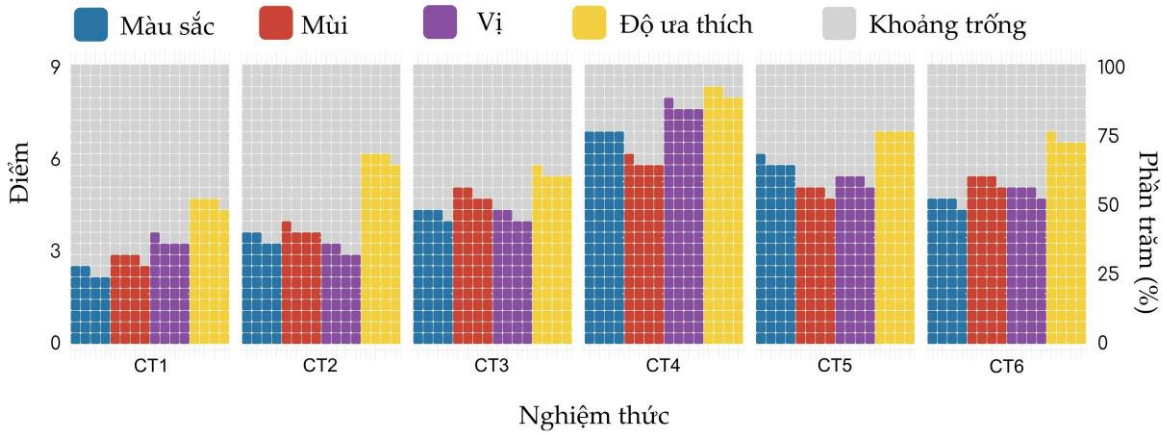
Công thức	12 giờ	24 giờ	48 giờ
	Đường kính vùng ức chế (mm)		
E. coli			
CT1	$6,53 \pm 0,44^{d}$	$8,80 \pm 0,64^{c}$	$6,95 \pm 0,77^{e}$
CT2	$7,95 \pm 0,45^{c}$	$8,98 \pm 0,29^{c}$	$9,18 \pm 0,61^{d}$
CT3	$7,78 \pm 0,37^{c}$	$10,54 \pm 0,64^{a}$	$11,07 \pm 0,37^{c}$

CT4	$8,07 \pm 0,35^{c}$	$9,58 \pm 0,38^{b}$	$12,26 \pm 0,36^{b}$
CT5	$10,39 \pm 0,70^{b}$	$10,45 \pm 0,28^{a}$	$11,88 \pm 0,52^{b}$
CT6	$11,71 \pm 0,40^{a}$	$10,97 \pm 0,56^{a}$	$13,42 \pm 0,47^{a}$
S. aureus			
CT1	$7,55 \pm 0,40^{d}$	$11,77 \pm 0,72^{d}$	$9,74 \pm 0,53^{d}$
CT2	$8,31 \pm 0,94^{bc}$	$11,76 \pm 0,62^{d}$	$11,08 \pm 1,26^{c}$
CT3	$7,81 \pm 0,44^{cd}$	$13,97 \pm 0,86^{c}$	$11,35 \pm 0,50^{c}$
CT4	$8,02 \pm 0,52^{bcd}$	$15,31 \pm 0,88^{b}$	$12,38 \pm 0,59^{b}$
CT5	$8,62 \pm 0,50^{b}$	$16,13 \pm 1,21^{ab}$	$12,55 \pm 0,70^{b}$
CT6	$9,41 \pm 0,67^{a}$	$16,65 \pm 0,74^{a}$	$13,58 \pm 0,91^{a}$

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 3 mẫu). Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Kiểm định Tukey's HSD, mức ý nghĩa P < 0,05). Các công thức CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 và CT6 tương ứng được bổ sung hệ sợi nấm T. versicolor (Nấm T. versicolor) với nồng độ lần lượt là 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% và 1,0% theo tỷ lệ thể tích/ thể tích (v/v).

3.3.2.4. Ảnh hưởng đến chất lượng cảm quan sản phẩm

Các thử nghiệm sàng lọc cho thấy thời gian lên men ngắn hơn (12 giờ) hoặc thời gian lên men dài hơn (48 giờ) dẫn đến điểm số cảm quan thấp hơn về mùi thơm, hương vị và mức độ yêu thích chung so với 24 giờ lên men. Điều này có thể là do quá trình lên men chưa hoàn tất trong vòng 12 giờ nên đồ uống trong tất cả các phương pháp xử lý thử nghiệm đều không đạt được độ acid và hương thơm cần thiết của sản phẩm lên men có nguồn gốc từ nấm. Mặc khác, việc kéo dài thời gian lên men lên 48 giờ dẫn đến tăng tổng hàm lượng acid tích lũy và giảm hàm lượng đường. Điều này khiến sản phẩm có vị quá chua, do đó làm thay đổi hương thơm của đồ uống lên men. Hiện tượng này đã được Shenxi-Chen (2021) báo cáo, thời gian lên men cực dài dẫn đến sự gia tăng LAB và sự giảm của nấm men, nguyên nhân là do sự thay đổi của các yếu tố môi trường, bao gồm hạn chế chất dinh dưỡng, nồng độ ethanol cao và giá trị pH thấp [217]. Do đó, phương pháp lên men trong 24 giờ đã được lựa chọn để đánh giá cảm quan và phân tích chất lượng.



Hình 3.22. Đánh giá cảm quan của đồ uống lên men 24 giờ từ các công thức thí nghiệm

Ghi chú: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5 và CT6 lần lượt là các công thức được bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8% và 1,0% (v/v) hệ sợi nấm T. versicolor

Kết quả cho thấy đồ uống lên men trong nghiệm thức bổ sung 0,6% sợi nấm (CT4, 0,6%) đạt điểm cảm quan cao nhất về hình thức, hương thơm, hương vị và độ hài lòng chung, lần lượt là 6,87; 5,86; 7,61 và 8,09. Trên thang đo Hedonic chín điểm, nghiệm thức không bổ sung sợi nấm (CT1, 0%) đạt điểm cảm quan thấp nhất ở cả ba tiêu chí đánh giá. Sản phẩm đồ uống lên men từ CT4 có màu vàng nhạt đồng nhất với hương thơm đặc trưng của *P. ostreatus*. Trong tất cả các phương pháp xử lý, mặc dù lượng *P. ostreatus* được thêm vào là như nhau, nhưng hàm lượng của sợi nấm *T. versicolor* lại khác nhau. Các công thức CT5 và CT6, sự tích tụ cao của tổng hàm lượng acid có thể dẫn đến mùi chua trong sản phẩm lên men lấn át mùi thơm đặc trưng của *P. ostreatus.* Trong khi đó, trong các phương pháp xử lý CT2 và CT3, lượng sợi nấm *T. versicolor* được thêm vào thấp hơn (0,2% và 0,4%), do đó mùi thơm của *P. ostreatus* vẫn mạnh, nhưng mùi thơm tổng thể thiếu hài hòa và cân bằng. CT4 cho thấy lượng sợi nấm *T. versicolor* được thêm vào đã tạo ra một quá trình lên men cân bằng. Các hợp chất được tạo ra trong quá trình lên men chiết xuất *P. ostreatus* có thêm sợi nấm *T. versicolor* có thể đã tương tác và kết hợp để tạo ra mùi thơm dễ chịu và hài hòa.

3.3.2.5. Ảnh hưởng đến sự thay đổi pH và hàm lượng acid tổng số (TAN)

Sự thay đổi pH là một trong những thông số quan trọng trong việc theo dõi và đánh giá hiệu quả của quá trình lên men. pH là chỉ số quan trọng để đánh giá các đặc tính của thực phẩm lên men bằng vi khuẩn lactic. Sự bổ sung các prebiotic được chứng minh là có tác dụng là tăng nồng độ acid amin và gia tăng đáng kể đến quần xã hệ vi khuẩn trong

quá trình lên men, đặc biệt là số lượng vi khuẩn Lactobacilli [218]. Các prebiotic như GOS và FOS có tác dụng duy trì sự sinh trưởng của các lợi khuẩn như *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, làm tăng cường hiệu quả của quá trình lên men [210].

Bảng 3.15. Sự thay đổi pH của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men

Công thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	5,62 ± 0,17	3,40 ± 0,14^{a}	3,19 ± 0,03^{a}	3,06 ± 0,02^{b}
CT2	5,28 ± 0,27	3,35 ± 0,05^{b}	3,15 ± 0,06^{b}	3,05 ± 0,01^{c}
CT3	5,10 ± 0,12	3,34 ± 0,02^{b}	3,14 ± 0,03^{c}	3,04 ± 0,05^{c}
CT4	4,89 ± 0,13	3,32 ± 0,02^{c}	3,14 ± 0,05^{c}	3,05 ± 0,04^{b}
CT5	4,90 ± 0,07	3,33 ± 0,02b^{c}	3,15 ± 0,03^{b}	3,07 ± 0,03^{a}
CT6	4,72 ± 0,09	3,33 ± 0,03^{bc}	3,16 ± 0,05^{b}	3,07 ± 0,02^{a}

Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% (v/v) hệ sợi nấm *T. versicolor*.

Việc duy trì pH thấp (pH < 4,6) trong quá trình lên men thực phẩm là điều cần thiết và quan trọng để tạo điều kiện cho sự phát triển vi khuẩn lactic, ngăn ngừa sự phát triển của các vi sinh vật không mong muốn như vi khuẩn gây bệnh, nấm mốc và nấm men, đảm bảo an toàn thực phẩm về vi sinh vật [219].

Trong nghiên cứu này, sau 48h lên men, pH đo được ở công thức đối chứng thấp hơn có ý nghĩa (CT1; 3,057) so với công thức bổ sung 0,8% (CT5; 3,071) và 1% (CT6; 3,073) hệ sợi nấm (P < 0,05). Xiqing-Yue cho rằng, việc bổ sung prebiotic vào quá trình lên men lactic có thể làm giảm pH, gây ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây hại và giảm sự tích lũy quá trình tạo ra các hợp chất nitrit, một trong những tác nhân gây ung thư dạ dày [220]. Tuy nhiên, Nieves-Corzo cho rằng, việc bổ sung prebiotic vào quá trình sản xuất các sản phẩm lên men không có tác động đáng kể đến sự tạo thành các acid lactic. Thay vào đó, pH của sản phẩm được kiểm soát bởi nhiều loại acid hữu cơ được tạo ta trong quá trình lên men [210]. Sự sinh trưởng của vi sinh vật trong quá trình lên men trải qua 4 giai đoạn, sự tạo thành các acid hữu cơ có tác dụng điều khiển đến độ

acid của môi trường nuôi cấy cũng vì vậy sẽ biến động theo sư phát triển của hệ vi sinh vật. Theo thời gian lên men, pH đo được dần dần sẽ ổn định ít thay đổi hơn khi vi sinh vật bước vào giai đoạn suy thoái do sự cạn kiệt về nguồn chất dinh dưỡng (chủ yếu là đường) có trong môi trường nuôi cấy [221].

Các carbohydrate như chitin, cellulose, α- và β-glucans, mannans, xylans và galactans có trong nấm là một nguồn prebiotic có khả năng kích thích sự phát triển và hoạt động của vi khuẩn lactic trong quá trình lên men. Ảnh hưởng của tỉ lệ hệ sợi nấm *T. versicolor* được bổ sung vào dịch chiết nấm Bào ngư đến hàm lượng acid tổng số thu nhận được trong quá trình lên men thể hiện ở **Bảng 3.16.** Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng acid tổng số tăng lên tỉ lệ thuận với tỉ lệ hệ sợi nấm được bổ sung và thời gian lên men.

Bảng 3.16. Sự thay đổi hàm lượng acid tổng số (tính theo acid lactic) của dịch chiết nấm Bào ngư được bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* theo thời gian lên men

Nghiệm thức	Thời gian lên men			
	Ban đầu	12 giờ	24 giờ	48 giờ
CT1	$1,362 \pm 0,074^{f}$	$3,702 \pm 0,118^{f}$	$6,611 \pm 0,101^{f}$	$8,026 \pm 0,059^{f}$
CT2	$1,437 \pm 0,026^{e}$	$4,244 \pm 0,128^{e}$	$7,218 \pm 0,100^{e}$	$9,158 \pm 0,132^{e}$
CT3	$1,606 \pm 0,030^{d}$	$5,466 \pm 0,049^{d}$	$7,435 \pm 0,041^{d}$	$9,442 \pm 0,099^{d}$
CT4	$1,744 \pm 0,028^{c}$	$5,782 \pm 0,034^{c}$	$7,825 \pm 0,071^{c}$	$9,769 \pm 0,045^{c}$
CT5	$1,875 \pm 0,043^{b}$	$6,017 \pm 0,089^{b}$	$8,16 \pm 0,059^{b}$	$10,362 \pm 0,106^{b}$
CT6	$2,021 \pm 0,036^{a}$	$6,617 \pm 0,027^{a}$	$8,643 \pm 0,033^{a}$	$10,678 \pm 0,027^{a}$

Ghi chú: dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (n = 15). Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, P < 0,05). CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, và CT6 là các nghiệm thức lần lượt bổ sung 0%, 0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0% (v/v) hệ sợi nấm T. versicolor.

Sau 12h lên men, so với công thức đối chứng (CT1, không bổ sung hệ sợi nấm), ngoại trừ CT2 (bổ sung 0,2% hệ sợi nấm), hàm lượng acid tổng số tăng lên ở các công thức còn lại đều hơn 1 g/L. Sau 24 giờ, ngoại trừ CT2 và CT3, xu hướng này lặp lại ở CT4, CT5 và CT6, và sau 48 giờ xu hướng này xảy ra ở tất cả các công thức thí nghiệm. Hàm lượng acid tổng số lớn nhất ghi nhận được đều ở CT6 (bổ sung 1,0% hệ sợi nấm), lần lượt là 6,615; 8,640; và 10,680 g/L sau 12; 24; và 48 giờ lên men.

Tuy nhiên, sau 48 giờ lên men, hàm lượng acid tổng số thu nhận được CT6 (1% hệ sợi nấm *T. versicolor*) không khác nhau có ý nghĩa thống kê so với CT5 (0,8% hệ sợi nấm *T. versicolor*). Kết quả này cho thấy, tỉ lệ hệ sợi nấm được bổ sung càng cao và thời gian lên men càng lâu thì càng tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng của vi khuẩn lên men lactic, dẫn đến tăng hàm lượng acid tổng số trong các công thức thí nghiệm.

Nieves-Corzo cho rằng, quá trình trao đổi chất của vi khuẩn acid lactic trong quá trình lên men tạo ra chủ yếu là acid lactic, bên cạnh đó là acid acetic và một số acid hữu cơ khác với hàm lượng rất nhỏ. Sự gia tăng đáng kể về hàm lượng acid lactic đi kèm với sự giảm của độ pH. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, các prebiotic như GOS và FOS hầu như không được vi khuẩn acid lactic chuyển hóa trong quá trình lên men, thay vào đó là đường lactose được chúng sử dụng hiệu quả như một nguồn cung cấp carbon. Tuy nhiên, việc bổ sung prebiotic như lactulose (với nồng độ 2% và 4%) lại làm tăng tốc độ của quá trình lên men [210].

3.3.2.6. Đánh giá an toàn sản phẩm nước nấm lên men có bổ sung sợi nấm

Sản phẩm nước nấm bào ngư lên men bổ sung 0,6% bột sợi nấm vân chi được đóng vào chai thủy tinh 110mL thanh trùng ở 75ºC, gửi mẫu phân tích chất lượng an toàn tại Quatest 2. Kết quả phân tích được thể hiện ở **Bảng 3.17.**

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá an toàn vi sinh và hoá học sản phẩm nước lên men

TT	Tên chỉ tiêu	Giới hạn cho phép (TCVN 13368:2021)	Hàm lượng trong sản phẩm	Phương pháp thử
1	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	100 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 4884-1:2015
2	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	10 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 8275-1:2010
3	*Coliforms*	10 (CFU/ml)	KPH (<1)	TCVN 6848:2007
4	*E. coli*	không được có	KPH (<1)	TCVN 7924-2:2008
5	Staphylococci có phản ứng dương tính với	không được có	KPH (<1)	ISO 6888-1:2021

	Coagulase (*S. aureus* và các loài khác)			
6	*Cl. perfringens*	không được có	KPH (<1)	TCVN 4991:2005
7	Cadmi (Cd)	1 (mg/kg)	<0,05	AOAC 999.11
8	Chì (Pb)	0,05 (mg/kg)	<0,05	AOAC 999.11
9	Thủy Ngân (Hg)	0,05 (mg/kg)	<0,05	AOAC 971.21

Kết quả phân tích chất lượng vi sinh và hoá học của sản phẩm nước uống lên men có bổ sung hệ sợi nấm *T. versicolor* cho thấy, không phát hiện tổng số vi sinh vật hiếu khí, bào tử nấm men, nấm mốc, *Coliform, E. coli,* Staphylococci có phản ứng dương tính với Coagulase, *Cl. perfringens*. Hàm lượng các kim loại nặng như Cd, Pb, Hg đều nằm thấp hơn giới hạn cho phép được quy định trong Quy chuẩn kĩ thuật quốc gia QCVN 20-1: 2024/BYT đối với giới hạn các chất ô nhiễm trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe. Như vậy, sản phẩm nước nấm lên men bằng chủng vi khuẩn *L. plantarum* đảm bảo được an toàn chất lượng về mặt vi sinh và hóa học.

Bổ sung sinh khối sợi nấm vân chi vào hỗ trợ lên men lactic dịch nấm bào ngư bằng chủng *L. plantarum* cho thấy sản phẩm nước nấm thành phẩm tăng hoạt tính kháng oxi hóa, kháng kháng khuẩn và tăng mật độ lợi khuẩn mà cũng đảm bảo giá trị cảm quan so với các nghiệm thức khác. Ở nồng độ 0,6% sợi nấm bổ sung cho kết quả tốt nhất khi kết hợp các yêu cầu đặt ra và được đánh giá an toàn chất lượng, đảm bảo tiêu chuẩn của thực phẩm hỗ trợ sức khỏe. Điều này cho thấy sự hỗ trợ mạnh mẽ của sinh khối sợi nấm trong quá trình lên men lactic nước nấm bào ngư để nâng cao chất lượng sản phẩm. Kết quả nghiên cứu cũng góp phần tạo ra sản phẩm lên men mới từ nấm, giàu hoạt tính sinh học, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của người tiêu dùng cũng như đóng góp vào sự đa dạng các sản phẩm sau thu hoạch ngành nấm trong nước.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

A. KẾT LUẬN

Luận án đã hoàn thành các mục tiêu nghiên cứu đề ra, tập trung vào việc đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* của polysaccharide thu nhận từ sinh khối hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể, bao gồm hoạt tính prebiotic, khả năng kháng oxi hóa, và định hướng ứng dụng vào sản phẩm thực phẩm. Từ các kết quả đạt được, có thể rút ra những kết luận chính như sau:

- Xác định được một số điều kiện tối ưu quan trọng cho nuôi cấy dịch thể nhằm thu sinh khối với hiệu suất cao và giàu polysaccharide.

• Đối với *Cordyceps militaris*: Điều kiện tối ưu là pH 5,05; nồng độ glucose 40 g/L và cao nấm men 5,07 g/L. Tại điều kiện này, năng suất sinh khối khô đạt 8,90 ± 0,25 g/L và hàm lượng PS đạt 5,28± 0,16%.

• Đối với *Trametes versicolor*: Điều kiện tối ưu là pH 5,545; nồng độ glucose 20,65 g/L và cao nấm men 2,0354 g/L. Tại điều kiện này, năng suất sinh khối khô đạt 3,59 ± 0,12 g/L và hàm lượng PS đạt 8,23 ± 0,27%.

- Đánh giá hiệu quả chiết, đặc điểm cấu trúc bề mặt và hoạt tính sinh học của các chiết xuất Polysaccharide

• Về hiệu suất chiết: Dung môi nước đã chứng minh cho hiệu suất thu hồi polysaccharide cao ở cả hai chủng (81,35 mg/g với *C. militaris* và 71,53 mg/g với *T. versicolor*), việc chiết trình tự tiếp tục thu được các PS trong kiềm và acid với các hoạt tính kháng oxi hóa và hoạt tính prebiotic đặc trưng.

• Về hình thái bề mặt: Điều kiện chiết có ảnh hưởng lớn đến cấu trúc bề mặt. Trong khi phân đoạn chiết nước và kiềm có dạng khối kết tụ, phân đoạn chiết acid (A-PST) và kiềm (S-PST) của nấm *T. versicolor* thể hiện cấu trúc nén chặt hoặc hạt mịn đặc thù.

• Khả năng trung hoà gốc tự do ABTS: Các phân đoạn PS đều thể hiện khả năng trung hòa gốc tự do ABTS. PS từ *T. versicolor* cho hoạt tính mạnh hơn (IC_{50} từ 1070 – 1279 µg/mL) so với *C. militaris* (IC_{50} từ 2446 – 3273 µg/mL).

• Tiềm năng Prebiotic: Các phân đoạn PS thể hiện tiềm năng prebiotic rõ rệt thông qua chỉ số PI dương và khả năng kháng thuỷ phân bởi alpha-amylase cao (mức độ thủy

phân chỉ từ 2,07 – 15,05%). Nổi bật nhất là phân đoạn W-PSC (trên chủng *L. pentosus NH1, PI = 0,857) và A-PST (*trên chủng *L. casei 01, PI = 0,935).*

• Cơ chế tác động: Việc bổ sung PS không chỉ thúc đẩy sinh trưởng của lợi khuẩn mà còn tăng cường sinh tổng hợp các acid béo chuỗi ngắn (SCFAs) và nâng cao hiệu quả ức chế các vi khuẩn gây bệnh (*E. coli, S. aureus*).

- Ứng dụng thực tiễn vào sản phẩm nước uống lên men

Đã phát triển thành công công thức chế biến nước uống từ nấm Bào ngư lên men lactic bổ sung sinh khối sợi nấm *T. versicolor.*

• Công thức tối ưu: Bổ sung 0,6% sinh khối sợi nấm, thời gian lên men 24 giờ.

• Chất lượng sản phẩm: Sản phẩm đạt giá trị cảm quan cao về màu sắc, mùi vị; đồng thời sở hữu hoạt tính sinh học tốt. Các chỉ tiêu an toàn thực phẩm (vi sinh, kim loại nặng) đều nằm trong giới hạn cho phép theo QCVN 20-1:2024/BYT.

B. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Các kết quả nghiên cứu của luận án đã được xác định có những đóng góp mới cho học thuật và thực tiễn như sau:

** Về mặt học thuật:*

- Hệ thống hóa cơ sở dữ liệu về công nghệ nuôi cấy dịch thể: đã xác lập được một số điều kiện công nghệ tối ưu cho quy trình nuôi cấy dịch thể hai chủng nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* nhằm định hướng sinh tổng hợp sinh khối giàu polysaccharide. Đây là cơ sở khoa học quan trọng để giải thích ảnh hưởng của điều kiện môi trường (pH, nguồn C, N) đến sự tích lũy sinh khối và polysaccharide trong tế bào nấm.

- Làm sáng tỏ hiệu quả của phương pháp chiết tuần tự: Chứng minh được hiệu quả của phương pháp chiết tuần tự trong việc phân tách các nhóm polysaccharide dựa trên đặc tính cấu trúc và độ tan. Đóng góp mới nằm ở việc phát hiện ra rằng phân đoạn polysaccharide chiết bằng acid (A-PS) – vốn ít được quan tâm trong các nghiên cứu trước đây – lại thể hiện hoạt tính prebiotic tiềm năng (chỉ số PI cao nhất với một số probiotic) so với các phân đoạn khác. Điều này mở ra hướng tiếp cận mới trong việc khai thác các polysaccharide liên kết chặt trong vách tế bào nấm.

- Kết quả nghiên cứu của luận án là cơ sở để tiếp tục tinh sạch, tách chiết và phát hiện ra các polysaccharide mới từ sinh khối sợi nấm với các hoạt tính kháng oxi hóa và

prebiotic đặc trưng.

- Cung cấp dự liệu về tiềm năng prebiotic của hệ sợi nấm: Cung cấp bằng chứng thực nghiệm tin cậy chứng minh hoạt tính prebiotic invitro của PS sợi nấm: kháng tiêu, có khả năng kích thích chọn lọc các chủng lợi khuẩn (*Lactobacillus, Bifidobacterium*…) và ức chế hại khuẩn (*E. coli, S. aureus*) thông qua cơ chế sinh acid béo chuỗi ngắn (acid acetic, propionic, butyric).

* Về mặt thực tiễn:

- Đề xuất giải pháp công nghệ chủ động nguồn nguyên liệu: Luận án đã chứng minh tính khả thi của việc nuôi cấy dịch thể để thu sinh khối sợi nấm, đây là phương thức tiềm năng để tạo ra nguồn nguyên liệu hữu cơ có giá trị cho thực phẩm, dược phẩm bởi tính ổn định, năng suất cao, thời gian ngắn và dễ thực hiện trong quy mô công nghiệp, dễ kiểm soát các điều kiện nuôi cấy và tự động hóa. Đây là tiền đề quan trọng để đa dạng hóa mô hình sản xuất nguyên liệu bên cạnh canh tác truyền thống thu quả thể.

- Đa dạng hóa nguồn nguyên liệu sản xuất prebiotic trên thị trường: hiện nay nguồn prebiotic trên thị trường chủ yếu được sản xuất từ thực vật (FOS, inulin), rong biển (fucoidan, carrageenan), kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng sinh khối sợi nấm cũng là nguồn prebiotic tiềm năng mà có thể chủ động điều kiện nuôi cấy để thu sản phẩm ở quy mô công nghiệp.

- Phát triển thành công dòng sản phẩm nước uống lên men probiotic, giàu hoạt tính kháng oxi hóa: nghiên cứu các điều kiện công nghệ chế biến nước uống lên men từ nấm Bào ngư bổ sung sinh khối sợi nấm *Trametes versicolor*. Sản phẩm đạt an toàn vi sinh, hoá học minh chứng cho việc ứng dụng thành công mô hình kết hợp Prebiotic (sợi nấm) và Probiotic (vi khuẩn lên men) để tạo ra thực phẩm bổ sung có giá trị gia tăng cao.

C. KIẾN NGHỊ VÀ HƯỚNG NGHIÊN CỨU TIẾP THEO

- Định lượng tạp chất, tinh chế qua cột sắc ký và phân tích cấu trúc phân tử bằng phương pháp FTIR/NMR, khối lượng phân tử, thành phần monosaccharides từng phân đoạn PS để tìm kiếm ra các PS mới tan trong các dung môi khác nhau.

- Khảo sát và làm sáng tỏ thêm các hoạt tính sinh học của PS: khả năng kháng tiểu đường, kháng viêm, kháng ung thư, tăng cường miễn dịch…

- Nghiên cứu đánh giá *in vivo* hoạt tính prebiotic của PS sợi nấm nhằm làm sáng tỏ cơ chế tác động và khẳng định hiệu quả prebiotic của sợi nấm đối với hệ vi sinh vật đường ruột cũng như sức khỏe vật chủ.

- Đánh giá độ ổn định của sản phẩm và nghiên cứu khả năng mở rộng quy mô sản xuất.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC

Các đề tài nghiên cứu khoa học:

1. Chủ nhiệm đề tài cấp cơ sở thành phố: Nghiên cứu nuôi trồng nấm Vân chi (*Trametes versicolor)* trên cơ chất gỗ keo lá tràm và chế biến một số sản phẩm bảo vệ sức khỏe từ nấm vân chi tại thành phố Đà Nẵng – Đã nghiệm thu năm năm 2021

2. Thành viên thư kí đề tài cở sở cấp trường Murata: Khảo sát hoạt tính prebiotic của polysaccharide chiết xuất từ sợi nấm *Cordyceps militaris*- Đã nghiệm thu năm 2023

3. Thành viên chính đề tài cấp thành phố: Áp dụng công nghệ lai bào tử đơn để chọn tạo chủng giống nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) cho năng suất và chất lượng cao – Đã nghiệm thu năm 2024

4. Chủ nhiệm đề tài cấp trường: Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và prebiotic của hệ sợi nấm Vân chi (*Trametes versicolor*) nuôi cấy dịch thể và ứng dụng chế biến nước uống nấm lên men – Đã nghiệm thu năm 2026.

Các bài báo trong và ngoài nước:

1. Nguyen Thi Bich Hang, Doan Chi Cuong, Truong Cong Phat, Bui Duc Thang, Do Phu Huy, Dang Minh Nhat (2024), Developing a health-suppoting fermented lactic beverage from oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). The New Diverse Facets of Sensory Evaluation (SPISE), 127-138.

2. Nguyen Thi Bich Hang, Dang Minh Nhat, Bui Duc Thang, Vo Van Minh, Nguyen Sy Toan, Munehiro Tanaka, Doan Chi Cuong (2025), Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating *Trametes versicolor* Mycelium and *Pleurotus ostreatus* Extract for Enhanced Functional Properties, Mycobiology, Volume 53, Issue 4, 1-14

3. Hang Thi-bich Nguyen, Cuong Chi Doan, Thang Duc Bui, Nhat Minh Dang (2026), Prebiotic Properties of Polysaccharide Extracts from *Cordyceps militaris* Mycelium: Potentials for Functional Food and Drink Applications, Journal of Applied Biology & Biotechnology. Vol. 14(1), pp. 46-55, January-February, 2026.

4. Nguyen Thi Bich Hang, Dang Minh Nhat, Doan Chi Cuong, Bui Duc Thang (2023), Prebiotic properties of polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* mycelia, Vietnam Trade and Industry Review, 4, 413-420

Sách chuyên khảo (Chương 1,3,5)

Sách chuyên khảo: *Polysaccharide hệ sợi nấm: sinh tổng hợp, đặc tính và ứng dụng*; Chủ biên: Đoạn Chí Cường, Đồng tác giả: Nguyễn Thị Bích Hằng, Đặng Minh Nhật, Võ Châu Tuấn, Bùi Đức Thắng, NXB Đại học Huế, năm 2026, ISBN: 978-632-627-353-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Friedman M. Mushroom polysaccharides: Chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. Foods. 2016;5(4):1–40.

[2] Aida F, Shuhaimi M, Yazid M, et al. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. Trends Food Sci Technol. 2009;20(11–12):567–575.

[3] Fuentes-Zaragoza E, Sánchez-Zapata E, Sendra E, et al. Resistant starch as prebiotic: A review. Starch/Staerke. 2011;63(7):406–415.

[4] Zhao H, Li M, Liu L, et al. *Cordyceps militaris* polysaccharide alleviates diabetic symptoms by regulating gut microbiota against TLR4/NF-κB pathway. Int J Biol Macromol. 2023;230:123241.

[5] Pallav K, Dowd SE, Villafuerte J, et al. Effects of polysaccharopeptide from *Trametes versicolor* and amoxicillin on the gut microbiome of healthy volunteers: a randomized clinical trial. Gut Microbes. 2014;5(4):458–467.

[6] Chen L, Liu X, Zheng K, et al. Cordyceps Polysaccharides: A Review of Their Immunomodulatory Effects. Molecules. 2024.

[7] Phull A-R, Ahmed M, Park H-J. *Cordyceps militaris* as a Bio Functional Food Source: Pharmacological Potential, Anti-Inflammatory Actions and Related Molecular Mechanisms. Microorganisms. 2022;10(2).

[8] Habtemariam S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. Biomedicines. 2020.

[9] Bai M, Huang Z, Zheng X, et al. Polysaccharides from *Trametes versicolor* as a Potential Prebiotic to Improve the Gut Microbiota in High-Fat Diet Mice. Microorganisms. 2024.

[10] Dudekula UT, Doriya K, Devarai SK. A critical review on submerged production of mushroom and their bioactive metabolites. 3 Biotech. 2020;10(8).

[11] Doriya K, Jose N, Gowda M, et al. Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. Adv Food Nutr Res. 2016;78:115–135.

[12] Cui J-D, Jia S-R. Optimization of medium on exopolysaccharides production in submerged culture of *Cordyceps militaris.* Food Sci Biotechnol. 2010;19(6):1567–1571.

[13] Shih IL, Tsai KL, Hsieh C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. Biochem Eng J. 2007;33(3):193–201.

[14] Das SK, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. Fitoterapia. 2010;81(8):961–968.

[15] Qin P, Li X, Yang H, et al. Therapeutic Potential and Biological Applications of Cordycepin and Metabolic Mechanisms in Cordycepin-Producing Fungi. Molecules. 2019.

[16] Chamyuang S, Owatworakit A, Honda Y. New insights into cordycepin production in *Cordyceps militaris* and applications. Ann. Transl. Med. China; 2019. p. S78.

[17] He Z, Lin J, He Y, et al. Polysaccharide-Peptide from *Trametes versicolor*: The Potential Medicine for Colorectal Cancer Treatment. Biomedicines. 2022.

[18] Dou H, Chang Y, Zhang L. Chapter Fifteen - *Coriolus versicolor* polysaccharopeptide as an immunotherapeutic in China. In: Zhang LBT-P in MB and TS, editor. Glycans and Glycosaminoglycans as Clinical Biomarkers and Therapeutics - Part B. Academic Press; 2019. p. 361–381.

[19] Yu G, Peng J, Li L, et al. The role and mechanisms of cordycepin in inhibiting cancer cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2024;57.

[20] Tuli HS, Sandhu SS, Sharma AK. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to Cordycepin. 3 Biotech. 2014 [cited 2025 Jul 21];4(1):1–12.

[21] Zhang J, Wen C, Duan Y, et al. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review. Int J Biol Macromol. 2019;132:906–914.

[22] Zhao H, Deng B, Li D, et al. Enzymatic-extractable polysaccharides from Cordyceps militaris alleviate carbon tetrachloride-induced liver injury via Nrf2/ROS/NF-κB signaling pathway. J Funct Foods. 2022;95:105152.

[23] Chen X, Wu G, Huang Z. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharides from cultured *Cordyceps militaris*. Int J Biol Macromol. 2013;58:18–22.

[24] Sakamoto J, Morita S, Oba K, et al. Efficacy of adjuvant immunochemotherapy with polysaccharide K for patients with curatively resected colorectal cancer: a meta-analysis of centrally randomized controlled clinical trials. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(4):404–411.

[25] Zuo K, Tang K, Liang Y, et al. Purification and antioxidant and anti-Inflammatory activity of extracellular polysaccharopeptide from sanghuang mushroom, Sanghuangporus lonicericola. J Sci Food Agric. 2021;101(3):1009–1020.

[26] Knežević A, Stajić M, Sofrenić I, et al. Antioxidative, antifungal, cytotoxic and antineurodegenerative activity of selected Trametes species from Serbia. PLoS One. 2018;13(8):e0203064.

[27] Ajibola OO, Nolasco-Hipolito C, Carvajal-Zarrabal O, et al. Turkey tail mushroom (*Trametes versicolor*): an edible macrofungi with immense medicinal properties. Curr Opin Food Sci. 2024;58:101191.

[28] Mitsou EK, Saxami G, Stamoulou E, et al. Effects of Rich in B-Glucans Edible Mushrooms on Aging Gut Microbiota Characteristics: An In Vitro Study. Molecules. 2020;25(12).

[29] Kamiyama M, Shibamoto T, Horiuchi M, et al. Antioxidant/Anti-Inflammatory Activities and Chemical Composition of Extracts from the Mushroom *Trametes Versicolor*. International Journal of Nutrition and Food Sciences. 2013;2(2):85–91.

[30] Camilleri E, Blundell R, Baral B, et al. A comprehensive review on the health benefits, phytochemicals, and enzymatic constituents for potential therapeutic and industrial applications of Turkey tail mushrooms. Discover Applied Sciences. 2024;6(5):257.

[31] Hsieh T-C, Wu JM. Regulation of cell cycle transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by the combination of *Coriolus versicolor* and *Ganoderma lucidum*. Int J Mol Med. 2013;32(1):251–257.

[32] Borlagdan M, De Castro ME, Altena I, et al. Sterols from *Trametes versicolor*. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2017;

[33] Kumar A, Arora PK. Biotechnological Applications of Manganese Peroxidases for Sustainable Management. Front Environ Sci. 2022;Volume 10.

[34] Jhan M-H, Yeh C-H, Tsai C-C, et al. Enhancing the antioxidant ability of *Trametes versicolor* polysaccharopeptides by an enzymatic hydrolysis process. Molecules. 2016;21(9):1215.

[35] Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition. 1995;125(6):1401–1412.

[36] Gibson G, Scott K, Rastall R, et al. Dietary prebiotics: Current status and new definition. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. 2010;7:1–19.

[37] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017;14(8):491–502.

[38] Macfarlane S. Chapter 10 - Prebiotics in the Gastrointestinal Tract. In: Watson RR, Preedy VRBT-BF in PH, editors. Bioactive Foods in Promoting Health. Boston: Academic Press; 2010. p. 145–156.

[39] Liều Mỹ Đông NTH. Khảo sát ảnh hưởng của Whey Protein và Prebiotic lên tỉ lệ sống sót của Bifidobacterium Bifidum vi gói trong sữa chua Synbiotic. 2015;c:49–55.

[40] Vũ Thị Kim Hoa; Nguyễn Xuân Ninh; Nguyễn Đỗ Huy. Hiệu quả của bổ sung sản phẩm dinh dưỡng có probiotic và prebiotic đến chỉ số miễn dịch, tiêu chảy và nhiễm khuẩn hô hấp của nhóm trẻ 25 - 36 tháng tuổi. 2017. p. 57–61.

[41] Hữu Dũng Trần, Hải Thúy Nguyễn. Tổng quan về vai trò tinh bột đề kháng trong kiểm soát đường huyết sau ăn trên bệnh nhân đái tháo đường týp 2. 2013;1–8.

[42] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2009;61(3):279–291.

[43] Lin R, Liu H, Wu S, et al. Production and in vitro antioxidant activity of exopolysaccharide by a mutant, Cordyceps militaris SU5-08. Int J Biol Macromol. 2012;51(1–2):153–157.

[44] Chou WT, Sheih IC, Fang TJ. The applications of polysaccharides from various mushroom wastes as prebiotics in different systems. J Food Sci. 2013;78(7).

[45] Sawangwan T, Wansanit W, Pattani L, et al. Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. Agriculture and Natural Resources. 2018;52(6):519–524.

[46] Khan I, Huang G, Li X, et al. Mushroom polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *Poria cocos* reveal prebiotic functions. J Funct Foods. 2018;41:191–201.

[47] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating. Appl Microbiol Biotechnol. 2002;60(3):258–274.

[48] Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Trends Food Sci Technol. 2007;18(1):4–19.

[49] Rathore H, Prasad S, Kapri M, et al. Medicinal importance of mushroom mycelium: Mechanisms and applications. J Funct Foods. 2019;56:182–193.

[50] Wang W, Tan J, Nima L, et al. Polysaccharides from fungi: A review on their extraction, purification, structural features, and biological activities. Food Chem X. 2022;15:100414.

[51] Fritz H, Kennedy DA, Ishii M, et al. Polysaccharide K and *Coriolus versicolor* Extracts for Lung Cancer: A Systematic Review. Integr Cancer Ther. 2015;14(3):201–211.

[52] Scarpari M, Reverberi M, Parroni A, et al. Tramesan, a novel polysaccharide from *Trametes versicolor*. Structural characterization and biological effects. PLoS One. 2017;12(8).

[53] Liu J, Wang Y, Wu J, et al. Isolation, Structural Properties, and Bioactivities of Polysaccharides from Mushrooms Termitomyces: A Review. J Agric Food Chem. 2022;70(1):21–33.

[54] Yu W-Q, Yin F, Shen N, et al. Polysaccharide CM1 from *Cordyceps militaris* hinders adipocyte differentiation and alleviates hyperlipidemia in LDLR(+/−) hamsters. Lipids Health Dis. 2021;20(1):178.

[55] Saleh MH, Rashedi I, Keating A. Immunomodulatory Properties of *Coriolus versicolor*: The Role of Polysaccharopeptide. Front Immunol. 2017;Volume 8-.

[56] Thuy DTT, Hieu N V. Khảo sát yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sản xuất polysaccharide từ *Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor* tại Việt Nam. Hội nghị Nấm học toàn quốc. 2020. p. 242–248.

[57] Kaewkod T, Ngamsaoad P, Mayer K, et al. Antioxidant, Antibacteria, and Anti-Inflammatory Effects of *Cordyceps militaris* Extracts and Their Bioactive Compounds. J Food Biochem. 2024;2024(1):1862818.

[58] Kanlayavattanakul M, Lourith N. *Cordyceps militaris* polysaccharides: preparation and topical product application. Fungal Biol Biotechnol. 2023;10(1):3.

[59] Liu J, Wang Y, Wu J, et al. Isolation, Structural Properties, and Bioactivities of Polysaccharides from Mushrooms Termitomyces: A Review. J Agric Food Chem. 2022;70:21–33.

[60] Như Ngọc N, Thị Hồng Nhung N, Trà My K, et al. Nghiên cứu chiết xuất polysaccharide tổng số từ một số loại nấm Linh chi *Ganoderma lucidum* và đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết. Tạp chí khoa học và công nghệ lâm nghiệp. 2024;13(5 SE-):11–19.

[61] Roy SK, Das D, Mondal S, et al. Structural studies of an immunoenhancing water-soluble glucan isolated from hot water extract of an edible mushroom, *Pleurotus florida*, cultivar Assam Florida. Carbohydr Res. 2009 [cited 2025 Jul 7];344(18):2596–2601.

[62] Bhunia SK, Dey B, Maity KK, et al. Structural characterization of an immunoenhancing heteroglycan isolated from an aqueous extract of an edible mushroom, *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Singer. Carbohydr Res. 2010;345(17):2542–2549.

[63] Mandal EK, Maity K, Maity S, et al. Chemical analysis of an immunostimulating (1→4)-, (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, Calocybe indica. Carbohydr Res. 2012;347(1):172–177.

[64] Nandi AK, Sen IK, Samanta S, et al. Glucan from hot aqueous extract of an ectomycorrhizal edible mushroom, Russula albonigra (Krombh.) Fr.: structural characterization and study of immunoenhancing properties. Carbohydr Res. 2012;363:43–50.

[65] Bhanja SK, Rout D, Patra P, et al. Structural studies of an immunoenhancing glucan of an ectomycorrhizal fungus Ramaria botrytis. Carbohydr Res. 2013;374:59–66.

[66] Samanta S, Maity K, Nandi AK, et al. A glucan from an ectomycorrhizal edible mushroom Tricholoma crassum (Berk.) Sacc.: isolation, characterization, and biological studies. Carbohydr Res. 2013;367:33–40.

[67] Suong N, Trung Au V, Mai D. Optimizing the Polysaccharide Extraction from the Vietnamese Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) Via Enzymatic Method. Journal of Food and Nutrition Sciences. 2015;3:111.

[68] Zhu ZY, Dong F, Liu X, et al. Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. Carbohydr Polym. 2016;140:461–471.

[69] Sangthong S, Pintathong P, Pongsua P, et al. Polysaccharides from *Volvariella volvacea* Mushroom: Extraction, Biological Activities and Cosmetic Efficacy. Journal of Fungi 2022, Vol 8, Page 572. 2022;8(6):572.

[70] Sun Y, He H, Wang Q, et al. A Review of Development and Utilization for Edible Fungal Polysaccharides: Extraction, Chemical Characteristics, and Bioactivities. Polymers (Basel). 2022;14(20).

[71] Song W, Li M, Yue X, et al. Effect of extraction and purification on the structure and activity of Flammulina velutipes polysaccharides: a review. Int J Food Sci Technol. 2024;59(12):9571–9591.

[72] Huỳnh PC, Tình LV, Tiên LTT, et al. Nghiên cứu sơ chế, chiết xuất polysaccharide và triterpenoid thô từ quả thể nấm linh chi. Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng. 2021;19(3):41–46.

[73] Bhargava S, Sanjrani M, et al. Solid-State Fermentation: An Overview. Chemical & Biochemical Engineering Quarterly; Vol22 No1. 2008;22.

[74] Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, et al. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Bioresour Technol. 2013;127:500–507.

[75] Palladino F, Marcelino PR, Schlogl AE, et al. Bioreactors: Applications and Innovations for a Sustainable and Healthy Future—A Critical Review. Applied Sciences. 2024.

[76] Zhou X, Gong Z, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products. J Pharm Pharmacol. 2009;61(3):279–291.

[77] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnol Adv. 2004;22(3):189–259.

[78] Wang H, Ma J-X, Zhou M, et al. Current advances and potential trends of the polysaccharides derived from medicinal mushrooms sanghuang. Front Microbiol. 2022;13:965934.

[79] Rahmatnejad V, Wei Y, Rao G. Recent Developments in Bioprocess Monitoring Systems BT - Biopharmaceutical Manufacturing: Progress, Trends and Challenges. In: Pörtner R, editor. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 39–66.

[80] Palladino F, Marcelino PRF, Schlogl AE, et al. Bioreactors: Applications and Innovations for a Sustainable and Healthy Future—A Critical Review. Applied Sciences 2024, Vol 14, Page 9346. 2024;14(20):9346.

[81] Luo S, Luo Y, Yuan Y, et al. Optimization of Submerged Fermentation Conditions for Polysaccharide Production in Species of the Genus *Ganoderma* (Agaricomycetes) and Comparative Analysis of the Antioxidant Activities of Different Strains. Int J Med Mushrooms. 2025;27(1):13–27.

[82] Berovic M, Podgornik BB, Gregori A. Cultivation Technologies for Production of Medicinal Mushroom Biomass: Review. Int J Med Mushrooms. 2022;24(2):1–22.

[83] Papinutti VL, Diorio LA, Forchiassin F. Production of laccase and manganese peroxidase by Fomes sclerodermeus grown on wheat bran. J Ind Microbiol Biotechnol. 2003;30(3):157–160.

[84] Boh B, Berovic M, Zhang J, et al. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. In: El-Gewely MRBT-BAR, editor. Elsevier; 2007. p. 265–301.

[85] Cui M, Yang H, He G. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. J Zhejiang Univ Sci B. 2015;16(12):998–1010.

[86] Bakratsas G, Polydera A, Katapodis P, et al. Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. Future Foods. 2021;4:100086.

[87] Kachrimanidou V, Papadaki A, Papapostolou H, et al. *Ganoderma lucidum* Mycelia Mass and Bioactive Compounds Production through Grape Pomace and Cheese Whey Valorization. Molecules. 2023.

[88] Wang Y, Gu J, Wu J, et al. Natural Products and Health Care Functions of Inonotus obliquus. Curr. Issues Mol. Biol. 2025.

[89] Das SK, Masuda M, Hatashita M, et al. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation. Process Biochemistry. 2010;45(1):129–132.

[90] Zhang J, Zhong J-J, Geng A. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. Process Biochemistry. 2014;49(10):1580–1586.

[91] Serody J, Matthew B, Hewlett J. Submerged Fermentation of Ganoderma tsugae for the Optimized Production of Exopolysaccharides. Journal of Advanced Technological Education. 2024;3(3):69–80.

[92] Li H, Dai J, Shi Y, et al. Molecular Regulatory Mechanism of the Iron-Ion-Promoted Asexual Sporulation of Antrodia cinnamomea in Submerged Fermentation Revealed by Comparative Transcriptomics. Journal of Fungi. 2023.

[93] Zhang B, Zhou J, Li Q, et al. Manganese affects the growth and metabolism of *Ganoderma lucidum* based on LC-MS analysis. PeerJ. 2019;7:e6846.

[94] Fan D, Wang W, Zhong J-J. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. Biochem Eng J. 2012;60:30–35.

[95] Yang S, Jin L, Ren X, et al. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. J Food Drug Anal. 2014;22(4):468–476.

[96] Showkat M, Narayanappa N, Umashankar N, et al. Optimization of Fermentation Conditions of *Cordyceps militaris* and In Silico Analysis of Antifungal Property of Cordycepin Against Plant Pathogens. J Basic Microbiol. 2024;64(10):e2400409.

[97] Fang Q, Zhong J-J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum.* Process Biochemistry. 2002;37:769–774.

[98] Zhou X-W, Su K-Q, Zhang Y-M. Applied modern biotechnology for cultivation of Ganoderma and development of their products. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93(3):941–963.

[99] Liu S-R, Zhang W-R. Optimization of submerged culture conditions involving a developed fine powder solid seed for exopolysaccharide production by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Food Sci Biotechnol. 2019;28(4):1135–1145.

[100] Camilleri E, Narayan S, Lingam D, et al. Mycelium-based composites: An updated comprehensive overview. Biotechnol Adv. 2025;79:108517.

[101] Fazenda M, Harvey L, Mcneil B. Effects of Dissolved Oxygen on Fungal Morphology and Process Rheology During Fed-Batch Processing of *Ganoderma lucidum.* J Microbiol Biotechnol. 2010;20:844–851.

[102] Thakur N, Sheetal, Bhalla TC. Chapter 18 - Enzymes and their significance in the industrial bioprocesses. In: Bhatt AK, Bhatia RK, Bhalla TCBT-BB for B and B, editors. Academic Press; 2023. p. 273–284.

[103] Lu Z, Chen Z, Liu Y, et al. Morphological Engineering of Filamentous Fungi: Research Progress and Perspectives. J Microbiol Biotechnol. 2024;34(6):1197–1205.

[104] Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102.

[105] Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4(2):89–96.

[106] Lobo V, Patil A, Phatak A, et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118–126.

[107] Jomova K, Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. Eur J Med Chem. 2013;70:102–110.

[108] Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013;53(Volume 53, 2013):401–426.

[109] Ontawong A, Pengnet S, Thim-Uam A, et al. A randomized controlled clinical trial examining the effects of *Cordyceps militaris* beverage on the immune response in healthy adults. Sci Rep. 2024;14(1):7994.

[110] Chou Y-C, Sung T-H, Hou S-J, et al. Current Progress Regarding *Cordyceps militaris*, Its Metabolite Function, and Its Production. Applied Sciences. 2024.

[111] Cheng C, Zhang S, Chen C, et al. Cordycepin combined with antioxidant effects improves fatigue caused by excessive exercise. Sci Rep. 2025;15(1):8141.

[112] Rašeta M, Popović M, Knežević P, et al. Bioactive Phenolic Compounds of Two Medicinal Mushroom Species *Trametes versicolor* and *Stereum subtomentosum* as Antioxidant and Antiproliferative Agents. Chem Biodivers. 2020;17(12):e2000683.

[113] K D, S P S, B V, et al. Medicinal potential of Turkey tail mushroom (Trametes versicolor): A comprehensive review. South African Journal of Botany. 2024;172:254–266.

[114] Bulam S, Üstün NŞ, Pekşen A. Evaluation of Nutritional and Medicinal Values of Edible Wild and Cultivated *Pleurotus ostreatus*. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. 2019;7(12):2054–2061.

[115] Lavelli V, Proserpio C, Gallotti F, et al. Circular reuse of bio-resources: the role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. Food Funct. 2018;9(3):1353–1372.

[116] Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Szwajgier D. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant properties and phenolic acid contents of oyster (*Pleurotus ostreatus*) and chanterelle (Cantharellus cibarius) mushrooms. Food Sci Biotechnol. 2016;25(2):439–444.

[117] Jabłońska-Ryś E, Skrzypczak K, Sławińska A, et al. Lactic Acid Fermentation of Edible Mushrooms: Tradition, Technology, Current State of Research: A Review. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2019;18(3):655–669.

[118] Ngoc TTA, Cao NLT, Bach NLT, et al. Effects of salt concentration and *Lactobacillus plantarum* population on grey oyster mushroom fermentation. CTU Journal of Innovation and Sustainable Development. 2024;16(2):25–31.

[119] Ayar-Sümer EN, Verheust Y, Özçelik B, et al. Impact of Lactic Acid Bacteria Fermentation Based on Biotransformation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Mushrooms. Foods. 2024;13(11):1616.

[120] Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Skrzypczak K, et al. Dynamics of Changes in pH and the Contents of Free Sugars, Organic Acids and LAB in Button Mushrooms during Controlled Lactic Fermentation. Foods. 2022;11(11):1553.

[121] Jabłońska-Ryś E, Przygoński K. Possibilities of Using the New Lactiplantibacillus plantarum EK11 Strain as a Starter Culture for the Fermentation of the Fruiting Bodies of Edible Mushrooms. Foods 2025, Vol 14, Page 2833. 2025;14(16):2833.

[122] Hur SJ, Lee SY, Kim YC, et al. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chem. 2014;160:346–356.

[123] Jabłońska-Ryś E, Sławińska A, Skrzypczak K, et al. Dynamics of Changes in pH and the Contents of Free Sugars, Organic Acids and LAB in Button Mushrooms during Controlled Lactic Fermentation. Foods. 2022;11(11):1553.

[124] Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, et al. Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFS1. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(4):1990–1995.

[125] Sun Y, Tang J, Gu X, et al. Water-soluble polysaccharides from Angelica sinensis (Oliv.) Diels: Preparation, characterization and bioactivity. Int J Biol Macromol. 2005;36(5):283–289.

[126] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Anal Chem. 1956;28(3):350–356.

[127] Peng Z, Tian S, Li H, et al. Extraction, characterization, and antioxidant properties of cell wall polysaccharides from the pericarp of Citrus Reticulata cv. Chachiensis. Food Hydrocoll. 2023;136:108237.

[128] Tian S, Peng Z, Zhang J, et al. Structural analysis and biological activity of cell wall polysaccharides and enzyme-extracted polysaccharides from pomelo (Citrus maxima (Burm.) Merr.). Int J Biol Macromol. 2024;279:135249.

[129] Yu D, Wang W, Hou S, et al. The effect of sequential extraction on the physicochemical and rheological properties of *Naematelia aurantialba* polysaccharides. Int J Biol Macromol. 2024;265:130777.

[130] Nenadis N, Wang LF, Tsimidou M, et al. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the $ABTS^{\bullet+}$ assay. J Agric Food Chem. 2004;52(15):4669–4674.

[131] Phirom-on K, Apiraksakorn J. Development of cellulose-based prebiotic fiber from banana peel by enzymatic hydrolysis. Food Biosci. 2021;41.

[132] Huebner J, Wehling RL, Parkhurst A, et al. Effect of processing conditions on the prebiotic activity of commercial prebiotics. Int Dairy J. 2008;18(3):287–293.

[133] Huebner J, Wehling RL, Hutkins RW. Functional activity of commercial prebiotics. Int Dairy J. 2007;17(7):770–775.

[134] İnci Ş, Akyüz M, Kirbağ S. Antioxidant and Antimicrobial Effects of Trametes versicolor (L.) Lloyd Extracts in Different Solvents. Turkish Journal of Science & Technology Research Paper. 2022;17(2):261–265.

[135] Thi-Bich Hang N, Van Minh V, Munehiro T, et al. Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating *Trametes versicolor* Mycelium and Pleurotus ostreatus Extract for Enhanced Functional Properties. Mycobiology. 2025;53(4):379–392.

[136] Tat TQ, Khanh ND. Isolation, identification and investigation some biochemical properties of lactic acid bacteria from “Mam sac chua” and “Com me” in Tien Giang province. Ho Chi Minh City Open University Journal of Science. 2021;11(1):11–21.

[137] Kosanić M, Ranković B, Dašić M. Mushrooms as possible antioxidant and antimicrobial agents. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2012;11(4):1095–1102.

[138] Gámbaro A, McSweeney MB. Chapter Eight - Sensory methods applied to the development of probiotic and prebiotic foods. In: da Cruz AG, Prudencio ES, Esmerino EA, et al., editors. Probiotic and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations and Advances. Academic Press; 2020. p. 295–337.

[139] Hà TT, Lê Văn Vẻ NNG, Thu PT, et al. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm Đông trùng hạ thảo trong môi trường nhân giống dịch thể. Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 2016;58(8).

[140] Deshmukh N, Bhaskaran L. Optimization of cultural and nutritional conditions to enhance mycelial biomass of *Cordyceps militaris* using statistical approach. Brazilian Journal of Microbiology. 2023;55(1):235.

[141] Liu XY, Meng FX, Zhang YB, et al. Enhanced production of mycelia by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* using plackett-burman design and response surface methodology. Applied Mechanics and Materials. 2012;138:1209–1214.

[142] Supramani S, Ahmad R, Ilham Z, et al. Optimisation of biomass, exopolysaccharide and intracellular polysaccharide production from the mycelium of an identified ganoderma lucidum strain qrs 5120 using response surface methodology. AIMS Microbiol. 2019;5(1):19–38.

[143] Yadav JS, Tripathi JP. Optimization of cultivation and nutrition conditions and substrate pretreatment for solid-substrate fermentation of wheat straw by *Coriolus versicolor*. Folia Microbiol (Praha). 1991;36:294–301.

[144] Dung HTY, Nam VH, Hằng NT, et al. Tối ưu điều kiện lên men và thu hồi sản phẩm từ chủng nấm Vân chi bản địa (*Trametes versicolor*) phân lập tại miền núi

phía bắc Việt Nam. TNU Journal of Science and Technology. 2023;228(13):139–147.

[145] Veena SS, Pandey M. Physiological and cultivation requirements of *Trametes versicolor*, a medicinal mushroom to diversify Indian mushroom industry. Indian Journal of Agricultural Sciences. 2012;82(8):672.

[146] Adebayo-Tayo BC, Ugwu EE. Influence of different nutrient sources on exopolysaccharide production and biomass yield by submerged culture of Trametes versicolor and Coprinus sp. AU Journal of Technology. 2011;15(2).

[147] Zheng Y, Zhang S, Wang Q, et al. Characterization and hypoglycemic activity of a β-pyran polysaccharides from bamboo shoot (Leleba oldhami Nakal) shells. Carbohydr Polym. 2016;144:438–446.

[148] Yan J-K, Ding Z-C, Gao X, et al. Comparative study of physicochemical properties and bioactivity of *Hericium erinaceus* polysaccharides at different solvent extractions. Carbohydr Polym. 2018;193:373–382.

[149] Ma Q, Yu Y, Zhou Z, et al. Effects of different treatments on composition, physicochemical and biological properties of soluble dietary fiber in buckwheat bran. Food Biosci. 2023;53:102517.

[150] Maity P, Sen IK, Chakraborty I, et al. Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. Int J Biol Macromol. 2021;172:408–417.

[151] Wang T, Han J, Dai H, et al. Polysaccharides from Lyophyllum decastes reduce obesity by altering gut microbiota and increasing energy expenditure. Carbohydr Polym. 2022;295:119862.

[152] Du B, Meenu M, Liu H, et al. A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β-Glucan. International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol 20, Page 4032. 2019;20(16):4032.

[153] Gong P, Wang S, Liu M, et al. Extraction methods, chemical characterizations and biological activities of mushroom polysaccharides: A mini-review. Carbohydr Res. 2020;494:108037.

[154] Chen Z, Yin C, Fan X, et al. Characterization of physicochemical and biological properties of Schizophyllum commune polysaccharide extracted with different methods. Int J Biol Macromol. 2020;156:1425–1434.

[155] Shang H, Chen S, Li R, et al. Influences of extraction methods on physicochemical characteristics and activities of *Astragalus cicer* L. polysaccharides. Process Biochemistry. 2018;73:220–227.

[156] Wu N, Ge X, Yin X, et al. A review on polysaccharide biosynthesis in *Cordyceps militaris*. Int J Biol Macromol. 2024;260:129336.

[157] Jin M, Zhao K, Huang Q, et al. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review. Carbohydr. Polym. 2012. p. 713–722.

[158] Flores GA, Cusumano G, Venanzoni R, et al. The Glucans Mushrooms: Molecules of Significant Biological and Medicinal Value. Polysaccharides. 2024. p. 212–224.

[159] Chen Y, Yao F, Ming K, et al. Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. Molecules. 2016;21(12):1705.

[160] Petraglia T, Latronico T, Fanigliulo A, et al. Antioxidant Activity of Polysaccharides from the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. Molecules. 2023.

[161] Teka N, Alminderej FM, Souid G, et al. Characterization of polysaccharides sequentially extracted from allium roseum leaves and their hepatoprotective effects against cadmium induced toxicity in mouse liver. Antioxidants. 2022;11(10):1866.

[162] Wang X, Zhang J, Zhang K, et al. Ultrasound-Assisted Enzyme Extraction, Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Cordyceps militaris* Solid Medium. Molecules. 2024;29(19):4560.

[163] Chen R, Jin C, Li H, et al. Ultrahigh pressure extraction of polysaccharides from *Cordyceps militaris* and evaluation of antioxidant activity. Sep Purif Technol. 2014;134:90–99.

[164] Bai L, Xu D, Zhou Y-M, et al. Antioxidant Activities of Natural Polysaccharides and Their Derivatives for Biomedical and Medicinal Applications. Antioxidants. 2022.

[165] Kim HM, Song Y, Hyun GH, et al. Characterization and antioxidant activity determination of neutral and acidic polysaccharides from Panax ginseng CA Meyer. Molecules. 2020;25(4):791.

[166] Sharma SK, Gautam N, Atri NS. [Retracted] Optimization, Composition, and Antioxidant Activities of Exo-and Intracellular Polysaccharides in Submerged Culture of *Cordyceps gracilis* (Grev.) Durieu & Mont. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015(1):462864.

[167] Dhahri M, Sioud S, Alsuhaymi S, et al. Extraction, characterization, and antioxidant activity of polysaccharides from ajwa seed and flesh. Separations. 2023;10(2):103.

[168] Yan J-K, Wang W-Q, Ma H-L, et al. Sulfation and enhanced antioxidant capacity of an exopolysaccharide produced by the medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. Molecules. 2012;18(1):167–177.

[169] Zeng F-S, Yao Y-F, Wang L-F, et al. Polysaccharides as antioxidants and prooxidants in managing the double-edged sword of reactive oxygen species. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;159:114221.

[170] Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2020;17(11):687–701.

[171] de Figueiredo FC, de Barros Ranke FF, de Oliva-Neto P. Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and *Salmonella typhimurium*. Lwt. 2020;118:108761.

[172] Song H, Jeon D, Unno T. Evaluation of Prebiotics through an *In vitro* Gastrointestinal Digestion and Fecal Fermentation Experiment: Further Idea on the Implementation of Machine Learning Technique. Foods. 2022;11(16):2490.

[173] Synytsya A, Míčková K, Synytsya A, et al. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Carbohydr Polym. 2009;76(4):548–556.

[174] Cör D, Knez Ž, Hrnčič MK. Antitumour, Antimicrobial, Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. Molecules 2018, Vol 23, Page 649. 2018 [cited 2026 Oct 10];23(3):649.

[175] Jayachandran M, Xiao J, Xu B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. Int. J. Mol. Sci. 2017.

[176] He S, Wang X, Zhang Y, et al. Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (Phyllostachys praecox). Carbohydr Polym. 2016;151:295–304.

[177] Yu ZT, Liu B, Mukherjee P, et al. *Trametes versicolor* Extract Modifies Human Fecal Microbiota Composition *In vitro*. Plant Foods for Human Nutrition. 2013;68(2):107–112.

[178] Uthan ET, Yamaç M, Yıldız Z. In vitro Prebiotic Activity of Polysaccharides Extracted from Edible / Medicinal Macrofungi Species. The Journal of Fungus. 2022;13(1):15–29.

[179] Duan H, Yu Q, Ni Y, et al. Effect of Agaricus bisporus Polysaccharides on Human Gut Microbiota during In Vitro Fermentation: An Integrative Analysis of Microbiome and Metabolome. Foods. 2023.

[180] Ma G, Du H, Hu Q, et al. Health benefits of edible mushroom polysaccharides and associated gut microbiota regulation. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;62(24):6646–6663.

[181] Barcan AS, Barcan RA, Vamanu E. Therapeutic Potential of Fungal Polysaccharides in Gut Microbiota Regulation: Implications for Diabetes, Neurodegeneration, and Oncology. J Fungi (Basel). 2024;10(6).

[182] Barrangou R, Altermann E, Hutkins R, et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by Lactobacillus acidophilus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(15):8957–8962.

[183] Rattanakiat S, Pulbutr P, Khunawattanakul W, et al. Prebiotic activity of polysaccharides extracted from Jerusalem artichoke tuber and development of prebiotic granules. Pharmacognosy Journal. 2020;12(6).

[184] Sargautiene V, Nakurte I, Nikolajeva V. Broad prebiotic potential of non-starch polysaccharides from oats (*Avena sativa* L.): an in vitro study. Pol J Microbiol. 2018;67(3):307.

[185] Islamova ZI, Ogai DK, Abramenko OI, et al. Comparative assessment of the prebiotic activity of some pectin polysaccharides. Pharm Chem J. 2017;51:288–291.

[186] Ren Z, Xu Z, Amakye WK, et al. *Hericium erinaceus* mycelium-Derived Polysaccharide Alleviates Ulcerative Colitis and Modulates Gut Microbiota in Cynomolgus Monkeys. Mol Nutr Food Res. 2023;67(3).

[187] Larypoor M, Jameyi N, Dadgostar H, et al. Evaluation of the Prebiotic Properties of *Ganoderma lucidum* and *Lentinula edodes* Polysaccharides in Enhancing Dairy Yeast and Bacterial Isolates. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2025;21(4):431–450.

[188] Annunziata G, Arnone A, Ciampaglia R, et al. Fermentation of Foods and Beverages as a Tool for Increasing Availability of Bioactive Compounds. Focus on Short-Chain Fatty Acids. Foods. 2020.

[189] Deleu S, Machiels K, Raes J, et al. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? EBioMedicine. 2021;66.

[190] Yang M, Meng F, Gu W, et al. Influence of polysaccharides from Polygonatum kingianum on short-chain fatty acid production and quorum sensing in *Lactobacillus faecis*. Front Microbiol. 2021;12:758870.

[191] Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. Environ Microbiol. 2017;19(1):29–41.

[192] Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, et al. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. Front Microbiol. 2016;7:185.

[193] Zhao G, Nyman M, Åke Jönsson J. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. Biomedical Chromatography. 2006;20(8):674–682.

[194] Miao M, Ma Y, Jiang B, et al. Structural elucidation and in vitro fermentation of extracellular α-D-glucan from *Lactobacillus reuteri* SK24. 003. Bioactive carbohydrates and dietary fibre. 2015;6(2):109–116.

[195] Fernández J, Redondo-Blanco S, Gutiérrez-del-Río I, et al. Colon microbiota fermentation of dietary prebiotics towards short-chain fatty acids and their roles as anti-inflammatory and antitumour agents: A review. J Funct Foods. 2016;25:511–522.

[196] Sun Y, Guan Y, Khoo HE, et al. In vitro assessment of chemical and pre-biotic properties of carboxymethylated polysaccharides from Passiflora edulis peel, xylan, and citrus pectin. Front Nutr. 2021;8:778563.

[197] Malanovic N, Lohner K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2016;1858(5):936–946.

[198] Joshi M, Pathania P, Sagar A. FTIR studies and antimicrobial potential of Cordyceps militaris (a highly medicinal fungus) against Hospital Pathogens Madhavi Joshi Pooja Pathania Anand Sagar Microbiology. 2015;(2277):4–6.

[199] Wang X, Li X, Qiu W, et al. Effects of mating-type ratio imbalance on the degeneration of *Cordyceps militaris* subculture and preventative measures. PeerJ. 2024;12(7):e17648.

[200] Yin J, Xin X, Weng Y, et al. Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration. PLoS One. 2017;12(10).

[201] Laitonjam WS. Chapter 9 - Natural antioxidants (NAO) of plants Acting as scavengers of free radicals. In: Atta-ur-Rahman BT-S in NPC, editor. Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier; 2012. p. 259–275.

[202] Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Arch Toxicol. 2020;94(3):651–715.

[203] Sołowiej BG, Nastaj M, Waraczewski R, et al. Effect of polysaccharide fraction from oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on physicochemical and antioxidative properties of acid casein model processed cheese. Int Dairy J. 2023;137:105516.

[204] Huang Heng-Li; Deng, Xian; Zhu, Ting-Ting; Xiong, Jian-Feng; Xu, You-Hua; Xu, Yong WG. Short-Chain Fatty Acids Inhibit Oxidative Stress and Inflammation in Mesangial Cells Induced by High Glucose and Lipopolysaccharide. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2017/01/03. 2017;125(02):98–105.

[205] Fontinha F, Martins N, Campos G, et al. The Effects of Short-Chain Fatty Acids in Gut Immune and Oxidative Responses of European Sea Bass (Dicentrarchus labrax): An Ex Vivo Approach. Animals. 2024.

[206] Butt UD, Lin N, Akhter N, et al. Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. Fish Shellfish Immunol. 2021;114:263–281.

[207] Ferreira VC, Barroso TLCT, Castro LEN, et al. An overview of prebiotics and their applications in the food industry. European Food Research and Technology. 2023;249(11):2957–2976.

[208] Matera M. Bifidobacteria, Lactobacilli... when, how and why to use them. Global Pediatrics. 2024;8:100139.

[209] Christensen CM, Kok CR, Auchtung JM, et al. Prebiotics enhance persistence of fermented-food associated bacteria in *in vitro* cultivated fecal microbial communities. Front Microbiol. 2022;13.

[210] Corzo N, Delgado-Fernández P, Olano A, et al. Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. Int Dairy J. 2019;89:77–85.

[211] Uthan ET, Yamaç M, Yıldız Z. *In vitro* prebiotic activity of polysaccharides extracted from edible/medicinal macrofungi species. Mantar Dergisi. 2022;13(1):15–29.

[212] Carvalho FM, Mergulhão FJM, Gomes LC. Using lactobacilli to fight *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms on urinary tract devices. Antibiotics. 2021;10(12):1525.

[213] Nguyễn Thị Thơ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thành Tuấn, et al. Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa và khả năng kháng khuẩn của cao chiết nấm Vân chi nuôi

trồng (*Trametes versicolor*). Tạp chí khoa học và công nghệ lâm nghiệp. 2024;13(3):022–030.

[214] Blieva R, Mustafin K, Bisko N, et al. Antioxidant and antimicrobial potential of *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. Turkish Journal of Biochemistry. 2022;47(4):483–489.

[215] Chawla P, Bains A. In vitro bioactivity, antimicrobial and anti-inflammatory efficacy of modified solvent evaporation assisted Trametes versicolor extract. 3 Biotech. 2020;10(9):404.

[216] da Silva RF, Barros AC de A, Pletsch M, et al. Study on the scavenging and anti-*Staphylococcus aureus* activities of the extracts, fractions and subfractions of two Volvariella volvacea strains. World J Microbiol Biotechnol. 2010;26(10):1761–1767.

[217] Tang J, Liu Y, Lin B, et al. Effects of ultra-long fermentation time on the microbial community and flavor components of light-flavor Xiaoqu Baijiu based on fermentation tanks. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2021 38:1. 2021;38(1):3-.

[218] Liang H, Zhao M, Cao X, et al. Effects of prebiotics on the fermentation of traditional suancai of Northeast China. Food Science and Human Wellness. 2024;13(3):1358–1367.

[219] Clifford A. Hall III, Julie Garden-Robinson, Anuradha Vegi, et al. The effect of fermentation on the physicochemical characteristics of dry-salted vegetables. J Food Res. 2017;6(5):32–40.

[220] Yue X, Wu R, Yu M, et al. Changes in flavour and microbial diversity during natural fermentation of suan-cai, a traditional food made in Northeast China. Int J Food Microbiol. 2015;211:23–31.

[221] Zhou X, Li YBT-A of OM, editors. Chapter 1 - Basic biology of oral microbes. Atlas of oral microbiology: From healthy microflora to dsease. Oxford: Academic Press; 2015. p. 1–14.

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

NGUYỄN THỊ BÍCH HẰNG

THU NHẬN, ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH PREBIOTIC CỦA POLYSACCHARIDE TỪ SỢI NẤM (*Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*) VÀ BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH KHỐI TRONG CHẾ BIẾN THỰC PHẨM BỔ SUNG

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KỸ THUẬT

PHẦN PHỤ LỤC

Đà nẵng, 2026

MỤC LỤC

PHỤ LỤC 1. CÔNG THỨC CÁC MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY 1

1.1. Môi trường PDB^{+} 1

1.2. Môi trường M9 1

1.3. Môi trường MRS borth 2

1.4. Môi trường LB 2

1.5. Môi trường NA 2

PHỤ LỤC 2. XỬ LÝ SỐ LIỆU TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN THU SINH KHỐI TỪ SỢI NẤM GIÀU POLYSACCHARIDE 3

2.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* 3

2.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris* 6

2.3. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh khối hệ sợi nấm *T. Versicolor* 8

2.4. Tối ưu điều kiện nuôi cấy sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor* 11

PHỤ LỤC 3. XỬ LÝ SỐ LIỆU TÁCH CHIẾT TUẦN TỰ VÀ ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI, HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HOÁ, PREBIOTIC CỦA CÁC CHIẾT XUẤT PS 13

3.1. Hàm lượng PS chiết xuất từ nấm 13

3.2. Khảo sát khả năng kích thích sự sinh trưởng các probiotic của các phân đoạn PS nấm *C. militaris* 14

3.3. Khảo sát khả năng kích thích sự sinh trưởng các probiotic của các chiết xuất PS nấm *T. versicolor* 20

3.4. Chỉ số prebiotic các chiết xuất PS nấm *T. versicolor* 26

3.5. Khảo sát khả năng kháng tiêu hoá các PS nấm 31

3.6. Khả năng chống lại vi khuẩn gây hại của môi trường nuôi cấy *L. plantarum* WCFS1 bổ sung PS chiết xuất từ nấm *C. militaris* 32

3.7. Khả năng chống lại vi khuẩn gây hại của môi trường nuôi cấy *L. plantarum* WCFS1 bổ sung PS chiết xuất từ nấm *T. versicolor* 36

3.8. Hàm lượng SCFA tạo ra khi nuôi probiotic trong môi trường bổ sung PS chiết xuất sợi nấm *T. versicolor* 40

3.9. Hàm lượng SCFA tạo ra khi nuôi probiotic trong môi trường bổ sung PS chiết xuất sợi nấm *C. militaris* 55

PHỤ LỤC 4. XỬ LÝ SỐ LIỆU ỨNG DỤNG SỢI NẤM CHẾ BIẾN NƯỚC NẤM BÀO NGƯ LÊN MEN LACTIC 70

4.1. Sự thay đổi tổng hàm lượng các chất hòa tan Brix 70

4.2. Sự thay đổi tổng hàm lượng pH 75

4.3. Sự thay đổi tổng hàm lượng TAN 80

4.4. Khả năng kháng oxi hoá của nước nấm Bào ngư lên men 85

4.5. Khả năng kích thích sự tăng trưởng đối với lợi khuẩn 89

4.6. Khả năng ức chế hại khuẩn 93

4.6.1. Ức chế S. aureus 93

4.6.2. Ức chế E. coli 96

4.7. Số liệu điểm đánh giá cảm quan 99

PHỤ LỤC 5. HÌNH ẢNH THÍ NGHIỆM 108

5.1. Sợi nấm *C. militaris* nuôi cấy lỏng 108

5.2. Bột sợi nấm sấy khô 109

5.3. Lên men nước Lactic sợi nấm Vân chi 110

5.4. Hình ảnh vi khuẩn phương đánh giá prebiotic 110

5.5. Tủ nuôi kỵ khí đánh giá hoạt tính prebiotic PS 111

5.6. Tách chiết PS từ nấm 111

5.7. Máy UV-Vis 111
5.8. Các phân đoạn PS tách chiết từ sợi nấm 112
5.9. Đường chuẩn glucose của phương pháp phenol-sunfuric 112
5.10. Đường chuẩn DNS 113
5.11. Sắc ký đồ SCFAs nuôi cấy probiotic bổ sung chiết xuất PS nấm C. militaris 114
5.12. Sắc ký đồ SCFAs nuôi cấy probiotic bổ sung chiết xuất PS nấm *T. versicolor* 118
5.13. Cấy trãi đĩa xác định mật độ tế bào 124
5.14. Khả năng bắt gốc tự do $ABTS^{+}$ 125
5.15. Nước lên men lactic 125
5.16. Phiếu đánh giá nước lên men lactic 126

PHỤ LỤC 1. CÔNG THỨC CÁC MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY

1.1. Môi trường PDB$^+$

Khoai tây : 200g

Glucose : 20g

Cao nấm men : 2g

Peptone : 2g

H2O : 1L

1.2. Môi trường M9

1. Chuẩn bị dung dịch muối M9 5X:

Chuẩn bị 400mL ddH_2O cho vào bình định mức, lần lượt thêm:

a. 64g $Na_2HPO_{4.7}H_2O$

b. 15g KH_2PO_4

c. 2,5g NaCl

d. 5.0g NH_4Cl

Chuẩn đến vạch định mức 1L với ddH_2O Khử trùng bằng nồi hấp tiệt trùng

2. Chuẩn bị dung dịch $MgSO_4$ 1M:

Cân 24,65g $MgSO_{4.7}H_2O$ chuẩn đến 100mL

3. Chuẩn bị dung dịch glucose 40% (w/v):

Cân 40 g glucose chuẩn đến 100 mL bằng nước cất/khử ion Chú ý: Thêm glucose vào nước khuấy trong cốc; đừng thêm nước vào Glucose.

4. Chuẩn bị dung dịch $CaCl_2$ 1M:

Để 100 mL ddH_2O thêm: 147.014g $CaCl_{2.2}$ddH_2O. Thực hiện đến 1L với ddH_2O

5. Phương pháp chuẩn bị (1L môi trường) M9:

a. 200 mL dung dịch muối M9 5X

b. 800 mL ddH_2O

c. 2 mL dung dịch $MgSO_4$ 1M

d. 0,1 mL dung dịch $CaCl_2$ 1M

e. 10 mL glucose 40%

1.3. Môi trường MRS borth

Glucose : 20g

Pepton : 20g

Cao nấm men : 5g

K_2HPO_4 : 2g

CH_3COONa : 5g

Triammonium Citrate: 2g

$MgSO_4$: 0,25g

$MnSO_4$: 0,02g

H2O : 1L

1.4. Môi trường LB

Pepton: 10g

Cao nấm men: 5g

Nacl: 10g

1.5. Môi trường NA

Pepton: 5g

Cao nấm men: 3g

Nacl: 5g

PHỤ LỤC 2. XỬ LÝ SỐ LIỆU TỐI ƯU ĐIỀU KIỆN THU SINH KHỐI TỪ SỢI NẤM GIÀU POLYSACCHARIDE

2.1. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*

PH

One-way ANOVA: pH

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0,05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	4,0. 4,5. 5,0. 5,5. 6,0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	2,95264	0,738160	380,49	0,000
Error	10	0,01940	0,001940		
Total	14	2,97204			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0440454	99,35%	99,09%	98,53%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
4,0	3	4,1133	0,0569	(4,0567. 4,1700)
4,5	3	4,5833	0,0651	(4,5267. 4,6400)
5,0	3	5,42000	0,01000	(5,36334. 5,47666)
5,5	3	5,0533	0,0416	(4,9967. 5,1100)
6,0	3	4,9400	0,0200	(4,8833. 4,9967)

Pooled StDev = 0,0440454

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
5,0	3	5,42000	A
5,5	3	5,0533	B
6,0	3	4,9400	B
4,5	3	4,5833	C
4,0	3	4,1133	D

Means that do not share a letter are significantly different.

GLU

One-way ANOVA: Glu

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0,05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	30. 35. 40. 45. 50

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	2,980	0,7451	6,81	0,007
Error	10	1,094	0,1094		
Total	14	4,074			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,330787	73,14%	62,40%	39,58%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
30	3	4,430	0,500	(4,004. 4,856)
35	3	4,503	0,455	(4,078. 4,929)
40	3	5,630	0,240	(5,204. 6,056)
45	3	5,1933	0,1716	(4,7678. 5,6189)
50	3	4,9933	0,0513	(4,5678. 5,4189)

Pooled StDev = 0,330787

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping	
40	3	5,630	A	
45	3	5,1933	A	B
50	3	4,9933	A	B
35	3	4,503		B
30	3	4,430		B

Means that do not share a letter are significantly different.

CNM

One-way ANOVA: Biomass versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	6.3252	1.58131	49.93	0.000
Error	10	0.3167	0.03167		
Total	14	6.6420			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.177970	95.23%	93.32%	89.27%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
4.0	3	5.7600	0.0900	(5.5311, 5.9889)
4.5	3	6.0600	0.1600	(5.8311, 6.2889)
5.0	3	7.470	0.230	(7.241, 7.699)
5.5	3	6.2533	0.0751	(6.0244, 6.4823)
6.0	3	5.663	0.257	(5.434, 5.892)

Pooled StDev = 0.177970

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping		
5.0	3	7.470	A		
5.5	3	6.2533		B	
4.5	3	6.0600		B	C
4.0	3	5.7600			C
6.0	3	5.663			C

Means that do not share a letter are significantly different.

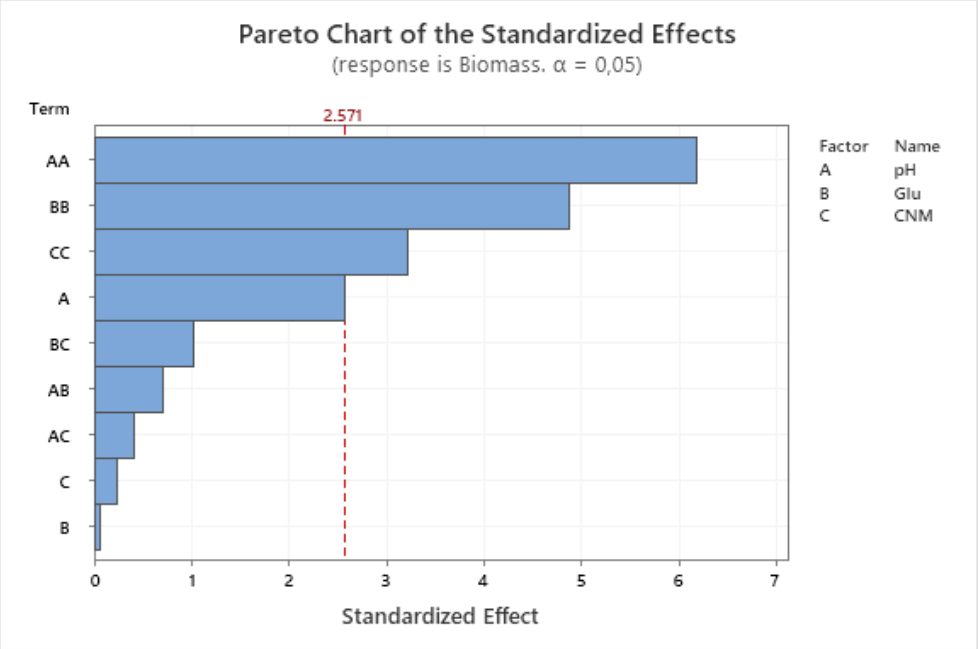
2.2. Tối ưu điều kiện nuôi cấy sinh khối hệ sợi nấm *C. militaris*

Bảng 2.1. Các yếu tố và mức độ thử nghiệm trong Box - Behnken

Các biến độc lập	Mức độ thử nghiệm		
	-1	0	1
pH (X_1)	4	5	6
Glucose g/L (X_2)	30	40	50
Cao nấm men g/L (X_3)	4	5	6

Bảng 2.2. Giá trị phân tích xác suất các biến (khối lượng sinh khối)

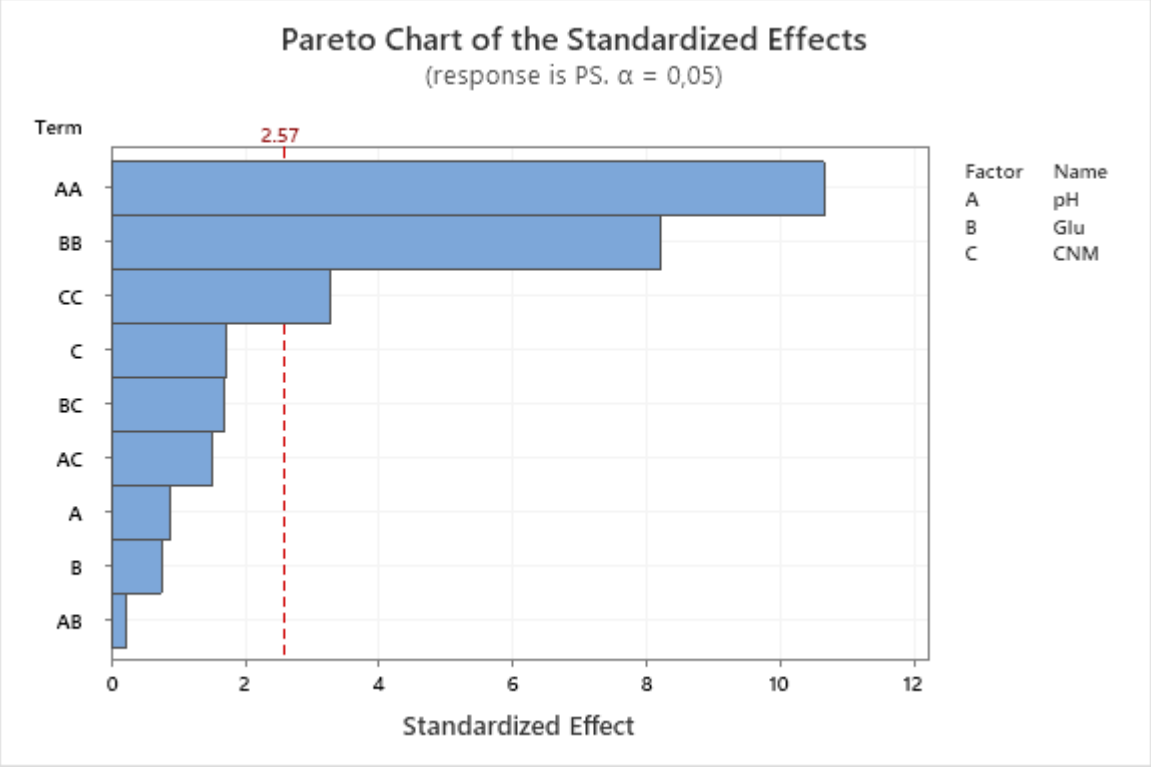
Biến độc lập	Coef	Coef SE	T-value	P-value
X_1	0,729	0,283	2,58	0,050
X_2	-0,016	0,283	-0,06	0,956
X_3	0,068	0,283	0,24	0,821
$X_1 \times X_1$	-2,575	0,416	-6,19	0,002
$X_2 \times X_2$	-2,035	0,416	-4,89	0,005
$X_3 \times X_3$	-1,342	0,416	-3,22	0,023
$X_1 \times X_2$	-0,283	0,400	-0,71	0,511
$X_1 \times X_3$	0,165	0,400	0,41	0,697
$X_2 \times X_3$	-0,410	0,400	-1,03	0,352



Hình 2.1. Biểu đồ Pareto về các hiệu ứng chuẩn hóa đối với hàm lượng sinh khối

Bảng 2.3. Giá trị phân tích xác suất các biến (Hàm lượng PS hệ sợi nấm)

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-46.33	6.63	-6.99	0.001
X_1	10.47	1.43	7.35	0.001
X_2	0.786	0.128	6.16	0.002
X_3	3.82	1.43	2.68	0.044
$X_1 \times X_1$	-1.138	0.121	-9.38	0.000
$X_2 \times X_2$	-0.00885	0.00121	-7.30	0.001
$X_3 \times X_3$	-0.377	0.121	-3.11	0.026
$X_1 \times X_2$	0.0022	0.0116	0.19	0.854
$X_1 \times X_3$	0.150	0.116	1.29	0.254
$X_2 \times X_3$	-0.0167	0.0116	-1.44	0.210



Hình 2.2. Biểu đồ Pareto về các hiệu ứng chuẩn hóa đối với hàm lượng PS

2.3. Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy đến sinh khối hệ sợi nấm *T. Versicolor*

GLUCOSE G.L

One-way ANOVA: Glu

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0,05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	10. 15. 20. 25. 30

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	1,8974	0,47435	43,39	0,000
Error	10	0,1093	0,01093		
Total	14	2,0067			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,104551	94,55%	92,37%	87,74%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
10	3	2,4197	0,0599	(2,2852. 2,5542)
15	3	3,1750	0,0300	(3,0405. 3,3095)
20	3	3,4290	0,0300	(3,2945. 3,5635)
25	3	2,825	0,200	(2,691. 2,959)
30	3	2,6973	0,0962	(2,5628. 2,8318)

Pooled StDev = 0,104551

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping		
20	3	3,4290	A		
15	3	3,1750	A		
25	3	2,825		B	
30	3	2,6973		B	C
10	3	2,4197			C

Means that do not share a letter are significantly different.

PH

One-way ANOVA: pH

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0,05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	4,0. 5,0. 5,5. 6,0. 6,5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	2,27213	0,568032	71,16	0,000
Error	10	0,07983	0,007983		
Total	14	2,35195			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0893450	96,61%	95,25%	92,36%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
4,0	3	2,5150	0,1384	(2,4001. 2,6299)
5,0	3	2,8417	0,1351	(2,7267. 2,9566)
5,5	3	3,57533	0,00451	(3,46040. 3,69027)
6,0	3	3,3760	0,0185	(3,2611. 3,4909)
6,5	3	2,8310	0,0464	(2,7161. 2,9459)

Pooled StDev = 0,0893450

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
5,5	3	3,57533	A
6,0	3	3,3760	A
5,0	3	2,8417	B
6,5	3	2,8310	B
4,0	3	2,5150	C

Means that do not share a letter are significantly different.

CNM G.L

One-way ANOVA: CNM

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0,05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	5	1,0. 1,5. 2,0. 2,5. 3,0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	4	4,4044	1,10110	27,11	0,000
Error	10	0,4062	0,04062		
Total	14	4,8106			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,201540	91,56%	88,18%	81,00%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
1,0	3	2,0960	0,0878	(1,8367. 2,3553)
1,5	3	2,511	0,432	(2,252. 2,770)
2,0	3	3,6710	0,0620	(3,4117. 3,9303)
2,5	3	3,1810	0,0642	(2,9217. 3,4403)
3,0	3	2,9143	0,0282	(2,6551. 3,1736)

Pooled StDev = 0,201540

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping		
2,0	3	3,6710	A		
2,5	3	3,1810	A	B	
3,0	3	2,9143		B	C
1,5	3	2,511			C D
1,0	3	2,0960			D

Means that do not share a letter are significantly different.

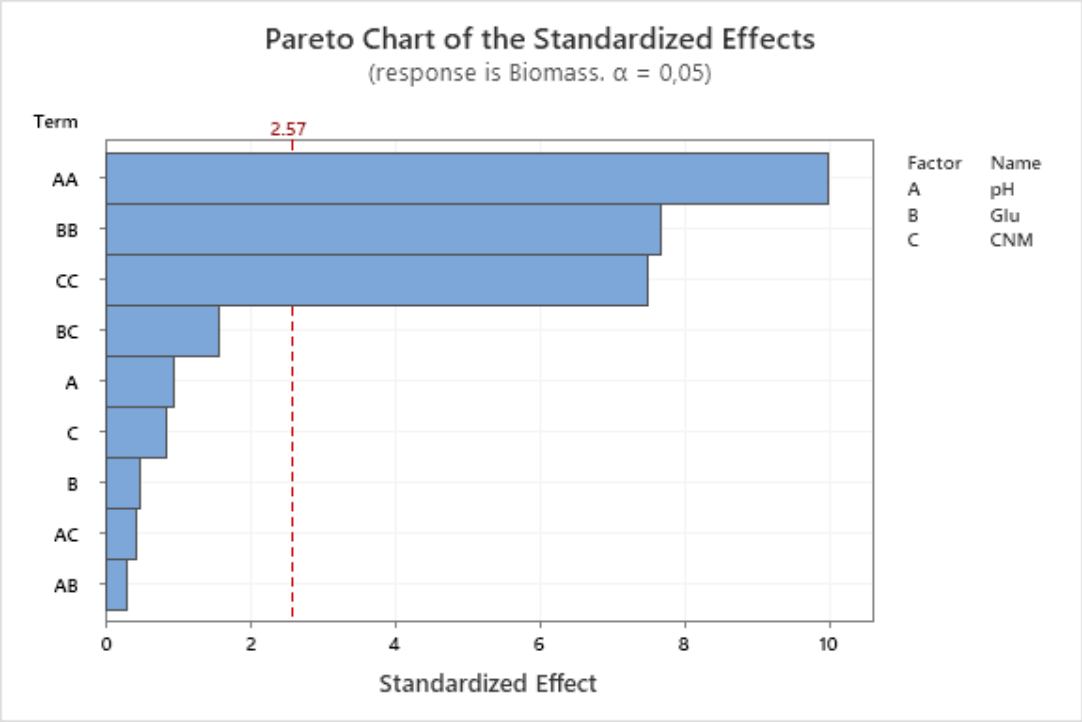
2.4. Tối ưu điều kiện nuôi cấy sinh khối hệ sợi nấm *T. versicolor*

Bảng 2.4. Các yếu tố và mức độ thử nghiệm trong Box - Behnken

Các biến độc lập	Mức độ thử nghiệm		
	-1	0	1
pH (X1)	5	5,5	6
Glucose g/L (X2)	15	20	25
Cao nấm men g/L (X3)	1,5	2	2,5

Bảng 2.5. Giá trị phân tích xác suất các biến (sinh khối)

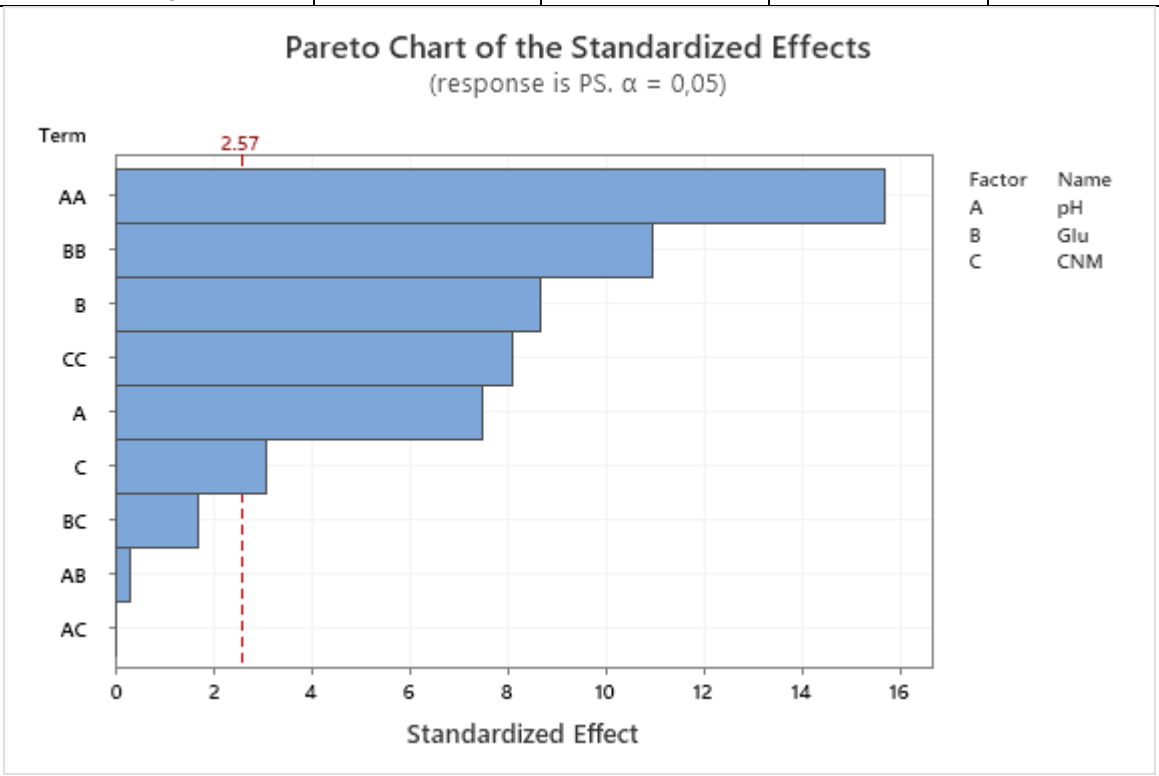
Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-109,1	11,0	-9,94	0,000
X_1	33,74	3,57	9,46	0,000
X_2	0,997	0,217	4,59	0,006
X_3	9,62	2,17	4,43	0,007
$X_1 \times X_1$	-3,099	0,315	-9,85	0,000
$X_2 \times X_2$	-0,02377	0,00315	-7,56	0,001
$X_3 \times X_3$	-2,324	0,315	-7,39	0,001
$X_1 \times X_2$	0,0096	0,0302	0,32	0,764
$X_1 \times X_3$	0,129	0,302	0,43	0,687
$X_2 \times X_3$	-0,0471	0,0302	-1,56	0,180



Hình 2.3. Biểu đồ Pareto về các hiệu ứng chuẩn hóa đối với hàm lượng sinh khối

Bảng 2.6. Giá trị phân tích xác suất các biến (Hàm lượng PS hệ sợi nấm)

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	-227.9	14.6	-15.59	0.000
X_1	73.24	4.75	15.42	0.000
X_2	1.754	0.289	6.06	0.002
X_3	12.61	2.89	4.36	0.007
$X_1 \times X_1$	-6.587	0.419	-15.72	0.000
$X_2 \times X_2$	-0.04597	0.00419	-10.97	0.000
$X_3 \times X_3$	-3.397	0.419	-8.11	0.000
$X_1 \times X_2$	0.0130	0.0402	0.32	0.760
$X_1 \times X_3$	0.010	0.402	0.02	0.981
$X_2 \times X_3$	0.0680	0.0402	1.69	0.152



Hình 2.4. Biểu đồ Pareto về các hiệu ứng chuẩn hóa đối với hàm lượng PS

PHỤ LỤC 3. XỬ LÝ SỐ LIỆU TÁCH CHIẾT TUẦN TỰ VÀ ĐÁNH GIÁ HÌNH THÁI, HOẠT TÍNH KHÁNG OXI HOÁ, PREBIOTIC CỦA CÁC CHIẾT XUẤT PS

3.1. Hàm lượng PS chiết xuất từ nấm

HÀM LƯỢNG PS

One-way ANOVA: ham luong versus nghiem thuc

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
nghiem thuc	6	A-PSC, A-PST, S-PSC, S-PST, W-PSC, W-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
nghiem thuc	5	17703.4	3540.68	430.26	0.000
Error	12	98.7	8.23		
Total	17	17802.2			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.86864	99.45%	99.21%	98.75%

Means

nghiem thuc	N	Mean	StDev	95% CI
A-PSC	3	13.32	3.46	(9.72, 16.93)
A-PST	3	5.467	0.701	(1.858, 9.075)
S-PSC	3	22.53	1.84	(18.92, 26.13)
S-PST	3	4.300	0.826	(0.691, 7.909)
W-PSC	3	81.35	4.22	(77.74, 84.96)
W-PST	3	71.53	3.88	(67.92, 75.14)

Pooled StDev = 2.86864

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

nghiem thuc	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	81.35	A
W-PST	3	71.53	B
S-PSC	3	22.53	C
A-PSC	3	13.32	D
A-PST	3	5.467	D E
S-PST	3	4.300	E

Means that do not share a letter are significantly different.

3.2. Khảo sát khả năng kích thích sự sinh trưởng các probiotic của các phân đoạn PS nấm *C. militaris*

Bảng 3.2. *Sự sinh trưởng các chủng lợi khuẩn bổ sung chiết xuất PS sau 24 giờ*

Chủng	GF	Glucose	FOS	H_2O	HCl	Na_2CO_3
L. pentosus	0.2564	0.7642	0.7573	0.7172	0.6830	0.3847
	0.2680	0.7785	0.7579	0.6877	0.7299	0.3250
	0.2691	0.7883	0.7600	0.6674	0.6855	0.4045
L. plantarum	0.2392	0.7577	0.4070	0.7219	0.7459	0.4435
	0.2384	0.7437	0.4114	0.6965	0.7174	0.3938
	0.2441	0.7421	0.5817	0.4387	0.7777	0.3966
P. acidilactici	0.3889	1.0543	0.7252	0.7784	0.5883	0.6158
	0.3898	1.0673	0.7307	0.6619	0.5605	0.5266
	0.3933	1.0704	0.7325	0.7335	0.7481	0.5492
B. animalis	0.1048	0.6914	0.6798	0.1376	0.2967	0.2451
	0.1066	0.6928	0.6345	0.2766	0.3059	0.1944
	0.1082	0.6873	0.6863	0.3002	0.2908	0.1750
L. casein	0.1252	0.6731	0.5657	0.4638	0.4842	0.1233
	0.1262	0.6733	0.5526	0.4819	0.4651	0.1247
	0.1231	0.6707	0.5591	0.4642	0.4656	0.1384

L. PENTOSUS

One-way ANOVA: GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	2.61926	0.523852	1590.03	0.000
Error	12	0.00395	0.000329		
Total	17	2.62321			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0181511	99.85%	99.79%	99.66%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
GF	3	0.16060	0.00685	(0.13777, 0.18343)
G	3	0.67820	0.01355	(0.65537, 0.70103)
W-PSC	3	0.6069	0.0198	(0.5841, 0.6298)
A-PSC	3	0.6316	0.0302	(0.6088, 0.6544)
S-PSC	3	0.2368	0.0206	(0.2140, 0.2596)
FOS	3	1.33577	0.00426	(1.31293, 1.35860)

Pooled StDev = 0.0181511

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	1.33577	A
G	3	0.67820	B
A-PSC	3	0.6316	B C
W-PSC	3	0.6069	C
S-PSC	3	0.2368	D
GF	3	0.16060	E

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM

One-way ANOVA: GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.70192	0.140384	21.55	0.000
Error	12	0.07816	0.006513		
Total	17	0.78008			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0807035	89.98%	85.81%	77.46%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
GF	3	0.13773	0.00359	(0.03621, 0.23925)
G	3	0.65517	0.01481	(0.55365, 0.75669)
W-PSC	3	0.5285	0.1673	(0.4269, 0.6300)
A-PSC	3	0.6717	0.0187	(0.5702, 0.7732)
S-PSC	3	0.2545	0.0308	(0.1530, 0.3561)
FOS	3	0.4175	0.0978	(0.3159, 0.5190)

Pooled StDev = 0.0807035

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
A-PSC	3	0.6717	A		
G	3	0.65517	A		
W-PSC	3	0.5285	A	B	
FOS	3	0.4175		B	C
S-PSC	3	0.2545			C D
GF	3	0.13773			D

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI

One-way ANOVA: GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.36290	0.272581	91.32	0.000
Error	12	0.03582	0.002985		
Total	17	1.39872			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0546337	97.44%	96.37%	94.24%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
GF	3	0.34083	0.00250	(0.27211, 0.40956)
G	3	1.21060	0.00885	(1.14188, 1.27933)
W-PSC	3	0.6986	0.0606	(0.6298, 0.7673)
A-PSC	3	0.6201	0.1031	(0.5514, 0.6888)
S-PSC	3	0.4692	0.0589	(0.4005, 0.5380)
FOS	3	0.55773	0.00698	(0.48901, 0.62646)

Pooled StDev = 0.0546337

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
G	3	1.21060	A		
W-PSC	3	0.6986		B	
A-PSC	3	0.6201		B	
FOS	3	0.55773		B	C
S-PSC	3	0.4692			C D
GF	3	0.34083			D

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS

One-way ANOVA: GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.62137	0.124274	75.24	0.000
Error	12	0.01982	0.001652		
Total	17	0.64119			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0406399	96.91%	95.62%	93.05%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
GF	3	0.02410	0.00272	(-0.02702, 0.07522)
G	3	0.57780	0.01234	(0.52668, 0.62892)
W-PSC	3	0.1431	0.0896	(0.0920, 0.1942)
A-PSC	3	0.22337	0.00490	(0.17224, 0.27449)
S-PSC	3	0.0742	0.0407	(0.0231, 0.1253)
FOS	3	0.07797	0.00644	(0.02684, 0.12909)

Pooled StDev = 0.0406399

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
G	3	0.57780	A		
A-PSC	3	0.22337		B	
W-PSC	3	0.1431		B	C
FOS	3	0.07797			C D
S-PSC	3	0.0742			C D
GF	3	0.02410			D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN

One-way ANOVA: GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	GF, G, W-PSC, A-PSC, S-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	3.52753	0.705506	8343.43	0.000
Error	12	0.00101	0.000085		
Total	17	3.52855			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0091956	99.97%	99.96%	99.94%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
GF	3	0.05007	0.00186	(0.03850, 0.06163)
G	3	0.57497	0.00310	(0.56340, 0.58653)
W-PSC	3	0.38117	0.01204	(0.36960, 0.39273)
A-PSC	3	0.40457	0.01085	(0.39300, 0.41613)
S-PSC	3	0.01547	0.01190	(0.00390, 0.02703)
FOS	3	1.34753	0.00949	(1.33597, 1.35910)

Pooled StDev = 0.00919556

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	1.34753	A
G	3	0.57497	B
A-PSC	3	0.40457	C
W-PSC	3	0.38117	C
GF	3	0.05007	D
S-PSC	3	0.01547	E

Means that do not share a letter are significantly different.

3.3. Khảo sát khả năng kích thích sự sinh trưởng các probiotic của các chiết xuất PS nấm *T. versicolor*

Bảng 3.1. Sự tăng trưởng của các chủng lợi khuẩn bổ sung chiết xuất sau 24 giờ

Chủng	FOS	Glucose	GF	H_2O	HCl	Na_2CO_3
B. animalis	0,6798	0,6914	0,1019	0,4114	0,5891	0,2112
	0,6345	0,6928	0,1138	0,416	0,5904	0,209
	0,6863	0,6873	0,1224	0,4272	0,5894	0,2025
	0,6363	0,68564	0,09	0,4247	0,5873	0,2197
	0,6361	0,6943	0,1115	0,4287	0,5899	0,2226
	0,6381	0,7213	0,1227	0,433	0,5864	0,2236
L. casein	0,5657	0,6731	0,1245	0,4055	0,6346	0,1757
	0,5526	0,6733	0,1378	0,4167	0,6451	0,1728
	0,5591	0,6707	0,1274	0,4221	0,6543	0,1363
	0,5643	0,6821	0,1252	0,3744	0,6936	0,1214
	0,5743	0,6796	0,1262	0,3818	0,7076	0,1301
	0,5578	0,6767	0,1231	0,3832	0,7058	0,138
P. acidilactici	0,7112	1,05429	0,3889	0,4834	0,7078	0,4532
	0,7123	1,06732	0,3898	0,4832	0,71	0,4357
	0,713	1,0704	0,3933	0,4818	0,7162	0,4634
	0,7252	1,121	0,3672	0,4841	0,7165	0,4689
	0,7307	1,021	0,3908	0,4827	0,7212	0,4734
	0,7325	0,9987	0,3878	0,4853	0,7205	0,4554
L. pentosus	0,7573	0,7642	0,25643	0,534	0,677	0,5857
	0,7579	0,7785	0,26802	0,5371	0,6822	0,5878
	0,76	0,7883	0,26908	0,5388	0,6819	0,6083
	0,7633	0,823	0,26392	0,5387	0,6664	0,6103
	0,7784	0,757	0,26008	0,5406	0,6737	0,5988
	0,781	0,7769	0,26074	0,5405	0,6757	0,6001
L. plantarum	0,407	0,7577	0,23921	0,5733	0,6411	0,5325
	0,4114	0,7437	0,23842	0,5791	0,6399	0,536
	0,5817	0,7421	0,24413	0,5813	0,6422	0,5353
	0,474	0,7613	0,26653	0,5763	0,6439	0,5285
	0,473	0,7537	0,26342	0,582	0,6443	0,5324
	0,532	0,7672	0,26444	0,6444	0,5794	0,5369

BIFIDO

One-way ANOVA: FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.74949	0.349898	1977.75	0.000
Error	30	0.00531	0.000177		
Total	35	1.75480			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0133010	99.70%	99.65%	99.56%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
FOS	6	0.65185	0.02428	(0.64076, 0.66294)
Glu	6	0.69546	0.01308	(0.68437, 0.70655)
GF	6	0.11038	0.01262	(0.09929, 0.12147)
W-PST	6	0.42350	0.00819	(0.41241, 0.43459)
A-PST	6	0.588750	0.001563	(0.577660, 0.599840)
S-PST	6	0.21477	0.00849	(0.20368, 0.22586)

Pooled StDev = 0.0133010

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Glu	6	0.69546	A
FOS	6	0.65185	B
A-PST	6	0.588750	C
W-PST	6	0.42350	D
S-PST	6	0.21477	E
GF	6	0.11038	F

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM

One-way ANOVA: FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.86486	0.172972	210.28	0.000
Error	30	0.02468	0.000823		
Total	35	0.88954			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0286806	97.23%	96.76%	96.01%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
FOS	6	0.4799	0.0681	(0.4559, 0.5038)
Glu	6	0.75428	0.00988	(0.73037, 0.77820)
GF	6	0.25269	0.01344	(0.22878, 0.27660)
W-PST	6	0.57857	0.00326	(0.55465, 0.60248)
A-PST	6	0.642633	0.001872	(0.618721, 0.666546)
S-PST	6	0.53360	0.00310	(0.50969, 0.55751)

Pooled StDev = 0.0286806

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Glu	6	0.75428	A
A-PST	6	0.642633	B
W-PST	6	0.57857	C
S-PST	6	0.53360	C
FOS	6	0.4799	D
GF	6	0.25269	E

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS

One-way ANOVA: FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.10155	0.220310	1612.46	0.000
Error	30	0.00410	0.000137		
Total	35	1.10565			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0116889	99.63%	99.57%	99.47%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
FOS	6	0.76632	0.01061	(0.75657, 0.77606)
Glu	6	0.78132	0.02323	(0.77157, 0.79106)
GF	6	0.26305	0.00489	(0.25330, 0.27279)
W-PST	6	0.53828	0.00247	(0.52854, 0.54803)
A-PST	6	0.67615	0.00586	(0.66640, 0.68590)
S-PST	6	0.59850	0.01016	(0.58875, 0.60825)

Pooled StDev = 0.0116889

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Glu	6	0.78132	A
FOS	6	0.76632	A
A-PST	6	0.67615	B
S-PST	6	0.59850	C
W-PST	6	0.53828	D
GF	6	0.26305	E

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI

One-way ANOVA: FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.83977	0.367953	996.99	0.000
Error	30	0.01107	0.000369		
Total	35	1.85084			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0192110	99.40%	99.30%	99.14%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
FOS	6	0.72082	0.00979	(0.70480, 0.73683)
Glu	6	1.0555	0.0426	(1.0394, 1.0715)
GF	6	0.38630	0.00954	(0.37028, 0.40232)
W-PST	6	0.483417	0.001199	(0.467399, 0.499434)
A-PST	6	0.71537	0.00545	(0.69935, 0.73138)
S-PST	6	0.45833	0.01350	(0.44232, 0.47435)

Pooled StDev = 0.0192110

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Glu	6	1.0555	A
FOS	6	0.72082	B
A-PST	6	0.71537	B
W-PST	6	0.483417	C
S-PST	6	0.45833	C
GF	6	0.38630	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN

One-way ANOVA: FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	FOS, Glu, GF, W-PST, A-PST, S-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.86446	0.372893	1069.85	0.000
Error	30	0.01046	0.000349		
Total	35	1.87492			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0186694	99.44%	99.35%	99.20%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
FOS	6	0.56230	0.00754	(0.54673, 0.57787)
Glu	6	0.67592	0.00435	(0.66035, 0.69148)
GF	6	0.12737	0.00532	(0.11180, 0.14293)
W-PST	6	0.39728	0.02011	(0.38172, 0.41285)
A-PST	6	0.6735	0.0326	(0.6579, 0.6891)
S-PST	6	0.14572	0.02287	(0.13015, 0.16128)

Pooled StDev = 0.0186694

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
Glu	6	0.67592	A
A-PST	6	0.6735	A
FOS	6	0.56230	B
W-PST	6	0.39728	C
S-PST	6	0.14572	D
GF	6	0.12737	D

Means that do not share a letter are significantly different.

3.4. Chỉ số prebiotic các chiết xuất PS nấm *T. versicolor*

BIFIDO

One-way ANOVA: PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	2.40373	0.801244	373.31	0.000
Error	20	0.04293	0.002146		
Total	23	2.44666			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0463283	98.25%	97.98%	97.47%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
PI(FOS)	6	0.7600	0.0723	(0.7206, 0.7995)
PI(A-PST)	6	0.85120	0.02432	(0.81175, 0.89065)
PI(S-PST)	6	0.0685	0.0450	(0.0290, 0.1079)
PI(W-PST)	6	0.3463	0.0272	(0.3069, 0.3858)

Pooled StDev = 0.0463283

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
PI(A-PST)	6	0.85120	A
PI(FOS)	6	0.7600	B
PI(W-PST)	6	0.3463	C
PI(S-PST)	6	0.0685	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM

One-way ANOVA: PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0.1274	0.042475	6.70	0.003
Error	20	0.1267	0.006337		
Total	23	0.2542			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0796070	50.13%	42.65%	28.19%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
PI(FOS)	6	0.2791	0.1360	(0.2113, 0.3469)
PI(A-PST)	6	0.3078	0.0616	(0.2400, 0.3756)
PI(S-PST)	6	0.3793	0.0414	(0.3115, 0.4471)
PI(W-PST)	6	0.4678	0.0365	(0.4000, 0.5356)

Pooled StDev = 0.0796070

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping	
PI(W-PST)	6	0.4678	A	
PI(S-PST)	6	0.3793	A	B
PI(A-PST)	6	0.3078		B
PI(FOS)	6	0.2791		B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS

One-way ANOVA: PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0.76088	0.253626	166.16	0.000
Error	20	0.03053	0.001526		
Total	23	0.79141			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0390692	96.14%	95.56%	94.45%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
PI(FOS)	6	0.7817	0.0488	(0.7484, 0.8150)
PI(A-PST)	6	0.6785	0.0496	(0.6453, 0.7118)
PI(S-PST)	6	0.50216	0.02329	(0.46889, 0.53543)
PI(W-PST)	6	0.3138	0.0269	(0.2806, 0.3471)

Pooled StDev = 0.0390692

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
PI(FOS)	6	0.7817	A
PI(A-PST)	6	0.6785	B
PI(S-PST)	6	0.50216	C
PI(W-PST)	6	0.3138	D

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI

One-way ANOVA: PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	0.67722	0.225740	210.44	0.000
Error	20	0.02145	0.001073		
Total	23	0.69867			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0327520	96.93%	96.47%	95.58%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
PI(FOS)	6	0.27699	0.02007	(0.24910, 0.30489)
PI(A-PST)	6	0.4699	0.0349	(0.4420, 0.4978)
PI(S-PST)	6	0.0708	0.0334	(0.0429, 0.0987)
PI(W-PST)	6	0.0622	0.0394	(0.0343, 0.0901)

Pooled StDev = 0.0327520

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
PI(A-PST)	6	0.4699	A		
PI(FOS)	6	0.27699		B	
PI(S-PST)	6	0.0708			C
PI(W-PST)	6	0.0622			C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN

One-way ANOVA: PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	PI(FOS), PI(A-PST), PI(S-PST), PI(W-PST)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	2.79554	0.931846	610.72	0.000
Error	20	0.03052	0.001526		
Total	23	2.82605			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0390616	98.92%	98.76%	98.45%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
PI(FOS)	6	0.57585	0.02270	(0.54258, 0.60911)
PI(A-PST)	6	0.9352	0.0404	(0.9019, 0.9684)
PI(S-PST)	6	0.0403	0.0412	(0.0070, 0.0735)
PI(W-PST)	6	0.2335	0.0475	(0.2003, 0.2668)

Pooled StDev = 0.0390616

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
PI(A-PST)	6	0.9352	A
PI(FOS)	6	0.57585	B
PI(W-PST)	6	0.2335	C
PI(S-PST)	6	0.0403	D

Means that do not share a letter are significantly different.

3.5. Khảo sát khả năng kháng tiêu hoá các PS nấm

KHÁNG TIÊU

One-way ANOVA: % versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	7	A-PSC, A-PST, FOS, S-PSC, S-PST, W-PSC, W-PST

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	6	311.38	51.8961	56.00	0.000
Error	14	12.98	0.9268		
Total	20	324.35			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.962699	96.00%	94.29%	91.00%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
A-PSC	3	10.140	0.948	(8.948, 11.332)
A-PST	3	15.054	0.964	(13.862, 16.246)
FOS	3	8.751	0.336	(7.559, 9.943)
S-PSC	3	2.069	0.568	(0.877, 3.261)
S-PST	3	4.457	0.539	(3.265, 5.649)
W-PSC	3	6.955	1.081	(5.763, 8.147)
W-PST	3	8.288	1.662	(7.096, 9.480)

Pooled StDev = 0.962699

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
A-PST	3	15.054	A
A-PSC	3	10.140	B
FOS	3	8.751	B C
W-PST	3	8.288	B C
W-PSC	3	6.955	C D
S-PST	3	4.457	D E
S-PSC	3	2.069	E

Means that do not share a letter are significantly different.

3.6. Khả năng chống lại vi khuẩn gây hại của môi trường nuôi cấy *L. plantarum* WCFS1 bổ sung PS chiết xuất từ nấm *C. militaris*

E. COLI ĐT 24H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	43.761	10.9402	17.16	0.000
Error	10	6.376	0.6376		
Total	14	50.137			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.798507	87.28%	82.20%	71.39%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	27.060	1.211	(26.033, 28.087)
CT2	3	25.670	0.666	(24.643, 26.697)
CT3	3	26.997	0.384	(25.969, 28.024)
CT4	3	26.493	0.915	(25.466, 27.521)
CT5	3	22.470	0.541	(21.443, 23.497)

Pooled StDev = 0.798507

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT1	3	27.060	A
CT3	3	26.997	A
CT4	3	26.493	A
CT2	3	25.670	A
CT5	3	22.470	B

Means that do not share a letter are significantly different.

E. COLI ĐT 48H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	15.113	3.7783	11.77	0.001
Error	10	3.211	0.3211		
Total	14	18.324			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.566639	82.48%	75.47%	60.58%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	27.680	0.619	(26.951, 28.409)
CT2	3	27.213	0.401	(26.484, 27.942)
CT3	3	27.113	0.391	(26.384, 27.842)
CT4	3	28.660	0.823	(27.931, 29.389)
CT5	3	25.563	0.481	(24.834, 26.292)

Pooled StDev = 0.566639

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT4	3	28.660	A		
CT1	3	27.680	A	B	
CT2	3	27.213	A	B	
CT3	3	27.113		B	
CT5	3	25.563			C

Means that do not share a letter are significantly different.

S. AUREUS ĐT 24H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	30.701	7.6751	35.73	0.000
Error	10	2.148	0.2148		
Total	14	32.849			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.463487	93.46%	90.84%	85.29%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	26.927	0.499	(26.330, 27.523)
CT2	3	26.467	0.297	(25.870, 27.063)
CT3	3	24.883	0.403	(24.287, 25.480)
CT4	3	27.220	0.658	(26.624, 27.816)
CT5	3	23.420	0.375	(22.824, 24.016)

Pooled StDev = 0.463487

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT4	3	27.220	A
CT1	3	26.927	A
CT2	3	26.467	A
CT3	3	24.883	B
CT5	3	23.420	C

Means that do not share a letter are significantly different.

S. AUREUS ĐT 48H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	25.492	6.3731	35.17	0.000
Error	10	1.812	0.1812		
Total	14	27.305			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.425707	93.36%	90.71%	85.07%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	25.010	0.353	(24.462, 25.558)
CT2	3	23.800	0.469	(23.252, 24.348)
CT3	3	24.630	0.420	(24.082, 25.178)
CT4	3	26.270	0.377	(25.722, 26.818)
CT5	3	22.347	0.492	(21.799, 22.894)

Pooled StDev = 0.425707

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT4	3	26.270	A		
CT1	3	25.010		B	
CT3	3	24.630		B	C
CT2	3	23.800			C
CT5	3	22.347			

Means that do not share a letter are significantly different.

3.7. Khả năng chống lại vi khuẩn gây hại của môi trường nuôi cấy *L. plantarum* WCFS1 bổ sung PS chiết xuất từ nấm *T. versicolor*

E. COLI VC 24H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	52.605	13.1513	35.27	0.000
Error	10	3.729	0.3729		
Total	14	56.334			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.610677	93.38%	90.73%	85.11%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	28.280	0.298	(27.494, 29.066)
CT2	3	28.473	0.853	(27.688, 29.259)
CT3	3	28.477	0.623	(27.691, 29.262)
CT4	3	28.857	0.344	(28.071, 29.642)
CT5	3	23.863	0.736	(23.078, 24.649)

Pooled StDev = 0.610677

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT4	3	28.857	A
CT3	3	28.477	A
CT2	3	28.473	A
CT1	3	28.280	A
CT5	3	23.863	B

Means that do not share a letter are significantly different.

E. COLI VC 48H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	26.532	6.6330	18.59	0.000
Error	10	3.568	0.3568		
Total	14	30.100			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.597344	88.15%	83.40%	73.33%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	27.880	0.760	(27.112, 28.648)
CT2	3	26.907	0.387	(26.138, 27.675)
CT3	3	27.743	0.294	(26.975, 28.512)
CT4	3	27.653	0.924	(26.885, 28.422)
CT5	3	24.330	0.341	(23.562, 25.098)

Pooled StDev = 0.597344

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT1	3	27.880	A
CT3	3	27.743	A
CT4	3	27.653	A
CT2	3	26.907	A
CT5	3	24.330	B

Means that do not share a letter are significantly different.

S. AUREUS VC 24H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	42.126	10.5315	30.28	0.000
Error	10	3.478	0.3478		
Total	14	45.604			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.589723	92.37%	89.32%	82.84%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	28.473	0.809	(27.715, 29.232)
CT2	3	27.350	0.676	(26.591, 28.109)
CT3	3	26.600	0.560	(25.841, 27.359)
CT4	3	27.530	0.248	(26.771, 28.289)
CT5	3	23.573	0.503	(22.815, 24.332)

Pooled StDev = 0.589723

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT1	3	28.473	A		
CT4	3	27.530	A	B	
CT2	3	27.350	A	B	
CT3	3	26.600		B	
CT5	3	23.573			C

Means that do not share a letter are significantly different.

S. AUREUS VC 48H

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	5	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	4	28.5463	7.13658	72.10	0.000
Error	10	0.9898	0.09898		
Total	14	29.5361			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.314611	96.65%	95.31%	92.46%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	27.037	0.250	(26.632, 27.441)
CT2	3	26.050	0.352	(25.645, 26.455)
CT3	3	27.493	0.496	(27.089, 27.898)
CT4	3	28.1900	0.1539	(27.7853, 28.5947)
CT5	3	24.213	0.199	(23.809, 24.618)

Pooled StDev = 0.314611

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT4	3	28.1900	A
CT3	3	27.493	A B
CT1	3	27.037	B
CT2	3	26.050	C
CT5	3	24.213	D

Means that do not share a letter are significantly different.

3.8. Hàm lượng SCFA tạo ra khi nuôi probiotic trong môi trường bổ sung PS chiết xuất sợi nấm *T. versicolor*

L. CASEIN VC BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	9112582	3037527	1630.05	0.000
Error	8	14908	1863		
Total	11	9127489			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
43.1677	99.84%	99.78%	99.63%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	4772.9	67.9	(4715.4, 4830.4)
S-PST	3	4516.8	18.3	(4459.3, 4574.3)
A-PST	3	6684.4	33.4	(6626.9, 6741.8)
FOS	3	4768.9	37.4	(4711.4, 4826.4)

Pooled StDev = 43.1677

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PST	3	6684.4	A
W-PST	3	4772.9	B
FOS	3	4768.9	B
S-PST	3	4516.8	C

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS VC BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	12188510	4062837	3302.06	0.000
Error	8	9843	1230		
Total	11	12198353			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
35.0770	99.92%	99.89%	99.82%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	6394.3	39.3	(6347.6, 6441.0)
S-PST	3	4272.7	33.8	(4226.0, 4319.4)
A-PST	3	6771.9	37.8	(6725.2, 6818.6)
FOS	3	6572.8	28.5	(6526.1, 6619.5)

Pooled StDev = 35.0770

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PST	3	6771.9	A
FOS	3	6572.8	B
W-PST	3	6394.3	C
S-PST	3	4272.7	D

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI VC BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	24510040	8170013	10820.83	0.000
Error	8	6040	755		
Total	11	24516080			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
27.4777	99.98%	99.97%	99.94%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	3197.14	16.72	(3160.56, 3233.73)
S-PST	3	3623.7	32.5	(3587.1, 3660.3)
A-PST	3	6838.2	33.7	(6801.6, 6874.8)
FOS	3	3980.4	23.5	(3943.8, 4017.0)

Pooled StDev = 27.4777

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PST	3	6838.2	A
FOS	3	3980.4	B
S-PST	3	3623.7	C
W-PST	3	3197.14	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM VC BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	11285193	3761731	3411.90	0.000
Error	8	8820	1103		
Total	11	11294013			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
33.2044	99.92%	99.89%	99.82%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	6748.0	44.9	(6703.8, 6792.3)
S-PST	3	4587.4	20.8	(4543.2, 4631.6)
A-PST	3	4766.3	31.4	(4722.1, 4810.5)
FOS	3	4280.4	31.3	(4236.2, 4324.6)

Pooled StDev = 33.2044

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PST	3	6748.0	A
A-PST	3	4766.3	B
S-PST	3	4587.4	C
FOS	3	4280.4	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS VC BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	2649110	883037	363.28	0.000
Error	8	19446	2431		
Total	11	2668555			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
49.3024	99.27%	99.00%	98.36%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	3656.2	34.0	(3590.6, 3721.8)
S-PST	3	4173.4	37.1	(4107.8, 4239.1)
A-PST	3	4771.9	62.3	(4706.3, 4837.5)
FOS	3	4788.8	57.5	(4723.2, 4854.4)

Pooled StDev = 49.3024

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	4788.8	A
A-PST	3	4771.9	A
S-PST	3	4173.4	B
W-PST	3	3656.2	C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS VC PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	6237	2078.9	15.83	0.001
Error	8	1051	131.4		
Total	11	7288			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
11.4615	85.58%	80.17%	67.55%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	159.77	6.83	(144.51, 175.03)
S-PST	3	167.06	8.34	(151.80, 182.32)
A-PST	3	156.58	7.44	(141.32, 171.84)
FOS	3	213.0	18.8	(197.8, 228.3)

Pooled StDev = 11.4615

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	213.0	A
S-PST	3	167.06	B
W-PST	3	159.77	B
A-PST	3	156.58	B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM VC PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	106458	35486.0	570.61	0.000
Error	8	498	62.2		
Total	11	106956			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
7.88605	99.53%	99.36%	98.95%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	367.11	9.43	(356.61, 377.61)
S-PST	3	149.37	7.61	(138.87, 159.87)
A-PST	3	151.88	3.38	(141.38, 162.38)
FOS	3	147.60	9.52	(137.10, 158.10)

Pooled StDev = 7.88605

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PST	3	367.11	A
A-PST	3	151.88	B
S-PST	3	149.37	B
FOS	3	147.60	B

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI VC PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	62808.9	20936.3	562.61	0.000
Error	8	297.7	37.2		
Total	11	63106.6			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6.10023	99.53%	99.35%	98.94%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	159.85	4.30	(151.73, 167.97)
S-PST	3	169.33	6.14	(161.21, 177.46)
A-PST	3	325.32	6.46	(317.20, 333.45)
FOS	3	148.23	7.15	(140.11, 156.36)

Pooled StDev = 6.10023

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
A-PST	3	325.32	A		
S-PST	3	169.33		B	
W-PST	3	159.85		B	C
FOS	3	148.23			C

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS VC PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	68380.8	22793.6	749.41	0.000
Error	8	243.3	30.4		
Total	11	68624.1			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5.51501	99.65%	99.51%	99.20%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	328.84	4.95	(321.50, 336.19)
S-PST	3	140.72	3.01	(133.38, 148.07)
A-PST	3	246.96	2.77	(239.62, 254.30)
FOS	3	320.49	8.97	(313.15, 327.84)

Pooled StDev = 5.51501

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
W-PST	3	328.84	A		
FOS	3	320.49	A		
A-PST	3	246.96		B	
S-PST	3	140.72			C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN VC PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	54524.8	18174.9	239.80	0.000
Error	8	606.3	75.8		
Total	11	55131.2			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
8.70582	98.90%	98.49%	97.53%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	161.03	15.64	(149.44, 172.62)
S-PST	3	161.04	6.11	(149.45, 172.63)
A-PST	3	313.01	3.05	(301.42, 324.60)
FOS	3	150.84	3.43	(139.25, 162.43)

Pooled StDev = 8.70582

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PST	3	313.01	A
S-PST	3	161.04	B
W-PST	3	161.03	B
FOS	3	150.84	B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM VC ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	881410	293803	245.77	0.000
Error	8	9563	1195		
Total	11	890973			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
34.5749	98.93%	98.52%	97.58%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	5539.9	33.1	(5493.8, 5585.9)
S-PST	3	6074.7	32.0	(6028.6, 6120.7)
A-PST	3	6237.3	39.5	(6191.3, 6283.4)
FOS	3	6142.1	33.2	(6096.0, 6188.1)

Pooled StDev = 34.5749

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
A-PST	3	6237.3	A		
FOS	3	6142.1		B	
S-PST	3	6074.7		B	
W-PST	3	5539.9			C

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI VC ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	5367497	1789166	808.43	0.000
Error	8	17705	2213		
Total	11	5385202			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
47.0441	99.67%	99.55%	99.26%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	7219.0	58.4	(7156.3, 7281.6)
S-PST	3	6345.6	39.6	(6283.0, 6408.3)
A-PST	3	5337.2	37.2	(5274.6, 5399.9)
FOS	3	6445.3	49.9	(6382.7, 6507.9)

Pooled StDev = 47.0441

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PST	3	7219.0	A
FOS	3	6445.3	B
S-PST	3	6345.6	B
A-PST	3	5337.2	C

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS VC ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	2654441	884814	330.69	0.000
Error	8	21405	2676		
Total	11	2675846			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
51.7270	99.20%	98.90%	98.20%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	5029.5	51.4	(4960.7, 5098.4)
S-PST	3	6247.4	70.4	(6178.5, 6316.3)
A-PST	3	6047.9	48.3	(5979.0, 6116.8)
FOS	3	5570.0	27.9	(5501.2, 5638.9)

Pooled StDev = 51.7270

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
S-PST	3	6247.4	A
A-PST	3	6047.9	B
FOS	3	5570.0	C
W-PST	3	5029.5	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L.CASEIN VC ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	68037	22679	6.18	0.018
Error	8	29362	3670		
Total	11	97399			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
60.5830	69.85%	58.55%	32.17%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	6245.5	49.5	(6164.9, 6326.2)
S-PST	3	6401.3	42.6	(6320.7, 6482.0)
A-PST	3	6220.4	91.2	(6139.7, 6301.0)
FOS	3	6221.1	45.7	(6140.5, 6301.8)

Pooled StDev = 60.5830

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping	
S-PST	3	6401.3	A	
W-PST	3	6245.5	A	B
FOS	3	6221.1		B
A-PST	3	6220.4		B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS VC ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PST, S-PST, A-PST, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	1660469	553490	325.87	0.000
Error	8	13588	1699		
Total	11	1674057			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
41.2129	99.19%	98.88%	98.17%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PST	3	6860.8	25.4	(6805.9, 6915.7)
S-PST	3	6031.6	37.6	(5976.7, 6086.4)
A-PST	3	6283.0	43.1	(6228.1, 6337.9)
FOS	3	5886.0	53.6	(5831.1, 5940.8)

Pooled StDev = 41.2129

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PST	3	6860.8	A
A-PST	3	6283.0	B
S-PST	3	6031.6	C
FOS	3	5886.0	D

Means that do not share a letter are significantly different.

3.9. Hàm lượng SCFA tạo ra khi nuôi probiotic trong môi trường bổ sung PS chiết xuất sợi nấm *C. militaris*

L. PENTOSUS - ĐT - BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	9052780	3017593	1030.27	0.000
Error	8	23432	2929		
Total	11	9076212			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
54.1198	99.74%	99.65%	99.42%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	6462.8	64.0	(6390.8, 6534.9)
S-PSC	3	4180.8	52.0	(4108.7, 4252.8)
A-PSC	3	4597.3	40.2	(4525.2, 4669.3)
FOS	3	4788.8	57.5	(4716.8, 4860.9)

Pooled StDev = 54.1198

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	6462.8	A
FOS	3	4788.8	B
A-PSC	3	4597.3	C
S-PSC	3	4180.8	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM - ĐT - BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	18984713	6328238	2743.58	0.000
Error	8	18452	2307		
Total	11	19003165			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
48.0267	99.90%	99.87%	99.78%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	6506.9	69.7	(6443.0, 6570.9)
S-PSC	3	3867.6	34.9	(3803.6, 3931.5)
A-PSC	3	6635.0	46.6	(6571.0, 6698.9)
FOS	3	4280.4	31.3	(4216.5, 4344.4)

Pooled StDev = 48.0267

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PSC	3	6635.0	A
W-PSC	3	6506.9	B
FOS	3	4280.4	C
S-PSC	3	3867.6	D

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI - ĐT - BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	12515305	4171768	1962.79	0.000
Error	8	17003	2125		
Total	11	12532309			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
46.1024	99.86%	99.81%	99.69%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	6360.5	63.2	(6299.1, 6421.9)
S-PSC	3	3836.5	35.9	(3775.1, 3897.9)
A-PSC	3	4274.1	51.7	(4212.7, 4335.4)
FOS	3	3980.4	23.5	(3919.0, 4041.8)

Pooled StDev = 46.1024

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	6360.5	A
A-PSC	3	4274.1	B
FOS	3	3980.4	C
S-PSC	3	3836.5	D

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS - ĐT - BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	18305518	6101839	1883.99	0.000
Error	8	25910	3239		
Total	11	18331428			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
56.9104	99.86%	99.81%	99.68%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	3612.7	58.4	(3536.9, 3688.5)
S-PSC	3	3704.2	65.4	(3628.4, 3780.0)
A-PSC	3	3867.9	66.8	(3792.1, 3943.7)
FOS	3	6572.8	28.5	(6497.0, 6648.5)

Pooled StDev = 56.9104

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	6572.8	A
A-PSC	3	3867.9	B
S-PSC	3	3704.2	C
W-PSC	3	3612.7	C

Means that do not share a letter are significantly different.

L.CASEIN - ĐT - BUTYRIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	17949801	5983267	2332.29	0.000
Error	8	20523	2565		
Total	11	17970324			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
50.6498	99.89%	99.84%	99.74%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	6603.7	29.3	(6536.3, 6671.1)
S-PSC	3	3148.0	51.2	(3080.5, 3215.4)
A-PSC	3	4762.0	73.4	(4694.5, 4829.4)
FOS	3	4768.9	37.4	(4701.5, 4836.3)

Pooled StDev = 50.6498

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	6603.7	A
FOS	3	4768.9	B
A-PSC	3	4762.0	B
S-PSC	3	3148.0	C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS - ĐT - PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	57703.3	19234.4	179.89	0.000
Error	8	855.4	106.9		
Total	11	58558.7			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
10.3404	98.54%	97.99%	96.71%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	326.01	4.10	(312.24, 339.78)
S-PSC	3	166.17	6.63	(152.41, 179.94)
A-PSC	3	147.65	3.60	(133.88, 161.42)
FOS	3	213.0	18.8	(199.3, 226.8)

Pooled StDev = 10.3404

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	326.01	A
FOS	3	213.0	B
S-PSC	3	166.17	C
A-PSC	3	147.65	C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM - ĐT - PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	44235.7	14745.2	473.22	0.000
Error	8	249.3	31.2		
Total	11	44484.9			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5.58208	99.44%	99.23%	98.74%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	247.46	4.53	(240.03, 254.89)
S-PSC	3	138.31	2.08	(130.88, 145.74)
A-PSC	3	277.26	3.03	(269.83, 284.70)
FOS	3	147.60	9.52	(140.17, 155.03)

Pooled StDev = 5.58208

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PSC	3	277.26	A
W-PSC	3	247.46	B
FOS	3	147.60	C
S-PSC	3	138.31	C

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI - ĐT - PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	67502.9	22501.0	524.34	0.000
Error	8	343.3	42.9		
Total	11	67846.2			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6.55078	99.49%	99.30%	98.86%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	328.97	5.74	(320.25, 337.69)
S-PSC	3	164.78	8.39	(156.06, 173.50)
A-PSC	3	155.87	4.14	(147.15, 164.59)
FOS	3	148.23	7.15	(139.51, 156.95)

Pooled StDev = 6.55078

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	328.97	A
S-PSC	3	164.78	B
A-PSC	3	155.87	B
FOS	3	148.23	B

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS - ĐT - PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	57405.1	19135.0	489.07	0.000
Error	8	313.0	39.1		
Total	11	57718.1			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6.25499	99.46%	99.25%	98.78%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	167.27	3.13	(158.94, 175.59)
S-PSC	3	161.52	6.02	(153.19, 169.85)
A-PSC	3	154.53	5.48	(146.20, 162.85)
FOS	3	320.49	8.97	(312.17, 328.82)

Pooled StDev = 6.25499

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
FOS	3	320.49	A
W-PSC	3	167.27	B
S-PSC	3	161.52	B
A-PSC	3	154.53	B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN - ĐT - PROPIONIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	56126.4	18708.8	557.30	0.000
Error	8	268.6	33.6		
Total	11	56395.0			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
5.79402	99.52%	99.35%	98.93%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	311.42	6.30	(303.70, 319.13)
S-PSC	3	159.57	8.58	(151.86, 167.29)
A-PSC	3	150.67	3.02	(142.96, 158.39)
FOS	3	150.84	3.43	(143.13, 158.55)

Pooled StDev = 5.79402

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
W-PSC	3	311.42	A
S-PSC	3	159.57	B
FOS	3	150.84	B
A-PSC	3	150.67	B

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PENTOSUS - ĐT - ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	337694	112565	92.84	0.000
Error	8	9700	1212		
Total	11	347394			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
34.8205	97.21%	96.16%	93.72%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	5649.4	22.9	(5603.0, 5695.8)
S-PSC	3	6053.7	26.8	(6007.4, 6100.1)
A-PSC	3	6063.2	27.1	(6016.8, 6109.5)
FOS	3	5886.0	53.6	(5839.6, 5932.3)

Pooled StDev = 34.8205

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PSC	3	6063.2	A
S-PSC	3	6053.7	A
FOS	3	5886.0	B
W-PSC	3	5649.4	C

Means that do not share a letter are significantly different.

L. PLANTARUM - ĐT - ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	1175805	391935	376.25	0.000
Error	8	8333	1042		
Total	11	1184138			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
32.2752	99.30%	99.03%	98.42%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	5532.9	22.8	(5489.9, 5575.9)
S-PSC	3	6320.2	19.1	(6277.2, 6363.2)
A-PSC	3	5737.5	46.7	(5694.6, 5780.5)
FOS	3	6142.1	33.2	(6099.1, 6185.0)

Pooled StDev = 32.2752

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
S-PSC	3	6320.2	A
FOS	3	6142.1	B
A-PSC	3	5737.5	C
W-PSC	3	5532.9	D

Means that do not share a letter are significantly different.

P. ACIDILACTICI - ĐT - ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	5861837	1953946	1770.00	0.000
Error	8	8831	1104		
Total	11	5870669			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
33.2254	99.85%	99.79%	99.66%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	5044.3	29.3	(5000.1, 5088.6)
S-PSC	3	6575.8	24.0	(6531.5, 6620.0)
A-PSC	3	6848.3	22.3	(6804.0, 6892.5)
FOS	3	6445.3	49.9	(6401.1, 6489.5)

Pooled StDev = 33.2254

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
A-PSC	3	6848.3	A
S-PSC	3	6575.8	B
FOS	3	6445.3	C
W-PSC	3	5044.3	D

Means that do not share a letter are significantly different.

B. ANIMALIS - ĐT - ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	3011694	1003898	2290.03	0.000
Error	8	3507	438		
Total	11	3015201			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
20.9375	99.88%	99.84%	99.74%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	6373.1	23.7	(6345.3, 6401.0)
S-PSC	3	6853.71	10.41	(6825.83, 6881.59)
A-PSC	3	6731.3	17.5	(6703.5, 6759.2)
FOS	3	5570.0	27.9	(5542.2, 5597.9)

Pooled StDev = 20.9375

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
S-PSC	3	6853.71	A
A-PSC	3	6731.3	B
W-PSC	3	6373.1	C
FOS	3	5570.0	D

Means that do not share a letter are significantly different.

L. CASEIN - ĐT - ACETIC ACID

One-way ANOVA: W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	4	W-PSC, S-PSC, A-PSC, FOS

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	3	3493707	1164569	866.61	0.000
Error	8	10751	1344		
Total	11	3504457			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
36.6581	99.69%	99.58%	99.31%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
W-PSC	3	5759.3	24.0	(5710.5, 5808.1)
S-PSC	3	7237.2	35.8	(7188.4, 7286.1)
A-PSC	3	6237.8	37.7	(6189.0, 6286.6)
FOS	3	6221.1	45.7	(6172.3, 6269.9)

Pooled StDev = 36.6581

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
S-PSC	3	7237.2	A
A-PSC	3	6237.8	B
FOS	3	6221.1	B
W-PSC	3	5759.3	C

Means that do not share a letter are significantly different.

PHỤ LỤC 4. XỬ LÝ SỐ LIỆU ỨNG DỤNG SỢI NẤM CHẾ BIẾN NƯỚC NẤM BÀO NGƯ LÊN MEN LACTIC

4.1. Sự thay đổi tổng hàm lượng các chất hòa tan Brix

WORKSHEET 1

General Linear Model: bx versus Nồng độ, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	Fixed	6	0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0
Thời gian	Fixed	4	0h, 12h, 24h, 48h

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nồng độ	5	0.8658	0.173167	23.46	0.000
Thời gian	3	0.3679	0.122639	16.62	0.000
Error	63	0.4650	0.007381		
Lack-of-Fit	15	0.3150	0.021000	6.72	0.000
Pure Error	48	0.1500	0.003125		
Total	71	1.6988			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0859125	72.63%	69.15%	64.25%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	5.9375	0.0101	586.43	0.000	
Nồng độ					
0.0	-0.1958	0.0226	-8.65	0.000	1.67
0.2	-0.0542	0.0226	-2.39	0.020	1.67
0.4	-0.0333	0.0226	-1.47	0.146	1.67
0.6	0.0500	0.0226	2.21	0.031	1.67
0.8	0.1125	0.0226	4.97	0.000	1.67
Thời gian					
0h	0.1181	0.0175	6.73	0.000	1.50
12h	-0.0153	0.0175	-0.87	0.387	1.50
24h	-0.0292	0.0175	-1.66	0.101	1.50

Regression Equation

bx = 5.9375 - 0.1958 Nồng độ_0.0 - 0.0542 Nồng độ_0.2 - 0.0333 Nồng độ_0.4
+ 0.0500 Nồng độ_0.6 + 0.1125 Nồng độ_0.8 + 0.1208 Nồng độ_1.0 + 0.1181 Thời gian_0h
- 0.0153 Thời gian_12h - 0.0292 Thời gian_24h - 0.0736 Thời gian_48h

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	bx	Fit	Resid	Std Resid	
54	5.8500	6.0292	-0.1792	-2.23	R
55	5.5000	5.6681	-0.1681	-2.09	R
59	6.0000	5.8097	0.1903	2.37	R

R Large residual

BAN ĐẦU (0H)

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.42944	0.085889	103.07	0.000
Error	12	0.01000	0.000833		
Total	17	0.43944			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0288675	97.72%	96.78%	94.88%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	5.8667	0.0577	(5.8304, 5.9030)
CT2	3	5.8833	0.0289	(5.8470, 5.9196)
CT3	3	6.000	0.000	(5.964, 6.036)
CT4	3	6.100	0.000	(6.064, 6.136)
CT5	3	6.200	0.000	(6.164, 6.236)
CT6	3	6.2833	0.0289	(6.2470, 6.3196)

Pooled StDev = 0.0288675

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	6.2833	A
CT5	3	6.200	B
CT4	3	6.100	C
CT3	3	6.000	D
CT2	3	5.8833	E
CT1	3	5.8667	E

Means that do not share a letter are significantly different.

12 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.48444	0.096889	31.71	0.000
Error	12	0.03667	0.003056		
Total	17	0.52111			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0552771	92.96%	90.03%	84.17%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	5.6667	0.1155	(5.5971, 5.7362)
CT2	3	5.7667	0.0289	(5.6971, 5.8362)
CT3	3	5.900	0.000	(5.830, 5.970)
CT4	3	6.000	0.000	(5.930, 6.070)
CT5	3	6.0667	0.0577	(5.9971, 6.1362)
CT6	3	6.1333	0.0289	(6.0638, 6.2029)

Pooled StDev = 0.0552771

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	6.1333	A
CT5	3	6.0667	A
CT4	3	6.000	A B
CT3	3	5.900	B C
CT2	3	5.7667	C D
CT1	3	5.6667	D

Means that do not share a letter are significantly different.

24 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.11125	0.022250	17.80	0.000
Error	12	0.01500	0.001250		
Total	17	0.12625			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0353553	88.12%	83.17%	73.27%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	5.7500	0.0500	(5.7055, 5.7945)
CT2	3	5.9667	0.0289	(5.9222, 6.0111)
CT3	3	5.9167	0.0289	(5.8722, 5.9611)
CT4	3	5.9167	0.0289	(5.8722, 5.9611)
CT5	3	6.000	0.000	(5.956, 6.044)
CT6	3	5.9000	0.0500	(5.8555, 5.9445)

Pooled StDev = 0.0353553

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT5	3	6.000	A		
CT2	3	5.9667	A	B	
CT4	3	5.9167	A	B	
CT3	3	5.9167	A	B	
CT6	3	5.9000		B	
CT1	3	5.7500			C

Means that do not share a letter are significantly different.

48 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.15569	0.031139	4.23	0.019
Error	12	0.08833	0.007361		
Total	17	0.24403			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0857969	63.80%	48.72%	18.55%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	5.6833	0.1607	(5.5754, 5.7913)
CT2	3	5.9167	0.0764	(5.8087, 6.0246)
CT3	3	5.800	0.000	(5.692, 5.908)
CT4	3	5.9333	0.0577	(5.8254, 6.0413)
CT5	3	5.9333	0.0577	(5.8254, 6.0413)
CT6	3	5.9167	0.0764	(5.8087, 6.0246)

Pooled StDev = 0.0857969

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping	
CT5	3	5.9333	A	
CT4	3	5.9333	A	
CT6	3	5.9167	A	B
CT2	3	5.9167	A	B
CT3	3	5.800	A	B
CT1	3	5.6833		B

Means that do not share a letter are significantly different.

4.2. Sự thay đổi tổng hàm lượng pH

WORKSHEET 6

General Linear Model: PH versus Nồng độ, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	Fixed	7	0.4, CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6
Thời gian	Fixed	4	0h, 12h, 24h, 48h

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nồng độ	6	0.4889	0.0815	4.26	0.001
Thời gian	3	41.3940	13.7980	720.64	0.000
Error	62	1.1871	0.0191		
Lack-of-Fit	14	1.1727	0.0838	279.48	0.000
Pure Error	48	0.0144	0.0003		
Total	71	51.4180			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.138372	97.69%	97.36%	96.94%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	3.6624	0.0186	197.13	0.000	
Nồng độ					
0.4	0.0110	0.0754	0.15	0.884	4.12
CT1	0.1563	0.0385	4.06	0.000	1.86
CT2	0.0459	0.0385	1.19	0.238	1.86
CT3	-0.0150	0.0451	-0.33	0.740	2.22
CT4	-0.0592	0.0385	-1.54	0.130	1.86
CT5	-0.0488	0.0385	-1.27	0.210	1.86
Thời gian					
0h	1.4252	0.0309	46.06	0.000	1.80
12h	-0.3160	0.0286	-11.06	0.000	1.53
24h	-0.5061	0.0286	-17.72	0.000	1.53

Regression Equation

PH = 3.6624 + 0.0110 Nồng độ_0.4 + 0.1563 Nồng độ_CT1 + 0.0459 Nồng độ_CT2
- 0.0150 Nồng độ_CT3 - 0.0592 Nồng độ_CT4 - 0.0488 Nồng độ_CT5 - 0.0903 Nồng độ_CT6
+ 1.4252 Thời gian_0h - 0.3160 Thời gian_12h - 0.5061 Thời gian_24h
- 0.6032 Thời gian_48h

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	PH	Fit	Resid	Std Resid	
1	5.7160	5.2440	0.4720	3.66	R
2	5.6000	5.2440	0.3560	2.76	R
3	5.5910	5.2440	0.3470	2.69	R
16	4.7300	4.9974	-0.2674	-2.08	R
17	4.7200	4.9974	-0.2774	-2.15	R
18	4.7120	4.9974	-0.2854	-2.22	R

R Large residual

PH BAN ĐẦU (0 GIỜ)

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	1.64389	0.328778	290.28	0.000
Error	12	0.01359	0.001133		
Total	17	1.65748			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0336543	99.18%	98.84%	98.16%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	5.6357	0.0697	(5.5933, 5.6780)
CT2	3	5.2900	0.0372	(5.2477, 5.3323)
CT3	3	5.09867	0.00208	(5.05633, 5.14100)
CT4	3	4.8973	0.0203	(4.8550, 4.9397)
CT5	3	4.89867	0.00723	(4.85633, 4.94100)
CT6	3	4.72067	0.00902	(4.67833, 4.76300)

Pooled StDev = 0.0336543

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT1	3	5.6357	A
CT2	3	5.2900	B
CT3	3	5.09867	C
CT5	3	4.89867	D
CT4	3	4.8973	D
CT6	3	4.72067	E

Means that do not share a letter are significantly different.

PH 12 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.010967	0.002193	56.32	0.000
Error	12	0.000467	0.000039		
Total	17	0.011434			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0062405	95.91%	94.21%	90.80%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	3.39733	0.01380	(3.38948, 3.40518)
CT2	3	3.34533	0.00473	(3.33748, 3.35318)
CT3	3	3.33667	0.00153	(3.32882, 3.34452)
CT4	3	3.32067	0.00208	(3.31282, 3.32852)
CT5	3	3.33200	0.00200	(3.32415, 3.33985)
CT6	3	3.33567	0.00321	(3.32782, 3.34352)

Pooled StDev = 0.00624055

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT1	3	3.39733	A		
CT2	3	3.34533		B	
CT3	3	3.33667		B	C
CT6	3	3.33567		B	C
CT5	3	3.33200		B	C
CT4	3	3.32067			C

Means that do not share a letter are significantly different.

PH 24 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.004389	0.000878	46.75	0.000
Error	12	0.000225	0.000019		
Total	17	0.004615			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0043333	95.12%	93.08%	89.01%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	3.18500	0.00300	(3.17955, 3.19045)
CT2	3	3.15300	0.00624	(3.14755, 3.15845)
CT3	3	3.13700	0.00300	(3.13155, 3.14245)
CT4	3	3.14033	0.00503	(3.13488, 3.14578)
CT5	3	3.15267	0.00306	(3.14722, 3.15812)
CT6	3	3.15900	0.00458	(3.15355, 3.16445)

Pooled StDev = 0.00433333

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT1	3	3.18500	A
CT6	3	3.15900	B
CT2	3	3.15300	B
CT5	3	3.15267	B
CT4	3	3.14033	C
CT3	3	3.13700	C

Means that do not share a letter are significantly different.

PH 48 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.002422	0.000484	56.61	0.000
Error	12	0.000103	0.000009		
Total	17	0.002524			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0029250	95.93%	94.24%	90.85%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	3.05700	0.00173	(3.05332, 3.06068)
CT2	3	3.04500	0.00100	(3.04132, 3.04868)
CT3	3	3.04333	0.00493	(3.03965, 3.04701)
CT4	3	3.05467	0.00351	(3.05099, 3.05835)
CT5	3	3.07133	0.00252	(3.06765, 3.07501)
CT6	3	3.07333	0.00208	(3.06965, 3.07701)

Pooled StDev = 0.00292499

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping		
CT6	3	3.07333	A		
CT5	3	3.07133	A		
CT1	3	3.05700		B	
CT4	3	3.05467		B	
CT2	3	3.04500			C
CT3	3	3.04333			C

Means that do not share a letter are significantly different.

4.3. Sự thay đổi tổng hàm lượng TAN

WORKSHEET 11

General Linear Model: TAN versus Nồng độ, Thời gian

Method

Factor coding (-1, 0, +1)

Factor Information

Factor	Type	Levels	Values
Nồng độ	Fixed	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6
Thời gian	Fixed	4	0h, 12h, 24h, 48h

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Nồng độ	5	33.324	6.665	57.32	0.000
Thời gian	3	625.925	208.642	1794.58	0.000
Error	63	7.325	0.116		
Lack-of-Fit	15	7.028	0.469	75.97	0.000
Pure Error	48	0.296	0.006		
Total	71	666.573			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.340972	98.90%	98.76%	98.56%

Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	6.0507	0.0402	150.57	0.000	
Nồng độ					
CT1	-1.1176	0.0899	-12.44	0.000	1.67
CT2	-0.5288	0.0899	-5.89	0.000	1.67
CT3	-0.0732	0.0899	-0.81	0.418	1.67
CT4	0.2249	0.0899	2.50	0.015	1.67
CT5	0.5531	0.0899	6.16	0.000	1.67
Thời gian					
0h	-4.3804	0.0696	-62.94	0.000	1.50
12h	-0.7507	0.0696	-10.79	0.000	1.50
24h	1.6018	0.0696	23.01	0.000	1.50

Regression Equation

TAN = 6.0507 - 1.1176 Nồng độ_CT1 - 0.5288 Nồng độ_CT2 - 0.0732 Nồng độ_CT3
+ 0.2249 Nồng độ_CT4 + 0.5531 Nồng độ_CT5 + 0.9416 Nồng độ_CT6 - 4.3804 Thời gian_0h
- 0.7507 Thời gian_12h + 1.6018 Thời gian_24h + 3.5293 Thời gian_48h

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	TAN	Fit	Resid	Std Resid	
1	1.327	0.553	0.775	2.43	R
2	1.350	0.553	0.797	2.50	R
3	1.440	0.553	0.887	2.78	R

R Large residual

TAN 0 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	0.97144	0.194289	120.69	0.000
Error	12	0.01932	0.001610		
Total	17	0.99076			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0401232	98.05%	97.24%	95.61%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	1.3725	0.0595	(1.3220, 1.4230)
CT2	3	1.4325	0.0344	(1.3820, 1.4830)
CT3	3	1.5900	0.0260	(1.5395, 1.6405)
CT4	3	1.7325	0.0225	(1.6820, 1.7830)
CT5	3	1.8600	0.0520	(1.8095, 1.9105)
CT6	3	2.0340	0.0324	(1.9835, 2.0845)

Pooled StDev = 0.0401232

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	2.0340	A
CT5	3	1.8600	B
CT4	3	1.7325	C
CT3	3	1.5900	D
CT2	3	1.4325	E
CT1	3	1.3725	E

Means that do not share a letter are significantly different.

TAN 12 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	18.5674	3.71349	354.93	0.000
Error	12	0.1256	0.01046		
Total	17	18.6930			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.102286	99.33%	99.05%	98.49%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	3.6900	0.0900	(3.5613, 3.8187)
CT2	3	4.2600	0.0687	(4.1313, 4.3887)
CT3	3	5.4150	0.1132	(5.2863, 5.5437)
CT4	3	5.7900	0.1447	(5.6613, 5.9187)
CT5	3	6.0300	0.0450	(5.9013, 6.1587)
CT6	3	6.6150	0.1191	(6.4863, 6.7437)

Pooled StDev = 0.102286

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	6.6150	A
CT5	3	6.0300	B
CT4	3	5.7900	B
CT3	3	5.4150	C
CT2	3	4.2600	D
CT1	3	3.6900	E

Means that do not share a letter are significantly different.

TAN 24 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	7.69151	1.53830	262.96	0.000
Error	12	0.07020	0.00585		
Total	17	7.76171			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0764853	99.10%	98.72%	97.97%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	6.6300	0.1132	(6.5338, 6.7262)
CT2	3	7.2000	0.0900	(7.1038, 7.2962)
CT3	3	7.4550	0.0520	(7.3588, 7.5512)
CT4	3	7.8150	0.0687	(7.7188, 7.9112)
CT5	3	8.1750	0.0687	(8.0788, 8.2712)
CT6	3	8.6400	0.0450	(8.5438, 8.7362)

Pooled StDev = 0.0764853

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	8.6400	A
CT5	3	8.1750	B
CT4	3	7.8150	C
CT3	3	7.4550	D
CT2	3	7.2000	E
CT1	3	6.6300	F

Means that do not share a letter are significantly different.

TAN 48 GIỜ

One-way ANOVA: CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
Factor	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Factor	5	13.1215	2.62431	388.79	0.000
Error	12	0.0810	0.00675		
Total	17	13.2025			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0821584	99.39%	99.13%	98.62%

Means

Factor	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	8.0400	0.0687	(7.9366, 8.1434)
CT2	3	9.1950	0.1375	(9.0916, 9.2984)
CT3	3	9.4500	0.0779	(9.3466, 9.5534)
CT4	3	9.7650	0.0450	(9.6616, 9.8684)
CT5	3	10.3500	0.0900	(10.2466, 10.4534)
CT6	3	10.6800	0.0260	(10.5766, 10.7834)

Pooled StDev = 0.0821584

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Factor	N	Mean	Grouping
CT6	3	10.6800	A
CT5	3	10.3500	B
CT4	3	9.7650	C
CT3	3	9.4500	D
CT2	3	9.1950	E
CT1	3	8.0400	F

Means that do not share a letter are significantly different.

4.4. Khả năng kháng oxi hoá của nước nấm Bào ngư lên men

ABTS 0 GIỜ

One-way ANOVA: % versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	2373.79	474.757	592.66	0.000
Error	12	9.61	0.801		
Total	17	2383.40			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.895021	99.60%	99.43%	99.09%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	25.840	0.435	(24.714, 26.966)
CT2	3	35.053	1.206	(33.927, 36.179)
CT3	3	40.173	0.845	(39.047, 41.299)
CT4	3	46.680	0.716	(45.554, 47.806)
CT5	3	54.539	1.309	(53.413, 55.665)
CT6	3	59.785	0.472	(58.659, 60.911)

Pooled StDev = 0.895021

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	59.785	A
CT5	3	54.539	B
CT4	3	46.680	C
CT3	3	40.173	D
CT2	3	35.053	E
CT1	3	25.840	F

Means that do not share a letter are significantly different.

ABTS 12 GIỜ

One-way ANOVA: % versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	2255.14	451.028	290.08	0.000
Error	12	18.66	1.555		
Total	17	2273.80			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.24693	99.18%	98.84%	98.15%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	25.917	0.349	(24.348, 27.486)
CT2	3	34.720	0.867	(33.152, 36.289)
CT3	3	39.686	1.057	(38.117, 41.254)
CT4	3	48.501	1.074	(46.932, 50.069)
CT5	3	54.530	1.182	(52.961, 56.098)
CT6	3	57.79	2.19	(56.22, 59.36)

Pooled StDev = 1.24693

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	57.79	A
CT5	3	54.530	A
CT4	3	48.501	B
CT3	3	39.686	C
CT2	3	34.720	D
CT1	3	25.917	E

Means that do not share a letter are significantly different.

ABTS 24 GIỜ

One-way ANOVA: % versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	1226.34	245.268	513.42	0.000
Error	12	5.73	0.478		
Total	17	1232.07			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.691167	99.53%	99.34%	98.95%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	25.845	0.466	(24.975, 26.714)
CT2	3	33.363	0.629	(32.494, 34.232)
CT3	3	37.872	0.394	(37.003, 38.741)
CT4	3	44.208	1.036	(43.339, 45.077)
CT5	3	47.158	0.637	(46.289, 48.027)
CT6	3	49.568	0.787	(48.698, 50.437)

Pooled StDev = 0.691167

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	49.568	A
CT5	3	47.158	B
CT4	3	44.208	C
CT3	3	37.872	D
CT2	3	33.363	E
CT1	3	25.845	F

Means that do not share a letter are significantly different.

ABTS 48 GIỜ

One-way ANOVA: % versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	1171.37	234.274	1059.59	0.000
Error	12	2.65	0.221		
Total	17	1174.02			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.470212	99.77%	99.68%	99.49%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	25.510	0.563	(24.919, 26.102)
CT2	3	32.564	0.595	(31.972, 33.155)
CT3	3	37.547	0.393	(36.956, 38.139)
CT4	3	43.248	0.482	(42.656, 43.839)
CT5	3	46.717	0.445	(46.126, 47.309)
CT6	3	48.345	0.267	(47.754, 48.937)

Pooled StDev = 0.470212

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	48.345	A
CT5	3	46.717	B
CT4	3	43.248	C
CT3	3	37.547	D
CT2	3	32.564	E
CT1	3	25.510	F

Means that do not share a letter are significantly different.

4.5. Khả năng kích thích sự tăng trưởng đối với lợi khuẩn

TĂNG TRƯỞNG 0 GIỜ

One-way ANOVA: 0h versus CT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
CT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
CT	5	0.002848	0.000570	0.47	0.790
Error	18	0.021601	0.001200		
Total	23	0.024450			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.0346420	11.65%	0.00%	0.00%

Means

CT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	4	8.3723	0.0387	(8.3359, 8.4087)
CT2	4	8.3961	0.0459	(8.3597, 8.4325)
CT3	4	8.38982	0.01314	(8.35343, 8.42621)
CT4	4	8.3894	0.0263	(8.3530, 8.4258)
CT5	4	8.3647	0.0220	(8.3283, 8.4011)
CT6	4	8.3799	0.0475	(8.3435, 8.4163)

Pooled StDev = 0.0346420

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

CT	N	Mean	Grouping
CT2	4	8.3961	A
CT3	4	8.38982	A
CT4	4	8.3894	A
CT6	4	8.3799	A
CT1	4	8.3723	A
CT5	4	8.3647	A

Means that do not share a letter are significantly different.

TĂNG TRƯỞNG 12 GIỜ

One-way ANOVA: 12h versus CT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
CT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
CT	5	0.9049	0.18098	8.55	0.000
Error	18	0.3809	0.02116		
Total	23	1.2858			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.145463	70.38%	62.15%	47.34%

Means

CT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	4	10.9016	0.0416	(10.7488, 11.0544)
CT2	4	11.2039	0.1371	(11.0511, 11.3567)
CT3	4	11.2114	0.1457	(11.0586, 11.3642)
CT4	4	11.4877	0.1355	(11.3349, 11.6405)
CT5	4	11.4429	0.1534	(11.2901, 11.5957)
CT6	4	11.344	0.208	(11.192, 11.497)

Pooled StDev = 0.145463

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

CT	N	Mean	Grouping	
CT4	4	11.4877	A	
CT5	4	11.4429	A	
CT6	4	11.344	A	
CT3	4	11.2114	A	B
CT2	4	11.2039	A	B
CT1	4	10.9016		B

Means that do not share a letter are significantly different.

TĂNG TRƯỞNG 24 GIỜ

One-way ANOVA: 24h versus CT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
CT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
CT	5	0.8761	0.17521	8.98	0.000
Error	18	0.3510	0.01950		
Total	23	1.2271			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.139647	71.39%	63.45%	49.14%

Means

CT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	4	11.0054	0.1180	(10.8588, 11.1521)
CT2	4	11.3951	0.1621	(11.2484, 11.5418)
CT3	4	11.5141	0.1322	(11.3674, 11.6608)
CT4	4	11.5250	0.1315	(11.3784, 11.6717)
CT5	4	11.5342	0.1537	(11.3875, 11.6809)
CT6	4	11.5367	0.1357	(11.3900, 11.6834)

Pooled StDev = 0.139647

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

CT	N	Mean	Grouping
CT6	4	11.5367	A
CT5	4	11.5342	A
CT4	4	11.5250	A
CT3	4	11.5141	A
CT2	4	11.3951	A
CT1	4	11.0054	B

Means that do not share a letter are significantly different.

TĂNG TRƯỞNG 48 GIỜ

One-way ANOVA: 48h versus CT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
CT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
CT	5	0.7452	0.14904	6.23	0.002
Error	18	0.4305	0.02391		
Total	23	1.1757			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.154644	63.38%	53.21%	34.91%

Means

CT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	4	10.9818	0.1067	(10.8194, 11.1443)
CT2	4	11.2175	0.1910	(11.0550, 11.3799)
CT3	4	11.4839	0.1603	(11.3214, 11.6463)
CT4	4	11.4638	0.1483	(11.3014, 11.6263)
CT5	4	11.3905	0.1668	(11.2280, 11.5529)
CT6	4	11.4153	0.1418	(11.2529, 11.5778)

Pooled StDev = 0.154644

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

CT	N	Mean	Grouping	
CT3	4	11.4839	A	
CT4	4	11.4638	A	
CT6	4	11.4153	A	
CT5	4	11.3905	A	
CT2	4	11.2175	A	B
CT1	4	10.9818		B

Means that do not share a letter are significantly different.

4.6. Khả năng ức chế hại khuẩn

4.6.1. Ức chế S. aureus

KHÁNG KHUẨN S. AUREUS 12 GIỜ

One-way ANOVA: 12h versus C1

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	5.983	1.19662	13.77	0.000
Error	12	1.043	0.08691		
Total	17	7.026			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.294807	85.16%	78.97%	66.60%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	7.597	0.295	(7.226, 7.968)
CT2	3	8.2500	0.1229	(7.8792, 8.6208)
CT3	3	7.7433	0.1234	(7.3725, 8.1142)
CT4	3	7.937	0.389	(7.566, 8.308)
CT5	3	8.503	0.455	(8.132, 8.874)
CT6	3	9.323	0.214	(8.952, 9.694)

Pooled StDev = 0.294807

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping		
CT6	3	9.323	A		
CT5	3	8.503		B	
CT2	3	8.2500		B	C
CT4	3	7.937		B	C
CT3	3	7.7433		B	C
CT1	3	7.597			C

Means that do not share a letter are significantly different.

KHÁNG KHUẨN S. AUREUS 24 GIỜ

One-way ANOVA: 24h versus C1

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	68.919	13.7839	135.28	0.000
Error	12	1.223	0.1019		
Total	17	70.142			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.319209	98.26%	97.53%	96.08%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	11.677	0.403	(11.275, 12.078)
CT2	3	11.8100	0.1513	(11.4085, 12.2115)
CT3	3	13.587	0.242	(13.185, 13.988)
CT4	3	15.283	0.311	(14.882, 15.685)
CT5	3	16.1833	0.1206	(15.7818, 16.5849)
CT6	3	16.527	0.506	(16.125, 16.928)

Pooled StDev = 0.319209

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
CT6	3	16.527	A
CT5	3	16.1833	A
CT4	3	15.283	B
CT3	3	13.587	C
CT2	3	11.8100	D
CT1	3	11.677	D

Means that do not share a letter are significantly different.

KHÁNG KHUẨN S. AUREUS 48 GIỜ

One-way ANOVA: 48h versus C1

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
C1	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
C1	5	26.0010	5.20020	85.36	0.000
Error	12	0.7311	0.06092		
Total	17	26.7320			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.246824	97.27%	96.13%	93.85%

Means

C1	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	9.993	0.263	(9.683, 10.304)
CT2	3	11.1233	0.1002	(10.8128, 11.4338)
CT3	3	11.2600	0.1652	(10.9495, 11.5705)
CT4	3	12.3767	0.1041	(12.0662, 12.6872)
CT5	3	12.660	0.245	(12.350, 12.970)
CT6	3	13.697	0.434	(13.386, 14.007)

Pooled StDev = 0.246824

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

C1	N	Mean	Grouping
CT6	3	13.697	A
CT5	3	12.660	B
CT4	3	12.3767	B
CT3	3	11.2600	C
CT2	3	11.1233	C
CT1	3	9.993	D

Means that do not share a letter are significantly different.

4.6.2. Ức chế E. coli

KHÁNG KHUẨN E. COLI 12 GIỜ

One-way ANOVA: 12 giờ versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	56.099	11.2197	72.66	0.000
Error	12	1.853	0.1544		
Total	17	57.952			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.392952	96.80%	95.47%	92.81%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	6.5467	0.1457	(6.0524, 7.0410)
CT2	3	8.023	0.446	(7.529, 8.518)
CT3	3	7.803	0.378	(7.309, 8.298)
CT4	3	8.0933	0.1007	(7.5990, 8.5876)
CT5	3	10.040	0.715	(9.546, 10.534)
CT6	3	11.963	0.206	(11.469, 12.458)

Pooled StDev = 0.392952

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	11.963	A
CT5	3	10.040	B
CT4	3	8.0933	C
CT2	3	8.023	C
CT3	3	7.803	C
CT1	3	6.5467	D

Means that do not share a letter are significantly different.

KHÁNG KHUẨN E. COLI 24 GIỜ

One-way ANOVA: 24 giờ versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	11.282	2.2563	17.67	0.000
Error	12	1.533	0.1277		
Total	17	12.814			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.357367	88.04%	83.06%	73.09%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	8.880	0.724	(8.430, 9.330)
CT2	3	9.047	0.241	(8.597, 9.496)
CT3	3	10.630	0.352	(10.180, 11.080)
CT4	3	9.4000	0.1500	(8.9505, 9.8495)
CT5	3	10.3700	0.1709	(9.9205, 10.8195)
CT6	3	10.8967	0.0924	(10.4471, 11.3462)

Pooled StDev = 0.357367

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping		
CT6	3	10.8967	A		
CT3	3	10.630	A		
CT5	3	10.3700	A	B	
CT4	3	9.4000		B	C
CT2	3	9.047			C
CT1	3	8.880			C

Means that do not share a letter are significantly different.

KHÁNG KHUẨN E. COLI 48 GIỜ

One-way ANOVA: 48 giờ versus NT

Method

Null hypothesis	All means are equal
Alternative hypothesis	Not all means are equal
Significance level	α = 0.05

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
NT	6	CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
NT	5	83.139	16.6277	91.17	0.000
Error	12	2.188	0.1824		
Total	17	85.327			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.427051	97.44%	96.37%	94.23%

Means

NT	N	Mean	StDev	95% CI
CT1	3	6.887	0.640	(6.349, 7.424)
CT2	3	9.327	0.202	(8.789, 9.864)
CT3	3	10.9100	0.1473	(10.3728, 11.4472)
CT4	3	12.353	0.445	(11.816, 12.891)
CT5	3	11.743	0.296	(11.206, 12.281)
CT6	3	13.430	0.580	(12.893, 13.967)

Pooled StDev = 0.427051

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

NT	N	Mean	Grouping
CT6	3	13.430	A
CT4	3	12.353	A B
CT5	3	11.743	B C
CT3	3	10.9100	C
CT2	3	9.327	D
CT1	3	6.887	E

Means that do not share a letter are significantly different.

4.7. Số liệu điểm đánh giá cảm quan

Bảng 4.1. Màu sắc nước lên men

appearance	CT1-24h	CT2-24h	CT3-24h	CT4-24h	CT5-24h	CT6-24h
1	2.44	3.68	4.47	7.24	6.27	4.09
2	2.25	4.55	3.30	7.28	5.68	5.40
3	2.41	4.53	4.86	6.26	6.35	4.06
4	2.48	3.89	4.62	6.62	5.24	4.25
5	2.14	4.09	5.05	6.73	6.13	4.54
6	2.23	2.05	2.48	6.64	4.32	4.28
7	2.85	2.66	4.55	7.13	7.00	4.95
8	2.38	3.55	4.51	6.50	5.49	4.80
9	2.71	3.98	3.15	6.47	5.99	4.15
10	2.19	3.98	3.85	7.28	5.60	4.36
11	2.92	4.38	3.73	6.78	5.57	4.44
12	1.80	3.75	4.73	7.22	5.55	4.64
13	2.09	1.68	3.80	6.87	6.31	4.12
14	2.17	2.81	4.33	6.63	5.73	4.22
15	2.37	4.13	4.62	6.66	5.99	4.19
16	2.21	4.92	4.24	8.05	6.08	4.12
17	1.98	4.12	4.20	7.34	5.54	4.53
18	2.95	3.11	5.05	6.66	5.18	4.79
19	2.18	3.75	4.28	6.59	5.75	4.63
20	2.16	3.31	3.92	6.76	5.69	5.00
21	1.86	4.09	4.54	6.81	4.90	3.98
22	2.45	2.81	2.99	6.92	7.12	4.22
23	2.11	4.46	2.38	6.56	5.99	4.61
24	2.53	3.12	3.47	8.07	5.79	4.35
25	2.31	3.38	3.81	7.02	4.87	4.55
26	2.13	4.26	4.43	6.61	6.03	4.20
27	2.26	4.85	3.58	6.79	5.23	4.41
28	2.64	3.60	4.53	7.79	5.91	4.48
29	2.57	3.79	4.97	8.00	5.61	4.35
30	2.01	3.24	3.22	7.00	5.76	4.76
31	2.37	3.82	2.62	6.76	6.27	4.26
32	2.19	3.82	4.07	6.20	5.29	4.88
33	2.36	3.02	4.42	6.36	6.32	4.52
34	2.66	4.02	3.72	6.80	6.57	4.65
35	2.40	3.81	3.22	7.61	6.63	3.81
36	2.59	4.83	4.61	6.78	5.72	4.69
37	2.35	3.84	3.70	6.91	4.91	4.08

38	2.34	4.35	5.51	7.03	5.31	4.61
39	2.55	3.02	3.79	6.84	6.02	5.10
40	2.47	2.21	5.51	6.83	6.72	4.37
41	2.28	2.80	3.71	6.98	6.45	5.14
42	2.42	3.49	4.21	6.21	6.06	5.04
43	2.27	3.09	5.01	6.19	6.65	4.54
44	2.36	3.84	4.14	7.02	5.49	4.85
45	2.36	1.93	3.88	6.19	5.29	4.51
46	2.35	3.61	4.13	6.25	5.69	4.74
47	2.19	3.62	5.76	7.08	5.90	4.88
48	2.32	3.18	5.47	6.49	6.43	4.31
49	2.51	3.42	4.91	7.38	5.69	4.86
50	2.95	4.06	4.93	6.37	6.36	4.64
51	2.48	3.85	3.42	6.44	5.14	4.52
52	2.60	4.26	4.15	7.52	5.07	4.86
53	2.18	1.59	4.42	6.88	5.63	4.87
54	1.96	4.36	3.21	6.28	4.97	5.05
55	2.49	2.51	3.42	6.37	5.93	5.36
56	2.59	2.27	3.91	7.56	5.08	4.57
57	2.21	3.39	3.19	7.02	5.94	4.72
58	1.83	1.94	3.87	6.58	5.57	4.27
59	2.29	4.64	2.96	7.10	5.92	4.24
60	2.32	4.93	4.45	6.69	6.23	4.64
61	2.66	3.04	4.24	6.97	4.97	5.15
62	2.39	2.94	4.40	6.46	6.50	4.50
63	3.08	3.06	4.59	4.99	5.32	4.45
64	1.99	3.68	3.95	6.70	6.28	4.31
65	2.62	3.51	3.66	7.40	6.46	4.99
66	2.29	2.78	3.82	6.61	5.90	4.70
67	2.61	2.60	4.27	6.71	5.41	4.24
68	2.84	3.73	4.88	5.96	5.42	4.64
69	2.20	3.06	5.99	7.05	6.22	5.01
70	2.07	4.08	4.63	7.42	5.66	4.29
71	2.22	3.46	5.03	6.56	5.15	4.58
72	2.37	2.94	5.17	6.91	6.19	4.83
73	2.41	2.91	4.35	6.42	5.87	4.84
74	2.50	3.13	4.34	7.67	6.06	3.98
75	2.58	2.96	4.56	6.83	5.33	4.34
76	2.86	2.64	3.67	8.02	5.70	4.83
77	2.01	3.59	5.26	6.27	5.94	4.43
78	2.48	3.82	3.93	7.15	5.47	4.40
79	2.05	4.11	4.62	7.38	6.18	4.28
80	2.47	2.75	5.00	7.40	5.61	4.91

81	2.37	3.01	4.07	6.97	6.59	4.69
82	2.36	2.26	5.75	7.62	6.57	4.27
mean	2.37	3.46	4.22	6.87	5.81	4.56
sd	0.26	0.77	0.75	0.52	0.54	0.33

Bảng 4.2. Mùi hương nước lên men

aroma	CT1-24h	CT2-24h	CT3-24h	CT4-24h	CT5-24h	CT6-24h
1	2.70	3.77	4.79	6.21	4.85	5.09
2	3.24	3.79	4.89	6.25	5.47	5.03
3	3.55	3.59	4.38	5.44	4.98	4.41
4	2.60	3.80	4.87	5.57	5.12	5.91
5	2.64	3.49	5.02	5.53	4.91	5.90
6	2.76	3.31	4.79	5.20	5.44	6.06
7	3.56	3.65	4.82	5.88	4.93	5.21
8	2.83	3.84	4.36	6.08	4.64	5.07
9	2.93	3.78	4.47	5.55	4.66	4.91
10	3.54	3.84	4.83	5.04	4.39	4.78
11	2.98	3.70	5.40	5.41	5.11	5.87
12	3.06	3.60	4.80	6.34	4.78	5.71
13	4.27	3.71	5.24	6.63	5.02	4.23
14	2.74	3.46	4.91	5.68	5.18	5.58
15	2.52	3.95	5.05	5.86	5.46	5.22
16	1.99	3.93	4.83	6.03	4.82	5.75
17	2.07	3.85	4.13	6.34	4.55	5.41
18	1.95	3.95	4.96	5.43	4.55	5.20
19	3.30	3.86	5.27	6.41	4.81	5.27
20	2.59	3.94	4.80	5.06	4.45	5.46
21	2.52	3.65	4.92	5.23	5.27	5.14
22	3.66	3.76	4.64	4.93	5.52	5.40
23	1.41	3.58	5.39	5.98	5.50	5.19
24	2.56	3.64	4.70	5.06	4.55	5.81
25	2.12	3.80	4.89	5.18	5.42	5.29
26	3.64	3.59	5.32	6.36	4.59	6.18
27	2.15	3.54	4.95	6.25	4.79	4.99
28	3.65	4.00	4.50	5.29	5.00	5.08
29	2.25	3.77	4.81	5.30	4.98	4.14
30	3.18	3.30	4.88	6.07	4.51	4.94
31	1.69	3.34	4.24	6.10	5.20	5.67
32	1.86	3.54	4.84	5.63	5.20	6.20
33	2.99	3.54	4.97	5.81	4.19	5.89
34	2.69	4.00	4.73	5.20	4.88	5.41

35	1.95	3.55	4.93	6.06	4.72	5.78
36	2.06	3.97	4.91	7.22	5.64	5.06
37	2.60	3.55	5.08	5.50	5.09	6.34
38	3.07	3.21	4.82	6.16	5.10	5.15
39	1.75	3.84	5.30	5.58	5.19	5.11
40	2.30	3.83	4.95	6.11	4.79	4.80
41	3.17	3.91	4.87	5.39	5.89	4.81
42	2.74	3.20	4.81	6.73	4.73	4.71
43	2.24	3.50	4.68	6.18	4.69	6.01
44	4.22	3.68	4.83	5.78	4.49	5.06
45	2.35	3.80	4.40	6.00	5.06	5.67
46	2.76	3.60	5.12	6.49	5.10	4.34
47	2.82	3.22	5.02	6.77	5.10	4.99
48	3.83	3.74	5.01	5.43	4.29	4.96
49	3.57	3.63	4.51	6.69	5.06	4.69
50	2.88	3.29	4.49	5.44	4.82	4.66
51	1.84	3.80	4.26	5.07	5.03	4.93
52	3.61	3.64	4.89	5.24	5.35	5.62
53	2.78	3.54	5.28	5.59	5.11	5.07
54	2.95	3.45	5.20	6.32	5.14	5.71
55	2.30	3.41	4.62	6.79	4.89	5.28
56	2.25	3.92	4.85	5.68	5.01	4.71
57	2.59	3.45	4.29	6.67	4.86	5.51
58	2.04	3.50	4.77	6.80	5.22	6.04
59	3.79	3.83	4.60	5.95	5.07	5.48
60	2.46	3.66	4.20	4.46	5.00	6.12
61	3.13	3.57	4.82	6.59	4.51	4.72
62	3.89	4.17	4.61	6.18	5.60	4.70
63	2.95	4.04	4.79	6.29	5.02	5.76
64	2.26	3.72	4.93	5.16	5.69	4.70
65	2.73	3.82	5.02	5.26	5.10	5.77
66	2.38	3.10	5.34	6.81	5.38	6.33
67	2.84	3.53	4.45	6.54	5.24	5.69
68	2.69	3.42	4.49	6.69	4.44	4.56
69	3.57	3.41	5.09	5.71	5.40	5.67
70	2.87	3.79	4.88	6.20	4.66	5.72
71	2.50	3.63	5.17	5.94	5.04	4.87
72	2.49	3.52	4.72	5.57	5.11	5.22
73	3.72	3.66	4.94	5.55	5.15	4.81
74	2.32	3.36	5.13	5.93	5.00	5.41
75	2.94	3.22	5.12	6.01	4.89	4.91
76	2.45	3.53	5.18	6.60	4.64	4.64
77	2.26	3.55	4.89	5.60	5.08	5.41

78	2.73	3.83	4.68	5.71	4.88	5.48
79	2.63	3.69	4.47	5.49	4.68	5.16
80	3.18	3.70	4.90	5.61	5.28	5.01
81	3.41	3.75	5.13	5.98	5.31	5.41
82	1.56	3.38	4.13	4.77	5.11	5.18
mean	2.76	3.65	4.83	5.86	4.99	5.28
sd	0.62	0.22	0.30	0.56	0.34	0.50

Bảng 4.3. Màu sắc nước lên men

flavour	CT1-24h	CT2-24h	CT3-24h	CT4-24h	CT5-24h	CT6-24h
1	3.48	2.95	4.15	7.40	4.48	4.89
2	3.43	2.96	4.11	7.51	5.66	4.24
3	3.48	3.10	3.94	7.31	4.94	4.99
4	3.35	3.22	4.19	7.40	6.24	4.75
5	3.62	2.99	4.41	7.52	5.41	4.84
6	3.01	2.94	5.60	7.98	4.93	4.79
7	2.76	2.67	3.44	7.16	4.46	5.27
8	3.39	3.18	4.35	7.44	5.09	5.16
9	3.18	2.79	3.94	9.01	5.72	4.87
10	3.38	3.07	4.16	7.63	4.59	5.63
11	2.98	3.19	4.01	8.22	5.09	5.14
12	3.06	3.49	4.91	8.05	5.14	4.42
13	3.53	2.97	4.11	8.02	5.09	4.32
14	3.17	2.80	3.76	9.37	5.51	5.34
15	3.68	3.54	4.80	7.16	4.49	5.05
16	4.00	3.10	3.89	7.95	5.83	4.72
17	2.89	3.29	3.98	7.35	5.91	5.42
18	3.72	3.09	3.79	7.51	6.18	5.89
19	2.75	2.79	4.10	8.09	5.84	5.32
20	3.98	2.55	3.50	9.06	6.54	4.56
21	2.98	2.95	3.03	7.01	6.46	4.80
22	2.73	3.08	3.15	8.11	5.79	5.02
23	3.90	2.98	4.44	7.58	4.94	5.46
24	3.28	3.09	3.75	7.31	5.39	5.38
25	3.76	3.25	4.33	8.26	4.95	5.19
26	3.27	2.93	4.81	6.94	4.51	4.47
27	2.85	2.52	4.33	7.76	4.82	5.01
28	3.41	3.31	4.49	6.24	4.89	4.98
29	3.51	2.75	4.65	7.92	5.49	3.90
30	3.13	2.87	5.15	6.98	5.01	4.84
31	3.47	2.64	4.02	7.64	5.64	5.18
32	3.37	3.31	3.99	8.31	5.71	4.82
33	3.21	2.65	4.07	7.88	4.78	4.50

34	3.08	2.75	4.53	7.26	5.76	4.18
35	3.76	3.07	4.30	7.38	5.08	4.66
36	3.39	2.67	3.62	7.38	4.99	5.42
37	3.17	3.07	4.63	7.47	5.20	4.82
38	3.65	2.97	4.47	7.14	5.15	4.40
39	3.06	3.34	4.45	8.44	4.07	5.01
40	3.25	2.97	4.20	6.80	6.18	4.61
41	3.15	3.21	3.72	7.43	6.29	5.33
42	3.75	3.01	4.42	6.49	5.28	5.14
43	2.62	2.69	3.89	8.18	4.89	5.01
44	3.38	3.41	3.85	6.62	5.01	5.08
45	3.42	3.12	4.06	7.63	5.41	5.18
46	3.50	2.88	4.58	8.18	5.54	4.65
47	3.21	3.25	4.12	7.87	5.52	5.06
48	3.43	2.92	3.90	8.01	5.57	5.29
49	2.93	3.14	5.10	7.70	5.27	5.09
50	2.83	3.50	3.96	6.94	4.97	4.49
51	3.51	3.10	3.76	7.37	4.83	4.75
52	3.21	3.20	4.09	6.96	4.36	5.74
53	3.61	2.66	3.78	6.89	5.27	4.50
54	2.71	2.62	4.71	6.85	5.59	5.12
55	3.12	3.03	4.14	8.25	4.62	4.50
56	3.34	2.66	4.42	7.88	5.50	5.31
57	3.16	2.87	4.07	8.17	6.25	4.45
58	3.76	2.93	4.67	7.64	5.24	4.44
59	2.73	3.04	4.22	7.45	5.31	5.73
60	3.39	3.19	4.41	8.14	4.49	4.22
61	3.30	2.81	4.70	7.05	4.78	4.90
62	3.14	3.03	3.31	6.72	5.84	5.21
63	3.28	2.76	4.08	7.62	5.85	4.62
64	3.28	3.38	4.93	6.75	5.17	4.50
65	2.93	2.96	4.83	8.03	5.75	4.84
66	3.15	3.01	4.03	7.48	4.98	4.33
67	3.56	2.95	4.38	7.83	5.82	4.76
68	3.25	2.91	4.27	7.20	5.44	4.64
69	3.51	3.15	3.96	7.60	4.29	5.32
70	3.66	3.03	5.49	8.29	6.05	5.39
71	3.67	3.77	3.56	6.83	4.39	5.32
72	3.41	3.02	3.61	7.01	5.72	5.68
73	3.23	3.47	3.98	8.62	4.69	4.58
74	3.39	2.93	3.93	8.58	5.72	4.81
75	3.43	2.66	4.18	6.78	5.46	5.82
76	3.37	3.70	4.10	7.37	4.90	4.61

77	2.97	3.29	3.38	7.67	5.67	5.21
78	3.13	2.66	4.22	8.47	5.28	4.98
79	2.89	2.97	4.62	6.75	5.93	4.88
80	3.18	2.57	3.98	7.03	4.82	3.95
81	3.43	3.32	3.40	9.12	5.72	4.68
82	3.11	3.08	4.07	7.76	4.89	4.81
mean	3.29	3.02	4.18	7.61	5.30	4.92
sd	0.31	0.26	0.48	0.63	0.55	0.42

Bảng 4.4. Độ yêu thích nước lên men

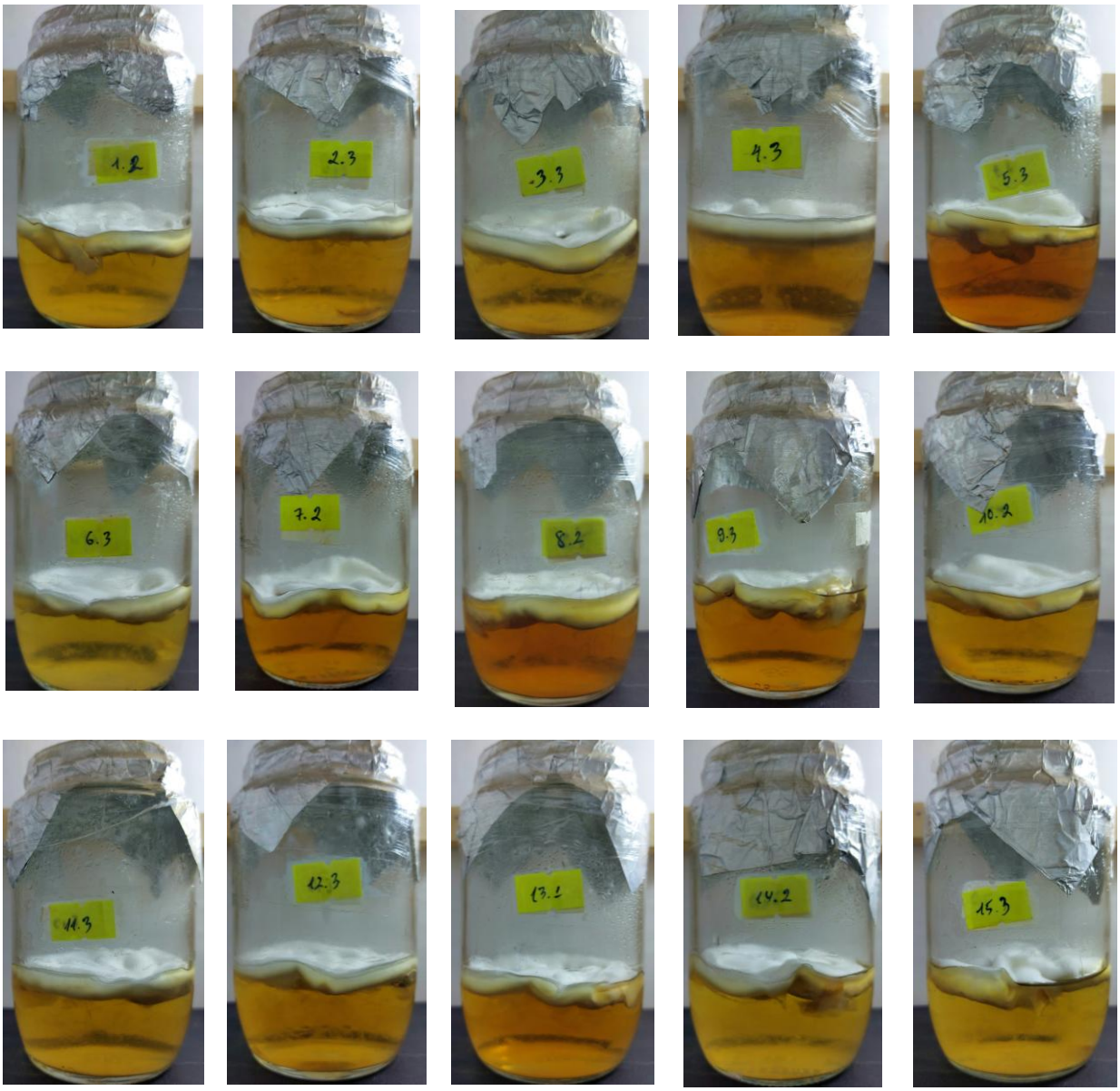
overall liking	CT1-24h	CT2-24h	CT3-24h	CT4-24h	CT5-24h	CT6-24h
1	4.55	6.01	5.46	7.92	6.75	6.46
2	4.62	7.24	5.90	7.40	6.68	5.66
3	4.69	6.12	4.08	7.77	6.64	6.27
4	4.94	5.83	5.71	8.08	7.27	6.56
5	4.39	6.04	6.02	8.15	6.78	6.07
6	4.84	6.28	7.10	7.88	6.43	6.29
7	4.54	6.48	5.50	7.63	7.71	7.33
8	4.88	5.92	5.29	7.90	7.17	6.41
9	4.70	6.37	5.30	7.81	6.46	7.34
10	4.36	6.45	6.26	8.19	5.72	7.43
11	4.11	5.36	5.32	7.70	6.54	7.17
12	4.68	5.53	5.72	8.67	7.56	6.32
13	4.80	5.69	6.62	8.34	7.35	5.96
14	4.53	6.26	5.46	7.90	5.72	7.17
15	4.78	6.18	5.07	7.66	7.06	7.43
16	4.28	6.22	5.15	8.16	7.04	6.35
17	4.30	6.08	6.73	8.14	5.96	6.39
18	4.89	5.56	6.00	7.96	7.53	6.51
19	4.13	6.58	6.13	7.23	7.48	7.14
20	4.31	6.07	3.63	8.38	6.82	6.53
21	4.62	6.53	7.05	8.44	6.28	7.09
22	4.43	6.77	6.23	7.76	7.07	6.45
23	4.53	5.78	4.99	7.74	6.54	6.35
24	4.47	5.74	5.44	8.28	6.47	6.75
25	4.74	6.15	5.66	8.27	5.94	6.32
26	4.48	6.44	4.87	7.28	7.27	6.40
27	4.66	5.96	5.97	8.55	7.44	6.37
28	4.96	5.93	3.66	8.39	7.34	6.32
29	4.64	6.28	5.95	7.63	6.87	5.99
30	4.64	6.47	4.13	7.92	6.88	6.85
31	4.28	6.69	5.05	8.10	7.49	6.45
32	4.60	6.10	5.65	8.50	6.81	6.22

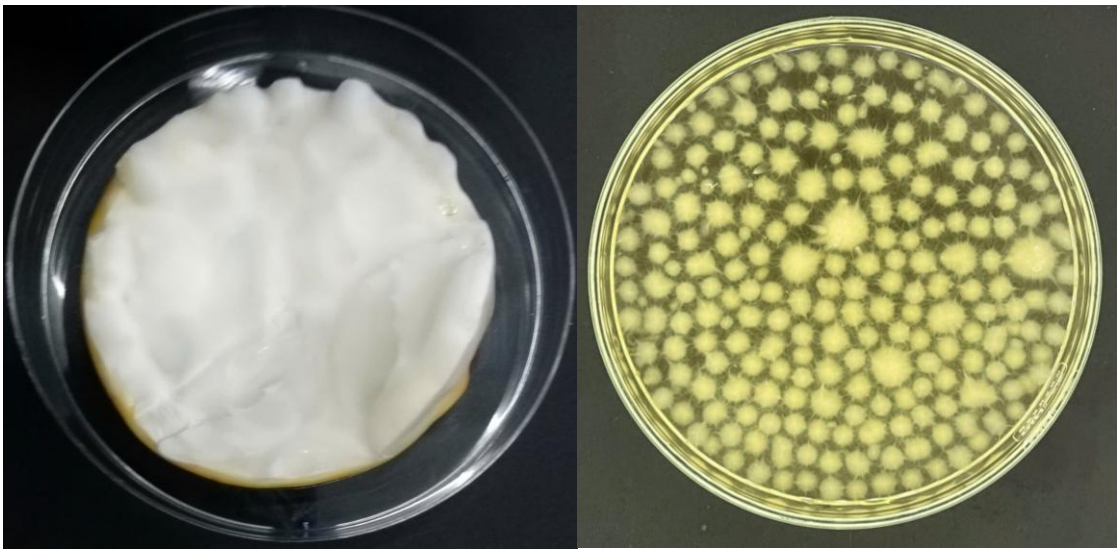
33	4.53	6.07	6.32	7.84	6.77	6.80
34	4.74	6.13	5.31	8.21	7.91	6.60
35	4.72	4.95	5.20	7.51	6.29	6.91
36	4.88	5.65	5.19	8.59	5.88	6.24
37	4.43	5.21	5.76	8.21	7.28	6.76
38	4.62	6.00	6.10	8.19	6.69	7.00
39	4.47	6.71	5.38	7.73	6.27	6.03
40	4.65	6.36	5.83	8.08	7.97	6.50
41	4.98	5.37	6.29	8.29	7.26	6.87
42	4.43	6.12	6.14	8.33	7.12	6.32
43	4.42	6.05	5.09	8.03	7.21	7.55
44	4.15	5.25	4.62	8.48	5.99	7.59
45	4.44	6.82	5.51	8.40	6.60	5.48
46	4.98	5.97	5.86	8.08	6.84	6.53
47	4.50	5.79	6.16	8.04	6.91	6.90
48	4.61	6.80	6.17	8.91	6.70	6.44
49	4.67	4.99	4.54	8.42	7.15	6.57
50	4.74	5.38	5.18	8.15	8.09	6.80
51	4.70	6.30	5.83	7.34	6.98	6.54
52	4.61	5.95	5.15	8.34	6.63	6.31
53	4.51	6.88	5.39	7.68	6.74	7.32
54	4.83	6.97	5.26	8.06	6.43	6.65
55	4.57	6.65	6.71	7.87	6.36	6.72
56	4.57	6.97	5.68	8.50	7.40	6.43
57	4.84	5.59	6.41	8.41	7.74	6.77
58	4.71	5.55	4.07	8.32	6.30	6.81
59	5.07	5.80	5.67	8.18	5.55	6.51
60	4.55	6.46	7.19	8.08	6.60	6.57
61	4.58	5.12	5.50	8.30	6.55	5.79
62	4.69	4.30	4.79	7.96	6.79	6.79
63	4.54	5.06	5.16	7.92	6.19	5.97
64	4.71	6.22	5.05	7.92	7.22	5.48
65	4.53	6.05	4.50	7.84	6.05	6.52
66	4.42	4.85	4.81	7.82	5.82	7.08
67	4.48	6.39	5.34	8.26	6.63	6.68
68	4.76	5.14	5.99	8.43	6.99	6.66
69	4.86	6.73	5.01	8.07	6.68	7.02
70	4.50	6.61	5.47	7.96	6.71	6.24
71	4.49	5.08	5.52	7.60	6.52	6.86
72	4.60	6.28	5.28	7.92	6.19	6.69
73	4.44	6.34	6.92	7.79	7.54	6.60
74	5.17	5.66	5.28	8.76	6.97	6.32
75	4.39	5.84	5.11	9.08	6.23	7.42

76	4.33	7.33	5.55	8.82	7.11	6.32
77	4.85	5.47	5.42	7.90	7.26	5.52
78	4.50	5.19	5.71	8.64	7.57	6.49
79	4.56	5.45	5.86	8.08	5.75	6.58
80	4.56	6.56	5.83	8.12	7.29	7.13
81	4.42	5.83	4.97	8.44	7.09	7.00
82	4.52	5.61	5.18	7.93	6.41	7.01
mean	4.60	6.01	5.53	8.09	6.81	6.60
sd	0.21	0.59	0.71	0.36	0.57	0.46

PHỤ LỤC 5. HÌNH ẢNH THÍ NGHIỆM

5.1. Sợi nấm *C. militaris* nuối cấy lỏng







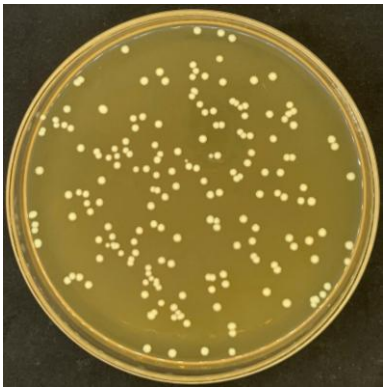
5.2. Bột sợi nấm sấy khô



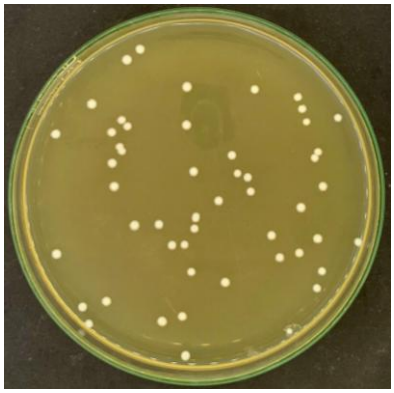
5.3. Lên men nước Lactic sợi nấm Vân chi



5.4. Hình ảnh vi khuẩn phương đánh giá prebiotic



L. plantarum WCFS1



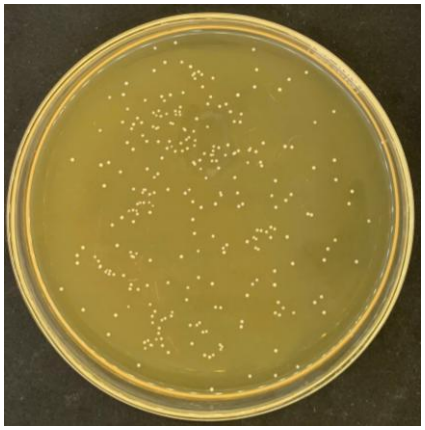
L. casei 01



L. pentosus NH1



B. animalis YC-381



P. acidilactici NBD8

5.5. Tủ nuôi kỵ khí đánh giá hoạt tính prebiotic PS



5.6. Tách chiết PS từ nấm



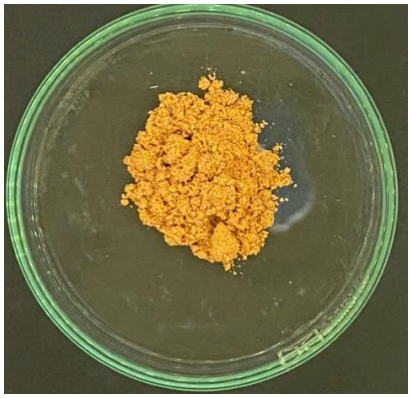
5.7. Máy UV-Vis



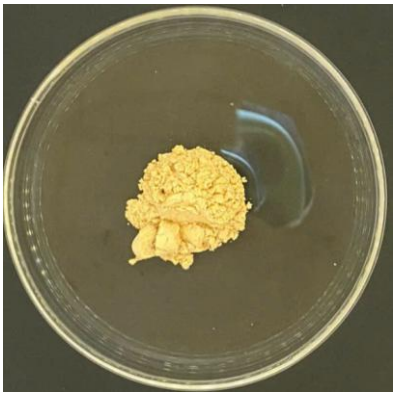
5.8. Các phân đoạn PS tách chiết từ sợi nấm



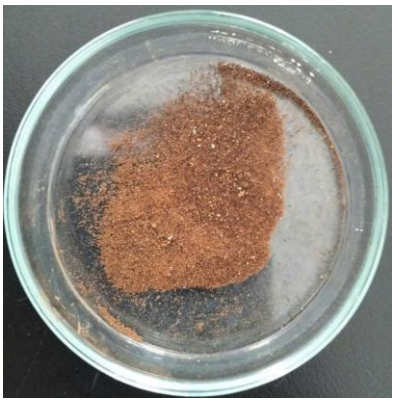
W-PSC



S-PSC



A-PSC



W-PST

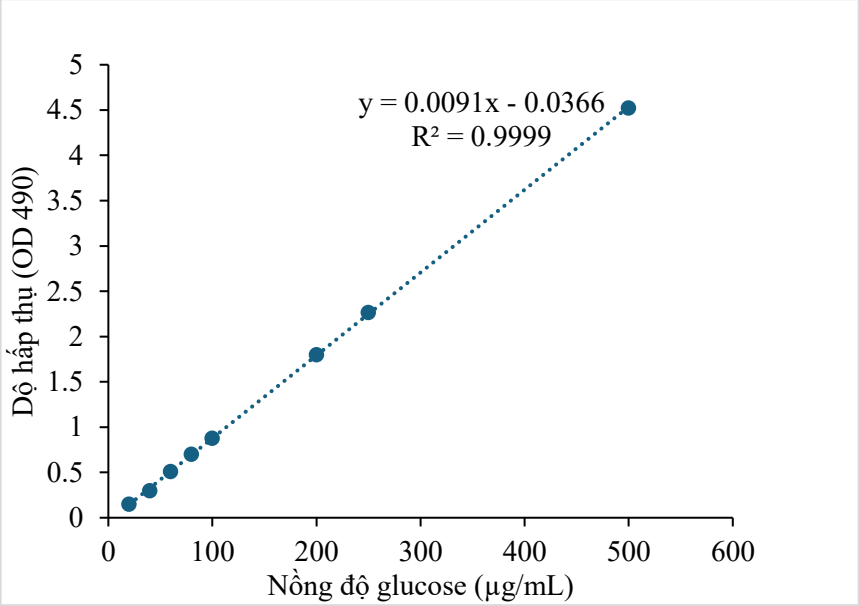


S-PST

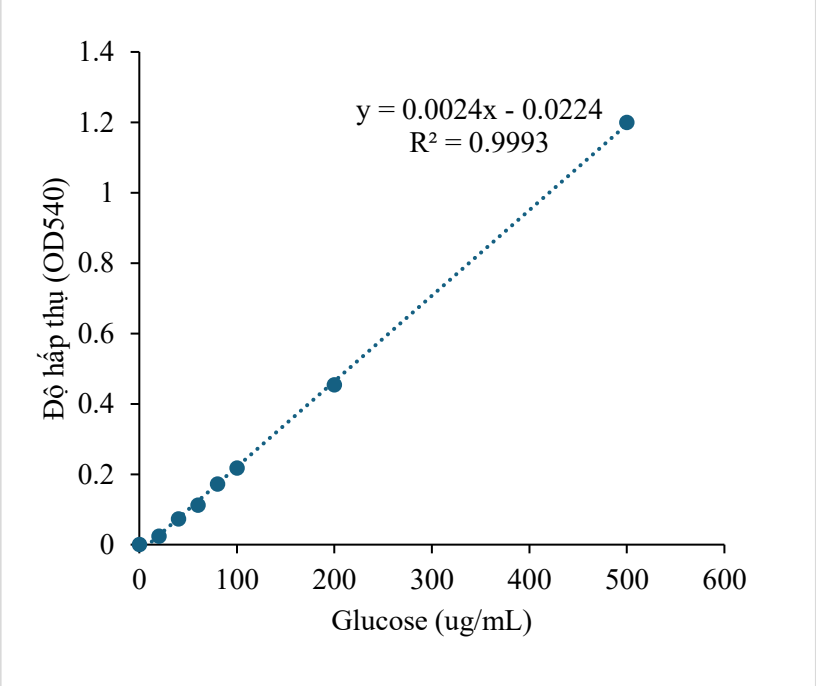


A-PST

5.9. Đường chuẩn glucose của phương pháp phenol-sunfuric

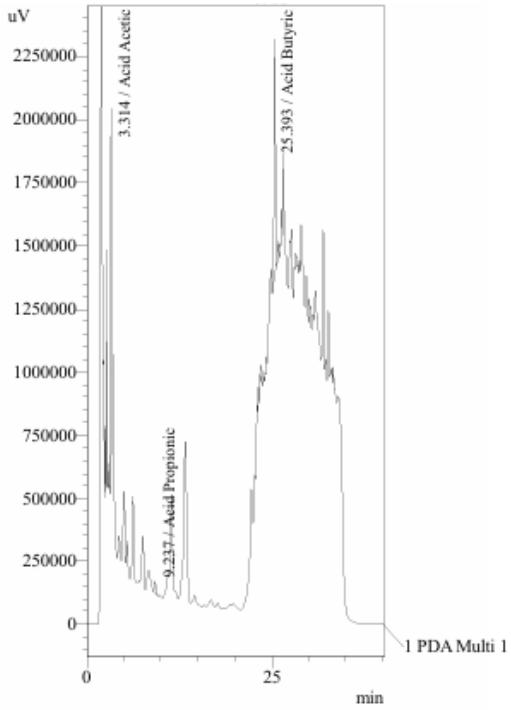


5.10. Đường chuẩn DNS

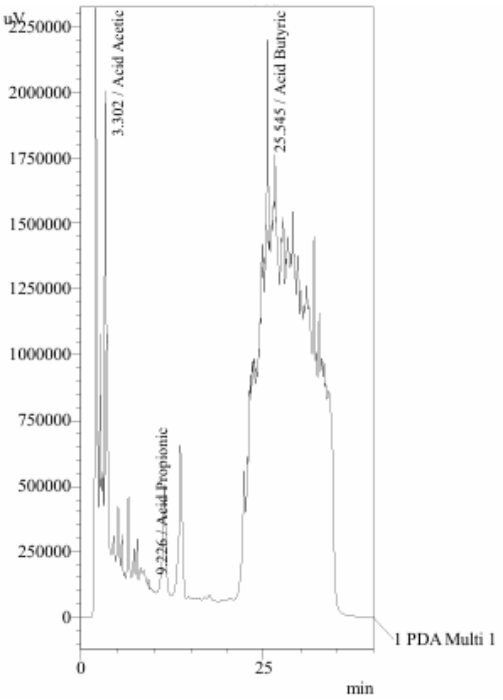


5.11. Sắc ký đồ SCFAs nuôi cấy probiotic bổ sung chiết xuất PS nấm C. militaris

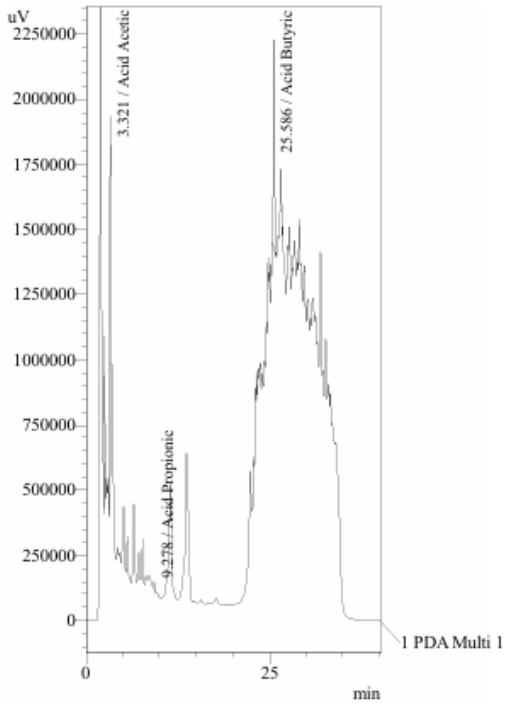
L. pentosus NH1



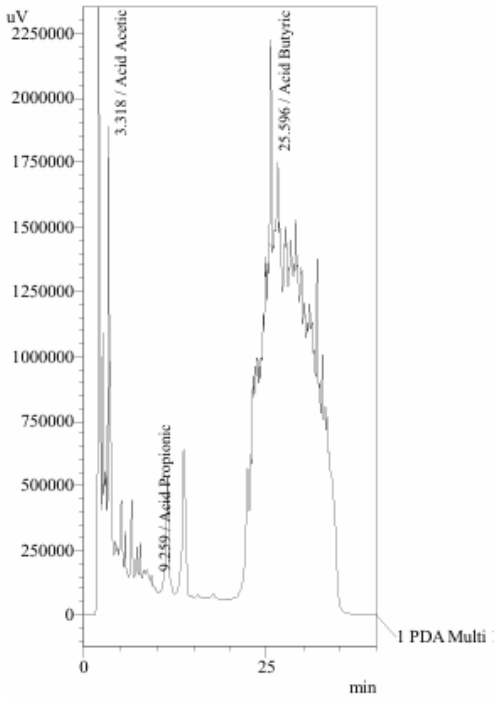
W-PSC



S-PSC

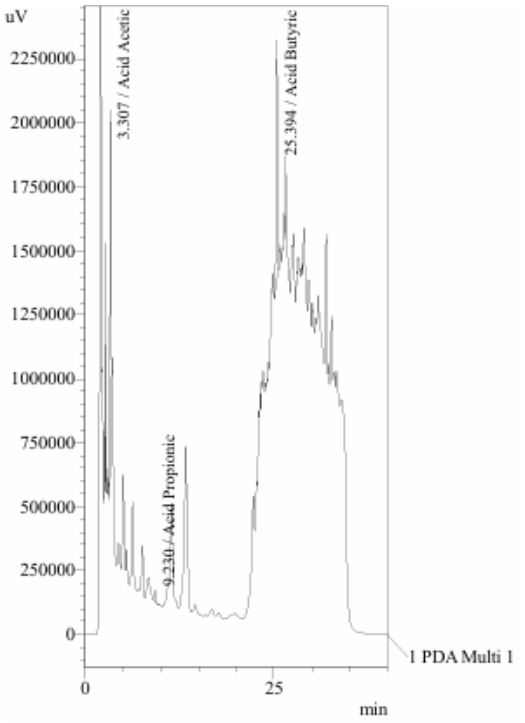


A-PSC

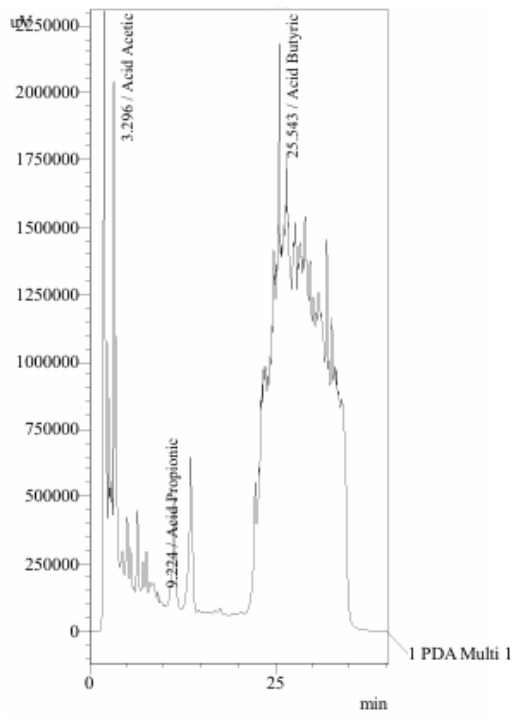


FOS

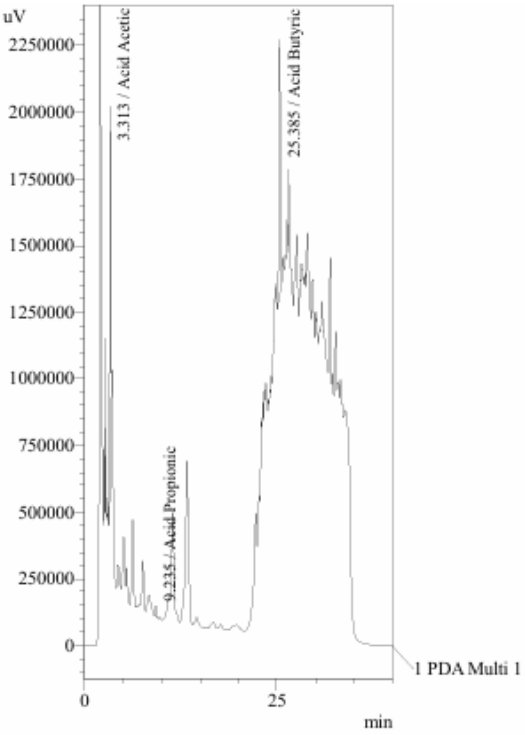
L. Plantarum WCFS1



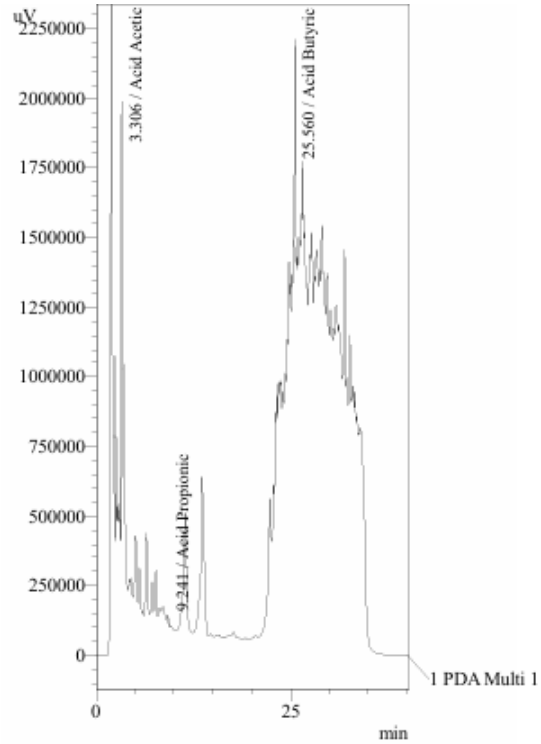
W-PSC



S-PSC

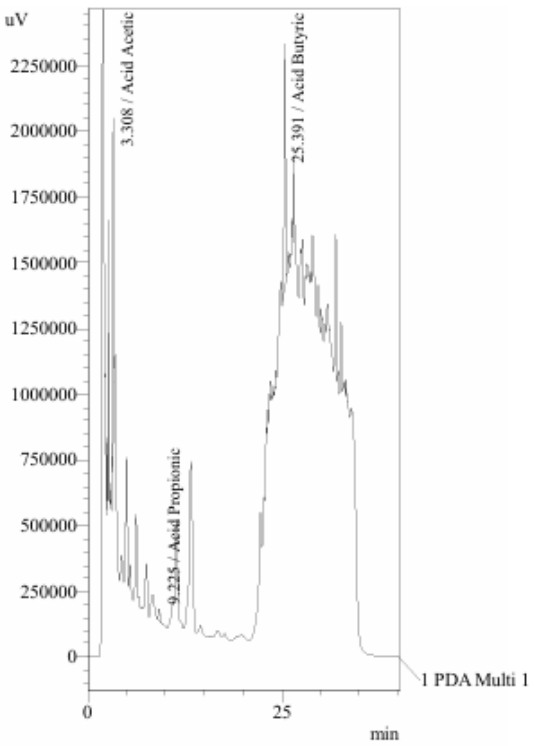


A-PSC

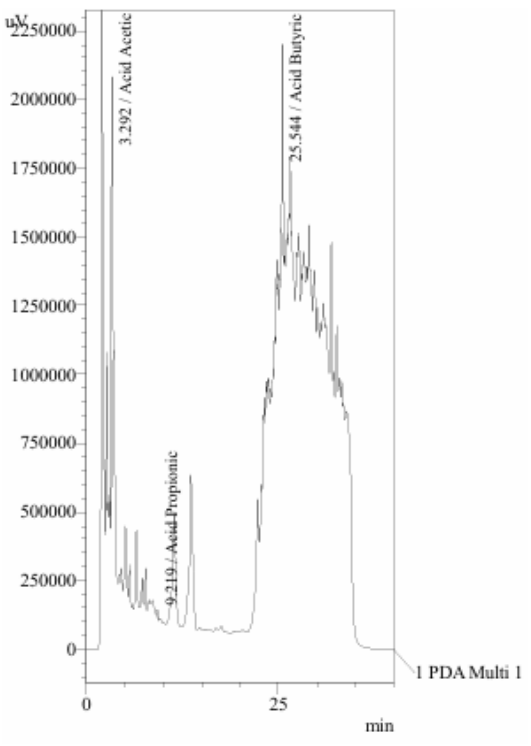


FOS

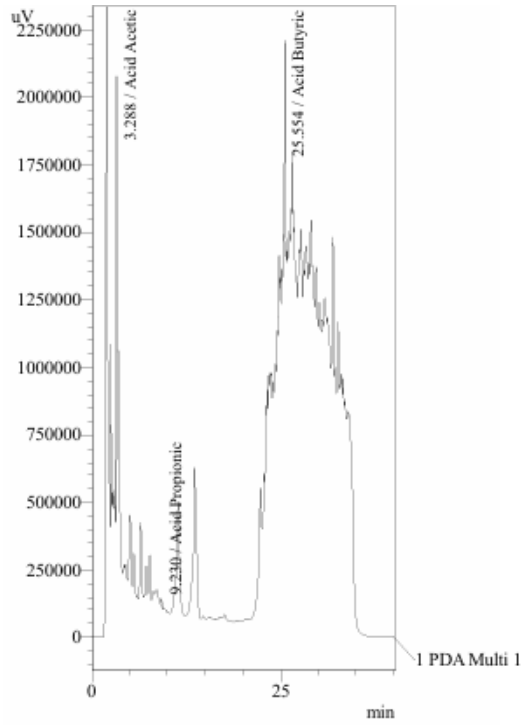
P. acidilactici NBD8



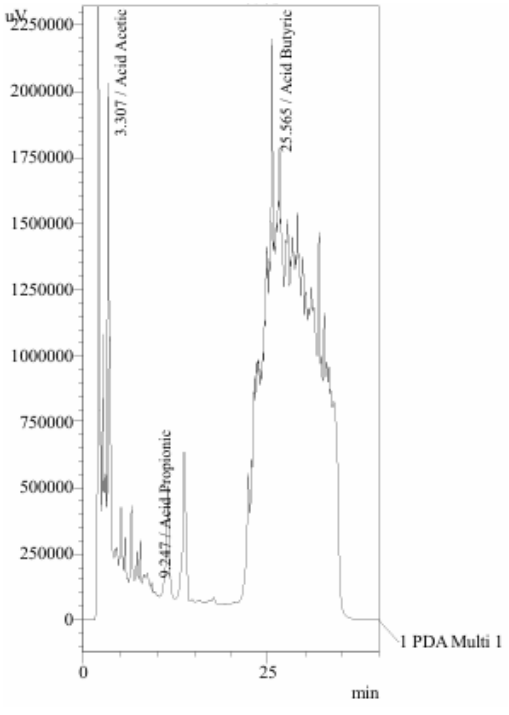
W-PSC



S-PSC

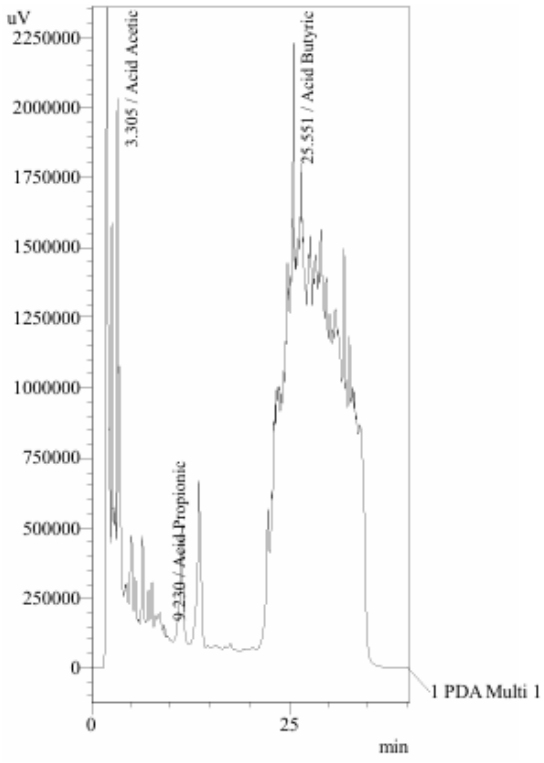


A-PSC

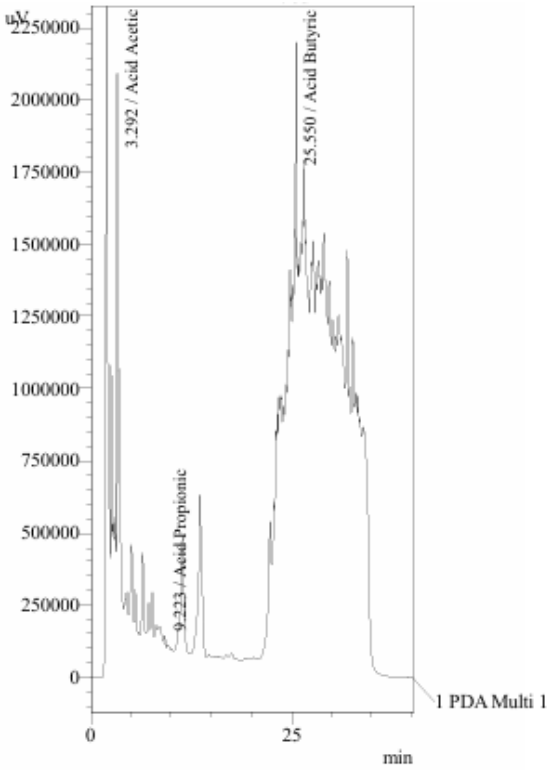


FOS

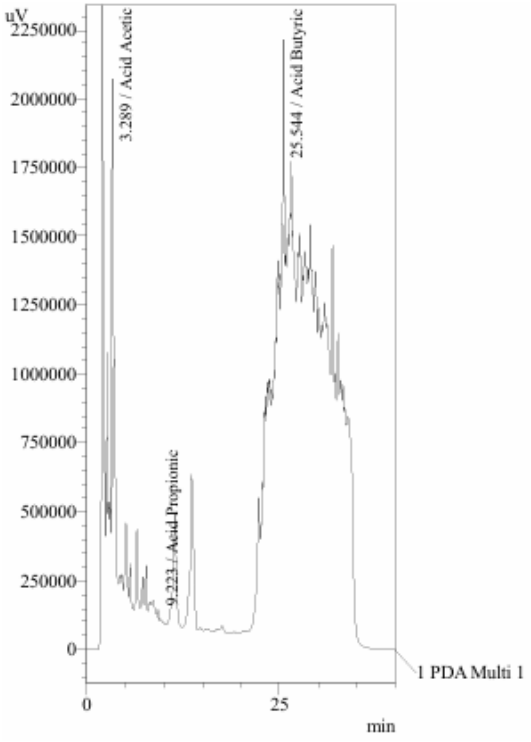
B. animalis YC 381



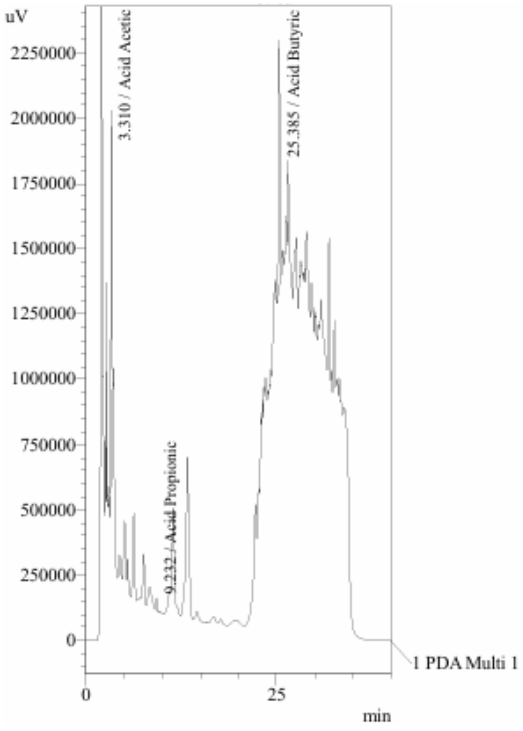
W-PSC



S-PSC

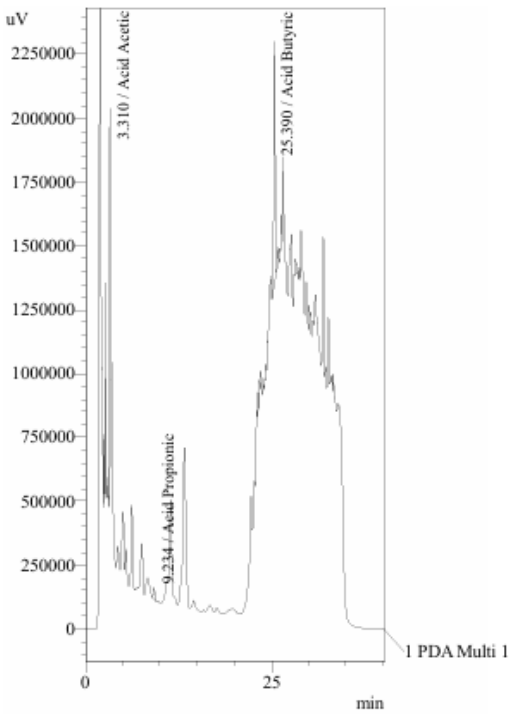


A-PSC

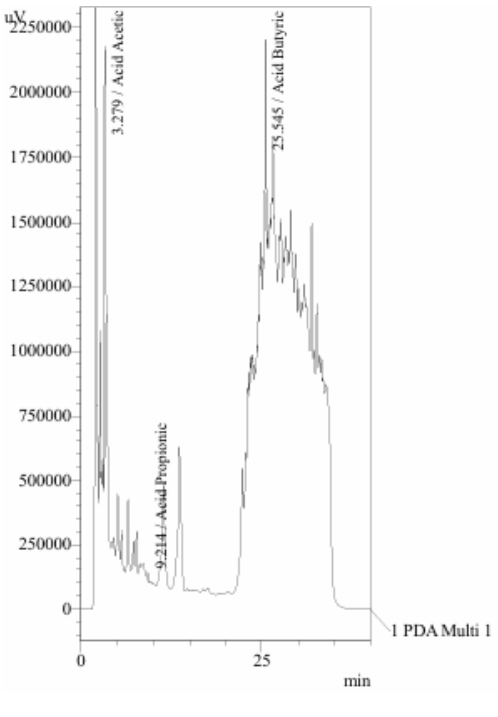


FOS

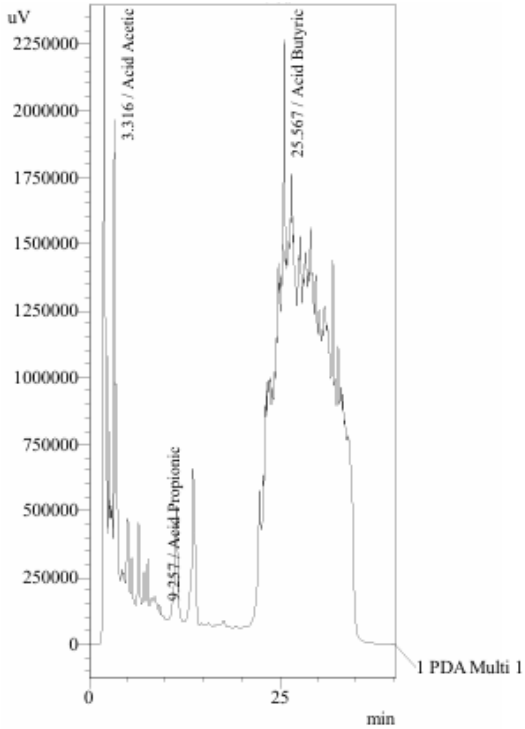
L. casei 01



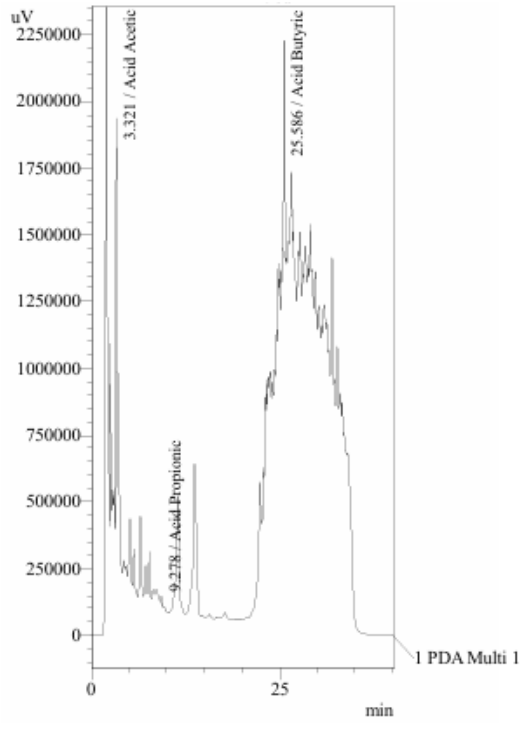
W-PSC



S-PSC

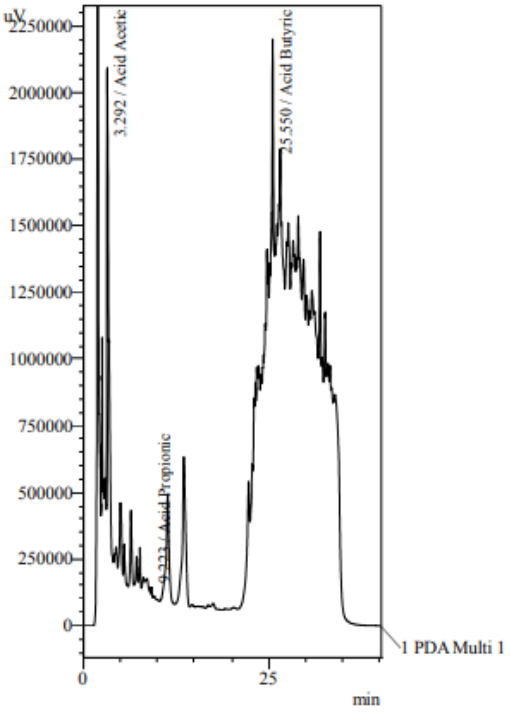


A-PSC

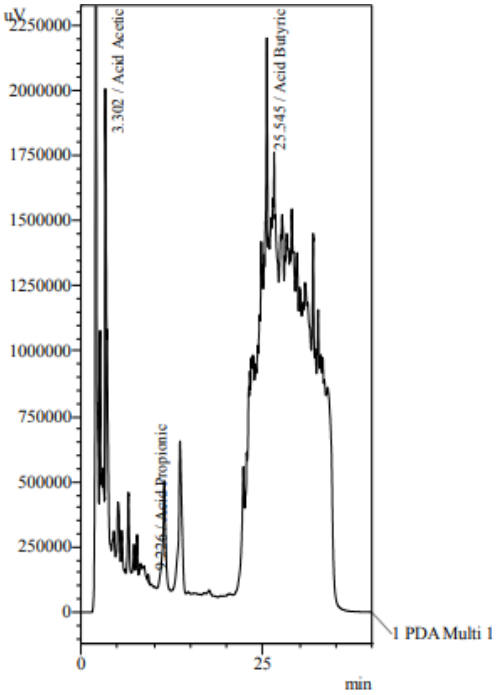


FOS

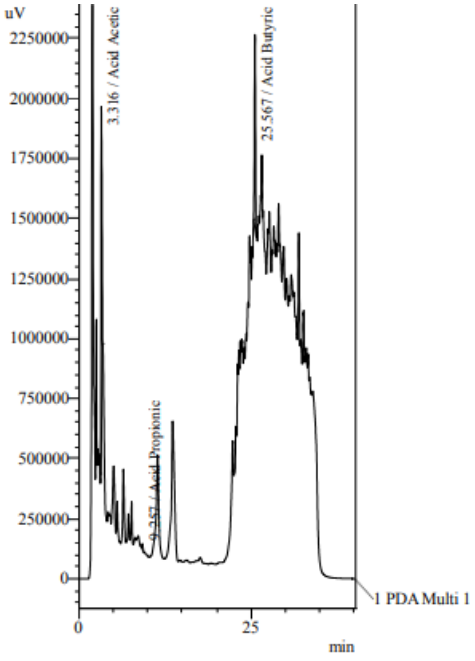
5.12. Sắc ký đồ SCFAs nuôi cấy probiotic bổ sung chiết xuất PS nấm *T. versicolor* *L. pentosus* NH1



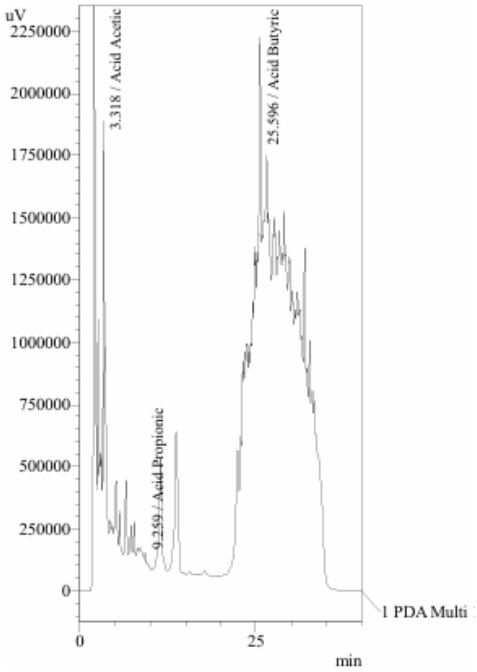
W-PST



S-PST

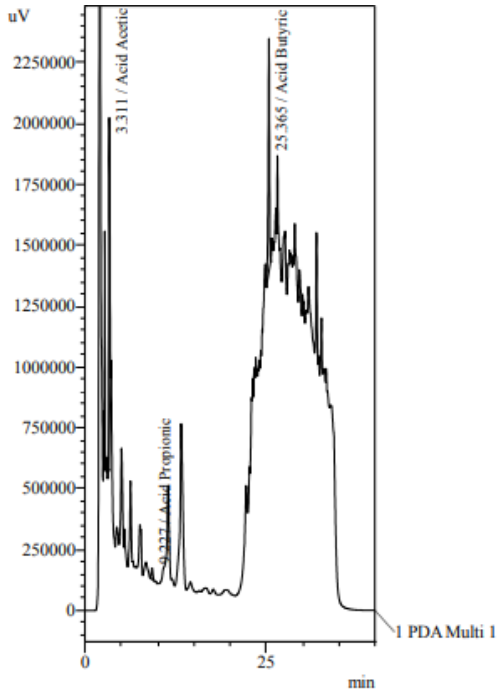


A-PST

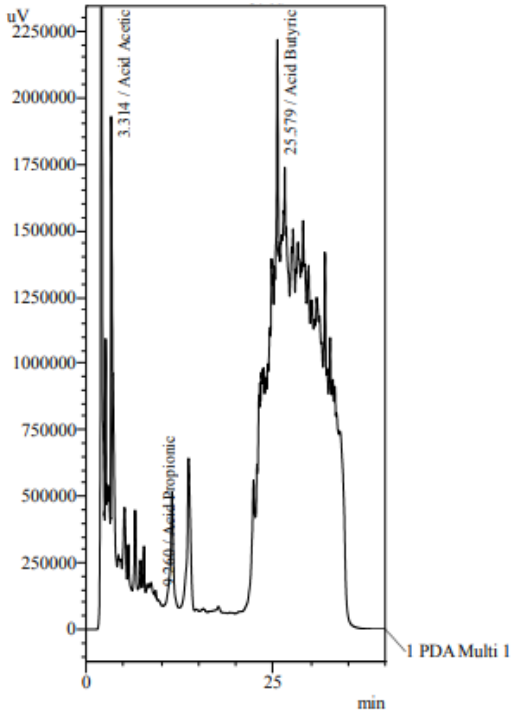


FOS

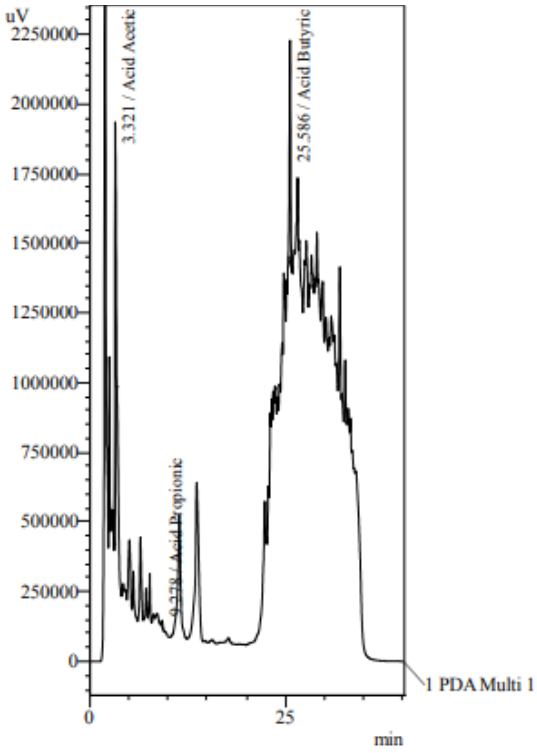
L. Plantarum WCFS1



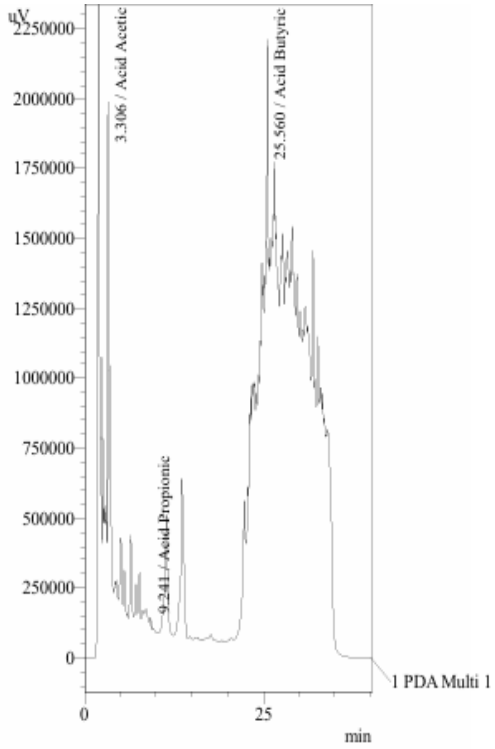
W-PST



S-PST

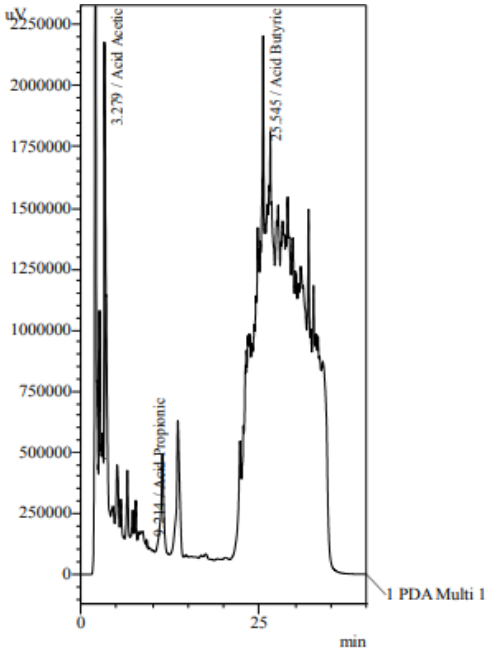


A-PST

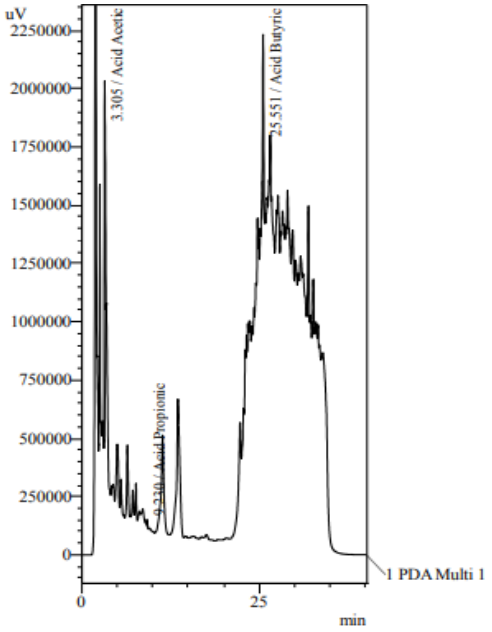


FOS

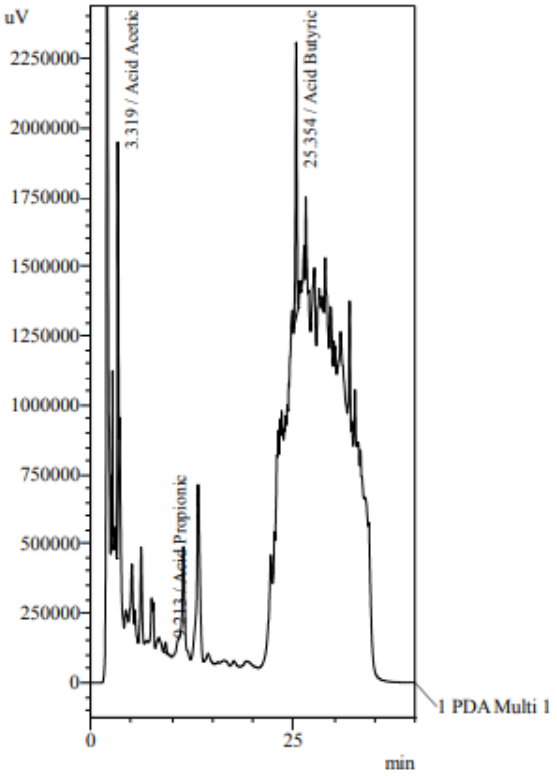
P. acidilactici NBD8



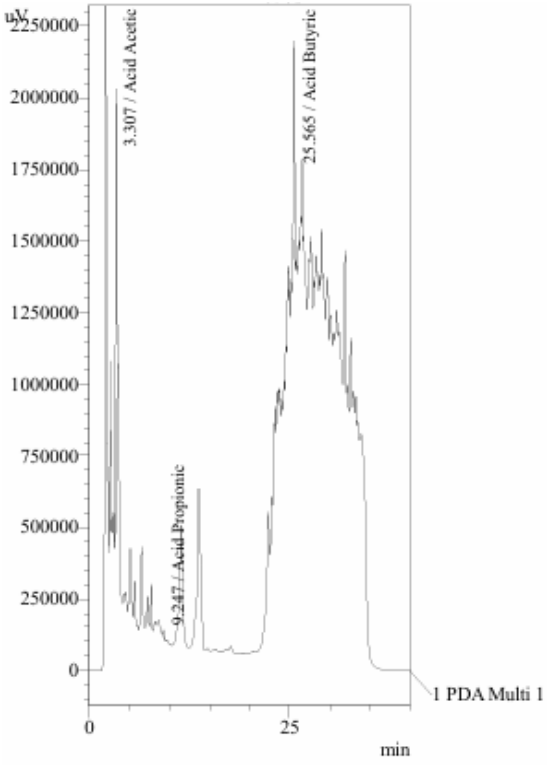
W-PST



S-PST

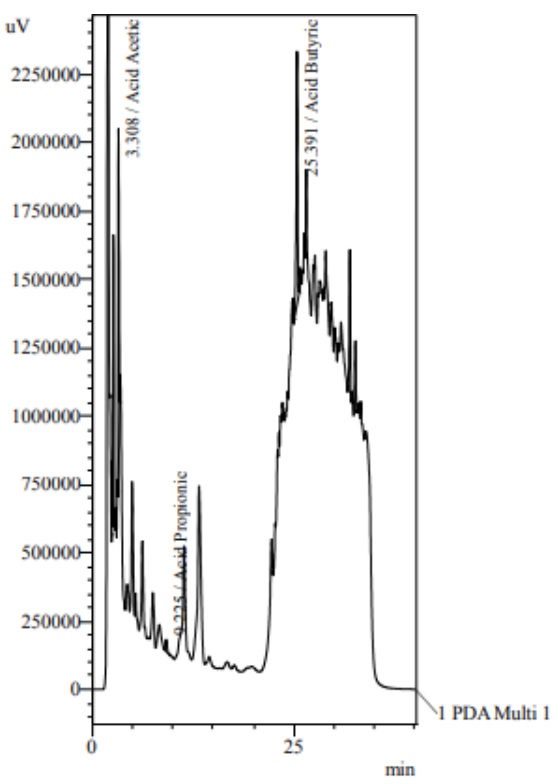


A-PST

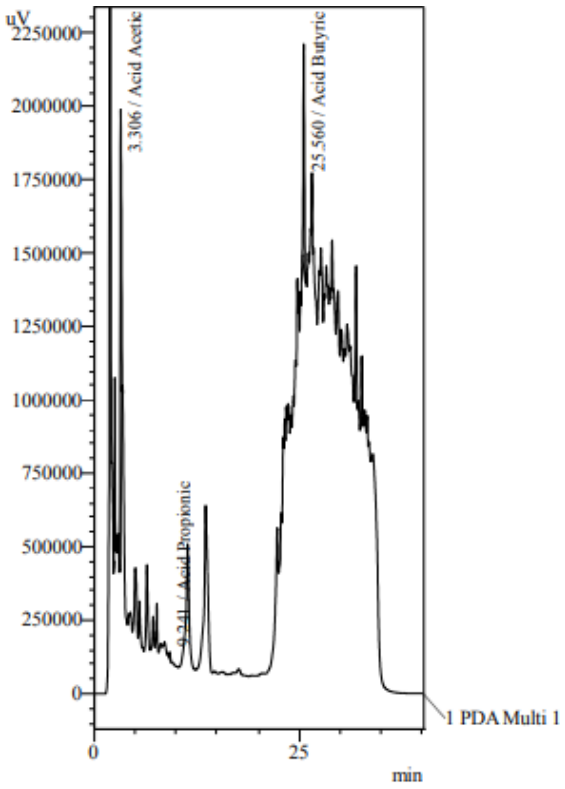


FOS

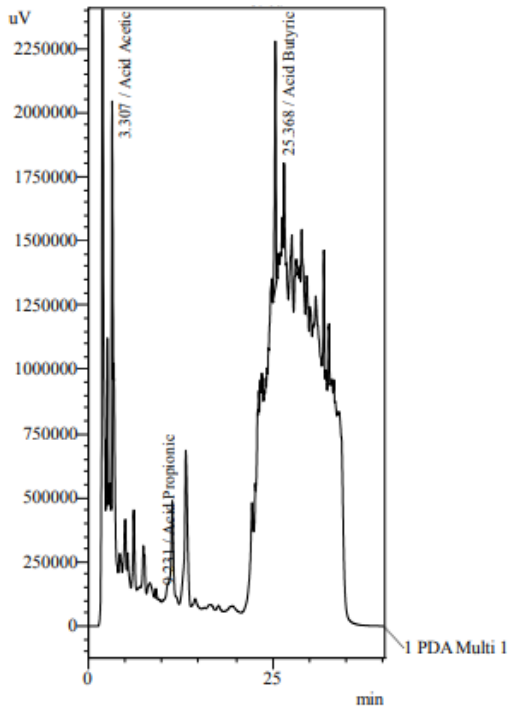
B. animalis YC 381



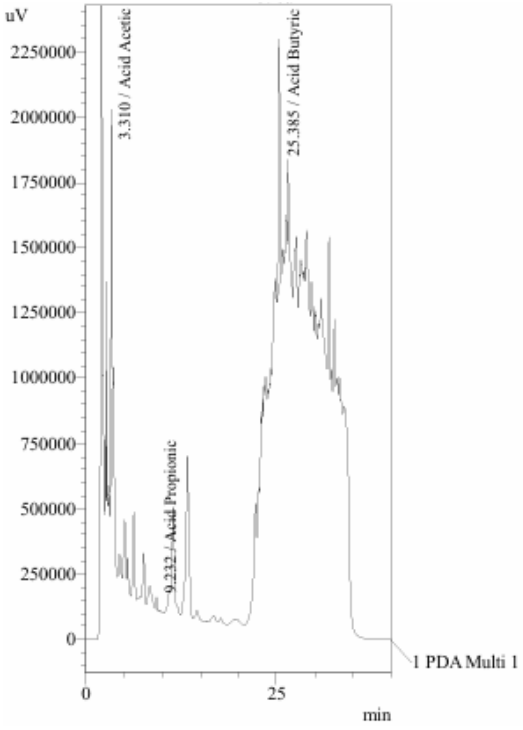
W-PS



S-PST

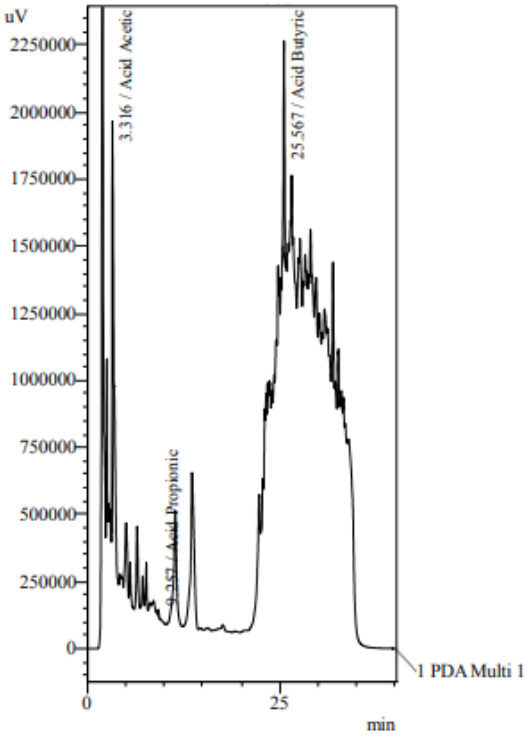


A-PST

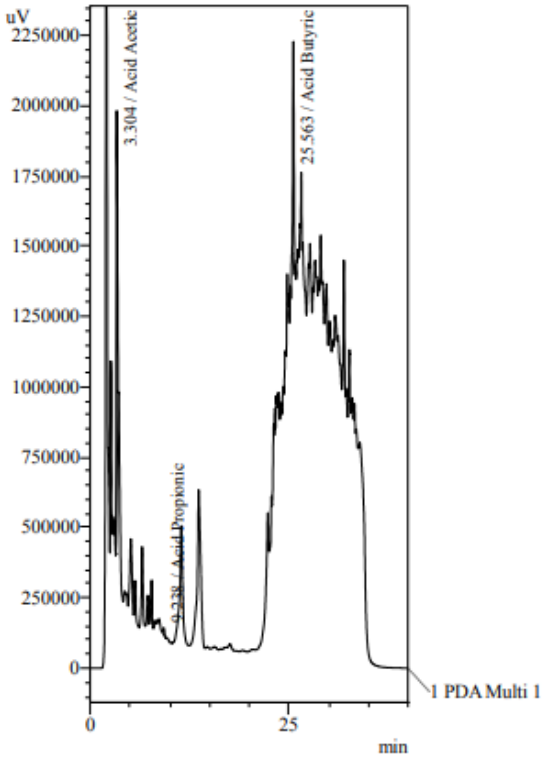


FOS

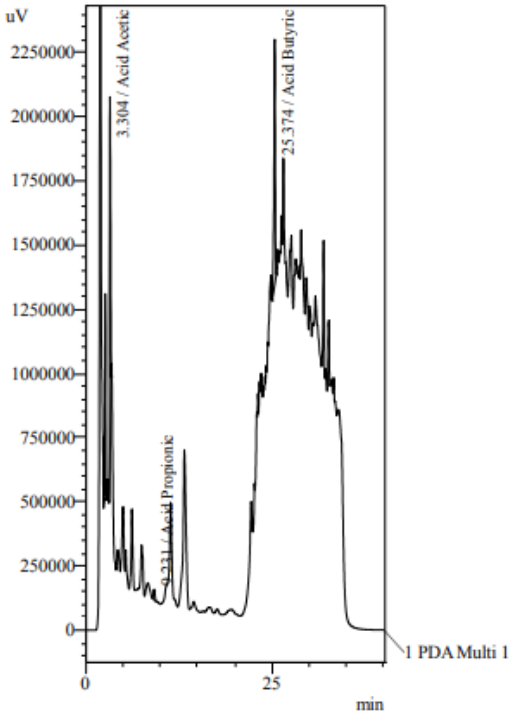
L. casei 01



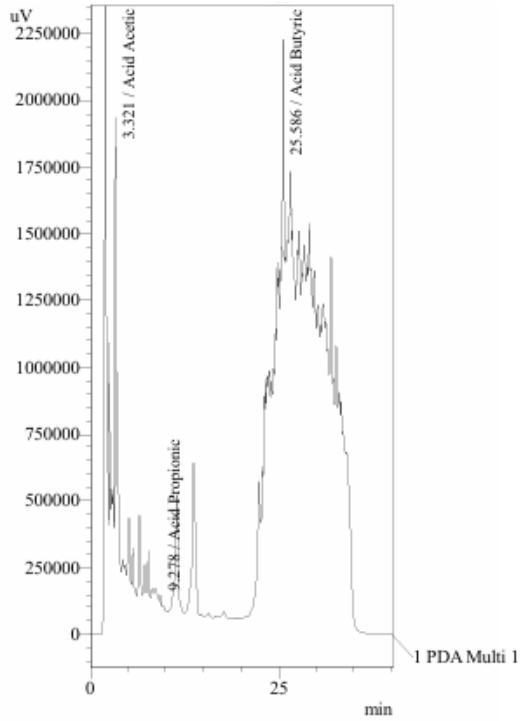
W-PST



S-PST

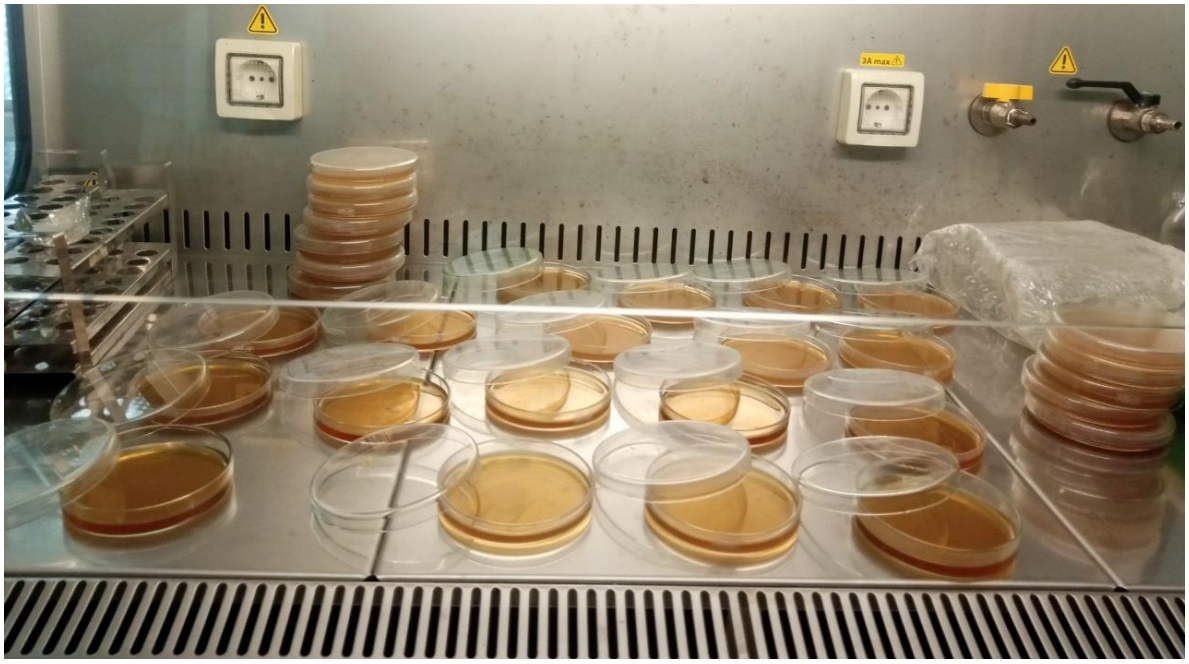


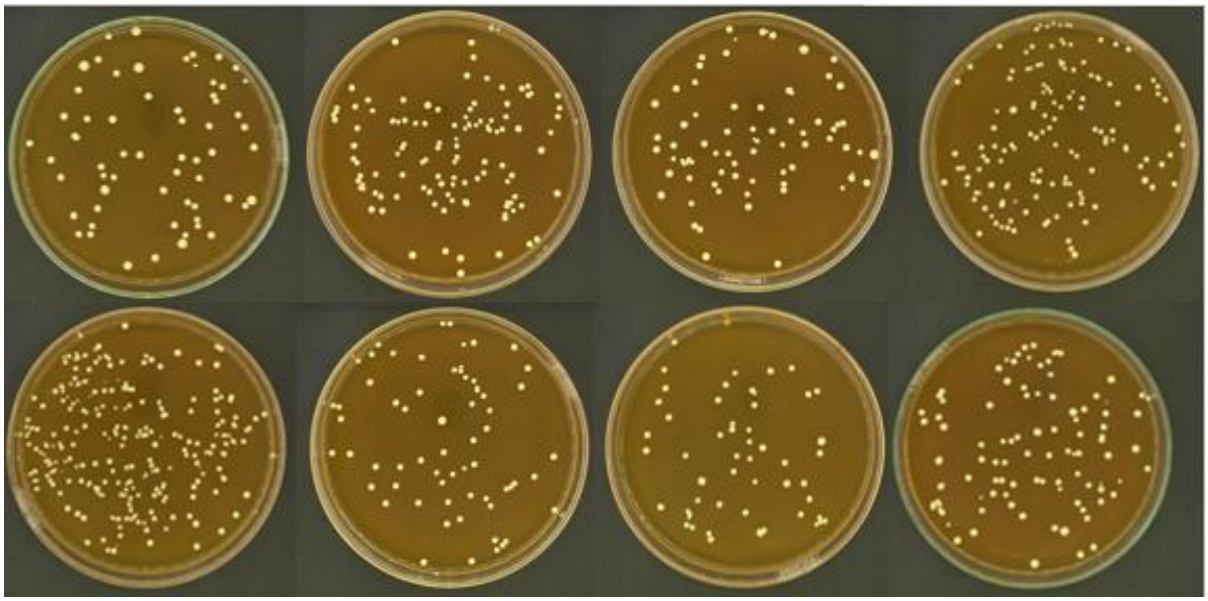
A-PST



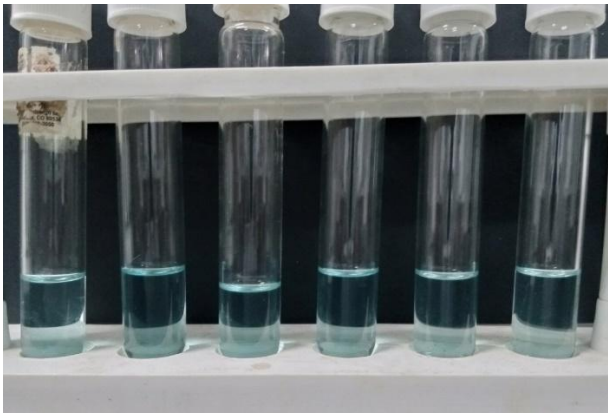
FOS

5.13. Cấy trãi đĩa xác định mật độ tế bào

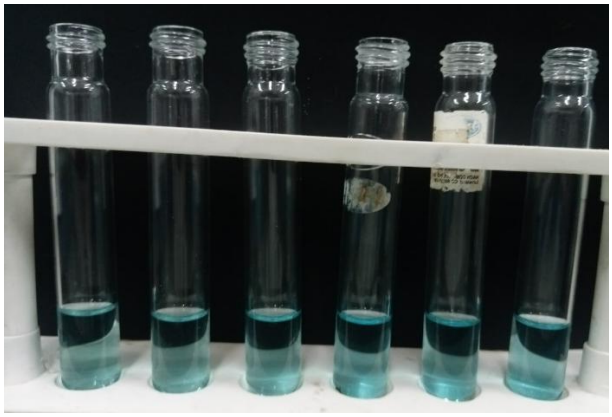




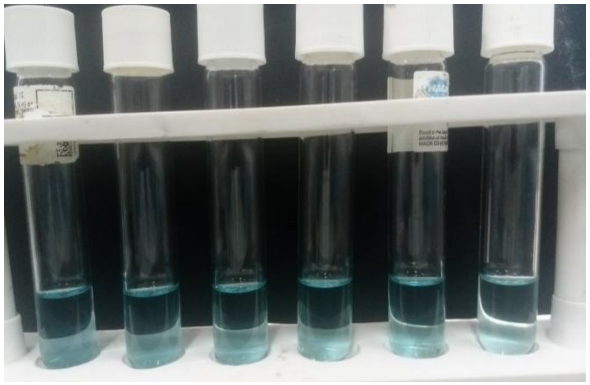
5.14. Khả năng bắt gốc tự do $ABTS^+$



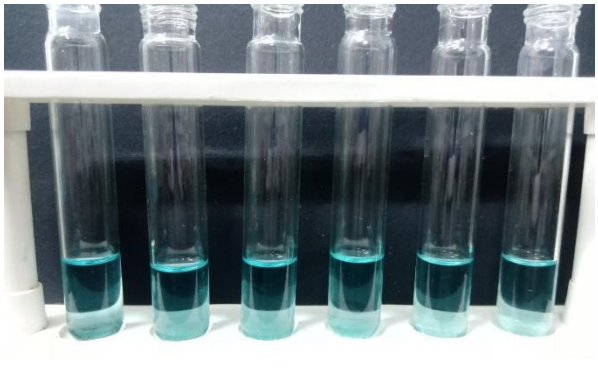
0 giờ



12 giờ



24 giờ

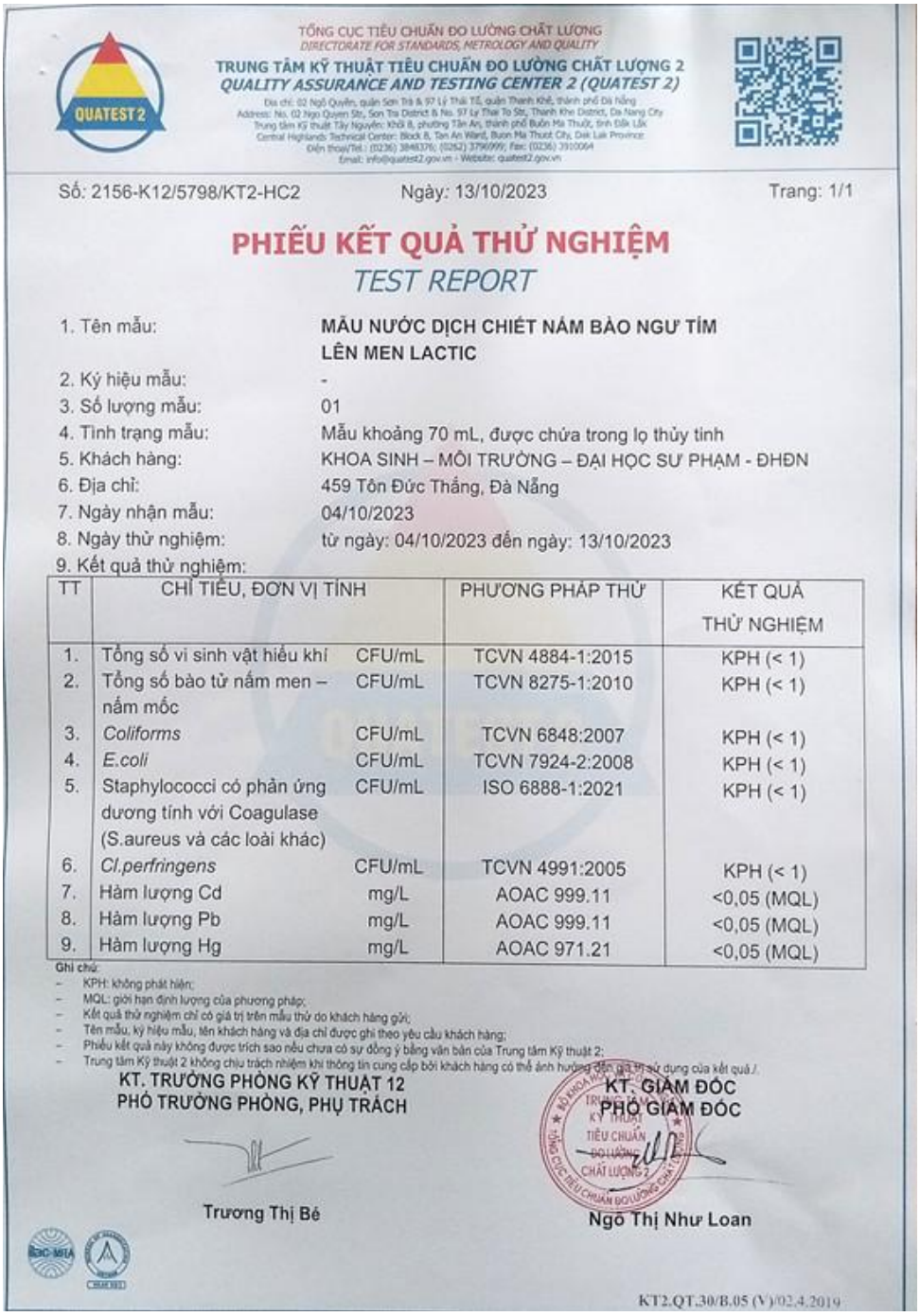


48 giờ

5.15. Nước lên men lactic



5.16. Phiếu đánh giá nước lên men lactic



TỔNG CỤC TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG
DIRECTORATE FOR STANDARDS, METROLOGY AND QUALITY
TRUNG TÂM KỸ THUẬT TIÊU CHUẨN ĐO LƯỜNG CHẤT LƯỢNG 2
QUALITY ASSURANCE AND TESTING CENTER 2 (QUATEST 2)
Địa chỉ: 02 Ngô Quyền, quận Sơn Trà & 97 Lý Thái Tổ, quận Thanh Khê, thành phố Đà Nẵng
Address: No. 02 Ngo Quyen Str., Son Tra District & No. 97 Ly Thai To Str., Thanh Khe District, Da Nang City
Trung tâm Kỹ thuật Tây Nguyên: Khối 8, phường Tân An, thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk
Central Highlands Technical Center: Block 8, Tan An Ward, Buon Ma Thuot City, Dak Lak Province
Điện thoại/Tel.: (0236) 3846376; (0262) 3796999; Fax: (0236) 3910064
Email: info@quatest2.gov.vn - Website: quatest2.gov.vn

Số: 2156-K12/5798/KT2-HC2 Ngày: 13/10/2023 Trang: 1/1

PHIẾU KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
TEST REPORT

1. Tên mẫu: **MẪU NƯỚC DỊCH CHIẾT NẤM BÀO NGƯ TÍM LÊN MEN LACTIC**
2. Ký hiệu mẫu: -
3. Số lượng mẫu: 01
4. Tình trạng mẫu: Mẫu khoảng 70 mL, được chứa trong lọ thủy tinh
5. Khách hàng: KHOA SINH – MÔI TRƯỜNG – ĐẠI HỌC SƯ PHẠM - ĐHĐN
6. Địa chỉ: 459 Tôn Đức Thắng, Đà Nẵng
7. Ngày nhận mẫu: 04/10/2023
8. Ngày thử nghiệm: từ ngày: 04/10/2023 đến ngày: 13/10/2023
9. Kết quả thử nghiệm:

TT	CHỈ TIÊU, ĐƠN VỊ TÍNH		PHƯƠNG PHÁP THỬ	KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM
1.	Tổng số vi sinh vật hiếu khí	CFU/mL	TCVN 4884-1:2015	KPH (< 1)
2.	Tổng số bào tử nấm men – nấm mốc	CFU/mL	TCVN 8275-1:2010	KPH (< 1)
3.	*Coliforms*	CFU/mL	TCVN 6848:2007	KPH (< 1)
4.	*E.coli*	CFU/mL	TCVN 7924-2:2008	KPH (< 1)
5.	Staphylococci có phản ứng dương tính với Coagulase (S.aureus và các loài khác)	CFU/mL	ISO 6888-1:2021	KPH (< 1)
6.	*Cl.perfringens*	CFU/mL	TCVN 4991:2005	KPH (< 1)
7.	Hàm lượng Cd	mg/L	AOAC 999.11	<0,05 (MQL)
8.	Hàm lượng Pb	mg/L	AOAC 999.11	<0,05 (MQL)
9.	Hàm lượng Hg	mg/L	AOAC 971.21	<0,05 (MQL)

Ghi chú:
- KPH: không phát hiện;
- MQL: giới hạn định lượng của phương pháp;
- Kết quả thử nghiệm chỉ có giá trị trên mẫu thử do khách hàng gửi;
- Tên mẫu, ký hiệu mẫu, tên khách hàng và địa chỉ được ghi theo yêu cầu khách hàng;
- Phiếu kết quả này không được trích sao nếu chưa có sự đồng ý bằng văn bản của Trung tâm Kỹ thuật 2;
- Trung tâm Kỹ thuật 2 không chịu trách nhiệm khi thông tin cung cấp bởi khách hàng có thể ảnh hưởng đến giá trị sử dụng của kết quả./.

KT. TRƯỞNG PHÒNG KỸ THUẬT 12
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG, PHỤ TRÁCH

Trương Thị Bé

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Ngô Thị Như Loan

KT2.QT.30/B.05 (V)/02.4.2019

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

Số: 3238./QĐ-ĐHBK

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Đà Nẵng, ngày 22. tháng 6 năm 2026

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường

HIỆU TRƯỞNG TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

Căn cứ Nghị định số 32/CP ngày 04 tháng 4 năm 1994 của Chính phủ về việc thành lập Đại học Đà Nẵng;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04 tháng 4 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Thông tư số 10/2020/TT-BGDĐT ngày 14 tháng 5 năm 2020 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của đại học vùng và các cơ sở giáo dục đại học thành viên;

Căn cứ Nghị quyết số 08/NQ-HĐĐH ngày 12 tháng 7 năm 2021 của Hội đồng Đại học Đà Nẵng ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Đà Nẵng và Nghị quyết số 13/NQ-HĐĐH ngày 07 tháng 9 năm 2021 của Hội đồng Đại học Đà Nẵng về việc sửa đổi, bổ sung một số điều của Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Đà Nẵng;

Căn cứ Nghị quyết số 93/NQ-HĐT ngày 18 tháng 12 năm 2023 của Hội đồng trường Trường Đại học Bách khoa ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng;

Căn cứ Quyết định số 405/QĐ-ĐHBK ngày 05 tháng 3 năm 2019 của Hiệu trưởng Trường Đại học Bách khoa về việc ban hành Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ tại Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng;

Xét Tờ trình số 51/TTr-KH ngày 01 tháng 6 năm 2026 của Khoa Hóa về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Bích Hằng;

Theo đề nghị của Trưởng phòng Phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường cho nghiên cứu sinh **Nguyễn Thị Bích Hằng**, tuyển sinh năm 2020, ngành *Công nghệ thực phẩm*, mã số *9540101* về đề tài *"**Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyces militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**"* gồm các thành viên có tên trong danh sách kèm theo.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án theo đúng Quy định của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Đại học Đà Nẵng và Trường Đại học Bách khoa. Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trưởng phòng Phòng Tổ chức - Hành chính, Trưởng phòng Phòng Đào tạo, Trưởng phòng Phòng Kế hoạch - Tài chính, Trưởng khoa Khoa Hóa, các thành viên trong Hội đồng và nghiên cứu sinh có tên tại Điều 1 căn cứ Quyết định thi hành./.

Nơi nhận:
- Như Điều 3;
- Hiệu trưởng (để báo cáo);
- Các Phó Hiệu trưởng (để biết);
- Khoa Hóa;
- Lưu: VT, P.ĐT.

KT. HIỆU TRƯỞNG
PHÓ HIỆU TRƯỞNG

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PGS. TS. Nguyễn Hồng Hải

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

DANH SÁCH THÀNH VIÊN
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN CẤP TRƯỜNG

(Kèm theo Quyết định số 3238/QĐ-ĐHBK ngày 22... tháng 6 năm 2026 của Hiệu trưởng Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng)

TT	HỌ VÀ TÊN, NƠI CÔNG TÁC	TRÁCH NHIỆM TRONG HỘI ĐỒNG
1.	Mời GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh	Chủ tịch Hội đồng
2.	Mời PGS. TS. Nguyễn Quang Vinh Trường Đại học Tây Nguyên	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Thị Đông Phương Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng	Phản biện 2
4.	Mời GS. TS. Trần Thanh Trúc Đại học Cần Thơ	Phản biện 3
5.	Mời PGS. TS. Võ Văn Quốc Bảo Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế	Uỷ viên 1
6.	Mời PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng	Uỷ viên 2
7.	TS. Mạc Thị Hà Thanh Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng	Thư ký Hội đồng

Hội đồng gồm có 7 thành viên.

Thông tin về đề tài luận án và Nghiên cứu sinh thực hiện:

Nghiên cứu sinh: ***Nguyễn Thị Bích Hằng***

Tên đề tài luận án: **Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyces militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**

Giảng viên hướng dẫn:

- ***PGS. TS. Đặng Minh Nhật, Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng***
- ***TS. Nguyễn Hoàng Dũng, Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam***

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ tên người nhận xét: Lê Văn Việt Mẫn
Học hàm: Giáo sư Học vị: Tiến sĩ
Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm
Cơ quan công tác: Trường Đại học Bách khoa – ĐHQG Tp.HCM
Địa chỉ: 268 Lý Thường Kiệt, Phường Diên Hồng, Tp. Hồ Chí Minh

Họ và tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng Tuyển sinh năm: 2020
Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm Mã số: 9540101
Tên luận án: Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyces militaris, Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Nấm dược liệu giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học; các hợp chất này được sử dụng ngày càng phổ biến trong ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm bổ sung và thực phẩm hỗ trợ sức khỏe. Đến nay đã có nhiều công bố về phương pháp trồng nấm dược liệu, trích ly - tinh sạch các hoạt chất từ nấm dược liệu và phát triển nhóm thực phẩm hỗ trợ sức khỏe có chứa hoạt chất sinh học từ nấm dược liệu.

Luận án này sử dụng một cách tiếp cận mới: nuôi cấy nấm dược liệu trên môi trường lỏng để thu nhận sinh khối và tách chiết polysaccharide từ sinh khối nấm để tạo chế phẩm có hoạt tính prebiotic. Hướng nghiên cứu này có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao trong việc góp phần phát triển nhóm nguyên liệu chế biến và sản phẩm hỗ trợ sức khỏe cho người tiêu dùng.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

Nội dung và kết quả nghiên cứu trong luận án này không trùng lặp với các đề tài, luận văn, luận án và công bố khoa học trước đây.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

Tên đề tài là phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận án. Nội dung nghiên cứu trong luận án có thể xem là phù hợp với chuyên ngành công nghệ thực phẩm.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

Luận án được viết theo đúng quy định của một tài liệu khoa học; phần trích dẫn được thực hiện rõ ràng và đầy đủ.

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Danh mục các công trình đã công bố của luận án có 4 bài báo khoa học. Kết quả trong bài báo đầu tiên "Developing a heath-supporting fermented lactic beverage from oyster

mushrooms "*Pleurotus ostreatus*" không có trình bày trong luận án nên bài báo này không được xem là kết quả của luận án. Kết quả của 3 bài báo còn lại đều là kết quả của luận án.

Ngoài ra, danh mục các công trình công bố của luận án còn có một quyển sách chuyên khảo do nghiên cứu sinh và một số tác giả khác cùng biên soạn. Tuy nhiên, hồ sơ không đính kèm quyển sách và không có giới thiệu những nội dung mà nghiên cứu sinh đã viết trong quyển sách nên không thể đánh giá được công bố này có phải là kết quả của luận án hay không.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng cả phương pháp nghiên cứu thực nghiệm cổ điển lẫn phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Cách thiết kế thí nghiệm là phù hợp với mục tiêu nghiên cứu của luận án. Những phương pháp phân tích sử dụng trong luận án là những phương pháp phân tích thông dụng hiện nay và có độ chính xác khá tốt. Các thí nghiệm được lặp lại để lấy giá trị trung bình; kết quả được xử lý thống kê đầy đủ nên số liệu thu được là đáng tin cậy.

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

Những kết quả nghiên cứu mới của luận án như sau:

- Đã xác định một số điều kiện tối ưu như hàm lượng glucose và chất chiết nấm men, pH ban đầu của môi trường nuôi cấy để hàm lượng sinh khối và polysaccharide từ hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* đạt giá trị cực đại.
- Đã đánh giá hiệu quả quy trình trích ly sử dụng 3 giai đoạn với 3 loại dung môi khác nhau để thu nhận polysaccharide từ sinh khối của hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*.
- Đã so sánh hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính prebiotic của các phân đoạn polysaccharide từ quy trình trích ly nhiều giai đoạn nói trên.
- Bước đầu khẳng định polysaccharide thu được từ *Trametes versicolor* có hoạt tính prebiotic trong quá trình lên men lactic dịch chiết nấm bào ngư.

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

Chương Mở đầu

- Mục tiêu tổng quát của luận án (trang 3) có nhắc đến "sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng" là không phù hợp với tên của luận án "thực phẩm bổ sung" nên cần được hiệu chỉnh lại. Trong phần mục tiêu cụ thể (trang 3), nội dung về "khảo sát khả năng ứng dụng sinh khối…" cần được sửa lại là "đánh giá tiềm năng sử dụng sinh khối…"
- Phạm vi nghiên cứu có nhắc lại "đối tượng nghiên cứu" (trang 3) là không phù hợp nên cần bỏ đi. Bên cạnh đó, cần trình bày phạm vi nghiên cứu về quá trình lên men thu sinh khối và polysaccharide, trích ly và phát triển sản phẩm nước uống lên men lactic.
- Phần phương pháp nghiên cứu cần được hiệu chỉnh lại, đặc biệt là bổ sung phương pháp thực nghiệm cổ điển và phương pháp bề mặt đáp ứng để thiết kế thí nghiệm, phương pháp phân tích hóa lý, vi sinh và phương pháp xử lý số liệu để đánh giá chất lượng sản phẩm (trang 4).

Chương Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Một số thí nghiệm chưa giới thiệu quy mô và cần được bổ sung: Ví dụ như trong nội dung 1, thể tích môi trường sử dụng cho mỗi nghiệm thức lên men là bao nhiêu; trong nội dung 3, khối lượng quả thể nấm bào ngư sử dụng để thu dịch chiết là bao nhiêu; thể tích dịch chiết để lên men là bao nhiêu.

Chương Kết quả và bàn luận

- Mục 3.2.4.4 cho thấy tỉ lệ phân giải polysaccharide từ nấm sợi bởi chế phẩm alpha amylase dao động từ 2 đến 14% (trang 105-106). Thông thường, các prebiotic không bị thủy phân bởi alpha amylase trong hệ tiêu hóa. Do đó, cần giải thích và biện luận thêm về kết quả đã thu được.
- Việc đề xuất quy trình chế biến nước uống nấm bào ngư bổ sung sinh khối nấm vân chi (trang 126) là không cần thiết vì mục tiêu luận án không có mục đề xuất quy trình. Hơn nữa, một số công đoạn trong quy trình chưa được nghiên cứu để tối ưu hóa các thông số công nghệ.

Một số góp ý thêm cho nghiên cứu trong tương lai

- Khi đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật bằng phương pháp đổ đĩa thạch, cần có mẫu đối chứng âm và dương để so sánh với kết quả thực nghiệm.
- Để chỉnh pH trong các quá trình lên men thực phẩm, cần hạn chế sử dụng dung dịch HCl hoặc NaOH.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Kết quả nghiên cứu của luận án đã công bố 1 bài trên tạp chí Mycobiology (Scopus Q2 thuộc lĩnh vực Infectious disease), 1 bài trên tạp chí Journal of Applied Biology and Biotechnology (Scimago Q2 thuộc lĩnh vực Agronomy and Crop Science và Q3 thuộc lĩnh vực Food Science) và 1 bài trên Tạp chí Công thương (Thuộc danh mục của HĐGSNN ngành Công nghệ thực phẩm). Các bài báo có chất lượng khá tốt và vượt yêu cầu về số lượng và chất lượng bài báo đối với một luận án tiến sĩ.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn Tóm tắt luận án

Tóm tắt luận án phản ánh nội dung cơ bản của luận án.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

Các vấn đề đặt ra của phản biện độc lập được nghiên cứu sinh giải trình đầy đủ và hợp lý.

12. Kết luận

Luận án đã đáp ứng tốt các yêu cầu chung của một LATS. Sau khi hiệu chỉnh luận án theo những góp ý ở trên, người viết nhận xét đề nghị cho phép NCS được bảo vệ luận án trước hội đồng cấp trường.

Xác nhận của cơ quan quản lý

Xác nhận: ông Lê Văn Việt Mẫn
là VC/NLĐ Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

TL. HIỆU TRƯỞNG
KT. TRƯỞNG PHÒNG
TỔ CHỨC – NHÂN SỰ
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG

ĐẠI HỌC QUỐC GIA THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

Trần Đức Học

Ngày 08 tháng 07 năm 2026

Người nhận xét

GS.TS. Lê Văn Việt Mẫn

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: Trần Thanh Trúc
Học hàm: Giáo sư Năm phong: 2025
Học vị: Tiến sĩ Năm công nhận: 2014
Chuyên ngành: Vi sinh vật học
Cơ quan công tác: Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ
Trách nhiệm trong Hội đồng: Phản biện 3
Tên nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng
Tên đề tài luận án: Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Đề tài lựa chọn hướng khai thác sinh khối hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể để thu nhận polysaccharide có tiềm năng prebiotic, đồng thời bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến đồ uống lên men. Hướng nghiên cứu phù hợp với xu thế phát triển nguồn nguyên liệu chức năng có nguồn gốc tự nhiên, chủ động về quá trình sản xuất và có khả năng kiểm soát chất lượng tốt hơn so với việc phụ thuộc hoàn toàn vào quả thể nấm.

Việc nghiên cứu đồng thời hai loài *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* có ý nghĩa vì hai loài này chứa các nhóm polysaccharide có giá trị và có tiềm năng sử dụng trong thực phẩm định hướng hỗ trợ sức khỏe. Nuôi cấy dịch thể cho phép rút ngắn thời gian thu sinh khối, kiểm soát pH, nguồn carbon và nitrogen, đồng thời tạo điều kiện nghiên cứu mối liên hệ giữa điều kiện nuôi cấy với sự tích lũy polysaccharide.

Về khoa học, luận án cung cấp bộ dữ liệu liên kết từ tối ưu hóa nuôi cấy, chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide, đánh giá khả năng kích thích probiotic, chỉ số prebiotic, tạo acid béo mạch ngắn và khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase, đến thử nghiệm ứng dụng sinh khối trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men. Về thực tiễn, nghiên cứu cho thấy khả năng sử dụng sinh khối hệ sợi nấm như một thành phần nguyên liệu cho thực phẩm lên men.

Tuy nhiên, phạm vi ý nghĩa cần được xác định đúng: luận án chủ yếu cung cấp bằng chứng về tiềm năng prebiotic in vitro và khả năng ứng dụng ban đầu ở quy mô phòng thí

nghiệm. Các kết quả chưa đủ để khẳng định hiệu quả sinh lý trên vật chủ, lợi ích sức khỏe trên người hoặc khả năng thương mại hóa đã được chứng minh.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu và kết luận

Các hướng nghiên cứu về nuôi cấy dịch thể nấm, chiết xuất polysaccharide, đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, tiềm năng prebiotic và phát triển đồ uống lên men đã được công bố trên thế giới. Vì vậy, từng kỹ thuật hoặc từng nội dung riêng lẻ của luận án không phải là hoàn toàn mới.

Tuy nhiên, luận án cho thấy không có dấu hiệu trùng lặp toàn bộ về thiết kế nghiên cứu, hệ thống số liệu và kết luận với một luận án hoặc công trình khoa học khác. Tính riêng của luận án thể hiện ở cách kết nối tương đối hệ thống giữa: (i) xác lập điều kiện nuôi cấy dịch thể cho hai chủng nấm; (ii) chiết xuất tuần tự bằng nước nóng, kiềm và acid; (iii) đánh giá nhiều chỉ dấu prebiotic in vitro; và (iv) lựa chọn sinh khối *T. versicolor* để bước đầu phát triển sản phẩm nước nấm lên men.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với chuyên ngành và mã số ngành

Đề tài phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, mã số 9540101. Nội dung bao gồm công nghệ nuôi cấy dịch thể, thu nhận hợp chất từ nguyên liệu sinh học, tối ưu hóa quá trình, đánh giá tính chất chức năng in vitro và phát triển sản phẩm thực phẩm lên men. Đây đều là các nội dung thuộc lĩnh vực công nghệ thực phẩm, công nghệ lên men và phát triển nguyên liệu thực phẩm chức năng.

Tuy nhiên, văn phong cần tiếp tục giữ đúng trọng tâm ngành Công nghệ thực phẩm. Các nội dung liên quan đến chống ung thư, điều hòa miễn dịch, phòng bệnh hoặc cải thiện sức khỏe chỉ nên được sử dụng làm bối cảnh từ tài liệu tham khảo, không nên diễn giải như kết quả được chứng minh trực tiếp bởi luận án.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ của việc trích dẫn tài liệu

Luận án sử dụng hệ thống tài liệu tham khảo tương đối phong phú, gồm các công trình về nấm dược liệu, polysaccharide nấm, nuôi cấy dịch thể, prebiotic, probiotic, chiết xuất và thực phẩm lên men. Tài liệu được sử dụng trong phần tổng quan, phương pháp và thảo luận khá đầy đủ, cho thấy nghiên cứu sinh đã có sự cập nhật và kế thừa kết quả nghiên cứu liên quan.

NCS cần kiểm tra tiếp tục sự thống nhất giữa cách viết tên loài, tên tạp chí, DOI, kiểu trình bày tên tác giả và các tài liệu mang tính nền tảng về định nghĩa prebiotic. Các nhận định như "không bị tiêu hóa", "kích thích chọn lọc", "hiệu quả cao", "an toàn" hoặc "sẵn sàng thương mại hóa" cần có nguồn trích dẫn phù hợp và phải được giới hạn đúng theo loại bằng chứng.

5. Sự phản ánh kết quả của luận án trong các công trình đã công bố

Theo danh mục hồ sơ, nghiên cứu sinh có 04 công trình liên quan trực tiếp đến luận án và đứng tên đầu trong các công trình này. Hai công trình tập trung vào hoạt tính prebioticcủa polysaccharide từ hệ sợi *C. militaris*; hai công trình liên quan đến sản phẩm nước nấm lên men và ứng dụng sinh khối *T. versicolor*. Ngoài ra, nghiên cứu sinh tham gia các đề tài khoa học và sách chuyên khảo liên quan đến polysaccharide hệ sợi nấm.

Các công trình đã công bố phản ánh được hai hợp phần quan trọng của luận án là đánh giá polysaccharide từ *C. militaris* và phát triển đồ uống lên men bổ sung sinh khối *T. versicolor*.

6. Tính hiện đại, hợp lý và độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng cách tiếp cận gồm khảo sát đơn yếu tố, quy hoạch thực nghiệm Box–Behnken và tối ưu hóa đa mục tiêu đối với sinh khối và hàm lượng polysaccharide; chiết xuất tuần tự bằng nước nóng, kiềm và acid; đánh giá polysaccharide bằng phương pháp phenol–sulfuric; quan sát hình thái bề mặt bằng SEM; đánh giá ABTS, khả năng kích thích các chủng probiotic, chỉ số PI, SCFAs, kháng thủy phân bởi α-amylase và hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi cấy. Phần ứng dụng có theo dõi mật độ *L. plantarum*, pH, acid tổng số, chống oxy hóa, kháng khuẩn, cảm quan và một số chỉ tiêu an toàn.

Hệ thống phương pháp có tính liên kết và nhìn chung phù hợp với mục tiêu nghiên cứu. Việc có số liệu lặp, phân tích phương sai, mô hình hồi quy, thí nghiệm kiểm chứng và phụ lục thống kê là cơ sở hỗ trợ độ tin cậy của kết quả.

Tuy vậy, cần nhận diện rõ giới hạn của từng phương pháp. Phương pháp phenol–sulfuric phản ánh carbohydrate tổng của phân đoạn thô quy đổi theo glucose, chưa xác định độ tinh sạch, khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide, kiểu liên kết hoặc cấu trúc phân tử. SEM chỉ mô tả hình thái bề mặt sau làm khô, không thể dùng đơn độc để giải thích cấu trúc hóa học hoặc quan hệ cấu trúc–hoạt tính.

Quy trình chiết tuần tự có ưu điểm thu hồi liên tiếp các phân đoạn có độ tan khác nhau, nhưng thứ tự chiết đồng thời tạo ra yếu tố nhiễu: phân đoạn acid được thu từ phần cặn đã trải qua nước nóng và kiềm, nên sự khác biệt hoạt tính có thể liên quan đồng thời đến đặc tính ban đầu của polysaccharide, sự làm giàu tương đối và biến đổi do các bước xử lý trước. Vì vậy, chưa đủ cơ sở để quy toàn bộ sự khác biệt cho bản chất của dung môi hoặc cấu trúc riêng của phân đoạn.

Mô hình prebiotic hiện sử dụng các chủng vi khuẩn đơn lẻ và mới đánh giá một phần khả năng kháng thủy phân bằng α-amylase. Đây là bằng chứng phù hợp cho sàng lọc tiềm năng *in vitro*, nhưng chưa đại diện đầy đủ cho tiêu hóa miệng–dạ dày–ruột non và lên men đại tràng bởi hệ vi sinh vật phức hợp.

7. Kết quả mới và đóng góp của luận án

Các đóng góp có thể được ghi nhận ở các nội dung sau:

– Xác lập được các điều kiện nuôi cấy dịch thể thích hợp để đồng thời hướng tới năng suất sinh khối và hàm lượng polysaccharide của hai chủng *C. militaris* và *T. versicolor*.

– Xây dựng được bộ dữ liệu so sánh các phân đoạn polysaccharide thô thu theo trình tự nước nóng – kiềm – acid, kèm theo hình thái bề mặt, khả năng chống oxy hóa và các chỉ dấu prebiotic in vitro.

– Cung cấp bằng chứng cho thấy một số phân đoạn, đặc biệt phân đoạn thu ở bước acid, có chỉ số PI và khả năng hỗ trợ tạo SCFAs đáng chú ý đối với một số chủng probiotic trong điều kiện khảo sát.

– Bước đầu xây dựng được sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic có bổ sung sinh khối *T. versicolor* và xác định được điều kiện bổ sung, thời gian lên men phù hợp ở quy mô phòng thí nghiệm.

Điểm mới của luận án chủ yếu nằm ở cách tiếp cận tích hợp và bộ dữ liệu thực nghiệm đối với sinh khối hệ sợi hai loài nấm trong điều kiện nghiên cứu cụ thể. Luận án chưa xác định cấu trúc phân tử hoàn chỉnh, chưa phát hiện polysaccharide mới và chưa chứng minh hiệu quả prebiotic in vivo. Do đó, các đóng góp mới cần được diễn đạt là tiềm năng prebiotic in vitro và ứng dụng ban đầu, không nên nâng thành bằng chứng đầy đủ về hiệu quả sinh lý hoặc thương mại hóa.

8. Những thiếu sót và nội dung cần tiếp tục hoàn thiện

8.1. Phần đặt vấn đề và tổng quan

– Phần đặt vấn đề còn một số phát biểu rộng về bệnh mạn tính, ung thư, miễn dịch và lợi ích sức khỏe. Cần rút gọn và tập trung vào khoảng trống nghiên cứu về polysaccharide từ hệ sợi nấm, tiêu chí prebiotic và ứng dụng trong thực phẩm.

– Cần trình bày cân bằng hơn giữa ưu điểm và giới hạn của chiết tuần tự HWE–AE–AEc, nhất là nguy cơ thủy phân, khử acetyl, biến đổi khối lượng phân tử hoặc làm thay đổi hoạt tính khi tiếp xúc với kiềm và acid.

– Tổng quan về phần sản phẩm cần nhấn mạnh cơ sở lựa chọn nền dịch chiết nấm Bào ngư, vai trò của *L. plantarum*, tính sống của probiotic, độ ổn định và yêu cầu cảm quan của đồ uống lên men.

8.2. Phần phương pháp nghiên cứu

– Làm rõ ba lần lặp ở từng thí nghiệm là ba mẻ nuôi cấy/chiết xuất/lên men độc lập hay lặp phân tích trên cùng một mẻ.

– Đối với phương pháp phenol–sulfuric và DNS, cần mô tả đầy đủ mẫu trắng, mẫu nền, khả năng nhiễu của đường tự do và cách hiệu chỉnh.

– Đối với SCFAs, cần nêu rõ đường chuẩn, giới hạn định lượng, hiệu suất thu hồi, mẫu trắng môi trường và cách tính phần SCFA hình thành do sử dụng phân đoạn PS.

– Đối với kháng khuẩn của dịch nuôi *L. plantarum*, cần phân biệt ảnh hưởng của pH/acid hữu cơ với bacteriocin, hydrogen peroxide hoặc các chất chuyển hóa khác; nếu chưa có thí nghiệm trung hòa pH và xử lý enzyme thì không nên kết luận cơ chế.

– Các thông số nuôi cấy được tối ưu mới gồm pH, glucose và cao nấm men trong điều kiện thiết bị cố định. Khi định hướng mở rộng quy mô cần thảo luận thêm về oxy hòa tan, kLa, hình thái pellet, công suất khuấy và truyền khối.

8.3. Phần kết quả và thảo luận

– Không nên gọi các phân đoạn là polysaccharide tinh sạch hoặc suy luận cấu trúc chi tiết khi chưa có số liệu độ tinh sạch, thành phần monosaccharide, FTIR/NMR, khối lượng phân tử và kiểu liên kết.

– Cần diễn giải thận trọng nhận định phân đoạn acid có hoạt tính tốt nhất, vì quy trình chiết tuần tự không tách riêng hoàn toàn ảnh hưởng của dung môi, thứ tự xử lý và sự biến đổi hóa học của mẫu.

– Các chỉ số tăng trưởng probiotic, PI, SCFAs và kháng α-amylase nên được tổng hợp thành chuỗi bằng chứng hỗ trợ tiềm năng prebiotic in vitro; từng chỉ tiêu riêng lẻ không đủ để xác nhận một chất là prebiotic theo nghĩa đầy đủ.

– Nên tăng thảo luận về mối liên hệ giữa lượng PS bổ sung, mức tăng sinh khối probiotic, lượng cơ chất được sử dụng và hiệu suất tạo từng SCFA, thay vì chỉ so sánh giá trị cuối.

– Cần giải thích rõ sự tương thích giữa mật độ *L. plantarum* cao trong quá trình lên men với kết quả kiểm nghiệm tổng số vi sinh vật hiếu khí của sản phẩm; nêu rõ mẫu gửi kiểm nghiệm là sản phẩm còn tế bào sống hay đã xử lý sau lên men.

8.4. Phần ứng dụng sản phẩm

– Kết quả hiện chỉ là bước đầu ở quy mô phòng thí nghiệm. Chưa có dữ liệu bảo quản để chứng minh khả năng duy trì mật độ probiotic, hoạt tính sinh học, cảm quan và an toàn trong suốt thời hạn sử dụng.

– Cần tách rõ đóng góp của sinh khối *T. versicolor*, dịch chiết nấm Bào ngư và quá trình lên men lactic. Thiết kế hiện tại chưa chứng minh đầy đủ thành phần nào là nguyên nhân chính của hoạt tính chống oxy hóa và kháng khuẩn của sản phẩm.

– Mức bổ sung 0,6% cần được giải thích dựa trên cân bằng giữa hoạt tính, khả năng lên men, mùi vị, độ đục và mức chấp nhận cảm quan; không chỉ dựa trên một chỉ tiêu đơn lẻ.

– Các cụm "sản phẩm giàu probiotic", "đạt tiêu chuẩn", "sẵn sàng chuyển giao" hoặc "thương mại hóa" cần giảm mức khẳng định nếu chưa có dữ liệu ổn định nhiều lô, thời hạn sử dụng và đánh giá người tiêu dùng.

8.5. Kết luận, đóng góp mới và hình thức trình bày

– Kết luận cần phản ánh đúng giới hạn của mô hình in vitro và tránh suy rộng sang hiệu quả sức khỏe trên người.

– Phần đóng góp mới nên dùng các cụm "xác lập điều kiện", "cung cấp bộ dữ liệu", "chứng minh tiềm năng *in vitro*" và "bước đầu ứng dụng"; không nên dùng "làm sáng tỏ cấu trúc", "phát triển thành công sản phẩm thương mại" hoặc "chứng minh hiệu quả sức khỏe".

– Tiếp tục rà soát lỗi chính tả, thống nhất thuật ngữ polysaccharide/polysaccharides, prebiotic/probiotic, kháng oxy hóa/chống oxy hóa, ký hiệu P/p, đơn vị, tên loài in nghiêng và cách đánh số bảng/hình.

– Bổ sung một đoạn riêng về giới hạn nghiên cứu trước phần kiến nghị để người đọc nhận diện rõ những nội dung đã chứng minh và những nội dung cần tiếp tục nghiên cứu.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Hệ thống công trình công bố có liên quan trực tiếp đến luận án và thể hiện nghiên cứu sinh có vai trò chính trong triển khai nghiên cứu. Công trình trên Mycobiology phản ánh phần tối ưu hóa và phát triển đồ uống lên men có bổ sung sinh khối *T. versicolor*; công trình trên Journal of Applied Biology & Biotechnology và bài báo trong nước phản ánh tiềm năng prebiotic của các phân đoạn polysaccharide từ *C. militaris*; công trình hội thảo phản ánh giai đoạn phát triển nền đồ uống lên men.

Các công bố có giá trị hỗ trợ tính kiểm chứng và mức độ hoàn thành nghiên cứu.

10. Sự phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án trong cuốn tóm tắt

Tóm tắt phản ánh tương đối đầy đủ cấu trúc nghiên cứu, mục tiêu, phương pháp và các kết quả chính của toàn văn. Các điều kiện tối ưu nuôi cấy, kết quả chiết xuất, hoạt tính prebiotic in vitro và nội dung ứng dụng sản phẩm được trình bày thống nhất về định hướng.

Tuy nhiên, tóm tắt vẫn còn một số phát biểu mạnh như polysaccharide "không bị tiêu hóa ở dạ dày", khả năng kích thích chọn lọc "rất hiệu quả", hoặc liên hệ trực tiếp với giảm ung thư và phòng bệnh. Cần rút gọn các nội dung này và giới hạn kết luận ở các bằng chứng trực tiếp của luận án.

Bản tiếng Anh cần tiếp tục hiệu đính các thuật ngữ mycelia/mycelium, food supplement/functional food, prebiotic potential và health-supporting để tránh diễn giải vượt quá dữ liệu.

11. Đánh giá việc tiếp thu và giải trình ý kiến phản biện độc lập

Đối chiếu với các ý kiến đã nêu ở giai đoạn phản biện độc lập, nghiên cứu sinh đã thể hiện thái độ tiếp thu nghiêm túc. Nhiều lỗi về hình thức, danh pháp khoa học, thuật ngữ, đơn vị, trình bày bảng/hình và sự thống nhất số liệu đã được rà soát. Nghiên cứu sinh cũng đã bổ sung thảo luận về giới hạn của mô hình *in vitro*, cơ sở lựa chọn *T. versicolor* cho phần ứng dụng, độ phù hợp của mô hình tối ưu và một số so sánh với nghiên cứu quốc tế.

Các chỉnh sửa giúp bản luận án hiện tại rõ hơn về phạm vi nghiên cứu và logic trình bày. Đặc biệt, việc bổ sung các cụm "*in vitro*", giảm mức khẳng định về hiệu quả sức khỏe và giải thích lý do lựa chọn công thức sản phẩm là những tiếp thu phù hợp.

Tuy nhiên, một số góp ý có tính bản chất chỉ có thể được xử lý ở mức nhận diện giới hạn và điều chỉnh cách diễn đạt, vì không có thêm dữ liệu thực nghiệm. Các vấn đề này gồm: đặc trưng cấu trúc phân tử của polysaccharide, ảnh hưởng riêng của từng bước trong chiết tuần tự, mô hình tiêu hóa–lên men đại tràng, cơ chế kháng khuẩn, độ ổn định bảo quản và khả năng mở rộng quy mô. NCS lưu ý bổ sung và nhấn mạnh đây là giới hạn của nghiên cứu và không sử dụng các kết luận vượt quá dữ liệu.

Tổng thể, bản giải trình và bản luận án sau chỉnh sửa cơ bản đáp ứng yêu cầu của giai đoạn phản biện độc lập.

12. Kết luận

Luận án được thực hiện công phu, có khối lượng thực nghiệm tương đối lớn, sử dụng hệ phương pháp phù hợp và có tính liên kết từ nuôi cấy dịch thể, thu nhận polysaccharide, đánh giá hoạt tính sinh học in vitro đến ứng dụng sinh khối trong sản phẩm lên men. Kết quảcó ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong phạm vi nghiên cứu, đồng thời đã được phản ánh trong các công trình công bố liên quan.

Tôi đánh giá luận án đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, mã số 9540101. Đề nghị Hội đồng cho phép nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Bích Hằng được bảo vệ luận án trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Trường, với yêu cầu tiếp thu các góp ý và hoàn thiện bản luận án sau bảo vệ.

Cần Thơ, ngày 12 tháng 7 năm 2026

NGƯỜI NHẬN XÉT

GS.TS. Trần Thanh Trúc

Câu hỏi dự kiến

1. Quy trình chiết được thực hiện tuần tự theo nước nóng → kiềm → acid. Nghiên cứu sinh phân biệt như thế nào giữa ảnh hưởng của độ tan ban đầu, ảnh hưởng của thứ tự chiết và sự biến đổi hóa học do kiềm/acid khi giải thích hoạt tính cao của phân đoạn acid?

2. Với phương pháp phenol–sulfuric, SEM và các thử nghiệm sinh học hiện có, cơ sở nào cho phép gọi các mẫu là những "phân đoạn polysaccharide khác nhau"? Những thông tin cấu trúc nào chưa được xác định và cần bổ sung trong nghiên cứu tiếp theo?

3. Nghiên cứu sinh đánh giá mức độ đáp ứng tiêu chí prebiotic của các phân đoạn như thế nào khi mô hình mới sử dụng các chủng đơn lẻ và thử kháng α-amylase? Để xác nhận mạnh hơn cần bổ sung những bước tiêu hóa, lên men hoặc mô hình sinh học nào?

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: TS. Mạc Thị Hà Thanh

Học hàm: ..... Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Khoa học thực phẩm

Cơ quan công tác: Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng Tuyển sinh năm: 2020

Ngành: Công nghệ thực phẩm Mã số: 9540101

Tên đề tài luận án: "Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung"

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Đề tài luận án mang tính cấp thiết và thời sự cao trong bối cảnh các rối loạn hệ vi sinh đường ruột ngày càng liên quan chặt chẽ đến bệnh chuyển hóa và viêm ruột, đòi hỏi việc khai thác các nguồn polysaccharide khó tiêu tự nhiên, an toàn và bền vững làm prebiotic. Luận án đã lựa chọn hai đối tượng nấm có giá trị sinh học cao nhưng còn thiếu các dữ liệu liên hệ đồng bộ giữa phương pháp thu nhận, đặc tính cấu trúc và hoạt tính prebiotic. Về ý nghĩa khoa học, công trình đóng góp những dữ liệu giá trị về nguồn polysaccharide từ sợi nấm, một hướng nghiên cứu còn ít được khai thác sâu so với thể quả hay cao chiết thô trong nhiều công bố trước đây. Về mặt thực tiễn, kết quả của luận án góp phần cung cấp nguồn nguyên liệu prebiotic mới cho ngành công nghiệp thực phẩm chức năng và đồ uống sức khỏe, đồng thời thúc đẩy sự phát triển của công nghệ sinh học thực phẩm trong nước thông qua việc tối ưu hóa quy trình polysaccharide từ nấm nuôi sợi và tận dụng sinh khối phù hợp định hướng sản xuất bền vững, quy mô hóa và nâng cao giá trị nấm dược liệu. Điểm mạnh nổi bật của luận án là cách tiếp cận liên ngành giữa công nghệ thu nhận, đánh giá chức năng và định hướng ứng dụng sản phẩm, hoàn toàn phù hợp với chuẩn đầu ra của một luận án tiến sĩ ngành công nghệ thực phẩm. Dù vẫn cần tiếp tục làm sâu hơn mối quan hệ cấu trúc – hoạt tính và xác nhận hiệu quả trên mô hình lâm sàng hoặc thực phẩm hoàn chỉnh, luận án có giá trị mở đường quan trọng và nhìn chung sở hữu tính cấp thiết, tính mới tương đối, ý nghĩa khoa học tốt cùng giá trị thực tiễn rõ rệt, đặc biệt phù hợp với xu hướng phát triển nguyên liệu prebiotic từ nấm cho ngành công nghệ thực phẩm.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

Việc khai thác polysaccharide nấm làm prebiotic và ứng dụng trong thực phẩm chức năng là xu hướng đã được công bố và phát triển mạnh mẽ. Do đó, các kết luận nền tảng như phương pháp chiết ảnh hưởng đến hiệu suất, polysaccharide nấm có tính prebiotic, hay phân đoạn có khối lượng phân tử thấp dễ được probiotic sử dụng hơn đều là hướng kế thừa, không phải khoảng trống hoàn toàn mới. Xét trong bối cảnh các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước, luận án không trùng lặp hoàn toàn với các đề tài, luận văn, luận án hay công trình khoa học đã công bố chủ yếu ở việc thu nhận polysaccharide, đánh giá prebiotic, và định hướng ứng dụng sinh khối thực phẩm trong cùng một thiết kế nghiên cứu; trong khi đó, phần lớn nghiên cứu trước chỉ tập trung vào tổng quan về tiềm năng prebiotic của polysaccharide, hoặc tối ưu/so sánh công nghệ chiết, hoặc đánh giá tác động lên hệ vi sinh và SCFA mà chưa sang hướng sản phẩm bổ sung

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

Tên đề tài và toàn bộ nội dung nghiên cứu (tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, thu nhận và phân đoạn hợp chất sinh học, đánh giá hoạt tính in vitro, xây dựng công thức và quy trình chế biến sản phẩm thực phẩm/đồ uống lên men) hoàn toàn phù hợp và bám sát phạm vi chuyên ngành Công nghệ thực phẩm (Mã số: 9540101).

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

Nhìn chung, hệ thống tài liệu tham khảo của luận án phù hợp và đủ cơ sở nền tảng cho một đề tài luận án tiến sĩ ngành công nghệ thực phẩm về polysaccharide nấm và prebiotic, nhất là *C. militaris* và cơ sở khoa học của prebiotic. Phần lớn các trích dẫn từ năm 2018–2024 còn tập trung vào β-glucan hoặc cao chiết, còn thiếu dữ liệu về cấu trúc-hoạt tính và thử nghiệm lâm sàng. Cần cân đối thêm nguồn tài liệu trích dẫn về cơ chế hoặc công nghệ thu nhận cho *T. versicolor*, tăng nguồn trích dẫn cho cấu trúc-hoạt tính và ứng dụng sản phẩm. Chỉnh sửa một số lỗi hình thức và thiếu nhất quán: lặp năm và các tài liệu trích dẫn lấy từ nhiều nguồn định dạng nhưng chưa được biên tập thống nhất.

Luận án có trích hai tài liệu đã bị rút bài về polysaccharide Cordyceps (tài liệu tham khảo số thứ tự 157 và 158), nên dùng chúng làm cơ sở chính cho quy trình phân tích (chương 2) và biện luận kết quả nghiên cứu (chương 3) sẽ làm giảm độ tin cậy của kết quả nghiên cứu. Một số trích dẫn thiếu chọn lọc, không liên quan (ví dụ: tài liệu tham khảo số thứ tự 62, 197 và 198)

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Theo danh mục hồ sơ công bố, Nghiên cứu có 04 bài báo khoa học liên quan trực tiếp đến nội dung luận án (bao gồm: 02 bài báo quốc tế thuộc danh mục uy tín (Scopus/ISI như Mycobiology, Journal of Applied Biology & Biotechnology), 01 bài báo Kỷ yếu Hội nghị Quốc tế (SPISE) và 01 bài báo trên Tạp chí chuyên ngành uy tín trong nước.) và đều đứng tên đầu trong toàn bộ các công trình này. Các công bố phản ánh bám sát và bao quát đầy đủ 02 hợp phần nội dung quan trọng nhất của luận án, , đáp ứng hoàn toàn và vượt mức quy định hiện hành về công bố khoa học đối với trình độ đào tạo tiến sĩ ngành Công nghệ thực phẩm:

- Đánh giá tiềm năng và hoạt tính prebiotic của polysaccharide chiết xuất từ hệ sợi nấm *Cordyceps militaris* (02 công trình).
- Phát triển và ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm Trametes versicolor trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men (02 công trình).

Ngoài ra, NCS còn tham gia biên soạn 01 sách chuyên khảo cũng như chủ nhiệm/tham gia 04 đề tài nghiên cứu khoa học các cấp liên quan trực tiếp đến lĩnh vực polysaccharide từ hệ sợi

nấm đã được nghiệm thu.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án đã xây dựng và triển khai một hệ thống phương pháp nghiên cứu có tính hiện đại, cập nhật theo các tiêu chuẩn phân tích hiện hành trong ngành Công nghệ thực phẩm như: định danh chủng vi sinh vật bằng giải trình tự gene (ITS/16S rRNA); quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa đa mục tiêu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) theo mô hình Box–Behnken; phân tích hình thái bề mặt sinh khối qua kính hiển vi điện tử quét (SEM); và định lượng các acid béo mạch ngắn (SCFAs) bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột chuyên dụng Aminex HPX-87H. Bố trí thực nghiệm của luận án thể hiện tính hợp lý và logic khoa học chặt chẽ, có sự liên kết xuyên suốt giữa các nội dung nghiên cứu. Trình tự thực hành được triển khai mạch lạc: từ khảo sát đơn yếu tố (OFAT) đến tiến hành tối ưu hóa đa mục tiêu điều kiện nuôi cấy dịch thể, chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide (nước nóng, kiềm, acid), đánh giá hoạt tính sinh học in vitro (ABTS, chỉ số PI, khả năng kháng α-amylase), đến ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm trong chế biến nước uống lên men lactic. Chuỗi tiếp cận này hoàn toàn phù hợp với định hướng công nghệ thực phẩm ứng dụng, đi từ nghiên cứu cơ bản đến phát triển sản phẩm.Độ tin cậy của kết quả nghiên cứu được đảm bảo nhờ việc thiết kế thí nghiệm có lặp lại, xử lý số liệu bằng các phương pháp thống kê tin cậy (phân tích phương sai ANOVA, kiểm định sai khác ở mức $p<0,05$, xây dựng mô hình hồi quy và kiểm chứng thực nghiệm). Hệ thống phụ lục được cung cấp đầy đủ với dữ liệu thô, các đường chuẩn và sắc ký đồ minh chứng, tạo cơ sở tốt cho tính kiểm chứng.

Tuy nhiên, NCS cần làm rõ một số giới hạn kỹ thuật của các phương pháp để đảm bảo tính khách quan và chặt chẽ tối đa khi diễn giải và biện luận kết quả.

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

Luận án đã cung cấp bằng chứng thực nghiệm mới về bộ dữ liệu thực nghiệm có hệ thống và cách tiếp cận tích hợp về tiềm năng prebiotic *in vitro* và khả năng ứng dụng ban đầu trong sản phẩm thực phẩm (thu nhận sinh khối hệ sợi giàu polysaccharide từ *C. militaris* và *T. versicolor*, về so sánh các phân đoạn polysaccharide chiết tuần tự, về tiềm năng prebiotic *in vitro* của một số phân đoạn, và về ứng dụng ban đầu của sinh khối *T. versicolor* trong sản phẩm nước nấm lên men lactic ở quy mô phòng thí nghiệm)

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

CHƯƠNG 1:

- Phần tổng quan tài liệu Chương 1 nhìn chung phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, đồng thời bao quát được các nội dung liên quan đến Cordyceps militaris, Trametes versicolor, polysaccharide nấm, sản xuất hoạt chất nấm bằng nuôi chìm, và ứng dụng thực phẩm bổ sung. Cách sắp xếp phù hợp với một đề tài công nghệ thực phẩm Tuy nhiên, Chương 1 chỉ dừng ở việc liệt kê tài liệu mà không kết luận rõ: vì sao chọn sợi nấm, vì sao chọn hai loài này, vì sao ưu tiên polysaccharide, vì sao dùng các chỉ tiêu prebiotic nào, và vì sao bước ứng dụng lại dừng ở mức "bước đầu", do đó chương 1 cần làm rõ hơn khoảng trống/vấn đề nghiên cứu.

CHƯƠNG 2:

Chương 2 trình bày đầy đủ đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu, cơ bản đáp ứng mục tiêu nghiên cứu của luận án. Tuy nhiên, để nâng cao tính chuẩn mực và độ tin cậy khoa học, hệ thống dữ liệu và phương pháp luận cần được trình bày chặt chẽ hơn; ở chương 2 nếu chia phần phương pháp thành 2 phần: Phương pháp bố trí thí nghiệm và phương pháp thu

nhận kết quả thí nghiệm (phương pháp phân tích) thì dễ theo dõi hơn. Một số góp ý cụ thể như sau:

- Mục 2.1 cần mô tả làm rõ nguồn giống và mã chủng của hai loài nấm để nhận diện chính xác nguồn gốc và tính đồng nhất của vật liệu sinh học, liệt kê rõ chủng vi sinh và tiêu chuẩn bảo quản, hoạt hóa (đối tượng so sánh cho thử nghiệm prebiotic)

- Mục 2.2 chỉ liệt kê danh mục mà không gắn với mục đích sử dụng, độ tinh khiết, hãng sản xuất, model thiết bị chính; cần rút gọn danh sách và chỉ liệt kê các hóa chất và thiết bị ảnh hưởng trực tiếp đến kết quả nghiên cứu.

Cần bổ sung tài liệu tham khảo cho 1 số phương pháp nghiên cứu: Khả năng kháng tiêu hóa bởi α-amylase, Xác định mật độ tế bào vi khuẩn L. Plantarum,…

CHƯƠNG 3:

Nhìn chung, kết quả Chương 3 bám đúng mục tiêu và phương pháp nghiên cứu của đề tài: tối ưu nuôi cấy chìm để thu sinh khối/polysaccharide, tách chiết và đặc trưng các phân đoạn polysaccharide, đánh giá hoạt tính prebiotic, rồi bước đầu ứng dụng sinh khối vào thực phẩm bổ sung. Tuy nhiên, phần thảo luận cần chặt hơn khi nối "kết quả nghiên cứu" với "giải thích cơ chế", nhất là ở các nhận định về quan hệ cấu trúc–chức năng. Nếu Chương 3 sử dụng hoạt tính chống oxy hóa, tăng trưởng probiotic, hay chỉ số prebiotic như bằng chứng để kết luận mạnh về "giá trị chức năng vượt trội", thì cần giữ mức diễn đạt vừa phải. Các nghiên cứu trước đây cho thấy polysaccharide nấm có thể có hoạt tính chống oxy hóa và prebiotic, nhưng mức độ này phụ thuộc đáng kể vào cấu trúc, khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide và điều kiện thử nghiệm. Nếu kết quả chỉ mới dừng ở sàng lọc in vitro, thì diễn đạt đúng nên là "có tiềm năng" chứ chưa phải "khẳng định hiệu quả".

- Mục 3.1: khi tiến hành khảo sát đơn yếu tố nên tránh dùng từ "tối ưu hóa" hoặc "vượt trội" khi dữ liệu mới chỉ chứng minh điều kiện thuận lợi trong phạm vi khảo sát (ví dụ: tr.68/3.1.1.1). Nếu không thảo luận khác biệt rõ giữa mục tiêu sinh khối và mục tiêu EPS, logic kết luận sẽ thiếu vì hai mục tiêu này thường không đồng tối ưu. Cần thận trọng biện luận kết quả khi không mô tả hình thái hệ sợi mà vẫn giải thích chênh lệch năng suất bằng "khả năng thích nghi tốt hơn" (Ở C. militaris, pH và nguồn nitrogen làm đổi hình thái khối sợi nấm và mức EPS; khối sợi nấm lớn, chặt hoặc dạng phân nhánh thích hợp có thể liên quan năng suất cao hơn. Đối với T. versicolor, khí động học và khuấy cũng làm đổi hình thái, từ đó đổi năng suất sinh khối và EPS)

- Mục 3.2: Lỗi biện luận lớn nhất có thể có trong 3.2 là nhảy cóc từ hình thái → cấu trúc, từ hiệu suất → hoạt tính, và từ in vitro → hiệu quả sức khỏe.

+ Mục 3.2.1 Kết quả SEM chỉ phù hợp để mô tả hình thái bề mặt hoặc trạng thái kết tụ của mẫu (như "dạng mạng", "hạt mịn", "khối vụn"), không đủ để kết luận sâu về cấu trúc hóa học hay cơ chế hoạt tính nếu không có dữ liệu bổ sung như FTIR, thành phần monosaccharide, liên kết glycosidic hoặc các phép đặc trưng khác

+ Mục 3.2.2 không nên đồng nhất hàm lượng hoặc hiệu suất chiết cao với giá trị sinh học cao hơn. Ngay cả trong C. militaris, phân đoạn có hoạt tính mạnh hơn không nhất thiết là phân đoạn có tổng hàm lượng cao nhất; khác biệt hoạt tính thường đi cùng khác biệt về cấu trúc, monosaccharide, hàm lượng β-glucan hoặc khối lượng phân tử.

+ Mục 3.2.3 Phần khả năng kháng oxi hóa của các chiết xuất PS là hợp logic và có so sánh với các kết quả trước đó, tuy nhiên khi so sánh với nghiên cứu trước, cần phải dùng cùng phép thử, cùng đơn vị, cùng nồng độ hoặc IC50, nếu không sẽ dễ so sánh sai. Cần tiết chế khi sử dụng kết quả DPPH/ABTS mạnh suy sang "khả năng chống oxi hóa sinh học cao" rồi kết luận

rộng về công dụng sức khỏe.

+ Mục 3.2.4. nếu chỉ dừng ở tăng OD hoặc tăng log CFU của một vài chủng probiotic, kết luận nên viết là "có tiềm năng prebiotic in vitro".

Phương pháp và thứ tự chiết quyết định không chỉ hiệu suất PS mà cả hoạt tính kháng oxi hóa và tiềm năng prebiotic. Vậy: các khác biệt hoạt tính giữa các phân đoạn trong luận án thực sự do cấu trúc đặc hiệu nào quyết định, hay mới chỉ phản ánh khác biệt thô về độ tan, độ tinh sạch và thành phần tổng quát?

- Mục 3.3:

+ Mục 3.3.1: bột sợi nấm chỉ kiểm tra các chỉ tiêu như vi sinh vật chỉ thị, độc tố nấm mốc và kim loại nặng đối chiếu quy chuẩn → nên chỉnh ngôn ngữ kết luận từ "đảm bảo an toàn sản phẩm" thành "đáp ứng yêu cầu an toàn nguyên liệu trong phạm vi khảo sát".

+ Mục 3.3.2: Trong phát triển thực phẩm prebiotic/probiotic, điều kiện chế biến có thể làm thay đổi hoạt tính chức năng, và lợi ích công nghệ thường phải đánh đổi với mùi vị, màu sắc, độ lắng hoặc khả năng chấp nhận của người tiêu dùng đối với sản phẩm. Vì vậy, cần thận trọng khi biện luận theo hướng "tăng mức bổ sung làm tăng hoạt tính nên chọn mức cao nhất", đó là kết luận chưa đủ cân bằng. Mức tốt nhất phải là điểm dung hòa đa mục tiêu.

+ Mục 3.3.3 mới dừng ở quy trình phòng thí nghiệm với một điều kiện lên men và chưa có dữ liệu lặp lại theo mẻ, độ ổn định bảo quản, hay đánh giá hạn sử dụng → nên kết luận là đề xuất quy trình thực nghiệm/ quy trình sản xuất… quy mô phòng thí nghiệm.

Liệu hoạt tính prebiotic và các chỉ tiêu chức năng của nguyên liệu có còn được duy trì ổn định trong sản phẩm cuối và trong bảo quản hay không?

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Phần kết luận và kiến nghị của luận án nhìn chung phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, phản ánh được các kết quả chính về thu nhận polysaccharide, đánh giá hoạt tính theo định hướng prebiotic và bước đầu ứng dụng sinh khối nấm trong thực phẩm bổ sung. Tuy nhiên, cần viết ngắn gọn, chuẩn xác hơn, đồng thời giới hạn kết luận đúng ở mức bằng chứng *in vitro* và ứng dụng ban đầu, tránh suy rộng thành hiệu quả sức khỏe hoặc khả năng thương mại hóa đã được chứng minh.

Ngoài ra, luận án cần rà soát lại toàn bộ lỗi chính tả, lỗi đánh máy và lỗi diễn đạt: viết không thống nhất "oxi hóa/oxy hóa", "prebiotic/pre-biotic", "nước lên men/nước uống lên men/đồ uống lên men lactic", thiếu đơn vị sau IC50, và diễn đạt kiểu "cao nhất nên tốt nhất", ; Các tên Latin, các từ in vitro, in vivo cần viết/in nghiêng, và tránh dùng các cụm đánh giá tuyệt đối như "tốt nhất", "an toàn", "tối ưu" nếu dữ liệu chỉ mới trong phạm vi khảo sát.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Các công trình đã công bố của nghiên cứu sinh có liên quan trực tiếp và phản ánh khá đầy đủ các nội dung cốt lõi của luận án; chất lượng học thuật nhìn chung tốt, công bố trên các diễn đàn chuyên ngành phù hợp; nghiên cứu sinh giữ vai trò chính trong các công bố. Tuy nhiên, cần tiếp tục chuẩn hóa cách diễn đạt trong phần tóm tắt và bài viết theo hướng chính xác, tiết chế, bám sát bằng chứng thực nghiệm trực tiếp của luận án.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn Tóm tắt luận án

Cuốn tóm tắt luận án về cơ bản phản ánh trung thực, khách quan và tương đối đầy đủ nội dung chính của toàn văn; các phần về mục tiêu, đối tượng, phương pháp và các kết quả chính được trình bày thống nhất với luận án. Tuy nhiên, phần tóm tắt cần tiếp tục chuẩn hóa câu

chữ theo hướng ngắn gọn, chuẩn xác và tiết chế hơn.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

Bản giải trình của nghiên cứu sinh nhìn chung nghiêm túc, cầu thị và phù hợp với các ý kiến phản biện độc lập; nhiều nội dung về hình thức và một số vấn đề học thuật đã được tiếp thu, chỉnh sửa, làm cho luận án rõ hơn về phạm vi và logic trình bày.

Có thể ghi nhận nghiên cứu sinh đã trình bày bản giải trình theo từng nhóm ý kiến, có đối chiếu nội dung góp ý, phần chỉnh sửa và vị trí chỉnh sửa trong luận án. Các lỗi về chính tả, danh pháp khoa học, thuật ngữ, ký hiệu, đơn vị, bảng biểu và sự thống nhất số liệu giữa luận án, tóm tắt, phụ lục và công trình công bố đã được rà soát tương đối đầy đủ.

Bản giải trình và bản luận án sau chỉnh sửa **cơ bản đáp ứng yêu cầu**; tuy nhiên, cần tiếp tục thống nhất cách diễn đạt thận trọng trong toàn luận án, tránh các kết luận vượt quá dữ liệu thực nghiệm, nhất là ở các nội dung về prebiotic, cấu trúc polysaccharide, cơ chế kháng khuẩn và khả năng ứng dụng sản phẩm.

12. Kết luận

Luận án được thực hiện nghiêm túc, có bố cục tương đối đầy đủ, mục tiêu nghiên cứu nhất quán, phương pháp phù hợp và khối lượng thực nghiệm tương đối lớn. Các kết quả đạt được có giá trị khoa học và thực tiễn trong phạm vi nghiên cứu, đồng thời đã được phản ánh qua các công bố khoa học liên quan.

Tuy nhiên, luận án vẫn còn một số hạn chế, chủ yếu ở cách diễn giải, chuẩn hóa thuật ngữ, hoàn thiện hình thức trình bày và mở rộng thảo luận về giới hạn nghiên cứu. Các tồn tại này không làm thay đổi bản chất các kết quả chính của luận án.

Vì vậy, có thể đánh giá luận án đủ điều kiện cơ bản để trình Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Trường.

+ **Tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường ☑**

+ Không tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường.☐

Đà Nẵng, ngày 14 tháng 07 năm 2026

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN QUẢN LÝ	**NGƯỜI NHẬN XÉT**
(nếu có)	*(Ký và ghi rõ họ tên)*
	TS. Mạc Thị Hà Thanh

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: **PGS. TS. Nguyễn Quang Vinh**

Học hàm: Phó Giáo sư Năm phong: 2018

Học vị: Tiến sĩ Năm công nhận: 2013

Chuyên ngành: Khoa học và Công nghệ thực phẩm

Cơ quan công tác: Đại học Tây Nguyên

Tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng

Tên đề tài luận án: **Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án:

Đề tài có tính cấp thiết, phù hợp với xu hướng khai thác nguồn nguyên liệu sinh học tự nhiên giàu polysaccharide định hướng ứng dụng trong thực phẩm bổ sung. Việc lựa chọn *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* là có cơ sở khoa học, do đây là hai loài nấm có giá trị sinh học cao; trong đó hệ sợi nấm nuôi cấy dịch thể là nguồn nguyên liệu có ưu thế về khả năng chủ động sản xuất, rút ngắn thời gian thu nhận sinh khối và thuận lợi cho kiểm soát chất lượng so với khai thác quả thể truyền thống.

Về ý nghĩa khoa học, luận án cung cấp dữ liệu thực nghiệm tương đối hệ thống về ảnh hưởng của pH, nguồn carbon và nguồn nitrogen đến sinh khối và hàm lượng polysaccharide của hệ sợi nấm; đồng thời so sánh các phân đoạn polysaccharide chiết bằng nước nóng, kiềm và acid thông qua một số chỉ tiêu hoạt tính sinh học *in vitro*. Về ý nghĩa thực tiễn, luận án có định hướng ứng dụng rõ thông qua bước đầu xây dựng sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men bổ sung sinh khối hệ sợi *T. versicolor*.

Tuy nhiên, cần xác định đúng phạm vi đóng góp của đề tài. Các kết quả hiện chủ yếu chứng minh tiềm năng prebiotic *in vitro* và khả năng ứng dụng ban đầu ở quy mô phòng thí nghiệm; chưa đủ cơ sở để diễn giải theo hướng hiệu quả sinh lý hoặc lợi ích sức khỏe trên người. Do đó, khi trình bày cần dùng các thuật ngữ thận trọng như "tiềm năng prebiotic *in vitro*", "định hướng hỗ trợ sức khỏe" và "bước đầu ứng dụng trong thực phẩm bổ sung".

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác:

Qua xem xét tên đề tài, mục tiêu, nội dung nghiên cứu, các kết quả chính và danh mục công trình đã công bố, chưa thấy dấu hiệu cho thấy luận án trùng lặp với một luận án, luận văn hay công trình khoa học khác ở mức độ đề tài, số liệu, kết quả và kết luận. Hướng nghiên cứu về polysaccharide từ nấm, hoạt tính prebiotic và sản phẩm lên men không phải là hướng hoàn toàn mới trên thế giới; tuy nhiên, luận án có sự kết hợp tương đối riêng giữa các nội dung: tối ưu nuôi

cấy dịch thể hệ sợi *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; chiết xuất tuần tự polysaccharide bằng nước nóng, kiềm và acid; đánh giá tiềm năng prebiotic *in vitro* qua tăng trưởng probiotic, chỉ số PI, SCFAs, kháng thủy phân bởi α-amylase; và bước đầu ứng dụng sinh khối hệ sợi *T. versicolor* trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men. Cấu trúc nghiên cứu này thể hiện tính độc lập tương đối so với các nghiên cứu riêng lẻ về quả thể nấm, polysaccharide nấm hoặc đồ uống lên men. Luận án có tính kế thừa các nghiên cứu đã công bố trong lĩnh vực, nhưng đã phát triển thành một hướng nghiên cứu có cấu trúc riêng, phù hợp với yêu cầu của một luận án tiến sĩ. Để tăng tính chặt chẽ, nghiên cứu sinh nên rà soát lại việc trích dẫn các công trình liên quan và làm rõ mối quan hệ giữa luận án với các bài báo, đề tài đã công bố hoặc nghiệm thu.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành:

Đề tài luận án phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, mã số 9540101. Tên đề tài và nội dung nghiên cứu tập trung vào thu nhận polysaccharide từ hệ sợi nấm, tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể, chiết xuất – đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* và bước đầu ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm trong chế biến thực phẩm bổ sung; đây là các hướng nghiên cứu nằm trong phạm vi của công nghệ thực phẩm, đặc biệt ở các mảng công nghệ lên men, khai thác hợp chất sinh học từ nguyên liệu thực phẩm, phát triển nguyên liệu chức năng và thiết kế sản phẩm thực phẩm định hướng hỗ trợ sức khỏe. Đề tài có sự phù hợp tốt với mã số ngành 9540101. Các nội dung nghiên cứu đáp ứng đặc trưng của ngành Công nghệ thực phẩm, vừa có cơ sở công nghệ, vừa có định hướng phát triển sản phẩm. Luận án chỉ cần điều chỉnh văn phong để giữ đúng trọng tâm ngành, hạn chế các diễn giải vượt sang phạm vi dược lý hoặc y học ứng dụng.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ của trích dẫn

Luận án sử dụng hệ thống tài liệu tham khảo tương đối phong phú, gồm 223 tài liệu bằng tiếng Việt và tiếng Anh, chủ yếu là bài báo khoa học, sách và chương sách liên quan đến nấm dược liệu, polysaccharide, prebiotic, nuôi cấy dịch thể, chiết xuất và phát triển sản phẩm thực phẩm bổ sung. Các nội dung tổng quan, phương pháp và thảo luận nhìn chung đều có trích dẫn nguồn, cho thấy nghiên cứu sinh có ý thức kế thừa tài liệu và đặt kết quả nghiên cứu trong bối cảnh khoa học phù hợp. Qua đối chiếu số thứ tự trích dẫn trong toàn văn với danh mục tài liệu tham khảo, chưa thấy hiện tượng thiếu tài liệu trong danh mục hoặc tài liệu có trong danh mục nhưng hoàn toàn không được trích dẫn. Tuy nhiên, cần rà soát kỹ hơn tính chính xác, tính phù hợp của một số trích dẫn; chuẩn hoá và thống nhất cách trích dẫn. Cụ thể:

+ "Khái niệm prebiotic lần đầu được giới thiệu năm 1999" ([36] chương sách năm 1999, không phải công bố gốc đầu tiên về khái niệm prebiotic), cần sửa thành năm 1995 và bổ sung đúng tài liệu gốc của Gibson và Roberfroid (Glenn R. Gibson, Marcel B. Roberfroid, Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, The Journal of Nutrition, Volume 125, Issue 6, 1995, Pages 1401-1412); định nghĩa ISAPP về prebiotic ở mục 3.2.4 cần trích dẫn tài liệu Gibson et al. 2017 về prebiotic [38], không dùng tài liệu Swanson et al. 2020 về synbiotic [166];

+ Phần dẫn nghiên cứu LED xanh trong nuôi cấy *C. militaris* cần sửa vì nội dung diễn giải chưa khớp với tài liệu [14] vì bài báo nghiên cứu trên môi trường bán rắn không liên quan đến nuôi cấy dịch thể.

+ Các tài liệu [157] và [158] là bài đã bị rút lại, không nên sử dụng làm cơ sở thảo luận kết quả.

+ Danh mục tài liệu tham khảo còn có một số tài liệu trùng lặp cần gộp, như [45]/[50], [47]/[48], [29]/[49], [43]/[80], [54]/[195], [19]/[203], [175]/[185] và [129]/[215].

Nghiên cứu sinh cần rà soát toàn bộ danh mục tài liệu tham khảo, loại bỏ các mục trùng, thay thế các tài liệu không còn hiệu lực khoa học, bổ sung đầy đủ thông tin thư mục và bảo đảm mỗi trích dẫn được sử dụng đúng với nội dung mà tài liệu gốc hỗ trợ.

5. Sự phản ánh kết quả của luận án trong những công trình đã công bố

Các công trình đã công bố phản ánh tương đối rõ các kết quả chính của luận án. Theo danh mục, nghiên cứu sinh có 04 bài báo liên quan trực tiếp đến luận án, trong đó nghiên cứu sinh đứng tên đầu ở cả 04 công trình. Các công bố này tập trung vào hai nhóm kết quả chính: đánh giá tiềm năng prebiotic của polysaccharide từ hệ sợi *Cordyceps militaris* và ứng dụng sinh khối hệ sợi *Trametes versicolor* trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men. Nhìn chung, hệ thống công trình đã công bố phù hợp với hướng nghiên cứu của luận án, có sự liên hệ rõ với các kết quả thực nghiệm quan trọng và góp phần xác nhận quá trình nghiên cứu của nghiên cứu sinh.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng hệ phương pháp nghiên cứu tương đối phù hợp với mục tiêu đề tài và có tính liên kết rõ giữa các nội dung: tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể hệ sợi nấm, chiết xuất tuần tự polysaccharide, đánh giá hoạt tính sinh học in vitro và bước đầu ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic. Cách tiếp cận này phù hợp với định hướng của ngành Công nghệ thực phẩm, trong đó kết hợp giữa công nghệ lên men, thu nhận hợp chất sinh học, đánh giá hoạt tính. Luận án đã sử dụng một số phương pháp phù hợp và đang được dùng phổ biến trong nghiên cứu thực phẩm và thực phẩm chức năng như nuôi cấy dịch thể hệ sợi nấm, khảo sát đơn yếu tố kết hợp tối ưu hóa bằng thiết kế Box–Behnken/RSM, chiết xuất tuần tự polysaccharide bằng nước nóng, kiềm và acid, quan sát hình thái bằng SEM, đánh giá khả năng trung hòa gốc ABTS, xác định chỉ số prebiotic, đánh giá khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase, định lượng SCFAs và thử nghiệm sản phẩm lên men lactic. Phần phụ lục cũng cung cấp thêm dữ liệu xử lý thống kê, đường chuẩn và sắc ký đồ SCFAs, góp phần hỗ trợ độ tin cậy của kết quả.

Trình tự nghiên cứu được xây dựng tương đối logic: trước hết tối ưu điều kiện nuôi cấy để thu sinh khối và polysaccharide; sau đó tách các phân đoạn polysaccharide và đánh giá hoạt tính; cuối cùng lựa chọn sinh khối hệ sợi *T. versicolor* để ứng dụng trong sản phẩm lên men. Thiết kế Box–Behnken dựa trên các khoảng giá trị rút ra từ khảo sát đơn yếu tố là phù hợp với mục tiêu tối ưu hóa pH, glucose và cao nấm men. Việc sử dụng nhiều chủng probiotic, đối chứng FOS và các chỉ tiêu như PI, hàm lượng SCFAs, khả năng kháng α-amylase giúp đánh giá tiềm năng prebiotic ở mức *in vitro* tương đối toàn diện hơn so với chỉ dựa trên tăng trưởng vi khuẩn đơn thuần.

Các thí nghiệm được bố trí có lặp lại, sử dụng phân tích phương sai và kiểm định sai khác thống kê ở mức ý nghĩa $P < 0,05$. Phụ lục có trình bày kết quả phân tích mô hình tối ưu, bảng ANOVA, đường chuẩn glucose của phương pháp phenol–sulfuric và DNS, sắc ký đồ SCFAs, cũng như dữ liệu bổ sung cho phần sản phẩm lên men. Đây là các minh chứng cần thiết để hỗ trợ tính kiểm chứng của kết quả.

Tuy nhiên, một số giới hạn phương pháp cần được nhận diện đúng để tránh diễn giải vượt quá dữ liệu như: phương pháp phenol–sulfuric chủ yếu phản ánh carbohydrate tổng/PS thô quy đổi theo glucose, chưa chứng minh được độ tinh sạch hay cấu trúc phân tử của polysaccharide; SEM chỉ cung cấp thông tin hình thái bề mặt, không đủ để kết luận về cấu trúc phân tử hoặc mối liên hệ cấu trúc – hoạt tính; việc đánh giá prebiotic chủ yếu dựa trên mô hình *in vitro* với các chủng vi khuẩn đơn lẻ (chưa có mô hình tiêu hóa – lên men đại tràng mô phỏng, hệ vi sinh vật phức hợp, dữ liệu *in vivo* hoặc dữ liệu lâm sàng) nên kết quả chỉ nên được kết luận là tiềm năng prebiotic *in vitro*.

7. Kết quả mới của luận án

Luận án đã xác lập được điều kiện nuôi cấy dịch thể thích hợp để thu sinh khối giàu polysaccharide từ hệ sợi *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; xây dựng được bộ dữ liệu so sánh các phân đoạn polysaccharide chiết tuần tự bằng nước nóng, kiềm và acid; cung cấp bằng chứng thực nghiệm về tiềm năng prebiotic *in vitro* của các phân đoạn PS thông qua chỉ số

PI, khả năng kích thích probiotic, kháng thủy phân bởi α-amylase và tạo SCFAs; đồng thời bước đầu ứng dụng sinh khối hệ sợi *T. versicolor* trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic.

Điểm mới đáng ghi nhận là cách tiếp cận tích hợp từ nuôi cấy dịch thể – chiết xuất phân đoạn – đánh giá hoạt tính *in vitro* – phát triển sản phẩm thử nghiệm. Tuy nhiên, cần giới hạn đúng phạm vi đóng góp: luận án chưa chứng minh cấu trúc phân tử chi tiết của PS, chưa phát hiện polysaccharide mới và chưa có dữ liệu *in vivo* hoặc lâm sàng. Vì vậy, kết quả mới nên được xác định là bằng chứng thực nghiệm mới về tiềm năng prebiotic *in vitro* và khả năng ứng dụng ban đầu của polysaccharide/sinh khối hệ sợi nấm trong thực phẩm bổ sung, không nên diễn đạt thành hiệu quả sinh lý hay khả năng thương mại hóa đã được chứng minh đầy đủ.

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

- *Phần đặt vấn đề nghiên cứu*: Phần đặt vấn đề đã xác định đúng tính thời sự của hướng nghiên cứu về prebiotic, polysaccharide từ nấm và khai thác sinh khối hệ sợi nấm bằng nuôi cấy dịch thể. Việc lựa chọn *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* là phù hợp với mục tiêu phát triển nguồn nguyên liệu sinh học cho thực phẩm bổ sung. Tuy nhiên, cần rút gọn, giảm các khẳng định quá rộng về lợi ích sức khỏe, làm rõ hơn khoảng trống nghiên cứu và xác định đúng phạm vi đóng góp của luận án là đánh giá tiềm năng prebiotic *in vitro* của polysaccharide từ hệ sợi nấm và bước đầu ứng dụng sinh khối trong thực phẩm bổ sung.

Phần tổng quan:

- Phần tổng quan tài liệu có phạm vi khá rộng và đã bao quát được các nội dung liên quan đến hai loài nấm nghiên cứu, hoạt tính prebiotic, polysaccharide nấm, phương pháp chiết xuất, nuôi cấy dịch thể và khả năng kháng oxy hóa. Tuy nhiên, bố cục còn dàn trải, một số nội dung thiên nhiều về dược lý – y sinh như chống ung thư, điều hòa miễn dịch, giảm lipid máu, cơ chế NF-κB, MAPK, Nrf2–Keap1–ARE, trong khi luận án chủ yếu đánh giá các chỉ tiêu công nghệ và hoạt tính sinh học in vitro. Do đó, cần rút gọn các phần không phục vụ trực tiếp cho mục tiêu nghiên cứu và tập trung hơn vào polysaccharide hệ sợi nấm, tiềm năng prebiotic in vitro, chiết xuất phân đoạn và ứng dụng trong sản phẩm thực phẩm bổ sung.

- Ở mục 1.1, các bảng về hợp chất hoạt tính của *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* nên tập trung vào polysaccharide, β-glucan, polysaccharopeptides (PSP), polysaccharide K (PSK) và các đặc điểm có liên quan trực tiếp đến prebiotic, chống oxy hóa và ứng dụng trong thực phẩm. Ở mục 1.2, cần trình bày chặt chẽ hơn tiêu chí xác định prebiotic và nhấn mạnh rằng các chỉ tiêu như kích thích probiotic, chỉ số PI, kháng tiêu hóa và tạo SCFAs mới chỉ là bằng chứng về tiềm năng prebiotic *in vitro*, chưa đủ để khẳng định lợi ích sức khỏe trên vật chủ. Ở mục 1.3, cần tăng hàm lượng tổng quan về đặc điểm cấu trúc polysaccharide liên quan đến hoạt tính, đồng thời trình bày cân bằng hơn ưu điểm và hạn chế của các phương pháp chiết HWE/AE/AEc, đặc biệt là nguy cơ thủy phân, biến đổi khối lượng phân tử hoặc làm thay đổi hoạt tính sinh học của polysaccharide. Ở mục 1.4, cần làm rõ cơ sở lựa chọn pH, glucose và cao nấm men làm các yếu tố tối ưu. Ở mục 1.5, nên giới hạn thảo luận ở ý nghĩa và giới hạn của phép thử ABTS, không mở rộng sang các cơ chế chống oxy hóa cấp độ tế bào khi luận án chưa có dữ liệu tương ứng.

- Ngoài ra, Chương 1 còn thiếu một phần tổng quan làm nền cho nội dung ứng dụng sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men bổ sung sinh khối hệ sợi *T. versicolor*. Cần bổ sung ngắn gọn cơ sở lựa chọn nền sản phẩm, vai trò của *L. plantarum*, các tiêu chí cảm quan, an toàn, khả năng sống sót của probiotic và tính ổn định sản phẩm.

Chương 2 trình bày đầy đủ đối tượng, phạm vi và phương pháp nghiên cứu, cơ bản đáp ứng mục tiêu luận án. Tuy nhiên, để nâng cao tính chuẩn mực và độ tin cậy khoa học, hệ thống dữ liệu và phương pháp luận cần được trình bày chặt chẽ hơn; ở chương 2 nếu chia phần phương pháp thành 2 phần: Phương pháp bố trí thí nghiệm và phương pháp thu nhận kết quả thí nghiệm (phương pháp phân tích) thì dễ theo dõi hơn. Một số góp ý cụ thể như sau:

- Ở mục 2.1,

+ bổ sung nguồn gốc, mã lưu giữ/mã chủng, phương pháp định danh; trường hợp có định danh phân tử thì cung cấp mã GenBank của chủng nấm; bổ sung nguồn gốc của enzyme α-amylase

+ Trang 48. Mô tả cấy giống bằng cách "chia nhỏ hệ sợi nấm trong đĩa thành phần bằng nhau 0.5x0.5 cm" và "1 đĩa gốc/cấp 1 có thể cấy được 25-30 bình dịch" là thiếu tính chuẩn xác. Cần làm rõ điều kiện nuôi tĩnh/lắc và định lượng chính xác lượng giống cấy.

+ Kiểm tra lại thông tin giữa văn bản và bảng bố trí thí nghiệm OFAT của *C. militaris* (Bảng 2.2) và *T. versicolor* (Bảng 2.3) cho chính xác.

+ Trình bày đúng nguyên tắc phương pháp phenol-sulfuric là xác định carbohydrate/PS thô quy đổi theo glucose, không xem đây là hàm lượng polysaccharide tinh khiết.

Ở mục 2.5.

+ Bổ sung bước khử muối (desalting) sau bước dùng HCl và NH_3 để trung hòa, tránh làm sai lệch khối lượng PS thô thu được hoặc nêu giới hạn của phương pháp

+ PS đem thử hoạt tính đều ở dạng thô. Cần đánh giá tỷ lệ tạp chất (protein, polyphenol) để không quy kết toàn bộ hoạt tính sinh học là do polysaccharide.

+ Việc đo mật độ quang ở 600 nm để tính chỉ số Prebiotic sẽ bị nhiễu do độ đục nền của môi trường chứa chiết xuất PS. Cần giải trình cách loại trừ nhiễu nền hoặc dùng phương pháp đếm khuẩn lạc (CFU/mL) để đối chứng.

- Cần trình bày rõ hơn thẩm định định lượng SCFAs, gồm đường chuẩn riêng cho acetate, propionate, butyrate, khoảng tuyến tính, hệ số tương quan, LOD/LOQ, độ lặp lại, độ thu hồi, sắc ký đồ đại diện và cách xử lý mẫu. Đồng thời, cần kiểm tra và thống nhất phần phương pháp SCFAs. Luận án nêu hệ Agilent 1200, detector RI, cột Aminex HPX87H, pha động H_2SO_4 3mM, tốc độ dòng 0,6 mL/phút, nhiệt độ buồng là 50^0C (trang 61); trong khi công trình công bố kèm theo có mô tả HPLC-UV với cột Phenomenex C18 và pha động acetonitrile/H_2SO_4 5mM, tốc độ dòng 1 mL/phút, không đề cập nhiệt độ.

Chương 3

Mục 3.1 là nội dung quan trọng, tạo cơ sở cho các phần nghiên cứu tiếp theo của luận án. Việc khảo sát đơn yếu tố kết hợp với tối ưu hóa bằng mô hình bề mặt đáp ứng đối với hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* là phù hợp với mục tiêu thu nhận sinh khối hệ sợi nấm giàu polysaccharide. Kết quả đã xác định được điều kiện nuôi cấy tối ưu cho từng loài và có thí nghiệm kiểm chứng cho thấy giá trị thực nghiệm gần với giá trị dự đoán của mô hình. Tuy nhiên, cần thảo luận sâu hơn và chỉnh sửa một số câu diễn đạt sau:

+ Cần thảo luận để làm rõ sự khác biệt sinh lý giữa hai loài nấm. *T. versicolor* đạt sinh khối thấp hơn *C. militaris* nhưng hàm lượng PS cao hơn; cần được phân tích sâu hơn theo hướng: khác biệt về hệ enzyme, hình thái hệ sợi, khả năng sử dụng nguồn carbon/nitrogen, tốc độ tăng trưởng và đặc điểm tích lũy polysaccharide. Nếu chỉ mô tả rằng các yếu tố có ảnh hưởng thì chưa khai thác hết giá trị khoa học của dữ liệu. Đồng thời, cần chuyển các giá trị % của PS sang nồng độ g/L dịch lên men để thể hiện rõ hơn về bản chất và ý nghĩa công nghệ khi đánh giá hiệu quả sản xuất polysaccharide.

+ Các mô hình hồi quy đã loại bỏ các hệ số tương tác do không có ý nghĩa thống kê, nhưng các hình bề mặt đáp ứng vẫn được gọi là "ảnh hưởng tương tác…", dễ gây hiểu nhầm; nên đổi thành "ảnh hưởng kết hợp" hoặc "bề mặt đáp ứng của hai yếu tố". Đồng thời, cần bổ sung đầy đủ các chỉ số đánh giá mô hình như R^2, R^2 hiệu chỉnh, R^2 dự đoán, phân tích phần dư và sai số dự đoán – thực nghiệm; đồng thời diễn đạt thận trọng hơn đối với lack-of-fit, nhất là khi p-value của một số mô hình gần ngưỡng 0,05 và số bậc tự do của pure error còn thấp.

Phần kiểm chứng điều kiện tối ưu cần trình bày rõ giá trị dự đoán, giá trị thực nghiệm, sai số tuyệt đối và sai số tương đối cho cả sinh khối và hàm lượng PS. Các nhận định như "mô hình phản ánh rất trung thực", "độ tin cậy cao" hoặc "khẳng định tính khả thi sản xuất quy mô lớn" cần được tiết chế, vì kết quả hiện mới chứng minh sự phù hợp của mô hình trong phạm vi khảo

sát ở quy mô phòng thí nghiệm. Nên diễn đạt theo hướng: kết quả tối ưu hóa là cơ sở ban đầu cho nghiên cứu mở rộng quy mô nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối hệ sợi nấm giàu polysaccharide.

Mục 3.2. là nội dung trọng tâm của luận án, được triển khai tương đối hệ thống từ chiết xuất tuần tự các phân đoạn polysaccharide đến đánh giá hình thái bề mặt, hàm lượng PS, khả năng trung hòa gốc ABTS, kích thích sinh trưởng probiotic, chỉ số PI, tạo SCFAs, kháng α-amylase và khả năng ức chế vi khuẩn kiểm định. Các kết quả thu được cho thấy các phân đoạn PS từ hệ sợi *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* có sự khác biệt đáng kể về hiệu suất thu hồi và hoạt tính sinh học *in vitro*; trong đó một số phân đoạn thể hiện tiềm năng đáng chú ý về hỗ trợ sinh trưởng probiotic, tạo SCFAs và khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase. Tuy nhiên, nội dung này cần xem xét điều chỉnh để hợp lý hơn và tránh diễn đạt quá mức so với kết quả đạt được như sau:

+ **Mục 3.2.1.** SEM chỉ phản ánh hình thái bề mặt, không đủ để kết luận về cấu trúc phân tử polysaccharide; do đó cần tránh diễn giải sâu về mối liên hệ cấu trúc–hoạt tính khi chưa có dữ liệu FTIR, NMR, khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide hoặc liên kết glycoside. Cần loại bỏ các cụm từ suy diễn như "cho thấy mức độ phân nhánh cao hơn". Chỉ giới hạn nhận xét ở góc độ "độ xốp bề mặt", "kích thước cụm kết tụ" vì hình thái bề mặt quan sát được dưới SEM là kết quả tổng hợp của cấu trúc polymer và quá trình sấy thăng hoa/kết tủa, đồng thời khẳng định SEM chỉ là bước đánh giá ngoại quan sơ bộ; cần đọc kỹ lại hình ảnh của mẫu S-PST và A-PST để viết lại phần giải thích sự tác động của acid/kiềm sao cho khớp với hình ảnh thực tế của luận án (Trang 84).

3.2.2. Hàm lượng PS xác định bằng phương pháp màu nên được diễn giải là PS thô/carbohydrate tổng quy đổi, không nên xem như polysaccharide tinh khiết vì phương pháp này không loại hoàn toàn protein, peptide….

3.2.3 Phép thử ABTS, cần dùng cách diễn đạt "khả năng trung hòa gốc ABTS" thay vì khái quát thành hoạt tính chống oxy hóa toàn diện. Đồng thời, cần biện luận sau hơn về nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt về kết quả của các phân đoạn PS thô và không gán chủ yếu cho PS vì hiện tại chưa minh chứng cho việc loại các thành phần khác có mặt trong PS thô đặc biệt là protein, peptide, polyphenol…

3.2.4. Các chỉ tiêu tăng trưởng probiotic, PI, SCFAs và kháng α-amylase là bằng chứng phù hợp để đánh giá tiềm năng prebiotic *in vitro*, nhưng chưa đủ để khẳng định hoạt tính prebiotic theo nghĩa đầy đủ hoặc lợi ích sức khỏe trên vật chủ. Một số góp ý cụ thể:

+ **PI dương trong mô hình thử nghiệm** này chỉ chứng minh tiềm năng prebiotic *in vitro*, chưa đủ để khẳng định hoạt tính prebiotic vì chưa có hệ vi sinh vật đường ruột phức hợp, chưa có dữ liệu về sử dụng chọn lọc bởi microbiota của vật chủ và chưa có bằng chứng lợi ích sức khỏe cho vật chủ. Ở phần công thức tính PI (trang 57-58) chỉ dựa trên *E. coli* như đại diện vi khuẩn không mong muốn, cần nêu rõ giới hạn là chỉ đánh giá trên một vi khuẩn kiểm định, không đại diện toàn bộ vi sinh vật đường ruột bất lợi.

+ **Định lượng acetate, propionate và butyrate** là nội dung có giá trị, vì SCFAs là một trong các chỉ dấu quan trọng của quá trình lên men carbohydrate bởi vi khuẩn đường ruột. Tuy nhiên, phần thảo luận hiện có một số nhận định quá rộng về lợi ích sức khỏe, ví dụ liên hệ SCFAs với giảm bệnh đường tiêu hóa, ung thư, tim mạch hoặc các liệu pháp dựa trên probiotic. Các ý này có thể đúng trong bối cảnh tài liệu, nhưng luận án chỉ đo SCFAs trong môi trường nuôi cấy *in vitro* sau 24 giờ; do đó không nên diễn giải như hiệu quả sinh lý. Nên chuyển sang cách viết: "sự gia tăng SCFAs là bằng chứng hỗ trợ khả năng các phân đoạn PS được lên men bởi probiotic trong điều kiện *in vitro*".

+ **Phần kháng phân giải bởi α-amylase** cách gọi "khả năng kháng tiêu hóa" cần điều chỉnh (đặc biệt ở đây chỉ sử dụng α-enzyme có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* không đại diện cho α-enzyme từ tuyến nước bọt) nên chưa đủ cơ sở để khẳng định vì vậy cần nêu các giới hạn của phương pháp. Đồng thời, thí nghiệm chỉ mô phỏng bước α-amylase, không đại diện đầy đủ cho

tiêu hóa người, vốn bao gồm điều kiện dạ dày với pH acid và pepsin, điều kiện ruột non với pancreatin, muối mật, enzyme bờ bàn chải và thời gian lưu khác nhau. Do đó, nên đổi thành "khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase *in vitro*" hoặc "một chỉ dấu ban đầu về khả năng kháng tiêu hóa", tránh khẳng định "kháng tiêu hóa cao" theo nghĩa toàn bộ hệ tiêu hóa. Ngoài ra, cần làm rõ phương pháp DNS đo đường khử có thể bị ảnh hưởng bởi đường khử sẵn có trong mẫu PS thô. Vì vậy, cần có mẫu trắng trước phản ứng enzyme và mẫu bất hoạt enzyme để hiệu chỉnh nền.

Mục 3.2 có giá trị khoa học và cung cấp dữ liệu quan trọng cho luận án, nhưng cần tiết chế các kết luận quá mạnh như "hoạt tính prebiotic rõ rệt", "cơ sở vững chắc" hoặc "lợi ích sức khỏe". Cách diễn đạt phù hợp hơn là: các phân đoạn PS từ hệ sợi nấm cho thấy tiềm năng prebiotic *in vitro*, cần tiếp tục được xác nhận bằng phân tích cấu trúc sâu, mô hình tiêu hóa–lên men phức hợp và nghiên cứu *in vivo*.

Mục 3.3. Một điểm cần làm rõ là sự chưa thống nhất giữa kết quả mật độ *L. plantarum* rất cao ở Bảng 3.13 và kết quả "không phát hiện tổng số vi sinh vật hiếu khí" ở Bảng 3.17. Luận án cần giải thích trạng thái sản phẩm gửi kiểm nghiệm là sản phẩm còn probiotic sống hay đã được xử lý sau lên men. Nếu sản phẩm đã qua xử lý làm mất vi khuẩn sống, cần tránh gọi sản phẩm thành phẩm là "giàu probiotic". Nếu được nên kiểm tra cả 2 sản phẩm để minh chứng cho sản phẩm lên men có tiềm năng ức chế vi khuẩn kiểm nghiệm trong sản phẩm thực tế.

Quy trình chế biến ở mục 3.3.3 có ý nghĩa định hướng nhưng còn ở mức phòng thí nghiệm. Cần bổ sung các thông số công nghệ định lượng như tỷ lệ nguyên liệu/nước, điều kiện chiết, tỷ lệ bổ sung sinh khối, mật độ giống, tỷ lệ cấy, nhiệt độ và thời gian lên men, pH kết thúc, điều kiện đóng chai, xử lý sau lên men, bảo quản và thời hạn sử dụng. Ngoài ra, cần rà soát lỗi hình thức như đánh số hình trong phần tóm tắt, thống nhất thuật ngữ "độ acid tổng số/tổng acid tính theo acid lactic" và diễn đạt thận trọng hơn về "thực phẩm hỗ trợ sức khỏe" hoặc "giàu hoạt tính sinh học".

Kết luận và kiến nghị: Cơ bản đã trình bày đầy đủ các kết quả chính đạt được và kiến nghị phù hợp. Tuy nhiên, cần diễn đạt lại theo 3 mục tiêu của luận án thì kết luận sẽ rõ ràng hơn. Đồng thời, cần chỉnh sửa văn phong theo hướng khoa học hơn, giảm các khẳng định vượt quá phạm vi dữ liệu, thống nhất thuật ngữ "tiềm năng prebiotic *in vitro*", "khả năng trung hòa gốc ABTS", "hình thái bề mặt" và "kháng thủy phân bởi α-amylase". Phần kiến nghị nên tập trung hơn vào các giới hạn cốt lõi của luận án, gồm phân tích cấu trúc PS, kiểm chứng prebiotic ở mô hình sinh học phù hợp, đánh giá ổn định sản phẩm và nghiên cứu mở rộng quy mô.

Ngoài ra, luận án cần rà soát lại toàn bộ lỗi chính tả, lỗi đánh máy và lỗi diễn đạt; tránh diễn đạt quá mức so với kết quả của luận án; Các tên Latin cần viết nghiêng, các từ *in vitro*, *in vivo* cần viết nghiêng; rà soát lại tính xác thực của tài liệu và tính phù hợp của nội dung trích dẫn được sử dụng trong luận án.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Các công trình đã công bố của nghiên cứu sinh có liên quan trực tiếp đến nội dung luận án. Nghiên cứu sinh có 04 bài báo liên quan, gồm 02 công trình về sản phẩm nước nấm lên men, 02 công trình về hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ hệ sợi *Cordyceps militaris*; ngoài ra còn có các đề tài nghiên cứu khoa học và sách chuyên khảo liên quan đến polysaccharide hệ sợi nấm. Nghiên cứu sinh đứng tên đầu trong các bài báo được liệt kê, cho thấy vai trò tham gia chính trong quá trình thực hiện và công bố kết quả nghiên cứu.

10. Sự phản ánh trung thực nội dung cơ bản của luận án trong cuốn tóm tắt luận án

Cuốn tóm tắt luận án về cơ bản đã phản ánh trung thành nội dung chính của toàn văn luận án. Tên đề tài, chuyên ngành, mục tiêu nghiên cứu, đối tượng – phạm vi và ba nội dung nghiên cứu chính được trình bày thống nhất với toàn văn, gồm: tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; chiết xuất tuần tự và đánh giá hoạt tính

của các phân đoạn polysaccharide; bước đầu ứng dụng sinh khối hệ sợi nấm trong sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men lactic.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

Bản giải trình của nghiên cứu sinh được trình bày theo từng ý kiến của phản biện độc lập, có đối chiếu nội dung góp ý, phần đã chỉnh sửa/giải trình và vị trí chỉnh sửa trong luận án. Về hình thức, bản giải trình có cấu trúc tương đối rõ, thể hiện thái độ nghiêm túc tiếp thu ý kiến phản biện; nhiều góp ý về lỗi chính tả, danh pháp khoa học, thuật ngữ, ký hiệu, đơn vị, trình bày bảng/hình, thống nhất số liệu giữa luận án – tóm tắt – phụ lục – công trình công bố đã được nghiên cứu sinh ghi nhận và chỉnh sửa.

Về nội dung khoa học, nghiên cứu sinh đã tiếp thu một số góp ý quan trọng của phản biện độc lập, như bổ sung thảo luận về giới hạn của mô hình *in vitro*, làm rõ hơn cơ sở lựa chọn sinh khối *T. versicolor* cho phần ứng dụng, bổ sung thảo luận về chỉ số R^2 và độ phù hợp của mô hình tối ưu, chỉnh sửa cách diễn đạt về phạm vi nghiên cứu, cũng như bổ sung một số so sánh với nghiên cứu quốc tế gần đây. Các điều chỉnh này góp phần làm luận án rõ hơn về phạm vi, logic nghiên cứu và giới hạn diễn giải kết quả.

Tuy nhiên, một số nội dung giải trình vẫn còn mang tính khái quát, chủ yếu nêu "đã rà soát", "đã bổ sung", "đã chỉnh sửa" mà chưa luôn làm rõ mức độ chỉnh sửa, nội dung chỉnh sửa cụ thể hoặc lý do khoa học của việc tiếp thu/không tiếp thu. Một số góp ý có tính bản chất như giới hạn của phân tích cấu trúc polysaccharide, mối liên hệ cấu trúc – hoạt tính, giới hạn của mô hình prebiotic *in vitro*, cơ chế kháng khuẩn, độ ổn định sản phẩm và khả năng mở rộng quy mô mới được giải trình theo hướng bổ sung thảo luận, chưa thể xem là đã được giải quyết đầy đủ bằng dữ liệu thực nghiệm mới. Đây là giới hạn cần được nhận diện đúng, không phải là sai sót nghiêm trọng, nhưng cần tránh diễn giải quá mức trong phần kết luận và đóng góp mới của luận án.

Đặc biệt, đối với góp ý về phân tích cấu trúc polysaccharide, nghiên cứu sinh đã bổ sung và chỉnh sửa phần thảo luận liên quan đến SEM; tuy nhiên SEM chỉ phản ánh hình thái bề mặt, chưa đủ để kết luận về cấu trúc phân tử, thành phần monosaccharide, khối lượng phân tử hoặc kiểu liên kết glycoside. Do đó, phần giải trình là chấp nhận được ở mức làm rõ giới hạn phương pháp, nhưng chưa thể thay thế cho các phân tích cấu trúc sâu như FTIR, NMR, HPSEC hoặc phân tích monosaccharide. Điều này cần tiếp tục được nêu là hướng nghiên cứu tiếp theo.

Đối với góp ý về tính *in vitro* của các kết quả prebiotic, nghiên cứu sinh đã có chỉnh sửa theo hướng thận trọng hơn, nhấn mạnh các kết quả mới phản ánh tiềm năng trong điều kiện thí nghiệm, chưa đại diện đầy đủ cho hệ tiêu hóa và hệ vi sinh vật đường ruột phức hợp trên vật chủ. Đây là phần giải trình phù hợp. Tuy nhiên, cần tiếp tục thống nhất cách diễn đạt trong toàn luận án, đặc biệt ở phần mở đầu, kết luận, ý nghĩa thực tiễn và tóm tắt luận án, để tránh các cụm từ dễ gây hiểu là đã chứng minh hiệu quả sức khỏe hoặc hiệu quả sinh lý trên người.

Đối với phần ứng dụng sản phẩm, nghiên cứu sinh đã giải trình lý do chọn *T. versicolor* thay vì *C. militaris* và làm rõ công thức bổ sung 0,6% sinh khối, lên men 24 giờ. Nội dung này về cơ bản phù hợp với kết quả thực nghiệm. Tuy nhiên, phần giải trình vẫn cần nhấn mạnh rõ hơn rằng đây là kết quả bước đầu ứng dụng ở quy mô phòng thí nghiệm, chưa phải quy trình sản xuất hoàn chỉnh; các vấn đề như ổn định bảo quản, khả năng sống sót của *L. plantarum*, an toàn theo nhiều lô mẫu, cảm quan người tiêu dùng và thời hạn sử dụng vẫn cần tiếp tục nghiên cứu.

Nhìn chung, bản giải trình của nghiên cứu sinh thể hiện tinh thần tiếp thu nghiêm túc và đã xử lý được nhiều góp ý của phản biện độc lập, nhất là các góp ý về hình thức trình bày, chuẩn hóa thuật ngữ, bổ sung thảo luận và làm rõ giới hạn nghiên cứu. Tuy vậy, một số vấn đề có tính chiều sâu khoa học mới được giải trình ở mức bổ sung thảo luận, chưa được giải quyết bằng dữ liệu thực nghiệm bổ sung. Do đó, có thể đánh giá bản giải trình là cơ bản đạt yêu cầu, nhưng nghiên cứu sinh cần tiếp tục rà soát để thống nhất cách diễn đạt thận trọng trong toàn luận án, đặc biệt đối với các nội dung về "prebiotic", "cấu trúc polysaccharide", "cơ chế kháng khuẩn", "hiệu quả sức khỏe" và "khả năng ứng dụng sản phẩm".

12. Kết luận

Trên cơ sở xem xét toàn văn luận án, tóm tắt luận án, danh mục công trình khoa học và bản giải trình phản biện độc lập, có thể nhận định luận án đã được thực hiện nghiêm túc, có cấu trúc tương đối đầy đủ và phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, mã số 9540101. Mặc dù luận án còn một số sai sót và hạn chế nhưng chủ yếu thuộc về mức độ diễn giải, chuẩn hóa thuật ngữ, hoàn thiện trình bày và mở rộng thảo luận giới hạn nghiên cứu; không làm thay đổi bản chất các kết quả chính của luận án. Nghiên cứu sinh đã có các công trình công bố liên quan trực tiếp đến nội dung luận án và đã có bản giải trình tiếp thu ý kiến phản biện độc lập.

Vì vậy, tôi đánh giá luận án đáp ứng yêu cầu cơ bản của một luận án tiến sĩ ngành Công nghệ thực phẩm. Đề nghị Hội đồng cho phép nghiên cứu sinh được bảo vệ luận án trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Trường, đồng thời yêu cầu nghiên cứu sinh nghiêm túc tiếp thu, chỉnh sửa các nội dung góp ý nêu trên trước khi hoàn thiện bản luận án cuối cùng.

Xác nhận của cơ quan quản lý

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TÂY NGUYÊN
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ MÔI TRƯỜNG

GS.TS. Nguyễn Anh Dũng

Đắk Lắk, ngày 7 tháng 7 năm 2026

Người nhận xét

PGS. TS. Nguyễn Quang Vinh

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: TS. Nguyễn Thị Đông Phương
Học hàm: ..... Học vị: Tiến sĩ
Chuyên ngành: Công nghệ Vi Sinh
Cơ quan công tác: Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng
Địa chỉ: 54 Nguyễn Lương Bằng - T.p Đà Nẵng

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng — Tuyển sinh năm: 2020
Ngành: Công nghệ thực phẩm — Mã số: 9540101
Tên đề tài luận án: Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyces militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Xu hướng nghiên cứu trong những năm gần đây là tập trung tìm kiếm, thu nhận các hợp chất thành phần nguyên liệu mới có hoạt tính prebiotic nhằm hỗ trợ sức khoẻ đường ruột của con người. Do vậy đề tài luận án mang tính cấp thiết và đáp ứng xu thế ngày trong việc thu nhận và đánh giá hoạt tính prebiotic từ sinh khối sợi nấm có ý nghĩa khoa học: 1) đề tài đã cung cấp hệ thống dữ liệu các yếu tố tác động đến sự tích lũy sinh khối & hàm lượng PS từ 2 chủng nấm trong quá trình nuôi cấy chìm 2) làm sáng tỏ cơ chế tác động của các phương pháp chiết xuất lên cấu trúc (SEM) và hoạt tính prebiotic của PS từ sợi nấm. 3) Cung cấp các dữ liệu về thành phần các acid béo mạch ngắn do các lợi khuẩn sinh ra khi nuôi cấy với PS từ sợi nấm. Ý nghĩa thực tiễn: Xác định được nguồn prebiotic tiềm năng có chất lượng cao thông qua chiết xuất và nuôi cấy chìm có giá thành cạnh tranh so với quy trình Xây dựng quy trình bào chế bổ sung PS kết hợp lactic định hướng có tác dụng hỗ trợ sức khoẻ

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

Luận án có số liệu, kết quả nghiên cứu không trùng lặp với các công trình khoa học khác. Hai loại nấm C. militaris và T. versicolor là hai đối tượng đã và đang được nghiên cứu rộng rãi, các nghiên cứu chủ yếu liên quan đến các hợp chất như cordycepin, adenosine, PSK, PSP trong ứng dụng hỗ trợ điều trị, điều hoà miễn

dịch, thảm, virus. Các nghiên cứu về hoạt tính prebiotic của PS từ nấm chỉ được chú ý trong những năm gần đây và chỉ liên về khả năng lên men chọn lọc của từng gam đoạn PS còn rất ít. Do vậy, tính không trùng lặp của đề tài được thể hiện ở những điểm mới của luận án: tối ưu quá trình thu nhận PS (nguồn prebiotic) từ quá trình nuôi cấy chìm, so sánh hoạt tính prebiotic tiềm năng của đoạn PS chiết xuất. Các công bố khoa học từ nội dung luận án cũng cho thấy sự không trùng lặp với các công trình khoa học khác.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

Nội dung đề tài luận án đã thể hiện sự phù hợp, tập trung đầy đủ các tiêu chuẩn của chuyên ngành Công nghệ Thực phẩm, từ đối tượng nghiên cứu: các loài nấm dược liệu ở nấm ăn, các phương pháp nghiên cứu: phân tích thực phẩm; vi sinh thực phẩm, phát triển sản phẩm mới, đánh giá cảm quan.

+ Vi sinh thực phẩm: tối ưu hóa điều kiện lên men chìm thu sinh khối, sử dụng hệ lợi khuẩn đặc trưng L. plantarum, B. animalis...

+ Phân tích thực phẩm: HPLC định lượng acid hữu cơ, các polysaccharide PS.

+ Phát triển sản phẩm thực tế: quy trình chế biến mứt nấm bào ngư từ PS.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

Luận án có nguồn TLTK tổng cộng 223 TLTK. Các TLTK là tính cập nhật và được trích dẫn đầy đủ trong toàn bộ nội dung luận án.

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Trong 4 bài báo khoa học đã công bố, có 3 bài được đăng trên các tạp chí lần lượt là Mycobiology Q2, Journal of Applied Biology & Biotechnology, tạp chí Công Thương đều là các nội dung được lấy từ kết quả luận án đã phản ánh chính xác kết quả luận án.

.....

.....

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Luận án có bố cục nghiên cứu được thiết kế logic, sử dụng và lựa chọn các phương pháp nghiên cứu từ truyền thống đến hiện đại có tính hợp lý và độ tin cậy cao. Quy trình nuôi cấy chủng đã khảo sát đến biến truyền thống động học ứng dụng mô hình bề mặt đáp ứng thông qua thiết kế BBD để tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy, so sánh và rút ra các kết quả thực nghiệm sử dụng các phương pháp chiết xuất truyền thống với các tác nhân nước, kiềm, acid để đánh giá quá trình thu hồi PS liên quan đến cấu trúc tế bào. Sử dụng thiết bị SEM hiện đại để minh chứng sự thay đổi cấu trúc thành tế bào do ảnh hưởng của dung môi chiết xuất liên quan trực tiếp đến hoạt tính prebiotic của PS. Đánh giá hoạt tính kháng OXH bằng ABTS; hoạt tính prebiotic thông qua chỉ số PAS, SCFA như kỹ thuật nuôi cấy & phân tích HPLC.

Các thí nghiệm có độ tin cậy cao khi thực hiện lặp lại 3 lần.

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

+ Đã thiết lập các thông số tối ưu để thu nhận sinh khối cao (PS) trong điều kiện SmF bởi C. militaris: pH = 5,05; glucose 40 g/L, cao nấm men 5,07 g/L, sinh khối 8,90 g/L, PS: 5,28 và T. versicolor: pH = 5,45, glucose 20,65 g/L, cao nấm men: 2,025 g/L, sinh khối 3,59 g/L, PS: 4,39 → định hướng cấp độ ứng dụng mở rộng

+ Đã chứng minh quá trình chiết xuất bằng các dung môi khác nhau tạo sự khác biệt về mặt hình thái và ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học tương ứng mối quan hệ chiết xuất PS có hoạt tính prebiotic & kháng OXH cao (ABTS IC50 ở T. versicolor 1070 µg/mL sau nuôi 14 ngày) + Đã chứng minh tiềm năng prebiotic của các phân đoạn, trong đó phân đoạn chiết bằng acid và chỉ số PAS cao hơn khả năng sản sinh SCFA mới tiềm năng (A-PS1) có butyrate lần lượt 4,95; 27 mg/kg khi nuôi với L. plantarum.

+ Đã xây dựng thành công mô hình sản phẩm sữa chua lên men có bổ sung sinh khối nấm men chứa hoạt tính kháng khuẩn, kháng OXH tốt, cảm quan tốt và đạt chỉ tiêu chất lượng theo quy định → chứng minh tính ứng dụng cao.

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

+ Về hình thức: Vẫn còn các lỗi chính tả, lỗi chưa thống nhất thuật ngữ (polysaccharide-peptid), lỗi viết tắt chưa thêm vào danh mục: OFAT ở Bảng 2.2, 2.3; DNS; môi trường PDB... lỗi in nghiêng tên khoa học sau rà soát vẫn còn (mục 1.1). Ở cuốn tóm tắt nội dung luận án có mục 1.3.3 không nằm trong cuốn toàn văn → cần đối chiếu và thống nhất.

+ Về nội dung: - Hiểu nhầm hoạt ghi nhãn PI và PAS (prebiotic activity score)

- Một số lỗi chính ở toàn văn chưa được chỉnh sửa ở tóm tắt (thuật ngữ không OXH)

- Mở đầu: mục 5, ý nghĩa thứ tiên: nên chỉnh sửa sản phẩm nước lên men sử dụng hoạt tính sinh học là kháng khuẩn và kháng OXH thay vì prebiotic. Vì NCS chỉ mới đánh giá in vitro chiết xuất PS để khẳng định tiềm năng prebiotic, trong thực tế trong quá trình lên men, có thể PS của sợi nấm được sử dụng là cơ chất cho L. plantarum → suy giảm hoạt tính prebiotic, chuyển thành dạng symbiotic.

- Chương I. Tổng quan tài liệu: Thiếu tổng quan về các phương pháp đánh giá hoạt tính prebiotic → trên cơ sở này NCS có thể hiểu rõ về các phương pháp liên quan như chỉ số PI (prebiotic index), PAS, phương pháp đồng nuôi cấy, in vitro trên hệ VSV thực tế từ ruột (mô lợn thường ruột) và lựa chọn phương pháp phù hợp, tránh hiểu nhầm thuật ngữ

- Chương II. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 1) NCS lưu ý khi sử dụng tên gọi hai chuẩn cho E. coli → cần thay đổi VSV thử thì hai chuẩn, trong các bài báo về PI hay PAS, đều dùng enteric bacteria (coli đường ruột) cho E. coli. 2) Rà soát và đổi lại thuật ngữ PAS thay vì PI do PI có công thức hoàn toàn khác so với PAS trong khi NCS sử dụng công thức của PAS. * Phương pháp thực hiện: 1) NCS cần thống nhất điều kiện nuôi cấy dịch thể: glucose, cao nấm men tương đương với các thí nghiệm sơ thử đã tiến hành. 2) Bảng tóm tắt bố trí thí nghiệm 2.2 & 2.3 bị nhầm, tên loại nhầm cho nấm T. versicolor bị thiếu → cần bổ sung. 3) Giá trị khảo sát pH, glucose, cao nấm men ở mục C đánh giá cảnh hưởng yếu tố đến biến cách tính IC50 cũng như bổ sung vào phần fu lục kết quả xử lý số liệu liên quan đến PS. 4) Phương pháp đánh giá khả năng hình thành SCFA có nêu đến hướng acid lactic, nhưng trong kết quả không có. Cần bổ sung vào phụ lục thường chuẩn của các loại acid acetic, propionic, butyric cũng như cách tính giá trị quy đổi dựa trên giá trị peak xuất hiện ở các sắc ký đồ. * Ủng dụng lên men: NCS cần ghi rõ dung dịch acid hoặc bazơ để điều chỉnh pH hay là cấp thực tế.

- Chương III. Kết quả và thảo luận; 3.1. Tối ưu hóa điều kiện thu C. militaris, 3.1.1.1. Đồng biến cần xem lại số liệu ở hình 3.1, các chữ cái a, b, c không đúng với biểu thị ở số liệu trong các biểu đồ. giải thích rõ hơn về giá trị pH tối ưu là 5 trong khi các công bố ở tổng quan là 6 hoặc 6,5. Theo trình tự thiết kế TN, khi có giá trị pH 5 thấp hơn khoảng sinh khối cao nhất thì bước tiếp theo là thay đổi glucose từ 20g lên 30 → 50g/L, tuy nhiên kết quả cho thấy ở 30, 35 g/l sinh khối và PS đều thấp hơn hẳn so với 20 g/L. Tăng gấp đôi lần glucose lên 40g/l thì sinh khối có tăng nhưng giá trị không đáng kể nếu so sánh về mặt kinh tế. NCS nên chú ý vấn đề này; 3.2. Chiết xuất tuần tự PS → đọc lại các phần đoạn PS theo cấu trúc và màu sắc thì dịch chiết khác nhau, điều này có ảnh hưởng đến việc xử dụng giá trị OD do mất độ quang tế bào VSV để đánh giá hoạt tính prebiotic không? với các cấu trúc PS này có thể tạo thông số nhiễm (có giá trị độ đục) hoặc khi ủ 24h thì các hạt có kết tủa 3.2.3. Khả năng thủy oxh của các phần đoạn cần bổ sung thêm tiêu chuẩn các giá trị mà NCS chỉ trích in đậm trong bảng 3.7 & 3.8 và các giá trị % bắt gốc từ đó in đậm này cho thấy xu hướng người lại (WPSC cao hơn so với A-PSC) với biến luận chung trong luận án.

+ Hoạt tính prebiotic thông qua đánh giá khả năng acid béo chuỗi ngắn + Khả năng kích thích sinh trưởng: NCS tham khảo phương pháp chưa đúng, chưa phân tích khả năng kích thích sinh trưởng VSV của các PS chiết xuất → nên thay bằng khả năng sinh trưởng hoặc chỉ số đánh giá tiềm prebiotic.

+ Hàm lượng acid béo chuỗi ngắn: Cần xem xét lại phương pháp, độ sạch cột sắc ký → các sắc ký đồ biểu thị thường tự nhau; tính đặc hiệu của từng chủng VSV trong sản xuất các SCFA.

+ Ứng dụng lên men nước: nên lựa chọn đối tượng cảm quan đa dạng hơn.

- Các ký hiệu khi biểu diễn lưu đồ cần quy định: đầu vào nguyên liệu

- pH ban đầu trong phương pháp nghiên cứu là 6,5 của nước nấm bổ sung sinh khối nấm T. versicolor, nhưng khi đó pH ban đầu trong quá trình lên men thì có sự thay đổi, pH trong bình 5?

.....

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Có 4 bài báo khoa học đã xuất bản trong và ngoài nước, trong đó 1 bài đăng trên kỷ yếu hội thảo SPISE là tiền đề cho hướng nghiên cứu phát triển sản phẩm men bổ sung PS của luận án. 2 bài đăng trên tạp chí quốc tế có uy tín Mycobiology Q2 và Journal of Applied Biology & Biotechnology Q2. Và 1 bài trên tạp chí Công Thương. Các bài báo nêu trên đều là kết quả công bố từ nội dung đề tài luận án. Ngoài ra còn 1 sách chuyên khảo mà tác giả luận án đóng vai trò là đồng tác giả => Kết quả từ luận án đã được công bố và thừa kế làm nguồn tài liệu tham khảo chuyên ngành. Có 4 đề tài nghiên cứu đã được nghiệm thu liên quan đến luận án. Tuy nhiên, tác giả cần xem xét lại vai trò của người hướng dẫn trong các công trình công bố và sự thiếu vắng của tên người hướng dẫn.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn Tóm tắt luận án

Tóm tắt luận án đã mô tả khái quát các nội dung cơ bản của luận án, trong đó các bảng, hình ảnh, số liệu đều trích dẫn đúng từ nội dung luận án. Tuy nhiên vẫn còn 1 số các thông tin từ tóm tắt chưa khớp giữa toàn văn: 1.3.2 Các p^2 chiết tách PS từ nấm men đã lại "Các p^2 chiết xuất..."; mục 1.3.3 Cơ sở khoa học sử dụng HWE; AE, AEc không có trong toàn văn. Cần ghi rõ trong tóm tắt tên đầy đủ L. plantarum và Mục 3.2.4 Hoạt tính kháng ... cần thay đổi tên cho luôn ăn. Một số lỗi chính tả góp ý của PBĐL chưa thấy sửa ở tóm tắt

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

NCS đã giải trình và chỉnh sửa đầy đủ theo góp ý của 2 phản biện độc lập về các nội dung như: thống nhất tên gọi và sót lỗi chính tả. Tuy nhiên do khối lượng nội dung lớn nên NCS vẫn còn mắc một số lỗi chính tả cần như chưa rà soát hết sự thống nhất trong cách dùng thuật ngữ 2) Đã bổ sung các nguồn tài liệu mới cập nhật cũng như thảo luận rõ hơn về kết quả nghiên cứu liên quan đến sự thay đổi cấu trúc ảnh hưởng đến hoạt tính prebiotic & khả năng kháng oxh của PS, làm rõ ưu nhược điểm của nghiên cứu in vitro so với in vivo để đề xuất hướng nghiên cứu mở rộng, đã giải thích cơ sở lựa chọn sinh khối nấm men chỉ cho phát triển sản phẩm

.....

.....

.....

.....

12. Kết luận:

+ Khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ

Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu đối với một luận án Tiến sĩ. Luận án có nội dung, hình thức và hàm lượng khoa học cao đủ điều kiện thông qua các công bố khoa học liên quan trực tiếp ở các tạp chí có uy tín trong và ngoài nước. Nội dung chính xuyên suốt của luận án hoàn toàn phù hợp và có đóng góp tích cực cho sự phát triển của ngành Công nghệ Thực phẩm.

+ Tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường ☑

+ Không tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường ☐

Lý do: .....

Xác nhận của cơ quan quản lý (nếu có)

Đà Nẵng, ngày 12 tháng 7 năm 2026

Người nhận xét

TS. Nguyễn Thị Đông Phương

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu

Học hàm: Phó giáo sư **Học vị:** Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

Địa chỉ: 459 Tôn Đức Thắng, Hòa Khánh, Đà Nẵng

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng Tuyển sinh năm: 2020

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm Mã số: 9540101

Tên đề tài luận án: Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung

TỔNG QUAN HỒ SƠ VÀ CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật của NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng, chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng. Toàn văn luận án gồm 156 trang (chưa tính phần phụ lục), được trình bày bài bản theo chuẩn mực của một công trình nghiên cứu tiến sĩ kỹ thuật với bố cục bao gồm: Lời cam đoan, Lời cảm ơn, Mục lục, Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt, Danh mục bảng/hình, Phần Mở đầu, 3 Chương nội dung chính, Kết luận & Kiến nghị, Danh mục công trình công bố của tác giả và Danh mục Tài liệu tham khảo (223 tài liệu tham khảo trong và ngoài nước, cập nhật nhiều công trình quốc tế uy tín công bố đến năm 2025).

Bố cục nội dung chính của luận án:

- **Phần Mở đầu**: Đặt vấn đề, mục tiêu nghiên cứu (tổng quát & cụ thể), đối tượng & phạm vi nghiên cứu, phương pháp tiếp cận, ý nghĩa khoa học & thực tiễn của đề tài, bố cục của luận án.
- **Chương 1. Tổng quan tài liệu** (37 trang, từ trang 7 đến 43): Tổng quan hệ sinh học và đặc tính dược liệu của hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; cơ sở lý luận về polysaccharide (PS) nấm và hoạt tính prebiotic; phương pháp nuôi cấy

dịch thể (Submerged Fermentation - SmF); quy trình chiết xuất và phân lập polysaccharide; cơ chế chống oxy hóa và kích thích sinh trưởng lợi khuẩn.

- **Chương 2. Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu** (22 trang, từ trang 44 đến 65): Giới thiệu nguyên liệu nấm, các chủng vi sinh vật đối chứng và hóa chất; Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu; Quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa nuôi cấy dịch thể bằng Phương pháp Bề mặt Đáp ứng (RSM) với Thiết kế Box-Behnken (BBD); Quy trình trích xuất tuần tự PS (dùng nước nóng 100°C, Na_2CO_3 1 M và HCl 0,1 M); Phân tích hình thái vi cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM); Đánh giá khả năng kháng oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP); Thử nghiệm hoạt tính prebiotic *in vitro* kích thích vi khuẩn lactic (*L. plantarum*, *L. acidophilus*) và ức chế vi sinh vật gây hại; Quy trình công nghệ lên men lactic đồ uống từ dịch chiết nấm Bào ngư (*Pleurotus ostreatus*) kết hợp sinh khối sợi nấm Vân chi; Xử lý thống kê (Minitab, SPSS, ANOVA, Tukey HSD).
- **Chương 3. Kết quả và Thảo luận** (63 trang, từ trang 66 đến 128):
- *3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể thu nhận sinh khối và PS hệ sợi nấm C. militaris và T. versicolor.*
- *3.2. Chiết xuất tuần tự, đánh giá hình thái (SEM), hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính prebiotic của các phân đoạn PS.*
- *3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung (nước uống lên men lactic từ chiết xuất nấm bào ngư kết hợp hệ sợi nấm Vân chi).*
- **Kết luận và Kiến nghị** (2 trang, từ trang 129 đến 130).

NỘI DUNG NHẬN XÉT CHI TIẾT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

- **Tính cấp thiết & thời sự**: Trong bối cảnh y - sinh - thực phẩm hiện đại, việc nghiên cứu, phát triển các sản phẩm thực phẩm bổ sung, thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên nhằm tăng cường sức khỏe đường ruột và hệ miễn dịch đang là xu hướng chủ đạo trên thế giới. Nấm dược liệu *Cordyceps militaris* (Đông trùng hạ thảo) và *Trametes versicolor* (Nấm Vân chi) nổi tiếng giàu các hợp chất sinh học quý, đặc biệt là polysaccharide. Tuy nhiên, phương pháp thu hái hoặc nuôi trồng quả thể nấm truyền thống tốn nhiều thời gian (60 – 90 ngày), phụ thuộc lớn vào thời tiết và chi phí sản xuất cao. Việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy dịch thể (Submerged Fermentation - SmF) để thu sinh khối và chiết xuất polysaccharide hệ sợi nấm trong thời gian ngắn (7 – 14 ngày) với các điều kiện kiểm soát nghiêm ngặt là giải pháp công nghệ mang tính thời sự, giải quyết triệt để bài toán nguyên liệu và tối ưu chi phí.
- **Ý nghĩa khoa học**:
    - Cung cấp hệ thống dữ liệu thực nghiệm và xây dựng thành công các mô hình toán học RSM/BBD chính xác về ảnh hưởng của pH, nồng độ glucose và cao nấm

men đến khả năng sinh trưởng sinh khối và tổng hợp polysaccharide của hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*.

- Làm sáng tỏ mối tương quan giữa hình thái vi cấu trúc bề mặt (SEM), khả năng kháng oxy hóa và hiệu quả prebiotic kích thích tăng trưởng lợi khuẩn lactic (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) của các phân đoạn polysaccharide thu nhận từ quy trình chiết xuất tuần tự (dùng nước nóng, Na_2CO_3 và HCl).

- **Ý nghĩa thực tiễn**:
  - Đề xuất được bộ thông số công nghệ nuôi cấy dịch thể tối ưu giúp thu nhận sinh khối và polysaccharide của hệ sợi nấm đạt năng suất cao.
  - Ứng dụng thành công sinh khối sợi nấm Vân chi kết hợp với dịch chiết nấm Bào ngư (*Pleurotus ostreatus*) để sản xuất đồ uống bổ sung lên men lactic đạt giá trị cảm quan xuất sắc (điểm Hedonic > 7,8/9), đảm bảo an toàn vi sinh và duy trì mật độ lợi khuẩn sinh học đạt ngưỡng rất cao (> 10^{11} CFU/mL).

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết quả của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

- Luận án là một công trình nghiên cứu khoa học độc lập, nghiêm túc và công phu do NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng tự thực hiện dưới sự hướng dẫn chuyên môn trực tiếp của PGS.TS. Đặng Minh Nhật và TS. Nguyễn Hoàng Dũng.
- **Tính mới & không trùng lặp**: Mặc dù các nghiên cứu về nấm *C. militaris*, *T. versicolor* hay *P. ostreatus* đã được công bố rải rác trên thế giới, nhưng việc nghiên cứu tích hợp song song quy trình nuôi cấy dịch thể tối ưu hóa RSM cho hai loài nấm dược liệu, đánh giá so sánh quy trình chiết xuất tuần tự bằng 3 hệ dung môi với các phân đoạn phân tử có vi cấu trúc và hoạt tính sinh học đa dạng, cùng việc phát triển sản phẩm đồ uống lên men lactic kết hợp sinh khối sợi nấm Vân chi với dịch chiết nấm Bào ngư là một hướng tiếp cận hoàn toàn mới, chưa từng được công bố ở bất kỳ luận văn, luận án hay công trình khoa học nào trước đây.
- **Tính trung thực của dữ liệu**: Toàn bộ hệ thống số liệu thực nghiệm (quang phổ hấp thụ, mật độ tế bào vi sinh, bảng phân tích ANOVA, mô hình bề mặt đáp ứng 3D, ảnh chụp SEM, bảng điểm cảm quan) đều là dữ liệu gốc, khách quan, thu được từ quá trình đo đạc thực tế tại phòng thí nghiệm của Trường Đại học Bách khoa – ĐH Đà Nẵng và Đại học Sư phạm - ĐH Đà Nẵng. Trích dẫn tài liệu được thực hiện nghiêm túc, minh bạch.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

- **Tên đề tài**: *"Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyceps militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung".*
- **Chuyên ngành**: Công nghệ thực phẩm | **Mã số**: 9540101.
- **Mức độ phù hợp**: Đề tài hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm cả về đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu:
- *Đối tượng*: Nấm thực phẩm và nấm dược liệu (*C. militaris*, *T. versicolor*).
- *Công nghệ & Phương pháp*: Kỹ thuật nuôi cấy dịch thể thu sinh khối; Quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa bằng RSM; Kỹ thuật trích tách và phân lập các hợp chất sinh học thực phẩm; Đánh giá hoạt tính sinh học thực phẩm *in vitro*; Kỹ thuật chế biến và lên men thực phẩm bổ sung; Phân tích cảm quan thực phẩm theo chuẩn mực.
- *Đầu ra*: Quy trình công nghệ chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung lên men lactic giàu giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

- Luận án sử dụng **223 tài liệu tham khảo** phong phú, bao gồm các bài báo khoa học chuyên ngành uy tín trong và ngoài nước, sách chuyên khảo và các công trình quốc tế được xuất bản, được cập nhật đến năm 2025.
- Trích dẫn được trình bày rõ ràng, tuân thủ đúng quy định về trích dẫn khoa học và quyền sở hữu trí tuệ.
- Qua quá trình rà soát và tiếp thu góp ý của các phản biện độc lập, NCS đã rà soát nghiêm túc toàn bộ luận án, sửa chữa các lỗi font chữ, ngắt dòng, bổ sung trích dẫn cho các hình vẽ (Hình 1.3), loại bỏ tài liệu trùng lặp dư thừa (tài liệu [64]) và chú thích rõ ràng các hình ảnh tự chụp trong phòng thí nghiệm (Hình 1.1, 1.2).

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Hệ thống công bố của NCS gồm **04 bài báo khoa học** (trong đó có 02 bài báo quốc tế uy tín thuộc danh mục WoS/Scopus, 01 bài báo hội nghị quốc tế, 01 bài báo tạp chí trong nước) và **01 sách chuyên khảo**. Sự tương thích được thể hiện cụ thể như sau:

STT	Nội dung nghiên cứu chính trong Luận án	Công trình khoa học đối chiếu	Đánh giá mức độ tương thích và nhất quán

1	**Tổng quan tài liệu:** Cơ sở lý thuyết về polysaccharide (PS) hệ sợi nấm, công nghệ lên men chìm (SmF), hoạt tính prebiotic và kháng oxy hóa.	**Sách chuyên khảo (2026):** *"Polysaccharide hệ sợi nấm: sinh tổng hợp, đặc tính và ứng dụng"* (NXB Đại học Huế, viết các chương 1, 3, 5).	**Trùng khớp hoàn toàn.** Sách chuyên khảo đã hệ thống hóa sâu sắc lý thuyết từ Chương 1 của luận án, nâng cao tính học thuật và cập nhật các nghiên cứu quốc tế mới nhất về vách tế bào nấm.
2	**Chương 3 - Mục 3.2:** Tách chiết tuần tự (nước nóng HWE, kiềm AE, acid AEc) và đánh giá hoạt tính prebiotic *in vitro* của PS từ sợi nấm *C. militaris*.	**Bài báo số 3 (JABB, 2026):** *"Prebiotic Properties of Polysaccharide Extracts from C. militaris Mycelium..."*. **Bài báo số 4 (Tạp chí Công Thương, 2023):** *"Prebiotic properties of polysaccharide isolated from C. militaris..."*.	**Trùng khớp hoàn toàn.** - Bài báo số 4 (2023) công bố kết quả sơ bộ về hoạt tính kích thích lợi khuẩn *L. plantarum* của PS nấm đông trùng hạ thảo. - Bài báo quốc tế số 3 (2026) công bố chi tiết toàn bộ số liệu về chỉ số prebiotic (PI), khả năng kháng tiêu hóa sinh học, và nồng độ SCFAs sinh ra từ 3 phân đoạn PS khác nhau của *C. militaris*.

3	**Chương 3 - Mục 3.3.1:** Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn lactic (*L. plantarum*) có khả năng lên men dịch chiết nấm.	**Bài báo số 1 (SPISE, 2024):** *"Developing a health-suppoting fermented lactic beverage from oyster mushrooms (Pleurotus ostreatus)"*.	**Nhất quán về nền tảng công nghệ.** Bài báo công bố kết quả phân lập các chủng lợi khuẩn (như NS3, NS6 tương thích với chủng *L. plantarum* dùng trong luận án) và quy trình lên men dịch chiết nấm Bào ngư tím – vốn là cơ chất nền của sản phẩm ứng dụng trong luận án.
4	**Chương 3 - Mục 3.3.2 & 3.3.3:** Tối ưu hóa chế biến nước uống nấm lên men bổ sung sinh khối sợi nấm Vân chi (*T. versicolor*); Đánh giá cảm quan và an toàn vệ sinh.	**Bài báo số 2 (Mycobiology, 2025 - SCIE Q2):** *"Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating T. versicolor Mycelium and Pleurotus ostreatus Extract..."*.	**Trùng khớp hoàn toàn.** Toàn bộ số liệu về công thức tối ưu hóa (bổ sung 0,6% sinh khối sợi nấm Vân chi, lên men 24h bằng *L. plantarum WCFS1*), kết quả HPLC định lượng SCFAs, chỉ số cảm quan Hedonic 9 điểm, và kết quả kiểm nghiệm an toàn vi sinh/kim loại nặng đều đồng nhất tuyệt đối.

Trong cả 4 bài báo khoa học đã công bố, NCS Nguyễn Thị Bích Hằng đều đứng tên ở vị trí tác giả đầu tiên (First Author) và đồng thời là tác giả liên hệ (Corresponding Author) ở bài báo số 4.

Trong cuốn sách chuyên khảo xuất bản năm 2026, NCS là đồng tác giả và trực tiếp biên soạn các chương cốt lõi liên quan đến đề tài.

=> Điều này khẳng định NCS không đóng vai trò thụ động hay chỉ là thành viên hỗ trợ, mà chính là người trực tiếp xây dựng ý tưởng, thực hiện các thí nghiệm lên men dịch thể phức tạp, xử lý dữ liệu thống kê trên Minitab và viết bản thảo khoa học.

- Tạp chí Mycobiology (Taylor & Francis): Đây là tạp chí quốc tế uy tín cao thuộc danh mục WoS/Scopus (SCIE, Q2) trong lĩnh vực nấm học và công nghệ sinh học. Việc công bố kết quả tại đây chứng tỏ quy trình tối ưu hóa SmF và công thức nước lên men bổ sung sợi nấm Vân chi của NCS đã vượt qua những tiêu chuẩn phản biện chuyên môn cực kỳ khắt khe của cộng đồng khoa học quốc tế.
- Tạp chí Journal of Applied Biology & Biotechnology (JABB): Tạp chí thuộc danh mục Scopus uy tín, phản ánh rất tốt các nghiên cứu ứng dụng sinh học thực nghiệm.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

- **Tính hiện đại**: NCS đã tiếp cận và làm chủ hệ thống các phương pháp nghiên cứu hiện đại trong lĩnh vực Công nghệ Thực phẩm và Công nghệ Sinh học:
  - Phương pháp quy hoạch thực nghiệm bề mặt đáp ứng (RSM) kết hợp thiết kế Box-Behnken (BBD) để tối ưu hóa đa mục tiêu quy trình lên men nuôi cấy dịch thể.
  - Kỹ thuật trích xuất tuần tự phân đoạn polysaccharide theo thang dung môi gia tăng tính kiềm/axit (nước nóng 100°C, Na_2CO_3 1 M và HCl 0,1 M).
  - Phân tích hình thái vi cấu trúc bề mặt vật liệu sinh học bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).
  - Phân tích hoạt tính kháng oxy hóa đa dạng thông qua các assay quang phổ DPPH
  - Đánh giá hoạt tính prebiotic *in vitro* của các chủng vi khuẩn lactic chuẩn (*L. plantarum*, *L. acidophilus*).
  - Đánh giá chất lượng cảm quan thực phẩm bằng phép thử Hedonic 9 điểm.
- **Tính hợp lý & Độ tin cậy**:
  - Tiến trình nghiên cứu được thiết kế theo logic chặt chẽ: Khảo sát đơn yếu tố (OFAT) trước để xác định khoảng biến, sau đó quy hoạch RSM/BBD để tối ưu hóa; Trích xuất phân đoạn -> Đánh giá vi cấu trúc & hoạt tính sinh học -> Ứng dụng chế biến thực phẩm.
  - Mọi thực nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần; số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn ($M \pm SD$).
  - Xử lý thống kê tin cậy bằng phần mềm Minitab và SPSS, phân tích biến động ANOVA 1 và 2 nhân tố, kiểm định so sánh trung bình Tukey HSD ($P < 0,05$).

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

1. **Xác lập mô hình tối ưu hóa nuôi cấy dịch thể**: Đã xác định được bộ thông số nuôi cấy dịch thể tối ưu theo mô hình Box-Behnken cho *C. militaris* (pH 5,05; Glucose 40 g/L; Cao nấm men 5,07 g/L, thu sinh khối cực đại 8,90 ± 0,25 g/L, hàm lượng PS = 5,28%) và *T. versicolor* (pH 5,545; Glucose 20,65 g/L; Cao nấm men 2,025 g/L, thu sinh khối 3,59 ± 0,12 g/L và hàm lượng PS đạt 8.23 %).

2. **Khám phá đặc tính phân đoạn Polysaccharide chiết xuất tuần tự**: Chứng minh việc trích xuất tuần tự bằng 3 hệ dung môi thu được các phân đoạn PS có hình thái bề mặt (SEM) và hoạt tính sinh học khác biệt: Phân đoạn chiết nước nóng (WPS) có vi cấu trúc xốp, nhiều khe nứt, thể hiện khả năng prebiotic kích thích tăng trưởng lợi khuẩn lactic cao nhất; trong khi các phân đoạn chiết kiềm (SPS) và acid (APS) thể hiện năng lực kháng oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP) vượt trội hơn.

3. Làm sáng tỏ cơ chế sinh học prebiotic in vitro: Khẳng định khả năng duy trì sự sống và sinh trưởng của vi khuẩn lactic (*L. plantarum, L. acidophilus*) khi có sự hiện diện của các phân đoạn PS nấm, qua đó mở ra tiềm năng thay thế các nguồn prebiotic truyền thống.

4. **Xây dựng quy trình công nghệ chế biến thực phẩm bổ sung**: Đã phát triển thành công quy trình công nghệ sản xuất nước uống bổ sung lên men lactic từ dịch chiết nấm Bào ngư kết hợp 0,6% sợi nấm Vân chi, sản phẩm đạt an toàn vi sinh, vị chua ngọt hài hòa (điểm cảm quan > 7,8/9), giàu hoạt tính chống oxy hóa và duy trì mật độ lợi khuẩn sinh học cao (> 10^{11} CFU/mL).

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

Mặc dù luận án được thực hiện rất công phu và có chất lượng tốt, NCS cần lưu ý một số hạn chế để tiếp tục phát triển nghiên cứu:

1. **Về phân tích cấu trúc hóa học polysaccharide**: Luận án mới dừng lại ở việc định lượng polysaccharide tổng số bằng phương pháp Phenol-Sulfuric và quan sát hình thái vi mô bằng SEM. Nếu bổ sung thêm phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), sắc ký gel (GPC/SEC) để xác định khối lượng phân tử (M_w) và sắc ký khí (GC-MS) xác định thành phần monosaccharide thì giá trị khoa học sẽ sâu sắc và hoàn thiện hơn.

2. **Về mô hình đánh giá prebiotic**: Đánh giá prebiotic trong luận án mới tiến hành trên mô hình *in vitro* với 2 dòng vi khuẩn lactic đơn thuần (*L. plantarum*, *L. acidophilus*). NCS chưa khảo sát trên hệ vi sinh vật đường ruột đa dạng (*gut microbiota*) hoặc mô hình *in vivo* trên động vật thử nghiệm để đánh giá chính xác sinh khả dụng và sự biến đổi của hợp chất qua đường tiêu hóa (dạ dày và ruột non).

3. **Về mô hình Quy hoạch thực nghiệm (RSM/BBD)**: Số lượng điểm tâm $n_c = 3$ trong thiết kế Box-Behnken 3 yếu tố hơi mỏng ($DF_{\text{Pure Error}} = 2$), làm kiểm định Lack-of-Fit nằm sát ngưỡng ý nghĩa ($p = 0,08$). NCS đã loại bỏ các tương tác kép (X_iX_j) ra khỏi phương

trình hồi quy, cần giải thích sâu hơn ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đối với quá trình sinh tổng hợp PS.

4. **Về hình thức trình bày**: Một số trang còn lỗi rớt chữ khi ngắt bảng, lặp tiêu đề cột (đã tiếp thu rà soát trong bản giải trình). Cần chú ý thống nhất cách sử dụng dấu phẩy (,) hay dấu chấm (.) trong các bảng số liệu ANOVA chuẩn tiếng Việt.

- Trong các công trình đã công bố, nhóm tác giả đều công bố phân tích dữ liệu bằng phần mềm R; tuy nhiên, trong luận án, tác giả mô tả phân tích dữ liệu bằng phần mềm SPSS và Minitab - có thể do đề cương nghiên cứu chưa chỉnh sửa. Tác giả nên hiệu chỉnh cho đồng nhất.

- Trong danh mục tài liệu tham khảo, nhiều tài liệu dạng bài báo còn có kèm theo dòng trích dẫn vào năm (Cited in …) - tác giả cần điều chỉnh lại danh mục tài liệu tham khảo cho đúng. Nên phân chia nhóm danh mục tài liệu tiếng Việt và tài liệu tiếng Anh.

- Trong bố trí thực nghiệm tối ưu hóa, tác giả có thể nên biện luận thêm về việc không có sự tương tác giữa các yếu tố thực nghiệm (pH, glucose, cao nấm mem) đến sinh khối và hàm lượng PS -> vì mục tiêu của thí nghiệm tối ưu là tìm ra mối tương tác này. Việc không có tương tác này có thể do tâm thực nghiệm được bố trí gần với điểm tối ưu làm việc ảnh hưởng đơn lẽ và ảnh hưởng tuyến tính chi phối tới 96 - 98% sự biến thiên làm cho hiệu ứng tương tác trở nên nhỏ hơn sai số ngẫu nhiên của mô hình.

- Trang 78 tác giả có viết "yếu tố X1 (pH) là nhân tố có tác động phân giải tuyết tính mạnh mẽ nhất => lỗi thuật ngữ, tác giải nên dùng là tác động tuyến tính hoặc hiệu ứng tuyến tính thì phù hợp hơn.

- Ở đoạn 1, tác giả viết: "...các tương tác hai chiều giữa các yếu tố độc lập không thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và đã được chủ động loại bỏ..." (khẳng định mô hình không còn số hạng tương tác). Nhưng sang đoạn 2, tác giả lại viết: "Giá trị R^2 0,96 chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X1, X2, X3) và sự tương tác của chúng giải thích được hơn 96%..." => Việc dùng câu "và sự tương tác của chúng" ở đoạn 2 gây mâu thuẫn với câu ở đoạn 1. => nên sửa thành "Giá trị $R^2 = 0,96$ chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X1, X2, X3) ở dạng tuyến tính và bậc hai giải thích được hơn 96% sự biến thiên..."

- Có sự nhầm lẫn trong nồng độ cao nấm men tối ưu của nấm Trametes versicolor trong kết luận (2,025 g/L) và trong bài viết (mục 3.1.2.3 là 2,0354 g/L) => lỗi đánh máy tác giả cần điều chỉnh.

- Việt hóa toàn bộ số liệu trên biểu đồ.

- Biểu đồ dạng trang đa hình có ký hiệu và có chú giải thì không cần tên của biểu đồ con, cụ thể hình 3.1, 3.3, 3.5.

- Tất cả các hình ảnh cần thiết phải được trích dẫn/dẫn chứng trong bài viết.

- Trong kết quả khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết PS từ hệ sợi nấm:

  + Tác giả đưa ra được nhận định rất hay về ảnh hưởng của cấu trúc không gian của A-PS đến khả năng trung hòa gốc tự do và mở rộng được vai trò PS hoạt động như một chất điều hòa sinh học gián tiếp. Tuy nhiên,
  + Kết quả trong bảng 3.7 và 3.8 cần kiểm tra lại đánh chữ cái theo ý nghĩa thống kê, tác giả ghi: "Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$) => tuy nhiên các chữ cái trong bảng này tác giả đang đánh theo hàng mới đúng.
  + Tác giả cần tính toán lại IC50 trong bảng 3.7: IC50 của A-PSC phải nhỏn hơn của W-PSC thì phù hợp với dữ liệu được cung cấp.
  + Bảng 3.8 tác giả nên tính IC50 theo Log-Linear thì phù hợp hơn.
  + Tác giả có so sánh: "So với một số các nghiên cứu khác về hoạt tính kháng oxi hóa của PS cho thấy khá có sự tương đồng, nghiên cứu của Petraglia (2023) hoạt tính kháng oxi hóa của PS tách chiết từ nấm *Pleurotus eryngii* là 1,15 ± 0,09 mg/mL [155]..." => Giá trị IC50 của *Pleurotus eryngii* là 1,15 mg/mL = 1150 µg/mL. => Nhận định "khá tương đồng" chỉ đúng đối với nấm *T. versicolor* (1070,6 - 1279,1 µg/mL ~ 1150 µg/mL). Nếu tính chung cho cả *C. militaris* (> 2400 µg/mL) mà kết luận "tương đồng" với mức 1150 µg/mL là thiếu chính xác về mặt định lượng.
  + Tác giả nhận định: "IC50 của các chiết xuất PS của 2 loại nấm này đều cao hơn so với IC50 của acid ascorbic..." => Cách diễn đạt "IC50 cao hơn" dễ làm người đọc phổ thông hiểu nhầm là "tốt hơn". Tác giả nên viết rõ ràng thành: "Giá trị IC50 của các chiết xuất PS đều cao hơn nhiều so với acid ascorbic (83,89 µg/mL), điều này chỉ ra rằng khả năng trung hóa gốc tự do trực tiếp của PS yếu hơn so với chất chuẩn."

- Trong kết quả 3.2.4.1. Khả năng kích thích sự sinh trưởng probiotic hình 3.13 và 3.14 tác giả cần kiểm tra lại cỡ mẫu là n = 3 hay n = 15 => Theo phương pháp nghiên cứu trang 57 "Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 ống" thì n = 3.

Trong tiểu mục 3.2.4 Hoạt tính prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm: Trình tự bố trí các thí nghiệm được thiết kế theo một chuỗi logic khoa học chặt chẽ, bám sát định nghĩa và 3 tiêu chí cốt lõi của một prebiotic:

- Bước 1 - Khảo sát khả năng đồng hóa cơ chất (3.2.4.1): Kiểm tra xem các chủng probiotic mục tiêu (Lactiplantibacillus, Bifidobacterium) có thể sử dụng các phân đoạn polysaccharide (PS) sợi nấm làm nguồn carbon duy nhất để sinh trưởng hay không.

- Bước 2 - Đánh giá tính chọn lọc qua Chỉ số Prebiotic - PI (3.2.4.2): Định lượng mức độ kích thích chọn lọc đối với lợi khuẩn so với hại khuẩn (E. coli) thông qua chỉ số PI. Điều này chứng minh tác động hướng đích của prebiotic.
- Bước 3 - Xác định sản phẩm chuyển hóa sinh học SCFAs (3.2.4.3): Định lượng các axit béo chuỗi ngắn (axit acetic, propionic, butyric) được giải phóng trong quá trình lên men bằng HPLC. Bước này làm sáng tỏ cơ chế sinh hóa tạo ra lợi ích sinh lý đối với tế bào biểu mô ruột.
- Bước 4 - Xác nhận tính kháng tiêu hóa (3.2.4.4): Đánh giá mức độ bền vững của PS khi đối mặt với enzyme α-amylase. Tiêu chí này bắt buộc để đảm bảo PS có thể đi qua dạ dày, ruột non mà không bị phân giải trước khi tiếp cận đại tràng.
- Bước 5 - Đánh giá hiệu quả bảo vệ sinh học chống hại khuẩn (3.2.4.5): Chứng minh dịch lên men của lợi khuẩn khi có bổ sung PS nấm có khả năng ức chế mạnh mẽ các tác nhân gây bệnh đường ruột (E. coli, S. aureus)

Tuy nhiên, trong bài viết, tác giả nhận định:

- Trong mục 3.2.4.1, tác giả giải thích lợi khuẩn sinh trưởng tốt nhất trên phân đoạn acid (A-PSC, A-PST) là vì: "*Trong quá trình tách chiết acid đã phá vỡ cấu trúc của PS thành các phân tử nhỏ hơn (oligosaccharide, đường đơn) nên các chủng có thể dễ dàng sử dụng.*"
- Nhưng đến mục 3.2.4.4 (Kháng tiêu hóa), tác giả ghi nhận phân đoạn A-PS bị phân giải bởi enzyme α-amylase nhiều nhất (khả năng kháng tiêu hóa kém nhất), và giải thích: "*Do quá trình thủy phân acid làm thay đổi cấu trúc PS, PS bị phân cắt thành các đoạn ngắn khiến nó dễ bị enzyme amylase tác động hơn*".
- => Tuy nhiên, enzyme α-amylase chỉ có hoạt tính đặc hiệu đối với liên kết α-(1→4)-glycoside (như trong tinh bột hay glycogen). Bản chất polysaccharide của thành tế bào nấm dược liệu chủ yếu được cấu tạo từ β-glucan (liên kết β-(1 → 3) và β-(1 → 6)). Việc xử lý bằng axit HCl (trong quá trình chiết axit phân đoạn cuối) dù có cắt ngắn mạch polymer cũng không thể làm biến đổi cấu hình lập thể từ liên kết β sang liên kết α để khiến nó nhạy cảm hơn với α-amylase.

Mô hình đánh giá tính kháng tiêu hóa còn tương đối đơn điệu: Tác giả chỉ sử dụng duy nhất một phép thử kháng tiêu hóa với enzyme α-amylase nước bọt. => Để một hợp chất được xác nhận có khả năng đi xuống đại tràng nguyên vẹn, nó phải vượt qua rào cản dịch vị dạ dày cực kỳ khắc nghiệt (pH axit 1,5 - 2,0 kết hợp enzyme pepsin) và dịch ruột non (chứa hỗn hợp pancreatin, các protease, dịch mật). Việc chỉ thử nghiệm độc lập với α-amylase là chưa đủ để khẳng định tính bền vững "kháng tiêu hóa" thực tế của polysaccharide trong cơ thể sống. Do vậy, nếu tiếp tục nghiên cứu, tác giả có thể lựa chọn mô hình theo quy trình tiêu hóa mô phỏng tiêu chuẩn quốc tế (như mô hình INFOGEST). Thử nghiệm cần được thiết lập liên hoàn qua 3 giai đoạn: miệng (α-amylase) → dạ dày (pH 2,0 + pepsin) → ruột non (pancreatin + muối mật). Đo lường lượng đường khử tự do

giải phóng sau từng giai đoạn để khẳng định chính xác tỷ lệ PS nguyên vẹn đi xuống ruột kết.

Đối với mục 3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung trong luận án, tác giả thiết kế rất tốt chặt chẽ theo quy trình phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng tiêu chuẩn:

1. Kiểm tra an toàn nguyên liệu đầu vào (3.3.1): Đảm bảo bột sợi nấm Vân chi đạt các tiêu chuẩn độc học và vi sinh trước khi ứng dụng chế biến.
2. Khảo sát động học lên men và xây dựng công thức phối chế tối ưu (3.3.2): Đánh giá tác động đa chiều của tỷ lệ bổ sung sợi nấm (0% - 1.0%) đến sự biến thiên của pH, axit tổng số (TAN), hoạt tính chống oxy hóa, sinh trưởng của lợi khuẩn, năng lực kháng khuẩn và chất lượng cảm quan của sản phẩm. => Nâng cao vượt trội hoạt tính sinh học của đồ uống khi bổ sung PS.
3. Xây dựng quy trình công nghệ chế biến hoàn chỉnh (3.3.3): Thiết lập sơ đồ quy trình và mô tả các thông số kỹ thuật chính cho việc sản xuất thực tế.

Tuy nhiên, có một số điểm tác giả cần lưu ý cho việc phát triển các nghiên cứu tiếp theo:

- Số liệu thực nghiệm ở Bảng 3.12 chỉ ra rằng hoạt tính kháng oxy hóa giảm dần theo thời gian lên men (ví dụ công thức tối ưu CT4 giảm từ 46.49% ban đầu xuống còn 44.43% sau 24 giờ lên men). NCS giải thích là do vi sinh vật phân hủy các hợp chất hữu cơ có hoạt tính hoặc do sự bay hơi. Tuy nhiên, nếu hoạt chất kháng oxy hóa bị suy giảm ngay trong 24 giờ đầu của quá trình lên men thì khi lưu trữ sản phẩm ở quy mô thương mại (1 - 3 tháng), hoạt tính này chắc chắn sẽ tiếp tục sụt giảm nghiêm trọng. Luận án hoàn toàn thiếu vắng các nghiên cứu về động học suy giảm hoạt tính sinh học trong quá trình bảo quản và chưa đề xuất các giải pháp bảo vệ.
- Trong quy trình chế biến proposed ở mục 3.3.3, dịch chiết nấm bổ sung bột sợi nấm phải trải qua giai đoạn hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút trước khi lên men, và sản phẩm cuối sau khi đóng chai tiếp tục chịu thanh trùng ở 80°C trong 15 phút. Nhưng, polysaccharide mạch dài có thể tương đối bền nhiệt, nhưng các hoạt chất sinh học cực kỳ quý và nhạy cảm với nhiệt độ có trong sợi nấm Vân chi (như hợp chất phenol, flavonoid, các axit amin tự do hay các vitamin nhóm B) chắc chắn sẽ bị phân hủy hàng loạt dưới tác động của nhiệt độ tiệt trùng 121°C trong thời gian dài. Luận án chưa tiến hành định lượng mức độ hao hụt của các hoạt chất nhạy nhiệt này trước và sau quá trình xử lý nhiệt nhằm chứng minh hiệu quả thực tế của quy trình công nghệ đề xuất.
- Tác giả tuyên bố rằng quá trình thanh trùng ở 80°C giúp kéo dài thời gian bảo quản của sản phẩm cuối cùng ở điều kiện thường. Tuy nhiên, trong toàn bộ luận án và phụ lục, không có bất kỳ dữ liệu thực nghiệm nào chứng minh thời hạn bảo quản

của sản phẩm (như theo dõi sự biến đổi mật độ lợi khuẩn sống, pH, TAN, sự biến đổi màu sắc, mùi vị và khả năng tái nhiễm vi sinh vật gây hại sau 1 tháng, 3 tháng hoặc 6 tháng bảo quản). Tôi cho rằng đây là một thiếu sót lớn đối với một quy trình công nghệ thực phẩm hoàn chỉnh, hướng tới thương mại hóa.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

- NCS đã công bố 04 bài báo khoa học chuyên ngành, 01 sách chuyên khảo và 04 đề tài NCKH các cấp đã nghiệm thu.
- **Chất lượng công bố**: Trong số 04 bài báo, có 02 bài báo được xuất bản trên các tạp chí quốc tế uy tín thuộc danh mục WoS/Scopus Q2/Q3 (*Mycobiology* thuộc Taylor & Francis và *Journal of Applied Biology & Biotechnology*), 01 bài báo Hội thảo quốc tế SPISE 2024 và 01 bài báo Tạp chí Công Thương.
- **Đóng góp của tác giả**: NCS Nguyễn Thị Bích Hằng là Tác giả thứ nhất (First Author) của toàn bộ 04 bài báo khoa học. Điều này khẳng định vai trò chủ đạo, tính chủ động và năng lực tư duy khoa học độc lập của NCS trong suốt quá trình thực hiện đề tài.
- **Mức độ vượt tiêu chuẩn**: Số lượng và chất lượng các công trình công bố của NCS vượt xa các yêu cầu tối thiểu đối với một luận án tiến sĩ theo Thông tư 18/2021/TT-BGDĐT.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn tóm tắt luận án

- Cuốn tóm tắt luận án dày 24 trang được trình bày ngắn gọn, khoa học, đúng quy định của Bộ Giáo dục & Đào tạo.
- **Tính trung thực & phản ánh đầy đủ**: Cuốn tóm tắt phản ánh trung thành và chính xác tất cả các nội dung cốt lõi của toàn văn luận án, từ Phần Mở đầu, Mục tiêu, Phương pháp nghiên cứu, các kết quả thực nghiệm nổi bật (bảng biểu RSM, đồ thị prebiotic, thông số quy trình đồ uống) đến Kết luận và Kiến nghị.
- **Tính thống nhất số liệu**: Mọi số liệu thực nghiệm, giá trị tối ưu hóa RSM, mật độ vi sinh và chỉ số cảm quan trong cuốn tóm tắt đều hoàn toàn nhất quán với toàn văn luận án và phần phụ lục.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

- Hồ sơ giải trình của NCS Nguyễn Thị Bích Hằng gồm Bản giải trình tiếp thu 7 trang, có đầy đủ chữ ký xác nhận của tập thể cán bộ hướng dẫn (PGS.TS. Đặng Minh Nhật, TS. Nguyễn Hoàng Dũng) và Trưởng đơn vị chuyên môn (TS. Mạc Thị Hà Thanh) ký ngày 30/05/2026.
- **Đánh giá chất lượng giải trình**:

- NCS thể hiện thái độ cầu thị, nghiêm túc và tinh thần trách nhiệm khoa học cao.
- NCS đã tiếp thu và chỉnh sửa chu đáo 100% các ý kiến đóng góp từ cả Phản biện độc lập 1 (5 nội dung) và Phản biện độc lập 2 (10 nội dung).
- *Về hình thức & thuật ngữ*: Đã rà soát sửa chữa toàn bộ lỗi chính tả, ngắt dòng, danh pháp sinh học (*C. militaris*, *T. versicolor*, *L. plantarum*), thuật ngữ "kháng oxy hóa", cách ghi đơn vị và rà soát loại bỏ tài liệu tham khảo dư.
- *Về nội dung khoa học*: Đã bổ sung thảo luận sâu về vi cấu trúc SEM với hoạt tính prebiotic; thêm tiểu mục làm rõ giới hạn của mô hình *in vitro* (trang 108); làm rõ cơ sở công nghệ và sinh học của việc lựa chọn sinh khối *T. versicolor* cho sản phẩm đồ uống lên men (trang 112); bổ sung cỡ mẫu và quy trình đánh giá cảm quan (trang 64); bổ sung bàn luận về giá trị R^2 và kiểm định Lack-of-Fit (trang 77).
- Kết luận về giải trình: Bản giải trình của NCS rất đầy đủ, mạch lạc, có luận cứ khoa học rõ ràng, ghi rõ vị trí trang chỉnh sửa trong luận án, hoàn toàn thỏa đáng và thuyết phục.

12. Kết luận

1. Khẳng định mức độ đáp ứng: Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật của NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng là một công trình nghiên cứu khoa học độc lập, nghiêm túc, công phu, có giá trị khoa học và giá trị thực tiễn cao. Phương pháp nghiên cứu hiện đại, số liệu thực nghiệm trung thực, đáng tin cậy. Nội dung các công trình công bố uy tín phản ánh trung thực kết quả của luận án. Luận án đáp ứng đầy đủ và vượt tất cả các yêu cầu đối với một Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật, chuyên ngành Công nghệ thực phẩm (Mã số: 9540101) theo Quy chế Đào tạo Tiến sĩ hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

2. Đề xuất: Kính đề nghị Hội đồng Đánh giá Luận án Tiến sĩ cấp Trường (Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng) cho phép NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng được bảo vệ luận án trước Hội đồng để nhận học vị Tiến sĩ Kỹ thuật.

Xác nhận cơ quan quản lý

Đà Nẵng, ngày 13 tháng 07 năm 2026

NGƯỜI PHẢN BIỆN

(Ký và ghi rõ họ tên)

PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu

Học hàm: Phó giáo sư **Học vị:** Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

Địa chỉ: 459 Tôn Đức Thắng, Hòa Khánh, Đà Nẵng

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng Tuyển sinh năm: 2020

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm Mã số: 9540101

Tên đề tài luận án: Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris, Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung

TỔNG QUAN HỒ SƠ VÀ CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật của NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng, chuyên ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng. Toàn văn luận án gồm 156 trang (chưa tính phần phụ lục), được trình bày bài bản theo chuẩn mực của một công trình nghiên cứu tiến sĩ kỹ thuật với bố cục bao gồm: Lời cam đoan, Lời cảm ơn, Mục lục, Danh mục các ký hiệu và chữ viết tắt, Danh mục bảng/hình, Phần Mở đầu, 3 Chương nội dung chính, Kết luận & Kiến nghị, Danh mục công trình công bố của tác giả và Danh mục Tài liệu tham khảo (223 tài liệu tham khảo trong và ngoài nước, cập nhật nhiều công trình quốc tế uy tín công bố đến năm 2025).

Bố cục nội dung chính của luận án:

- **Phần Mở đầu**: Đặt vấn đề, mục tiêu nghiên cứu (tổng quát & cụ thể), đối tượng & phạm vi nghiên cứu, phương pháp tiếp cận, ý nghĩa khoa học & thực tiễn của đề tài, bố cục của luận án.
- **Chương 1. Tổng quan tài liệu** (37 trang, từ trang 7 đến 43): Tổng quan hệ sinh học và đặc tính dược liệu của hai loài nấm *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*; cơ sở lý luận về polysaccharide (PS) nấm và hoạt tính prebiotic; phương pháp nuôi cấy

dịch thể (Submerged Fermentation - SmF); quy trình chiết xuất và phân lập polysaccharide; cơ chế chống oxy hóa và kích thích sinh trưởng lợi khuẩn.

- **Chương 2. Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu** (22 trang, từ trang 44 đến 65): Giới thiệu nguyên liệu nấm, các chủng vi sinh vật đối chứng và hóa chất; Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu; Quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa nuôi cấy dịch thể bằng Phương pháp Bề mặt Đáp ứng (RSM) với Thiết kế Box-Behnken (BBD); Quy trình trích xuất tuần tự PS (dùng nước nóng 100°C, Na_2CO_3 1 M và HCl 0,1 M); Phân tích hình thái vi cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM); Đánh giá khả năng kháng oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP); Thử nghiệm hoạt tính prebiotic *in vitro* kích thích vi khuẩn lactic (*L. plantarum*, *L. acidophilus*) và ức chế vi sinh vật gây hại; Quy trình công nghệ lên men lactic đồ uống từ dịch chiết nấm Bào ngư (*Pleurotus ostreatus*) kết hợp sinh khối sợi nấm Vân chi; Xử lý thống kê (Minitab, SPSS, ANOVA, Tukey HSD).
- **Chương 3. Kết quả và Thảo luận** (63 trang, từ trang 66 đến 128):
- *3.1. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy dịch thể thu nhận sinh khối và PS hệ sợi nấm C. militaris và T. versicolor.*
- *3.2. Chiết xuất tuần tự, đánh giá hình thái (SEM), hoạt tính kháng oxy hóa và hoạt tính prebiotic của các phân đoạn PS.*
- *3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung (nước uống lên men lactic từ chiết xuất nấm bào ngư kết hợp hệ sợi nấm Vân chi).*
- **Kết luận và Kiến nghị** (2 trang, từ trang 129 đến 130).

NỘI DUNG NHẬN XÉT CHI TIẾT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

- **Tính cấp thiết & thời sự**: Trong bối cảnh y - sinh - thực phẩm hiện đại, việc nghiên cứu, phát triển các sản phẩm thực phẩm bổ sung, thực phẩm chức năng có nguồn gốc tự nhiên nhằm tăng cường sức khỏe đường ruột và hệ miễn dịch đang là xu hướng chủ đạo trên thế giới. Nấm dược liệu *Cordyceps militaris* (Đông trùng hạ thảo) và *Trametes versicolor* (Nấm Vân chi) nổi tiếng giàu các hợp chất sinh học quý, đặc biệt là polysaccharide. Tuy nhiên, phương pháp thu hái hoặc nuôi trồng quả thể nấm truyền thống tốn nhiều thời gian (60 – 90 ngày), phụ thuộc lớn vào thời tiết và chi phí sản xuất cao. Việc ứng dụng công nghệ nuôi cấy dịch thể (Submerged Fermentation - SmF) để thu sinh khối và chiết xuất polysaccharide hệ sợi nấm trong thời gian ngắn (7 – 14 ngày) với các điều kiện kiểm soát nghiêm ngặt là giải pháp công nghệ mang tính thời sự, giải quyết triệt để bài toán nguyên liệu và tối ưu chi phí.
- **Ý nghĩa khoa học**:
    - Cung cấp hệ thống dữ liệu thực nghiệm và xây dựng thành công các mô hình toán học RSM/BBD chính xác về ảnh hưởng của pH, nồng độ glucose và cao nấm

men đến khả năng sinh trưởng sinh khối và tổng hợp polysaccharide của hệ sợi nấm *C. militaris* và *T. versicolor*.

- Làm sáng tỏ mối tương quan giữa hình thái vi cấu trúc bề mặt (SEM), khả năng kháng oxy hóa và hiệu quả prebiotic kích thích tăng trưởng lợi khuẩn lactic (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*) của các phân đoạn polysaccharide thu nhận từ quy trình chiết xuất tuần tự (dùng nước nóng, Na_2CO_3 và HCl).

- **Ý nghĩa thực tiễn**:
  - Đề xuất được bộ thông số công nghệ nuôi cấy dịch thể tối ưu giúp thu nhận sinh khối và polysaccharide của hệ sợi nấm đạt năng suất cao.
  - Ứng dụng thành công sinh khối sợi nấm Vân chi kết hợp với dịch chiết nấm Bào ngư (*Pleurotus ostreatus*) để sản xuất đồ uống bổ sung lên men lactic đạt giá trị cảm quan xuất sắc (điểm Hedonic > 7,8/9), đảm bảo an toàn vi sinh và duy trì mật độ lợi khuẩn sinh học đạt ngưỡng rất cao (> 10^{11} CFU/mL).

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết quả của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

- Luận án là một công trình nghiên cứu khoa học độc lập, nghiêm túc và công phu do NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng tự thực hiện dưới sự hướng dẫn chuyên môn trực tiếp của PGS.TS. Đặng Minh Nhật và TS. Nguyễn Hoàng Dũng.
- **Tính mới & không trùng lặp**: Mặc dù các nghiên cứu về nấm *C. militaris*, *T. versicolor* hay *P. ostreatus* đã được công bố rải rác trên thế giới, nhưng việc nghiên cứu tích hợp song song quy trình nuôi cấy dịch thể tối ưu hóa RSM cho hai loài nấm dược liệu, đánh giá so sánh quy trình chiết xuất tuần tự bằng 3 hệ dung môi với các phân đoạn phân tử có vi cấu trúc và hoạt tính sinh học đa dạng, cùng việc phát triển sản phẩm đồ uống lên men lactic kết hợp sinh khối sợi nấm Vân chi với dịch chiết nấm Bào ngư là một hướng tiếp cận hoàn toàn mới, chưa từng được công bố ở bất kỳ luận văn, luận án hay công trình khoa học nào trước đây.
- **Tính trung thực của dữ liệu**: Toàn bộ hệ thống số liệu thực nghiệm (quang phổ hấp thụ, mật độ tế bào vi sinh, bảng phân tích ANOVA, mô hình bề mặt đáp ứng 3D, ảnh chụp SEM, bảng điểm cảm quan) đều là dữ liệu gốc, khách quan, thu được từ quá trình đo đạc thực tế tại phòng thí nghiệm của Trường Đại học Bách khoa – ĐH Đà Nẵng và Đại học Sư phạm - ĐH Đà Nẵng. Trích dẫn tài liệu được thực hiện nghiêm túc, minh bạch.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

- **Tên đề tài**: *"Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyceps militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung".*
- **Chuyên ngành**: Công nghệ thực phẩm | **Mã số**: 9540101.
- **Mức độ phù hợp**: Đề tài hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm cả về đối tượng, nội dung và phương pháp nghiên cứu:
- *Đối tượng*: Nấm thực phẩm và nấm dược liệu (*C. militaris*, *T. versicolor*).
- *Công nghệ & Phương pháp*: Kỹ thuật nuôi cấy dịch thể thu sinh khối; Quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa bằng RSM; Kỹ thuật trích tách và phân lập các hợp chất sinh học thực phẩm; Đánh giá hoạt tính sinh học thực phẩm *in vitro*; Kỹ thuật chế biến và lên men thực phẩm bổ sung; Phân tích cảm quan thực phẩm theo chuẩn mực.
- *Đầu ra*: Quy trình công nghệ chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung lên men lactic giàu giá trị dinh dưỡng và hoạt tính sinh học.

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

- Luận án sử dụng **223 tài liệu tham khảo** phong phú, bao gồm các bài báo khoa học chuyên ngành uy tín trong và ngoài nước, sách chuyên khảo và các công trình quốc tế được xuất bản, được cập nhật đến năm 2025.
- Trích dẫn được trình bày rõ ràng, tuân thủ đúng quy định về trích dẫn khoa học và quyền sở hữu trí tuệ.
- Qua quá trình rà soát và tiếp thu góp ý của các phản biện độc lập, NCS đã rà soát nghiêm túc toàn bộ luận án, sửa chữa các lỗi font chữ, ngắt dòng, bổ sung trích dẫn cho các hình vẽ (Hình 1.3), loại bỏ tài liệu trùng lặp dư thừa (tài liệu [64]) và chú thích rõ ràng các hình ảnh tự chụp trong phòng thí nghiệm (Hình 1.1, 1.2).

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Hệ thống công bố của NCS gồm **04 bài báo khoa học** (trong đó có 02 bài báo quốc tế uy tín thuộc danh mục WoS/Scopus, 01 bài báo hội nghị quốc tế, 01 bài báo tạp chí trong nước) và **01 sách chuyên khảo**. Sự tương thích được thể hiện cụ thể như sau:

STT	Nội dung nghiên cứu chính trong Luận án	Công trình khoa học đối chiếu	Đánh giá mức độ tương thích và nhất quán

1	**Tổng quan tài liệu:** Cơ sở lý thuyết về polysaccharide (PS) hệ sợi nấm, công nghệ lên men chìm (SmF), hoạt tính prebiotic và kháng oxy hóa.	**Sách chuyên khảo (2026):** *"Polysaccharide hệ sợi nấm: sinh tổng hợp, đặc tính và ứng dụng"* (NXB Đại học Huế, viết các chương 1, 3, 5).	**Trùng khớp hoàn toàn.** Sách chuyên khảo đã hệ thống hóa sâu sắc lý thuyết từ Chương 1 của luận án, nâng cao tính học thuật và cập nhật các nghiên cứu quốc tế mới nhất về vách tế bào nấm.
2	**Chương 3 - Mục 3.2:** Tách chiết tuần tự (nước nóng HWE, kiềm AE, acid AEc) và đánh giá hoạt tính prebiotic *in vitro* của PS từ sợi nấm *C. militaris*.	**Bài báo số 3 (JABB, 2026):** *"Prebiotic Properties of Polysaccharide Extracts from C. militaris Mycelium..."*. **Bài báo số 4 (Tạp chí Công Thương, 2023):** *"Prebiotic properties of polysaccharide isolated from C. militaris..."*.	**Trùng khớp hoàn toàn.** - Bài báo số 4 (2023) công bố kết quả sơ bộ về hoạt tính kích thích lợi khuẩn *L. plantarum* của PS nấm đông trùng hạ thảo. - Bài báo quốc tế số 3 (2026) công bố chi tiết toàn bộ số liệu về chỉ số prebiotic (PI), khả năng kháng tiêu hóa sinh học, và nồng độ SCFAs sinh ra từ 3 phân đoạn PS khác nhau của *C. militaris*.

3	**Chương 3 - Mục 3.3.1:** Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn lactic (*L. plantarum*) có khả năng lên men dịch chiết nấm.	**Bài báo số 1 (SPISE, 2024):** *"Developing a health-suppoting fermented lactic beverage from oyster mushrooms (Pleurotus ostreatus)"*.	**Nhất quán về nền tảng công nghệ.** Bài báo công bố kết quả phân lập các chủng lợi khuẩn (như NS3, NS6 tương thích với chủng *L. plantarum* dùng trong luận án) và quy trình lên men dịch chiết nấm Bào ngư tím – vốn là cơ chất nền của sản phẩm ứng dụng trong luận án.
4	**Chương 3 - Mục 3.3.2 & 3.3.3:** Tối ưu hóa chế biến nước uống nấm lên men bổ sung sinh khối sợi nấm Vân chi (*T. versicolor*); Đánh giá cảm quan và an toàn vệ sinh.	**Bài báo số 2 (Mycobiology, 2025 - SCIE Q2):** *"Optimization of Lactic Fermented Beverages: Integrating T. versicolor Mycelium and Pleurotus ostreatus Extract..."*.	**Trùng khớp hoàn toàn.** Toàn bộ số liệu về công thức tối ưu hóa (bổ sung 0,6% sinh khối sợi nấm Vân chi, lên men 24h bằng *L. plantarum WCFS1*), kết quả HPLC định lượng SCFAs, chỉ số cảm quan Hedonic 9 điểm, và kết quả kiểm nghiệm an toàn vi sinh/kim loại nặng đều đồng nhất tuyệt đối.

Trong cả 4 bài báo khoa học đã công bố, NCS Nguyễn Thị Bích Hằng đều đứng tên ở vị trí tác giả đầu tiên (First Author) và đồng thời là tác giả liên hệ (Corresponding Author) ở bài báo số 4.

Trong cuốn sách chuyên khảo xuất bản năm 2026, NCS là đồng tác giả và trực tiếp biên soạn các chương cốt lõi liên quan đến đề tài.

=> Điều này khẳng định NCS không đóng vai trò thụ động hay chỉ là thành viên hỗ trợ, mà chính là người trực tiếp xây dựng ý tưởng, thực hiện các thí nghiệm lên men dịch thể phức tạp, xử lý dữ liệu thống kê trên Minitab và viết bản thảo khoa học.

- Tạp chí Mycobiology (Taylor & Francis): Đây là tạp chí quốc tế uy tín cao thuộc danh mục WoS/Scopus (SCIE, Q2) trong lĩnh vực nấm học và công nghệ sinh học. Việc công bố kết quả tại đây chứng tỏ quy trình tối ưu hóa SmF và công thức nước lên men bổ sung sợi nấm Vân chi của NCS đã vượt qua những tiêu chuẩn phản biện chuyên môn cực kỳ khắt khe của cộng đồng khoa học quốc tế.
- Tạp chí Journal of Applied Biology & Biotechnology (JABB): Tạp chí thuộc danh mục Scopus uy tín, phản ánh rất tốt các nghiên cứu ứng dụng sinh học thực nghiệm.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

- **Tính hiện đại**: NCS đã tiếp cận và làm chủ hệ thống các phương pháp nghiên cứu hiện đại trong lĩnh vực Công nghệ Thực phẩm và Công nghệ Sinh học:
  - Phương pháp quy hoạch thực nghiệm bề mặt đáp ứng (RSM) kết hợp thiết kế Box-Behnken (BBD) để tối ưu hóa đa mục tiêu quy trình lên men nuôi cấy dịch thể.
  - Kỹ thuật trích xuất tuần tự phân đoạn polysaccharide theo thang dung môi gia tăng tính kiềm/axit (nước nóng 100°C, Na_2CO_3 1 M và HCl 0,1 M).
  - Phân tích hình thái vi cấu trúc bề mặt vật liệu sinh học bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).
  - Phân tích hoạt tính kháng oxy hóa đa dạng thông qua các assay quang phổ DPPH
  - Đánh giá hoạt tính prebiotic *in vitro* của các chủng vi khuẩn lactic chuẩn (*L. plantarum*, *L. acidophilus*).
  - Đánh giá chất lượng cảm quan thực phẩm bằng phép thử Hedonic 9 điểm.
- **Tính hợp lý & Độ tin cậy**:
  - Tiến trình nghiên cứu được thiết kế theo logic chặt chẽ: Khảo sát đơn yếu tố (OFAT) trước để xác định khoảng biến, sau đó quy hoạch RSM/BBD để tối ưu hóa; Trích xuất phân đoạn -> Đánh giá vi cấu trúc & hoạt tính sinh học -> Ứng dụng chế biến thực phẩm.
  - Mọi thực nghiệm đều được lặp lại ít nhất 3 lần; số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn ($M \pm SD$).
  - Xử lý thống kê tin cậy bằng phần mềm Minitab và SPSS, phân tích biến động ANOVA 1 và 2 nhân tố, kiểm định so sánh trung bình Tukey HSD ($P < 0,05$).

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

1. **Xác lập mô hình tối ưu hóa nuôi cấy dịch thể**: Đã xác định được bộ thông số nuôi cấy dịch thể tối ưu theo mô hình Box-Behnken cho *C. militaris* (pH 5,05; Glucose 40 g/L; Cao nấm men 5,07 g/L, thu sinh khối cực đại 8,90 ± 0,25 g/L, hàm lượng PS = 5,28%) và *T. versicolor* (pH 5,545; Glucose 20,65 g/L; Cao nấm men 2,025 g/L, thu sinh khối 3,59 ± 0,12 g/L và hàm lượng PS đạt 8.23 %).

2. **Khám phá đặc tính phân đoạn Polysaccharide chiết xuất tuần tự**: Chứng minh việc trích xuất tuần tự bằng 3 hệ dung môi thu được các phân đoạn PS có hình thái bề mặt (SEM) và hoạt tính sinh học khác biệt: Phân đoạn chiết nước nóng (WPS) có vi cấu trúc xốp, nhiều khe nứt, thể hiện khả năng prebiotic kích thích tăng trưởng lợi khuẩn lactic cao nhất; trong khi các phân đoạn chiết kiềm (SPS) và acid (APS) thể hiện năng lực kháng oxy hóa (DPPH, ABTS, FRAP) vượt trội hơn.

3. Làm sáng tỏ cơ chế sinh học prebiotic in vitro: Khẳng định khả năng duy trì sự sống và sinh trưởng của vi khuẩn lactic (*L. plantarum, L. acidophilus*) khi có sự hiện diện của các phân đoạn PS nấm, qua đó mở ra tiềm năng thay thế các nguồn prebiotic truyền thống.

4. **Xây dựng quy trình công nghệ chế biến thực phẩm bổ sung**: Đã phát triển thành công quy trình công nghệ sản xuất nước uống bổ sung lên men lactic từ dịch chiết nấm Bào ngư kết hợp 0,6% sợi nấm Vân chi, sản phẩm đạt an toàn vi sinh, vị chua ngọt hài hòa (điểm cảm quan > 7,8/9), giàu hoạt tính chống oxy hóa và duy trì mật độ lợi khuẩn sinh học cao (> 10^{11} CFU/mL).

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

Mặc dù luận án được thực hiện rất công phu và có chất lượng tốt, NCS cần lưu ý một số hạn chế để tiếp tục phát triển nghiên cứu:

1. **Về phân tích cấu trúc hóa học polysaccharide**: Luận án mới dừng lại ở việc định lượng polysaccharide tổng số bằng phương pháp Phenol-Sulfuric và quan sát hình thái vi mô bằng SEM. Nếu bổ sung thêm phân tích phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), sắc ký gel (GPC/SEC) để xác định khối lượng phân tử (M_w) và sắc ký khí (GC-MS) xác định thành phần monosaccharide thì giá trị khoa học sẽ sâu sắc và hoàn thiện hơn.

2. **Về mô hình đánh giá prebiotic**: Đánh giá prebiotic trong luận án mới tiến hành trên mô hình *in vitro* với 2 dòng vi khuẩn lactic đơn thuần (*L. plantarum*, *L. acidophilus*). NCS chưa khảo sát trên hệ vi sinh vật đường ruột đa dạng (*gut microbiota*) hoặc mô hình *in vivo* trên động vật thử nghiệm để đánh giá chính xác sinh khả dụng và sự biến đổi của hợp chất qua đường tiêu hóa (dạ dày và ruột non).

3. **Về mô hình Quy hoạch thực nghiệm (RSM/BBD)**: Số lượng điểm tâm $n_c = 3$ trong thiết kế Box-Behnken 3 yếu tố hơi mỏng ($DF_{\text{Pure Error}} = 2$), làm kiểm định Lack-of-Fit nằm sát ngưỡng ý nghĩa ($p = 0,08$). NCS đã loại bỏ các tương tác kép (X_iX_j) ra khỏi phương

trình hồi quy, cần giải thích sâu hơn ảnh hưởng của tỷ lệ C/N đối với quá trình sinh tổng hợp PS.

4. **Về hình thức trình bày**: Một số trang còn lỗi rớt chữ khi ngắt bảng, lặp tiêu đề cột (đã tiếp thu rà soát trong bản giải trình). Cần chú ý thống nhất cách sử dụng dấu phẩy (,) hay dấu chấm (.) trong các bảng số liệu ANOVA chuẩn tiếng Việt.

- Trong các công trình đã công bố, nhóm tác giả đều công bố phân tích dữ liệu bằng phần mềm R; tuy nhiên, trong luận án, tác giả mô tả phân tích dữ liệu bằng phần mềm SPSS và Minitab - có thể do đề cương nghiên cứu chưa chỉnh sửa. Tác giả nên hiệu chỉnh cho đồng nhất.

- Trong danh mục tài liệu tham khảo, nhiều tài liệu dạng bài báo còn có kèm theo dòng trích dẫn vào năm (Cited in …) - tác giả cần điều chỉnh lại danh mục tài liệu tham khảo cho đúng. Nên phân chia nhóm danh mục tài liệu tiếng Việt và tài liệu tiếng Anh.

- Trong bố trí thực nghiệm tối ưu hóa, tác giả có thể nên biện luận thêm về việc không có sự tương tác giữa các yếu tố thực nghiệm (pH, glucose, cao nấm mem) đến sinh khối và hàm lượng PS -> vì mục tiêu của thí nghiệm tối ưu là tìm ra mối tương tác này. Việc không có tương tác này có thể do tâm thực nghiệm được bố trí gần với điểm tối ưu làm việc ảnh hưởng đơn lẽ và ảnh hưởng tuyến tính chi phối tới 96 - 98% sự biến thiên làm cho hiệu ứng tương tác trở nên nhỏ hơn sai số ngẫu nhiên của mô hình.

- Trang 78 tác giả có viết "yếu tố X1 (pH) là nhân tố có tác động phân giải tuyết tính mạnh mẽ nhất => lỗi thuật ngữ, tác giải nên dùng là tác động tuyến tính hoặc hiệu ứng tuyến tính thì phù hợp hơn.

- Ở đoạn 1, tác giả viết: "...các tương tác hai chiều giữa các yếu tố độc lập không thể hiện ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) và đã được chủ động loại bỏ..." (khẳng định mô hình không còn số hạng tương tác). Nhưng sang đoạn 2, tác giả lại viết: "Giá trị R^2 0,96 chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X1, X2, X3) và sự tương tác của chúng giải thích được hơn 96%..." => Việc dùng câu "và sự tương tác của chúng" ở đoạn 2 gây mâu thuẫn với câu ở đoạn 1. => nên sửa thành "Giá trị $R^2 = 0,96$ chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X1, X2, X3) ở dạng tuyến tính và bậc hai giải thích được hơn 96% sự biến thiên..."

- Có sự nhầm lẫn trong nồng độ cao nấm men tối ưu của nấm Trametes versicolor trong kết luận (2,025 g/L) và trong bài viết (mục 3.1.2.3 là 2,0354 g/L) => lỗi đánh máy tác giả cần điều chỉnh.

- Việt hóa toàn bộ số liệu trên biểu đồ.

- Biểu đồ dạng trang đa hình có ký hiệu và có chú giải thì không cần tên của biểu đồ con, cụ thể hình 3.1, 3.3, 3.5.

- Tất cả các hình ảnh cần thiết phải được trích dẫn/dẫn chứng trong bài viết.

- Trong kết quả khả năng kháng oxy hóa của các cao chiết PS từ hệ sợi nấm:

  + Tác giả đưa ra được nhận định rất hay về ảnh hưởng của cấu trúc không gian của A-PS đến khả năng trung hòa gốc tự do và mở rộng được vai trò PS hoạt động như một chất điều hòa sinh học gián tiếp. Tuy nhiên,
  + Kết quả trong bảng 3.7 và 3.8 cần kiểm tra lại đánh chữ cái theo ý nghĩa thống kê, tác giả ghi: "Các chữ cái khác nhau trong một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey's HSD Test, $P < 0,05$) => tuy nhiên các chữ cái trong bảng này tác giả đang đánh theo hàng mới đúng.
  + Tác giả cần tính toán lại IC50 trong bảng 3.7: IC50 của A-PSC phải nhỏn hơn của W-PSC thì phù hợp với dữ liệu được cung cấp.
  + Bảng 3.8 tác giả nên tính IC50 theo Log-Linear thì phù hợp hơn.
  + Tác giả có so sánh: "So với một số các nghiên cứu khác về hoạt tính kháng oxi hóa của PS cho thấy khá có sự tương đồng, nghiên cứu của Petraglia (2023) hoạt tính kháng oxi hóa của PS tách chiết từ nấm *Pleurotus eryngii* là 1,15 ± 0,09 mg/mL [155]..." => Giá trị IC50 của *Pleurotus eryngii* là 1,15 mg/mL = 1150 µg/mL. => Nhận định "khá tương đồng" chỉ đúng đối với nấm *T. versicolor* (1070,6 - 1279,1 µg/mL ~ 1150 µg/mL). Nếu tính chung cho cả *C. militaris* (> 2400 µg/mL) mà kết luận "tương đồng" với mức 1150 µg/mL là thiếu chính xác về mặt định lượng.
  + Tác giả nhận định: "IC50 của các chiết xuất PS của 2 loại nấm này đều cao hơn so với IC50 của acid ascorbic..." => Cách diễn đạt "IC50 cao hơn" dễ làm người đọc phổ thông hiểu nhầm là "tốt hơn". Tác giả nên viết rõ ràng thành: "Giá trị IC50 của các chiết xuất PS đều cao hơn nhiều so với acid ascorbic (83,89 µg/mL), điều này chỉ ra rằng khả năng trung hóa gốc tự do trực tiếp của PS yếu hơn so với chất chuẩn."

- Trong kết quả 3.2.4.1. Khả năng kích thích sự sinh trưởng probiotic hình 3.13 và 3.14 tác giả cần kiểm tra lại cỡ mẫu là n = 3 hay n = 15 => Theo phương pháp nghiên cứu trang 57 "Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 ống" thì n = 3.

Trong tiểu mục 3.2.4 Hoạt tính prebiotic của PS chiết xuất từ hệ sợi nấm: Trình tự bố trí các thí nghiệm được thiết kế theo một chuỗi logic khoa học chặt chẽ, bám sát định nghĩa và 3 tiêu chí cốt lõi của một prebiotic:

- Bước 1 - Khảo sát khả năng đồng hóa cơ chất (3.2.4.1): Kiểm tra xem các chủng probiotic mục tiêu (Lactiplantibacillus, Bifidobacterium) có thể sử dụng các phân đoạn polysaccharide (PS) sợi nấm làm nguồn carbon duy nhất để sinh trưởng hay không.

- Bước 2 - Đánh giá tính chọn lọc qua Chỉ số Prebiotic - PI (3.2.4.2): Định lượng mức độ kích thích chọn lọc đối với lợi khuẩn so với hại khuẩn (E. coli) thông qua chỉ số PI. Điều này chứng minh tác động hướng đích của prebiotic.
- Bước 3 - Xác định sản phẩm chuyển hóa sinh học SCFAs (3.2.4.3): Định lượng các axit béo chuỗi ngắn (axit acetic, propionic, butyric) được giải phóng trong quá trình lên men bằng HPLC. Bước này làm sáng tỏ cơ chế sinh hóa tạo ra lợi ích sinh lý đối với tế bào biểu mô ruột.
- Bước 4 - Xác nhận tính kháng tiêu hóa (3.2.4.4): Đánh giá mức độ bền vững của PS khi đối mặt với enzyme α-amylase. Tiêu chí này bắt buộc để đảm bảo PS có thể đi qua dạ dày, ruột non mà không bị phân giải trước khi tiếp cận đại tràng.
- Bước 5 - Đánh giá hiệu quả bảo vệ sinh học chống hại khuẩn (3.2.4.5): Chứng minh dịch lên men của lợi khuẩn khi có bổ sung PS nấm có khả năng ức chế mạnh mẽ các tác nhân gây bệnh đường ruột (E. coli, S. aureus)

Tuy nhiên, trong bài viết, tác giả nhận định:

- Trong mục 3.2.4.1, tác giả giải thích lợi khuẩn sinh trưởng tốt nhất trên phân đoạn acid (A-PSC, A-PST) là vì: "*Trong quá trình tách chiết acid đã phá vỡ cấu trúc của PS thành các phân tử nhỏ hơn (oligosaccharide, đường đơn) nên các chủng có thể dễ dàng sử dụng.*"
- Nhưng đến mục 3.2.4.4 (Kháng tiêu hóa), tác giả ghi nhận phân đoạn A-PS bị phân giải bởi enzyme α-amylase nhiều nhất (khả năng kháng tiêu hóa kém nhất), và giải thích: "*Do quá trình thủy phân acid làm thay đổi cấu trúc PS, PS bị phân cắt thành các đoạn ngắn khiến nó dễ bị enzyme amylase tác động hơn*".
- => Tuy nhiên, enzyme α-amylase chỉ có hoạt tính đặc hiệu đối với liên kết α-(1→4)-glycoside (như trong tinh bột hay glycogen). Bản chất polysaccharide của thành tế bào nấm dược liệu chủ yếu được cấu tạo từ β-glucan (liên kết β-(1 → 3) và β-(1 → 6)). Việc xử lý bằng axit HCl (trong quá trình chiết axit phân đoạn cuối) dù có cắt ngắn mạch polymer cũng không thể làm biến đổi cấu hình lập thể từ liên kết β sang liên kết α để khiến nó nhạy cảm hơn với α-amylase.

Mô hình đánh giá tính kháng tiêu hóa còn tương đối đơn điệu: Tác giả chỉ sử dụng duy nhất một phép thử kháng tiêu hóa với enzyme α-amylase nước bọt. => Để một hợp chất được xác nhận có khả năng đi xuống đại tràng nguyên vẹn, nó phải vượt qua rào cản dịch vị dạ dày cực kỳ khắc nghiệt (pH axit 1,5 - 2,0 kết hợp enzyme pepsin) và dịch ruột non (chứa hỗn hợp pancreatin, các protease, dịch mật). Việc chỉ thử nghiệm độc lập với α-amylase là chưa đủ để khẳng định tính bền vững "kháng tiêu hóa" thực tế của polysaccharide trong cơ thể sống. Do vậy, nếu tiếp tục nghiên cứu, tác giả có thể lựa chọn mô hình theo quy trình tiêu hóa mô phỏng tiêu chuẩn quốc tế (như mô hình INFOGEST). Thử nghiệm cần được thiết lập liên hoàn qua 3 giai đoạn: miệng (α-amylase) → dạ dày (pH 2,0 + pepsin) → ruột non (pancreatin + muối mật). Đo lường lượng đường khử tự do

giải phóng sau từng giai đoạn để khẳng định chính xác tỷ lệ PS nguyên vẹn đi xuống ruột kết.

Đối với mục 3.3. Ứng dụng hệ sợi nấm chế biến sản phẩm thực phẩm bổ sung trong luận án, tác giả thiết kế rất tốt chặt chẽ theo quy trình phát triển sản phẩm thực phẩm chức năng tiêu chuẩn:

1. Kiểm tra an toàn nguyên liệu đầu vào (3.3.1): Đảm bảo bột sợi nấm Vân chi đạt các tiêu chuẩn độc học và vi sinh trước khi ứng dụng chế biến.
2. Khảo sát động học lên men và xây dựng công thức phối chế tối ưu (3.3.2): Đánh giá tác động đa chiều của tỷ lệ bổ sung sợi nấm (0% - 1.0%) đến sự biến thiên của pH, axit tổng số (TAN), hoạt tính chống oxy hóa, sinh trưởng của lợi khuẩn, năng lực kháng khuẩn và chất lượng cảm quan của sản phẩm. => Nâng cao vượt trội hoạt tính sinh học của đồ uống khi bổ sung PS.
3. Xây dựng quy trình công nghệ chế biến hoàn chỉnh (3.3.3): Thiết lập sơ đồ quy trình và mô tả các thông số kỹ thuật chính cho việc sản xuất thực tế.

Tuy nhiên, có một số điểm tác giả cần lưu ý cho việc phát triển các nghiên cứu tiếp theo:

- Số liệu thực nghiệm ở Bảng 3.12 chỉ ra rằng hoạt tính kháng oxy hóa giảm dần theo thời gian lên men (ví dụ công thức tối ưu CT4 giảm từ 46.49% ban đầu xuống còn 44.43% sau 24 giờ lên men). NCS giải thích là do vi sinh vật phân hủy các hợp chất hữu cơ có hoạt tính hoặc do sự bay hơi. Tuy nhiên, nếu hoạt chất kháng oxy hóa bị suy giảm ngay trong 24 giờ đầu của quá trình lên men thì khi lưu trữ sản phẩm ở quy mô thương mại (1 - 3 tháng), hoạt tính này chắc chắn sẽ tiếp tục sụt giảm nghiêm trọng. Luận án hoàn toàn thiếu vắng các nghiên cứu về động học suy giảm hoạt tính sinh học trong quá trình bảo quản và chưa đề xuất các giải pháp bảo vệ.
- Trong quy trình chế biến proposed ở mục 3.3.3, dịch chiết nấm bổ sung bột sợi nấm phải trải qua giai đoạn hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút trước khi lên men, và sản phẩm cuối sau khi đóng chai tiếp tục chịu thanh trùng ở 80°C trong 15 phút. Nhưng, polysaccharide mạch dài có thể tương đối bền nhiệt, nhưng các hoạt chất sinh học cực kỳ quý và nhạy cảm với nhiệt độ có trong sợi nấm Vân chi (như hợp chất phenol, flavonoid, các axit amin tự do hay các vitamin nhóm B) chắc chắn sẽ bị phân hủy hàng loạt dưới tác động của nhiệt độ tiệt trùng 121°C trong thời gian dài. Luận án chưa tiến hành định lượng mức độ hao hụt của các hoạt chất nhạy nhiệt này trước và sau quá trình xử lý nhiệt nhằm chứng minh hiệu quả thực tế của quy trình công nghệ đề xuất.
- Tác giả tuyên bố rằng quá trình thanh trùng ở 80°C giúp kéo dài thời gian bảo quản của sản phẩm cuối cùng ở điều kiện thường. Tuy nhiên, trong toàn bộ luận án và phụ lục, không có bất kỳ dữ liệu thực nghiệm nào chứng minh thời hạn bảo quản

của sản phẩm (như theo dõi sự biến đổi mật độ lợi khuẩn sống, pH, TAN, sự biến đổi màu sắc, mùi vị và khả năng tái nhiễm vi sinh vật gây hại sau 1 tháng, 3 tháng hoặc 6 tháng bảo quản). Tôi cho rằng đây là một thiếu sót lớn đối với một quy trình công nghệ thực phẩm hoàn chỉnh, hướng tới thương mại hóa.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

- NCS đã công bố 04 bài báo khoa học chuyên ngành, 01 sách chuyên khảo và 04 đề tài NCKH các cấp đã nghiệm thu.
- **Chất lượng công bố**: Trong số 04 bài báo, có 02 bài báo được xuất bản trên các tạp chí quốc tế uy tín thuộc danh mục WoS/Scopus Q2/Q3 (*Mycobiology* thuộc Taylor & Francis và *Journal of Applied Biology & Biotechnology*), 01 bài báo Hội thảo quốc tế SPISE 2024 và 01 bài báo Tạp chí Công Thương.
- **Đóng góp của tác giả**: NCS Nguyễn Thị Bích Hằng là Tác giả thứ nhất (First Author) của toàn bộ 04 bài báo khoa học. Điều này khẳng định vai trò chủ đạo, tính chủ động và năng lực tư duy khoa học độc lập của NCS trong suốt quá trình thực hiện đề tài.
- **Mức độ vượt tiêu chuẩn**: Số lượng và chất lượng các công trình công bố của NCS vượt xa các yêu cầu tối thiểu đối với một luận án tiến sĩ theo Thông tư 18/2021/TT-BGDĐT.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn tóm tắt luận án

- Cuốn tóm tắt luận án dày 24 trang được trình bày ngắn gọn, khoa học, đúng quy định của Bộ Giáo dục & Đào tạo.
- **Tính trung thực & phản ánh đầy đủ**: Cuốn tóm tắt phản ánh trung thành và chính xác tất cả các nội dung cốt lõi của toàn văn luận án, từ Phần Mở đầu, Mục tiêu, Phương pháp nghiên cứu, các kết quả thực nghiệm nổi bật (bảng biểu RSM, đồ thị prebiotic, thông số quy trình đồ uống) đến Kết luận và Kiến nghị.
- **Tính thống nhất số liệu**: Mọi số liệu thực nghiệm, giá trị tối ưu hóa RSM, mật độ vi sinh và chỉ số cảm quan trong cuốn tóm tắt đều hoàn toàn nhất quán với toàn văn luận án và phần phụ lục.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

- Hồ sơ giải trình của NCS Nguyễn Thị Bích Hằng gồm Bản giải trình tiếp thu 7 trang, có đầy đủ chữ ký xác nhận của tập thể cán bộ hướng dẫn (PGS.TS. Đặng Minh Nhật, TS. Nguyễn Hoàng Dũng) và Trưởng đơn vị chuyên môn (TS. Mạc Thị Hà Thanh) ký ngày 30/05/2026.
- **Đánh giá chất lượng giải trình**:

- NCS thể hiện thái độ cầu thị, nghiêm túc và tinh thần trách nhiệm khoa học cao.
- NCS đã tiếp thu và chỉnh sửa chu đáo 100% các ý kiến đóng góp từ cả Phản biện độc lập 1 (5 nội dung) và Phản biện độc lập 2 (10 nội dung).
- *Về hình thức & thuật ngữ*: Đã rà soát sửa chữa toàn bộ lỗi chính tả, ngắt dòng, danh pháp sinh học (*C. militaris*, *T. versicolor*, *L. plantarum*), thuật ngữ "kháng oxy hóa", cách ghi đơn vị và rà soát loại bỏ tài liệu tham khảo dư.
- *Về nội dung khoa học*: Đã bổ sung thảo luận sâu về vi cấu trúc SEM với hoạt tính prebiotic; thêm tiểu mục làm rõ giới hạn của mô hình *in vitro* (trang 108); làm rõ cơ sở công nghệ và sinh học của việc lựa chọn sinh khối *T. versicolor* cho sản phẩm đồ uống lên men (trang 112); bổ sung cỡ mẫu và quy trình đánh giá cảm quan (trang 64); bổ sung bàn luận về giá trị R^2 và kiểm định Lack-of-Fit (trang 77).
- Kết luận về giải trình: Bản giải trình của NCS rất đầy đủ, mạch lạc, có luận cứ khoa học rõ ràng, ghi rõ vị trí trang chỉnh sửa trong luận án, hoàn toàn thỏa đáng và thuyết phục.

12. Kết luận

1. Khẳng định mức độ đáp ứng: Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật của NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng là một công trình nghiên cứu khoa học độc lập, nghiêm túc, công phu, có giá trị khoa học và giá trị thực tiễn cao. Phương pháp nghiên cứu hiện đại, số liệu thực nghiệm trung thực, đáng tin cậy. Nội dung các công trình công bố uy tín phản ánh trung thực kết quả của luận án. Luận án đáp ứng đầy đủ và vượt tất cả các yêu cầu đối với một Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật, chuyên ngành Công nghệ thực phẩm (Mã số: 9540101) theo Quy chế Đào tạo Tiến sĩ hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

2. Đề xuất: Kính đề nghị Hội đồng Đánh giá Luận án Tiến sĩ cấp Trường (Trường Đại học Bách khoa – Đại học Đà Nẵng) cho phép NCS. Nguyễn Thị Bích Hằng được bảo vệ luận án trước Hội đồng để nhận học vị Tiến sĩ Kỹ thuật.

Xác nhận cơ quan quản lý

Đà Nẵng, ngày 13 tháng 07 năm 2026

NGƯỜI PHẢN BIỆN

(Ký và ghi rõ họ tên)

PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ và tên người nhận xét: Võ Văn Quốc Bảo
Chức danh khoa học: Phó Giáo sư
Học vị: Tiến sĩ
Chuyên ngành: Khoa học và Công nghệ thực phẩm
Cơ quan công tác: Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

Họ và tên Nghiên cứu sinh: Nguyễn Thị Bích Hằng — Tuyển sinh năm: 2020
Ngành: Công nghệ thực phẩm — Mã số: 9540101

Tên đề tài luận án: "Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (*Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung"

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Tính cấp thiết và thời sự: Trong bối cảnh các rối loạn chuyển hóa và bệnh lý đường tiêu hóa ngày càng gia tăng, xu hướng phát triển thực phẩm chức năng hỗ trợ hệ vi sinh vật đường ruột (prebiotic) là rất lớn. Việc nghiên cứu tận dụng công nghệ nuôi cấy dịch thể (SmF) để thu nhận sinh khối hệ sợi nấm dược liệu (*Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor*) nhằm thay thế phương pháp nuôi quả thể truyền thống (vốn tốn thời gian, phụ thuộc thời tiết) là hướng đi có tính thời sự cao, giúp chủ động nguồn nguyên liệu công nghiệp ổn định.

Ý nghĩa khoa học: Luận án cung cấp bộ dữ liệu khoa học hệ thống về ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng (C, N) và môi trường (pH) đến động học sinh trưởng và tích lũy polysaccharide (PS) nội/ngoại bào của hai chủng nấm thuộc hai ngành khác nhau. Việc lựa chọn hai loài *Cordyceps militaris* và *Trametes versicolor* có cơ sở khoa học vì đây là các loài nấm dược liệu chứa nhiều polysaccharide và hợp chất có hoạt tính sinh học. Nuôi cấy dịch thể có ưu điểm về thời gian, khả năng kiểm soát điều kiện công nghệ và tính chủ động nguồn nguyên liệu so với nuôi quả thể.

Nghiên cứu đã làm sáng tỏ mối quan hệ giữa phương pháp chiết tách tuần tự (nước, kiềm, acid) đến đặc điểm cấu trúc hình thái vi mô (SEM) và các hoạt tính sinh học *in vitro* (kháng oxy hóa, prebiotic, động học sinh SCFAs).

Ý nghĩa thực tiễn: Thiết lập được thông số công nghệ cho quy trình sản xuất sinh khối ở quy mô lớn. Đồng thời, luận án đã cụ thể hóa bằng việc phát triển thành công sản phẩm ứng dụng "Nước nấm Bào ngư lên men bổ sung hệ sợi nấm *Trametes versicolor*" quy mô phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn chất lượng và an toàn thực phẩm, mở ra cơ hội thương mại hóa thực tế.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

Đề tài có tính độc lập cao. Mặc dù các nghiên cứu về polysaccharide của nấm Đông trùng hạ thảo và Vân chi đã được công bố rải rác trên thế giới, phần lớn chỉ tập trung vào quả thể hoặc hoạt tính miễn dịch trực tiếp.

Điểm phân tách không trùng lặp của luận án này là tập trung vào hoạt tính prebiotic chuyên sâu *in vitro* của các phân đoạn chiết xuất tuần tự từ hệ sợi nấm và việc phối hợp sinh khối thô vào ma trận thực phẩm uống lên men lactic tại Việt Nam. Các số liệu thực nghiệm, mô hình tối ưu Box-Behnken và các lát cắt hình ảnh SEM, đồ thị HPLC định lượng SCFAs đều chưa thấy trùng lặp với các công trình đã công bố trước đây.

3. Sự phù hợp giữa đề tài luận án với mã số ngành

Tên đề tài và toàn bộ nội dung nghiên cứu (tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy thu nhận hợp chất sinh học; thu nhận, phân đoạn và đánh giá hợp chất chức năng từ nguyên liệu sinh học; đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* liên quan đến thực phẩm; xây dựng công thức và quy trình chế biến đồ uống lên men; đánh giá chỉ tiêu hóa lý, vi sinh, cảm quan và an toàn thực phẩm.) phù hợp với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm (Mã số: 9540101).

4. Tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn

NCS thể hiện sự nghiêm túc trong nghiên cứu khoa học. Phần tổng quan tài liệu gồm 38 trang với 223 tài liệu tham khảo cập nhật cả trong và ngoài nước. Các luận điểm khoa học, phương pháp phân tích thường quy (phenol-sulfuric, DNS, HPLC, SEM) và kết quả đối chứng đều được trích dẫn nguồn rõ ràng từ các tạp chí uy tín (Molecules, Foods, Gut Microbes,...). Số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê ANOVA qua phần mềm Minitab 19.0 với độ tin cậy cao ($P < 0,05$).

Tuy nhiên, cần rà soát và chỉnh sửa các vấn đề sau:

- Cần ưu tiên trích dẫn tài liệu gốc thay vì dẫn nguồn thứ cấp cho các định nghĩa, phương pháp phân tích và cơ chế sinh học.

- Không nên sử dụng các trang thông tin phổ thông như Healthline làm nguồn khoa học trong luận án tiến sĩ. Các nội dung này cần được thay bằng bài báo nghiên cứu gốc, tổng quan hệ thống hoặc tài liệu từ tổ chức chuyên môn.

- Danh pháp vi sinh vật chưa chính xác và chưa thống nhất. "Bifidobacteria animalis" phải sửa thành *Bifidobacterium animalis*; "Pediococci acidilactici" phải sửa thành *Pediococcus acidilactici*; tên loài phải được in nghiêng và viết hoa đúng quy ước.

5. Sự phản ánh kết quả luận án trong những công trình đã công bố

Các kết quả cốt lõi của luận án đã được công bố một cách toàn diện và kịp thời thông qua 04 bài báo khoa học. Trong đó có 02 bài báo quốc tế thuộc danh mục uy tín (Scopus/ISI như Mycobiology, Journal of Applied Biology & Biotechnology), 01 bài hội nghị quốc tế (SPISE) và 01 bài báo trên tạp chí chuyên ngành trong nước. Ngoài ra, NCS còn tham gia

biên soạn 01 sách chuyên khảo và làm chủ nhiệm/thành viên của 04 đề tài nghiên cứu liên quan đã nghiệm thu. Điều này khẳng định giá trị và tính chất lượng của luận án đã được cộng đồng khoa học thừa nhận.

6. Tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Tính hiện đại: Nghiên cứu đã tiếp cận các kỹ thuật hiện đại như định danh chủng nấm bằng giải trình tự gene ITS/16S rRNA; quy hoạch thực nghiệm tối ưu hóa đa mục tiêu bằng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM) theo mô hình Box-Behnken; quan sát cấu trúc bề mặt bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM); và định lượng các acid béo mạch ngắn bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) sử dụng cột chuyên dụng Aminex HPX87H.

Tính hợp lý: Cách tiếp cận từ khảo sát đơn biến (OFAT) để định vị dải thông số, sau đó tiến hành tối ưu hóa đa mục tiêu (BBD-RSM), chiết tách phân đoạn, đánh giá hoạt tính prebiotic *in vitro* trên các chủng vi khuẩn chuẩn thức (ATCC, WCFS1) trước khi đưa vào ứng dụng chế biến thực phẩm là hoàn toàn logic và chặt chẽ.

7. Kết quả nghiên cứu mới của luận án

- Xác lập được bộ thông số tối ưu đa mục tiêu cho quá trình SmF: Thu sinh khối khô đạt 8,90 ± 0,25 g/L (hàm lượng PS 5,28%) đối với *C. militaris*; và 3,59 ± 0,12 g/L (hàm lượng PS 8,23%) đối với *T. versicolor*.

- Thu nhận và so sánh được sáu phân đoạn kết tủa giàu carbohydrate từ hai loài nấm bằng quy trình chiết tuần tự nước nóng, Na_2CO_3 và HCl.

- Cung cấp dữ liệu so sánh về khả năng trung hòa ABTS, hỗ trợ sinh trưởng một số chủng vi khuẩn có lợi, chỉ số PI và mức độ thủy phân bởi α-amylase.

- Xây dựng hoàn chỉnh quy trình công nghệ chế biến nước uống nấm Bào ngư lên men lactic bổ sung 0,6% sinh khối thô *T. versicolor* và thời gian lên men 24 giờ, chứng minh được bột sinh khối thô có khả năng hiệp đồng bảo vệ, gia tăng hoạt tính chống oxy hóa và nâng cao khả năng kháng khuẩn (*E. coli*, *S. aureus*) của sản phẩm đồ uống.

8. Những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

Về nội dung: Nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở các đánh giá hoạt tính prebiotic và kháng oxy hóa dừng lại ở quy mô *in vitro*. Để các kết luận về "thực phẩm chức năng hỗ trợ sức khỏe" mang tính thuyết phục tuyệt đối, cần có các dữ liệu đánh giá *in vivo* trên mô hình động vật để kiểm chứng sự thay đổi thực tế của hệ vi sinh vật và các chỉ số mô học ruột.

Phần ứng dụng sản phẩm mới chỉ thử nghiệm bổ sung bột sinh khối thô *T. versicolor*. NCS nên giải thích rõ hơn lý do tại sao không thử nghiệm ứng dụng đối với sinh khối *C. militaris* trong thực phẩm uống lên men này dù năng suất thu nhận sinh khối của *C. militaris* cao hơn rất nhiều.

Về hình thức: Một số đồ thị hệ thống và hình ảnh sơ đồ quy trình cần được quy chuẩn hóa về định dạng chữ, tránh lỗi font hiển thị ở các phần chú thích kỹ thuật.

9. Nhận xét về các công trình đã công bố của tác giả liên quan đến luận án

Các công trình công bố của tác giả có hàm lượng khoa học cao, được đăng tải trên

các tạp chí quốc tế chuyên ngành có phản biện nghiêm ngặt và các tạp chí uy tín trong nước. NCS là người thực hiện chính và có đóng góp cốt lõi trong các công bố này.

10. Sự phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án trong cuốn Tóm tắt luận án

Cuốn Tóm tắt luận án đã phản ánh một cách trung thực, khách quan và đầy đủ cấu trúc, phương pháp, các kết quả thực nghiệm quan trọng cũng như các kết luận cốt lõi của toàn văn luận án tiến sĩ.

11. Đánh giá nội dung giải trình của nghiên cứu sinh về nhận xét của phản biện độc lập

NCS đã tiếp thu nghiêm túc, có thái độ cầu thị và đưa ra các lập luận giải trình khoa học, rõ ràng đối với các góp ý của các nhà phản biện độc lập. Những chỉnh sửa đã được cập nhật vào bản thảo của Luận án.

12. Kết luận

Mức độ đáp ứng: Luận án tiến sĩ kỹ thuật của Nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Bích Hằng là một công trình nghiên cứu khoa học nghiêm túc, công phu, có giá trị cao cả về mặt khoa học lẫn ứng dụng thực tiễn trong ngành Công nghệ thực phẩm. Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một Luận án Tiến sĩ Kỹ thuật.

Đánh giá:

[X] Tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường.

[ ] Không tán thành NCS được đánh giá luận án cấp Trường.

Đà Nẵng, ngày 14 tháng 07 năm 2026

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN QUẢN LÝ
(nếu có)

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM
ĐẠI HỌC HUẾ

Đinh Thị Song Thủy

NGƯỜI NHẬN XÉT
(Ký và ghi rõ họ tên)

PGS. TS. Võ Văn Quốc Bảo

ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG

1. Tên đề tài luận án: **Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyces militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**
2. Ngành: **Công nghệ thực phẩm**
3. Mã số: **9540101**
4. Nghiên cứu sinh: **Nguyễn Thị Bích Hằng**
5. Quyết định thành lập Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Trường 3238/QĐ-ĐHBK ngày 22 tháng 6 năm 2026 của Hiệu trưởng Trường Đại học Bách khoa.
6. Ngày họp Hội đồng: 01/08/2026
7. Danh sách thành viên Hội đồng:

STT	HỌC HÀM, HỌC VỊ, HỌ VÀ TÊN	CHỨC TRÁCH TRONG HỘI ĐỒNG
1.	GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh	Chủ tịch Hội đồng
2.	PGS. TS. Nguyễn Quang Vinh Trường Đại học Tây Nguyên	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Thị Đông Phương Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng	Phản biện 2
4.	GS. TS. Trần Thanh Trúc Đại học Cần Thơ	Phản biện 3
5.	PGS. TS. Võ Văn Quốc Bảo Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế	Ủy viên
6.	PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng	Ủy viên
7.	TS. Mạc Thị Hà Thanh Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng	Thư ký Hội đồng

Có mặt: ..07.. thành viên. Vắng mặt: ..0...

Khách mời: PGS.TS Trịnh Đăng Mậu - Trưởng khoa Sinh - Nông nghiệp - Môi trường

Về phía cơ sở đào tạo: Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

Nghiên cứu sinh trình bày luận án.

8. Ba ủy viên phản biện đọc bản phản biện luận án.

9. Câu hỏi và trả lời: **Theo phần đính kèm.**

10. Các ý kiến đóng góp khác:

.....

.....

.....

.....

11. Kết luận của Hội đồng

Ghi rõ các kết luận theo các nội dung dưới đây:

a. Kết luận về tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn về đề tài luận án; Sự phù hợp giữa đề tài và mã số ngành đào tạo.

Đề tài thể hiện sự tính cấp thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn đóng việc góp phần phát triển nhóm nguyên liệu sinh học giàu polysaccharide cho thực phẩm hỗ trợ sức khỏe.

Tên đề tài phù hợp với nội dung nghiên cứu của luận án và với chuyên ngành Công nghệ thực phẩm (Mã ngành: 9540101)

.....

b. Kết luận về tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn; Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác

Luận án không có dấu hiệu trùng lặp với đề tài, số liệu, kết quả và kết luận của công trình khác.

Cần sà soát, ưu tiên trích dẫn tài liệu gốc thay vì nguồn thứ cấp.

.....

.....

.....

.....

.....

c. Kết luận về phương pháp nghiên cứu, mức độ chính xác của dữ liệu sử dụng

Phương pháp nghiên cứu trong đề hiện đại, hợp lý và phù hợp với mục tiêu đề ra.

Mức độ chính xác của dữ liệu sử dụng nhìn chung khá tốt nhưng kết luận vẫn còn giới hạn ở mức bằng chứng in vitro và phân đoạn thô

d. Kết luận về những thành công và đóng góp mới của luận án về lý luận và thực tiễn

Điểm mới của luận án thể hiện ở cách tiếp cận tích hợp giữa dịch thể - chiết xuất phân đoạn - đánh giá hoạt tính in vitro - phát triển sản phẩm thử nghiệm

Cần diễn đạt lại kết quả nghiên cứu mới là bằng chứng thực nghiệm mới về tiềm năng prebiotic và khả năng ứng dụng ban đầu của polysaccharide trong thực phẩm bổ sung

e. Kết luận về các công trình công bố liên quan đến luận án

Các kết quả đã được công bố qua 4 bài báo (02 bài Scopus/ISI, 01 hội nghị quốc tế và 1 tạp chí trong nước), 01 sách chuyên khảo và 04 đề tài đã nghiệm thu; đáp ứng quy định về công bố khoa học đối với trình độ tiến sĩ.

.....

.....

.....

f. Kết luận về nội dung giải trình về nhận xét của phản biện độc lập

Nội dung giải trình được trình bày rõ ràng, với nhiều chỉnh sửa đã cập nhật trong luận án

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

g. Kết luận về các hạn chế và yêu cầu chỉnh sửa

Nghiên cứu sinh cần chỉnh sửa:

Mở đầu: điều chỉnh lại 1 số thông tin trong mục tiêu, phạm vi và phương pháp nghiên cứu

Chương 1: bổ sung phương pháp đánh giá hoạt tính prebiotic, hiệu chỉnh lại mục 1.2.4.1

Chương 2: bổ sung quy mô thí nghiệm, xem lại 1 số thuật ngữ theo ý kiến các thành viên hội đồng

Chương 3: hiệu chỉnh lại 1 số nhận xét cho phù hợp với điều kiện thực nghiệm. Rà soát lại các phương pháp phân tích cho logic.

Chỉnh lại cách diễn đạt trong nội dung những đóng góp mới của luận án

Rà soát lại các lỗi chính tả, lỗi in ấn, lỗi trình bày.

h. Kết luận về việc trả lời câu hỏi, trình độ và hiểu biết của nghiên cứu sinh

Nghiên cứu sinh trả lời thông thổ đầy đủ, trọn vẹn các câu hỏi của thành viên hội đồng, thể hiện hiểu biết và nền tảng chuyên môn vững chắc

.....

.....

.....

.....

.....

i. Kết luận chung

- Kết quả đánh giá: Hội đồng đã tiến hành bỏ phiếu kín, kết quả 07/07 đạt; 0/07 không đạt.

- Kết luận về giá trị khoa học và thực tiễn của luận án, kết luận về trình độ và năng lực của nghiên cứu sinh

Đề tài có giá trị khoa học và thực tiễn trong việc góp phần phát triển nhóm nguyên liệu chế biến và sản phẩm hỗ trợ sức khỏe cho người tiêu dùng

Nghiên cứu sinh thể hiện nền tảng chuyên môn vững chắc, có năng lực thực nghiệm và phân tích dữ liệu tốt

.....

- Kết luận đồng ý cho phép nghiên cứu sinh làm hồ sơ xét công nhận tốt nghiệp

Hội đồng tán thành đề nghị cho phép nghiên cứu sinh làm hồ sơ xét công nhận tốt nghiệp

.....

.....

.....

Biên bản này được 100% thành viên Hội đồng có mặt tán thành

Đà Nẵng, ngày 01 tháng 8 năm 2026

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

TS. Mạc Thị Hà Thanh

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG
CHẤM LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG

GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn

PHẦN GHI CÂU HỎI VÀ TRẢ LỜI CỦA NGHIÊN CỨU SINH

A. CÂU HỎI DÀNH CHO NCS

1. Người hỏi; nội dung câu hỏi: .....

* PGS.TS. Nguyễn Quang Vinh (Phản biện 1)

1, Trong phần đặt vấn đề cho sáng. mùn cây. dịch thể hệ sợi nấm là xu hướng nghiên cứu có nhiều ưu điểm so với mùn cây truyền thống / quả thể hoặc mùn cây bán sản. Tuy nhiên trên thực tế sản phẩm sinh khối nấm từ mùn cây dịch thể chưa phát triển rộng như các sản phẩm từ mùn cây bán sản hoặc quả thể. Theo NCS nguyên nhân chính là gì ? Để phát triển mùn cây dịch thể thu sinh khối nấm ở quy mô công nghiệp, những yếu tố nào thể hiện tính khả thi và những điều nào là rào cản không khả thi hoặc cần tiếp tục giải quyết ?

* TS. Nguyễn Thị Thùy Dương (Phản biện 2)

2, Hãy giải thích tại sao pH ban đầu trong phương pháp nghiên cứu là 6.5 của mũn nấm bổ sung sinh khối nấm T. versicolor nhưng khi đo pH ban đầu trong quá trình lên men thì pH ~ 5 ?

* GS.TS. Trần Thanh Trúc (Phản biện 3)

3, Tại sao chọn nên nấm bào ngư lên men bổ sung sinh khối T. versicolor ?

* GS.TS. Lê Văn Việt Mẫn (Chủ tịch hội đồng)

4, Để làm đồ uống lên men nguyên liệu nên đảm bảo điều chỉ gì ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

B. TRẢ LỜI CỦA NGHIÊN CỨU SINH

.....

1, Trình bày thí có thể nhân rộng ở quy mô công nghiệp
Rau cần công nghệ và giống nấm. Giống nấm tập trung
sao cần bảo tồn nguồn gốc, mã chủng, định danh
phân lập và tính phù thuộc chủng tiêu quả quá trình
phụ thuộc vào nhiều yếu tố thành phần môi trường, điều kiện
vật lý, hình thái hệ sợi, giai đoạn phát triển và đặc điểm chủng nấm
2, pH = 6,5 là pH đất cho môi trường nuôi cấy thu sinh khối,
pH = 5 là pH thức đồ quả dịch nước nấm đã bổ sung hệ sợi
T. versicolor ngay tại thời điểm bắt đầu theo dõi lên men, giá
trị này giảm dần theo tỷ lệ sinh khối bổ sung
3, Mục tiêu mong muốn tạo ra dòng sản phẩm thực phẩm
mới bảo vệ sức khỏe bắt probiotic từ sợi nấm có khả năng
tăng hoạt tính chống oxi hoá và năng cao kháng khuẩn
4, Nguyên liệu cần đảm bảo:
Giàu C, N để vi sinh vật có thể chuyển hoá các chất
thành sản phẩm mong muốn
→ Bổ sung thêm nguồn thức ăn glucose bằng cách
hiệu chỉnh hàm lượng đường

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

C. PHẦN TRAO ĐỔI VÀ THẢO LUẬN CỦA CÁC THÀNH VIÊN HỘI ĐỒNG

(Ghi rõ ý kiến trao đổi, thảo luận trong thời gian họp kín để đánh giá và đưa ra kết luận của các thành viên Hội đồng)

Ý kiến 1: PGS. TS. Nguyễn Quang Vinh (Phản biện 1)

- Luận án đáp ứng yêu cầu cơ bản của luận án tiến sĩ
- Quy trình mục 3.3.3 cần bổ sung thông số công nghệ, quy mô chỉ ở mức phòng thí nghiệm
- Một số thuật ngữ cần thống nhất
- Kết luận nên diễn đạt lại theo mục tiêu đặt ra

Ý kiến 2: GS. TS. Trần Thanh Trúc (Phản biện 3)

- Kết luận cần phản ánh đúng giới hạn mô hình vi vớt, tránh suy sông sang hiệu quả sức khoẻ đến người
- Nên tách chế phần "đóng góp mới"
- Rà soát lỗi chính tả và thống nhất thuật ngữ

Ý kiến 3: GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn (Chủ tịch hội đồng)

- Cần điều chỉnh lại mục tiêu, phạm vi nghiên cứu và phương pháp nghiên cứu ở chương mở đầu cho phù hợp
- Chỉnh sửa lại cách diễn đạt trong nội dung những đóng góp mới của luận án

Ý kiến 4: PGS. TS. Trịnh Đăng Mậu. (Ủy viên)

Cần hiệu chỉnh lại một số nhận xét cho phù hợp với điều kiện thực nghiệm.

Ý kiến 5: .....

Ý kiến 6: .....

Ý kiến 7.....

.....

.....

.....

.....

.....

Ý kiến kết luận của Chủ tịch Hội đồng: Sau khi trao đổi, thảo luận, Hội đồng thống nhất các kết luận sau:

- Luận án đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ ngành Công nghệ thực phẩm. Nghiên cứu sinh chỉnh sửa theo các góp ý của Hội đồng.
- Đề nghị công nhận học vị tiến sĩ cho NCS Nguyễn Thị Bích Hằng.

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG

TS. Mạc Thị Hà Thanh

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG
CHẤM LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG

GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
HỘI ĐỒNG CHẤM LUẬN ÁN CẤP TRƯỜNG

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

QUYẾT NGHỊ
CỦA HỘI ĐỒNG CHẤM LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG

Tên đề tài luận án: **Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyces militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung**

- Ngành: **Công nghệ thực phẩm**
- Mã số: **9540101**
- Nghiên cứu sinh: **Nguyễn Thị Bích Hằng**

Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Trường, được thành lập theo Quyết định số 3238/QĐ-ĐHBK ngày 22 tháng 6 năm 2026 của Hiệu trưởng Trường Đại học Bách khoa, đã họp vào lúc 8h30 ngày 01/08/2026 tại Trường Đại học Bách khoa. Sau khi thảo luận, Hội đồng đã thống nhất với quyết nghị về luận án như sau:

1. Kết luận về ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao trong việc góp phần phát triển nhóm nguyên liệu sinh học giàu polysaccharide cho thực phẩm hỗ trợ sức khoẻ

2. Kết luận về tính hiện đại, hợp lý, độ tin cậy của phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu tương đối hiện đại, hợp lý và phù hợp mục tiêu. Độ tin cậy của kết quả nhìn chung khá tốt nhưng kết luận vẫn nên giới hạn ở mức bằng chứng in vitro và phân đoạn thô

3. Kết luận các kết quả nghiên cứu mới của luận án

Điểm mới của luận án tập trung cách tiếp cận tích hợp mũi cay dịch thể - chiết xuất phân đoạn - đánh giá hoạt tính in vitro - phát triển sản phẩm thử nghiệm. Cần điểm đạt kết quả nghiên cứu mới: là bằng chứng thực nghiệm mới về tiềm năng prebiotic in vitro và khả năng ứng dụng ban đầu của PS trong thực phẩm bổ sung.

4. Kết luận về những thiếu sót của luận án về nội dung và hình thức

Luận án còn thiếu sót chủ yếu ở nội dung diễn giải, chuẩn hoá thuật ngữ, cần hoàn thiện trình bày và mở rộng thảo luận giới hạn nghiên cứu nhưng không làm thay đổi bản chất các kết quả chính.

5. Kết luận về việc trả lời câu hỏi, trình độ và hiểu biết của nghiên cứu sinh

Nghiên cứu sinh trả lời thuyết phục đầy đủ, đơn vẹn các câu hỏi của thành viên hội đồng, thể hiện hiểu biết và nền tảng chuyên môn vững chắc

6. Kết luận chung

- Kết quả bỏ phiếu:

+ 07/07 đạt

+ 0/07 không đạt

- Kết luận về giá trị khoa học và thực tiễn của luận án, kết luận về trình độ và năng lực của nghiên cứu sinh:

Đề tài có giá trị khoa học và thực tiễn đóng góp phần phát triển nhóm nguyên liệu chế biến và sản phẩm bổ thọ sức khỏe cho người tiêu dùng.

Nghiên cứu sinh thể hiện nền tảng chuyên môn vững chắc, có năng lực thực nghiệm và phân tích dữ liệu tốt.

- Kết luận về yêu cầu sửa chữa luận án:

Nghiên cứu sinh cần chỉnh sửa:

Phần mở đầu: điều chỉnh lại một số thông tin trong mục tiêu, phạm vi và phương pháp nghiên cứu.

Chương 1: bổ sung 1 số phương pháp đánh giá hoạt tính probiotic và hiệu chỉnh lại mục 1.2.4.1 tình hình nghiên cứu trong nước.

Chương 2: bổ sung quy mô thí nghiệm, xem lại 1 số thuật ngữ theo ý kiến các thành viên hội đồng.

Chương 3: hiệu chỉnh lại một số nhận xét cho phù hợp với điều kiện thực nghiệm. Rà soát lại các phương pháp phân tích cho logic, thống nhất với nội dung nghiên cứu.

- Chỉnh sửa lại cách diễn đạt trong nội dung những đóng góp mới của luận án.

- Rà soát lại các lỗi chính tả, lỗi in ấn, lỗi trình bày.

- Kết luận về việc tán thành đề nghị công nhận hay không công nhận học vị tiến sĩ cho nghiên cứu sinh; đề nghị khen thưởng đối với luận án đặc biệt xuất sắc:

Đề nghị công nhận học vị tiến sĩ cho nghiên cứu sinh Nguyễn Thị Bích Hằng

Bản Quyết Nghị này được 100% thành viên Hội đồng có mặt tán thành.

Đà Nẵng, ngày 01 tháng 8 năm 2026

TM. HỘI ĐỒNG CHẤM LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG
CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

GS. TS. Lê Văn Việt Mẫn

XÁC NHẬN CỦA TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
KT. HIỆU TRƯỞNG
TRƯỞNG PHÒNG ĐÀO TẠO

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PGS.TS. Đặng Công Thuật

Nhận ngày 02/11/2026

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BẢN GIẢI TRÌNH THEO QUYẾT NGHỊ CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP TRƯỜNG

Họ và tên NCS: **Nguyễn Thị Bích Hằng**

Tên luận án: ***"Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyceps militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung"***

Chuyên ngành: Công nghệ thực phẩm

Mã số: 9.54.01.01

Người hướng dẫn Khoa học:

PGS.TS. Đặng Minh Nhật

TS. Nguyễn Hoàng Dũng

Sau khi nhận được bản nhận xét của các thành viên Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp trường, NCS và tập thể hướng dẫn đã chỉnh sửa luận án theo nội dung sau:

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
I.	**Yêu cầu chung theo Quyết nghị /Biên bản của hội đồng**	
1.	Phần mở đầu: điều chỉnh lại một số thông tin trong mục tiêu, phạm vi và phương pháp nghiên cứu.	Đã điều chỉnh mục tiêu, loại bỏ đối tượng trong phạm vi, bổ sung thêm giới hạn của nghiên cứu và bổ sung các thông số vào (Trang 3-4)
2.	Chương 2: bổ sung quy mô thử nghiệm, xem lại 1 số thuật ngữ theo ý kiến các thành viên hội đồng.	Tại Chương 2, đã bổ sung chi tiết thông tin về quy mô cho từng lô thử nghiệm (ví dụ: thể tích môi trường, dung tích bình lên men, khối lượng nấm, số lượng mẫu lặp lại). Đồng thời, toàn bộ các thuật ngữ chuyên ngành đã được rà soát, chuẩn hóa và chỉnh sửa lại theo đúng góp ý chuyên môn của các thành viên hội đồng để đảm bảo tính chính xác và thống nhất trong toàn văn.
3.	Chương 3: hiệu chỉnh lại một số nhận xét cho phù hợp với điều kiện thực nghiệm.	Chương 3, tác giả đã rà soát và viết lại các đoạn nhận xét, biện luận kết quả để bám sát,

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	Rà soát lại các phương pháp phân tích cho logic, thống nhất về nội dung nghiên cứu.	phản ánh đúng giới hạn của điều kiện thực nghiệm đã thiết lập.
4.	Chỉnh sửa lại cách diễn đạt trong nội dung những đóng góp mới của luận án.	Đã chỉnh sửa lại, thay thế và dùng từ tiết chế hơn trong nội dung đóng góp mới của luận án (Trang 131)
5.	Rà soát lại các lỗi chính tả, lỗi in ấn, lỗi trình bày.	Các lỗi đánh máy, chính tả, định dạng phông chữ, canh lề, giãn dòng, cũng như các lỗi nhảy trang, đánh số hình/bảng và trích dẫn tài liệu tham khảo đã được khắc phục hoàn toàn để bản thảo đạt chuẩn mực hình thức quy định.
II.	**Yêu cầu của từng thành viên Hội đồng**	
II.1.	**Chủ tịch hội đồng: GS.TS. Lê Văn Việt Mẫn**	
1.	Mục tiêu tổng quát của luận án (trang 3) có nhắc đến "sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng" là không phù hợp với tên của luận án "thực phẩm bổ sung" nên cần được hiệu chỉnh lại. Trong phần mục tiêu cụ thể (trang 3), nội dung về "khảo sát khả năng ứng dụng sinh khối…" cần được sửa lại là "đánh giá tiềm năng sử dụng sinh khối…"	Đã chỉnh sửa "sản phẩm thực phẩm định hướng chức năng" thành "thực phẩm bổ sung" (Trang 3). Đã chỉnh sửa "Khảo sát khả năng ứng dụng sinh khối…" Thành "đánh giá tiềm năng sử dụng sinh khối…" (Trang 3)
2.	Phạm vi nghiên cứu có nhắc lại "đối tượng nghiên cứu" (trang 3) là không phù hợp nên cần bỏ đi. Bên cạnh đó, cần trình bày phạm vi nghiên cứu về quá trình lên men thu sinh khối và polysaccharide, trích ly và phát triển sản phẩm nước uống lên men lactic.	Đã loại bỏ đối tượng nghiên cứu và bổ sung phạm vi về quá trình lên men thu sinh khối PS và phát triển sản phẩm nước uống lên men (Trang 4).
3.	Phần phương pháp nghiên cứu cần được hiệu chỉnh lại, đặc biệt là bổ sung phương pháp thực nghiệm cổ điển và phương pháp bề mặt đáp ứng để thiết kế thí nghiệm, phương pháp phân tích hóa lý, vi sinh và phương pháp xử lý số liệu để đánh giá chất lượng sản phẩm (trang 4).	Đã chỉnh sửa, bổ sung phương pháp thực nghiệm cổ điển và phương pháp bề mặt đáp ứng để thiết kế thí nghiệm trong phần 2.5.1. Chương 2 (Trang 50, 51, 52).

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
4.	Một số thí nghiệm chưa giới thiệu quy mô và cần được bổ sung: Ví dụ như trong nội dung 1, thể tích môi trường sử dụng cho mỗi nghiệm thức lên men là bao nhiêu; trong nội dung 3, khối lượng quả thể nấm bào ngư sử dụng để thu dịch chiết là bao nhiêu; thể tích dịch chiết để lên men là bao nhiêu.	Đã bổ sung quy mô lên men ở các thí nghiệm (Trang 62)
5.	Mục 3.2.4.4 cho thấy tỉ lệ phân giải polysaccharide từ nấm sợi bởi chế phẩm α-amylase dao động từ 2 đến 14% (trang 105-106). Thông thường, các prebiotic không bị thủy phân bởi α-amylase trong hệ tiêu hóa. Do đó, cần giải thích và biện luận thêm về kết quả đã thu được.	Thành phần chính tạo nên đặc tính prebiotic của polysaccharide từ nấm là các β-glucan (chủ yếu mang liên kết β-(1,3) và β-(1,6)). Các liên kết β này hoàn toàn không bị nhận diện và thủy phân bởi α-amylase (vốn chỉ cắt liên kết α-(1,4) glycosidic). Tuy nhiên, trong vách tế bào và nội bào của hệ sợi nấm luôn tồn tại một tỷ lệ nhất định các α-glucan (như glycogen nấm) đóng vai trò là nguồn carbon dự trữ. Tỷ lệ 2 – 14% bị phân giải thực chất là quá trình enzyme α-amylase cắt đứt cấu trúc của các α-glucan dự trữ nội tại được chiết xuất ra này, chứ không phải phá vỡ khung β-glucan mang hoạt tính (Trang 109).
6.	Việc đề xuất quy trình chế biến nước uống nấm bào ngư bổ sung sinh khối nấm vân chi (trang 126) là không cần thiết vì mục tiêu luận án không có mục đề xuất quy trình. Hơn nữa, một số công đoạn trong quy trình chưa được nghiên cứu để tối ưu hóa các thông số công nghệ.	Đã loại bỏ kết quả đề xuất quy trình chế biến nước uống nấm bào ngư bổ sung sợi nấm Vân chi khỏi luận án.
II.2.	**1. Phản biện 1: PGS.TS. Nguyễn Quang Vinh**	
1.	Khái niệm prebiotic lần đầu được giới thiệu năm 1999" ([36] chương sách năm 1999, không phải công bố gốc đầu tiên về khái niệm prebiotic), cần sửa thành năm 1995 và bổ sung đúng tài liệu gốc của Gibson và Roberfroid (Glenn R. Gibson, Marcel B. Roberfroid, Dietary	Đã chỉnh sửa lại chính xác khái niệm prebiotic lần đầu được giới thiệu năm 1995 và bổ sung đúng tài liệu gốc của Gibson và Roberfroid (Glenn R. Gibson, Marcel B. Roberfroid, Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, The Journal of

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, The Journal of Nutrition, Volume 125, Issue 6, 1995, Pages 1401-1412);	Nutrition, Volume 125, Issue 6, 1995, Pages 1401-1412 (Trang 12)
2.	Phần dẫn nghiên cứu LED xanh trong nuôi cấy *C. militaris* cần sửa vì nội dung diễn giải chưa khớp với tài liệu [14] vì bài báo nghiên cứu trên môi trường bán rắn không liên quan đến nuôi cấy dịch thể.	Đã loại bỏ phần dẫn nghiên cứu LED xanh trong nuôi cấy *C. militaris* (Trang 2)
3.	Các tài liệu [157] và [158] là bài đã bị rút lại, không nên sử dụng làm cơ sở thảo luận kết quả.	Đã loại bỏ phần lý luận và tài liệu này khỏi luận án.
4.	Danh mục tài liệu tham khảo còn có một số tài liệu trùng lặp hoặc gần trùng lặp cần gộp, như [45]/[50], [47]/[48], [29]/[49], [43]/[80], [54]/[195], [19]/[203], [175]/[185] và [129]/[215]. Nghiên cứu sinh cần rà soát toàn bộ danh mục tài liệu tham khảo, loại bỏ các mục trùng, thay thế các tài liệu không còn hiệu lực khoa học, bổ sung đầy đủ thông tin thư mục và bảo đảm mỗi trích dẫn được sử dụng đúng với nội dung mà tài liệu gốc hỗ trợ.	Đã gộp tất cả các tài liệu trùng lặp, loại bỏ các tài liệu không còn hiệu lực khoa học.
5.	Cần giới hạn đúng phạm vi đóng góp: luận án chưa chứng minh cấu trúc phân tử chi tiết của PS, chưa phát hiện polysaccharide mới và chưa có dữ liệu *in vivo* hoặc lâm sàng. Vì vậy, kết quả mới nên được xác định là bằng chứng thực nghiệm mới về tiềm năng prebiotic *in vitro* và khả năng ứng dụng ban đầu của polysaccharide/sinh khối hệ sợi nấm trong thực phẩm bổ sung, không nên diễn đạt thành hiệu quả sinh lý hay khả năng thương mại hóa đã được chứng minh đầy đủ.	Đã tiếp thu và rà soát toàn bộ luận án để giới hạn đúng phạm vi nghiên cứu. Đã chỉnh sửa các khẳng định về "hiệu quả sinh lý" thành "bằng chứng thực nghiệm về tiềm năng prebiotic *in vitro*"; đồng thời chuyển cụm từ "thương mại hóa" thành "khả năng ứng dụng ban đầu trong thực phẩm bổ sung" (Trang 5)
6.	Cần rút gọn, giảm các khẳng định quá rộng về lợi ích sức khỏe, làm rõ hơn	Đã viết lại mục tiêu và khoảng trống nghiên cứu, nhấn mạnh phạm vi luận án dừng ở

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	khoảng trống nghiên cứu và xác định đúng phạm vi đóng góp của luận án là đánh giá tiềm năng prebiotic *in vitro* của polysaccharide từ hệ sợi nấm và bước đầu ứng dụng sinh khối trong thực phẩm bổ sung.	việc đánh giá tiềm năng *in vitro* của polysaccharide (PS) hệ sợi nấm (tảng 131-132).
7.	Chương 1 còn thiếu một phần tổng quan làm nền cho nội dung ứng dụng sản phẩm nước nấm Bào ngư lên men bổ sung sinh khối hệ sợi *T. versicolor*. Cần bổ sung ngắn gọn cơ sở lựa chọn nền sản phẩm, vai trò của *L. plantarum*, các tiêu chí cảm quan, an toàn, khả năng sống sót của probiotic và tính ổn định sản phẩm.	Đã bổ sung tổng quan ngắn gọn về cơ sở lựa chọn nền nấm bào ngư lên men và vai trò của *L. plantarum* trong chương 1 (Trang 42 - 45).
8.	Trang 48. Mô tả cấy giống bằng cách "chia nhỏ hệ sợi nấm trong đĩa thành phần bằng nhau 0.5x0.5 cm" và "1 đĩa gốc/cấp 1 có thể cấy được 25-30 bình dịch" là thiếu tính chuẩn xác. Cần làm rõ điều kiện nuôi tĩnh/lắc và định lượng chính xác lượng giống cấy.	Đã xoá mô tả thiếu chuẩn xác và bổ sung điều kiện nuôi tĩnh, lắc (Trang 48).
9.	Kiểm tra lại thông tin giữa văn bản và bảng bố trí thí nghiệm OFAT của *C. militaris* (Bảng 2.2) và *T. versicolor* (Bảng 2.3) cho chính xác.	Đã kiểm tra đồng nhất lại thông tin trong văn bảng và bảng bố trí thí nghiệm (Trang 49 và 50).
10.	Trình bày đúng nguyên tắc phương pháp phenol-sulfuric là xác định carbohydrate/PS thô quy đổi theo glucose, không xem đây là hàm lượng polysaccharide tinh khiết.	Đã bổ sung chính xác mẫu PS là PS thô (54).
11.	Bổ sung bước khử muối (desalting) sau bước dùng HCl và NH_3 để trung hòa, tránh làm sai lệch khối lượng PS thô thu được hoặc nêu giới hạn của phương pháp	Đã bổ sung giới hạn của phương pháp (Trang 56).
12.	PS đem thử hoạt tính đều ở dạng thô. Cần đánh giá tỷ lệ tạp chất (protein, polyphenol) để không quy kết toàn bộ hoạt tính sinh học là do polysaccharide.	*Trong nghiên cứu này thực chất là các phân đoạn polysaccharide thô. Việc không tinh sạch hoàn toàn và chưa định lượng cặn kẽ tỷ lệ protein/polyphenol đồng chiết là

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
		một giới hạn của nghiên cứu ở giai đoạn này. Tuy nhiên, tác giả xin phép được giải trình thêm về định hướng sử dụng mẫu thô này: - Trong sợi nấm, nhiều polysaccharide không tồn tại độc lập mà liên kết cộng hóa trị với protein tạo thành các phức hệ glycoprotein hoặc proteoglycan. Việc cố gắng loại bỏ hoàn toàn protein (ví dụ bằng phương pháp Sevag) đôi khi làm đứt gãy cấu trúc tự nhiên và làm giảm đáng kể hoạt tính sinh học nguyên bản của nấm. Mặc khác, các nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng, trong các ứng dụng thực phẩm chức năng các phân đoạn polysaccharide thô thường cho hoạt tính sinh học (như kháng oxy hóa, prebiotic) cao hơn so với polysaccharide tinh sạch nhờ tác dụng hiệp đồng với các hợp chất vi lượng đi kèm như polyphenol và peptid. Việc giữ nguyên dạng thô phù hợp với định hướng ứng dụng trực tiếp làm nguyên liệu tạo màng, bổ sung vào đồ uống lên men (Kombucha, nước uống nấm), giúp tối ưu hóa chi phí sản xuất thay vì phải trải qua các bước tinh chế phức tạp bằng sắc ký. * Để đảm bảo tính chặt chẽ về mặt khoa học theo đúng góp ý của Hội đồng, tác giả đã tiến hành chỉnh sửa trong bản thảo như sau: + Thay đổi tất cả thuật ngữ từ polysaccharide thành polysaccharide thô ở tất cả các mục thử nghiệm hoạt tính. + Bổ sung bàn luận khẳng định: Hoạt tính sinh học ghi nhận được là kết quả tác dụng tổng hợp của hệ phức hệ giàu polysaccharide, trong đó không loại trừ sự đóng góp của các protein và polyphenol đồng kết tủa.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
		+ Đưa việc định lượng tạp chất (đo hàm lượng protein bằng Bradford/Lowry, đo polyphenol bằng Folin-Ciocalteu) và tinh chế qua cột sắc ký trao đổi ion thành định hướng nghiên cứu tiếp theo (Trang 132).
13.	Việc đo mật độ quang ở 600 nm để tính chỉ số Prebiotic sẽ bị nhiễu do độ đục nền của môi trường chứa chiết xuất PS. Cần giải trình cách loại trừ nhiễu nền hoặc dùng phương pháp đếm khuẩn lạc (CFU/mL) để đối chứng.	Để kiểm soát và loại trừ sai số này, trong quá trình thực nghiệm, nghiên cứu đã dùng kỹ thuật trừ giá trị nền kết hợp với mẫu chứng trắng. Cụ thể, sinh khối vi khuẩn thực tế tại mỗi thời điểm được xác định bằng độ chênh lệch mật độ quang (ΔOD_{600}) giữa thời điểm đánh giá (t) và thời điểm ngay sau khi cấy (t_0). Bên cạnh đó, các ống môi trường chứa phân đoạn PS (không cấy khuẩn) cũng được ủ song song để làm mẫu blank, giúp loại trừ hoàn toàn sự cộng gộp quang học gây ra bởi màu sắc và các vi hạt lơ lửng của hệ PS thô.
14.	Cần kiểm tra và thống nhất phần phương pháp SCFAs. Luận án nêu hệ Agilent 1200, detector RI, cột Aminex HPX87H, pha động H_2SO_4 3mM, tốc độ dòng 0,6 mL/phút, nhiệt độ buồng là 50^0C (trang 61); trong khi công trình công bố kèm theo có mô tả HPLC-UV với cột Phenomenex C18 và pha động acetonitrile/H_2SO_4 5mM, tốc độ dòng 1 mL/phút, không đề cập nhiệt độ.	Tác giả xác nhận phương pháp thực tế được sử dụng để định lượng SCFAs và cũng là phương pháp đã được bình duyệt trong bài báo công bố là hệ thống HPLC-UV, sử dụng cột Phenomenex C18, pha động acetonitrile/H_2SO_4 5mM, tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột duy trì ở 30°C. Đã chỉnh sửa mô tả đúng phương pháp sắc ký đã dùng trong nghiên cứu này (mục d trang 65)
15.	Các mô hình hồi quy đã loại bỏ các hệ số tương tác do không có ý nghĩa thống kê, nhưng các hình bề mặt đáp ứng vẫn được gọi là "ảnh hưởng tương tác…", dễ gây hiểu nhầm; nên đổi thành "ảnh hưởng kết hợp" hoặc "bề mặt đáp ứng của hai yếu tố". Đồng thời, cần bổ sung đầy đủ các chỉ số đánh giá mô hình như R^2, R^2 hiệu chỉnh, R^2 dự đoán, phân tích phần dư và sai số dự đoán – thực nghiệm; đồng thời diễn đạt thận trọng hơn đối với lack-of-	Đã chỉnh sửa tên các mô hình thành ảnh hưởng kết hợp (Trang 71/79). Đã sửa lại diễn đạt thận trọng hơn đối với lack-of-fit (Trang 71).

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	fit, nhất là khi p-value của một số mô hình gần ngưỡng 0,05 và số bậc tự do của pure error còn thấp.	
16.	Phần kiểm chứng điều kiện tối ưu cần trình bày rõ giá trị dự đoán, giá trị thực nghiệm, sai số tuyệt đối và sai số tương đối cho cả sinh khối và hàm lượng PS. Các nhận định như "mô hình phản ánh rất trung thực", "độ tin cậy cao" hoặc "khẳng định tính khả thi sản xuất quy mô lớn" cần được tiết chế, vì kết quả hiện mới chứng minh sự phù hợp của mô hình trong phạm vi khảo sát ở quy mô phòng thí nghiệm. Nên diễn đạt theo hướng: kết quả tối ưu hóa là cơ sở ban đầu cho nghiên cứu mở rộng quy mô nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối hệ sợi nấm giàu polysaccharide.	Đã bổ sung các giá trị dự đoán, thực nghiệm, sai số tuyệt đối và sai số tương đối cho sinh khối và hàm lượng PS. Đồng thời đã loại bỏ các nhận định như "mô hình phản ánh rất trung thực", "độ tin cậy cao" hoặc "khẳng định tính khả thi sản xuất quy mô lớn" và diễn đạt lại theo hướng: kết quả tối ưu hóa là cơ sở ban đầu cho nghiên cứu mở rộng quy mô nuôi cấy dịch thể nhằm thu nhận sinh khối hệ sợi nấm giàu polysaccharide (Trang 76/83)
17.	**Mục 3.2.1.** SEM chỉ phản ánh hình thái bề mặt, không đủ để kết luận về cấu trúc phân tử polysaccharide; do đó cần tránh diễn giải sâu về mối liên hệ cấu trúc–hoạt tính khi chưa có dữ liệu FTIR, NMR, khối lượng phân tử, thành phần monosaccharide hoặc liên kết glycoside. Cần loại bỏ các cụm từ suy diễn như "cho thấy mức độ phân nhánh cao hơn". Chỉ giới hạn nhận xét ở góc độ "độ xốp bề mặt", "kích thước cụm kết tụ" vì hình thái bề mặt quan sát được dưới SEM là kết quả tổng hợp của cấu trúc polymer và quá trình sấy thăng hoa/kết tủa, đồng thời khẳng định SEM chỉ là bước đánh giá ngoại quan sơ bộ; cần đọc kỹ lại hình ảnh của mẫu S-PST và A-PST để viết lại phần giải thích sự tác động của acid/kiềm sao cho khớp với hình ảnh thực tế của luận án (Trang 84).	Đã loại bỏ các cụm từ suy diễn như "cho thấy mức độ phân nhánh cao hơn" và đã mô tả lại hình ảnh (trang 85 và 86).
18.	Hàm lượng PS xác định bằng phương pháp màu nên được diễn giải là PS	Đã sửa lại PS thành PS thô trong phương pháp chiết xuất (Trang 55).

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	thô/carbohydrate tổng quy đổi, không nên xem như polysaccharide tinh khiết vì phương pháp này không loại hoàn toàn protein, peptide…	
19.	Phép thử ABTS, cần dùng cách diễn đạt "khả năng trung hòa gốc ABTS" thay vì khái quát thành hoạt tính chống oxy hóa toàn diện. Đồng thời, cần biện luận sâu hơn về nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt về kết quả của các phân đoạn PS thô và không gán chủ yếu cho PS vì hiện tại chưa minh chứng cho việc loại các thành phần khác có mặt trong PS thô đặc biệt là protein, peptide, polyphenol…	Đã diễn đạt là khả năng trung hoà gốc tự do ABTS (Trang 91-92)
20.	Phần thảo luận hiện có một số nhận định quá rộng về lợi ích sức khỏe, ví dụ liên hệ SCFAs với giảm bệnh đường tiêu hóa, ung thư, tim mạch hoặc các liệu pháp dựa trên probiotic. Các ý này có thể đúng trong bối cảnh tài liệu, nhưng luận án chỉ đo SCFAs trong môi trường nuôi cấy *in vitro* sau 24 giờ; do đó không nên diễn giải như hiệu quả sinh lý. Nên chuyển sang cách viết: "sự gia tăng SCFAs là bằng chứng hỗ trợ khả năng các phân đoạn PS được lên men bởi probiotic trong điều kiện *in vitro*".	Đã loại bỏ nhận định quá rộng về lợi ích sức khỏe của SCFAs trong thảo luận (Trang 106).
21.	**Phần kháng phân giải bởi α-amylase** cách gọi "khả năng kháng tiêu hóa" cần điều chỉnh (đặc biệt ở đây chỉ sử dụng α-enzyme có nguồn gốc từ *Bacillus subtilis* không đại diện cho α-enzyme từ tuyến nước bọt) nên chưa đủ cơ sở để khẳng định vì vậy cần nêu các giới hạn của phương pháp. Đồng thời, thí nghiệm chỉ mô phỏng bước α-amylase, không đại diện đầy đủ cho tiêu hóa người, vốn bao gồm điều kiện dạ dày với pH acid và pepsin, điều kiện ruột non với pancreatin, muối mật, enzyme bờ bàn chải và thời	- Đã chỉnh sửa khả năng kháng tiêu hóa thành khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase *in vitro* (Trang 107-108). - Trong phương pháp đã sử dụng đầy đủ mẫu trắng trước phản ứng enzyme và mẫu bất hoạt enzyme để hiệu chỉnh nền.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	gian lưu khác nhau. Do đó, nên đổi thành "khả năng kháng thủy phân bởi α-amylase *in vitro*" hoặc "một chỉ dấu ban đầu về khả năng kháng tiêu hóa", tránh khẳng định "kháng tiêu hóa cao" theo nghĩa toàn bộ hệ tiêu hóa. Ngoài ra, cần làm rõ phương pháp DNS đo đường khử có thể bị ảnh hưởng bởi đường khử sẵn có trong mẫu PS thô. Vì vậy, cần có mẫu trắng trước phản ứng enzyme và mẫu bất hoạt enzyme để hiệu chỉnh nền.	
22.	**Mục 3.2** có giá trị khoa học và cung cấp dữ liệu quan trọng cho luận án, nhưng cần tiết chế các kết luận quá mạnh như "hoạt tính prebiotic rõ rệt", "cơ sở vững chắc" hoặc "lợi ích sức khỏe". Cách diễn đạt phù hợp hơn là: các phân đoạn PS từ hệ sợi nấm cho thấy tiềm năng prebiotic *in vitro*, cần tiếp tục được xác nhận bằng phân tích cấu trúc sâu, mô hình tiêu hóa–lên men phức hợp và nghiên cứu *in vivo*.	Đã chỉnh sửa các kết luận quá mạnh như "hoạt tính prebiotic rõ rệt", "cơ sở vững chắc" hoặc "lợi ích sức khỏe" và thay bằng các diễn đạt phù hợp hơn (101/130).
23.	**Mục 3.3.** Một điểm cần làm rõ là sự chưa thống nhất giữa kết quả mật độ *L. plantarum* rất cao ở Bảng 3.13 và kết quả "không phát hiện tổng số vi sinh vật hiếu khí" ở Bảng 3.17. Luận án cần giải thích trạng thái sản phẩm gửi kiểm nghiệm là sản phẩm còn probiotic sống hay đã được xử lý sau lên men. Nếu sản phẩm đã qua xử lý làm mất vi khuẩn sống, cần tránh gọi sản phẩm thành phẩm là "giàu probiotic". Nếu được nên kiểm tra cả 2 sản phẩm để minh chứng cho sản phẩm lên men có tiềm năng ức chế vi khuẩn kiểm nghiệm trong sản phẩm thực tế.	Luận án đã sử dụng mẫu sản phẩm gửi kiểm nghiệm là sản phẩm đã được thanh trùng sau lên men nên kết quả 3.17 không phát hiện vi sinh vật hiếu khí. Còn ở bảng 3.13 là kết quả đánh giá mật độ vi sinh lên men sau 24 giờ lên men.
24.	Thống nhất thuật ngữ "độ acid tổng số/tổng acid tính theo acid lactic" và diễn đạt thận trọng hơn về "thực phẩm hỗ trợ sức khỏe" hoặc "giàu hoạt tính sinh học".	Đã thống nhất sử dụng thuật ngữ độ acid tổng số và diễn đạt thận trọng hơn thay thế các thuật ngữ "thực phẩm hỗ trợ sức khỏe" hoặc "giàu hoạt tính sinh học (Trang 125).

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
25.	Kết luận và kiến nghị cần diễn đạt lại theo 3 mục tiêu của luận án thì kết luận sẽ rõ ràng hơn. Đồng thời cần chỉnh sửa văn phong theo hướng khoa học hơn, giảm các khẳng định vượt quá phạm vi dữ liệu, thống nhất thuật ngữ "tiềm năng prebiotic *in vitro*", "khả năng trung hòa gốc ABTS", "hình thái bề mặt" và "kháng thủy phân bởi α-amylase". Phần kiến nghị nên tập trung hơn vào các giới hạn cốt lõi của luận án, gồm phân tích cấu trúc PS, kiểm chứng prebiotic ở mô hình sinh học phù hợp, đánh giá ổn định sản phẩm và nghiên cứu mở rộng quy mô.	Kết luận đã chia lại theo 3 tiểu mục rõ ràng theo 3 nội dung. Đồng thời đã chỉnh sửa rút gọn chỉnh sửa văn phong khoa học hơn. Đã thống nhất lại các thuật ngữ ngữ "tiềm năng prebiotic *in vitro*", "khả năng trung hòa gốc ABTS", "hình thái bề mặt" và "kháng thủy phân bởi α-amylase". Phần kiến nghị đã rút gọn và tập trung vào các giới hạn cốt lõi của đề tài (Trang 130).
26.	Cần rà soát lại toàn bộ lỗi chính tả, lỗi đánh máy và lỗi diễn đạt; tránh diễn đạt quá mức so với kết quả của luận án; Các tên Latin cần viết nghiêng, các từ *in vitro*, *in vivo* cần viết nghiêng; rà soát lại tính xác thực của tài liệu và tính phù hợp của nội dung trích dẫn được sử dụng trong luận án.	Đã rà soát lại toàn bộ lỗi chính tả, lỗi đánh máy, lỗi diễn đạt quá mức, viết nghiêng tất cả tên Latin, các từ *in vitro*, *in vivo*.
II.3.	**Ủy viên phản biện 2: PGS.TS. Võ Văn Quốc Bảo**	
1.	Không nên sử dụng các trang thông tin phổ thông như Healthline làm nguồn khoa học trong luận án tiến sĩ. Các nội dung này cần được thay bằng bài báo nghiên cứu gốc, tổng quan hệ thống hoặc tài liệu từ tổ chức chuyên môn.	Đã xoá bỏ các thông tin trích dẫn từ Heathline (Trang 41)
2.	Danh pháp vi sinh vật chưa chính xác và chưa thống nhất. "Bifidobacteria animalis" phải sửa thành Bifidobacterium animalis; "Pediococci acidilactici" phải sửa thành Pediococcus acidilactici; tên loài phải được in nghiêng và viết hoa đúng quy ước	Đã chỉnh sửa chính xác tên vi sinh vật trang 44/57

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
3.	Phần ứng dụng sản phẩm mới chỉ thử nghiệm bổ sung bột sinh khối thô *T. versicolor.* NCS nên giải thích rõ hơn lý do tại sao không thử nghiệm ứng dụng đối với sinh khối *C. militaris* trong thực phẩm uống lên men này dù năng suất thu nhận sinh khối của *C. militaris* cao hơn rất nhiều.	Đã bổ sung lý do lựa chọn: *T. versicolor* có tính ổn định giống cao hơn, ít bị thoái hóa khi nuôi cấy liên tục so với *C. militaris*. Bên cạnh đó, *T. versicolor* có tính ổn định cao và khả năng sinh trưởng ở dải nhiệt độ thuận lợi hơn, giúp tối ưu hóa chi phí, giảm thiểu rủi ro nhiễm chéo và dễ dàng kiểm soát khi mở rộng quy mô lên men công nghiệp. Về mặt giá trị sinh học, phân đoạn PS thu nhận từ *T. versicolor* thể hiện năng lực chống oxy hóa mạnh mẽ hơn so với *C. militaris* trong cùng hệ điều kiện. Vì vậy, sợi nấm *T. versicolor* được chọn làm nghiên cứu ứng dụng bổ sung vào quy trình chế biến nước nấm bào ngư lên men trong nghiên cứu này (Trang 112).
II.4.	**Ủy viên phản biện 3: GS.TS. Trần Thanh Trúc**	
1.	Phần đặt vấn đề còn một số phát biểu rộng về bệnh mạn tính, ung thư, miễn dịch và lợi ích sức khỏe. Cần rút gọn và tập trung vào khoảng trống nghiên cứu về polysaccharide từ hệ sợi nấm, tiêu chí prebiotic và ứng dụng trong thực phẩm.	Đã chỉnh sửa rút gọn một số phát biểu rộng về bệnh mạn tính, ung thư, miễn dịch và lợi ích sức khỏe (Trang 1).
2.	Cần trình bày cân bằng hơn giữa ưu điểm và giới hạn của chiết tuần tự HWE–AE–AEc, nhất là nguy cơ thủy phân, khử acetyl, biến đổi khối lượng phân tử hoặc làm thay đổi hoạt tính khi tiếp xúc với kiềm và acid.	Đã bổ sung: quá trình chiết acid (HCl) và kiềm (Na_2CO_3) tuy tăng hiệu suất nhưng có nguy cơ gây đứt gãy mạch phân tử polymer, làm giảm khối lượng phân tử và thay đổi cấu trúc không gian của PS thô (Trang 29).
3.	Tổng quan về phần sản phẩm cần nhấn mạnh cơ sở lựa chọn nền dịch chiết nấm Bào ngư, vai trò của *L. plantarum*, tính sống của probiotic, độ ổn định và yêu cầu cảm quan của đồ uống lên men.	Đã bổ sung tổng quan ngắn về cơ sở lựa chọn dịch nền nấm bào ngư và vai trò của *L. plantarum* (Trang 42 - 45)
4.	Làm rõ ba lần lặp ở từng thí nghiệm là ba mẻ nuôi cấy/chiết xuất/lên men độc lập hay lặp phân tích trên cùng một mẻ.	Các thí nghiệm đều được thực hiện lặp lại trên 3 mẻ nuôi cấy/chiết xuất/lên men hoàn toàn độc lập.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
5.	Đối với phương pháp phenol–sulfuric và DNS, cần mô tả đầy đủ mẫu trắng, mẫu nền, khả năng nhiễu của đường tự do và cách hiệu chỉnh.	Đã bổ sung mô tả cho 2 phương pháp (Trang 55/64). - Phương pháp phenol–sulfuric + Mẫu trắng: Nước cất (thể tích bằng với thể tích mẫu thử) + dung dịch Phenol + H_2SO_4 đặc. + Mẫu nền: Dịch chiết mẫu + Nước cất (thay cho dung dịch Phenol) + H_2SO_4 đặc. + Khả năng nhiễu của đường tự do: Thuốc thử Phenol-Sulfuric phản ứng với *tất cả* các loại carbohydrate (đường đơn, đường đôi, oligo và polysaccharide). Nếu mục tiêu là định lượng riêng Polysaccharide (ví dụ: EPS hoặc IPS), sự hiện diện của các đường tự do (glucose, fructose, sucrose) còn sót lại trong dịch lên men hoặc dịch chiết tế bào sẽ cộng gộp vào kết quả, gây sai số dương rất lớn. + Cách hiệu chỉnh: $OD_{thực\ tế} = OD_{mẫu\ thử} - OD_{mẫu\ nền}$ - Phương pháp DNS + Mẫu trắng: Nước cất + Thuốc thử DNS. Hỗn hợp được đun sôi 5-10 phút và làm nguội tương tự như mẫu thử. + Mẫu nền: Dịch chiết mẫu + Nước cất (thay cho thuốc thử DNS). Hỗn hợp cũng phải được đun sôi và làm nguội như mẫu thử nghiệm. + Khả năng nhiễu: DNS không đặc hiệu 100% cho đường. Các chất có tính khử mạnh trong dịch chiết thực vật hoặc nấm (như vitamin C, polyphenol, tannin, hoặc các protein có chứa nhóm thiol) cũng có thể khử DNS, làm tăng khống kết quả định lượng đường. + Cách hiệu chỉnh: Cách hiệu chỉnh: $OD_{thực\ tế} = OD_{mẫu\ thử} - OD_{mẫu\ nền}$
6.	Đối với SCFAs, cần nêu rõ đường chuẩn, giới hạn định lượng, hiệu suất thu hồi, mẫu trắng môi trường và cách tính phần	Định lượng bằng cách chạy song song các chất chuẩn acetate, propionate, butyrate thương mại để xây dựng đường chuẩn.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	SCFA hình thành do sử dụng phân đoạn PS.	Lượng SCFA hình thành được tính toán dựa trên diện tích peak HPLC.
7.	Đối với kháng khuẩn của dịch nuôi *L. plantarum*, cần phân biệt ảnh hưởng của pH/acid hữu cơ với bacteriocin, hydrogen peroxide hoặc các chất chuyển hóa khác; nếu chưa có thí nghiệm trung hòa pH và xử lý enzyme thì không nên kết luận cơ chế.	Khả năng kháng khuẩn trong nghiên cứu này là tác động tổng hợp của việc giảm pH (do sinh acid lactic, SCFAs) và sự cạnh tranh dinh dưỡng chưa thực hiện thí nghiệm trung hòa pH. Luận án đã điều chỉnh không quy kết cơ chế ức chế là do bacteriocin (Trang 111/113).
8.	Không nên gọi các phân đoạn là polysaccharide tinh sạch hoặc suy luận cấu trúc chi tiết khi chưa có số liệu độ tinh sạch, thành phần monosaccharide, FTIR/NMR, khối lượng phân tử và kiểu liên kết.	Đã chỉnh sửa và làm rõ các phân đoạn PS là PS thô (Trang 59).
9.	Cần diễn giải thận trọng nhận định phân đoạn acid có hoạt tính tốt nhất, vì quy trình chiết tuần tự không tách riêng hoàn toàn ảnh hưởng của dung môi, thứ tự xử lý và sự biến đổi hóa học của mẫu.	Hoạt tính cao của phân đoạn acid có thể do quá trình xử lý làm phân mảnh mạch polymer, phơi bày các nhóm chức phản ứng, đồng thời là kết quả tổng hợp của dung môi chứ không hoàn toàn do bản chất cấu trúc nguyên bản.
10.	Cần giải thích rõ sự tương thích giữa mật độ *L. plantarum* cao trong quá trình lên men với kết quả kiểm nghiệm tổng số vi sinh vật hiếu khí của sản phẩm; nêu rõ mẫu gửi kiểm nghiệm là sản phẩm còn tế bào sống hay đã xử lý sau lên men.	Mẫu gửi kiểm nghiệm là sản phẩm đã thanh trùng sau quá trình lên men. Đã bổ sung rõ mẫu kiểm nghiệm là sản phẩm đã thanh trùng (Trang 124).
11.	Các cụm "sản phẩm giàu probiotic", "đạt tiêu chuẩn", "sẵn sàng chuyển giao" hoặc "thương mại hóa" cần giảm mức khẳng định nếu chưa có dữ liệu ổn định nhiều lô, thời hạn sử dụng và đánh giá người tiêu dùng	Đã chỉnh sửa loại bỏ các cụm khẳng định cụm "sản phẩm giàu probiotic", "đạt tiêu chuẩn", "sẵn sàng chuyển giao" hoặc "thương mại hóa" (Trang 132)
12.	Phần đóng góp mới nên dùng các cụm "xác lập điều kiện", "cung cấp bộ dữ liệu", "chứng minh tiềm năng in vitro" và "bước đầu ứng dụng"; không nên dùng "làm sáng tỏ cấu trúc", "phát triển thành	Đã chỉnh sửa sử dụng các cụm từ phù hợp (Trang 132)

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	công sản phẩm thương mại" hoặc "chứng minh hiệu quả sức khỏe".	
13.	Tiếp tục rà soát lỗi chính tả, thống nhất thuật ngữ polysaccharide/polysaccharides, prebiotic/probiotic, kháng oxy hóa/chống oxy hóa, ký hiệu P/p, đơn vị, tên loài in nghiêng và cách đánh số bảng/hình.	Đã rà soát thống nhất thuật ngữ polysaccharide (không thêm s) Toàn bộ tên chi và loài của nấm, vi khuẩn đã được rà soát để đảm bảo in nghiêng chuẩn xác 100% trong cả phần nội dung chữ, bảng biểu, hình ảnh và danh mục tài liệu tham khảo.
II.5.	**Ủy viên hội đồng: TS. Nguyễn Thị Đông Phương**	
1.	Cần rà soát và sửa các lỗi chính tả, lỗi in nghiêng tên khoa học (mục 1.1), thống nhất thuật ngữ (polysaccharide) và bổ sung các từ viết tắt (OFAT ở Bảng 2.2, 2.3; DNS; môi trường PDB...) vào danh mục.	Đã rà soát sửa lỗi chính tả, lỗi in nghiêng tên khoa học, thống nhất sử dụng polysaccharide thay vì polysaccharides toàn cuốn. Đã bổ sung các từ viết tắt còn thiếu (OFAT, DNS, PDB…) vào danh mục viết tắt.
2.	Cần đối chiếu và lược bỏ mục 1.3.3 trong bản tóm tắt vì nội dung này không tồn tại trong bản toàn văn.	Đã rà soát chỉnh sửa thống nhất toàn văn và tóm tắt.
3.	Trong phần ý nghĩa thực tiễn, nên điều chỉnh thành "sản phẩm nước nấm lên men sở hữu hoạt tính sinh học kháng khuẩn và kháng Oxi hoá" thay vì "prebiotic". Nguyên nhân là nghiên cứu mới chỉ đánh giá in vitro chiết xuất PS để khẳng định tiềm năng prebiotic, và trong quá trình lên men, PS của sợi nấm có thể bị *L. plantarum* sử dụng làm cơ chất khiến hoạt tính prebiotic suy giảm và chuyển thành dạng symbiotic.	Đã chỉnh sửa sản phẩm nước nấm lên men sở hữu hoạt tính sinh học kháng khuẩn và kháng Oxi hoá" thay vì "prebiotic" trong phần mục tiêu (Trang 5).
4.	Cần thống nhất điều kiện nuôi cấy dịch thể (như hàm lượng glucose, cao nấm men) cho tương đương với các thí nghiệm cụ thể đã tiến hành.	Đã chỉnh sửa đồng nhất các điều kiện nuôi cấy trong phương pháp và kết quả (51/52).
5.	Sửa lại tên loại nấm đang bị nhầm lẫn trong Bảng tóm tắt bố trí thí nghiệm 2.2 và 2.3	Đã chỉnh sửa lại (Trang 49/50)

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
6.	Cần bổ sung cách tính giá trị IC50 cho phương pháp đánh giá khả năng kháng oxy hóa, đồng thời đưa phần kết quả xử lý số liệu này vào phụ lục.	Đã bổ sung cách tính IC50 cho phương pháp đánh giá khả năng kháng oxi hoá (Trang 56)
7.	Đối với ứng dụng lên men, cần ghi chú rõ dung dịch acid hoặc bazơ dùng để điều chỉnh pH phải là loại cấp thực phẩm.	Dung dịch HCl và NaOH được sử dụng để điều chỉnh pH trong các thí nghiệm lên men của đề tài đều là loại đạt tiêu chuẩn cấp thực phẩm. Đã bổ sung chú thích trong phương pháp (Trang 62)
8.	Cần kiểm tra lại Hình 3.1 vì các chữ cái a, b, c không đồng nhất với số liệu hiển thị trên biểu đồ.	Đã kiểm tra và chỉnh sửa chính xác chữ cái a,b,c ở hình 3.1 (trang 76)
9.	Việc chiết xuất tuần tự tạo ra các phân đoạn PS có màu sắc và cấu trúc khác nhau có ảnh hưởng đến phép đo mật độ quang (OD) khi đánh giá prebiotic không? Hội đồng e ngại các cấu trúc này có thể tạo thông số nhiễu (độ đục) hoặc gây kết tủa khi ủ 24 giờ.	Để kiểm soát và loại trừ sai số này, trong quá trình thực nghiệm, nghiên cứu đã dùng kỹ thuật trừ giá trị nền kết hợp với mẫu chứng trắng. Cụ thể, sinh khối vi khuẩn thực tế tại mỗi thời điểm được xác định bằng độ chênh lệch mật độ quang (ΔOD_{600}) giữa thời điểm đánh giá (t) và thời điểm ngay sau khi cấy (t_0). Bên cạnh đó, các ống môi trường chứa phân đoạn PS (không cấy khuẩn) cũng được ủ song song để làm mẫu blank, giúp loại trừ hoàn toàn sự cộng gộp quang học gây ra bởi màu sắc và các vi hạt lơ lửng của hệ PS thô.
10.	Phương pháp tham khảo đang dùng chưa phản ánh đúng khả năng kích thích sinh trưởng của các PS chiết xuất; nên thay bằng phương pháp đo khả năng sinh trưởng hoặc chỉ số đánh giá tiềm năng prebiotic.	Đã chỉnh sửa nội dung nghiên cứucủa phương pháp đo OD_{600} là đánh giá tiềm năng prebiotic (Trang 60)
11.	Tại sao phương pháp nghiên cứu quy định pH ban đầu của nước nấm bổ sung sinh khối *T. versicolor* là 6.5, nhưng khi đo pH thực tế trong quá trình lên men lại thay đổi xuống mức trung bình là 5?	Sự chênh lệch giữa pH thiết lập ban đầu trong phương pháp (6.5) và pH thực tế ghi nhận khi lên men (trung bình là 5.0) là do đã tiếp giống bằng dịch lỏng môi trường lên men trước đó.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
II.6.	**Ủy viên hội đồng: PGS.TS. Trịnh Đăng Mậu**	
1.	Đánh giá cấu trúc hóa học của polysaccharide mới dừng ở định lượng tổng số (Phenol-Sulfuric) và quan sát SEM; cần bổ sung phân tích FTIR, GPC/SEC (xác định khối lượng phân tử Mw), và GC-MS (xác định monosaccharide) để kết quả sâu sắc hơn.	Do những giới hạn khách quan về thời gian và thiết bị, chúng tôi chưa thể thực hiện và bổ sung các phân tích cấu trúc sâu (FTIR, GPC/SEC, GC-MS) vào bản thảo hiện tại. Thay vào đó, tiếp thu ý kiến của hội đồng, chúng tôi đã đưa nội dung này vào phần Hạn chế của đề tài và Đề xuất hướng nghiên cứu tiếp theo tại trang 131 và 132.
2.	Thử nghiệm kháng tiêu hóa chỉ dùng duy nhất enzyme α-amylase là quá đơn điệu và chưa đủ căn cứ; cần áp dụng quy trình tiêu hóa mô phỏng liên hoàn 3 giai đoạn (miệng, dạ dày, ruột non) như mô hình INFOGEST. Hơn nữa, việc xử lý bằng HCl không thể làm biến đổi cấu hình liên kết beta đặc trưng của vách tế bào nấm sang liên kết alpha để trở nên nhạy cảm hơn với alpha-amylase.	Về việc áp dụng mô hình tiêu hóa mô phỏng INFOGEST. Tác giả nhìn nhận đây là một giới hạn thực nghiệm của luận án. Chúng tôi đã bổ sung nội dung "Tiến hành đánh giá đặc tính tiêu hóa của polysaccharide bằng mô hình tiêu hóa mô phỏng liên hoàn (INFOGEST) để khẳng định tính kháng tiêu hóa trong điều kiện sinh lý gần với cơ thể người nhất" vào phần Kiến nghị của luận án (trang [Điền số trang]). Về mâu thuẫn hóa học dưới tác động của HCl và enzyme α-amylase. Về mặt hóa học, acid (HCl) chỉ có khả năng xúc tác thủy phân (cắt đứt) liên kết glycosidic thành các đoạn ngắn hơn (depolymerization), chứ hoàn toàn không thể làm đảo ngược cấu hình lập thể biến liên kết β thành liên kết α. Tác giả đã xóa bỏ các diễn đạt gây hiểu nhầm về việc "acid làm cơ chất nhạy cảm hơn với α-amylase". Hiện tượng tỷ lệ đường khử tăng nhẹ trong thực nghiệm đã được biện luận lại đúng bản chất hóa sinh: Việc xử lý bằng acid đã phá vỡ một phần ma trận cấu trúc không gian của polysaccharide, từ đó làm bộc lộ một lượng nhỏ các α-glucan nội bào dự trữ (glycogen nấm) hoặc oligosaccharide tạp chất vốn bị vùi lấp bên trong. Chính phần α-glucan (chứa liên kết α-1,4) vừa được giải phóng này mới bị α-

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
		amylase phân giải. Trong khi đó, mạch chính chứa các liên kết β (như β-1,3 hay β-1,6) mang đặc tính prebiotic của nấm vẫn hoàn toàn kháng lại sự thủy phân của enzyme này (Trang 109).
3.	Việc bố trí 3 điểm tâm là khá mỏng ($DF_{Pure\ Error}$ = 2), làm kiểm định Lack-of-Fit sát ngưỡng ý nghĩa (p=0,08). Cần giải thích lý do không có sự tương tác giữa các yếu tố (pH, glucose, cao nấm men) đối với sinh khối và PS, nguyên nhân có thể do tâm thực nghiệm bố trí sát điểm tối ưu nên ảnh hưởng tuyến tính đã chi phối từ 96 - 98%.	Mặc dù giá trị p của Lack-of-Fit đạt 0,08 (sát ngưỡng 0,05), nhưng về nguyên tắc thống kê (p > 0,05), điều này vẫn khẳng định mô hình không bị thiếu sự phù hợp (Lack-of-Fit is not significant). Do đó, hàm mục tiêu vẫn đảm bảo độ tin cậy để dự đoán điểm tối ưu. Tác giả đã bổ sung thêm giải thích không có sự tương tác có thể là do kết quả định vị tốt từ bước sàng lọc đơn yếu tố (OFAT) trước đó, tọa độ điểm tâm đã được bố trí rất sát với đỉnh tối ưu thực tế. Tại vùng không gian tiệm cận bão hòa này, các ảnh hưởng tuyến tính và ảnh hưởng bậc hai đã chi phối gần như hoàn toàn (đóng góp từ 96% - 98% vào sự biến thiên của mô hình). Bên cạnh đó về mặt sinh lý học, khi điều kiện môi trường đã ở trạng thái tối ưu, không có sự thiếu hụt dinh dưỡng hay stress cực đoan, nguồn carbon (glucose), nitrogen (cao nấm men) và pH đóng vai trò là các giới hạn độc lập. Chúng đi trực tiếp vào con đường sinh trưởng và sinh tổng hợp chuyển hóa thứ cấp của tế bào nấm mà không đòi hỏi sự bù trừ hay tạo ra các hiệu ứng hiệp đồng/đối kháng mạnh mẽ như ở các điều kiện nuôi cấy bất lợi (Trang 81).
4.	Cần tính lại IC50 của A-PSC trong Bảng 3.7 (số liệu hiện tại không phù hợp, A-PSC phải nhỏ hơn W-PSC) và nên áp dụng mô hình Log-Linear cho Bảng 3.8. Đánh giá giá trị IC50 > 2400 µg/mL của nấm *C. militaris* là "tương đồng" với mức 1150 µg/mL của nấm *P. eryngii* là thiếu chính xác về mặt định lượng. Tránh viết	Do có sự nhầm lẫn (đảo ngược vị trí) trong quá trình đối chiếu và nhập liệu giữa hai mẫu A-PSC và W-PSC. Chúng tôi đã rà soát, tính toán lại và cập nhật số liệu chính xác vào Bảng 3.7. Hiện tại, giá trị IC50 của A-PSC đã được điều chỉnh nhỏ hơn W-PSC, phản ánh đúng logic về mặt hoạt tính sinh học của hai phân đoạn này (Trang 91).

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
	"IC50 cao hơn" gây nhầm lẫn là tốt hơn; cần diễn đạt rõ rằng IC50 cao hơn chứng tỏ khả năng trung hòa gốc tự do yếu hơn so với chất chuẩn.	
5.	Kiểm tra lại cỡ mẫu ở Hình 3.13 và 3.14 là n=3 hay n=15 vì phương pháp ghi "lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 ống". Có sự mâu thuẫn trong lập luận khi mục 3.2.4.1 cho rằng acid phân cắt PS thành đoạn ngắn giúp lợi khuẩn "dễ sử dụng", nhưng mục 3.2.4.4 lại giải thích hiện tượng này làm enzyme alpha-amylase "dễ tác động hơn	Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập mỗi lần 15 mẫu. Tuy nhiên mỗi lần đo 5 mẫu nên lặp lại sinh học n = 15. Số liệu thể hiện là giá trị trung bình ± SD. Chúng tôi đã xóa bỏ kết luận "acid làm enzyme α-amylase dễ tác động hơn". Thay vào đó, hiện tượng tỷ lệ đường khử tăng lên một chút sau khi xử lý acid được giải thích lại đúng bản chất: Quá trình phân cắt vật lý bởi acid đã làm bộc lộ một lượng nhỏ các α-glucan nội bào dự trữ (glycogen nấm) hoặc tạp chất đường vốn bị vùi lấp bên trong cấu trúc phân tử. Chính phần α-glucan lộ ra này mới là cơ chất bị α-amylase phân giải, chứ không phải do các liên kết β-glycosidic bị chuyển đổi hay trở nên nhạy cảm với α-amylase (Trang 109).
6.	Mâu thuẫn văn bản ở phần hồi quy: đoạn 1 ghi "chủ động loại bỏ" tương tác hai chiều do p>0,05, nhưng đoạn 2 lại khẳng định "sự tương tác của chúng giải thích được hơn 96%". Cần sửa thành "các yếu tố đầu vào ở dạng tuyến tính và bậc hai giải thích được..."	Đã chỉnh sửa "Giá trị R^2 = 0,96 chỉ ra rằng các yếu tố đầu vào (X_1, X_2, X_3) ở dạng tuyến tính và bậc hai giải thích được giải thích được …" (Trang 81).
7.	Cần chỉnh sửa danh mục tài liệu tham khảo (phân tách Anh/Việt, bỏ lỗi "Cited in..."), Việt hóa toàn bộ số liệu trên biểu đồ, bỏ tên biểu đồ con ở dạng trang đa hình và chú ý thống nhất dấu thập phân trong các bảng ANOVA.	Đã loại bỏ các lỗi Cited in trong danh sách tài liệu tham khảo và thống nhất dấu thập phân trong các bảng ANOVA.

STT	Nội dung đề nghị chỉnh sửa, giải trình	Nội dung đã chỉnh sửa, giải trình
8.	Sửa lỗi đánh máy về nồng độ cao nấm men tối ưu (2,025 g/L ở kết luận so với 2,0354 g/L ở mục 3.1.2.3), và ghi chú lại ý nghĩa thống kê của các chữ cái trong Bảng 3.7, 3.8 vì chúng đang được đánh theo hàng ngang thay vì cột dọc. Trang 78 nên dùng từ "tác động tuyến tính" hoặc "hiệu ứng tuyến tính" thay vì "tác động phân giải tuyến tính"	Đã chỉnh sửa chính xác là 2,0354 g/L và ghi chú chính xác ý nghĩa thống kê theo hàng ngang (Trang 130). Trang 80 đã chỉnh sửa lại thành tác động tuyến tính.

Đà Nẵng, ngày 08 tháng 08 năm 2026

Người hướng dẫn 1 **Người hướng dẫn 2** **Nghiên cứu sinh**

PGS.TS. Đặng Minh Nhật **TS. Nguyễn Hoàng Dũng** **Nguyễn Thị Bích Hằng**

Xác nhận của Trường Đại học Bách Khoa

TL HIỆU TRƯỞNG
KT. TRƯỞNG PHÒNG
PHÒNG ĐT VÀ BĐCL
PHÓ TRƯỞNG PHÒNG

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PGS. TS. Phan Hoàng Nam

Chủ tịch Hội đồng

GS.TS. Lê Văn Việt Mẫn

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

ĐƠN XIN XÁC NHẬN

Hoàn thành toàn văn và tóm tắt luận án

Kính gửi: - Hiệu trưởng Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng;
- Khoa: Hóa, Môi trường và khoa học sự sống;
- Tập thể cán bộ hướng dẫn

Tôi tên là: Nguyễn Thị Bích Hằng
Nghiên cứu sinh khoa: Hóa, Môi trường và khoa học sự sống
Ngành: Công nghệ thực phẩm Mã số: 9.54.01.01
Cơ sở đào tạo: Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng
Tên đề tài luận án: ***"Thu nhận, đánh giá hoạt tính prebiotic của polysaccharide từ sợi nấm (Cordyceps militaris, Trametes versicolor) và bước đầu ứng dụng sinh khối trong chế biến thực phẩm bổ sung"***. Quyết định bảo vệ cấp trường: 3238/QĐ-ĐHB.

Căn cứ biên bản họp ngày 01/08/2026, Tôi đã tiến hành chỉnh sửa toàn văn và tóm tắt luận án theo ý kiến đóng góp của Hội đồng chấm luận án cấp trường. Với mục đích hoàn thành hồ sơ xét công nhận tốt nghiệp, tôi kính đề nghị tập thể giảng viên hướng dẫn, đơn vị chuyên môn, Trường Đại học Bách Khoa xác nhận tôi đã hoàn thành toàn văn và tóm tắt luận án theo đúng quy định.

Tôi xin chân thành cảm ơn.

Đà Nẵng, ngày 02 tháng 11 năm 2026

Xác nhận của Tập thể cán bộ hướng dẫn **Nghiên cứu sinh**

PGS.TS. Đặng Minh Nhật TS. Nguyễn Hoàng Dũng Nguyễn Thị Bích Hằng

Xác nhận của đơn vị chuyên môn

Phan Như Thức

Xác nhận của Hiệu trưởng Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng

HIỆU TRƯỞNG

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA
ĐẠI HỌC ĐÀ NẴNG

PGS. TS. Nguyễn Hữu Hiếu