ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA

BÙI THANH PHONG

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA DỊCH THỦY PHÂN PROTEIN TỪ TRÙN QUẾ (*PERIONYX EXCAVATUS*)

Ngành: Công nghệ thực phẩm
Mã số ngành: 62540101

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2025

Công trình được hoàn thành tại **Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM**

Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Võ Đình Lệ Tâm
Người hướng dẫn 2: TS. Phạm Trọng Khoa

Phản biện độc lập:
Phản biện độc lập:

Phản biện:
Phản biện:
Phản biện:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án họp tại
.....
.....
vào lúc giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Trường Đại học Bách Khoa – ĐHQG-HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia Tp.HCM
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Tp.HCM

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

Tạp chí quốc tế

1. Phong Thanh Bui, Khoa Trong Pham, Tam Dinh Le Vo, “Earthworm (*Perionyx excavatus*) Protein Hydrolysate: Hypoglycemic Activity and Its Stability for the Hydrolysate and Its Peptide Fractions,” *Processes*, vol 11, no 8, 2490, 2023.

https://doi.org/10.3390/pr11082490

2. Phong Thanh Bui, Duong Qui Ha, Khoa Trong Pham, and Tam Dinh Le Vo, “Investigation into Antimicrobial Activity and Its Stability of Protein Hydrolysate Derived from Earthworms,” *Chemical Engineering Transactions*, vol 106, pp. 883-888, 2023.

https://doi.org/10.3303/CET23106148

MỞ ĐẦU

1.1 Tính cấp thiết của luận án

Trùn quế (*Perionyx excavatus*) là một loài động vật không xương sống (oligochaeta) có khả năng nâng cao độ phì nhiêu và năng suất của đất. Trùn quế là loài phổ biến ở Việt Nam, có hàm lượng protein cao (55-70% theo trọng lượng khô. Protein trùn và dịch cơ thể của nó đã được chứng minh có tác dụng tiêu hủy tế bào, phân giải các khối máu đông trong mạch, hạ sốt và tiêu diệt khối u. Ding và cộng sự (2019) cũng ghi nhận rằng trùn quế là nguồn cung cấp các hợp chất tiềm năng có tác dụng chống tăng huyết áp, chống đông máu và chống tăng lipid máu.

Các sản phẩm có nguồn gốc từ trùn bao gồm trùn khô, chiết xuất trùn, đã được sử dụng làm nguyên liệu làm thuốc để điều trị dị ứng ở Trung Quốc. Ngoài ra, ở nhiều quốc gia khác như Đài Loan, Nhật Bản, Nam Phi, Brazil và Philippines, giun đất đã được sử dụng làm thức ăn. Bột protein trùn (BOCOM XUETONG) và trùn hun khói đã được bán trên thị trường Mỹ và Venezuela. Đồng thời, Lumbrokinase thương mại, một serine protease từ trùn là một sản phẩm chống chống dị ứng. Hơn nữa, bột giun đất được chế biến và đánh giá an toàn về mặt vi sinh, kim loại nặng, thuốc trừ sâu.

Protein là hợp chất được hình thành do các acid amin liên kết với nhau bằng liên kết peptide. Quá trình thủy phân protein (bằng phương pháp hóa học hay phương pháp sinh học) tạo ra các peptide ngắn có hoạt tính sinh học (Bioactive peptides, gọi tắt là BP). Phương pháp sinh học được ưu tiên sử dụng do điều kiện thủy phân ôn hòa hơn và peptide có hoạt tính cao hơn. Hiện nay, phương pháp thủy phân thường sử dụng các chế phẩm enzyme (thu nhận từ thực vật, động vật, vi sinh vật) với điều kiện thủy phân phù hợp nhằm cắt protein mạch dài thành các mạch ngắn hơn và có hoạt tính sinh học.

Peptide có hoạt tính sinh học (BP) hỗ trợ hoạt động của hệ thống tiêu hóa, nội tiết, tim mạch, miễn dịch và thần kinh. BP được minh chứng là có thể hỗ trợ điều hòa đường huyết thông qua việc BP tác động lên các enzyme tham gia vào

chuyển hóa tinh bột thành đường glucose như α-glucosidase, α-amylase hay giúp tăng insulin thông qua ức chế dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Hoạt tính ức chế các enzyme như ACE hay Renin trong hệ thống RAS giúp cho huyết áp của người không tăng cao. Bên cạnh đó, một nhóm peptide có thể ức chế các vi khuẩn (gọi là AMP) thông qua tương tác với màng phospholipid kép của tế bào. Với rất nhiều hoạt tính như vậy, peptide ngắn được ứng dụng ngày càng nhiều trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, mỹ phẩm hay trở thành một hợp chất bảo quản.

1.2 Mục tiêu của luận án

Khảo sát một số hoạt tính sinh học của dịch thủy phân và các phân đoạn peptide từ protein trùn quế (*Perionyx excavatus*), từ đó đề xuất quy trình sản xuất nhằm thu nhận sản phẩm có tính ứng dụng trong hỗ trợ điều trị đái tháo đường, tăng huyết áp.

1.3 Đóng góp mới của luận án

Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát khả năng ức chế ACE, ức chế các enzyme chuyển hóa tinh bột (α-amylase, α-glucosidase, DPP-IV) và kháng khuẩn cũng như đánh giá độ ổn định khi thử nghiệm tiêu hóa *in vitro*, xử lý nhiệt và pH của dịch thủy phân và các phân đoạn protein từ trùn quế. Qua đó, giúp đánh giá được tiềm năng hỗ trợ điều trị tăng huyết áp, đái tháo đường và kháng khuẩn của dịch thủy phân protein và các phân đoạn peptide từ trùn quế, đồng thời đưa ra đề xuất quy trình công nghệ tạo ra các chế phẩm peptide sinh học đa chức năng.

CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1 Tình hình nghiên cứu hoạt tính sinh học của dịch thủy phân protein từ các loài trùn

1.1.1 Các ứng dụng của trùn quế

Trùn là một loài động vật không xương sống (oligochaeta), có khả năng nâng cao độ phì nhiêu của đất. *P. excavatus* là loài phổ biến ở Việt Nam, có hàm lượng protein cao (55-70%, trọng lượng khô) đồng thời chứa nhiều thành phần

hóa học có tác dụng sinh học như kháng đông máu, hỗ trợ điều trị chứng rối loạn thần kinh, viêm phế quản, bệnh lao, kháng oxy hóa, hỗ trợ miễn dịch và sức khỏe tim mạch. Trùn còn có tác dụng tiêu hủy tế bào, phân giải các khối máu đông trong mạch, hạ sốt và tiêu diệt khối u, chống tăng huyết áp, chống đông máu và chống tăng lipid máu.

1.1.2 Ứng dụng của dịch thủy phân protein từ các loài trùn

Các loài trùn rất dồi dào protein. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng chất chiết xuất từ trùn có chứa các đại phân tử khác nhau, thể hiện nhiều hoạt động khác nhau, chẳng hạn như có enzyme làm tiêu sợi huyết, chất chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm, làm lành vết thương nhanh, chống ung thư…

Hiện chưa có công bố nào trên thế giới và ở Việt Nam về hoạt tính sinh học như ức chế ACE, ức chế α-amylase, ức chế α-glucosidase, ức chế DPP-IV, kháng khuẩn của dịch thủy phân protein từ trùn quế.

1.2 Quá trình thủy phân protein

Quá trình thủy phân protein có thể thực hiện bằng các tác nhân như hóa học (acid/kiềm), tác nhân vi sinh vật hay tác nhân enzyme protease.

Trong các phương pháp đó, phương pháp sử dụng enzyme đang được sử dụng rất nhiều. Ưu điểm của việc sử dụng chế phẩm enzyme để thủy phân protein là điều kiện thủy phân ôn hòa (như nhiệt độ và pH), không làm phân hủy acid amin. Quá trình thủy phân được kiểm soát tốt hơn do các protease có tính đặc hiệu và cắt liên kết peptide tốt hơn, ít tạo ra sản phẩm phụ.

Các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân và hoạt tính sinh học của dịch thủy phân như: loại chế phẩm enzyme, tỉ lệ cơ chất:đệm (w/v), pH thủy phân, nhiệt độ thủy phân (ºC), tỉ lệ enzyme:cơ chất (U/g protein), thời gian thủy phân. Tùy theo điều kiện thủy phân mà hoạt tính dịch thủy phân có thể tăng hoặc giảm. Hơn nữa kích thước, khối lượng của các phân đoạn peptide cũng ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của phân đoạn.

Khi xét đến loại chế phẩm enzyme cho quá trình thủy phân, yếu tố được xem xét hàng đầu là vị trí cắt của enzyme trên chuỗi protein. Mỗi protease có xu hướng sẽ chỉ cắt các liên kết peptide giữa các loại acid amin nhất định. Hoạt

tính của peptide bị ảnh hưởng rất mạnh bởi các acid amin đầu mạch nên việc lựa chọn protease thủy phân rất quan trọng.

Nhiệt độ và pH là hai yếu tố ảnh hưởng chủ yếu đến hiệu quả hoạt động của enzyme, mỗi enzyme có một giá trị nhiệt độ và pH để hoạt động tối ưu. Khi hoạt động trong điều kiện pH hay nhiệt độ xa giá trị tối ưu thì hiệu quả xúc tác của enzyme sẽ giảm. Nhiệt độ và pH ảnh hưởng đến cấu trúc chuỗi protein nên khi nhiệt độ, pH thay đổi quá cao hay quá thấp có thể làm biến tính protein, làm giảm hoạt tính thậm chí là bất hoạt enzyme.

Nồng độ cơ chất (được xác định bằng tỉ lệ cơ chất:đệm hay tỉ lệ cơ chất:nước) ảnh hưởng đến quá trình thủy phân rất rõ rệt. Nếu nồng độ cơ chất càng tăng hay càng giảm quá mức thì vận tốc phản ứng thủy phân cũng giảm theo.

Tỉ lệ enzyme:cơ chất (E:S) ảnh hưởng rất lớn đến quá trình thủy phân. Nếu enzyme có nồng độ cao sẽ thực hiện phản ứng thủy phân nhanh, peptide cũng được tạo ra nhiều. Khi tăng tỉ lệ E:S thì phản ứng thủy phân sẽ xảy ra mạnh hơn, phân cắt quá nhiều các peptide làm giảm hàm lượng peptide có hoạt tính sinh học. Nếu tỉ lệ E:S thấp, vận tốc của phản ứng thủy phân sẽ chậm.

Enzyme tiếp xúc cơ chất càng lâu thì enzyme cắt cơ chất càng nhiều. Tuy nhiên mỗi enzyme có những vị trí cắt đặc hiệu nhất định, khi nó đã cắt hết các vị trí đặc hiệu trong cơ chất, việc kéo dài thời gian thủy phân sẽ không hiệu quả.

1.3 Hoạt tính sinh học của dịch thủy phân

1.3.1 Hoạt tính ức chế men chuyển (ACE) của dịch thủy phân protein/peptide

Trong hệ thống Renin-angiotensin system (RAS), men chuyển (ACE) chuyển angiotensin decapeptide (dạng không hoạt động) thành octapeptide angiotensin II (dạng hoạt động) và gây tăng huyết áp. Các peptide cũng có thể liên kết với trung tâm hoạt động của ACE và làm giảm hoạt tính của enzyme này. Hơn nữa các peptide ít gây ra tác dụng phụ hơn do nó dễ dàng bị phân cắt thành các acid amin tự do.

1.3.2 Hoạt tính ức chế enzyme α-amylase, α-glucosidase, DPP-IV làm giảm đường huyết của dịch thủy phân protein/peptide

Bệnh đái tháo đường (Diabetes mellitus gọi tắt là DM) do rối loạn chuyển hóa carbohydrate dẫn đến mức đường huyết cao. Để kiểm soát tình trạng tăng đường huyết sau bữa ăn và kiểm soát bệnh đái tháo đường, việc làm chậm hai quá trình là chuyển hóa tinh bột thành glucose và đưa glucose từ ruột vào máu bằng cách ức chế các enzyme tiêu hóa tinh bột (bao gồm α-amylase và α-glucosidase) hay làm tăng khả năng sản sinh insulin của cơ thể (thông qua ức chế DPP-IV) là một trong những chiến lược hiệu quả nhất.

1.3.3 Hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein/peptide

Các peptide kháng khuẩn (antimicrobial peptide-AMP) là các đoạn oligopeptide được phát hiện lần đầu vào những năm 1980, có khả năng ức chế mạnh với vi khuẩn, nấm và virus. Cơ chế kháng khuẩn khác với kháng sinh truyền thống nên các AMP có thể được sử dụng để ức chế nhiều vi khuẩn khác nhau, kể cả vi khuẩn kháng thuốc. Hàng ngàn AMP đã được tìm ra từ các nguồn sinh vật khác nhau (vi khuẩn, nấm, động vật, thực vật).

1.4 Tổng quan về nghiên cứu độ bền hoạt tính sinh học của dịch thủy phân protein/peptide

Hoạt tính sinh học của dịch thủy phân và các peptide có thể có sự khác biệt khi được sử dụng trên các động vật thí nghiệm. Nguyên nhân chủ yếu là do tác động của các enzyme tiêu hóa, pH và nhiệt độ lên độ bền vững cấu trúc của các peptide. Sự ổn định hoạt động của các peptide đã trở thành một vấn đề được lưu ý trong các nghiên cứu về hoạt tính của các hợp chất tự nhiên, đặc biệt là peptide do chứa liên kết dễ bị tác động bởi enzyme tiêu hóa, pH và nhiệt độ.

CHƯƠNG 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu và hóa chất

Mẫu trùn quế có độ ẩm là 80,99 ± 0,53%. Hàm lượng các chất tính theo trọng lượng khô như sau: protein là 69,92 ± 0,23%, lipid là 6,97 ± 0,10%, carbohydrate là 12,78 ± 0,18%, độ tro là 10,25 ± 0,10%.

Các enzyme, cơ chất và chất đối chứng dùng cho các thí nghiệm khảo sát hoạt tính sinh học được mua từ hãng Sigma và các chế phẩm enzyme thủy được mua từ Novozymes Co. (Bagsvaerd, Denmark) và AB enzymes (Darmstadt, Germany).

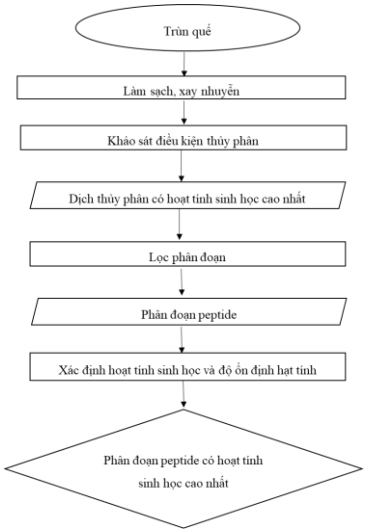
Chủng vi sinh vật thử nghiệm là *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *B. subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25953.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn Mueller Hinton Agar (MHA) và Mueller Hinton Borth (MHB) của hãng Merck.

2.2 Quy trình nghiên cứu

Quy trình nghiên cứu theo hình 2.2.

2.3 Phương pháp nghiên cứu



Hình 2.2 Quy trình nghiên cứu

Quá trình thủy phân được thực hiện theo quy trình của Vo TLD và cộng sự (2020) với một số sửa đổi. Dung dịch đệm phosphate 20 mM (với pH xác định) được cho vào trùn quế với tỉ lệ đã chọn và đun nóng ở 90 ºC trong 10 phút để khử hoạt tính của các enzyme nội tại. Chờ dịch nguội lại ở nhiệt độ phòng, kiểm tra và hiệu chỉnh lại pH (bằng dung dịch HCl 1M hay NaOH 1M). Sau đó

enzyme thủy phân được thêm vào với tỉ lệ enzyme:cơ chất đã chọn và quá trình thủy phân được diễn ra ở thời gian và nhiệt độ đã xác định. Phản ứng thủy phân được kết thúc bằng cách đun dịch thủy phân trong 10 phút ở 90 ºC để khử hoạt tính của các enzym. Dịch thủy phân sau đó được ly tâm ở 5000 rpm trong 15 phút để thu dịch. Phần dịch nổi được sấy đông khô và bảo quản ở -20 ºC để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp lọc phân đoạn: Màng lọc được sử dụng là màng lọc Macrosep của hãng Pall Laboratory (Mỹ). Các loại cột được sử dụng là cột 1 kDa, 3 kDa, 10 kDa và 30 kDa.

Phân tính hàm lượng protein trong mẫu protein trùn quế theo phương pháp Kjeldahl.

Phân tích hàm lượng protein hòa tan theo phương pháp Lowry.

Phương pháp khảo sát độ bền tiêu hóa *in vitro* của dịch thủy phân protein.

Phương pháp khảo sát độ ổn định hoạt tính sau khi xử lý pH theo Sripokar và cộng sự (2019).

Độ ổn định hoạt tính sau khi xử lý nhiệt theo Sripokar và cộng sự (2019).

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế angiotensin-converting enzyme (ACE): được thực hiện sử dụng phương pháp của Ngo và cộng sự (2014).

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α-amylase theo Li và cộng sự (2018).

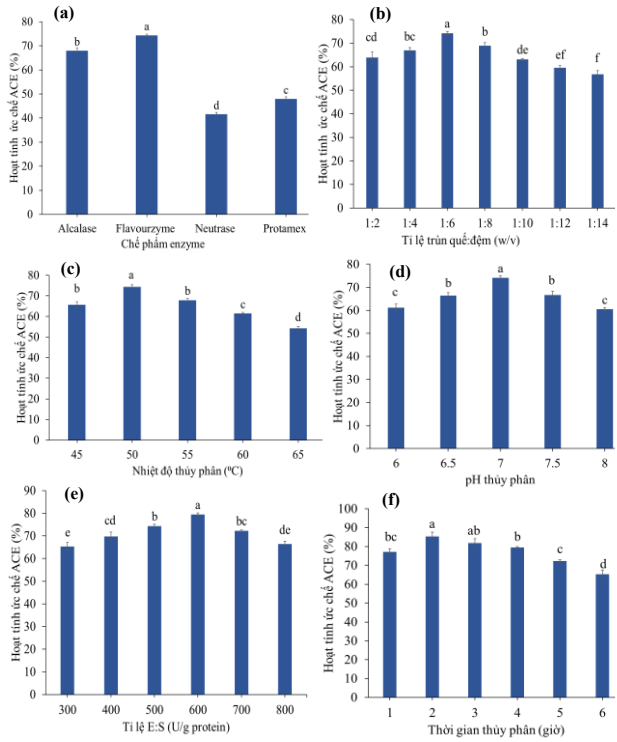
Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme α-glucosidase theo Nguyen và cộng sự (2019).

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme DPP-IV theo phương pháp của Kamal và cộng sự (2018) với một số sửa đổi.

Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn: Xác định đường kính vùng ức chế và MIC theo Onyegbule và cộng sự (2014).

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

3.1 Hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân protein trùn quế



* Các chữ cái khác nhau giữa các cột trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.1 Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme (a) tỉ lệ trùn quế:đệm (b), nhiệt độ, pH (d), tỉ lệ E:S (e), thời gian thủy phân (f) đến hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 2 mg protein/ml)

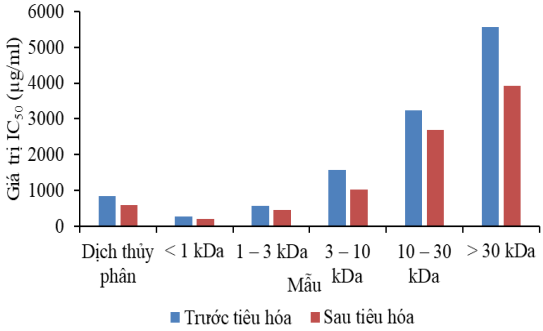
3.1.1 Ảnh hưởng của các điều kiện thủy phân đến hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân

Hoạt tính ức chế ACE cao nhất (tỉ lệ ức chế đạt 85,38 ± 2,31% ở nồng độ 2 mg protein /ml và giá trị IC_{50} đạt 0,84 mg/ml) trong điều kiện thủy phân sử dụng enzyme chế phẩm Flavourzyme® 500 MG, tỉ lệ trùn quế:đệm là 1:6 (w/v), nhiệt độ 50 ºC, pH 7, tỉ lệ E:S 600 U/g protein, thời gian thủy phân 2 giờ (hình 3.1).

3.1.2 Hoạt tính ức chế ACE của các phân đoạn từ dịch thủy phân protein trùn quế

Hoạt tính dịch thủy phân cao nhất là phân đoạn < 1kDa (với giá trị IC_{50} đạt 261,94 µg/ml), hoạt tính này thấp hơn 65485 lần so với chất đối chứng captopril (giá trị IC_{50} là 0,004 µg/ml). Theo hình 4.2, các giá trị IC_{50} chỉ ra rằng khi trọng lượng phân tử của phân đoạn càng nhỏ, tỷ lệ ức chế ACE càng tăng lên (hình 3.2).

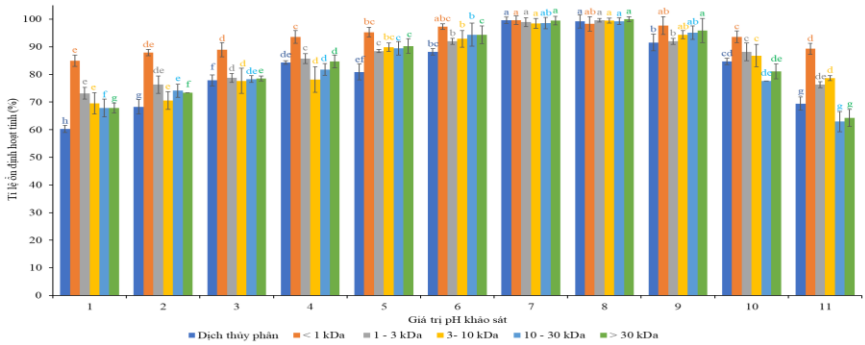
3.1.3 Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân protein trùn quế



Hình 3.2 Giá trị IC_{50} (µg/ml) đối với hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn trước và sau tiêu hóa *in vitro*

Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE sau quá trình tiêu hóa *in vitro*: Hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân và các phân đoạn đều tăng sau quá trình tiêu hóa *in vitro* (hình 3.2).

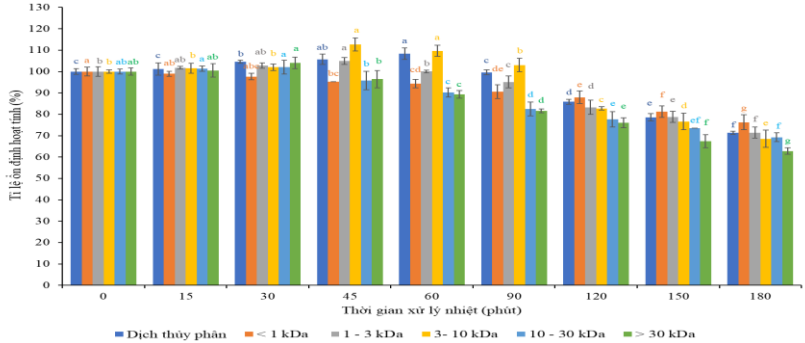
Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH: Hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân protein và các phân đoạn được duy trì được trên 60% sau khi xử lý pH trong khoảng từ 1 đến 11 (hình 3.3).



*Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

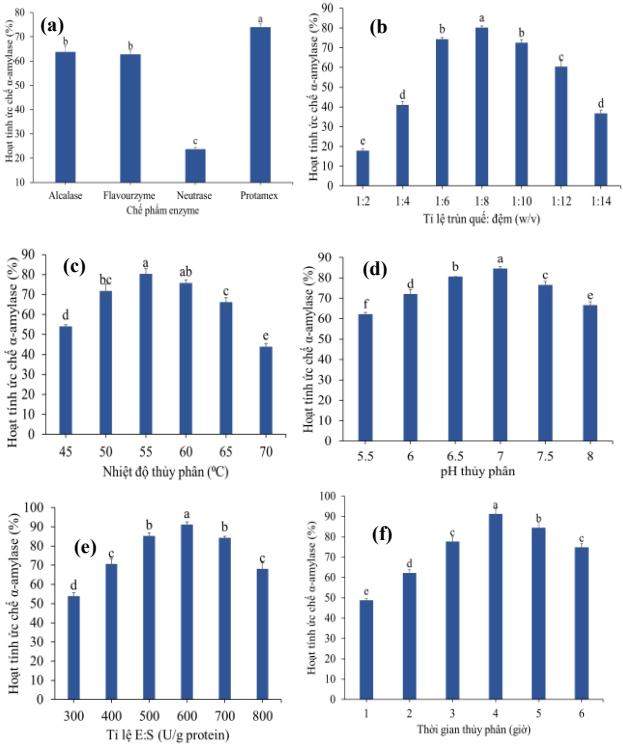
Hình 3.3 Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH

Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân từ trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt: Hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân protein và các phân đoạn vẫn được duy trì được trên 62% sau khi xử lý xử lý nhiệt ở 100 ºC trong 180 phút (hình 3.4).



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

Hình 3.4 Độ ổn định hoạt tính ức chế ACE của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt



* Các chữ cái khác nhau giữa các cột trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

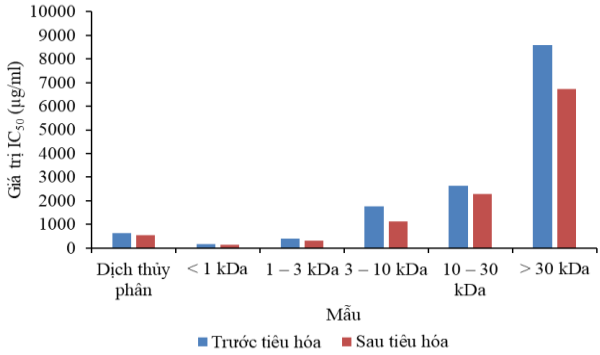
Hình 3.5 Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme (a), tỉ lệ trùn quế:đệm (b), nhiệt độ (c), pH (d), tỉ lệ E:S (e), thời gian thủy phân (f) đến hoạt tính ức chế α-amylase của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 2 mg protein/ml).

3.2 Hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân protein trùn quế

3.2.1 Ảnh hưởng của các điều kiện thủy phân đến hoạt tính ức chế α-amylase của dịch thủy phân

Dịch thủy phân có hoạt tính cao nhất (tỉ lệ ức chế đạt 91,30 ± 2,51% ở nồng độ 2 mg protein /ml và giá trị IC_{50} của đạt 618,65 µg/ml) khi thủy phân protein trùn quế trong điều

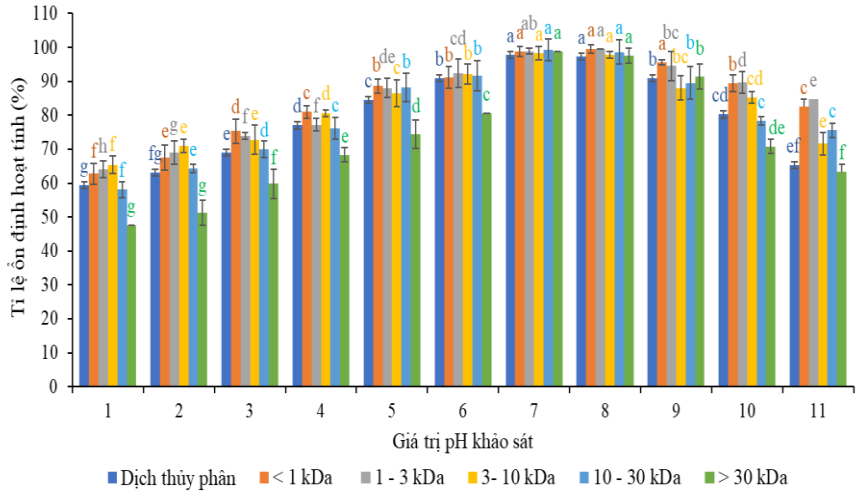
kiện sử dụng enzyme Protamex®, tỉ lệ trùn quế:đệm là 1:8 (w/v), nhiệt độ 55 ºC, pH 7, tỉ lệ E:S là 600 U/g protein, thời gian thủy phân 4 giờ (Hình 3.5).



Hình 3.6 Giá trị IC_{50} (µg/ml) đối với hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn trước và sau tiêu hóa *in vitro*

3.2.2 Hoạt tính ức chế α-amylase của các phân đoạn từ dịch thủy phân protein trùn quế

Phân đoạn <1kDa có hoạt tính ức chế *α*-amylase cao nhất với giá trị IC_{50} đạt 162,81 µg/ml và cao hơn chất đối chứng acarbose (giá trị IC_{50} của phân đoạn <1 kDa thấp hơn 4,05 lần so với acarbose). Phân đoạn có khối lượng càng lớn thì hoạt tính ức chế *α*-amylase càng thấp (hình 3.6).



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

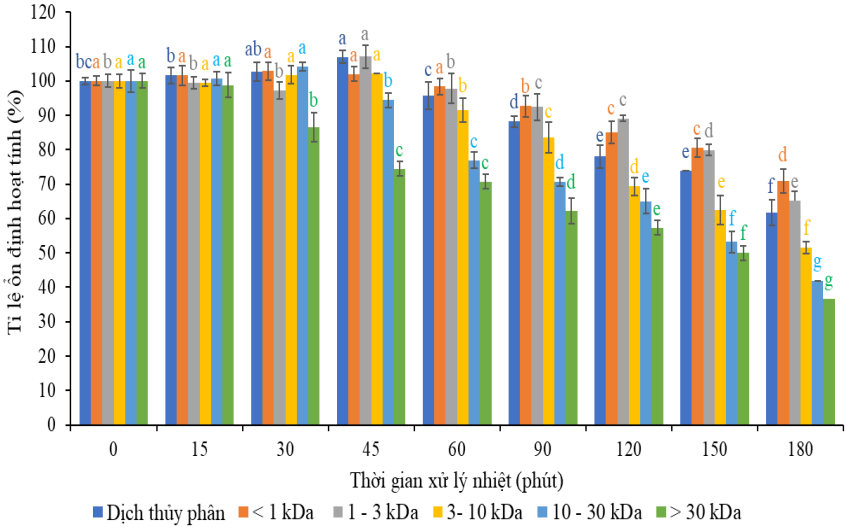
Hình 3.7 Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH

3.2.3 Độ ổn định hoạt tính ức chế α-amylase của dịch thủy phân protein trùn quế

Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình tiêu hóa *in vitro*: Hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân và các phân đoạn đều tăng sau quá trình tiêu hóa *in vitro*, hai phân đoạn có độ tăng hoạt tính mạnh nhất là 1-3 kDa và 3-10 kDa (hình 3.6).

Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý pH: Hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân và các phân đoạn được duy trì được trên 47% sau khi xử lý pH trong khoảng từ 1 đến 11 (hình 3.7).

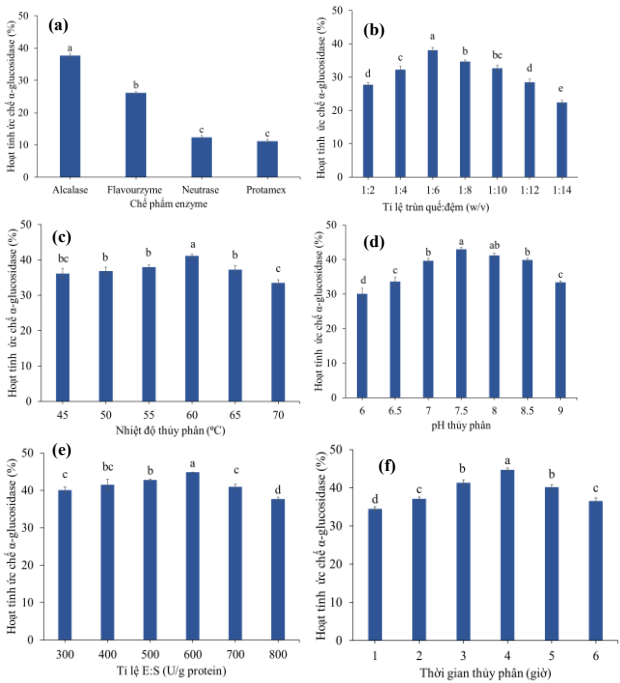
Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý nhiệt: dịch thủy phân protein trùn quế và 5 phân đoạn peptide giữ lại trên 40% hoạt tính ức chế *α*-amylase sau khi xử lý pH 1-11hoặc xử lý nhiệt ở 100 ºC trong 180 phút (hình 3.8).



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

Hình 3.8 Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-amylase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt

3.3 Hoạt tính ức chế α-glucosidase của dịch thủy phân protein trùn quế



* Các chữ cái khác nhau giữa các cột trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

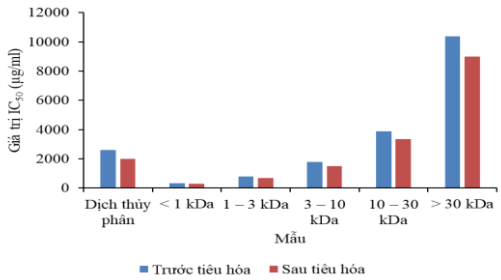
Hình 3.9 Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme (a), tỉ lệ trùn quế:đệm (b), nhiệt độ (c), pH (d), tỉ lệ E:S (e), thời gian thủy phân (f) đến hoạt tính ức chế α-glucosidase của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 2 mg protein/ml)

3.3.1 Ảnh hưởng các điều kiện thủy phân đến hoạt tính ức chế α-glucosidase của dịch thủy phân

Hoạt tính ức chế α-glucosidase cao nhất (khả năng ức chế α-glucosidase đạt 44,69 ± 0,47% ở nồng độ là 2 mg protein/ml, và giá trị IC_{50} đạt 2,61 mg/ml) được tạo ra trong điều kiện thủy phân bằng enzyme chế phẩm alcalase, tỉ lệ trùn quế:đệm là 1:6 (w/v), nhiệt độ 60 °C, pH 7,5, tỉ lệ E:S là 600 U/g protein, thời gian thủy phân là 4 giờ (hình 3.9).

3.3.2 Hoạt tính ức chế α-glucosidase của các phân đoạn từ dịch thủy phân protein trùn quế

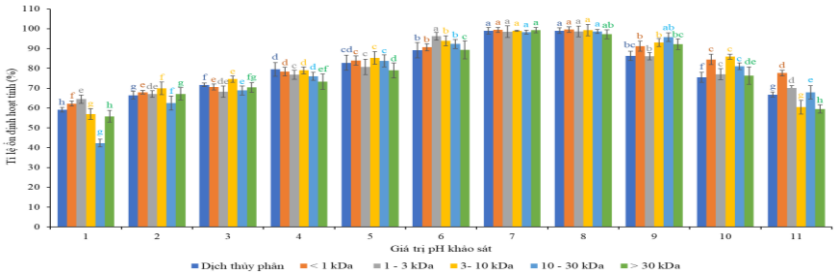
Phân đoạn <1kDa có hoạt tính ức chế α-glucosidase cao nhất với giá trị IC_{50} đạt 318,16 µg/ml và hoạt tính này thấp hơn chất đối chứng là acarbose (IC_{50}=170,77 µg/ml) (hình 3.10). Đồng thời hoạt tính ức chế α-glucosidase càng cao khi khối lượng phân đoạn càng nhỏ.



Hình 3.10 Giá trị IC_{50} (µg/ml) đối với hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn trước và sau tiêu hóa *in vitro*

3.3.3 Độ ổn định hoạt tính ức chế α-glucosidase của dịch thủy phân protein trùn quế

Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân



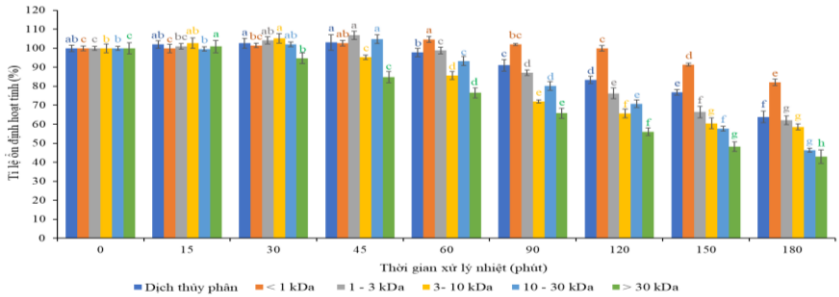
* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

Hình 3.11 Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH

protein từ trùn quế sau quá trình tiêu hóa *in vitro*: Hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân và các phân đoạn tăng lên, trong đó phân đoạn 1-3 kDa và 3-10 kDa tăng nhiều nhất (hình 3.10).

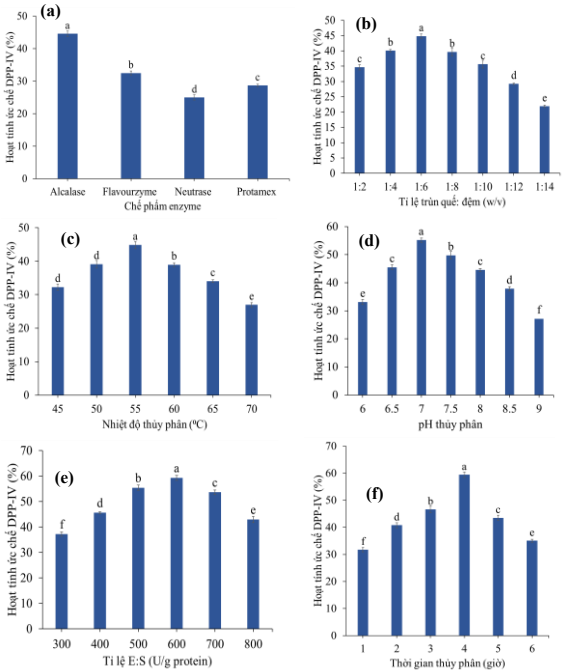
Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý pH: hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân protein và các phân đoạn được duy trì được trên 42% sau khi xử lý pH trong khoảng từ 1 đến 11 (hình 3.11).

Độ ổn định hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý nhiệt: hoạt tính ức chế *α*-glucosidase của dịch thủy phân protein và các phân đoạn vẫn được duy trì được trên 43% sau khi xử lý xử lý nhiệt ở 100 ºC trong 180 phút (hình 3.12).



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

Hình 3.12 Độ ổn định hoạt tính ức chế α-glucosidase của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt



*Các chữ cái khác nhau giữa các cột trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

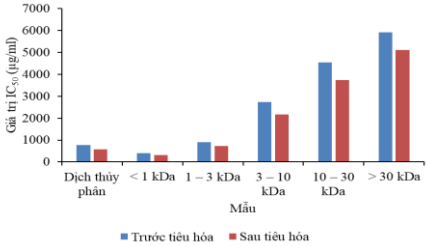
Hình 3.13 Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme (a), tỉ lệ trùn quế:đệm (b), nhiệt độ (c), pH (d),tỉ lệ E:S (e), thời gian thủy phân (f) đến hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 2 mg protein/ml)

3.4 Hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein trùn quế

3.4.1 Ảnh hưởng của các điều kiện thủy phân đến hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân

Dịch thủy phân có hoạt tính cao nhất (tỉ lệ ức chế đạt 59,42 ± 1,02% ở nồng độ thủy phân 2 mg protein /ml và giá trị IC_{50} đạt mg/ml) khi thủy phân bằng enzyme chế phẩm alcalase ở tỉ lệ trùn quế:đệm là 1:6 (w/v), nhiệt độ 55 ºC, pH 7, tỉ lệ E:S 600 U/g protein, thời gian thủy phân 4 giờ (hình 3.13).

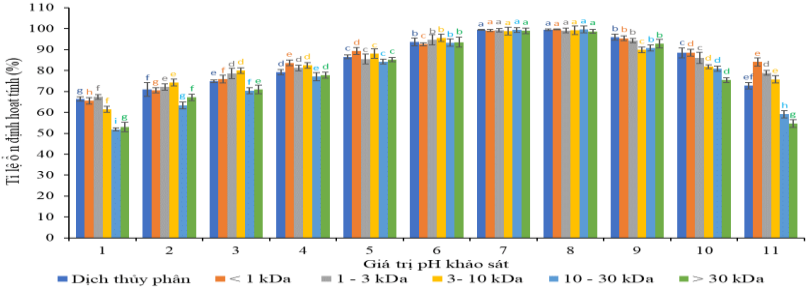
3.4.2 Hoạt tính ức chế DPP-IV của các phân đoạn từ dịch thủy phân protein trùn quế



Hình 3.14 Giá trị IC_{50} (µg/ml) đối với hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn trước và sau tiêu hóa *in vitro*

Hoạt tính dịch thủy phân cao nhất là phân đoạn <1kDa (IC_{50} đạt 395,03 µg/ml), hoạt tính này thấp hơn so với chất đối chứng diprotin A (IC_{50} đạt 1,5 µg/ml) (hình 3.14). Các phân đoạn còn lại có hoạt tính thấp dần khi khối lượng phân tử tăng dần.

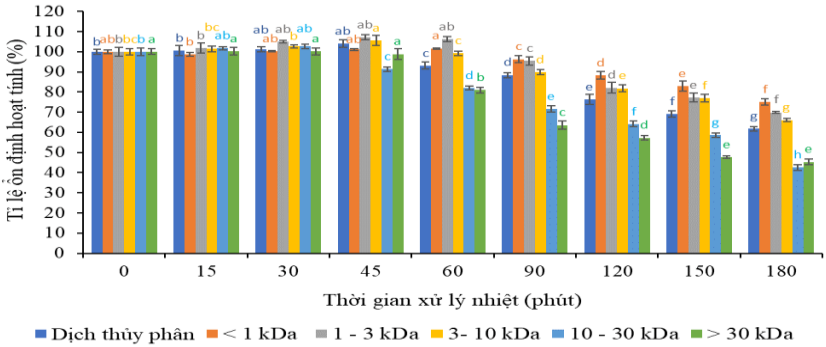
3.4.3 Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein trùn quế



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

Hình 3.15 Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH

Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình tiêu hóa *in vitro*: Hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân và các phân đoạn tăng sau quá trình tiêu hóa *in vitro* (hình 3.14).



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong cùng một phân đoạn thử nghiệm

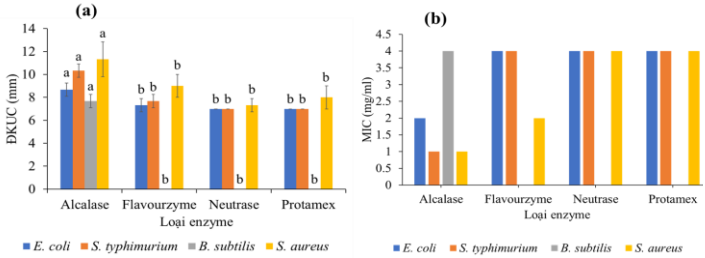
Hình 3.16 Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt

Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý pH: Hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein và các phân đoạn được duy trì được trên 50% sau khi xử lý pH trong khoảng từ 1 đến 11. (hình 3.15).

Độ ổn định hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý nhiệt: Hoạt tính ức chế DPP-IV của dịch thủy phân protein và các phân đoạn vẫn được duy trì được trên 40% sau khi xử lý xử lý nhiệt ở 100 ºC trong 180 phút (hình 3.16).

3.5 Hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein trùn quế

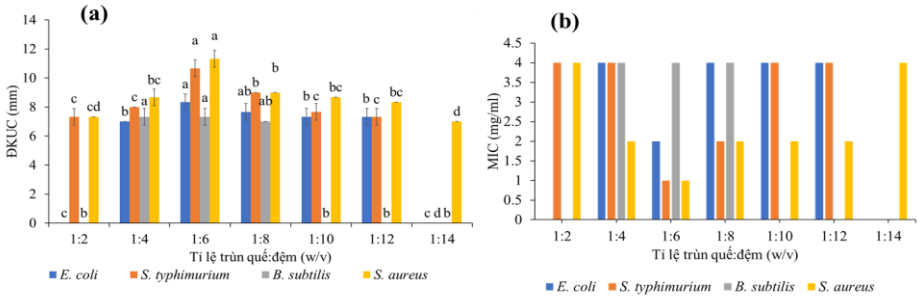
3.5.1 Ảnh hưởng của các điều kiện thủy phân đến hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân



* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.17 Ảnh hưởng của loại chế phẩm enzyme đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml) (b)

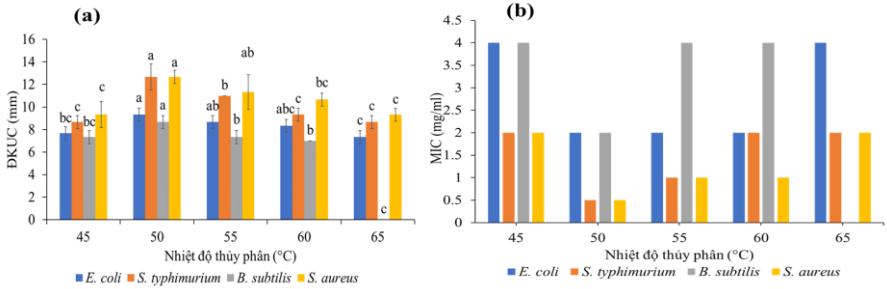
Điều kiện thủy phân protein trùn quế thu dịch thủy phân có hoạt tính kháng khuẩn cao là thủy phân bằng enzyme chế



* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

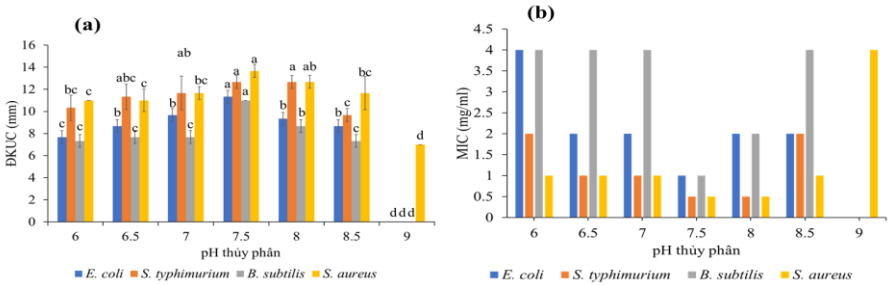
Hình 3.18 Ảnh hưởng của tỉ lệ trùn quế:đệm (w/v) đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml) (b)

phẩm Alcalase® 2.5 L ở tỉ lệ trùn quế:đệm là 1:6 (w/v), nhiệt độ 50 ºC, pH 7.5, tỉ lệ E:S là 500 U/g protein, thời gian thủy phân 3 giờ. MIC của dịch thủy phân sử dụng chế phẩm Alcalase® 2.5 L đạt 1 mg/ml (ở vi khuẩn *S.aureus*, *S.typhimurium*), 2 mg/ml (ở vi khuẩn *E.coli*), 4 mg/ml (ở vi khuẩn *B. subtilis*) (hình 3.17 đến 3.22). Đường kính vùng ức chế (mm) của dịch thủy phân sử dụng chế phẩm Alcalase® 2.5 L với các vi khuẩn *E.coli*, *B.subtilis*, *S.typhimurium*, *S.aureus* lần lượt là 8,67 ± 0,58; 7,67 ± 0,58; 10,33 ± 0,58; 11,33 ± 1,53 và là giá trị cao nhất (hình 3.17 đến 3.22).



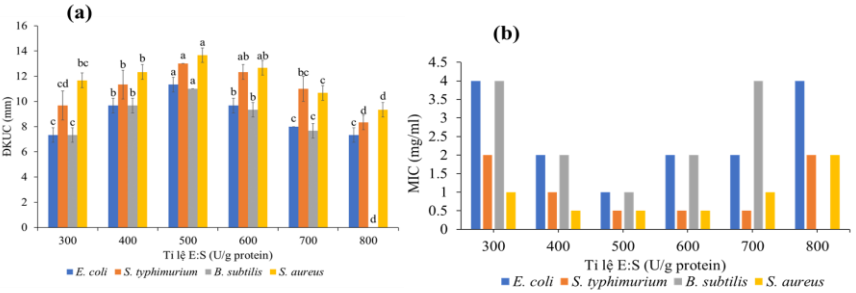
* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.19 Ảnh hưởng của nhiệt độ thủy phân (ºC) đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml) (b)



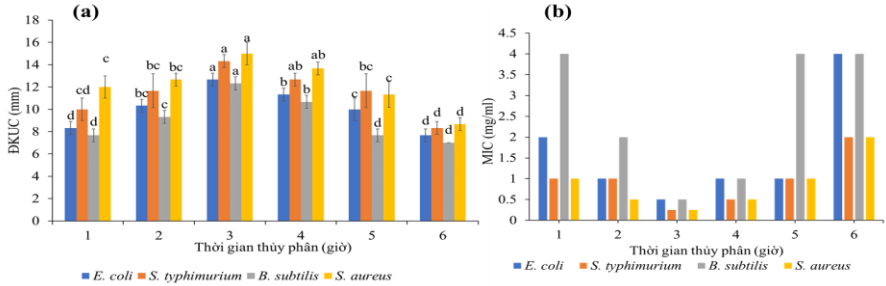
* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.20 Ảnh hưởng của pH thủy phân đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml)



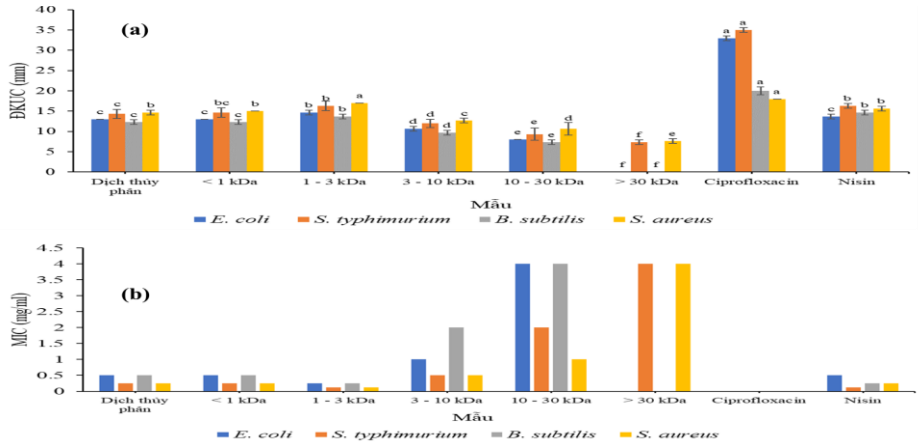
* Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.21 Ảnh hưởng của tỉ lệ E:S (U/g protein) đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml) (b)



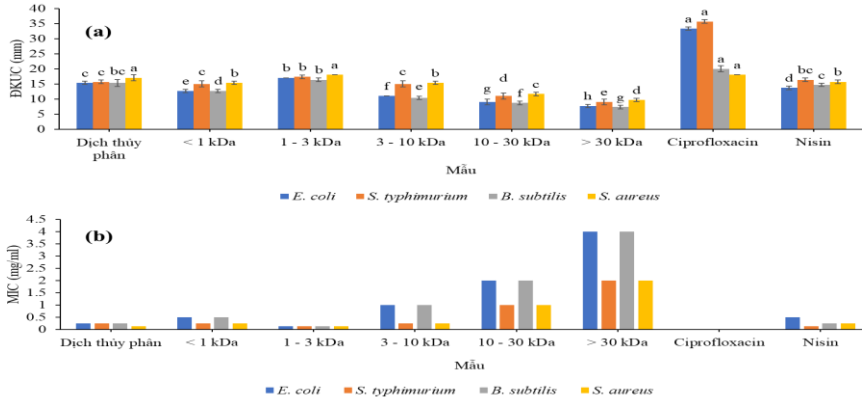
* Các chữ cái khác nhau trong cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.22 Ảnh hưởng của thời gian thủy phân (giờ) đến giá trị đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) (a) của dịch thủy phân trùn quế (nồng độ 5 mg protein/ml) và giá trị MIC (mg/ml) (b)



* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.23 Đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) ở nồng độ 5 mg protein/ml (a) và giá trị MIC (mg/ml) (b) của của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn

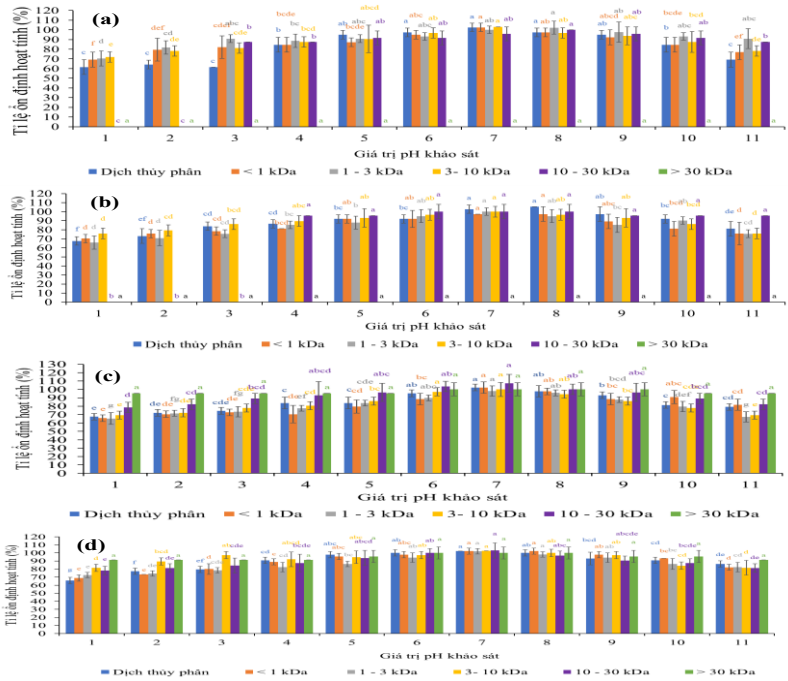


* Các chữ cái khác nhau trên một loài vi khuẩn cùng một biểu đồ thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

Hình 3.24 Đường kính vùng ức chế vi khuẩn (mm) ở nồng độ 5 mg protein/ml (a) và giá trị MIC (mg/ml) (b) của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình tiêu hóa *in vitro*

3.5.2 Hoạt tính kháng khuẩn của các phân đoạn từ dịch thủy phân protein trùn quế

Sau quá trình lọc màng đã thu được các phân đoạn <1 kDa, 1-3 kDa, 3-10 kDa,



* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo mẫu thử nghiệm

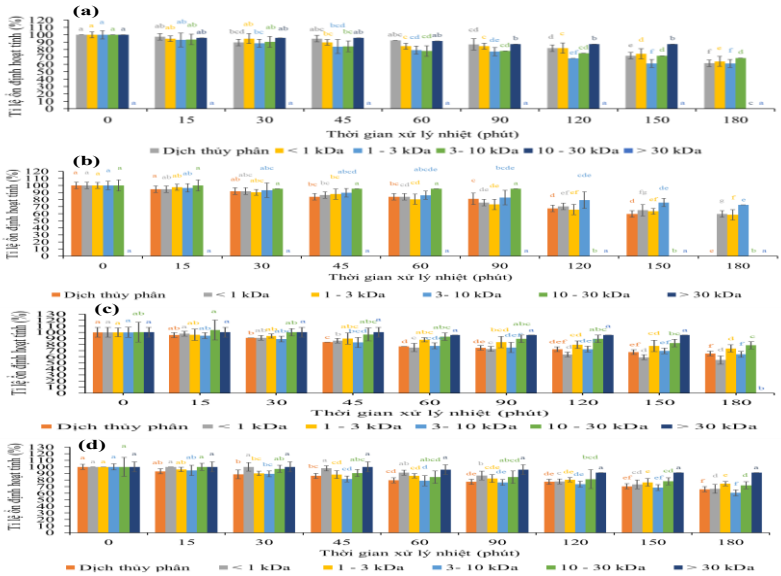
Hình 3.25 Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn tính theo đường kính vùng ức chế *E. coli* (a), *B. subtilis* (b), *S. typhimurium* (c), *S. aureus* (d) của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý pH

10-30 kDa, >30 kDa. Trong số các phân đoạn sau khi lọc, phân đoạn 1-3 kDa có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất, tiếp theo là các phân đoạn <1 kDa và 3-10 kDa. Hai phân đoạn có hoạt tính kháng khuẩn thấp nhất là 10-30 kDa, >30 kDa và hai phân đoạn này có tính kháng khuẩn kém hơn so với dịch thủy phân protein (hình 3.23).

3.5.3 Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein trùn quế

Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình tiêu hóa *in vitro*: Hoạt tính kháng khuẩn của tất cả các phân đoạn thủy phân protein của trùn quế sau khi tiêu hóa *in vitro* đều tăng lên, ngoại trừ phân đoạn <1 kDa có hoạt tính giảm (hình 3.24).

Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý pH (tính theo đường kính vùng kháng khuẩn): Nhìn chung, hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein và các phân đoạn được duy trì được trên 60% sau khi xử lý pH trong khoảng từ 1-11 (hình 3.25).

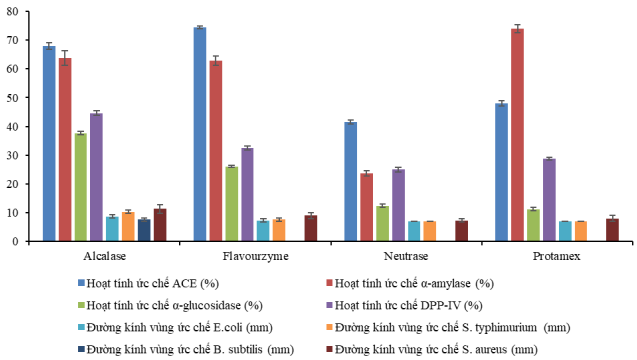


* Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê theo mẫu thử nghiệm

Hình 3.26 Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn theo đường kính vùng ức chế *E. coli* (a), *B. subtilis* (b), *S. typhimurium* (c), *S. aureus* (d) của dịch thủy phân trùn quế và các phân đoạn sau quá trình xử lý nhiệt

Độ ổn định hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein từ trùn quế sau quá trình xử lý nhiệt (tính theo đường kính vùng kháng khuẩn): hoạt tính kháng khuẩn của dịch thủy phân protein và các phân đoạn vẫn được duy trì được trên 54% sau khi xử lý xử lý nhiệt ở 100 ºC trong 180 phút (hình 3.26).

3.6 Đánh giá chung về các hoạt tính sinh học của dịch thủy phân protein và các phân đoạn peptide từ trùn quế



Hình 3.27 Ảnh hưởng của loại enzyme thủy phân đến hoạt tính sinh học của dịch thủy phân từ protein trùn quế

3.6.1 Ảnh hưởng của điều kiện thủy phân đến các hoạt tính sinh học

Khi xét về ảnh hưởng của loại enzyme thủy phân đến hoạt tính sinh học của dịch thủy phân thì dịch thủy phân sử dụng Alcalase® 2.5 L có hoạt tính ức chế α-glucosidase, DPP-IV và kháng khuẩn cao nhất. Dịch thủy phân có hoạt tính ức chế ACE cao nhất khi sử dụng Flavourzyme® 500 MG và ức chế α-amylase cao nhất khi sử dụng Protamex® (hình 3.27).

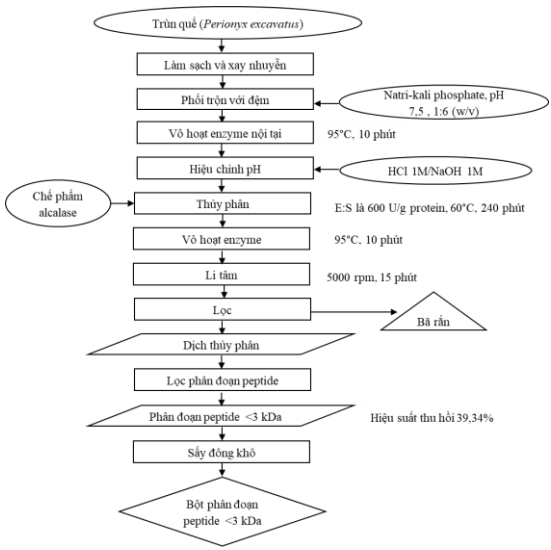
Các điều kiện thủy phân khác như tỉ lệ trùn quế: đệm (w/v) nằm trong khoảng 1:6-1:8, nhiệt độ thủy phân nằm trong khoảng 50-60°C, pH thủy phân từ 7-7,5, tỉ lệ E:S (U/g protein) là 500-600 và thời gian thủy phân từ 2-4 giờ cho thấy sự phù hợp trong việc thu nhận dịch thủy phân có hoạt tính cao.

3.6.2 Độ ổn định hoạt tính sinh học qua quá trình xử lý nhiệt, pH và tiêu hóa in vitro

Sau quá trình tiêu hóa *in vitro* thì hoạt tính sinh học của dịch thủy phân và các phân doạn đều tăng. Sau quá trình xử lý pH thì hoạt tính sinh học của dịch thủy phân và các phân đoạn đều giảm khi pH càng xa pH 7-8. Sau quá trình xử lý nhiệt cho thấy thời gian xử lý nhiệt càng kéo dài, hoạt tính của dịch thủy phân và các phân đoạn càng giảm.

3.6.3 Đề xuất quy trình công nghệ

Quy trình công nghệ được đề xuất theo hình 3.28



Hình 3.28 Quy trình sản xuất bột thủy phân có hoạt tính sinh học từ trùn quế (*P. excavatus*)

CHƯƠNG 4 KẾT LUẬN-ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Nghiên cứu đã xác định được điều kiện thủy phân nhằm thu được dịch thủy phân có hoạt tính sinh học cao nhất (ức chế α-amylase, α-glucosiase, DPP-IV, ACE và kháng khuẩn. Nghiên cứu cũng xác định được tỉ lệ ổn định hoạt tính của dịch thủy phân và các phân đoạn khi xử lý tiêu hóa *in vitro*, pH và nhiệt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn <1kDa có hoạt tính ức chế ACE và các enzyme chuyển hóa tinh bột thành đường cao nhất, trong khi đó phân đoạn 1-3 kDa có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất.

4.2 Kiến nghị

Các sản phẩm thủy phân từ trùn quế có thể được bổ sung vào nhiều loại thực phẩm chức năng có hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường và cao huyết áp.

Tuy nhiên, cần phải xác định thêm đặc tính của các peptide, xác định cơ chế hoạt động của các phân đoạn protein thủy phân/peptide, các thí nghiệm *in vivo,* các thí nghiệm lâm sàng để tăng cường khả năng ứng dụng của các phân đoạn protein thủy phân/peptide trong thực tế.

Cần xây dựng quy trình kiểm định chất lượng sản phẩm sản xuất hoàn chỉnh để tiến hành sản xuất chế phẩm.