

ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN PROTEIN ĐẾN HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CHIẾT XUẤT TRÙN QUẾ (*Perionyx excavatus*)

Nguyễn Thị Dung*, Bùi Bảo Thịnh, Nguyễn Thị Nữ Trinh, Phạm Hải Sơn, Bùi Lê Khả Tú, Võ Nguyễn Thanh Thảo, Lê Quang Luân

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của các phương pháp thu nhận protein sử dụng các dung môi khác nhau (nước, ethanol, acetone và phosphate) đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein và hoạt tính sinh học của chiết xuất trùn quế (*Perionyx excavatus*). Kết quả cho thấy dung môi nước cho hiệu suất chiết xuất cao nhất đạt 10,6%, tiếp theo là ethanol (8,9%), acetone (4,9%) và phosphate (3,5%). Hàm lượng protein cao nhất được ghi nhận trong chiết xuất acetone (70%), sau đó là ethanol (68,8%), nước (67,5%) và phosphate (50,3%). Phân tích SDS-PAGE cho thấy các dải protein đặc trưng xuất hiện trong tất cả các chiết xuất ngoại trừ phosphate. Chiết xuất nước thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa vượt trội với giá trị IC_{50} lần lượt là 0,838 mg/mL cho DPPH và 0,864 mg/mL cho ABTS. Ngược lại, chiết xuất phosphate và ethanol có khả năng ức chế enzyme elastase mạnh nhất lần lượt đạt 20,8% và 19,6%, vượt trội so với acetone và nước. Các kết quả này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc lựa chọn dung môi đối với các tính chất và hoạt tính sinh học của chiết xuất từ trùn quế, mở ra tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm để sản xuất các sản phẩm bảo vệ da, kháng oxy hóa và ức chế enzyme.

Từ khóa: Dung môi, hoạt tính kháng oxy hóa, hoạt tính ức chế enzyme elastase, *Perionyx excavatus*, trùn quế.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trùn quế, hay còn gọi là giun quế hay giun đỏ (*Perionyx excavatus*), là một loài thuộc họ Megascolecidae (Bertrand *et al.*, 2015). Đây là một loài giun đất phổ biến, được nuôi dưỡng chủ yếu để sản xuất phân hữu cơ, xử lý chất thải và làm thức ăn cho gia súc. *P. excavatus* nổi bật với khả năng sinh sản nhanh và sức chịu đựng tốt trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau, làm cho chúng trở thành một lựa chọn phổ biến trong nông nghiệp hữu cơ và sản xuất phân hữu cơ (Bertrand *et al.*, 2015).

Chiết xuất từ trùn quế rất giàu protein và có nhiều hoạt tính sinh học đáng kể. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng chiết xuất từ trùn quế có hàm lượng protein cao, làm cho nó trở thành một nguồn dinh dưỡng quan trọng trong thức ăn gia súc và thậm chí có thể được sử dụng trong thực phẩm chức năng dành cho con người (Ding *et al.*, 2019). Ngoài ra, chiết xuất này còn chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như chất kháng oxy hóa và các enzyme có lợi (Azmi *et al.*, 2014; Gudeta *et al.*, 2020). Các hoạt tính kháng oxy hóa giúp bảo vệ tế bào khỏi sự tổn hại của các gốc tự do, góp phần ngăn ngừa nhiều bệnh lý liên quan đến stress oxy hóa. Trong khi hoạt tính ức chế enzyme elastase có thể hữu ích trong việc làm giảm sự thoái hóa của elastin trong da, giúp duy trì độ đàn hồi và sự trẻ trung của da.

Việc lựa chọn dung môi trong quá trình chiết xuất có vai trò vô cùng quan trọng, ảnh hưởng lớn đến hiệu quả, chất lượng và thành phần của chiết xuất thu được (Chemat *et al.*, 2019). Các dung môi khác nhau có khả năng hòa tan các hợp chất khác nhau, do đó ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein, và các hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng (Chemat *et al.*, 2019). Một số dung môi thường được sử dụng trong quá trình chiết xuất bao gồm nước, ethanol, methanol, acetone, và hexane. Mỗi dung môi này có đặc điểm riêng về độ phân cực và khả năng tương tác với các thành phần hóa học khác nhau. Ngoài ra, dung môi cũng ảnh hưởng đến sự ổn định của các hợp chất sinh học trong chiết xuất. Một số hợp chất nhạy cảm với nhiệt độ hoặc ánh sáng có thể bị phân hủy hoặc mất hoạt tính nếu dung môi không được chọn lựa cẩn thận hoặc quy trình chiết xuất không được kiểm soát chặt chẽ (Chemat *et al.*, 2019). Hơn nữa, sự lựa chọn dung môi cũng ảnh hưởng đến khả năng loại bỏ các tạp chất và độc tố, điều này đặc biệt quan trọng khi chiết xuất được sử dụng trong thực phẩm hoặc y dược (Syamitra *et al.*, 2014).

Nghiên cứu và tối ưu hóa dung môi chiết xuất không chỉ giúp tăng hiệu suất chiết xuất và hàm lượng các hợp chất có giá trị, mà còn giúp bảo toàn và nâng cao các hoạt tính sinh học của chiết xuất. Cho đến nay, nghiên cứu ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất, hàm lượng protein và các hoạt tính sinh học của chiết xuất trùn quế là hạn chế. Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp thu nhận protein sử dụng các dung môi khác nhau đến (1) hiệu suất chiết xuất, (2) hàm lượng protein, (3) hoạt tính kháng oxy hóa và (4) hoạt tính ức chế enzyme elastase của chiết xuất trùn quế được thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Trùn quế (*P. excavatus*) từ 8-9 tuần tuổi được thu thập từ một trang trại tại huyện Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi thu thập, chúng được vận chuyển nhanh chóng đến Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tại đây, trùn quế được rửa sạch dưới vòi nước chảy để loại bỏ bám bẩn trên bề mặt cơ thể. Tiếp theo, chúng được ngâm trong dung dịch NaCl 1,0% trong 15 phút, sau đó là dung dịch acid citric 0,3% trong 20 phút. Sau quá trình xử lý này, trùn quế được sấy khô bằng phương pháp đông lạnh để tạo ra bột trùn quế và được bảo quản ở nhiệt độ 40°C.

Phương pháp nghiên cứu

Thu nhận chiết xuất protein bằng nước

Bột trùn quế (50 g) sau khi xử lý được đưa vào cốc thủy tinh dung tích 1000 mL và pha cùng 700 mL nước cất, sau đó lắc kỹ. Mẫu tiếp tục được phá bằng sóng siêu âm cường độ dao động 50% trong 5 phút và sau đó đun sôi trong 30 phút. Sau khi chiết xuất, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc Whatman để thu dịch lọc. Quá trình chiết xuất được lặp lại 2 lần và các dịch lọc của hai lần chiết được kết hợp và cô quay chân không (ở áp suất 46 mbar, gia nhiệt ở 50°C, nhiệt độ làm lạnh ở 10°C) để thu cao lỏng. Cuối cùng, bột chiết xuất được thu được sau khi đông khô.

Thu nhận chiết xuất protein bằng đệm phosphate

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào cốc thủy tinh dung tích 500 mL, sau đó bổ sung 100 mL dung dịch đệm phosphate 50 mM với pH = 7. Mẫu được phá bằng sóng siêu âm (Qsonica - Q700) cường độ dao động 50% trong 5 phút. Dung dịch sau đó được ly tâm ở 3000 rpm trong 20 phút và quy trình này được lặp lại 2 lần để thu dịch nổi. Tiếp theo, ammonium sulfate 60% được bổ sung vào dịch nổi, và sau đó lắc đều và ly tâm ở 4°C, 3000 rpm trong 20 phút, lặp lại 2 lần để loại bỏ dịch và thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate 50 mM, sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Thu nhận chiết xuất protein bằng ethanol

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào túi dập mẫu với 250 mL nước và tiếp tục phá mẫu bằng máy dập mẫu trong 25 phút, sau đó ly tâm để thu được dịch trích ly thô. Dịch trích ly thô sau đó được rửa với ethanol lạnh nồng độ 99,6% (v/v) với tỷ lệ dịch thô và dung môi là 1:0,4. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 4°C trong 20 phút và sau đó tiến hành ly tâm ở 7500 rpm trong 40 phút để thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate (pH = 6,5), sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Thu nhận chiết xuất protein bằng acetone

Bột trùn quế đã xử lý (50 g) được cân vào túi dập mẫu với 250 mL nước và tiếp tục phá mẫu bằng máy dập mẫu trong 25 phút. Sau đó ly tâm để thu được dịch trích ly thô. Dịch trích ly thô sau đó được rửa với acetone lạnh với tỷ lệ dịch thô và dung môi là 1:2. Hỗn hợp sau đó được ủ ở 4°C trong 20 phút và sau đó tiến hành ly tâm ở 7500 rpm trong 40 phút để thu được kết tủa. Kết tủa được hòa tan lại với đệm phosphate (pH = 6,5), sau đó tiến hành đông khô để thu bột chiết xuất trùn quế.

Phương pháp xác định hiệu suất chiết xuất

Hiệu suất chiết xuất của mỗi chiết xuất trùn quế được tính toán dựa trên công thức: Hiệu suất (%) = $\frac{W_1}{W_2} \times 100$, trong đó W_1 là trọng lượng của bột chiết xuất thu được (g) và W_2 là trọng lượng của mẫu ban đầu (g).

Phương pháp xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein tổng được xác định bằng phương pháp Kjeldahl (Goyal *et al.*, 2022). Mẫu được cân 5 g vào bình Kjeldahl sau đó cho chất xúc tác K_2SO_4 và $CuSO_4$ và 10 mL dung dịch H_2SO_4 đậm đặc. Tiến hành đun chậm cho đến khi dung dịch trong suốt không màu hay có màu xanh nhạt của $CuSO_4$ khi để nguội. Sau đó, cho nước cất vào bình Kjeldahl để tráng rồi đưa vào bình định mức 500 mL, tiếp theo cho khoảng 10 - 15 mL NaOH 40% và vài giọt phenolphthalein vào bình định mức. Định mức bằng nước cất đến vạch. Cho 10 mL acid boric vào bình hứng, sau đó lắp bình vào hệ thống và bắt đầu quá trình cất đạm đến khi dung dịch trong bình hứng đạt được 150 mL. Thu dung dịch từ bình hứng cho vào erlen và chuẩn độ bằng dung dịch H_2SO_4 0,1 N, sau đó tính toán hàm lượng protein theo công thức sau:

$$\text{Hàm lượng protein} = \frac{(0,0014 \times (V_{H_2SO_4} - V'_{H_2SO_4}) \times 100 \times 6,25)}{m}$$

Trong đó: 0,0014: Lượng nitơ (g) tương đương với 1 mL H_2SO_4 0,1 N.

V: Dung dịch H_2SO_4 dùng cho mẫu trắng (mL).

V': Dung dịch H_2SO_4 dùng cho mẫu thử (mL).

m: Khối lượng của mẫu thử (g).

Phương pháp điện di SDS-PAGE

Các mẫu trùn quế thu được từ các phương pháp tách chiết được phân tích khối lượng phân tử của các thành phần protein bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Tiến hành theo phương pháp của Hua và đồng tác giả (2011), với một số điều chỉnh. Phương pháp SDS-PAGE sử dụng nồng độ gel tách và gel gom lần lượt là 12,5% và 5% nhằm đánh giá độ tinh khiết và khối lượng phân tử của sản phẩm thu nhận, gel phân tích được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R-250.

Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do DPPH

Hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát bằng phương pháp DPPH theo mô tả của Kim và đồng tác giả (2017) với một số điều chỉnh. Bổ sung 4 mL DPPH 0,1 mM pha trong ethanol vào mỗi ống nghiệm có chứa 1 mL chiết xuất trùn tại các nồng độ khác nhau từ 0,1 - 1 mg/mL. Ủ dung dịch phản ứng 30 phút trong bóng tối. Sau đó, tiến hành đo mật độ quang OD tại bước sóng 517 nm bằng máy Elisa (VERSA max microplate reader). Giá trị mật độ quang OD của mẫu phản ánh khả năng kháng oxy hóa của mẫu. Đối chứng dương trong thí nghiệm là acid ascorbic với dãy nồng độ từ 1 - 50 µg/mL. Chứng âm là nước Milli - Q, mẫu blank. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được xác định theo công thức sau: % ức chế = $(A_C - A_M) / A_C \times 100$. Trong đó, A_C : Mật độ quang của mẫu blank; A_M : Mật độ quang của mẫu thử. Giá trị IC_{50} , biểu thị nồng độ mẫu gây ra sự giảm 50% nồng độ DPPH ban đầu, được xác định từ đường cong nồng độ của chiết xuất so với tỷ lệ ức chế gốc tự do thu được thông qua phân tích hồi quy tuyến tính.

Phương pháp xác định khả năng bắt gốc tự do ABTS

Hoạt tính kháng oxy hóa được khảo sát bằng phương pháp ABTS theo mô tả của Kim và đồng tác giả (2017) với một số điều chỉnh. Pha các dung dịch stock: (1) dung dịch $K_2S_2O_8$ 2,6 mM và (2) dung dịch ABTS 7,4 mM. Trộn dung dịch stock (1) và (2) theo tỉ lệ (1:1), lắc kỹ và để yên trong bóng tối, ở nhiệt độ phòng trong 12 giờ để cho phản ứng xảy ra hoàn toàn và độ hấp thụ của dung dịch đạt mức ổn định. Pha loãng bằng nước cất và điều chỉnh độ hấp thụ ở bước sóng 734 nm về $0,7 \pm 0,02$ ngay trước khi dùng. Dung dịch mẫu được chuẩn bị thành các dãy nồng độ từ 0,1 - 1 mg/mL. Acid ascorbic được sử dụng làm đối chứng dương với dãy nồng độ từ 1 - 50 µg/mL. Mẫu chiết xuất trùn quế (1 mL) tại các nồng độ khác nhau cho phản ứng với 5 mL ABTS vortex, để yên trong bóng tối 15 phút và đem đo ở bước sóng 734 nm bằng máy Elisa (VERSA max microplate reader). Mẫu trắng được chuẩn bị tương tự nhưng thay ABTS bằng methanol. Mẫu chứng âm thay 1 mL mẫu bằng 1 mL methanol. Phần trăm bắt gốc tự do ABTS+ và giá trị IC_{50} được tính toán tương tự như phương pháp DPPH.

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế enzyme elastase

Hoạt tính ức chế elastase được xác định theo phương pháp của Azmi và đồng tác giả (2014). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 100 µL dung dịch đệm Tris-HCl 0,2 M (pH = 8), 25 µL dung dịch N-(methoxysuccinyl)-ala-ala-pro-val-4-nitroanilide (MAAPVN) 10 mM và 100 µL mẫu được trộn đều và ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó, bổ sung 50 µL elastase 0,3 U/mL và ủ thêm 15 phút ở 25°C. Độ hấp thụ của hỗn hợp phản ứng được đo bằng máy đọc đĩa Elisa (VERSA max microplate reader) với bước sóng 410 nm. Sử dụng EGCG làm đối chứng dương. Phần trăm ức chế elastase được tính toán theo công thức sau: % ức chế = $(A_C - A_M) / A_C \times 100$. Trong đó: A_C : Mật độ quang của mẫu chứng âm; A_M : Mật độ quang của mẫu thử.

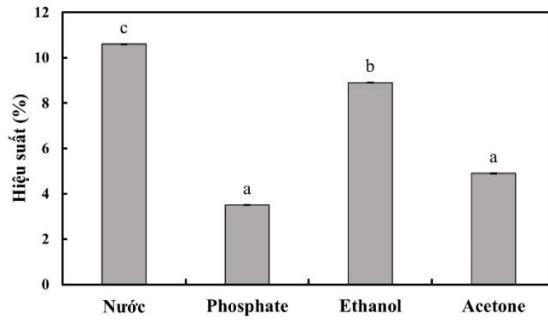
Phương pháp xử lý số liệu

Dữ liệu được phân tích và tính toán bằng phần mềm R (phiên bản 4.3.1) và trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD). Phân tích phương sai một chiều (ANOVA) với thử nghiệm HSD của Tukey đã được sử dụng để đánh giá sự khác biệt giữa tất cả các mẫu. Phương pháp phân tích hồi quy tuyến tính đã được sử dụng để thiết lập dạng chuẩn phương trình tuyến tính cho hoạt tính kháng oxy hóa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của dung môi đến hiệu suất của chiết xuất trùn quế

Mỗi loại dung môi có tính chất hóa học khác nhau, do đó, khả năng hoà tan và chiết xuất các thành phần khác nhau từ mẫu vật cũng khác nhau (Chemat *et al.*, 2019). Việc so sánh hiệu suất thu nhận chiết xuất giữa các dung môi giúp xác định dung môi tối ưu để thu được lượng chiết xuất cao nhất, đồng thời duy trì hoặc cải thiện hàm lượng protein và hoạt tính sinh học. Kết quả ở Hình 1 cho thấy hiệu suất thu nhận chiết xuất ở mẫu dung môi nước cao nhất, đạt 10,6%. Tiếp theo là mẫu chiết xuất ethanol (8,9%), acetone (4,9%) và phosphate (3,5%). Kết quả này cho thấy rằng nước là dung môi hiệu quả nhất để chiết xuất các hợp chất từ trùn quế, tiếp theo là ethanol. Chiết xuất bằng nước cho hiệu suất cao nhất do khả năng hòa tan mạnh mẽ của nước, giúp chiết xuất nhiều loại hợp chất sinh học từ trùn quế (Chemat *et al.*, 2019). Các dung môi khác như acetone và phosphate có hiệu suất thấp hơn do tính chất hóa học của chúng không phù hợp với việc hòa tan và chiết xuất các thành phần từ mẫu vật này.

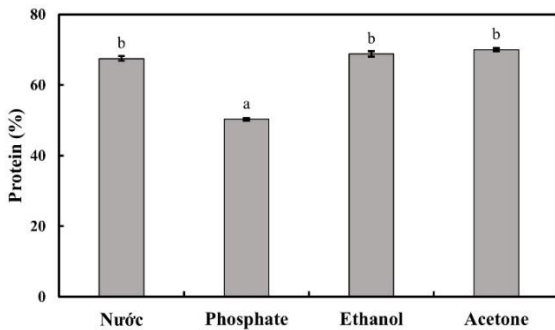


Hình 1. Hiệu suất của chiết xuất từ trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

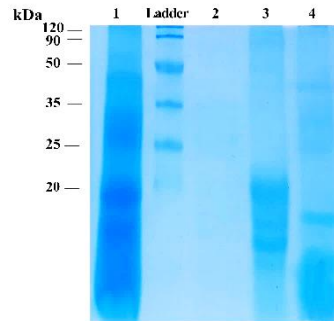
Ảnh hưởng của dung môi đến hàm lượng protein của chiết xuất trùn quế

Trong nghiên cứu về chiết xuất từ trùn quế, hàm lượng protein trong các mẫu chiết xuất là một chỉ số quan trọng để đánh giá chất lượng và hiệu quả của quá trình chiết xuất (Ding *et al.*, 2019). Protein có nhiều chức năng sinh học quan trọng và là một trong những thành phần chính cần được chiết xuất. Kết quả ở Hình 2 cho thấy hàm lượng protein của chiết xuất acetone cao nhất, đạt 70%. Tiếp theo là mẫu chiết xuất ethanol (68,8%), nước (67,5%) và phosphate (50,3%). Tuy nhiên, hàm lượng protein khác nhau của nước, ethanol và acetone không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này cho thấy acetone là dung môi hiệu quả nhất để chiết xuất protein từ trùn quế, tiếp theo là ethanol và nước. Acetone là chất kết tủa mạnh, tập trung chủ yếu vào việc kết tủa protein và loại bỏ các tạp chất không cần thiết, nên dù hiệu suất chiết xuất tổng thể thấp, hàm lượng protein trong chiết xuất acetone lại cao. Nước và dung dịch phosphate có hàm lượng protein thấp hơn, có thể do tính chất hóa học của chúng không phù hợp để chiết xuất và tập trung protein một cách hiệu quả.

Các peptide có hoạt tính sinh học được biết đến với nhiều đặc tính sinh học quan trọng, bao gồm khả năng kháng oxy hóa, kháng khuẩn, kháng viêm và ức chế các enzyme liên quan đến quá trình lão hóa như elastase, collagenase, tyrosinase và hyaluronidase (Ngoc *et al.*, 2023). Đặc biệt, việc lựa chọn các peptide hoặc protein có hoạt tính sinh học có trọng lượng phân tử thấp là rất cần thiết, vì những peptide này thường thể hiện hoạt tính sinh học cao và khả năng hấp thụ tốt hơn trong cơ thể (Nongonierma, FitzGerald, 2017). Để đánh giá trọng lượng phân tử của các protein trong chiết xuất trùn quế, kỹ thuật điện di SDS-PAGE đã được sử dụng (Hình 3).



Hình 2. Hàm lượng protein của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau



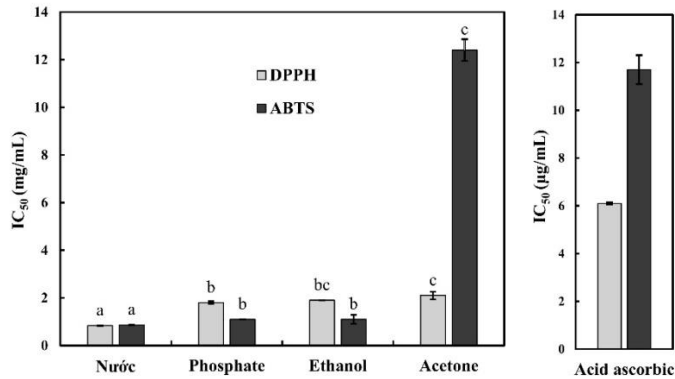
Hình 3. Phân tích SDS-PAGE của chiết của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau
1: Ethanol, 2: Phosphate, 3: Nước, 4: Acetone.

Kết quả điện di ở Hình 3 cho thấy rằng chiết xuất bằng dung dịch phosphate (giếng 2) không biểu hiện rõ các dải protein. Điều này có thể là do dung dịch phosphate không hiệu quả trong việc chiết xuất protein hoặc do protein không được phân giải đủ trong dung dịch này. Ngược lại, các mẫu chiết xuất bằng nước (giếng 3) và acetone (giếng 4) cho thấy các dải protein rõ ràng, chủ yếu tập trung ở các phân đoạn nhỏ hơn 25 kDa. Các protein có trọng lượng phân tử thấp này thường là các peptide hoạt tính sinh học, có thể đóng vai trò quan trọng trong các hoạt động sinh học, chẳng hạn như các hoạt động chống oxy hóa và kháng khuẩn (Nongonierma, FitzGerald, 2017). Trong khi đó, các mẫu chiết xuất bằng ethanol (giếng 1) lại cho thấy sự hiện diện của các dải protein có trọng lượng phân tử cao. Điều này chỉ ra rằng ethanol có khả năng chiết xuất các protein có trọng lượng phân tử cao tốt hơn. Sự khác biệt trong khả năng chiết xuất của các dung môi này cho thấy rằng việc lựa chọn dung môi phù hợp là quan trọng trong việc chiết xuất các protein hoặc peptide có hoạt tính sinh học cụ thể từ trùn quế.

Ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế

Hoạt động kháng oxy hóa là một trong những đặc tính sinh học quan trọng của các peptide và protein có hoạt tính sinh học, đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể khỏi các tổn thương do gốc tự do gây ra. Các gốc

tự do như DPPH và ABTS là những hợp chất gây oxy hóa mạnh, và khả năng loại bỏ các gốc này của các chiết xuất có thể được đo lường thông qua giá trị IC_{50} – nồng độ cần thiết để ức chế 50% hoạt động của gốc tự do (Munteanu, Apetrei, 2021). Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất từ trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau có khả năng bắt gốc DPPH và ABTS khác nhau (Hình 4). Chiết xuất bằng dung môi nước cho thấy hoạt động bắt gốc DPPH tốt nhất với giá trị IC_{50} là 0,838 mg/mL, tiếp theo là chiết xuất phosphate (1,8 mg/mL), ethanol (1,9 mg/mL) và acetone (2,1 mg/mL). Tương tự, về hoạt động bắt gốc tự do ABTS, chiết xuất bằng dung môi này cũng cho thấy giá trị IC_{50} tốt nhất, đạt 0,864 mg/mL, tiếp theo là chiết xuất phosphate (1,1 mg/mL), ethanol (1,1 mg/mL) và acetone (12,4 mg/mL).

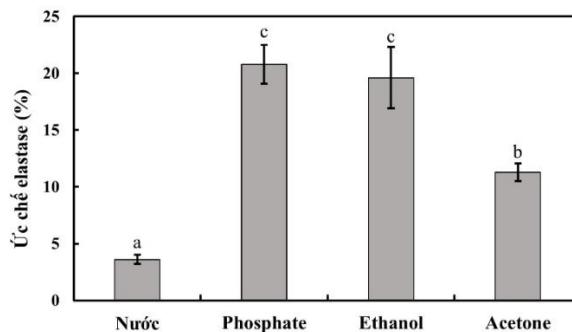


Hình 4. Hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

Việc chiết xuất nước đạt được hiệu quả cao nhất trong cả hai thử nghiệm có thể giải thích do khả năng hòa tan tốt hơn các hợp chất kháng oxy hóa trong môi trường nước, giúp tăng cường hoạt động kháng oxy hóa của chiết xuất. Acid ascorbic, một chất kháng oxy hóa mạnh đã được biết đến, cho thấy hoạt động kháng oxy hóa đáng kể với giá trị IC_{50} là 6,1 µg/mL đối với thử nghiệm DPPH và 11,7 µg/mL đối với thử nghiệm ABTS. Mặc dù giá trị IC_{50} của các chiết xuất từ trùn quế cao hơn nhiều so với acid ascorbic tuy nhiên đây mới chỉ là chiết xuất dạng thô do đó kết quả này cũng cho thấy tiềm năng như là nguồn cung cấp chất kháng oxy hóa tự nhiên. Kết quả hoạt tính kháng oxy hóa của chiết xuất trùn quế trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trước đây (Gudeta *et al.*, 2020).

Ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế

Hoạt động ức chế enzyme elastase là một trong những chỉ số quan trọng để đánh giá tiềm năng của các chiết xuất từ tự nhiên trong điều trị và phòng ngừa các tình trạng liên quan đến quá trình lão hóa da (Donarska, Łączkowski, 2020). Elastase là một enzyme phân huỷ elastin, một thành phần chính của sợi collagen trong da, và hoạt động quá mức của nó có thể dẫn đến lão hóa da. Kết quả nghiên cứu từ Hình 5 cho thấy chiết xuất từ trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau có khả năng ức chế elastase khác nhau. Chiết xuất phosphate cho thấy hoạt động ức chế elastase cao nhất, đạt 20,8%. Tiếp theo là chiết xuất ethanol (19,6%), acetone (11,3%) và nước (3,6%). Tuy nhiên, sự khác nhau kết quả ức chế elastase của phosphate và ethanol không có ý nghĩa thống kê. Điều này cho thấy đệm phosphate hiệu quả nhất trong việc chiết xuất các hoạt chất có khả năng ức chế elastase từ trùn quế. Việc các dung môi khác nhau ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chiết xuất có thể được giải thích bằng khả năng hòa tan và chiết xuất các thành phần sinh học từ nguyên liệu. Đệm phosphate có thể cung cấp điều kiện tối ưu để chiết xuất các hoạt chất có hoạt tính ức chế elastase cao, trong khi đó, các dung môi khác như nước và acetone lại cho hiệu quả thấp hơn. Kết quả hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu trước đây (Azmi *et al.*, 2014).



Hình 5. Hoạt tính ức chế elastase của chiết xuất trùn quế sử dụng các dung môi khác nhau

KẾT LUẬN

Tổng hợp các kết quả nghiên cứu từ các thí nghiệm về chiết xuất từ trùn quế cho thấy rằng dung môi chiết xuất có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất chiết xuất, hàm lượng protein và hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng. Dung môi nước đã cho thấy hiệu suất thu nhận chiết xuất cao nhất (10,6%) và chiết xuất này cũng thể hiện hoạt động kháng oxy hóa mạnh mẽ nhất đối với cả DPPH và ABTS. Trong khi đó, dung môi acetone làm tăng hàm lượng protein trong chiết xuất (70%) và đệm phosphate cho hoạt động ức chế elastase mạnh nhất (20,8%). Việc lựa chọn dung môi phù hợp không chỉ quan trọng để tối ưu hóa hiệu suất chiết xuất mà còn ảnh hưởng đến tính chất sinh học của sản phẩm cuối cùng. Các kết quả này cung cấp cơ sở cho việc phát triển các ứng dụng của chiết xuất từ trùn quế trong các lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm, nhằm hỗ trợ trong việc bảo vệ và tái tạo da, cũng như trong các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và làm đẹp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này đã được hỗ trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (số 05/2023/HĐ-QKHCN).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Azmi N, Hashim P, Hashim DM, Halimoon N, Majid NMN (2014). Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4: S348-S352.
- Bertrand M, Barot S, Blouin M, Whalen J, de Oliveira T, Roger-Estrade J (2015). Earthworm services for cropping systems. A review. *Agron Sustain Dev*, 35: 553-567.
- Chemat F, Abert Vian M, Ravi HK, Khadhraoui B, Hilali S, Perino S, Fabiano Tixier AS (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications and prospects. *Molecules*, 24(16): 3007.
- Ding S, Lin X, He S (2019). Earthworms: A source of protein. *J Food Sci Eng*, 9(5): 159-170.
- Donarska B, Z Łączkowski K (2020). Recent advances in the development of elastase inhibitors. *Future Med Chem*, 12(20): 1809-1813.
- Goyal K, Singh N, Jindal S, Kaur R, Goyal A, Awasthi R (2022). Kjeldahl method. Goyal A, Kumar H, eds. *Advanced Techniques of Analytical Chemistry*. Bentham Science Publishers: 105-112.
- Gudeta K, Kumari S, Bhagat A, Julka JM, Goyal R, Adama E (2020). Mitogenic, antioxidative and antimicrobial activities of g-90 and coelomic fluid from earthworm as a therapeutic agent, a review. *Int J Pharm Sci Res*, 11: 5298-5307.
- Hua Z, Wang YH, Cao HW, Pu LJ, Cui YD (2011). Purification of a protein from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida* and evaluation of its hemolytic, antibacterial, and antitumor activities. *Pharm Biol*, 49(3), 269-275.
- Kim HJ, Park CG, Varghese R, Lee JY, Kim Y, Sung GH (2017). In-vitro antioxidative, antiinflammatory properties of *Aurea helianthus* leaf extract a Korean traditional medicinal plant. *Saudi J Biol Sci*, 24(8): 1943-1947.
- Munteanu IG, Apetrei C (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci*, 22(7): 3380.
- Ngoc LTN, Moon JY, Lee YC (2023). Insights into bioactive peptides in cosmetics. *Cosmetics*, 10(4): 111.
- Nongonierma AB, FitzGerald RJ (2017). Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. *Trends Food Sci Technol*, 69: 289-305.
- Syamittra B, Parasuraman S, Yeng WY, Ping WY, Thujithra J, Kumar J, Dhanaraj SA (2014). A review on adverse health effects of laboratory volatile solvents. *Int J Clin Ther Diagn*, 2: 59-63.

EFFECTS OF PROTEIN EXTRACTION METHODS ON THE BIOLOGICAL ACTIVITIES OF EARTHWORM EXTRACT (*Perionyx excavatus*)

Nguyen Thi Dung*, Bui Bao Thinh, Nguyen Thi Nu Trinh, Pham Hai Son, Bui Le Kha Tu, Vo Nguyen Thanh Thao, Le Quang Luan

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

This study aims to investigate the effects of protein extraction methods using different solvents (water, ethanol, acetone, and phosphate) on the extraction efficiency, protein content, and biological activity of earthworm extract (*Perionyx excavatus*). The results indicate that water yielded the highest extraction efficiency at 10.6%, followed by ethanol (8.9%), acetone (4.9%), and phosphate (3.5%). The highest protein content was recorded in the acetone extract (70%), followed by ethanol (68.8%), water (67.5%), and phosphate (50.3%). SDS-PAGE analysis revealed characteristic protein bands in all extracts except for phosphate. The water extract exhibited superior antioxidant activity with IC₅₀ values of 0.838 mg/mL for DPPH and 0.864 mg/mL for ABTS. In contrast, the phosphate and ethanol extracts demonstrated the strongest elastase inhibitory activity at 20.8% and 19.6%, respectively, surpassing those of acetone and water. These findings underscore the importance of solvent selection concerning the properties and bioactivity of earthworm extract, highlighting their potential applications in the pharmaceutical and cosmetic industries for the production of skin-protective, antioxidant, and enzyme-inhibitory products.

Keywords: Solvent, antioxidant activity, elastase inhibitory activity, *Perionyx excavatus*, earthworm.

* Author for correspondence: Tel: 0935358270; Email: thuydung9810@gmail.com