

KHẢO SÁT CÁC HOẠT CHẤT CHỐNG OXY HÓA TRÊN HAI LOÀI TRÙN ĐẤT *Perionyx excavatus* VÀ *Lampito mauritii*

Phan Thị Bích Trâm¹*, Lâm Thị Việt Hà¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định các hoạt chất chống oxy hóa có trong hai loài trùn đất *Perionyx excavatus* và *Lampito mauritii*. Kết quả cho thấy, các hoạt chất chống oxy hóa có bản chất không enzyme và enzyme ở loài trùn đất *Perionyx excavatus* đều cao hơn loài trùn đất *Lampito mauritii*. Trùn đất xử lý ở dạng bột đông khô lạnh có thể bị giảm đi 10% - 30% các hoạt chất chống oxy hóa so với sử dụng ở dạng nguyên liệu tươi. Hàm lượng polyphenol tổng số, glutathione và vitamin C đạt cao nhất trên loài trùn đất *Perionyx excavatus* dạng tươi là 15,69 mgGAE/g, 3,01 mg/g và 0,84 mg/g tương ứng. Bộ ba enzyme chống oxy hóa loại bỏ các ion superoxide và hydrogen peroxide có hoạt tính superoxide dimutase, catalase và glutathione peroxidase tương ứng đạt 6,31 U/mg; 13,5 U/mg và 6,53 U/mg protein. Khả năng loại 50% gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) của loài trùn đất *Perionyx excavatus* dạng tươi cao hơn gấp 2,7 lần so với loài trùn đất *Lampito mauritii* dạng bột khô và có giá trị IC50 đạt thấp nhất ở mức nồng độ 2,62 mg/mL.

Từ khóa: Chống oxy hóa, *Lampito mauritii*, *Perionyx excavatus*, TPC.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, trùn đất ở Việt Nam có trên 110 loài nhưng chỉ có 6 đến 8 loài được nuôi để sử dụng và sản xuất phân bón [15]. Trong số đó có loài trùn đất *Perionyx excavatus* là được nuôi phổ biến nhất ngoài việc cung cấp nguồn đạm dinh dưỡng quý giá cho gia súc, gia cầm và thủy hải sản. Có những khuyến cáo cho rằng sử dụng loài trùn đất *Perionyx excavatus* còn giúp các loại động vật nuôi, đặc biệt là tôm có sức đề kháng cao, khỏe mạnh, có khả năng vượt qua bệnh phân trắng và tăng trưởng nhanh [7]. Ngoài ra, ở một số tỉnh như An Giang, Trà Vinh còn phổ biến và dễ tìm nhất là loài trùn đất *Lampito mauritii*, chúng sống ở những vùng đồng bằng ven biển với số lượng khá nhiều và hiện nay đang được nhân giống để nuôi đại trà.

Một số nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới cho thấy rằng trùn đất có khả năng kháng viêm [10], chống oxy hóa và đã được thử nghiệm trên động vật khi gây tổn thương tế bào gan [4]. Bansal và cs (2018) [6] sử dụng dịch chiết từ loài trùn đất *Eisenia fetida* có đặc tính kháng khuẩn rất mạnh được dùng để điều trị nhiễm trùng do vi khuẩn ở cá. Đặc biệt dịch chiết từ loài trùn đất *Perionyx excavatus* có khả năng kháng được 5 chủng vi khuẩn gram âm *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogens* và 2 chủng gram dương *Staphylococcus aureus* và *Micrococcus luteus* thường gây bệnh trên cá [5]. Tuy nhiên, các tài liệu phân tích cụ thể các chất chống oxy hóa trong trùn đất còn hạn chế hoặc không công bố. Vì vậy, trong phạm vi nghiên cứu này đã phân tích các hoạt chất chống oxy hóa trên hai loài trùn đất phổ biến là *Perionyx excavatus* và *Lampito mauritii* nhằm làm cơ sở cho các nghiên cứu về kháng khuẩn dùng trong lĩnh vực thủy sản cũng như thử nghiệm trên động vật để đánh giá khả năng bảo vệ tế bào gan bị tổn thương bởi các độc tố.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Trùn đất *Perionyx excavatus* (P. E) được thu hoạch khoảng 8 tuần tuổi đến 9 tuần tuổi, còn sống có khối lượng trung bình 500 con/kg từ hộ nông dân ấp Bình Yên A, thành phố Cần Thơ. Trùn đất *Lampito mauritii* (L. M) được thu nhận tại huyện Duyên Hải, tỉnh Trà Vinh. Trùn đất được rửa sạch bằng nước nhiều lần để loại bỏ đất và chất bẩn trên bề mặt cơ thể, sau đó được ngâm trong dung dịch NaCl 0,65%, cứ cách 30 phút thay dung dịch ngâm cho đến khi sạch ruột. Trùn đất rửa sạch đem đông lạnh ở -20°C, tiến hành các thí nghiệm trên mẫu tươi hoặc đem đông khô lạnh bằng máy Virtis (Mỹ) để thực hiện các thí nghiệm trên mẫu khô.

¹ Trường Đại học Cần Thơ

* Email: ptbtram@ctu.edu.vn

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xác định độ ẩm và hàm lượng protein nguyên liệu

Xác định độ ẩm nguyên liệu theo AOAC (2000) [2], hàm lượng protein xác định theo phương pháp của Lowry (1951) [13].

2.2.2. Khảo sát các hoạt chất chống oxy hóa trong hai loài trùn đất

Hàm lượng phenolic tổng số (TPC) được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu theo Rao (2010) [18] với chất chuẩn là axit gallic. Hàm lượng glutathione được xác định theo Haroon (2012) [9], xây dựng đường chuẩn GSH để xác định hàm lượng GSH có trong mẫu. Vitamin C được xác định bằng phương pháp đo quang phổ theo Joseph George (2003) [11].

Xác định hoạt tính enzyme catalase (CAT): Hoạt tính enzyme catalase được xác định theo phương pháp của Sinha (1972) [20]. Dựm đường chuẩn H_2O_2 với dãy nồng độ H_2O_2 từ 10 μmol - 160 μmol . Dựa vào đường chuẩn tính được nồng độ H_2O_2 suy ra hoạt tính enzyme catalase. Đơn vị hoạt tính catalase biểu thị lượng enzyme trong 1 mg protein có khả năng phân hủy 1 μmol H_2O_2 trong thời gian 1 phút ($U_{\text{CAT}}/\text{mg protein}$).

Xác định hoạt tính enzyme Glutathione peroxidase (GPx): Hoạt tính enzyme glutathione peroxidase được xác định theo Prakash (2007) [17]. Đơn vị hoạt tính GPx biểu thị lượng enzyme trong 1 mg protein có khả năng tiêu thụ 1 μmol GSH trong thời gian 1 phút ($U_{\text{GPx}}/\text{mg protein}$).

Xác định hoạt tính enzyme superoxide dismutase (SOD): Hoạt tính enzyme superoxide dismutase được xác định theo Kakkar (1984) [12].

Hoạt tính enzyme SOD quy về khả năng ức chế 50% nitroblue tetrazolium (NBT) khử trong 1 phút. Đơn vị hoạt tính SOD được xác định là lượng enzyme trong 1 mg protein ức chế 50% nitroblue tetrazolium (NTB) khử trong 1 phút ($U_{\text{SOD}}/\text{mg protein}$).

2.2.3. Đánh giá khả năng loại bỏ gốc tự do của hai loài trùn nghiên cứu

Xác định khả năng loại gốc tự do theo Sharma (2012) [21]. Kết quả SC% được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI để tìm phương trình hồi quy thể hiện mối quan hệ giữa SC% và nồng độ dịch chiết tương ứng. Từ phương trình hồi quy, mức nồng độ ức chế được 50% gốc tự do DPPH (IC50) được xác định.

2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Thí nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel và phần mềm thống kê Minitab 16. Kết quả phân tích ANOVA với độ tin cậy 95%, so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức qua phép thử LSD.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả hàm lượng các hoạt chất chống oxy hóa có bản chất không là enzyme

Các hợp chất polyphenol có khả năng chống oxy hóa bằng cách phản ứng trực tiếp với gốc tự do tạo thành một gốc tự do mới bền hơn, hoặc cũng có thể tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp vốn là xúc tác cho quá trình tạo gốc tự do [16]. Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tất cả các chỉ tiêu phân tích các hoạt chất chống oxy hóa có bản chất không là enzyme ở loài trùn đất *P. excavatus* cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với loài trùn đất *L. mauritii* khi so sánh trên cùng dạng trùn tươi hoặc trùn đông khô.

Bảng 1. Hàm lượng TPC, GSH và vitamin C trong hai loài trùn đất

Mẫu trùn đất	TPC (mg GAE/g•)	GSH (mg/g•)	Vtm C (mg/g•)
<i>P. excavatus</i> tươi	15,69 ^a ± 0,32	3,01 ^a ± 0,04	0,84 ^a ± 0,02
<i>P. excavatus</i> khô	10,77 ^b ± 0,26	1,17 ^b ± 0,02	0,64 ^b ± 0,01
<i>L. mauritii</i> tươi	10,48 ^b ± 0,16	0,76 ^c ± 0,02	0,33 ^c ± 0,02
<i>L. mauritii</i> khô	8,65 ^c ± 0,03	0,61 ^d ± 0,03	0,27 ^d ± 0,01
Mức ý nghĩa	*	*	*
CV%	1,92	1,93	2,95

Ghi chú: Số liệu trong bảng là hàm lượng trung bình của mỗi chỉ tiêu phân tích. (*) khác biệt thống kê mức ý nghĩa 5%, • Kết quả được tính trên khối lượng VCK.

Hàm lượng polyphenol tổng số (TPC) khảo sát đạt cao nhất (15,69 mg GAE/g) ứng với mẫu của loài trùn đất *P. excavatus* dạng tươi và gấp 1,5 lần so với mẫu của loài trùn đất *L. mauritii* (10,48 mg GAE/g) ở cùng dạng. Vì thế trong thực tế, loài trùn đất *P. excavatus* vừa là nguồn cung cấp đạm rất phổ biến, vừa có ý nghĩa trong việc bồi bổ sức khỏe cho vật nuôi sau khi trải qua thời gian dài điều trị bệnh. Loài trùn đất *L. mauritii* cũng được người dân sử dụng nhưng không phổ biến vì còn hạn chế trong việc nuôi đại trà. Các mẫu trùn đất nghiên cứu dạng tươi đều có hàm lượng polyphenol tổng số cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mẫu trùn đất đông khô. Hàm lượng này giảm đi khoảng 17% - 31% so với mẫu tươi ban đầu, nguyên nhân có thể do các hợp chất polyphenol bị oxy hóa một phần trong quá trình đông lạnh và sấy đông khô cũng như bảo quản. Kết quả được so sánh với nghiên cứu của Anitha và Indira (2012) [1] đã công bố về hàm lượng polyphenol tổng số trên loài trùn đất *Eudrillus euginae* là 44,36 mg/g, so với của loài trùn đất *P. excavatus* có hàm lượng khá thấp có thể do đây là hai loài khác nhau ở Ấn Độ về điều kiện sống, ngoài ra cách quy đổi về phần trăm khối lượng mẫu cũng khác nhau.

Glutathione là chất chống oxy hóa có tính khử mạnh do sự có mặt của nhóm - SH trong phân tử. Chúng dễ dàng chuyển hóa qua lại giữa hai dạng Glu-SH (dạng khử) và Glu-S-S-Glu (dạng oxy hóa), thường xuyên có mặt trong các mô của cơ thể động vật và được xem như kháng thể [22] và là cơ chế phòng thủ bẩm sinh bảo vệ cơ thể [8]. Bảng 1 cho thấy, hàm lượng glutathione giảm dần theo thứ tự các mẫu khảo sát là loài trùn đất *P. excavatus* tươi, *P. excavatus* bột khô; loài trùn đất *L. mauritii* tươi và *L. mauritii* bột khô. Các mẫu của loài trùn đất *P. excavatus* và loài trùn đất *L. mauritii* dạng tươi đều có hàm lượng GSH cao hơn mẫu dạng bột khô tương ứng. Trong đó, hàm lượng GSH cao nhất ở loài trùn đất *P. excavatus* dạng tươi đạt 3,01 mg/g gấp khoảng 2,6 lần so với loài trùn đất *P. excavatus* dạng bột khô, trong khi đó hàm lượng GSH thấp nhất ứng với mẫu của loài trùn đất *L. mauritii* dạng bột khô (0,61 mg/g). Nguyên nhân có thể do GSH là chất chống oxy hóa mạnh nên càng có thời gian tiếp xúc với không khí càng nhiều thì hoạt tính giảm càng nhanh, hoạt tính GSH ở *P. excavatus* dạng bột khô giảm khoảng 60% so với dạng tươi.

Vitamin C thuộc nhóm chất chống oxy hóa hòa tan trong nước nên dễ dàng chuyển hóa giữa các mô trong cơ thể và hoạt động như một chất chống oxy hóa trong môi trường nước của cơ thể – cả nội bào lẫn ngoại bào. Vitamin C còn hoạt động cùng với các enzyme chống oxy hóa khác như GSH -Px, catalase và SOD. Ngoài ra, vitamin C giúp phục hồi và tái tạo lại vitamin E từ dạng bị oxy hóa trong cơ thể, làm tăng cường hiệu lực chống oxy hóa của vitamin E. Vì vậy đánh giá hàm lượng vitamin C được xem là một trong những chỉ tiêu quan trọng trong việc khảo sát khả năng chống oxy hóa của một đối tượng nguyên liệu. Kết quả khảo sát cho thấy hàm lượng vitamin C ở trùn đất tươi đạt cao hơn so với trùn đất dạng bột khô và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 4 nghiệm thức khảo sát. Cụ thể, hàm lượng vitamin C đạt cao nhất ở loài trùn đất *P. excavatus* dạng tươi (0,84 mg/g), cao gấp 1,3 lần so với dạng bột khô (0,64 mg/g), cao gấp 2,5 lần so với loài trùn đất *L. mauritii* dạng tươi và gấp 3,1 lần so với loài trùn đất *L. mauritii* dạng bột khô có hàm lượng thấp nhất (0,27 mg/g). Kết quả này rất cao khi so sánh trên loài trùn đất *Eudrillus euginae* ở Ấn Độ chỉ có khoảng 0,005 mg/g bột khô. Đây cũng là cơ sở cho việc sử dụng trùn đất *P. excavatus* làm nguồn nguyên liệu đặc trị cho thử nghiệm *in vivo* trên chuột khi bị gây tổn thương tế bào gan.

3.2. Kết quả khảo sát các hoạt chất chống oxy hóa có bản chất là enzyme

Các tế bào được bảo vệ chống lại stress oxy hóa bởi một mạng lưới tương tác của các enzyme chống oxy hóa [19]. Các hợp chất superoxide khởi đầu bởi các quá trình phosphoryl oxy hóa biến đổi thành hydrogen peroxide và sau đó tiếp tục chuyển đến cho phân tử nước. Con đường giải độc này là kết quả của nhiều enzyme như superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) và glutathione peroxidase (GPx). Đây là ba enzyme quan trọng loại bỏ các ion superoxide và hydrogen peroxide. Đầu tiên, các ion superoxide sẽ được loại bỏ với sự xúc tác bởi superoxide dismutase, sau đó là catalase và peroxidase khác nhau sẽ loại bỏ các hydrogen peroxide [14]. Hệ thống phòng thủ các chất chống oxy hóa có bản chất enzyme là rào cản tự nhiên bảo vệ tế bào chống lại các peroxide của lipid. Các enzyme này ngăn ngừa sự tạo gốc hydroxyl gốc tự do và bảo vệ các thành phần tế bào từ quá trình oxy hóa.