



Research article

Research on pre-treatment method in the process of separating bioactive peptides from silkworm

Vu Kim Thoa*, Dinh Thi Thu Le, Le Thanh Hai Ha, Dao Thi Hong Van

Institute of Biological and Food Technology, Hanoi Open University, Hanoi, Vietnam

(Received: 27 Jun 2025; Revised: 11 Sep 2025; Accepted: 21 Sep 2025)

Abstract

Bioactive peptides are short amino acid sequences involved in regulating key physiological processes, including cellular signaling and metabolic functions. Despite their small size, these peptides demonstrate high specificity and significant biological activity through receptor interactions. Silkworm pupae are a rich source of proteins, lipids, carbohydrates, minerals, vitamins, and polyphenolic compounds, making them a promising raw material for peptide extraction. However, effective extraction requires an initial pretreatment step to enhance raw material preservation and facilitate lipid removal, which otherwise impairs protease activity during enzymatic hydrolysis. In this study, lipase-assisted hydrolysis was employed to remove lipids from silkworm pupae powder. Using lipase (CAS 9001-62-1), optimal conditions were established at 50°C, 1.5% enzyme concentration, and 2 hours of reaction time. This pretreatment significantly improved protease hydrolysis efficiency, resulting in a 44% increase in amino nitrogen yield compared to untreated samples.

Keywords: *Peptide, enzyme, amino acid, lipase, silkworm pupae.*

*Corresponding author: Vu Kim Thoa (E-mail: kimthoacnsh@hou.edu.vn)

<https://doi.org/10.47866/2615-9252/vjfc.4552>

Copyright © 2025 The author(s). This article is licensed under [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Nghiên cứu phương pháp tiền xử lý nguyên liệu nhộng trong quy trình tách chất peptide có hoạt tính sinh học từ nhộng tằm

Vũ Kim Thoa, Đinh Thị Thu Lê, Lê Thanh Hải Hà, Đào Thị Hồng Vân

Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam

Tóm tắt

Peptide sinh học là những chuỗi acid amin tham gia vào các quá trình chuyển hóa sinh học trong cơ thể. Những peptide này có thể hoạt động như các tín hiệu sinh hóa, điều chỉnh các hoạt động tế bào, hoặc giữ các chức năng sinh học quan trọng khác của cơ thể sống. Các peptide sinh học có thể là những phân tử ngắn, nhưng chúng có khả năng tác động mạnh mẽ và có tính chất đặc biệt giữ vai trò tương tác với các thụ thể hoặc các hệ thống sinh học. Nhộng tằm rất giàu protein, chất béo, đường, ngoài ra còn có khoáng chất, vitamin, hợp chất polyphenol và nhiều chất dinh dưỡng khác. Để tách chiết acid amin và peptid từ nhộng tằm đạt hiệu quả cao thì việc tiền xử lý nhộng tằm là bước đầu khá quan trọng. Hiệu quả tiền xử lý nguyên liệu nhộng ảnh hưởng lớn đến điều kiện bảo quản nguyên liệu, quá trình phân tách loại bỏ chất béo trong nhộng tằm để thu được hỗn hợp peptide và acid amin trước khi đi vào giai đoạn tách chiết. Tiền xử lý nguyên liệu nhộng chủ yếu là quá trình phân tách loại bỏ thành phần chất béo trong nhộng tằm, tạo điều kiện cho enzyme protease hoạt động trong công đoạn tiếp theo. Trong nghiên cứu này, quá trình tách chất béo khỏi nguyên liệu nhộng sử dụng lipase để thủy phân lipid cho hiệu quả khả quan hơn. Chế phẩm Lipase (CAS 9001-62-1) được sử dụng để loại chất béo trong quá trình tách chất béo khỏi nguyên liệu bột nhộng, điều kiện cho lipase hoạt động trong quá trình này ở nhiệt độ 50°C, tỷ lệ enzyme bổ sung là 1,5% trong thời gian 2 giờ. Hiệu suất thủy phân của protease đối với nguyên liệu nhộng qua xử lý bằng enzyme tăng 44% so với mẫu nguyên liệu chưa qua xử lý.

Từ khóa: Nhộng tằm, thủy phân, peptide, lipase, acid amin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhộng tằm chứa vitamin B1, B2 và vitamin E. Các hoạt chất quan trọng, chẳng hạn như chitin và triacontanol cũng được phân lập từ lớp vỏ. Nhộng chứa khoảng 26% dầu và 75% protein. Chất béo chiếm khoảng 30% tổng trọng lượng khô của nhộng, hàm lượng acid oleic và linoleic trong chất béo tương tự như trong mỡ động vật. Protein của nhộng tằm được đánh giá cao hơn protein của đậu nành, cá hoặc thịt bò [1]. Protein nhộng tằm chứa các chuỗi acid amin thể hiện nhiều hoạt động sinh học khác nhau, có thể giải phóng những peptide sinh học này bằng quá trình thủy phân protein nhộng tằm với enzyme protease. Một vài nghiên cứu gần đây đã chứng minh các peptide có nguồn gốc từ nhộng tằm, thu được qua quá trình thủy phân bằng enzym, thể hiện nhiều hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe [2]. Ngoài ra, một vài nghiên cứu chỉ ra protein nhộng thu được bằng phương pháp thủy phân protein bằng proteinase trung tính, có khả năng ức chế quá trình tổng hợp cholesterol, có tiềm năng lớn trong việc cải thiện tình trạng tăng cholesterol máu [3]. Peptide thủy phân từ nhộng tằm có một số chức năng khác, bao gồm cải thiện khả năng miễn dịch, hoạt động chống khối u, chống viêm và chống oxy hóa [4-6].

Phương pháp tách chiết protein nhộng tằm truyền thống bao gồm chiết bằng kiềm, sau đó là kết tủa acid. Protein nhộng sau khi kết tủa được xử lý bằng phương pháp ly tâm và thu nhận bằng đông khô. Tuy nhiên, bên cạnh việc cần một bước tẩy dầu tốn nhiều công sức, phương pháp truyền thống này còn tiêu tốn một lượng lớn acid và kiềm dẫn đến ô nhiễm môi trường. Hơn nữa, trong khi serine và lysine bị phân hủy bởi quá trình hòa tan bằng kiềm, một số acid amin bị chuyển đổi sang dạng khó hấp thụ do quá trình kết tủa. Quá trình thủy phân bằng acid cũng dẫn đến sự phân hủy tryptophan, thường tạo ra mùi đặc biệt. Phương pháp truyền thống này có hạn chế lớn bao gồm ô nhiễm khá lớn, các phản ứng diễn ra khó kiểm soát, giảm cảm giác an toàn và ngon miệng, tạo ra một vài sản phẩm phụ không mong muốn và cuối cùng là quy trình sản xuất có tiềm ẩn gây nguy hại. Vì vậy, việc phát triển một quy trình mới có hiệu quả cao hơn và thân thiện với môi trường để chiết xuất protein nhộng tằm là rất cần thiết [7].

Một mối quan tâm lớn liên quan đến các nguồn protein mới, bao gồm nhộng tằm, là khả năng gây dị ứng thực phẩm của chúng [8]. Trong những năm gần đây, một số lượng lớn các trường hợp phản ứng dị ứng với nhộng tằm đã được báo cáo [9], bao gồm dị ứng nghiêm trọng và thậm chí là sốc phản vệ [10]. Do đó, dị ứng với nhộng tằm hiện là chủ đề của nhiều nghiên cứu trên toàn thế giới. Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã báo cáo

ảnh hưởng của quá trình thủy phân bằng enzyme lên khả năng gây dị ứng protein. Ví dụ, nghiên cứu đã chứng minh rằng khả năng gây dị ứng của một số loài giáp xác đã giảm khi xử lý bằng protease [11]. Trong một nghiên cứu khác, quá trình tiêu hóa proteinase có thể làm giảm hiệu quả khả năng liên kết globulin miễn dịch E (IgE) của tropomyosin từ cả tôm và cua [12].

Với những ưu điểm vượt trội, thu nhận peptide sinh học bằng việc ứng dụng enzyme và vi sinh vật đang ngày càng trở thành xu thế. Trong phương pháp này, peptide được tách chiết từ nguyên liệu thông qua hoạt động chuyển hóa của enzyme và quá trình lên men vi sinh vật. Tiền xử lý nhộng tằm chủ yếu gồm hai giai đoạn: (1) Sấy ở nhiệt độ phù hợp, mục đích tạo bột nguyên liệu thích hợp cho giai đoạn thủy phân bằng enzyme sau, đồng thời với nguyên liệu bột có độ ẩm thấp việc bảo quản trở nên dễ dàng hơn; (2) Tách chất béo: Hàm lượng chất béo của nhộng tằm khô là 25 đến 32% và có 11 loại acid béo, trong đó hàm lượng acid α -linolenic tương đối cao [13]. Các nghiên cứu về hydrolysis ghi nhận rằng chất béo và các chất kháng enzyme (như trypsin inhibitors) có thể cản trở sự tiếp xúc giữa enzyme và protein, làm giảm hiệu suất thủy phân [14]. Do đó, hàm lượng chất béo trong nhộng tằm lớn có thể là yếu tố gây cản trở hoạt động thủy phân của enzyme protease, vì vậy loại chất béo là bước hỗ trợ cần thiết trong quy trình thủy phân protein nhộng thu nhận peptide có hoạt tính mong muốn. Sử dụng hệ enzyme lipase để loại lipid trong bước đầu xử lý nguyên liệu nhộng, giúp nâng cao hiệu quả hoạt động thủy phân của protease tạo các peptide sinh học và acid amin.

Công nghệ thủy phân bằng enzyme đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt là chế biến thực phẩm và đã thành công trong việc thay đổi các đặc tính dinh dưỡng, chức năng sinh học của protein thực phẩm, bao gồm cả việc giảm các hợp chất gây dị ứng [15]. Quá trình sử dụng enzyme làm giảm khả năng gây dị ứng bằng cách phân hủy protein thành các mảnh/peptide hoặc acid amin nhỏ và thường không phá hủy giá trị dinh dưỡng của nguồn protein trong điều kiện ôn hòa. Chế phẩm lipase được nghiên cứu tìm ra các điều kiện tối thích để tách chiết và loại chất béo khỏi nguyên liệu nhộng tằm, tăng hiệu quả xúc tác và thủy phân protein nhộng bằng protease thu nhận peptid sinh học và các amino acid.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nhộng tằm *Bombyx mori* L.

Lipase 30.000U (Trung Quốc): thủy phân chất béo trong nhộng tằm giúp tăng hiệu quả tách chiết chất béo khỏi nguyên liệu.

Bromelain 2400 GDU (Ấn Độ): thủy phân protein nhộng tằm thành amino acid và các peptide sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố tới quá trình tiền xử lý nguyên liệu nhộng tằm, thí nghiệm được bố trí gồm các bước sau:

Bước 1: Sấy nhộng tằm. Từ nhộng tằm tươi, tiến hành sấy/nghiền/sấy ở nhiệt độ, thời gian phù hợp để thu bột nhộng tằm có độ ẩm thích hợp làm nguyên liệu cho giai đoạn tiếp theo.

Bước 2: Tách/loại chất béo. Thủy phân bột nhộng tằm nguyên liệu bằng enzyme lipase, giúp tăng hiệu quả tách chất béo khỏi nguyên liệu, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tách chiết peptide sinh học bằng enzyme protease.

Bước 3: Thủy phân protein nhộng tằm. Dịch bột nhộng tằm sau khi loại bỏ thành phần chất béo, tiếp tục được thủy phân bằng enzyme Bromelain, quá trình này giúp protein nhộng được phân cắt thành các peptide ngắn có hoạt tính sinh học và các amino acid có giá trị dinh dưỡng cao. Nitor là nguyên tố đặc trưng trong cấu trúc của peptide, hàm lượng nitor tỷ lệ thuận với peptide và acid amin. Do đó, hàm lượng amin tổng trong dịch thủy phân được xác định để đánh giá hiệu quả của quá trình tách béo đến khả năng tách chiết peptide sinh học từ nhộng tằm bằng enzyme.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình sấy nhộng tằm

Trong **bước 1**, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ sấy và thời gian sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu nhộng tằm. Thí nghiệm tiến hành như sau:

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu:

Nhộng tằm tươi sau khi làm sạch tiến hành sấy theo 2 giai đoạn: (1) Sấy nhộng ở các mức nhiệt độ từ 40 - 70°C, bước nhảy 10°C trong thời gian 4 giờ; (2) Xay nhỏ nhộng sấy và tiếp tục sấy thêm 4 giờ ở cùng nhiệt độ. Tiến hành xác định độ ẩm bột nguyên liệu sau sấy, thu bột nhộng tằm và bảo quản [15].

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu:

Nhộng tằm tươi sau khi làm sạch tiến hành sấy theo 2 giai đoạn: (1) Sấy nhộng nhiệt độ thích hợp đã lựa chọn ở nghiên cứu trên trong thời gian 4 giờ; (2) Xay nhỏ nhộng sấy và tiếp tục sấy thêm các khoảng thời gian là 0h, 1h, 2h, 3h, 4h giờ ở cùng nhiệt độ. Tiến hành xác định độ ẩm bột nguyên liệu sau sấy, thu bột nhộng và bảo quản [16].

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố đến quá trình tách chất béo trong bột nhộng tằm bằng enzym lipase

Trong bước 2, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, thời gian, tỷ lệ enzym bổ sung đến quá trình tách chất béo từ bột nguyên liệu nhộng tằm bằng enzym lipase. Các thí nghiệm được bố trí như sau:

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu:

Cân 10g bột nhộng tằm, hòa vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), pH được điều chỉnh đến pH 8.0 bằng NaOH 1 M. Duy trì dịch bột nhộng tằm ở 40°C trong 30 phút sau đó chỉnh lại pH về 8,0, nếu cần. Bổ sung enzym lipase (1% w/v), thực hiện phản ứng thủy phân ở các mức nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C trong 2h, duy trì khuấy nhẹ trong suốt quá trình. Sau phản ứng, dịch thủy phân được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút ở nhiệt độ thường, thời gian ly tâm 10 phút. Dùng pipet hoặc phễu chiết tách lớp chất béo trên bề mặt và xác định khối lượng chất béo thu được.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu:

Tiến hành thủy phân 10 g bột nhộng tằm bằng lipase (1% w/v) ở 40°C trong 3 h, duy trì khuấy nhẹ trong suốt quá trình thủy phân. Sau mỗi 30 phút, tiến hành ly tâm mẫu ở tốc độ 5000 vòng/phút ở nhiệt độ thường, thời gian ly tâm 10 phút. Dùng pipet hoặc phễu chiết tách lớp chất béo trên bề mặt và xác định khối lượng chất béo thu được.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ lipase bổ sung đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu:

Tiến hành thủy phân bột nhộng tằm bằng lipase với tỷ lệ enzym bổ sung tăng dần 0,5 - 2,5% (v/v), ở 40°C trong 2 h, duy trì khuấy nhẹ trong suốt quá trình thủy phân. Sau phản ứng, tiến hành ly tâm mẫu ở tốc độ 5000 vòng/phút ở nhiệt độ thường, thời gian ly tâm 10 phút. Dùng pipet hoặc phễu chiết tách lớp chất béo trên bề mặt và xác định khối lượng chất béo thu được.

2.2.4. Phương pháp thủy phân nhộng tằm bằng protease

Hòa 10 g bột nhộng tằm vào nước theo tỷ lệ 1:10 (w/v), bổ sung protease với tỷ lệ 1%, giữ trong bể ổn nhiệt 50°C trong 4h, khuấy liên tục trong suốt quá trình gia nhiệt. Sau 4h, tiến hành ly tâm lạnh, tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút, loại bỏ lớp cặn, thu dịch chứa hỗn hợp acid amin và peptide. Xác định hàm lượng amin tổng trong dịch thủy phân bằng phương pháp chuẩn độ formol [17]. So sánh hàm lượng amin tổng thu được trong dịch thủy phân đã tách chất béo bằng enzym lipase với dịch chưa tách chất béo để đánh giá hiệu quả của việc xử lý tách béo bằng enzym đối với quá trình thủy phân protein nhộng tằm.

2.2.5. Phương pháp thống kê xử lý số liệu

Các số liệu thô thu được được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 16.0. Giá trị được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn, mỗi giá trị trung bình được tính từ tối thiểu 3 lần lặp lại độc lập. So sánh hai giá trị trung bình được thực hiện bằng kiểm định T-test với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu

Quá trình sấy nguyên liệu ảnh hưởng không nhỏ đến hiệu quả trích ly, tách chiết peptide từ nhộng tằm. Độ ẩm quá thấp hoặc quá cao dẫn đến việc tách chất béo trong nhộng kém hiệu quả. Đối với nguyên liệu thông thường, khi bảo quản thường sấy đến độ ẩm dưới 10%, để tránh ẩm mốc gây nhiễm bẩn và hỏng nguyên liệu. Nhiệt độ sấy là một trong những tác nhân quan trọng trong quá trình sấy nguyên liệu, tiến hành thực hiện quá

trình sấy nhộng theo 2 giai đoạn ở các mức nhiệt độ khác nhau, mỗi giai đoạn sấy kéo dài 4 giờ. Kết quả độ ẩm của nguyên liệu ở các nhiệt độ sấy khác nhau được trình bày trong **Bảng 1**.

Bảng 1. Độ ẩm của nguyên liệu ở các nhiệt độ sấy khác nhau

Nhiệt độ	Độ ẩm nguyên liệu sau sấy (%)
40°C	25,58 ± 0,08 ^a
50°C	14,29 ± 0,04 ^b
60°C	6,72 ± 0,07 ^c
70°C	2,59 ± 0,01 ^d
<i>p</i>	<0,001

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các giá trị trên cùng một cột có mũ là các chữ cái giống nhau thì khác biệt

Kết quả phân tích ANOVA cho thấy giá trị độ ẩm có ý nghĩa thống kê giữa các mức nhiệt độ khác nhau ($p < 0,001$). Từ **Bảng 1**, ở nhiệt độ 40°C và 50°C độ ẩm còn khá cao không thích hợp để bảo quản và chất béo từ nhộng. Theo thời gian, độ ẩm nguyên liệu giảm dần, ở mức 60°C độ ẩm giảm xuống dưới 10%. Khi sấy ở nhiệt độ 70°C làm cho độ ẩm nguyên liệu chỉ còn 2,58%. Tuy nhiên, ở nhiệt độ này nhộng bị giòn và khô rất khó để thực hiện bước tiếp theo. Do đó, lựa chọn nhiệt độ thích hợp cho quá trình sấy là 60°C.

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian sấy đến độ ẩm của bột nguyên liệu

Nhộng sau khi sấy lần 1 ở nhiệt độ 60°C trong 4 h, tiến hành xay nhỏ và tiếp tục sấy lần 2 với các khoảng thời gian là 0 – 4 h ở cùng nhiệt độ 60°C. Sau 2 h sấy bột nhộng ở 60°C, độ ẩm của nguyên liệu giảm xuống 8,6% và độ ẩm giảm ít khi tiếp tục sấy ở nhiệt độ này. Điều này khá dễ hiểu bởi trong nhộng thì thành phần chất béo chiếm tỷ lệ khá lớn, khó có thể tiếp tục giảm độ ẩm xuống thấp hơn nữa khi kéo dài thời gian.

Bảng 2. Độ ẩm của nguyên liệu theo thời gian sấy

Thời gian sấy (giờ)	Độ ẩm nguyên liệu sau sấy (%)
0	18,53 ± 0,33 ^a
1	12,53 ± 0,15 ^b
2	8,60 ± 0,06 ^c
3	7,17 ± 0,11 ^d
4	6,38 ± 0,13 ^e
<i>p</i>	<0,001

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các giá trị trên cùng một cột có mũ là các chữ cái giống nhau thì khác biệt

Từ **Bảng 2** kết quả khảo sát độ ẩm nguyên liệu khi thực hiện sấy với các mốc thời gian, nhóm nghiên cứu lựa chọn phương án sấy gồm hai giai đoạn:

- (1) Sấy nhộng ở nhiệt độ 60°C trong 4 giờ;
- (2) Xay nhỏ nhộng sấy và tiếp tục sấy trong 2 giờ ở cùng nhiệt độ.

Độ ẩm bột nhộng sau sấy đạt 8 - 10%. Độ ẩm này phù hợp cho việc bảo quản nguyên liệu và quá trình thủy phân bằng enzym sau này.

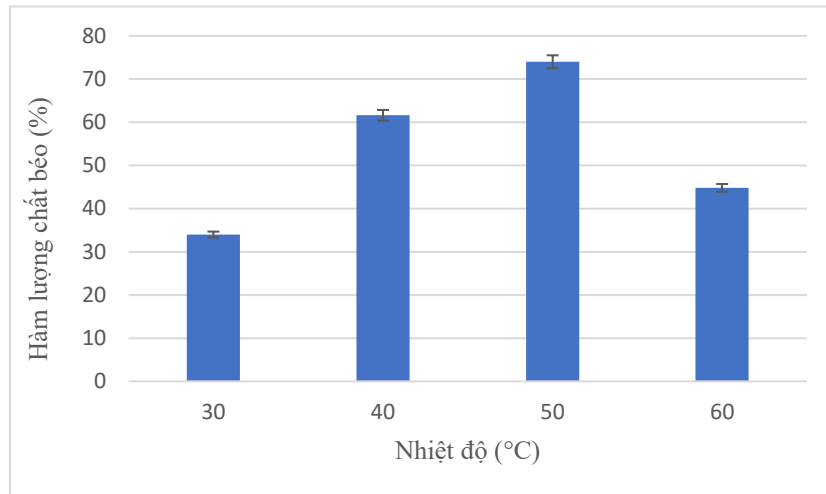
3.2. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tách chất béo từ bột nguyên liệu nhộng tằm bằng lipase

Quá trình tiền xử lý nguyên liệu nhộng chủ yếu là quá trình tách chất béo khỏi bột nhộng tằm, giúp cho enzym protease hoạt động hiệu quả hơn trong công đoạn thủy phân sau này. Quá trình tách chất béo khỏi nguyên liệu nhộng thường sử dụng phương pháp gia nhiệt hoặc enzym lipase. Thực tế, sử dụng lipase để thủy phân chất béo trong quá trình tách béo thường cho hiệu quả hơn do khả năng thủy phân chọn lọc lipid mà không ảnh hưởng đến các thành phần khác trong bột nhộng tằm. Ngoài ra, nhiệt độ cao dễ phá hủy các thành phần dinh dưỡng trong bột nhộng tằm như protein, acid amin, vitamin và làm giảm chất lượng tổng thể của sản phẩm.

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu

Tiến hành thủy phân bột nhộng tằm bằng lipase ở các mốc nhiệt độ 30°C, 40°C, 50°C, 60°C trong 2 h, duy trì khuấy nhẹ trong suốt quá trình. Kết thúc phản ứng, thu chất béo bằng phễu chiết và xác định khối lượng thu được.

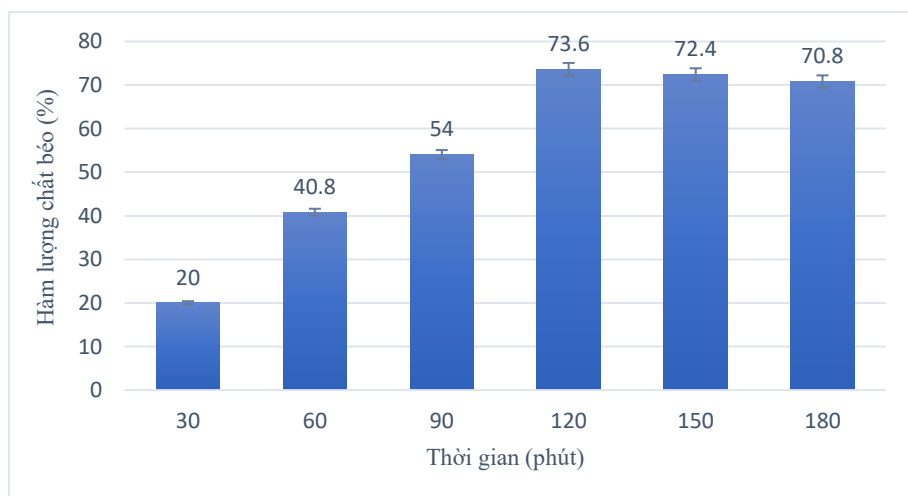
Kết quả ở **Hình 1** cho thấy, khối lượng chất béo thu được đạt mức cao nhất ở 50°C (đạt 74%). Khi nhiệt độ tăng đến 60°C, lượng chất béo thu được giảm rõ rệt. Nhiệt độ cao làm giảm hoạt tính của enzyme, khả năng xúc tác của lipase giảm dần và enzyme có thể bắt đầu bị biến tính [18].



Hình 1. Hàm lượng chất béo thu được ở các mốc nhiệt độ khác nhau

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu

Thời gian là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của enzyme. Việc xác định thời gian phản ứng phù hợp cho enzyme lipase là vô cùng cần thiết. Tiến hành khảo sát ở nhiệt độ 40°C trong khoảng thời gian 180 phút, cứ mỗi 30 phút lấy mẫu phân tích hàm lượng chất béo thu được, kết quả được trình bày trong **Hình 2**.



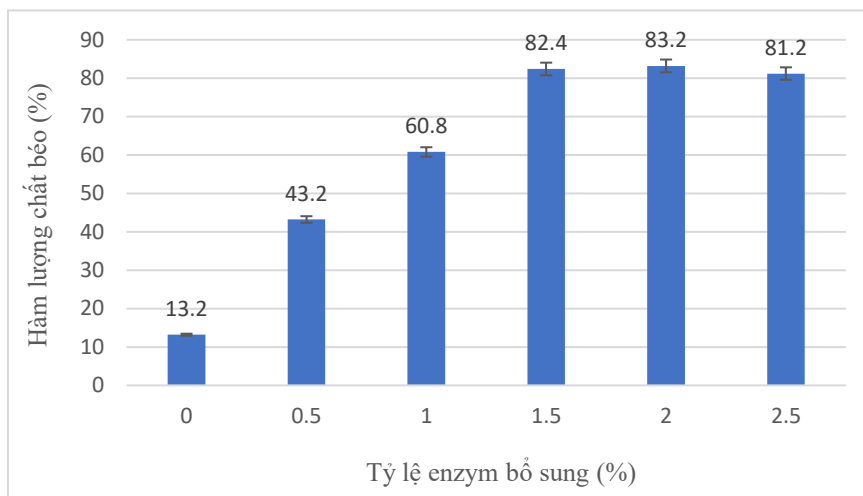
Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đến hàm lượng chất béo tách chiết

Biểu đồ **Hình 2** cho thấy, hàm lượng chất béo thu được có sự thay đổi theo thời gian phản ứng của enzyme lipase. Trong 30 phút đầu của phản ứng, hàm lượng chất béo thu được chỉ đạt 20% (w/w). Trọng lượng chất béo tăng đáng kể trong 120 phút đầu (hàm lượng chất béo thu được đạt 73,6%). Khi kéo dài thời gian lên 180 phút, hàm lượng chất béo gần như không thay đổi. Thời gian khuấy dài, sản phẩm trong dịch thủy phân tăng

cao có thể cản trở trung tâm hoạt động của enzyme, dẫn đến cơ chất lipid khó tiếp xúc với trung tâm hoạt động của enzyme làm quá trình nhũ hoá của mẫu bị ảnh hưởng và làm giảm lượng chất béo tách được [19].

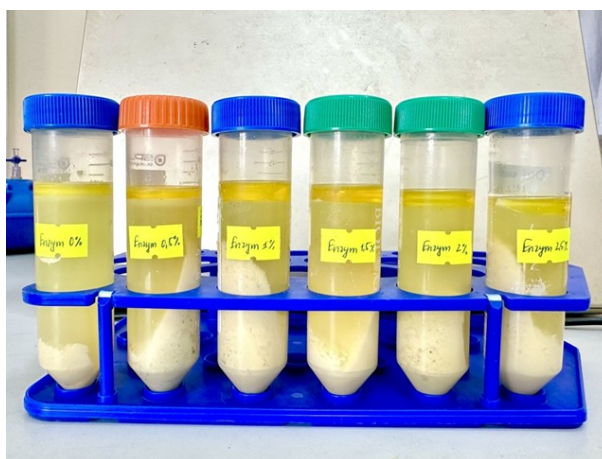
3.2.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme bổ sung đến hàm lượng chất béo tách chiết từ bột nguyên liệu

Trong phản ứng thủy phân của lipase, chất béo trong nhộng tằm đóng vai trò là cơ chất bị phân giải bởi enzyme lipase - xúc tác phản ứng thủy phân giúp quá trình tách chất béo nhộng đạt hiệu quả cao hơn. Tiến hành đánh giá ảnh hưởng của bổ sung enzyme theo tỷ lệ enzyme với lượng enzyme tăng dần từ 0,5 đến 2,5%, với bước nhảy 0,5, thu được kết quả ở **Hình 3**.



Hình 3. Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme bổ sung khác nhau đến hàm lượng chất béo tách chiết

Hàm lượng chất béo tách được tăng dần khi tăng lượng enzyme lipase bổ sung từ 0,5% - 2%. Trọng lượng chất béo đạt mức cao nhất là 2,08 g khi tỷ lệ enzyme bổ sung 2%. Điều này khá dễ hiểu, bởi trong một giới hạn cơ chất nhất định, hàm lượng enzyme bổ sung tỷ lệ thuận với tốc độ phản ứng. Tuy nhiên, hàm lượng chất béo thu được ở mức enzyme 1,5% và enzyme 2% gần như tương đương, do đó, để tiết kiệm, tỷ lệ enzyme thích hợp để bổ sung cho quá trình tách chất béo khỏi nguyên liệu là 1,5%.



Hình 4. Hình ảnh dịch thu được sau khi ly tâm để tách chất béo với các tỷ lệ enzyme khác nhau

Trong phản ứng enzyme, khả năng xúc tác của enzyme bị tác động bởi nhiều yếu tố bao gồm tỷ lệ giữa enzyme và cơ chất. Trong giới hạn nồng độ nhất định, khi nồng độ cơ chất tăng thì tốc độ phản ứng tăng dần theo tỷ lệ. Ở nồng độ cơ chất thấp, nhiều phân tử enzyme có trung tâm hoạt động chưa liên kết với cơ chất nên khi tăng nồng độ cơ chất sẽ làm tăng tốc độ phản ứng. Tuy nhiên, khi nồng độ cơ chất đạt đến một giới hạn nhất định, các trung tâm hoạt động của enzyme hầu hết đã liên kết với cơ chất làm dẫn đến số lượng enzyme trở nên giới hạn. Điều này cũng lý giải vì sao hiệu suất tách chất béo chỉ dao động nhẹ, thậm chí giảm nhẹ khi tiếp tục tăng thể tích enzyme bổ sung từ 1,5 - 2,5%.

3.3. Đánh giá hiệu quả thủy phân protein nhộng sau xử lý nguyên liệu bằng enzyme lipase

Bột nhộng tằm sau khi sấy được hòa tan trong nước cất ở mức 10% (w/v) và độ pH được điều chỉnh đến pH 8,0 bằng NaOH 1M. Dung dịch này được duy trì ở 50°C trong 30 phút. Enzyme lipase được bổ sung vào với tỷ lệ 1,5%, giữ ở nhiệt độ 50°C trong 2 h. Tiến hành ly tâm lạnh 5000 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 10°C. Dịch sau khi tách bỏ lớp chất béo phía trên tiến hành bổ sung enzyme protease để thực hiện quá trình thủy phân protein nhộng. Hàm lượng amin tổng trong dịch thủy phân được xác định bằng formaldehyde (Bảng 3).

Bảng 3. Hàm lượng amin tổng trong dịch thủy phân protein nhộng tằm

Nguyên liệu nhộng	Hàm lượng amin tổng (mg/mL)
Không tách chất béo	15,67 ± 0,15 ^b
Tách chất béo bằng xử lý lipase	22,60 ± 0,40 ^a
<i>p</i>	<0,001

Ghi chú: Số liệu được trình bày dưới số trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$

Hiệu suất thủy phân của protease đối với nguyên liệu nhộng qua xử lý bằng enzyme lipase tăng rõ rệt so với nguyên liệu chưa được loại chất béo. Hàm lượng amin tổng thu nhận tăng 44% (so với khi dùng bột nhộng tằm chưa tách chất béo). Ngoài ra, lượng chất béo tách từ nhộng khi sử dụng enzyme lipase khá đồng nhất, điều kiện phản ứng nhẹ nhàng giúp bảo toàn hoạt tính sinh học của lipid nhộng, có thể tận dụng làm nguyên liệu tách chiết lipid sử dụng trong thực phẩm [20].

4. KẾT LUẬN

Sau quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã lựa chọn được phương pháp tiền xử lý nguyên liệu thích hợp cho quy trình tách chiết peptide sinh học từ nhộng tằm. Nhiệt độ thích hợp cho quá trình sấy nhộng tằm là 60°C, giai đoạn 1 sấy trong 4 giờ, giai đoạn 2 sấy trong 2 giờ. Độ ẩm bột nguyên liệu sau sấy đạt 8 - 10%, độ ẩm này phù hợp cho việc bảo quản và các bước xử lý bằng enzyme sau này. Trong công đoạn tách chất béo, nhiệt độ thích hợp để lipase hoạt động là 50°C trong 2 giờ, tỷ lệ lipase bổ sung là 1,5%. Ở điều kiện này, tỷ lệ chất béo tách được đạt trên 70%, dịch nhộng tằm sau tách béo dễ dàng bị thủy phân bởi protease mà không bị hạn chế bởi hàm lượng chất béo ban đầu.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ từ nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở, mã số MHN 2025 - 02.25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. K.P. Singh and R.S. Jayasomu, "Bombyx mori - A Review of its Potential as a Medicinal Insect," *Pharmaceutical Biology*, vol. 40, no. 1, pp. 28–32, 2002.
- [2]. Xiaolin Wu, Jing Yang, William MumbY, Yuhong Zhang, Yu Zhang, Chen Wang, Xiaoyong Chen, Huayi Suo, Jiajia Song, "Silkworm pupa protein and its peptides: Preparation, biological activity, applications in foods, and advantages," *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 139, pp. 104129, 2023.
- [3]. Suling Sun, Wei Wang, Nan Wang, Yu Zhang, Zuoyi Zhu, Xue Li, Junhong Wang, Qihe Chen, Faizan Ahmed Sadiq, Hua Yang, Qianhui Qi, Guohua Zhang, "HPP and SGQR peptides from silkworm pupae protein hydrolysates regulated biosynthesis of cholesterol in HepG2 cell line," *Journal of Functional Foods*, vol. 77, 2021.
- [4]. Li Z., Zhao S., Xin X., Zhang B., Thomas A., Charles A., Lee K.S., Jin B.R., Gui Z. Purification, "Identification and Functional Analysis of a Novel Immunomodulatory Peptide from Silkworm Pupa Protein," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 26, pp. 243–249, 2020.
- [5]. Zhou Y., Ji X., Wang D., Guo Y., Zhao J., Yan W, "Effect of Silkworm Pupae (*Bombyx mori*) Protein on Colon Cancer in Nude Mice: Inhibition of Tumor Growth, Oxidative Stress and Inflammatory Response," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 14, 2023.
- [6]. Maria Cermeño, Carmen Bascón, Miryam Amigo-Benavent, Manuel Felix, Richard J. FitzGerald, "Identification of peptides from edible silkworm pupae (*Bombyx mori*) protein hydrolysates with antioxidant activity," *Journal of Functional Foods*, vol. 92, 2022.

- [7]. Qing-Lei Zeng, Ning Zhang, Yue-Yue Zhang, Xiang-Dong Xin, Thomas Attaribo, Ying Shao, Liu-Mei Tang, Ran Zhang, Kwang Sik Lee, Byung Rae Jin, Zhongzheng Gui, "Ionic liquid extraction of silkworm pupa protein and its biological characteristics," *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Vol. 24, iss. 1, pp. 363-368, 2021.
- [8]. Isabella Pali-Schöll, Eva Untersmayr, Martina Klems and Erika Jensen-Jarolim, "The Effect of Digestion and Digestibility on Allergenicity of Food," *Nutrients*, vol. 10, no. 9, 2018.
- [9]. KM Ji, Z-K Zhan, J-J Chen, Z-G Liu, "Anaphylactic shock caused by silkworm pupa consumption in China," *Allergy*, vol. 63, no. 10, 2008.
- [10]. [10] Van der Poel, L., Chen, J. and Penagos, M, "Food Allergy Epidemic—Is It Only a Western Phenomenon?," *Current Allergy & Clinical Immunology*, vol. 22, no. 3, 2009.
- [11]. Kuniyoshi Shimakura, Yumiko Tonomura, Yuki Hamada, Yuji Nagashima, Kazuo Shiomi (2005). "Allergenicity of crustacean extractives and its reduction by protease digestion," *Food Chemistry*, Vol. 91, iss. 2, pp. 247-253, 2005.
- [12]. Yuan-Yuan Huang, Guang-Ming Liu, Qiu-Feng Cai, Wu-Yin Weng, Soheila J. Maleki, Wen-Jin Su, Min-Jie Cao, "Stability of major allergen tropomyosin and other food proteins of mud crab (*Scylla serrata*) by in vitro gastrointestinal digestion," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 48, iss. 5, pp. 1196-1201, 2010.
- [13]. Thirupathaiah Yeruva, Harishkumar Jayaram, Ravindra Aurade, Manthira Moorthy Shunmugam, Vijay S Shinde, Sathyendra Rao Baragi Venkatesharao, Mary Josepha Azhiyakathu, "Profiling of nutrients and bioactive compounds in the pupae of silkworm, *Bombyx mori*," *Food Chemistry Advances* vol. 3, 2023.
- [14]. X. MeiS. CaiH. Wu, "Volatile components and in Vitro digestibility of silkworm pupae protein," *Modern Food Science and Technology, Beijing University*, vol. 31, no. 10, 2015.
- [15]. Yan Dai, Meijia Huang, Yujuan Xu, Lixia Mu, Jingyan Gao, Hongbing Chen, Zhihua Wu, Anshu Yang, Yong Wu, Xin Li, "Enzymatic hydrolysis of silkworm pupa and its allergenicity evaluation by animal model with different immunization routes," *Food Science and Human Wellness*, vol. 12, iss. 3, pp. 774-782, 2023.
- [16]. Vu Kim Thoa, Nguyen Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Thu Hien, "Research on the Acquisition of Amino Acid-Rich Extracts from Silkworm Pupae by Enzymes," *Vietnam Journal Online*, vol. 95, pp. 12 – 20, 2022 [in Vietnamese].
- [17]. TCVN 6120:2018 (ISO 662:2016) - Animal and vegetable oils and fats - Determination of moisture and volatile content [in Vietnamese].
- [18]. Paul D., Dey S., "The essential amino acids, lipid profile, and fat-soluble vitamins of edible silkworms *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)," *International Journal of Tropical Insect Science*, vol. 34, pp. 239–247, 2014.
- [19]. Wang W., Xu L., Zou Y., Pang D., Shi W., Mu L., Li E., Lan D., Wang Y., Liao S, "Comprehensive identification of the main lipid layers and tocopherols in silkworm oil (*Antheraea pernyi* and *Bombyx mori*)," *European Journal of Lipid Science & Technology*, vol. 122, 2020.
- [20]. Lina Zhao, Baoxiang Wu, Shuyun Liang, Douyong Min, Hongrui Jiang,s "Insight of Silkworm Pupa Oil Regulating Oxidative Stress and Lipid Metabolism in *Caenorhabditis elegans*". *Foods*, vol. 11, iss. 24, pp. 4084, 2022.