

PEPTIDE CHỐNG TĂNG HUYẾT ÁP TINH SẠCH TỪ GELATIN VỎ CÁ RÔ PHI VẦN

Ngô Đại Hùng

Trường Đại học Thủ Dầu Một

TÓM TẮT

Cao huyết áp là nhân tố nguy hiểm nhất đối với các bệnh tim mạch. Trong số những quá trình liên quan cao huyết áp, enzym chuyển angiotensin-I (ACE) đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển huyết áp. Trong nghiên cứu này, gelatin vẩy cá rô phi vằn được thủy phân dùng alcalase, pronase E, pepsin and trypsin. Trong số đó, alcalase hydrolysate cho thấy sự ức chế ACE cao nhất. Do đó, alcalase hydrolysate được tinh sạch tiếp tục sử dụng hệ thống sắc kí lỏng nhanh, sắc kí lỏng hiệu năng cao và Q-TOF LC/MS/MS. Cuối cùng, một peptide có hoạt tính ức chế ACE được xác định là DPALATEPDPMPF với khối lượng phân tử là 1399 Da. Peptide ức chế ACE tinh sạch từ gelatin vẩy cá rô phi vằn có thể được sử dụng như là thành phần thực phẩm chức năng trong việc ngăn chặn huyết áp cao.

Từ khóa: gelatin, hoạt tính, ức chế enzym, huyết áp, cá rô phi vằn

1. GIỚI THIỆU

Bệnh cao huyết áp là một trong những yếu tố nguy cơ dễ dẫn đến hình thành mảng xơ vữa, tiến triển bệnh lý cơ tim thiếu máu cục bộ và tai biến mạch máu não đồng thời ngày càng gia tăng trên thế giới. Trong số những quá trình liên quan cao huyết áp, enzym chuyển angiotensin-I (ACE) đóng vai trò quan trọng trong việc điều khiển huyết áp vì ACE chuyển angiotensin-I (decapeptide Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu không có hoạt tính) thành angiotensin-II (octapeptide Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe có hoạt tính) là chất có tác dụng co mạch. Do đó, hoạt tính ức chế ACE được xem như là một phương pháp chữa trị hiệu quả trong việc điều khiển cao huyết áp [1].

Ngành chế biến thủy hải sản thải ra một lượng lớn các phế phụ phẩm như da, vẩy, nội tạng và các chất béo gây ô nhiễm môi trường. Việc tận dụng các phế phụ phẩm này để tạo ra những sản phẩm có lợi cho sức khỏe vừa nâng cao giá trị các phụ phẩm vừa góp phần giải quyết ô nhiễm môi

trường. Việc nghiên cứu tạo ra các sản phẩm từ gelatin peptide phục vụ cho ngành dược phẩm mang lại giá trị thương mại cao đã và đang được các nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam quan tâm. Gelatin peptide là sản phẩm có giá trị dinh dưỡng cao với nhiều công dụng tốt cho sức khỏe con người như giảm cao huyết áp, kháng oxi hóa, kháng viêm... [2]. Mục đích của nghiên cứu này là tinh sạch peptide ức chế ACE từ gelatin vẩy cá rô phi vằn bằng các kĩ thuật hiện đại như sắc kí lỏng nhanh, sắc kí lỏng hiệu năng cao và Q-TOF LC/MS/MS.

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Gelatin vẩy cá rô phi vằn được mua từ Geltech Co., Busan, Hàn Quốc. Pronase E, pepsin, trypsin, ACE (từ phôi thỏ) và hippuryl-histidyl-leucine (HHL) được mua từ công ty hóa chất Sigma (St. Louis, MO, Mỹ). Alcalase được mua từ Novozymes (Bagsvaerd, Đan Mạch).

2.2. Chuẩn bị thủy phân gelatin

Gelatin được thủy phân riêng biệt với các enzym khác nhau (alcalase, pronase E, pepsin and trypsin) dưới những điều kiện tối ưu. Tỷ lệ giữa enzym và cơ chất là 1/100 (w/w). Hỗn hợp được khuấy 4 giờ tại pH và nhiệt độ tối ưu cho từng enzym, sau đó được đun ở 100°C trong 10 phút để bất hoạt enzym. Sản phẩm thủy phân (hydrolysate) được khử muối, sấy khô và giữ âm 80°C cho đến khi dùng.

2.3. Tinh sạch peptide

Peptide được tinh sạch sử dụng hệ thống sắc kí lỏng nhanh (FPLC, AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Thụy Điển) và sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC, Dionex Korea Ltd., Sunnyvale, CA).

2.4. Xác định chuỗi amino axit

Khối lượng phân tử và chuỗi amino axit của peptide được xác định sử dụng khối phổ kế quadrupole time-of-flight (Q-TOF) liquid chromatography (LC)/mass spectroscopy (MS)/MS.

2.5. Phương pháp xác định hoạt tính ức chế ACE

Phương pháp xác định hoạt tính ức chế ACE được thực hiện sử dụng phương pháp của Cushman và Cheung [3] bảng 1.

Bảng 1: Phương pháp xác định hoạt tính ức chế ACE

| Chất | Blank (µl) | Control (µl) | Mẫu (µl) |
|----------------------|------------|--------------|----------|
| Dung dịch đệm pH 8 | 50 | 50 | 0 |
| Mẫu | 0 | 0 | 50 |
| Enzym ACE (25 mU/ml) | 50 | 50 | 50 |
| Ủ 37 độ C 10 phút | | | |
| 1N HCl | 250 | 0 | 0 |
| 25 mM HHL | 0 | 150 | 150 |
| Ủ 37 độ C 30 phút | | | |
| 25 mM HHL | 150 | 0 | 0 |

| | | | |
|------------------------------------|------|------|------|
| 1 N HCl | 0 | 250 | 250 |
| Ethyl acetate | 500 | 500 | 500 |
| Trộn và li tâm 3000 vòng 10 phút | | | |
| Thu dịch nổi | 200 | 200 | 200 |
| Làm khô ở 70 độ C | | | |
| Nước cất | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Đo độ hấp thu tại bước sóng 260 nm | | | |

Cách pha HHL: 8.3 mM HHL pha trong 50 mM dung dịch đệm chứa 0.5 M NaCl pH 8.

Công thức tính:

$$\text{Hoạt tính ức chế ACE (\%)} = (C - M)/(C - B) * 100$$

C = Độ hấp thu của dung dịch Control

M = Độ hấp thu của dung dịch mẫu

B = Độ hấp thu của dung dịch Blank

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

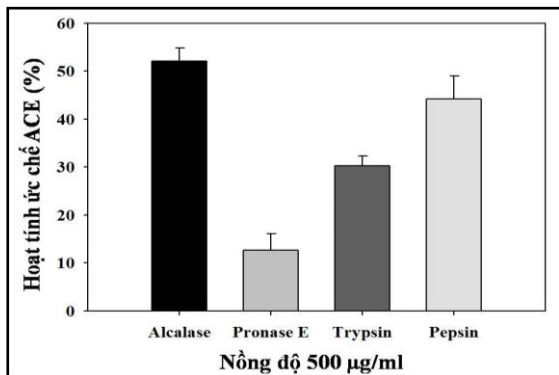
Tất cả số liệu được phân tích, tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuẩn bị hydrolysate từ gelatin và hoạt tính ức chế ACE

Sự thủy phân bằng enzym được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm, kỹ thuật này không tạo ra những chất độc so với tách chiết bằng dung môi. Do đó, gelatin được thủy phân riêng biệt sử dụng những enzym khác nhau như alcalase, pronase E, pepsin and trypsin để tạo ra những peptide ức chế ACE. Trong số những hydrolysate, alcalase hydrolysate cho thấy hoạt tính ức chế ACE cao nhất khoảng 52% tại nồng độ 500 µg/ml (hình 1). Alcalase tạo ra những chuỗi peptide ngắn cho thấy những hoạt tính sinh học có lợi cho sức khỏe bao gồm sự ức chế ACE [4]. Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy rằng alcalase có khả năng tạo ra những peptide hoạt tính khi nó được kết hợp để thủy phân những protein thực phẩm [5]. Do đó, alcalase hydrolysate được chọn để tinh sạch

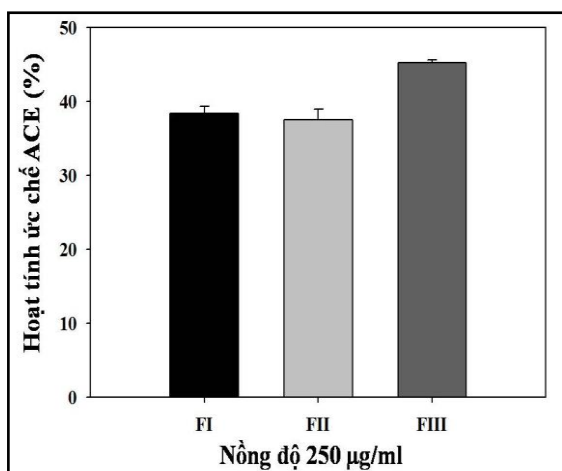
những peptide ức chế ACE từ gelatin cá rô phi vẫn.



Hình 1. Hoạt tính ức chế ACE của các hydrolysate từ gelatin vảy cá rô phi vẫn

3.2. Tinh sạch các peptide ức chế ACE sử dụng FPLC

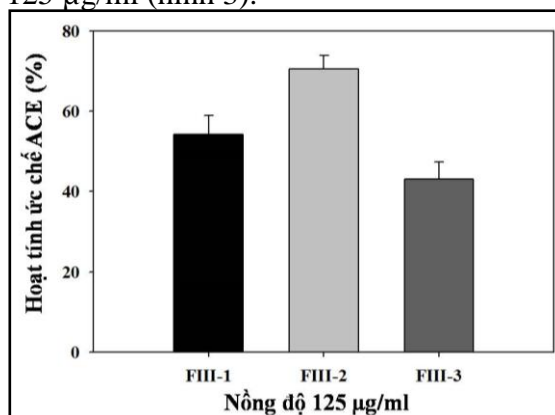
Alcalase hydrolysate đông khô được hòa trong 20 mM dung dịch đệm natri axetat (pH 4.0) và được nạp vào cột trao đổi ion Hiprep 16/10 DEAE FF sử dụng hệ thống FPLC với tốc độ 2 ml/phút. Mỗi phân đoạn (4 ml) được xác định tại bước sóng 280 nm, và ba phân đoạn tương ứng với các đỉnh được thu thập riêng biệt, khử muối, đông khô và kiểm tra hoạt tính ức chế ACE. Phân đoạn số 3 (FIII) cho thấy hoạt tính ức chế ACE cao nhất khoảng 45% tại nồng độ 250 µg/ml (hình 2).



Hình 2. Hoạt tính ức chế ACE của alkalase hydrolysate sử dụng hệ thống FPLC

3.3. Tinh sạch các peptide ức chế ACE sử dụng HPLC

Phân đoạn số 3 (FIII) được tinh sạch tiếp tục trên cột Primesphere 10 C₁₈ (10 mm × 250 mm, Phenomenex, Cheshire, Anh) sử dụng hệ thống HPLC với tốc độ 2 ml/phút. Các đỉnh được xác định tại bước sóng 215 nm, và ba phân đoạn được thu thập, khử muối và đông khô. Phân đoạn 2 (FIII-2) cho thấy hoạt tính ức chế ACE tiềm năng nhất khoảng 70% tại nồng độ 125 µg/ml (hình 3).

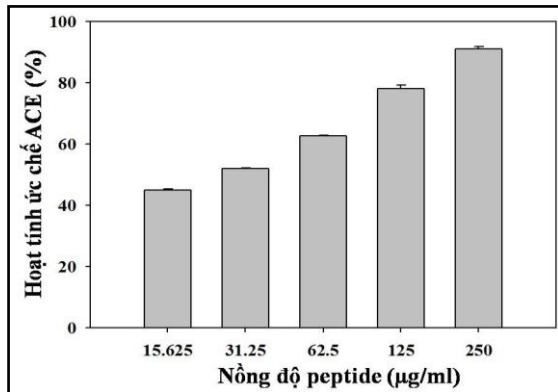
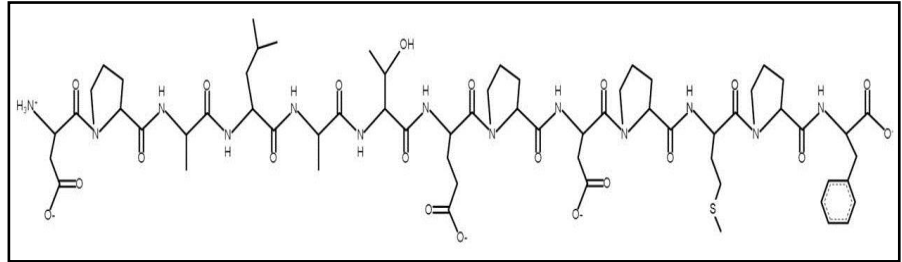


Hình 3. Hoạt tính ức chế ACE của hydrolysate thu được từ FIII sử dụng hệ thống HPLC

3.4. Xác định chuỗi amino axit của peptide

Phân đoạn 2 (FIII-2) sau khi qua HPLC được phân tích bởi khối phổ kế Q-TOF để xác định chuỗi amino axit. Chuỗi amino axit của peptide được xác định gồm 13 amino axit (DPALATEPDPMPF) với khối lượng phân tử là 1399 Da, và cấu trúc của peptide được cho thấy trong hình 4A. Peptide cho thấy hoạt tính ức chế ACE tiềm năng là 45%, 52%, 62%, 78% và 90% tại nồng độ lần lượt là 15.625, 31.25, 62.5, 125 và 250 µg/ml (hình 4B). Peptide hoạt tính thường có từ 3-20 amino axit, và những peptide trọng lượng phân tử thấp là những peptide hoạt tính tiềm năng hơn những peptide trọng lượng phân tử lớn [6-8].

Hình 4A. Cấu trúc peptide đã được tinh sạch (DPALATEPDMPF)



Hình 4B. Hoạt tính ức chế ACE của peptide đã được tinh sạch tại các nồng độ khác nhau

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Một peptide ức chế ACE được tinh sạch từ sự thủy phân gelatin vảy cá rô phi vằn bằng alcalase chứa 13 amino axit là DPALATEPDMPF (1399 Da) cho thấy hoạt tính ức chế ACE tiềm năng. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy peptide ức chế ACE từ gelatin vảy cá rô phi vằn có thể được sử dụng như là một thành phần thực phẩm chức năng tiềm năng trong công nghiệp thực phẩm cũng như y dược chống lại bệnh cao huyết áp và nhiều bệnh khác.

ANTIHYPERTENSIVE PEPTIDE PURIFIED FROM NILE TILAPIA SCALE GELATIN

Ngo Dai Hung

ABSTRACT

Elevated blood pressure is an independent risk factor for cardiovascular diseases. Amongst processes related to hypertension, angiotensin-I-converting enzyme (ACE) plays an important role in blood pressure regulation. In the present study, Nile tilapia gelatin was hydrolyzed using alcalase, pronase E, pepsin and trypsin. Among them, the alcalase hydrolysate exhibited the highest ACE inhibitory activity. Therefore, it was further analyzed using fast protein liquid chromatography, high performance liquid chromatography and Q-TOF LC/MS/MS system. Finally, a peptide responsible for ACE inhibitory activity was identified to be DPALATEPDMPF with molecular mass 1399 Da. Collectively, the ACE inhibitory peptide from Nile tilapia scale gelatin could be used as functional food ingredients in the prevention of hypertension.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Furuta T., Miyabe Y., Yasui H., Kinoshita Y., and Kishimura H., *Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from phycobiliproteins of Dulse *Palmaria palmata**, Mar. Drugs 2016, 32, 1-10.
- [2] Ngo D. H., Wijesekara, I., Vo, T. S., Ta, Q. V., and Kim, S. K., *Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview*, Food Res. Int, 2011, 44, 523-529.

- [3] Cushman, D. W., and Cheung, H. S., *Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung*, *Biochem. Pharmacol*, 1971, 20, 1637-1648.
- [4] Pihlanto, L., *Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory*, *Trends Food Sci, Technol*, 2000, 11, 347-356.
- [5] Li, G. H., Wan, J. Z., Le, G. W., and Shi, Y. H., *Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein*, *J. Pept. Sci.* 2006, 12, 509-514.
- [6] Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P., and Nedjar-Arroume, N., *Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (Sepia officinalis) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats*, *Food Chem*, 2015, 170, 519-525.
- [7] García-Moreno, P. J., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., and Guadix, E. M., *Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards*, *J. Funct, Foods* 2015, 18, 95-105.
- [8] Amado, I. R., Vázquez, J. A., González, P., Esteban-Fernández, D., Carrera, M., and Piñeiro, C., *Identification of the major ACE-inhibitory peptides produced by enzymatic hydrolysis of a protein concentrate from cuttlefish wastewater*, *Mar. Drugs* 2014, 12, 1390-1405.

- Ngày nhận bài: 15/3/2016
- Chấp nhận đăng: 12/05/2016

Liên hệ: Ngô Đại Hùng

Khoa Tài nguyên Môi trường, Trường Đại học Thủ Dầu Một,
Số 06 Trần Văn Ôn, Phú Hòa – Thủ Dầu Một – Bình Dương
Email: hungdaingo83@yahoo.com; hungnd@tdmu.edu.vn