

BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Quang Hiếu**

**NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH  
ỨC CHẾ ENZYME CHUYỂN HÓA ANGIOTENSIN (ACE)  
CỦA PEPTIDE TỪ DỊCH THỦY PHÂN MỰC XÀ ĐẠI DƯƠNG  
(*Sthenoteuthis oualaniensis*)**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Ngành: Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8 42 01 14**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :**

1. PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị
2. TS. Nguyễn Văn Hạnh

***Hà Nội - 2026***

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam kết rằng đề tài nghiên cứu trong luận văn này là kết quả làm việc khoa học do tôi thực hiện, dựa trên các tài liệu, số liệu mà tôi tìm hiểu và nghiên cứu dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Đỗ Hữu Nghị và TS. Nguyễn Văn Hạnh. Vì vậy, các kết quả trình bày bảo đảm tính trung thực và khách quan cao nhất. Đồng thời, những kết quả này chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nghiên cứu nào trước đây. Mọi số liệu và kết quả nêu trong luận văn đều chính xác, nếu có sai sót, tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.*

**Tác giả luận văn**



**Nguyễn Quang Hiêu**

## LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn thạc sĩ này một cách trọn vẹn, ngoài sự nỗ lực của bản thân, tôi còn nhận được sự hướng dẫn, chỉ bảo, chia sẻ tận tình từ quý thầy cô cùng với sự động viên, hỗ trợ của gia đình và bạn bè trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện đề tài.

Đầu tiên tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn tới quý Lãnh đạo, quý thầy cô cùng với toàn thể cán bộ Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ, giúp đỡ, hướng dẫn tận tình tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu tại Học viện. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn trân quý tới các thầy, cô Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình truyền đạt kiến thức quý báu và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian học tập cũng như thực hiện luận văn.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Đỗ Hữu Nghị và TS. Nguyễn Văn Hạnh, những người đã tận tâm hướng dẫn, chỉ bảo và hỗ trợ tôi hoàn thành đề tài này.

Tôi xin chân thành gửi cảm ơn đến các cán bộ, nhân viên Phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới gia đình và bạn bè đã luôn động viên, hỗ trợ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn thạc sĩ này.

*Hà Nội, ngày 20 tháng 03 năm 2026*

**Học viên**



**Nguyễn Quang Hiếu**

## MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	i
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ii
DANH MỤC CÁC HÌNH VÀ ĐỒ THỊ.....	iii
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	3
1.1. Tăng huyết áp và enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE) .....	3
1.1.1. Giới thiệu bệnh tăng huyết áp.....	3
1.1.2. Enzyme chuyển hóa angiotensin và cơ chế gây tăng huyết áp ....	3
1.1.3. Các chất ức chế enzyme ACE .....	4
1.2. Protein thủy sản và tiềm năng tạo peptide hoạt tính sinh học.....	5
1.2.1. Peptide hoạt tính sinh học.....	5
1.2.2. Nguồn protein từ thủy sản .....	6
1.3. Một số enzyme sử dụng trong thủy phân protein tạo peptide .....	7
1.3.1. Papain (EC 3.4.22.2) .....	7
1.3.2. Thermolysin (EC 3.4.24.27) .....	8
1.3.3. Pepsin (EC 3.4.24.27) .....	8
1.3.4. Alcalase (EC 3.4.21.62) .....	9
1.4. Mực xà đại dương ( <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i> ) .....	9
1.4.1. Phân loại .....	9
1.4.2. Đặc điểm sinh học.....	9
1.5. Tình hình nghiên cứu về peptide từ mực xà đại dương.....	11
1.5.1. Trên thế giới .....	11
1.5.2. Tại Việt Nam .....	12
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	14
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU .....	14
2.1.1. Nguyên liệu .....	14
2.1.2. Hóa chất.....	14
2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	14
2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu .....	14
2.2.2. Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Bradford.....	16
2.2.3. Thủy phân protein mực xà (MX) bằng enzyme có hỗ trợ siêu âm .....	16

2.2.4. Xác định hàm lượng protein hoà tan.....	16
2.2.5. Xác định hàm lượng peptide .....	17
2.2.6. Xác định độ thủy phân (Degree of hydrolysis, DH).....	17
2.2.7. Tách và thu hồi peptide.....	18
2.2.8. Tinh sạch peptide từ mẫu thủy phân .....	18
2.2.9. Xác định khối lượng phân tử và phân tích trình tự của peptide đã tinh sạch .....	19
2.2.10. Xác định hoạt tính ức chế ACE .....	19
2.2.11. Xác định độ bền của peptide với các enzyme hệ tiêu hoá.....	20
2.2.12. Độ ổn định của các peptide đối với enzyme ACE .....	20
2.2.13. Xử lý số liệu .....	21
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	22
3.1. Sản xuất dịch thủy phân protein từ mực .....	22
3.2. Nghiên cứu lựa chọn phân đoạn peptide từ dịch thủy phân có hoạt tính ức chế ACE cao .....	24
3.3. Thủy phân protein mực xạ đại dương bằng enzyme kết hợp siêu âm ..	26
3.4. Tinh sạch và phân tích trình tự peptide .....	29
3.5. Xác định trình tự peptide và khối lượng phân tử.....	32
3.6. Độ bền, độ ổn định và đánh giá độc tính của peptide.....	35
3.6.1. Độ bền của peptide với các enzyme hệ tiêu hoá.....	35
3.6.2. Độ ổn định của các peptide đối với enzyme ACE .....	37
3.6.3. Kết quả đánh giá độc tính trên tế bào thường.....	39
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	43

## DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Stt	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ Tiếng Anh	Chữ viết đầy đủ Tiếng Việt
1	ACE	Angiotensin-Converting Enzyme	Enzyme chuyển hóa angiotensin
2	DH	Degree of Hydrolysis	Mức độ thủy phân
3	HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
4	IC <sub>50</sub>	The half maximal inhibitory concentration	Nồng độ ức chế 50% đối tượng thử nghiệm
5	MX		Mục xà
6	WHO	World health organization	Tổ chức Y tế thế giới

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

Bảng 3.1 Hàm lượng peptide và hoạt tính ức chế ACE của các dịch thủy phân protein.....	26
Bảng 3.2 Hoạt tính ức chế ACE và tỷ lệ hiệu suất ức chế (inhibitory efficiency ratio, IER%) của các phân đoạn sau sắc FPLC trên cột Hitrap™ Q FF.....	31
Bảng 3.3 Phân tích độc tính in silico sử dụng công cụ ToxinPred 3.0: .....	38
Bảng 3.4 Kết quả đánh giá ức chế của peptide với tế bào .....	39

## DANH MỤC CÁC HÌNH VÀ ĐỒ THỊ

Hình 1.1 Cơ chế ức chế enzyme angiotensin-converting enzyme (ACE) của peptide sinh học trong hệ renin–angiotensin. ....	4
Hình 1.2 Hình thái và cấu tạo mực xà. a) mặt lưng, b) bông xúc giác, c) tay giao phối con đực, d) răng vòng sừng tay xúc giác, e) răng vòng sừng tay . ....	10
Hình 2.1 Mẫu Mực xà đại dương được thu thập ở biển Phú Yên (Đăk Lăk).14	
Hình 2.2 Mẫu mực được cắt nhỏ và sau khi xay nhuyễn.....	15
Hình 3.1 Độ thủy phân (DH, %) của các enzyme đối với protein từ mực <i>Sthenoteuthis oualaniensis</i> . ....	22
Hình 3.2 Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) và thời gian thủy phân đến mức độ thủy phân (DH) protein mực xà có hỗ trợ siêu âm. ....	27
Hình 3.3 Sắc ký đồ FPLC quá trình rửa giải, tinh sạch peptide có hoạt tính ức chế ACE trên cột sắc ký trao đổi anion. Độ hấp thụ quang (absorbance) tại $\lambda = 214$ nm (đường nét liền) và gradient nồng độ NaCl (đường nét đứt). ....	30
Hình 3.4 Xác định trình tự axit amin và khối lượng phân tử của peptide tinh sạch từ phân đoạn f.III. (A) Phổ MALDI-TOF MS của peptide đã tinh sạch. (B) Phổ phân mảnh MALDI-TOF/TOF MS/MS với các ion phân mảnh được chú giải để giải trình tự de novo. (C) Cấu trúc hóa học đề xuất của peptide đã xác định. ....	34

## MỞ ĐẦU

Tăng huyết áp là bệnh tim mạch phổ biến và nguy hiểm, là nguyên nhân chính gây các biến chứng như đột quỵ, suy tim và bệnh thận mạn. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), số ca mắc tăng huyết áp đang gia tăng, đặc biệt tại các nước đang phát triển như Việt Nam. Cơ chế quan trọng liên quan là hệ renin–angiotensin, trong đó enzyme ACE đóng vai trò trung tâm trong điều hòa huyết áp.

Hiện nay, các thuốc ức chế ACE tổng hợp được sử dụng rộng rãi trong điều trị tăng huyết áp, nhưng dùng lâu dài có thể gây ho khan, tụt huyết áp hoặc suy giảm chức năng thận. Do đó, các hợp chất tự nhiên, đặc biệt là peptide sinh học ức chế ACE, đang được quan tâm như giải pháp an toàn và hiệu quả hơn.

Việt Nam có nguồn tài nguyên biển phong phú, trong đó mực xà đại dương (*Sthenoteuthis oualaniensis*) có trữ lượng lớn nhưng chủ yếu được sử dụng thô nên giá trị còn hạn chế. Nhiều nghiên cứu cho thấy protein thủy sản sau thủy phân có thể tạo peptide sinh học, bao gồm peptide ức chế ACE. Tuy nhiên, tại Việt Nam, nghiên cứu khai thác peptide từ mực xà, đặc biệt về hoạt tính ức chế ACE, vẫn còn hạn chế.

Xuất phát từ các vấn đề nêu trên, đề tài: “**Nghiên cứu thu nhận và đánh giá hoạt tính ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE) của peptide từ dịch thủy phân mực xà đại dương (*Sthenoteuthis oualaniensis*)**” được triển khai nhằm góp phần nâng cao hiệu quả khai thác nguồn nguyên liệu biển, đồng thời mở ra định hướng ứng dụng trong phát triển các sản phẩm thực phẩm chức năng hỗ trợ kiểm soát tăng huyết áp.

### **Mục đích nghiên cứu**

Thu nhận các peptide từ dịch thủy phân mực xà đại dương và tiến hành đánh giá hoạt tính ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE).

### **Nội dung nghiên cứu thủy phân protein mực xà**

- Xây dựng quy trình thủy phân protein từ mực xà đại dương nhằm thu nhận dịch peptide.
- Xác định enzyme thủy phân tối ưu nhất.
- Nghiên cứu tinh chế và đặc điểm của peptide ức chế ACE.
- Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme ACE của các phân đoạn peptide.

- Xác định nồng độ ức chế 50% ( $IC_{50}$ ) của peptide đối với enzyme ACE.

### **Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài**

Cơ sở khoa học: ACE là một enzyme đóng vai trò quan trọng trong hệ renin–angiotensin, có chức năng xúc tác quá trình chuyển angiotensin I thành angiotensin II – chất gây co mạch và làm tăng huyết áp. Các peptide sinh học có nguồn gốc từ protein thực phẩm có khả năng ức chế ACE thông qua cơ chế cạnh tranh hoặc không cạnh tranh tại vị trí hoạt động của enzyme. Quá trình thủy phân protein bằng enzyme có thể tạo ra các peptide mang hoạt tính sinh học cao, phụ thuộc vào loại enzyme sử dụng và các điều kiện thủy phân.

Tính thực tiễn: Mực xà đại dương là nguồn nguyên liệu phong phú, có chi phí hợp lý để phát triển các sản phẩm có giá trị gia tăng. Các peptide có khả năng ức chế ACE thể hiện tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm chức năng. Những sản phẩm này đáp ứng xu hướng sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc tự nhiên và an toàn cho sức khỏe.

### **Những đóng góp của luận văn**

Xây dựng được quy trình thu nhận peptide từ mực xà đại dương bằng phương pháp thủy phân enzyme.

Xác định được phân đoạn peptide có hoạt tính ức chế ACE đáng kể.

Cung cấp dữ liệu khoa học về khả năng ứng dụng peptide từ mực trong hỗ trợ kiểm soát huyết áp.

## **Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU**

### **1.1. Tăng huyết áp và enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE)**

#### **1.1.1. Giới thiệu bệnh tăng huyết áp**

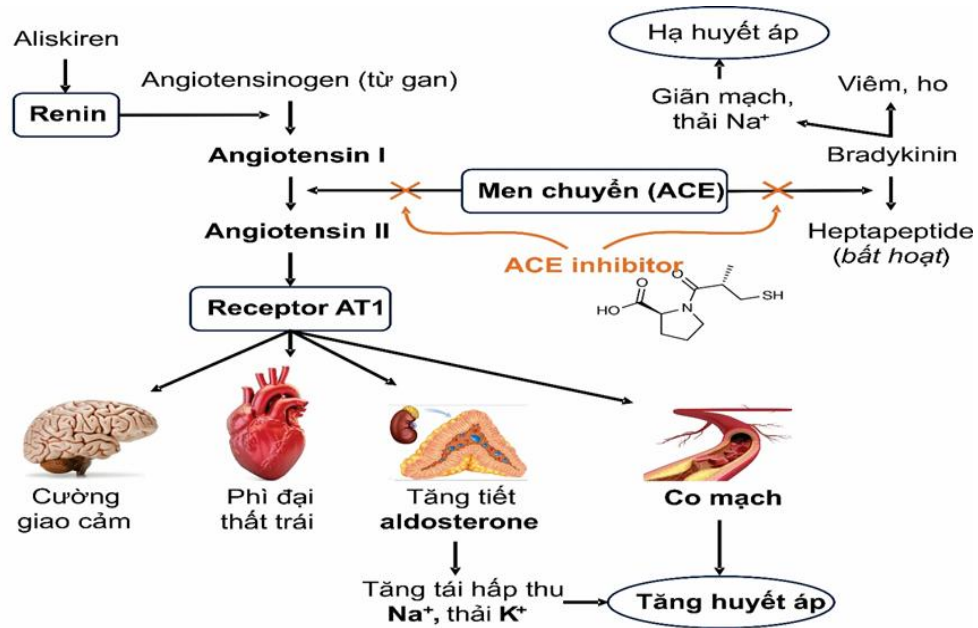
Tăng huyết áp là một trong những bệnh tim mạch phổ biến trên thế giới và là yếu tố nguy cơ chính gây ra các biến chứng nghiêm trọng như đột quy, suy tim và bệnh thận mạn. Đây là tình trạng huyết áp trong động mạch duy trì ở mức cao kéo dài, gây áp lực lên thành mạch và ảnh hưởng đến nhiều cơ quan trong cơ thể. Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), bệnh được xác định khi huyết áp tâm thu  $\geq 140$  mmHg và/hoặc huyết áp tâm trương  $\geq 90$  mmHg ở người trưởng thành khi đo lúc nghỉ. Bệnh thường tiến triển âm thầm, ít biểu hiện ở giai đoạn đầu nên được gọi là “kẻ giết người thầm lặng”. Nếu không kiểm soát kịp thời, tình trạng này có thể gây tổn thương nghiêm trọng đến tim, não, thận và hệ mạch máu [1].

Hiện nay, tăng huyết áp đang là vấn đề sức khỏe cộng đồng nghiêm trọng trên toàn cầu. Theo WHO, có hơn 1,28 tỷ người từ 30–79 tuổi mắc bệnh, chủ yếu ở các quốc gia thu nhập trung bình và thấp [1]. Đáng chú ý, gần một nửa số ca chưa được chẩn đoán hoặc điều trị đầy đủ, làm tăng nguy cơ biến chứng. Nhiều nghiên cứu cho thấy đây là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong sớm do liên quan trực tiếp đến bệnh tim mạch và mạch máu não. Huyết áp cao kéo dài có thể làm tổn thương nội mô, thúc đẩy xơ vữa động mạch và gia tăng nguy cơ nhồi máu cơ tim, đột quy cùng các bệnh tim mạch khác [2].

Sự gia tăng nhanh của bệnh tăng huyết áp liên quan đến lối sống không lành mạnh như ít vận động, béo phì, ăn nhiều chất béo, rượu bia, hút thuốc và căng thẳng. Các yếu tố này làm rối loạn điều hòa huyết áp, dẫn đến tăng áp lực tuần hoàn.

#### **1.1.2. Enzyme chuyển hóa angiotensin và cơ chế gây tăng huyết áp**

Huyết áp của cơ thể được điều hòa bởi nhiều cơ chế sinh lý khác nhau, trong đó hệ renin–angiotensin–aldosterone (RAAS) đóng vai trò trung tâm trong việc kiểm soát huyết áp, cân bằng dịch và điện giải (Hình 1.1) [3]. Một thành phần đóng vai trò quan trọng trong hệ thống này là enzyme chuyển hóa angiotensin (Angiotensin converting enzyme – ACE), có vai trò xúc tác quá trình chuyển hóa angiotensin I thành angiotensin II – một peptide có hoạt tính sinh học mạnh gây co mạch và làm tăng huyết áp [4].



Hình 1.1 Cơ chế ức chế enzyme angiotensin-converting enzyme (ACE) của peptide sinh học trong hệ renin–angiotensin. Sơ đồ tổng hợp từ Fyhrquist & Saijonmaa (2008) [3] và các tài liệu RAAS.

Ngoài vai trò xúc tác chuyển angiotensin I thành angiotensin II, ACE còn phân hủy bradykinin – một peptide có tác dụng giãn mạch và hạ huyết áp [5]. Vì vậy, hoạt động của ACE vừa làm tăng angiotensin II vừa làm giảm bradykinin, từ đó làm tăng trương lực mạch máu và góp phần thúc đẩy tăng huyết áp. Sự mất cân bằng của hệ RAAS, đặc biệt là tăng hoạt tính ACE, được xem là một cơ chế quan trọng trong sự hình thành và tiến triển của bệnh [3].

Do vai trò quan trọng của ACE trong điều hòa huyết áp, enzyme này trở thành mục tiêu chính trong điều trị tăng huyết áp. Các thuốc ức chế ACE như captopril, enalapril và lisinopril được sử dụng phổ biến nhằm ngăn chuyển angiotensin I thành angiotensin II, qua đó giảm co mạch và hạ huyết áp [5]. Tuy nhiên, sử dụng kéo dài có thể gây tác dụng phụ như ho khan, tụt huyết áp hoặc suy giảm chức năng thận. Vì vậy, các peptide tự nhiên từ protein thực phẩm, đặc biệt từ thủy sản, đang được nghiên cứu như những chất ức chế ACE tiềm năng với khả năng hỗ trợ điều hòa huyết áp, ít tác dụng phụ hơn [6].

### 1.1.3. Các chất ức chế enzyme ACE

Các chất ức chế enzyme chuyển đổi angiotensin (ACE inhibitors) là nhóm hợp chất có khả năng ức chế hoạt động của enzyme ACE, từ đó làm giảm sự hình thành angiotensin II – chất gây co mạch mạnh và làm tăng huyết áp. Đồng thời, việc ức chế ACE cũng hạn chế sự phân hủy bradykinin, một chất có

tác dụng giãn mạch, góp phần giảm sức cản ngoại vi và hạ huyết áp. Vì vậy, nhóm chất này đóng vai trò quan trọng trong điều trị tăng huyết áp và các bệnh tim mạch liên quan [3]. Trong thực hành lâm sàng, nhiều thuốc ức chế ACE tổng hợp như captopril, enalapril, lisinopril, ramipril và benazepril đã được sử dụng rộng rãi. Các thuốc này hoạt động theo cơ chế cạnh tranh với cơ chất tại vị trí hoạt động của enzyme. Nhờ đó, chúng làm giảm nồng độ angiotensin II trong hệ tuần hoàn, dẫn đến giãn mạch, hạ huyết áp và cải thiện chức năng tim mạch [7].

Mặc dù các thuốc ức chế ACE tổng hợp có hiệu quả cao, việc sử dụng kéo dài có thể gây ra một số tác dụng không mong muốn như là ho khan kéo dài, liên quan đến sự tích tụ bradykinin và các peptide giãn mạch trong đường hô hấp [8]. Ngoài ra, một số trường hợp có thể gặp tụt huyết áp, suy giảm chức năng thận, tăng kali máu hoặc phản ứng dị ứng [9]. Trước những hạn chế nêu trên, các nghiên cứu gần đây đã tập trung vào việc tìm kiếm các hợp chất sinh học có nguồn gốc tự nhiên từ protein thực phẩm. Trong đó, các peptide sinh học thu nhận từ quá trình thủy phân protein đang được quan tâm đặc biệt, do có thể được giải phóng nhờ tác động của enzyme protease và thể hiện nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng [10].

Nhiều nghiên cứu cho thấy các peptide có nguồn gốc từ thực phẩm có khả năng ức chế ACE đáng kể. So với thuốc tổng hợp, các peptide này có ưu điểm như độc tính thấp, dễ hấp thu và ít gây tác dụng phụ. Nhiều nguồn protein như sữa, đậu nành, cá, tôm và các loài thủy sản khác đã được nghiên cứu để thu nhận peptide ức chế ACE [6, 11, 12].

## **1.2. Protein thủy sản và tiềm năng tạo peptide hoạt tính sinh học**

### **1.2.1. Peptide hoạt tính sinh học**

Peptide hoạt tính sinh học là các đoạn peptide ngắn được tạo ra từ quá trình phân giải protein và có khả năng ảnh hưởng tích cực đến các chức năng sinh lý của cơ thể. Chúng thường gồm khoảng 2–20 axit amin và tồn tại ở dạng không hoạt động trong cấu trúc protein ban đầu [13, 14]. Các peptide này chỉ được giải phóng khi protein bị thủy phân thông qua enzyme protease, quá trình lên men vi sinh hoặc tiêu hóa trong đường tiêu hóa. Sau khi được giải phóng, chúng có thể tương tác với thụ thể hoặc enzyme trong cơ thể để tạo ra các tác dụng sinh học đặc hiệu [15].

Gần đây, các peptide hoạt tính sinh học nhận được nhiều sự quan tâm nhờ khả năng ứng dụng trong dinh dưỡng, y sinh do chúng có nhiều hoạt tính như ức chế enzyme, chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm, điều hòa miễn dịch, chống huyết khối và hỗ trợ kiểm soát huyết áp [16].

Hoạt tính sinh học của peptide chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó quan trọng nhất là thành phần axit amin, độ dài chuỗi và cấu trúc không gian. Các acid amin kỵ nước như leucine, isoleucine, valine hoặc acid amin vòng thơm như phenylalanine, tyrosine góp phần tăng khả năng tương tác với enzyme hoặc thụ thể. Ngoài ra, vị trí các axit amin trong chuỗi, đặc biệt ở đầu N và C, cũng ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính sinh học của peptide [17].

Nguồn thu nhận peptide hoạt tính sinh học chủ yếu từ protein thực phẩm như sữa, trứng, đậu nành, ngũ cốc và thủy sản. Trong đó, protein thủy sản được đánh giá cao nhờ thành phần acid amin cân đối, dễ hòa tan và dễ bị thủy phân, tạo ra các peptide kích thước nhỏ, hấp thu tốt [14].

### **1.2.2. Nguồn protein từ thủy sản**

Protein từ thủy sản được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng để tạo peptide hoạt tính sinh học. Các loài như cá, tôm, mực có hàm lượng protein cao, giá trị dinh dưỡng tốt, bao gồm các acid amin thiết yếu như lysine, leucine, isoleucine, valine và methionine. Nhờ cấu trúc dễ bị phân cắt bởi enzyme protease, protein thủy sản phù hợp để tạo peptide sinh học thông qua quá trình thủy phân [14, 17].

Protein từ thủy sản có một số đặc điểm thuận lợi cho việc sản xuất peptide sinh học như khả năng hòa tan tốt, cấu trúc linh hoạt và dễ tiếp cận đối với enzyme thủy phân. Khi protein từ các nguồn thủy sản được thủy phân bằng enzyme protease, các liên kết peptide trong chuỗi polypeptide sẽ bị cắt đứt, giải phóng các đoạn peptide có kích thước nhỏ hơn. Một số peptide được tạo ra trong quá trình này có thể thể hiện các hoạt tính sinh học khác nhau như kháng khuẩn, chống viêm, ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE) [6, 17].

Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu tập trung khai thác protein thủy sản để thu nhận peptide hoạt tính sinh học. Các phụ phẩm như đầu, da, xương cá hay vỏ tôm được xem là nguồn nguyên liệu dồi dào, giúp tăng giá trị kinh tế nguồn tài nguyên biển [18]. Nhiều peptide từ thủy sản đã được phát hiện với khả năng chống oxy hóa, bảo vệ tế bào và hỗ trợ điều hòa các quá trình sinh

lý [11, 19]. Đặc biệt, peptide ức chế ACE từ nguồn này đang được quan tâm do tiềm năng ứng dụng trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị tăng huyết áp.

Các peptide có kích thước phân tử nhỏ, thường dưới 3 kDa, được cho là có khả năng ức chế ACE hiệu quả và dễ dàng hấp thu trong cơ thể [17]. Nhiều nghiên cứu cũng cho thấy protein từ các loài mực biển là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc sản xuất các peptide có hoạt tính sinh học.

Do đó, việc nghiên cứu khai thác nguồn protein từ các loài mực biển, để tạo và tinh sạch các peptide có hoạt tính sinh học đang trở thành một hướng nghiên cứu quan trọng.

### **1.3. Một số enzyme sử dụng trong thủy phân protein tạo peptide**

Thủy phân protein bằng enzyme là quá trình sử dụng các enzyme protease để phân cắt liên kết peptide trong cấu trúc protein, tạo thành các peptide có kích thước nhỏ hơn hoặc axit amin tự do. Công nghệ enzyme mang lại khả năng kiểm soát phản ứng tốt, đảm bảo sản phẩm thủy phân giữ được hoạt tính sinh học và an toàn cho con người. Nhờ đó, các peptide chức năng thu được từ quá trình thủy phân có thể mang lại nhiều lợi ích như ức chế, chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm, điều hòa huyết áp, hỗ trợ miễn dịch [20].

Ứng dụng công nghệ enzyme trong thủy phân protein từ động vật thân mềm hiện đang được khai thác theo nhiều hướng như trong công nghiệp thực phẩm, trong lĩnh vực dược phẩm, một số peptide có nguồn gốc từ động vật biển đã cho thấy khả năng ức chế enzyme chuyển angiotensin (ACE-inhibitory activity), tiềm năng phòng ngừa tăng huyết áp [6].

Việc ứng dụng hiệu quả công nghệ enzyme phụ thuộc vào nhiều yếu tố như: lựa chọn loại enzyme thích hợp (alcalase, papain, thermolysin, pepsin...), xác định các điều kiện tối ưu (pH, nhiệt độ, thời gian, tỉ lệ enzyme/nguyên liệu...), cũng như xây dựng quy trình công nghệ phù hợp với đặc điểm từng loại nguyên liệu. Đồng thời, cần kết hợp với các phương pháp hiện đại như siêu âm, chiết siêu tới hạn, hoặc màng lọc phân tử nhằm tăng hiệu suất thu hồi và chất lượng sản phẩm cuối.

#### **1.3.1. Papain (EC 3.4.22.2)**

Papain là enzyme protease nguồn gốc thực vật, chủ yếu thu từ mủ quả đu đủ xanh (*Carica papaya*) [21]. Thuộc nhóm cysteine protease, enzyme này có khả năng cắt liên kết peptide tại các vị trí chứa lysine, arginine và phenylalanine. Papain hoạt động hiệu quả trong khoảng pH 5–8 và nhiệt độ 50–

65°C, nên được đánh giá là linh hoạt và phù hợp để thủy phân protein từ nhiều nguồn, bao gồm cả động vật nhuỷễn thể như mực, bạch tuộc, nghêu, sò và hàu.

Việc sử dụng papain trong thủy phân protein nhuỷễn thể được quan tâm nhờ các ưu điểm chính: khả năng phân cắt hiệu quả giúp giải phóng peptide có hoạt tính cao từ nguồn protein giàu acid amin thiết yếu và tính an toàn, thân thiện môi trường do có nguồn gốc tự nhiên, được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm và dược phẩm [21].

Một trong những ưu điểm nổi bật của papain là tính đặc hiệu thấp – tức có thể thủy phân nhiều loại liên kết peptide khác nhau – nên có thể ứng dụng tốt với đa dạng cấu trúc protein. Ngoài ra, do hoạt động hiệu quả trong điều kiện tương đối ôn hòa, papain không làm biến tính mạnh protein hay làm mất hoạt tính sinh học của các peptide, đây là yếu tố then chốt trong sản xuất các peptide chức năng chất lượng cao.

### 1.3.2. Thermolysin (EC 3.4.24.27)

Thermolysin là enzyme metalloendopeptidase thuộc nhóm protease phụ thuộc ion kim loại ( $Zn^{2+}$ ), có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. thermoproteolyticus* [17]. Enzyme này có khả năng chịu nhiệt cao, hoạt động tối ưu ở 65–85°C và ổn định trong khoảng pH 6,0–8,5, nên được ứng dụng rộng rãi trong thủy phân protein để tạo peptide sinh học, bao gồm từ các loài nhuỷễn thể như mực, bạch tuộc, sò và hàu. Ưu điểm nổi bật của thermolysin là tính chọn lọc cao, ưu tiên cắt tại các liên kết chứa acid amin không phân cực như leucine, isoleucine, valine và phenylalanine. Nhờ đó, các peptide tạo thành có kích thước và trình tự tương đối đồng nhất, thuận lợi cho kiểm soát và ứng dụng.

Khi sử dụng thermolysin để thủy phân protein từ động vật thân mềm, nhiều nghiên cứu cho thấy khả năng tạo ra các peptide có hoạt tính sinh học mạnh như chống oxy hóa, ức chế ACE và hỗ trợ miễn dịch [6].

Bên cạnh đó, thermolysin hoạt động hiệu quả ở nhiệt độ cao, giúp tăng tốc độ thủy phân, hạn chế nhiễm vi sinh và phá vỡ cấu trúc protein bền vững trong mô cơ nhuỷễn thể. Nhờ vậy, quá trình này nâng cao hiệu suất giải phóng và thu hồi các peptide hoạt tính.

### 1.3.3. Pepsin (EC 3.4.24.27)

Pepsin là enzyme protease nội bào thuộc nhóm aspartic protease, có trong dịch vị dạ dày động vật có vú (thường từ heo hoặc bò trong sản xuất) [22]. Enzyme này hoạt động tối ưu ở pH rất thấp (1,5–3,0) và có khả năng cắt

liên kết peptide tại các vị trí chứa acid amin thơm như phenylalanine, tyrosine và tryptophan.

Việc sử dụng pepsin mang lại lợi thế trong việc phá vỡ cấu trúc protein bền vững nhờ môi trường acid, giúp phân cắt thành các peptide nhỏ có hoạt tính sinh học [17].

Ngoài ra, pepsin đặc biệt phù hợp để mô phỏng quá trình tiêu hóa trong cơ thể người, nên các sản phẩm thủy phân bằng enzyme này thường được đánh giá cao về khả năng tương thích sinh học và hiệu quả sinh lý.

#### **1.3.4. Alcalase (EC 3.4.21.62)**

Alcalase từ vi khuẩn *B. licheniformis* là enzyme serine endopeptidase, có khả năng cắt liên kết peptide bên trong chuỗi protein. Đây là enzyme công nghiệp phổ biến, được sản xuất thương mại bởi nhiều công ty như Novozymes (Đan Mạch). Enzyme hoạt động hiệu quả trong môi trường kiềm (pH 8–10) và nhiệt độ 50–60°C, với khả năng thủy phân nhanh và sâu các protein phức tạp, nên được ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, dược phẩm và xử lý phụ phẩm. Alcalase đặc biệt phù hợp để tạo peptide chức năng như chống oxy hóa, kháng khuẩn, chống viêm và hạ huyết áp, đồng thời hỗ trợ trong bào chế dược phẩm và vật liệu sinh học [22].

### **1.4. Mực xà đại dương (*Sthenoteuthis oualaniensis*)**

#### **1.4.1. Phân loại**

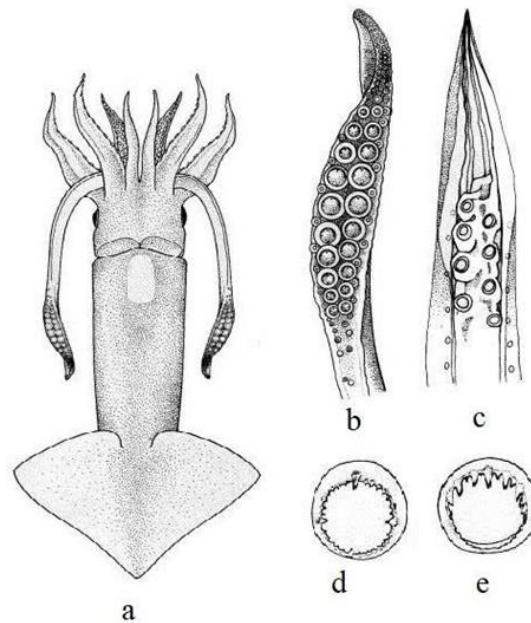
Mực xà đại dương, còn được gọi là mực ma, là một loài mực ống có kích thước lớn với tên khoa học *S. oualaniensis*. Loài này được công bố lần đầu tiên vào năm 1830 bởi nhà tự nhiên học người Pháp René Primevère Lesson, dựa trên các ghi chép thu thập được trong chuyến thám hiểm “La Coquille” của Hải quân Pháp [23]. Trong tiếng Anh, loài này được gọi là “Purpleback flying squid”, xuất phát từ đặc điểm phần lưng có màu tím đặc trưng. Theo hệ thống phân loại sinh học, *S. oualaniensis* thuộc ngành Mollusca, lớp Cephalopoda, bộ Teuthida và họ Ommastrephidae [24].

#### **1.4.2. Đặc điểm sinh học**

##### **1.4.2.1. Hình thái**

Mực xà đại dương (*S. oualaniensis*) là một trong những loài đại diện của nhóm động vật thân mềm có cơ thể dạng hình ống. Cơ thể chúng thon dài và thuôn dần về phía sau, được cấu tạo bởi ba phần chính gồm đầu, thân và hai vây bên phát triển hình tam giác [25]. Hệ cơ và hệ tim mạch của loài này phát

triển tốt, giúp chúng di chuyển linh hoạt trong môi trường nước. Phần đầu mang tám tua ngắn và hai xúc tu dài; ở đầu xúc tu có bông xúc giác với bốn hàng giác hút, trong đó hai hàng giữa lớn hơn rõ rệt. Các giác hút ở đầu bông nhỏ và xếp liên tục, còn ở phần giữa thưa hơn, khoảng 8–10 chiếc. Cuống tay xúc giác hẹp, chứa các giác hút nhỏ dạng ô van hoặc gần chữ nhật. Vòng sừng của giác hút có cấu trúc đặc trưng với 8–10 răng lớn nhọn cùng một số răng nhỏ xen kẽ. Ở con đực, tay thứ tư biến đổi thành tay giao phối (hectocotylus), nằm ở một bên và có chức năng chuyển tinh nang khi sinh sản.



Hình 1.2 Hình thái và cấu tạo mực xà đại dương. a) mặt lưng, b) bông xúc giác, c) tay giao phối con đực, d) răng vòng sừng tay xúc giác, e) răng vòng sừng tay [26].

Phần thân của mực xà có bề mặt lưng áo tương đối trơn nhẵn. Mặt bụng của áo thân liên kết với phễu thông qua một hoặc hai mép khớp sụn. Trên mặt lưng của cơ thể xuất hiện các chấm sắc tố màu nâu phân bố khá đồng đều. Ngoài ra, ở phần giáp phía trên mặt lưng còn có một đốm sáng lớn hình ô van nằm dưới lớp da. Phần vây của mực phát triển khỏe, có dạng hình thoi. Chiều dài vây chiếm khoảng 44–48% chiều dài thân, trong khi chiều rộng vây đạt khoảng 75–80% chiều dài vây. Chiều rộng phần đầu gần tương đương với chiều rộng thân. Góc vây khoảng  $62^\circ$  (dao động từ  $61-71^\circ$ ), giúp loài này có khả năng bơi lội linh hoạt và thích nghi tốt với môi trường biển khơi.

#### 1.4.2.2. Phân bố địa lý

*S. oualaniensis* là loài có phạm vi phân bố rộng, chủ yếu xuất hiện tại các vùng biển xích đạo và cận nhiệt đới thuộc Thái Bình Dương và Ấn Độ Dương. Thông thường, phạm vi phân bố của loài dao động từ khoảng 30°B đến 25°N. Tuy nhiên, một số ghi nhận cho thấy loài này có thể xuất hiện rải rác ở các khu vực phía Bắc tới khoảng 40°B và phía Nam tới 47°N [27].

Tại Việt Nam, mực xà phân bố nhiều ở các vùng biển xa bờ thuộc khu vực duyên hải miền Trung, đặc biệt là các ngư trường thuộc Nam Trung Bộ như Đà Nẵng, Quảng Ngãi, Gia Lai và Đắk Lắk. Ngoài ra, loài này cũng được ghi nhận với mật độ đáng kể tại khu vực quần đảo Hoàng Sa và Trường Sa, nơi có độ sâu khoảng 800 m [28].

#### **1.4.2.3. Thành phần hóa học của mực xà đại dương**

Mực xà đại dương *S. oualaniensis* được đánh giá là một loại hải sản có giá trị dinh dưỡng cao nhờ hàm lượng protein dồi dào, dao động từ khoảng 16–20% khối lượng tươi. Protein là thành phần dinh dưỡng chủ yếu của loài này và chứa đầy đủ các acid amin thiết yếu như lysine, leucine, valine và methionine [29].

Hàm lượng lipid trong cơ thịt mực xà đại dương tương đối thấp, chỉ khoảng 1–3% và không chứa cholesterol đã góp phần làm tăng giá trị dinh dưỡng cũng như tiềm năng ứng dụng của mực xà đại dương trong các sản phẩm thực phẩm chức năng [22].

Đáng chú ý, khi chế biến dạng khô, mực xà đại dương có thể đạt khoảng 68,4 g protein/100 g, cùng với 2,1 g lipid và 7 g khoáng, cao hơn nhiều loài mực khác. Một số nghiên cứu cũng đã tách được collagen type I từ da *S. oualaniensis* và thu nhận peptide khối lượng thấp khoảng 1,3 kDa [21]. Các peptide này có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, mở ra hướng ứng dụng trong y sinh, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm, đồng thời nâng cao giá trị nguồn nguyên liệu.

### **1.5. Tình hình nghiên cứu về peptide từ mực xà đại dương**

#### **1.5.1. Trên thế giới**

Thời gian gần đây, nhiều nghiên cứu về peptide sinh học có nguồn gốc từ các loài mực được đánh giá rất tích cực nhờ thành phần acid amin phong phú và khả năng dễ bị thủy phân bởi các enzyme protease [15, 25]. Đặc biệt, loài mực xà đại dương *S. oualaniensis* đã được chứng minh là nguồn protein dồi dào có thể tạo ra nhiều peptide sinh học có giá trị cao.

Một trong những hướng nghiên cứu nổi bật hiện nay là khai thác collagen từ da mực xà đại dương để tạo ra các peptide collagen có hoạt tính sinh học. Nghiên cứu của Wang và cộng sự (2024) đã tiến hành tách chiết collagen từ da mực *S. oualaniensis* bằng hai phương pháp: collagen hòa tan trong acid (ASC) và collagen hòa tan nhờ pepsin (PSC) [30].

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng peptide sinh học có nguồn gốc từ các loài mực có thể thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh thông qua khả năng loại bỏ các gốc tự do hoặc ức chế quá trình oxy hóa lipid [17]. Ngoài ra, sự hiện diện của các acid amin kỵ nước ở đầu C-terminal của peptide được cho là yếu tố quan trọng giúp tăng cường khả năng ức chế enzyme ACE.

Mặc dù đã có một số nghiên cứu về collagen peptide và các peptide sinh học từ mực xà đại dương, tuy nhiên các nghiên cứu về việc phân lập và tinh sạch các peptide riêng lẻ có hoạt tính sinh học, đặc biệt là peptide ức chế ACE, vẫn còn chưa nhiều. Vì vậy, việc nghiên cứu tạo dịch thủy phân protein từ mực xà đại dương, kết hợp với các phương pháp phân tách và tinh sạch hiện đại nhằm thu nhận các peptide có hoạt tính sinh học cao là hướng nghiên cứu cần thiết và có ý nghĩa khoa học cũng như thực tiễn quan trọng.

### 1.5.2. Tại Việt Nam

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu trong nước về mực xà đại dương chủ yếu tập trung vào khai thác và sử dụng hiệu quả nguồn tài nguyên thông qua đánh giá nguồn lợi, công nghệ khai thác, bảo quản và phát triển sản phẩm chế biến. Một số nghiên cứu của Viện Nghiên cứu Hải sản đã khảo sát đặc điểm sinh học, phân bố, trữ lượng, đồng thời xây dựng quy trình khai thác và bảo quản phù hợp [31].

Ngoài ra, một số nghiên cứu trong nước đã bắt đầu khai thác công nghệ chế biến sâu nhằm nâng cao giá trị mực xà đại dương. Nổi bật là các nghiên cứu sản xuất surimi và đánh giá các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tạo gel của protein mực. Kết quả cho thấy protein mực xà đại dương có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và có thể dùng làm nguồn tạo peptide hoạt tính sinh học thông qua quá trình thủy phân [31].

Tuy nhiên, các nghiên cứu liên quan đến thu nhận, phân lập và đánh giá hoạt tính sinh học của peptide từ mực xà đại dương *S. oualaniensis*, đặc biệt là các peptide có khả năng ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE), vẫn chưa được nghiên cứu nhiều.

Do đó, việc nghiên cứu tạo dịch thủy phân protein từ mực xà đại dương, kết hợp với các phương pháp phân tách và tinh sạch nhằm thu nhận các peptide có hoạt tính ức chế enzyme ACE là cần thiết.

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Nguyên liệu

Mực xà đại dương (*S. oualaniensis*) được đánh bắt ở biển Phú Yên (nay là Đăk Lăk, 13°5'17.47"N, 109°5'34.354"E). Mực xà đại dương này được xác định đúng loài bởi TS. Đỗ Mạnh Hào đang công tác tại Viện tài nguyên và môi trường Biển. Mẫu được lưu giữ ở điều kiện đông lạnh trong quá trình vận chuyển và lưu giữ ở -20 °C tại phòng Sinh học thực nghiệm, Viện Hóa học. Kích thước trung bình: chiều dài ~ 65 cm và khối lượng ~7,2 kg/con. Nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu là phần cơ thịt của mực xà.



Hình 2.1 Mẫu Mực xà đại dương được thu thập ở biển Phú Yên (Đăk Lăk).

#### 2.1.2. Hóa chất

Các hóa chất đa lượng, vi lượng được dùng trong quá trình thực hiện đề tài có xuất xứ từ Trung Quốc, Việt Nam, Đức như: Bradford,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{HCl}$ , glucose, agar, ethanol 96°C, ...

Alcalase, proteinase K, -chymotrypsin, pepsin, papain, thermolysin, trypsin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), huyết thanh phôi bò (FBS), môi trường nuôi cấy Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), penicillin-streptomycin và 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) được mua từ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) hoặc Novozymes A/S (Bagsværd, Đan Mạch). Tất cả các hóa chất và thuốc thử khác đều thuộc loại tinh khiết phân tích (analytical grade).

### 2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.2.1. Phương pháp xử lý mẫu

Mực xà đại dương sau khi đánh bắt, được vận chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý sơ bộ bằng cách tách bỏ các phần không cần thiết như đầu, da, mang,... Nguyên liệu sử dụng phân tách thành 2 phần riêng biệt gồm cơ thịt và nội tạng, đóng gói trong túi polyethylene (PE). Khối lượng 1 kg/túi và bảo quản ở nhiệt độ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  cho đến khi sử dụng.

Trước khi bước vào thí nghiệm, mẫu đã bảo quản trước đó đem rã đông tự nhiên ở điều kiện lạnh  $4-8\text{ }^{\circ}\text{C}$  trong khoảng 8-12 giờ nhằm hạn chế sự biến tính và thất thoát hoạt tính sinh học của protein do tác động bởi nhiệt độ. Nguyên liệu rã đông hoàn toàn xong sẽ rửa sạch bằng nước lạnh để loại bỏ các tạp chất cơ học, dịch nhớt và cặn bẩn bám trên bề mặt.

Tiếp theo cắt nhỏ mẫu với kích thước khoảng 1-2 cm, sau đó xay nhuyễn bằng máy đồng nhất ở tốc độ cao nhằm phá vỡ cấu trúc mô và tạo hỗn hợp đồng nhất. Quá trình này làm tăng diện tích tiếp xúc giữa protein và enzyme trong các bước thực hiện tiếp theo. Mẫu được chia làm 3 phần để (1) xác định các thành phần cơ bản; (2) thủy phân bằng enzyme kết hợp siêu âm; (3) khảo sát hiệu quả tinh sạch và hoạt tính sinh học.



Hình 2.2 Mẫu mực được cắt nhỏ và sau khi xay nhuyễn

### 2.2.2. Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Bradford

Phương pháp Bradford được áp dụng để định lượng protein dựa trên sự hình thành phức giữa thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 và protein trong môi trường acid, làm xuất hiện màu xanh với cực đại hấp thụ tại 595 nm. Trong thí nghiệm, dung dịch chuẩn (BSA) và mẫu được trộn với thuốc thử Bradford theo tỷ lệ 1:10, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 5–10 phút. Mật độ quang được đo tại 595 nm bằng máy quang phổ, và hàm lượng protein được xác định thông qua đường chuẩn xây dựng từ BSA [32].

### 2.2.3. Thủy phân protein mực xà (MX) bằng enzyme có hỗ trợ siêu âm

Để thu nhận peptide, protein mực được thủy phân bằng nhiều protease (alcalase, proteinase K,  $\alpha$ -chymotrypsin, pepsin, papain, thermolysin và trypsin). Trong đó, enzyme chính sử dụng là alcalase® AF 2.4 L (EC 3.4.21.62) từ *Bacillus licheniformis* (Novonesis, Đan Mạch), có hoạt tính khoảng 7.000 U/mL (2.4 AU/g), với pH<sub>opt</sub> 8.0 và T<sub>opt</sub> 40 °C. Tỷ lệ enzyme/cơ chất được thiết lập 1:100 (w/w) pH và nhiệt độ được kiểm soát theo điều kiện phù hợp nhất. Phản ứng được dừng bằng gia nhiệt ở 95 °C trong 10 phút, sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ phần không tan. Dịch nổi được thu nhận và bảo quản ở –20 °C cho đến khi sử dụng theo các phương pháp đã công bố [33, 34].

Quá trình thủy phân protein được thực hiện với siêu âm tăng cường hiệu quả tiếp theo giữa enzyme và cơ chất. Siêu âm được tiến hành trong bể Asonic PRO-70S (Ljubljana, Slovenia) với tần số 40 kHz và công suất khoảng 300 W. Tần số và công suất siêu âm dựa trên các kết quả nghiên cứu trước đó của Phòng công nghệ sinh học-Viện hóa học. Các thông số khảo sát để tối ưu hóa quá trình phân tích thủy phân (9 điều kiện phản ứng) bao gồm tỷ lệ enzyme/cơ chất (0,5%, 1% và 2% w/w) và thủy phân thời gian (10, 20 và 30 phút).

### 2.2.4. Xác định hàm lượng protein hoà tan

Hàm lượng protein hòa tan được xác định theo phương pháp Folin–Lowry, dựa trên phản ứng tạo phức giữa các nhóm peptide với ion đồng trong môi trường kiềm và phản ứng khử thuốc thử Folin–Ciocalteu tạo sản phẩm màu xanh lam [35]. Mẫu (0,5 mL) được trộn với 0,7 mL thuốc thử kiềm–đồng, ủ 20 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó bổ sung 0,1 mL thuốc thử Folin–Ciocalteu (pha loãng 2 lần) và tiếp tục ủ 30 phút. Độ hấp thụ quang được đo tại 750 nm bằng

máy quang phổ, và hàm lượng protein được xác định dựa trên đường chuẩn được xây dựng từ albumin huyết thanh bò (BSA).

### 2.2.5. Xác định hàm lượng peptide

Hàm lượng peptide trong dịch thủy phân được xác định bằng phương pháp quang phổ sử dụng thuốc thử o-phthaldialdehyde (OPA), dựa trên phản ứng với các nhóm amino tự do của peptide tạo sản phẩm hấp thụ mạnh tại 340 nm [36]. Thuốc thử OPA (50 mL) được chuẩn bị từ dung dịch natri tetraborat 100 mM, SDS 20%, OPA hòa tan trong methanol và  $\beta$ -mercaptoethanol, sau đó bổ sung nước khử ion đến đủ thể tích.

Dịch thủy phân được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ cặn. Lấy 50  $\mu$ L dịch nổi trộn với 2 mL thuốc thử OPA, ủ 2 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó đo độ hấp thụ tại 340 nm bằng máy quang phổ. Hàm lượng peptide được xác định dựa trên đường chuẩn từ casein tryptone trong đệm phosphate (pH 7,4). Hàm lượng peptide tính theo công thức:

$$\text{Hàm lượng peptide (mg/mL)} = \frac{(A-B)-b}{a}$$

Trong đó: A: độ hấp thụ của mẫu tại 340 nm

B: độ hấp thụ của mẫu trắng

a: hệ số góc của đường chuẩn

b: hệ số chặn của đường chuẩn

### 2.2.6. Xác định độ thủy phân (Degree of hydrolysis, DH)

Độ thủy phân (DH) của các dịch thủy phân protein được xác định bằng phương pháp o-phthaldialdehyde (OPA) theo quy trình của Wanasundara và cộng sự [37]. Tóm tắt quy trình như sau: 0,4 mL dịch thủy phân mục được trộn với 3 mL thuốc thử OPA và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Độ hấp thụ được đo tại bước sóng 340 nm bằng máy quang phổ. Hàm lượng các nhóm amino tự do được tính toán bằng cách sử dụng L-serine làm chất chuẩn. Tổng hàm lượng nhóm amino của protein mục được xác định sau khi thủy phân hoàn toàn bằng axit HCl 6 M ở 110 °C trong 24 giờ, dưới các điều kiện đảm bảo sự phân cắt hoàn toàn các liên kết peptide.

Độ thủy phân được tính toán theo phương trình sau:

$$\text{DH(\%)} = \left( \frac{(\text{NH}_2)_{[\text{Tx}]} - (\text{NH}_2)_{[\text{To}]}}{(\text{NH}_2)_{[\text{Total}]} - (\text{NH}_2)_{[\text{To}]}} \right) \times 100\%$$

Trong đó:

$(\text{NH}_2)_{\text{T}0}$ : hàm lượng các nhóm amino tự do tại thời điểm 0 phút (trước khi thủy phân) (mg/mL).

$(\text{NH}_2)_{\text{T}x}$ : hàm lượng các nhóm amino tự do tại thời điểm x trong quá trình thủy phân (mg/mL).

$(\text{NH}_2)_{\text{Total}}$ : tổng hàm lượng nhóm amino được xác định sau khi thủy phân hoàn toàn bằng axit (mg/mL).

### 2.2.7. Tách và thu hồi peptide

Sau quá trình thủy phân, dịch thủy phân được làm sạch bằng ly tâm ở 15.000 vòng/phút trong 5 phút nhằm loại bỏ cơ chất chưa phản ứng và protein còn lại (bao gồm enzyme). Phần dịch nổi được lọc qua vải thô và giấy lọc GF6 (Whatman, UK) để loại bỏ tạp chất. Dịch lọc tiếp tục được phân đoạn theo kích thước phân tử bằng hệ thống siêu lọc (MWCO 10, 3 và 1 kDa) sử dụng thiết bị Vivaflow 200 hoặc Amicon® Ultra (Sartorius) ở 11–19°C. Các phân đoạn peptide được đánh giá hoạt tính sinh học, trong đó phân đoạn có khả năng ức chế ACE cao nhất được lựa chọn cho bước tinh sạch tiếp theo.

Phân đoạn này được tinh sạch bằng sắc ký gel lọc trên cột Sephadex G25 với đệm Tris-HCl 20 mM chứa 100 mM NaCl (pH 7,5), tốc độ dòng 0,3 mL/phút. Các phân đoạn rửa giải được thu riêng và theo dõi hàm lượng protein tại 280 nm bằng UV-Vis. Những phân đoạn có hoạt tính sinh học cao được cô đặc bằng bay hơi chân không và đông khô để thu nhận peptide dạng bột phục vụ các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2.8. Tinh sạch peptide từ mẫu thủy phân

Peptide được phân tách và tinh sạch bằng hệ FPLC ÄKTA Pure 25M (Cytiva, Thụy Điển) thông qua các cột Sephadex G-25 và trao đổi anion HiTrap™ Q XL/FF. Mẫu được ly tâm, lọc và điều chỉnh về đệm natri axetat 20 mM (pH 5,0). Cột được cân bằng bằng 5–10 thể tích đệm, sau đó nạp mẫu và rửa đến khi ổn định đường nền. Quá trình rửa giải thực hiện bằng gradient NaCl từ 0–1,5 M với tốc độ dòng 1 mL/phút. Các phân đoạn (1–2 mL) được thu tự động và theo dõi tại 214 nm và 280 nm; phần có hoạt tính ACE cao nhất được thu nhận và cô đặc bằng bay hơi quay.

Phân đoạn này tiếp tục được tinh sạch bằng RP-HPLC trên cột Kromasil C18 (4,6 × 250 mm) với pha động gồm dung môi A (0,1% TFA trong nước) và dung môi B (0,1% TFA trong acetonitril). Quá trình tách được thực hiện bằng gradient 0–25% B trong 30 phút, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, theo dõi tại 214 nm.

Phân đoạn có hoạt tính cao được thu, cô đặc bằng siêu lọc và ly tâm; quy trình được lặp lại cho đến khi thu đủ peptide tinh sạch cho các thí nghiệm ức chế ACE.

### **2.2.9. Xác định khối lượng phân tử và phân tích trình tự của peptide đã tinh sạch**

Trình tự axit amin và khối lượng phân tử của peptide được xác định bằng phương pháp MALDI-TOF/TOF MS/MS tại Genomine (Hàn Quốc). Mẫu được phân tích trên hệ Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Đức) với chế độ phản xạ ion dương. Phổ khối được thu trong khoảng m/z 500–3000 Da, trong đó ion sơ cấp ưu thế được lựa chọn để phân mảnh MS/MS.

Dữ liệu phổ được xử lý bằng phần mềm FlexAnalysis và BioTools, và trình tự peptide được xác định bằng phương pháp giải mã de novo dựa trên sự sai khác khối lượng của các ion phân mảnh a-, b- và y-.

### **2.2.10. Xác định hoạt tính ức chế ACE**

Hoạt tính ức chế ACE được xác định bằng cách sử dụng phương pháp đo quang phổ. Thành phần phản ứng 100 µl dung dịch cơ chất bao gồm HHL (hippuryl-histidyl-leucine) 10 mM pha trong đệm phosphate pH 8,3, thêm vào 20 µl mẫu, 5.0 mU ACE pha trong glycerol 50%. Hỗn hợp ủ ở 37 °C, trong 30 phút. Axit hippuric (HA) được hình thành sau phản ứng và được tách ra khỏi hỗn hợp bằng cách thêm 600 µl ethyl acetate, sau đó ly tâm trong 10 phút và ethyl acetate được loại bỏ bằng ủ ở 95 °C trong 10 phút. HA được xác định bằng cách đo huỳnh quang ở bước sóng 228 nm. Mỗi cho vào phản ứng với nồng độ 0,4 protein mg/mL.

$$\text{Tỷ lệ ức chế ACE (\%)} = \frac{Ac-As}{Ac-Ab} \times 100$$

Trong đó: Ac là độ hấp phụ của HA được hình thành sau khi ACE hoạt động không có chất ức chế, Ab là độ hấp phụ của HHL, As là độ hấp phụ của HA được hình thành sau khi ACE hoạt động có chất ức chế (ACEi). Các mẫu có biểu hiện hoạt tính (% ức chế  $\geq 50\%$ ) được xác định giá trị IC<sub>50</sub> (µg/mL hoặc µM) là nồng độ của mẫu thử mà tại đó ức chế 50% hoạt tính ACE so với đối chứng (-), sử dụng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, CSan Rafael, CA).

### 2.2.11. Xác định độ bền của peptide với các enzyme hệ tiêu hoá

Độ ổn định của peptide được đánh giá thông qua mô hình tiêu hóa *in vitro* theo Chen và cộng sự [38], có điều chỉnh phù hợp. Pepsin (2%, w/w) được hòa tan trong đệm KCl-HCl (pH 2,0) và chymotrypsin (2%, w/w) trong đệm KCl-NaOH (pH 7,0). Peptide (1 mg/mL) được ủ với các enzyme này ở 37 °C trong 4 giờ, sau đó phản ứng được dừng bằng đun sôi 15 phút. Sau ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 15 phút, dịch nổi được thu, điều chỉnh pH 8,0 và đánh giá hoạt tính ức chế ACE. Đồng thời, mẫu được phân tích bằng RP-HPLC để theo dõi sự biến đổi peptide sau tiêu hóa. Các mẫu đối chứng sử dụng enzyme đã bất hoạt và được xử lý tương tự trước khi đánh giá hoạt tính.

### 2.2.12. Độ ổn định của các peptide đối với enzyme ACE

Độ ổn định của các peptide đối với enzyme ACE được phân tích theo phương pháp của Deng và cộng sự [39], với một số thay đổi. Mỗi phản ứng bao gồm 30 µL peptide (2 mg/mL) được trộn với 30 µL dung dịch ACE 0,25 U/mL và được ủ ở trong 30 phút. Sau đó, enzyme ACE được bất hoạt bằng cách đun sôi dung dịch trong 10 phút. Sau đó, 20 µL của mỗi mẫu peptide được sử dụng để phát hiện hoạt tính ức chế ACEi như đã mô tả trong phần "Xác định hoạt tính ức chế ACE".

### Đánh giá độc tính trên tế bào thường

Phương pháp MTT gián tiếp đánh giá hoạt tính của chất thử thông qua khả năng ức chế enzyme oxidoreductase phụ thuộc NAD(P)H của tế bào. Enzyme này xúc tác quá trình khử thuốc nhuộm tetrazolium MTT thành dạng formazan không hoà tan (màu tím), từ đó phản ánh tương quan với số lượng tế bào đang phát triển khi đo ở bước sóng  $\lambda = 540/720\text{nm}$ .

Tế bào được nuôi cấy ở 37 °C trong môi trường 5% CO<sub>2</sub> với các môi trường thích hợp như DMEM, EMEM (Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Đức), bổ sung L-glutamine 2 mM, kháng sinh (penicillin-streptomycin) và 5–10% huyết thanh bê. Tế bào được gieo vào đĩa 96 giếng ( $1,5 \times 10^5$  tế bào/giếng) và xử lý với mẫu ở dải nồng độ 256–8 µg/mL (lặp lại 3 lần).

Ellipticine, paclitaxel, doxorubicin hoặc cisplatin được sử dụng làm đối chứng dương, trong khi DMSO ( $\leq 1\%$ , v/v) là đối chứng âm. Sản phẩm formazan được hòa tan trong DMSO và đo mật độ quang tại 540/720 nm bằng

thiết bị Tecan Spark® (Thụy Sĩ). Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào của mẫu thử được tính theo tỷ lệ % so với đối chứng dựa trên công thức:

$$\text{Tỷ lệ ức chế tế bào (\%)} = \left[ 1 + \frac{\text{OD(Mẫu)}}{\text{OD (Đối chứng)}} \right] \times 100\%$$

Các mẫu được xác định giá trị  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$  hoặc  $\mu\text{M}$ ) là những mẫu có biểu hiện hoạt tính (% ức chế  $\geq 50\%$ ). Chỉ số  $IC_{50}$  là giá trị mà nồng độ của mẫu thử tại đó ức chế 50% khả năng sống sót của tế bào. Giá trị  $IC_{50}$  được xác định bằng cách sử dụng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA).

### 2.2.13. Xử lý số liệu

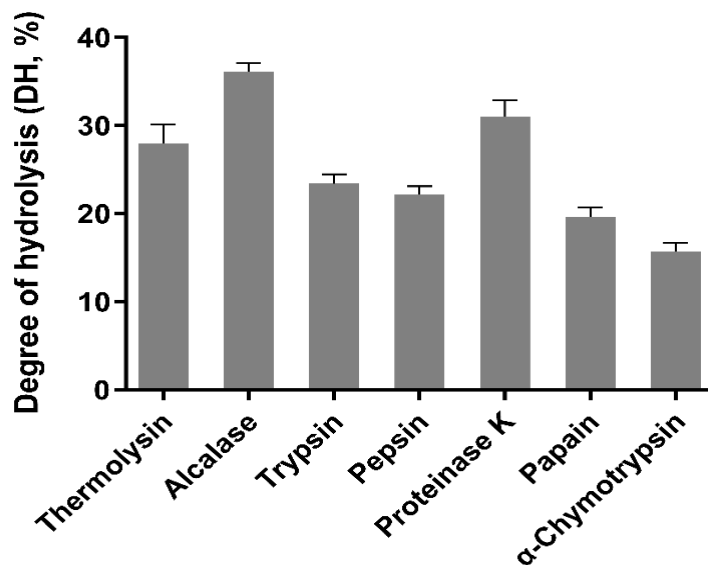
Nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả, các thí nghiệm được thực hiện lặp lại ít nhất ba lần. Dữ liệu thu được sau đó được xử lý và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (Mean  $\pm$  SD, SD: Standard Deviation).

Đối với các mẫu thể hiện hoạt tính sinh học (% ức chế  $\geq 50\%$ ), giá trị  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$  hoặc  $\mu\text{M}$ ) sẽ được xác định.  $IC_{50}$  là nồng độ của mẫu thử tại đó ức chế 50% hoạt tính hoặc đáp ứng sinh học của hệ thử nghiệm. Giá trị này được tính toán bằng phần mềm TableCurve AISN Software (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sản xuất dịch thủy phân protein từ mực

Khả năng thủy phân protein của các enzyme hoạt tính protease được đánh giá thông qua độ thủy phân (degree of hydrolysis, DH %). DH là chỉ số quan trọng phản ánh mức độ phân cắt liên kết peptide trong quá trình thủy phân protein. Giá trị DH quyết định kích thước phân tử, thành phần các peptide và axit amin tự do được tạo thành, từ đó ảnh hưởng trực tiếp đến các đặc tính chức năng và hoạt tính sinh học của dịch thủy phân protein. Trong nghiên cứu này, protein từ mực xà được tiến hành thủy phân bằng nhiều loại protease khác nhau, bao gồm thermolysin, alcalase, papain, pepsin, trypsin và  $\alpha$ -chymotrypsin, proteinase K nhằm lựa chọn enzyme phù hợp để thu nhận các peptide có hoạt tính sinh học, đặc biệt là hoạt tính chống oxy hóa và ức chế enzyme ACE. Theo kết quả, giá trị DH của các enzyme thủy phân protein từ mực xà *S. oualaniensis* có sự khác biệt rõ rệt tùy thuộc vào loại hoạt tính protease sử dụng (Hình 3.1). Trong các enzyme thử nghiệm, alcalase cho thấy hiệu quả thủy phân cao nhất, đạt giá trị DH là 36,1%, tiếp theo là proteinase K (31,0%) và thermolysin (27,9%). Ngược lại, papain, trypsin, pepsin và  $\alpha$ -chymotrypsin cho thấy mức độ thủy phân tương đối thấp (DH < 25%).



Hình 3.1 Độ thủy phân (DH, %) của các enzyme đối với protein từ mực *S. oualaniensis*. Các giá trị biểu thị số trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn (SD) ( $n=3$ ).

Kết quả thu được (Hình 3.1) biểu thị sự khác biệt đáng kể về độ thủy phân (DH) giữa các enzyme protease sử dụng trong nghiên cứu, phản ánh rõ vai trò của tính đặc hiệu cơ chất và cơ chế xúc tác của từng enzyme đối với cấu

trúc protein từ mực xà *S. oualaniensis*. Giá trị DH cao nhất ghi nhận ở alcalase (36,1%) cho thấy enzyme này có khả năng phân cắt mạnh mẽ các liên kết peptide trong protein cơ mực, vốn có cấu trúc phức tạp. Điều này phù hợp với đặc tính của alcalase là một serine endoprotease có phổ cắt rộng, ít bị giới hạn bởi cấu trúc bậc cao của protein, từ đó tạo ra số lượng lớn peptide có kích thước nhỏ và trung bình [22].

Ngược lại, các enzyme như pepsin, trypsin và  $\alpha$ -chymotrypsin cho giá trị DH thấp hơn đáng kể (DH < 25%), có thể được giải thích bởi tính đặc hiệu cơ chất cao của các enzyme này. Cụ thể, trypsin ưu tiên cắt tại các vị trí có lysine và arginine, trong khi  $\alpha$ -chymotrypsin chủ yếu tác động lên các liên kết peptide có chứa amino acid thơm. Điều này làm hạn chế số lượng vị trí cắt trong protein mực nếu thành phần acid amin không phù hợp, dẫn đến mức độ thủy phân thấp hơn. Tương tự, papain mặc dù là một cysteine protease có khả năng thủy phân protein, nhưng hoạt tính của enzyme này phụ thuộc mạnh vào điều kiện phản ứng và có thể không tối ưu đối với protein từ mực trong điều kiện thí nghiệm.

Khả năng phân cắt tương đối cao của proteinase K (31,0%) và thermolysin (27,9%) cũng cho thấy tiềm năng của các enzyme này trong thủy phân protein từ nguồn nguyên liệu biển. Proteinase K có khả năng hoạt động ổn định trong điều kiện rộng về pH và nhiệt độ, đồng thời có thể tiếp cận các vùng protein bị che khuất. Trong khi đó, thermolysin có xu hướng cắt tại các vị trí kỵ nước, điều này phù hợp với đặc điểm của protein cơ mực, vốn chứa nhiều vùng kỵ nước trong cấu trúc bậc ba. Tuy nhiên, do mức độ đặc hiệu nhất định, khả năng tạo peptide đa dạng của các enzyme này vẫn thấp hơn so với alcalase.

Từ góc độ ứng dụng, giá trị DH cao thường liên quan đến việc tạo ra các peptide có khối lượng phân tử thấp, dễ hấp thu và có tiềm năng hoạt tính sinh học cao như chống oxy hóa và ức chế ACE. Do đó, việc lựa chọn alcalase làm enzyme chính trong quá trình thủy phân là hợp lý, đặc biệt khi mục tiêu nghiên cứu hướng đến thu nhận các peptide chức năng. Tuy nhiên, nếu DH quá cao cũng có thể dẫn đến sự hình thành các peptide rất ngắn hoặc acid amin tự do, làm giảm một số hoạt tính sinh học đặc hiệu của sản phẩm.

Bên cạnh đó, sự khác biệt về DH giữa các enzyme cũng gợi ý cho chúng ta khả năng phối hợp enzyme (enzyme combination) nhằm tối ưu hóa quá trình thủy phân. Việc sử dụng kết hợp các protease có cơ chế cắt khác nhau có thể

giúp gia tăng mức độ thủy phân và đa dạng hóa phổ peptide thu được, từ đó nâng cao hiệu quả sinh học của dịch thủy phân protein.

Hiệu suất thủy phân vượt trội của alcalase có thể được lý giải bởi tính đặc hiệu cơ chất rộng cùng với hoạt tính endo-peptidase mạnh, cho phép enzyme này tác động và phân cắt trên phạm vi rộng các liên kết peptide trong các cấu trúc protein cơ phức tạp. Nhờ khả năng tiếp cận nhiều vị trí khác nhau trên chuỗi protein, alcalase có thể phá vỡ cấu trúc protein một cách hiệu quả hơn so với nhiều enzyme khác. Các kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu về thủy phân protein từ sinh vật biển, khi alcalase thường tạo ra giá trị độ thủy phân (DH) cao hơn so với các protease khác, do cơ chế phân cắt ít đặc hiệu và hiệu suất xúc tác vượt trội, giúp tạo ra lượng lớn peptide trong thời gian ngắn [40, 41].

Proteinase K và thermolysin là các enzyme protease thường được sử dụng trong thủy phân protein, với các đặc điểm xúc tác khác nhau, ảnh hưởng đến hiệu quả và đặc tính peptide thu được [42] điều này phù hợp với đặc điểm của protein cơ mực, vốn có nhiều vùng kỵ nước trong cấu trúc bậc ba. Tuy nhiên, do mức độ đặc hiệu cao hơn trong cơ chế xúc tác, khả năng tạo ra tập hợp peptide đa dạng của các enzyme này vẫn hạn chế hơn so với alcalase, vốn có phổ phân cắt rộng và linh hoạt hơn.

### **3.2. Nghiên cứu lựa chọn phân đoạn peptide từ dịch thủy phân có hoạt tính ức chế ACE cao**

Dịch thủy phân sau khi ly tâm 10.000 vòng/phút, phần dịch nổi được siêu lọc và đánh giá hoạt tính ức chế ACE. Bảng 1 thể hiện giá trị  $IC_{50}$  của các dịch thủy phân protein với các phân đoạn có khối lượng phân tử khác nhau, liên quan đến độ hòa tan của protein và hàm lượng peptide. Kết quả cho thấy các phân đoạn có kích thước nhỏ (MWCO 10 kDa – 3 kDa – 1 kDa), hàm lượng peptide và hoạt tính ức chế ACE đều cao và cao hơn nhiều so với dịch protein thô trước thủy phân.

Alcalase không chỉ cho thấy hiệu quả xúc tác thủy phân dịch protein với hàm lượng peptide cao, mà hoạt tính ức chế ACE của peptide sau thủy phân bằng alcalase cũng cao nhất. Đồng thời hoạt tính tăng tương ứng với khối lượng phân tử (MW) giảm 10-3-1 kDa. Cụ thể, hàm lượng peptide tăng 1,55 lần sau siêu lọc MWCO 30 kDa và tới 1,79 lần sau lọc MWCO 1 kDa so với MWCO 10 kDa. Trong khi hoạt tính ức chế ACE của peptide tăng ( $IC_{50}$  giảm) 1,95 lần

sau MWCO 3 kDa và tăng lên 3,15 lần sau MWCO 1 kDa. Bên cạnh đó, công thức phối trộn 2 enzyme cũng cho thấy hiệu quả tăng đáng kể các thông số trên. Qua đánh giá này giúp lựa chọn phương án tối ưu theo thực tế sản xuất dựa trên tính toán về giá thành enzyme và hiệu quả sản phẩm thu được. Từ góc độ công nghệ và ứng dụng, việc lựa chọn phân đoạn peptide có MW thấp (đặc biệt < 1 kDa) là hướng đi tiềm năng để phát triển các sản phẩm có hoạt tính sinh học cao, chẳng hạn như thực phẩm chức năng hỗ trợ điều hòa huyết áp. Tuy nhiên, cần cân nhắc rằng quá trình siêu lọc với MWCO thấp thường đi kèm với chi phí đầu tư và vận hành cao hơn, cũng như khả năng thất thoát một số peptide có giá trị. Do đó, việc lựa chọn ngưỡng MWCO phù hợp cần dựa trên sự cân đối giữa hiệu quả sinh học và tính kinh tế trong sản xuất.

Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận rằng alcalase có khả năng tạo ra độ thủy phân (DH) cao hơn so với các enzyme khác như flavourzyme, papain hoặc pepsin khi áp dụng cho các nguồn protein thủy sản khác nhau. Kết quả này cho thấy alcalase có hiệu quả xúc tác vượt trội nhờ khả năng phân cắt rộng và nhanh các liên kết peptide trong cấu trúc protein. Cụ thể, Wisuthiphaet và cộng sự khi nghiên cứu thủy phân protein cá bằng các enzyme protease khác nhau đã ghi nhận alcalase đạt độ thủy phân cao nhất lên đến 88,9%, vượt xa so với flavourzyme và papain [43].

Tương tự, theo nghiên cứu của Senadheera và cộng sự [44], alcalase cũng cho giá trị DH cao nhất, dao động khoảng 12–13,5% sau 4 giờ thủy phân, cao hơn đáng kể so với flavourzyme và corolase trong cùng điều kiện thí nghiệm. Nghiên cứu này đồng thời cho thấy độ thủy phân có xu hướng tăng dần theo thời gian phản ứng, do số lượng liên kết peptide bị phân cắt ngày càng nhiều khi quá trình thủy phân diễn ra [45]. Từ các kết quả này có thể nhận thấy alcalase có hiệu quả cao trong việc thủy phân protein mực xà so với các protease khác đã khảo sát, và khi so sánh với các công bố trước đó, kết quả thu được là phù hợp và có cơ sở khoa học.

Do vậy, enzyme alcalase được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm tối ưu hóa quá trình thủy phân protein, bao gồm việc đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố hỗ trợ như siêu âm đến hiệu quả thủy phân, từ đó nâng cao khả năng thu nhận các peptide có hoạt tính sinh học.

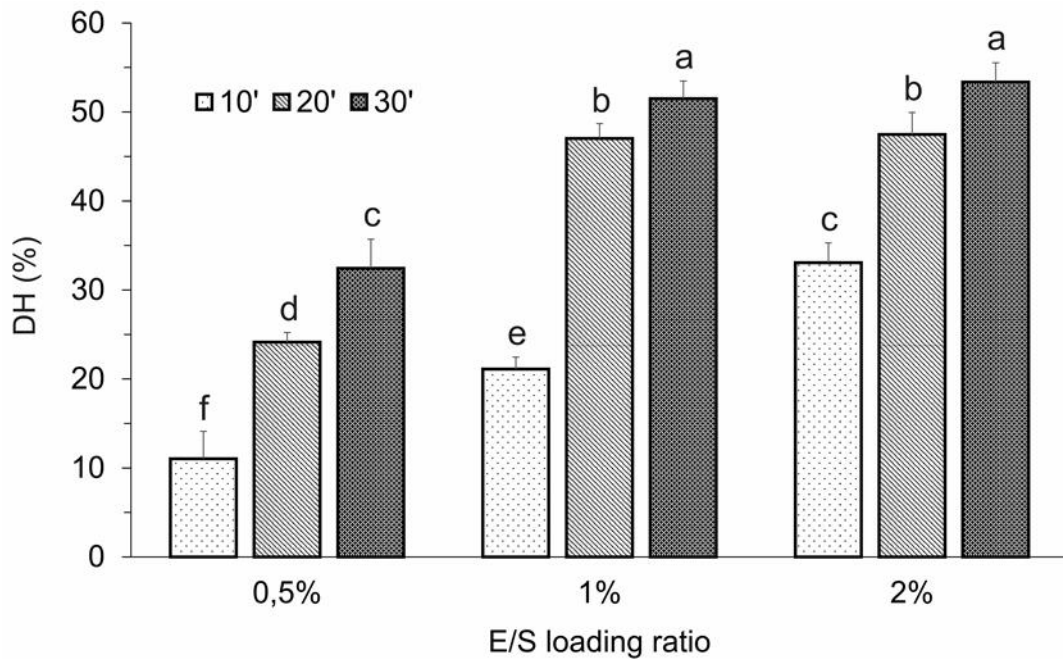
Bảng 3.1 Hàm lượng peptide và hoạt tính ức chế ACE của các dịch thủy phân protein

Mẫu*	Siêu lọc MWCO cut-off	Hàm lượng peptide (mg/g)	Giá trị IC <sub>50</sub> (mg/mL)**
Dịch protein thô	ND.	74,5±1,8	ND.
<b>MX</b>			
<b>MX<sub>Alc</sub></b>	10,000	341,3±0,3	1,670
	3,000	528,9±4,2	0,857
	1,000	<b>612,2±2,9</b>	<b>0,531</b>
MX <sub>Therm</sub>	10,000	391,1±5,2	ND.
	3,000	401,6±2,5	1,224
	1,000	465,6±2,5	0,944
MX <sub>Prot</sub>	10,000	278,1±3,1	1,840
	3,000	282,7±4,3	1,118
	1,000	324,7±1,0	0,709
MX <sub>Mix</sub>	10,000	276,7±2,5	1,824
	3,000	587,5±1,1	1,052
	1,000	621,6±2,4	0,780

\* MX và MX<sub>Alc</sub>, MX<sub>Therm</sub>, MX<sub>Prot</sub>, MX<sub>Mix</sub> lần lượt là các mẫu dịch protein thô từ thịt mực xà và dịch thủy phân protein bằng enzyme alcalase, thermolysin, Proteinase K và hỗn hợp của hai enzyme (“Enzyme cocktail”: alcalase & thermolysin). \*\* Nồng độ thử nghiệm cao nhất đến 2 mg/ml; ND.: không xác định.

### 3.3. Thủy phân protein mực xà đại dương bằng enzyme kết hợp siêu âm

Việc áp dụng sóng siêu âm trong quá trình thủy phân đã góp phần cải thiện hiệu quả phản ứng, thể hiện qua giá trị DH tương đối cao đạt được trong thời gian ngắn (20–30 phút). Quá trình siêu âm tạo ra các vi bọt khí và lực cắt mạnh, giúp phá vỡ cấu trúc bậc cao của protein, làm lộ ra nhiều vị trí cắt tiềm năng cho enzyme. Ngoài ra, siêu âm còn giúp tăng cường sự khuếch tán và trộn lẫn trong hệ phản ứng, từ đó nâng cao khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. So với các nghiên cứu không sử dụng siêu âm với thời gian thủy phân kéo dài hàng giờ, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng rút ngắn đáng kể thời gian xử lý mà vẫn đạt hiệu quả thủy phân cao.



Hình 3.2 Ảnh hưởng của tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) và thời gian thủy phân đến mức độ thủy phân (DH) protein mực xà có hỗ trợ siêu âm.

Các chữ cái viết thường phía trên các cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) và thời gian thủy phân là hai yếu tố có ảnh hưởng rõ rệt đến mức độ thủy phân (DH) của protein mực xà trong điều kiện có hỗ trợ siêu âm. Xu hướng gia tăng DH khi tăng nồng độ enzyme là phù hợp với nguyên lý động học enzyme, khi số lượng phân tử enzyme tham gia phản ứng nhiều hơn sẽ làm tăng xác suất va chạm giữa enzyme và cơ chất, từ đó thúc đẩy quá trình phân cắt các liên kết peptide. Tuy nhiên, kết quả cũng cho thấy khi tăng E/S từ 1% lên 2%, mức độ gia tăng DH không còn đáng kể, đặc biệt tại thời điểm 20 phút, cho thấy hệ phản ứng đã tiến gần đến trạng thái bão hòa enzyme. Điều này phản ánh rằng khi nồng độ enzyme vượt quá một ngưỡng nhất định, cơ chất trở thành yếu tố giới hạn, dẫn đến hiệu quả sử dụng enzyme giảm.

Sự gia tăng nhanh chóng của DH trong giai đoạn đầu (10–20 phút) có thể được lý giải bởi việc các enzyme ưu tiên thủy phân các liên kết peptide dễ tiếp cận nằm trên bề mặt hoặc ở các vùng ít bị cản trở về mặt không gian trong cấu trúc protein. Khi thời gian phản ứng kéo dài, các liên kết peptide còn lại thường nằm sâu trong cấu trúc bậc ba hoặc bậc bốn của protein, gây khó khăn cho enzyme tiếp cận. Đồng thời, sự tích lũy của các sản phẩm thủy phân như peptide ngắn và acid amin tự do có thể gây ra hiện tượng ức chế ngược, làm giảm hoạt

tính của enzyme và dẫn đến tốc độ phản ứng chậm lại. Đây là nguyên nhân dẫn đến xu hướng tiệm cận bão hòa của DH sau 20 phút, mặc dù thời gian thủy phân tiếp tục được kéo dài.

Đáng chú ý, việc áp dụng sóng siêu âm trong quá trình thủy phân đã góp phần cải thiện hiệu quả phản ứng, thể hiện qua giá trị DH tương đối cao đạt được trong thời gian ngắn (20–30 phút). Quá trình siêu âm tạo ra các vi bọt khí và lực cắt mạnh, giúp phá vỡ cấu trúc bậc cao của protein, làm lộ ra nhiều vị trí cắt tiềm năng cho enzyme. Ngoài ra, siêu âm còn giúp tăng cường sự khuếch tán và trộn lẫn trong hệ phản ứng, từ đó nâng cao khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. So với các nghiên cứu không sử dụng siêu âm với thời gian thủy phân kéo dài hàng giờ, kết quả trong nghiên cứu này cho thấy tiềm năng rút ngắn đáng kể thời gian xử lý mà vẫn đạt hiệu quả thủy phân cao.

Việc lựa chọn điều kiện tối ưu E/S = 1% và thời gian 20 phút là hợp lý khi xét đồng thời cả hiệu quả kỹ thuật và yếu tố kinh tế. Mặc dù giá trị DH tại E/S 2% có xu hướng cao hơn, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với E/S 1%, trong khi chi phí enzyme tăng lên đáng kể. Điều này cho thấy E/S 1% là điểm cân bằng tối ưu giữa hiệu suất và chi phí, đặc biệt trong bối cảnh ứng dụng ở quy mô sản xuất công nghiệp. Bên cạnh đó, việc hạn chế thời gian thủy phân ở mức 20 phút cũng giúp giảm tiêu hao năng lượng và hạn chế nguy cơ hình thành các peptide quá ngắn hoặc acid amin tự do, vốn có thể ảnh hưởng không mong muốn đến hoạt tính sinh học của sản phẩm.

Các thông số chính của quá trình thủy phân protein mực xà bằng enzyme alcalase có hỗ trợ siêu âm đã được khảo sát, bao gồm tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S: 0,5%, 1% và 2% v/v) và thời gian thủy phân (10, 20 và 30 phút). Hình 3.2 trình bày ảnh hưởng của các yếu tố này đến mức độ thủy phân (DH, %) của protein mực xà trong điều kiện có hỗ trợ siêu âm (40 kHz, 300 W) ở nhiệt độ phản ứng 30 °C. Kết quả cho thấy mức độ thủy phân (DH, %) có xu hướng tăng khi tỷ lệ enzyme/cơ chất tăng từ 0,5% lên 2%. Ở thời gian thủy phân 10 phút, giá trị DH cao nhất đạt 33,0% khi sử dụng E/S 2%. Khi kéo dài thời gian thủy phân lên 20 phút, DH tiếp tục tăng và đạt 47,5% tại E/S 2%. Tuy nhiên, giá trị này không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với điều kiện E/S 1% (46,1%) ( $p < 0,05$ ). Khi kéo dài thời gian thủy phân đến 30 phút, giá trị DH chỉ tăng nhẹ, dao động khoảng 51,5–53,3%, cho thấy quá trình phản ứng dần tiến tới trạng thái bão hòa và tốc độ thủy phân không còn tăng đáng kể như giai đoạn trước. Điều này

chúng tỏ việc tiếp tục kéo dài thời gian sau mốc 20 phút không mang lại sự cải thiện rõ rệt về hiệu quả thủy phân protein. Sự gia tăng nhanh của DH ở giai đoạn đầu có thể được giải thích do các liên kết peptide dễ tiếp cận bị phân cắt nhanh chóng khi enzyme bắt đầu hoạt động. Tuy nhiên, khi phản ứng tiếp diễn, quá trình thủy phân chậm lại do nhiều nguyên nhân như sự suy giảm nồng độ cơ chất, hiện tượng ức chế ngược bởi sản phẩm tạo thành, hoặc do các liên kết peptide còn lại nằm trong những vùng cấu trúc khó tiếp cận hơn, gây cản trở cho enzyme [46, 47].

Nghiên cứu của Tran và cộng sự cho thấy độ thủy phân có xu hướng tăng khi tăng thời gian và điều kiện xử lý enzyme, đồng thời hiệu suất thu hồi protein cũng được cải thiện trong các điều kiện thủy phân thích hợp [45].

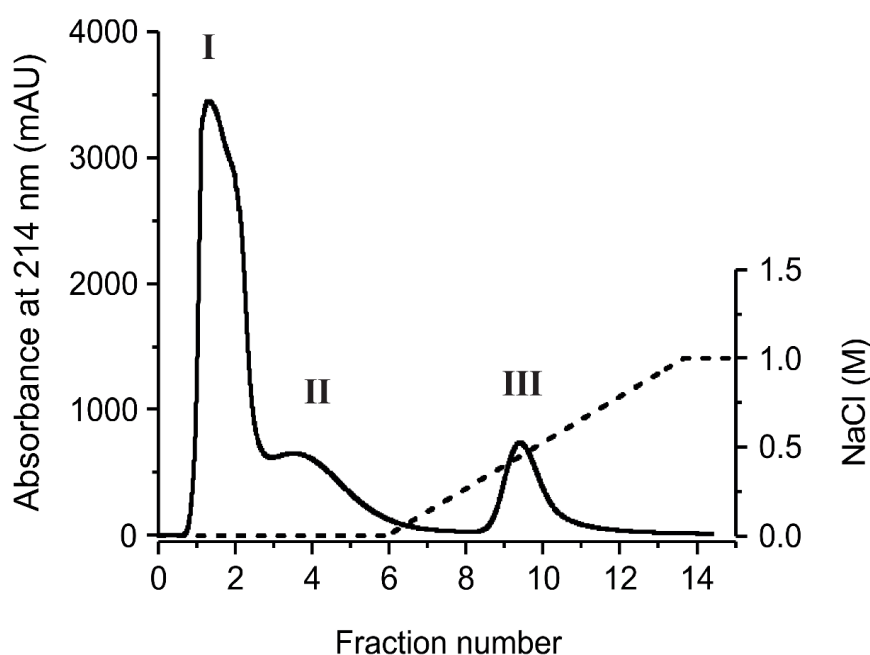
Tiếp đó, Phongthai và cộng sự, cũng chỉ ra rằng độ thủy phân (DH) của enzyme alcalase tăng dần khi tăng nồng độ enzyme và kéo dài thời gian thủy phân. Cụ thể, kết quả được minh chứng thông qua quá trình thủy phân protein đậu nành đen bằng alcalase với các nồng độ từ 0,25-0,75% và thời gian thủy phân từ 3-6 giờ [46]. Trên cơ sở các kết quả tối ưu hóa điều kiện thủy phân với tỷ lệ enzyme/cơ chất (E/S) 1% và thời gian phản ứng 20 phút được lựa chọn khi xét đồng thời cả hiệu quả kỹ thuật và yếu tố kinh tế. Mặc dù giá trị DH tại E/S 2% có xu hướng cao hơn, nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với E/S 1%, trong khi chi phí enzyme tăng lên đáng kể. Điều này cho thấy E/S 1% là điểm cân bằng tối ưu giữa hiệu suất và chi phí, đặc biệt trong bối cảnh ứng dụng ở quy mô sản xuất công nghiệp. Bên cạnh đó, việc hạn chế thời gian thủy phân ở mức 20 phút cũng giúp giảm tiêu hao năng lượng và hạn chế nguy cơ hình thành các peptide quá ngắn hoặc acid amin tự do, vốn có thể ảnh hưởng không mong muốn đến hoạt tính sinh học của sản phẩm.

### **3.4. Tinh sạch và phân tích trình tự peptide**

Quá trình tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel Sephadex G-25 và trao đổi anion HiTrap™ Q XL sử dụng hệ thiết bị sắc ký lỏng protein/peptide nhanh (FPLC) ÄKTA Pure 25M đã thu được ba phân đoạn chính (I–III) (Hình 3.3). Trong đó, phân đoạn f.III xuất hiện khi rửa giải bằng dung dịch đệm phosphate 50 mM và tăng nồng độ muối NaCl tới 0,5 M cho thấy hoạt tính ức chế ACE cao nhất tới 78,16% ở nồng độ thử nghiệm 100 µg/mL, tương ứng với tỷ lệ hiệu suất ức chế (IER) 188,33 %/mg mL<sup>-1</sup> (Bảng 3.2). Kết quả sắc ký và phân đoạn hoạt tính cho thấy phân đoạn f.III giàu peptide có hoạt tính tiềm năng và có thể

liên quan đến thành phần axit amin cụ thể và điện tích tổng (-) cao hơn để tương tác mạnh với nhựa trao đổi anion của cột HiTrap™ Q XL. Các mô hình làm giàu với kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận đối với các peptide có hoạt tính sinh học phân lập từ dịch thủy phân protein từ mực, trong đó các phân đoạn có hoạt tính cao chủ yếu được rửa giải ở nồng độ muối cao hơn trong quá trình sắc ký trao đổi ion [35, 44].

Sự xuất hiện của một đỉnh hoạt tính chiếm ưu thế tương ứng với phân đoạn f.II trên sắc ký đồ FPLC cho thấy độ tinh khiết cao, gợi ý hoạt tính ức chế ACE thể hiện bởi một peptide cụ thể được làm giàu trong phân đoạn này. Nhìn chung, sự gia tăng dần dần hoạt tính sinh học của peptide qua các bước tinh sạch liên tiếp đã khẳng định tính hiệu quả của chiến lược tinh sạch sử dụng. Kết quả này thể hiện ở các báo cáo trước đây về các peptide hoạt tính phân lập từ sinh vật biển, nơi hoạt tính sinh học được làm giàu đáng kể thông qua phương pháp phân đoạn từng bước [22, 47]. Để xác định peptide hoạt tính, phần gom của phân đoạn f.III được tiếp tục rửa giải qua cột sắc ký pha đảo C18 (RP-HPLC) và phân tích phổ khối MALDI-TOF/TOF MS/MS.



Hình 3.3 Sắc ký đồ FPLC quá trình rửa giải, tinh sạch peptide có hoạt tính ức chế ACE trên cột sắc ký trao đổi anion. Độ hấp thụ quang (absorbance) tại  $\lambda = 214$  nm (đường nét liền) và gradient nồng độ NaCl (đường nét đứt).

Kết quả tinh sạch peptide bằng sắc ký trao đổi anion (HiTrap™ Q XL) cho thấy sự phân tách rõ ràng các phân đoạn peptide dựa trên đặc tính điện tích, trong đó phân đoạn f.III thể hiện hoạt tính ức chế ACE cao nhất. Điều này cho

thấy phương pháp sắc ký trao đổi ion là một công cụ hiệu quả trong việc phân lập các peptide có hoạt tính sinh học từ dịch thủy phân protein. Việc phân đoạn f.III được rửa giải ở nồng độ muối cao (NaCl 0,5 M) cho thấy các peptide trong phân đoạn này có điện tích âm tương đối lớn ở điều kiện pH của hệ đệm, từ đó tương tác mạnh với pha tĩnh mang điện tích dương của cột. Khi tăng nồng độ muối, các ion  $\text{Cl}^-$  cạnh tranh với peptide để liên kết với các vị trí tích điện trên cột, dẫn đến sự giải hấp các peptide có ái lực cao nhất, đồng thời cũng là các peptide có tiềm năng hoạt tính sinh học cao.

Bảng 3.2 Hoạt tính ức chế ACE và tỷ lệ hiệu suất ức chế (inhibitory efficiency ratio, IER%) của các phân đoạn sau sắc FPLC trên cột Hitrap<sup>TM</sup> Q FF

Ký hiệu mẫu/ phân đoạn	Hàm lượng peptide (mg/mL)	Tỷ lệ ức chế ACE (%) <sup>*</sup>	IER <sup>**</sup> (%/mg mL <sup>-1</sup> )
Đối chứng (-) (DMSO)	ND.	0	ND.
Mẫu tham khảo (+) (Captopril)	0,005	94,09 ± 0,8	18.818,00
<b>f. II</b>	0,049	31,74±1,4	647,76
<b>f. III</b>	0,036	78,16±1,1	2.171,11

<sup>\*</sup>IER (tỷ lệ hiệu suất ức chế) = % ức chế/hàm lượng peptide. ND.: không xác định.

Hoạt tính ức chế ACE vượt trội của phân đoạn f.III (78,16%) cùng với giá trị IER cao cho thấy mức độ tinh sạch và hiệu quả làm giàu peptide hoạt tính đã được cải thiện đáng kể so với các bước trước đó. Điều này phản ánh rằng các peptide có hoạt tính mạnh đã được tập trung vào một phân đoạn tương đối tinh khiết. So với phân đoạn f.II, mặc dù có hàm lượng peptide cao hơn, nhưng hoạt tính ức chế ACE lại thấp hơn đáng kể, cho thấy không phải tất cả các peptide đều có hoạt tính sinh học tương đương. Điều này nhấn mạnh vai trò quan trọng của trình tự acid amin và cấu trúc peptide trong việc quyết định hoạt tính sinh học, thay vì chỉ phụ thuộc vào hàm lượng peptide tổng. Phân đoạn f.III cho thấy giá trị IER thấp hơn đáng kể so với chất chuẩn captopril. Điều này là hợp lý do captopril là một chất ức chế ACE tổng hợp có cấu trúc tối ưu hóa cao, trong khi các peptide tự nhiên thường có hoạt tính thấp hơn nhưng lại có ưu điểm về độ an toàn và khả năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng.

Do đó, các peptide thu được từ nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm chức năng hoặc hỗ trợ điều trị, thay vì thay thế hoàn toàn thuốc điều trị.

### 3.5. Xác định trình tự peptide và khối lượng phân tử

Peptide ức chế đã tinh sạch từ phân đoạn f.III tiếp tục được đặc trưng hóa bằng phân tích MALDI-TOF MS và MALDI-TOF/TOF MS/MS để xác định khối lượng phân tử và trình tự axit amin. Như thể hiện trong Hình 3.4 A, phổ MALDI-TOF MS xuất hiện một đỉnh ion phân tử chiếm ưu thế tại  $m/z$  775,386 Da, cho thấy đây là một peptide có độ đồng nhất cao với khối lượng phân tử thấp. Để xác định trình tự peptide, ion sơ cấp (precursor ion) tại  $m/z$  775,386 Da được phân tích MALDI-TOF/TOF MS/MS. Phổ phân mảnh thu được (Hình 3.4 B) hiển thị các ion mảnh loại *b*- và *y*- được phân tách rõ ràng, cùng với các ion loại *a*- hỗ trợ, cho phép giải trình tự *de novo* một cách tin cậy cho peptide là Glu–Cys–Pro–Gly–Asp–Lys–Gln (**ECPGDKQ**). Việc quan sát thấy một ion sơ cấp duy nhất chiếm ưu thế và các kiểu phân mảnh có thể diễn giải và cung cấp bằng chứng cho độ tin cậy của việc xác định trình tự này.

Kết quả phân tích MALDI-TOF MS và MALDI-TOF/TOF MS/MS đã xác nhận sự hiện diện của một peptide có khối lượng phân tử thấp và độ tinh sạch cao trong phân đoạn III-d, với đỉnh ion phân tử duy nhất tại  $m/z$  775,386 Da. Việc chỉ xuất hiện một ion sơ cấp chiếm ưu thế cho thấy quá trình tinh sạch trước đó đã đạt hiệu quả cao, giúp loại bỏ hầu hết các tạp chất và peptide không mong muốn. Điều này đặc biệt quan trọng vì độ tinh khiết cao là điều kiện tiên quyết để đánh giá chính xác hoạt tính sinh học cũng như xác định trình tự peptide bằng phương pháp giải trình tự *de novo*.

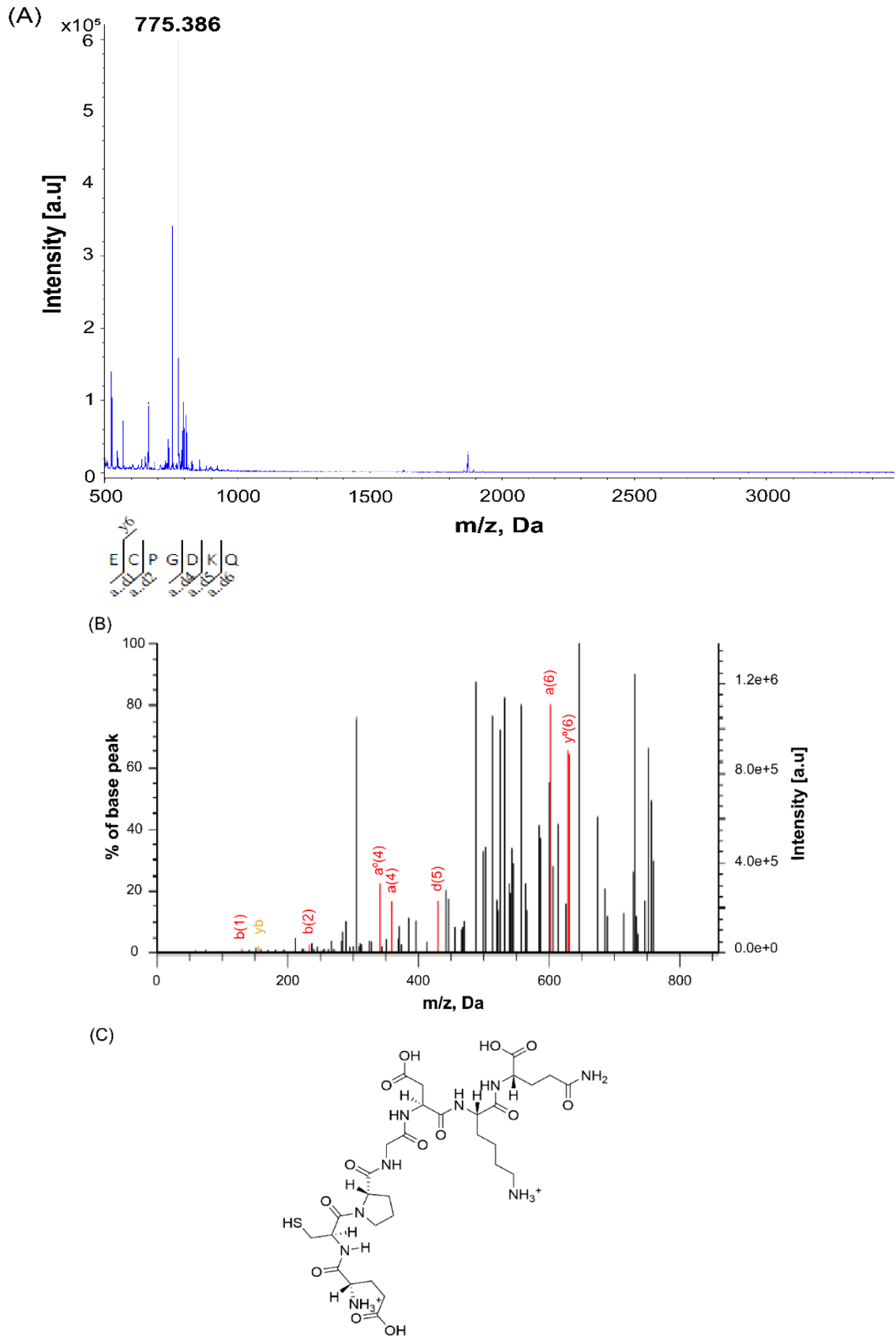
Trình tự peptide ECPGDKQ được xác định từ phổ MS/MS cho thấy đây là một oligopeptide gồm 7 acid amin với khối lượng phân tử nhỏ (<1 kDa), phù hợp với xu hướng chung của các peptide có hoạt tính ức chế ACE mạnh đã được công bố trước đây. Các peptide ngắn thường có khả năng khuếch tán nhanh, dễ dàng tiếp cận trung tâm hoạt động của enzyme và ít bị cản trở bởi cấu trúc không gian, từ đó nâng cao hiệu quả ức chế. Giá trị  $IC_{50}$  đạt được (20,4  $\mu$ g/mL, tương đương 26,31  $\mu$ M) cho thấy peptide này có hoạt tính sinh học đáng kể, đặc biệt khi xét đến nguồn gốc tự nhiên và chưa qua tối ưu hóa cấu trúc.

Xét trên phương diện mối quan hệ cấu trúc – hoạt tính (SAR), trình tự ECPGDKQ thể hiện nhiều đặc điểm thuận lợi cho hoạt tính ức chế ACE. Sự hiện

diện của cysteine (C) với nhóm chức -SH đóng vai trò quan trọng trong việc tương tác với ion  $Zn^{2+}$  tại trung tâm hoạt động của enzyme ACE, tương tự cơ chế của các chất ức chế ACE tổng hợp như captopril. Điều này cho thấy peptide có thể hoạt động theo cơ chế ức chế cạnh tranh hoặc bán cạnh tranh thông qua việc chiếm giữ vị trí gắn kết của cơ chất tự nhiên. Ngoài ra, sự có mặt của proline (P) trong chuỗi peptide góp phần tạo nên cấu trúc không gian phù hợp để tương tác với các vị trí liên kết đặc hiệu (S1, S2) của enzyme. Proline cũng được biết đến là acid amin giúp tăng độ bền của peptide đối với sự phân giải bởi các enzyme tiêu hóa, từ đó cải thiện khả năng tồn tại và phát huy tác dụng sinh học trong cơ thể.

Bên cạnh đó, các acid amin tích điện như glutamic acid (E), aspartic acid (D) và lysine (K) trong trình tự cũng có thể góp phần tạo ra các tương tác điện tích và liên kết hydro với enzyme đích, giúp tăng cường độ bền của phức hợp enzyme-peptide. Sự kết hợp giữa các acid amin kỵ nước (proline), acid amin chứa lưu huỳnh (cysteine) và các acid amin tích điện tạo nên một cấu trúc peptide có tính linh hoạt và khả năng tương tác đa dạng, từ đó nâng cao hiệu quả ức chế ACE.

So với các peptide ức chế ACE đã được công bố từ các nguồn protein biển khác, peptide ECPGDKQ có hoạt tính ở mức trung bình đến khá, mặc dù chưa đạt đến mức độ của các chất ức chế tổng hợp. Tuy nhiên, ưu điểm nổi bật của peptide tự nhiên là độ an toàn cao, ít gây tác dụng phụ và có thể ứng dụng trong thực phẩm chức năng hoặc các sản phẩm hỗ trợ sức khỏe. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong bối cảnh nhu cầu sử dụng các hợp chất sinh học tự nhiên ngày càng tăng.



Hình 3.4 Xác định trình tự axit amin và khối lượng phân tử của peptide tinh sạch từ phân đoạn f.III. (A) Phổ MALDI-TOF MS của peptide đã tinh sạch. (B) Phổ phân mảnh MALDI-TOF/TOF MS/MS với các ion phân mảnh được chú

giải để giải trình tự de novo. (C) Cấu trúc hóa học đề xuất của peptide đã xác định.

Hoạt tính ức chế enzyme chuyển angiotensin (ACE) của peptide tinh sạch được xác định với giá trị  $IC_{50} = 20,4 \mu\text{g/mL}$  (tương đương  $26,31 \mu\text{M}$ ). Các peptide có khối lượng phân tử dưới 1 kDa được công nhận rộng rãi là có tiềm năng hoạt tính vượt trội, nhờ khả năng hấp thu và tính sinh khả dụng cao. Các nghiên cứu gần đây về mối quan hệ cấu trúc–hoạt tính (SAR) đã nhấn mạnh rằng các peptide nhỏ ( $<1.000 \text{ Da}$ ) thường thể hiện hoạt tính sinh học cao hơn do khả năng khuếch tán và tương tác hiệu quả với các đích sinh học [48]. Xét mối quan hệ cấu trúc–hoạt tính, tiềm năng chống oxy hóa của ECPGDKQ có thể được giải thích bởi chiều dài trình tự ngắn cũng thành phần axit amin.

Hoạt tính ức chế ACE của một peptide được quyết định bởi khả năng nó "khóa" trung tâm hoạt động của enzyme, ngăn không cho Angiotensin I gắn vào. Trình tự ECPGDKQ có những đặc điểm cấu trúc chiến lược như: Cysteine (C) và sự phối trí với ion kẽm ( $Zn^{2+}$ ) có thể là yếu tố then chốt nhất do ACE là một metalloenzyme cần ion  $Zn^{2+}$  để hoạt động. Nhóm sulfhydryl (-SH) trên mạch bên của cysteine có ái lực mạnh với kim loại, đóng vai trò như một "mỏ neo" gắn trực tiếp vào ion tại trung tâm hoạt động của ACE, làm bất hoạt enzyme. Đây là cơ chế tương tự như thuốc huyết áp nổi tiếng Captopril (vốn chứa nhóm -SH). Peptide có chứa proline (P) - thường xuất hiện trong các peptide ức chế ACE mạnh nhất. Cấu trúc vòng của proline tạo ra một độ gấp lý tưởng để peptide khớp với vùng liên kết  $S_1$  hoặc  $S_2$  của enzyme. Đặc biệt, proline cũng bảo vệ peptide khỏi sự thủy phân bởi các enzyme tiêu hóa, giúp peptide duy trì hoạt tính khi đi vào hệ tuần hoàn [4, 48].

### 3.6. Độ bền, độ ổn định và đánh giá độc tính của peptide

#### 3.6.1. Độ bền của peptide với các enzyme hệ tiêu hoá

Các peptide có kích thước nhỏ hơn được biết là dễ được hấp thu bởi các tế bào ở ruột non, điều này do các peptide chuỗi ngắn ít bị phân giải bởi các enzyme protease của tiêu hóa và có thể kháng được peptidase trong huyết tương. Tuy nhiên, một số peptide có hoạt tính ức chế ACE cao trong điều kiện in vitro lại không thể hiện tác dụng hạ huyết áp tương ứng trên cơ thể sống (in vivo). Hiện tượng này có thể được giải thích do các peptide bị thủy phân hoặc biến đổi bởi các enzyme tiêu hóa hoặc chính enzyme ACE, dẫn đến thay đổi cấu trúc và giảm hoạt tính sinh học [49]. Độ bền với enzyme thủy phân thuộc

hệ tiêu hóa của phân đoạn f.III được nghiên cứu khi ủ *in vitro* với các protease đường ruột-dạ dày nhằm đánh giá khả năng kháng lại điều kiện thủy phân trong dịch tiêu hoá trên cơ thể sống của các peptide tinh sạch. Kết quả hoạt tính ức chế ACE của phân đoạn f.III không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng (không ủ với enzyme thủy phân), nghĩa là chúng không bị ảnh hưởng bởi các protease tiêu hoá. Theo đó tỷ lệ ức chế ACE xác định được lần lượt là 72,15%, 74,05% và 71,28% sau khi xử lý với pepsin, trypsin cũng như hỗn hợp trypsin và chymotrypsin, so với giá trị đối chứng là 73,52%. Những kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, trong đó một số peptide ức chế ACE vẫn duy trì hoạt tính sau khi trải qua quá trình tiêu hóa mô phỏng *in vitro*, cho thấy tiềm năng ổn định sinh học của các peptide này [50]. Kết quả này cho thấy rằng các peptide chuỗi ngắn từ dịch thủy phân bằng alcalase có hoạt tính ức chế ACE cao có thể kháng lại sự thủy phân trong đường tiêu hóa và có tiềm năng ứng dụng trong phòng và điều trị cao huyết áp.

Kết quả nghiên cứu cho thấy phân đoạn peptide f.III duy trì được hoạt tính ức chế ACE sau khi xử lý với các enzyme tiêu hóa chính như pepsin, trypsin và chymotrypsin, chứng tỏ các peptide trong phân đoạn này có độ bền cao trong điều kiện mô phỏng hệ tiêu hóa *in vitro*. Đây là một đặc điểm rất quan trọng đối với các peptide có nguồn gốc thực phẩm, bởi vì khả năng kháng lại sự phân giải bởi enzyme tiêu hóa là điều kiện tiên quyết để peptide có thể tồn tại, hấp thu qua ruột và phát huy hoạt tính sinh học trong cơ thể.

Sự ổn định của hoạt tính ức chế ACE sau xử lý enzyme có thể được giải thích bởi đặc điểm cấu trúc của các peptide có trong phân đoạn f.III, đặc biệt là các peptide có khối lượng phân tử thấp và chứa các acid amin đặc trưng như proline. Các peptide giàu proline thường có cấu trúc bền vững hơn trước tác động của protease do liên kết peptide liên quan đến proline khó bị thủy phân. Ngoài ra, sự hiện diện của các acid amin kỵ nước hoặc các gốc tích điện trong chuỗi peptide cũng có thể góp phần làm giảm khả năng nhận diện và cắt của enzyme tiêu hóa. Điều này phù hợp với nhận định rằng các peptide ức chế ACE hiệu quả thường có cấu trúc đặc biệt giúp chúng vừa tương tác tốt với enzyme đích, vừa kháng lại sự phân giải sinh học.

Một yếu tố khác có thể góp phần vào độ bền của peptide là kích thước phân tử nhỏ (<1 kDa), giúp peptide ít bị ảnh hưởng bởi các cơ chế phân giải

không đặc hiệu trong đường tiêu hóa. Các peptide ngắn thường có khả năng khuếch tán nhanh và giảm thời gian tiếp xúc với enzyme tiêu hóa, từ đó hạn chế sự phân hủy.

Kết quả này có ý nghĩa quan trọng đối với việc đánh giá tiềm năng ứng dụng của peptide trong thực phẩm chức năng hoặc dược phẩm, đặc biệt là trong các sản phẩm hỗ trợ điều hòa huyết áp. Việc peptide duy trì hoạt tính sau khi đi qua môi trường dạ dày và ruột non cho thấy khả năng sinh khả dụng cao hơn và tăng khả năng phát huy tác dụng *in vivo*.

Tuy nhiên, cũng cần hiểu rằng mô hình *in vitro* chỉ phản ánh một phần điều kiện thực tế trong cơ thể. Trong hệ tiêu hóa *in vivo*, peptide còn chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố khác như pH biến đổi liên tục, sự hiện diện của nhiều loại enzyme khác nhau, thời gian lưu trú trong đường tiêu hóa và sự tương tác với các thành phần thực phẩm khác. Ngoài ra, sau khi được hấp thu, peptide còn có thể bị chuyển hóa tiếp trong huyết tương hoặc tại các mô đích, ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học cuối cùng.

Do đó, trong các nghiên cứu tiếp theo, cần tiến hành đánh giá độ bền và hoạt tính của peptide trong các mô hình *in vivo* để xác nhận khả năng ứng dụng thực tế.

### 3.6.2. Độ ổn định của các peptide đối với enzyme ACE

Độ ổn định của các peptide đã tinh sạch (ECPGDKQ) đối với enzyme ACE cho thấy có giá trị  $IC_{50}$  **khoảng** 25,97  $\mu M$  thấp hơn so với đối chứng (ủ chung với ACE đã bất hoạt;  $IC_{50} = 27,20 \mu M$ ). Do đó, những peptide này có thể được xếp vào nhóm các chất ức chế ACE thể hiện hoạt tính được cải thiện do sự hình thành của phân mảnh hoạt động mạnh hơn sau khi bị thủy phân bởi ACE. Kết quả cho thấy peptide ECPGDKQ không những duy trì được hoạt tính ức chế ACE sau khi tiếp xúc với enzyme này mà còn có xu hướng gia tăng hiệu quả ức chế (thể hiện qua giá trị  $IC_{50}$  giảm nhẹ so với đối chứng). Điều này gợi ý rằng peptide ban đầu có thể bị ACE thủy phân một phần, tạo ra các phân mảnh peptide ngắn hơn với hoạt tính ức chế mạnh hơn. Hiện tượng này phù hợp với cơ chế đã được ghi nhận đối với một số peptide sinh học, trong đó peptide “tiền chất” (pro-peptide) được chuyển hóa thành dạng hoạt động hơn thông qua quá trình cắt bởi chính enzyme đích. Kết quả này có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá tiềm năng ứng dụng của peptide trong điều kiện sinh lý thực tế. Trong cơ thể, peptide không tồn tại ở trạng thái tĩnh mà luôn chịu

tác động của các enzyme khác nhau, bao gồm cả ACE. Do đó, việc peptide có thể chuyển hóa thành các dạng hoạt tính mạnh hơn khi tương tác với ACE là một lợi thế, giúp duy trì hoặc tăng cường hiệu quả sinh học theo thời gian. Đây cũng là một đặc điểm tích cực so với nhiều peptide khác bị mất hoạt tính sau khi bị enzyme phân giải.

### ***Độc tính hoá sinh và độc tính in silico của peptide***

Peptide hoạt tính ACEi tinh sạch từ mực xà đại dương (Peptide MX) được phân tích độc tính *in silico* sử dụng công cụ ToxinPred 3.0 [51] để dự đoán tính chất peptide độc hay không độc. Bộ dữ liệu chính được sử dụng cho phân tích trong phương pháp này bao gồm 1805 peptide độc (kích thước  $\leq 35$  axit amin). Dựa trên thông số cung cấp, peptide ECPGDKQ cho kết luận không độc. Ngoài ra, các giá trị độ kỵ nước (hydrophobicity) và độ ưa nước (hydrophilicity) của một peptide cho ta biết về tính chất hòa tan của nó trong môi trường nước. Theo đó, peptide ECPGDKQ có điện tích -1,00, là một peptide có tính axit. Do mang điện tích âm, nó sẽ có xu hướng đẩy các phân tử cùng điện tích và hút các phân tử/bề mặt mang điện tích dương. Điện tích này giúp peptide duy trì trạng thái hòa tan tốt trong dung dịch đệm sinh lý, ít bị kết tủa do các lực đẩy tĩnh điện giữa các phân tử peptide với nhau. Peptide có giá trị độ kỵ nước (hydrophobicity) = -0,43, chỉ số kỵ nước = -1,19; độ ưa nước (hydrophilicity) = 1,17. Xét đồng thời cả hai giá trị, có thể kết luận rằng peptide này có tính ưa nước rõ rệt. Các peptide ngắn, ưa nước và mang điện tích âm như thế này thường xuất hiện trong các motif nhận diện tế bào, hoặc đóng vai trò làm chất mang (carrier) trong mỹ phẩm và dược phẩm nhờ khả năng tan tốt. Đây là một peptide có độ linh hoạt cấu trúc cao và khả năng phản ứng hóa học tốt nhờ nhóm Cysteine.

Bảng 3.3 Phân tích độc tính in silico sử dụng công cụ ToxinPred 3.0:

Peptide ID	SVM Score*	Độc tính	Độ kỵ nước	Chỉ số kỵ nước	Tính ưa nước	Điện tích	Mol wt.
Peptide MX	-0,03	Không độc	-0,43	-1,99	1,17	-1,00	678,83

\* *Chú thích:* “SVM score” là giá trị đầu ra của mô hình SVM (Support Vector Machine) thể hiện mức độ peptide thuộc về lớp được dự đoán.  $Score > 0 \rightarrow$  peptide được dự đoán thuộc lớp dương (trong trường

hợp này là độc tính),  $Score < 0 \rightarrow$  peptide thuộc lớp âm (không độc tính). Giá trị  $|score|$  lớn  $\rightarrow$  peptide nằm xa ranh giới  $\rightarrow$  dự đoán chắc chắn hơn;  $|score|$  nhỏ  $\rightarrow$  peptide gần ranh giới  $\rightarrow$  dự đoán kém chắc chắn hơn hoặc cần kiểm chứng. Mol wt.: Khối lượng phân tử ( $M_w$ , Dalton).

### 3.6.3. Kết quả đánh giá độc tính trên tế bào thường

Peptide được đánh giá độc tính *in vitro* trên các dòng tế bào Vero (tế bào thận khỉ xanh châu Phi) và HEK-293 (tế bào thận phôi người) bằng phương pháp MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Đánh giá độc tính *in vitro* cho thấy peptide có hoạt tính ức chế ACE từ mức xà không gây độc đáng kể trên 2 dòng tế bào thường Vero và HEK-293 (với nồng độ thử nghiệm tới 256  $\mu\text{g/mL}$ ):

Bảng 3.4 Kết quả đánh giá ức chế của peptide với tế bào

Ký hiệu mẫu	Dòng tế bào Vero		Dòng tế bào HEK-293	
	Tỉ lệ ức chế tế bào (%)	Giá trị $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tỉ lệ ức chế tế bào (%)	Giá trị $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Đối chứng (-)	0,00	-	0,00	-
Chất tham khảo (+)	90,83 $\pm$ 2,91	0,71	91,72 $\pm$ 2,83	0,32
Peptide ECPGDKQ	17,02 $\pm$ 1,92	>256	17,45 $\pm$ 0,32	>256

Tỷ lệ sống của tế bào được duy trì ở mức cao trong toàn bộ khoảng nồng độ khảo sát, cho thấy peptide không gây ảnh hưởng bất lợi đáng kể đến khả năng tồn tại và chức năng sinh lý của tế bào trong điều kiện thí nghiệm. Kết quả này phản ánh tính tương thích sinh học tốt của peptide, đồng thời gợi ý rằng hợp chất có thể được xem là an toàn khi tiếp xúc với tế bào ở các mức liều đã đánh giá. Quan sát này cũng phù hợp với xu hướng chung đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đây về peptide có nguồn gốc từ sinh vật biển, vốn được biết đến với khả năng thể hiện hoạt tính sinh học cao nhưng ít gây độc tế bào. Đặc biệt, các peptide có hoạt tính ức chế enzyme chuyển angiotensin (ACE) thường vừa duy trì hiệu quả sinh học vừa đảm bảo mức độ an toàn tương đối trong các mô hình thử nghiệm *in vitro* [52].

Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy các peptide sinh học thường

không gây độc đáng kể trên các dòng tế bào thường khi đánh giá bằng phương pháp MTT [53].

Phương pháp MTT là một trong những kỹ thuật phổ biến để đánh giá khả năng sống của tế bào thông qua hoạt động của enzyme ty thể, từ đó phản ánh mức độ độc tính của các hợp chất thử nghiệm. Theo các nghiên cứu đã công bố, các peptide sinh học được xem là không gây độc đáng kể khi tỷ lệ sống của tế bào vẫn duy trì trên 80% so với đối chứng. Trong nghiên cứu này, việc không ghi nhận sự suy giảm đáng kể về khả năng sống của tế bào Vero và HEK-293 cho thấy peptide thu nhận không gây ảnh hưởng tiêu cực đến chức năng tế bào ở nồng độ thử nghiệm [54, 55].

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã minh chứng tiềm năng khai thác protein từ mực xà đại dương (*Sthenoteuthis oualaniensis*) để tạo ra các peptide có hoạt tính sinh học, đặc biệt là khả năng ức chế enzyme chuyển hóa angiotensin (ACE). Kết quả lựa chọn được enzyme alcalase tối ưu trong quá trình thủy phân, với độ thủy phân (DH) cao nhất 36,1%, vượt trội so với các enzyme thử nghiệm khác. Khi kết hợp với siêu âm, điều kiện tối ưu được xác định tại tỷ lệ enzyme/cơ chất 1% trong 20 phút (DH = 46,1–47,5%).

Quá trình siêu lọc cho thấy kích thước phân tử peptide có ảnh hưởng rõ rệt đến hoạt tính sinh học. Phân đoạn <1 kDa cho hàm lượng peptide cao nhất (612,2 mg/g) và hoạt tính ức chế ACE mạnh nhất với  $IC_{50}$  giảm xuống còn 0,531 mg/mL. Điều này khẳng định peptide có khối lượng phân tử thấp đóng vai trò quan trọng trong hoạt tính sinh học.

Quy trình tinh sạch bằng FPLC và RP-HPLC đã thu được một peptide và xác định có trình tự ECPGDKQ, khối lượng phân tử ~775,386 Da, hoạt tính ức chế ACE với giá trị  $IC_{50} = 20,4 \mu\text{g/mL}$  ( $\approx 26,31 \mu\text{M}$ ). Peptide này thể hiện cấu trúc phù hợp cho hoạt tính ức chế ACE nhờ sự hiện diện của các acid amin đặc trưng như cysteine và proline.

Ngoài ra, peptide thu được có độ bền cao trong điều kiện tiêu hóa *in vitro*, với hoạt tính ức chế ACE duy trì ổn định (~71–74%) sau xử lý với các enzyme tiêu hóa. Đồng thời peptide biểu hiện độc tính không đáng kể trên 2 dòng tế bào thường Vero và HEK-293.

Tổng thể, nghiên cứu đã xây dựng được quy trình tương đối hoàn chỉnh từ nguyên liệu đến thủy phân rồi phân đoạn sau đó tinh sạch và xác định cấu trúc và hoạt tính peptide, tạo nền tảng khoa học cho việc phát triển sản phẩm giá trị gia tăng từ nguồn nguyên liệu mực xà

## KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả đạt được, nghiên cứu đề xuất một số định hướng phát triển và ứng dụng như sau:

Thứ nhất, cần tiếp tục nghiên cứu mở rộng quy mô sản xuất ở mức pilot hoặc bán công nghiệp nhằm đánh giá tính khả thi về công nghệ và kinh tế. Điều kiện tối ưu đã xác định (E/S 1%, 20 phút, siêu âm 40 kHz) cần được kiểm chứng ở quy mô lớn để đảm bảo tính ổn định và hiệu quả chi phí enzyme, đặc biệt trong bối cảnh alcalase cho hiệu suất cao nhưng chi phí tương đối lớn.

Thứ hai, cần nghiên cứu sâu hơn về tác dụng sinh học in vivo của peptide ECPGDKQ. Mặc dù  $IC_{50}$  đạt mức 20,4  $\mu\text{g/mL}$  và độ bền tiêu hóa tốt, nhưng cần đánh giá thêm về sinh khả dụng, chuyển hóa và độc tính cấp trên động vật để đánh giá tiềm năng ứng dụng của peptide.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. World Health Organization, 2023, *Global report on hypertension: the race against a silent killer*, World Health Organization.
2. Mills K.T., Stefanescu A., He J., 2020, The global epidemiology of hypertension, *Nature reviews nephrology*, 16(4), pp. 223-237.
3. Fyhrquist F., Saijonmaa O., 2008, Renin-angiotensin system revisited, *Journal of internal medicine*, 264(3), pp. 224-236.
4. Bernstein K.E., Ong F.S., Blackwell W.B., Shah K.H., Giani J.F., Gonzalez-Villalobos R.A., Shen X.Z., Fuchs S., 2013, A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme, *Pharmacological reviews*, 65(1), pp. 1-46.
5. Forrester S.J., Booz G.W., Sigmund C.D., Coffman T.M., Kawai T., Rizzo V., Scalia R., Eguchi S., 2018, Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology, *Physiological reviews*, 98(3), pp. 1627-1738.
6. Udenigwe C.C., Mohan A., 2014, Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition, *Journal of Functional Foods*, 8, pp. 45-52.
7. Brown N.J., Vaughan D.E., 1998, Angiotensin-converting enzyme inhibitors, *Circulation*, 97(14), pp. 1411-1420.
8. Singh B., Cusick A.S., Goyal A., Patel P., 2025, ACE inhibitors, *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
9. Semple P.F., 1995, Putative mechanisms of cough after treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors, *Journal of Hypertension*, 13, pp. S17-S21.
10. Zhao D., Liu X., 2023, Purification, identification and evaluation of antioxidant peptides from pea protein hydrolysates, *Molecules*, 28(7), pp. 2952.
11. Zhi T., Li X., Sadiq F.A., Mao K., Gao J., Mi S., Liu X., Deng W., Chitrakar B., Sang Y., 2022, Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization, *Lwt*, 164, pp. 113636.

12. Shi J., Su R., Zhang W., Chen J., 2020, Purification and the secondary structure of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the alcalase hydrolysate of seahorse protein, *Journal of Food Science and Technology*, 57(11), pp. 3927-3934.
13. Korhonen H., Pihlanto A., 2006, Bioactive peptides: production and functionality, *International dairy journal*, 16(9), pp. 945-960.
14. Kim S.K., Wijesekara I., 2010, Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review, *Journal of Functional foods*, 2(1), pp. 1-9.
15. Wang P., Zhang Y., Hu J., Tan B.K., 2024, Bioactive peptides from marine organisms, *Protein & Peptide Letters*, 31(8), pp. 569-585.
16. Ngo D.H., Vo T.S., Ngo D.N., Wijesekara I., Kim S.K., 2012, Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms, *International journal of biological macromolecules*, 51(4), pp. 378-383.
17. Udenigwe C.C., Aluko R.E., 2012, Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits, *Journal of food science*, 77(1), pp. R11-R24.
18. Vibhute P., Radhakrishnan A., Jeyachandran S., 2023, Antioxidant properties of marine proteins and peptides, *Marine Antioxidants*. Elsevier, pp. 11-25.
19. Zhu Z., Xu Z., Li Y., Fan Y., Zhou Y., Song K., Meng L., 2024, Antioxidant function and application of plant-derived peptides, *Antioxidants*, 13(10), pp. 1203.
20. Zhang R., Ren Y., Ren T., Yu Y., Li B., Zhou X., 2025, Marine-Derived Antioxidants: A Comprehensive Review of Their Therapeutic Potential in Oxidative Stress-Associated Diseases, *Marine Drugs*, 23(6), pp. 223.
21. Mamboya F., Amri E., 2012, Papain, a plant enzyme of biological importance: A review, *Am. J. Biochem. Biotechnol*, 8(2), pp. 99-104.
22. Zhang, R., Ren, Y., Ren, T., Yu, Y., Li, B., & Zhou, X., 2025, Marine Derived Antioxidants: A Comprehensive Review of Their Therapeutic Potential in Oxidative Stress-Associated Diseases. *Marine Drugs*, 23(6), pp 223.

23. Lesson R. P. (René Primevère), 1794-1849. Voyage autour du monde sur la corvette la Coquille. Tome 1 / René Primevère Lesson Archival Facsimiles Alburgh, England 1987.
24. Duo W., Xu L., Yusof M.J.M., Wang Y., Ng S.B., Du F., 2025, Characterization of the Complete Mitochondrial Genome of Dwarf Form of Purpleback Flying Squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) and Phylogenetic Analysis of the Family Ommastrephidae, *Genes*, 16(2), pp. 226.
25. Zhu K., Xu K., Zhu W., 2024, Discrimination of different forms and oceanic regions of purpleback flying squid (*Sthenoteuthis oualaniensis*) based on stable isotopes and fatty acid composition, *Frontiers in Marine Science*, 11, pp. 1415976.
26. Gerald McCormack, 2007, Cook Islands biodiversity database, Rarotonga, Cook Islands: Cook Islands Natural Heritage Trust.
27. Yang X., Yang L., Huang H., Li L., Deng J., Zhao Y., Yang S., 2015, Nutritional component analysis and quality evaluation of *Sthenoteuthis oualaniensis* ink in the South China Sea, *South China Fisheries Science*, 11(5), pp. 138-142.
28. Siriraksophon S., Sukramongkol N, Nakamura Y, 2001, Exploration of oceanic squid, *Sthenoteuthis oualaniensis* resources in the South China Sea, Vietnamese waters. *Proceedings of the Fourth Technical Seminar on Marine Fishery Resources Survey in the South China Sea, Area IV: Vietnamese Waters, 18-20 September 2000. Secretariat, Southeast Asian Fisheries Development Center.*
29. Zhu Y., Lao F., Pan X., Wu J., 2022, Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability, *Biomolecules*, 12(11), pp. 1622.
30. Wang J., Pei X., Liu H., Zhou D., 2018, Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*), *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, pp. 544-550.
31. Nguyễn Văn Hương, Vũ Văn Khương, Nguyễn Hoàng Minh, Phan Đăng Liêm, Nguyễn Văn Hải, Nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân bố ngư trường mực lá đại dương ở vùng biển Việt Nam.

32. Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254.
33. Je J.Y., Qian Z.J., Byun H.G., Kim S.K., 2007, Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis, *Process Biochemistry*, 42(5), pp. 840-846.
34. Sudhakar S., Nazeer R.A., 2015, Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species, *Journal of functional foods*, 14, pp. 502-512.
35. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), pp. 265–275.
36. Ghassem M. Arihara K., Babji A.S., Said M., Ibrahim S., 2011, Purification and identification of ACE-inhibitory peptides from haruan (*Channa striatus*) myofibrillar protein hydrolysate, *Food Chemistry*, 129(4), pp. 1770–1777.
37. Wanasundara P.K.J.P.D., Amarowicz R., Pegg R., Shand P., 2002, Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma, *Journal of Food Science*, 67(2), pp. 623-630.
38. Chen J., Wang Y., Zhong Q., Wu Y., Xia W., 2012, Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein, *Peptides*, 33, pp. 52–58.
39. Deng Z., Liu Y., Wang J., Wu S., Geng L., Sui Z. et al., 2018, Antihypertensive effects of two novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) in Spontaneously Hypertensive Rats (SHRs), *Mar Drugs*, 16, pp. 299.
40. Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F., 2007, Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type, *Food chemistry*, 102(4), pp. 1317-1327.
41. Kristinsson H.G., Rasco B.A., 2000, Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, pp. 43-81.

42. Nemati M., Shahosseini S.R., Ariaii P., 2024, Review of fish protein hydrolysates: production methods, antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation, *Food Science and Biotechnology*, 33(8), pp. 1789-1803.
43. Wisuthiphaet S., Kongruang P., Chamcheun S., 2016, Fish protein hydrolysate production by acid and enzymatic hydrolysis, *International Journal of Applied Science and Technology*, 9(3), pp. 261–270.
44. Senadheera, T. R. L., Dave, D., & Shahidi, F., 2021, Antioxidant potential and physicochemical properties of protein hydrolysates from North Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*), *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), pp. 3.
45. Tran H.C. Le H.A.T., 2021, Effects of enzyme types and extraction conditions on protein recovery and antioxidant properties of hydrolysed proteins derived from *Lemna minor*, *Applied Science and Engineering Progress*, 14(3), pp. 360-369.
46. Phongthai P.S., Rawdkuen S., Thitipramote N., 2020, Effects of enzyme concentrations and digestion time on degree of hydrolysis and chemical properties of protein hydrolysate from black soybean using alcalase enzyme, *KMUTNB International Journal of Applied Science and Technology*, 13(4), pp. 331–340.
47. Rajapakse N., Mendis E., Byun H.G., Kim S.K., 2005, Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems, *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(9), pp. 562-569.
48. Xiang Z., Xue Q., Gao P., Yu H., Wu M., Zhao Z., Dai L., 2023, Antioxidant peptides from edible aquatic animals: Preparation method, mechanism of action, and structure-activity relationships, *Food chemistry*, 404, pp. 134701.
49. Minkiewicz P., Iwaniak A., Darewicz M., 2019, BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities, *Int J Mol Sci*, 20(23), pp. 5978.
50. Li W., Chen W., Wang J., Li Z., Zhang Z., Wu D., Yan M., Ma H., Yang Y., 2023, Structure-Activity Relationship of Novel ACE Inhibitory

- Undecapeptides from *Stropharia rugosoannulata* by Molecular Interactions and Activity Analyses, *Foods*, 12(18), pp. 3461.
51. Gupta S, et al, ToxinPred2/3.0, 2023/2024, an improved method for predicting toxicity of peptides, *Comput Biol Med*, 179, 108926.
52. Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Ravallec-Plé R., Leroy Y., Guillochon D., Barkia A. et al., 2008, Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases, *Food Chemistry*, 111, pp. 350–356.
53. Li M, Zhang Y, Wang Q, Chen H., 2025, Identification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from squid (*Todarodes pacificus*) skin gelatin hydrolysate. *Mar Drugs*, 23(2), pp. 81.
54. Senthilraja P, Kathiresan K., 2015, In vitro cytotoxicity MTT assay in Vero cell line study, *J Appl Pharm Sci*, 5(3), pp. 80–84.
55. Quah YX., Bioactive peptides and their cytotoxicity evaluation using HEK-293 cell line [Master's thesis], Universiti Tunku Abdul Rahman, 2018.