

NGHIÊN CỨU CÁC CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN (TI) VÀ KIMOTRIPXIN (KI) CỦA HẠT THANH LONG (*HYLOCEREUS UNDATUS* (Haw.) Britton & Rose)

Hoàng Thu Hà, Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội

1. Mở đầu

Cây thanh long được trồng phổ biến ở nước ta cũng như các nước Đông Nam Á khác. Quả thanh long có tác dụng giải nhiệt, lợi tiểu, nhuận tràng [2]. Phần ăn được của quả chứa 82 – 83% nước, giàu vitamin C và một số vitamin nhóm B [5]. Công bố của Perez 2005 [6] cho biết nhiều bộ phận của cây thanh long trong đó có quả còn có tác dụng làm liền vết thương ở người bị tiểu đường. Theo nhiều tác giả, các chất ức chế proteinaz có thể có nhiều triển vọng sử dụng làm thuốc chữa nhiều bệnh trong đó có các bệnh liên quan đến vết thương phần mềm. Tuy nhiên chưa có công bố nào về các chất ức chế proteinaz của loại quả quý giá này. Phần ăn được của quả bao gồm nhiều hạt rất nhỏ xen lẫn với thịt quả, rất khó tách riêng, có lẽ vì vậy chưa có các nghiên cứu phân tích riêng về hạt thanh long. Để tìm hiểu kỹ hơn về các hoạt chất của quả thanh long, chúng tôi tiến hành tách riêng hạt khỏi thịt quả và nghiên cứu điều tra sơ bộ các chất ức chế proteinaz của hạt.

2. Nguyên liệu và Phương pháp

- Quả thanh long chín tách hạt, hong khô ở nhiệt độ bình thường, bảo quản trong tủ lạnh, dùng cho các lần phân tích khác nhau.

- Xác định hàm lượng chất khô tuyệt đối bằng cân Scaltex.

- Xác định protein theo phương pháp Bradford [1]

- Xác định hoạt độ proteinaz: bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (điều tra sơ bộ) và phương pháp Anson cải tiến [7] với cơ chất casein.

- Xác định hoạt độ ức chế tripxin (TIA), kimotripxin (KIA) cũng thực hiện theo hai phương pháp trên nhưng enzym được ủ với dung dịch nghiên cứu trong 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi xác định hoạt độ như đã mô tả trước đây [3].

Công trình được hỗ trợ về kinh phí của Chương trình NCCB, đề tài 621306.

Chữ viết tắt: DC: dịch chiết; DCTL: dịch chiết hạt thanh long; Đ1: đỉnh 1; Đ2: đỉnh 2; HDR: hoạt độ riêng; KI: chất ức chế kimotripxin; KIA: hoạt độ ức chế kimotripxin; LC: dịch lên cột; PA: hoạt độ proteinaz; PAGE: điện di trên gel polyacrylamit; TL: thanh long; TI: chất ức chế tripxin; TIA: hoạt độ ức chế tripxin; Rm: độ di động.

- Điện di protein theo phương pháp Laemmli [4], gel 12,5%.
- Điện di để phát hiện trực tiếp proteinaz, các chất ức chế proteinaz: gel 12,5% đồng trùng hợp với casein, nồng độ casein trong gel 0,1%, điện di không có SDS, không có chất khử, mẫu không xử lý nhiệt.

3. Kết quả và thảo luận

Kết quả phân tích sơ bộ quả thanh long cho thấy

Trọng lượng quả (kg)	Phần ăn được (gam)	Dịch thu được (ml)	Trọng lượng hạt (gam)	Protein (mg)	
				s-fj	hạt
1	670	470 ^(a)	10,8	328,3	301,4

^(a) dịch ép nhận được từ phần thịt quả (670g) đã bỏ hạt (viết tắt là s-fj)

Kết quả trên cho thấy hạt chỉ chiếm khoảng 1,6% trọng lượng phần ăn được của quả nhưng protein của hạt đạt khoảng gần 92% protein của s-fj. Ngoài ra, khi phân tích dịch ép thịt quả cũng không phát hiện được proteinaz, hoạt độ ức chế trypsin (TIA) cũng như hoạt độ ức chế kimotripxin (KIA). Vì vậy, chúng tôi chỉ tiến hành nghiên cứu với hạt thanh long.

3.1. Hàm lượng protein, hoạt độ ức chế trypsin (TIA) và kimotripxin (KIA) của hạt thanh long chiết bằng các dung dịch đệm khác nhau

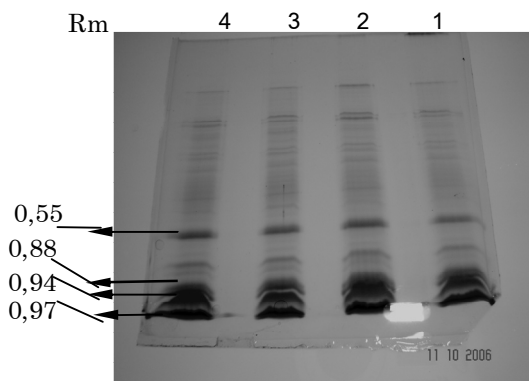
Để lựa chọn dung dịch chiết các chất ức chế trypsin (TI), kimotripxin (KI), chúng tôi đã sử dụng 4 loại dung dịch khác nhau để chiết rút. Kết quả trên bảng 1 cho thấy khi sử dụng nước Mili Q hay dung dịch axit axetic 0,005 M, TIA tổng số cũng như KIA tổng số trong các dịch chiết này đều cao hơn khi sử dụng các dung dịch khác. Dung dịch đệm Sorensen chiết rút được nhiều protein nhất, nhưng TIA, KIA đều thấp hơn so với dịch chiết bằng nước hay bằng axit axetic. Do đó, hoạt độ riêng của dịch chiết bằng đệm Sorensen thấp hơn khi sử dụng các dung dịch khác. Vì vậy, để tinh sạch TI hoặc KI của hạt thanh long có thể dùng nước Mili Q hoặc dung dịch a. axetic 0,005M.

Bảng 1. So sánh các loại dung dịch khác nhau dùng để chiết TI và KI từ hạt thanh long

STT	Dung dịch dùng để chiết rút	Protein (mg/100 gam hạt)	TIA		KIA	
			Hoạt độ tổng số (IU/100g hạt)	HĐR mIU/mg protein	Hoạt độ tổng số (IU/100g hạt)	HĐR mIU/mg protein
1	Nước Mili Q	2831	872,6	237,10	227,9	80,51
2	Đệm Sorensen 1/15M pH 6,5	4290	695,8	162,19	255,9	59,65
3	Đệm natri axetat 0,02M pH 4,5	2925	626,2	214,10	188,9	64,58
4	Axit axetic 0,005M	3315	872,6	202,48	238,9	72,05

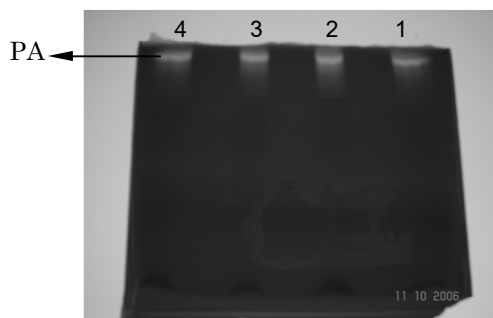
Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng chất khô của hạt thanh long là 91% do đó, nếu tính hàm lượng protein trên chất khô sẽ bằng 3,1%.

3.2. So sánh phổ điện di protein của 4 loại dịch chiết

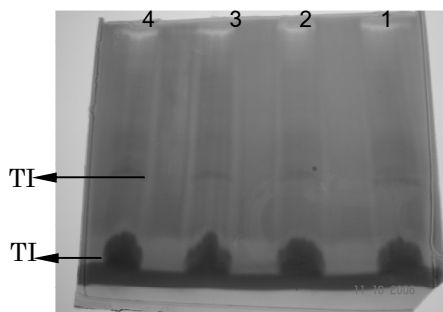


Hình 1. Phổ điện di protein hạt thanh long (TL) trong các dung dịch chiết khác nhau

1. Nước Mili Q
 2. Dung dịch đệm Sorensen 1/15M pH 6,5
 3. Dung dịch đệm Natri axetat 0,02M pH 4,5
 4. Dung dịch axit axetic 0,005M
- (ghi chú này dùng cho cả hình 2 và 3)



Hình 2. Phổ điện di PA của hạt TL trong 4 dung dịch chiết khác nhau



Hình 3. Phổ điện di TIA của hạt TL trong 4 dung dịch chiết khác nhau

Để so sánh tiếp khả năng chiết rút protein của các dung dịch trên, đã tiến hành điện di protein có trong 4 loại dung dịch trên. Kết quả trên hình 1 cho thấy phổ điện di protein của các dung dịch tương tự nhau.

3.3. So sánh phổ điện di PA, TI, KI của 4 loại dịch chiết

Sử dụng phương pháp điện di trên gel polyacrilamit 12,5% đồng trùng hợp với cơ chất casein 0,1% là phương pháp nhạy, cho phép phát hiện trực tiếp proteinaz, các chất ức chế proteinaz từ dịch chiết nguyên liệu mà không cần phải tinh sạch. Sau khi điện di, giữ gel trong điều kiện thích hợp, ở vị trí có proteinaz, casein trong gel sẽ bị phân giải, gel không bắt màu khi nhuộm với Coomassie Blue, tạo thành những băng sáng trên nền gel màu đậm. Kết quả trên hình 2 cho thấy tất cả 4 loại dịch chiết đều có một băng sáng, chứng tỏ hạt thanh long có proteinaz.

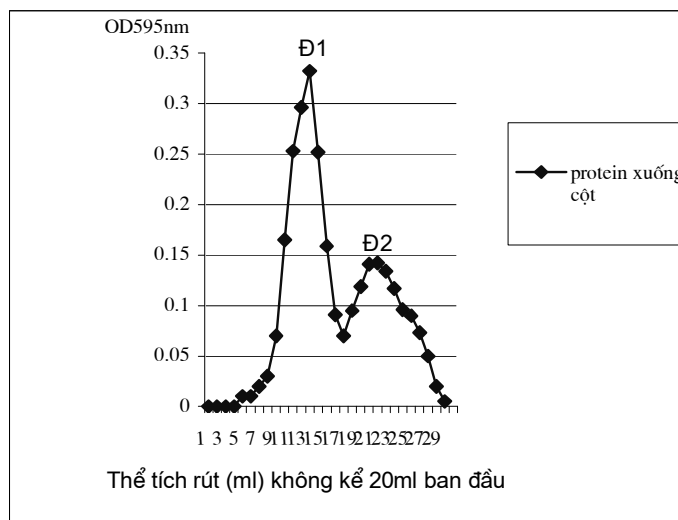
Điện di các TI có trong dịch chiết (hình 3) đã phát hiện được 2 băng TI (băng màu đậm hơn nền gel): băng chính có độ di động (R_m) $\approx 0,97$, băng nhỏ có $R_m \approx 0,53$. Điều này chứng tỏ phần lớn các TI của hạt thanh long có thể có tính axit và có khối lượng phân tử thấp. Kết quả điện di song song với các protein chuẩn (không trình bày ở đây) cho thấy băng TI/KI chính có khối lượng phân tử thấp hơn 14,4 kD.

Điện di KI cũng nhận được phổ điện di tương tự với phổ điện di TI.

Từ các kết quả trên, trong các thí nghiệm tiếp theo chúng tôi đã sử dụng nước Mili Q để chiết rút TI và KI của hạt thanh long, vừa đơn giản và rẻ tiền.

3.4. Sắc ký qua cột Sephadex G-25

Để sơ bộ tách từng phần các protein của dịch chiết, đã tiến hành sắc ký qua cột Sephadex G-25. Cân bằng cột và chiết rút protein bằng dung dịch axit axetic 0,005M, pH 4,5. Xác định protein trong các phân đoạn thu được bằng phương pháp Bradford, nhận được 2 đỉnh protein (hình 4), ký hiệu là Đ1 và Đ2 theo thứ tự được rút xuống cột.



Hình 4. Sắc ký mẫu TL qua cột Sephadex G-25

Kích thước của cột: 1,2x55cm ; vận tốc 17ml/h ; thể tích mỗi phân đoạn 1ml

—◆—protein: OD_{595nm} (xác định theo Bradford)

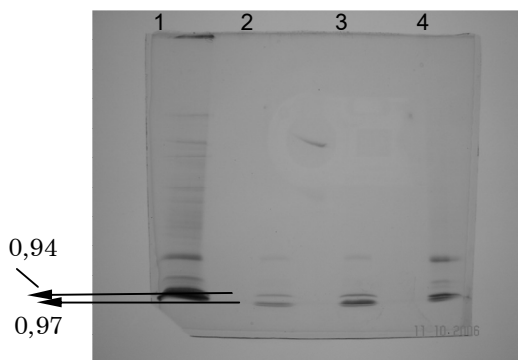
Đ1 là đỉnh chính (bảng 2), có thể tích rút là 38ml (tương đương V_e của ribonucleaz); V_e của Đ2 là 54ml (trước muối 11ml). Như vậy Đ2 có thể là các protein/polypeptit có khối lượng phân tử thấp hơn Đ1. Kết quả trên bảng 2 cho thấy TIA của Đ1 gấp hơn 3 lần TIA của Đ2. Tuy nhiên, tổng TIA của cả 2 đỉnh Đ1 và Đ2

cũng chỉ bằng 73,1% TIA của dịch lên cột, do đó hoạt độ riêng của cả 2 đỉnh Đ1 và Đ2 đều bị giảm so với dịch lên cột. Phải chăng TI của hạt thanh long không bền ? Hoạt độ ức chế kimotripxin lại không bị giảm và tập trung ở Đ1: KIA của Đ1 chiếm đến 98% KIA của dịch lên cột, gấp khoảng 10,8 lần KIA của Đ2; hoạt độ riêng của đỉnh này tăng lên gần 1,6 lần so với dịch lên cột. Như vậy, để tinh sạch KI từ hạt thanh long chỉ cần thu Đ1.

Điện di protein của đỉnh 1 và đỉnh 2 cho thấy băng protein có $R_m=0,97$ chiếm tỉ lệ lớn (hình 5). Điện di TI (hình 6) chứng tỏ băng protein với $R_m = 0,97$ có hoạt tính ức chế tripxin. Điện di KI (hình 7) đã phát hiện được Đ1 và Đ2 đều có băng KI với $R_m = 0,97$, ngoài băng này, Đ2 còn có thêm 1 băng KI nhỏ với $R_m = 0,53$, giống với DC lên cột (cột 1, hình 7).

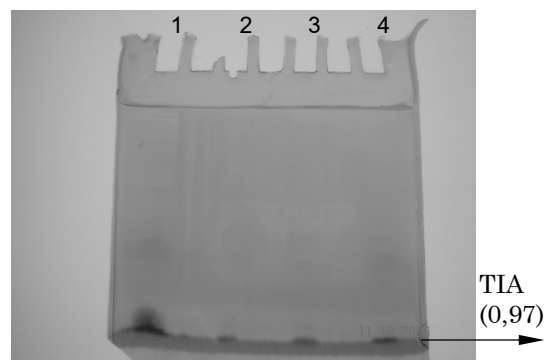
Bảng 2. Tóm tắt kết quả sắc ký dịch chiết hạt thanh long qua cột Sephadex G-25

Mẫu	Protein		TIA				KIA			
	mg	%	mIU	%	HĐR mIU/mg protein	Số lần tinh sạch	mIU	%	HĐR mIU/mg protein	Số lần tinh sạch
Dịch chiết hạt TL đã cô đặc	81,60	100	20 592	100	252,35	1	3 488	100	42,74	1
Sau qua cột Sephadex G25										
Đỉnh 1	51,00	62,5	11 494	55,8	225,37	0,893	3 425	98,2	67,15	1,57
Đỉnh 2	30,30	37,5	3 577	17,3	116,89	0,463	316	9,0	10,33	0,24



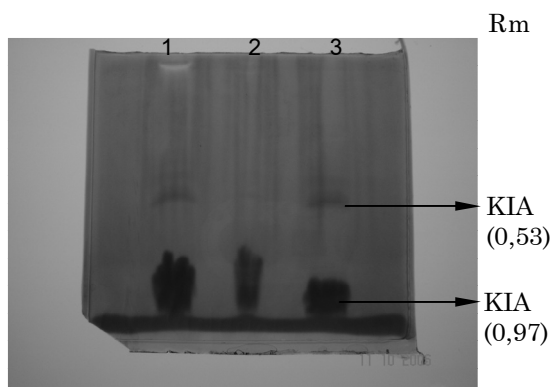
Hình 5. Phổ điện di protein của DCTL qua cột G25

1. DC lên cột ; 2. Đ1 ; 3. Đ2 ;
4. DC lên cột pha loãng

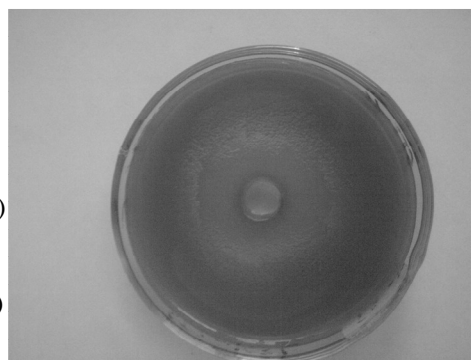


Hình 6. Phổ điện di TIA của DCTL qua cột G25

1. DC lên cột ; 2. Đ1 ; 3. Đ2 ;
4. DC lên cột pha loãng



Hình 7. Phổ điện di KIA của DCTL qua cột G25
1. LC ; 2. Đ1 ; 3. Đ2



Hình 8. Đ1 DCTL qua cột G25 ức chế sinh trưởng của *Pseudomonas aeruginosa*

Kết quả kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn (hình 8) cho thấy: ngoài hoạt tính ức chế tripxin, kimotripxin, Đ1 còn có tác dụng ức chế sinh trưởng của *Pseudomonas aeruginosa* phân lập từ mụn vết thương bỏng của bệnh nhân.

4. Kết luận

- Hàm lượng protein hòa tan của hạt thanh long vào khoảng 3% chất khô của hạt.
- Hạt thanh long có proteinaz và các chất ức chế tripxin(TI), kimotripxin (KI). Để chiết rút TI, KI từ hạt thanh long và tiếp tục tinh sạch, nên dùng dung dịch axit axetic 0,005M hoặc nước MiliQ.
- Phổ điện di TI, KI của dịch chiết từ hạt thanh long khá giống nhau về số băng, độ di động cũng như tỉ lệ giữa các băng: có 2 băng TI/KI, băng chính có độ di động nhanh hơn với $R_m = 0,97$; băng phụ có độ di động vào khoảng 0,53.
- Sắc ký qua cột Sephadex G-25 nhận được 2 đỉnh protein (xác định theo Bradford), đỉnh 1 (Đ1) là đỉnh chính, có TIA gấp hơn 3 lần và KIA gấp khoảng 10,6 lần ở đỉnh 2 (Đ2).
- Đ1 còn có hoạt tính ức chế sinh trưởng của *Pseudomonas aeruginosa* phân lập từ mụn vết thương bỏng của bệnh nhân.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bradford M.M., A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding, *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-253.
2. Đỗ H. Bích, Đặng Q. Chung, Bùi X. Chương, Nguyễn T. Dong, Đỗ T. Đàm, Phạm V. Hiên, Vũ N. Lô, Phạm D. Mai, Phạm K. Mãn, Đoàn T. Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, NXB Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội 2004, Tập II, 1256 trang, pp826-827.
3. Hoàng Thu Hà, Phạm Thị Trân Châu, Một số thành phần hóa sinh và hoạt tính sinh học của dịch ép từ thịt quả mướp đắng (*Momordica charantia* L.), *Tạp chí Sinh học*. V.28, N01 (2006), pp75-80.
4. Laemmli U.K., Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(1970), p. 341-349.
5. Morton, Julia F., Miami, FL. Morton, J. 1987. In: *Fruits of warm climates*. Strawberry Pear. p. 347 – 348.
6. Perez G. R.M., Vargas S.R., Ortiz H.Y.D., Wound healing properties of *Hylocereus undatus* on diabetes, *Phytotherapy Research*. V.19, N08(2005), p.665-668.
7. Pietrowa J.S., Wincjunajte M. M., *Opredelenie proteolyticheskoi aktivnosti fermentnykh preparatov microbiologicheskovo proiskhozhdenie*, Priklad. Biochem. Mikrobiol., 2(1966), p.232 – 236 (tiếng Nga).

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XXIII, N₀1, 2007

STUDY ON TRYPSIN INHIBITOR (TI) AND CHYMOTRYPSIN INHIBITOR (KI) FROM SEEDS OF BLUE DRAGON (*HYLOCEREUS UNDATUS* (Haw.) Britton & Rose)

Hoang Thu Ha, Pham Thi Tran Chau

Center for Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

Blue dragon (or strawberry pear) plants have been widely planted in Viet Nam and other countries of South East Asian region. Their fruit juice has been enjoyed as a cool drink. Moreover, the wound healing properties of fruit pulp have also been found recently. Hence, it is worthy to investigate biochemical components of this fruits. In this work, we focused on trypsin and chymotrypsin inhibitors of seeds separated from edible portion of fruits.

The obtained results indicated that soluble proteins content of the seeds was around 3% of dry substances of seeds. By using several methods documented that *H. undatus* seeds containing proteinase, trypsin inhibitors and chymotrypsin inhibitors, which could be extracted by either Milli Q water, or acetic acid 0,005M, Sorensen buffer pH 6.5, natri acetate buffer pH 4.5. The total and specific inhibitory activity in the first two extract solutions were higher than those of the later ones. However, the electrophoretic patterns of protein, PA, TI and KI from these 4 seed extracts were rather similar: one PA band and two inhibitor bands on polyacrylamide gel copolymerized with casein were detected. The mobility (R_m) of the major TI/KI band was around 0.97 and that of the minor TI/KI was around 0.53.

By fractionating seed aqueous extract on Sephadex G-25 column, two protein peaks were obtained, designated as D1 and D2. Both of them exhibited inhibitory activity against trypsin (TIA) and chymotrypsin (KIA). Moreover, inhibitory activity concentrated on peak 1: TIA and KIA of D1 were higher than those of D2 three- and tenfold, respectively. It is interested that D1 also inhibited growth of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pus of patient's infected burn wound.