

Nghiên cứu điều tra các chất ức chế proteinase ở các phần khác nhau của thân và hạt cây tô mộc (*Caesalpinia sappan* L.)

Hoàng Thu Hà, Phạm Thị Trân Châu*

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, ĐHQGHN, 144 Xuân Thủy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2008

Tóm tắt. Công trình này nghiên cứu tác dụng của dịch chiết từ các phần khác nhau của thân, hạt cây tô mộc (*C.sappan*) đến hoạt độ của một số proteinase. Các kết quả nghiên cứu cho thấy:

Dịch chiết từ phần vỏ cũng như phần gỗ thân cây *C. sappan* đều có hoạt tính ức chế trypsin (TIA) và hoạt tính ức chế chymotrypsin (ChIA). TIA, ChIA của phần gỗ và lõi gỗ theo thứ tự vào khoảng 6,11 IU và 22,44 IU/100 gam nguyên liệu; TIA, ChIA của phần vỏ thân theo thứ tự vào khoảng 52,45 IU và 74,94 IU/100 gam nguyên liệu. Dịch chiết từ hạt *C. sappan* có TIA, ChIA và chất ức chế protease của *P.aeruginosa* (PPsIA): TIA, ChIA của vỏ và nhân hạt không khác nhau nhiều, theo thứ tự, vào khoảng 3000 và hơn 10000 mIU/g. Tuy nhiên, PPsIA của vỏ hạt cao hơn nhân hạt khoảng 5 lần, đạt khoảng 1700mIU/g.

Phổ điện di TI, CHI của dịch chiết nhân hạt *C. sappan* tương tự nhau: có ít nhất 7 băng, tập trung ở 2 vùng, vùng thứ nhất có độ di động điện di (R_m) tương đương với các protein có Mr lớn hơn 43kD, vùng thứ 2 (có ít nhất 3 băng) tương đương với các protein có Mr từ 20-30 kD và 1 băng vào khoảng 14 kD. Các băng PPsI có R_m tương ứng với các protein có Mr lớn hơn 67 kD. Sắc ký qua cột Sephadex G-75 hoặc G-100 nhận được một đỉnh hoạt động (Đ2), đạt hiệu suất hơn 90%, hoạt độ riêng tăng từ 3 – 4 lần.

1. Mở đầu

Cây *Caesalpinia sappan* (Cs) có nhiều ở một số tỉnh miền núi nước ta, gỗ thân cây có tác dụng kháng khuẩn, kháng viêm, tiêu viêm, và sử dụng để điều trị một số bệnh như bệnh thấp khớp, viêm v.v... và cũng được dùng làm chất màu [1-3]. Cho đến nay đã có nhiều công trình nghiên cứu thành phần hóa học của gỗ cây *C. sappan*, nhưng chưa có công trình nào nghiên cứu các chất ức chế proteinase của cây này. Một số chất ức chế proteinase (PI) cũng có tác dụng kháng khuẩn, ngăn cản quá trình xâm

nhập của vi khuẩn, virus, ký sinh trùng vào cơ thể chủ, có tác dụng kháng viêm v.v.... Vì vậy, các PI cũng là đối tượng đã và đang được nghiên cứu để phát triển thuốc [4], một số đã được thương mại hóa [5]. Nghiên cứu của chúng tôi về PI đã bắt đầu từ hơn 20 năm nay [6,7], đã phát hiện và ứng dụng được một số PI quý như các PI của hạt gấc.

C.sappan thuộc họ *Caesalpinaceae*, hạt các cây họ này thường giàu PI nhưng cho đến nay chưa tìm thấy các công bố về PI của *C.sappan*. Công trình này nghiên cứu tác dụng của dịch chiết từ các phần khác nhau của thân, hạt *C.sappan* đến hoạt độ của trypsin, chymotrypsin, và proteinase tách từ *Pseudomonas aeruginosa*;

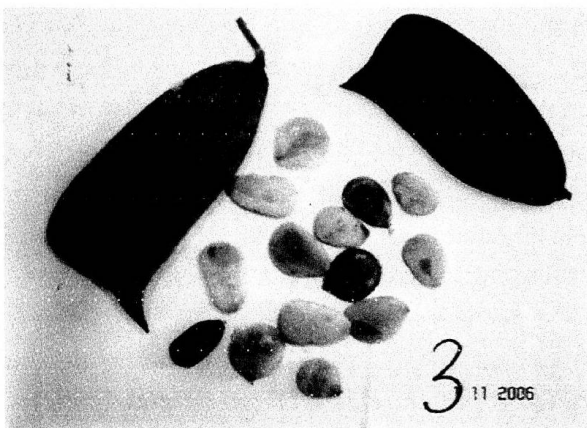
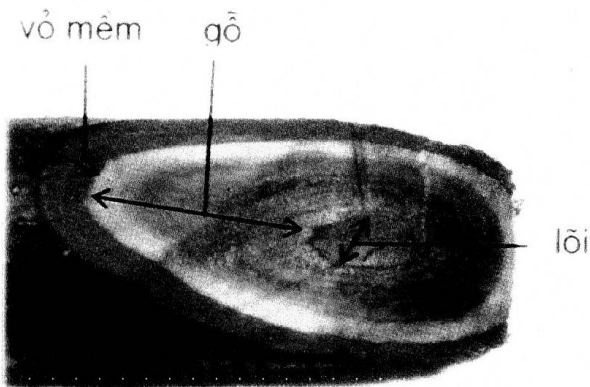
* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-4-37547638.
E-mail: chauptt@vnu.edu.vn

nghiên cứu sự phân bố, điều kiện tách và tinh sạch sơ bộ các chất ức chế proteinase từ hạt của chúng

2. Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu: - Quả và hạt *C. sappan* do Thạc sĩ Nguyễn thị Hòa, Trung tâm Trồng và chế biến cây thuốc, Viện Dược liệu Trung ương cung cấp

Hoá chất: Trypsin, Chymotrypsin, Albumin tinh khiết của hãng Sigma. Casein của hãng Kanto chemicals co., INC, Coomassie brilliant blue G-250 của hãng ICN Biomedicals, Inc (Đức). Cao thịt của hãng Merck (Đức), Peptone (Trung Quốc).



- Agar của hãng Merck (Đức). Màng lọc vô khuẩn Minisart 0,2 μm của hãng Sartorius. Các hoá chất khác đạt độ sạch phân tích.

- Phương pháp

+ Xác định protein theo phương pháp Bradford [8], dùng albumin huyết thanh bò làm chuẩn, đo độ hấp thụ ở bước sóng 595nm.

+ Xác định hoạt độ ức chế trypsin (TIA), chymotrypsin (ChIA) theo phương pháp Anson cải tiến [9]. Mỗi đơn vị ức chế (IU) là lượng chất ức chế làm giảm 50% hoạt độ của 2mg enzyme.

+ Điện di protein trên gel polyacrylamide (PAGE) theo phương pháp Laemmeli [10]

+ Điện di phát hiện các băng chất ức chế: gel có cơ chất casein, sau khi điện di kết thúc, xử lý với enzyme tương ứng, ở vị trí có chất ức chế proteinase sẽ tạo thành các băng có màu đậm trên nền gel sáng hơn.

+ Sắc ký qua cột Sephadex G-25 (cột có kích thước 1,1 x 55cm, cân bằng với dung dịch acetic acid 0,005M); Sẹoadex G-75 (cột có kích thước 1,3 x 79 cm, cân bằng với dung dịch đệm Sorensen 1/15M, pH 6,5) ; Sephadex G-100 (cột có kích thước 1,8 x 89cm, cân bằng với dung dịch đệm Sorensen 1/15M, pH 6,5), rút protein cũng bằng các dung dịch cân bằng cột tương ứng.

+ Nuôi vi khuẩn, tách proteinase của *P. aeruginosa* như đã mô tả trước đây [11]

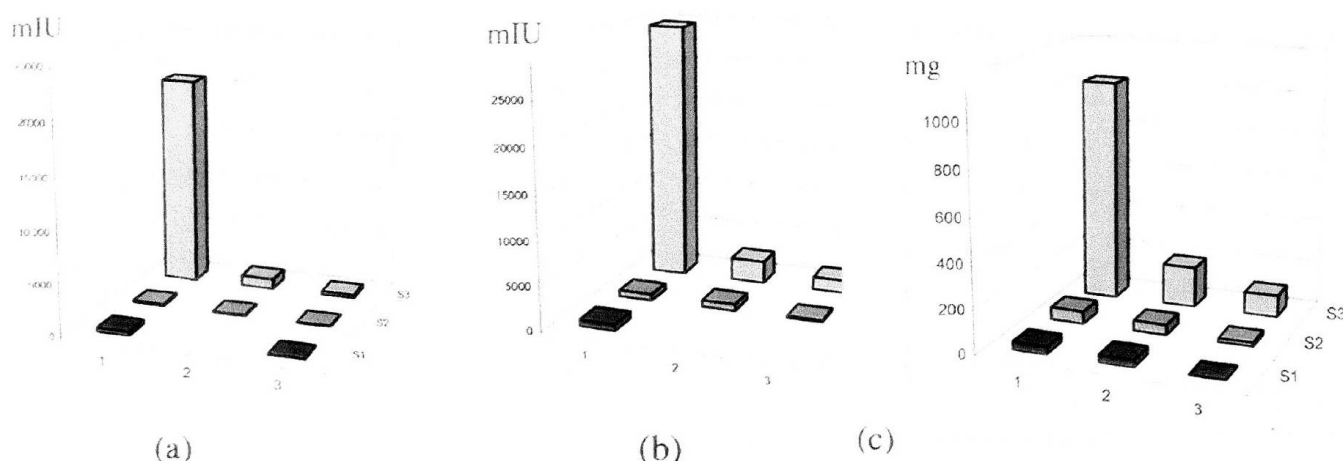
3. Kết quả và thảo luận

3.1 Hoạt độ ức chế trypsin (TIA) và hoạt độ ức chế chymotrypsin (ChIA) của thân cây *C. sappan*

Tách riêng thân cây thành ba phần: lớp vỏ (V), phần gỗ (G) và phần lõi giữa (L). Tỷ lệ trọng lượng của mỗi phần V, G, và L so với trọng lượng toàn thân theo thứ tự vào khoảng 39,5, 52,0 và 8,4%. Để lựa chọn dung dịch chiết rút TI và ChI, đã sử dụng các loại dung dịch sau: dung dịch đệm Sorensen M/15 pH 6,5, dung dịch ethanol 50% và dung dịch NaCl 0,9%.

Bảng 1. Hàm lượng protein, TIA, ChIA của thân *C. sappan* khi sử dụng các loại dung dịch khác nhau để chiết rút

Mẫu	Dung dịch dùng để chiết	Protein mg/gam	TIA		ChIA	
			tổng số (mIU/gam)	HĐR (mIU/mg protein)	tổng số (mIU/gam)	HĐR (mIU/mg protein)
Vỏ mềm (vỏ thân)	Đệm Sorensen.	1,46	7,11	4,85	19,00	12,95
	Ethanol 50%	26,06	524,50	20,13	749,40	28,75
	NaCl 0,9%	0,94	11,18	11,92	20,80	22,17
Gỗ	Đệm Sorensen.	0,81	1,97	2,44	14,85	18,35
	Ethanol 50%	3,67	19,45	5,30	50,05	13,63
	NaCl 0,9%	0,68	27,53	0,00	0,00	0,00
Lõi	Đệm Sorensen.	2,20	14,27	6,50	29,20	13,30
	Ethanol 50%	12,15	41,62	3,42	174,37	14,35
	NaCl 0,9%	0,45	12,71	28,24	0	0



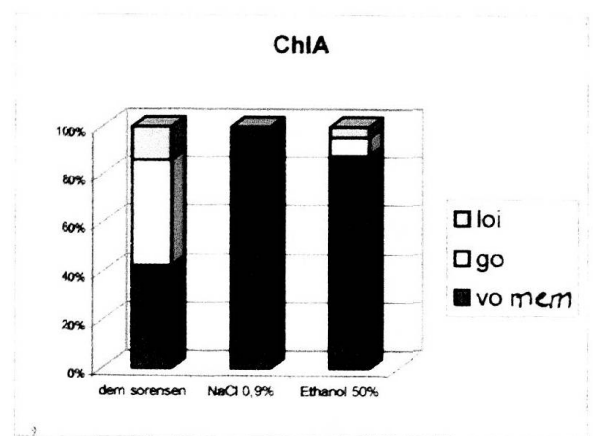
Hình 1. TIA (a), ChIA (b), Protein (c), tính theo tỷ lệ % trọng lượng mỗi phần so với toàn thân.
 1. Vỏ ; 2. gỗ ; 3. Lõi.
 S1: chiết bằng NaCl 0,9% ;
 S2: chiết bằng đệm Sorensen 1/15M ;
 S3: chiết bằng ethanol 50%.

Bảng 2. Protein, TIA, ChIA của mỗi phần tính trên 100g thân (theo tỉ lệ % trọng lượng của mỗi phần so với toàn thân (100g thân có 39,5 g vỏ mềm; 52,0 g gỗ và 8,5 g lõi)

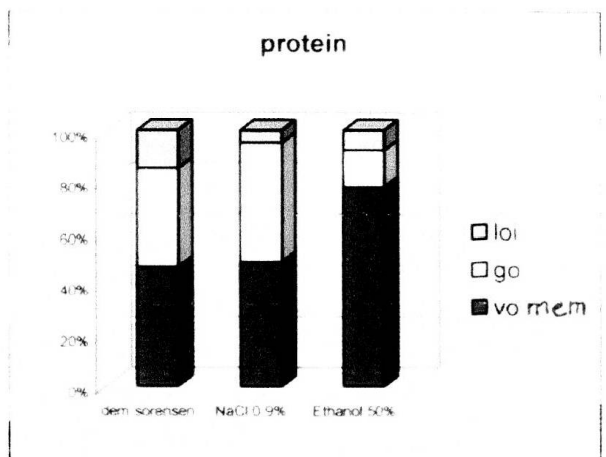
Chỉ tiêu phân tích	Dung dịch dùng để chiết rút	Vỏ mềm	Gỗ	Lõi	Tính tổng số các phần của 100 g thân	HĐR (mIU/mg protein)
Protein (mg)	Đệm Sorensen	57,97	47,36	18,50	123,83	
	Etanol 50%	1029,89	191,02	102,18	1232,09	
	NaCl 0,9%	37,15	35,39	3,78	76,32	
TIA (mIU)	Đệm Sorensen	208,98	102,53	102,01	413,52	3,34
	Etanol 50%	20728,24	1012,37	350,02	22090,63	17,93
	NaCl 0,9%	441,83	0	106,89	548,72	7,19
ChIA (mIU)	Đệm Sorensen	750,88	772,94	244,06	1767,88	14,28
	Etanol 50%	29616,28	2605,10	1466,45	33687,83	27,34
	NaCl 0,9%	822,02	0	0	822,02	10,77

Kết quả trên bảng 1 cho thấy TIA và ChIA trong dịch chiết ethanol 50% của V, G cũng như L luôn cao hơn ở các dịch chiết khác. Từ số liệu ở bảng 1 có thể tính được dịch chiết ethanol của 100g vỏ thân có TIA, ChIA theo thứ tự vào khoảng 52,45 IU và 74,94 IU; TIA, ChIA của phần gỗ thấp nhất, nếu tính tổng TIA, ChIA của cả gỗ và lõi, theo thứ tự vào khoảng 6,11 IU và 22,44 IU/100gam, thấp hơn các giá trị tương ứng của vỏ mềm khoảng 8,5 và hơn 3 lần. Kết quả này cũng cho thấy: ChIA luôn cao hơn TIA, giống như kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi đối với nhiều cây thuốc khác [12].

Dựa vào tỉ lệ trọng lượng của mỗi phần V, G, L so với trọng lượng toàn thân để tính protein, TIA, ChIA có trong 100 g thân, cũng cho thấy: protein, TIA và ChIA trong DC ethanol của phần vỏ thân (V) vẫn cao hơn các phần khác, mặc dù nó chỉ chiếm 39,5% trọng lượng của thân (bảng 2, hình 1). Do đó, TIA, ChIA của phần vỏ luôn chiếm tỉ lệ % khá cao của tổng TIA hoặc ChIA của thân, trong dịch chiết ethanol hoặc NaCl có thể chiếm đến hơn 80% (hình 2)

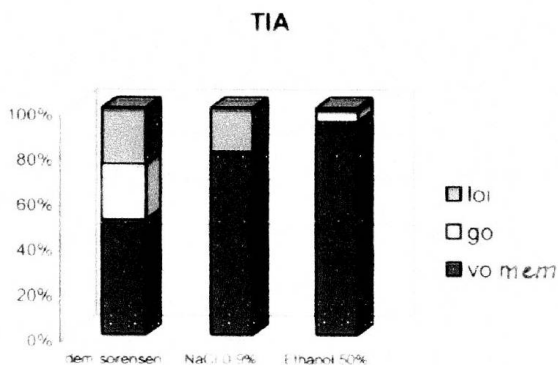


b)



c)

Hình 2. TIA (a), ChIA (b), Protein (c) tính theo % của tổng protein hoặc TIA hoặc ChIA của toàn thân khi chiết bằng các dung dịch khác nhau.



a)

Tóm lại, ta thấy phần vỏ thân (V) có hàm lượng protein, hoạt độ ức chế trypsin (TIA), ức chế chymotrypsin (ChIA) cao hơn hẳn các phần khác của thân. Điều này có thể vì phần V có chứa mạch libe nên giàu các chất hơn so với phần gỗ cây. Trypsin và chymotrypsin là các proteinase có trong hệ tiêu hoá của nhiều động vật, TIA và ChIA trong phần V của cây cao cũng có thể là để thực hiện chức năng bảo vệ cây.

3.2. Hoạt độ ức chế proteinase (PIA) của vỏ và nhân hạt chín.

Các kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi ở hạt các cây họ bí [6] cho thấy hạt càng già TIA càng cao, ngay cả ở giai đoạn mất nước (desiccation), vì vậy, chúng tôi cũng đã

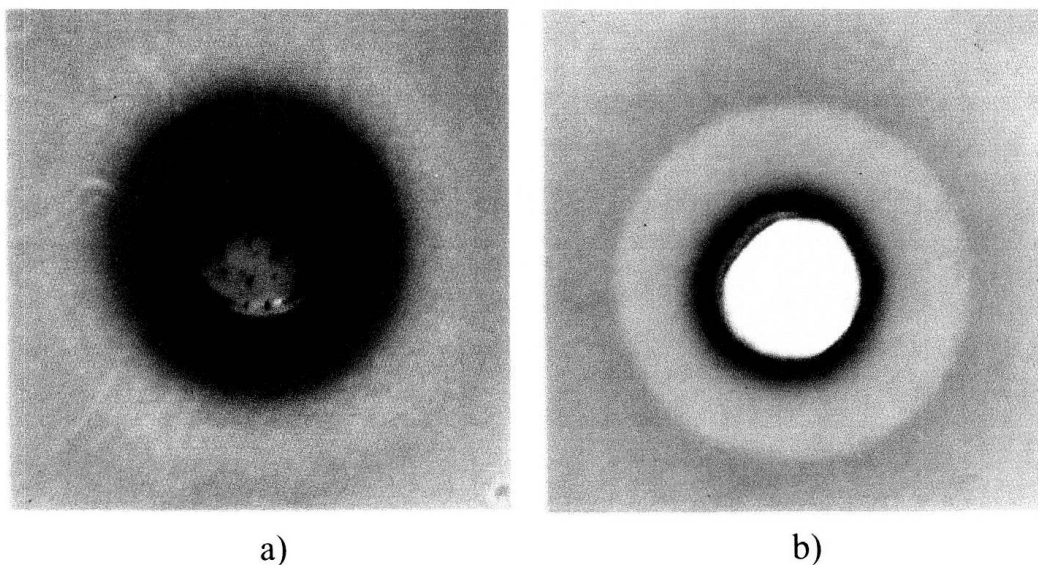
nghiên cứu và lựa chọn được hạt ở giai đoạn có PIA cao, gọi là hạt chín. Sự phân bố TIA ở các phần của hạt cũng không đồng đều, vì vậy chúng tôi đã tách riêng vỏ hạt, nhân hạt chín và xác định hoạt độ ức chế proteinase (PIA) ở mỗi phần.

Bảng 3. Hàm lượng protein, hoạt độ ức chế proteinase (PIA) của vỏ và nhân hạt *C.sappan* chín

Chỉ tiêu Phân tích	Vỏ hạt		Nhân hạt	
	Tính theo trọng lượng tươi	Tính theo trọng lượng khô	Tính theo trọng lượng tươi	Tính theo trọng lượng khô
Chất khô (%)	79,1		67,96	
Protein (mg/gam)	5,18	7,81	8,20	12,06
PPsIA (mIU/gam)	1709,00	2160,55	312,60	459,97
TIA (mIU/gam)	2861,10	3617,06	3020,00	4443,79
ChIA (mIU/gam)	11.453,60	14479,90	10498,05	15447,39

Kết quả ở bảng 3 cho thấy TIA và ChIA của vỏ và nhân hạt cao hơn TIA, ChIA của vỏ thân khoảng 5 đến 14 lần. So sánh giữa vỏ và nhân hạt, ta thấy TIA và ChIA khác nhau không nhiều, nhưng hoạt độ ức chế proteinase *Pseudomonas aeruginosa* (PPsIA) của DC vỏ hạt cao gấp hơn 5 lần PPsIA của DC nhân hạt. Thử hoạt tính kháng khuẩn (hình 3) cho thấy DC vỏ hạt có tác dụng ức chế sinh trưởng

Pseudomonas aeruginosa và *Staphylococcus aureus* 5 (phân lập từ mũ vết thương). Tuy nhiên khi điện di DC vỏ hạt đã không phát hiện được bằng protein hoặc bằng PI nào. Có thể PIA của DC vỏ chủ yếu là do những chất phân tử thấp, không phải protein? Vấn đề này đang được tiếp tục nghiên cứu. Các thí nghiệm tiếp trong công trình này chỉ sử dụng nhân hạt.



Hình 3. Hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết vỏ hạt (a): *S. aureus* ; (b) *P. aeruginosa*.

3.3. *Thăm dò điều kiện chiết rút các chất ức chế trypsin (TI), ức chế chymotrypsin (ChI) từ hạt C. sappan.* Để lựa chọn dung dịch thích hợp chiết rút các chất ức chế chúng tôi đã sử dụng 4 dung dịch thường dùng là: nước Mili Q, đệm Sorensen 1/15M pH 6,5, dung dịch acetic acid 0,005M, dung dịch đệm natri acetate 0,02M pH 4,5.

Kết quả xác định cho thấy TIA trong dịch chiết (DC) bằng đệm Sorensen pH 6,5 cao hơn các dịch chiết khác, gấp gần 2 lần TIA trong DC pH axit; ChIA ở các DC acid tuy có thấp hơn các DC khác nhưng không nhiều. Tính hoạt độ riêng của TIA, ChIA cũng cho kết quả tương tự.

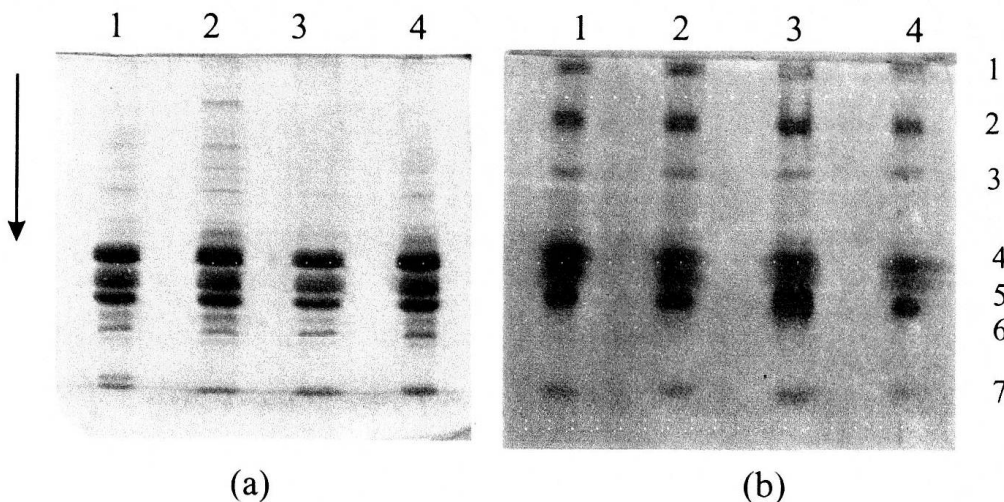
Phổ điện di protein, TI, ChI của 4 loại DC

Để so sánh kỹ hơn khả năng chiết rút các PI, chúng tôi đã sử dụng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid (PAGE). Kết quả điện di protein (hình 4a) cho thấy phổ điện di protein của các DC khá tương tự nhau về số băng protein có khối lượng phân tử thấp. Tuy nhiên, ở DC bằng đệm Sorensen (cột 2) cũng như DC bằng nước (cột 1), các băng protein phân tử lớn

(di động chậm) có nhiều hơn so với 2 dung dịch còn lại. Điều này là do ở pH thấp (4,5) một số protein phân tử lớn có thể đã bị kết tủa.

Sử dụng phương pháp PAGE đồng trùng hợp với cơ chất casein 0,1% là phương pháp nhạy, cho phép phát hiện trực tiếp một cách đầy đủ các TI/ChI từ một lượng rất ít dịch chiết thô (<20 microlit) mà không cần phải tinh sạch, thích hợp cho việc điều tra, so sánh “bộ” PI của mẫu. Kết quả cho thấy: phổ TI và ChI của 4 loại dịch chiết đều tương tự như nhau, có ít nhất 7 băng, được đánh số từ 1-7 theo độ di động điện di tăng dần (hình 4b). Các băng TI/ChI 4, 5, 6 có độ di động rất gần nhau, tập trung thành một vùng, tương ứng với vùng protein chủ yếu (hình 4a) của các DC. Các băng TI/ChI 1,2,3 khá rõ nét nhưng các băng protein tương ứng lại mờ nhạt (nhất là ở cột 3 và 4), chứng tỏ các protein có hoạt tính ức chế này chỉ chiếm tỉ lệ thấp trong tổng protein của DC.

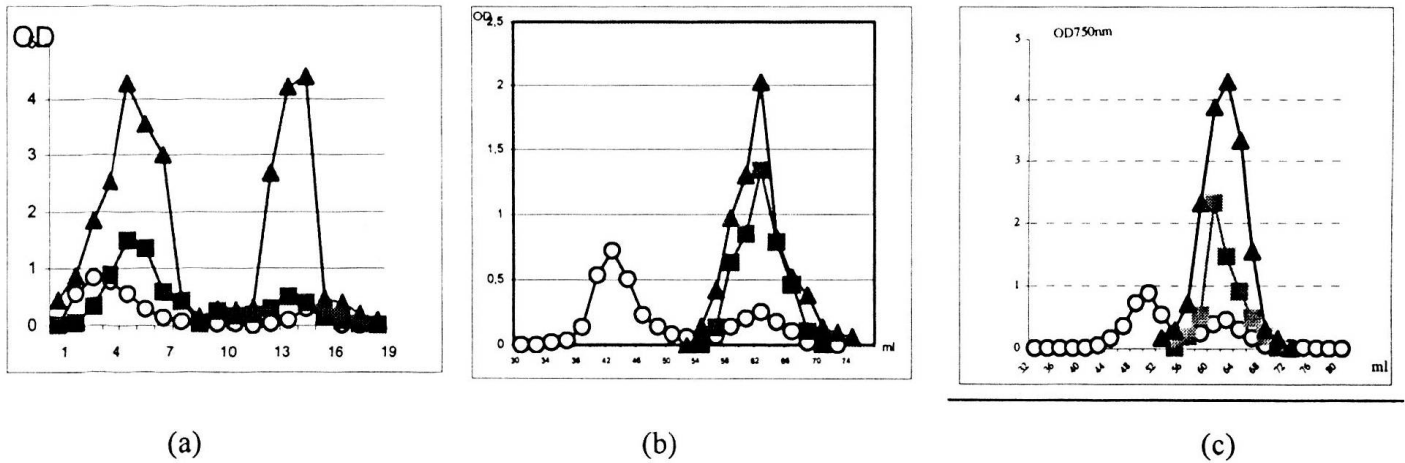
Các kết quả nhận được cho thấy để chiết rút được nhiều TI và ChI nên sử dụng dung dịch đệm Sorensen 1/15M pH 6,5.



Hình 4. Phổ điện di protein (a), ChIA/TIA (b) hạt Cp trong các dung dịch chiết khác nhau.

- 1. Nước Mili Q
- 2. Dung dịch đệm Sorensen 1/15M pH 6,5
- 3. Dung dịch acetic acid 0,005M
- 4. Dung dịch đệm natri acetate 0,02M pH 4,5.

3.4. Tách các PI của hạt *C. sappan* bằng phương pháp sắc ký qua cột Sephadex



Hình 5. Sắc ký qua cột Sephadex - G25 (a), Sephadex -G75 (b) ; Sephadex-G100 (c)
 —○— : protein (OD 595nm/ml) ; —■— TIA (OD750nm/ml) ; —▲—: ChIA (OD750nm/ml)
 (Ghi chú: trục hoành: thể tích rút (ml), hình (a) : thể tích rút chưa kể 20ml ban đầu).

Kết quả trên hình 5 cho thấy khi sắc ký DC nhân hạt qua các cột Sephadex đều nhận được 2 đỉnh protein, nhưng với cột Sephadex G-25 cả 2 đỉnh đều có TIA, ChIA, nhưng hiệu suất thu hồi thấp (bảng 4). Sắc ký đồ qua cột Sephadex G-75 và G-100 khá giống nhau: TIA, ChIA tập trung vào đỉnh protein thứ 2 (Đ2), hiệu suất

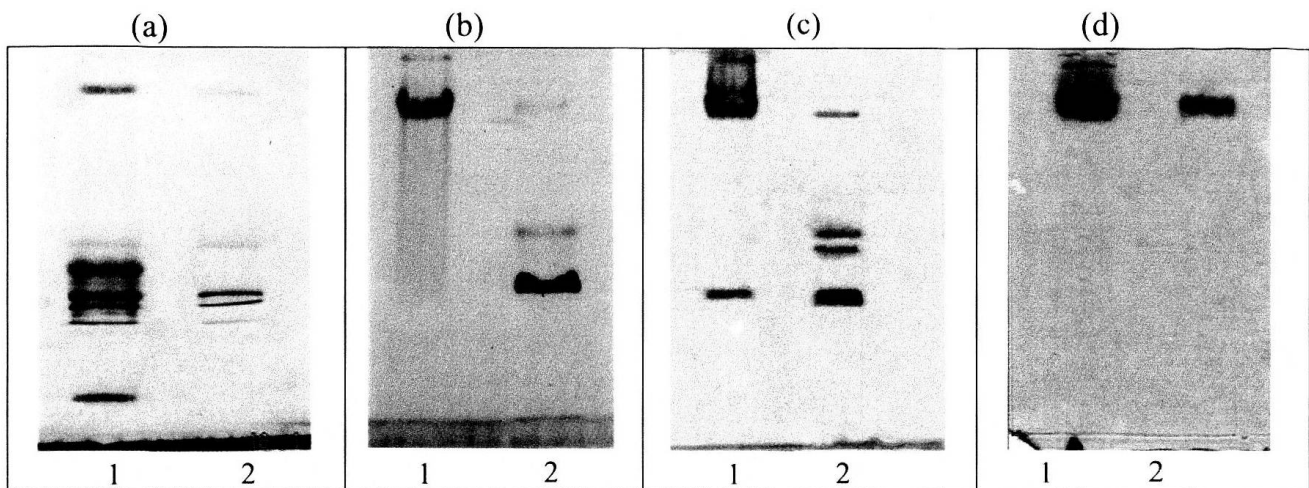
TIA và ChIA đều cao, độ sạch tăng lên hơn 3 lần (bảng 4). Từ bảng tóm tắt kết quả sắc ký qua các cột Sephadex khác nhau (bảng 4) cho thấy để tinh sạch sơ bộ các TI,ChI từ hạt *C. sappan* có thể sử dụng cột Sephadex G-75 hoặc G-100. Đỉnh 2 thu được từ các cột này đang được nghiên cứu tiếp.

Bảng 4. Tóm tắt kết quả sắc ký qua các cột Sephadex khác nhau

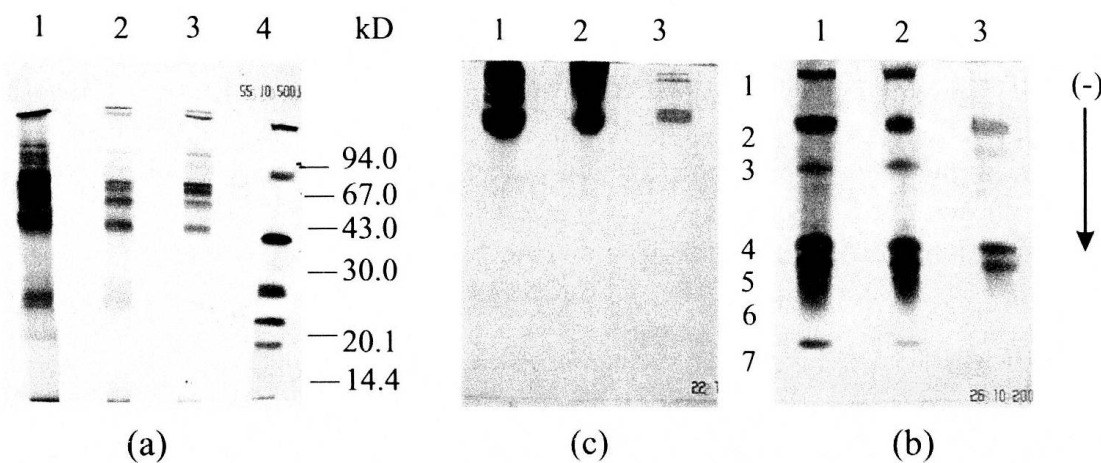
Mẫu: sau khi sắc ký qua cột Sephadex		TIA		ChIA	
		Hiệusuat (%)	Độ sạch (lần) so với DC	Hiệusuat (%)	Độ sạch (lần) so với DC
G-25 :	Đỉnh 1	71,66	0,99	55,20	0,62
	Đỉnh 2	48,30	5,78	31,00	4,67
G-75	Đỉnh 2	104,00	4,79	76,97	3,54
G-100	Đỉnh 2	93,50	3,49	82,5	3,08

Phổ điện di protein, TI/ChI của đỉnh Đ2 của cột Sephadex G-75 và G-100 cũng tương tự nhau (hình 6). Đỉnh protein thứ nhất (Đ1) tuy không xác định được PIA bằng phương pháp Anson cải tiến nhưng đã phát hiện được bằng PPSI khi sử dụng phương pháp PAGE có cơ

chất (hình 6d). Kết quả này giống với kết quả nhận được khi điện di đỉnh 1 và đỉnh 2 của cột Sephadex G-25 (hình 7). Các băng PPSI có độ di động chậm, tương ứng với các protein có khối lượng phân tử lớn hơn 67 kD.



Hình 6. Phổ điện di các đỉnh protein nhận được sau khi sắc ký DC hạt *C. sappan* qua cột Sephadex G-75/G100 (1. Đỉnh 1 ; 2. Đỉnh 2).
(a): protein ; (b): TIA ; (c): ChIA ; (d): ức chế PA của *P. aeruginosa*



Hình 7. Phổ điện di của mẫu hạt *C.sappan* trước và sau khi qua cột Sephadex G-25.
(a): protein ; (b): TI/ChI ; (c): chất ức chế PA của *P. aeruginosa*
1: DC lên cột ; 2: Đỉnh 1 ; 3: Đỉnh 2 ; 4: protein chuẩn (14,4 – 94kD)

4. Kết luận

1) Dịch chiết từ phần vỏ cũng như phần gỗ thân cây *C. sappan* đều có hoạt tính ức chế trypsin (TIA) và hoạt tính ức chế chymotrypsin (ChIA). Sử dụng dung dịch ethanol 50% để chiết rút các chất ức chế đạt được hoạt độ cao nhất: TIA, ChIA của phần gỗ và lõi gỗ theo thứ tự vào khoảng 6,11 IU và 22,44 IU/100 gam nguyên liệu ; TIA, ChIA của phần vỏ theo thứ tự vào khoảng 52,45 IU và 74,94 IU/100 gam nguyên liệu. Dịch chiết vỏ hạt có tác dụng ức chế sinh trưởng *S. aureus* và *P. aeruginosa*.

2) Dịch chiết từ hạt *C. sappan* có TIA, ChIA và chất ức chế protease của *P.aeruginosa* (PPsIA). PPsIA của vỏ hạt đạt khoảng 1700mIU/g, cao hơn nhân hạt khoảng 5 lần; tuy nhiên TIA, ChIA của chúng lại không khác nhau nhiều, theo thứ tự, vào khoảng 3000 và hơn 10000 mIU/ g.

3) Phổ điện di TI, ChI của dịch chiết hạt *C. sappan* tương tự nhau: có ít nhất 7 băng, tập trung ở 2 vùng, vùng thứ nhất có độ di động điện di (R_m) tương đương với các protein có Mr lớn hơn 43kD, vùng thứ 2 (có ít nhất 3 băng) tương đương với các protein có Mr từ 20-

30 kD và 1 băng vào khoảng 14 kD. Các băng PPI có Rm tương ứng với các protein có Mr lớn hơn 67 kD.

4) Sắc ký qua cột Sephadex G-75 hoặc G-100 nhận được một đỉnh hoạt động (Đ2) đạt hiệu suất hơn 90%, hoạt độ riêng tăng từ 3 – 4 lần. Vì vậy có thể sử dụng các loại Sephadex này để bước đầu tinh sạch các TI/CHI từ hạt *C. Sappan*.

*
* *
* *

**Công trình được sự hỗ trợ về kinh phí của
chương trình NCCB- Khoa học Sự sống,
Đề tài 621306.**

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Huy Bích, Đ.Q. Chung, B.X. Chương, N.T. Dong, Đ.T. Đàm, P.V. Hiền, V.N. Lộ, P. D. Mai, P.K. Mãn, Đ. T. Nhu, N. Tập, T. Toàn, *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập II*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2004.

[2] M.T. Nguyen, S. Awale, Y. Tezyka, Ql. Tran, Kadota, Xanthine oxidase inhibitors from the heartwood of Vietnamese *Caesalpinia sappan*. *Chem. Pharm. Bull* (Tokyo), 53, 8 (2005) 984.

[3] Shrishailappa Badami, Sudheer Moorkth and Suresh *Caesalpinia sappan* – A medicinal and dye yielding plant. *Natural Product Radiance* 3 (2004) 75.

[4] Dung Le Nguyen, A. Heitz, L. Chiche, J-F Hernandez, T. H. Phan, Tran-Chau Pham: Microproteins from *Cucurbitaceae* with potential therapeutic applications: Molecular

design of EETI and MCoTI, *Proceeding of the 4th International Seminar of Asian Network of Research on antidiabetic plants* (ANRAP), January 16-18, Kolkata, India, Mukherjee & Dubnath, eds; Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd, New Delhi. (2005) 81.

[5] Protein drug delivery: Penetrating a growth marker, *Datamonitor* 7/3/2005

[6] Phạm thị Trân Châu, Trypsin inhibitors of white bush (*Cucurbita pepo* var. *patissonina*) fruits and seeds (in English, 110 pages), *Acta Universtatis Wratislaviensis N^o912*. Wydaw. Univ. Wroclawskiego, Wroclaw 1987.

[7] Phạm thị Trân Châu, Concise report on study of proteinase inhibitors in Viet nam, *Proceeding of The 2nd International Conference on the development of Biomedical engineering in Viet nam, July 25th - 27th*, Hanoi, (2007) 196.

[8] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.

[9] J.S. Pietrowa, M.M. Wincjunajte, *Opređenje proteolytičeskoj aktivnosti fermentnykh preparatov microbiologičeskovo proiskhozhdenie. Priklad. Biochem. Mikrobiol.*, 2 (1966) 232.

[10] U.K. Laemmli, Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 341.

[11] 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*, 28, 1 (2006) 75.

[12] Phạm Thị Trân Châu, Hoàng Thu Hà, Nguyễn thị Hòa, Phạm Hồng Minh, Proteinase và hoạt độ ức chế proteinase của một số cây thuốc chữa bệnh mụn nhọt - mẩn ngứa - lở loét - bệnh da, *Tạp chí Dược liệu*, 13 (2008) 30.

Investigation of proteinase inhibitors from *Caesalpinia sappan* L. wood and seeds

Hoang Thu Ha, Pham Thi Tran Chau

Institute of Microbiology and Biotechnology, VNU, 144 Xuan Thuy, Hanoi, Vietnam

Caesalpinia sappan wood is widely used in oriental medicine. In Vietnamese traditional medicine it has been used for treatment of rheumatism, inflammatory, infection and other disease. There have

been many papers about chemical compositions of *C. sappan* wood but none of them related to proteinase inhibitors (PIs). As is known, PIs play an important role in regulation of different living processes and they are good candidates for development of new drugs. *C.sappan* belongs to *Caesalpiaceae* plant family, and the seeds of this plant family is known as a PIs-rich source. However, so far, no publication related to PIs from *C. sappan* seeds has been found. The aim of this work is to determine the effect of wood and seeds extracts on the activity of trypsin, chymotrypsin, proteinases isolated from *P. aeruginosa* and to study the conditions to partly purify the proteinase inhibitors coming from *C. sappan* seeds. The results obtained have indicated that:

C. sappan bark and heartwood extracts exhibit inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin. The trypsin inhibitory activity (TIA) and chymotrypsin inhibitory activity (ChIA) in 50% aqueous extract from bark are found to be 52.45 IU and 74.94 IU/100g, respectively, while those from heartwood are only 6.11 IU and 22.44 IU/100g, respectively..

C. sappan dormant seeds extract possesses TIA, ChIA as well as inhibitors against *P. aeruginosa* proteolytic enzymes (PPsIA). The PPsIA of seed coats is around 170IU/100g, that is 5 times higher than that of coat-free seeds. The use of 1/15M, pH 6,5 Sorensen buffer allows us to extract, at a high level, both TI and ChI. The TIA and ChIA of coat-free seeds (c-f-s) reach a level around 302 IU and 1049 IU/100g.

The electrophoretic patterns of TI and ChI from c-f-s extract are very similar: 7 inhibitor bands were detected on the gel. These bands are located in two zones: the first one (at least 3 bands) corresponds to proteins of Mr higher than 43 kD and the other one (with 3 bands) to proteins with Mr from 20 – 30 kD; another band is equivalent to 14 kD. The PPsI bands zone is corresponding to protein bands of Mr higher than 67kD.

Fractionation of c-f-s extract on Sephadex G-75 or G-100 column, one active peak (D2) has been obtained. The inhibitory activity yield of D2 is more than 90% of extract and their specific activities increase from 3 to 4 times. Thus, it has been suggested that the column chromatography on Sephadex G-75 or G-100 gel can be used at the first step for purification of TI/ChI from *C. sappan* seeds.