

SÁNH CÁC CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN (TI) CỦA HẠT GẮC CHÍN SINH LÝ TRƯỚC (Go) VÀ SAU KHI XỬ LÝ NHIỆT (Gx)

Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Thị Trân Châu
Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG Hà Nội

Gấc (*Momordica cochinchinensis*) là một loại cây trồng phổ biến và quen thuộc trong dân gian. Theo dân gian, hạt gấc sau khi đồ xôi có thể sử dụng để chữa nhiều bệnh khác nhau [1]. Ngoài ra các nghiên cứu sơ bộ trước đây [12, 13] còn cho thấy hạt gấc là một nguồn nguyên liệu rất giàu PPI (Protein ức chế proteinaza). Các PPI của họ bí (*curbitaceae*) tuy mới được phát hiện và nghiên cứu từ năm 1980 [4, 7, 8, 9, 10, 11] nhưng đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới và Việt Nam quan tâm. Để góp thêm dẫn liệu về vấn đề này chúng tôi tiến hành nghiên cứu các TI của hạt gấc chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt (Gx) nhằm so sánh hai nguồn hạt gấc khác nhau để tìm nguồn nguyên liệu thích hợp với giá thành hạ để chiết rút các TI. Kết quả nghiên cứu này sẽ còn có ý nghĩa cả về mặt khoa học trong lĩnh vực nghiên cứu protein nói chung cũng như PPI của họ bí.

I - NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP :

Nguyên liệu

Hạt gấc chín sinh lý (Go) là hạt gấc được lấy từ quả gấc đã chín

Hạt gấc xử lý nhiệt (Gx) là hạt gấc chín sinh lý được lấy từ quả gấc đã chín sau khi đồ xôi thu lấy hạt.

Hoá chất

Tripxin tuy bỏ do phòng thí nghiệm enzym, Viện Sinh hoá, Đại học Tổng hợp Wrocław sản xuất : Cazein, aminoden 10B của hãng Merch A.G (Darmstadt, F.R.G), tinh của hãng Koch-Light (Colnbrook, Bucks, Anh), các chất điện di của hãng Fluka (Thụy Sĩ). Các hoá chất còn lại đạt độ sạch phân tích.

Phương pháp : Các phương pháp xác định protein, TIA, điện di được tiến hành đã mô tả chi tiết trong công trình trước đây [2].

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

So sánh một số chỉ tiêu hoá sinh của dịch chiết hạt gấc chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt (Gx)

Để có những số liệu cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo chúng tôi đã tiến hành phân định sơ bộ hàm lượng protein tan trong nước, hoạt độ ức chế tripxin (TIA) của hai hạt Go và Gx. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

* Công trình thuộc đề tài 6.4.5, CT nghiên cứu KH cơ bản, giai đoạn 1996-2000

Các chữ viết tắt :

Dịch chiết hạt gấc ;	Go : Hạt gấc chín sinh lý ;	Gx : Hạt gấc chín sinh lý đã đồ xôi
Hoạt độ riêng ;	PA : Hoạt độ phân giải protein ;	PPI : protein kìm hãm proteinaza
Gel poli-acramit ;	TI : Chất kìm hãm tripxin ;	TIA : hoạt độ kìm hãm tripxin

Bảng 1 : Hàm lượng protein, TIA của mẫu hạt Go và Gx

Mẫu	Protein (mg)		TIA (IU)		HDR (IU/mg)
	mg/hạt	mg/g	IU/hạt	IU/g	
Go	144,5	91,74	27,472	17,442	0,19
Gx a	27,3	14,68	5,103	2,743	0,187

Từ bảng 1 cho thấy ở hạt sau khi xử lý nhiệt hàm lượng protein tan trong tính trên hạt giảm khoảng 5 lần so với hạt trước khi xử lý. TIA cũng giảm tương do vậy hoạt độ riêng của mẫu hạt Go và hạt Gx không khác nhau.

1.1. Điện di trên gel poliacrilamit (PAG) protein của dịch chiết hạt.

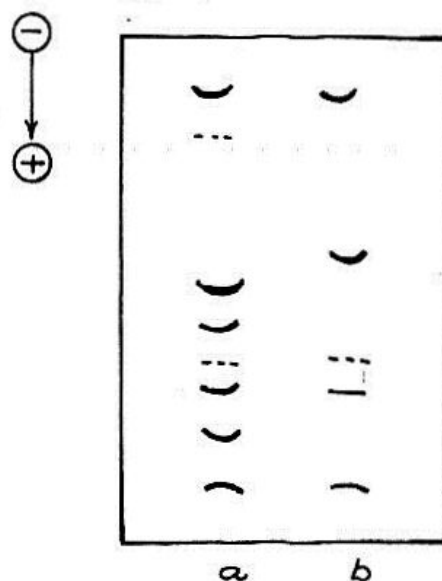
Chúng tôi cũng tiến hành điện di protein có SDS theo phương pháp của Laemmli mẫu DC hạt Go và hạt Gx (hình 1). Kết quả điện di phù hợp với kết quả trên, sau xử lý nhiệt số băng protein phát hiện được ít hơn hạt trước khi xử lý là 3 băng giảm này có thể là do một số protein bị biến tính trong quá trình xử lý nhiệt.

Hình 1 : Phổ điện di protein trên PAG theo phương pháp của Laemmli.

a. Mẫu DC hạt Go

b. Mẫu DC hạt Gx

Kết quả trên bảng 1 mới cho chúng ta biết TIA tổng số mà chưa biết cụ thể số TI có trong hạt nên chúng tôi đã sử dụng phương pháp điện di rất nhạy để phát hiện các băng TI trên gel [5]. Khi tiến hành điện di theo chiều từ dương sang âm với lượng mẫu chỉ cần phần vụn của hạt là đã phát hiện được các băng TI. Kết quả đã phát hiện được 4 băng TI (hình 2a) với độ di động điện di tương ứng là 0,8cm ; 2,3cm ; 5,0cm và 7,0cm. Trong đó băng TI - 5,0 là băng chủ yếu. Khi điện di



theo chiều ngược lại với lượng dịch như trên đã không phát hiện được băng TI và

Tăng lượng mẫu lên hàng trăm lần mới phát hiện được 4 băng TI với độ di động điện di (Rf) tương ứng là 0,26 ; 0,53 ; 0,72 ; 1,0 trong đó băng TI 0,26 và TI - 1 những băng TI chủ yếu (hình 2b). Như vậy trong dịch chiết hạt gốc có chứa ít 8 băng TI, trong điều kiện pH8,3 có 4 băng TI chính di chuyển về catot và 4 băng phụ di chuyển về anot. Như vậy dịch chiết hạt gốc có nhiều TI nhất trong số các Cucurbitaceae đã nghiên cứu trước đây [2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Mặt khác cá chủ yếu của gốc đều có tính kiềm đó là một đặc điểm ít gặp ở các hạt bí khác.

xuống cột. Các đỉnh TIA tương ứng của 2 loại hạt được ký hiệu bằng cách thêm hoặc "x" vào cạnh các số la mã (MCoTI-Io và MCoTI-Ix, MCoTI-IIo và MCoTI-IIx, MCoTI-IIIo và MCoTI-IIIx) được thổi ra ở các nồng độ muối như nhau, theo thứ tự tương ứng là 0,14M, 0,20M và 0,30M.

Các đỉnh MCoTI-II và MCoTI-III đều là các đỉnh chính chiếm phần lớn hoạt tính xuống cột. Sự sai khác chủ yếu của hai mẫu hạt Go và Gx là sự phân bố TIA giữa các đỉnh này. Ở DC hạt trước khi đồ xôi đỉnh MCoTI-IIIo là đỉnh chủ yếu còn DC hạt sau (sau khi đồ xôi) thì đỉnh MCoTI-IIx lại là đỉnh chủ yếu. Nguyên nhân sự sai khác này cần phải tìm hiểu sâu hơn.

Bảng 2 : Hàm lượng peptit và protein của mẫu hạt Go đã nghiền mịn xử lý ở 70°C trong 24 giờ.

1g hạt Go đã nghiền mịn, thêm 5ml nước cất khuấy đều, xử lý ở 70°C sau đó lấy mẫu phân tích.

Mẫu a : ở thời điểm bắt đầu (0 giờ)

Mẫu b : sau 24 giờ

Mẫu c : đun cách thủy 15 phút trong nước sôi, sau đó xử lý ở 70°C trong 24 giờ

Mẫu	Hàm lượng peptit		Hàm lượng protein	
	μ mol/g	%	mg/g	%
Mẫu a	8,8	100	49	100
Mẫu b	14,0	159	54	110,2
Mẫu c	7,5	85	30	61,2

Bảng 3 : Sự phân bố TIA ở các đỉnh của 2 mẫu Go và Gx sau khi sắc ký qua SP - Sephadex C.25

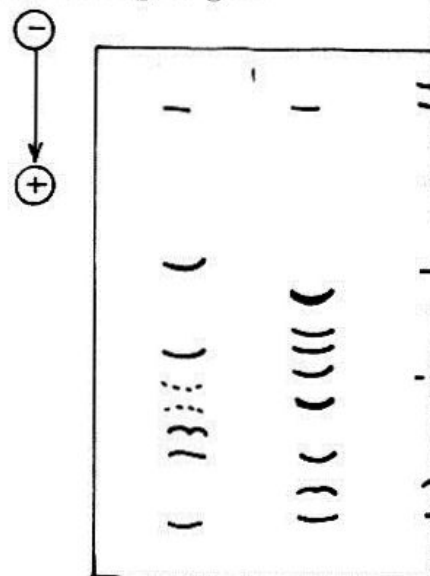
Mẫu	% Tổng số TIA xuống cột		
	MCoTI-I	MCoTI-II	MCoTI-III
Go	5,46	22,7	71,8
Gx	6,4	56,9	36,6

Hình 3 : Điện di đồ protein theo phương pháp Laemmli của mẫu hạt Go nghiền mịn xử lý ở 70°C trong 24 giờ.

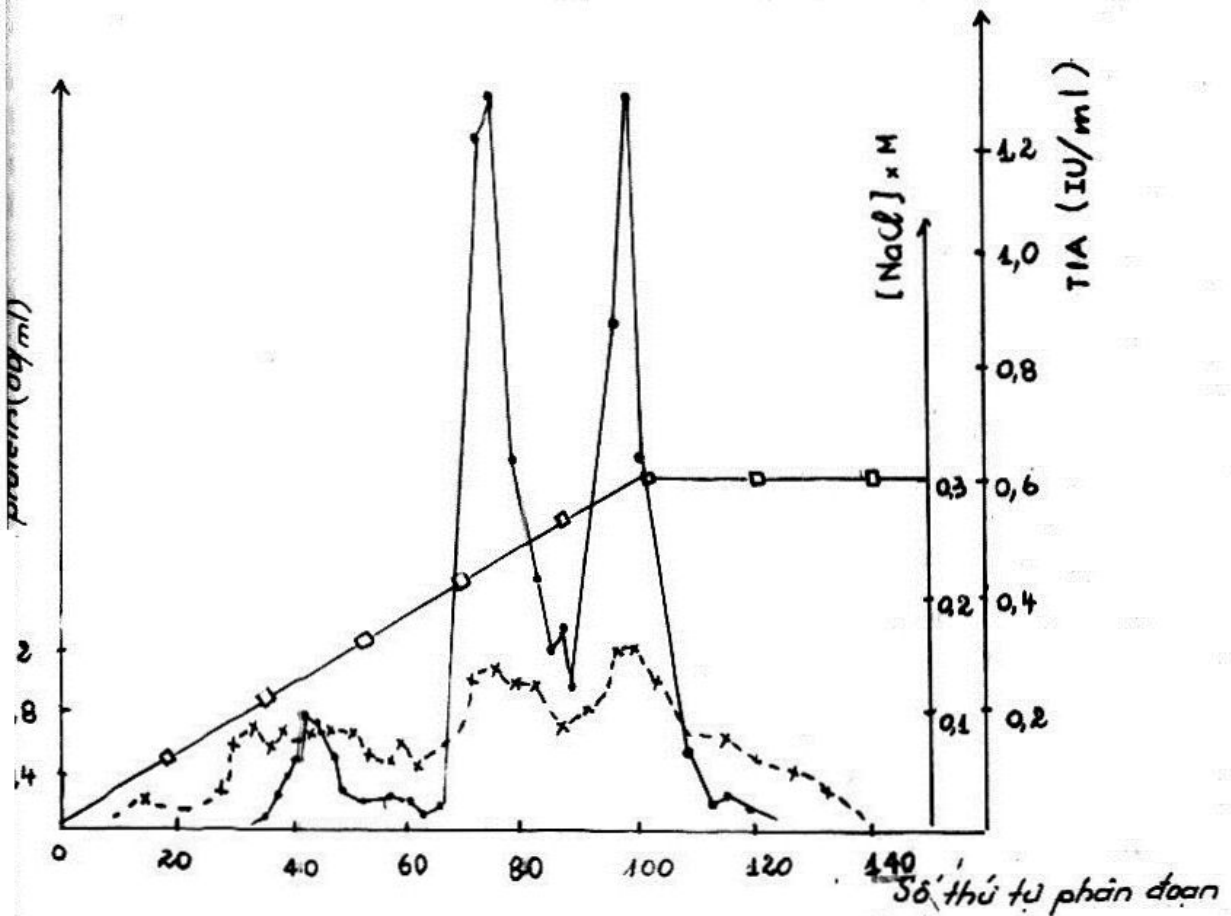
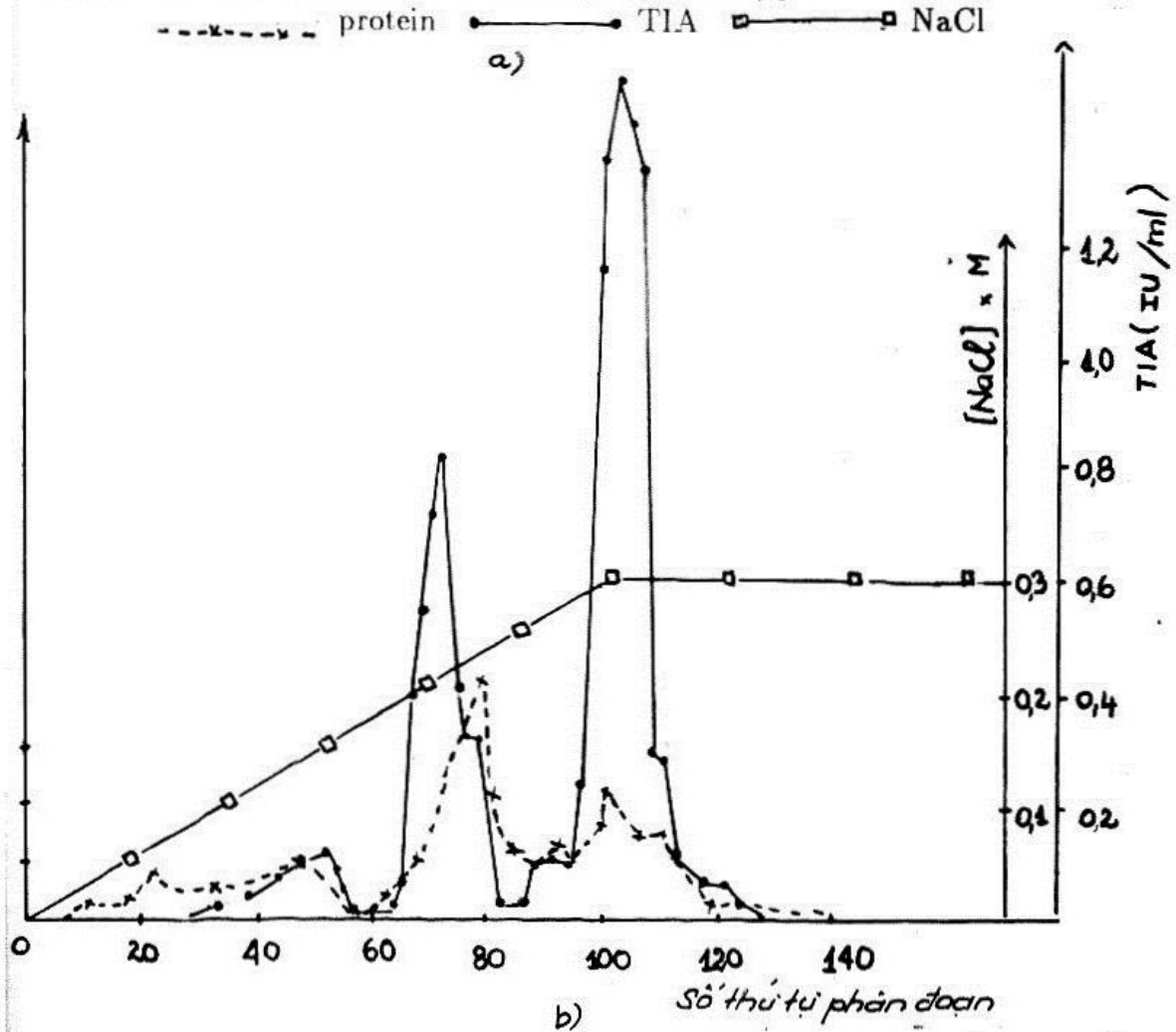
Mẫu a : ở thời điểm bắt đầu (0 giờ)

Mẫu b : sau 24 giờ

Mẫu c : đun cách thủy 15 phút trong nước sôi, sau đó xử lý ở 70°C trong 24 giờ



h 4: Sắc ký qua cột sản phẩm - Sephadex C.25 dịch chiết hạt Go (a) và Gx a (b)
 kích thước cột: 12cm x 1,9cm; đệm xitrat Na 0.02M; pH 5,0; gradient nồng độ NaCl
 - 0.3M; Thu mỗi phân đoạn 3ml; tốc độ chạy 25ml/giờ.



Kết quả trên bảng 3 cho thấy ở hạt trước khi xử lý nhiệt (Go) đỉnh MCoTI chiếm 71,8% tổng số TIA xuống cột, trong khi đó ở hạt sau khi xử lý (Gx) thì MCoTI-IIIx chỉ chiếm 36,6%. Để tìm hiểu xem mỗi đỉnh TIA có bao nhiêu TI, chúng tôi đã dùng phương pháp điện di phát hiện trực tiếp các băng TI trên gel. Kết quả thấy trừ MCoTI-Ix các mẫu khác đều có chứa 2 băng TI. Vì vậy, đã tiến hành tái ký.

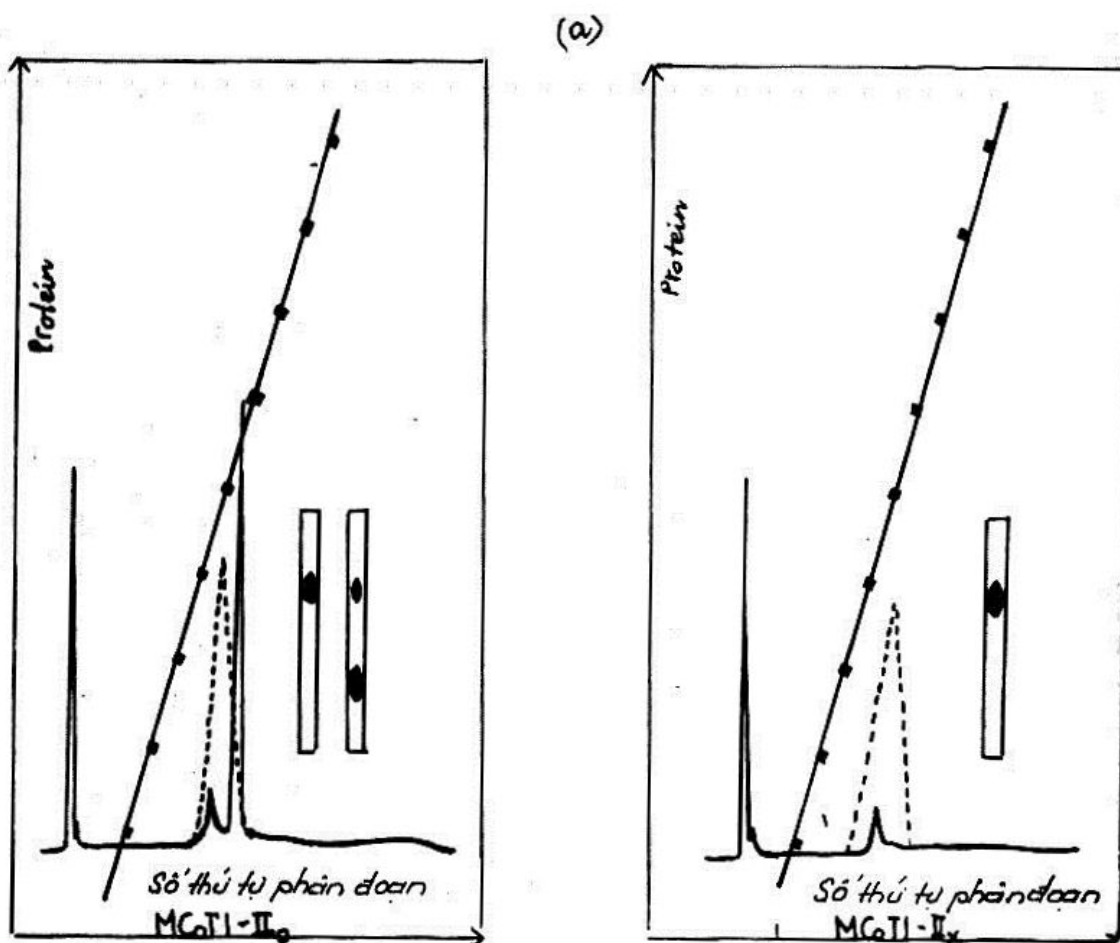
2.2. Tái sắc ký qua cột Mono S với hệ thống FPLC

Kết quả trên hình 5a cho thấy: MCoTI-IIo và MCoTI-IIx tuy có khác nhau về protein nhưng cả 2 mẫu đều có một đỉnh TIA (phân đoạn 8) được rút xuống ở nồng độ muối 0,125M. Tuy nhiên ở MCoTI-IIo phân đoạn 9 cũng có TIA và ứng với đỉnh protein khá cao (hình 5a). Điện di trên PAG có cơ chất phân đoạn 8 của 2 mẫu chỉ phát hiện được một băng TI có độ di động giống nhau (hình 5a).

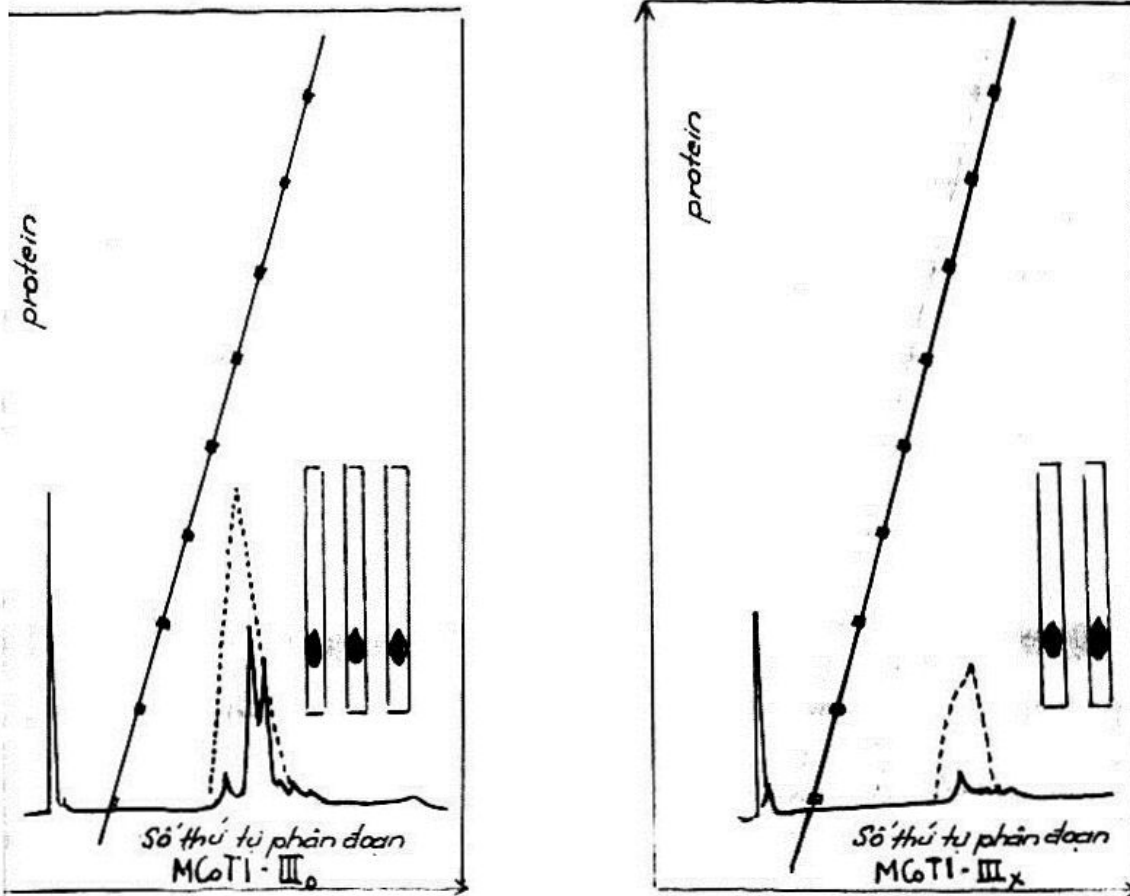
Khi tái sắc ký MCoTI-IIIo và MCoTI-IIIx qua cột Mono S cũng cho thấy phổ protein của MCoTI-IIIo phức tạp hơn MCoTI-IIIx nhưng chỉ có một đỉnh TIA (hình 5b). Ở MCoTI-IIIo vùng này có 3 - 4 đỉnh protein trong khi ở mẫu MCoTI-IIIx chỉ có 1 đỉnh. Tuy nhiên khi điện di trên PAG chỉ phát hiện được một băng TI-5,0 (hình 5b). Có trong điều kiện điện di này chưa cho phép tách riêng các TI gần giống nhau?

Hình 5: Sắc ký đồ và điện di đồ qua cột MCoTI-II(a) và MCoTI-III(b)

--- TIA — Protein ● NaCl



b)



KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu protein và các chất ức chế tripsin của dịch chiết từ hạt chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt (Gx) cho thấy :

Hàm lượng protein và TIA của mẫu Go lớn gấp 5 lần mẫu Gx.

Có sự sai khác rõ rệt về phổ điện di protein giữa Go và Gx : đã phát hiện được ở hạt Go 8 băng protein, trong khi ở hạt Gx chỉ có 5 băng.

Tuy nhiên phổ điện di TI của Go và Gx khá giống nhau về số băng TI, cả 2 mẫu đều có 8 băng : 4 băng chính di chuyển về catot và 4 băng phụ di chuyển về anot.

Sắc ký đồ của 2 mẫu qua cột SP - Sephadex C.25 giống nhau ở chỗ đều có 3 đỉnh TIA (MCoTI-I, -II, -III). Hơn nữa các đỉnh tương ứng được rút xuống ở các nồng độ muối giống nhau : 0,14M ; 0,20M và 0,30M. Tuy nhiên, giữa 2 mẫu khác nhau về tỉ lệ giữa MCoTI-II và -III : ở Go TI chủ yếu là MCoTI-II_o còn ở Gx là MCoTI-II_x.

Tiếp tục tinh sạch các TI này qua cột Mono S với hệ thống FPLC cho thấy MCoTI-II_x và MCoTI-III_x đã được tinh sạch.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, 1985, tr. 876 - 879
2. Nguyễn Tuyết Mai, Phí Nguyệt Thanh, Phạm Trân Châu. Sự biến đổi các chất

- ức chế trypsin và một số chỉ tiêu sinh hoá khác ở hạt mướp (*Luffa cylindrica* Roem) đang phát triển. *Tạp chí Sinh học*, t. 14(3), 1992, tr. 28 - 32.
3. Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Trần Châu Sự biến đổi hoạt độ kim hãm trypsin ở quả và hạt mướp đắng (*Momordica charantia* L.) trong quá trình phát triển của chúng. *Tạp chí sinh học*, tập 9, số 3, 1987 tr. 12 - 17.
 4. Leluk J., Otlewski J., Wieczorek M., Polanowski A., Wilusz T. Preparative characteristics of trypsin inhibitors from the seeds of squash (*Cucurbita maxima*) and zucchini (*Cucurbita pepo* var. *Girromontia*). *Acta Biochim. Polonica* (1983), pp.127 - 138.
 5. Leluk J., Pham T.C., J. Kieleczawa Zastosowanie immobilizowanego inhibitora trypsyny z nasion cukinii do oczyszczania trypsynopodobnych proteaz z przynależności. *XXI Zjazd PT Bioch. Krakow Streszczenie*, , 1985, pp. 139.
 6. Leluk J., Pham T.C., Wilusz T., Polanowski A. Trypsin inhibitors (TIs) from germinating seeds of *Cucurbita pepo* var. *Clypeata* (CPC) and var. *Girromontia* (CPG). 16th FEBS. Meet, Abstract XIV. 018, 1984, pp.317.
 7. Pham Tran Chau. Trypsin inhibitors of white bush (*Cucurbita pepo* var. *sonina*) fruits and seeds (Doctor Habilitatus Thesis 1995). *Acta Universitatis Wratislaviensis* No 912(1987).
 8. Pham Tran Chau, Knopska L. and Leluk J. Trypsin inhibitors in the cotyledons of grains of *Cucurbita pepo* var. *Patissonina* (white bush) cotyledons. *Biochem. Physiol. Pflanz* 181 (1986), pp. 565 - 569.
 9. Pham Tran Chau, Leluk J., Polanowski A., Wilusz T. Trypsin inhibitor from *Cucurbita pepo* var. *Clypeata* (CPC). 16th FEBS. Meet. Abstracts 1984, pp. 0-17.
 10. Pham T.C., Leluk J., Wilusz T., Polanowski A. Purification and characterization of the trypsin inhibitor from *Cucurbita pepo* var. *Patissonina* fruit. *Biol. Hoppe. Seyler*. 366 (1985), pp. 939 - 944.
 11. Pham T. C., Leluk J., Wilusz T., Polanowski A. Isolation of two trypsin inhibitors from resting seeds of the white bush (*Cucurbita pepo* var. *Patissonina*) and their properties. *Acta Biochim. Polonica* 32 (1985), pp. 319 - 328.
 12. Pham T.C., Vu T. Hien, P.T.Ha, N.T.Mai, N.H.M.Quyen Preliminary study of trypsin inhibitors (TIs) from squash seeds of Vietnam *Program and abstracts FAOB. Symposium on protein research*, 1993
 13. Pham Tran Chau Biosynthesis of trypsin inhibitors (TIs) during development of Cucurbitaceae seeds. *Proceedings of the Australia Society for Biochemistry and Molecular Biology 7th FAOBMB Congress Sydney*. Australia POS - 2.143
 14. Wilimowska - Pelc A, Planowski A, Kolaskowska, M.K. Wieczorek M and Wilusz T. Aspartyl proteinases from Cucumber (*Cucumis sativus*) seeds. Preparation and characteristics. *Acta Biochim. Polonica* 30 (1985), pp. 23 - 31.

**COMPARISON OF TRYPSIN INHIBITORS (TIS) FROM DORMANT SEEDS
OF MOMORDICA COCHINCHINENSIS BEFORE (GO)
AND AFTER (GX) HEAT TREATMENT.**

Nguyen Tuyet Mai and Pham Thi Tran Chau
College of Natural Sciences - VNU

idly proteins and trypsin inhibitors in the extracts from Go and Gx seeds showed that:

1. Protein content and TIA of Go seeds were as high as five times of those of Gx seeds.

2. There was a distinct difference in the protein electrophoretic patterns between Go and Gx: 8 protein bands were discovered in the former while only 5 bands in the latter were observed.

3. However, the TI - bands electrophoretic patterns of Go and Gx were similar: 4 bands migrating to the cathode and 4 other minus TI - bands to the anode.

4. Using SP - Sephadex C.25 column chromatography method for fractionation of TIs from Go and Gx, a similar chromatogram were obtained. From each sample 3 TIA peaks were isolated (MCoTI-I, -II, - III) and the respective peaks were eluted at the same NaCl concentrations. However the difference between Go and Gx was found in the ratio between MCoTI-II and MCoTI-III. The major TI of Go was MCoTI-III while that of Gx was MCoTI-II. Further purification of these TIs on Mono S column in FPLC system showed that MCoTI-II and -III from Gx were homogeneous.