

MỘT SỐ THÀNH PHẦN HÓA SINH VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA DỊCH ÉP TỪ THỊT QUẢ MƯỚP ĐẮNG (*MOMORDICA CHARANTIA* L.)

HOÀNG THU HÀ, PHẠM THỊ TRÂN CHÂU

Đại học quốc gia Hà Nội

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

a. Vật liệu sinh học

Quả mướp đắng mới thu hoạch. Các chủng vi khuẩn tụ cầu vàng *Streptococcus aureus* do phòng thí nghiệm Vi sinh của bệnh viện Bạch Mai cung cấp, được phân lập từ mụn vết thương của bệnh nhân, có ký hiệu St1M, St 2M, St3M và St5.

b. Hóa chất

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

2. Phương pháp

- Xác định hàm lượng chất khô tuyệt đối của thịt quả mướp đắng bằng cân scaltex SMO 01.

- Xác định protein theo phương pháp Bradford [1], dùng albumin làm chuẩn, đo độ hấp thụ ở bước sóng 595 nm.

- Xác định hoạt độ phân giải protein (PA) theo 2 phương pháp:

+ Phương pháp khuếch tán để điều tra sơ bộ hoặc với các mẫu có hoạt độ thấp. Dùng đĩa thạch có cơ chất là casein 0,1%; sau khi cho dung dịch enzym vào các giếng đã đục sẵn trên đĩa thạch, giữ ở 35,5°C trong khoảng thời gian

Ở nước ta, cũng như ở nhiều nước châu Á khác, thường sử dụng quả mướp đắng (*Momordica charantia* L.), làm thức ăn, làm thuốc điều trị nhiều bệnh khác nhau như: sốt, ho, tiểu đường, gan, lá lách, rắn cắn, viêm ecpet mảng tròn, rôm sảy, viêm mụn da....

Gần đây, Ganguly và Das đã công bố việc uống dịch ép (DE) từ quả mướp đắng với lượng thích hợp có tác dụng chống ung thư và tăng tuổi thọ [2]. Một số tác giả khác cũng nêu rằng DE từ quả mướp đắng có thể kìm hãm các enzym chủ yếu tham gia trong quá trình gây bệnh HIV. Công trình trước đây của chúng tôi [6] cũng đã phát hiện được thịt quả mướp đắng có chứa các chất ức chế tripxin, là một proteinaza xerin.

Các proteinaza tham gia trong nhiều quá trình sống quan trọng, quá trình gây bệnh, lây nhiễm của vi khuẩn và virút. Do đó, người ta đã và đang nghiên cứu sử dụng các chất ức chế proteinaza nói chung cũng như các protein ức chế proteinaza (PPI) để làm thuốc điều trị các bệnh, trong đó proteinaza là yếu tố gây bệnh hoặc tham gia trong quá trình gây bệnh.

Staphylococcus aureus (tụ cầu vàng) phân bố rất rộng rãi trong tự nhiên, ký sinh trên da và niêm mạc mũi, là một trong số các vi khuẩn chủ yếu gây hàng loạt các bệnh nhiễm trùng vết thương, vết mổ dễ dẫn đến nhiễm khuẩn máu.... Vi khuẩn này lại kháng với nhiều loại kháng sinh, vì vậy việc tìm kiếm các chất mới ức chế vi khuẩn tụ cầu vàng đang được quan tâm nghiên cứu.

Công trình này thăm dò hoạt tính kháng khuẩn của DE từ thịt quả mướp đắng.

thích hợp tùy hoạt độ của enzym. Nhuộm bằng dung dịch amido đen 10B 0,1% trong axit axêtic 7%; đánh giá hoạt độ theo đường kính của vòng phân giải.

+ Phương pháp Anson cải tiến [7].

- Xác định hoạt độ kìm hãm tripxin (TIA), kimotripxin (KIA) cũng thực hiện theo hai phương pháp trên nhưng dung dịch enzym được ủ với dung dịch nghiên cứu trong 10 phút ở nhiệt độ phòng trước khi xác định hoạt độ. Hoạt độ kìm hãm được đánh giá theo sự sai khác hoạt độ của enzym khi không có (đối chứng) và có dung dịch nghiên cứu (chứa chất kìm hãm). Mỗi đơn vị kìm hãm (IU) là lượng chất kìm hãm làm giảm 50% hoạt độ của 2 mg enzym.

- Sắc ký qua cột sephadex G-50: cột có kích thước 2 x 90 cm cân bằng với đệm Sorensen pH = 6,5; rút protein cũng bằng dung dịch đệm này.

- Điện di protein theo phương pháp Laemmli [3].

- Nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường thạch thường dạng lỏng và dạng rắn (pepton: 10 g, cao nấm men 10 g, NaCl: 1g; pH = 7): cấy vi khuẩn vào môi trường ống thạch nghiêng; ủ ở 37°C cho đến khi vi khuẩn mọc; bảo quản ở 4°C. Để xác định PA hoặc tách proteinaza, cấy vi khuẩn vào môi trường dịch thể; lắc 200 vòng/phút ở 37°C; ly

tâm để loại tế bào, thu dịch trong (DT).

- Thử tác dụng kháng khuẩn: để 30 ml môi trường thạch thường đạt nhiệt độ gần 40°C, thêm vào 200 µl dịch nuôi tăng sinh vi khuẩn, lắc nhẹ, đổ ra đĩa thạch. Đợi đến khi thạch đông hoàn toàn, dùng khoan khoan giếng có đường kính 8 mm; nhỏ 150 µl dung dịch nghiên cứu vào mỗi giếng. Để trong tủ lạnh trong 7 giờ, sau đó chuyển vào tủ ấm ở 37°C; đo vòng vô khuẩn sau 24 giờ.

- Chuẩn bị chế phẩm thô: DE hoặc dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn (đã loại tế bào) được làm lạnh ở 4°C, thêm axêton lạnh với tỷ lệ 1 thể tích mẫu: 2,5 thể tích axêton; ly tâm lạnh 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu kết tủa. Sau khi cho bay hết axêton, kết tủa hoà tan trong đệm Sorensen 1/15 M, pH = 6,5; ly tâm để thu DT để phân tích.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thành phần của thịt quả mướp đắng (bảng 1)

Từ 50 kg quả mướp đắng, sau khi bỏ ruột và hạt, thu được 42,65 kg thịt quả. Hàm lượng chất khô của thịt quả trung bình khoảng 7%. Hàm lượng nước của thịt quả còn phụ thuộc nhiều vào thời tiết.

Bảng 1

Một số thành phần của thịt quả mướp đắng

Chỉ tiêu phân tích	Tính trên 50 kg quả	Tính trên 1kg thịt quả	Tính trên 1l DE từ thịt quả
Trọng lượng của thịt quả từ 50 kg quả	42,65 kg		
Thể tích của dịch ép thu được	17,25 l	0,40 l	
Protein (xác định theo Bradford)	5,33 g	125 mg	309 mg
TIA	6,16 IU	144 mIU	357 mIU
Hoạt độ riêng (mIU/mg protein)	1,15	1,15	1,15

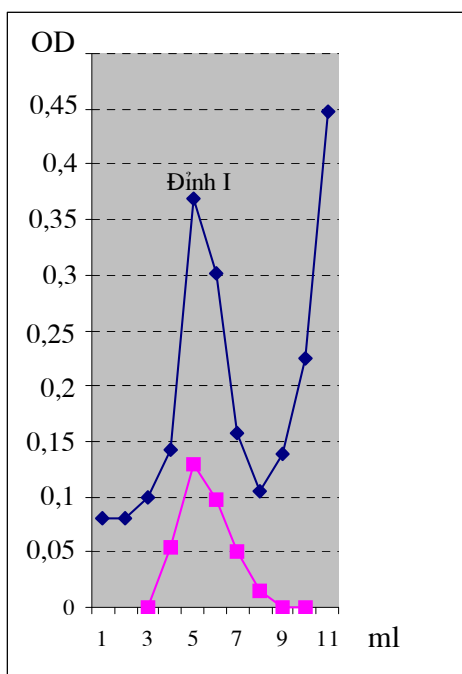
Qua bảng 1, ta thấy cũng giống như các loại quả khác, hàm lượng protein của thịt quả mướp đắng rất thấp, tính theo trọng lượng tươi chỉ bằng 0,0125%; nếu tính trên chất khô tuyệt đối là 0,18%. So sánh với kết quả phân tích trước đây của chúng tôi [6], hàm lượng chất khô cũng tương đương nhưng hàm lượng protein thấp hơn. Điều này một phần có thể do đã sử dụng phương pháp khác nhau; trong công trình này, sử dụng phương pháp Bradford. Đây là phương pháp có

tính đặc hiệu cao hơn phương pháp Lowry đã sử dụng trước đây.

So với thịt quả *Cucurbita pepo* var. *patisonina* (CPP) [5], TIA của thịt quả mướp đắng thấp hơn nhiều lần; hoạt độ riêng cũng thấp hơn 10 lần.

2. Proteinaza của dịch ép (DE) từ thịt quả mướp đắng

Trong công trình nghiên cứu trước đây [6], chúng tôi đã xác định PA của thịt quả mướp đắng ở 3 pH: 4,5, 6,5 và 8,1. Kết quả cho thấy ở pH = 4,5, hầu như không có PA; ở pH = 8,1, PA giảm mạnh. Vì vậy, để thăm dò ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của proteinaza (PA), chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch ở các pH khác nhau, từ 5,5 trở lên: 5,5; 6,5; 7,0; 7,6 và 9,1 với cơ chất là casein, ủ ở 35°C trong 7 giờ. Kết quả cho thấy hoạt độ ở các pH từ 5,5 đến 7,6 không khác nhau; ở pH = 6,5, hoạt độ có hơi cao hơn (vòng phân giải đạt 14 mm); ở pH = 9,1, PA giảm rõ rệt; điều đó chứng tỏ proteinaza trung tính chiếm ưu thế trong DE.

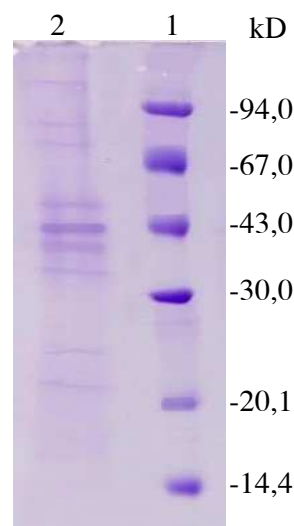


Hình 1. Sắc ký mẫu DE qua cột sephadex G-50.

Kích thước của cột: 2 × 90 cm; vận tốc: 30 ml/h; đệm Sorensen 1/15 M pH = 6,5; thể tích của mỗi phân đoạn 0,5 ml; —■— protein: OD_{595 nm} (xác định theo Bradford); —◆— protein: OD_{280 nm} (từ ml thứ 9 bắt đầu có mẫu).

Sắc ký lọc gel qua cột sephadex G-50 chỉ thu được một đỉnh protein (hình 1); đỉnh này có PA. Điện di trên gel poliacrilamit (SDS-PAGE) phát hiện được 9 băng protein, trong đó 4 băng chính có khối lượng phân tử từ 35-50 kD (hình 2); các phân đoạn có protein đều có PA (xác định bằng phương pháp khuếch tán). Do hàm

lượng protein trong quả mướp đắng rất thấp nên rất hiếm gặp các công bố về phổ điện di protein của quả. Tuy nhiên, do quả mướp đắng có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng nên nghiên cứu này là dẫn liệu cơ sở ban đầu giúp cho các nghiên cứu tiếp về hoạt tính sinh học của các protein trong thịt quả mướp đắng.



Hình 2. Điện di trên SDS-PAGE 12,5%

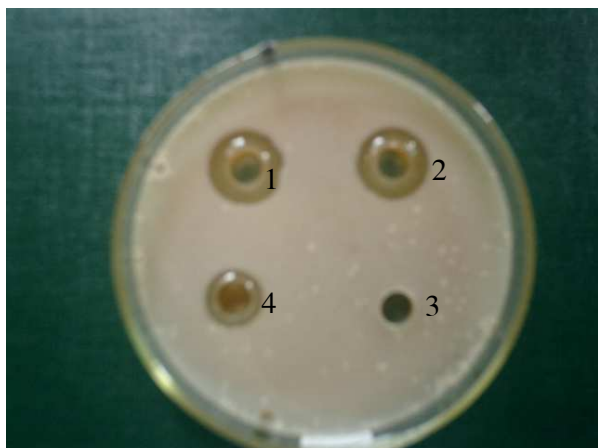
1. Protein chuẩn (14,4 kD-94 kD); 2. Đỉnh I của DE qua cột sephadex G-50

3. Hoạt tính kháng khuẩn của DE từ thịt quả mướp đắng

a. Thăm dò điều kiện xử lý vô trùng DE

Những nghiên cứu thăm dò sơ bộ của chúng tôi cho thấy DE ức chế sự sinh trưởng của một số chủng vi khuẩn tụ cầu vàng. Để có thể tạo chế phẩm vô trùng ứng dụng trong thực tế, chúng tôi đã thử xử lý chế phẩm theo các cách khác nhau. Kết quả trên bảng 2 cho thấy, khi khử trùng DE trong nồi hấp ở 121°C, trong 4 phút, ở dung dịch đã xuất hiện kết tủa trắng. Ly tâm để thu DT; dịch này không còn hoạt tính kháng khuẩn (hình 3, giếng 3). Điều đó chứng tỏ chất có hoạt tính kháng khuẩn của DE đã bị bất hoạt dưới tác dụng của nhiệt độ cao; đó có thể là các protein đã bị kết tủa. Kết quả thí nghiệm cho thấy phân kết tủa (sau khi đã rửa nhanh bằng nước) vẫn còn hoạt độ kháng khuẩn nhưng đã bị giảm nhiều so với ban đầu (hình 3, giếng 4 và bảng 2). Điều này khác với kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi đối với các chất kìm hãm triptxin (TI) đã tinh sạch [4], sự sai khác có thể

do trong thí nghiệm này TI ở dạng thô. Các kết quả trên cho thấy thành phần protein của DE có thể đóng vai trò chủ yếu đối với hoạt tính kháng khuẩn của nó. Vì vậy, khi kéo dài thời gian khử trùng đến 15 phút thì protein đã bị biến tính hoàn toàn nên đã mất hoạt tính kháng khuẩn.



Hình 3. Hoạt tính kháng khuẩn của DE sau khi xử lý ở các điều kiện khác nhau

1. DE cô đặc 4 lần; 2. DE cô đặc 4 lần được xử lý bằng tia cực tím trong 30 phút; 3. DE cô đặc 4 lần, khử trùng trong 4 phút dịch trong; 4. Kết tủa của mẫu 3 (sau khi khử trùng DE trong 4 phút).

Sau khi khử trùng DE trong 4 phút hoặc 15 phút, hoạt độ ức chế triplexin vẫn còn một ít ở phần dịch trong, như vậy có thể TIA của DE một phần là do các chất có phân tử thấp khác không phải protein, ví dụ như các chất mẫu. Sau khi khử trùng trong 15 phút, không phát hiện được TIA trong phần kết tủa. Chúng tôi cũng đã sử dụng màng lọc Minisart 0,2 μm và xác định các chỉ tiêu như đã nêu trong bảng 2, hoạt độ của dịch lọc không thay đổi nhưng dịch bị hao hụt một ít.

Để kiểm tra lại độ vô khuẩn của DE xử lý bằng tia cực tím, đã cấy chế phẩm trên môi trường thạch thường, giữ ở 37°C trong 48 giờ, không có vi khuẩn nào mọc. Như vậy, có thể sử dụng phương pháp xử lý với tia tử ngoại để chuẩn bị chế phẩm DE vô trùng.

b. *Nghiên cứu ảnh hưởng của DE có hàm lượng protein khác nhau đến hoạt độ kháng khuẩn*

Kết quả trên bảng 2 và hình 4 cho thấy, khi hàm lượng protein trong DE tăng, kích thước của vòng vô khuẩn cũng tăng tương ứng; đối với các chủng dùng trong thí nghiệm này, sử dụng dung dịch có hàm lượng protein khoảng 1,5 mg/ml là thích hợp.

Bảng 2

Hoạt tính kháng khuẩn của DE sau khi xử lý ở các điều kiện khác nhau.

STT	Mẫu	Protein		Đường kính của vòng vô khuẩn (D-d) (mm)			TIA xác định theo phương pháp Anson cải tiến (%)
		mg/ml	%	St1M	St2M	St3M	
1	DE không xử lý (đối chứng)	0,61	100	11	10	8	100
2	Dịch trong (DT) sau khi ly tâm DE đã khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 4 phút	0,161	26,4	-	-	-	12
3	Kết tủa của mẫu 2 + nước cất vô trùng (dung dịch huyền phù)	không xác định được		5	5	2	(*)
4	DT nhận được sau khi ly tâm DE đã khử trùng trong nồi hấp ở 121°C trong 15 phút.	0,071	11,6	-	-	-	(**)
5	DE xử lý bằng tia tử ngoại trong 30 phút trong buồng cấy	0,61	100	11	10	8	100

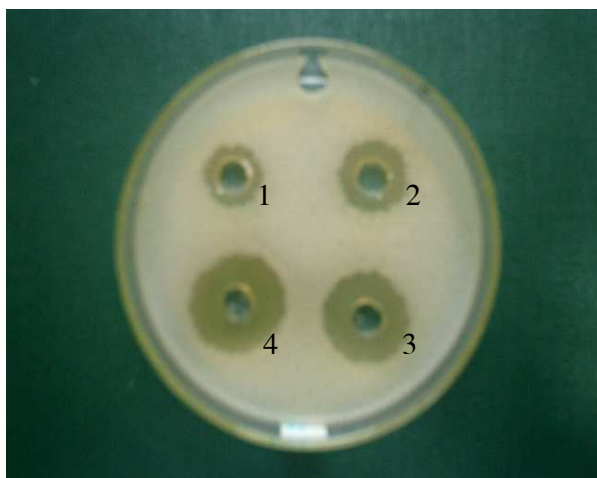
Ghi chú: D. đường kính của vòng vô khuẩn (mm) (kể cả đường kính của giếng); d. đường kính của giếng (mm); (-). không có hoạt tính kháng khuẩn; (*). nếu hoà kết tủa trong dung dịch sorenson pH 7,6 (bằng thể tích dung dịch ban đầu), ly tâm để lấy dịch trong và xác định bằng phương pháp khuếch tán, hoạt độ còn 28% (tính theo đường kính của vòng phân giải); (**). chỉ có thể xác định bằng phương pháp khuếch tán.

Bảng 3:

Ảnh hưởng của DE có hàm lượng protein khác nhau đến hoạt độ kháng khuẩn

Hoạt độ kháng khuẩn Chủng	Đường kính của vòng vô khuẩn (D-d) mm			
	C 0,7 mg/ml	C 1 mg/ml	C 1,5 mg/ml	C 2 mg/ml
St1M	7	9	14	17
St2M	7	9	14	17
St3M	7	9	14	16
St5	0	4	10	14

Ghi chú: C. hàm lượng prôtêin



Hình 4. Hoạt tính kháng khuẩn của DE ở các nồng độ khác nhau đối với chủng St2M

1. DE có 0,61 mg protein/ml; 2. DE có 1 mg protein/ml;
3. DE có 1,5 mg protein/ml; 4. DE có 2 mg protein/ml.

c. Tách proteinaza của các chủng tụ cầu vàng

Để sơ bộ tìm hiểu cơ chế tác dụng kháng khuẩn của DE, chúng tôi đã thực hiện các thí nghiệm sau:

+ Theo dõi sự biến đổi PA của dịch môi

trường nuôi cấy theo thời gian (16, 24, 48, 72 giờ), kết quả cho thấy PA của 4 chủng nghiên cứu đều đạt cao nhất sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút. Trong các thí nghiệm tiếp theo, đã sử dụng dịch môi trường nuôi cấy sau 24 giờ ở các điều kiện trên.

+ Nghiên cứu ảnh hưởng của các pH khác nhau 4,5; 5,6; 6,5; 7,0; 7,6; 9,15 đến PA của dịch môi trường nuôi cấy 4 chủng tụ cầu vàng cho thấy: ở các pH 6,5-7,6, PA không khác nhau nhiều.

Trong 4 chủng đã nghiên cứu, PA của hai chủng St2M và St5 mạnh hơn cả. Vì vậy, đã tiến hành nuôi cấy hai chủng St2M và St5 ở các điều kiện đã lựa chọn; kết tủa enzym trong dịch môi trường nuôi cấy bằng axêton, nhằm mục đích nhận được chế phẩm đậm đặc hơn và loại bớt các chất có phân tử thấp của môi trường. Phân kết tủa được hòa tan trong đệm Sorensen pH = 6,5 đến thể tích thích hợp, ly tâm để thu dịch trong để phân tích. Kết quả xác định PA của chế phẩm theo phương pháp Anson ở pH = 6,5, được trình bày trên bảng 4; số liệu trên bảng 4 cũng cho thấy PA của chủng St5 gấp 6 lần PA của chủng St2M.

Bảng 4

Protein và PA ngoại bào trong chế phẩm proteinaza thô được tách từ 2 chủng St2M và St5

Chế phẩm proteinaza của vi khuẩn kết tủa bằng axeton	Protein (mg/100 ml dịch môi trường)	PA (tính tương đương với μg tripxin)	Hoạt độ riêng ($\mu\text{g E}/\text{mg protein}$)
St2M	3,56	67,6	19
St5	3,12	362,08	116

Ghi chú: xác định hoạt độ của tripxin song song với enzym vi khuẩn và tính tương đương với lượng tripxin để dễ dàng tính lượng DE cần sử dụng.

Thử tác dụng của DE đối với PA của vi khuẩn: đã tiến hành thử chế phẩm protein của DE (đã kết tủa bằng axeton) đối với chế phẩm axêton của proteinaza của vi khuẩn nhưng không phát hiện được tác dụng kìm hãm của DE. Điều này có thể do nhiều nguyên nhân khác nhau, như điều kiện tương tác (ví dụ lực ion) chưa thích hợp; để làm rõ vấn đề này, cần tiếp tục tinh sạch proteinaza của vi khuẩn. Tuy nhiên, cũng có thể do tác dụng kháng khuẩn của DE thực hiện theo một cơ chế khác; vấn đề này đang được tiếp tục nghiên cứu.

III. KẾT LUẬN

1. Từ 50 kg quả mướp đắng, đã thu được 42,65 kg thịt quả (không có ruột và hạt); đem ly tâm dịch ép từ thịt quả đã thu được 17,25 l dịch trong (DE).

2. Thịt quả có 7% chất khô, 0,0125% protein tính theo trọng lượng tươi (hoặc 0,18% chất khô tuyệt đối).

3. Hoạt độ phân giải protein (PA) của DE tương đối thấp, ít thay đổi trong khoảng pH từ 5,5 đến 7,6 (ở pH = 6,5, PA có cao hơn), và giảm mạnh ở pH = 9,1.

4. Sắc ký lọc gel qua cột sephadex G-50, thu được 1 đỉnh protein có PA. Điện di trên SDS-PAGE, đã phát hiện được 9 băng protein, trong đó 4 băng chính có khối lượng phân tử từ 35 đến 50 kD.

5. Dịch ép từ thịt quả ức chế sự sinh trưởng của 4 chủng vi khuẩn tụ cầu vàng *Staphylococcus*

aureus được phân lập từ mủ của vết thương bệnh nhân; hoạt độ kháng khuẩn không bị mất sau khi được khử trùng bằng tia UV trong 30 phút trong buồng cấy.

Các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến hoạt độ kháng khuẩn cho phép giả thiết protein của thịt quả mướp đắng có vai trò quan trọng đối với hoạt tính kháng khuẩn của nó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bradford M. M.**, 1976: Ann. Biochem., 72: 248.
2. **Ganguly C., De S., Das S.**, 2000: Eur. J. Cancer Prev., 9 (4): 283-288.
3. **Leammi U. K.**, 1970: Nature, 227: 680-685.
4. **Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Thị Trân Châu**, 1994: Proceedings of the 11th FAOBMB Symposium, 405-410.
5. **Phạm Thị Trân Châu**, 1987: Trypsin inhibitors of white bush (*Cucurbita pepo* var. *patissonina*) fruits and seeds (in English). Wydaw. Uniw Wroclawskiego, Wroclaw (110 pages).
6. **Phan Tuấn Nghĩa, Phạm Thị Trân Châu**, 1987: Tạp chí Sinh học, 9(3): 12-17. Hà Nội.
7. **Petrova J. S., M. M. Wincjunajte**, 1966: Priklad. Biochim. i Microbiol., 2: 232 (tiếng Nga).

SOME BIOCHEMICAL COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PLACENTA-FREE FRUIT JUICE OF *MOMORDICA CHARANTIA* L.

HOANG THU HA, PHAM THI TRAN CHAU

SUMMARY

This work dealt with analysis of placenta-free fruits (PFF) of *M. charantia*. After removing the placenta of 50 kg of *M. charantia* fresh fruits, 42,65 kg of PFF were obtained. This PFF contained 7% of dry substances, of which 0.18% were proteins. The clarified juice (17.25 l) obtained from PFF of *M. charantia* was subjected to study. The proteolytic activity (PA) of this juice was rather low and almost the same in the range of pH from 5.5 to 7.6. By fractionating this juice on sephadex G-50 column, only one protein peak was obtained. By using SDS-PAGE method, 9 protein bands were detected and Mr of 4 major bands were found to be in the range of 35 kD to 50 kD. The placenta-free fruit juice of *M. charantia* inhibited the growth of 4 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from patient wound pus. Basing on the obtained results, it was suggested that proteins of PFF contributed to their antibacterial activity.

Ngày nhận bài: 09-11-2005