

TINH SẠCH CATALASE BẰNG PHƯƠNG PHÁP CẢI TIẾN VÀ MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA ENZYME

Nguyễn Hoàng An, Godagama G. D. Suminda, Nguyễn Thị Thu Phương,
Đinh Nho Thái, Nguyễn Thị Hồng Loan*

Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ enzyme và protein,
Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Việt Nam

TÓM TẮT: Catalase (EC 1.11.1.6) là một trong những enzyme thuộc hệ thống chống oxy hóa, bảo vệ cơ thể khỏi các stress oxy hóa nhờ khả năng phân hủy hydrogen peroxide thành nước và oxy phân tử. Bài báo này trình bày kết quả tinh sạch catalase từ gan bò theo một quy trình cải tiến và một số tính chất của nó. Bằng việc kết tủa chọn lọc với acetone, tiếp nối sắc ký qua cột trao đổi anion DEAE-sepharose và trao đổi cation CM-sepharose, catalase của gan bò đã được tinh sạch tới mức đồng nhất về điện di, được thể hiện với một băng protein khoảng 60 kDa trên gel SDS-PAGE. Chế phẩm enzyme tinh sạch có hoạt độ riêng lên tới 79.277 U/mg protein, hiệu suất thu hồi 1,87% và có độ sạch tăng lên gần 60 lần. Các thí nghiệm phân tích trên gel không biến tính cho thấy, catalase của gan bò là một homotetramer với khối lượng phân tử khoảng 240,987 KDa. Enzyme hoạt động tối thích ở pH 7,0, nhiệt độ 37°C và vẫn giữ được hoạt động ở pH 5,0–10,0, nhiệt độ 4–40°C. Tuy vậy, enzyme bị bất hoạt ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Hoạt độ của catalase được hoạt hoá bởi Ca^{2+} và bị ức chế bởi Na^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} và NaN_3 . Trong điều kiện thích hợp, giá trị K_m và K_{cat}/K_m tương ứng là 23,69 mM và $5 \cdot 10^6$ (M.giây)⁻¹.

Từ khoá: Catalase, động học catalase, gan bò, tinh sạch catalase, tính chất catalase.

MỞ ĐẦU

Catalase ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}_2$ oxidoreductase; EC 1.11.1.6) có chức năng phân giải hydrogen peroxide (H_2O_2) thành nước (H_2O) và oxygen (O_2), là một trong những enzyme chống oxy hoá có vai trò quan trọng nhất trong loại bỏ các gốc oxy hoá của tế bào. Các nghiên cứu cũng cho thấy, catalase có nhiều ứng dụng trong sinh y học: enzyme có vai trò trong ức chế sự phá vỡ của các tế bào thần kinh, apoptosis, chống viêm, lão hoá và các khối u. Nồng độ của catalase cùng với một số enzyme chống oxy hoá khác còn được xem như chỉ số để đánh giá các nhóm oxy hoạt động ROS (reactive oxygen species) được tạo ra trong quá trình phát sinh một số bệnh ở người (Nadeem et al., 2015). Theo một số công bố gần đây (Wood et al., 2005; Shi et al., 2014), sự giảm của catalase có thể đóng vai trò quan trọng trong quá trình bạc tóc sớm ở người. H_2O_2 tự nhiên được tạo ra bởi các hoạt động trao đổi của cơ thể và catalase có vai trò phân giải H_2O_2 rất nhanh. Vì vậy, nếu hàm lượng catalase giảm đi, H_2O_2 sẽ không bị phân hủy hết, dẫn đến tóc bị tẩy trắng từ bên trong. Nhận định này vẫn đang được làm sáng tỏ với

hy vọng phát triển các phương pháp chữa bạc tóc dựa trên việc bổ sung catalase.

Catalase cũng đã được tinh sạch và xác định một số tính chất từ nhiều sinh vật khác nhau như ở thực vật (cây phèn đen, táo, cây dầu muồng ăn) (Beulah & Ramana, 2013; Yoruk et al., 2005; Kandukuri et al., 2012); từ gan của nhiều loài động vật như dê (Chatterjee et al., 1989), chó (Nakamura et al., 2000); bò (Prakash et al., 2002) và từ một số vi khuẩn (Hossain et al., 2008; Yumoto et al., 2002). Phần lớn các nghiên cứu thường tinh sạch catalase bằng kết tủa chọn lọc với $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cùng với các phương pháp sắc ký như lọc gel, trao đổi ion (Goyal & Anjan 2008; Aydemir & Kuru, 2003; Nadeem et al., 2015). Nhìn chung, catalase thường hoạt động trong khoảng pH 5,0–10,0 với hoạt tính tối ưu tại pH 6,0–8,0 và ổn định ở nhiệt độ 10–30°C. Catalase từ các nguồn khác nhau chủ yếu là một tetramer với khối lượng phân tử (KLPT) từ 220 đến 270 kDa (Nadeem et al., 2015).

Ở Việt Nam, bò là gia súc khá phổ biến và có vai trò quan trọng trong nông nghiệp; các nghiên cứu cũng cho thấy lượng catalase có

hiều trong gan của động vật (Chatterjee et al., 1990, Nakamura et al., 2000, Prakash et al., 2002). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách chiết catalase từ gan bò và xác định một số tính chất của nó với mục tiêu tạo được chế phẩm enzyme có độ tinh sạch cao và hoạt tính tốt, phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Gan bò đã được thu nhận từ chợ ở Hà Nội và bảo quản ở (-20°C cho đến khi sử dụng.

Gel DEAE-sepharose và CM-sepharose Fast Flow (FF) được mua từ hãng GE Healthcare (USA); H₂O₂ được mua từ hãng Sigma Aldrich (USA); thang chuẩn protein được mua từ Thermo scientific (USA); kháng thể đa dòng kháng catalase từ hãng Novus Biological (USA); các hóa chất khác đều được mua từ các hãng uy tín và đạt độ tinh khiết cần cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Tinh sạch catalase từ gan bò

Về cơ bản, catalase từ gan bò được thu nhận và tinh sạch theo quy trình của Nadeem et al. (2015) với một số cải tiến. Gan của bò được cắt nhỏ và cho vào đệm kali phosphat 20 mM, pH 7,5 (đệm A) theo tỷ lệ 1 g gan:1,5 ml đệm; được nghiền nhỏ bằng máy xay đến khi đồng nhất, tiến hành ly tâm 13.000 vòng, 30 phút, 4°C thu dịch chiết trong. Dịch chiết gan bò sau đó được bổ sung acetone với các nồng độ khác nhau từ 5–35%, loại bỏ kết tủa bằng ly tâm 13.000 rpm/20 phút, 4°C. Dịch nổi có hoạt độ riêng của catalase cao nhất sẽ tiếp tục được bổ sung acetone 30–90%, thu tủa protein có catalase, hoà tan kết tủa tan hoàn toàn trong đệm A. Bước này nhằm loại một số amino acid và protein không mong muốn. Dịch hoà tan sau bước acetone với hoạt độ riêng của catalase cao nhất được thẩm tích qua đệm trong đệm A nhằm loại bỏ acetone. Dịch thẩm tích sau đó được cho lên cột XK 26/40 đã nhồi sẵn gel anion DEAE-sepharose và cân bằng với đệm A, tốc độ dòng chảy 2 ml/phút.

Các bước tinh sạch được tiến hành với hệ thống máy sắc ký tự động AKTAprius plus (GE, USA). Sau bước gắn mẫu, các protein gắn không đặc hiệu hoặc không gắn với cột sẽ được rửa đến khi độ hấp thụ của mẫu tại bước sóng

280 nm (A_{280}) < 0,05. Các protein gắn trên cột được rửa chiết bằng gradient của đệm A với nồng độ NaCl 0–0,3 M. Các phân đoạn có hoạt tính của catalase sẽ được thu lại, thẩm tích qua đệm trong đệm B (Natri acetate 10 mM, pH 4,5) và tiếp tục được cho lên cột CM-sepharose đã được cân bằng với đệm B. Các protein gắn trên cột sẽ được rửa chiết trong đệm B với gradient NaCl 0–0,7 M. Các phân đoạn có hoạt tính của catalase sẽ được thu lại, thẩm tích qua đệm trong đệm C (kali phosphat 20 mM, pH 7,0). Các phân đoạn thu nhận sẽ được kiểm tra độ tinh sạch bằng SDS-PAGE cũng như đánh giá hoạt tính phân giải H₂O₂.

Xác định hoạt độ của catalase

Hoạt độ của catalase được xác định dựa trên khả năng phân giải cơ chất H₂O₂ ở nhiệt độ 37°C, nồng độ H₂O₂ được xác định qua độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 240 nm (A_{240}) với hệ số hấp thụ của H₂O₂ bằng 43,6 M⁻¹cm⁻¹. Một đơn vị hoạt độ của catalase là lượng enzyme phân giải 1 μmol H₂O₂ trong một phút ở 37°C tại pH 7,0 (Jang et al., 2004).

pH tối thích và ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của catalase

pH hoạt động tối thích của catalase tinh sạch từ gan bò được xác định bằng cách tính hoạt độ còn lại của catalase (hoạt độ riêng 26,27 U) trong các phản ứng phân giải H₂O₂ với các dung dịch đệm có pH 4,0–11,0 tại nồng độ 50 mM các đệm: CH₃COONa (pH 4,0–5,0); kali phosphate (pH 6,0–7,0); Tris-HCl (pH 8,0); glycine-NaOH (pH 9,0–10,0) và Na₂HPO₄-NaOH (pH 11,0). Để xác định độ ổn định pH của catalase, enzyme tinh sạch được pha trong các đệm có pH 4,0–11,0 và ủ ở 37°C trong 30 phút. Xác định hoạt độ còn lại của catalase và hoạt độ cao nhất thể hiện 100% hoạt tính của enzyme. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy kết quả trung bình.

Nhiệt độ tối ưu và ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của catalase

Để xác định nhiệt độ tối ưu cho hoạt độ của catalase, hoạt độ còn lại của enzyme trong các phản ứng phân giải H₂O₂ tại các nhiệt độ khác nhau 20–80°C được xác định.

Để xác định độ ổn định nhiệt độ của catalase tinh sạch, enzyme được ủ ở 4–70°C trong 30 phút. Xác định hoạt độ còn lại của

catalase, trong đó hoạt độ còn lại cao nhất của catalase được xác định còn 100% hoạt tính.

Động học của catalase tinh sạch

Hằng số động học K_m và V_{max} của catalase tinh sạch từ gan bò được xác định dựa trên tương quan tốc độ thủy phân H_2O_2 của catalase và nồng độ cơ chất theo phương trình Lineweaver-Burk. Nồng độ H_2O_2 được sử dụng trong thí nghiệm là khoảng 6–20 mM.

Ảnh hưởng của một số chất đến hoạt động của catalase

Ảnh hưởng của các chất ức chế (NaN_3) và ion kim loại (Ca^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} và Fe^{3+}) lên hoạt động của catalase được xác định bằng cách đo hoạt tính còn lại của enzyme ở các nồng độ khác nhau của các chất. Catalase được xem là còn 100% hoạt tính khi trong phản ứng không có mặt của các chất nghiên cứu. Kết quả được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình.

Xác định hàm lượng catalase

Hàm lượng protein được xác định bằng đo

độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm với hệ số hấp thụ của catalase là $40,75 M^{-1}cm^{-1}$ và phương pháp Bradford (1976) sử dụng albumin huyết thanh bò làm chất chuẩn.

Xác định khối lượng phân tử của catalase

KLPT của catalase được xác định bằng phương pháp điện di trên các gel polyacrylamid không biến tính với các nồng độ gel khác nhau 6–9% (Sean, 1999). Các protein chuẩn được sử dụng là ovalbumin (45 kDa), albumin huyết thanh bò (66 kDa), catalase của Sigma Aldrich (250 kDa). Các băng protein được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue R-250. Thang marker chuẩn được mua từ hãng Thermo fisher scientific (USA).

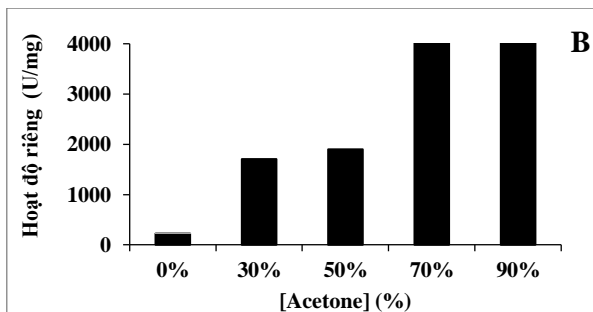
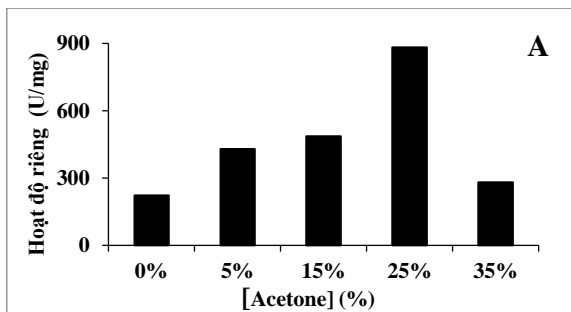
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh sạch catalase từ gan bò

Trong nghiên cứu này, từ 65 g gan bò, chúng tôi đã thu nhận được 12659,39 mg protein tổng số với hoạt độ riêng của catalase là 1352 U/mg (bảng 1).

Bảng 1. Bảng tóm tắt quá trình tinh sạch catalase từ dịch chiết gan bò

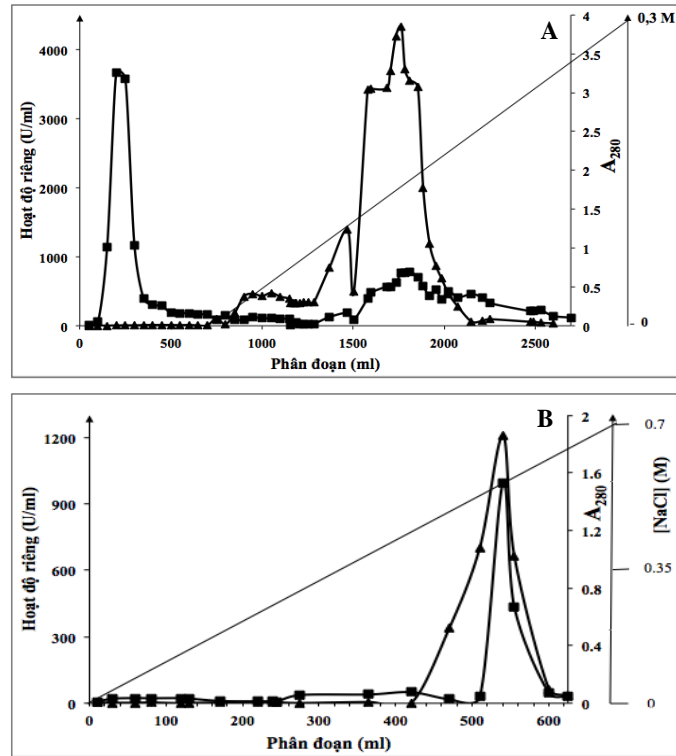
Các phân đoạn	Thể tích mẫu (ml)	Hàm lượng protein tổng số (mg)	Hoạt độ riêng của catalase (U/mg protein)	Hoạt độ tổng số của catalase (U)	Số lần tinh sạch	Hiệu suất thu nhận (%)
Dịch chiết	105	12.659,39	1.352,43	17.120.880	1,00	100
Dịch nổi phân đoạn tủa dịch chiết gan bò bằng acetone 25%	100	3.086,71	1.417,59	4.375.680	1,05	25,56
Dịch hoà tủa phân đoạn tủa bằng acetone 70%	145	1.916,37	2.193,33	4.203.221	1,62	24,55
DEAE-sepharose	120	70,69	45547,45	3.219.840	33,68	18,81
CM-sepharose	26	4,05	79.277,61	320.791	58,62	1,87



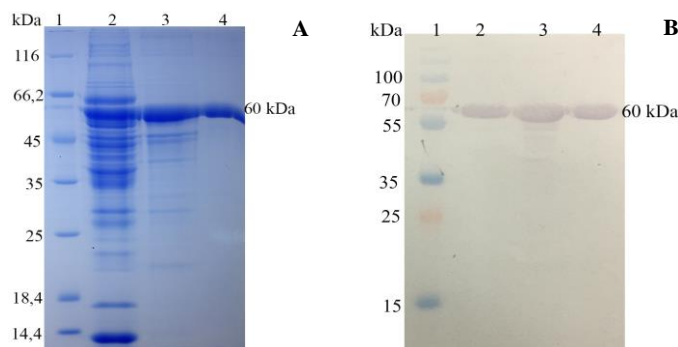
Hình 1. Hoạt độ riêng của catalase trong dịch nổi khi tủa bằng các nồng độ acetone 0–35% (A) và trong dịch hoà tủa bằng các nồng độ acetone 0–90% (B)

Bước tiếp theo, catalase được tinh sạch sơ bộ bằng kết tủa phân đoạn bởi acetone; cụ thể đầu tiên acetone được bổ sung vào dung dịch mẫu đến nồng độ 25% để loại bỏ một số protein không mong muốn, catalase được giữ lại trong phần dịch nổi (hình 1A) và sau đó kết tủa

catalase bằng acetone 70% (hình 1B). Phân đoạn kết tủa bằng acetone 70% được hòa tan trong đệm A và thẩm tích 24 giờ trong đệm A để loại bỏ acetone. Chế phẩm sau đó được cho sắc ký cột trao đổi anion DEAE-sepharose và cột trao đổi cation CM-sepharose (bảng 1, hình 2).



Hình 2. Sắc kí đồ các phân đoạn tinh sạch catalase từ dịch gan bò qua cột trao đổi anion DEAE-sepharose (A) và CM-sepharose (B). (▲)- độ hấp thụ protein tại bước sóng A₂₈₀ nm; (□)- hoạt độ riêng của catalase



Hình 3. Điện di SDS-PAGE (A) và thẩm tách miễn dịch (B) các phân đoạn tinh sạch qua cột DEAE-sepharose và CM-sepharose: 1. Thang chuẩn protein; 2. Dịch chiết gan bò lên cột DEAE-sepharose; 3. Phân đoạn có hoạt tính catalase rửa chiết từ cột DEAE-sepharose và lên cột CM-sepharose; 4. Phân đoạn catalase tinh sạch từ CM-sepharose

Kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch qua các bước (hình 3A) cũng cho thấy

sự có mặt của duy nhất một băng protein KLPT khoảng 60 kDa tương tự như KLPT của

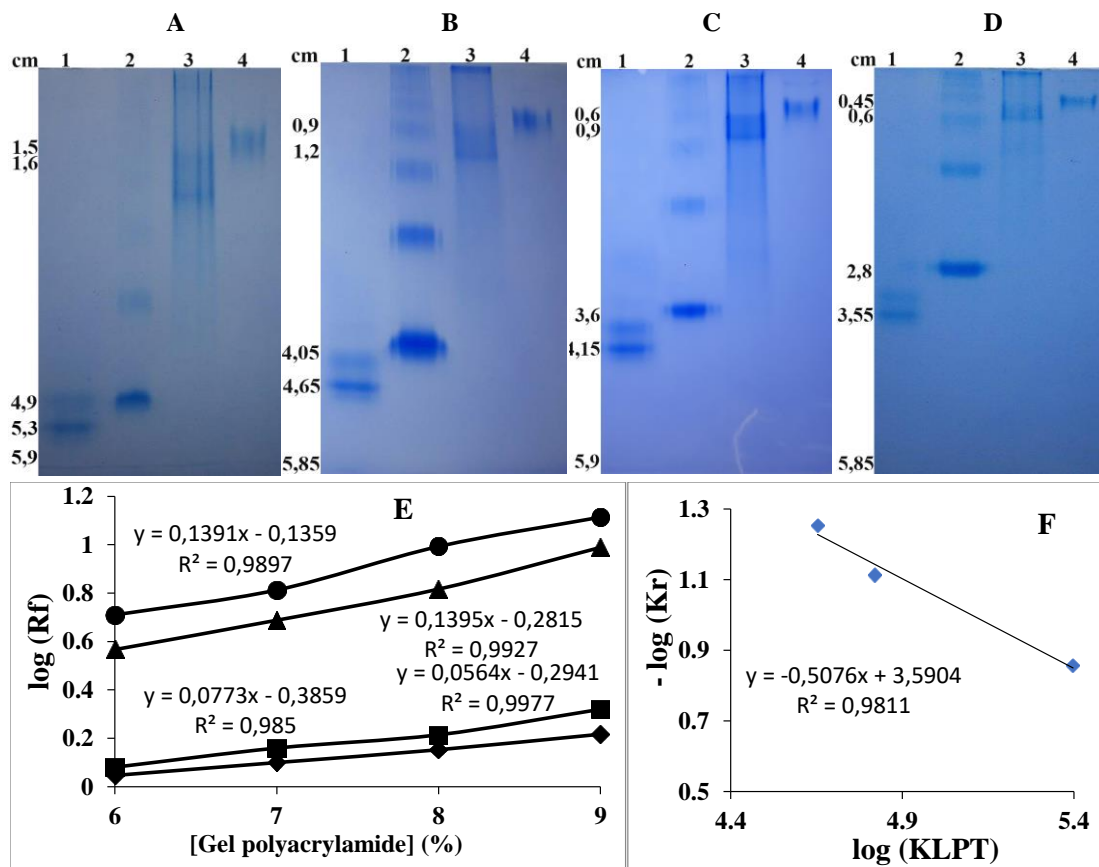
catalase tinh sạch từ động vật. Bằng protein 60 kDa được nhận ra bởi kháng thể đa dòng kháng catalase trên tấm tách miễn dịch western blotting (hình 3B). Như vậy, bằng kết tủa thuận nghịch với acetone và sắc ký qua cột DEAE sepharose và CM-sepharose đã cho phép tinh sạch được catalase từ dịch chiết gan bò. Cụ thể, catalase đã được tinh sạch gần 60 lần với hiệu suất thu hồi 1,87% từ dịch chiết thô và có hoạt độ riêng phân giải H₂O₂ là 79.277,61 U/mg, cao hơn so với catalase được tinh sạch từ ếch nhái (623,92 U/mg) (Jang et al., 2004), lạc đà (4.416 U/m) (Omar, 2012) và trâu nước (35753 U/mg) (Nadeem et al., 2015).

Một số tính chất của catalase tinh sạch từ gan bò

Khối lượng phân tử của catalase

KLPT của catalase tinh sạch được xác định

bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamid không biến tính (Sean, 1999). Trên cơ sở độ di động điện di của các protein ở các nồng độ gel khác nhau (hình 4A-D), sự phụ thuộc của log độ di động điện di với nồng độ gel được xác định (hình 4E), từ đó hệ số góc Kr và tương quan giữa logarit Kr với logarit KLPT của các protein chuẩn được tính ra (hình 4F), cuối cùng, KLPT của catalase từ gan bò được xác định là 240,987 kDa. Kết quả này tương tự với kết quả của Nadeem et al. (2015) là 240 kDa. Do catalase từ gan bò là tetramer nên KLPT của một monomer là 60,247 KDa, tương đương với kết quả xác định KLPT của catalase dựa trên độ di động điện di của enzyme trên SDS-PAGE (hình 3A) là 60,1 kDa. Như vậy, chế phẩm catalase tinh sạch được từ gan bò trong nghiên cứu này có KLPT 60,2 kDa.



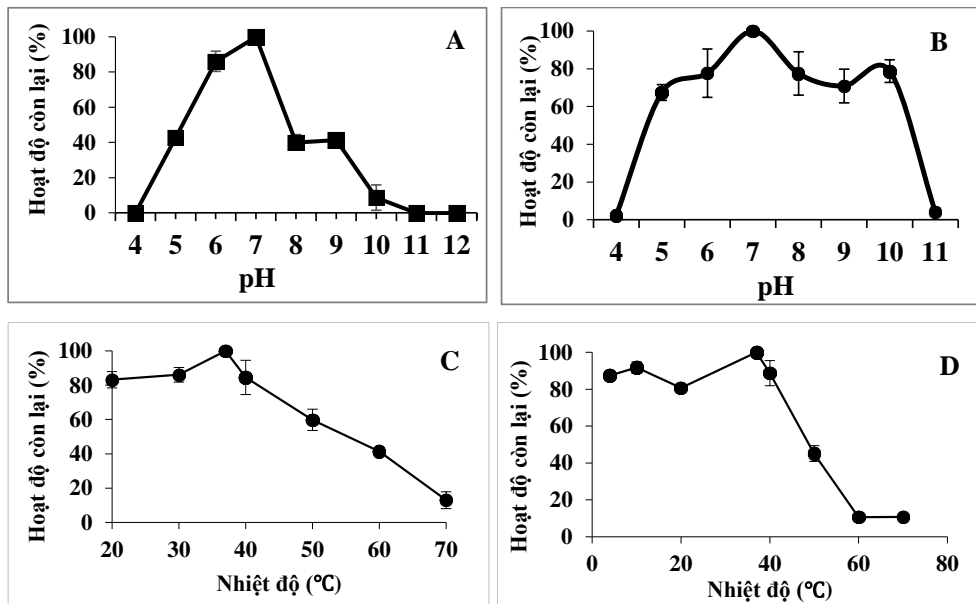
Hình 4. Kết quả xác định KLPT của catalasae: A-D. Điện di các protein trên gel polyacrylamide không biến tính với các nồng độ gel khác nhau: 6% (A), 7% (B), 8% (C) và 9% (D); 1. Ovalbumin, 2. Albumin, 3. Catalase chuẩn (Sigma Aldrich), 4. Catalase tinh sạch. E. Sự phụ thuộc của độ di động điện di ở các nồng độ gel polyacrylamide khác nhau. F. Sự phụ thuộc log hệ số góc Kr vào log KLPT của các protein chuẩn

Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ đến hoạt độ của catalase tinh sạch

Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của catalase tinh sạch đã được khảo sát ở khoảng pH 4,0–11,0 (hình 5A). Phạm vi hoạt động của catalase được quan sát thấy từ pH 5,0 đến 11,0 với pH tối ưu 7,0. Khi được ủ trong dung dịch đệm có pH 4,0–11,0 ở 37°C trong 30 phút, enzyme ổn định tối đa 100% ở pH 7,0 và hơn

80% hoạt tính vẫn được giữ ở pH 6,0 và 8,0 (hình 5B).

Tương tự, hoạt độ của catalase tinh sạch cũng đã được xác định ở các nhiệt độ khác nhau (20–80°C). Kết quả cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của catalase ở 37°C (hình 5C). Mặt khác, enzyme vẫn ổn định ở khoảng nhiệt độ 4–40°C và vẫn còn hơn 70% khi xử lý enzyme ở 50°C trong 30 phút (hình 5D).



Hình 5. Ảnh hưởng của pH (A), độ ổn định pH (B), ảnh hưởng của nhiệt độ (C) và độ ổn định của nhiệt độ (D) đến hoạt độ của catalase tinh sạch

Ảnh hưởng của các ion kim loại đến hoạt độ của catalase tinh sạch

Các ion kim loại có thể hoạt hoá hoặc làm giảm hoạt tính phân giải cơ chất của enzyme

bằng cách ảnh hưởng đến ái lực của enzyme với cơ chất, ổn định cấu hình trung tâm hoạt động của enzyme hoặc giúp trung tâm hoạt động thay đổi cấu hình cho gắn với cơ chất (Suryani et al., 2017).

Bảng 2. Ảnh hưởng của một số ion kim loại đến hoạt độ của catalase tinh sạch

STT	Tên chất	Nồng độ thử (mM)	Nồng độ ức chế 50 (IC ₅₀ nếu có)
1	NaN ₃	0–1,2	Ức chế (IC ₅₀ = 0,105 ± 0,005 mM)
2	NaCl	0–3500	Ức chế (IC ₅₀ = 380 mM)
3	CaCl ₂	0–1,4	Hoạt hoá
4	NiCl ₂	0–2	Ức chế (IC ₅₀ = 1,74 mM)
5	CuSO ₄	0–0,04	Ức chế (IC ₅₀ = 0,0265 ± 0,0025 mM)
6	ZnSO ₄	0–0,24	Ức chế (IC ₅₀ = 0,176 ± 0,008 mM)
7	FeSO ₄	0–0,667	Ức chế (IC ₅₀ = 0,565 ± 0,035 mM)
8	Fe ₂ (SO ₄) ₃	0–2	Ức chế (IC ₅₀ = 1,615 ± 0,015 mM)

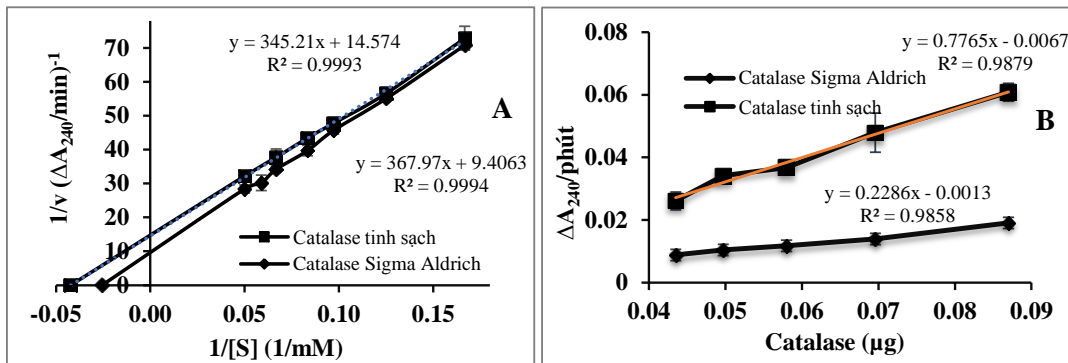
Trong nghiên cứu này, ion Ca²⁺ đã hoạt hoá catalase (hoạt độ tương đối của catalase đạt

170% tại nồng độ Ca²⁺ 1,5 mM); trong khi đó, các ion Na⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺ và Fe³⁺ đều

ức chế hoạt động của enzyme (bảng 2). Kết quả này có thể giải thích do Ca^{2+} có vị trí gắn tại trung tâm hoạt động của catalase và giúp cho cơ chất gắn được vào trung tâm hoạt động của enzyme (Manu & Prasader, 2009); Cu^{2+} làm giảm phản ứng oxi hoá trong suốt quá trình phân giải H_2O_2 ; catalase là metallo protease, có kim loại trong trung tâm hoạt động nên việc bổ sung các ion tại nồng độ nhất định có thể ảnh hưởng đến độ ổn định cấu trúc của enzyme hoặc làm giảm phản ứng oxi hoá tại trung tâm hoạt động dẫn tới làm giảm hoạt tính của enzym (Suryani et al., 2017). Ngoài ra, ảnh hưởng của NaCl và chất kháng khuẩn NaN_3 đến hoạt độ của catalase cũng cho thấy nên loại muối ngay sau khi quá trình tinh sạch enzym và không nên bảo quản enzyme trong đệm có NaN_3 .

Động học của catalase tinh sạch và so sánh với catalase hãng Sigma Aldrich

Trong các điều kiện thích hợp, catalase tinh sạch đã thủy phân cơ chất H_2O_2 với hằng số Michaelis-Menten $K_m = 23,69 \text{ mM}$ và hiệu quả xúc tác $K_{cat}/K_m = 5.10^6 \text{ (M.giây)}^{-1}$ (hình 6A). Khi so sánh với catalase của hãng Sigma Aldrich (Mỹ, mã số: C9322), catalase tinh sạch có K_m thấp hơn 1,65 lần và hiệu quả xúc tác K_{cat}/K_m cao gấp 5 lần catalase của hãng Sigma Aldrich ($K_m = 39,1 \text{ mM}$ và $K_{cat}/K_m = 1.10^6$) (hình 6A). Đồ thị sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng tại các lượng enzyme khác nhau (hình 6B) cũng cho thấy, tại cùng một nồng độ enzyme, tốc độ phản ứng của catalase tinh sạch gấp 3 lần catalase từ hãng Sigma Aldrich.



Hình 6. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng của catalase vào nồng độ cơ chất (A) và ảnh hưởng của hàm lượng catalase (B) đến tốc độ phản ứng

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tinh sạch được catalase từ gan bò bằng phương pháp kết tủa phân đoạn với acetone kết hợp với sắc ký qua cột trao đổi anion DEAE-sepharose và trao đổi cation CM-sepharose. Catalase tinh sạch có một băng protein khoảng 60 kDa trên gel SDS-PAGE với hoạt độ riêng lên tới 79.277 U/mg protein, hiệu suất thu hồi 1,87% và có độ sạch tăng lên gần 60 lần. Các thí nghiệm phân tích trên gel không biến tính cho thấy, catalase của gan bò là một homotetramer với khối lượng phân tử khoảng 240,987 kDa. Enzyme hoạt động tối thích ở pH 7,0, nhiệt độ 37°C và vẫn giữ được hoạt động ở pH 5,0–10,0, nhiệt độ 4–40°C. Tuy vậy, enzyme bị bất hoạt ở nhiệt độ 60°C trong 30 phút. Hoạt độ của catalase được hoạt hoá bởi Ca^{2+} và bị ức chế bởi Na^+ , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} và NaN_3 . Trong điều kiện thích hợp,

catalase tinh sạch phân giải cơ chất với $K_m = 23,69 \text{ mM}$ và hiệu quả xúc tác $K_{cat}/K_m = 5.10^6 \text{ (M.giây)}^{-1}$.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ kinh phí của Đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số QG.16.82. Các tác giả chân thành cảm ơn GS.TS. Phan Tuấn Nghĩa đã đọc và góp ý cho bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aydemir T., Kuru K., 2003. Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors on enzyme activity. Turkish J. Chem., 27: 85–97.
- Aydemir T., Kuru K., Çınar S., 2003. Purification and partial characterisation of catalase from chicken liver and the

- inhibition effects of some chemicals on the enzyme activity. Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi, 1(21): 63–74.
- Beers R. F., Sizer I. W., 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem., 195: 133–140.
- Beulah K. and Ramana T., 2013. Purification, properties and kinetic studies of catalase from leaves of *Phyllanthus reticulatus*. IJPCBS, 3: 940–948.
- Chatterjee U., Kumar A., Sanwal G. G., 1989. Purification and properties of goat liver catalase: Two pH optima. Indian J. Biochem. Biophys, 26: 140–147.
- Goyal M. M., Anjan B., 2008. Purification of human erythrocyte catalase by ion exchange chromatography: A few modifications. J. Enz. Res., 2: 11–17.
- Jang M. J., Park P. J., Jung W. K., Kim S. K., 2004. Purification and characterization of catalase from the liver of bullfrog, *Rana catesbeiana shaw*. J. Food Biochem, 28: 435–448.
- Kandukuri S. S., Noor A., Ranjini S. S., Vijayalakshmi M., 2012. Purification and characterization of catalase from sprouted black gram (*Vigna mungo*) seeds. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 15: 889–890.
- Marion M. B., 1976. A rapid and a sensitive method for the quantitation of microgram protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem, 72: 248–254.
- Manu, B. T., Prasada Rao U. J. S., 2009. Calcium modulated activity enhancement and thermal stability study of a cationic peroxidase purified from wheat bran. Food Chem, 114: 66–71.
- Nadeem M. S., Khan I. A., Murtaza B. N., Muhammad K., Rauf A., 2015. Purification and properties of liver catalase from water buffalo (*Bubalus bubalis*). S. Asian J. Life Sci., 32: 51–55.
- Nakamura K., Watanabe M., Sasaki Y., Ikeda T., 2000. Purification and characterization of liver catalase in acatalasemic beagle dog: Comparison with normal dog liver catalase. Int. J. Biochem. Cell. Biol., 32: 89–98.
- Omar A. M. A., 2012. Characterization of partially purified catalase from camel (*Camelus dromedarius*) liver. Afr. J. Biotechnol, 11(40): 9633–9640.
- Prakash K., Shashi P., Atta A., Jain SK., Bhakuni V., 2002. Unique oligomeric intermediates of bovine liver catalase. Protein Sci., 11: 46–57.
- Sean R. G., 1999. Current Protocol in Molecular Biology, John Willey & Sons, New Jersey, USA, 10: 5–8.
- Shi Y, Luo L. F., Liu X. M., Zhou Q., Xu S. Z., Lei T. C., 2014. Premature Graying as a Consequence of Compromised Antioxidant Activity in Hair Bulb Melanocytes and Their Precursors. Plos One, 9: 1–5.
- Suryani, Ambarsari L and Lindawati E., 2017. Isolation, Fractionation and Characterization of Catalase from *Neurospora crassa* (InaCC F226). IOP Conference Series: Earth Environ. Sci., 58: 1–7.
- Wood J. M., Decker H., Hartmann H., 2009. Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. FASEB J., 23: 2065–2075.
- Yoruk I. H., Demir H., Ekici K., Sarvan A., 2005. Purification and properties of catalase from Van Apple (Golden Delicious). Pak J. Nutr., 4: 8–10.

**PURIFICATION OF CATALASE BY MODIFIED PROCEDURE
AND SOME PROPERTIES OF ENZYME**

**Nguyen Hoang An, Suminda G. G. D., Nguyen Thi Thu Phuong,
Dinh Nho Thai, Nguyen Thi Hong Loan***

Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT),
Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Ha Noi

SUMMARY

Catalase (EC 1.11.1.6) plays an important role in protecting organism from oxidative effect by breaking down H₂O₂ into H₂O and O₂ molecules. In this study, a modified procedure for catalase from bovine liver and its properties were reported. Bovine liver catalase was purified to electrophoretic homogeneity as a single protein band around 60 kDa on SDS-PAGE by acetone fractionation, followed by ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and CM-Sepharose columns. The specific activity of the purified catalase was 79,277 units per mg of protein (U/mg) with 1.87% recovery and purification fold was roughly 60 times. The catalase was a homo-tetramer with a molecular mass of about 240.987 kDa as determined by native gel electrophoresis. The purified enzyme showed the highest activity at pH 7, 37°C, and remained active over a broad range of pH from 5 to 10 and range of temperature from 4°C to 40°C. Its activity was inactivated by incubating in 60°C for 30 min. The activity of the enzyme was induced by Ca²⁺ and inhibited by Na⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺ and NaN₃. Under the optimal conditions, K_m and K_{cat}/K_m values of the catalase was found to be 23,69 mM and K_{cat}/K_m = 5.106 (M.s)⁻¹, respectively.

Keywords: Bovine liver catalase, purification, oxidative effect.

Citation: Nguyen Hoang An, Nguyen Hoang An, Suminda G. G. D., Nguyen Thi Thu Phuong, Dinh Nho Thai, Nguyen Thi Hong Loan, 2018. Purification of catalase by modified procedure and some properties of enzyme. Tap chi Sinh hoc, 40(2): 214–222. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.10893>.

**Corresponding author email:* loannhbio@gmail.com

Received 14 November 2017, accepted 30 June 2018