

## Nghiên cứu tinh sạch và xác định một số tính chất của catalase từ *Bacillus subtilis* PY79

Phạm Thu Hương<sup>1</sup>, Lê Thị Thủy<sup>1</sup>, Đinh Nho Thái<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Hồng Loan<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

**Tóm tắt:** Catalase là enzyme có mặt ở peroxisome trong hầu hết các tế bào hiếu khí và là một thành phần trung tâm của các quá trình khử độc, ngăn chặn nhanh sự hình thành H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bằng cách xúc tác cho quá trình phân giải H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thành H<sub>2</sub>O và O<sub>2</sub>. Trong nghiên cứu này, catalase từ *Bacillus subtilis* PY79 đã được tinh sạch bằng phương pháp tủa ammonium sulfate bão hòa ở nồng độ 50% kết hợp với sắc kí trao đổi ion âm Q-sepharose và sắc kí trao đổi ion dương CM-sepharose. Catalase tinh sạch có hoạt độ riêng là 30717,2 U/mg và hiệu suất thu hồi đạt 8,9%. Enzyme hoạt động trong khoảng pH từ 5 - 11, nhiệt độ 4 - 40°C và tối thích tại pH 7,0; nhiệt độ 37°C. Enzyme có giá trị K<sub>m</sub> với H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> là 14,4 mM và V<sub>max</sub> đạt 16294,83 U/mg. Ngoài ra, catalase tinh sạch bị ức chế bởi NaN<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaCl ở các nồng độ lần lượt: 5 μM, 15 mM, 50 mM, 2 M và không bị ảnh hưởng bởi MgSO<sub>4</sub> và MnSO<sub>4</sub> đến nồng độ 1 M.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis* PY79, catalase, tinh sạch, tính chất catalase.

### 1. Mở đầu

Catalase (EC 1.11.1.6) là enzyme có mặt ở hầu hết các sinh vật hiếu khí bao gồm thực vật, động vật và vi sinh vật [1]. Enzyme là một trong những thành phần trung tâm của các quá trình khử độc, ngăn chặn nhanh chóng sự hình thành phân ứng hydroxyl bằng cách xúc tác sự phân hủy H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> thành H<sub>2</sub>O và O<sub>2</sub> [2]. Catalase điển hình hoạt động trong khoảng pH 5 - 10, tối ưu tại pH 6 - 8 và ổn định ở nhiệt độ từ 10 - 30°C [3]. Catalase từ các nguồn khác nhau chủ yếu là một tetramer với khối lượng phân tử (KLPT) từ 220 đến 270 kDa [4] và đã được ứng

dụng trong nhiều quy trình công nghệ sinh học khác nhau. Do có hoạt tính phân giải nhanh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nên catalase có khả năng ức chế sự phân giải của tế bào thần kinh, apoptosis, viêm, lão hóa và một loạt các khối u [5-9]; hỗ trợ phân phối thuốc nội bào [10] và sử dụng trong định lượng cholesterol [11]. Theo một số công bố gần đây, sự giảm của catalase có thể đóng vai trò trong quá trình bạc tóc sớm ở người. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tự nhiên được tạo ra bởi các hoạt động trao đổi của cơ thể và catalase có vai trò phân giải chúng rất nhanh. Do vậy, nếu hàm lượng catalase giảm đi, nó sẽ không thể phân hủy hết H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 [12].

\*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24-35575494

Email: loannhbio@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4545>

Catalase từ các vi khuẩn khác nhau đã được tinh sạch và nghiên cứu tính chất như từ chủng *V. rumoiensis* S-1<sup>T</sup> [13], *C. terrigena* [14], chủng *R. radiobacter* 2-1 [15]. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) được xem như chủng vi khuẩn có lợi cho con người và đã được sử dụng để sản xuất các chế phẩm sinh học [16, 17]. Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về tinh sạch và xác định các tính chất của catalase từ nguồn gốc tự nhiên. Các nghiên cứu chủ yếu là định tính và định lượng hoạt tính của catalase có trong mẫu dịch chiết [18]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tinh sạch và xác định một số tính chất của catalase từ *B. subtilis* PY79 với mục tiêu tạo được chế phẩm enzyme có độ tinh sạch và hoạt tính tốt để phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* PY79 là quà tặng của Giáo sư Simon Cutting, Đại học Hoàng Gia Holloway London, Vương quốc Anh.

Gel Q-sepharose Fast Flow, CM-sepharose Fast Flow được mua từ hãng GE Healthcare (Mỹ); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được mua từ hãng Sigma Aldrich (Mỹ); thang chuẩn protein được mua từ Thermo scientific (Mỹ); 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.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Nuôi cấy vi khuẩn và thu nhận dịch chiết protein

Vi khuẩn *B. subtilis* từ môi trường thạch được cấy vào năm môi trường lỏng khác nhau bao gồm LB (Tryptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 1%); DSM (Nutrient Broth 8% g; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; MnCl<sub>2</sub> 10 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 μM; FeSO<sub>4</sub> 1μM); PYS (Peptone 1%, cao nấm men 0,5%, NaCl 0,5%); TBS có 1% cao nấm men (Peptone 1,5%, tryptone 0,5%, cao nấm men 1%, NaCl 0,5%) và môi trường ký hiệu MT5 (Glucose

3%, peptone 0,5%, cao nấm men 0,2%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,61%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O 0,61%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3%, MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,3%) [19], nuôi cấy lắc 200 vòng/phút tại 37°C. Sau 14-16 giờ, trẻ hoá tế bào trong 1 lít môi trường sao cho mật độ tế bào A<sub>600</sub> = 0,05 và cảm ứng vi khuẩn sinh catalase bằng cách bổ sung các nồng độ khác nhau của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cảm ứng 4 lần, mỗi lần cách nhau 10 phút) trong pha sinh trưởng. Thu nhận lại tế bào vi khuẩn sau 0,5 - 3 giờ cảm ứng bằng cách ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút.

Dịch chiết tế bào đã được thu nhận bằng cách hoà tan vi khuẩn trong 50 ml đệm phosphat 50 mM, pH 7,0 (đệm A); siêu âm phá tế bào (4 lần, mỗi lần 30 giây) tại 4°C trong đệm A. Dịch siêu âm sau đó được ly tâm ở 4°C, tốc độ 12000 vòng/phút trong 30 phút để loại bỏ cặn tế bào và thu dịch nổi cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 2.2.2. Tinh sạch enzyme catalase từ dịch chiết vi khuẩn *B. subtilis*

Catalase bước đầu được tinh sạch từ dịch chiết vi khuẩn *B. subtilis* bằng kết tủa với (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bão hòa ở các nồng độ khác nhau 30 - 60%. Sau khi ủ ở 4°C trong 3 giờ, tiến hành loại dịch nổi và thu lấy tủa bằng ly tâm 12000 vòng/phút ở 4°C trong 30 phút, hòa tan phần tủa trong đệm A. Phần lớn catalase đã được tìm thấy trong phân đoạn tủa 50 và 60% ammonium sulfate. Dịch hoà tủa 50% được thẩm tích loại muối qua đêm ở 4°C trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (đệm B) và được sử dụng cho các bước tinh sạch tiếp theo.

Bước tiếp theo, dịch thẩm tích được cho lên cột Q-sepharose (2,5x4 cm) đã được cân bằng với đệm B, tốc độ dòng chảy 0,5 ml/phút. Sau khi rửa các phân đoạn protein không gắn cột bằng đệm B, các phân đoạn protein gắn cột đã được rửa chiết bằng gradient NaCl (0-0,7 M) trong đệm B. Các phân đoạn thu nhận (1 ml) sau đó được xác định hoạt tính của catalase và định lượng protein bằng đo độ hấp thụ tại A<sub>280</sub> nm. Các phân đoạn có hoạt tính của catalase sẽ được dồn lại, cô đặc bằng amplicon 10 kDa

(Millipore) và thẩm tích ở 4°C qua đêm trong đệm CH<sub>3</sub>COONa 20 mM, pH 4,8 (đệm C).

Dịch cô và thẩm tích cho lên cột CM-sepharose (1x2 cm) đã được cân bằng bằng đệm C. Sau khi rửa các protein không gắn hoặc gắn không đặc hiệu, protein gắn cột sẽ được rửa chiết bằng đệm C có lần lượt 0,1 M, 0,3 M và 0,5 M NaCl. Các phân đoạn có hoạt tính của catalase được dồn lại với nhau và thẩm tích loại muối ở 4°C trong đệm A và bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 2.2.3. Xác định hoạt độ của catalase

Hoạt độ của catalase được xác định dựa trên khả năng phân giải cơ chất H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở nhiệt độ 37°C sử dụng máy quang phổ khả biến ở bước sóng 240 nm [19]. Lượng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> phân giải trong mỗi phút được tính bằng cách sử dụng định luật Lambert Beer với hệ số hấp thụ của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ở bước sóng 240 nm là 43,6 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Một đơn vị hoạt độ của catalase phân giải 1 μmol của H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> trong một phút ở 37°C tại pH 7,0.

#### 2.2.4. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định bằng cách sử dụng định luật Lambert Beer với hệ số hấp thụ của catalase ở bước sóng 280 nm là 40,75 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

#### 2.2.5. pH tối thích và ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của catalase

Để xác định pH hoạt động tối thích, catalase tinh sạch từ *B. subtilis* PY79 (212 U) đã được đo hoạt tính ở các dung dịch đệm có pH 4-12 tại nồng độ 50 mM các đệm: CH<sub>3</sub>COONa (pH 4-5); Kali phosphate (pH 6-7); Tris-HCl (pH 8); glycine-NaOH (pH 9-10), đệm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11-12).

Để xác định độ ổn định pH của catalase, enzyme tinh sạch được pha trong đệm có pH từ 4-12 và ủ ở 37°C trong 30 phút. Xác định hoạt độ của catalase như mục 2.2.3 và hoạt độ cao nhất thể hiện 100% hoạt tính của catalase.

#### 2.2.6. Nhiệt độ tối thích và ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt độ của catalase

Để xác định nhiệt độ tối thích cho hoạt động của catalase, enzyme tinh sạch (212 U) được xác định hoạt độ tại dải nhiệt độ từ 20 - 80°C.

Để xác định độ ổn định nhiệt độ của catalase tinh sạch, enzyme được ủ ở 4 - 80°C trong 30 phút. Xác định hoạt độ của catalase như mục 2.2.3 và hoạt độ còn lại cao nhất của catalase được xác định là 100% hoạt tính.

#### 2.2.7. Ảnh hưởng của một số chất đến hoạt động của enzyme

Ảnh hưởng của các chất ức chế (NaN<sub>3</sub>) và ion kim loại (MnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaCl) 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.

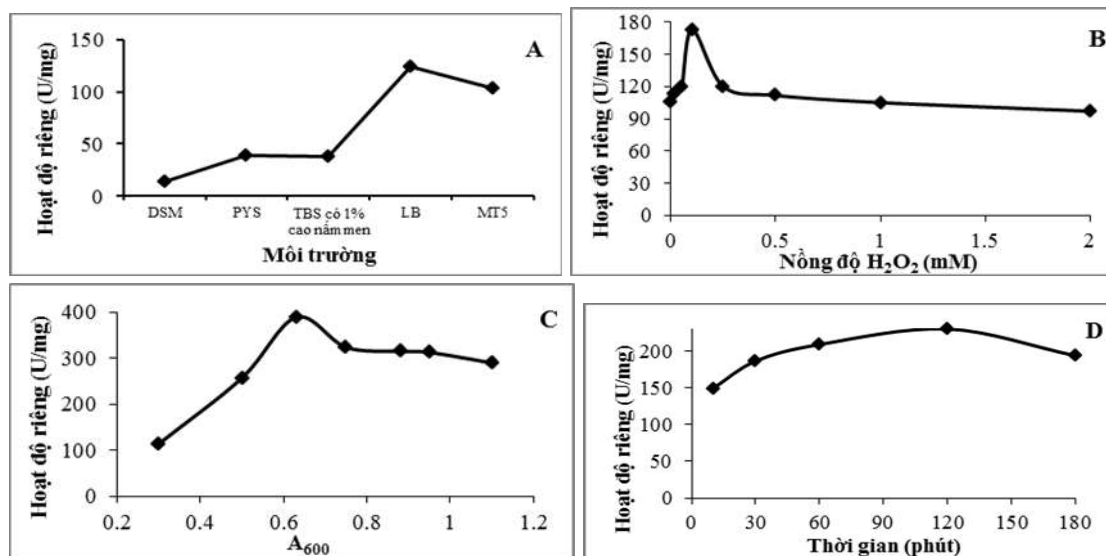
#### 2.2.8. Động học của catalase tinh sạch

Hằng số động học K<sub>m</sub> và V<sub>max</sub> của catalase tinh sạch từ *B. subtilis* PY79 được xác định dựa trên tương quan tốc độ thủy phân H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> của catalase và nồng độ cơ chất theo phương trình Lineweaver - Burk. Nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> được sử dụng trong thí nghiệm là khoảng từ 6 - 30 mM.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Các điều kiện tối ưu cho nuôi cấy *B. subtilis* PY79 sinh catalase

Trong nghiên cứu này, các điều kiện thích hợp cho nuôi cấy *B. subtilis* PY79 sinh catalase đã được xác định. Trong mỗi thí nghiệm, chỉ một điều kiện (môi trường nuôi cấy [Hình 1A], nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Hình 1B], thời điểm cảm ứng [Hình 1C] hoặc thời gian thu tế bào [Hình 1D]) là thay đổi trong khi các điều kiện khác được giữ nguyên. Kết quả được thể hiện ở Hình 1A-D cho thấy, hoạt tính catalase cao nhất khi nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* trong môi trường LB; cảm ứng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tại nồng độ 0,1 mM tại thời điểm giữa pha sinh trưởng của vi khuẩn (A<sub>600</sub> = 0,6 - 0,8) và thu nhận tế bào sau 2 giờ cảm ứng.



Hình 1. Các điều kiện thích hợp cho nuôi cấy *B. subtilis* PY79 sinh catalase. A) môi trường nuôi cấy, B) nồng độ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cảm ứng, C) thời điểm cảm ứng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, D) Thời gian thu sinh khối tế bào.

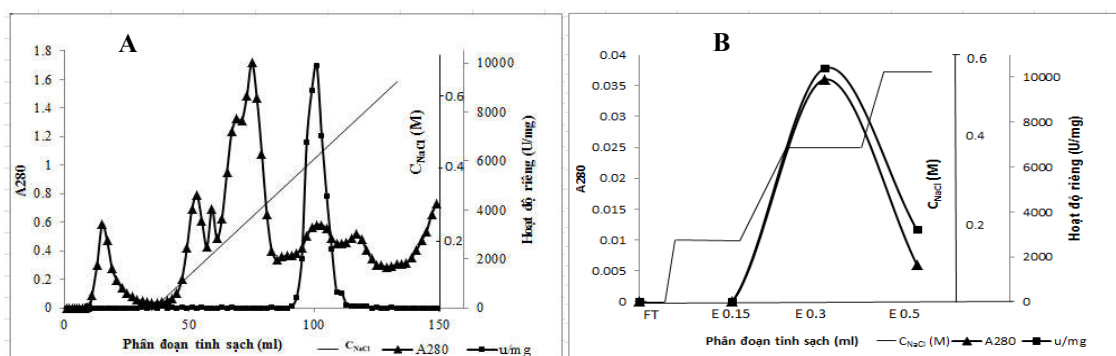
### 3.2. Tinh sạch catalase

Catalase từ dịch chiết vi khuẩn *B. subtilis* nuôi cấy trong điều kiện thích hợp đã được tinh sạch qua ba bước kết tủa thuận nghịch bằng muối trung tính (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, tiếp theo là sắc ký trao đổi anion Q-sepharose và cation CM-

sépharose (Bảng 1, Hình 2). Kết quả cho thấy, enzyme đã được tinh sạch 144 lần với hiệu suất thu hồi 8,9% từ dịch chiết thô và có hoạt độ riêng phân giải H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> là 30717,2 U/mg, cao hơn so với catalase được tinh sạch từ *B. subtilis* sp. (1500 U/mg) [20], và *Neurospora crassa* InaCC F226 (3339,82 U/mg) [21].

Bảng 1. Bảng tóm tắt tinh sạch catalase từ *B. subtilis* PY79

Các phân đoạn	V(ml)	(mg)	(U/mg)	Tổng U	Độ sạch	Hiệu suất thu hồi
Dịch chiết	50	418,2	213,4	89250	1,0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50%	10	275,8	272	74992	1,3	84
Q-Sepharose	18	12,7	3475	44163,4	16,3	50
CM-Sepharose	2,5	0,26	30717,2	7912	144	8,9



Hình 2. Sắc kí đồ các phân đoạn tinh sạch catalase từ dịch chiết *B. subtilis* qua cột trao đổi anion Q-sepharose (A) và CM-sepharose (B).

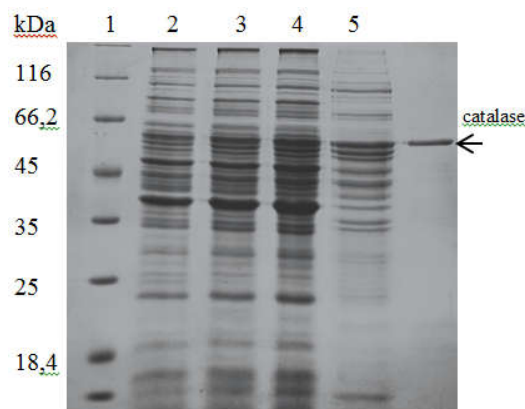
Kết quả SDS-PAGE (Hình 3) cũng cho thấy sự có mặt của duy nhất 1 băng protein khối lượng phân tử (KLPT) khoảng gần 66 KDa tương tự như KLPT của catalase tinh sạch từ chủng *B. subtilis* 168 [22].

### 3.3. Một số tính chất của catalase tinh sạch

Trong nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành xác định một số tính chất của catalase tinh sạch từ dịch chiết vi khuẩn *B. subtilis*.

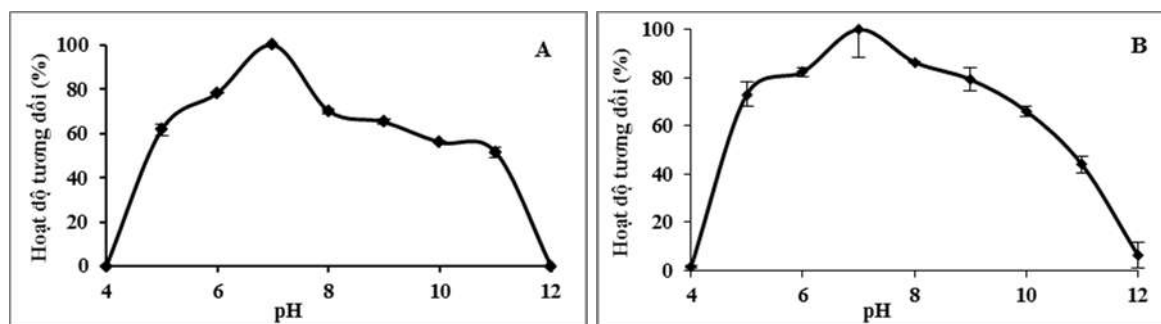
#### Ảnh hưởng của pH và độ ổn định pH

Ảnh hưởng của pH đến hoạt độ của catalase tinh sạch từ *B. subtilis* PY79 đã được khảo sát ở khoảng pH từ 4,0 đến 12,0 (Hình 4A). Phạm vi hoạt động của catalase được quan sát thấy từ pH 5,0 đến 11,0 với pH tối ưu là pH 7,0. Khi enzyme được ủ trong dung dịch đệm có giá trị pH từ 4,0 đến 12,0 ở 37°C trong 30 phút, enzyme cho thấy độ ổn định tối đa 100% ở pH 7,0 và hơn 80% hoạt tính vẫn được giữ ở pH 6,0 và pH 8,0 (Hình 4B).



Hình 3. Điện di SDS-PAGE các phân đoạn tinh sạch catalase từ dịch chiết *B. subtilis*.

1. Thang chuẩn protein, 2. Protein tổng số trong dịch chiết *B. subtilis*, 3. Dịch hoà tan tủa 50%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4. Protein tổng số lên cột Q-sepharose, 4. Phân đoạn gắn cột Q-sepharose và lên cột CM-sepharose, 5. Phân đoạn tinh sạch qua cột CM-sepharose.



Hình 4. Ảnh hưởng của pH (A), độ ổn định pH (B) đến hoạt độ của catalase tinh sạch từ *B. subtilis*.

#### Ảnh hưởng của nhiệt độ và độ ổn định nhiệt độ

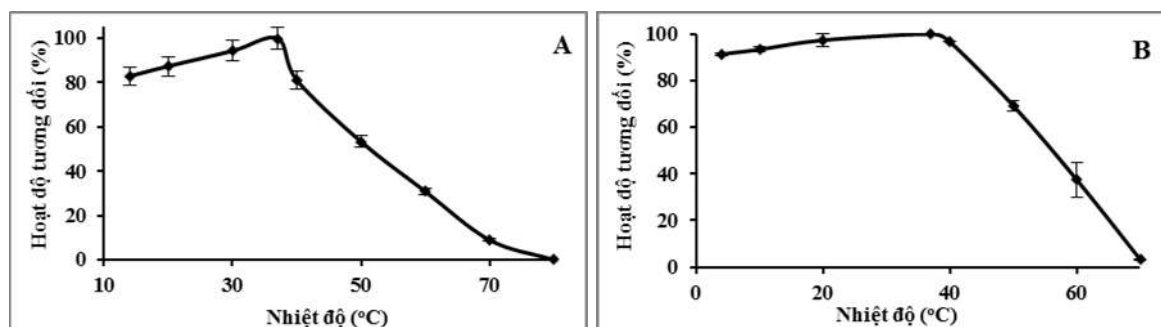
Hoạt tính của catalase tinh sạch từ *B. subtilis* PY79 đã được xác định ở các nhiệt độ khác nhau (20-80°C). Kết quả cho thấy, nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của catalase là ở 37°C (Hình 5A). Mặt khác, hoạt tính của enzyme vẫn ổn định ở khoảng nhiệt độ 4-40°C và vẫn còn hơn 70% khi xử lý enzyme ở 50°C trong 30 phút (Hình 5B).

#### Ảnh hưởng của một số chất đến hoạt động của catalase

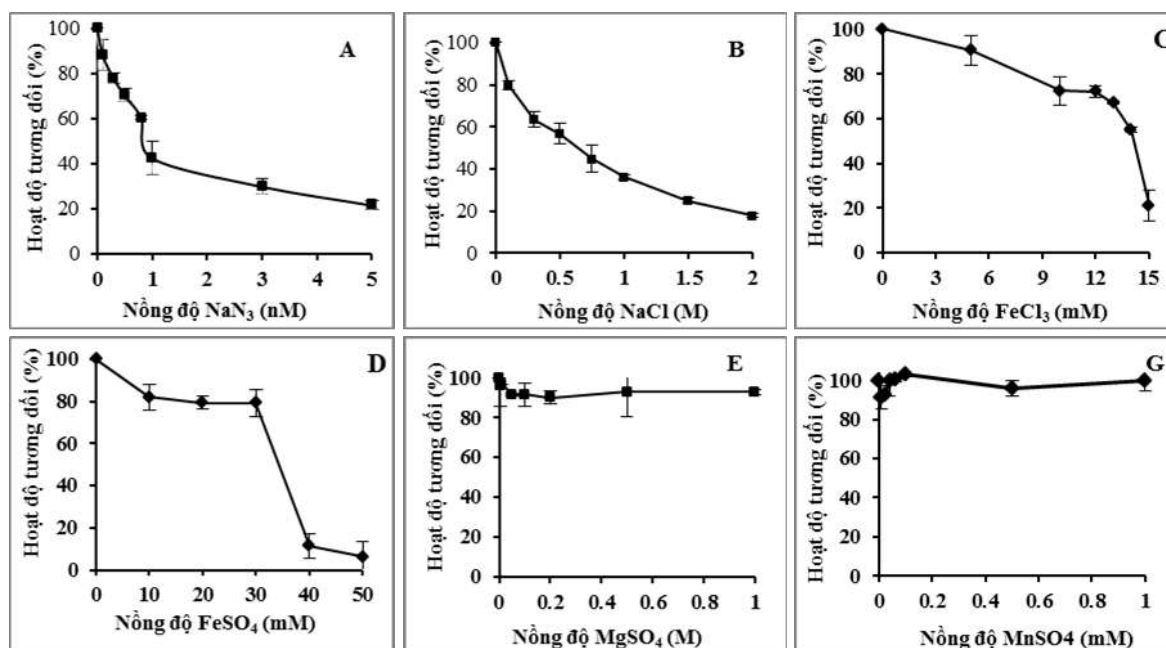
Ảnh hưởng của các chất ( $\text{NaN}_3$ ) và các ion kim loại ( $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ) lên hoạt động của catalase (Hình 6) cho thấy  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$  là các chất ức chế đối với hoạt động của catalase, làm mất hơn 80-90% hoạt tính của enzyme ở các nồng độ lần lượt là: 5  $\mu\text{M}$ , 2 M, 15 mM và 50 mM. Trong khi đó,  $\text{MgSO}_4$  và  $\text{MnSO}_4$  không ảnh hưởng đến hoạt độ của catalase. Hussein et al. (2012)

khi thử ảnh hưởng của các chất đối với hoạt động của catalase được tinh sạch từ *Bacillus sp* ở cùng nồng độ là 5 mM cũng cho thấy  $\text{NaN}_3$ , KCN là các chất ức chế mạnh đối với hoạt động của catalase; còn ở nồng độ 0,5 mM cho thấy  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_2$  và  $\text{FeSO}_4$  không ảnh hưởng đến

hoạt độ của enzyme [20]. Kết quả này cũng cho thấy, không thể bổ sung chất kháng khuẩn  $\text{NaN}_3$  cho bảo quản catalase ở nhiệt độ phòng cũng như cần loại  $\text{NaCl}$  sau các bước tinh sạch enzyme.



Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và độ bền nhiệt độ của catalase (B) tinh sạch từ *B. Subtilis*.

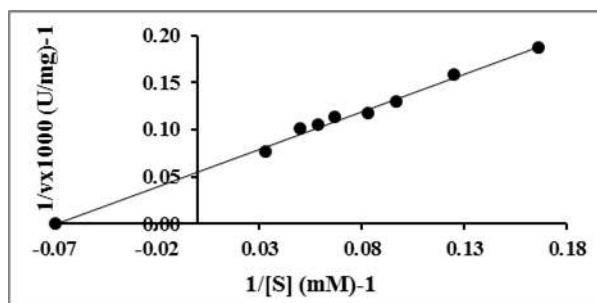


Hình 6. Ảnh hưởng của các chất đến hoạt độ của catalase tinh sạch từ *B. subtilis*.

#### Động học của catalase tinh sạch

Trong nghiên cứu này, theo phương trình Lineweaver-Burk,  $K_m$  và  $V_{max}$  của catalase tinh sạch đã được xác định tương ứng là 14,4 mM

với  $\text{H}_2\text{O}_2$  và 16294,83 U/mg (Hình 7). Kết quả này tương tự với các công bố trước đây về  $K_m$  của catalase từ vi khuẩn là thường trong khoảng 8,8 - 40 mM [22, 23].



Hình 7. Sự phụ thuộc của tốc độ phản ứng thủy phân  $H_2O_2$  của catalase ở các nồng độ  $H_2O_2$  khác nhau theo phương trình Lineweaver-Burk

#### 4. Kết luận

Các điều kiện thích hợp cho nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* PY79 sinh catalase bao gồm: môi trường nuôi cấy LB lỏng, tại nhiệt độ  $37^\circ C$ , cảm ứng tế bào 4 lần với  $H_2O_2$  0,1 mM tại thời điểm giữa pha sinh trưởng của tế bào và tiến hành thu sinh khối sau 2 giờ cảm ứng.

Catalase đã được tinh sạch từ dịch chiết vi khuẩn *B. subtilis* bằng kết tủa chọn lọc với  $(NH_4)_2SO_4$  50%, sắc ký cột trao đổi anion Q-sepharose và trao đổi cation CM - sepharose. Catalase sau tinh sạch có một băng protein kích thước khoảng 66 kDa trên gel SDS-PAGE với hoạt độ riêng phân giải  $H_2O_2$  30717,2 U/mg, độ tinh sạch tăng 114 so với dịch chiết ban đầu và hiệu suất thu hồi đạt 8,9%.

Catalase tinh sạch hoạt động trong khoảng pH từ 5 – 11, nhiệt độ 4 –  $40^\circ C$  và hoạt động tối thích tại pH 7,0; nhiệt độ  $37^\circ C$ . Enzyme có giá trị  $K_m$  là 14,4 mM và  $V_{max}$  đạt 16294,83 U/mg. Ngoài ra, catalase tinh sạch bị mất 80 - 90% hoạt tính khi có mặt bởi một trong các chất  $NaN_3$ ,  $FeCl_3$ ,  $FeSO_4$ ,  $NaCl$  ở các nồng độ lần lượt: 5  $\mu M$ , 15 mM, 50 mM, 2 M và không bị ảnh hưởng bởi  $MgSO_4$  và  $MnSO_4$  đến nồng độ 1 M.

#### Lời cảm ơn

Công trình nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí bởi Đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số QG.16.82.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Bailly C., Leymarie J., Lehner A., Rousseau S., Come D., Corbineau F., Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying, *Journal of Experimental Botany* 55 (2004) 475.
- [2] Shin DH., Choi YS., Cho YH., Unusual properties of catalase a (Kat) of *Pseudomonas aeruginosa* Pa14 are associated with its biofilm peroxide resistance, *Journal of Bacteriology* 190 (2008) 2663.
- [3] Aydemir T., Kuru K., Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocytes and the effect of various inhibitors an enzyme activity, *Turkish Journal of Chemistry* 27 (2003) 85.
- [4] Nadeem MS., Khan IA., Murtaza BN., Muhammad K., Rauf A., Purification and properties of liver catalase from water buffalo (*Budalus bubalis*), *South Asian Journal of Life Sciences* 32 (2015) 51.
- [5] Vuillaume M., Reduced oxygen species, mutation induction and cancer initiation, *Mutation Research* 186 (1987) 43.
- [6] Miyamoto T., Hayashi M., Takeuchi A., Okamoto T., Kawashima S., Takii T., Ayashi H., Onozaki K., Identification of a novel growth-promoting factor with a wide target cell spectrum from various tumor cells as catalase, *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 120 (1996) 725.
- [7] Esch F., Lin KI., Hills A., Zaman K., Baraban JM., Purification of a multipotent antideath activity from bovine liver and its identification as arginase: nitric oxide-independent inhibition of neuronal apoptosis, *Journal of Neuroscience* 18 (1998) 4083.

- [8] Yabuki M., Kariya S., Ishisaka R., Yasuda T., Yoshioka T., Horton AA., Utsumi K., Resistance to nitric oxide-mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase, *Free Radical Biology and Medicine* 26 (1999) 325.
- [9] Halliwell B., Gutteridge JM., Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal* 219 (2011) 1.
- [10] Siwale RC., Yeboah GK., Addo R., Oettinger CW., D'Souza MJ., The effect of intracellular antioxidant delivery (catalase) on hydrogen peroxide and pro-inflammatory cytokine synthesis: A new therapeutic horizon, *Journal of Drug Target* 17 (2009) 710.
- [11] Robinet P., Wang Z., Hazen SL., Smith JD., A simple and sensitive enzymatic method for cholesterol quantification in macrophages and foam cells, *Journal of Lipid Research* 51 (2010) 3364.
- [12] Wood JM., Decker H., Hartmann H., Senile hair graying: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair, *FASEB Journal* 23 (2009) 2065.
- [13] Yumoto I., Ichihashi D., Iwata H., Istokivics A., Ichise N., Matuyama H., Okuyama H., Kosei K., Purification and Characterization of Catalase from the Facultatively Psychrophilic Bacterium *Vibriorumoiensis* S-1T Exhibiting High Catalase Activity, *Journal of Bacteriology* 182 (2000) 1903.
- [14] Zámocký M., Godočíková J., Gašperík J., Koller F., Polek B., Expression, purification, and sequence analysis of catalase-1 from the soil bacterium *Comamonas terrigena* NH<sub>3</sub>, Protein expression and purification 36 (2004) 115.
- [15] Hossain SM., Nakayama M., Uchiyama H., Nakajima-Kambe T., Purification and Molecular Cloning of Catalase from *Rhizobium radiobacter* Strain 2-1, *Journal of Environmental Biotechnology* 8 (2008) 35.
- [16] Hong HA., Huang JM., Khaneja R., Hiep LV., Urdaci MC., Cutting SM., The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as food probiotics, *Journal of Applied Microbiology* 105 (2008) 510.
- [17] Lefevre M., Racedo SM., Denayrolles M., Ripert G., Desfougères T., Lobach AR., Simon R., Pélerin F., Jüsten P., Urdaci MC., Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use a probiotic in human, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 83 (2017) 54.
- [18] Võ Thị Mai Hương, Trần Thanh Phong, Một số đặc trưng hóa sinh và khả năng kháng khuẩn của dịch chiết quả nhàu (*Morinda citrifolia* L.), Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5 (2006) 1073.
- [19] Fusho Y., Yajima Y., Catalase from *Bacillus subtilis* IAM 1026 (Ferm BP-4844), United States Patent 5486467 (1996).
- [20] Hussein AA., Purification and characterization of thermo-alkali stable catalase from *Bacillus sp.*, *International Research Journal Biotechnology* 3 (2012) 207.
- [21] Suryani, Ambarsari L., Lindawati E., Isolation, Fractionation and Characterization of Catalase from *Neurospora crassa* (InaCC F226), *Conference Series: Earth and Environmental Science* 58 (2017) 012068.
- [22] Loewen PC., Switala J., Purification and characterization of catalase-1 from *Bacillus subtilis*, *Biochemistry and Cell Biology* 65 (1987) 939.
- [23] Santoso P., Ambarsari L., Suryani, Yopi, Purification and Characterization of Catalase from Indigenous Fungi of *Neurospora crassa* InaCC F226, *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology* 6 (2016) 2088.



## Purification and Characterization Catalase from *Bacillus subtilis* PY79

Pham Thu Hương<sup>1</sup>, Le Thi Thuy<sup>1</sup>, Dinh Nho Thai<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Hong Loan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT), VNU University of Science,  
334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam

**Abstract:** Catalase is an enzyme present in peroxisome in most aerobic cells and is a central component of detoxifying processes that rapidly suppress the formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by catalysing the degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub>. In this study, catalase was purified from *Bacillus subtilis* PY79 by three steps: ammonium sunfate precipitation, anion exchange chromatography on Q-sepharose and cation exchange chromatography on CM-sepharose. The purified catalase showed high specific activity of 30717.2 U/mg with 8.89% yield. The enzyme remained active over a broad pH range of 5 - 11, with a peak in activity at pH 7.0. A broad optimum temperature range from 4 - 40°C was observed with highest activity at 37°C. The apparent K<sub>m</sub> for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was 14.4 mM and its V<sub>max</sub> was 16294.83 U/mg. Moreover, it was inhibited by NaN<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NaCl at concentrations of 5 μM, 15 mM, 50 mM, 2 M, respectively and MgSO<sub>4</sub> or MnSO<sub>4</sub> at 1 M was no inhibitory effect on this enzyme.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* PY79, catalase, characterization, purification.