



## PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN TỐI ƯU CHO HOẠT ĐỘNG CỦA ENZYME XANTHINE OXIDASE TỪ SỮA BÒ

Từ Văn Quyền<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Chơn<sup>2</sup> và Đái Thị Xuân Trang<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh ngành Công nghệ sinh học K2014, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đái Thị Xuân Trang (email: [dtxtrang@ctu.edu.vn](mailto:dtxtrang@ctu.edu.vn))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/08/2017

Ngày nhận bài sửa: 20/10/2017

Ngày duyệt đăng: 26/04/2018

### Title:

Isolating and determining the optimal conditions for activity of xanthine oxidase from bovine milk

### Từ khóa:

Allopurinol, sữa bò, xanthine và xanthine oxidase

### Keywords:

Allopurinol, bovine milk, xanthine and xanthine oxidase

### ABSTRACT

The aim of this project was to isolate the xanthine oxidase (XO) from cow milk, determine the optimal conditions for activity of the isolated enzyme, and prove that this enzyme could replace the commercial enzyme in research about inhibiting the activity of this enzyme. The XO was isolated from cow milk by ammonium sulfate precipitation method, with the concentration of 0.509 mg protein/mg crude extract. Enzyme activity and specific activity of XO were 0.2095 U/mg crude extract and 0.412 U/mg protein, respectively. The optimum conditions for the enzymatic activity were determined at pH 7.5, 25°C, 0.02 U/mL enzyme XO, 0.15 mM xanthine. The inhibitory effect of allopurinol to the activity of the isolated and commercial XO enzyme were comparable. The results indicated that the commercial enzyme could be replaced by the XO enzyme isolated from cow milk in research about inhibiting the activity of this enzyme.

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm phân lập enzyme xanthine oxidase (XO) từ sữa bò, xác định một số điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme XO và chứng minh enzyme XO được phân lập có thể thay thế enzyme XO thương mại trong các nghiên cứu về ức chế hoạt tính của enzyme XO. Phương pháp trích enzyme được sử dụng trong nghiên cứu này là dùng ammonium sulfate để kết tủa enzyme. Enzyme XO được phân lập từ sữa bò có hàm lượng protein là 0,509 mg/mg enzyme thô, enzyme sau khi được phân lập có hoạt tính và hoạt tính riêng lần lượt là 0,2095 U/mg enzyme thô và 0,412 U/mg protein. Điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme XO phân lập được xác định ở pH 7,5; 25°C; 0,02 U/mL enzyme XO và 0,15 mM xanthine. Hiệu quả ức chế của allopurinol đối với hoạt tính của enzyme XO phân lập và thương mại là tương đương nhau. Từ kết quả nghiên cứu này cho thấy enzyme XO được phân lập từ sữa bò có thể thay thế được enzyme thương mại trong các nghiên cứu về ức chế hoạt tính của enzyme XO.

Trích dẫn: Từ Văn Quyền, Nguyễn Minh Chơn và Đái Thị Xuân Trang, 2018. Phân lập và khảo sát điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme xanthine oxidase từ sữa bò. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(3B): 59-66.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh gout là biểu hiện lâm sàng của tình trạng tăng acid uric máu (Kasper *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, tăng acid uric trong máu thường kèm theo tăng nguy cơ mắc các bệnh như tim mạch, sỏi thận, đái tháo đường và các hội chứng chuyển hóa khác. Những bệnh có liên quan đến tăng acid uric trong máu đang khá phổ biến và có chiều hướng gia tăng trên thế giới. Tình trạng tăng acid uric trong máu bắt nguồn từ hoạt động của enzyme xanthine oxidase (XO) (E.C 1.17.3.2). Hoạt động của enzyme XO là nguyên nhân dẫn tới sự tạo ra nhiều gốc tự do có hại cho cơ thể (Van *et al.*, 2002). Enzyme XO là một phức hợp metallo-flavoenzyme xúc tác hai bước cuối trong quá trình phân giải purine, cụ thể là biến đổi hypoxanthine thành xanthine và xanthine thành acid uric. Ức chế XO bằng các hoạt chất hóa học là mục tiêu hàng đầu trong việc điều trị tăng acid uric máu và giảm sự sản xuất các gốc tự do (Terkeltaub, 2003). Để nghiên cứu xác định các chất có khả năng ức chế enzyme XO thì trước hết phải thực hiện trong điều kiện *in vitro* với enzyme đã được phân lập. Từ trước đến nay, tất cả các nghiên cứu ở Việt Nam về enzyme XO đều sử dụng enzyme nhập nội rất đắt tiền (Nguyễn Thùy Dương *và ctv.*, 2011; Hoàng Thị Thanh Thảo *và ctv.*, 2013). Vì vậy, việc nghiên cứu phân lập enzyme XO từ các nguồn nguyên liệu tại địa phương nhằm thay thế nguồn enzyme nhập nội để sử dụng vào các nghiên cứu nói trên là hết sức cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập được enzyme XO từ sữa bò, xác định một số điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme XO và chứng minh được enzyme XO đã được phân lập có thể thay thế enzyme XO thương mại trong các nghiên cứu có liên quan.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Phân lập enzyme xanthine oxidase từ sữa bò

Sữa bò được thu từ Trại Nghiên cứu và Thực nghiệm Nông nghiệp - Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng - Trường Đại học Cần Thơ.

Enzyme XO từ sữa bò được phân lập theo phương pháp của Massey *et al.* (1969) có hiệu chỉnh như sau: 3 L sữa bò tươi vừa vắt từ cơ thể bò được cho vào thùng lạnh, nhanh chóng mang về phòng thí nghiệm và tiến hành phân lập enzyme ở điều kiện 4°C. Trước tiên, 3 L sữa bò tươi được cho thêm vào các chất lần lượt như sau: 7,5 mL ethylenediaminetetraacetic acid 0,3 M, pH 7,0; 3 mL salicylate 1 M, pH 7,0; 3,6 g cysteine·HCl; 3 mL phenylmethylsulfonyl fluoride 0,1 M (được pha trong ethanol); 47,4 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 4,74 g pancreatin.

Hỗn hợp được khuấy trong 30 phút, sau đó để yên qua đêm ở 4°C.

Sau 24 giờ, hỗn hợp được thêm 0,6 kg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và khuấy trong 1 giờ. Tiếp theo, hỗn hợp được thêm 0,5 L 1-butanol lạnh (-20°C), khuấy 30 phút và tiếp tục để yên hỗn hợp qua đêm ở 4°C.

Khi hỗn hợp tạo thành 2 lớp, bỏ lớp lipid đông đặc phía trên, lấy lớp dung dịch lỏng ở phía dưới và thêm vào 160 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> với thể tích 2,25 L, sau đó khuấy trong 30 phút và để yên 1 giờ. Hỗn hợp tách thành 2 lớp, lấy lớp enzyme XO thô đông đặc phía trên và bỏ lớp dung dịch phía dưới.

Tiếp theo, enzyme XO thô được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 20 phút. Sau khi ly tâm, hỗn hợp tách thành 3 lớp, lấy lớp giữa (trạng thái rắn), bỏ 2 lớp dung dịch phía trên và phía dưới. Chất rắn sau ly tâm được cho vào 45 mL dung dịch đệm phosphate 0,1 M; ethylenediaminetetraacetic acid 0,3 mM, salicylate 1 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 10 μM, pH 6,0 và thẩm tích trong 72 giờ. Sản phẩm sau thẩm tích được đông khô chân không và sau đó trữ ở -20°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Quy trình phân lập enzyme XO được tóm tắt trong sơ đồ Hình 1.

### 2.2 Xác định sự hiện diện của enzyme xanthine oxidase sau khi phân lập

Hàm lượng protein hòa tan trong hỗn hợp sau khi phân lập được xác định theo phương pháp Folin-Lowry dựa vào phản ứng màu của protein với thuốc thử Folin-phenol (Lowry *et al.*, 1951). Sự hiện diện của enzyme XO được xác định bằng phương pháp điện di SDS-PAGE được thực hiện theo Harlow và Lane (1988).

### 2.3 Xác định hoạt tính của enzyme xanthine oxidase sau khi phân lập

Hoạt tính của enzyme XO được xác định bằng phương pháp quang phổ của Bergmeyer *et al.* (1974). Hỗn hợp phản ứng gồm 1,9 mL dung dịch đệm phosphate (pH 7,5), 1 mL xanthine nồng độ 0,15 mM và 0,1 mL enzyme XO nồng độ 1 mg/mL. Mẫu trắng được thực hiện trong điều kiện không có enzyme. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 25°C. Thời gian phản ứng (T) được tính từ lúc cho enzyme vào hỗn hợp mẫu thử đến khi giá trị hấp thụ quang phổ bắt đầu không tăng thêm nữa. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 290 nm.

Hoạt tính của enzyme (U/mL enzyme) được tính bằng công thức

$$\frac{(A_{\text{mẫu thử}} - A_{\text{mẫu trắng}}) \times 3}{12,2 \times 0,1 \times T}$$

Trong đó:

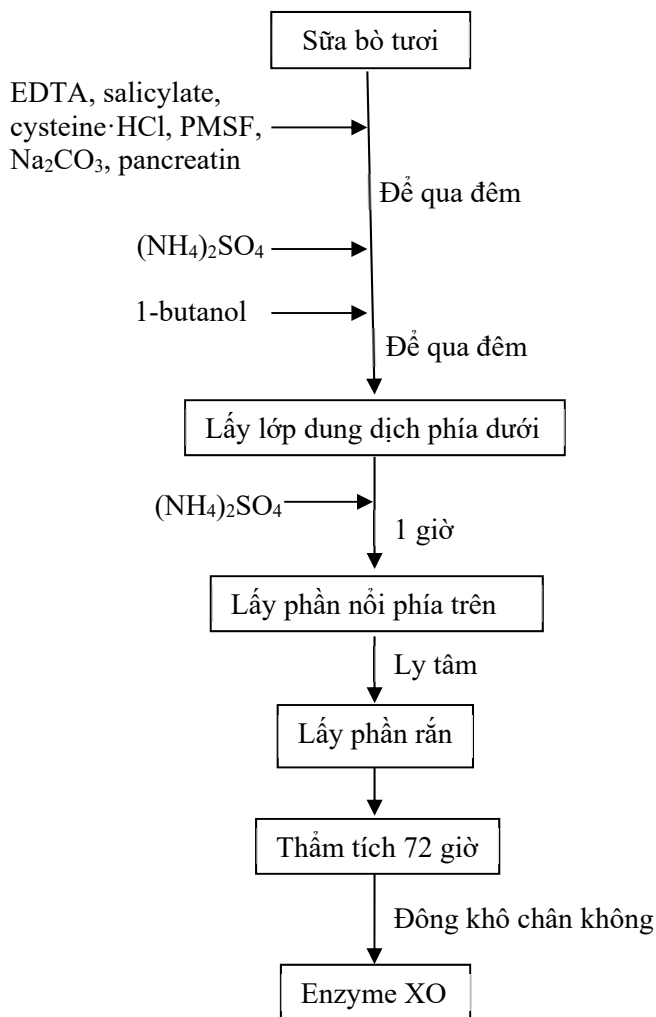
A: Độ hấp thu quang phổ lớn nhất của mẫu trong thời gian phản ứng.

12,2: Hệ số hấp thụ milimol phân tử của acid uric tại bước sóng 290 nm ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

3: Thể tích hỗn hợp phản ứng (mL)

0,1: Thể tích enzyme cho vào (mL)

T: Thời gian phản ứng



Hình 1: Sơ đồ tóm tắt quy trình phân lập enzyme XO từ sữa bò

#### 2.4 Khảo sát nhiệt độ và pH phù hợp cho hoạt động của enzyme xanthine oxidase

Mục đích của thí nghiệm là xác định pH và nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme XO. Phản ứng xúc tác của enzyme xanthine oxidase được thực hiện tương tự như trên. Thí nghiệm gồm 2 nhân tố là pH với các mức độ pH 6,5; 7; 7,5 và 8,0; và nhiệt độ ở các mức độ 20, 25, 30 và 35°C.

#### 2.5 Khảo sát nồng độ xanthine và xanthine oxidase phù hợp cho phản ứng

Thí nghiệm khảo sát nồng độ xanthine và XO phù hợp được thực hiện trên đĩa 96 giếng dựa vào hiệu suất phản ứng tạo thành acid uric từ xanthine, với sự xúc tác của enzyme XO ở nhiệt độ 25°C và pH 7,5 (xác định từ thí nghiệm trên). Hỗn hợp trong

mỗi giếng thử bao gồm: 85  $\mu\text{L}$  dung dịch đệm phosphate (0,05 M; pH 7,5), 60  $\mu\text{L}$  xanthine, 30  $\mu\text{L}$  enzyme XO, sau 30 phút cho thêm 25  $\mu\text{L}$  HCl 1 N. Dung dịch xanthine được sử dụng trong thí nghiệm với các nồng độ 0; 0,075; 0,15; 0,3 và 0,6 mM. Dung dịch enzyme XO được sử dụng với các nồng độ 0; 0,005; 0,01; 0,02 và 0,04 U/mL. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự như mẫu thử, nhưng HCl được cho vào trước enzyme (Nguyen *at al.*, 2004).

Lượng acid uric tạo thành theo lý thuyết nếu phản ứng xảy ra hoàn toàn được xác định dựa vào lượng xanthine cho vào hỗn hợp. Tuy nhiên trên thực tế, lượng acid uric tạo ra thường ít hơn trên lý thuyết. Dựa vào đường chuẩn acid uric, lượng acid uric thực tế sinh ra (mM) được định lượng bằng cách đo độ hấp thu quang phổ ở bước sóng 290 nm.

Lượng acid uric được tạo thành theo lý thuyết (mM) bằng lượng xanthine cho vào hỗn hợp (mM). Hiệu suất phản ứng tạo thành acid uric từ xanthine dưới

sự xúc tác của enzyme XO được tính theo công thức sau:

$$\text{Hiệu suất phản ứng (\%)} = \frac{\text{Lượng acid uric tạo thành trên thực tế (mM)}}{\text{Lượng acid uric tạo thành trên lý thuyết (mM)}} \times 100\%$$

Đường chuẩn acid uric được xác định như sau: acid uric được pha trong dung dịch đệm phosphate (0,05 M; pH 7,5) thành các nồng độ 0,025; 0,05, 0,1; 0,2; 0,4 và 0,6 mM. Thí nghiệm được khảo sát trong đĩa 96 giếng với thể tích dung dịch cho vào giếng là 200  $\mu$ L. Mẫu trắng là mẫu chứa 200  $\mu$ L dung dịch đệm phosphate. Hàm lượng acid uric được đo ở bước sóng 290 nm. Độ hấp thụ quang phổ của acid uric trong hỗn hợp là độ hấp thụ quang phổ chênh lệch giữa các mẫu so với mẫu trắng. Sử dụng độ hấp thụ quang phổ của acid uric ở các nồng độ khác nhau để xây dựng đường chuẩn acid uric.

### 2.6 So sánh hoạt tính của enzyme xanthine oxidase phân lập từ sữa bò và enzyme xanthine oxidase thương mại

Khả năng ức chế enzyme XO của allopurinol (AP) được thực hiện trên đĩa 96 giếng dựa vào lượng acid uric tạo thành (Nguyen *et al.*, 2004; Anam *et al.*, 2017). Hỗn hợp trong mỗi giếng thử bao gồm: 50  $\mu$ L dung dịch AP, 35  $\mu$ L dung dịch đệm phosphate, 30  $\mu$ L dung dịch enzyme XO 0,02 U/mL, ủ ở điều kiện 25°C trong 15 phút, tiếp theo cho thêm 60  $\mu$ L dung dịch xanthine 0,15 mM ủ ở 25°C trong 30 phút. Sau đó, 25  $\mu$ L HCl 1 N được thêm vào để cố định mẫu. Cuối cùng mẫu được đo ở bước sóng 290 nm để xác định lượng acid uric tạo thành. Dung dịch AP được sử dụng với các nồng độ 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 và 20  $\mu$ g/mL. Tương ứng với mỗi giếng thử, có một giếng đối chứng được thực hiện. Giếng đối chứng là giếng được thực hiện tương tự như giếng thử. Tuy nhiên, HCl được cho vào giếng trước khi cho enzyme XO vào. Mỗi giếng được thực hiện lặp lại 3 lần.

AP cũng được sử dụng để so sánh hiệu quả ức chế hoạt động của enzyme XO phân lập từ sữa bò và enzyme thương mại.

Phần trăm ức chế được tính theo công thức

$$I (\%) = [(A_{\text{đối chứng}} - A_{\text{thử}}) / A_{\text{đối chứng}}] \times 100$$

Trong đó:

$A_{\text{đối chứng}}$ : Là độ hấp thụ quang phổ của mẫu đối chứng

$A_{\text{thử}}$ : Là độ hấp thụ quang phổ của mẫu thử

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

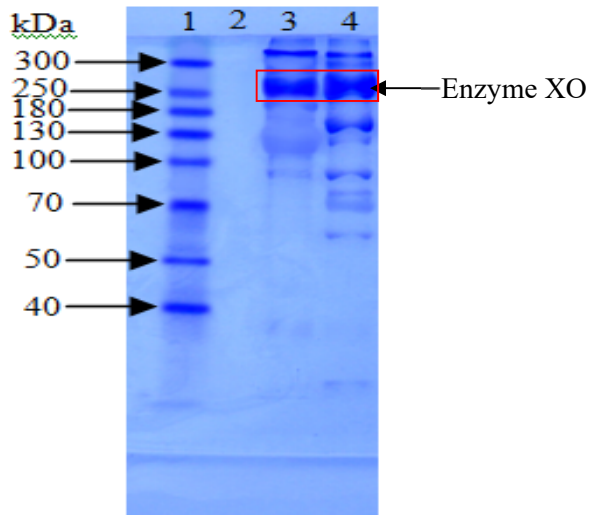
### 3.1 Kết quả về phân lập và xác định hoạt tính enzyme xanthine oxidase từ sữa bò

Sữa bò là nguyên liệu được chọn để phân lập enzyme XO vì enzyme XO có nhiều trong sữa bò và enzyme XO từ sữa bò gần giống với enzyme XO từ cơ thể người (Enroth *et al.*, 2000). Ngoài ra, sữa bò là nguồn nguyên liệu dễ tìm, giá rẻ ở địa phương. Sử dụng phương pháp của Massey *et al.* (1969) để phân lập enzyme XO vì cho đến thời điểm này, đây là phương pháp phân lập hiệu quả và được nhiều tác giả sử dụng phân lập enzyme cho các nghiên cứu về cấu trúc, chức năng và khả năng ức chế enzyme XO (Cao *et al.*, 2014).

Từ 3 L sữa bò tươi đã phân lập được 1,5 g enzyme thô ở trạng thái rắn với hàm lượng protein là 0,509 $\pm$ 0,003 mg/mg enzyme thô, số đơn vị hoạt tính có trong 1 mg enzyme thô là 0,2095  $\pm$  0,0005 U và hoạt tính riêng là 0,412 $\pm$ 0,001 U/mg protein. Một đơn vị hoạt tính của enzyme XO (U) được định nghĩa là lượng enzyme XO xúc tác chuyển 1  $\mu$ mol xanthine thành acid uric trong mỗi phút ở điều kiện 25°C và pH 7,5. Hoạt tính riêng của enzyme XO (U/mg protein) được xác định là số đơn vị hoạt tính của enzyme có trong 1 mg protein và là đại lượng đặc trưng cho độ tinh sạch của enzyme. Trong khi hoạt tính riêng của enzyme thương mại (Sigma Aldrich, Mỹ; mã hàng X1875) được công bố từ nhà sản xuất là 0,6 U/mg protein. So sánh hoạt tính riêng của enzyme XO phân lập được và enzyme XO thương mại cho thấy enzyme XO thương mại có độ tinh sạch cao hơn enzyme XO phân lập được.

### 3.2 Kết quả điện di xác định sự hiện diện của enzyme xanthine oxidase sau khi phân lập

Kết quả điện di cho thấy enzyme thô phân lập được từ sữa bò có sự xuất hiện của băng trùng với băng của enzyme XO thương mại và có trọng lượng phân tử khoảng 283 kDa (Bray, 1975) (Hình 2). Từ kết quả trên, nghiên cứu đã phân lập được enzyme XO từ sữa bò có hoạt tính xúc tác phản ứng chuyển hóa xanthine thành acid uric.



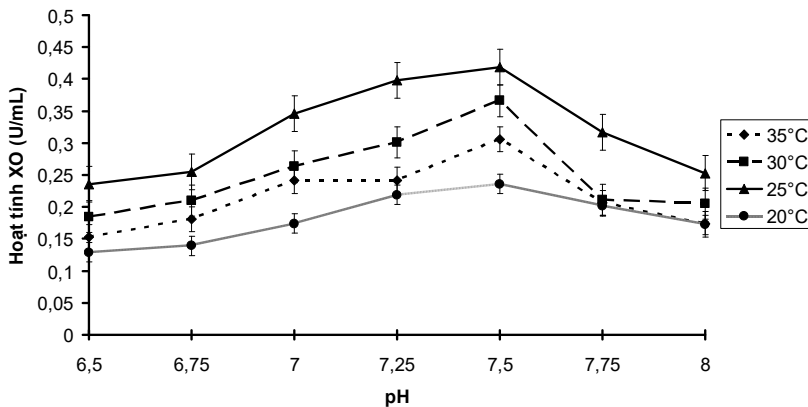
**Hình 2: Kết quả điện di SDS-PAGE của enzyme XO phân lập và thương mại**

(1): Marker chuẩn (40 – 300 kDa), thể tích 6  $\mu$ L; (2): Nước cất, thể tích 6  $\mu$ L; (3): Enzyme XO thương mại (Sigma Aldrich, Mỹ), thể tích 2  $\mu$ L; (4): Enzyme XO phân lập từ sữa bò, thể tích 12  $\mu$ L của dung dịch 2 mg protein/mL

**3.3 Khảo sát nhiệt độ và pH phù hợp cho hoạt động của enzyme xanthine oxidase phân lập từ sữa bò**

Kết quả trình bày ở Hình 3 cho thấy hoạt tính của enzyme XO cao nhất ở nhiệt độ 25°C và pH 7,5, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tất cả các nghiệm thức khác. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Evans *et al.* (2004). Nhóm tác giả này đã xác định được pH tối ưu cho hoạt động của enzyme XO từ sữa bò là 7,5. Ngoài ra, pH tối

ưu của enzyme XO từ vi khuẩn *Arthrobacter luteus*, từ gan trâu nước *Bubalus bubalis* và từ gan chuột bị khối u cũng được xác định lần lượt là 7,5; 7,4 và 7,6 (Noemi and George, 1975; Tanigaki *et al.*, 1993; Mahmoud *et al.*, 2015). Nhiều nghiên cứu về hoạt tính của enzyme XO thương mại trích từ sữa bò đã chọn pH 7,5 và nhiệt 25°C để thực hiện phản ứng (Anam *et al.*, 2017; Bambrana *et al.*, 2017). Vì vậy, pH 7,5 và nhiệt độ 25°C được chọn để thực hiện cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 3: Hoạt tính của enzyme XO ở các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau**

Ghi chú: Mỗi mg enzyme thô từ sữa bò ở trạng thái rắn được pha thành 1 mL dung dịch

**3.4 Khảo sát nồng độ xanthine và xanthine oxidase phù hợp cho phản ứng**

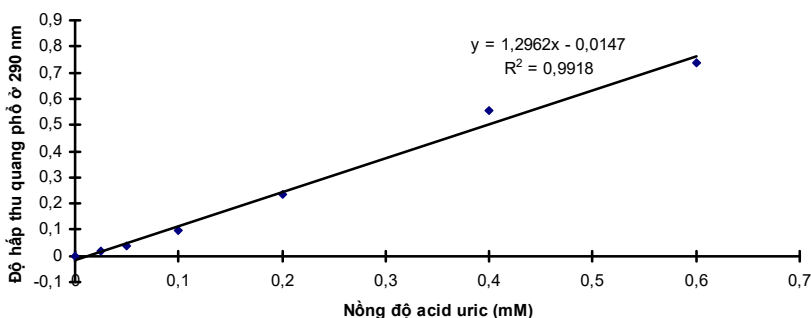
Trên thế giới, phương pháp xác định hoạt tính enzyme XO dựa vào lượng acid uric tạo thành sau phản ứng được phát hiện bước sóng 290 nm (Noro *et al.*, 1983; Anam *et al.*, 2017). Tại Việt Nam,

phương pháp này cũng được áp dụng thành công (Nguyễn Thùy Dương *et al.*, 2011).

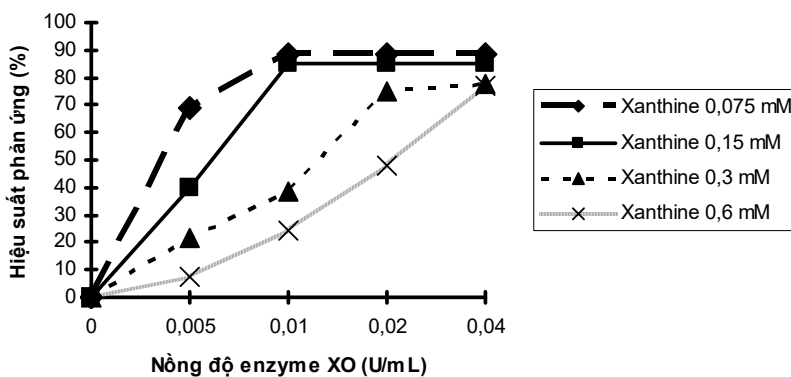
Lượng acid uric thực tế sinh ra trong phản ứng được định lượng dựa vào phương trình đường chuẩn acid uric (Hình 4). Kết quả trình bày ở Hình 5 cho thấy ở các nghiệm thức nồng độ xanthine 0,075 mM

có hiệu suất phản ứng cao nhất so với các nghiệm thức ở các nồng độ xanthine khác. Tuy nhiên, các hỗn hợp ở các nghiệm thức nồng độ xanthine 0,075 mM có độ hấp thu quang phổ từ 0,157 đến 0,234, không phù hợp cho việc nghiên cứu khả năng ức chế enzyme XO theo định luật Bouguer – Lambert – Beer. Ở các nghiệm thức nồng độ xanthine 0,15 mM, hiệu suất phản ứng tăng tuyến tính khi tăng nồng độ enzyme XO từ 0 đến 0,005 và 0,01 U/mL. Hiệu suất phản ứng không tăng khi tiếp tục tăng nồng độ enzyme XO từ 0,01 đến 0,04 U/mL. Nghiệm thức được thực hiện với nồng độ xanthine 0,15 mM và nồng độ enzyme XO 0,02 U/mL có hiệu suất phản ứng cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống

kê so với các nghiệm thức nồng độ xanthine 0,3 và 0,6 mM. Đồng thời, độ hấp thu quang phổ của hỗn hợp ở nghiệm thức này từ 0,233 đến 0,388, phù hợp cho việc khảo sát hiệu quả ức chế enzyme XO của các chất theo định luật Bouguer – Lambert – Beer. Định luật Bouguer – Lambert – Beer cho rằng để sử dụng máy đo quang phổ đạt được độ chính xác cao thì độ hấp thu quang phổ nên nằm trong khoảng 0,1 – 1, tốt nhất là từ 0,2 – 0,5 (Trần Từ Hiếu, 2003). Vì vậy, nồng độ xanthine 0,15 mM và nồng độ enzyme XO là 0,02 U/mL được chọn để thực hiện các thí nghiệm về khả năng ức chế enzyme XO của các chất.



Hình 4: Đường chuẩn acid uric



Hình 5: Đồ thị biểu diễn ảnh hưởng của nồng độ xanthine và enzyme XO đến hiệu suất phản ứng hình thành acid uric

### 3.5 Kết quả so sánh hoạt tính của enzyme xanthine oxidase phân lập từ sữa bò và enzyme thương mại

Allopurinol (AP) là chất ức chế enzyme XO đang được sử dụng trong điều trị tăng acid uric trong máu. Chất này được dùng làm chất đối chứng dương trong các nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme XO của các thảo dược (Anam *et al.*, 2017; Bambrana *et al.*, 2017). Enzyme XO thương mại và phân lập được sử dụng để khảo sát hiệu quả ức chế

của AP. Kết quả khảo sát khả năng ức chế enzyme XO tăng tỷ lệ thuận với nồng độ AP và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nồng độ khảo sát từ 2,5 đến 17,5 µg/mL, khi tăng nồng độ từ 17,5 lên 20 µg/mL thì hiệu quả ức chế tăng khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Khi so sánh hoạt tính xúc tác của enzyme dựa trên hiệu quả ức chế của AP kết quả cho thấy cả hai enzyme thương mại và enzyme phân lập có hoạt tính tương đương nhau ở tất cả các nồng độ khảo sát (Bảng 1). Kết quả so sánh khả năng ức chế enzyme XO phân lập từ sữa bò trong nghiên cứu này và

enzyme thương mại của AP ở các nồng độ khác nhau cho thấy khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép so sánh cặp (independent-sample T-Test) ở mức ý nghĩa 5%. Từ đó có thể kết luận, enzyme XO được phân lập trong nghiên cứu này có thể thay thế enzyme XO thương mại để khảo sát khả năng ức chế enzyme XO của các chất.

Phương trình đường chuẩn hiệu quả ức chế của AP đối với enzyme XO phân lập có dạng  $y = 5,3493x + 0,5718$  ( $R^2 = 0,9906$ ) và của enzyme XO thương mại là  $y = 5,45x + 0,1964$  ( $R^2 = 0,9953$ ). Từ phương trình đường chuẩn này,  $IC_{50}$  của AP được xác định là 9,24  $\mu\text{g/mL}$  và 9,14  $\mu\text{g/mL}$  lần lượt đối với enzyme phân lập từ sữa bò và enzyme thương mại, kết quả này tương đương với kết quả nghiên cứu của Hajdú *et al.* (2014) và Xu *et al.* (2014).

**Bảng 1: Hiệu quả ức chế enzyme XO của allopurinol**

Nồng độ AP ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hiệu quả ức chế	
	Enzyme XO thương mại	Enzyme XO phân lập
0	-	-
2,5	10,91 <sup>a</sup> ±3,69	11,10 <sup>a</sup> ±3,69
5	30,37 <sup>f</sup> ±2,01	30,69 <sup>f</sup> ±2,83
7,5	43,29 <sup>e</sup> ±1,60	43,77 <sup>e</sup> ±2,64
10	53,96 <sup>d</sup> ±1,04	53,52 <sup>d</sup> ±0,49
12,5	66,97 <sup>c</sup> ±1,42	63,46 <sup>c</sup> ±1,94
15	81,90 <sup>b</sup> ±1,15	82,30 <sup>b</sup> ±0,30
17,5	92,69 <sup>a</sup> ±0,44	92,87 <sup>a</sup> ±0,54
20	93,03 <sup>a</sup> ±0,44	93,08 <sup>a</sup> ±0,04
F	***	***
CV	3,17	3,14

Ghi chú: Các chữ cái theo sau các số khác nhau trong cùng cột sẽ khác biệt có ý nghĩa thống kê

**4 KẾT LUẬN**

Enzyme XO được phân lập từ sữa bò trong nghiên cứu này có hàm lượng protein, hoạt tính và hoạt tính riêng lần lượt là 0,509 mg/mg enzyme thô, 0,2095 U/mg enzyme thô và 0,412 U/mg protein. Điều kiện tối ưu cho hoạt động của enzyme XO phân lập được xác định ở pH 7,5; 25°C; 0,02 U/mL enzyme XO và 0,15 mM xanthine. Hiệu quả ức chế của chất chuẩn là allopurinol đối với hoạt tính của enzyme XO phân lập và enzyme XO thương mại là tương đương nhau. Từ kết quả nghiên cứu này cho thấy enzyme XO được phân lập từ sữa bò có thể thay thế được enzyme thương mại trong các nghiên cứu về ức chế hoạt tính của enzyme XO.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Anam, K., Susilo, D., Kusri, D. and Agustina, L.N.A., 2017. Chemical constituents and inhibition xanthine oxidase activity of *Avicennia*

marina Exudate. Research Journal Of Medicinal Plant . 11(1): 19-24.

Bambrana, V., Dayanand, C.D. and Sheela, S.R., 2017. Evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity by flavonoids from *Pongamia pinnata* linn. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 10 (3):360-362.

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. and Grassl, M., 1974. Section C: Methods for Determination of Enzyme Activity. In: Bergmeyer, H.U (ed.) 2nd ed.. Methods of Enzymatic Analysis. Academic Press Inc., Cambridge, pp. 521-522.

Bray, R.C., 1975. The Enzymes. 3rd ed., vol. XII, pt. B. Academic Press. New York, pp. 303-388.

Cao, H., Hall, J. and Hille, R., 2014. Substrate Orientation and Specificity in xanthine oxidase: Crystal Structures of the Enzyme in Complex with Indole-3-acetaldehyde and Guanine. The Journal of Biochemistry. 53 (3): 533-541.

Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T. and Pai, E.F., 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 10723 – 10728.

Evans, C.E., Mohammed, A.V. and Patience, O.E., 2005. Comparism of xanthine oxidase activities in cow and goat milks. Biokemistri, 171: 1-6.

Hajdú, Z., Martins, A., Orbán-Gyapai et al., 2014. Xanthine oxidase-Inhibitory Activity and Antioxidant Properties of the Methanol Extract and Flavonoids of *Artemisia Asiatica*. Records of Natural Products, 8: 299-302.

Harlow, E. and Lane, D., 1988. Commonly used techniques in molecular cloning. In: Sambrook, J., Russell, D.W (eds.). Molecular cloning, 3rd. Cold Spring Harbor Press. New York, A: 8-40.

Hoàng Thị Thanh Thảo, Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Hoàng Anh, Phạm Đức Vĩnh, Phương Thiện Thương, Nguyễn Thị Hoài và Nguyễn Quỳnh Chi, 2013. Sàng lọc các cây thuốc Việt Nam có tác dụng ức chế xanthin oxidase in vitro. Tạp chí Dược liệu, 18(6): 361-367.

Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L. and Jameson, J.L., 2015. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th ed. Publisher: McGraw-Hill Professional, New York. 3000 pages.

Lowry, O.H., Rosenberg, W.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Quantitation of protein using Folin-Ciocalteau. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

Mahmoud, A.I., Hassan, M.M.M., Doa, A.D., Sayed, S.E. and Samir, A.M.Z., 2015. Purification and characterization of xanthine oxidase from liver of the water buffalo *Bubalus bubalis*. Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol. 5 (11): 063-068.

- Massey, V., Brumby, P.E., Komai, H. and Palmer, G., 1969. Studies on milk xanthine oxidase. Some spectral and kinetic properties. *Journal of Biological Chemistry*. 244: 1682 - 1691.
- Noemi, P. and George, W., 1975. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Letters*.: Volume 59, number 2:245-249.
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S., 1983. Inhibitors of xanthine oxidase from flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31: 3984-3987.
- Nguyen, M.T.T., Awale, S., Tezuka, Y., Tran, Q.L., Wantanabe, H. and Kadota, S., 2004. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese Medicinal Plants. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. Vol 27(9): 1414-1421.
- Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Minh Khôi và Hoàng Thị Kim Huyền, 2011. Tác dụng ức chế xanthine oxidase in vitro và độc tính tiền lâm sàng của phân đoạn n-butanol hy thiêm. *Tạp chí Dược liệu*, 16/6: 350–356.
- Tanigaki, N., Furukawa, K., Sogabe, Y. and Emi, S., 1993. Thermostable XO from *Arthrobacter luteus*. *Toyo Boseki Kabushiki Kaisha*. US 5185257 A.
- Terkeltaub, R.A., 2003. Gout. *The New England Journal of Medicine*. 349: 1647-1655.
- Trần Từ Hiếu, 2003. Phân tích trắc quang hấp thụ UV – VIS. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội. Hà Nội. 231 trang.
- Van, H.D.E., Nijveldt, R.J., Van, L.P.A., Hofman, J. and Rabet, L., 2002. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European Journal of Pharmacology*. 451: 111–118.
- Xu, F., Zhao, X., Yang, L., Wang, X. and Zhao, J., 2014. A New Cycloartane-Type Triterpenoid Saponin XO Inhibitor from *Homonoia riparia* Lour. *Molecules*. 19: 13422-13431.