

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đặng Nguyễn Minh Huyền

**ĐIỀU CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH
XÚC TÁC CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

Nha Trang – 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đặng Nguyễn Minh Huyền

**ĐIỀU CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH
XÚC TÁC CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM
Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh 
2. TS. Cao Thị Thúy Hằng 

Nha Trang - 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Đặng Nguyễn Minh Huyền

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, trước hết tôi xin gửi đến ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ để luận văn được hoàn thành.

Sự biết ơn sâu sắc nhất tôi xin được dành cho TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh, TS. Cao Thị Thúy Hằng, đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình giúp đỡ, truyền đạt kiến thức và kinh nghiệm quý báu, động viên tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn tốt nghiệp này.

Xin được cảm ơn sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài mã số VAST02.01/23-24 do TS. Võ Thị Diệu Trang chủ nhiệm. Cảm ơn các cán bộ nghiên cứu của Phòng Công nghệ Sinh học biển, Phòng Hóa phân tích và triển khai công nghệ thuộc Viện nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ nhiệt tình và tạo thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin cảm ơn gia đình, người thân và bạn bè đã tạo điều kiện, động viên khích lệ để tôi vượt qua mọi khó khăn trong quá trình học tập vừa qua cũng như thực hiện đề tài này.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

MỤC LỤC.....	1
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT	4
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	5
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ	6
MỞ ĐẦU	7
Chương 1. TỔNG QUAN NGUYÊN CỨU	9
1.1. FUCOIDAN – CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC	9
1.1.1. Cấu trúc fucoidan	9
1.1.2. Hoạt tính sinh học của fucoidan khối lượng phân tử thấp	10
1.2. KHÁI NIỆM FUCOIDANASE VÀ PHÂN LOẠI FUCOIDANASE	11
1.2.1. Khái niệm về fucoidanase	11
1.2.2. Phân loại fucoidanase.....	11
1.2.3. Nguồn tìm kiếm và thu nhận fucoidanase.....	12
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP TINH SẠCH FUCOIDANASE.....	15
1.4. ĐẶC TÍNH XÚC TÁC CỦA FUCOIDANASE	17
1.4.1. Tính đặc hiệu liên kết của fucoidanase	18
1.4.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của fucoidanase	20
1.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase	20
1.4.4. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl và ion kim loại hóa trị 2 đến hoạt tính của fucoidanase	21
1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU FUCOIDANASE.....	22
1.5.1. Các nghiên cứu trong nước	22
1.5.2. Các nghiên cứu trên thế giới	23
1.6. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP TRONG ĐIỀU CHẾ FUCOIDAN TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP	25
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	27
2.1.1. Nguyên liệu	27
2.1.2. Thiết bị, dụng cụ	27
2.1.3. Hóa chất	28

2.2. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	30
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu chung.....	31
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thu nhận fucoidanase tái tổ hợp	31
2.3.2.1. <i>Biểu hiện fucoidanase</i>	31
2.3.2.2. <i>Phương pháp thu nhận enzyme thô nội bào</i>	32
2.3.2.3. <i>Phương pháp tinh sạch enzyme</i>	33
2.3.3. Phương pháp khảo sát đặc tính của fucoidanase tái tổ hợp	33
2.3.3.1. <i>Phương pháp xác định khả năng thủy phân cơ chất fucoidan</i> ..	33
2.3.3.2. <i>Phương pháp xác định ảnh hưởng của yếu tố thời gian thủy phân</i>	34
2.3.3.3. <i>Phương pháp xác định ảnh hưởng nhiệt độ đến hoạt tính của</i> <i>fucoidanase</i>	34
2.3.3.4. <i>Phương pháp xác định ảnh hưởng pH đến hoạt tính của</i> <i>fucoidanase</i>	34
2.3.4. Các kỹ thuật sử dụng.....	34
2.3.4.1. <i>Phương pháp điện di carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-</i> <i>PAGE)</i>	34
2.3.4.2. <i>Điện di protein trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE)</i>	35
2.3.4.3. <i>Phương pháp chuyển màng lai Western blot</i>	36
2.3.4.4. <i>Định lượng protein</i>	36
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	38
3.1. KẾT QUẢ THU NHẬN FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP	38
3.1.1. Kết quả biểu hiện fucoidanase của chủng PSFU21	38
3.1.2. Kết quả thu nhận fucoidanase thô của chủng PSFU21	40
3.1.3. Kết quả tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp	42
3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH XÚC TÁC CỦA FUCOIDANASE Psfu.....	48
3.2.1. Kết quả xác định khả năng thủy phân fucoidan từ các loài rong khác nhau của fucoidanase Psfu.....	48
3.2.2. Kết quả xác định thời gian phản ứng thích hợp của fucoidanase Psfu.....	52
3.2.3. Kết quả xác định nhiệt độ phản ứng tối ưu của fucoidanase Psfu	53
3.2.4. Kết quả xác định pH phản ứng tối ưu của fucoidanase Psfu	54
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	56

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	57
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	58

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu và chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
1	Fe, F2.1	<i>Fucus evanescens</i> ; phân đoạn 2.1
2	Fv; F2.2	<i>Fucus vesiculosus</i> ; phân đoạn 2.2
3	KLPT	Khối lượng phân tử
4	OD	Trị số mật độ quang học
5	PSFU21	Chủng vi khuẩn <i>E.Coli</i> BL21 chứa plasmid mang gene mã hóa fucoidanase
6	<i>Psfu</i>	Gene mã hóa fucoidanase
7	Sl; F1.1	<i>Saccharina latissima</i> ; phân đoạn 1.1
8	Sm; F3.1	<i>Sargassum mcclurei</i> ; phân đoạn 3.1
9	So; F3.3	<i>Sargassum oligocystum</i> ; phân đoạn 3.3
10	Sp; F3.2	<i>Sargassum polycystum</i> ; phân đoạn 3.2
11	Sc; F1.2	<i>Saccharina cicrioides</i> ; phân đoạn 1.2
12	To; F1.3	<i>Turbinaria ornata</i> ; phân đoạn 1.3

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1. 1. Nguồn tìm kiếm và thu nhận fucoidanase từ sinh vật biển	13
Bảng 1. 2. Một số trình tự fucoidanase trên Ngân hàng gene thế giới (NCBI)	14
Bảng 1. 3. Đặc tính xúc tác của một số fucoidanase tái tổ hợp	17
Bảng 2. 1. Điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn PSFU21 biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp Psfu.....	32
Bảng 2. 2. Hóa chất chuẩn bị gel điện di.	35
Bảng 3. 1. Kết quả thu nhận enzyme fucoidanase Psfu	41
Bảng 3. 2. Hàm lượng fucoidanase Psfu ở các phân đoạn khác nhau	45
Bảng 3. 3. Các bước và hiệu quả tinh sạch fucoidanase Psfu.....	48
Bảng 3. 4. Kết quả phân tích khả năng thủy phân fucoidan từ các loài rong khác nhau của enzyme fucoidanase Psfu	50

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 2. 1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài.....	31
Hình 3. 1. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện của fucoidanase tái tổ hợp Psfu (A) –Điện di SDS-PAGE; (B)–Western blot.....	39
Hình 3. 2. Kiểm tra sự hiện diện của enzyme tái tổ hợp trong dịch chiết thô: SDS-PAGE (A) và Western blot (B)	41
Hình 3. 3. Kiểm tra sự hiện diện của enzyme tái tổ hợp trong phần dịch không hấp thu bởi nhựa Nikel: SDS-PAGE (A) và Western blot (B)	42
Hình 3. 4. Kết quả đánh giá độ tinh sạch fucoidanase Psfu ở mỗi phân đoạn khác nhau bằng điện di SDS-PAGE (A) và Western blot (B).....	44
Hình 3. 5. Kết quả đánh giá độ tinh sạch fucoidanase Psfu trước và sau khi loại trừ Imidazole và NaCl.....	46
Hình 3. 6. Kết quả đánh giá hoạt tính của fucoidanase Psfu trước và sau khi qua cột PD10	47
Hình 3. 7. Khả năng thủy phân fucoidan chiết xuất từ các loài rong khác nhau của fucoidanase Psfu	49
Hình 3. 8. Sản phẩm sau phản ứng thủy phân của Psfu trên cơ chất fucoidan từ rong <i>S. latissima</i> theo thời gian.....	52
Hình 3. 9. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính xúc tác thủy phân fucoidan của fucoidanase Psfu	54
Hình 3. 10. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính xúc tác thủy phân fucoidan của fucoidanase Psfu.....	55

MỞ ĐẦU

Fucoidan là một trong những sulfate polysaccharide biển có hoạt tính sinh học đa dạng như kháng tế bào ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn, hoạt tính nhạy cảm phóng xạ nên fucoidan có giá trị ứng dụng cao trong nhiều lĩnh vực như sản phẩm dinh dưỡng, thực phẩm chức năng hay mỹ phẩm [1]. Tuy nhiên, vì cấu trúc hóa học phức tạp, khối lượng phân tử lớn, và độ nhớt cao đã làm cho việc ứng dụng fucoidan trong lĩnh vực y dược gặp nhiều khó khăn. Một trong những giải pháp tăng tiềm năng ứng dụng của fucoidan trong lĩnh vực y dược đó là tạo ra các fucoidan có khối lượng phân tử thấp nhưng vẫn bảo tồn được đặc điểm cấu trúc chính và các nhóm chức năng liên quan đến hoạt tính sinh học. Các enzyme chuyển hóa fucoidan trong đó có fucoidanase là một trong những công cụ hữu hiệu và đang nhận được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu bởi chúng có khả năng bẻ mạch đặc hiệu và chọn lọc nguồn cơ chất fucoidan để tạo ra fucoidan mạch ngắn có hoạt tính sinh học, với các nhóm chức năng vẫn được bảo tồn và dễ dàng để xác định cấu trúc hóa học, từ đó làm cơ sở để thiết lập mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của fucoidan. Việc sử dụng enzyme không chỉ làm rõ cấu trúc từng phần hoặc toàn phần của đại phân tử fucoidan, mà còn giúp điều chế và thu nhận hiệu quả fucoidan khối lượng phân tử thấp có hoạt tính sinh học, làm tăng tính khả thi trong việc sử dụng fucoidan như một nguồn dược liệu tự nhiên điều trị bệnh cho con người [2].

Fucoidanase được tìm kiếm từ các nguồn tự nhiên như vi khuẩn [3], [4], vi nấm và động vật thân mềm biển [5] bằng cách phân lập vi sinh vật biển từ các nguồn thu nhận ở biển, sau đó nghiên cứu lên men, chiết xuất và tinh sạch enzyme từ các chủng vi sinh vật tiềm năng hoặc chiết xuất enzyme từ tuyến tiêu hóa của động vật thân mềm biển [6]. Bên cạnh đó, với sự phát triển của khoa học công nghệ, bộ gene của vi sinh vật biển, đặc biệt là vi khuẩn biển được giải mã và công bố trên ngân hàng dữ liệu online, cùng với việc các nhà khoa học đã xác định được các gene mã hóa một số loại fucoidanase và trình tự trung tâm hoạt động của của các gene này [7], đã đưa đến cơ hội tìm kiếm gene mã hóa fucoidanase trên ngân hàng dữ liệu online, từ đó sử dụng các kỹ thuật như tạo dòng, biểu hiện gene, tinh sạch protein tái tổ hợp để tạo ra nguồn

thu nhận enzyme ổn định, hiệu suất cao, tạo điều kiện thuận lợi trong việc nghiên cứu, xác định và phát hiện những fucoidanase có đặc tính xúc tác khác biệt, định hướng ứng dụng trong sản xuất thực nghiệm.

Vì vậy, đề tài “**Điều chế và xác định đặc tính xúc tác của fucoidanase tái tổ hợp**” đã được thực hiện. Kết quả của đề tài có ý nghĩa khoa học và ý nghĩa thực tiễn trong việc tạo ra nhiều hơn các công cụ sinh học nhằm thủy phân fucoidan thành fucoidan khối lượng phân tử thấp có hoạt tính sinh học định hướng ứng dụng trong y sinh.

Đối tượng nghiên cứu: Enzyme fucoidanase Psfu được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET-28b(+) chứa đoạn gene mã hóa fucoidanase *Psfu* (kí hiệu chủng PSFU21). Đây là đoạn gene tìm kiếm được trên ngân hàng dữ liệu online (Mã số Genbank TMP05905.1), có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. S3178 mã số Genbank PNCW00000000.1. Quá trình tạo dòng đã được thực hiện trong đề tài nghiên cứu khoa học mã số VAST02.01/23-24.

- **Phạm vi nghiên cứu:** Thu nhận và xác định đặc tính xúc tác của enzyme fucoidanase Psfu.

- **Mục đích của đề tài:**

- Nghiên cứu thu nhận enzyme fucoidanase tái tổ hợp.
- Xác định đặc tính xúc tác của fucoidanase tái tổ hợp thu nhận được.

Chương 1. TỔNG QUAN NGUYÊN CỨU

1.1. FUCOIDAN – CẤU TRÚC VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

1.1.1. Cấu trúc fucoidan

Fucoidan là một loại sulfate polysaccharide được tìm thấy trong thành tế bào rong nâu [8]. Fucoidan đã thu hút sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học vì các tính chất hóa học và hoạt tính sinh học đa dạng, có tiềm năng lớn trong việc ứng dụng vào các lĩnh vực như thực phẩm, thực phẩm chức năng, y dược [1].

Fucoidan có sự đa dạng về cấu trúc thể hiện qua cấu trúc của mạch chính, thành phần monosaccharide, vị trí của nhóm sulfate. Dựa vào đặc điểm cấu tạo mạch chính, fucoidan có mạch chính được cấu tạo bởi các đơn vị α -L-fucose sulfate liên kết bởi liên kết glycosidic ($1 \rightarrow 3$), được gọi là α -L-fucans. Cấu trúc này đã được tìm thấy ở các loài rong nâu như *Undaria pinnatifida* ở New Zealand [9], *Saccharina latissima* thu nhận ở vùng Viễn Đông, Liên Bang Nga, và phân đoạn F3 của rong *Turbinaria ornata* ở vùng biển Việt Nam.

Fucoidan có cấu trúc mạch chính được tạo bởi các đơn vị α -L-fucose liên kết với nhau qua các liên kết ($1 \rightarrow 3$) và ($1 \rightarrow 4$) xen kẽ nhau, ví dụ như fucoidan chiết từ loài rong *Ascophyllum nodosum* [10], *Fucus vesiculosus* [11] hay *Fucus evanescens* [12].

Fucoidan có cấu trúc phức tạp hơn nữa thuộc nhóm sulfate galactofucan [13], fucogalactan [14] hoặc fucoglucuronomannans [15]. Đây là các nhóm fucoidan có thành phần monomer rất đa dạng và chiếm tỉ lệ cao như: galactose, mannose, glucose, xylose và axit uronic. Các loại đường này có thể xuất hiện trong mạch chính hoặc mạch nhánh của fucoidan. Cho đến nay chỉ một phần nhỏ cấu trúc của fucoidan từ hầu hết các loài rong được nghiên cứu, cấu trúc toàn diện của fucoidan vẫn đang được các nhà khoa học khám phá. Ví dụ, cấu trúc của một đoạn nhỏ của phân tử F3 của fucoidan từ loài *Sargassum mcclurei* đã được báo cáo [16], *S. oligocystum* và *S. polycystum*, các loài rong này thuộc được thu nhận tại vùng biển Việt Nam.

Do cấu trúc phức tạp của fucoidan, khối lượng phân tử cao nên fucoidan vẫn chưa tường minh về cấu trúc hóa học. Điều này dẫn đến khó khăn trong

việc xác định mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học, để từ đó có thể ứng dụng sâu hơn fucoidan vào lĩnh vực y dược. Một trong những phương pháp để xác định rõ ràng cấu trúc của fucoidan đó là bẻ gãy mạch fucoidan bằng các enzyme đặc hiệu. Dựa vào tính đặc hiệu liên kết của enzyme sử dụng, và việc xác định cấu trúc của fucoidan khối lượng phân tử thấp sẽ tạo nên các thông tin để có thể xác định cấu trúc của fucoidan.

1.1.2. Hoạt tính sinh học của fucoidan khối lượng phân tử thấp

Do có cấu trúc rất đa dạng và phức tạp nên fucoidan có phổ hoạt tính sinh học rộng. Tuy nhiên, fucoidan được công bố hoạt tính sinh học hầu hết đều được thực hiện trên các đối tượng cơ chất có cấu trúc chưa được rõ ràng. Điều này đã gây khó khăn trong việc xác định mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học. Một số ít công trình công bố đã bước đầu xác định được mối quan hệ giữa khối lượng phân tử, cấu trúc và hoạt tính sinh học của fucoidan. Fucoidan KLPT thấp thường có hoạt tính chống ung thư cao hơn so với fucoidan KLPT cao [17]; [18]. KLPT cũng đã được phát hiện ảnh hưởng đến hiệu ứng chống viêm trong một nghiên cứu gần đây trên fucoidan được cô lập từ *Ascophyllum nodosum*, trong đó phân tử có khối lượng 63,2 kDa đã cho thấy hoạt tính sinh học tiềm năng hơn so với phân tử có khối lượng 124,5 kDa [19] hay fucoidan KLPT thấp cũng đã được phát hiện có tác dụng cải thiện hiệu quả chống mầm bệnh, trong đó fucoidan có KLPT 6 kDa được điều chế từ fucoidan chiết từ *Fucus evanescens* có hoạt tính kháng virus mạnh hơn đối với orthohantavirus [20]. Đã có các công trình công bố fucoidan KLPT dưới 30 kDa thích hợp hơn cho nanomedicine như các chất chụp hình và chất mang thuốc để giao thuốc nhằm mục tiêu vì chúng có tính hòa tan trong nước và hoạt tính sinh học cao hơn, có thể được định hình hiệu quả dưới dạng hạt nano và chất mang nano so với fucoidan KLPT cao [21]; [22]; [23]; [24]. Do đó, việc điều chế fucoidan KLPT thấp các đoạn nhỏ oligomeric đang là xu hướng để tạo các nguyên liệu ứng dụng trong lĩnh vực y dược.

Với những tổng quan cơ bản về fucoidan và hoạt tính sinh học của fucoidan, có thể nhận thấy rằng, việc xác định cấu trúc cũng như tạo fucoidan KLPT thấp là phương pháp hiệu quả để xác định cấu trúc, mối liên hệ của cấu trúc và hoạt tính của fucoidan. Enzyme sẽ là công cụ hữu hiệu để thực hiện quá trình này. Bằng cách sử dụng enzyme có tính chất xúc tác khác nhau trên các

chất mẫu fucoidan phức tạp, phần chưa được khám phá của cấu trúc fucoidan có thể được nghiên cứu. cấu trúc rõ ràng của fucoidan sẽ đem lại tiềm năng ứng dụng của chúng trong y học.

1.2. KHÁI NIỆM FUCOIDANASE VÀ PHÂN LOẠI FUCOIDANASE

1.2.1. Khái niệm về fucoidanase

Fucoidanase là tên gọi chung của các enzyme tham gia xúc tác cho sự phân cắt các liên kết glycoside giữa các gốc fucose sunfate hóa trong phân tử fucoidan. Nhóm này bao gồm các enzyme này thuộc nhóm endo-fucoidanase [25] và exo-fucoidanase hay còn gọi là α -L- fucosidase [26].

Endo-fucoidanase có thể phân cắt các liên kết glycoside trong một phân tử fucoidan và tạo ra oligosaccharide với các mức độ polyme hóa khác nhau (EC 3.2.1.121, EC 3.2.1.122)

α -L-Fucosidase là các enzyme có khả năng xúc tác quá trình cắt các đơn vị α -L-fucose đầu cuối cùng của phân tử fucoidan và được phân loại thuộc EC 3.2.1.51, EC 3.2.1.111, EC 3.2.1.63 và EC 3.2.1.127.

1.2.2. Phân loại fucoidanase

Tùy thuộc vào liên kết xúc tác đặc hiệu, cơ chế hoạt động hoặc cấu trúc bậc 1 của enzyme mà fucoidanase có thể được phân loại thành các nhóm khác nhau:

Dựa vào liên kết xúc tác đặc hiệu: Dựa vào khả năng xúc tác bẻ mạch liên kết đường ở các vị trí carbon khác nhau giữa các gốc fucose hoặc fucose sulfate hóa trong mạch chính của phân tử cơ chất fucoidan mà fucoidanase được phân thành 2 nhóm chính là endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ fucoidanase và $\alpha(1\rightarrow3)$ fucoidanase [27], [28]; exo fucoidanase [26]. Cho đến nay, hầu hết các fucoidanase được xác định đặc tính đều hoạt động theo cơ chế của endo-enzyme [25], [27], [28], [29], động vật thân mềm biển *P. maximus* [30] và *Strongulocentrotus nudus* [31] được xác định là các exo-fucoidanase.

Dựa vào cấu trúc bậc 1 của enzyme: Dựa vào sự tương đồng của trình tự amino acids và trung tâm hoạt động của fucoidanase, hệ thống phân loại Carbohydrate-Active enzymes (CAZy database) phân endo-fucoidanase vào 2 họ thuộc nhóm enzyme thủy phân liên kết đường (Glycoside hydrolase-GH) là:

GH107 [32] và GH168 [33]. Các endo-fucoidanase thuộc GH107 được mô tả là các enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn như FcnA [32], FFA1 [34], FFA2 [35], Fp273, Fp277, Fp279 [36], FWf1, FWf2 [37], Fhf1 [27], Fhf2 [28]. Hầu hết các fucoidanase thuộc họ GH107 là các endo-fucoidanase thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow4)$ của 2 gốc đường fucose trong phân tử fucoidan [32], [27], [28], [29]-[35], 02 fucoidanase Fda1 và Fda2 từ vi khuẩn *Alteromonas sp.* được chứng minh cũng là endo-fucoidanase nhưng lại xúc tác thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow3)$ trong mạch chính của phân tử fucoidan [38], [39].

Endo-fucoidanase thuộc GH168 đã được mô tả đầu tiên năm 2020 là FunA, phân lập từ vi khuẩn biển *Wenyngzhuangia fucanilytica* được xác định là một endo-fucoidanase xúc tác thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow3)$ của cơ chất fucoidan chiết xuất từ hải sâm *Isostichopus badionotus* [33].

Fucoidan còn có thể bị thủy phân bởi enzyme theo cơ chế exo-fucoidanase, cắt fucose từ đầu mạch của phân tử fucoidan, enzyme này được gọi là fucosidase. Theo cơ sở dữ liệu CAZY, hoạt động α -L-fucosidase được mô tả trong các họ enzyme hydrolase glycoside GH 29, 95 và 141 (www.cazy.org). α -L-Fucosidase có vẻ đóng một trong những vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy fucoidan, vì bộ gene của vi khuẩn phân hủy fucoidan thường chứa gen mã hóa α -L-fucosidase họ GH29 và GH95 [40].

Như vậy, do fucoidan có cấu trúc phức tạp, nên trong tự nhiên, để có thể chuyển hóa fucoidan thành nguồn năng lượng cho cơ thể sinh vật hoạt động, sinh vật cần tổng hợp nhiều loại enzyme tác động lên nguồn carbon phức tạp này. Đây cũng chính là cơ sở khoa học để tìm kiếm fucoidanase từ các nguồn khác nhau.

1.2.3. Nguồn tìm kiếm và thu nhận fucoidanase

Cơ chất fucoidan là polysaccharide sulfate được chiết xuất từ vách tế bào rong Nâu, do đó, các enzyme chuyển hóa fucoidan đặc biệt là fucoidanase thường được thu nhận trực tiếp từ các loài động vật biển ăn rong như hải sâm *Haliotis sp.* [41], cầu gai *S. Nudus* [42], và ốc bàn tay *Lambis sp.* [6] ; hay vi sinh vật biển như vi khuẩn và vi nấm biển, cộng sinh với rong biển và động vật biển ăn rong, cũng là một trong những nguồn tìm kiếm fucoidanase tự nhiên chính [43], [44], [45]. Cho đến nay, có hơn 20 chủng vi sinh vật chủ yếu là vi

khuẩn biển, đã được công bố có khả năng sản xuất fucoidanase như *Vibrio* sp. No.5 [43], *Formosa algae* KMM 3553^T [46], *Alteromonas* sp. SN-1009 [45], *Fucobacter marina* SA-0082 [47], hay *Mariniflexile fucanivorans* SW5^T [48]. Mặc dù còn hạn chế, fucoidanase từ vi nấm biển cũng đã được phát hiện và nghiên cứu, cụ thể là trên 2 chủng vi nấm biển cộng sinh với rong nâu *Dendryphiella arenaria* TM94 [49] và *Fusarium* sp. LD8 [50](Bảng 1.1)

Bảng 1. 1. Nguồn tìm kiếm và thu nhận fucoidanase từ sinh vật biển

STT	Nguồn phân lập fucoidanase	Cơ chế hoạt động	Tài liệu tham khảo
Động vật thân mềm biển			
1	<i>Haliotis</i> sp.	-	[41]
2	<i>Strongulocentrotus nudus</i>	Exo- α (1 \rightarrow 2) fucoidanase	[31]
3	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	-	[51]
4	<i>Pecten maximus</i>	Exo-fucoidanase	[30]
5	<i>Littorina sitkana</i>	Endo- α (1 \rightarrow 3) fucoidanase	[52]
6	<i>Lambis</i> sp.	Endo- α (1 \rightarrow 4) fucoidanase	[6]
Vi khuẩn biển			
7	<i>Vibrio</i> sp. N-5	Exo-fucoidanase	[53]
8	" <i>Fucobacter marina</i> " SA-0082	Endo-fucoidanase	[54]
9	<i>Alteromonas</i> sp. SN-1009	Endo- α (1 \rightarrow 3) fucoidanase	[45]
10	" <i>Fucophilus fucoidanolyticus</i> " SI-1234	Endo- α (1 \rightarrow 3) fucoidanase	[55]
11	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5	Endo- α (1 \rightarrow 4) fucoidanase	[48]
12	<i>Flavobacteriaceae</i> CZ1127	Endo- α (1 \rightarrow 3) fucoidanase	[56], [57]
13	<i>Formosa algae</i> KMM 3553T	Endo- α (1 \rightarrow 4) fucoidanase	[46]
Vi nấm biển			
14	<i>Dendryphiella arenaria</i> TM94	Endo-fucoidanase	[49]
15	<i>Fusarium</i> sp. LD8	Endo-fucoidanase	[50]

"-": chưa xác định

Bên cạnh sinh vật biển, các trình tự gene trên ngân hàng dữ liệu gene thế giới (NCBI) cũng là một nguồn tìm kiếm và thu nhận fucoidanase hiệu quả, đang được quan tâm nghiên cứu trong thời gian gần đây. Nghiên cứu của Vicker

và cộng sự năm 2018 đã lần đầu tiên làm sáng tỏ cấu trúc 3D, trình tự trung tâm hoạt động và các vùng bảo thủ của fucoidanase MfFcnA, P5AFcnA, P19DFcnA từ vi khuẩn biển *Psychromonas* SW5A, SW19D. Đây chính là một bước tiến lớn trong lĩnh vực nghiên cứu fucoidanase và cũng là cơ sở khoa học quan trọng trong việc tìm kiếm các nguồn gene có khả năng mã hóa enzyme fucoidanase về sau. Bằng cách sử dụng các công cụ tin sinh học hiện đại, các trình tự trên ngân hàng dữ liệu sẽ được so sánh, phân tích độ tương đồng với các trình tự đặc trưng sẵn có của fucoidanase. Các trình tự gene tiềm năng này sẽ được lựa chọn, thiết kế và nghiên cứu biểu hiện bằng các kỹ thuật tái tổ hợp. Bởi tính hiệu quả trong nghiên cứu protein tái tổ hợp và nguồn dữ liệu rộng lớn của ngân hàng gene thế giới, hầu hết các enzyme fucoidanase được công bố từ năm 2018 cho đến nay đều từ nguồn dữ liệu này. Các enzyme này đã được mô tả đặc điểm thủy phân và đều thuộc GH107 với các thành viên tiêu biểu gồm FcnA, FFA1, FFA2, Fp273, Fp277, Fp279, FWf1, FWf2, Fhf1, Fhf2, Mef2 thuộc họ GH107 [27], [28]; [29]; [37]; [58]. Các gene mã hóa cho các fucoidanase tái tổ hợp trên đều có nguồn gốc từ bộ gene của các chủng vi khuẩn biển (Bảng 1.2).

Bảng 1. 2. Một số trình tự fucoidanase trên Ngân hàng gene thế giới (NCBI)

T T	Fucoidanase	Kích thước (acid amin)	Mã số Genbank	Sinh vật chủ	Tài liệu tham khảo
1	Fda1	814	AAO00508.1	<i>Alteromonas sp.</i> <i>SN-1009</i>	[38] [39] [45]
2	Fda2	881	AAO00509.1		
3	MfFcnA	1007	CAI47003.1	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5	[32]
4	FWf1	967	ANW96115.1	<i>Wenyingzhuangia fucanilytica</i> <i>CZ1127</i>	[37]
5	FWf2	799	ANW96116.1		
6	FWf3	883	ANW96098.1		
7	FWf4	800	ANW96097.1		
8	FFA1	1008	WP_0577842 17.1	<i>Fomosa algae</i> <i>KMM 3553T</i>	[34]
9	FFA2	917	WP_0577842 19.1		[35]

10	FdIA	704	AAO00510.1	<i>Flavobacterium</i> <i>sp. SA-0082</i>	[59]
11	FdIB	697	AAO00511.1		
12	SW19D	404	AYF59292.1	<i>Psychromonas sp.</i> <i>SW19D</i>	[29]
13	SW5A	404	AYF59291.1		
14	Fhf1	1120	WP_0662177 80.1	<i>Formosa haliotis</i>	[27]
15	Fhf2	910	WP_0662177 84.1		[28]
16	MEF2	1067	WP_0553922 00.1	<i>Muricauda</i> <i>eckloniae</i>	[58]

Như vậy, fucoidanase là một loại enzyme rất khó thu nhận và tinh sạch từ các nguồn tự nhiên. Tổng hợp các công trình công bố về fucoidanase cho thấy, có rất ít enzyme fucoidanase đã được tinh sạch theo phương pháp truyền thống, hầu hết đều được sản xuất bằng phương pháp enzyme tái tổ hợp. Đặc biệt, sau khi cấu trúc của fucoidanase bậc 4 được xác định là MfFcnA từ vi khuẩn biển *Mariniflexile fucanivorans* bởi Vickers và cộng sự [7], việc tìm kiếm và sản xuất fucoidanase thông qua phương pháp tái tổ hợp trở nên hiệu quả hơn. Trong phương pháp sản xuất enzyme tái tổ hợp, hệ biểu hiện *E. coli* là phổ biến nhất để tổng hợp protein tái tổ hợp do nhiều lợi ích, bao gồm dễ nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng nhanh, đặc điểm di truyền được nghiên cứu kỹ lưỡng, có thể sử dụng nhiều loại vector tách dòng và việc thu nhận protein mục tiêu dễ dàng. Sau khi gene được biểu hiện thành công, fucoidanase cần được tinh sạch để hiệu quả thủy phân thể hiện tốt nhất và khi ứng dụng để điều chế fucoidan KLPT thấp, sản phẩm thu nhận ít bị tạp nhiễm bởi các protein không mong muốn trong quá trình biểu hiện, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình tinh sạch fucoidan KLPT thấp.

1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP TINH SẠCH FUCOIDANASE

Tùy thuộc vào đặc điểm của fucoidanase mà sử dụng các phương pháp tinh sạch khác nhau. Tuy nhiên, đặc điểm chung trong quá trình tinh sạch fucoidanase, nhiệt độ là yếu tố cần được đảm bảo bởi fucoidanase là một trong những enzyme có tính nhạy cảm với nhiệt độ cao, nhiệt độ không thích hợp trong quá trình tinh sạch sẽ dễ dàng gây mất hoạt tính của enzyme này, vì vậy

tất cả các bước tinh sạch đều thường được thực hiện ở trong phòng lạnh hoặc trên đá, có nhiệt độ khoảng 4-6°C [25], [27], [28].

Dung dịch đệm sử dụng trong tinh sạch enzyme này cũng khá đa dạng, đối với fucoidanase chiết xuất từ động vật thân mềm biển như bào ngư *Haliotis* sp. [41] hay ốc bàn tay *Lambis* sp. [6]. Các tác giả đã sử dụng đệm phosphate có pH từ 5,0-7,7; đối với fucoidanase từ vi sinh biển, các loại đệm thường được sử dụng là sodium acetate và phosphate pH từ 6,0-7,0 [43], [46]. Trong khi đó, đệm Tris-HCl lại được sử dụng phổ biến nhất trong quá trình điều chế và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp gần đây, ví dụ như Fhf2 [28], FWf1, FWf2 [37], MEF2 [58] hay P5AFcnA và P19DFcnA [29]. Bên cạnh đó, hầu hết các fucoidanase thu nhận được từ nguồn vi khuẩn tự nhiên hay tái tổ hợp đều là enzyme nội bào. Vì vậy, quá trình phá vỡ tế bào để giải phóng enzyme thô ra pha lỏng là cần thiết, kỹ thuật dùng sóng siêu âm có bổ sung enzyme lysozyme phá vỡ vách tế bào thường được sử dụng để thu nhận triệt để enzyme thô trước khi tiến hành các bước tinh sạch tiếp theo [27], [28], [58].

Tương tự như protein hay enzyme khác, các fucoidanase tự nhiên thường được tinh sạch bằng các phương pháp sắc ký dựa theo kích thước, tính kỵ nước và phân cực của phân tử đó [6], [53], [46]. Fucoidanase từ ốc bàn tay *Lambis* sp. được tinh sạch lần lượt qua các cột sắc ký khác nhau như cột sắc ký lọc gel sử dụng nhựa Sephacryl S-100, cột sắc ký trao đổi ion DEAE-MacroPrep rửa giải bằng gradient muối NaCl và cột sắc ký lọc gel TSKgel-G2000SW [6]. Dịch enzyme thô của fucoidanase từ vi khuẩn biển *F. alga* được tinh sạch bằng cột DEAE-MacroPrep, sau đó tiếp tục phân tách lần hai bằng cột Sephacryl S-200 dựa trên kích thước phân tử [46].

Đối với fucoidanase tái tổ hợp, phương pháp sắc ký ái lực thường được sử dụng với loại cột có chứa nhựa Nikel có khả năng tương tác đặc hiệu với protein tái tổ hợp có chứa đuôi Histidine. Protein sẽ được rửa giải bằng đệm có chứa Imidazole với nồng độ tăng dần. Một số nghiên cứu phải tiến hành thêm các bước tinh sạch khác, chủ yếu là các loại cột sắc ký lọc gel như Bio-gel P-6 [37] hay HiPrep 16/60 [29] để thu nhận enzyme có độ tinh sạch cao. Trong khi đó, một số tác giả khác cho thấy khả năng thu nhận được enzyme tinh sạch chỉ sau một bước qua cột sắc ký ái lực Nikel như Fhf1 [27], Fhf2 [28] hay MEF2 [58].

FFA1	α -(1→4)	37	6,5-9,1	-	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺	[34]
FFA2	α -(1→4)	25-37	6,5-9,1	-	Al ²⁺ , Cu ²⁺ , Sn ²⁺ , Fe ³⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Ba ²⁺ , Co ²⁺ , Mn ²⁺	[35]
FWf1	α -(1→4)	24-35	6,4-7,2	100-300	Al ³⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Ni ²⁺	Ca ²⁺	[37]
FWf2	α -(1→4)	24-40	6,0-6,8	100-300	Al ³⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Mn ²⁺ , Pb ²⁺ , Sn ²⁺ , Ni ²⁺	Ca ²⁺	
Fhf1	α -(1→4)	37-40	8,0	100	Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺	[27]
Fhf2	α -(1→4)	35-45	8,0-9,0	100	Zn ²⁺ , Cu ²⁺	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺	[28]
MEF2	α -(1→3)	35	8,0	-	Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺	Ca ²⁺ ,	[58]

1.4.1. Tính đặc hiệu liên kết của fucoidanase

Theo các công bố khoa học liên quan đến lĩnh vực fucoidanase, tính đặc hiệu liên kết là một trong những đặc tính cơ bản và đặc biệt nhất khi nghiên cứu về fucoidanase. Hoạt tính thủy phân của fucoidanase không chỉ chịu ảnh hưởng bởi liên kết đường trong mạch chính của phân tử fucoidan mà còn bởi mức độ và vị trí của các nhóm chức khác như sulfate hay acetyl, mật độ và cấu trúc của mạch nhánh của cơ chất cũng ảnh hưởng lớn đến hoạt động của fucoidanase.

Cùng xúc tác thủy phân liên kết α (1→4) trong mạch chính của cơ chất fucoidan từ rong *F. evanescens*, nhưng FFA1 chỉ hoạt động giữa 2 gốc fucose gồm 1 gốc fucose được sulfate hóa ở 2 vị trí: carbon số 2 (C2) và carbon số 4 (C4) và 1 gốc fucose chỉ chứa gốc sulfate ở vị trí C2 [34], trong khi FFA2 và Fhf1 chỉ thủy phân liên kết giữa 2 gốc fucose có cùng vị trí sulfate hóa ở C2 [27], [35], còn Fhf2 lại có khả năng hoạt động đa dạng hơn, trong cả 2 phân

đoạn có mức độ sulfate hóa khác nhau $[\rightarrow 3)\text{Fuc}2\text{S}-\alpha(1\rightarrow 4)\text{Fuc}2\text{S}-\alpha(1\rightarrow]$ và $[\rightarrow 3)\text{Fuc}2\text{S}-\alpha(1\rightarrow 4)\text{Fuc}2,4\text{S}-\alpha(1\rightarrow]$ [28]. Hai fucoidanase khác là FWf1 và FWf2, được phân lập từ vi khuẩn *W. fucanilytica* CZ1127T, đều được xác định là các endo- $\alpha(1\rightarrow 4)$ -fucoidanase tuy nhiên vị trí và mức độ sulfate hóa của gốc fucose cũng ảnh hưởng đến khả năng thủy phân của chúng. FWf1 chỉ xúc tác thủy phân liên kết giữa 2 gốc fucose không liên kết với mạch nhánh và đồng thời sulfate hóa ở vị trí C2 và C3; trong khi FWf2 chỉ hoạt động khi có mặt của ít nhất một gốc đường fucose có sulfate hóa ở vị trí C2, gốc đường còn lại có thể chứa gốc sulfate ở vị trí C2 hoặc C3 [37].

Giống như các endo- $\alpha(1\rightarrow 4)$ -fucoidanase, hoạt tính của các endo- $\alpha(1\rightarrow 3)$ -fucoidanase cũng bị ảnh hưởng bởi gốc sulfate. Fucoidanase FunA thuộc họ GH168, chỉ xúc tác thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow 3)$ giữa gốc fucose sulfate hóa ở C2 và gốc fucose không bị sulfate hóa trong cơ chất fucoidan được chiết xuất từ hải sâm *Isostichopus badionotus*, mà không hoạt động được ở các gốc đường fucose có chứa nhóm sulfate ở bất kỳ vị trí cacbon nào khác [33]. Trong khi đó, các endo- $\alpha(1\rightarrow 3)$ -fucoidanase Fda1 và Fda2, thuộc họ GH107, được minh chứng xúc tác đặc hiệu thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow 3)$ trong đoạn cấu trúc $[\rightarrow 3)\text{Fuc}2\text{S}-\alpha(1\rightarrow 3)\text{Fuc}2,4\text{S}-(1\rightarrow]$ của cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *Kjellmaniella crassifolia* [38], [39], [45].

Hầu hết các fucoidanase chỉ hoạt động trên cơ chất fucoidan có cấu trúc đơn giản, đồng nhất và không chứa mạch nhánh. Bởi sự xuất hiện của các mạch nhánh được cho là sẽ chiếm chỗ không gian hoạt động của enzyme, gây cản trở sự gắn kết giữa enzyme và cơ chất. Tuy nhiên, một công bố gần đây của Tran, Nguyen và cộng sự, về đặc tính xúc tác của fucoidanase MEF2 từ chủng vi khuẩn biển *Muricauda eckloniae* cho thấy, fucoidanase này không chỉ xúc tác thủy phân liên kết $\alpha(1\rightarrow 3)$ của fucoidan có cấu trúc đồng nhất từ rong *F. evenescens*, mà còn hoạt động mạnh trên cơ chất fucoidan có cấu trúc phức tạp từ rong *S. latissima*, với mật độ mạch nhánh cao và gần với vị trí liên kết đường mà enzyme này xúc tác [58]. Kết quả trên một lần nữa cho thấy, tính đặc hiệu liên kết của fucoidanase rất đa dạng và phức tạp, cần có nhiều hơn các nghiên cứu chuyên sâu để tìm ra bản chất của mối quan hệ và sự ảnh hưởng của cấu trúc cơ chất fucoidan đến hoạt tính của enzyme fucoidanase.

1.4.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của fucoidanase

Bên cạnh tính đặc hiệu liên kết, fucoidanase cũng thể hiện sự đa dạng và thú vị ở đặc tính sinh hóa. Những đặc tính này bao gồm các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của fucoidanase như: nhiệt độ, pH, nồng độ muối, cation hóa trị 2.... Trong đó, hoạt tính của fucoidanase bị tác động đáng kể bởi giá trị pH của môi trường phản ứng. Fucoidanase có nguồn gốc khác nhau, thường có khoảng pH hoạt động tối ưu khác nhau.

Theo các công bố khoa học cho thấy, fucoidanase từ động vật không xương sống biển hoạt động tốt trong vùng pH acid đến acid yếu, khoảng từ 3,5-5,5 [25], [6]. Trong đó, fucoidanase từ nhím biển *S. nudus* hoạt động tốt ở pH 2,0-5,0 và đạt tối ưu ở 3,0-4,0 [42]. Fucoidanase từ hai loài nhuyễn thể *Lambis* sp. [6] và *Pecten maximus* [30] lần lượt có pH tối ưu tại 4,9 và 5,5. Tương tự như động vật biển, fucoidanase từ vi nấm biển có pH tối ưu ở vùng axit yếu. Fucoidanase từ hai chủng vi nấm biển *Fusarium* sp. LD18 và *D. arenaria* TM94 đều có hoạt tính mạnh nhất ở pH 6,0 [50], [49].

So với động vật thân mềm và vi nấm biển, fucoidanase từ vi khuẩn biển có vùng pH hoạt động rộng hơn, hoạt tính tối ưu thường ở vùng pH trung tính hoặc kiềm từ 6 đến 9. Fucoidanase FFA1, FFA2 từ vi khuẩn biển *F. alga* và Fhf1, Fhf2 từ *F. haliotis* hoạt động tối ưu ở pH từ 6,5-9,0 [6], [15], [16] và 8,0-9,0 [27], [28]. Trong khi đó, fucoidanase FWf1 và FWf2 hoạt động tốt trong vùng pH trung tính và acid yếu từ 6,0-7,2 [37]. Bên cạnh giá trị pH, loại đệm sử dụng trong môi trường phản ứng cũng ảnh hưởng lớn đến hoạt tính của fucoidanase. Mặc dù có khoảng pH thích hợp khá tương đồng, một số enzyme chỉ có thể hoạt động tốt trong đệm phosphate như FFA1 [34], FFA2 [35] hay Fhf1 [27], nhưng một số khác lại hoạt động mạnh hơn trong môi trường chứa đệm Tris như Fhf2 [28], hay MEF2 [58]. Fucoidanase MEF2 được cho thấy hoạt động tốt trong đệm UB4 ở pH 6,0-8,0 và đạt tối ưu ở 7,0-8,0, tuy nhiên với cùng khoảng pH này, nhưng trong đệm Borate, hoạt tính của enzyme lại bị giảm đáng kể [58].

1.4.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase

Các fucoidanase được phát hiện cho đến nay phần lớn có nguồn gốc từ sinh vật biển, nơi có nhiệt độ môi trường sống ổn định và ít biến động. Nhìn

chung, fucoidanase hoạt động hiệu quả trong các phản ứng có nhiệt độ thích hợp, nhiệt độ quá thấp hoặc quá cao có thể ức chế hoạt tính của chúng [25].

Bên cạnh đó, fucoidanase từ nấm biển và động vật thân mềm biển là các enzyme có độ bền nhiệt độ khá cao. Nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của fucoidanase từ ốc bàn tay *Lambis* sp. lên đến 45°C và hoạt tính chỉ giảm đi một nửa khi ủ enzyme này trong 20 phút ở 54°C [6]. Tương tự, fucoidanase từ nhím biển *S. nudus* hoạt động mạnh nhất ở 45°C và vẫn ổn định ở mức nhiệt 50°C [31]. Trong khi đó, các fucoidanase từ vi nấm biển như *Fusarium* sp. LD18 [50] và *D. arenaria* TM94 [49] cũng thể hiện hoạt tính tối đa ở 50°C.

Khác với các fucoidanase từ các nguồn kể trên, fucoidanase từ vi khuẩn biển hoạt động tốt ở mức nhiệt độ thấp hơn, hầu hết các enzyme này có nhiệt độ tối ưu trong khoảng 20 đến 37°C. Fucoidanase FFA1 và FFA2 thể hiện hoạt tính mạnh nhất ở 25-37°C [46], [34], [35] trong khi nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của FWf1 và MfFcnaA lần lượt ở 24-35°C [37] và 20-25°C [32]. Mặc dù vậy, một số enzyme mới được công bố vẫn có khả năng hoạt động ở mức nhiệt hoạt động tương đối cao, như Fhf1, FWf2 và tFda1B đạt hoạt tính mạnh nhất ở 40°C [27], [37], [38] và Fhf2 ở 45°C [28].

1.4.4. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl và ion kim loại hóa trị 2 đến hoạt tính của fucoidanase

So với các yếu tố khác, ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến hoạt tính của fucoidanase chỉ mới được quan tâm nghiên cứu trong thời gian gần đây [27], [28], [37]. Các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, hầu hết các fucoidanase đặc biệt là các fucoidanase tái tổ hợp có khả năng hoạt động tốt trong khoảng nồng độ NaCl khá rộng, từ 50 đến 500mM [37]. Tuy nhiên, nồng độ NaCl trong phản ứng nếu quá cao hoặc quá thấp cũng sẽ gây ức chế đến hoạt tính của fucoidanase [27], [28]. Các công bố về cấu trúc phân tử bậc nhất của một số fucoidanase cũng đã cho thấy, hoạt tính của fucoidanase bị ảnh hưởng bởi nồng độ NaCl là hoàn toàn có cơ sở khoa học, bởi trong phân tử fucoidanase cũng xuất hiện một số vị trí liên kết với ion NaCl [37], [28].

Bên cạnh các yếu tố như pH, nhiệt độ, hay nồng độ NaCl, ion kim loại hóa trị 2 cũng được xem là một trong các tác nhân có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của fucoidanase. Trong đó, mỗi ion kim loại lại ảnh hưởng theo các

chiều hướng khác nhau đến hoạt tính của mỗi fucoidanase nhất định [25]. Ion kim loại Mg^{2+} giúp tăng hoạt tính của fucoidanase FFA1 [34], FFA2 [35] và Fhf2 [28], nhưng lại ức chế hoàn toàn khả năng thủy phân fucoidan của Fhf1 [27]. Trong khi đó, sự có mặt của ion Mn^{2+} hoạt hóa hoạt tính của Fhf1 [27], Fhf2 [28] và FFA2 [35], nhưng lại làm giảm đáng kể hoạt động của FWf1 và FWf2 [37].

Mặt khác, hoạt tính của các fucoidanase được phân lập từ cùng một đối tượng sinh vật, có thể bị ảnh hưởng giống hoặc khác nhau bởi các ion kim loại [37], [28], [42]. Fucoidanase FWf1 và FWf2 từ vi khuẩn biển *W. fucanilytica* CZ1127^T đều được hoạt hóa bởi Ca^{2+} và bị ức chế bởi các ion kim loại Al^{3+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Ni^{2+} [8]. Ngược lại, FFA1 và FFA2 cùng được thu nhận từ vi khuẩn biển *F. alga* nhưng lại chịu các tác động khác nhau bởi ion kim loại. Trong khi fucoidanase FFA1 được hoạt hóa bởi Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} và bị ức chế bởi Zn^{2+} , Cu^{2+} ; thì hoạt tính của FFA2, fucoidanase cùng được thu nhận từ vi khuẩn biển *F. alga*, được hoạt hóa bởi Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} và Ba^{2+} và bị ức chế bởi Al^{2+} , Sn^{2+} , Fe^{2+} và Cu^{2+} [34], [35].

Từ các kết quả nghiên cứu trên có thể thấy pH, nhiệt độ, NaCl và ion kim loại hóa trị 2 đều có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của fucoidanase. Tuy nhiên, cần có nhiều hơn các nghiên cứu về cấu trúc và trung tâm hoạt động của fucoidanase để làm sáng tỏ bản chất mối quan hệ giữa các yếu tố trên với hoạt tính của enzyme, từ đó có thể xác định một cách chính xác điều kiện hoạt động tối ưu của fucoidanase.

1.5. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU FUCOIDANASE

1.5.1. Các nghiên cứu trong nước

Việt Nam với tổng chiều dài bờ biển hơn 3.200km làm ranh giới phía tây của Biển Đông có diện tích trên 3,5 triệu km^2 , là một trong những vùng biển quan trọng của thế giới. Theo kết quả điều tra cho thấy, nguồn tài nguyên rong biển của nước ta rất phong phú và đa dạng bao gồm gần 1000 loài rong biển thuộc 3 ngành rong biển chính là rong Đỏ, rong Nâu và rong Lục. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về polysaccharide và các chất chống oxy hóa từ rong biển đã được một số nhà khoa học tiến hành. Trong đó, lĩnh vực nghiên cứu về fucoidan và fucoidanase đang phát triển mạnh mẽ trong những năm gần đây. Một số loại

fucoidan khác nhau và một số enzyme phân hủy fucoidan đã được phân lập và nghiên cứu. Sự quan tâm đến fucoidan từ các nguồn khác nhau, cấu trúc và các ứng dụng sinh học có thể có của nó đã tăng lên. Do đó, các nghiên cứu để tìm kiếm và tinh sạch fucoidanase đã được quan tâm nhiều.

Theo thông tin thu thập được từ các công trình khoa học nghiên cứu trong nước nói chung và Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang nói riêng cho thấy, việc nghiên cứu về fucoidanase đã được thực hiện trong nhiều năm trở lại đây và thu được những kết quả nhất định: sàng lọc, phân lập, và xác định hoạt tính thủy phân fucoidan của enzyme được chiết xuất trực tiếp từ động vật thân mềm biển [5], hay vi khuẩn biển [3], [4]; đã tinh sạch và xác định đặc tính xúc tác của endo (1→4) fucoidanase từ gan tụy Ốc tay quéo *Lambis* sp. [6]; cùng với các nhà khoa học Nga đã tìm ra được phương pháp sàng lọc nhanh enzyme fucoidanase từ vi khuẩn biển [60]. Tuy nhiên, cho đến nay, vẫn chưa có enzyme nào hoạt động hiệu quả cao trên cơ chất fucoidan chiết từ rong nâu Việt Nam. Các nhà khoa học vẫn đang không ngừng tìm kiếm các chủng vi khuẩn biển có khả năng sinh fucoidanase, sau đó tiến hành giải và phân tích trình tự bộ gene vi khuẩn để có thể tìm kiếm được gene mã hóa fucoidanase, có hoạt tính cao trên nguồn cơ chất fucoidan dồi dào và phong phú về cấu trúc và hoạt tính, tiến tới sản xuất enzyme tái tổ hợp, ứng dụng làm công cụ điều chế fucoidan KLPT thấp ứng dụng trong lĩnh vực y dược, thực phẩm, mỹ phẩm.

1.5.2. Các nghiên cứu trên thế giới

Bằng chứng đầu tiên về việc vi khuẩn có khả năng giải phân fucoidan được công bố vào năm 1959 [61]. Thuật ngữ "fucoidanase" xuất hiện vào năm 1967 và được sử dụng để chỉ một phần tử enzyme được tinh chế từ gan tụy của động vật thân mềm biển *Haliotus* sp. [41]. Kể từ đó đến nay, hơn nữa thế kỷ trôi qua fucoidanase thu nhận được vẫn còn rất hạn chế. Trong thời gian gần đây, ngày càng có nhiều hơn số lượng fucoidanase được công bố, tuy nhiên, việc tinh sạch, xác định đặc tính xúc tác và cấu trúc phân tử fucoidanase vẫn còn rất hạn chế. Tính đến tháng 3 năm 2022, họ GH107 có 29 thành viên trong đó có 07 fucoidanase được xác định đặc tính sinh học (gồm Fhf2 (GenBank WP_066217784.1) từ *F. haliotis*; MfFcnA (CAI47003.1) từ *Mariniflexile fucanivorans*; P5AFcnA (AYF59291.1) và P19DfcnA (AYF59292.1) từ *Psychromonas* sp. SW19D và SW5A; Fp273 (AYC81238.1), Fp277 (AYC81239.1), và Fp279

(AYC81240.1) từ dòng vi khuẩn không nuôi cấy được) và 02 fucoidanase được xác định cấu trúc là MfFcnA và P5AFcnA. Trong khi đó, họ GH168 gồm 47 thành viên nhưng chỉ có duy nhất 01 fucoidanase được công bố về đặc tính xúc tác là FunA từ *W. fucanilytica* CZ1127T (ANW96599.1) [33].

Một bước tiến lớn trong quá trình nghiên cứu fucoidanase là lần đầu tiên cấu trúc tinh thể của fucoidanase được thực hiện thành công, và công bố trên trình tự acid amin của 2 fucoidanase MfFcnA và P5AFcnA [29]. Trong nghiên cứu này, vùng bảo thủ (D1 domain) chịu trách nhiệm về hoạt tính của fucoidanase cũng lần đầu tiên được xác định, đó là một đoạn polypeptide gồm khoảng 400 acid amin có cấu trúc dạng xoắn và tám kết hợp (β/α)₈ tính từ đầu tận cùng amino của chuỗi protein, mỗi vùng đều chứa 02 gốc acid amin là Aspartic (D) và Histidine (H) là trung tâm hoạt động của enzyme (tương ứng với vị trí D226 và H294 của trình tự MfFcnA, D201 và H276 của trình tự P5AFcnA), cùng với các vị trí liên kết khác trong đó có liên kết với ion Ca²⁺ [29]. Nhờ vào công bố về trung tâm hoạt động, vị trí xúc tác và cấu trúc 3D của fucoidanase từ nhóm nghiên cứu của Vicker và cộng sự, một loạt các fucoidanase khác cũng đã được xác định trong thời gian ngắn sau đó, như 04 fucoidanase từ vi khuẩn biển *W. fucanilytica* CZ1127T [37], fucoidanase P19DFcnA từ vi khuẩn *Psychromonas* sp. [29], fucoidanase Fhf1 từ *F. haliotis* [27], hay gần đây nhất là fucoidanase thứ 2 của chủng vi khuẩn *F. haliotis*, Fhf2 [28]. Các fucoidanase này không phải được sàng lọc, phân lập, tách chiết trực tiếp từ tế bào sinh vật như các nghiên cứu trước đây, mà được tổng hợp bằng kỹ thuật sinh học phân tử nhờ vào việc dự đoán các trình tự protein tiềm năng sẵn có trên Ngân hàng gen thế giới (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Trong các nghiên cứu này, bên cạnh vùng D1 và trung tâm hoạt động của fucoidanases, một số vùng bảo thủ khác như vùng peptide tín hiệu (signal peptide), vùng Cadherin-like domain (IgR), hay vùng Type IX secretion system (T9SS) cũng được xác định.

Như vậy, mặc dù đã có những bước tiến trong quá trình tìm kiếm và tinh sạch fucoidanase, việc nghiên cứu fucoidanase vẫn còn rất nhiều khó khăn thách thức. Một trong những khó khăn hàng đầu đó là dữ liệu về fucoidanase trên ngân hàng dữ liệu còn hạn chế, enzyme có tính đặc hiệu cao nhưng cấu trúc của cơ chất fucoidan lại vô cùng phức tạp. Điều này dẫn đến cần phải có

những chuyên gia hàng đầu về sinh học phân tử, sinh hóa phối hợp để tìm ra nhiều hơn nữa fucoidanase mới có hoạt tính đối với fucoidan có cấu trúc đa dạng và phức tạp.

1.6. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP TRONG ĐIỀU CHẾ FUCOIDAN TRỌNG LƯỢNG PHÂN TỬ THẤP

Trong tự nhiên fucoidan có chức năng bảo vệ rong biển chống lại sự xâm nhập của vi sinh vật gây bệnh và các tác hại của môi trường như hạn hán hay thủy triều. Trong đời sống con người, thì người Nhật đã sử dụng rong biển như là một loại thức ăn truyền thống và thực tế đã cho thấy người Nhật có tuổi thọ và chất lượng cuộc sống thuộc hàng tốt nhất thế giới. Vì chính những lợi ích của fucoidan mà người ta thấy trong tự nhiên, xã hội đã được các nhà nguyên cứu quan tâm trong thời gian gần đây. Fucoidan tảo nâu, là loại polysaccharide được nghiên cứu rộng rãi nhất cho đến nay. Fucoidan oligosaccharide có hoạt tính sinh học thu được từ hoạt động của fucoidanase là một trong những thành phần đầy hứa hẹn cho các ứng dụng y sinh. Hoạt tính sinh học cao của fucoidan phụ thuộc vào mức độ sulfat hóa của chúng. Fucoidanase được phát hiện có hoạt tính sinh học cao [2]. Fucoidanase được biết đến là enzyme thủy phân fucoidan thành oligosaccharide có đặc tính chống viêm, chống ung thư, kháng virus và chống đông máu. Do đó, nghiên cứu về nguồn gốc, phương pháp phân lập, tác dụng của fucoidanase đối với fucoidan và hoạt động enzyme của nó rất hứa hẹn và có thể được sử dụng để xây dựng sức đề kháng của cơ thể đối với các yếu tố môi trường bất lợi (điều kiện làm việc khó khăn, căng thẳng và làm việc quá sức), cũng như phục hồi và kích thích đáp ứng miễn dịch thuốc cho các mục đích khác nhau [62]. Có thể thấy, tìm kiếm nguồn phân lập và thu nhận fucoidanase là bước đi quan trọng và thiết yếu trong các nghiên cứu về fucoidanase. Bên cạnh phương pháp truyền thống là phân lập và sàng lọc enzyme fucoidanase trực tiếp từ sinh vật biển hay giải trình tự bộ gene của chủng vi khuẩn tuyển chọn, thì phương thức khai thác nguồn dữ liệu vô tận trên ngân hàng gene thế giới (NCBI), kết hợp với các thông tin mới nhất về trình tự gene và cấu trúc của fucoidanase đã được công bố, cùng với các công cụ tin sinh học, đã mở ra một hướng nghiên cứu mới giúp tăng khả năng phát hiện các gene tiềm năng mã hóa fucoidanase một cách nhanh chóng và hiệu quả. Ngoài ra, việc thực hiện nghiên cứu fucoidanase tái tổ hợp bằng các kỹ thuật

như tạo dòng, biểu hiện gene, tinh sạch, xác định đặc tính cấu trúc không chỉ giúp tạo ra nguồn thu nhận fucoidanase ổn định, hiệu suất cao mà còn giúp cho các công trình khoa học và công bố trong nước bắt kịp với xu thế phát triển chung của thế giới.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET-28b(+) chứa đoạn gene mã hóa fucoidanase *Psfu* và trình tự gene kháng kháng sinh Kanamycin là yếu tố chọn lọc (kí hiệu chủng PSFU21). Đây là đoạn gene tìm kiếm được trên ngân hàng dữ liệu online (Mã số Genbank TMP05905.1), có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. S3178 mã số Genbank PNCW00000000.1. Quá trình tạo dòng đã được thực hiện trong đề tài nghiên cứu khoa học mã số VAST02.01/23-24.

Cơ chất fucoidan chiết xuất từ các loài rong nâu khác nhau thuộc 3 nhóm cấu trúc khác nhau theo phương pháp hóa học [45], được cung cấp từ nhóm nghiên cứu thuộc Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, trong đó *Fucus vesiculosus* (Fv) được mua của hãng Sigma (Sigma-Aldrich, Steinheim, Đức):

Nhóm 1: *Saccharina latissima* (Sl), *S. cicrioides* (Sc), *Turbinaria ornata* (To) nhóm fucoidan có chứa liên kết 1-3.

Nhóm 2: *Fucus evanescens* (Fe), *F. vesiculosus* (Fv) nhóm fucoidan có chứa liên kết α -(1 \rightarrow 3) và α -(1 \rightarrow 4) xem kẽ nhau.

Nhóm 3: *Sargassum mcclurei* (Sm), *S. oligocystum* (So) và *S. polycystum* (Sp) thuộc nhóm galactofucan chiết xuất từ các loài rong nâu thu nhận ở vùng biển Việt Nam.

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị chính như sau: Tủ ủ lắc, điều chỉnh nhiệt độ (Shaking incubator NB -250V); Bộ điện di đứng (Cleaver scientific); Bộ chuyển màng lai (Bio-Rad); Cân phân tích ((KD-TBED-600); Máy đo quang phổ (DLAB SP-UV1100); Máy đo pH (Hanna HI98107); Máy khuấy từ gia nhiệt (Velp scientifica); Máy Vortex (IKA); Máy li tâm (Hermle Z 446 K); Nồi hấp tiệt trùng (Tomy ES-315); Tủ ủ vi sinh 37°C (Mettler); Tủ cấy vô trùng (Telstar

AV-100)); Tủ mát 4°C (Sanyo); Tủ lạnh -20°C (Sanaky); Tủ lạnh âm sâu -80°C (Sanaky); Tủ sấy (France etuves).

Và một số dụng cụ cơ bản của phòng thí nghiệm vi sinh-sinh học phân tử gồm: micropipette, đầu típ, ống nghiệm các thể tích, que cấy, đèn cồn, đĩa petri, becher, erlen, bình tia, ống falcon 15ml, 50ml...

2.1.3. Hóa chất

**** Môi trường nuôi cấy E. coli, biểu hiện protein tái tổ hợp***

Môi trường Lysogeny broth (LB): 10g peptone, 5g cao chiết nấm men (yeast extract), 10g NaCl, thêm nước cất vừa đủ 1 lít môi trường.

Thành phần LB bổ sung kháng sinh : 10g peptone, 5g cao chiết nấm men (yeast extract), 10g NaCl, 50µg/mL kanamycin thêm nước cất vừa đủ 1 lít môi trường.

Môi trường LB bổ sung kháng sinh và arabinose: 10g peptone, 5g cao chiết nấm men (yeast extract), 10g NaCl, 50µg/mL kanamycin, 0,5 g arabinose, thêm nước cất vừa đủ 1 lít môi trường.

Chất cảm ứng IPTG (Isopropyl b-D thiogalactoside): bổ sung vào môi trường LB chứa kháng sinh và arabinose, nồng độ cuối đạt 1mM.

**** Hóa chất tách chiết và tinh sạch protein tái tổ hợp***

Đệm chiết enzyme: Tris-HCl 20mM, NaCl 250mM, Imidazole 20mM, pH 7,5. Bổ sung lysozyme nồng độ cuối đạt 0,2mg/mL và bảo quản ở 4°C trước khi sử dụng.

Đệm rửa giải qua cột sắc ký Nikel Sepharose (GE Healthcare, USA): Tris-HCl 20mM, NaCl 250mM, Imidazole (20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, và 500mM), pH 7,5. Bảo quản ở 4°C trước khi sử dụng.

Đệm rửa giải qua cột PD10 (GE Healthcare, USA): Tris-HCl 20mM, NaCl 100mM, pH 7,5. Bảo quản ở 4°C trước khi sử dụng.

**** Hóa chất chạy điện di Carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-PAGE) và cách tiến hành chuẩn bị gel điện di***

Dung dịch đệm pha mẫu: 50% glycerol và 0,02% phenol red, pha trong nước cất.

Acrylamid/bisacrylamid 40%: 187,5g Acrylamid; 12,5g Bisacrylamid. Thêm nước cất vừa đủ 500mL. Bảo quản ở 2-8°C.

Đệm chạy điện di C-PAGE (2X): 48,4g Tris-base, 26g axit boric. Thêm nước đến đủ 2 lít. Lọc và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Dung dịch nhuộm gel C-PAGE: 0,01% O toluidine blue trong EtOH, AcOH và nước với tỉ lệ thể tích 2:1:1. Pha sẵn từ 1 đến 2 lít. Bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Mẫu chuẩn oligosaccharide là sản phẩm sau thủy phân của enzyme fucoidanase Fhf1 [7] trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *F. evanescens*, đã được xác định cấu trúc và kích thước phân tử.

*** Hóa chất dùng để điện di protein SDS-PAGE**

Acrylamid/bisacrylamid 40%: 187,5g Acrylamid; 12,5g Bisacrylamid. Thêm nước cất vừa đủ 500mL. Bảo quản ở 2-8°C.

Tris HCl 1,5M pH 8,8: 181,7g Tris (M=121,14). Thêm nước cất đến khoảng 900mL, chỉnh pH 8,8 bằng HCl đậm đặc. Thêm nước cất vừa đủ 1 lít. Lọc và bảo quản ở 2-8°C.

Tris HCl 0,5M pH 6,8: 60,57g Tris (M=121,14). Thêm nước cất đến khoảng 900mL, chỉnh pH 6,8 bằng HCl đậm đặc. Thêm nước cất vừa đủ 1 lít. Lọc và bảo quản ở 2-8°C.

SDS 10%: 100g Natri dodecyl sulfat (SDS). Thêm nước cất vừa đủ 1000mL, bảo quản nhiệt độ phòng.

APS 10%: 100g Amoni persulfat (APS). Thêm nước cất vừa đủ 1000mL, bảo quản ở 2-8°C.

TEMED: dung dịch Tetramethylethylenediamine.

Dung dịch đệm pha mẫu dạng khử: 12,5mL Tris HCl 0,5M pH 6,8, 2,5g SDS, 10mL glycerol, 0,2g xanh bromophenol, bổ sung thêm 2-mercaptoethanol đạt nồng độ cuối 5%. Thêm nước cất vừa đủ 100mL.

Đệm chạy điện di SDS-PAGE: 3g Tris-base, 14,4g Glycine, 10g SDS. Thêm nước vào đủ 1 lít. Bảo quản nhiệt độ phòng.

Thang protein chuẩn: Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

*** Hóa chất dùng để chuyển màng làm Western Blot**

Màng lai Polyvinylidene difluoride PVDF (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Đệm chuyển protein lên màng lai: sử dụng đệm chạy điện di SDS-PAGE có bổ sung 10% methanol.

Đệm TBS pH 8,3: 6,1g Tris (M=121,14), 9g NaCl. Thêm nước cất đủ 900mL, chỉnh pH đến 8,3 bằng axit HCl. Thêm nước cất đủ 1 lít. Lọc và bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Dung dịch đệm khóa màng: đệm TBS pH 8,3 bổ sung skim milk nồng độ cuối đạt 2%.

Kháng thể liên kết đặc hiệu với protein đích tái tổ hợp: monoclonal anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

Kit thuốc nhuộm AEC Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) phát hiện protein đích tái tổ hợp liên kết với kháng thể.

Thang protein chuẩn: Precision Plus Protein™ Stained Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

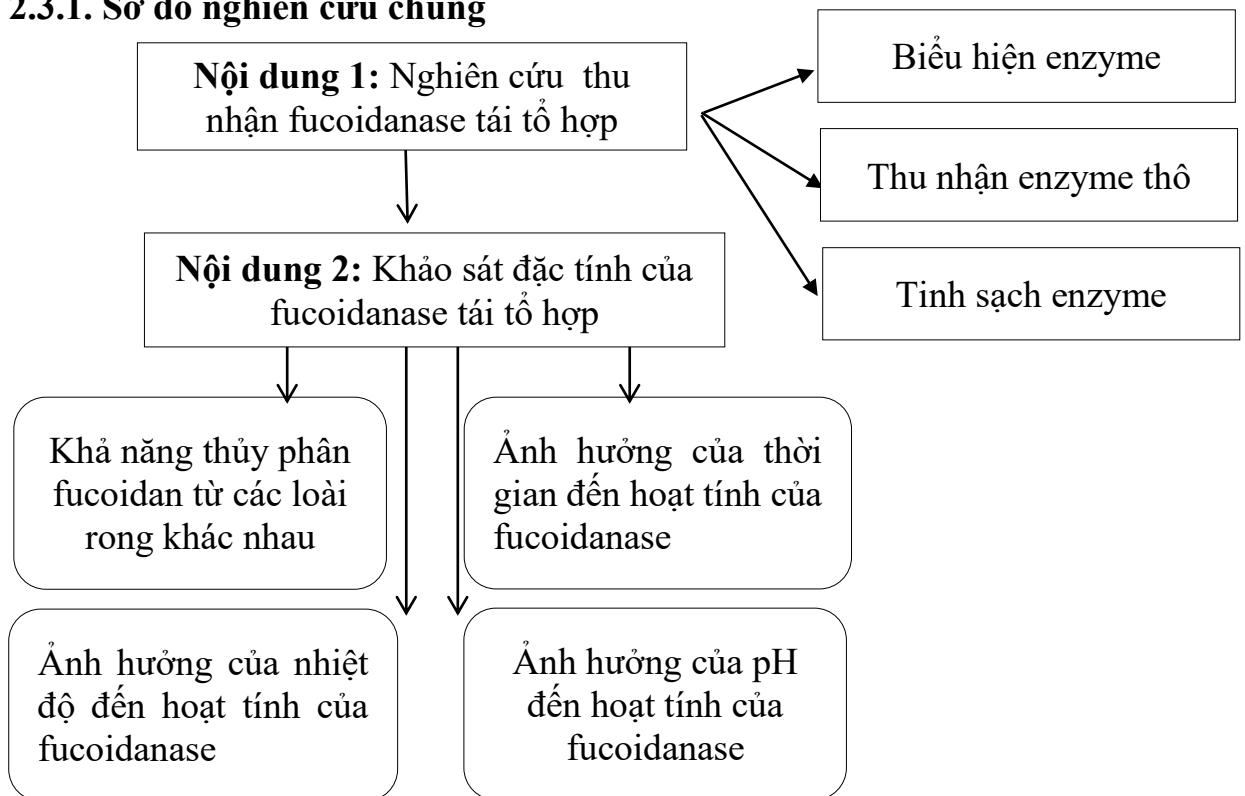
2.2. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 09 năm 2022 đến tháng 09 năm 2023.

Địa điểm nghiên cứu: tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật biển, Trung tâm Nghiên cứu tiên tiến và sáng tạo Hòn Chông, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Sơ đồ nghiên cứu chung



Hình 2. 1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài

Đề tài được thực hiện thông qua hai nội dung nghiên cứu chính đó là Nghiên cứu thu nhận fucoidanase tái tổ hợp và khảo sát đặc tính của fucoidanase tái tổ hợp. Trong đó nội dung 1 gồm 3 công việc là: Biểu hiện enzyme, thu nhận enzyme thô và tinh sạch enzyme; Nội dung 2 gồm 4 công việc là: Khả năng thủy phân fucoidan từ các loài rong khác nhau, ảnh hưởng của thời gian đến hoạt tính của fucoidanase, ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase và ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của fucoidanase.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thu nhận fucoidanase tái tổ hợp

2.3.2.1. Biểu hiện fucoidanase

Chúng vi khuẩn *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp mang gene mã hóa fucoidanase (*Psfu*) (PSFU21) từ ống giữ giống được nuôi cấy tăng sinh và làm thuần trên môi trường thạch LB, có bổ sung kháng sinh Kanamycin ở nồng độ 50µg/mL làm yếu tố chọn lọc, ở 37°C trong 18 giờ. Chọn một khuẩn lạc thuần của vi khuẩn trên môi trường thạch LB cho vào 10mL môi trường LB lỏng có bổ sung Kanamycin ở nồng độ 50µg/mL, nuôi cấy ở 37°C, tốc độ lắc 180 vòng/phút

trong qua đêm. Sau đó, hút 5mL dịch vi khuẩn trên vào 500mL LB lỏng bổ sung Kanamycin đạt 50 μ g/mL. Tiếp tục nuôi lắc ở cùng điều kiện, cho đến khi OD₆₀₀ đạt từ 0,6 đến 0,8. Tiến hành cảm ứng biểu hiện protein bằng chất cảm ứng IPTG (Isopropyl b-D thiogalactoside), nồng độ cuối đạt 1mM, tốc độ lắc 180 vòng/phút, ở 20°C trong khoảng 18 giờ hoặc qua đêm. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 5.000 vòng/phút, ở 4°C trong vòng 30 phút. Các điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn PSFU21 biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp Psfu được thể hiện qua bảng 2.1.

Bảng 2. 1. Điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn PSFU21 biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp Psfu

STT	Điều kiện nuôi cấy	Chỉ số cụ thể
1	Môi trường nuôi cấy	LB
2	Nồng độ kháng sinh Kanamycin	50 μ g/mL
3	Thời điểm bổ sung chất cảm ứng (IPTG)	Mật độ tế bào trong môi trường: OD ₆₀₀ đạt 0,8
4	Nồng độ chất cảm ứng IPTG	1mM
5	Tốc độ lắc	180 vòng/phút
6	Nhiệt độ biểu hiện	20°C
7	Thời gian biểu hiện	18 giờ

Tiến hành loại dịch nổi, thu sinh khối tế bào. Sinh khối tế bào được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp chạy điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) và Western blot của sinh khối vi khuẩn thu được.

2.3.2.2. Phương pháp thu nhận enzyme thô nội bào

Sinh khối của tế bào PSFU21 - được huyền phù hóa bằng dung dịch đệm chiết enzyme theo tỉ lệ sinh khối : đệm là 1:3 (w/v) trước khi tiến hành phá vỡ tế bào bằng thiết bị siêu âm. Ly tâm dịch huyền phù sinh ở 20.000 vòng/phút trong 20 phút để tủa xác sinh khối và thu dịch nổi. Phần dịch nổi sau đó được

lọc qua màng có kích thước lỗ 0,45 μ m, phần dịch dưới màng được gọi là enzyme thô. Hàm lượng protein được thực hiện theo phương pháp Lowry.

2.3.2.3. Phương pháp tinh sạch enzyme

Dịch enzyme thô được tinh sạch bằng cột sắc ký Nikel Sepharose (GE Healthcare, USA) với các bước cụ thể như sau: Nạp vào cột nhựa Ni²⁺ Sepharose HisTrap HP đã được cân bằng trước với dung dịch đệm cân bằng (20 mM Tris-HCl, NaCl 250 mM, imidazole 20 mM, pH 7,4). Hỗn hợp enzyme-nhựa được ủ qua đêm ở 4°C với sự khuấy trộn nhẹ nhàng để quá trình liên kết diễn ra tốt nhất. Sau đó, đưa hỗn hợp nhựa-enzyme lên cột tinh sạch, phần dịch qua cột được kiểm tra bằng SDS-PAGE và Western Blot để kiểm tra khả năng hấp thu enzyme lên nhựa.

Phần enzyme hấp thu với nhựa Nikel sau đó được rửa giải với các với nồng độ Imidazole tăng dần với các nồng độ 50, 100, 150, 200, 250, và 300mM. Sau khi qua cột Nikel Sepharose, phân đoạn chứa protein mục tiêu tiếp tục được loại Imidazole và muối bằng cách sử dụng cột PD10 (GE Healthcare, USA) với đệm rửa tương ứng, dựa trên quy trình của nhà sản xuất. Fucoidanase tinh sạch được xác định nồng độ protein, chia nhỏ vào các ống eppendofit với thể tích dịch enzyme tinh sạch trong mỗi ống là 0,5mL, nồng độ 0,2mg/mL và giữ ở -80°C.

2.3.3. Phương pháp khảo sát đặc tính của fucoidanase tái tổ hợp

2.3.3.1. Phương pháp xác định khả năng thủy phân cơ chất fucoidan

Khả năng thủy phân các cơ chất fucoidan tách chiết từ 08 loài rong khác nhau thuộc 3 nhóm cấu trúc fucoidan khác nhau: Nhóm I: *S. latissima* (F1.1), *S. cicrioides* (F1.2), *T. ornate* (F1.3); nhóm II: *F. evanescens* (F2.1), *F. vesiculosus* (F2.2), và nhóm III: *S. mcclurei* (F3.1), *S. polycystum* (F3.2) và *S. oligocystum* (F3.3).

Hỗn hợp phản ứng gồm 1mg/mL cơ chất fucoidan và 0,1mg/mL enzyme fucoidanase được thực hiện ở điều kiện cơ bản (10mM đệm Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 10mM CaCl₂, 30°C, 24 giờ). Dừng phản ứng bằng cách làm nóng ở 85°C trong vòng 10 phút. Sản phẩm dịch thủy phân được trộn đều với dung dịch đệm pha mẫu theo tỷ lệ 1:1 để chuẩn bị cho chạy C-PAGE.

2.3.3.2. Phương pháp xác định ảnh hưởng của yếu tố thời gian thủy phân

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hoạt tính của fucoidanase: sau khi xác định được cơ chất fucoidan đặc hiệu của enzyme fucoidanase, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản như ở mục 2.3.3.1, ở các khoảng thời gian khác nhau: 0, 30, 60 phút, 2, 4, 8, 12, 24 và 48 giờ.

2.3.3.3. Phương pháp xác định ảnh hưởng nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase: sau khi xác định được cơ chất fucoidan đặc hiệu và thời gian phản ứng thích hợp, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản như ở mục 2.3.3.1 và tiến hành ở các điểm nhiệt độ khác nhau: 20, 25, 30, 37, 40, 45, 50, và 55°C.

2.3.3.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng pH đến hoạt tính của fucoidanase

Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính của fucoidanase: phản ứng thủy phân được thực hiện ở điều kiện cơ bản với cơ chất đặc hiệu, nhiệt độ tối ưu đã được xác định và các pH khác nhau: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, và 11.

2.3.4. Các kỹ thuật sử dụng

2.3.4.1. Phương pháp điện di carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-PAGE)

Khả năng thủy phân liên kết trong mạch chính của cơ chất fucoidan bởi enzyme fucoidanase tái tổ hợp được xác định dựa trên phương pháp điện di carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-PAGE):

Chuẩn bị gel điện di: Chuẩn bị để chạy điện di trên gel polyacrylamide 20% bằng đệm chạy C-PAGE 1X, độ dày gel khoảng 1mm. Để đổ 1 gel cần chuẩn bị 30mL hỗn hợp gồm các hóa chất sau được lấy theo thứ tự theo bảng 2.2:

Bảng 2. 2. Hóa chất chuẩn bị gel điện di.

Dung dịch gốc	Thể tích cần dùng	Ghi chú
(1) Tris-borate 0,1M, pH: 8,3 (2X)	15 mL	Chờ 30-40 phút, cho gel đông lại rồi lắp ghép vào hệ thống điện di.
(2) Acrylamid/bisacrylamid 40%	15 mL	
(3) APS 10%	144 μ L	
(4) TEMED	12 μ L	

Tiến hành điện di: Sử dụng 6 μ L hỗn hợp phản ứng để đưa lên các giếng điện di, chạy cố định 400V trong khoảng 55 phút. Sau khi kết thúc điện di, tiến hành nhuộm gel bằng dung dịch nhuộm gel gồm hai bước: Alciane trong 1h; Rửa bằng nước cất 1-2 lần rồi Toluidine trong 30 phút. Sau đó, tiến hành giải nhuộm bằng cách ngâm và rửa gel nhiều lần trong nước cất đến khi thấy xuất hiện rõ nét các vạch trên mẫu chuẩn. Thuốc nhuộm chỉ bắt màu với các sản phẩm oligosaccharide tạo thành sau phản ứng thủy phân nếu có. Hoạt tính thủy phân của enzyme càng mạnh sẽ tạo ra càng nhiều sản phẩm, thủy phân trọng lượng phân tử thấp, bắt màu thuốc nhuộm và di chuyển xa hơn trên gel so với các sản phẩm thủy phân trọng lượng phân tử cao.

2.3.4.2. Điện di protein trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE)

Phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide có chứa SDS được tiến hành theo phương pháp của Laemmli (Laemmli, 1970): Pha mẫu với dung dịch đệm pha mẫu dạng khử. Mẫu được xử lý nhiệt ở 95°C trong 10 phút để gây biến tính protein. Dùng 8 μ L mẫu/chuẩn để tra vào từng giếng trên gel, tiến hành chạy điện di trên gel polyacrylamide 12%. Đồ dung dịch chạy (Running buffer) SDS-PAGE, chạy điện di ở hiệu điện thế 200V trong 35 phút. Bản gel được nhuộm bằng dung dịch Comassie Brilliant Blue R250 (Bio-rad, Hercules, CA, USA) trong khoảng 1 giờ. Giải nhuộm bằng cách ngâm bản gel đã nhuộm vào dung dịch Acid acetic 7% và methanol 20%, hoặc trong nước cất đến khi nền của bản gel màu trắng thì kết thúc quá trình tẩy. Sau đó gel được chụp ảnh và bảo quản. Hỗn hợp protein Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) được sử dụng là thang chuẩn protein.

2.3.4.3. Phương pháp chuyển màng lai Western blot

Enzyme tái tổ hợp được phân tách bằng điện di SDS-PAGE theo phương pháp nêu trên: Protein trên gel sẽ được chuyển qua màng Polyvinylidene difluoride PVDF (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) trong đệm chạy Tris/glycine pH 8,3, hiệu điện thế 100V trong 45 phút. Các vị trí không chứa protein đích trên màng được khóa trong dung dịch đệm TBS chứa 2% skim milk, pH 7,6 trong 1 giờ, trên máy lắc. Màng chứa protein sau đó được ngâm trong dung dịch TBS và skim milk, có bổ sung kháng thể monoclonal anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) trong 1 giờ. Sau khi màng được rửa lại với dung dịch đệm TBS chứa 2% skim milk trong khoảng 1 giờ, kháng thể gắn kết với protein tái tổ hợp được phát hiện bằng AEC Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Hình ảnh của quá trình chuyển màng lai được scan bằng máy Canoscan LiDE220. Hỗn hợp protein Precision Plus Protein™ Stained Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) được sử dụng là thang chuẩn protein.

2.3.4.4. Định lượng protein

Định lượng protein của dịch enzyme thu nhận được bằng phương pháp Lowry.

Hóa chất cần dùng: Dung dịch A: Na₂CO₃ 2% trong NaOH 0,1N; Dung dịch B: Natri, Kali Tartrate 1% trong nước cất; Dung dịch C: CuSO₄.5H₂O 0,5% trong nước cất; Dung dịch D: hỗn hợp của 3 dung dịch A, B và C với tỷ lệ 48:1:1 (pha trước khi sử dụng); Thuốc thử folin: pha loãng 2 lần với nước cất trước khi sử dụng; Albumin huyết thanh bò (BSA-Bovine Serum Albumin) 1mg/mL được pha thành các nồng độ 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 và 120μl/mL để tiến hành xây dựng đường chuẩn. Dựa vào đồ thị chuẩn để xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu.

Cách tiến hành cho mẫu nghiên cứu: Lấy chính xác 0,5mL dịch chứa protein với hàm lượng thích hợp cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2mL dung dịch D, lắc đều để yên trong 10 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp trong ống nghiệm 0,25mL folin đã pha loãng 2 lần, lắc đều và để yên trong 15-30 phút. Đo màu của hỗn hợp trên máy đo quang ở bước sóng 660nm. Xác định

được trị số mật độ quang học (OD) của dung dịch nghiên cứu. Đo trên máy 3 lần lặp lại và lấy trị số trung bình.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

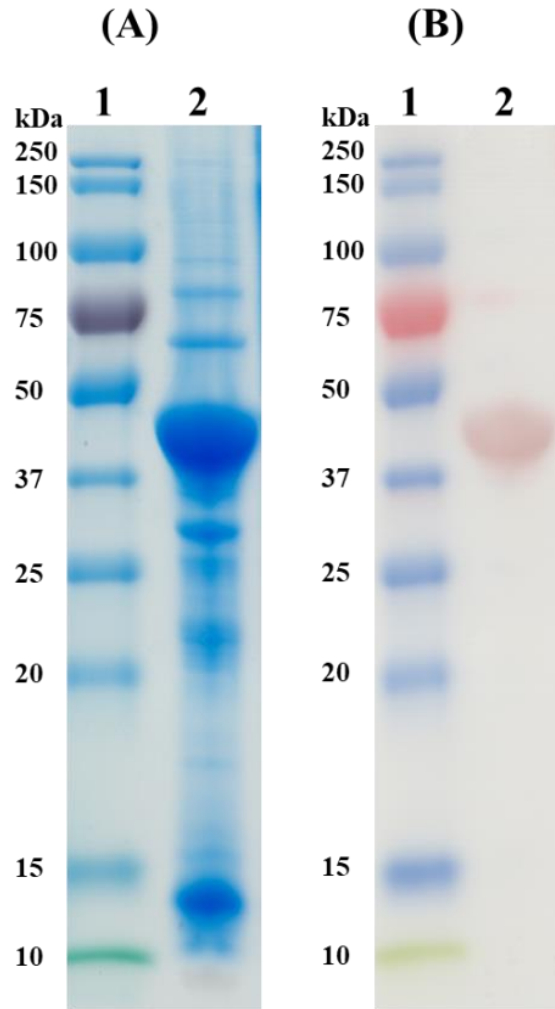
3.1. KẾT QUẢ THU NHẬN FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP

3.1.1. Kết quả biểu hiện fucoidanase của chủng PSFU21

Tiến hành lên men 5L chủng vi khuẩn PSFU21, đây là chủng *E.coli* chứa plasmid tái tổ hợp mang gene mã hóa fucoidanase (*Psfu*) theo phương pháp được nêu ở mục 2.3.2, tương ứng với điều kiện cụ thể được nêu ở Bảng 2.1, để thu nhận fucoidanase tái tổ hợp *Psfu*, với khối lượng phân tử tương đương 45kDa.

Sau quá trình biểu hiện, tiến hành loại dịch nổi và thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 5.000 vòng/phút, ở 4°C trong vòng 30 phút. Tiến hành chạy điện di SDS-PAGE và Western blot mẫu sinh khối thu được, để kiểm tra khả năng biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp *Psfu* của chủng vi khuẩn PSFU21.

Từ kết quả điện di trên SDS-PAGE (Hình 3.1A) cho thấy, chủng PSFU21 có khả năng sinh tổng hợp protein có trọng lượng phân tử khoảng 45kDa. Đây cũng chính là trọng lượng phân tử tương đương với trọng lượng phân tử protein mục tiêu *Psfu*. Để xác định chính xác sự có mặt của protein tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi tiến hành phản ứng lai miễn dịch Western blot (Hình 3.1B), kết quả cho thấy, xuất hiện vạch màu đỏ tương ứng với protein kích thước 45kDa ngay tại vị trí biểu hiện của protein mục tiêu. Vệt màu đỏ trong phản ứng lai Western blot là kết quả cho thấy sự biểu hiện thành công protein tái tổ hợp mục tiêu *Psfu*, do chủng vi khuẩn PSFU21 mang vector pET-28b(+) có chứa đoạn gen mã hóa protein *Psfu* có gắn đuôi His-tag gồm 10 gốc Histidine. Phản ứng màu sẽ xuất hiện khi có sự liên kết giữa protein tái tổ hợp mang đuôi His-tag và kháng thể monoclonal anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody.



Hình 3. 1. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện của fucoidanase tái tổ hợp *Psfu* (A) –Điện di SDS-PAGE; (B)–Western blot

Trong đó: 1. Thang chuẩn protein; 2. Mẫu sinh khối sau biểu hiện

Bên cạnh việc biểu hiện thành công protein *Psfu* với kích thước tương ứng là 45kDa, độ lớn và màu sắc của vệt protein này trên bảng điện di SDS-PAGE cũng cho thấy sự biểu hiện hiệu quả protein với các điều kiện biểu hiện nêu trên. Kết quả này, cũng mang tính tương đồng cao với các công bố khoa học về nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp nói chung và biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp nói riêng. Cho đến nay, *E. coli* BL21 vẫn là chủng vi khuẩn tốt nhất để biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong đó, chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) pLysS thường được sử dụng trong biểu hiện protein dung hợp với đuôi His-tag bằng vector biểu hiện pET. Hệ thống này cho phép biểu hiện vượt mức protein, đồng thời hạn chế tối đa hiện tượng phiên mã rò rỉ khi không có chất cảm ứng. Mặc dù chưa có nghiên cứu nào so sánh hiệu quả biểu hiện giữa

các chủng *E. coli* khác nhau, nhưng kết quả của các công bố gần đây cho thấy việc sử dụng vector pET và chủng vi khuẩn *E. coli* BL21, cùng với các điều kiện biểu hiện (như môi trường, thời gian, nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng...) hợp lý đã mang lại hiệu suất biểu hiện fucoidanase ngày càng cao [27], [28], [37].

Dựa vào kết quả điện di SDS-PAGE và kết quả Western blot chúng tôi nhận thấy, điều kiện nuôi cấy được nêu ở Bảng 3.1 là thích hợp cho sự biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp Psfu. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thu nhận toàn bộ sinh khối sau biểu hiện, bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

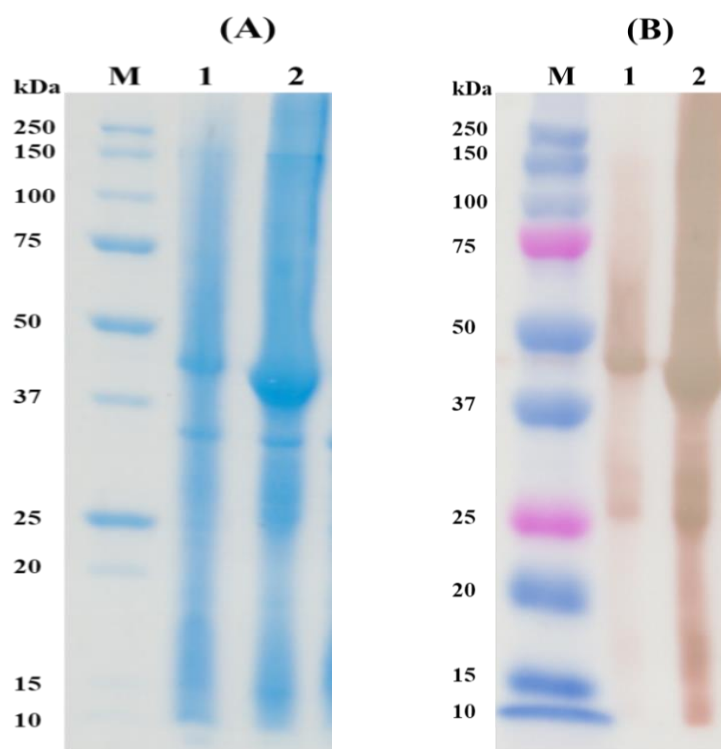
3.1.2. Kết quả thu nhận fucoidanase thô của chủng PSFU21

Fucoidanase Psfu là một dạng enzyme nội bào, hòa tan (intra-cellular, soluble enzyme). Vì vậy, trước tiên sinh khối tế bào được huyền phù hóa trong đệm và phá vỡ bằng phương pháp siêu âm, hỗn hợp sau siêu âm được ly tâm lạnh để phân tách xác tế bào và dịch enzyme nội bào, sau đó tiến hành thu dịch nội bào. Để loại bỏ hoàn toàn xác tế bào và tăng hiệu quả liên kết với cột nhựa tinh sạch, dịch enzyme nội bào thu được sẽ tiếp tục được lọc qua màng với kích thước lỗ $0,45\mu\text{m}$. Kết quả thu nhận fucoidanase Psfu thô trong dịch chiết ngoại bào được thể hiện ở Bảng 3.2. Với 5L môi trường lên men (10 bình môi trường, 500mL/bình), thu được 124 gram sinh khối tế bào và lọc qua màng lọc $0,45\mu\text{m}$ thì khối lượng protein tổng số thu nhận được là 79,8 mg.

Bảng 3. 1. Kết quả thu nhận enzyme fucoidanase *Psfu*

Thể tích lên men (Lít)	Khối lượng sinh khối tươi (gram)	Enzyme thô thu nhận được (mL)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Hàm lượng protein tổng số (mg)
5	124	50	1,596	79,8

Sự hiện diện của fucoidanase **Psfu** trong dịch chiết enzyme được xác định bằng điện di SDS-PAGE và Western-blot. Kết quả thể hiện ở Hình 3.2.



Hình 3. 2. Kiểm tra sự hiện diện của enzyme tái tổ hợp trong dịch chiết thô: SDS-PAGE (A) và Western blot (B)

Trong đó: M. Thang chuẩn protein; 1. Sinh khối tế bào; 2. Dịch enzyme nội bào.

Kết quả kiểm tra sự hiện diện của enzyme thô trong dịch nội bào bằng phương pháp SDS-PAGE và Western blot (Hình 3.2) cho thấy: sinh khối tế bào (1) và dịch enzyme nội bào thu được sau phá vỡ tế bào (2) là một hỗn hợp gồm rất nhiều protein do vi khuẩn sinh tổng hợp, biểu hiện ở vệt màu đậm, dài và phân bố ở tất cả các kích thước khác nhau so với thang chuẩn. Bên cạnh đó, tại vị trí tương ứng với kích thước protein 45kDa, vệt có kích thước rộng và diện

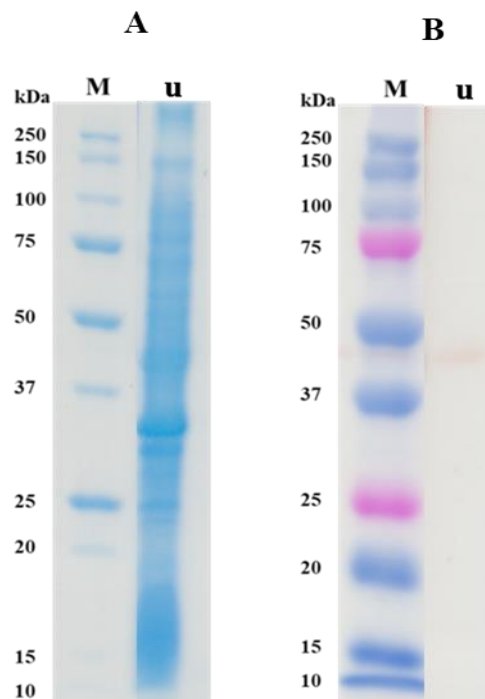
tích lớn nhất, điều này chỉ ra rằng trong cả sinh khối tế bào và đặc biệt là dịch enzyme nội bào chứa chủ yếu protein mục tiêu cần được tinh sạch.

Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng fucoidanase là enzyme có sự gắn kết với màng tế bào chặt chẽ, dù phá vỡ tế bào nhưng enzyme không đi được vào pha chiết mà vẫn dính chặt trên thành tế bào. Kết quả một ở Hình 3.3 cho thấy, fucoidanase Psfu đã đi vào pha chiết, đây là điều kiện thuận lợi để tiến hành bước tinh sạch tiếp theo.

3.1.3. Kết quả tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp

* Kết quả thu nhận fucoidanase Psfu ở các nồng độ Imidazole khác nhau

Dịch enzyme thô thu được dưới màng lọc được nạp lên cột nhựa Nikel, rửa giải bằng đệm có nồng độ Imidazole thích hợp để loại bỏ các protein tạp nhiễm, chuẩn bị cho các bước tinh sạch tiếp theo. Khả năng gắn kết của enzyme tái tổ hợp với cột nhựa Nikel được kiểm tra bằng sự hiện diện của fucoidanase trong phần dịch sau khi hấp thụ fucoidanase với nhựa Nikel.



Hình 3. 3. Kiểm tra sự hiện diện của enzyme tái tổ hợp trong phần dịch không hấp thu bởi nhựa Nikel: SDS-PAGE (A) và Western blot (B)

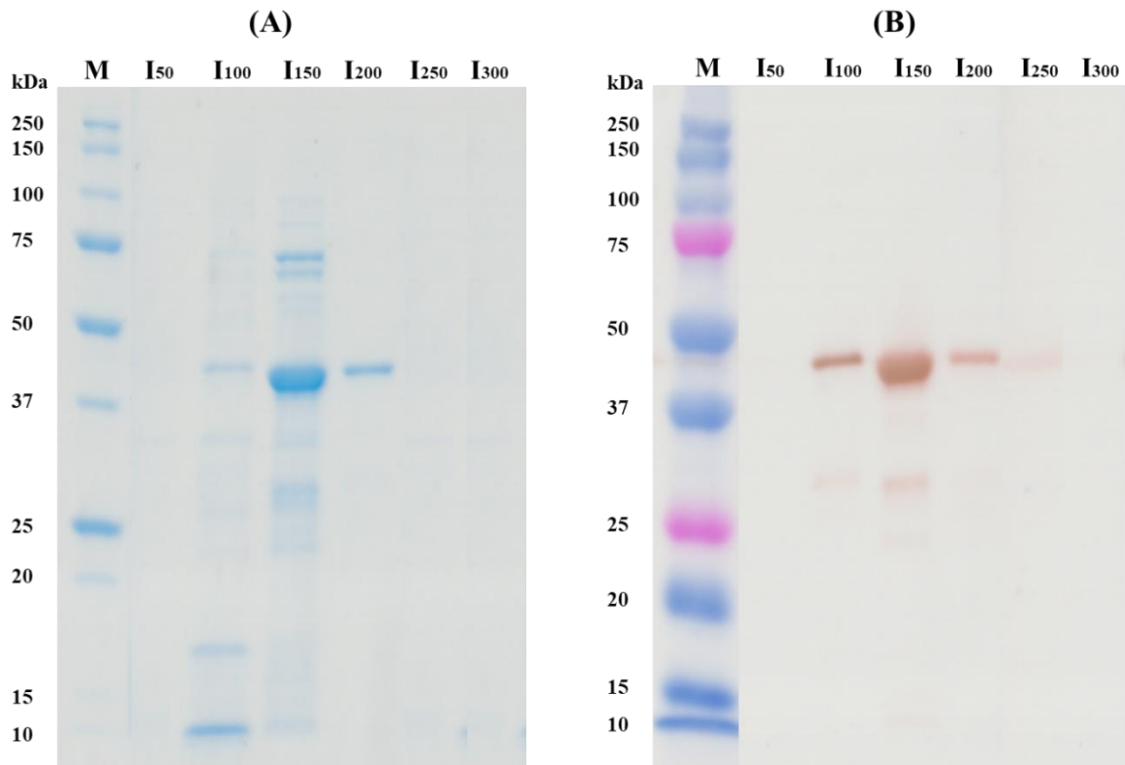
Trong đó: M. Thang chuẩn protein; u. Phần dịch qua cột

Kết quả thể hiện ở Hình 3.3 cho thấy, có thể quan sát thấy trên kết quả điện di SDS-PAGE là một vệt màu xanh đậm, với hàng loạt các band có kích thước khác nhau nhưng kết quả trên Western blot sự có mặt của protein mục tiêu rất ít, hầu như không có, điều này được giải thích là do các protein được rửa giải ra khỏi cột là các protein tạp, không chứa đuôi His-tag nên không có khả năng liên kết với hạt nhựa Nikel của cột tinh sạch. Qua đó, có thể khẳng định, quá trình rửa cột đã loại bỏ một lượng lớn các protein tạp nhiễm, còn protein mục tiêu với đuôi His-tag vẫn đang liên kết với cột nhựa.

Để thu được protein tái tổ hợp sau khi chúng bám vào các hạt Nikel, một số phương pháp khác nhau được sử dụng để tách rửa. Trong đó, việc sử dụng Imidazole ở nồng độ cao đã được sử dụng thành công và đang được sử dụng rộng rãi. Trong nghiên cứu này để tối ưu hóa quá trình thu nhận fucoidanase Psfu, chúng tôi đã sử dụng lần lượt dung dịch đệm có nồng độ Imidazole tăng dần từ 50mM đến 300mM để rửa giải, ở mỗi nồng độ Imidazole tương ứng sẽ thu được mỗi phân đoạn khác nhau. Dịch protein thu được ở mỗi phân đoạn được kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western blot. Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Lowry. Kết quả thu nhận fucoidanase Psfu và hàm lượng protein ở mỗi phân đoạn được thể hiện ở Hình 3.4 và Bảng 3.3. Kết quả Hình 3.4 (A) cho thấy, ở nồng độ Imidazole thấp (50mM), protein chưa được giải phóng. Protein được phát hiện ở các nồng độ Imidazole lớn hơn (100, 150 và 200mM). Sau đó giảm dần và không còn phát hiện thấy trên bảng điện di SDS-PAGE ở nồng độ Imidazole cao hơn là 250 và 300mM. Ở phân đoạn có nồng độ Imidazole 100 và 150mM bên cạnh protein mục tiêu ở vạch tương ứng 45kDa còn phát hiện được rất nhiều protein tạp nhiễm khác. Trong khi đó, ở phân đoạn I200 chỉ xuất hiện 1 band duy nhất ở vị trí 45kDa.

Kết quả chạy Western blot ở Hình 3.4 (B) cho thấy sự xuất hiện của vạch protein mục tiêu ở các phân đoạn có nồng độ Imidazole tương ứng là 100, 150, 200 và 250mM. Trong đó, phân đoạn có nồng độ I100 và I150 thể hiện vạch protein với nồng độ cao và giảm dần ở các phân đoạn Imidazole có nồng độ 200, và 250mM. Kết quả Western blot cũng cho thấy có hiện tượng đứt gãy protein mục tiêu ở nồng độ I100 và I150, vì bên cạnh band chính ở 45kDa còn xuất hiện thêm các band đỏ (có đuôi His-tag) ở khu vực tương ứng với trọng

lượng phân tử thấp hơn từ 30 đến 25kDa. Trong khi đó, ở phân đoạn I200 và I250 chỉ xuất hiện 1 band duy nhất ở đúng vị trí 45 kDa. Kích thước của protein này là phù hợp với kích thước fucoidanase Psfu mục tiêu. Kết quả này chứng tỏ, nồng độ Imidazole 200 và 250mM là thích hợp cho quá trình rửa giải để thu được fucoidanase Psfu có tinh sạch cao và có cấu trúc phân tử toàn vẹn.



Hình 3. 4. Kết quả đánh giá độ tinh sạch fucoidanase Psfu ở mỗi phân đoạn khác nhau bằng điện di SDS-PAGE (A) và Western blot (B)

Trong đó: M. Thang chuẩn protein; I₅₀, I₁₀₀, I₁₅₀, I₂₀₀, I₂₅₀, I₃₀₀ là mẫu các phân đoạn thu được tương ứng với các nồng độ Imidazole 50, 100, 150, 200, 250 và 300mM.

Để đánh giá toàn diện hiệu quả tinh sạch fucoidanase Psfu, chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng protein thu được ở mỗi phân đoạn tương ứng với mỗi nồng độ Imidazole khác nhau. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.3.

Bảng 3. 2. Hàm lượng fucoidanase Psfu ở các phân đoạn khác nhau

STT	Nồng độ Imidazole trong đệm rửa giải (mM)	Thể tích dịch protein thu được ở mỗi phân đoạn (mL)	Hàm lượng protein ở mỗi phân đoạn (mg/mL)
1	50	10	0,082
2	100	10	1,018
3	150	10	1,557
4	200	10	1,172
5	250	10	0,210
6	300	10	0,031

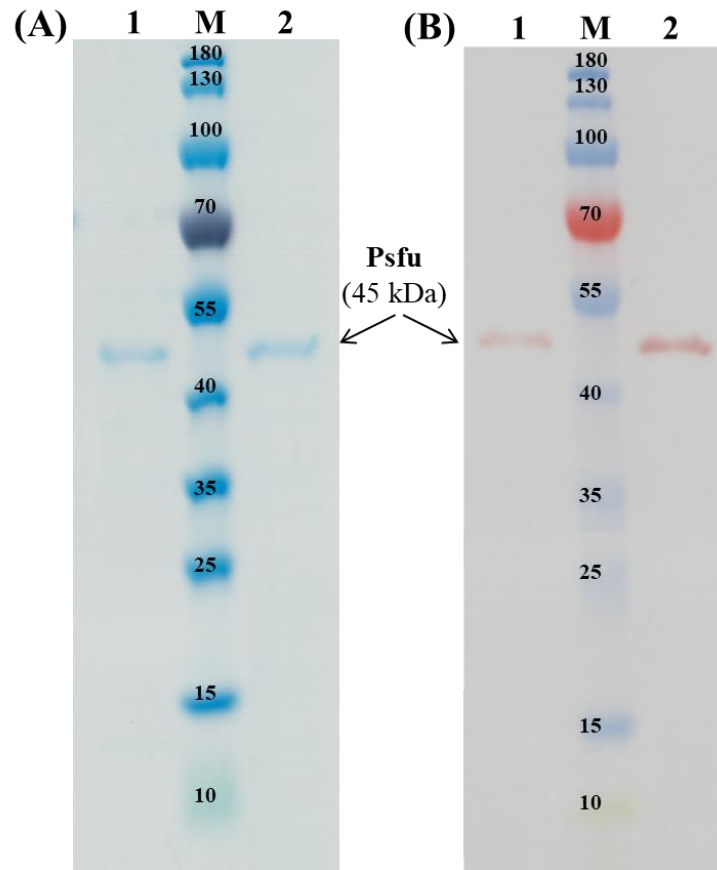
Kết quả Bảng 3.3 cho thấy, với nồng độ Imidazole trong dịch rửa giải là 50mM đã có thể tách rửa được protein trong cột Nikel, tuy nhiên ở nồng độ rất thấp (0,082mg/mL). Ở nồng độ Imidazole 100, 150 và 200mM, quá trình tách rửa nhanh hơn và thu được protein có nồng độ cao, dao động trong khoảng 1,0 đến hơn 1,5mg/mL. Nồng độ protein sau đó giảm nhanh chóng ở nồng độ Imidazole 250 (0,210mg/mL) và 300 (0,031mg/mL).

Kết hợp kết quả điện di và Western blot ở Hình 3.4 và hàm lượng protein ở mỗi phân đoạn từ Bảng 3.3, cùng với mục tiêu chính là thu được protein fucoidanase Psfu với độ tinh sạch cao, cấu trúc phân tử toàn vẹn và hàm lượng protein cao, chúng tôi chọn phân đoạn có nồng độ **Imidazole là 200mM** để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo.

*** Kết quả loại muối và Imidazole trong dịch fucoidanase Psfu tinh sạch được**

Bên cạnh Imidazole, dịch fucoidanase Psfu sau tinh sạch còn chứa một lượng muối NaCl với nồng độ là 250mM. Mặc dù 02 tác nhân này là cần thiết cho quá trình tinh sạch protein đặc biệt là protein tái tổ hợp, tuy nhiên các nghiên cứu cũng cho thấy rằng, bảo quản protein sau tinh sạch trong đệm có hàm lượng Imidazole và muối cao sẽ có thể tạo nên tác dụng ngược, đó là làm

biến đổi cấu trúc và ức chế hoạt tính của enzyme. Vì vậy, sau khi đã tinh sạch được fucoidanase Psfu, để giảm thiểu tác động của Imidazole và muối đến cấu trúc và hoạt tính của enzyme trong quá trình nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi tiến hành loại trừ nồng độ Imidazole và muối bằng cách cho dịch enzyme sau tinh sạch qua cột PD10 với dung dịch đệm không chứa Imidazole và nồng độ NaCl 100mM.

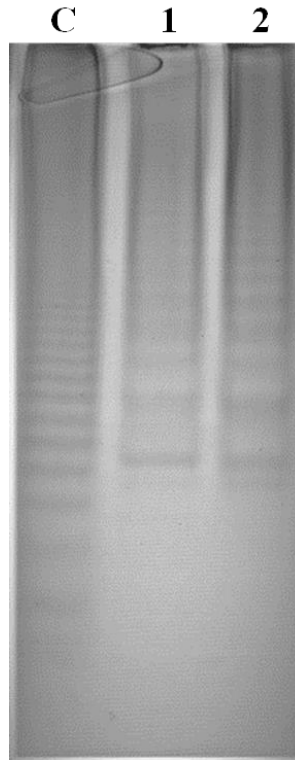


Hình 3. 5. Kết quả đánh giá độ tinh sạch fucoidanase Psfu trước và sau khi loại trừ Imidazole và NaCl

Trong đó: (A). điện di SDS-PAGE; (B). Western blot; (M) thang chuẩn protein; (1) dịch fucoidanase Psfu trước khi qua cột PD10 và (2) dịch fucoidanase Psfu sau khi qua cột PD10.

Kết quả nghiên cứu Hình 3.5 cho thấy, độ sạch và tính toàn vẹn của phân tử protein thu được trước và sau khi qua cột là không có sự thay đổi, khi dịch protein thu được sau khi qua cột PD10 chỉ chứa một band duy nhất tại vị trí 45 kDa là trọng lượng phân tử của fucoidanase Psfu. Trong khi đó, dịch chứa protein lúc này không còn Imidazole và nồng độ muối NaCl lúc này chỉ còn 100mM.

Bên cạnh đó, hàm lượng protein của fucoidanase Psfu thu được sau khi qua cột PD10 đạt 0.984mg/mL. Mặc dù hàm lượng protein của dịch thu được có giảm khoảng 16% so với trước khi qua cột PD10 (1.172mg/mL), tuy nhiên mức giảm này nằm trong giới hạn cho phép của nhà sản xuất vì đó là do đặc tính kỹ thuật khi sử dụng cột PD10.



Hình 3. 6. Kết quả đánh giá hoạt tính của fucoidanase Psfu trước và sau khi qua cột PD10

Trong đó: (C). dung dịch chuẩn oligosaccharide; (1) sản phẩm sau thủy phân của fucoidan S1 bằng fucoidanase Psfu trước khi qua cột PD10; (2) sản phẩm sau thủy phân của fucoidan S1 bằng fucoidanase Psfu sau khi qua cột PD10.

Để xác định quá trình loại Imidazole và giảm nồng độ muối trong dịch protein không làm ảnh hưởng đến hoạt tính của fucoidanase Psfu, chúng tôi tiến hành pha loãng 2 mẫu Psfu trước và sau khi qua cột PD10 về cùng nồng độ protein 0.2mg/mL, sau đó đánh giá hoạt tính của 2 mẫu này bằng phương pháp C-PAGE trên cơ chất fucoidan được chiết xuất từ rong *Saccharia latissima* (S1) (Hình 3.6).

Kết quả C-PAGE (Hình 3.6) cho thấy, cả 2 dịch enzyme trước và sau khi qua cột PD10 đều có khả năng thủy phân cơ chất fucoidan S1. Phổ sản phẩm

tạo thành cũng cho thấy không có sự khác biệt về độ phân bố cũng như kích thước của các sản phẩm sau thủy phân trong cả 2 thí nghiệm. Điều này cho thấy, quá trình sử dụng cột PD10 không chỉ giúp loại Imidazole và giảm trừ muối (là các tác nhân có thể ức chế và ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme) mà còn bảo tồn được hoạt tính ban đầu của fucoidanase Psfu.

Như vậy, để tinh sạch được enzyme fucoidanase Psfu nội bào và giữ hoạt tính từ chủng vi khuẩn *E.coli* mang gene mã hóa fucoidanase Psfu, cần thông qua hai bước tinh sạch là sử dụng cột Nikel và PD10. Kết quả qua hai bước tinh sạch được thể hiện ở Bảng 3.4.

Bảng 3. 3. Các bước và hiệu quả tinh sạch fucoidanase Psfu

Bước tinh sạch	Tổng protein (mg)	Hiệu suất (%)
Dịch thô	79,8	100
Nikel	45,25	56,70
PD10	28,77	36,05

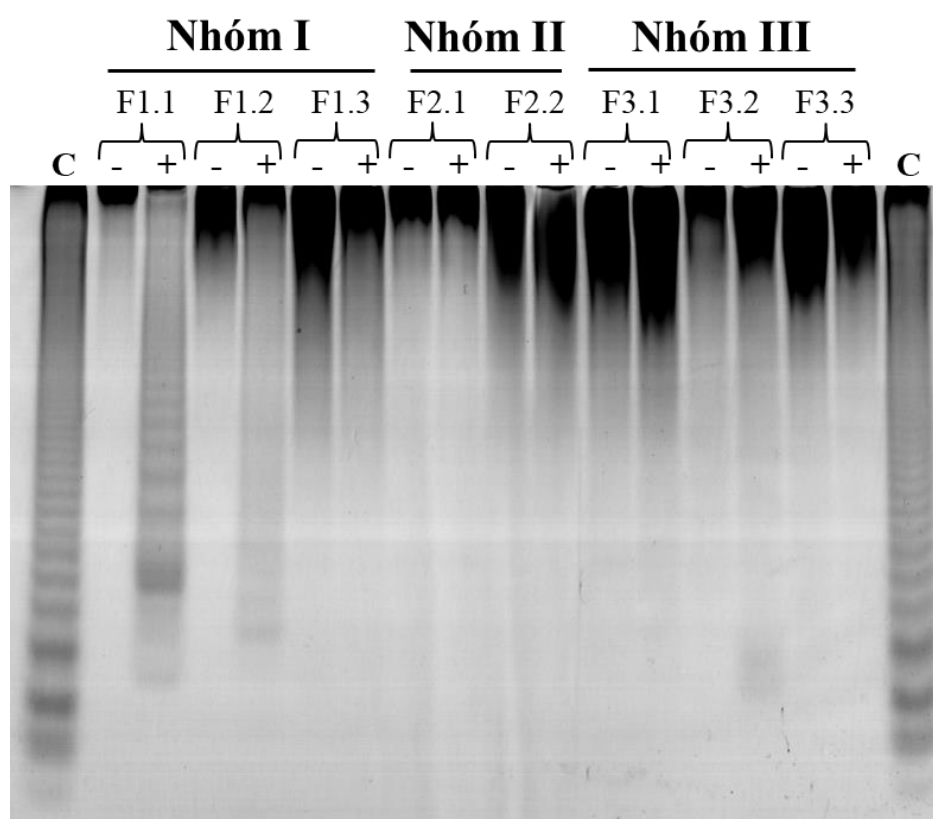
Thông qua các bước tinh sạch enzyme tái tổ hợp, hiệu suất thu nhận enzyme so với protein tổng số lên đến 36,05%. Trong bước tiếp theo, chúng tôi sử dụng dịch enzyme đã tinh sạch và loại trừ Imidazole và giảm trừ muối bằng phương pháp nêu trên để thực hiện các thí nghiệm liên quan đến xác định đặc tính thủy phân của fucoidanase Psfu.

3.2. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH XÚC TÁC CỦA FUCOIDANASE Psfu

3.2.1. Kết quả xác định khả năng thủy phân fucoidan từ các loài rong khác nhau của fucoidanase Psfu

Khả năng thủy phân fucoidan của enzyme fucoidanase được xác định dựa trên việc sử dụng 08 loại cơ chất fucoidan được chiết xuất từ 08 loài rong khác nhau: *Saccharina latissima*, *S. cicrioides*, *Turbinaria ornata*, *Fucus evanescens*, *F. vesiculosus*, *Sargassum mcclurei*, *S. polycystum* và *S. oligocystum*. Trong đó, cơ chất fucoidan được chiết xuất từ rong *S. latissima*

(F1.1), *S. cicrioides* (F1.2), *T. ornate* (F1.3) có liên kết đường giữa các gốc fucose trên mạch chính là liên kết α -(1 \rightarrow 3) (fucoidan nhóm I) [63], fucoidan chiết xuất từ rong *F. evanescens* (F2.1), *F. vesiculosus* (F2.2) có liên kết trên mạch chính gồm 2 loại liên kết α -(1 \rightarrow 3) và α -(1 \rightarrow 4) xem kẽ nhau (fucoidan nhóm II) [64], và fucoidan chiết xuất từ 3 loại rong Nâu của Việt Nam là *S. mcclurei* (F3.1), *S. polycystum* (F3.2) và *S. oligocystum* (F3.3) (galactosefucan-fucoidan) có cấu trúc phức tạp với nhiều loại liên kết khác nhau α -(1 \rightarrow 3) và α -(1 \rightarrow 4) giữa các gốc đường fucose, và β (1 \rightarrow 3) giữa các gốc đường galactose (fucoidan nhóm III) [39].



Hình 3. 7. Khả năng thủy phân fucoidan chiết xuất từ các loài rong khác nhau của fucoidanase *Psfu*

Trong đó: (C)-mẫu chuẩn oligosaccharide; (F1.1, F1.2, F1.3, F2.1, F2.2, F3.1, F3.2, F3.3)-fucoidan được chiết xuất từ các loài rong tương ứng *S. latissima*, *S. cicrioides*, *T. ornata*, *F. evanescens*, *F. vesiculosus*, *S. mcclurei*, *S. polycystum* và *S. oligocystum*; (-) - dịch phản ứng của cơ chất không chứa fucoidanase *Psfu*; (+) - dịch phản ứng của cơ chất chứa fucoidanase *Psfu*.

Phản ứng xúc tác của fucoidanase *Psfu* trên cơ chất fucoidan được thực hiện ở 30°C trong vòng 24 giờ. Dừng phản ứng bằng cách gia nhiệt đến 85°C

trong vòng 10 phút. Dịch thủy phân thu được sẽ được kiểm tra khả năng phân cắt bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (C-PAGE). Kết quả được trình bày và phân tích ở Hình 3.6 và Bảng 3.3.

Bảng 3. 4. Kết quả phân tích khả năng thủy phân fucoidan từ các loài rong khác nhau của enzyme fucoidanase Psfu

	Cơ chất fucoidan từ các loại rong	Hoạt tính thủy phân của Psfu
Fucoidan nhóm I	<i>S. latissima</i>	+++
	<i>S. cicrioides</i>	++
	<i>T. ornata</i>	-
Fucoidan nhóm II	<i>F. evanescens</i>	-
	<i>F. vesiculosus</i>	-
Fucoidan nhóm III	<i>S. mcclurei</i>	-
	<i>S. polycystum</i>	+
	<i>S. oligocystum</i>	-

Trong đó: (+++)-hoạt tính mạnh; (++)-hoạt tính trung bình; (+)-hoạt tính yếu; (-)-không có hoạt tính.

Từ kết quả điện di C-PAGE có thể thấy, Psfu thể hiện hoạt tính thủy phân 3/8 loại fucoidan thử nghiệm, gồm 2 cơ chất thuộc fucoidan nhóm I từ rong *S. latissima*, *S. cicrioides* và 1 cơ chất fucoidan thuộc nhóm III từ rong *S. polycystum*. Trong đó, Psfu thể hiện hoạt tính thủy phân mạnh nhất trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *S. latissima* chứa chủ yếu liên kết α -(1 \rightarrow 3) fucosyl, khi tạo ra nhiều sản phẩm trọng lượng phân tử thấp được thể hiện bằng các band đậm, rõ nét ở khu vực phía dưới của gel điện di. Trong 3 nhóm fucoidan được sử dụng làm nguồn cơ chất, Psfu không thể hiện hoạt tính thủy phân trên tất cả 2 loại cơ chất thuộc fucoidan nhóm II có trong nghiên cứu là fucoidan chiết xuất từ rong *F. evanescens* và *F. vesiculosus* (Hình 3.6).

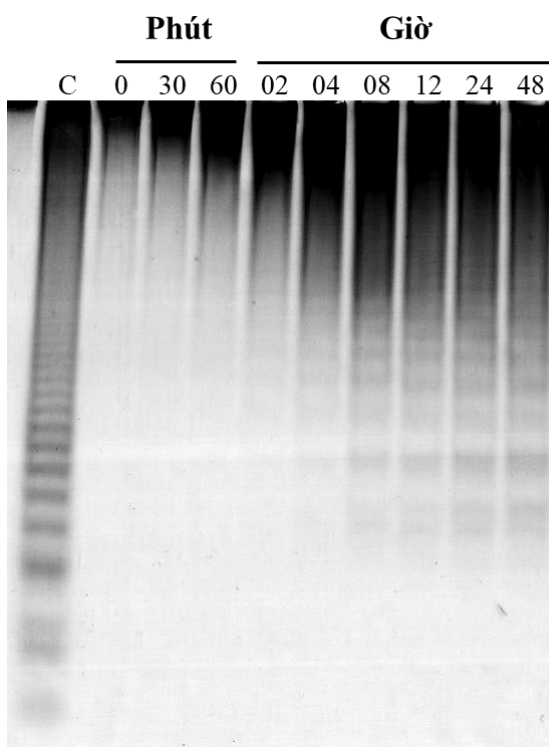
Kết quả phân tích hoạt tính ở Bảng 3.3 cũng cho thấy, Psfu không chỉ thể hiện hoạt tính thủy phân fucoidan ở các mức độ khác nhau đối với fucoidan thuộc nhóm khác nhau, mà sự khác nhau còn thể hiện ở các fucoidan thuộc cùng một nhóm cấu trúc. Trên các cơ chất fucoidan từ nhóm I, Psfu chỉ hoạt động tốt trên cơ chất *S. latissima* và *S. cicrioides*, trong khi không thể phân cắt cơ chất fucoidan chiết từ rong *T. ornata*. Tương tự đối với fucoidan nhóm III, Psfu chỉ thể hiện hoạt tính trên fucoidan chiết xuất từ rong *S. polycystum* mà không thể hiện hoạt tính trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *S. mcclurei* và *S. oligocystum* (Bảng 3.3). Điều này có thể được lý giải bởi bên cạnh liên kết đường trên mạch chính, sự khác nhau của mức độ sulfate hóa, acetyl hóa, vị trí của gốc sulfate, gốc acetyl và mạch nhánh của cơ chất fucoidan chiết xuất từ các loài rong khác nhau cũng ảnh hưởng đáng kể đến hoạt tính của fucoidanase Psfu. Sự ảnh hưởng của các yếu tố về thành phần đường và cấu trúc hóa học của cơ chất fucoidan đến hoạt tính của enzyme fucoidanase cũng đã được báo cáo gần đây trong các nghiên cứu của [37], [28], [27]. Enzyme fucoidanase Fhf2 xúc tác đặc hiệu cho fucoidan chứa liên kết α -(1 \rightarrow 4), nhưng chỉ hoạt động mạnh trên cơ chất *F. evanescens* chứa các gốc sulfate thường ở vị trí C2, trong khi không thể hoạt động trên cơ chất cùng nhóm phân loại là *F. vesiculosus* có mật độ sulfate hóa cao hơn và gốc sulfate thường ở vị trí C2, C3 và C4 [28], [39].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, Psfu không chỉ thể hiện hoạt tính trên các fucoidan được chiết xuất từ các loài rong *S. latissima* và *S. cicrioides* có cấu trúc và thành phần hóa học khá đồng nhất và đơn giản, mà còn có hoạt tính thủy phân fucoidan chiết xuất từ loài rong nâu của Việt Nam là *S. polycystum*. Mặc dù hoạt tính ghi nhận được là không cao, nhưng đây là một tín hiệu đáng mừng, bởi fucoidan từ các loài rong nâu có nguồn gốc từ các vùng biển nóng như Việt Nam được xem là có thành phần và cấu trúc hóa học rất đa dạng và phức tạp hơn rất nhiều so với các rong có nguồn gốc từ các vùng biển lạnh như *S. latissima* và *S. cicrioides* [65]. Cho đến nay chỉ một số vài fucoidanase được ghi nhận có hoạt tính trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ các loại rong Nâu của Việt Nam, có thể kể đến như fucoidanase tái tổ hợp Fhf2 Δ 484 có hoạt tính thủy phân fucoidan chiết xuất từ 02 loại rong *S. mcclurei* và *S. polycystum* [28]; hay fucoidanase Fda1 có hoạt tính thủy phân fucoidan chiết xuất từ rong Nâu *S. mcclurei* [39].

Tổng hợp kết quả nghiên cứu và phân tích cho thấy, Psfu thể hiện khả năng thủy phân mạnh nhất trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *S. latissima* có chứa liên kết α -(1 \rightarrow 3) giữa các gốc đường fucose trên mạch chính. Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng fucoidan chiết xuất từ rong *S. latissima* làm nguồn cơ chất cho các phản ứng của enzyme Psfu ở nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Kết quả xác định thời gian phản ứng thích hợp của fucoidanase Psfu

Để xác định thời gian thích hợp cho quá trình xúc tác thủy phân cơ chất fucoidan từ rong *S. latissima* của fucoidanase Psfu, chúng tôi tiến hành thực hiện phản ứng enzyme ở 30°C với các khoảng thời gian khác nhau 0, 30, 60 phút, và 2, 4, 8, 12, 24, và 48 giờ. Dịch phản ứng tại mỗi điểm thời gian được kiểm tra khả năng thủy phân bằng phương pháp C-PAGE. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.7.



Hình 3. 8. Sản phẩm sau phản ứng thủy phân của Psfu trên cơ chất fucoidan từ rong *S. latissima* theo thời gian

Kết quả từ Hình 3.7 cho thấy, sản phẩm sau thủy phân bắt đầu được tạo ra sau 2 giờ phản ứng khi xuất hiện các vệt mờ được ghi nhận trên gel C-PAGE. Nồng độ sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp bắt đầu tăng dần sau 4 giờ phản ứng, với các band có độ đậm và rõ nét hơn. Sản phẩm sau thủy phân được quan sát thấy ở nồng độ cao nhất sau 8 giờ phản ứng và không đổi khi kéo dài phản

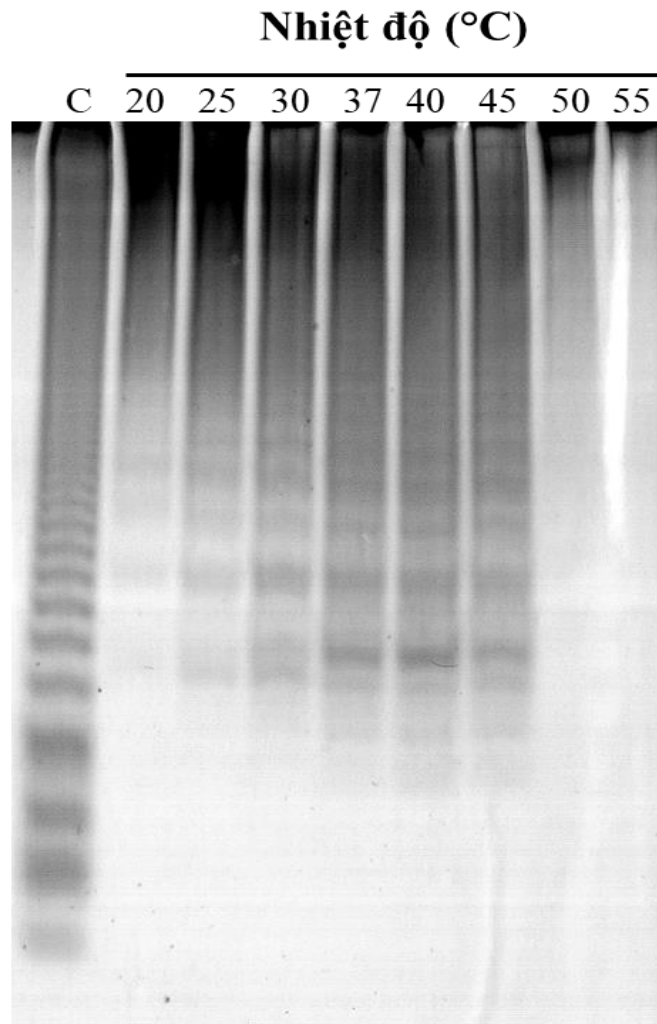
ứng đến 12, 24 và 48 giờ. Kết quả cho thấy rằng, phản ứng thủy phân của enzyme Psfu trên cơ chất fucoidan đạt cực đại sau 8 giờ phản ứng. Vì vậy chúng tôi chọn thời gian này để thực hiện cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Kết quả xác định nhiệt độ phản ứng tối ưu của fucoidanase Psfu

Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động xúc tác của enzyme nói chung và enzyme fucoidanase nói riêng. Trong nghiên cứu này, để đánh giá khả năng ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính cũng như xác định được nhiệt độ phản ứng tối ưu cho hoạt động của fucoidanase Psfu, hỗn hợp phản ứng gồm enzyme và cơ chất fucoidan từ rong *S. latissima* được ủ trong vòng 8 giờ, ở khoảng nhiệt độ khác nhau (20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50 và 55°C). Kết quả phân tích sản phẩm sau thủy phân được thể hiện ở Hình 3.8.

Trong khoảng nhiệt độ thử nghiệm từ 20 đến 55°C, hoạt tính của Psfu tăng dần từ 20°C và đạt cực đại ở 37°C và 40°C với các band sản phẩm trọng lượng phân tử thấp được quan sát thấy rõ và tập trung nhất. Hoạt tính Psfu bắt đầu giảm dần khi nhiệt độ tăng đến 45°C và gần như mất hoàn toàn khả năng thủy phân ở mức nhiệt 50 và 55°C (Hình 3.8).

Hoạt tính của enzyme fucoidanase được cho là rất nhạy cảm với sự thay đổi của nhiệt độ, nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp đều làm ảnh hưởng đến khả năng xúc tác của enzyme [25]. Hầu hết các enzyme fucoidanase được xác định đặc tính cho đến nay đều chỉ hoạt động tối ưu trong khoảng nhiệt độ trung bình từ 25 đến 37°C như FFA1 [15], FFA2 [16], FWf1 [8] và MEF2 [37]. Trong khi đó, Fhf2 có nguồn gốc từ vi khuẩn biển *Formosa haliotis* được xem là một trong những fucoidanase có khả năng hoạt động tốt nhất ở nhiệt độ cao, khi hoạt tính đạt tối ưu ở 35°C và vẫn duy trì khi mức nhiệt lên tới 45°C. Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả cũng cho thấy Fhf2 là enzyme có độ bền nhiệt độ cao, hoạt tính enzyme vẫn ổn định sau khi được ủ ở 37, 40 và 45°C trong vòng 4 giờ, 20 phút và 5 phút [48].

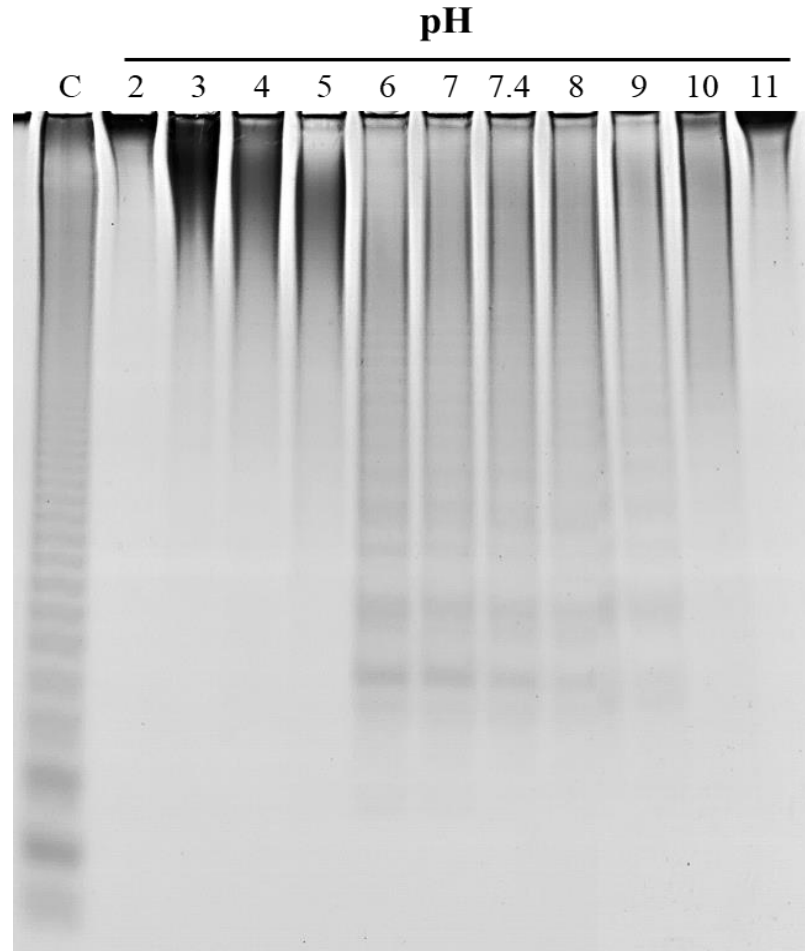


Hình 3. 9. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính xúc tác thủy phân fucoidan của fucoidanase Psfu

Từ kết quả nghiên cứu như trên, chúng tôi xác định được rằng 37 và 40 °C là khoảng nhiệt độ tối ưu của fucoidanase Psfu và lựa chọn 37°C là nhiệt độ cho phản ứng thủy phân của Psfu ở các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Kết quả xác định pH phản ứng tối ưu của fucoidanase Psfu

Tương tự như nhiệt độ, pH của đệm trong phản ứng thủy phân cũng ảnh hưởng rất lớn đến hoạt tính của fucoidanase [25]. Phần lớn các fucoidanase được xác định đặc tính xúc tác cho thấy, chúng thường hoạt động tốt trong khoảng pH trung tính hoạt kiềm nhẹ. Trong nghiên cứu này, pH tối ưu của Psfu được khảo sát trong khoảng pH rộng từ 2 đến 11. Kết quả điện di sản phẩm sau thủy phân ở các điểm pH khác nhau được thể hiện ở Hình 3.9.



Hình 3. 10. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính xúc tác thủy phân fucoidan của fucoidanase Psfu

Psfu có khả năng hoạt động trong khoảng pH rộng từ 6 đến 9, trong đó hoạt tính đạt tối ưu ở pH 6 và 7, giảm nhẹ ở pH cao hơn từ 7,4 đến 8, ở pH 9 khả năng thủy phân của Psfu cho thấy sự giảm sút đáng kể và mất hoàn toàn hoạt tính ở vùng pH axit mạnh và kiềm mạnh (pH 2-5, 10-11) (Hình 3.9).

pH tối ưu của Psfu có sự tương đồng cao với 02 fucoidanase FFA1 và FFA2 từ vi khuẩn biển *F. alga*, khi chúng cũng hoạt động tốt nhất trong khoảng pH từ 6 đến 9 [34], [35]; Trong khi đó, một số fucoidanase khác được công bố là có vùng pH tối ưu hẹp hơn chỉ trong khoảng pH 8 đến 9 như các fucoidanase Fhf1, Fhf2 và MEF2 [27], [28], [58]; hay fucoidanase FWf2 hoạt động tốt ở môi trường axit nhẹ nhưng chỉ trong khoảng pH 6-6,8 [37].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đề tài đã biểu hiện thành công fucoidanase tái tổ hợp Psfu từ chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E.coli PSFU21*, qua đó thu nhận được enzyme fucoidanase tái tổ hợp Psfu, với các điều kiện biểu hiện cụ thể như sau: Môi trường nuôi cấy: LB. Nhiệt độ, thời gian biểu hiện: 20°C, 18 giờ. Nồng độ chất cảm ứng IPTG: 1mM. Nồng độ kháng sinh Kanamycin: 50µg/mL. Thời điểm bổ sung chất cảm ứng (IPTG): Mật độ tế bào trong môi trường OD₆₀₀ đạt 0,8. Tốc độ lắc: 180 vòng/phút.

Tinh sạch được fucoidanase tái tổ hợp với độ tinh sạch cao, trọng lượng phân tử đạt 45kDa (đúng bằng trọng lượng phân tử ước lượng của trình tự protein), và có hoạt tính thủy phân fucoidan.

Xác định được đặc tính xúc tác của fucoidanase Psfu, với các đặc tính cụ thể như sau: Cơ chất đặc hiệu là fucoidan từ rong Nâu *Saccharina latissima*. Liên kết xúc tác đặc hiệu: liên kết α -(1→3) giữa các gốc đường fucose. Thời gian phản ứng tối ưu: 8 giờ. Nhiệt độ phản ứng tối ưu: 37 đến 40°C. pH phản ứng tối ưu: pH 6 đến 7.

KIẾN NGHỊ

Để thu nhận được protein tái tổ hợp có cao, cần khảo sát các điều kiện tối ưu trong quá trình biểu hiện để thu nhận được.

Việc xác định đặc tính xúc tác của enzyme fucoidanase chỉ mới được thực hiện ở một số yếu tố cơ bản, cần thực hiện đánh giá và khảo sát sự ảnh hưởng của một số yếu tố khác đến hoạt tính xúc tác của enzyme như: ảnh hưởng của nồng độ muối, ảnh hưởng của ion kim loại, ảnh hưởng của các loại đệm sử dụng trong phản ứng... Từ đó có thể nghiên cứu sử dụng enzyme trong điều chế các sản phẩm fucoidan trọng lượng phân tử thấp có hoạt tính sinh học.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

STT	Tác giả	Tên kết quả công bố/dăng ký	Tên tạp chí/Nơi công bố	Năm công bố
1	Võ Thị Diệu Trang, Cao Thị Thúy Hằng, Huỳnh Hoàng Như Khánh, Phạm Đức Thịnh, Trần Văn Huỳnh, Đặng Nguyễn Minh Huyền.	Phân lập, sàng lọc và định danh một số chủng vi khuẩn biển nguồn gốc từ rong nâu sinh fucoidanase.	Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc năm 2023.	2023

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Thị Thúy Hằng, Trần Thị Thanh Vân, Nguyễn Thị Khánh Vy, Nguyễn Thị Thuận, Trần Nguyễn Hà Vy, Võ Mai Như Hiếu, Phạm Đức Thịnh, 2022, Khảo sát điều kiện hoạt động của Viscozyme trên rong nâu *Sargassum mcclurei* để thu nhận fucoidan, *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, 64(8), tr.22-26, DOI: 10.31276/VJST.
2. Noora Barzkar, Vilai Rungsardthong, Saeid Tamadoni Jahromi, Qandeel Laraib, Rakesh Das, Olga Babich and Stanislav Sukhikh, 2023, A recent update on fucoidonase: source, Isolation methods and its enzymatic activity, *Frontiers in Marine Science*, 10, pp. 1, doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1129982>.
3. Nguyen Thi Thuan, Cao Thi Thuy Hang, Huynh Hoang Nhu Khanh, Truong Hai Bang, Pham Duc Thinh, Tran Thi Thanh Van, Bui Minh Ly, 2016, Study of using the fucoidan-containing solid media plates for screening and identifying fucoidanase from marine microorganisms, *Tap Chi Sinh Hoc*, 38(2), doi: 10.15625/0866-7160/v38n2.7112.
4. Vo Thi Dieu Trang, Cao Thi Thuy Hang, Phan Thi Hoai Trinh, Ngo Thi Duy Ngoc, Huynh Hoang Nhu Khanh, Tran Thi Thanh Van, 2020, Isolation of Marine Bacteria From Sponges in the South-Central Coastal Region of Vietnam With Brown Seaweed Polysaccharide-Degrading Activities, *Viet Nam Journal of Science, Technology and Engineering*, 58(6A) , pp. 41–51.
5. Huỳnh Hoàng Như Khánh, Bùi Minh Lý, Thái Thị Hòa, Cao Thị Thúy Hằng, Lê Mai Hương, 2010, Sàng lọc hoạt tính enzym của động vật thân mềm biển Việt Nam phân giải fucoidan và laminaran từ rong Nâu, *Tuyển tập Nghiên cứu biển*, 17, tr. 178–182.

6. A. Silchenko, M. Kusaykin, A. Zakharenko, Roza V. Menshova, H. H. N. Khánh, P. Dmitrenok, V. Isakov, T. Zvyagintseva, 2014, Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk Lambis sp. which producing sulphated fucooligosaccharides, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 102, pp.154–160, doi: 10.1016/j.molcatb.2014.02.00.
7. Chelsea Vickers, Feng Liu, Kento Abe, Orly Salama-Alber, Meredith Jenkins, Christopher M K Springate, John E Burke, Stephen G Withers, Alisdair B Boraston, 2018, Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to α -l-fucosidases from GH29, *Journal of Biological Chemistry*, 293(47), pp. 18296-18308, doi: 10.1074/jbc.RA118.005134.
8. Estelle Deniaud-Bouët , Nelly Kervarec, Gurvan Michel, Thierry Tonon, Bernard Kloareg and Céécile Herve´, 2014, Chemical and Enzymatic Fractionation of Cell Walls from Fucales: Insights into the Structure of the Extracellular Matrix of Brown Algae, *Annals of Botany*, 114(6), pp.1203–1216.
9. Hui Si Audrey Koh, Jun Lu, Weibiao Zhou, 2019, Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand, *Carbohydrate Polymers*, 212, pp.178–185.
10. Chevolut L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S, 2001, A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae, *Carbohydrate research* , 330, pp. 529–535, doi: 10.1016/s0008-6215(00)00314-1.
11. Descamps V, Colin S, Lahaye M, Jam M, Richard C, Potin P, Barbeyron T, Yvin JC, Kloareg B, 2006, Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae, *Marine Biotechnol*, 8, pp. 27–39, doi: 10.1007/s10126-005-5107-0.

12. Mikhail Kusaykin, Irina Bakunina, Victoria Sova, Svetlana Ermakova, Tatyana Kuznetsova, Natalya Besednova, Tatyana Zaporozhets, Tatyana Zvyagintseva, 2008, Structure, Biological Activity, and Enzymatic Transformation of Fucoidans from the Brown Seaweeds, *Biotechnology Journal*, 3(7), pp. 904–15, doi: 10.1002/biot.200700054.
13. Zayed A, Avila-Peltroche J, El-Aasr M, Ulber R, 2022a, Sulfated galactofucans: An outstanding class of fucoidans with promising bioactivities, *Marine Drugs*, 20(7), pp. 412, doi: 10.3390/md20070412.
14. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Zhang H, Niu X, 2010, Structural studies on a novel fucogalactan sulfate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*, *International journal of Biological macromolecules*, 47(2), pp.126–131,doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.05.010.
15. Imbs TI, Shevchenko NM, Semenova TL, Sukhoverkhov SV, Zvyagintseva TN, 2011, Compositional heterogeneity of sulfated polysaccharides synthesized by the brown alga *Costaria costata*, *Chemistry of Natural Compounds*, 47, pp. 96–97.
16. Thinh PD, Menshova RV, Ermakova SP, Anastyuk SD, Ly BM, Zvyagintseva TN, 2013, Structural characteristics and anticancer activity of fucoidan from the brown alga *Sargassum mcclurei*, *Marine Drugs*, 11(5), pp. 1456–1476, doi: 10.3390/md11051456.
17. Pielesz A, Biniś W, Paluch J, 2011, Mild acid hydrolysis of fucoidan: characterization by electrophoresis and FT-Raman spectroscopy, *Carbohydrate research*, 346(13), pp. 1937–1944, doi: 10.1016/j.carres.2011.05.016.
18. Choi JI, Kim HJ, 2013, Preparation of low molecular weight fucoidan by gamma-irradiation and its anticancer activity, *Carbohydrate Polymers*, 97(2), pp. 358–362, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.002.

19. Wang L, Wang L, Yan C, Ai C, Wen C, Guo X, Song S, 2022, Two *Ascophyllum nodosum* fucoidans with different molecular weights inhibit inflammation via blocking of TLR/NF- κ B signaling pathway discriminately, *Foods*, 11, pp. 2381.
20. Sun X, Ai C, Wen C, Peng H, Yang J, Cui Y, Song S, 2023, Inhibitory effects of fucoidan from *Laminaria japonica* against some pathogenic bacteria and SARS-CoV-2 depend on its large molecular weight, *International journal of Biological macromolecules*, 229, pp. 413–421.
21. Hu S, Chen S, Zhu H, Du M, Jiang W, Liu Y, Gao X, Su L, Xu Y, 2021, Low molecular weight, 4-O-sulfation, and sulfation at meta-fucose positively promote the activities of sea cucumber fucoidans on improving insulin resistance in HFD-fed mice, *Marine Drugs*, 20(1) pp.37, doi: 10.3390/md20010037.
22. Suprunchuk V, 2021, Ultrasonic-treated fucoidan as a promising therapeutic agent, *Polymers in medicine*, 51(2), pp. 85–90, doi: 10.17219/pim/143961.
23. Lee ZH, Lee MF, Chen JH, Tsou MH, Wu ZY, Lee CZ, Huang YY, Lin SM, Lin HM, 2022, Fucoidan with three functions extracted from *Sargassum aquifolium* integrated rice-husk synthesis dual-imaging mesoporous silica nanoparticle, *Journal of Nanobiotechnology*, 20, pp. 298.
24. Wang M, Veeraperumal S, Zhong S, Cheong KL, 2023b, Fucoidan-derived functional oligosaccharides: Recent developments, preparation, and potential applications, *Foods*, 12, pp. 878.
25. M. I. Kusaykin, A. S. Silchenko, A. M. Zakharenko, and T. N. Zvyagintseva, 2015, Fucoidanases, *Glycobiology*, 26(1), pp. 3–12, doi: 10.1093/glycob/cwv072.

26. Artem S. Silchenko, N.K. Rubtsov, A.O. Zueva, M.I. Kusaykin, A.B. Rasin, S.P. Ermakova, 2022, Fucoidan-active α -L-fucosidases of the GH29 and GH95 families from a fucoidan degrading cluster of the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 728, pp. 109373, DOI:10.1016/j.abb.2022.109373.
27. Marlene Vuillemin, Artem S Silchenko, Hang Thi Thuy Cao, Maxim S Kokoulin, Vo Thi Dieu Trang, Jesper Holck, Svetlana P Ermakova, Anne S Meyer, Maria Dalgaard Mikkelsen, 2020, Functional Characterization of a New GH107 Endo- α -(1,4)-Fucoidanase from the Marine Bacterium *Formosa haliotis*, *Marine Drugs*, 11(18), pp.562, doi: 10.3390/md18110562.
28. Vo Thi Dieu Trang, Maria Dalgaard Mikkelsen, Marlene Vuillemin, Sebastian Meier, Hang Thi Thuy Cao, Jan Muschiol, Valentina Perna, Thuan Thi Nguyen, Vy Ha Nguyen Tran, Jesper Holck, Tran Thi Thanh Van , Huynh Hoang Nhu Khanh, Anne S Meyer, 2022, The Endo- α (1,4) Specific Fucoidanase Fhf2 From *Formosa haliotis* Releases Highly Sulfated Fucoidan Oligosaccharides, *Frontiers in Plant Science*, 13, doi: 10.3389/fpls.2022.823668.
29. Chelsea Vickers, Feng Liu, Kento Abe, Orly Salama-Alber, Meredith Jenkins, Christopher M K Springate, John E Burke, Stephen G Withers, Alisdair B Boraston, 2018, Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to α -L-fucosidases from GH29, *Journal of Biological Chemistry*, 293(47), pp. 18296–18308, doi: 10.1074/jbc.RA118.005134.
30. O. Berteau, I. Mccort, N. Goasdoué, B. Tissot, and R. Daniel, 2002, Characterization of a new α - L -fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of α - L -fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*), *Glycobiology*, 12(4), pp. 273–282.

31. K. Sasaki, T. Sakai, K. Kojima, S. Nakayama, and I. Kato, 1996, Partial Purification and Characterization of an Enzyme Releasing 2-Sulfo- α -L-fucopyranose from Fucose from a Sea Urchin, *Strongylocentrotus nudus*, 8451, pp. 2–5, doi: 10.1271/bbb.60.666.
32. Sébastien Colin , Estelle Deniaud, Murielle Jam, Valérie Descamps, Yann Chevolot, Nelly Kervarec, Jean-Claude Yvin, Tristan Barbeyron, Gurvan Michel, Bernard Kloareg, 2006, Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: Definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans, *Glycobiology*, 16(11), pp. 1021–1032, doi: 10.1093/glycob/cwl029.
33. J. Shen, Y. Chang, Y. Zhang, X. Mei, and C. Xue, 2020, Discovery and Characterization of an Endo-1,3-Fucanase From Marine Bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica*: A Novel Glycoside Hydrolase Family, *Frontiers in Microbiology*, 11(7), pp. 1–11, doi: 10.3389/fmicb.2020.01674.
34. Artem S Silchenko, Anton B Rasin, Mikhail I Kusaykin, Anatoly I Kalinovsky, Zhang Miansong, Liu Changheng, Olesya Malyarenko, Anastasiya O Zueva, Tatyana N Zvyagintseva, Svetlana P Ermakova, 2017, Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*, *Carbohydrate Polymers*, 175(4), pp. 654–660, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.043.
35. Artem S Silchenko, Nadezhda E Ustyuzhanina, Mikhail I Kusaykin, Vadim B Krylov, Alexander S Shashkov, Andrey S Dmitrenok, Roza V Usoltseva, Anastasiya O Zueva, Nikolay E Nifantiev, Tatyana N Zvyagintseva, 2017, Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa* algae, *Glycobiology*, 27(3), pp. 1–10, doi: 10.1093/glycob/cww138.
36. Mikkel Schultz-Johansen, Marie Cueff, Kévin Hardouin, Murielle Jam, Robert Larocque, Mikkel A. Glaring, Cécile Hervé, Mirjam Czjzek, Peter

- Stougaard, 2018, Discovery and screening of novel metagenome-derived GH107 enzymes targeting sulfated fucans from brown algae, *The Febs Journal*, 285, pp. 4281-4295, doi:10.1111/febs.14662.
37. A.O. Zueva , A.S. Silchenko , A.B. Rasin , M.I. Kusaykin , R.V. Usoltseva , A.I. Kalinovsky , V.V. Kurilenko , T.N. Zvyagintseva , P.D. Thinh , S.P. Ermakova, 2020, Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T, *International journal of Biological macromolecules*, 164, pp.3025–3037, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.08.131.
38. Chenlu Zhu, Zebin Liu, Lishi Ren, Siming Jiao, Xuebing Zhang, Qiukuan Wang, Zhimin Li, Yuguang Du, Jian-Jun Li, 2021, Overexpression and biochemical characterization of a truncated endo- α (1 \rightarrow 3)-fucoidanase from *Alteromonas* sp. SN-1009, *Food Chemistry*, 353(2), pp.129460, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129460.
39. Hang T T Cao , Maria D Mikkelsen , Mateusz J Lezyk , Ly M Bui , Van T T Tran , Artem S Silchenko , Mikhail I Kusaykin , Thinh D Pham , Bang H Truong , Jesper Holck , Anne S Meyer, 2018, Novel Enzyme Actions for Sulphated Galactofucan Depolymerisation and a New Engineering Strategy for Molecular Stabilisation of Fucoidan Degrading Enzymes, *Marine Drugs*, 16(11), pp. 1–18, doi: 10.3390/md16110422.
40. Masamichi Nagae, Atsuko Tsuchiya, Takane Katayama, Kenji Yamamoto, Soichi Wakatsuki, Ryuichi Kato, 2007, Structural Basis of the Catalytic Reaction Mechanism of Novel 1,2- α -L-Fucosidase from *Bifidobacterium bifidum**, *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), <https://doi.org/10.1074/jbc.M702246200>.
41. N. M. Thanassi and H. I. Nakada, 1967, Enzymic Degradation of Fucoidan by Enzymes from the Hepatopancreas of Abalone, *Haliotis* Species, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 118(2), pp. 172–177.

42. K. Sasaki, T. Sakai, K. Kojima, S. Nakayama, Y. Nakanishi, and I. Kato, 1996, Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo- α -1-fucopyranose from 2-sulfo- α -1-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *strongylocentrotus nudus*, Bioscience, *Biotechnology and Biochemistry*, 60(4) , pp. 666–668, doi: 10.1271/bbb.60.666.
43. S.I. Furukawa, T. Fujikawa, D. Koga, and A. Ide, 1992, Production of Fucoidan-Degrading and Fucoidan Sulfatase by *Vibrio* sp . N-5, *Bulletin of the Japanese Society for the science of Fish*, 58(8), pp. 1499–1503.
44. I Iu Bakunina , L S Shevchenko, O I Nedashkovskaia, N M Shevchenko, S A Alekseeva, V V Mikhaïlov, T N Zviagintseva, 2000, Screening of marine bacteria for fucoidan hydrolases, *Mikrobiologiia*, 69(3), pp. 370–376, doi: 10.1007/BF02756738.
45. T. Sakai, T. Kawai, and I. Kato, 2004, Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase, *Marine Biotechnology*, 6(4), pp. 335–346, doi: 10.1007/s10126-003-0033-5.
46. Artem S Silchenko , Mikhail I Kusaykin, Valeriya V Kurilenko, Alexander M Zakharenko, Vladimir V Isakov, Tatyana S Zaporozhets, Anna K Gazha, Tatyana N Zvyagintseva, 2013, Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, *formosa* algae, *Marine Drugs*, doi: 10.3390/md11072413.
47. T. Sakai, H. Kimura, and I. Kato, 2003, Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *Fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion, *Marine Biotechnology*, 5(4), pp. 380–387, doi: 10.1007/s10126-002-0083-0.
48. Valérie Descamps, Sébastien Colin, Marc Lahaye, Murielle Jam, Christophe Richard, Philippe Potin, Tristan Barbeyron, Jean-Claude Yvin, Bernard Kloareg, 2006, Isolation and culture of a marine bacterium

- degrading the sulfated fucans from marine brown algae, *Marine Biotechnology*, 8(1), pp. 27–39, doi: 10.1007/s10126-005-5107-0.
49. Q. Wu, M. Zhang, K. Wu, B. Liu, J. Cai, and R. Pan, 2011, Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94, *Journal of Applied Phycology*, 23(2), pp. 197–203, doi: 10.1007/s10811-010-9588-5.
 50. Q. Wu, S. Ma, H. Xiao, M. Zhang, and J. Cai, 2011, Purification and the secondary structure of fucoidanase from *Fusarium* sp. LD8, *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, doi: 10.1155/2011/196190.
 51. K. Kitamura, M. Matsuo, and T. Yasui, 1992, Enzymic Degradation of Fucoidan by Fucoidanase from the Hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(3), pp. 490–494, doi: 10.1271/bbb.56.490.
 52. M. Bilan, M. Kusaykin, A. Grachev, E. A. Tsvetkova, T. Zvyagintseva, N. Nifantiev, A. Usov, 2005, Effect of Enzyme Preparation from the Marine Mollusk, *Biochemistry*, 70(12) pp. 1321-1326.
 53. S. Furukawa, T. Fujikawa, D. Koga, and A. Ide, 1992, Purification and Some Properties of Exo-type Fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(11), pp. 1829–1834, doi: 10.1271/bbb.56.1829.
 54. T. Sakai, H. Kimura, and I. Kato, 2002, A marine strain of Flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan, *Marine Biotechnology*, 4(4), pp. 399–405, doi: 10.1007/s10126-002-0032-y.
 55. T. Sakai, H. Kimura, K. Kojima, K. Shimanaka, K. Ikai, and I. Kato, 2003, Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides, *Marine Biotechnology*, 5(1), pp. 70–78, doi: 10.1007/s10126-002-0056-3.

56. Y. Chang, C. Xue, Q. Tang, D. Li, X. Wu, and J. Wang, 2010, Isolation and characterization of a sea cucumber fucoidan-utilizing marine bacterium, *Letters in Applied Microbiology*, 50(3), pp. 301–307, doi: 10.1111/j.1472-765X.2009.02792.x.
57. Long Yu , Xiaoqi Xu, Changhu Xue, Yaoguang Chang, Lei Ge, Yanchao Wang, Cuiyu Zhang, Guanchen Liu, Chen He, 2013, Enzymatic preparation tural determination of oligosaccharides derived from sea cucumber (*Acaudina molpadioides*) fucoidan, *Food Chemistry*, 139(1- 4), pp. 702–709, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.055.
58. Vy Ha Nguyen Tran, Thuan Thi Nguyen, Sebastian Meier, Jesper Holck, Hang Thi Thuy Cao, Tran Thi Thanh Van, Anne S Meyer, Maria Dalgaard Mikkelsen, 2022, The Endo- α (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans, *Marine Drugs*, 20(5), pp. 305, doi: 10.3390/md20050305.
59. Masaji Takayama, Kenji Watanabe, Yoshikiyo Furuya, 2002, (12) United States Patent, *United States Patent Takayama et al.*, 1(12).
60. Artem S. Silchenko, Huynh Hoang Nhu Khanh, Cao Thi Thuy Hang, Valeriya V. Kurilenko, Alexander M. Zakharenko, Anastasiya O. Zueva, Bui Minh Ly, Mikhail I. Kusaykin, 2015, A Simple Plate Method for the Screening and Detection of Fucoidanases, *Achieve Life Sciences*, 9(2), pp. 104–106, doi: 10.1016/j.als.2015.12.002.
61. Yaphe, W. and K. Morgan, 1959, Enzymic Hydrolysis of Fucoidin by *Pseudomonas Atlantica* and *Pseudomonas Carrageenovora*, *Nature* , 183(4663), pp. 761–62, doi: 10.1038/183761b0.
62. Noora Barzkar , Vilai Rungsardthong, Saeid Tamadoni Jahromi, Qandeel Laraib, Rakesh Das, Olga Babich and Stanislav Sukhikh, 2023, A recent update on fucoidonase: source, Isolation methods and its enzymatic activity, *Frontiers in Marine Science*, 10, pp. 4, doi: <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1129982>.

63. Thuan Thi Nguyen, Maria Dalgaard Mikkelsen, Vy Ha Nguyen Tran, Vo Thi Dieu Trang, Nanna Rhein-Knudsen, Jesper Holck, Anton B. Rasin, Hang Thi Thuy Cao, Tran Thi Thanh Van, and Anne S. Meyer, 2020, Enzyme-Assisted Fucoïdan Extraction from Brown Macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*, *Marine Drugs*, 18(6), pp.296, doi: 10.3390/md18060296.
64. Bilan, A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanina, A. S. Shashkov, N. E. Nifantiev, and A. I. Usov, 2002, Structure of a fucoïdan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag, *Carbohydrate research*, 337(8), pp. 719–730, doi: 10.1016/s0008-6215(02)00053-8.
65. Nguyễn Thị Thuận, Cao Thị Thúy Hằng, Huỳnh Hoàng Như Khánh, Trương Hải Bằng, Phạm Đức Thịnh, Trần Thị Thanh Vân, Bùi Minh Lý, 2016, Nghiên cứu sử dụng đĩa thạch Fucoïdan để sàng lọc và xác định hoạt tính fucoïdanase từ vi sinh vật biển, *Tạp chí sinh học*, 38(2), tr. 186-191, DOI: 10.15625/0866-7160/v38n2.7112.