

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thanh Hiếu

**THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH
THỦY PHẦN SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM
CỦA MỘT SỐ FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Nha Trang – 2024

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thanh Hiếu

**THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH
THỦY PHÂN SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM
CỦA MỘT SỐ FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: 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 – 2024

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 chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn ký và ghi rõ họ tên



Trần Thanh Hiếu

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, trước hết tôi xin gửi lời cảm ơn đến ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam 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 và TS. Võ Thị Diệu Trang đã trực tiếp hướng dẫn, tận tình giúp đỡ, truyền đạt kiến thức và kinh nghiệm quý báu, cũng như 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 khoa học công nghệ thuộc các hướng KH-CN ưu tiên (mã số VAST02.01/24-25) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam do TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh 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

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ SULFATED POLYSACCHARIDE CHIẾT XUẤT TỪ HẢI SÂM.....	4
1.1.1. Sulfated polysaccharide từ hải sâm và đặc điểm cấu trúc	4
1.1.2. Hoạt tính sinh học của sulfated polysaccharide từ hải sâm	7
1.1.3. Tình hình nghiên cứu sulfated polysaccharide chiết xuất từ các loài hải sâm ở vùng biển Việt Nam.....	8
1.2. TỔNG QUAN VỀ FUCOIDANASE	9
1.2.1. Khái niệm, nguồn gốc và cơ chế xúc tác	9
1.2.2. Kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp fucoidanase trong các hệ thống vi sinh vật	10
1.2.3. Thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp.....	11
1.2.4. Đặc điểm xúc tác của một số fucoidanase tái tổ hợp.....	11
1.2.4.1. <i>Fucoidanase Mef1</i>	12
1.2.4.2. <i>Fucoidanase Mef2</i>	12
1.2.4.3. <i>Fucoidanase Fda1, Fda2</i>	13
1.2.4.4. <i>Fucoidanase Fhf2</i>	13
1.2.5. Các phương pháp xác định hoạt tính thủy phân của enzyme	14
1.3. MỘT SỐ ỨNG DỤNG CỦA FUCOIDANASE	14
1.3.1. Công cụ trong nghiên cứu cấu trúc của fucoidan, sulfated polysaccharide.....	14
1.3.2. Điều chế sulfated polysaccharide trọng lượng phân tử thấp, các oligosaccharide.....	15
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	17
2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	17

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	17
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu	18
2.2. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT.....	18
2.2.1. Thiết bị, dụng cụ	18
2.2.2. Hóa chất	19
2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	20
2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	20
2.4.1. Sơ đồ nghiên cứu chung.....	20
2.4.2. Phương pháp biểu hiện, thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp.....	21
2.4.2.1. Biểu hiện và thu nhận fucoidanase tái tổ hợp.....	21
2.4.2.2. Tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp	22
2.4.3. Phương pháp thử hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp.....	23
2.4.3.1. Thử nghiệm hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu	23
2.4.3.2. Thử nghiệm hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất sulfated polysaccharide từ hải sâm.....	23
2.4.4. Phương pháp nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính fucoidanase tái tổ hợp	24
2.4.4.1. Phương pháp xác định ảnh hưởng thời gian đến hoạt tính của fucoidanase.....	24
2.4.4.2. Phương pháp xác định ảnh hưởng nồng độ canxi (Ca^{2+}) đến hoạt tính của fucoidanase	24
2.4.4.3. Phương pháp xác định ảnh hưởng nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase.....	24
2.4.4.4. Phương pháp xác định ảnh hưởng pH đến hoạt tính của fucoidanase.....	24
2.4.5. Các kỹ thuật sử dụng.....	24

2.4.5.1. Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Lowry	24
2.4.5.2. Xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của fucoidanase tái tổ hợp bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western blot	25
2.4.5.3. Hoạt tính thủy phân PS của enzyme fucoidanase được xác định dựa trên phương pháp điện di carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-PAGE) theo phương pháp của Silchenko.....	25
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	27
3.1. KẾT QUẢ BIỂU HIỆN, THU NHẬN VÀ TINH SẠCH FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP	27
3.2. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH THỦY PHÂN SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM CỦA CÁC FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP.....	36
3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HOẠT TÍNH CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP TRÊN CƠ CHẤT SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM.....	41
3.3.1. Thời gian phản ứng thích hợp.....	41
3.3.2. Nồng độ canxi (Ca ²⁺) thích hợp trong phản ứng.....	44
3.3.3. Nhiệt độ phản ứng thích hợp.....	47
3.3.4. pH phản ứng thích hợp.....	49
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	52
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ.....	53
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	54

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu và chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ Tiếng Anh/ Tiếng Việt
1	PS	Sulfated polysaccharide/Polysaccharit sulfate hoá
2	FCS	Fucosylated chondroitin sulfated
3	FS	Sulfated fucan/Fucan sulfate hoá
4	IPTG	Isopropyl b-D thiogalactoside
5	PVDF	Polyvinylidene difluoride
6	Ba	Sulfated polysaccharide chiết xuất từ loài hải sâm <i>Bohadschia argus</i>
7	He	Sulfated polysaccharide chiết xuất từ loài hải sâm <i>Holothuria edulis</i>
8	Hs	Sulfated polysaccharide chiết xuất từ loài hải sâm <i>Holothuria spinifera</i>
9	Fhf2	Sulfated polysaccharide chiết xuất từ loài hải sâm <i>Formosa haliotis</i>
10	F1	Fucoidanase được sản xuất từ chủng <i>E. coli</i> BL21 (Fhf2)
11	F2	Fucoidanase được sản xuất từ chủng <i>E. coli</i> BL21 (Mef1)
12	F3	Fucoidanase được sản xuất từ chủng <i>E. coli</i> BL21 (Mef2)
13	F4	Fucoidanase được sản xuất từ chủng <i>E. coli</i> BL21 (Fda1)
14	F5	Fucoidanase được sản xuất từ chủng <i>E. coli</i> BL21 (Fda2)

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thông tin chủng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp sử dụng trong nghiên cứu	17
Bảng 2.2. Vật tư hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu.....	19
Bảng 2.3. Điều kiện biểu hiện của các chủng vi khuẩn tái tổ hợp.....	22
Bảng 3.1. Kết quả thu nhận dịch enzyme thô của 5 loại fucoidanase tái tổ hợp	30
Bảng 3.2. Kết quả xác định hàm lượng protein ở các phân đoạn thu nhận được của các fucoidanase tái tổ hợp	33
Bảng 3.3. Liên kết xúc tác và cơ chất đặc hiệu của các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5.....	34
Bảng 3.4. Kết quả phân tích khả năng thủy phân PS từ hải sâm của fucoidanase tái tổ hợp	38

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Cấu trúc của một dạng FCS tách được từ hải sâm.....	5
Hình 1.2. Cấu trúc của một dạng FS tách được từ hải sâm	6
Hình 2.1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài.....	20
Hình 2.2. Sơ đồ các bước thu nhận fucoidanase tái tổ hợp.....	21
Hình 3.1. Kiểm tra biểu hiện các fucoidanase tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE và lai Western blot	29
Hình 3.2. Kết quả tinh sạch 05 fucoidanase tái tổ hợp (F1, F2, F3, F4, F5) được xác định bằng phương pháp SDS-PAGE và lai Western blot	32
Hình 3.3. Kết quả xác định hoạt tính các fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu tương ứng.....	35
Hình 3.4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính thủy phân PS từ hải sâm của fucoidanase tái tổ hợp bằng phương pháp C-PAGE	37
Hình 3.5. Cấu trúc của FCS từ Hs, đơn vị lặp lại của FCS từ Hs.....	40
Hình 3.6. Các khối lặp của fucan FS-BA-AT và FS-HS-AT [5].....	41
Hình 3.7. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 theo thời gian	42
Hình 3.8. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các nồng độ canxi khác nhau.....	45
Hình 3.9. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các nhiệt độ phản ứng khác nhau.....	47
Hình 3.10. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các mức pH phản ứng khác nhau.....	50

MỞ ĐẦU

Biển Đông, đặc biệt là vùng biển Khánh Hòa của Việt Nam chứa đựng nguồn tài nguyên phong phú các hợp chất tự nhiên, trong đó nhiều hợp chất đã được phát hiện trong hơn nửa thế kỷ qua. Nổi bật là polysaccharide từ các loài rong đã mang lại nhiều thành quả trong nghiên cứu về quá trình chiết xuất, đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học. Tuy nhiên, sulfated polysaccharide (PS) từ động vật biển đặc biệt là từ các loài hải sâm tuy có cấu trúc đặc biệt và hoạt tính sinh học tiềm năng, chỉ mới được nghiên cứu khoảng 10 năm gần đây và chưa được khai thác đầy đủ. Vì vậy, việc mở rộng nghiên cứu về cấu trúc và hoạt tính sinh học của PS từ ngành Da gai biển Việt Nam là cần thiết, có ý nghĩa khoa học quan trọng và triển vọng ứng dụng cao trong lĩnh vực y dược [1,2,3].

PS từ hải sâm thể hiện sự đa dạng cấu trúc không chỉ giữa các loài mà còn trong cùng một loài do ảnh hưởng từ môi trường sống, dinh dưỡng và mức độ tiến hóa, điều này ảnh hưởng đến các hoạt tính sinh học của chúng. Tại Việt Nam, các nghiên cứu về PS từ hải sâm còn khá khiêm tốn. Hiện nay, quy trình chiết xuất PS từ hải sâm và cầu gai đã được thiết lập với một số loài hải sâm từ vùng biển Nha Trang. Kết quả cho thấy các PS chủ yếu gồm Fucosylated chondroitin sulfated (FCS) và Sulfated fucan (FS). Các PS này có sự khác biệt về thành phần monosaccharide, hàm lượng sulfate và vị trí nhóm sulfate so với các loài hải sâm khác trên thế giới [2,4,5]. Dù đã được công bố hoạt tính chống đông tụ và kháng u, mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính của PS vẫn được sáng tỏ. Thách thức lớn đặt ra trong nghiên cứu cấu trúc và phát triển ứng dụng của PS từ hải sâm chính là do cấu trúc phức tạp, khối lượng phân tử lớn, độ nhớt cao gây khó khăn trong hòa tan, hấp thụ và kiểm soát liều lượng [6,7]. Chính vì vậy, vấn đề được đặt ra là cần tập trung nghiên cứu điều chế các oligosaccharide có khối lượng phân tử thấp nhưng vẫn bảo toàn các nhóm chức năng có liên quan đến hoạt tính sinh học của hợp chất.

Có nhiều phương pháp để điều chế oligosaccharide. Các nghiên cứu trước đây đã báo cáo về sự phân cắt polysaccharide thông qua các biện pháp xử lý vật lý, hóa học và enzyme, chẳng hạn như chiếu xạ ^{60}Co , thủy phân bằng axit và phân cắt bằng enzyme [8,9,10]. Ngày nay với hoạt động nghiên

cứu khoa học ngày một phát triển, việc ứng dụng công nghệ enzyme là phương án an toàn và hiệu quả mà giới khoa học đang tập trung sự quan tâm. PS từ hải sâm gồm hai nhóm chính là FCS và FS do đó enzyme bẻ mạch PS hải sâm là những enzyme bẻ mạch FCS và FS. Các enzyme bẻ mạch FS có thể là các fucoidanase, bẻ mạch FCS có thể là chondroitinase hoặc hyaluronidase [11,12].

Fucoidanase là nhóm enzyme có khả năng thủy phân các liên kết glycosidic giữa các gốc sulfated-fucose trong PS. Với tính đặc hiệu cơ chất cao, fucoidanase được nghiên cứu như một công cụ hiệu quả trong sản xuất các oligosaccharide trọng lượng phân tử thấp, mang lại các hoạt tính sinh học cao hơn PS gốc nhờ duy trì cấu trúc lõi và các nhóm chức năng [13,14]. Quá trình này giúp tăng tính hòa tan và giảm độ nhớt của PS, đồng thời duy trì hoặc tối ưu hóa các hoạt tính sinh học, làm cho các phân đoạn PS dễ hấp thụ hơn, nâng cao hiệu quả điều trị trong ứng dụng dược phẩm. Tuy nhiên, ứng dụng fucoidanase còn gặp khó khăn do enzyme tự nhiên thường không ổn định, có hiệu suất tinh sạch và thu hồi thấp, trong khi fucoidanase tái tổ hợp có đặc tính xúc tác vượt trội, dễ dàng hơn trong quá trình tinh sạch và thu hồi, từ đó gia tăng khả năng ứng dụng thực nghiệm.

Tìm kiếm và phân lập fucoidanase là bước quan trọng trong nghiên cứu enzyme này. Ngoài các phương pháp truyền thống như phân lập và giải trình tự bộ gene vi khuẩn, khai thác dữ liệu từ ngân hàng gene thế giới (NCBI) kết hợp công cụ tin sinh học hiện đại đã mở ra hướng nghiên cứu mới, giúp phát hiện nhanh các gene mã hóa fucoidanase tiềm năng, đồng thời thúc đẩy sản xuất fucoidanase tái tổ hợp hiệu suất cao. Các kỹ thuật như tạo dòng biểu hiện gene, tinh sạch và xác định cấu trúc góp phần nâng cao chất lượng nghiên cứu và đáp ứng xu hướng quốc tế. Fucoidanase tái tổ hợp đã được chứng minh là phương pháp hiệu quả để khám phá enzyme với đặc tính mới, tạo ra oligosaccharide có hoạt tính sinh học phong phú, mở rộng tiềm năng ứng dụng trong chăm sóc sức khỏe. Từ đó, một vấn đề quan trọng nảy sinh là khả năng thủy phân của các enzyme endo- $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucoidanase và endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucoidanase tái tổ hợp đối với cơ chất PS từ hải sâm.

Chính vì vậy, việc thực hiện nghiên cứu "***Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase***

tái tổ hợp" là có ý nghĩa khoa học và thực tiễn nhằm tìm kiếm các công cụ sinh học có khả năng thủy phân sulfate polysaccharide từ hải sâm thành các oligosaccharide có hoạt tính sinh học ứng dụng trong lĩnh vực y dược. Mục tiêu của đề tài là: Nghiên cứu biểu hiện, thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp và xác định đặc tính xúc tác thủy phân sulfate polysaccharide từ hải sâm của fucoidanase tái tổ hợp thu nhận được.

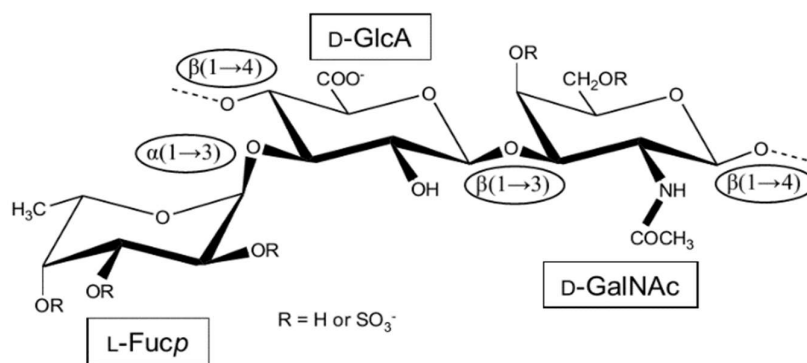
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ SULFATED POLYSACCHARIDE CHIẾT XUẤT TỪ HẢI SÂM

1.1.1. Sulfated polysaccharide từ hải sâm và đặc điểm cấu trúc

Việt Nam sở hữu nguồn tài nguyên sinh vật biển phong phú, đặc biệt là động vật thuộc ngành Da gai với 05 (năm) lớp chính: Cầu gai (Echinoidea), Sao biển (Asteroidea), Hải sâm (Holothuroidea), Huệ biển (Crinoidea) và Đuôi rắn (Ophiuroidea). Ngành động vật Da gai chiếm tỷ lệ rất cao, chiếm khoảng 29% tổng lượng sinh vật đáy ở vịnh Bắc Bộ, 39% ở vùng biển Thuận Hải - Minh Hải và 51% ở vịnh Vân Phong - Nha Trang. Mặc dù vậy, ngành động vật Da gai vẫn chưa được nghiên cứu sâu rộng về các hợp chất có hoạt tính sinh học. Các nghiên cứu hiện có đã làm rõ cấu trúc và hoạt tính sinh học của các hợp chất như saponin, holothurin, asterosaponin và steroid trong các loài Hải sâm (*Holothuria scabra*, *H. vagabunda*, *H. martensii*, *H. atra*, *Stichopus chloronotus*), Sao biển (*Astropecten polyacanthus*, *A. monacanthus*, *Protoeraster nodosus*, *Asterina batheri*) và Cầu gai (*Diadema setosum*, *D. savignyi*, *Tripneustes gratilla*) [15,16].

Cấu trúc của PS từ hải sâm gồm hai nhóm chính là FCS và FS. Hai loại PS giàu fucose được biết đến như là thành phần của động vật không xương sống ở biển thuộc lớp *Holothuroidea* (Hải sâm). FCS được tìm thấy trong thành cơ thể của hải sâm. Các phân tử của các polyme sinh học này đã được chứng minh là có polymer mạch thẳng có chứa lõi chondroitin sulfated [$\rightarrow 3$]- β -D-GalNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcA-(1 \rightarrow)]_n giống với khung cấu tạo của chondroitin sulfated từ động vật có xương sống (**Hình 1.1**) [17,18]. Trong cấu trúc của FCS, lõi chondroitin này thường chứa các nhánh α -L-fucosyl gắn với GlcA tại vị trí O-3. Tùy thuộc vào loài hải sâm, FCS có thể chứa bốn loại đơn vị GalNAc (không sulfate và sulfate tại vị trí O-4, vị trí O-6 hoặc cả hai vị trí O-4 và O-6) [19], tương tự như GlcA, không chỉ bị fucosyl hóa tại vị trí O-3, mà còn có thể được sulfate hóa tại O-3 hoặc đồng thời tại cả hai vị trí O-2 và O-3 [20,21].

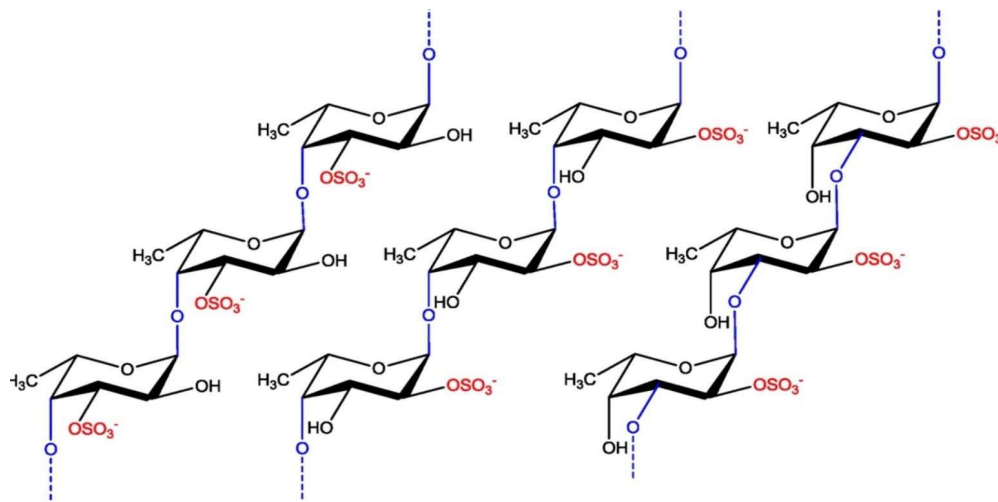


Hình 1.1. Cấu trúc của một dạng FCS tách được từ hải sâm [17,18]

Ngoài ra, các nhánh disaccharide gắn với GlcA tại vị trí O-3 đã được tìm thấy cùng với các nhánh monofucosyl bên cạnh trong một số FCS. Ví dụ, FCS từ *Holothuria (Lud-wigothuria) grisea* được chứng minh là có chứa nhánh α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S-(1 \rightarrow) [22]. Các nhánh difucose tương tự cũng đã được xác định trong một số FCS khác, ví dụ như nhánh α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S4S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Eupentacta fraudatrix* [21], α -L-Fuc2S4S-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc4S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Stichopus japonicas* [19] và α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc4S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Holothuria lentiginosa* [23]. Gần đây, các mạch nhánh có cấu trúc phức tạp hơn có chứa các gốc galactose hoặc galactosamine cũng được phát hiện trong một số FCS, ví dụ như mạch nhánh α -D-Gal4S(6S)-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Thelenota ananas* [24], α -D-GalNAc-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S4S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Acaudina molpadioides* [25] và α -D-GalNAcS-(1 \rightarrow 2)- α -L-Fuc3S-(1 \rightarrow) trong FCS từ *Holothuria nobilis* [26]. Có một số bằng chứng cho thấy các nhánh có thể không chỉ được gắn tại vị trí O-3 của GlcA, mà còn có thể gắn vào các vị trí như O-4 hoặc O-6 của của gốc GalNAc còn lại của khung cấu trúc chính [27]. Những ví dụ này cho thấy sự đa dạng cấu trúc của FCS. Nghiên cứu về FCS được thúc đẩy bởi các hoạt tính sinh học đầy tiềm năng của chúng, do các hoạt tính này phụ thuộc vào cấu trúc tinh vi của FCS. Cụ thể, những yếu tố như mức độ sulfate hóa, vị trí của nhóm sulfate, tính chất và vị trí của các nhánh, cũng như sự phân bố khối lượng phân tử đều ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của chúng.

Ngoài FCS, một loại PS khác thường gặp ở hải sâm có thành phần chủ yếu là các gốc đường fucose và các nhóm sulfate, được xếp vào nhóm FS. FS từ mỗi loài hải sâm có sự khác biệt chủ yếu về mật độ và vị trí của các nhóm

sulfate trong gốc đường fucose (**Hình 1.2**). Chúng hầu như tương tự với FS của cầu gai, nhưng khác biệt đáng kể so với fucoidan phức tạp chiết từ rong nâu [28].



Hình 1.2. Cấu trúc của một dạng FS tách được từ hải sâm [29]

Các cấu trúc đơn giản nhất là các polyme của gốc α -L-fucose monosulfated được liên kết với nhau thông qua liên kết 1 \rightarrow 3 hoặc 1 \rightarrow 4, ví dụ như các polysaccharide có độ lặp lại cao là [-3)- α -L-Fuc2S-(1-)] $_n$ từ *Stichopus horrens* [29]. Các FS có liên kết 1 \rightarrow 3 tương tự, nhưng sự phân bố không đều của các nhóm sulfate, được phân lập từ *Acaudina leicoprocta*, trong khi các FS liên kết 1 \rightarrow 4, cụ thể là [-4)- α -L-Fuc3S-(1-)] $_n$ và [-4)- α -L-Fuc2S-(1-)] $_n$, lần lượt được tìm thấy ở *Holothuria fuscopunctata* và *Thelenota ananas* tương ứng [29]. Cấu trúc mạch thẳng của FS thường được biểu diễn dưới dạng các phân tử có sự lặp lại của các đơn vị tetrasaccharide được sulfate hóa. Các polysaccharide như vậy, chứa liên kết 1 \rightarrow 3 trong mạch chính, được phân lập từ *Isostichopus badionotus* [30], *Acaudina molpadioides* [31], *Thelenota ananas* [32]. Cấu trúc của FS từ *Holothuria albiventer* đã được chứng minh là có các đơn vị lặp lại là hexasaccharide sulfated [33], chúng có kiểu sulfate hóa khác với kiểu sulfate hóa của FS từ *Holothuria floridana* [34]. Các FS phức tạp hơn có chứa các chuỗi carbohydrate phân nhánh. Chẳng hạn như các polysaccharide từ *Holothuria edulis* và *Ludwigothurea grisea* có chứa khung là các gốc 1 \rightarrow 3 tetrafucoside được nối với nhau bằng các liên kết 1 \rightarrow 2, trong đó tại các liên kết 1 \rightarrow 2 này, các gốc trên được fucosyl hóa thêm (một phần

như ở *Ludwigothurea grisea* hoặc hoàn toàn như ở *Holothuria edulis*) ở vị trí 4 [35]. Phân nhánh của FS chiết từ *Apostichopus japonicus* chứa khung cấu trúc là gốc α -L-Fuc2S được liên kết với nhau qua liên kết 1 \rightarrow 3, trong đó mỗi trisaccharide mang một nhánh 1 \rightarrow 3difucose không sulfate tại vị trí O-4 [36]. Gần đây, một số bằng chứng cho thấy có thể có một số FS có cấu trúc khác nhau trong cùng một loài *Holothuria*. Ví dụ như FS từ *Hothuria fuscopunctata* không chỉ có polyme có chứa các gốc (1 \rightarrow 4) α -L-fucose 3-sulfated, mà còn chứa một FS khác với các đơn vị lặp lại là tetrasaccharit \rightarrow 3)- α -L-Fuc2S4S-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fuc2S-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fuc-(1 \rightarrow với các liên kết interfucoside 1 \rightarrow 3 và 1 \rightarrow 4 xen kẽ [37].

Như vậy, PS ở hải sâm thường tồn tại ở hai dạng chính là FCS và FS với cấu trúc phức tạp và đa dạng. Cấu trúc PS từ hải sâm phụ thuộc vào đối tượng tách chiết, phương pháp tách chiết và phần lớn PS từ các đối tượng hải sâm khác nhau vẫn còn chưa được sáng tỏ. Vì vậy, việc nghiên cứu làm sáng tỏ cấu trúc của nhóm PS này là yêu cầu cấp thiết đối với khoa học, đối với thực tiễn nhằm mục đích phát triển khả năng ứng dụng chúng trong các lĩnh vực và cuộc sống.

1.1.2. Hoạt tính sinh học của sulfated polysaccharide từ hải sâm

Sự đa dạng về cấu trúc của PS liên quan đến các hoạt tính sinh học đầy tiềm năng của chúng. Các hoạt tính sinh học khác nhau của FCS phụ thuộc vào các đặc điểm cấu trúc tinh vi của chúng, chẳng hạn như mức độ sulfate hóa, vị trí của nhóm sulfate, bản chất và vị trí của nhánh [18,38,39]. Bên cạnh đó tùy thuộc vào trọng lượng phân tử, thành phần monosaccharide mà hoạt tính sinh học của PS của các loài hải sâm cũng khác nhau. Một số hoạt tính sinh học của FCS đã được nghiên cứu và công bố gồm hoạt tính chống viêm, chống ung thư, trong đó hoạt tính chống đông máu được công bố nhiều nhất [40,41]. Vasconcelos và cộng sự vào năm 2018 đã công bố rằng ngay cả những thay đổi nhỏ trong cấu trúc của nhóm sulfate cũng có thể làm thay đổi hoạt tính sinh học của hợp chất. Ví dụ như 2-sulfated fucan chiết xuất từ *Strongylocentrotus franciscanu* thể hiện hoạt tính chống đông máu yếu hơn 4-sulfated fucan chiết xuất từ *Lytechinus variegatus* [42]. Các PS giàu fucose tự nhiên có tác dụng chống huyết khối, chống virus và chống ung thư tuyệt vời cùng với nhiều hoạt động sinh học khác [18,43]. Ví dụ, một loại

FS có hoạt tính chống ung thư đã được phân lập từ hải sâm Việt Nam *Stichopus variegatus*. FCS được phân lập từ *H. spinifera* có cấu trúc tương tự đến FCS tương ứng của *B. argus*. Cả hai polysaccharides này đều chứng minh hoạt tính chống đông máu trong ống nghiệm. Tuy nhiên FS được phân lập từ *H. spinifera* thực tế lại không hoạt động trong các thử nghiệm này, mặc dù có hàm lượng sunfat khá cao [2].

Với sự đa dạng trong cấu trúc có ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học, cần có các nghiên cứu về đặc tính của FCS và FS của hải sâm với mục đích tìm ra các chất sinh học mới có tầm quan trọng thực tế và thiết lập các mối tương quan giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học riêng biệt độc đáo này. Các nhà khoa học đang tập trung vào mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học nhằm làm rõ cơ chế hoạt động của hợp chất, mở ra tiềm năng ứng dụng trong nhiều lĩnh vực. Tuy nhiên, cấu trúc phức tạp và không đồng nhất của PS gây khó khăn cho việc phân tích chi tiết, dẫn đến sự chưa rõ ràng trong mối tương quan giữa cấu trúc hóa học và hoạt động sinh học của chúng. Để giải quyết vấn đề này, việc sử dụng các enzyme có tính đặc hiệu cao như fucoidanase là cần thiết để thủy phân các phân tử PS phức tạp. Phân tích các mảnh PS nhỏ sẽ giúp xác định cấu trúc hóa học của PS, từ đó làm rõ mối liên hệ giữa các thành phần cấu trúc và hoạt động sinh học của chúng. Đặc biệt, sự phát triển của công nghệ dược phẩm sinh học và kỹ thuật di truyền đã tạo tiền đề cho việc nâng cao ứng dụng của PS có nguồn gốc từ biển. Fucoidanase với khả năng sản xuất các oligosaccharide sulfated chứa đựng nhiều tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực này [14].

1.1.3. Tình hình nghiên cứu sulfated polysaccharide chiết xuất từ các loài hải sâm ở vùng biển Việt Nam

Hải sâm là một trong những loài sinh vật biển giàu nguồn chất hoạt tính sinh học đặc biệt là các PS, được biết đến với nhiều tác dụng sinh học như chống oxy hóa, chống đông máu, chống ung thư và chống tiểu đường [44].

Việt Nam có khoảng 70 loài hải sâm phân bố chủ yếu ở vùng ven biển, đặc biệt tại các khu vực như Nha Trang, Phú Quốc và Côn Đảo. Đây là nguồn tài nguyên sinh học phong phú và là đối tượng nghiên cứu tiềm năng để khai thác các hợp chất có giá trị cao, trong đó có PS. Một số nghiên cứu đã được tiến hành nhằm xác định cấu trúc và tính chất sinh học của PS từ các loài hải

sâm như *Bohadschia argus*, *Stichopus variegatus*, *Holothuria spinifera* và *Bohadschia ocellata* [44,45,46,47]. Các polysaccharide này thường chứa các thành phần như fucose, glucuronic acid và sulfate tạo nên các đặc tính sinh học đa dạng. PS từ hải sâm Việt Nam đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng. Đặc biệt, các nghiên cứu gần đây tập trung vào tác dụng chống ung thư và chống tiểu đường của FCS. Các hoạt chất này còn có tiềm năng trở thành các liệu pháp mới trong điều trị các bệnh mãn tính, thông qua việc ức chế các enzyme và tín hiệu liên quan đến phát triển bệnh [48].

Mặc dù đã đạt được những kết quả nhất định, nhưng số lượng nghiên cứu về PS từ hải sâm ở Việt Nam vẫn còn hạn chế so với tiềm năng của nguồn tài nguyên này. Nhiều loài hải sâm có mặt ở Việt Nam nhưng chưa được nghiên cứu đầy đủ về thành phần và hoạt tính sinh học. Bên cạnh đó, các nghiên cứu chủ yếu mới dừng lại ở kết quả nghiên cứu cấu trúc và hoạt tính sinh học của một số PS từ hải sâm mà chưa phát triển khả năng ứng dụng chúng vào thực tiễn.

Với sự gia tăng nhu cầu về các sản phẩm sinh học có nguồn gốc từ biển trong y học, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm, PS từ hải sâm Việt Nam hứa hẹn sẽ mở ra cơ hội cho các ứng dụng mới. Đặc biệt, việc đầu tư vào công nghệ chiết xuất, tinh chế và sản xuất quy mô pilot có thể giúp đưa các sản phẩm từ PS ra thị trường quốc tế.

1.2. TỔNG QUAN VỀ FUCOIDANASE

1.2.1 Khái niệm, nguồn gốc và cơ chế xúc tác

Fucoidanase là một nhóm enzyme xúc tác quá trình phân cắt liên kết glycoside giữa các gốc fucose sulfate hóa trong phân tử PS. Dựa vào vị trí cắt liên kết, nhóm enzyme này được chia thành hai loại chính: endo-fucoidanase [49] và exo-fucoidanase, còn được gọi là α -L-fucosidase [50].

Endo-fucoidanase có khả năng phân cắt các liên kết glycoside ở bên trong phân tử fucoidan, dẫn đến sự hình thành các oligosaccharide với các mức độ polyme hóa khác nhau. Các enzyme này được xếp vào nhóm EC 3.2.1.121 và EC 3.2.1.122. Ngược lại, α -L-fucosidase là nhóm enzyme có khả năng xúc tác quá trình cắt các đơn vị α -L-fucose ở đầu mút của phân tử

fucoidan. Các enzyme thuộc nhóm này được xếp vào các nhóm EC 3.2.1.51, EC 3.2.1.111, EC 3.2.1.63 và EC 3.2.1.127.

Tùy thuộc vào cấu trúc phân tử, liên kết xúc tác đặc hiệu hay cơ chế hoạt động mà fucoidanase có thể được phân loại thành các nhóm khác nhau. Dựa vào sự tương đồng của trình tự amino acid và trung tâm hoạt động của các enzyme, fucoidanases được xếp vào 4 họ của nhóm enzyme thủy phân liên kết đường (Glycoside hydrolase – GH) là GH107, GH168, GH29 và GH95 [51,52] theo hệ thống phân loại Carbohydrate-Active enzymes (CAZy database). Trong khi đó, dựa vào loại (dạng) liên kết được phân cắt giữa các gốc fucose hoặc sulfated fucose trong mạch chính của phân tử cơ chất mà fucoidanase được phân thành 2 nhóm chính là $\alpha(1\rightarrow4)$ fucoidanase và $\alpha(1\rightarrow3)$ fucoidanase [53,54].

1.2.2. Kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp fucoidanase trong các hệ thống vi sinh vật

Phần lớn fucoidanase thường được chiết xuất từ các sinh vật biển, ví dụ động thân mềm biển [55,56], vi nấm biển, vi khuẩn biển [57,58,59]. Tuy nhiên tính ổn định của fucoidanase tự nhiên không cao khiến việc phát triển enzyme tái tổ hợp trở nên cần thiết. Gần đây, các nghiên cứu tập trung vào khai thác trình tự gen từ ngân hàng NCBI và hệ thống phân loại CAZy. Đặc biệt sau khi cấu trúc tinh thể đầu tiên của fucoidanase được xác định vào năm 2018, vùng trung tâm hoạt động của endo-(1 \rightarrow 4) fucoidanase được phát hiện thì đến nay đã có thêm nhiều fucoidanase đã được tìm thấy và xác định đặc tính bằng hướng đi này [60].

Biểu hiện tái tổ hợp fucoidanase thường được thực hiện trong các hệ thống vi sinh vật như *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis* và nấm men. Các vi sinh vật này được sử dụng như "nhà máy sinh học" để tạo ra lượng lớn enzyme fucoidanase thông qua việc chuyển gene mã hóa fucoidanase từ sinh vật nguồn sang hệ thống biểu hiện. Một số yếu tố cần xem xét khi lựa chọn hệ thống vi sinh vật là khả năng biểu hiện protein ngoại lai, mức độ glycosyl hóa (liên quan đến việc thêm đường vào protein), khả năng tiết enzyme ra ngoài môi trường và sự dễ dàng trong việc thu hồi sản phẩm. Trong hệ thống biểu hiện phổ biến như *E. coli*, việc biểu hiện fucoidanase có lợi nhờ tốc độ sinh trưởng nhanh, chi phí nuôi cấy thấp và khả

năng điều chỉnh biểu hiện dễ dàng. Nhờ vào kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp trong vi sinh vật, nghiên cứu và ứng dụng fucoidanase đã có bước tiến đáng kể, mở rộng khả năng sử dụng enzyme này trong nhiều lĩnh vực khác nhau, từ dược phẩm, thực phẩm chức năng đến ngành công nghiệp hóa mỹ phẩm.

1.2.3. Thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp

Để thu nhận và tinh sạch enzyme fucoidanase từ các nguồn khác nhau, các nhà nghiên cứu đã phát triển nhiều phương pháp như kết tủa bằng ammonium sulfate, sắc ký trao đổi ion và sắc ký lọc gel cho nguồn enzyme thu nhận trực tiếp từ vi sinh vật [61,62] hay phương pháp sắc ký ái lực cho nguồn enzyme tái tổ hợp [63,64].

Kỹ thuật tái tổ hợp DNA đã mở ra một hướng mới trong việc sản xuất enzyme fucoidanase với số lượng lớn và độ tinh khiết cao. Bằng cách sử dụng các hệ thống biểu hiện như *E. coli*, nấm men, hoặc các hệ thống tế bào động vật, gene mã hóa fucoidanase có thể được chèn vào và biểu hiện dưới dạng enzyme tái tổ hợp. Các phương pháp này không chỉ giúp tăng năng suất sản xuất mà còn cho phép tinh chỉnh các đặc tính của enzyme thông qua các kỹ thuật đột biến định hướng.

1.2.4. Đặc điểm xúc tác của một số fucoidanase tái tổ hợp

Mỗi fucoidanase có đặc điểm xúc tác riêng, bao gồm khả năng phân cắt các loại liên kết glycoside khác nhau, chẳng hạn như liên kết $\alpha(1\rightarrow3)$ hoặc $\alpha(1\rightarrow4)$, cũng như yêu cầu về điều kiện xúc tác tối ưu. Khi hoạt động trên các cơ chất khác nhau, các điều kiện xúc tác (như nhiệt độ, pH, và sự hiện diện của ion kim loại) cũng có thể thay đổi để phù hợp với đặc điểm cấu trúc của polysaccharide, nhằm tối đa hóa hiệu quả phản ứng. Việc nghiên cứu và tối ưu hóa điều kiện xúc tác cho từng loại fucoidanase không chỉ giúp tăng hiệu quả thủy phân mà còn mở rộng khả năng ứng dụng của chúng trong sản xuất các sản phẩm oligosaccharide chức năng. Trong nghiên cứu này, đặc điểm xúc tác của một số fucoidanase tái tổ hợp tiêu biểu như Mef1, Mef2, Fda1, Fda2 và Fhf2 được chọn để mô tả chi tiết vì đây là các enzyme đã được chứng minh có hoạt tính phân giải tốt trên các cơ chất polysaccharide cụ thể.

1.2.4.1. *Fucoidanase Mef1*

Enzyme Mef1, một endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucoidanase có nguồn gốc từ vi khuẩn biển *Muricauda eckloniae*, có cấu trúc tương đồng với các enzyme thuộc họ GH107. Qua phân tích bằng phương pháp điện di trên gel carbohydrate polyacrylamide, Mef1 cho thấy khả năng xúc tác phân cắt các liên kết $\alpha(1\rightarrow4)$ giữa các gốc sulfated fucose tại vị trí C2 trong cấu trúc $[-3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp2S-(1}\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp2S-(1-[n}$ từ polysaccharide của *Fucus evanescens*. Phân tích động học của Mef1 được thực hiện bằng quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), cho thấy hoạt tính của Mef1 fucoidanase (Uf) trên fucoidan của *Fucus evanescens* là $0,1 \times 10^{-3}$ Uf μM^{-1} . Cấu trúc tinh thể của Mef1, được xác định ở độ phân giải 1,8 Å, cho thấy các axit amin His270 và Asp187 tham gia vào vị trí hoạt động của enzyme, cung cấp các nhóm axit/bazơ và nucleophile cần thiết cho quá trình thủy phân các liên kết glycosid trong phân tử polysaccharide. Mật độ điện tích của enzyme đã chỉ ra sự hiện diện của hai ion Ca^{2+} , một ion tiếp xúc một phần với rãnh hoạt động, trong khi ion còn lại được phối hợp chặt chẽ. Một chuỗi nước được phát hiện nối từ bên ngoài enzyme vào vị trí hoạt động, đi qua vị trí phối hợp chặt chẽ của ion Ca^{2+} [65].

1.2.4.2. *Fucoidanase Mef2*

Enzyme Mef2, thuộc loại enzyme endo- $\alpha(1\rightarrow3)$ -fucoidanase, là fucoidanase thứ hai được phân lập từ chủng vi khuẩn biển *Muricauda eckloniae*. Mef2 đã được phân lập và giải trình tự. Dựa trên phân tích trình tự chính, Mef2 được phân loại thuộc họ GH107 theo hệ thống phân loại CAZy. Enzyme Mef2 hoạt động tối ưu ở pH 8 và nhiệt độ 35°C, mặc dù nó có khả năng chịu nhiệt lên tới 50°C. Sự hiện diện của ion Ca^{2+} làm tăng nhiệt độ nóng chảy của enzyme từ 38°C lên 44°C và ion này là cần thiết để đạt hiệu quả hoạt động tối ưu của Mef2. Fucoidanase Mef2 hoạt động hiệu quả trong đệm UB4 với pH từ 6,0 đến 8,0, đạt tối ưu ở pH 7,0 đến 8,0. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme giảm đáng kể khi sử dụng đệm Borate trong cùng khoảng pH [66].

Đặc tính cơ chất của Mef2 được nghiên cứu bằng phương pháp quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), cho thấy hoạt tính của enzyme (đơn vị trên mỗi μM enzyme: Uf/ μM) là $1,2 \times 10^{-3}$ Uf/ μM trên polysaccharide từ

Fucus evanescens và $3,6 \times 10^{-3}$ Uf/ μ M trên polysaccharide từ *Saccharina latissima*. Đặc biệt, Mef2 là fucoidanase đầu tiên được ghi nhận có hoạt tính trên polysaccharide từ *S. latissima*.

1.2.4.3. *Fucoidanase Fda1, Fda2*

Enzyme Fda1 và Fda2 là hai endo-fucoidanase thuộc họ GH107 (EC 3.2.1.-) được nghiên cứu. Cả hai enzyme này đều có khả năng xúc tác quá trình thủy phân PS chứa liên kết 1-fucosyl $\alpha(1\rightarrow3)$, được chiết xuất từ các loại rong nâu *S. Cichorioides*, *U. pinnatifida*. Ở cấu trúc phân tử ban đầu, hoạt tính thủy phân của cả hai enzyme Fda1 và Fda2 rất nhạy cảm và dễ bị biến đổi. Vì vậy, việc tối ưu hóa cấu trúc phân tử bằng cách loại bỏ khoảng 40% trình tự protein từ đầu carboxyl, giúp nâng cao khả năng hoạt động và bền vững của enzyme là cách để hạn chế vấn đề trên [67]. Nghiên cứu này cung cấp thông tin quan trọng về hoạt tính và cấu trúc của Fda1 và Fda2, đồng thời mở rộng hiểu biết về cơ chế phân hủy polysaccharide của các enzyme này. Những phát hiện này có thể góp phần vào việc phát triển quy trình sản xuất oligosaccharide từ polysaccharide, với ứng dụng tiềm năng trong các lĩnh vực nghiên cứu và công nghiệp.

1.2.4.4. *Fucoidanase Fhf2*

Enzyme Fhf2, một fucoidanase được xác định trong bộ gene của vi khuẩn biển hiếu khí Gram âm *Formosa haliotis*, cho thấy sự tương đồng về trình tự với các endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -fucoidanase (EC 3.2.1.212) thuộc họ GH107. Đột biến xóa đầu C của Fhf2, được gọi là Fhf2 Δ 484, thiếu 484 axit amin ở đầu C-terminus và có trọng lượng phân tử khoảng 46 kDa, đã được chế tạo và cho thấy tính ổn định cao hơn so với protein Fhf2 đầy đủ [68]. Fhf2 Δ 484 có khả năng xúc tác quá trình thủy phân PS từ nhiều loài rong biển, bao gồm *Fucus evanescens*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum mcclurei* và *Sargassum polycystum*, với hoạt tính cao nhất quan sát được trên PS từ *Fucus evanescens*. Enzyme này hoạt động hiệu quả trong khoảng nhiệt độ từ 20°C đến 45°C và ở pH từ 6 đến 9, với điều kiện tối ưu tại 37°C và pH 8. Fhf2 Δ 484 cũng được xác định là phụ thuộc vào canxi [68].

Phân tích NMR cho thấy Fhf2 Δ 484 xúc tác quá trình thủy phân các liên kết $\alpha(1\rightarrow4)$ giữa các gốc L-fucosyl sulfated gắn tại vị trí C2, tương tự như

enzyme Fhf1 từ *Formosa haliotis*. Đặc biệt, Fhf2 Δ 484 còn giải phóng oligosaccharide chứa một lượng đáng kể dư lượng fucose đã được disulf hóa tại vị trí 2,4. Những dữ liệu này cho thấy enzyme Fhf2 Δ 484 có tiềm năng lớn trong việc sản xuất các oligosaccharide có hàm lượng sulfate cao, và có thể là ứng cử viên giá trị cho nghiên cứu hoạt tính sinh học của fucoidan [68].

1.2.5. Các phương pháp xác định hoạt tính thủy phân của enzyme

Sau khi thu nhận được enzyme, việc đánh giá hoạt tính của fucoidanase là bước quan trọng để xác định khả năng thủy phân fucoidan của enzyme cũng như các đặc tính sinh học của sản phẩm phân giải. Hoạt tính của enzyme fucoidanase thường được đo bằng cách xác định lượng sản phẩm phân giải fucoidan sinh ra trong một khoảng thời gian nhất định. Một trong những phương pháp phổ biến là sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phân tích các monosaccharide hoặc oligosaccharide được tạo ra từ quá trình thủy phân. Phương pháp này cho phép xác định chính xác cấu trúc và lượng các phân đoạn fucoidan có trọng lượng phân tử thấp, qua đó đánh giá hoạt tính của enzyme [69]. Phương pháp đo quang phổ (spectrophotometry) cũng được sử dụng rộng rãi, trong đó sự biến đổi màu sắc của mẫu phản ánh sự phân giải của fucoidan. Phương pháp này, mặc dù đơn giản, nhưng mang lại thông tin quý giá về hoạt động của enzyme trong các điều kiện khác nhau [70].

Bên cạnh đó, phương pháp C-PAGE (Clear-native PAGE) là một kỹ thuật phổ biến để xác định hoạt tính thủy phân của enzyme thông qua khả năng phân giải các polysaccharide trên gel điện di. Điểm đặc biệt của phương pháp này là cho phép trực tiếp quan sát hoạt tính enzyme mà không cần nhuộm gel, nhờ sự tạo ra các vùng sáng trên nền gel khi polysaccharide bị thủy phân. C-PAGE thường được sử dụng để đánh giá hoạt tính của các enzyme thủy phân polysaccharide, chẳng hạn như fucoidanase, agarase, hoặc cellulase, trong các nghiên cứu liên quan đến biển hoặc ứng dụng công nghiệp [71].

1.3. MỘT SỐ ỨNG DỤNG CỦA FUCOIDANASE

1.3.1. Công cụ trong nghiên cứu cấu trúc của fucoidan, sulfated polysaccharide

Enzyme fucoidanase đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu cấu

trúc của fucoidan, một loại PS với nhiều chức năng sinh học đa dạng. Fucoidanase được sản xuất bởi các sinh vật biển như vi khuẩn, nấm, và động vật biển, hỗ trợ quá trình thủy phân các liên kết glycosidic cụ thể trong cấu trúc của fucoidan. Hoạt động này rất cần thiết để làm sáng tỏ sự phức tạp trong cấu trúc của fucoidan, bao gồm các mô hình phân nhánh và mức độ sulfate hóa, vốn có liên quan mật thiết đến các hoạt tính sinh học của nó [14].

Ví dụ, các enzyme được phân lập từ *Mariniflexile fucanivorans* và *Pseudoalteromonas citrea* đã được sử dụng để nghiên cứu cấu trúc fucoidan từ tảo nâu. Những enzyme này giúp các nhà nghiên cứu xác định các tính chất chức năng của các mảnh fucoidan, chẳng hạn như khả năng chống ung thư hoặc điều hòa miễn dịch, thường phụ thuộc vào mô hình sulfate hóa cụ thể [62].

Những tiến bộ trong nghiên cứu fucoidanase đã mở rộng khả năng ứng dụng chúng trong công nghệ sinh học, cải thiện hiểu biết về cơ chế xúc tác và tiềm năng ứng dụng ở quy mô công nghiệp. Mặc dù vậy, những hiểu biết về các enzyme này vẫn còn nhiều hạn chế. Nghiên cứu trong tương lai có thể tập trung vào việc thiết kế các fucoidanase với độ bền và hoạt tính cao hơn trong các điều kiện khác nhau, mở rộng tiềm năng ứng dụng của chúng trong cả nghiên cứu cấu trúc và phát triển liệu pháp.

1.3.2. Điều chế sulfated polysaccharide trọng lượng phân tử thấp, các oligosaccharide

Ứng dụng của fucoidanase trong điều chế oligosaccharide đặc biệt hấp dẫn do khả năng tạo ra hàng loạt các oligosaccharide có cấu trúc khác nhau, vốn có tác dụng sinh học mạnh mẽ trong y học, bao gồm khả năng chống viêm, chống đông máu, kháng virus, và tiềm năng chống ung thư [14]. Các oligosaccharide này không chỉ có hoạt tính sinh học mạnh mà còn không độc hại, giúp chúng trở thành ứng viên lý tưởng cho các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và thực phẩm chức năng.

Quá trình thủy phân fucoidan bằng fucoidanase có nhiều ưu điểm so với phương pháp hóa học thông thường, đặc biệt là khả năng duy trì các nhóm sulfate trong sản phẩm cuối, yếu tố quan trọng để đảm bảo hoạt tính sinh học của oligosaccharide [72]. Việc bảo tồn cấu trúc sulfate giúp các

oligosaccharide duy trì đặc tính sinh học mạnh mẽ, đồng thời enzyme này có thể hoạt động ở nhiệt độ và pH ổn định, giúp giảm nguy cơ biến đổi không mong muốn trong sản phẩm [14].

Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận rằng fucoidanase có nguồn gốc từ các vi sinh vật biển như vi khuẩn và nấm có hiệu quả cao trong việc thủy phân PS thành các phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp [61]. Chẳng hạn, enzyme fucoidanase từ vi khuẩn *Mariniflexile fucanivorans* được phát hiện có khả năng thủy phân PS một cách hiệu quả, tạo ra các sản phẩm có trọng lượng phân tử từ 10 đến 30 kDa, những phân đoạn này cho thấy khả năng kháng viêm và chống oxy hóa mạnh mẽ hơn so với PS trước khi thủy phân [62]. Tiềm năng của fucoidanase trong việc điều chế các polysaccharide trọng lượng phân tử thấp không chỉ giới hạn ở việc cải thiện các đặc tính sinh học của PS mà còn mở rộng ứng dụng của các PS này trong y học và công nghiệp thực phẩm. Các sản phẩm fucoidan có trọng lượng phân tử thấp được tạo ra bởi fucoidanase đã được chứng minh là có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào ung thư phổi và đại trực tràng trong các thử nghiệm tiền lâm sàng, cho thấy tiềm năng to lớn trong việc phát triển các phương pháp điều trị ung thư mới [64].

Hiện nay, enzyme fucoidanase đã và đang chứng minh được tiềm năng to lớn trong việc điều chế các PS có trọng lượng phân tử thấp. Những nghiên cứu hiện nay không chỉ giúp mở rộng hiểu biết về fucoidan và các enzyme liên quan, mà còn mở ra những cơ hội mới cho việc phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe và y học mới. Với sự tiến bộ của công nghệ enzyme học và sinh học phân tử, tiềm năng ứng dụng của fucoidanase chắc chắn sẽ còn tiếp tục được khai thác và phát triển trong tương lai [73,74].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG VÀ VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

05 (năm) chủng vi khuẩn *E.coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp mang gene mã hóa fucoidanase thuộc bộ sưu tập Vi sinh vật của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, được liệt kê ở **Bảng 2.1**.

Bảng 2.1. Thông tin chủng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp sử dụng trong nghiên cứu

STT	Fucoidanase tái tổ hợp	Dạng enzyme	Chủng vi khuẩn	Ký hiệu fucoidanase	Trọng lượng fucoidanase (kDa)
1	Fhf2	Endo 1-4 fucoidanase	<i>E. coli</i> BL21/ pET-18b- <i>fhf2</i>	F1	46
2	Mef1	Endo 1-4 fucoidanase	<i>E. coli</i> BL21/ pET-18b- <i>mef1</i>	F2	45
3	Mef2	Endo 1-3 fucoidanase	<i>E. coli</i> BL21/ pET-18b- <i>mef2</i>	F3	105
4	Fda1	Endo 1-3 fucoidanase	<i>E. coli</i> BL21/ pET-18b- <i>Fda1</i>	F4	43
5	Fda2	Endo 1-3 fucoidanase	<i>E. coli</i> BL21/ pET-18b- <i>Fda2</i>	F5	53

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

03 (ba) cơ chất PS (Ba, He và Hs) tách chiết lần lượt từ các loài hải sâm *Bohadschia argus*, *Holothuria edulis* và *Holothuria spinifera*. PS từ các loài hải sâm nêu trên hiện nay vẫn chưa hoàn toàn xác định được cấu trúc, việc xác định đặc tính thủy phân của các fucoidanase tái tổ hợp trên các cơ chất này sẽ góp phần làm tường minh cấu trúc của các cơ chất PS từ hải sâm.

02 (hai) cơ chất fucoidan chiết từ các loài rong nâu *Fucus evanescens*, *Sargassum mcclurei* được cung cấp bởi phòng Hóa phân tích và triển khai công nghệ, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang. Đây là các PS đã xác định được cấu trúc, đóng vai trò là PS đối chứng trong nghiên cứu.

2.2. THIẾT BỊ, DỤNG CỤ VÀ HÓA CHẤT

2.2.1. Thiết bị, dụng cụ

Một số thiết bị chính bao gồm: 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 (Memmert); 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...

2.2.2. Hóa chất

Bảng 2.2. *Vật tư hóa chất chính sử dụng trong nghiên cứu*

STT	Tên vật tư	Xuất xứ hóa chất
1	Tris base	Sigma, Mỹ
2	Boric-acid	Sigma, Mỹ
3	Bisacrylamide	Sigma, Mỹ
4	Acrylamide	Sigma, Mỹ
5	Phenol red	Sigma, Mỹ
6	Ammonium persulfated (APS)	Sigma, Mỹ
7	N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, Mỹ
8	Alcian Blue 8GX	Sigma, Mỹ
9	Toludine Blue O	Sigma, Mỹ
10	Kanamycin	Mỹ
11	Arabinose	Mỹ
12	Chất cảm ứng IPTG (Isopropyl b-D thiogalactoside)	Mỹ
13	Imidazole	Mỹ
14	Màng lai Polyvinylidene difluoride (PVDF)	Mỹ
15	Monoclonal antipolyHistidine peroxidase-conjugated antibody	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany
16	Kit thuốc nhuộm AEC Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

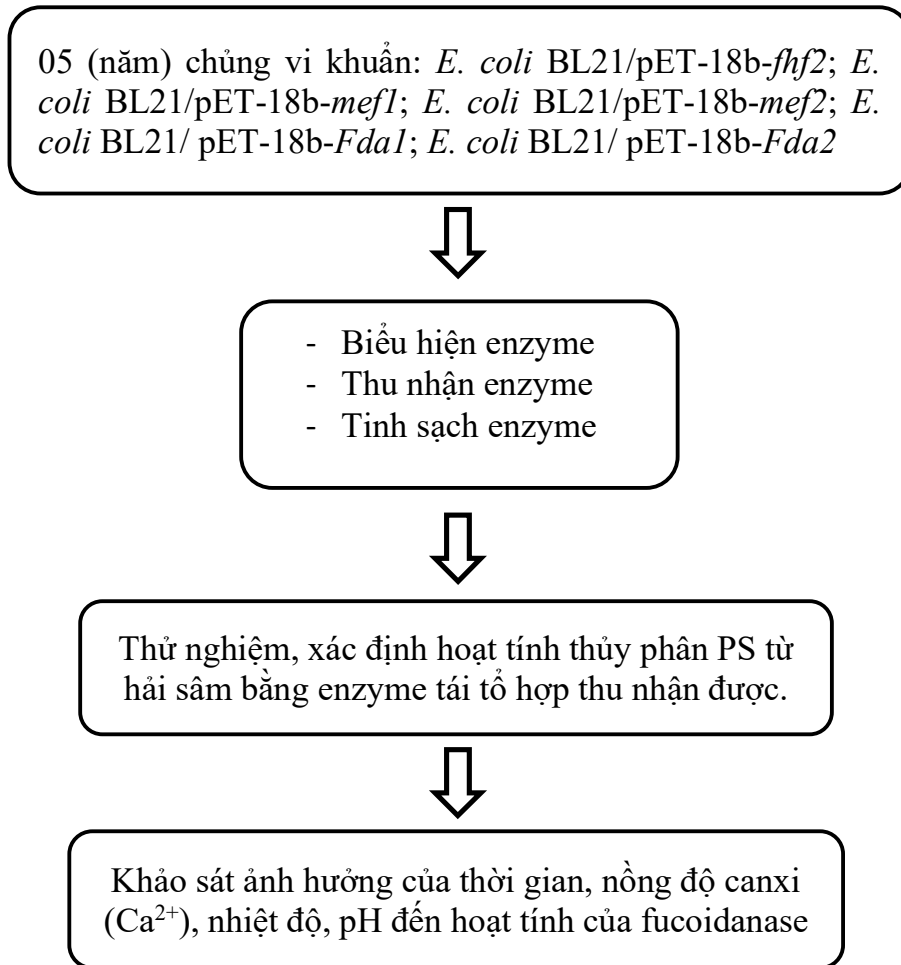
2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 02 năm 2024 đến tháng 11 năm 2024

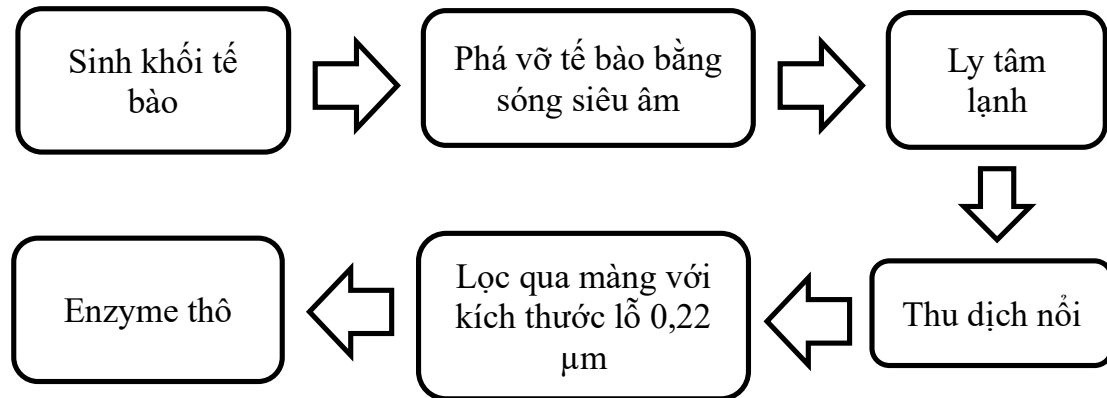
Địa điểm nghiên cứu: tại phòng thí nghiệm Vi sinh vật biển, Trung tâm Nghiên cứu tiên tiến và sáng tạo Hòn Chồng, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.4.1. Sơ đồ nghiên cứu chung



Hình 2.1. Sơ đồ các nội dung nghiên cứu chính của đề tài



Hình 2.2. Sơ đồ các bước thu nhận fucoidanase tái tổ hợp

2.4.2. Phương pháp biểu hiện, thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp

2.4.2.1. Biểu hiện và thu nhận fucoidanase tái tổ hợp

Fucoidanase tái tổ hợp được biểu hiện và thu nhận theo các bước cơ bản của kỹ thuật biểu hiện gene:

- Từ các ống giống gốc, các chủng vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường LB chứa các loại kháng sinh với nồng độ tương ứng, ở điều kiện 37°C, 18 giờ, tốc độ lắc 180 vòng/phút.
- Sau đó cấy chuyển với tỷ lệ 1/100 (v/v) và nuôi cấy ở điều kiện 37°C, 18 giờ, tốc độ lắc 180 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ nm đạt giá trị trong khoảng 0,6 đến 0,8 thì tiến hành cảm ứng.
- Cảm ứng biểu hiện bằng chất cảm ứng Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), nồng độ cuối đạt 1mM, tiếp tục nuôi cấy lắc 180 vòng/phút, ở nhiệt độ 37°C, 18 giờ.
- Sinh khối tế bào được thu nhận bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy với tốc độ 8000 vòng/phút, ở 4°C trong 15 phút. Sinh khối sẽ được cân khối lượng và bảo quản ở -20°C, cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Các chủng vi khuẩn *E.coli* mang vector tái tổ hợp pET-18b-fhf2, pET-18b-mef1, pET-18b-mef2, pET-18b-fda1 và pET-18b-fda2 tổng hợp các fucoidanase tương ứng Fhf2 (F1), Mef1 (F2), Mef2 (F3), Fda1 (F4) và Fda2 (F5) được hoạt hóa và biểu hiện theo điều kiện đã được công bố [67,10,66,65], liệt kê chi tiết ở **Bảng 2.3.**

Bảng 2.3. Điều kiện biểu hiện của các chủng vi khuẩn tái tổ hợp

Fucoidanase	Điều kiện biểu hiện				
	Môi trường	Nồng độ kháng sinh	OD ₆₀₀ nm	Nồng độ cảm ứng (IPTG)	Điều kiện nuôi cấy
F1	LB	50 µg/mL kanamycin, 34 µg/mL chloramphenicol và arabinose 0,05% (w/v)	0,6 - 0,8	1 mM	Nuôi cấy lắcl80 vòng/phút; 18 giờ, 20°C
F2					
F3		100 µg/mL ampicillin, 34 µg/mL chloramphenicol			
F4					
F5		100 µg/mL ampicillin, 34 µg/mL chloramphenicol và arabinose 0,05% (w/v)			

Kiểm tra khả năng biểu hiện bằng các phân tích mẫu sinh khối thông qua kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) và lai Western blot.

2.4.2.2. Tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp

Sinh khối vi khuẩn sau biểu hiện sẽ được hòa tan lại trong dung dịch đệm chiết 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 7,4, lysozyme 0,2 mg/mL. Tiến hành phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm (dòng máy UP400S Hielscher, Teltow, Đức) với cường độ 100%, chu kỳ siêu âm 30 giây, nghỉ 20 giây, ở 4°C, tổng thời gian siêu âm là 2 phút. Sau đó, ly tâm hỗn hợp dịch tế bào với tốc độ 20000 vòng/phút, trong 30 phút, ở 4°C, thu dịch

nổi và lọc qua màng có kích thước lỗ 0,22 μm để loại bỏ xác tế bào. Phần dịch qua màng thu được là enzyme thô, được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tiến hành tinh sạch.

Enzyme fucoidanase được tinh sạch bằng cột Sepharose Histrap HP (GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển), chứa Nikel (Ni^{2+}) làm chất mang. Dung dịch rửa giải 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 7,4, với nồng độ Imidazole tăng dần từ 20 đến 500 mM. Dịch enzyme sau khi qua cột Nikel, sẽ được thu nhận thành các phân đoạn. Kiểm tra độ tinh sạch của các phân đoạn bằng kỹ thuật SDS-PAGE và lai Western blot.

Các phân đoạn enzyme tiếp tục được loại muối và Imidazole bằng cột PD10 (GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển), được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các bước tinh sạch enzyme fucoidanase đều phải được thực hiện ở 4°C để không gây ảnh hưởng đến cấu trúc và hoạt tính của chúng [75,10,54]. Enzyme fucoidanase sau tinh sạch, được tiến hành xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry, sau đó chia nhỏ thể tích vào các ống eppendofit và bảo quản ở -80°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

2.4.3. Phương pháp thử hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp

2.4.3.1. Thử nghiệm hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu

Hoạt tính của các fucoidanase tái tổ hợp thu nhận được xác định trên các cơ chất fucoidan chiết từ các loài rong nâu *F. evanescens* và *S. mcclurei* là các fucoidan đã được xác định cấu trúc và có chứa liên kết (1 \rightarrow 3) và (1 \rightarrow 4) giữa các phân tử fucose trong mạch chính. Hoạt tính enzyme được xác định bằng phương pháp C-PAGE (chi tiết trong mục 2.4.5.).

2.4.3.2. Thử nghiệm hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất sulfated polysaccharide từ hải sâm

Cơ chất PS sử dụng trong nghiên cứu này là Ba, He và Hs tách chiết lần lượt từ 3 loài hải sâm *B. argus*, *H. edulis* và *H. Spinifera* sống ở vùng biển Việt Nam và là các PS chưa từng minh trong cấu trúc. Hỗn hợp phản ứng giữa fucoidanase và cơ chất được ủ theo điều cơ bản, gồm: 1 mg/mL cơ chất PS và 0,1 mg/mL enzyme fucoidanase trong đệm cơ bản (10 mM Tris-HCl

pH 7,5; 50 mM NaCl; 10 mM CaCl₂) ở 30°C trong 24 giờ. Phản ứng dừng lại bằng cách gia nhiệt ở 85°C trong 10 phút. Khả năng bẻ gãy mạch PS được xác định bằng phương pháp C-PAGE (chi tiết nêu ở mục 2.4.5.).

2.4.4. Phương pháp nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính fucoidanase tái tổ hợp

Xác định ảnh hưởng thời gian đến hoạt tính của fucoidanase

Ảnh hưởng của thời gian phản ứng đến hoạt tính của fucoidanase: sau khi xác định được cơ chất PS mà enzyme fucoidanase tái tổ hợp có thể xúc tác, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản ở các khoảng thời gian khác nhau: 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 phút.

Xác định ảnh hưởng nồng độ canxi (Ca²⁺) đến hoạt tính của fucoidanase

Ảnh hưởng của nồng độ canxi (Ca²⁺) đến hoạt tính của fucoidanase: sau khi xác định được cơ chất PS, thời gian phản ứng thích hợp, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản ở các nồng độ Canxi (Ca²⁺) khác nhau: 0, 2, 5 mM.

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 PS, thời gian phản ứng và nồng độ Canxi (Ca²⁺) thích hợp, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản ở các điểm nhiệt độ khác nhau: 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C.

Xác định ảnh hưởng pH đến hoạt tính của fucoidanase

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của fucoidanase: sau khi xác định được cơ chất PS, thời gian phản ứng, nồng độ Canxi (Ca²⁺) và nhiệt độ phản ứng thích hợp, phản ứng thủy phân sẽ được thực hiện ở điều kiện phản ứng cơ bản ở các điểm pH khác nhau: Từ pH 2 đến pH 10.

2.4.5. Các kỹ thuật sử dụng

2.4.5.1. Xác định nồng độ protein bằng phương pháp Lowry

Nguyên tắc: Phương pháp này dựa trên cơ sở phức chất đồng protein khử hỗn hợp photphomolipden–photphovonphramat (thuốc thử Folin–ciocalteu)

tạo phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 660nm. Cường độ màu của hỗn hợp phản ứng tỉ lệ thuận với nồng độ protein trong một phạm vi nhất định. Dựa vào mức độ hấp thụ quang học của protein chuẩn, có thể xác định được hàm lượng protein trong mẫu nghiên cứu [76].

Chất chuẩn là Albumin huyết thanh bò (BSA-Bovine Serum Albumin) có nồng độ gốc là 1 mg/mL.

2.4.5.2. Xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của fucoïdanase tái tổ hợp bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western blot

Điện di protein trên gel polyacrylamide có chứa SDS được tiến hành theo phương pháp của Laemmli và cộng sự [77]. Sử dụng hỗn hợp protein Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) làm thang chuẩn protein.

Enzyme tái tổ hợp được phân tách bằng điện di SDS-PAGE theo phương pháp nêu trên, được phát hiện bằng phương pháp Western blot. Sử dụng màng Polyvinylidene difluoride (PVDF) và kháng thể monoclonal anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody làm yếu tố chỉ thị. Fucoïdanase tái tổ hợp gắn kết với kháng thể đặc hiệu được phát hiện bằng Kit AEC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4.5.3. Hoạt tính thủy phân PS của enzyme fucoïdanase được xác định dựa trên phương pháp điện di carbohydrate trên gel polyacrylamide (C-PAGE) [49].

Đánh giá khả năng thủy phân và đặc tính xúc tác của fucoïdanase tái tổ hợp bằng cách so sánh phổ sản phẩm xuất hiện trên gel C-PAGE so với mẫu chuẩn. Mẫu chuẩn là sản phẩm sau thủy phân của enzyme fucoïdanase FFA2 trên cơ chất fucoïdan từ rong *F. evanescens*, đã được xác định cấu trúc và kích thước phân tử.

Quy trình thực hiện bao gồm: Dịch thủy phân được pha với dung dịch đệm tải (20% glycerol và 0,025 phenol đỏ) theo tỷ lệ 1:1 và chuẩn bị cho chạy C-PAGE bằng cách nạp 6 µL mẫu lên gel polyacrylamide 20% (độ dày gel 1 mm), đệm chạy điện di là Tris-borate 100mM, pH 8,3, thời gian điện di là 1 giờ. Sau khi chạy điện di, gel được nhuộm lần đầu với dung dịch chứa 0,055

alcian blue 8 GX trong 2% axit acetic trong 45 phút, sau đó là với dung dịch 0,01% O-toluidine blue trong 50% ethanol và 1% axit acetic trong 1 giờ. Bảng gel sau đó được giải nhuộm bằng nước cất đến khi thấy rõ các vạch oligosaccharide.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ BIỂU HIỆN, THU NHẬN VÀ TINH SẠCH FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP

3.1.1. Kết quả biểu hiện fucoidanase tái tổ hợp

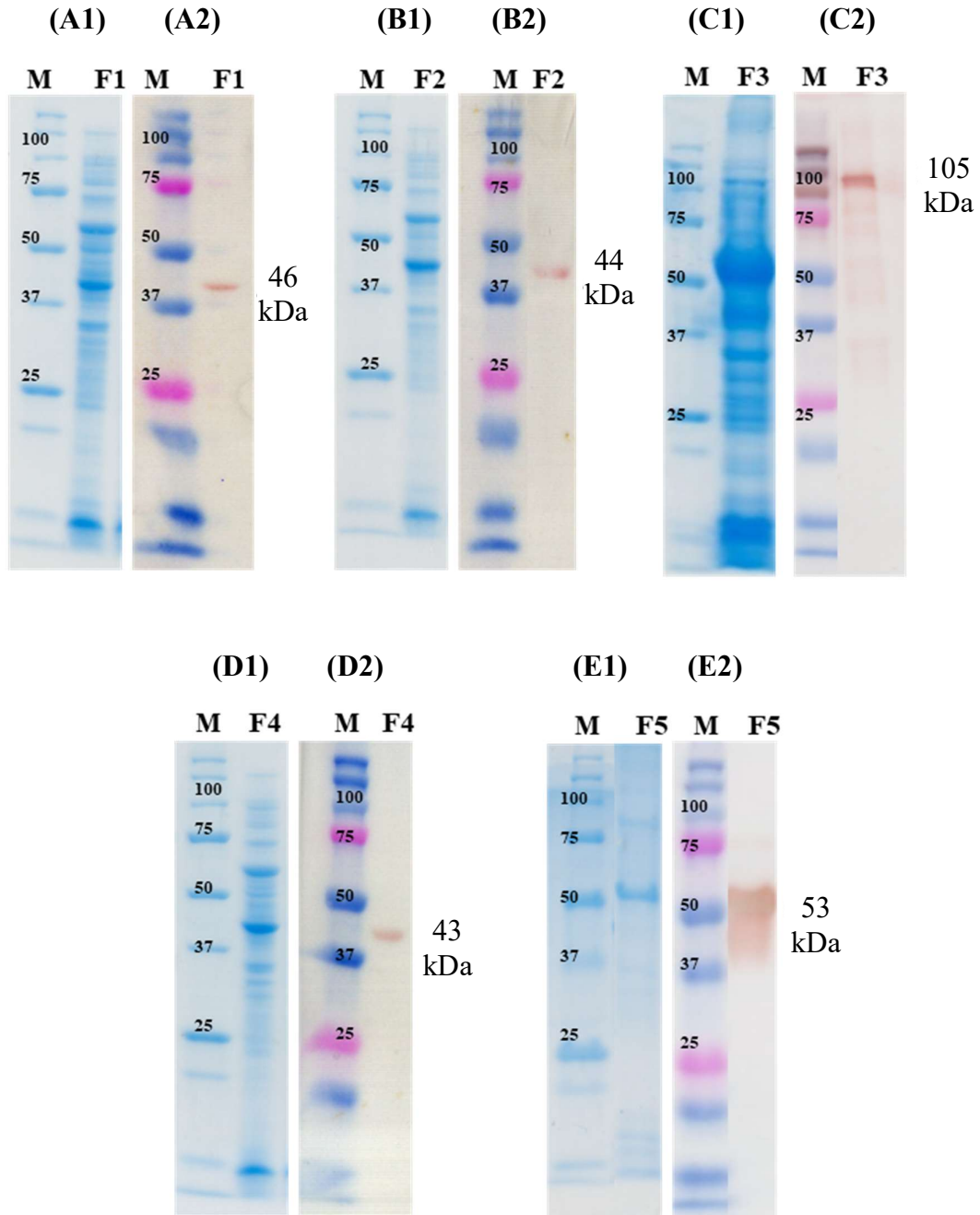
Fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5 được cảm ứng biểu hiện lần lượt từ các chủng *E. coli* BL21/pET-18b-*fhf2*, *E. coli* BL21/pET-18b-*Mef1*, *E. coli* BL21/pET-18b-*Mef2*, *E. coli* BL21/pET-18b-*Fda1*, *E. coli* BL21/pET-18b-*Fda2* như mô tả ở **Bảng 2.3** trong phần phương pháp Mục 2.4.2. Các mẫu sinh khối sau biểu hiện được thu nhận và phân tích sự biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE và lai Western blot. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5 của các chủng tương ứng thể hiện ở **Hình 3.1**.

Trên bản điện di SDS-PAGE, các vệt protein màu xanh ở các vị trí khác nhau đại diện cho sinh khối protein từ các chủng *E. coli* biểu hiện fucoidanase F1, F2, F3, F4 và F5. Các vệt này phù hợp với kích thước dự đoán của từng enzyme: F1 (46 kDa), F2 (45 kDa), F3 (105 kDa), F4 (43 kDa) và F5 (53 kDa) (**Hình 3.1**). Việc xác định được kích thước của từng băng protein này cho thấy các chủng *E. coli* BL21 mang vector pET-18b có khả năng đã biểu hiện thành công các fucoidanase mong muốn khi được cảm ứng bằng IPTG. Kết quả ban đầu cho thấy mỗi loại fucoidanase có khả năng đã được biểu hiện thành công trong sinh khối tế bào. Sự xuất hiện của các băng protein ở các kích thước khác nhau cũng cho thấy rằng các điều kiện biểu hiện và cảm ứng đã đáp ứng tốt yêu cầu về sự ổn định của protein trong hệ thống vi khuẩn.

Kết quả Western blot là bằng chứng về sự biểu hiện của các fucoidanase tái tổ hợp nhờ vào sự hiện diện của các băng protein chứa đuôi His-tag tại các vị trí có khối lượng phân tử tương ứng với từng enzyme mục tiêu. Khi sử dụng kháng thể đặc hiệu nhận diện đuôi His-tag, các băng protein đặc trưng xuất hiện ở vị trí của fucoidanase F1 (46 kDa), F2 (45 kDa), F3 (105 kDa), F4 (43 kDa) và F5 (53 kDa) (**Hình 3.1**), cho thấy các enzyme tái tổ hợp không chỉ được biểu hiện hiệu quả mà còn giữ nguyên đuôi His-tag cần thiết cho các bước tinh sạch tiếp theo bằng sắc ký ái lực trên cột niken (Ni^{2+}).

Dựa vào kết quả phân tích điện di SDS-PAGE và lai Western blot chứng tỏ việc thực hiện quá trình nuôi cấy và biểu hiện theo các điều kiện đã được nêu ở phần phương pháp, cả 05 chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp pET-18b-*fhf2*, pET-18b-*Mef1*, pET-18b-*Mef2*, pET-18b-*Fda1*, pET-18b-*Fda2* đều đã sản sinh được các protein mục tiêu, đó là các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5 với kích thước tương ứng, lần lượt là 46, 45, 105, 43 và 53 kDa. Kết quả này là tương đồng và phù hợp với khối lượng phân tử với các enzyme fucoidanase *fhf2* [68], *Mef1* [65], *Mef2* [66], *Fda1* và *Fda2* [67] đã được công bố trước đó. Vì vậy, các mẫu sinh khối này đã được thu nhận và bảo quản ở -20°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Như vậy, kết quả biểu hiện và phân tích trên SDS-PAGE và Western blot không chỉ cho thấy thành công trong biểu hiện các fucoidanase tái tổ hợp mà còn cung cấp cơ sở quan trọng cho bước thu nhận và tinh sạch enzyme. Các enzyme được biểu hiện đúng kích thước và có khả năng phản ứng đặc hiệu với kháng thể, cho thấy hệ thống biểu hiện đang hoạt động ổn định, đáng tin cậy cho các thí nghiệm tiếp theo. Việc này cũng giúp tối ưu hóa quy trình sản xuất fucoidanase tái tổ hợp, tiết kiệm thời gian và tăng hiệu suất cho các nghiên cứu sau này.



Hình 3.1. Kiểm tra biểu hiện các fucoidanase tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE và lai Western blot

Trong đó: Kết quả SDS-PAGE (A1, B1, C1, D1, E1) lần lượt của Fucoidanase (F1, F2, F3, F4, F5); Kết quả Western blot (A2, B2, C2, D2, E2) với kích thước tương ứng 46, 45, 105, 43 và 53 kDa lần lượt của Fucoidanase (F1, F2, F3, F4, F5); (M): Thang chuẩn protein.

3.1.2. Kết quả thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp

Quy trình thu nhận và tinh sạch fucoidanase tái tổ hợp được thực hiện qua nhiều bước nhằm đảm bảo độ tinh sạch cao và bảo toàn hoạt tính enzyme. Sau khi biểu hiện enzyme thành công trong *E. coli*, quá trình phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm và ly tâm lạnh được tiến hành để tách enzyme khỏi tế bào chủ, phù hợp với các enzyme nội bào (intra cellular, soluble enzyme) nhạy cảm. Dịch enzyme thô được lọc qua màng 0,22 μm để loại bỏ tạp chất bằng phương pháp cụ thể đã được nêu ở Mục 2.4. Kết quả thu nhận enzyme thô của năm loại fucoidanase tái tổ hợp (F1, F2, F3, F4, F5) được trình bày chi tiết trong **Bảng 3.1**.

Bảng 3.1. Kết quả thu nhận dịch enzyme thô của 5 loại fucoidanase tái tổ hợp

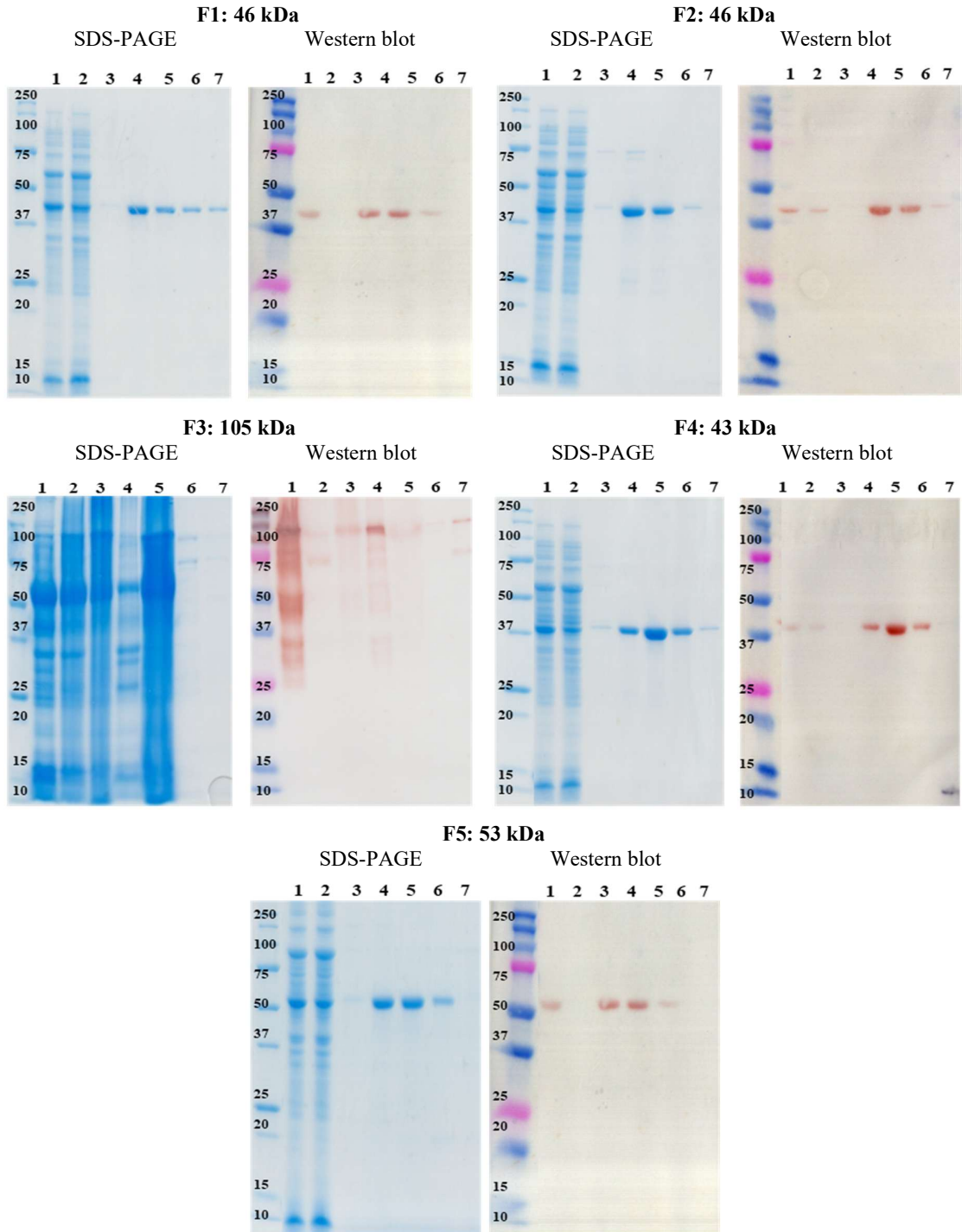
Fucoidanase	Thể tích lên men (Lít)	Sinh khối tế bào (gram)	Dịch enzyme thô (mL)	Hàm lượng protein (mg/mL)	Protein tổng số (mg)
F1	3	95	40	1,56	62,4
F2	3	120	52	1,89	98,28
F3	3	77	37	1,43	52,91
F4	3	104	45	1,67	75,15
F5	3	98	40	1,75	70

Kết quả từ **Bảng 3.1** cho thấy, với cùng thể tích lên men (3 lít), lượng sinh khối tế bào thu được sau quá trình biểu hiện ở các chủng có sự khác nhau. Trong đó, sinh khối tế bào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21/pET-18b-*Mef1* (F2) thu được là cao nhất đạt 120 gram, thấp nhất là sinh khối tế bào chủng *E. coli* BL21/pET-18b-*Mef2* (F3) đạt 77 gram. Kết quả này cũng tương đồng với công bố của Maria và cộng sự [65] khi đã biểu hiện thành công fucoidanase *Mef1* (F2), có trọng lượng phân tử 45 kDa và cấu trúc phân tử chỉ chứa trung tâm hoạt động D1 của fucoidanase, ở mức độ biểu hiện rất cao với cùng điều kiện nuôi cấy. Trong khi đó, nghiên cứu biểu hiện fucoidanase *Mef2* (F4), có trọng lượng phân tử 105 kDa và cấu trúc phân tử không chỉ

chứa trung tâm hoạt động D1 của fucoidanase mà còn bao gồm các vùng chức năng khác như vùng Cadherin-like domain (IPR003343), galactose binding-like domain (IPR000421) hay vùng Type IX secretion system (IPR026444) [66] cho thấy việc biểu hiện fucoidanase này ở mức độ không cao, cần được xem xét thiết kế lại cấu trúc phân tử protein trước khi tiến hành tái tổ hợp.

Vì các fucoidanase tái tổ hợp trong nghiên cứu đều đã được thiết kế mang đuôi Histidin nên các enzyme fucoidanase thô sẽ tiếp tục được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực trên cột Nikel (Ni^{2+}). Điều này cho phép loại bỏ các protein tạp không bám hoặc bám yếu trên cột, giúp thu nhận enzyme mục tiêu với độ tinh sạch cao. Các protein mục tiêu bám dính trên cột, sẽ được thu nhận thành các phân đoạn tương ứng bằng cách sử dụng đệm rửa với nồng độ Imidazole tăng dần từ 50 đến 300 mM. Các phân đoạn protein thu nhận được sau khi qua cột Nikel sẽ được phân tích và đánh giá độ tinh sạch bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và lai Western blot (**Hình 3.2**).

Phân tích kết quả trên gel điện di SDS-PAGE và màng lai Western blot (**Hình 3.2**) cho thấy: dịch enzyme thô (1) và dịch rửa giải (2) là một hỗn hợp rất nhiều protein có kích thước khác nhau được biểu hiện bằng các vệt màu đậm trên gel SDS-PAGE; tuy nhiên trên màng lai Western blot vệt màu đỏ tương ứng với trọng lượng phân tử mục tiêu của fucoidanase tái tổ hợp chỉ xuất hiện ở mẫu dịch enzyme thô (1) mà không (hoặc rất khó) phát hiện ở dịch rửa giải (2). Điều này được giải thích là do các fucoidanase mục tiêu trong dịch enzyme thô có chứa đuôi His-tag nên đã liên kết với hạt nhựa Nikel của cột tinh sạch, bám dính trên cột và không bị rửa trôi khỏi cột ở nồng độ Imidazole 20 mM.



Hình 3.2. Kết quả tinh sạch 05 fucoidanase tái tổ hợp (F1, F2, F3, F4, F5) được xác định bằng phương pháp SDS-PAGE và lai Western blot

Trong đó: (1) dịch enzyme thô; (2) dịch rửa qua cột; (3, 4, 5, 6, 7): các phân đoạn thu nhận ở nồng độ Imidazole 50, 100, 150, 200 và 300 mM.

Trong khi phần lớn các protein tạp nhiễm đã được loại bỏ khỏi cột sau quá trình rửa giải. Đối với các mẫu phân đoạn thu nhận (3), (4), (5), (6), (7) ở

nồng độ Imidazole tăng dần tương ứng 50, 100, 150, 200, 300 mM cho thấy, ở nồng độ Imidazole 50 mM cơ bản chưa thể phân tách fucoidanase tái tổ hợp ra khỏi cột, fucoidanase tái tổ hợp chỉ bắt đầu được phát hiện khi tăng nồng độ Imidazole cao hơn như 100, 150, 200 mM. Với nồng độ Imidazole cao nhất là 300 mM vẫn có khả năng tách rửa các fucoidanase tái tổ hợp, tuy nhiên kết quả Western blot gần như không phát hiện được vệt màu tại vị trí tương ứng với trọng lượng phân tử của các fucoidanase tái tổ hợp, điều này lý giải là vì các fucoidanase tái tổ hợp đã được rửa giải hoàn toàn ở nồng độ thấp hơn sử dụng trước đó (**Hình 3.2**).

Bên cạnh kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và lai Western blot, hàm lượng protein ở mỗi phân đoạn thu nhận được cũng được xác định bằng phương pháp Lowry. Kết quả được thể hiện ở **Bảng 3.2**.

Bảng 3.2. Kết quả xác định hàm lượng protein ở các phân đoạn thu nhận được của các fucoidanase tái tổ hợp

Fucoidanase	Hàm lượng protein (mg/mL) thu nhận sau khi qua cột tinh sạch tương ứng với nồng độ Imidazole				
	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM	300 mM
F1	0,024	1,576	1,257	0,454	0,183
F2	0,065	1,839	1,602	0,327	0,016
F3	0,132	1,384	1,035	0,862	0,054
F4	0,069	1,432	1,971	1,003	0,258
F5	0,018	1,548	1,672	0,432	0,014

Kết quả từ **Bảng 3.2** cho thấy, hàm lượng protein ở tất cả các mẫu fucoidanase đều có cùng xu hướng, phân đoạn Imidazole 50 mM đã có thể tách rửa được protein ra khỏi cột tinh sạch nhưng rất ít, hàm lượng protein ở các mẫu chỉ từ 0,024 đến 0,132 mg/mL. Ở nồng độ Imidazole 100 và 150 mM, quá trình tách rửa diễn ra nhanh hơn và mạnh hơn, nên hàm lượng protein thu được ở các phân đoạn này của các mẫu đều tăng và đạt cực đại từ 1,035 đến 1,971 mg/mL. Hàm lượng protein sau đó giảm nhanh chóng ở các

phân đoạn có nồng độ Imidazole 200 và 300 mM, chỉ còn dao động trong khoảng từ 0,014 đến 1,003 mg/mL.

Dựa trên phân tích kết quả điện di SDS-PAGE và lai Western blot (**Hình 3.2**) và hàm lượng protein của các phân đoạn thu nhận được (**Bảng 3.2**), cùng với mục đích thu nhận được fucoidanase tái tổ hợp có độ tinh sạch cao, hàm lượng protein cao, chúng tôi đã chọn 2 phân đoạn có nồng độ Imidazole là 100 mM và 150 mM ở mỗi mẫu fucoidanase để thu nhận mẫu fucoidanase tinh sạch, thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.3. Kết quả đánh giá hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu

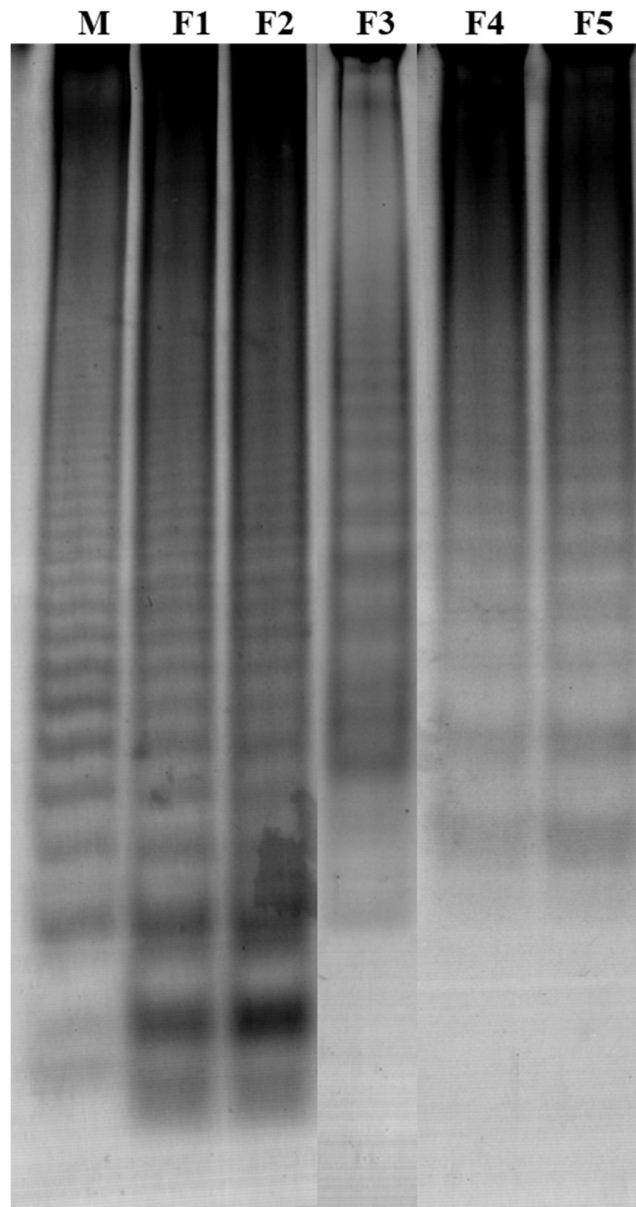
Trong các kết quả nghiên cứu đã được công bố, các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5 đã được xác định liên kết xúc tác và cơ chất đặc hiệu tương ứng (**Bảng 3.3**), vì vậy trong nghiên cứu này, để có thể đánh giá hoạt tính của các enzyme trên sau quá trình tinh sạch, chúng tôi đã tiến hành thiết lập lại các phản ứng thủy phân theo đúng cơ chất đặc hiệu và điều kiện xúc tác tương ứng cho từng fucoidanase, đã nêu ở Mục 2.4.4. Sau đó phân tích kết quả bằng phương pháp điện di C-PAGE (**Hình 3.3**).

Bảng 3.3. Liên kết xúc tác và cơ chất đặc hiệu của các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4 và F5

Fucoidanase	Liên kết xúc tác	Cơ chất đặc hiệu	TLTK
F1	Endo (1→4)	<i>F. evanescens</i>	[5]
F2	Endo (1→4)	<i>F. evanescens</i>	[1]
F3	Endo (1→3)	<i>F. evanescens</i>	[2]
F4	Endo (1→3)	<i>S. mcclurei</i>	[6]
F5	Endo (1→3)	<i>S. mcclurei</i>	[6]

Kết quả C-PAGE ở **Hình 3.3** cho thấy, tất cả 5 fucoidanase tái tổ hợp sau quá trình tinh sạch đều thể hiện hoạt tính trên cơ chất đặc hiệu tương ứng (F1, F2 và F3 hoạt động trên cơ chất *F. evanescens*, F4, F5 hoạt động trên cơ chất *S. mcclurei*). Sản phẩm tạo thành là các oligo-fucoidan có trọng lượng

phân tử thấp hơn, di chuyển về phía dưới và phân bố khắp bề mặt băng gel điện di.



Hình 3.3. Kết quả xác định hoạt tính các fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu tương ứng

Trong đó: (M): mẫu chuẩn oligo-fucoidan; (F1): dịch phản ứng của fucoidanase F1 trên cơ chất *F. evanescens*; (F2): dịch phản ứng của fucoidanase F2 trên cơ chất *F. evanescens*; (F3): dịch phản ứng của fucoidanase F3 trên cơ chất *F. evanescens*; (F4): dịch phản ứng của fucoidanase F4 trên cơ chất *S. mcclurei*; (F5): dịch phản ứng của fucoidanase F5 trên cơ chất *S. mcclurei*.

Fucoidanase F1, F2 và F3 mặc dù cùng hoạt động trên cơ chất đặc hiệu là *F. evanescens*, nhưng lại xúc tác thủy phân các liên kết khác nhau: F1 và F2 xúc tác thủy phân liên kết đường fucose (1→4), trong khi đó F3 xúc tác thủy phân liên kết đường fucose (1→3) trong mạch chính của cơ chất fucoidan, vì vậy mà sản phẩm tạo thành của F3 sẽ có sự khác biệt so với F1 và F2. Điều này cũng đã được thể hiện qua kết quả điện di C-PAGE ở **Hình 3.3**, khi phổ sản phẩm của F3 có khác biệt so với F1 và F2.

Như vậy, dựa trên các kết quả và phân tích nêu trên, chúng tôi đã thu nhận được 5 fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4, F5 có hoạt tính mạnh và độ tinh sạch cao. Các enzyme này được chia nhỏ và bảo quản ở -20°C để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

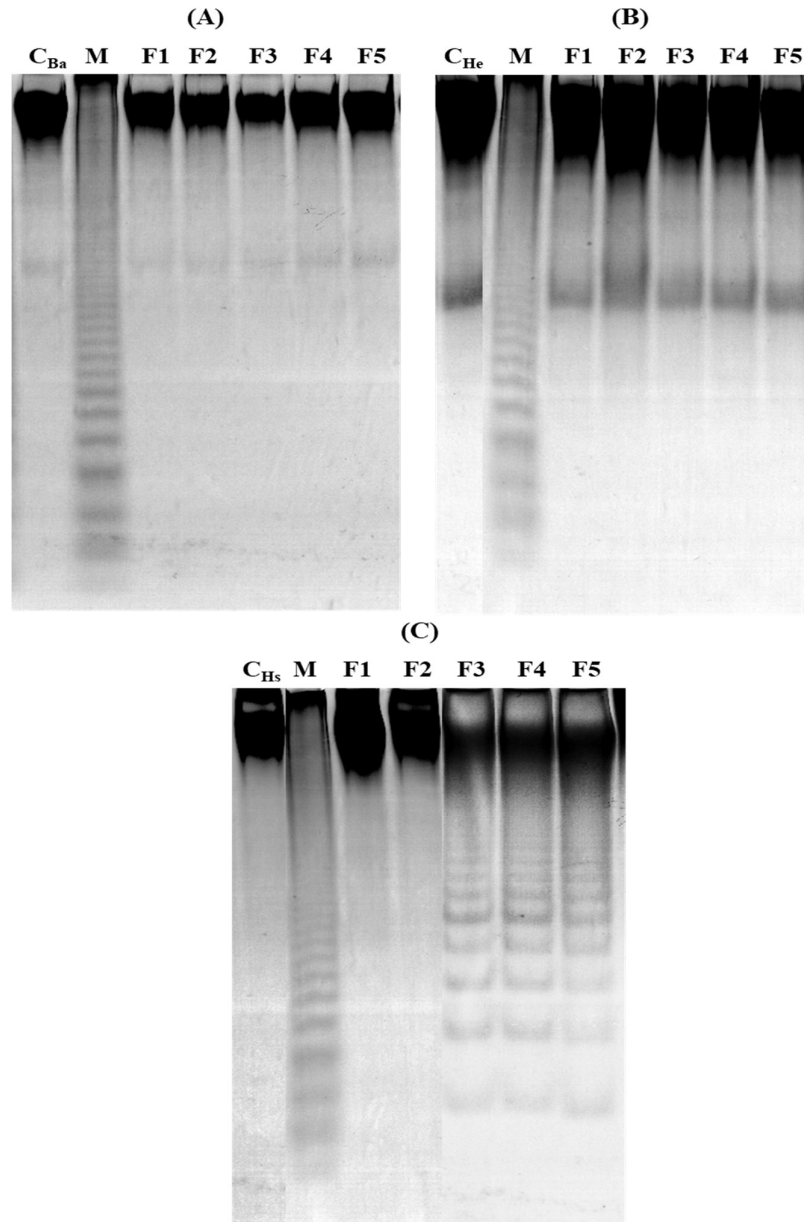
3.2. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH THỦY PHÂN SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM CỦA CÁC FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP

Trong nghiên cứu này, hoạt tính thủy phân PS từ ba loài hải sâm *B. argus*, *H. edulis* và *H. spinifera* của các fucoidanase F1, F2, F3, F4 và F5 được đánh giá để xác định khả năng phân cắt các liên kết đặc trưng của từng loại enzyme trên các cơ chất có cấu trúc khác nhau. Các phản ứng xúc tác được thực hiện ở 30°C trong 24 giờ, dừng phản ứng bằng cách gia nhiệt đến 85°C trong vòng 10 phút. Kiểm tra khả năng phân cắt của các fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất PS từ hải sâm bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (C-PAGE). Kết quả được trình bày và phân tích ở **Hình 3.4** và **Bảng 3.4**.

So sánh hoạt tính thủy phân của các fucoidanase F1, F2, F3, F4 và F5:

Kết quả điện di C-PAGE cho thấy, đối với cơ chất PS từ *B. argus* và *H. edulis*, không có sự thay đổi nào giữa mẫu cơ chất và các mẫu dịch sau phản ứng với cả 5 fucoidanase (**Hình 3.4A và 3.4B**), điều này cho thấy F1, F2, F3, F4 và F5 đều không có khả năng xúc tác phân cắt mạch PS từ các loài hải sâm này. Đối với cơ chất còn lại là PS từ *H. spinifera*, kết quả nghiên cứu cho thấy cơ chất này bị phân cắt bởi ba fucoidanase là F3, F4 và F5, tạo ra các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp hơn và di chuyển xa hơn trên gel điện di (**Hình 3.4C**).

Sự khác biệt rõ ràng trong hoạt tính của F3, F4 và F5 so với F1 và F2 trên cơ chất PS từ *H. spinifera* phản ánh tính đặc hiệu của các enzyme này với liên kết fucose trong cơ chất.



Hình 3.4. Kết quả thử nghiệm hoạt tính thủy phân PS từ hải sâm của fucoidanase tái tổ hợp bằng phương pháp C-PAGE

Trong đó: (A) (B) (C): kết quả phản ứng thủy phân trên cơ chất PS từ hải sâm *B. argus* (Ba), *H. edulis* (He) và *H. spinifera* (Hs); (C_{Ba}), (C_{He}), (C_{Hs}): cơ chất PS từ hải sâm *B. argus*, *H. edulis* và *H. spinifera*; M: thang chuẩn oligofucoidan; F1, F2, F3, F4, F5: dịch phản ứng của các fucoidanase tái tổ hợp F1, F2, F3, F4, và F5 trên cơ chất tương ứng.

Sự đặc hiệu của enzyme với các liên kết fucose (1→3) và (1→4):

Bên cạnh đó, trên cơ sở kết quả phân tích hoạt tính ở **Bảng 3.4** còn cho thấy, cả 3 fucoidanase F3, F4 và F5 có khả năng thủy phân cơ chất PS Hs, đều là các endo-(1→3) fucoidanase. Trong khi các enzyme F1 và F2 không thể hiện hoạt tính trên cùng cơ chất Hs là các endo-(1→4) fucoidanase.

Sự phân bố hoạt tính thủy phân của các fucoidanase cho thấy F3, F4 và F5 là các endo-(1→3) fucoidanase, phù hợp với liên kết fucose (1→3) có trong PS từ *H. spinifera*, trong khi F1 và F2 là các endo-(1→4) fucoidanase không thể xúc tác thủy phân trên cùng cơ chất này. Kết quả này cho thấy rằng PS từ *H. spinifera* có chứa các liên kết fucose (1→3) trong mạch chính, tạo điều kiện thuận lợi cho hoạt động của các enzyme F3, F4 và F5, nhưng có thể cũng chứa một số liên kết (1→4), tuy nhiên lại bị cản trở về mặt không gian xúc tác bởi các nhóm chức nên F1 và F2 không thể tiếp cận để xúc tác thủy phân liên kết này, do đó không xuất hiện hoạt tính trên gel C-PAGE.

Bảng 3.4. Kết quả phân tích khả năng thủy phân PS từ hải sâm của fucoidanase tái tổ hợp

		Cơ chất sulfated polysaccharide từ hải sâm		
Fucoidanase và liên kết xúc tác đặc hiệu		<i>Bohadschia argus</i> (Ba)	<i>Holothuria edulis</i> (He)	<i>Holothuria spinifera</i> (Hs)
F1	Endo-(1→4)	-	-	-
F2	Endo-(1→4)	-	-	-
F3	Endo-(1→3)	-	-	+
F4	Endo-(1→3)	-	-	+
F5	Endo-(1→3)	-	-	+

Trong đó: (-) không có hoạt tính thủy phân; (+) có hoạt tính thủy phân

Đặc điểm cấu trúc của cơ chất sulfated polysaccharide từ hải sâm và ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme:

Cấu trúc PS của ba loài hải sâm *B. argus*, *H. edulis* và *H. spinifera* có sự khác biệt rõ rệt về thành phần hóa học và kiểu liên kết fucose trong mạch chính, dẫn đến sự khác nhau trong khả năng tương tác với các fucoidanase tái tổ hợp. Đặc biệt, PS từ *H. spinifera* có cấu trúc mạch chính chứa liên kết fucose (1→3) và các nhóm sulfate gắn ở vị trí C2 và C4 của các gốc fucose, làm cho PS này phù hợp với hoạt tính của các enzyme endo-(1→3) như F3, F4 và F5. Trong khi đó, PS từ *B. argus* và *H. edulis* có thể chứa liên kết fucose (1→4) cùng với mức độ sulfate hóa khác nhau, hoặc cũng có thể chứa liên kết fucose (1→3) nhưng bị sulfate hóa ở vị trí khác với C2 và C4, hoặc nó chỉ chứa FCS mà không chứa FS khiến chúng không bị các fucoidanase này thủy phân. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng PS từ hải sâm có hai dạng, dạng FS thường có cấu trúc đơn giản và đồng nhất hơn PS từ rong biển, với các mạch nhánh chứa chủ yếu là fucose cùng vị trí sulfate hóa đặc trưng [83,84], trong khi đó FCS thì có cấu trúc phức tạp hơn. Chính sự khác biệt cấu trúc này đã lý giải tại sao chỉ có PS từ *H. spinifera* có thể bị thủy phân bởi các fucoidanase F3, F4 và F5.

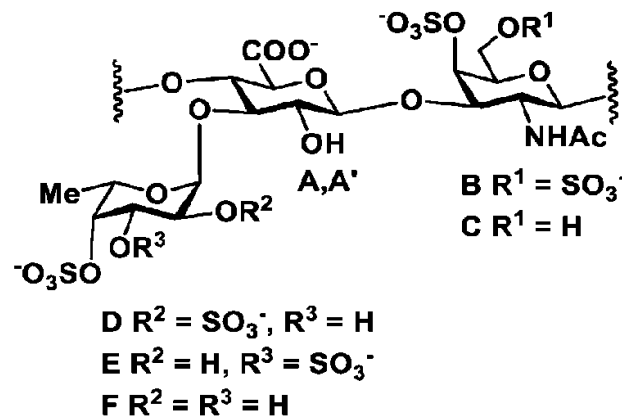
Phân tích C-PAGE cho thấy, khi thủy phân PS từ *H. spinifera*, các fucoidanase F3, F4 và F5 tạo thành các oligo-fucoidan có trọng lượng phân tử thấp hơn, dễ dàng nhận biết qua các băng di chuyển xa hơn trên gel. Những oligo-fucoidan này có tiềm năng ứng dụng cao trong y sinh học nhờ các đặc tính sinh học như chống oxy hóa, chống viêm và ức chế sự phát triển của tế bào ung thư. Các nghiên cứu trước cũng ghi nhận khả năng chống đông máu của sản phẩm thủy phân từ PS chứa fucose, làm tăng tiềm năng ứng dụng của các oligo-fucoidan trong lĩnh vực y tế và dược phẩm.

Dựa vào đặc tính sinh học của các oligo-fucoidan tạo thành, sản phẩm từ phản ứng thủy phân PS của *H. spinifera* bởi các enzyme F3, F4 và F5 có thể là nguồn nguyên liệu quan trọng cho các nghiên cứu y sinh. Sản phẩm này có thể phát huy hiệu quả trong hỗ trợ điều trị các bệnh lý liên quan đến viêm nhiễm, căng thẳng oxy hóa, và thậm chí là ung thư, mở ra hướng nghiên cứu tiềm năng trong phát triển dược liệu từ nguồn PS tự nhiên có trong hải sâm.

Ngoài ra, **Bảng 3.4** cũng chỉ rõ sự khác biệt trong hoạt tính thủy phân

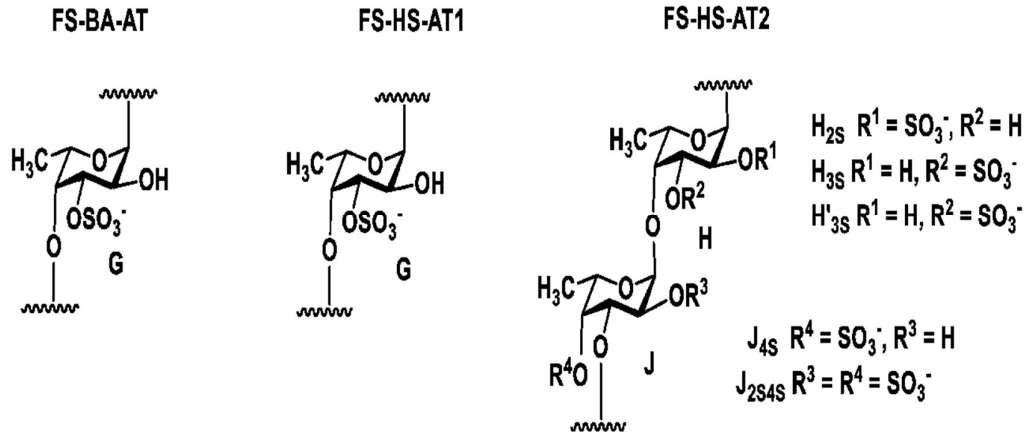
của các fucoidanase. Cụ thể, F3, F4 và F5 đều là các endo-(1→3) fucoidanase, trong khi F1 và F2 thuộc loại endo-(1→4), nên chúng không thể hiện hoạt tính trên PS từ *H. spinifera*. Kết quả này cho phép dự đoán rằng cơ chất PS *H. spinifera* chứa chủ yếu các liên kết (1→3) fucose trong mạch chính hoặc nhánh, trong khi vẫn có thể tồn tại một số liên kết (1→4) mà F1 và F2 có thể tiếp cận. Tuy nhiên, các nhóm chức như sulfate, acetyl và mức độ sulfate hóa trong cấu trúc phân tử PS *H. spinifera* có thể ngăn cản sự tiếp cận của F1 và F2, dẫn đến việc hai enzyme này không thể xúc tác thủy phân. Điều này phù hợp với bản chất đặc hiệu cao của các fucoidanase, vốn không chỉ bị ảnh hưởng bởi kiểu liên kết giữa các gốc đường mà còn bởi vị trí và mức độ sulfate hóa của các nhóm chức xung quanh [53,49,78].

So với PS chiết xuất từ rong biển, PS từ hải sâm được cho là đơn giản và đồng nhất hơn về cấu trúc, với mạch nhánh chỉ chứa các gốc đường fucose, thường được sulfate hóa tại các vị trí C2 và C4 [79,80]. PS từ *H. spinifera* đặc biệt thuộc nhóm FCS, với mạch chính chứa liên kết (1→3) giữa các gốc fucose, glucuronic acid (GlcA) và N-acetylgalactosamine (GalNAc) như **Hình 3.5** và **Hình 3.6**. Các nhánh chứa fucose này có các nhóm sulfate ở vị trí C4 và C2, vốn được biết là các vị trí đóng vai trò quyết định trong hoạt tính sinh học như chống đông máu và chống oxy hóa [5,81]. Tuy nhiên, để tối ưu hóa các ứng dụng y sinh, việc tìm kiếm các enzyme có khả năng bẻ gãy mạch của các PS này nhằm tạo ra các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp vẫn luôn là mục tiêu nghiên cứu quan trọng.



Hình 3.5. Cấu trúc của FCS từ *Hs*, đơn vị lặp lại của FCS từ *Hs*

Trong đó: đơn vị A chứa Fuc2S4S (D), trong khi đơn vị A' chứa Fuc3S4S (E) hoặc Fuc4S (F) [5]



Hình 3.6. Các khối lặp của fucan FS-BA-AT và FS-HS-AT [5]

Nhờ kết quả nghiên cứu này đã xác định được 3 loại fucoidanase tái tổ hợp (F3, F4 và F5) có thể thủy phân PS từ *H. spinifera*, đây là một kết quả đáng ghi nhận, mở ra các hướng nghiên cứu mới trong ứng dụng enzyme fucoidanase. Mặc dù cả ba fucoidanase (F3, F4, và F5) đều cho thấy hoạt tính, nhưng xét về tính ổn định và hiệu suất, nghiên cứu tiếp theo sẽ ưu tiên tập trung vào fucoidanase F3 và cơ chất PS từ *H. spinifera* để tối ưu hóa quy trình và khảo sát thêm các đặc tính sinh học của sản phẩm thủy phân.

3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HOẠT TÍNH CỦA FUCOIDANASE TÁI TỔ HỢP TRÊN CƠ CHẤT SULFATED POLYSACCHARIDE TỪ HẢI SÂM

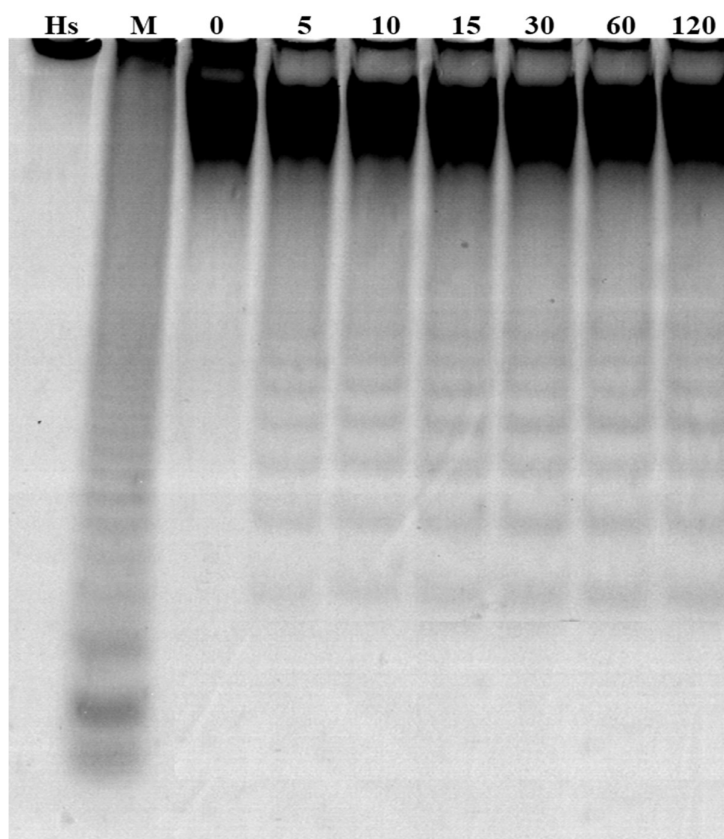
3.3.1. Thời gian phản ứng thích hợp

Việc xác định thời gian phản ứng thích hợp đóng vai trò then chốt trong quá trình thủy phân, vì nó không chỉ đảm bảo hiệu quả cao nhất của enzyme mà còn giúp tối ưu hóa quá trình tạo thành các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp, cần thiết cho mục tiêu nghiên cứu. Nếu thời gian phản ứng quá ngắn, enzyme có thể chưa kịp xúc tác đầy đủ, dẫn đến hiệu suất thủy phân thấp và không đạt được lượng sản phẩm mong muốn. Ngược lại, nếu thời gian phản ứng kéo dài quá mức, sản phẩm tạo thành có nguy cơ bị phân hủy hoặc thay đổi cấu trúc do enzyme tiếp tục tác động lên chúng. Điều này có thể gây ra sự suy giảm hoạt tính sinh học hoặc thậm chí phá vỡ cấu trúc đặc thù của các oligo-fucoidan, làm mất đi các đặc tính quan trọng như khả năng chống oxy hóa, chống viêm và các tác dụng sinh học khác.

Do đó, việc tìm ra thời gian phản ứng tối ưu không chỉ giúp tiết kiệm chi

phí và tài nguyên trong quá trình sản xuất mà còn đảm bảo rằng sản phẩm cuối cùng có chất lượng cao, duy trì được các đặc tính sinh học cần thiết cho các ứng dụng y sinh và công nghiệp. Thời gian phản ứng phù hợp sẽ giúp quá trình thủy phân diễn ra hiệu quả, đạt mức độ phân cắt tối đa mà không gây ra các phản ứng phụ không mong muốn, từ đó ổn định chất lượng và giá trị của sản phẩm.

Để xác định thời gian thích hợp cho quá trình xúc tác thủy phân cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera* của fucoidanase tái tổ hợp F3, tiến hành thực hiện phản ứng ở 30°C với các khoảng thời gian khác nhau 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 phút. Dịch phản ứng của mỗi thí nghiệm được kiểm tra bằng phương pháp C-PAGE. Kết quả được thể hiện ở **Hình 3.7**.



Hình 3.7. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 theo thời gian

Trong đó: (Hs): cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera*, (M): thang chuẩn oligo-fucoidan; (0, 5, 10, 15, 30, 60, 120): thời gian phản ứng tính bằng phút.

Kết quả từ **Hình 3.7** chỉ ra rằng, sản phẩm thủy phân bắt đầu xuất hiện ngay sau khi diễn ra phản ứng và có thể nhìn thấy rõ sau 5 phút phản ứng, khi

các vệt mờ được phát hiện trên gel C-PAGE. Sự gia tăng nồng độ của các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp được ghi nhận sau 10 phút, với sự xuất hiện của các band rõ ràng và đậm hơn. Sau 15 phút phản ứng, sản phẩm thủy phân đạt mức cao nhất và duy trì ổn định khi thời gian phản ứng kéo dài đến 30, 60 và 120 phút. Thời gian tối ưu cho hoạt động của fucoidanase F3 là 15 phút, điều này cho thấy enzyme này có khả năng xúc tác nhanh và hiệu quả trên PS từ *H. spinifera*. Kết quả này phù hợp với các enzyme fucoidanase có nguồn gốc từ vi khuẩn biển đã được công bố, với thời gian phản ứng thường dao động trong khoảng từ vài phút đến vài giờ, tùy thuộc vào cấu trúc enzyme và cơ chất. Quá trình phản ứng nhanh của F3 có thể được lý giải bởi cấu trúc đặc hiệu của enzyme, giúp nó tiếp cận và phân cắt liên kết fucose (1→3) trong mạch chính của PS từ *H. spinifera* một cách hiệu quả, tạo thành các oligo-fucoidan có trọng lượng phân tử thấp ngay từ những phút đầu phản ứng.

Thời gian phản ứng thích hợp của các fucoidanase đã được công bố trong nhiều nghiên cứu khác nhau [41,42,43] tùy thuộc vào loại enzyme, nguồn gốc fucoidan, và điều kiện phản ứng cụ thể. Một số enzyme fucoidanase có thể đạt hiệu suất tối đa trong khoảng 4 đến 8 giờ như fucoidanase Fhf2 [53] hay FWf1 và FWf2 [78], trong khi các enzyme khác có thể yêu cầu thời gian dài hơn để thủy phân fucoidan một cách hiệu quả như fucoidanase FcnA, Fda1 hay Fda2 [67]. Tuy nhiên, thời gian tối ưu thường được xác định thông qua thử nghiệm cụ thể, dựa trên sự gia tăng nồng độ của sản phẩm thủy phân fucoidan tại thành trong quá trình phản ứng. Trong phạm vi đề tài nghiên cứu này, ban đầu thiết kế thí nghiệm được thiết lập thời gian tối đa cho phản ứng thủy phân là 24 giờ, tuy nhiên với kết quả F3 đạt hiệu suất cao nhất từ rất sớm (sau 15 phút phản ứng) và duy trì qua các mốc thời gian đã tạo cơ sở cho việc rút ngắn thời gian phản ứng tối đa còn 120 phút.

Việc xác định được thời gian phản ứng tối ưu là 15 phút cho fucoidanase F3 không chỉ giúp tối ưu hóa quy trình thủy phân PS từ *H. spinifera* mà còn mở ra tiềm năng trong các nghiên cứu tiếp theo. Sản phẩm thu được từ phản ứng trong thời gian ngắn có thể duy trì được các đặc tính sinh học quan trọng, tránh hiện tượng phân hủy hoặc biến tính không mong muốn do phản ứng kéo dài. Điều này đặc biệt hữu ích trong các ứng dụng y sinh, nơi các oligo-fucoidan có trọng lượng phân tử thấp được cho là có hoạt tính sinh học cao,

giúp hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến viêm nhiễm và ung thư.

Từ kết quả này, có thể thấy rằng thời gian phản ứng tối ưu cho fucoidanase F3 là ngắn, điều này rất có lợi khi áp dụng trong sản xuất công nghiệp. Thời gian phản ứng ngắn sẽ giúp tăng hiệu suất sản xuất oligo-fucoidan từ PS của *H. spinifera*, giảm chi phí năng lượng, đồng thời tránh được các hiện tượng phân hủy hoặc mất hoạt tính sinh học của sản phẩm do thời gian ủ kéo dài. Do đó, thời gian phản ứng 15 phút sẽ được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo để duy trì hiệu quả thủy phân và ổn định chất lượng sản phẩm.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, quá trình thủy phân PS bằng fucoidanase tái tổ hợp F3 đạt hiệu quả tối đa sau 15 phút. Vì vậy, thời gian phản ứng này được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. Nồng độ canxi (Ca^{2+}) thích hợp trong phản ứng

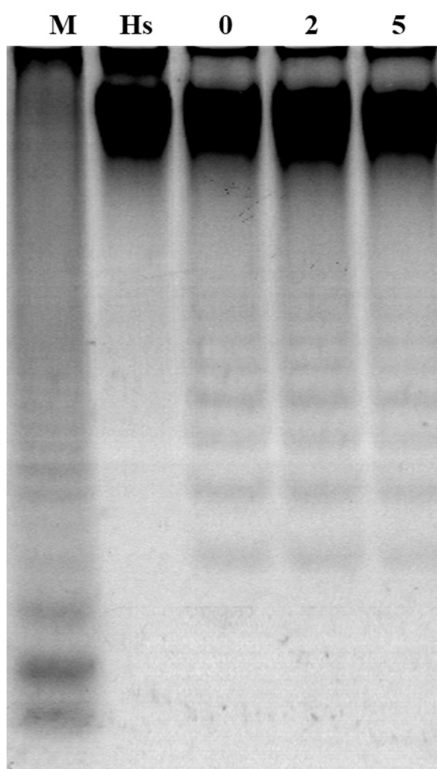
Cation kim loại đóng vai trò quan trọng trong việc ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, bởi chúng tham gia vào nhiều khía cạnh của chức năng enzyme. Đầu tiên, nhiều cation kim loại hoạt động như các cofactor cần thiết, hỗ trợ enzyme trong việc thực hiện các phản ứng hóa học. Các ion như Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} và Ca^{2+} thường tham gia vào việc ổn định cấu trúc của enzyme hoặc trực tiếp tham gia vào cơ chế xúc tác, tạo điều kiện thuận lợi cho sự liên kết với cơ chất hoặc sự hình thành trạng thái chuyển tiếp trong phản ứng. Ngoài ra các cation này có thể tác động lên cấu trúc bậc ba và bậc bốn của enzyme, giúp định hình vùng trung tâm hoạt động hoặc điều chỉnh hoạt tính enzyme thông qua các thay đổi cấu trúc nhỏ [82].

Đối với enzyme fucoidanase, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự hiện diện của một số cation kim loại cụ thể có thể tăng cường hoặc ức chế hoạt tính của enzyme này. Ví dụ, cation như Mg^{2+} hoặc Ca^{2+} thường liên quan đến việc ổn định cấu trúc enzyme, trong khi các cation khác, như Cu^{2+} có thể gây biến tính hoặc làm suy giảm hoạt tính enzyme do tương tác bất lợi với cấu trúc protein. Các ion kim loại cũng có thể điều chỉnh mức độ hoạt động của fucoidanase bằng cách ảnh hưởng đến sự liên kết với cơ chất hoặc sự phân cắt các liên kết glycosidic trong phân tử fucoidan [14].

Nhiều nghiên cứu cho thấy, hoạt tính phần lớn các fucoidanase phụ

thuộc vào sự có mặt của canxi nồng độ Ca^{2+} thích hợp thường nằm trong khoảng từ 1 mM đến 10 mM. Một số enzyme fucoidanase yêu cầu khoảng 5 mM canxi để đạt hoạt tính tối ưu [49]. Điều thú vị là trong tất cả các ion kim loại được nghiên cứu, Ca^{2+} là ion duy nhất không gây bất hoạt cho tất cả các fucoidanase được khảo sát. Kết quả này có thể được lý giải bởi sau đó, vị trí liên kết với ion Ca^{2+} được tìm thấy trong hàng loạt trung tâm hoạt động của các fucoidanase như MfFcnA, P5AFcnA [60], FFA1 [83], FFA2 [84], FWf1-4 [78] và Fhf2 [53].

Trong các thí nghiệm, phản ứng thủy phân của fucoidanase F3 trên cơ chất PS từ *H. spinifera* được thực hiện ở các nồng độ Ca^{2+} khác nhau (0, 2, và 5 mM) nhằm xác định mức độ ảnh hưởng của ion này đến hiệu quả của enzyme.



Hình 3.8. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các nồng độ canxi khác nhau

Trong đó: (Hs): cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera*, (M): thang chuẩn oligo-fucoidan; (0, 2, 5): nồng độ CaCl_2 tính bằng mM.

Kết quả từ **Hình 3.8** cho thấy, không có sự khác nhau của sản phẩm tạo

thành trong dịch phản ứng ở các nồng độ CaCl_2 , kể cả trường hợp không bổ sung CaCl_2 . Như vậy có thể thấy hoạt tính của fucoidanase F3 không phụ thuộc vào sự có mặt của Ca^{2+} trong phản ứng. So với các fucoidanase đã được công bố, một số enzyme có yêu cầu Ca^{2+} để duy trì hoạt tính cao nhất, như các fucoidanase từ rong biển hoặc một số enzyme thủy phân polysaccharide khác, vốn cần từ 1 đến 10 mM Ca^{2+} để tối ưu hóa hiệu quả xúc tác. Khả năng hoạt động của fucoidanase F3 mà không cần Ca^{2+} mang lại một số lợi ích lớn cho các ứng dụng công nghiệp, vì điều này giúp đơn giản hóa điều kiện phản ứng, giảm chi phí cho việc điều chỉnh nồng độ ion kim loại, đồng thời giúp hạn chế ảnh hưởng của Ca^{2+} lên các tính chất khác của sản phẩm cuối cùng.

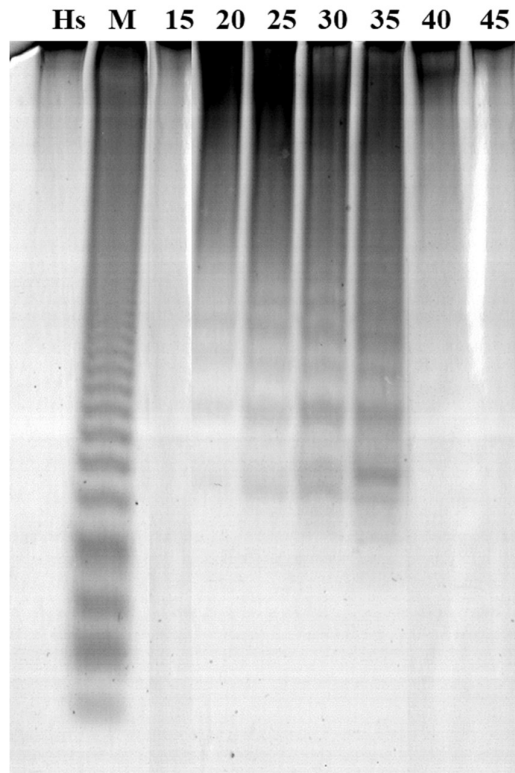
Bên cạnh đó, fucoidanase F3 có thể đạt hoạt tính cao mà không cần đến Ca^{2+} , điều này cho thấy cấu trúc enzyme của F3 có thể đã được tối ưu hóa tự nhiên để duy trì độ bền cấu trúc và hiệu quả xúc tác mà không cần cofactor. Điều này có thể do các liên kết nội phân tử mạnh mẽ hoặc cấu trúc vùng hoạt động được hình thành ổn định, không phụ thuộc vào sự liên kết với ion kim loại như Ca^{2+} . Khả năng không phụ thuộc này giúp F3 thích nghi tốt trong các điều kiện phản ứng biến đổi, tăng khả năng ứng dụng của enzyme này trong sản xuất mà không cần đến các yêu cầu khắt khe về thành phần ion kim loại.

Việc không phụ thuộc vào Ca^{2+} không chỉ giúp tiết kiệm chi phí mà còn giảm thiểu các ảnh hưởng không mong muốn của ion kim loại lên các đặc tính sinh học của sản phẩm cuối cùng, đặc biệt trong các ứng dụng y sinh đòi hỏi độ tinh sạch cao. Từ kết quả này, quy trình thủy phân PS từ *H. spinifera* bằng fucoidanase F3 có thể tối ưu mà không cần bổ sung Ca^{2+} , giúp giảm thiểu bước xử lý ion kim loại trong các công đoạn sản xuất, phù hợp với tiêu chí thân thiện với môi trường và tiết kiệm chi phí. Ngoài ra, cơ chế không phụ thuộc vào Ca^{2+} của F3 cũng tạo điều kiện thuận lợi cho việc ứng dụng enzyme trong các hệ thống phản ứng khác, nơi sự có mặt của Ca^{2+} có thể gây ảnh hưởng không mong muốn đến các thành phần khác của hệ thống.

Từ kết quả nghiên cứu, cho thấy đối với phản ứng xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera* của fucoidanase tái tổ hợp F3 không cần sự có mặt của Ca^{2+} , nên chúng tôi sẽ không bổ sung CaCl_2 trong các phản ứng ở các thí nghiệm tiếp theo.

3.3.3. Nhiệt độ phản ứng thích hợp

Nhiệt độ ảnh hưởng mạnh mẽ đến hoạt tính của fucoidanase, cũng như nhiều loại enzyme khác. Ở nhiệt độ thấp, hoạt tính fucoidanase thường bị hạn chế do sự suy giảm chuyển động phân tử, khiến cho các tương tác giữa enzyme và cơ chất ít hiệu quả hơn. Ngược lại, khi nhiệt độ tăng lên, tốc độ phản ứng tăng theo do các phân tử di chuyển nhanh hơn và tăng cường khả năng tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Sự gia tăng nhiệt độ có thể thúc đẩy tốc độ phản ứng enzyme lên đến một mức nhiệt độ tối ưu, nhưng nếu vượt quá ngưỡng này, hoạt tính enzyme có thể giảm do mất ổn định cấu trúc protein và hiện tượng biến tính. Trong nghiên cứu này, để đánh giá tác động của nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme và xác định nhiệt độ tối ưu cho fucoidanase F3, phản ứng enzyme và cơ chất từ hải sâm *H. spinifera* được ủ ở các nhiệt độ khác nhau (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45°C). Kết quả phân tích sản phẩm thủy phân được trình bày trong **Hình 3.9**.



Hình 3.9. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các nhiệt độ phản ứng khác nhau

Trong đó: (Hs): cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera*, (M): thang chuẩn oligofucoidan; (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45): nhiệt độ phản ứng tính bằng °C.

Ở nhiệt độ phản ứng là 15°C fucoidanase F3 không cho thấy sự hoạt động hoặc hoạt động rất yếu nên không thể phát hiện sản phẩm tạo thành trên gel C-PAGE. Hoạt tính của fucoidanase F3 tăng dần trong khoảng nhiệt độ từ 20°C và đạt mức cao nhất ở 35°C, khi các sản phẩm trọng lượng phân tử thấp xuất hiện rõ nét và tập trung. Hoạt tính F3 gần như mất hoàn toàn ở 40°C và 45°C (**Hình 3.9**).

Hoạt động của fucoidanase được biết là rất nhạy cảm với nhiệt độ, và cả nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng đến khả năng xúc tác của enzyme [49]. Hầu hết các fucoidanase được nghiên cứu đến nay cho thấy hoạt động tối ưu trong khoảng từ 25 đến 30°C, như FFA1 [83], FFA2 [84], FWf1 [78] và MEF2 [66]. Nhưng có một số enzyme vẫn giữ hoạt tính ở mức cao hơn, chẳng hạn như fucoidanase tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn biển *Formosa haliotis* (Fhf2), hoạt tính tối ưu ở 35°C và vẫn duy trì hoạt động ở nhiệt độ cao, lên đến 45°C. Điều này khiến Fhf2 trở thành một trong những fucoidanase có khả năng chịu nhiệt tốt nhất. Ngoài ra, enzyme này có độ bền nhiệt cao, giữ được hoạt tính sau khi ủ ở 37°C, 40°C, và 45°C trong các khoảng thời gian khác nhau, từ 4 giờ đến 5 phút [53].

Hoạt tính tối ưu của fucoidanase F3 tại 35°C có thể liên quan đến cấu trúc không gian của enzyme, trong đó các liên kết hydro và các tương tác ion trong cấu trúc bậc ba của enzyme được ổn định ở nhiệt độ này. Nhiệt độ tối ưu giúp enzyme duy trì cấu trúc hoạt động và đảm bảo các vùng hoạt động có khả năng tương tác hiệu quả với cơ chất. Ngoài ra, các enzyme fucoidanase từ vi khuẩn biển như F3 thường có cấu trúc bền hơn so với các enzyme từ các nguồn khác, cho phép chúng hoạt động ổn định trong môi trường có biến động nhiệt độ, điều này lý giải cho sự gia tăng hoạt tính của F3 khi nhiệt độ tăng lên đến ngưỡng 35°C.

Khi nhiệt độ vượt quá 35°C, hoạt tính của fucoidanase F3 bắt đầu suy giảm rõ rệt, đặc biệt ở 40°C và 45°C, enzyme gần như mất hoàn toàn hoạt tính. Sự suy giảm này có thể được giải thích bởi hiện tượng biến tính nhiệt, trong đó các liên kết yếu trong cấu trúc không gian của enzyme (liên kết hydro, tương tác Van der Waals) bị phá vỡ khi nhiệt độ tăng cao. Quá trình này làm thay đổi cấu trúc bậc ba của enzyme, dẫn đến mất cấu trúc vùng hoạt động và không còn khả năng xúc tác. Sự nhạy cảm với nhiệt độ của F3 cho

thấy rằng enzyme này không bền vững ở nhiệt độ cao và 35°C là nhiệt độ tối ưu nhất để duy trì hoạt tính cũng như cấu trúc bền vững.

Nhiệt độ phản ứng thích hợp ở 35°C của F3 không chỉ đảm bảo tối ưu hóa hoạt tính enzyme mà còn giúp bảo toàn các đặc tính sinh học của sản phẩm tạo thành. Ở nhiệt độ tối ưu này, quá trình thủy phân PS diễn ra hiệu quả và nhanh chóng, tạo ra các oligo-fucoidan với đặc tính sinh học mong muốn. Trong quy trình công nghiệp, việc xác định nhiệt độ tối ưu này giúp tiết kiệm năng lượng, vì không cần phải duy trì hệ thống ở nhiệt độ cao, đồng thời giảm thiểu nguy cơ enzyme mất hoạt tính do nhiệt. Điều này cũng góp phần bảo vệ cấu trúc sản phẩm cuối cùng, giúp duy trì hoạt tính sinh học của các oligo-fucoidan cho các ứng dụng trong y học và dược phẩm.

Việc xác định nhiệt độ tối ưu cho F3 ở mức 35°C cho phép linh hoạt trong việc điều chỉnh nhiệt độ cho các ứng dụng cụ thể, chẳng hạn trong các phản ứng liên tục hoặc phản ứng được thiết kế cho môi trường không ổn định về nhiệt độ. Đặc biệt, trong các ứng dụng cần sản phẩm có độ tinh sạch cao hoặc yêu cầu bảo toàn đặc tính sinh học, nhiệt độ phản ứng tối ưu ở 35°C giúp giảm thiểu tối đa tác động của nhiệt đến sản phẩm, nâng cao hiệu quả thủy phân mà vẫn đảm bảo chất lượng của các oligo-fucoidan.

Nhìn chung, các fucoidanase tái tổ hợp có xu hướng hoạt động tối ưu trong khoảng 30°C đến 40°C, mức nhiệt cao hơn so với các fucoidanase tự nhiên đã được nghiên cứu trước đây. Vì mức độ ổn định nhiệt của enzyme có thể được cải thiện thông qua kỹ thuật tái tổ hợp hoặc biến đổi gene để phù hợp với các ứng dụng cụ thể, chẳng hạn như trong các điều kiện môi trường hoặc quy trình công nghiệp đòi hỏi nhiệt độ cao hơn.

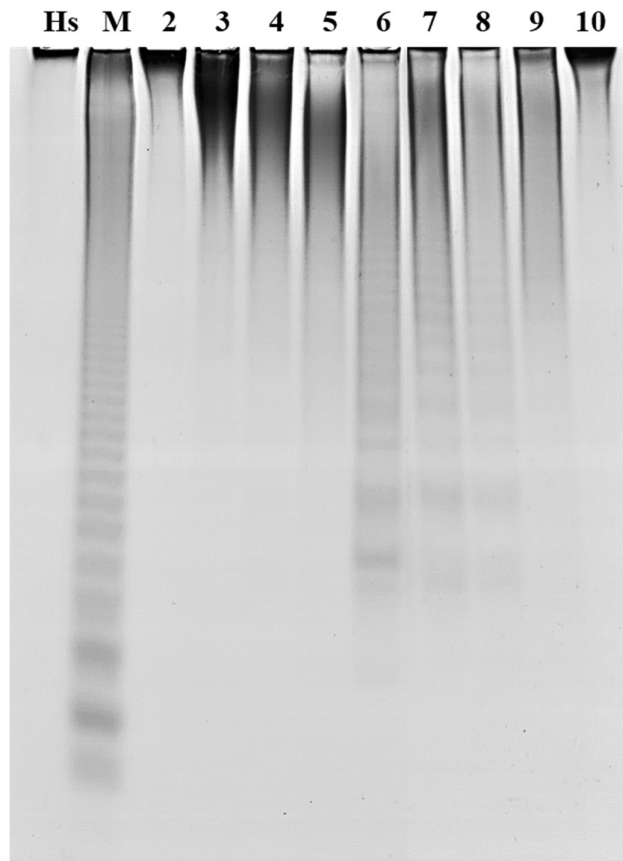
3.3.4. pH phản ứng thích hợp

pH là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme, mỗi enzyme có một khoảng pH tối ưu giúp cấu trúc giữ trạng thái ổn định nhất và tối đa hóa hoạt tính xúc tác. Nếu pH nằm ngoài khoảng tối ưu, enzyme có thể bị biến tính hoặc thay đổi hình dạng, làm suy giảm hoặc mất hoạt tính do sự phá vỡ các liên kết ion và hydro trong cấu trúc của nó.

Đối với enzyme fucoidanase, pH cũng ảnh hưởng mạnh mẽ đến quá trình thủy phân fucoidan. Các nghiên cứu cho thấy fucoidanase thường có hoạt tính

cao nhất ở môi trường trung tính hoặc kiềm nhẹ (pH 6-8), tùy thuộc vào nguồn gốc của enzyme. Nếu pH giảm quá thấp hoặc tăng quá cao, fucoidanase dễ bị biến tính và không còn khả năng xúc tác hiệu quả.

Trong nghiên cứu này, để đánh giá tác động của pH lên hoạt tính của enzyme và xác định pH tối ưu cho fucoidanase F3, phản ứng enzyme và cơ chất từ hải sâm Hs được thực hiện ở các pH khác nhau (từ 2 đến 10). Kết quả phân tích sản phẩm thủy phân được trình bày trong **Hình 3.10**.



Hình 3.10. Dịch thủy phân PS Hs của fucoidanase tái tổ hợp F3 với các mức pH phản ứng khác nhau

Trong đó: (Hs): cơ chất PS từ hải sâm *H. spinifera*, (M): thang chuẩn oligofucoidan; (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10): pH phản ứng.

Fucoidanase F3 có khả năng hoạt động trong khoảng pH từ 6 đến 8, trong đó hoạt tính đạt tối ưu ở pH 6, giảm nhẹ ở pH 7 và pH 8, ở pH 9 khả năng thủy phân của F3 cho thấy sự giảm sút đáng kể và mất hoàn toàn hoạt tính ở pH 10, tương tự ở vùng kiềm mạnh (pH 2-5) F3 cũng không thể hiện hoạt tính (**Hình 3.10**).

Hoạt tính tối ưu của fucoidanase F3 ở pH 6 cho thấy cấu trúc không gian ba chiều của enzyme, đặc biệt là vùng hoạt động, được ổn định nhất trong môi trường axit yếu. Ở pH tối ưu này, các liên kết ion và hydro trong cấu trúc bậc ba và bậc bốn của enzyme được duy trì tốt nhất, đảm bảo các gốc axit amin tại vùng hoạt động có thể tương tác hiệu quả với cơ chất. Khi pH nằm ngoài khoảng tối ưu, các ion H^+ hoặc OH^- có thể phá vỡ các liên kết yếu này, gây ra sự thay đổi trong cấu trúc enzyme và làm giảm khả năng xúc tác.

Một số fucoidanase khác được công bố là có vùng pH tối ưu hẹp hơn chỉ trong khoảng pH 8-9 như các fucoidanase Fhf1, Fhf2 và MEF2 [46,20,47]; hay fucoidanase FWf2 hoạt động tốt ở môi trường axit nhẹ nhưng chỉ trong khoảng pH 6-6,8 [7]. Điều này có thể là do tính chất của cơ chất fucoidan, vốn ổn định hơn trong môi trường pH trung tính đến axit yếu. Mức pH axit yếu không chỉ giúp ổn định cấu trúc enzyme mà còn có thể làm tăng hiệu quả phân cắt liên kết fucose trong PS từ *H. spinifera*, tạo điều kiện thuận lợi để sản phẩm có hoạt tính sinh học cao. Khi pH phản ứng chuyển sang môi trường quá kiềm (pH 9-10) hoặc quá axit (pH 2-5), hoạt tính của fucoidanase F3 giảm mạnh và gần như không còn hoạt tính. Hiện tượng này có thể được giải thích do các thay đổi trong cân bằng ion, phá vỡ các liên kết nội phân tử và làm biến tính enzyme, khiến các nhóm chức năng trong vùng hoạt động không còn ở trạng thái tối ưu để xúc tác phản ứng. Cấu trúc enzyme có thể bị mất ổn định, dẫn đến sự suy giảm hoặc mất hoàn toàn hoạt tính xúc tác.

Xác định pH tối ưu ở mức 6 cho fucoidanase F3 mang lại nhiều lợi ích trong sản xuất công nghiệp. Duy trì pH ở vùng axit yếu gần trung tính giúp kéo dài tuổi thọ enzyme, tăng hiệu suất và giảm chi phí điều chỉnh pH trong các phản ứng quy mô lớn. Môi trường này cũng ít ảnh hưởng tiêu cực đến sản phẩm, đặc biệt khi yêu cầu độ tinh khiết và hoạt tính sinh học ổn định. Với hoạt tính cao nhất ở pH 6 và khả năng duy trì ở pH 7 và 8, F3 có thể được ứng dụng hiệu quả trong các hệ thống có biến động nhẹ về pH, giúp giảm thiểu rủi ro giảm hoạt tính và tăng hiệu quả sản xuất oligo-fucoidan có đặc tính sinh học cao.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã biểu hiện, thu nhận và tinh sạch thành công 5 fucoidanase tái tổ hợp (F1, F2, F3, F4, F5) với độ tinh sạch cao và có hoạt tính thủy phân cơ chất đặc hiệu tương ứng

Trong đó, 03 fucoidanase F3, F4, và F5 có hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm *H. spinifera*, tạo oligosaccharide có trọng lượng phân tử thấp.

Đã xác định được điều kiện phản ứng thích hợp cho hoạt động xúc tác của fucoidanase F3 khi thủy phân cơ chất sulfated polysaccharide từ hải sâm *H. spinifera* gồm: thời gian phản ứng 15 phút, nhiệt độ phản ứng 35°C và pH 6.

KIẾN NGHỊ

Xác định sự ảnh hưởng của các yếu tố như nồng độ muối, ion kim loại và loại đệm... đến hoạt tính xúc tác của fucoidanase F3 trên cơ chất PS từ *H. spinifera* nhằm thu nhận tối đa sản phẩm trọng lượng phân tử thấp.

Tiếp tục thực hiện nghiên cứu đặc tính xúc tác của 02 fucoidanase F4 và F5, nhằm tìm kiếm các enzyme có khả năng thủy phân cơ chất PS hiệu quả và tạo ra sản phẩm đa dạng về cấu trúc cũng như hoạt tính sinh học.

Nghiên cứu cũng đề xuất mở rộng phân tích cấu trúc hóa học và hoạt tính sinh học của sản phẩm, nhằm tăng cường ứng dụng hợp chất từ sinh vật biển trong y dược.

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, Trần Thanh Hiếu , Lê Nhã Uyên, Phạm Đức Thịnh, Huỳnh Hoàng Như Khánh	Phân tích trình tự fucoidanase tiềm năng có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn biển <i>Pseudomonas</i> sp. S3178 bằng phần mềm tin sinh học	Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học - Tập 30, số 2A/2024)	2024

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Thi Thuy Hang, Vo Mai Nhu Hieu, Phan Thi Hoai Trinh, Thanh Thi Thu Thuy, Quach Thi Minh Thu, Tran Nguyen Ha Vy, Nguyen Thi Thuan, Tran Thi Thanh Van, 2023, Structural Characteristics and Antioxidant Activities of Polysaccharide Extracted from *Ulva fasciata* Green Seaweed, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology*, 39(1), pp. 2588-1140, DOI: <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5360>.
2. M. I. Bilan, A. S. Dmitrenok, S. P. Nikogosova, E. A. Tsvetkova, N. E. Ustyuzhanina, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Dinh Thanh Trung, Tran Thi Thanh Van, A. I. Usov, N. E. Nifantiev, 2023, The Structure of Sulfated Polysaccharides from the Sea Cucumber *Holothuria (Stauropora) fuscocinerea*, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 49(4), pp. 758-767.
3. Abul Hossain, Deepika Dave, Fereidoon Shahidi, 2023, Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, pp.127329.
4. Pham Duc Thinh, Bui Minh Ly, Roza V. Usoltseva, Natalia M. Shevchenko, Anton B. Rasin, Stanislav D. Anastyuk, Olesya S. Malyarenko, Tatiana N. Zvyagintseva, Pham Trung San, Svetlana P. Ermakova, 2018, A Novel Sulfated Fucan from Vietnamese Sea Cucumber *Stichopus Variegatus*: Isolation, Structure and Anticancer Activity in Vitro, *Int J Biol Macromol*, 117, pp.1101–1109, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.017.
5. Nadezhda E. Ustyuzhanina, Maria I. Bilan, Andrey S. Dmitrenok, Eugenia A. Tsvetkova, Sofya P. Nikogosova, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Dinh Thanh Trung, Tran Thi Thanh Van, Alexander S.

- Shashkov, Anatolii I. Usov, Nikolay E. Nifantiev, 2022, Fucose-rich sulfated polysaccharides from two Vietnamese sea cucumbers *Bohadschia argus* and *Holothuria (Theelothuria) spinifera*: Structures and anticoagulant activity, *Marine Drugs*, 20(6), pp. 380.
6. Makoto Hasegawa, Akira Isogai, Fumihiko Onabe, 1993, Preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid, *Carbohydrate Polymers*, 20(4), pp.279-283.
 7. A.V Ilyina, V.E Tikhonov, A.I Albulov, V.P Varlamov, 2000, Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan, *Process Biochemistry*, 35(6), pp.563-568.
 8. Nian Wu , Xingqian Ye , Xin Guo, Ningbo Liao, Xinzi Yin, Yaqin Hu, Yujing Sun, Donghong Liu, Shiguo Chen, 2013, Depolymerization of fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber, *Pearsonothuria graeffei*, via 60 Co irradiation, *Carbohydrate polymers*, 93(2), pp.604-614.
 9. Anders Karlsson, Satish K. Singh, 1999, Acid hydrolysis of sulphated polysaccharides. Desulphation and the effect on molecular mass, *Carbohydrate Polymers*, 38(1), pp.7-15.
 10. 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.
 11. Rong Lan, Ye Li, Rong Shen, Ran Yu, Lihua Jing, Shuangsheng Guo, 2020, Preparation of low-molecular-weight chondroitin sulfates by complex enzyme hydrolysis and their antioxidant activities, *Carbohydrate polymers*, 241, pp.116302.

12. Jesus Valcarcel, Míriam R. García, Lucía F. Sampayo, José Antonio Vázquez, 2020, Marine chondroitin sulfate of defined molecular weight by enzymatic depolymerization, *Carbohydrate polymers*, 229, pp.115450.
13. Julia Ohmes, Yuejun Xiao, Fanlu Wang, Maria Dalgaard Mikkelsen, Thuan Thi Nguyen, Harald Schmidt, Andreas Seekamp, Anne S Meyer, Sabine Fuchs, 2020, Effect of enzymatically extracted fucoidans on angiogenesis and osteogenesis in primary cell culture systems mimicking bone tissue environment, *Mar. Drugs*, 18(9), pp. 1–18.
14. Noora Barzkar, Vilai Rungsardthong, Saeid Tamadoni Jahromi, Qandeel Laraib, Rakesh Das, Olga Babich, Stanislav Sukhikh, 2023, A recent update on fucoidonase: source, Isolation methods and its enzymatic activity, *Frontiers*, 10, <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1129982>.
15. Nguyen Phuong Thao , Nguyen Xuan Cuong, Bui Thi Thuy Luyen, Nguyen Hoai Nam, Pham Van Cuong, Nguyen Van Thanh, Nguyen Xuan Nhiem, Tran Thi Hong Hanh, Eun-Ji Kim, Hee-Kyoung Kang, Phan Van Kiem, Chau Van Minh, Young Ho Kim, 2013, Steroidal Constituents from the Starfish *Astropecten Polyacanthus* and Their Anticancer Effects, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 61(10), pp.1044–1051. doi: 10.1248/cpb.c13-00490.
16. N. Thao, N. X. Cuong, B. Luyen, N. H. Nam, P. Cuong, N. Thanh, N. X. Nhiem, T. H. Hanh, Eun-ji Kim, Hee-kyoung Kang, P. Kiem, C. Minh, Y. Kim, 2014, Steroidal Constituents from the Starfish *Astropecten Polyacanthus* and Their Anticancer Effects, *Biol Pharm Bull*, 37, pp. 315–321, doi: 10.1248/bpb.b13-00705.
17. N. Ustyuzhanina, M. Bilan, N. Nifantiev and A. Usov, 2019, New Insight on the Structural Diversity of Holothurian Fucosylated Chondroitin Sulfates, *Pure and Applied Chemistry*, 91, doi:10.1515/pac-2018-1211.
18. H. Xu, Q. Zhou, B. Liu, F. Chen and M. Wang, 2022, Holothurian

- Fucosylated Chondroitin Sulfates and Their Potential Benefits for Human Health: Structures and Biological Activities, *Carbohydrate Polymers*, 275, pp.118691, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2021.118691.
19. P. Gong, Q. Li, Y. Wu, W. Lu, J. Zeng and H. Li, 2021, Structural Elucidation and Antidiabetic Activity of Fucosylated Chondroitin Sulfate from Sea Cucumber *Stichopus Japonicas*, *Carbohydrate Polymers*, 262, pp.117969, doi:10.1016/J.CARBPOL.2021.117969.
20. N. Ustyuzhanina, M. Bilan, A. Dmitrenok, A. Shashkov, M. Kusaykin, V. Stonik, N. Nifantiev and A. Usov, 2016, Structure and Biological Activity of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from the Sea Cucumber *Cucumaria Japonica*, *Glycobiology*, 26, pp.449–459, doi: 10.1093/GLYCOB/CWV119.
21. N. Ustyuzhanina, M. Bilan, A. Dmitrenok, N. Nifantiev and A. Usov, 2017, Two Fucosylated Chondroitin Sulfates from the Sea Cucumber *Eupentacta Fraudatrix*, *Carbohydrate Polymers*, 164, pp. 8–12, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.01.034.
22. G. Santos, A. Porto, P. Soares, E. Vilanova and P. Mourão, 2017, Exploring the Structure of Fucosylated Chondroitin Sulfate through Bottom-up Nuclear Magnetic Resonance and Electrospray Ionization High-Resolution Mass Spectrometry Approaches, *Glycobiology*, 27(7), pp. 625–634, doi: 10.1093/GLYCOB/CWX031.
23. P. Soares, K. Ribeiro, A. Valente, N. V. CapillCrossed D'Sign, S. Oliveira, A. Tovar, M. Pereira, E. Vilanova and P. Mourão, 2018, A unique fucosylated chondroitin sulfate type II with strikingly homogeneous and neatly distributed α -fucose branches, *Glycobiology*, 28(8), pp. 565–579, doi: 10.1093/GLYCOB/CWY048.
24. Ronghua Yin, Lutan Zhou, Na Gao, Lisha Lin, Huifang Sun, Dingyuan Chen, Ying Cai, Zhili Zuo, Kaifeng Hu, Shengxiong Huang, Jikai Liu,

- Jinhua Zhao, 2021, Unveiling the Disaccharide-Branched Glycosaminoglycan and Anticoagulant Potential of Its Derivatives, *Biomacromolecules*, 22(3), pp.1244–1255, doi: 10.1021/acs.biomac.0c01739.
25. Hui Mao, Ying Cai, Shanni Li, Huifang Sun, Lisha Lin, Ying Pan, Wenjiao Yang, Zhicheng He, Ru Chen, Lutan Zhou, Weili Wang, Ronghua Yin, Jinhua Zhao, 2020, A New Fucosylated Glycosaminoglycan Containing Disaccharide Branches from *Acaudina Molpadioides*: Unusual Structure and Anti-Intrinsic Tenase Activity, *Carbohydrate Polymers*, 245, pp.116503, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116503>.
26. Shanni Li, Wei Zhong, Ying Pan, Lisha Lin, Ying Cai, Hui Mao, Taocui Zhang, Sujuan Li, Ru Chen, Lutan Zhou, Weili Wang, Qinghua Cui, Ronghua Yin, Shengxiong Huang, Jinhua Zhao, 2021, Structural Characterization and Anticoagulant Analysis of the Novel Branched Fucosylated Glycosaminoglycan from Sea Cucumber *Holothuria Nobilis*, *Carbohydrate Polymers*, 269, pp.118290, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118290>.
27. N. Ustyuzhanina, M. Bilan, A. Dmitrenok, A. Shashkov, N. Nifantiev and A. Usov, 2017, The Structure of a Fucosylated Chondroitin Sulfate from the Sea Cucumber *Cucumaria Frondosa*, *Carbohydr Polym*, 165, pp.7–12, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.02.003.
28. M. Pereira, B. Mulloy and P. Mourão, 1999, Structure and Anticoagulant Activity of Sulfated Fucans, *Journal of Biological Chemistry*, 274, pp. 7656–7667, doi: 10.1074/jbc.274.12.7656.
29. F. Shang, R. Mou, Z. Zhang, N. Gao, L. Lin, Z. Li, M. Wu and J. Zhao, 2018, Structural analysis and anticoagulant activities of three highly regular fucan sulfates as novel intrinsic factor Xase inhibitors,

Carbohydrate Polymers, 195, pp.257–266, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.04.117.

30. Leticia Olivera-Castillo, George Grant, Nuvia Kantún-Moreno, Hirian A Barrera-Pérez, Jorge Montero, Miguel A Olvera-Novoa, Leydi M Carrillo-Cocom, Juan J Acevedo, Cesar Puerto-Castillo, Victor May Solís, Juan A Pérez-Vega, Judit Gil-Zamorano, Enrique Hernández-Garibay, María A Fernández-Herrera, Mayra Pérez-Tapia, Oscar Medina-Contreras, Jairo R Villanueva-Toledo, Rossanna Rodriguez-Canul, Alberto Dávalos, 2020, A Glycosaminoglycan-Rich Fraction from Sea Cucumber *Isostichopus Badionotus* Has Potent Anti-Inflammatory Properties in Vitro and in Vivo, *Nutrients*, 12(6), pp.1698, doi: 10.3390/nu12061698.
31. L. Yu, L. Ge, C. Xue, Y. Chang, C. Zhang, X. Xu and Y. Wang, 2014, Structural Study of Fucoidan from Sea Cucumber *Acaudina Molpadioides*: A Fucoidan Containing Novel Tetrafucose Repeating Unit, *Food Chem*, 142, pp.142, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.079.
32. L. Yu, C. Xue, Y. Chang, X. Xu, L. Ge, G. Liu and Y. Wang, 2014, Structure Elucidation of Fucoidan Composed of a Novel Tetrafucose Repeating Unit from Sea Cucumber *Thelenota Ananas*, *Food Chem*, 146, pp.113–119, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.033.
33. Y. Cai, W. Yang, R. Yin, L. Zhou, Z. Li, M. Wu and J. Zhao, 2018, An Anticoagulant Fucan Sulfate with Hexasaccharide Repeating Units from the Sea Cucumber *Holothuria Albiventer*, *Carbohydr Res*, 464, pp.12– 18, doi: 10.1016/J.CARRES.2018.05.007.
34. D. Shi, J. Qi, H. Zhang, H. Yang, Y. Yang and X. Zhao, 2019, Comparison of Hydrothermal Depolymerization and Oligosaccharide Profile of Fucoidan and Fucosylated Chondroitin Sulfate from *Holothuria Floridana*, *Int J Biol Macromol*, 132, pp.738–747, doi:

- 10.1016/J.IJBIOMAC.2019.03.127.
35. M. Wu, L. Xu, L. Zhao, C. Xiao, N. Gao, L. Luo, L. Yang, Z. Li, L. Chen and J. Zhao, 2015, Structural Analysis and Anticoagulant Activities of the Novel Sulfated Fucan Possessing a Regular Well-Defined Repeating Unit from Sea Cucumber, *Marine Drugs*, 13, pp. 2063-2084, doi: 10.3390/MD13042063.
36. L. Yu, C. Xue, Y. Chang, Y. Hu, X. Xu, L. Ge and G. Liu, 2015, Structure and Rheological Characteristics of Fucoidan from Sea Cucumber *Apostichopus Japonicus*, *Food Chem*, 180, pp.71–76, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2015.02.034.
37. N. Gao, R. Chen, R. Mou, J. Xiang, K. Zhou, Z. Li and J. Zhao, 2020, Purification, Structural Characterization and Anticoagulant Activities of Four Sulfated Polysaccharides from Sea Cucumber *Holothuria Fuscopunctata*, *Int J Biol Macromol*, 164, pp. 3421–3428, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.08.150.
38. H. Li, Q. Yuan, K. Lv, H. Ma, C. Gao, Y. Liu, S. Zhang and L. Zhao, 2021, Low-Molecular-Weight Fucosylated Glycosaminoglycan and Its Oligosaccharides from Sea Cucumber as Novel Anticoagulants: A Review, *Carbohydrate Polymers*, 251, pp. 117034, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2020.117034.
39. W. Lu, Z. Yang, J. Chen, D. Wang and Y. Zhang, 2021, Recent Advances in Antiviral Activities and Potential Mechanisms of Sulfated Polysaccharides, *Carbohydrate Polymers*, 272, pp.118526 doi: 10.1016/J.CARBPOL.2021.118526.
40. Abirami R. Ganesan, Manoj Saravana Guru, Balamuralikrishnan Balasubramanian, Kannan Mohan, Wen Chao Liu, Mariadhas Valan Arasu, Naif Abdullah Al-Dhabi, Veeramuthu Duraipandiyam, Savarimuthu Ignacimuthu, M.P. Sudhakar, Palaniappan Seedeve, 2020,

- Biopolymer from Edible Marine Invertebrates: A Potential Functional Food, *J King Saud Univ Sci*, 32, pp.1772–1777, doi: 10.1016/j.jksus.2020.01.015.
41. M. Mohan, A. Achary, V. Mani, E. Cicinskas, A. Kalitnik and M. Khotimchenko, 2019, Purification and Characterization of Fucose-Containing Sulphated Polysaccharides from *Sargassum Tenerrimum* and Their Biological Activity, *J Appl Phycol*, pp.1–13, doi:10.1007/s10811-019-01797-7.
42. A. Vasconcelos, I. Sucupira, A. Guedes, I. Queiroz, F. Frattani, R. Fonseca and V. Pomin, 2018, Anticoagulant and Antithrombotic Properties of Three Structurally Correlated Sea Urchin Sulfated Glycans and Their Low-Molecular-Weight Derivatives, *Mar Drugs*, 19, pp.304, doi: 10.3390/md16090304.
43. N. Ustyuzhanina, M. Bilan, A. Dmitrenok, A. Silchenko, B. Grebnev, V. Stonik, N. Nifantiev and A. Usov, 2020, Fucosylated Chondroitin Sulfates from the Sea Cucumbers *Paracaudina Chilensis* and *Holothuria Hilla*: Structures and Anticoagulant Activity, *Marine Drugs*, 18, pp.540, doi: 10.3390/MD18110540.
44. Abul Hossain, Deepika Dave, Fereidoon Shahidi, 2020, Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties, *Marine Drugs*, 18(9), pp.471.
45. Nadezhda E. Ustyuzhanina, Maria I. Bilan, Andrey S. Dmitrenok, Eugenia A. Tsvetkova, Sofya P. Nikogosova, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Dinh Thanh Trung, Tran Thi Thanh Van, Alexander S. Shashkov, Anatolii I. Usov, Nikolay E. Nifantiev, 2020, Structural characteristics and biological activities of fucosylated chondroitin sulfate from *Bohadschia argus*, *Marine Drugs*, 18(10), pp.512, doi: 10.3390/md18100512.

46. Nadezhda E. Ustyuzhanina, Maria I. Bilan, Andrey S. Dmitrenok, Eugenia A. Tsvetkova, Sofya P. Nikogosova, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Dinh Thanh Trung, Tran Thi Thanh Van, Alexander S. Shashkov, Anatolii I. Usov, Nikolay E. Nifantiev, 2021, Fucosylated polysaccharides from *Holothuria spinifera*: Structural characterization and biological properties, *Carbohydrate Polymers*, 253, pp.117177, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117177.
47. T. N. B. Nguyen, N. T. N. Ho, 2019, Characterization of sulfated polysaccharides from *Holothuria edulis* and their potential applications, *Journal of Applied Phycology*, 31(3), pp.1957-1967, DOI: 10.1007/s10811-018-1711-y.
48. Vu V. H, Nguyen Thi, 2019, Applications of sea cucumber-derived polysaccharides in biomedicine, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 17(4), pp. 65-74.
49. Mikhail I Kusaykin, Artem S Silchenko, Alexander M Zakharenko, Tatyana N Zvyagintseva, 2015, Fucoidanases, *Glycobiology*, 26(1), pp.3–12, doi: 10.1093/glycob/cwv072.
50. 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.
51. Sébastien Colin, Estelle Deniaud, Murielle Jam, Valérie Descamps, Yann Chevolut, 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.

52. Jingjing Shen, Yaoguang Chang, Yuying Zhang, Xuanwei Mei, Changhu Xue, 2020, Discovery and Characterization of an Endo-1,3- Fucanase From Marine Bacterium *Wenylingzhuangia fucanilytica*: A Novel Glycoside Hydrolase Family, *Front. Microbiol*, 11(7), pp.1–11.
53. Vo Thi Dieu Trang, Maria Dalgaard Mikkelsen, Marlene Vuillemin, Sebastian Meier, Hang Thi Thuy Cao, Jan Muschiol, 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, *Front. Plant Sci*, 13, doi: 10.3389/fpls.2022.823668.
54. 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*, *Mar. Drugs*, 18(11), pp.562.
55. Natalie M. Thanassi, Henry 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.
56. Ken Sasaki, Takeshi Sakai, Kaoru Kojima, Shinji Nakayama, Yoshikuni Nakanishi, Ikunoshin Kato, 1966, Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2- sulfo- α -l- fucopyranose from 2-sulfo- α -l- 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.
57. 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, *Mikrobiologïia*, 69(3), pp. 370–

- 376, doi: 10.1007/BF02756738.
58. Shin-ichi Furukawa, Tatsuo Fujikawa, Daizo Koga, Akio 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.
59. Takeshi Sakai, Takashi Kawai, Ikunoshin 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.
60. 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.
61. Kit-Leong Cheong, Saiyi Zhong, Suresh Veeraperumal, Min Wang, 2021, Fucoidanase-mediated preparation of low-molecular-weight fucoidan and its bioactivities: A review, *Carbohydrate Polymers*, 256, pp.117526.
62. Y. K. Kim, L. S. Kim, 2022, Biodegradation of fucoidan by marine bacteria and its potential application in cancer therapy, *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, pp.3443-3451.
63. N. L. X. & W. Y. Li, 2021, Advances in the development and application of fucoidanase, *Carbohydrate Polymers*, 255, pp.117379.
64. X. Y. Hu, X. Y. Zhu, 2019, Potential applications of low molecular weight fucoidan: A review, *Carbohydrate Research*, 484, pp.107743.
65. Maria Dalgaard Mikkelsen, Vy Ha Nguyen Tran, Sebastian Meier, Thuan Thi Nguyen, Jesper Holck, Hang Thi Thuy Cao, Tran Thi Thanh Van, Pham Duc Thinh, Anne S Meyer, Jens Preben Morth, 2023, Structural and

- functional characterization of the novel endo- $\alpha(1,4)$ - fucoidanase Mef1 from the marine bacterium *Muricauda eckloniae*, *Structural Biology*, 79, pp.1026-1043, <https://doi.org/10.1107/S2059798323008732>.
66. 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- $\alpha(1,3)$ -Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans, *Marine Drugs*, 20(5), pp.305, doi: 10.3390/md20050305.
67. 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, *Mar Drugs*, 16(11), pp.422, doi: 10.3390/md16110422.
68. V. T. D. Trang, M. D. Mikkelsen, M. Vuillemin, S. Meier, H. T. T. Cao, and H. H. N. K. and A. S. M. Jan Muschiol, Valentina Perna, Thuan Thi Nguyen, Tran Nguyen Ha Vy, Jesper Holck, Tran Thi Thanh Van, 2022, The endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -L fucoidanase Fhf2 from *Formosa haliotis* releases highly sulfated fucoidan oligosaccharides, *Front. plan Sci.*, 3, pp.823668, doi: 10.3389/fpls.2022.823668.
69. Marcel Tutor Ale, Jorn D. Mikkelsen and Anne S. Meyer, 2011, Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds, *Mar. Drugs*, 9(10), pp. 2106–2130, <https://doi.org/10.3390/md9102106>.
70. S. H. Wang, C. Y. Huang, C. Y. Chen, C. C. Chang, C. Y. Huang, C. D. Dong, J. S. Chang, 2020, Structure and Biological Activity Analysis of Fucoidan Isolated from *Sargassum siliquosum*, *ACS Omega*, 5(50), pp.

32447–32455, doi: 10.1021/acsomega.0c04591.

71. By BNO Team, 2024, Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), *Biology Notes Online*.
72. 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*, *Mar. Drugs*, 11(7), pp. 2413–2430, doi: 10.3390/md11072413.
73. J. Fitton, 2011, Therapeutic potential of fucoidan from brown seaweed for disease prevention, *Marine Drugs*, 9(10), pp.1731-1760.
74. Abul Hossain, Deepika Dave, Fereidoon Shahidi, 2022, Sulfated polysaccharides in sea cucumbers and their biological properties, *Marine Drugs*, 20(5), pp. 299.
75. Mikhail I. Kusaykin, Artem S. Silchenko, Alexander M. Zakharenko, Tatyana N. Zvyagintseva, 2015, Fucoidanases, *Glycobiology*, 26(1), pp. 3–12, doi: 10.1093/glycob/cwv072.
76. J. H. Waterborg, 2009, The Lowry Method for Protein Quantitation, *The Protein Protocols Handbook*, pp.7-10.
77. U. K. Laemmli, 1970, Determination of protein concentration, *Nature*, 227, pp.680–685.
78. A. O. Zueva, A. S. Silchenko, A. B. Rasin, M. I. Kusaykin, R. V. Usoltseva, A. I. Kalinovskiy, 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 *Wenyngzhuanzia fucanilytica* CZ1127T, *Int. J. Biol. Macromol*, 164, pp.3025–3037, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.131.
79. Yaqin Hu, Shan Li, Junhui Li, Xingqian Ye, Tian Ding, Donghong Liu, Jianchu Chen, Zhiwei Ge, Shiguo Chen, 2015, Identification of a highly

- sulfated fucoidan from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* with well-repeated tetrasaccharides units, *Carbohydrate Polymers*, 134, pp.808–816, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.088.
80. Varsha Kale, Jona Freysdottir, Berit S. Paulsen, Ólafur H. Friðjónsson, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Sesselja Omarsdottir, 2013, Sulphated polysaccharide from the sea cucumber *Cucumaria frondosa* affect maturation of human dendritic cells and their activation of allogeneic CD4(+) T cells in vitro, *Bioact. Carbohydrates Diet. Fibre*, 2(2), pp.108–117, doi: 10.1016/j.bcdf.2013.09.009.
81. Guangling Jiao, Guangli Yu, Junzeng Zhang, H. Stephen Ewart, 2019, Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae, *Mar. Drugs*, 9(4), pp. 1–14, doi: 10.1007/s10811-018-1651-7.
82. D. Auld, 2001, Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites, *Biometals*, 14, pp. 271-313, <https://doi.org/10.1023/A:1012976615056>.
83. 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.
84. 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.

PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ FUCOIDANASE TIỀM NĂNG CÓ NGUỒN GỐC TỪ CHỦNG VI KHUẨN BIỂN *Pseudomonas* sp. S3178 BẰNG PHẦN MỀM TIN SINH HỌC

Đến toà soạn 15-05-2024

Võ Thị Diệu Trang¹, Cao Thị Thúy Hằng¹, Trần Thanh Hiếu², Lê Nhã Uyên³,
Phạm Đức Thịnh¹, Huỳnh Hoàng Như Khánh^{1*}

¹ Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Đại học Nha Trang

*Email: khanhhuynh@nitra.vast.vn

SUMMARY

ANALYSIS OF POTENTIAL FUCOIDANASE SEQUENCES FROM THE MARINE BACTERIA *Pseudomonas* sp. S3178 WITH BIOINFORMATICS SOFTWARE

*Fucoidanase are enzymes that catalyze the conversion of fucoidan into short-chain oligosaccharides through hydrolysis of sugar bonds between fucose or sulfate fucose residues, helping to prepare fucoidan oligosaccharides with high biological activity and clear structure. The use of bioinformatics software to search and identify potential fucoidanase sequences is an important research step to help improve efficiency and save costs in recombinant fucoidanase research. In this paper, we analyze and compare the protein sequence (PF1) originating from the marine bacterium *Pseudomonas* sp. S3178 with fucoidanase sequences has been published on National Center for Biotechnology Information (NCBI) using bioinformatics software. Analysis results show that PF1 is a protein of 402 amino acids, containing a 22 amino acid signal peptide domain and a 380-amino-acid D1 functional domain typical of fucoidanase. In the D1 domain of PF1, two amino acid residues D203 and H278 have been identified that are responsible for catalysis and four amino acid residues Y142, N144, S231 and T327 belong to the active center of this enzyme. Phylogenetic tree analysis showed that the PF1 sequence belongs to $\alpha(1\rightarrow3)$ fucoidanase group. These results are the scientific basis and premise for further research to create high-performance, highly active recombinant fucoidanase.*

Keywords: fucoidanase, *Pseudomonas* sp. S3178, recombinant, bioinformatics tools

1. GIỚI THIỆU

Fucoidan là một trong những sulfate polysaccharide có hoạt tính sinh học đa dạng, đáng quý và có giá trị ứng dụng cao trong lĩnh vực y dược có nguồn gốc từ

rong Nâu [1]. Tuy nhiên, vì cấu trúc hóa học phức tạp, trọng lượng phân tử lớn, và độ nhớt cao nên các sản phẩm fucoidan trên thị trường hiện nay, chủ yếu liên quan đến các sản phẩm dinh dưỡng, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm. Chính vì vậy, các

enzyme chuyển hóa fucoidan trong đó có fucoidanase đang nhận được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Fucoidanase (EC 3.2.1.-) là các enzyme xúc tác thủy phân liên kết đường giữa các gốc fucose hoặc sulfated fucose trong mạch chính của phân tử fucoidan. Dựa vào khả năng xúc tác thủy phân liên kết đường ở các vị trí carbon khác nhau giữa các gốc fucose hoặc sulfated fucose trong mạch chính của phân tử cơ chất fucoidan mà fucoidanase được phân thành 2 nhóm chính là $\alpha(1\rightarrow4)$ fucoidanase và $\alpha(1\rightarrow3)$ fucoidanase [2]. Fucoidanase tái tổ hợp được tạo ra bằng kỹ thuật sinh học phân tử giúp tạo ra các enzyme có hoạt tính mạnh và độ bền cao. Trong những năm gần đây, nhờ vào sự phát triển của các phần mềm phân tích tin sinh học mà thông tin của các vùng bảo thủ của phân tử protein fucoidanase cũng như cấu trúc của enzyme này đã được làm sáng tỏ, qua đó giúp nâng cao khả năng tìm kiếm các trình tự fucoidanase tiềm năng hướng đến nghiên cứu thành công fucoidanase tái tổ hợp [3-6]. Công bố của Vicker và cộng sự về cấu trúc tinh thể 3D của 02 phân tử fucoidanase P5AFcnA và MfFcnA từ vi khuẩn biển *Psychromonas* SW5A và *Mariniflexile fucanivorans* sp. nov. đã chỉ ra vùng bảo thủ chịu trách nhiệm hoạt tính của fucoidanase là vùng D1, đó là một đoạn polypeptide gồm khoảng 400 axit amin có cấu trúc dạng xoắn và tằm kết hợp (β/α)₈ tính từ đầu tận cùng amino của chuỗi protein, mỗi vùng đều chứa 02 gốc axit amin là Aspartic (D) và Histidine (H) chịu trách nhiệm xúc tác của enzyme fucoidanase (trùng khớp 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 Ca^{2+} [5].

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 và tái tổ hợp thành công trong thời gian ngắn sau đó, như 04 fucoidanase từ vi khuẩn biển *W. fucanilytica* CZ1127T [6], fucoidanase P19DFcnA từ vi khuẩn *Psychromonas* sp. [5], fucoidanase Fhf1, Fhf2 từ *F. haliotis* [3,4]. 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 fucoidanase, 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, mặc dù vậy cho đến nay vai trò của các vùng bảo thủ này (loại trừ vùng D1) đối với hoạt tính của fucoidanase vẫn chưa được làm rõ [4-7].

Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã sử dụng các phần mềm tin sinh học hiện đại, kết hợp với các thông tin khoa học mới nhất về trình tự, cấu trúc của fucoidanase, để phân tích trình tự protein PF1 có nguồn gốc từ chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. S3178 được khai thác từ Ngân hàng gen thế giới (NCBI).

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Đoạn trình tự protein (PF1) của chủng vi khuẩn *Pseudomonas* sp. S3178, có mã số Genbank: WP_138682449.1 và mã số Protein ID: TMP05905.1 trên Ngân hàng gen thế giới (NCBI).

2.2 Phương pháp

Công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): một tập hợp các công cụ tìm

kiểm, thống kê được thiết kế để phân tích mức độ tương đồng và độ bao phủ của trình tự sinh học trên ngân hàng dữ liệu gen NCBI.

Công cụ InterProScan: cung cấp thông tin về chức năng của protein bằng cách phân loại chúng thành các họ và dự đoán các vùng bảo tồn của trình tự protein phân tích.

Công cụ SignalP 5.0: dự đoán sự hiện diện của các vùng peptide tín hiệu (signal peptide) và các vị trí phân cắt của chúng trong trình tự protein.

Phần mềm CLC Genomics workbench program 8.0: được sử dụng để xác định các vùng và gốc axit amin bảo tồn của các trình tự protein phân tích, dựng cây phát sinh loài.

Hệ thống phân loại CAZy (Carbohydrate Active Enzymes): phân loại enzyme hoạt động trên cơ chất carbohydrate.

Các trình tự fucoidanase đã được công bố được sử dụng làm trình tự tham chiếu được liệt kê ở Bảng 1.

Bảng 1. Danh mục các GH107 fucoidanase được sử dụng làm tham chiếu

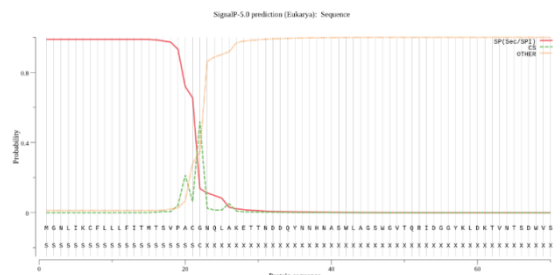
Enzyme	Nguồn vi khuẩn	Phân loại	Genbank
MfFcnA [7]	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5T	Endo- α (1 \rightarrow 4)	CAI47003.1
FFA1 [8]	<i>Formosa algae</i>		WP_057784217.1
FFA2 [9]	<i>Formosa algae</i>		WP_057784219.1
Fhf1 [4]	<i>Formosa haliotis</i>		WP_066217780.1
Fhf2 [3]	<i>Formosa haliotis</i>		WP_066217784.1
FWf1-4 [6]	<i>Wenyngzhuangia fucanilytica</i> CZ1127T		AXE80_07305; AXE80_07310
P5AfcnA [5]	<i>Psychromonas sp. Psychromonas</i>	Endo- α (1 \rightarrow 3)	AYF59291.1

	SW5A		
P9DfcnA [5]	<i>Psychromonas sp.</i> SW19D		AYF59292.1
Fda1 [10-12]	<i>Alteromonas sp.</i> SN-1009		AAO00508.1
Fda2 [10,11]	<i>Alteromonas sp.</i> SN-1009		AAO00509.1

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân tích trình tự và vùng bảo thủ của PF1

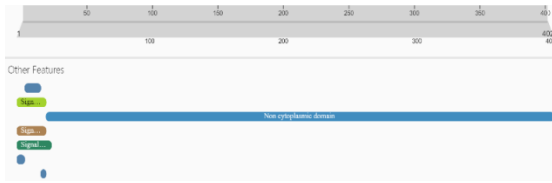
Theo kết quả phân tích bằng SignalIP 5.0 (mã số tra cứu: 6677967F0016A135EBF45AA6, ngày 23/06/2024) và InterproScan (mã số tra cứu: iprscan5-R20240622-121812-0969-222055-p1m, ngày 22/06/2024), PF1 là một protein gồm 402 axit amin, có chứa đoạn signal peptide gồm 22 axit amin (vị trí cắt- cleavage site nằm giữa axit amin 22 và 23) và không chứa bất kỳ miền dự đoán chức năng nào (Hình 1 và Hình 2).



Hình 1. Chiều dài và vị trí signal peptide của PF1 được xác định bằng SignalIP 5.0

Phân tích độ tương đồng của PF1 với các trình tự sẵn có trên cơ sở dữ liệu của Ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST (mã số tra cứu: 7F88UD9M016, ngày 23/06/2024) cho thấy, PF1 có độ tương đồng cao nhất với trình tự protein giả định (hypothetical protein) từ chủng vi khuẩn *Pseudoalteromonas fuliginea* (WP_14961387.1), với độ tương đồng (Identify percent) đạt 90% và độ bao phủ (Query percent) đạt 99%. Đối với các trình tự fucoidanase đã được công bố, PF1 có độ tương đồng cao nhất với trình tự

P5AFcnA với 63% độ tương đồng và 90% độ bao phủ. P5AFcnA là fucoidanase đặc hiệu liên kết đường $\alpha(1\rightarrow3)$ và cũng là fucoidanase đầu tiên được xác định cấu trúc tinh thể 3D [5].



Hình 2. Kết quả phân tích vùng chức năng của PF1 bằng InterproScan

Kết quả phân tích vùng chức năng ở Hình 2 cho thấy, trình tự PF1 chỉ chứa vùng signal peptide và vùng D1, vùng bảo thủ chịu trách nhiệm cho hoạt động xúc tác của fucoidanase, mà không bao gồm bất kỳ một vùng chức năng nào khác. Cấu trúc đơn giản của PF1 cũng tương đồng với một số fucoidanase đã được công bố như P5AFcnA và P9DFcnA [5]. Mặc dù vậy, bên cạnh vùng signal peptide và vùng D1, phần lớn các trình tự fucoidanase còn chứa thêm một số vùng chức năng khác như vùng Cadherin-like domain (IgR), hay vùng Type IX secretion system (T9SS)...các vùng này có thể xuất hiện một lần hoặc nhiều lần trong cấu trúc của các enzyme fucoidanase [3-5,7].

3.2 Kết quả phân tích axit amin bảo thủ thuộc vùng chức năng D1 của PF1

Trong vùng D1, có hai gốc axit amin chịu trách nhiệm xúc tác của fucoidanase là Aspartic (D) hoạt động như tác nhân nucleophile và Histidine (H) hoạt động như chất xúc tác gốc axit. Trước đó, Vicker và cộng sự đã xác định ở các vị trí D226 và H294, D201 và H276, D198 và H276 lần lượt của các trình tự fucoidanase MfFcnA, P5AFcnA và P9DFcnA [5]. Trong nghiên cứu này, đã được xác định trên trình tự của PF1, ở các vị trí tương ứng (D203) và H278. Thêm vào đó, kết quả phân tích của chúng tôi cũng chỉ ra rằng, 2 axit amin này xuất

hiện ở tất cả các trình fucoidanase đã được công bố (Bảng 2).

Bảng 2. Vị trí axit amin bảo thủ trong vùng bảo thủ D1 của PF1 và các fucoidanase

Fucoidanase	Axit amin bảo thủ của vùng D1					
	142	144	203	231	278	327
PF1	Y	N	D	S	H	W
P5AFcnA	143	145	201	229	276	325
P19DFcnA	140	142	198	229	276	327
Fda1	135	137	226	252	273	323
Fda2	198	200	295	221	342	392
MfFcnA	147	149	226	270	294	351
Fhf1	142	144	223	266	290	364
Fhf2	144	146	227	270	297	355
FFA1	144	146	223	267	291	348
FFA2	154	156	237	280	307	365
FWf1	129	131	225	267	293	357
FWf2	365	367	464	506	537	611
FWf3	311	313	401	443	469	528
FWf4	150	152	229	273	297	354

Trong đó: 02 axit amin chịu trách nhiệm xúc tác được in đậm: Aspartate (D) và Histidine (H); 04 axit amin thuộc trung tâm hoạt động: Tyrosine (Y), 2 gốc Asparagine (N), Tryptophan (W). Số trong bảng là vị trí axit amin tương ứng với từng trình tự fucoidanase phân tích.

Bên cạnh đó, 03 trong 04 gốc axit amin thuộc trung tâm hoạt động của fucoidanase bao gồm Y147, N149 và T351 đã được công bố trên trình tự MfFcnA [5], cũng được xác định ở trình tự PF1, tương ứng với các gốc axit amin là Y142, N144 và T327. Trong khi đó,

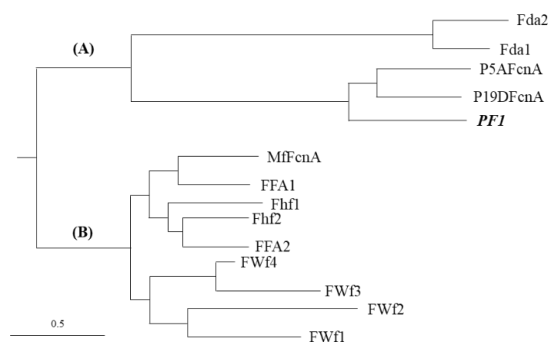
gốc axit amin còn lại của MfFcna là N270, được biến đổi thành S231 trong trình tự PF1 (Bảng 2).

Đáng chú ý, có 02 gốc axit amin thuộc trung tâm hoạt động không bảo tồn hoàn toàn giữa tất cả các trình tự fucoidanase nghiên cứu. Gốc N149 của MfFcna bị biến đổi thành Alanine (A) trong Fda1 và Fda2 [3,4]. Còn gốc N270 của MfFcna bị biến đổi thành S231 trong PF1 và Q267 trong FWf1 (Bảng 2). Mặc dù, cần phải phân tích sâu hơn về góc độ phân tử cũng như sinh hóa để thấy được các khác biệt này có ảnh hưởng như thế nào đến đặc tính xúc tác của mỗi fucoidanase khác nhau, nhưng cũng có thể lý giải cho tính đặc hiệu cao của enzyme fucoidanase, đó là, bên cạnh loại liên kết giữa các gốc đường fucose ở mạch chính của cơ chất fucoidan, đặc tính xúc tác của các fucoidanase cũng chịu ảnh hưởng của vị trí và số lượng các nhóm chức khác như gốc sulfate, gốc acetyl...; hay mật độ và độ phức tạp của cấu trúc các mạch nhánh [2,3,11].

3.3. Kết quả phân tích cây phát sinh loài của PF1 với các fucoidanase khác

Cây phát sinh loài được thực hiện từ kết quả phân của vùng D1 giữa PF1 và 13 fucoidanase khác bằng Phần mềm CLC Genomics workbench program 8.0 (Hình 3).

Cây phân loài được phân thành 2 nhánh chính, gồm Nhánh A và Nhánh B. Trong đó, tất cả các fucoidanase xúc tác đặc hiệu cho liên kết đường $\alpha(1\rightarrow4)$ như MfFcna [5,7], FFA1 [13], FFA2 [9], Fhf1 [4], Fhf2 [3], FWf1,2,3,4 [6] đều thuộc Nhánh B. Trong khi, PF1 thuộc cùng Nhánh A cùng với các fucoidanase xúc tác đặc hiệu với liên kết đường $\alpha(1\rightarrow3)$ như Fda1 và Fda2 [11,12] và P5AFcna, P19DFcna [5] (Hình 3).



Hình 3. Cây phát sinh loài của PF1 và các fucoidanase

4. KẾT LUẬN

Bằng công cụ tin sinh học và nguồn dữ liệu trên Ngân hàng gen thế giới NCBI, đã xác định được 01 đoạn trình tự fucoidanase tiềm năng PF1. Kết quả nghiên cứu sẽ là luận chứng khoa học đáng tin cậy để tiến hành lựa chọn trình tự PF1 cho nghiên cứu tái tổ hợp fucoidanase.

Lời cảm ơn: Kết quả bài báo được thực hiện từ nguồn kinh phí thuộc Đề tài Khoa học công nghệ thuộc các hướng KHCN ưu tiên (mã số VAST02.01/23-24) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Usov A.I., Bilan M.I., (2009). Fucoidans - sulfated polysaccharides of brown algae. *Russian chemical reviews*, **78**, 785-799.
- [2]. Kusaykin M.I., Silchenko A.S., Zakharenko A.M., Zvyagintseva T.N., (2015). Fucoidanases. *Glycobiology*, **26**, 3-12.
- [3]. Vo Thi Dieu Trang, Mikkelsen M.D., Vuillemin M., Meier S., Cao Thi Thuy Hang, Huynh Hoang Nhu Khanh and Muschiol J., Meyer A.S., Perna V., Thuan T.N., Tran N.H.V., Holck J., Van T.T.T., (2022). The endo- $\alpha(1\rightarrow4)$ -L fucoidanase Fhf2 from *Formosa haliotis* releases highly sulfated fucoidan oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science*, **3**, 823668.
- [4]. Vuillemin M., Silchenko A.S., Cao Thi Thuy Hang, Kokoulin M.S., Vo Thi Dieu

- Trang, Holck J., Ermakova S.P., Meyer A.S., Mikkelsen M.D., (2020). Functional Characterization of a New GH107 Endo- α -(1,4)-Fucoidanase from the Marine Bacterium *Formosa haliotis*. *Marine Drugs*, **18**, 562.
- [5]. Vickers C., Liu F., Abe K., Salama-Alber O., Jenkins M., Springate C.M.K., Burke J.E., Withers S.G., Boraston A.B., (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**, 18296-18308.
- [6]. Zueva A.O., Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Usoltseva R.V., Kalinovskiy A.I., Kurilenko V.V., Zvyagintseva T.N., Pham Duc Thinh, Ermakova S.P., (2020). Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 3025-3037.
- [7]. Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolut Y., Kervarec N., Yvin J.C., Barbeyron T., Michel G., Kloareg B., (2006). Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: Definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology*, **16**, 1021-1032.
- [8]. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Malyarenko O.S., Shevchenko N.M., Zueva A.O., Kalinovskiy A.I., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P., (2018). Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydrate Polymers*, **193**, 189-195.
- [9]. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R. V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N., (2017). Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae*. *Glycobiology*, **27**, 1-10.
- [10]. Sakai T., Kawai T., Kato I., (2004). Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. *Marine Biotechnology*, **6**, 335-346.
- [11]. Cao Thi Thuy Hang, Mikkelsen M.D., Lezyk M.J., Bui Minh Ly, Tran Thi Thanh Van, Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Pham Duc Thinh, Truong Hai Bang, Holck J., Meyer A.S., (2018). Novel Enzyme Actions for Sulphated Galactofucan Depolymerisation and a New Engineering Strategy for Molecular Stabilisation of Fucoidan Degrading Enzymes. *Marine Drugs*, **16**, 1-18.
- [12]. Zhu C., Liu Z., Ren L., Jiao S., Zhang X., Wang Q., Li Z., Du Y., Li J.J., (2021). Overexpression and biochemical characterization of a truncated endo- α (1 \rightarrow 3)-fucoidanase from *Alteromonas* sp. SN-1009, *Food Chemistry*, **353**, 129460.
- [13]. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Kalinovskiy A.I., Miansong Z., Changheng L., Malyarenko O., Zueva A.O., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P., (2017). Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers*, **175**, 654-660.

Số: 1241 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 06 tháng 11 năm 2024

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ

GIÁM ĐỐC
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Căn cứ Quyết định số 303/QĐ-VHL ngày 01/03/2023 của Chủ tịch Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Học viện Khoa học và Công nghệ;

Căn cứ Thông tư số 15/2014/TT-BGDĐT ngày 15/5/2014 của Bộ Giáo dục và Đào tạo ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 775/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2016 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ ban hành Quy chế đào tạo trình độ thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 850/QĐ-HVKHCN ngày 31/05/2021 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận học viên cao học trúng tuyển đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 65/QĐ-HVKHCN ngày 26/02/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc công nhận đề tài và cử người hướng dẫn luận văn thạc sĩ;

Căn cứ Quyết định số 57/QĐ-HVKHCN ngày 26/02/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 2 cho học viên Trần Thanh Hiếu;

Xét đề nghị của Trưởng khoa Khoa Công nghệ sinh học, Trường phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Trần Thanh Hiếu với đề tài: “Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase tái tổ hợp”.

Ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8 42 01 14

Danh sách thành viên Hội đồng đánh giá luận văn kèm theo Quyết định này.

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận văn thạc sĩ theo đúng quy chế hiện hành của Bộ Giáo dục và Đào tạo, Học viện Khoa học và Công nghệ. Quyết định này có hiệu lực trong thời hạn tối đa 60 ngày làm việc kể từ ngày ký.

Hội đồng tự giải thể sau khi hoàn thành nhiệm vụ.

Điều 3. Trường phòng Tổ chức - Hành chính và Truyền thông, Trường phòng Đào tạo, Trường phòng Kế toán, Trường Khoa Công nghệ sinh học, các thành viên có tên trong danh sách Hội đồng và học viên cao học có tên tại Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này. /.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;
- Lưu hồ sơ học viên;
- Lưu: VT, ĐT, MT.07.



GIÁM ĐỐC

GS.TS. Vũ Đình Lâm

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 1241/QĐ-HVKHCN ngày 06/11/2024

của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Cho luận văn của Học viên Trần Thanh Hiếu

Tên đề tài: Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số *Urocidanase* tái tổ hợp.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

- Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang,
Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Cao Thị Thúy Hằng

- Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang,
Viện Hàn lâm KHCNVN

TT	Họ và tên, học hàm, học vị	Chuyên ngành	Cơ quan công tác	Trách nhiệm trong Hội đồng
1.	PGS.TS. Đào Việt Hà	Hóa sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Chủ tịch
2.	TS. Lê Đình Hải	Ký sinh trùng và vi sinh vật học thú y	Phân Viện Thú Y Miền Trung, Bộ NN&PTNT	Phản biện 1
3.	TS. Nguyễn Xuân Vy	Sinh học	Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN	Phản biện 2
4.	TS. Phan Thị Hoài Trinh	Công nghệ sinh học	Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KHCNVN	Ủy viên - Thư ký
5.	TS. Phan Quốc Thông	Vật liệu Y sinh	Trường Đại học Khánh Hòa, Ủy ban Nhân dân tỉnh Khánh Hòa	Ủy viên

(Hội đồng gồm 05 thành viên)./.

Khánh Hòa, ngày 22 tháng 11 năm 2024

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 1241/QĐ-HVKHCN ngày 06/11/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ của học viên Trần Thanh Hiếu

Tên đề tài: Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase tái tổ hợp.

Ngành/Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 22/11/2024 Hội đồng đã họp tại Phòng họp, Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, số 02 Hùng Vương, Phường Lộc Thọ, TP. Nha Trang vào lúc 09h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1. PGS.TS. Đào Việt Hà | Chủ tịch hội đồng |
| 2. TS. Phan Thị Hoài Trinh | Thư ký hội đồng |
| 3. TS. Lê Đình Hải | Phản biện 1 |
| 4. TS. Nguyễn Xuân Vy | Phản biện 2 |
| 5. TS. Phan Quốc Thông | Ủy viên hội đồng |

Thành viên vắng mặt: 0/5 (Phản biện hoặc ủy viên, đã có bản nhận xét đồng ý cho phép học viên được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ).

NỘI DUNG LÀM VIỆC

- Đại diện cơ sở đào tạo đọc quyết định thành lập Hội đồng đánh giá luận văn
- Chủ tịch Hội đồng, điều khiển phiên họp
- Thư ký HĐ, đọc lí lịch khoa học và bảng điểm của học viên
- Học viên trình bày luận văn trước Hội đồng
- Phản biện 1: TS. Lê Đình Hải** thông qua bản nhận xét của về luận văn và có những ý chính như sau:

- Trong đề tài luận văn này học viên đã nghiên cứu sử dụng enzyme fucoidanase tái tổ hợp để phân cắt các sulfated polysaccharide từ hải sâm ở vùng biển Việt Nam là



hướng nghiên cứu mới và không có sự trùng lặp với các kết quả nghiên cứu trong nước và trên thế giới.

- Kết quả luận văn được trình bày, rõ ràng, trung thực và chính xác.
- Nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.
- Nội dung nghiên cứu trình bày rõ ràng, đầy đủ, khoa học, phù hợp với nội dung nghiên cứu, phương pháp, vật liệu nghiên cứu được trình bày chi tiết, đầy đủ cơ sở khoa học và phù hợp với các nội dung, mục tiêu nghiên cứu. Nghiên cứu mang tính khoa học và có độ tin cậy cao. Tài liệu tham khảo được trích dẫn đầy đủ và được cập nhật đến năm 2024.

- Kết quả nghiên cứu :

+ Đã biểu hiện, thu nhận và tinh sạch thành công 5 loại fucoidanase tái tổ hợp (F1, F2, F3, F4 và F5) dựa trên các điều kiện đã được công bố, fucoidanase thu nhận được có độ tinh sạch cao.

+ Đã xác định được 03 enzyme fucoidanase tái tổ hợp là F3, F4 và F5 có khả năng thủy phân, bẻ gãy mạch PS tách chiết từ loài hải sâm *Holothuria spinifera* tạo ra các oligosaccharide có trọng lượng phân tử thấp.

+ Đã xác định được một số điều kiện tối ưu cho fucoidanase F3 hoạt động xúc tác.

- Những điểm cần chỉnh sửa trong luận văn:

+ Cần bổ sung thông tin nguồn gốc của 5 chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp.

+ Phần kết quả thảo luận cần viết ngắn gọn, súc tích tránh lặp lại các thông tin ở phần phương pháp nghiên cứu.

+ Rà soát, chỉnh sửa cách sử dụng các thuật ngữ khoa học, cách trình bày phân tích kết quả nghiên cứu để rõ thông tin khoa học, chú thích đúng các hình và bảng.

+ Chỉnh sửa lỗi chính tả và các tiêu mục trong luận văn.

- Câu hỏi: Vì sao tác giả sử dụng fucoidanase tái tổ hợp để nghiên cứu hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm mà không thu nhận fucoidanase từ tự nhiên?

*** Kết luận chung:**

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sỹ.

6. Phản biện 2: TS. Nguyễn Xuân Vy đã thông qua bản nhận xét của về luận văn và có các ý kiến:

- Phản biện 2 đồng ý với các nhận xét, góp ý của Phản biện 1.

- Những điểm cần chỉnh sửa trong luận văn:

+ Cần trình bày ngắn gọn các phần mở đầu, kết quả và thảo luận, kết luận và kiến nghị.

+ Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.

+ Thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo.

*** Kết luận chung:**

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sỹ.

7. Các thành viên HD và những người tham dự nêu câu hỏi

*** TS. Phan Quốc Thông** thông qua bản nhận xét luận văn và có các ý kiến:

- Đồng ý với ý kiến nhận xét của 2 phản biện.

- Cần bổ sung tài liệu tham khảo cho thông tin trích dẫn về hoạt tính sinh học của sulfated polysaccharide.

*** TS. Phan Thị Hoài Trinh** có các ý kiến:

- Cần định dạng lại phần kết quả và nghiên cứu để tránh các khoảng trống. Phần mở đầu, kết quả nghiên cứu và thảo luận, kết luận và kiến nghị cần trình bày ngắn gọn, xúc tích.

- Định dạng tài liệu tham khảo cần thống nhất theo đúng quy định của Học viện KHCN.

- Rà soát các thuật ngữ khoa học, cách trình bày.

*** PGS.TS Đào Việt Hà**

- Phần thảo luận cần trình bày bám sát vào nội dung kết quả nghiên cứu đạt được của luận văn.

- Trình bày ngắn gọn phần mở đầu, tránh lặp lại nội dung phần phương pháp ở phần kết quả.

- Rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ khoa học.

- Câu hỏi: Trong nghiên cứu này có thể lược bỏ mục 3.1.3 về đánh giá hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm có được không? Vì sao học viên lựa chọn enzyme F3 trong số 03 enzyme fucoidanase tái tổ hợp là F3, F4 và F5 để nghiên cứu đặc tính xúc tác trên cơ chất sulfated polysaccharide tách chiết từ loài hải sâm *Holothuria spinifera*?

*** Kết luận chung:**

Luận văn đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một luận văn thạc sỹ.

8. Học viên trả lời

Câu 1. Vì sao tác giả sử dụng fucoidanase tái tổ hợp để nghiên cứu hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm mà không thu nhận fucoidanase từ tự nhiên?

Trả lời: Vì fucoidanase tự nhiên có hoạt tính không ổn định nên gây ra khó khăn trong nghiên cứu thu nhận oligosaccharide từ polysaccharide. Việc lựa chọn fucoidanase tái tổ hợp là phù hợp với xu hướng nghiên cứu mới của thế giới.

VIA C
VIỆN
HỌC V
NGH
M

Câu 2. Trong nghiên cứu này có thể lược bỏ mục 3.1.3 về đánh giá hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu để sang phần thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm có được không?

Trả lời: Đánh giá hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất đặc hiệu là cần thiết để khẳng định hoạt tính thủy phân trên dạng liên kết của sulfated polysaccharide trước khi thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm.

Câu 3. Vì sao học viên lựa chọn enzyme F3 trong số 03 enzyme fucoidanase tái tổ hợp là F3, F4 và F5 để nghiên cứu đặc tính xúc tác trên cơ chất sulfated polysaccharide tách chiết từ loài hải sâm *Holothuria spinifera*?

Trả lời: Do thời gian nghiên cứu có hạn nên học viên chỉ đủ để thực hiện nghiên cứu đặc tính xúc tác của enzyme fucoidanase tái tổ hợp F3 trên cơ chất sulfated polysaccharide tách chiết từ loài hải sâm *Holothuria spinifera*

9. Nhận xét của thầy hướng dẫn về học viên

TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh đại diện tập thể hướng dẫn đã đọc bản nhận xét của giáo viên hướng dẫn và có những đánh giá cao về quá trình làm việc nghiêm túc của học viên.

10. Hội đồng họp kín và cho điểm

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu gồm 3 thành viên:

Trưởng ban: TS. Phan Quốc Thông

Ủy viên: TS. Nguyễn Xuân Vy

Ủy viên: TS. Phan Thị Hoài Trinh

- Kết quả kiểm phiếu như sau:

Số phiếu phát ra: 05

Số phiếu thu về: 05

Tổng số điểm: 41,5

Điểm trung bình: 8,3

Điểm thưởng công trình công bố: 1

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 9,3

- Kết luận của Hội đồng:

- + Luận văn đạt yêu cầu của luận văn thạc sĩ.
- + Nội dung và tên đề tài luận văn không trùng lặp với các công trình đã công bố.
- + Học viên cần chỉnh sửa luận văn theo nhận xét của 02 phản biện và các góp ý của Hội đồng.
- + Trình bày ngắn gọn các phần mở đầu, kết quả và thảo luận, kết luận và kiến nghị.
- + Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.
- + Thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo theo quy định của Học viên Khoa học và Công nghệ.

11. Chủ tịch Hội đồng, công bố kết quả, yêu cầu học viên chỉnh sửa luận văn với các nội dung sau:

Luận văn có nội dung nghiên cứu đáp ứng được yêu cầu của một luận văn thạc sỹ, học viên chỉnh sửa theo góp ý của hội đồng và hoàn thiện hồ sơ gửi cơ sở đào tạo đúng hạn.

Buổi họp đã kết thúc vào 11 giờ 05 phút ngày 22/11/2024.

Khánh Hòa, ngày 22 tháng 11 năm 2024

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Phan Thị Hoài Trinh

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Đào Việt Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO



**KI. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**

Trần Thị Phương Anh



BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Lê Đình Hải Học hàm, học vị: Tiến sỹ

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 1

Cơ quan công tác: Phân viện thú y miền Trung

Họ và tên học viên: Trần Thanh Hiếu

Tên đề tài: “Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase tái tổ hợp”

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm Mã số: 8420114

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Sulfated polysaccharide là những hợp chất có hoạt tính sinh học đa dạng và có khả năng ứng dụng trong y học như: kháng virus, chống huyết khối, kháng viêm, kháng ung thư vv.... Tuy nhiên, chúng vẫn chưa được sử dụng thành công trong việc chế tạo thuốc do khối lượng phân tử lớn và cấu trúc không rõ, phức tạp, độ nhớt cao. Để giải quyết vấn đề này các nhà khoa học đã nghiên cứu sử dụng các phương pháp khác nhau để tạo ra các sulphated polysaccharide có khối lượng phân tử thấp.

Gần đây, các nghiên cứu đã sử dụng enzyme làm công cụ bẻ gãy mạch sulfated polysaccharide thành các oligosaccharide theo định hướng sử dụng trong dược học. Sulfated polysaccharide từ hải sâm gồm có thể được cắt mạch bằng cách enzyme fucoidanase, chondroitinase hoặc hyaluronidase. Mặc dù enzyme fucoidanase có thể tìm thấy trong tự nhiên, tuy nhiên việc điều chế enzyme này trong tự nhiên gặp nhiều khó khăn đó là hiệu suất thu nhận thấp và hoạt tính enzyme dễ bị ảnh hưởng trong quá trình thu nhận và tinh sạch. Chính vì vậy tác giả đặt vấn đề nghiên cứu thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm bằng một số fucoidanase tái tổ hợp cần thiết, có tính thời sự.

Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn đó là cơ sở khoa học để nghiên cứu phát triển các loại enzyme fucoidanase tái tổ hợp. Sản phẩm của đề tài là fucoidanase tái tổ hợp có hoạt tính trên sulfated polysaccharide từ hải sâm – có tiềm năng ứng dụng trong việc sản xuất các sản phẩm sinh học có giá trị, đặc biệt là trong y học.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Trong nghiên cứu này, tác giả nghiên cứu sử dụng enzyme fucoidanase tái tổ hợp để phân cắt các sulfated polysaccharide từ hải sâm ở vùng biển Việt Nam là hướng nghiên cứu mới và không có sự trùng lặp với các kết quả nghiên cứu trong nước và thế giới.

Luận văn là một phần của đề tài khoa học công nghệ thuộc các hướng KHCN ưu tiên (mã số VAST02.01/24-25) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam do TS.

Huỳnh Hoàng Như Khánh - hướng dẫn của học viên làm chủ nhiệm tài; các nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm của viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang nên đảm bảo được tính trung thực, độ chính xác và độ tin cậy cao. Các số liệu và các kết quả được trình bày khá chi tiết, có nhiều hình ảnh minh họa.

Trong luận văn tác giả đã tham khảo 89 tài liệu; các tài liệu này là hoàn toàn phù hợp với nội dung nghiên cứu; các trích dẫn tài liệu được thể hiện đầy đủ có những tài liệu xuất bản năm 2024, điều này chứng tỏ tác giả rất cập nhật các tài liệu liên quan đến vấn đề nghiên cứu.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài phù hợp với nội dung cũng như kết quả thu được; đề tài phù hợp với chuyên ngành và mã số đào tạo.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Để hoàn thành được nghiên cứu tác giả đã sử dụng nhiều phương pháp và kỹ thuật khác nhau. Trong đó có những phương pháp, kỹ thuật thường quy như là nuôi cấy vi khuẩn, xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry; tác giả cũng sử dụng các phương pháp hiện đại như tinh sạch protein bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng hạt Niken, kỹ thuật điện di SDS-PAGE, C - PAGE, phương pháp Western blot. Những phương pháp, kỹ thuật này là phù hợp với nội dung nghiên cứu và kết quả thu được là hoàn toàn đáng tin cậy.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Kết quả của luận văn bao gồm:

Đã biểu hiện và tinh sạch thành công 5 enzyme tái tổ hợp fucoidanase từ các chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 mang gen tái tổ hợp.

Đã xác định được hoạt tính của 5 enzyme tái tổ hợp fucoidanase trên cơ chất đặc hiệu và trên sulfated polysaccharide từ hải sâm.

Đã đánh giá được một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt động xúc tác trên cơ chất của fucoidanase tái tổ hợp.

Như vậy, các kết quả thu được là phù hợp với phương pháp nghiên cứu và mục tiêu đề tài đặt ra.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

- Trong phần đặt vấn đề, học viên nên xem xét bổ sung một số thông tin để thấy được tầm quan trọng của nghiên cứu này. Cụ thể, tác giả cần làm sáng tỏ hơn tại sao nghiên cứu này tác giả sử dụng fucoidanase tái tổ hợp mà không đi thu nhận enzyme fucoidanase có trong tự nhiên.

Bên cạnh đó, trong phần mở đầu nếu tác giả đưa tên đề tài trong phần mở đầu thì phải viết cho đúng với tên ở trang bìa. Cũng trong phần này, tác giả nên bỏ phần đối tượng nghiên cứu, vì phần đối tượng nghiên cứu đã trình bày ở chương 2. Ngoài ra tác giả nên xem xét trình bày lại các nội dung nghiên cứu cho logic hơn với các kết quả thu được.

- Trong phần tổng quan, tác giả nên bổ sung thêm một số nghiên cứu về sản xuất

Trong phần xác định hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp, tác giả thực hiện trong thời gian 24 giờ (mục 3.2 trang 37). Tuy nhiên khi xác định tối ưu về thời gian tác giả chỉ thực hiện trong tối đa 120 phút (mục 3.3.1 trang 43). Tác giả nên giải thích rõ hơn.

Nên đổi tên mục 3.3. trang 43 thành “kết quả xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của fucoidanase tái tổ hợp trên cơ chất từ hải sâm”.

- Phần kết luận còn quá dài và còn mô tả quá nhiều, chỉ nên tập trung kết luận các kết quả thu được.

Trong phần tài liệu tham khảo, tác giả nên thống nhất cách trích dẫn cho đúng quy định của cơ sở đào tạo.

Các lỗi khác: căn lề phần mục lục, danh mục bảng; in nghiêng các tên khoa học, thông nhất viết các chữ giống nhau “virus”, “vi rút” “hơi axit” viết thành “axít yếu”....

Còn một số lỗi đánh máy, chính tả....

7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?

Theo hồ sơ học viên đã cung cấp, học viên đã tham gia nghiên cứu và là đồng tác giả của một công bố ở tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học với nội dung nghiên cứu là cơ sở để phát triển luận án này. Và với kết quả đã được thể hiện trong luận án này, theo tôi tác giả có thể viết thêm 1 bài báo nữa để gửi đăng trên tạp chí khoa học chuyên ngành.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Luận văn là một công trình nghiên cứu nghiêm túc, khá công phu, được thực hiện tại những phòng thí nghiệm có uy tín trong nước. Kết quả đạt được đáng tin cậy, có ý nghĩa khoa học, thực tiễn cao trong tình hình hiện nay và có đóng góp mới.

Luận văn được trình bày khá đẹp, đúng với quy định của cơ sở đào tạo. Nội dung và hàm lượng khoa học như vậy là phù hợp với một luận án thạc sĩ. Vì vậy, có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị thạc sĩ.

Khánh Hòa..., ngày 19. tháng 11. năm 2024

Xác nhận của cơ quan công tác

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC



TS. Nguyễn Thị Thắm

Người nhận xét

Lê Đình Hải

BẢN NHẬN XÉT PHẢN BIỆN LUẬN VĂN THẠC SĨ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Xuân Vy, Học hàm, học vị: TS

Chức danh trong Hội đồng: Phản biện 2

Cơ quan công tác: Viện Hải dương học

Họ và tên học viên: Trần Thanh Hiếu

Tên đề tài: Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase tái tổ hợp

Ngành: Sinh học thực nghiệm.

Mã số: 8 42 01 14

NỘI DUNG NHẬN XÉT

1. Tính cấp thiết, tính thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận văn:

Nghiên cứu này sử dụng 5 chủng fucoidanases tái tổ hợp đã được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* để xác định hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide chiết rút từ Hải sâm. Nhìn chung đề tài có tính thời sự, có ý nghĩa khoa học và ứng dụng trong thực tiễn cho ngành được.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình khoa học, luận văn đã công bố ở trong và ngoài nước; tính trung thực, rõ ràng và đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo:

Việc sử dụng fucoidanases tái tổ hợp để thủy phân sulfated polysaccharide trong Hải sâm là mới, chưa được thực hiện nhiều trên thế giới cũng như tại Việt Nam được thể hiện trong danh mục tài liệu tham khảo

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung nghiên cứu cũng như với chuyên ngành và mã số đào tạo:

Tên đề tài và nội dung phù hợp với nhau, nghiên cứu này cũng phù hợp với chuyên ngành đào tạo về công nghệ sinh học

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu đã sử dụng để hoàn thành luận văn:

Như đã trình bày trong luận văn, tác giả sử dụng 5 gene mã hóa cho fucoidanase từ vi khuẩn, rong biển, đã được biến nạp vào *E. coli*. Năm fucoidanase được thử nghiệm thủy phân trên ba loại sulfated polysaccharide có được từ 3 loài Hải sâm. Các bước kiểm tra biểu hiện, thu nhận, tinh sạch enzyme cũng như xác định hoạt tính thủy phân và nghiên cứu các điều kiện ảnh hưởng là các phương pháp thường quy, đang được sử dụng hiện nay.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Nghiên cứu này cho thấy, 3 enzym được mã hóa từ rong nâu và vi khuẩn *Formosa haliotis* có khả năng thủy phân được sulfated polysaccharide của loài Hải sâm *Holothuria spinifera*. Đề tài này cũng đã xác định được một số điều kiện môi trường tối ưu cho việc thủy phân sulfated polysaccharide của fucoidanase có nguồn gốc từ vi khuẩn *Mauricauda eckloniae*: thời gian phản ứng là 15 phút, CaCl_2 rộng từ không bổ sung đến 5 mM, pH tại 6.0.

6. Những hạn chế, thiếu sót của luận văn về nội dung, hình thức và câu hỏi:

Nhìn chung, luận văn đã trình bày tương đối tốt nhưng vẫn còn một số chỗ cần hoàn chỉnh lại:

- Phần mở đầu: Nên ngắn gọn thể hiện rõ lý do thực hiện và ý nghĩa của luận văn này. Thông thường phần mở đầu không có trích dẫn. Nhiều thông tin trong đoạn hai chuyển vào phần Tổng quan
- Phần tổng quan tài liệu: Mục 1.1.2 trình bày về sulfated polysaccharide từ Hải sâm nên thông tin về sulfated polysaccharide trong câu gai nên tách ra thành đoạn văn mới hoặc chuyển từ “hải sâm” trong tựa đề thành “da gai” cho phù hợp với nội dung thể hiện.

Các tên khoa học xuất hiện lần đầu tiên thì viết tên đầy đủ, những lần tiếp theo thì viết tắt tên giống. Ví dụ *Bohaschia* (trang 9). Thay đổi từ “thiếu minh bạch” thành từ khác phù hợp hơn, ví dụ “chưa rõ ràng” hay “đang tranh cãi”. “sulfated polysaccharide từ nguồn biển” nên chuyển thành “sulfated polysaccharide có nguồn gốc từ biển” Mục 1.2.4.2. Mef2 được phân lập từ *Mauricauda* thay vì *Marinobacter*. Thêm từ rong nâu trước tên la tinh của chúng để người đọc dễ hiểu. Mục 1.2.4.3. Trích dẫn Cao Hằng là chưa đúng, đây là công trình QT, nên trích dẫn Cao và cs, kèm số thứ tự. Mục 1.2.4.4. Trích dẫn thông tin cho hai đoạn văn.

- Phần kết quả: Trách viết lại phương pháp trong phần kết quả, ví dụ mục 3.1.2, hay trang 32, 37, 43. Hình 3.5 và 3.6 chưa được trích dẫn vào phần viết. Đây là kết quả của tác giả khác thì đưa sang phần tổng quan tài liệu. Trang 63, kết quả pH 6.0 là tốt nhất nên không thể tương đồng với hai enzyme khác, hoạt động ở trung tính và kiềm nhẹ.
- Kết luận và kiến nghị: Thu gọn lại kết luận, bằng các bỏ các dòng nói về phương pháp.
- Tài liệu tham khảo chưa đồng nhất với nhau, đề nghị hoàn thiện lại

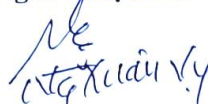
7. Nếu tác giả chưa viết bài báo khoa học thì nội dung của luận văn có thể được viết thành các bài báo để gửi đăng trên tạp chí khoa học, sách chuyên ngành hoặc tuyển tập công trình hội nghị khoa học cấp quốc gia, quốc tế hay không?
Học viên là đồng tác giả của công trình đã xuất bản.

8. Kết luận chung (khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được hay không?):

Đề tài đáp ứng được các yêu cầu đối với một luận văn Thạc sĩ; luận văn có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được

Khánh Hoa ngày 1.2 tháng 11. năm 2024

Người nhận xét



**BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA LUẬN VĂN
THEO KẾT LUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ**

Họ tên học viên: Trần Thanh Hiếu

Lớp: BIO 21A

Tên đề tài luận văn: **Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính thủy phân sulfated polysaccharide từ hải sâm của một số fucoidanase tái tổ hợp**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh
2. TS. Cao Thị Thúy Hằng

Ngày bảo vệ luận văn: 22/11/2024

Căn cứ biên bản họp hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ, học viên đã chỉnh sửa luận văn như sau:

STT	Nội dung đề nghị bổ sung, chỉnh sửa	Nội dung đã bổ sung, chỉnh sửa
1	Cần bổ sung thông tin nguồn gốc của 5 chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> BL21 tái tổ hợp.	Đã bổ sung thông tin vào Mục 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.
2	Phần kết quả thảo luận cần viết ngắn gọn, súc tích tránh lặp lại các thông tin ở phần phương pháp nghiên cứu.	Đã viết súc tích và ngắn gọn lại theo góp ý.
3	Rà soát, chỉnh sửa cách sử dụng các thuật ngữ khoa học, cách trình bày phân tích kết quả nghiên cứu để rõ thông tin khoa học, chú thích đúng các hình và bảng.	Đã rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ khoa học; Đã trình bày phân tích lại kết quả nghiên cứu cho rõ thông tin khoa học; Đã chú thích lại đúng các hình và bảng.
4	Chỉnh sửa lỗi chính tả và các tiêu mục	Đã chỉnh sửa lỗi chính tả và các

	trong luận văn.	tiêu mục trong luận văn.
5	Cần trình bày ngắn gọn các phần mở đầu, kết quả và thảo luận, kết luận và kiến nghị.	Đã viết súc tích và ngắn gọn lại theo góp ý.
6	Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.	Đã rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.
7	Thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo.	Đã chỉnh sửa và thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo.
8	Cần bổ sung tài liệu tham khảo cho thông tin trích dẫn về hoạt tính sinh học của sulfated polysaccharide.	Đã bổ sung tài liệu tham khảo.
9	Cần định dạng lại phần kết quả và nghiên cứu để tránh các khoảng trống. Phần mở đầu, kết quả nghiên cứu và thảo luận, kết luận và kiến nghị cần trình bày ngắn gọn, súc tích.	Đã định dạng lại phần kết quả và nghiên cứu để tránh các khoảng trống; Đã viết súc tích và ngắn gọn lại theo góp ý.
10	Định dạng tài liệu tham khảo cần thống nhất theo đúng quy định của Học viện KHCN.	Đã chỉnh sửa và thống nhất cách trích dẫn và định dạng tài liệu tham khảo.
11	Rà soát các thuật ngữ khoa học, cách trình bày.	Đã rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ khoa học và chỉnh sửa cách trình bày theo góp ý.
12	Phần thảo luận cần trình bày bám sát vào nội dung kết quả nghiên cứu đạt được của luận văn.	Đã điều chỉnh và viết lại phần thảo luận theo góp ý.
13	Trình bày ngắn gọn phần mở đầu, tránh lặp lại nội dung phần phương pháp ở phần kết quả.	Đã viết súc tích và ngắn gọn lại theo góp ý.

14	Rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ khoa học.	Đã rà soát, chỉnh sửa các thuật ngữ, tên khoa học trong luận văn.
----	--	---

Nha Trang, ngày 10 tháng 12 năm 2024

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

Đào Việt Hà

TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

Hướng dẫn 1

Huỳnh Hoàng Như Khánh

Hướng dẫn 2

Cao Thị Thúy Hằng

HỌC VIÊN

Trần Thanh Hiếu

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO