

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Hoàng Hải

**XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN VÀ THU NHẬN
ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP TRÊN *ESCHERICHIA COLI***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Nha Trang – 2025

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Hoàng Hải

**XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN VÀ THU NHẬN
ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP TRÊN *ESCHERICHIA COLI***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

Hướng dẫn 1: TS. Cao Thị Thúy Hằng

Hướng dẫn 2: TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

Nha Trang - 2025

LỜI CAM ĐOAN

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

Tác giả luận văn



Trần Hoàng Hải

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, đầu tiên 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.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất và sự cảm ơn dành cho TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh, TS. Cao Thị Thúy Hằng và TS. Trần Nguyễn Hà Vy 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 KHCN ưu tiên (mã số VAST06.01/23-24) của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam do TS. Trần Nguyễn Hà Vy chủ nhiệm. Cảm ơn các cán bộ nghiên cứu của Phòng Công nghệ Sinh học biển, Phòng Hóa phân tích và Phát triển công nghệ thuộc Viện Hải dương học – 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 hỗ trợ, động viên khích lệ để tôi vượt qua mọi khó khăn trong quá trình học tập cũng như thực hiện đề tài này.

Xin chân thành cảm ơn!

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TỔNG QUAN VỀ RONG LỤC VÀ ULVAN TỪ RONG LỤC	3
1.1.1. Giới thiệu chung về rong lục (Chlorophyta)	3
1.1.2. Ulvan – sulfate polysaccharide từ rong lục	6
1.1.2.1. Thành phần hóa học và đặc điểm cấu trúc của ulvan	6
1.1.2.2. Tính chất lý hóa của ulvan	7
1.1.2.3. Hoạt tính sinh học của ulvan	7
1.2. TỔNG QUAN VỀ ULVAN LYASE	9
1.2.1. Nguồn gốc và phân loại ulvan lyase	9
1.2.1.1. Nguồn gốc của ulvan lyase	9
1.2.1.2. Phân loại ulvan lyase	10
1.2.2. Phương pháp thu nhận ulvan lyase	11
1.2.3. Đặc tính xúc tác của ulvan lyase	14
1.2.3.1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt động của ulvan lyase	14
1.2.3.2. Ảnh hưởng của ion kim loại và chất hoạt động bề mặt	15
1.3. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA ULVAN LYASE	16
1.3.1. Sản xuất oligosaccharide ulvan	16
1.3.2. Ứng dụng trong phân tích cấu trúc ulvan	17
1.3.3. Tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm	18
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	19
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	19
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu	19
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.2.1. Phương pháp kiểm tra sự hiện diện và khả năng biểu hiện của gene mã hóa ulvan lyase trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp	20
2.2.1.1. Kiểm tra sự hiện diện của gene P30_PL28 trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp	20
2.2.1.2. Phương pháp biểu hiện enzyme tái tổ hợp	21

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp.....	22
2.2.3. Tinh sạch protein ulvan lyase bằng phương pháp sắc ký ái lực.....	22
2.2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính ulvan lyase tái tổ hợp.....	23
2.2.4.1. Thử nghiệm hoạt tính enzyme bằng phương pháp điện di C-PAGE (Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	23
2.2.4.2. Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp UV-VIS	23
2.2.5. Các kỹ thuật dùng chung.....	24
2.2.5.1. Phương pháp điện di protein SDS-PAGE	24
2.2.5.2. Phương pháp chuyển màng lai kháng thể miễn dịch Western Blot	24
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
3.1. KẾT QUẢ KIỂM TRA SỰ HIỆN DIỆN CỦA GENE MÃ HÓA ULVAN LYASE TRONG CHỦNG VI KHUẨN TÁI TỔ HỢP	25
3.2. NGHIÊN CỨU KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ BIỂU HIỆN CỦA ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY	28
3.2.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên men và thời gian lên men đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly	28
3.2.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly	30
3.2.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly	31
3.2.4. Biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly ở điều kiện tối ưu	33
3.3. KẾT QUẢ TINH SẠCH ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY	35
3.4. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH THỦY PHÂN ULVAN CỦA ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY	37
3.4.1. Kết quả thử nghiệm khả năng thủy phân ulvan của Faly thu nhận được	37
3.4.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính thủy phân ulvan từ hai loại rong lục khác nhau của ulvan lyase tái tổ hợp Faly	39
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	42
4.1. KẾT LUẬN.....	42

4.2. KIẾN NGHỊ.....	42
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	44

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu và chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ Tiếng Anh/ Tiếng Việt
1	AT	Autoinduction
2	C-PAGE	Carbohydrate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
3	DNA	Deoxyribonucleic Acid
4	DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
5	DTT	Dithiothreitol
6	FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
7	IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
8	Lac	Lactose
9	LB	Lysogeny broth
10	OD	Optical Density
11	PCR	Polymerase Chain Reaction
12	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
13	TBS	Tris-buffered saline

14	<i>U.</i>	<i>Ulva</i>
15	UB4	Tên đệm được dùng trong phản ứng enzyme (Thành phần ở phần phụ lục)
16	UV-VIS	Ultraviolet Visible Spectrophotometry

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp	12
Bảng 3.1 Hoạt tính của Faly thô và sau khi tinh sạch qua cột PD10	36

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Cấu trúc tế bào rong lục <i>Ulva</i> spp. với các bào quan chính như nhân, lục lạp, thể pyrenoid, thể lipid, màng tế bào	3
Hình 1.2 Hình ảnh rong lục <i>Ulva</i> sp.....	5
Hình 1.3 Cấu trúc hóa học của ulvan dạng A và dạng B	6
Hình 1.4 Cây phát sinh phân loài của ulvan lyase từ các họ polysaccharide lyase khác nhau	10
Hình 2.1 Sơ đồ nghiên cứu tổng quát của đề tài	20
Hình 3.1 Hình ảnh điện di agarose 1% sản phẩm PCR khuếch đại gene mã hóa ulvan lyase từ chủng vi khuẩn <i>E. coli</i> tái tổ hợp.....	25
Hình 3.2 Phân tích biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).....	26
Hình 3.3 Ảnh hưởng của môi trường lên men và thời gian lên men đến sự biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly	29
Hình 3.4 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly	31
Hình 3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự biểu hiện (A) và hoạt tính của enzyme Faly tái tổ hợp (B)	32
Hình 3.6 Phân tích ulvan lyase tái tổ hợp Faly sau biểu hiện ở điều kiện tối ưu bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).	33
Hình 3.7 Phân tích SDS-PAGE các phân đoạn chứa enzyme Faly thu được từ sắc ký ái lực trên cột Ni^{2+} -Sephacrose HisTrap HP với các nồng độ khác nhau	35
Hình 3.8 Khả năng thủy phân ulvan của ulvan lyase Faly trên các cơ chất ulvan chiết từ rong <i>U. lactuca</i> và thời gian phản ứng của enzymen phản ứng của enzyme	38
Hình 3.9 Phân tích sản phẩm thủy phân ulvan bởi enzyme ulvan lyase Faly bằng điện di C-PAGE.....	39

Hình 3.10 Đặc điểm cấu trúc của ulvan chiết xuất từ rong lục <i>U. lactuca</i> và <i>U. papenfussii</i>	40
--	----

MỞ ĐẦU

Rong biển từ lâu đã được con người khai thác như một nguồn nguyên liệu quan trọng phục vụ cho nhiều ngành công nghiệp như thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm và dệt may. Hiện nay trên thế giới có khoảng 10.000 loài rong biển đã được xác định, chia thành ba nhóm chính dựa trên thành phần sắc tố quang hợp: rong lục (Chlorophyta), rong nâu (Phaeophyta) và rong đỏ (Rhodophyta). Với đường bờ biển dài hơn 3.200 km và điều kiện khí hậu nhiệt đới thuận lợi, sở hữu hệ sinh thái biển phong phú và đa dạng, Việt Nam đã ghi nhận hơn 878 loài thực vật biển, trong đó có khoảng 196 loài rong lục. Các loài này chủ yếu phân bố tại các vùng biển có hệ sinh thái phát triển mạnh như vịnh Bắc Bộ, vùng biển miền Trung và vùng Nam Trung Bộ. Đặc biệt, chi *Ulva* chiếm tỷ lệ lớn với khoảng 69 loài, trong đó *Ulva lactuca* và *Ulva reticulata* là hai loài phổ biến nhất [1].

Rong lục chứa nhiều hợp chất sinh học quan trọng đặc biệt là polysaccharide sulfate hóa như ulvan. Đây là hợp chất chủ yếu được chiết xuất từ các loài rong lục thuộc bộ Ulvales, đặc biệt là các chi *Ulva* và *Enteromorpha*. Với hàm lượng cao trong thành tế bào, ulvan được biết đến nhờ các hoạt tính sinh học phong phú như chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, điều hòa miễn dịch và tiềm năng ứng dụng trong điều trị bệnh lý liên quan đến stress oxy hóa và rối loạn chuyển hóa lipid.

Mặc dù ulvan có nhiều tiềm năng ứng dụng nhưng việc khai thác và ứng dụng hợp chất sinh học này còn nhiều thách thức do các đặc tính vật lý và hóa học như khả năng hòa tan kém và khối lượng phân tử lớn, làm hạn chế khả năng hấp thụ và tính ổn định trong các hệ thống sinh học. Để khắc phục những hạn chế này, việc chuyển hóa ulvan thành dạng oligosaccharide thông qua quá trình cắt mạch polysaccharide đã được nghiên cứu. Các oligosaccharide ulvan không chỉ có trọng lượng phân tử thấp hơn mà còn giữ được cấu trúc sinh học đặc trưng, làm tăng khả năng hòa tan và nâng cao hiệu quả sinh học.

Trong số các phương pháp cắt mạch hiện nay, phương pháp sử dụng enzyme được đánh giá là ưu việt hơn so với các phương pháp hóa học và vật lý truyền thống. Đặc biệt, enzyme ulvan lyase có khả năng xúc tác phân giải chọn lọc các liên kết glycoside trong cấu trúc ulvan, giúp thu nhận các oligosaccharide có cấu trúc đặc hiệu và giữ nguyên các nhóm chức quan trọng.

Tuy nhiên, việc thu nhận ulvan lyase từ nguồn tự nhiên gặp nhiều khó khăn do sản lượng thấp và chi phí cao. Giải pháp hiệu quả được nhiều nghiên cứu áp dụng là sản xuất enzyme thông qua biểu hiện tái tổ hợp [2].

Hệ thống biểu hiện protein trên vi khuẩn *Escherichia coli* được sử dụng phổ biến trong sản xuất enzyme tái tổ hợp nhờ vào các ưu điểm như tốc độ sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy, hệ thống di truyền đơn giản, và chi phí thấp. Ngoài ra, *E. coli* còn cho phép thu nhận enzyme với hiệu suất cao và tính ổn định tốt, tạo điều kiện thuận lợi cho các nghiên cứu chuyên sâu về đặc tính xúc tác, cấu trúc phân tử và ứng dụng thực tế trong công nghiệp.

Xuất phát từ những cơ sở khoa học và thực tiễn nêu trên, đề tài "**Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia coli***" được thực hiện với mục tiêu là xác định các điều kiện thích hợp để biểu hiện và thu nhận enzyme ulvan lyase tái tổ hợp trên chủng *Escherichia coli* BL21(DE3).

Để đạt được mục tiêu trên, đề tài tập trung vào ba nội dung nghiên cứu chính:

1. Xác định điều kiện biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia coli*.
2. Nghiên cứu thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp.
3. Đánh giá hoạt tính enzyme và khả năng bẻ gãy mạch ulvan của ulvan lyase thu nhận được.

Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho việc sản xuất ulvan lyase tái tổ hợp quy mô phòng thí nghiệm, hướng đến ứng dụng trong sản xuất oligosaccharide ulvan có hoạt tính sinh học cao. Điều này góp phần phát triển các sản phẩm từ rong biển ở Việt Nam, đặc biệt trong lĩnh vực dược liệu biển, thực phẩm chức năng và sinh học phân tử.

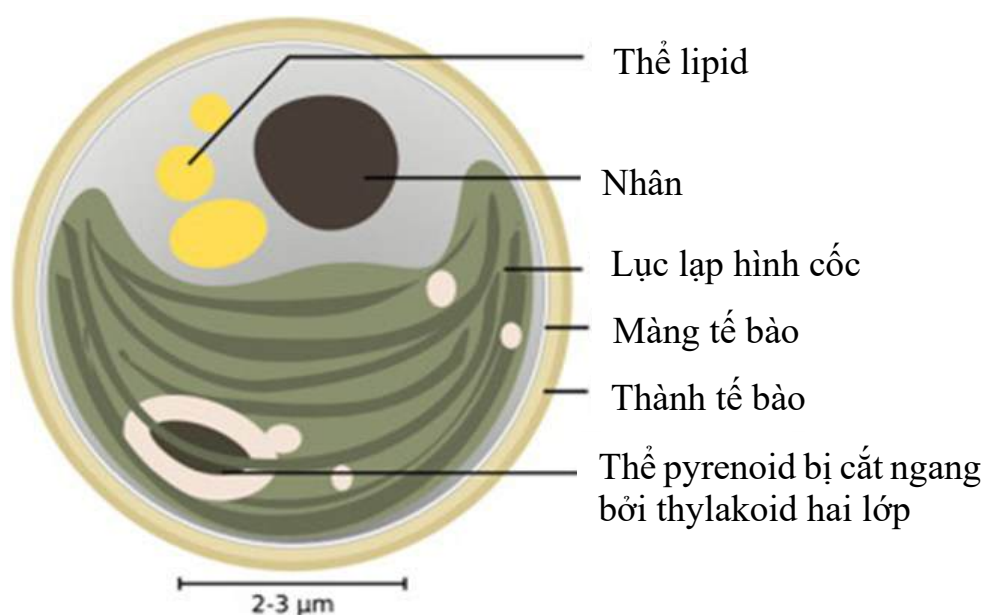
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ RONG LỤC VÀ ULVAN TỪ RONG LỤC

1.1.1. Giới thiệu chung về rong lục (Chlorophyta)

Rong lục (Chlorophyta) là một nhóm tảo lục thuộc giới thực vật, có màu xanh đặc trưng do chứa diệp lục a và b, giúp thực hiện quá trình quang hợp để sinh dưỡng. Rong lục có mặt phổ biến trong các môi trường nước ngọt và nước mặn trên khắp thế giới, đa dạng về hình dạng, kích thước, từ các loại nhỏ bé đơn bào (*Chlorella*, *Dunaliella*) đến các tảo lớn dạng dây (*Cladophora* spp.) hoặc tấm như tảo biển (*Ulva* spp.).

Về mặt cấu trúc, thành tế bào rong lục được cấu tạo bởi cellulose ở phía trong và pectin ở ngoài. Chất nguyên sinh tạo thành một lớp mỏng ở sát thành vỏ tế bào, ở giữa tế bào là một không bào lớn chứa đầy dịch bào. Thể sắc tố có dạng phiến, đai vành móng ngựa, hình sao nhiều cánh, hình xoắn lò xo, mắt lưới, hạt nhỏ, v.v. Sắc tố chủ yếu là chlorophyll a, chlorophyll b làm cho rong có màu xanh, β -caroten và 10 loại xanthophyll, trong thể sắc tố còn có các hạt tạo bột hình tròn nhỏ. Hạt tế bào thường nằm ở giữa khoang túi dịch bào, hay sát bên thành lớp nguyên sinh (**Hình 1.1**). Rong lục có ba kiểu sinh sản là: sinh sản dinh dưỡng, sinh sản vô tính và sinh sản hữu tính [3,4].



Hình 1.1 Cấu trúc tế bào rong lục *Ulva* spp. với các bào quan chính như nhân, lục lạp, thể pyrenoid, thể lipid, màng tế bào [3]

Rong lục có khả năng phân bố rộng rãi và xuất hiện ở nhiều môi trường khác nhau như nước ngọt, nước mặn, nước lợ, và cả trong các môi trường đất ẩm. Đặc biệt, ở vùng biển, rong lục thường phát triển mạnh ở khu vực ven bờ và các vùng cửa sông, nơi có điều kiện ánh sáng và nguồn dinh dưỡng dồi dào. Trong hệ sinh thái, rong lục đóng vai trò là nhà sản xuất sơ cấp quan trọng. Thông qua quá trình quang hợp, chúng tạo ra một lượng lớn oxy, đồng thời là nguồn dinh dưỡng quan trọng cho nhiều sinh vật khác, từ các động vật phù du đến cá và động vật thân mềm. Sự hiện diện của rong lục cũng góp phần cải thiện chất lượng nước bằng cách hấp thụ carbon dioxide và các hợp chất dinh dưỡng dư thừa, đồng thời giữ vai trò trong cân bằng sinh thái và bảo vệ môi trường sống tự nhiên [5].

Việt Nam có hệ sinh thái biển phong phú, là một trong những quốc gia có sự đa dạng sinh học biển cao nhất tại khu vực Biển Đông. Theo thống kê cập nhật, rong lục (Chlorophyta) chiếm 196 loài trong tổng số 878 loài thực vật biển được ghi nhận tại Việt Nam. Những loài này được tìm thấy phổ biến tại các hệ sinh thái ven biển như rạn san hô, đầm phá, và các bãi cát ngập nước [5]. Vùng ven biển miền Nam Trung Bộ được ghi nhận có sự đa dạng loài rong biển cao nhất, đặc biệt là tại các khu vực có mật độ rạn san hô lớn như vịnh Nha Trang, đảo Phú Quý và quần đảo Trường Sa. Đây là những khu vực có điều kiện môi trường thuận lợi như ánh sáng, nhiệt độ và nguồn dinh dưỡng phong phú, giúp các loài rong biển, đặc biệt là rong lục, phát triển mạnh. Trữ lượng rong lục tại Việt Nam được đánh giá là có tiềm năng khai thác lớn nhưng hiện nay vẫn chưa được khai thác một cách hiệu quả.

Về mặt đa dạng loài, các chi rong lục phổ biến nhất tại Việt Nam bao gồm:

- Chi *Ulva* (*Ulva lactuca*, *Ulva pertusa*, *Ulva intestinalis*, *Ulva fasciata*, *Ulva vietnamensis* – loài mới được phát hiện tại Việt Nam).
- Chi *Cladophora* (*Cladophora gracilis*, *Cladophora socialis*, *Cladophora vagabunda*).
- Chi *Caulerpa* (*Caulerpa lentillifera* – rong nho biển, *Caulerpa sertularioides*, *Caulerpa racemosa*).
- Chi *Codium* (*Codium fragile*, *Codium intricatum*).

- Chi *Chaetomorpha* (*Chaetomorpha linum*).

Đặc biệt, các loài thuộc chi *Ulva* không chỉ đóng vai trò quan trọng trong hệ sinh thái biển mà còn mang lại tiềm năng kinh tế lớn khi được khai thác trong các lĩnh vực như thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. *Ulva* thường được biết đến với tên gọi rau diếp biển, là một chi tảo lục ăn được, phân bố rộng rãi ở các vùng ven biển trên toàn thế giới. Trong số các loài phổ biến, *U. lactuca* được coi là đại diện tiêu biểu nhờ vào giá trị dinh dưỡng và khả năng sinh trưởng mạnh mẽ trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau (**Hình 1.2**) (www.biolib.cz/en).



Hình 1.2 Hình ảnh rong lục *Ulva* sp.

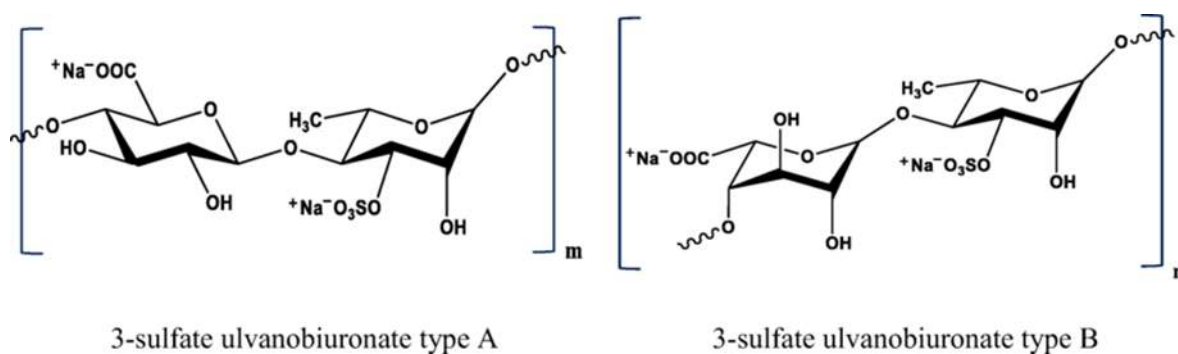
Bên cạnh giá trị dinh dưỡng, một trong những đặc điểm đáng chú ý nhất của các loài thuộc chi *Ulva* là khả năng tổng hợp và tích lũy ulvan – một polysaccharide sulfate hóa chiếm tỷ lệ cao trong thành tế bào của rong lục. Ulvan không chỉ đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc và chức năng sinh học của rong mà còn là hợp chất mang lại nhiều tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm chức năng và dược phẩm nhờ các hoạt tính sinh học phong phú. Đây chính là cơ sở quan trọng để các nghiên cứu tập trung vào việc khai thác và chuyển hóa ulvan nhằm phát triển các sản phẩm có giá trị cao từ nguồn tài nguyên rong lục.

1.1.2. Ulvan – sulfate polysaccharide từ rong lục

1.1.2.1. Thành phần hóa học và đặc điểm cấu trúc của ulvan

Ulvan được tìm thấy ở thành tế bào rong lục, chiếm từ 9% đến 36% khối lượng khô của rong *Ulva*. Ulvan có cấu trúc phức tạp hơn các polysaccharide tảo khác do thành phần monosaccharide, liên kết glycosid và các cấu tử ở vị trí phân nhánh của chúng. Thành phần chủ yếu là các đường rhamnose, xylose, glucuronic axit, iduronic axit và một lượng nhỏ galactose. Thành phần và hàm lượng của các gốc đường này có sự thay đổi khác nhau giữa các loài rong [6].

Cấu trúc của ulvan bao gồm các liên kết lặp lại của các disaccharide như axit ulvanobiuronic và ulvanobiose. Các loài *Ulva* khác nhau cho ulvan với cấu trúc của dạng chuỗi disaccharide lặp lại là khác nhau [7]. Các disaccharide được phân thành 2 dạng chính là dạng A (A3s) với β -D-GlcA nối với L-Rha3S tạo thành dimer qua liên kết glycoside (1 $\rightarrow$ 4) (β -D-GlcA-(1 $\rightarrow$ 4)-L-Rha3S) và dạng B (B3s) với sự có mặt của α -L-IdoA nối với α -L-Rha3S cũng qua liên kết glycoside ở vị trí (1 $\rightarrow$ 4) (Hình 1.3).



Hình 1.3 Cấu trúc hóa học của ulvan dạng A và dạng B [7]

Lahaye và cộng sự [7] đã nghiên cứu cấu trúc hóa học của ulvan từ loài rong lục *U. lactuca*, kết quả chỉ ra rằng polysaccharide được tạo thành bởi phần lớn là chuỗi liên kết glycoside ở Rha dạng (1 $\rightarrow$ 4) và (1 $\rightarrow$ 2,4) và Rha bị sulfate hóa ở vị trí carbon C-3, liên kết glycoside ở GlcA là β -(1 $\rightarrow$ 4)-, liên kết glycoside ở Xyl là (1 $\rightarrow$ 4)- và (1 $\rightarrow$ 3)- và xylose bị sulfate hóa ở vị trí carbon C-2. Gần đây, những số liệu nghiên cứu khẳng định lại sự có mặt của 2-sulfate Xyl trong phân tử ulvan và chứng minh là hầu hết các nhóm sulfate trong phân tử ulvan từ rong lục *Ulva* đều ở vị trí carbon C-3 hoặc C-2 của Rha-(1 $\rightarrow$ 4)-.

1.1.2.2. *Tính chất lý hóa của ulvan*

Ulvan là một polysaccharide sulfate hóa có khả năng hòa tan trong nước nóng ở nhiệt độ từ 80°C đến 90°C. Độ hòa tan của ulvan chịu ảnh hưởng bởi pH và hàm lượng ion, với khả năng hòa tan giảm trong môi trường axit hoặc khi có mặt các cation hóa trị II. Độ nhớt và độ bền của gel ulvan cũng phụ thuộc vào pH và loại cation trong dung dịch. Ở pH trung tính hoặc thấp, ulvan có xu hướng hình thành các cấu trúc hình cầu, làm giảm độ nhớt; trong khi đó, pH cao (~13) làm mở rộng cấu trúc, tăng cường tương tác giữa các phân tử [8].

Ulvan là polymer mang điện âm do chứa các nhóm carboxylic và sulfate, với tính chất phụ thuộc vào pH và nồng độ ion. Trong dung dịch, ulvan có khả năng tạo gel thông qua liên kết với ion Ca^{2+} và tạo thành cấu trúc borate ester, tương tự như cơ chế gel hóa của alginate [9].

1.1.2.3. *Hoạt tính sinh học của ulvan*

Ulvan là một hợp chất tiềm năng với nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, kháng vi-rút, điều hòa miễn dịch, chống tăng lipid máu, chống đông máu và ứng dụng trong kỹ thuật mô.

Hoạt tính chống oxy hóa: Ulvan có khả năng chống oxy hóa mạnh, liên quan đến hàm lượng sulfate và trọng lượng phân tử của nó. Nhiều loài rong như *U. lactuca*, *U. australis*, *U. rigida*, và *U. ohnoi* đã được báo cáo có hoạt tính chống oxy hóa đáng kể [10, 11, 12]. Các phương pháp đánh giá bao gồm khả năng bắt gốc tự do DPPH, hoạt tính khử sắt (FRAP), khả năng bắt gốc hydroxyl và ức chế quá trình peroxy hóa lipid [13]. Ulvan giúp giảm stress oxy hóa thông qua tăng cường hoạt động của enzyme chống oxy hóa như catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) và glutathione peroxidase (GPx) [14].

Hoạt tính chống viêm: Ulvan thể hiện khả năng chống viêm thông qua tác động đến hệ thống miễn dịch và ức chế cytokine tiền viêm như $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, và IFN- γ . Trong các nghiên cứu in vivo, ulvan giúp giảm viêm gan và hoại tử tế bào gan ở chuột bị gây viêm bằng D-Gal (500 mg/kg). Ulvan còn có tác dụng làm giảm hiệu quả sản xuất cytokine tiền viêm trong các tế bào thần kinh đệm nguyên phát bị nhiễm nhiều chủng virus viêm não Nhật Bản (JEV) [15].

Hoạt tính gây độc tế bào và chống ung thư: Ulvan từ *U. lactuca*, *U. australis*, *U. rigida*, và *U. ohnoi* đã được chứng minh có hoạt tính chống ung thư thông qua việc ức chế sự phát triển của các dòng tế bào ung thư như HepG2 (ung thư gan), MCF7 (ung thư vú), Caco-2 (ung thư đại tràng) và HeLa (ung thư cổ tử cung) [16, 17]. Ulvan giúp kích hoạt quá trình apoptosis trong tế bào ung thư thông qua con đường caspase-8 và caspase-9 [18].

Hoạt tính kháng khuẩn: Ulvan có khả năng ức chế một số vi khuẩn gây bệnh như *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Bordetella* sp., nhưng có hiệu quả thấp hơn với *Bacillus subtilis*, *Proteus* sp., *Salmonella* sp., và *Bacillus cereus* [19, 20]. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng sự khác biệt trong phương pháp chiết xuất, dung môi sử dụng và điều kiện sinh trưởng của rong có thể ảnh hưởng đến hiệu quả kháng khuẩn của ulvan [21].

Hoạt tính kháng vi-rút: Ulvan có khả năng kháng vi-rút thông qua việc ngăn chặn sự hấp thụ và xâm nhập của vi-rút vào tế bào chủ. Nó đã được thử nghiệm với vi-rút cúm A/PR/8/34 (H1N1) và vi-rút viêm não Nhật Bản (JEV). Các polysaccharide sulfate hóa trong ulvan có thể ức chế sự nhân lên của vi-rút và giảm viêm thần kinh do JEV gây ra [15].

Hoạt tính chống đông máu: Ulvan từ *U. fasciata* và *U. lactuca* đã được chứng minh có hoạt tính chống đông máu thông qua việc kéo dài thời gian đông máu trong các xét nghiệm APTT, PT và TT [22]. Hoạt tính này phụ thuộc vào hàm lượng sulfate và nhóm carboxyl trong ulvan.

Mặc dù ulvan có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, việc ứng dụng nó vẫn gặp một số hạn chế. Một trong những thách thức chính là trọng lượng phân tử lớn của ulvan, làm giảm khả năng thâm nhập vào tế bào và ảnh hưởng đến tính khả dụng khi sử dụng trong các ứng dụng dược phẩm. Hơn nữa, khả năng hòa tan trong nước của ulvan thay đổi tùy thuộc vào phương pháp chiết xuất, ảnh hưởng đến hiệu quả sinh học của nó.

Đã có nhiều nghiên cứu tập trung vào việc điều chế oligosaccharide có nguồn gốc từ ulvan nhằm cải thiện tính sinh khả dụng và hoạt tính sinh học. Hiện nay, các phương pháp thủy phân hóa học và phân giải enzyme đã được phát triển. Đặc biệt, phương pháp sử dụng enzyme ulvan lyase nổi bật với các ưu điểm như điều kiện phản ứng nhẹ nhàng, tính đặc hiệu cao và khả năng duy

trì cấu trúc nguyên bản của ulvan. Điều này góp phần tạo ra oligosaccharide ulvan có tiềm năng ứng dụng vượt trội [23].

1.2. TỔNG QUAN VỀ ULVAN LYASE

1.2.1. Nguồn gốc và phân loại ulvan lyase

1.2.1.1. Nguồn gốc của ulvan lyase

Ulvan lyase là một enzyme thuộc nhóm polysaccharide lyase (PL), có khả năng xúc tác quá trình phân cắt ulvan – một polysaccharide cấu tạo chủ yếu từ rhamnose 3-sulfate (Rha3S), axit D-glucuronic (GlcA) hoặc axit L-iduronic (IduA). Ulvan lyase hoạt động theo cơ chế loại bỏ liên kết β (β -elimination), tạo ra các oligosaccharide với nhóm axit uronic không bão hòa ở đầu không khử.

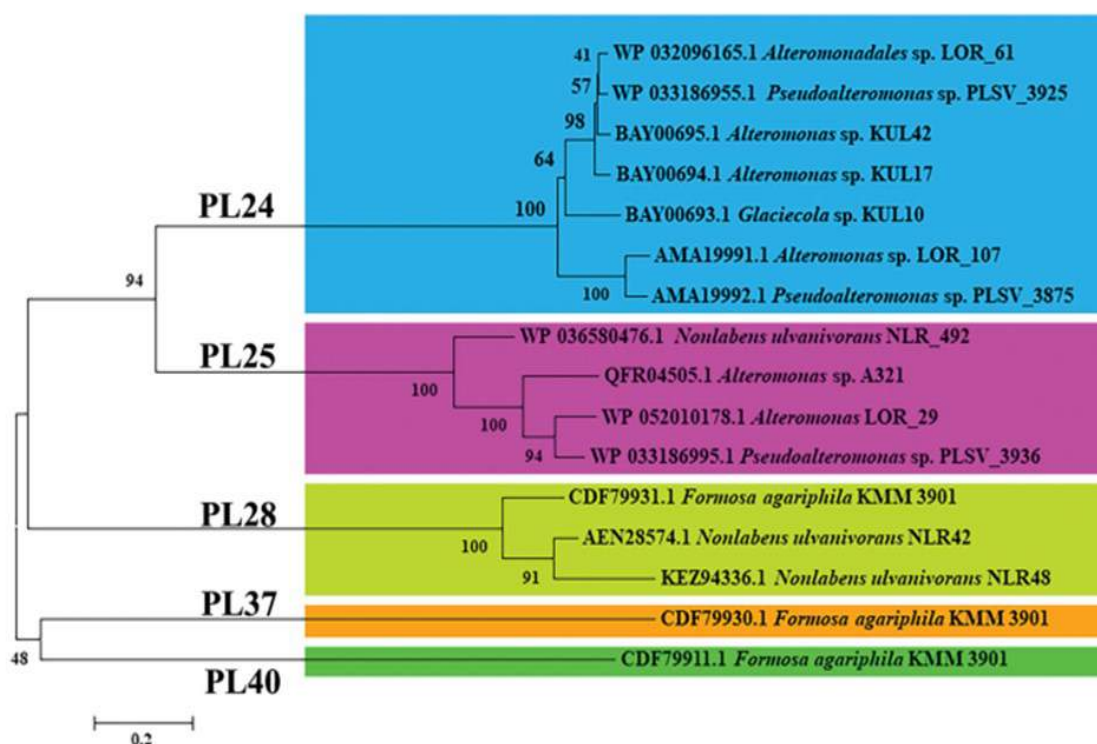
Ulvan lyase chủ yếu được phân lập và tinh sạch từ động vật biển và vi khuẩn biển. Một số nghiên cứu đã xác định vi khuẩn có khả năng phân giải ulvan từ hệ vi sinh vật đường ruột của động vật biển. Chẳng hạn, Olivier Coste và cộng sự [23] đã sàng lọc và xác định các vi khuẩn có hoạt tính ulvan lyase từ ruột của loài giáp xác biển *Gammarus insensibilis*. Trong khi đó, Chuan He và cộng sự [24] đã phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng phân cắt ulvan thành oligosaccharide từ phân của động vật biển nhỏ.

Mặc dù một số ulvan lyase có nguồn gốc từ động vật biển, nhưng phần lớn enzyme này được phân lập từ vi khuẩn biển. Moran và William [25] đã thu được bốn enzyme có khả năng phân giải ulvan từ ba chủng vi khuẩn thuộc bộ Alteromonadales, bao gồm *Alteromonas* LOR, *Alteromonas* LTR và *Pseudoalteromonas* PLSV. Dựa trên nghiên cứu này, Elizabeth Foran và cộng sự [25] đã tiếp tục phân lập và tinh sạch một loại ulvan lyase mới từ *Alteromonas* LOR thông qua cơ chế Polysaccharide Utilization Loci (PUL).

Các vi khuẩn sinh ulvan lyase đã được xác định bao gồm các chi chủ yếu như *Alteromonas*, *Formosa agariphila*, *Glaciecola*, *Pseudoalteromonas*, *Catenovulum maritimum* và *Nonlabens ulvanivorans*. Những vi khuẩn này đóng vai trò quan trọng trong quá trình phân hủy ulvan và là nguồn chính để sản xuất ulvan lyase phục vụ nghiên cứu và ứng dụng công nghiệp.

1.2.1.2. Phân loại ulvan lyase

Dựa trên đặc tính xúc tác, ulvan lyase được chia thành hai nhóm chính: **Glucuronic ulvan lyase (EC 4.2.2.-)**: Phân cắt liên kết giữa Rha3S và GlcA và **Iduronic ulvan lyase (EC 4.2.2.-)**: Phân cắt liên kết giữa Rha3S và IduA. Các nghiên cứu hiện tại chưa ghi nhận sự tồn tại của ulvan lyase có khả năng phân cắt ulvanobiose loại U (*U3s*), chứa β -D-xylose-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnose-3-sulfate, hoặc ulvanobiose loại U' (*U2's3s*), chứa β -D-xylose-2-sulfate-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-rhamnose-3-sulfate. Điều này đặt ra những thách thức và cơ hội trong nghiên cứu nhằm tìm kiếm các enzyme mới có khả năng phân giải hoàn toàn ulvan [26]. Dựa trên phân tích trình tự axit amin, ulvan lyase được xếp vào năm họ enzyme trong cơ sở dữ liệu CAZy (**Hình 1.4**).



Hình 1.4 Cây phát sinh phân loài của ulvan lyase từ các họ polysaccharide lyase khác nhau [25]

PL24: Được tìm thấy ở các loài *Alteromonas* sp. (KUL17, KUL42, LOR_107, LOR_61), *Glaciecola* sp. (KUL10), *Pseudoalteromonas* sp. (PLSV_3875, PLSV_3925).

PL25: Được phát hiện trong *Alteromonas* sp. (A321, LOR), *Nonlabens ulvanivorans* (NLR), *Pseudoalteromonas* sp. (PLSV).

PL28: Xuất hiện trong *Formosa agariphila* KMM 3901 và một số vi khuẩn biển khác.

PL37 và PL40: Được tìm thấy trong *Formosa agariphila* KMM 3901, nhưng ít phổ biến hơn.

1.2.2. Phương pháp thu nhận ulvan lyase

Ulván lyase là một enzyme quan trọng có khả năng phân cắt polysaccharide sulfate hóa ulvan thành các oligosaccharide có nhiều hoạt tính sinh học. Hiện nay, việc thu nhận ulvan lyase có thể được thực hiện theo hai phương pháp chính: (1): Phân lập và tinh sạch từ vi khuẩn phân giải ulvan tự nhiên, (2): Biểu hiện tái tổ hợp enzyme bằng công nghệ DNA tái tổ hợp.

1.2.2.1. Phân lập và tinh sạch ulvan lyase từ vi khuẩn tự nhiên

Vi khuẩn có khả năng sinh ulvan lyase chủ yếu thuộc các chi *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Catenovulum*, *Glaciecola*, *Formosa* và *Nonlabens*. Các chủng này thường được tìm thấy trong môi trường biển, đặc biệt là trong hệ vi sinh vật đường ruột của động vật biển hoặc môi trường nước biển giàu tảo lục.

Quy trình phân lập và tinh sạch ulvan lyase từ vi khuẩn tự nhiên bao gồm các bước chính sau:

- Phân lập vi khuẩn: Mẫu nước biển, trầm tích hoặc ruột động vật biển được thu thập và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có chứa ulvan làm nguồn carbon duy nhất để sàng lọc vi khuẩn có khả năng phân giải ulvan.
- Tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh ulvan lyase: Các chủng có khả năng phân hủy ulvan được xác định dựa trên vùng phân giải trên môi trường nuôi cấy hoặc đo hoạt tính enzyme trong dịch nuôi cấy lỏng.
- Tinh sạch enzyme: Ulvan lyase được thu nhận từ dịch nuôi cấy bằng các phương pháp tủa amoni sulfate, sắc ký trao đổi ion, sắc ký lọc gel hoặc sắc ký ái lực để đạt độ tinh sạch cao.
- Xác định đặc tính enzyme: Enzyme sau khi tinh sạch được kiểm tra về hoạt tính, pH tối ưu, nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt để đánh giá khả năng ứng dụng trong công nghiệp.

Mặc dù phương pháp này giúp thu nhận enzyme từ nguồn tự nhiên, nhưng nó gặp một số hạn chế như hiệu suất thấp, quy trình tinh sạch phức tạp, và khó duy trì nguồn enzyme ổn định. Do đó, phương pháp biểu hiện tái tổ hợp ngày càng được ứng dụng phổ biến hơn.

1.2.2.2. *Biểu hiện tái tổ hợp enzyme bằng công nghệ DNA tái tổ hợp*

Tất cả các ulvan lyase đã được đăng ký trên cơ sở dữ liệu CAZy (Carbohydrate-Active EnZymes; www.cazy.org) đều thuộc nhóm enzyme tái tổ hợp, nhấn mạnh vai trò quan trọng của công nghệ này trong nghiên cứu và ứng dụng enzyme phân giải polysaccharide. Để đảm bảo quá trình thu nhận ulvan lyase với hiệu suất cao, việc tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện là cần thiết nhằm cải thiện mức độ tổng hợp protein, độ ổn định của enzyme và tinh sạch dễ dàng.

Các yếu tố chính ảnh hưởng đến hiệu suất biểu hiện ulvan lyase bao gồm:

- **Môi trường nuôi cấy và nồng độ chất cảm ứng:** Ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ tổng hợp protein và khả năng hòa tan của enzyme.
- **Thời gian cảm ứng:** Quyết định hiệu suất biểu hiện tối đa của enzyme mà không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn chủ.
- **Nhiệt độ biểu hiện:** Ảnh hưởng đến cấu trúc bậc ba của enzyme, độ hòa tan và khả năng hoạt động sinh học của ulvan lyase.

Các yếu tố này được trình bày chi tiết trong **Bảng 1.1**, cung cấp cơ sở để tối ưu hóa điều kiện biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp nhằm phục vụ nghiên cứu và ứng dụng công nghiệp.

Bảng 1.1 Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp

GeneBank	Chủng vi khuẩn mang gene ulvan lyase	Chủng biến nạp	Điều kiện biểu hiện/ cảm ứng	Thu nhận protein	TLTK
PL24					
BAY00694.1	<i>Alteromonas</i> sp. KUL17	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	1 mM IPTG, 20 °C, 4 h	Dịch nội bào	[24]

BAY00695.1	<i>Alteromonas</i> sp. KUL42	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	1 mM IPTG, 20 °C, 4 h	Dịch nội bào	[24]
AMA19991.1	<i>Alteromonas</i> sp. LOR_107	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0.5 mM IPTG, 16 °C, 18 h	Dịch nội bào	[25, 27]
WP_0320961 65.1	<i>Alteromonas</i> sp. LOR_61	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0.5 mM IPTG, 16 °C, 18 h	Dịch nội bào	[25]
BAY00693.1	<i>Glaciecola</i> sp. KUL10	<i>E. coli</i> BL2 1 (DE3)		Dịch nội bào	[25]
AMA19992.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.PLSV_3875	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	0.2 mM IPTG, 16– 18 h, 16 °C	Dịch nội bào	[25, 28]
PL25					
QFR04505.1	<i>Alteromonas</i> sp. A321	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	1 mM IPTG, 28 °C, 18 h	Dịch nội bào	[29]
WP_0331869 95.1	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. PLSV_3936	<i>E. coli</i> BL21	IPTG, 16– 18°C	Dịch nội bào	[30]
WP_0520101 78.1	<i>Alteromonadale</i> s sp. LOR_29	<i>E. coli</i>	IPTG, 16°C–25°C	Dịch nội bào	[30]
WP_0365804 76.1	<i>Nonlabens</i> <i>ulvanivorans</i> NLR_492	<i>E. coli</i>	IPTG, 16°C–25°C	Dịch nội bào	[31]
PL28					
CDF79931.1	<i>Formosa</i> <i>agariphila</i> KMM 3901	<i>E. coli</i>		Dịch nội bào	[32]
KEZ94336.1	<i>Nonlabens</i> <i>ulvanivorans</i> NLR48	<i>E. coli</i> . BL21 (DE3)	0.5 mM IPTG, 16 h, 18 °C	Dịch nội bào	[33]

WP_1396985 91	<i>Tamlana fucoidanivorans</i> CW2-9	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	IPTG	Dịch nội bào	[34]
PL37					
CDF79930.1	<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	<i>E. coli</i> BL2 1 (DE3)	0.2 mM IPTG, 16 h, 16 °C	Dịch nội bào	[35]
PL40					
CDF79911.1	<i>Formosa agariphila</i> KMM 3901	<i>E. coli</i>	IPTG, 16- 20°C	Dịch nội bào	[36]

Phương pháp biểu hiện tái tổ hợp mang lại nhiều ưu điểm như hiệu suất thu hồi cao, quy trình tinh sạch đơn giản, khả năng kiểm soát quá trình sản xuất, và tạo ra enzyme có độ bền cũng như hoạt tính ổn định. Trong đó, hệ thống *E. coli* là lựa chọn phổ biến nhất nhờ vào các đặc điểm như tốc độ sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy, chi phí thấp và có sẵn nhiều vector biểu hiện thương mại, giúp tối ưu hóa quy trình sản xuất ulvan lyase ở quy mô công nghiệp.

1.2.3. Đặc tính xúc tác của ulvan lyase

Ulvan lyase là enzyme thuộc nhóm polysaccharide lyase, có khả năng phân cắt liên kết glycosid giữa rhamnose-3-sulfate (Rha3S) và axit glucuronic (GlcA) hoặc axit iduronic (IdoA) trong cấu trúc ulvan thông qua cơ chế loại bỏ β . Các đặc tính xúc tác của enzyme này chịu ảnh hưởng bởi nhiệt độ, pH, ion kim loại, và đặc điểm cấu trúc của trung tâm hoạt động.

1.2.3.1. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt động của ulvan lyase

Nhiệt độ và pH là hai yếu tố quan trọng quyết định hoạt tính và độ ổn định của ulvan lyase. Enzyme này thể hiện hoạt tính tối ưu trong khoảng pH 7,5 – 9,0, phù hợp với điều kiện kiềm nhẹ của môi trường biển và hệ vi sinh đường ruột của sinh vật biển, nơi chứa nhiều vi khuẩn sinh enzyme này [37]. Đây là bằng chứng cho thấy quá trình tiến hóa đã giúp vi khuẩn biển thích nghi với điều kiện môi trường có độ pH cao hơn so với vi khuẩn từ các hệ sinh thái khác.

Nhiệt độ tối ưu của ulvan lyase dao động từ 30°C đến 50°C, phụ thuộc vào nguồn gốc enzyme. Một số nghiên cứu đã xác định nhiệt độ tối ưu của các enzyme này từ các họ polysaccharide lyase khác nhau. Cụ thể, enzyme *Alteromonas sp. LOR_107* (họ PL24) có nhiệt độ tối ưu là 40°C [25], trong khi *Pseudoalteromonas sp. PLSV_3875* hoạt động mạnh nhất ở 35°C [28]. Enzyme từ *PLSV_3875* có độ ổn định cao hơn so với *LOR_107*, vì nó vẫn duy trì 100% hoạt động sau 24 giờ ở 30°C, trong khi *LOR_107* chỉ còn 10% hoạt động trong cùng điều kiện. Trong nhóm PL25, enzyme từ *Alteromonas sp. A321* có nhiệt độ tối ưu cao hơn, đạt 50°C [29], trong khi enzyme *FaPL37* từ *Formosa agariphila KMM 3901* thuộc họ PL37 hoạt động tối ưu ở 40°C [35]. Enzyme từ *Alteromonadales sp. LOR_29* có hoạt tính cao nhất ở 45°C [38].

Một số enzyme ulvan lyase có thể chịu nhiệt cao hơn nhưng có độ ổn định nhiệt kém. Ví dụ, enzyme *NLR42* từ *Nonlabens ulvanivorans* có nhiệt độ tối ưu là 50°C, nhưng mất hơn 75% hoạt tính trong vòng 5 phút, cho thấy khả năng chịu nhiệt thấp. Ngược lại, khi ủ ở 30°C trong 2 giờ, enzyme này không có sự suy giảm đáng kể về hoạt tính, cho thấy nó nhạy cảm với nhiệt độ cao nhưng ổn định hơn ở nhiệt độ trung bình [39].

1.2.3.2. Ảnh hưởng của ion kim loại và chất hoạt động bề mặt

Sự có mặt của ion kim loại và chất hoạt động bề mặt có thể kích hoạt hoặc ức chế hoạt động của ulvan lyase, ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng xúc tác của enzyme. Một số ion kim loại có tác dụng tăng cường hoạt tính enzyme, trong khi các ion kim loại khác có thể làm giảm hoặc bất hoạt hoàn toàn enzyme này.

Một số ion kim loại có vai trò kích hoạt ulvan lyase, giúp gia tăng đáng kể hoạt tính enzyme. Chẳng hạn, enzyme PL24 từ *Pseudoalteromonas sp. PLSV_3875* tăng hoạt tính lên 45% khi có Ca^{2+} và 60% khi có Co^{2+} , cho thấy các ion này đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định cấu trúc enzyme và tối ưu hóa hoạt động xúc tác [40]. Tương tự, enzyme ALT3695 từ *Alteromonas sp. A321* cũng cho thấy sự gia tăng hoạt tính khi có mặt Ca^{2+} , Mg^{2+} và Ba^{2+} , chứng tỏ các ion này có thể tham gia vào cơ chế hoạt động hoặc cấu trúc của enzyme, cải thiện hiệu suất phân cắt ulvan.

Ngược lại, một số ion kim loại lại có tác động ức chế hoạt động của ulvan lyase. Enzyme PL24 từ *Pseudoalteromonas* sp. PLSV_3875 bị ức chế khi có Mn^{2+} , Zn^{2+} , đồng thời hoạt tính cũng giảm khi có mặt EDTA, cho thấy enzyme này có thể phụ thuộc vào các ion kim loại để duy trì cấu trúc và chức năng xúc tác [40]. Enzyme ALT3695 từ *Alteromonas* sp. A321 bị giảm hoạt tính đáng kể khi có mặt Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} ở nồng độ thấp và bị bất hoạt hoàn toàn khi tiếp xúc với Cd^{2+} , Hg^{2+} và Fe^{3+} , cho thấy sự nhạy cảm của enzyme đối với các ion kim loại nặng. Ngoài ra, enzyme FaPL28 từ *Formosa agariphila* KMM 3901 có hoạt tính tăng 70% khi có NaCl ở nồng độ 100–200 mM, nhưng lại giảm khi nồng độ NaCl quá cao, cho thấy nồng độ ion trong môi trường phản ứng cần được kiểm soát để tối ưu hóa hoạt tính enzyme.

Những nghiên cứu này cho thấy ulvan lyase có sự khác biệt đáng kể về nhiệt độ hoạt động và độ ổn định nhiệt tùy theo nguồn gốc enzyme. Điều này đóng vai trò quan trọng trong việc lựa chọn enzyme phù hợp cho các ứng dụng công nghiệp, đặc biệt là khi cần tối ưu hóa điều kiện hoạt động trong các quy trình sản xuất oligosaccharide ulvan hoặc phân tích cấu trúc polysaccharide.

Những kết quả này nhấn mạnh vai trò quan trọng của Ca^{2+} trong việc kích hoạt ulvan lyase, đồng thời chỉ ra rằng các ion nặng như Cd^{2+} , Hg^{2+} và Fe^{3+} có thể bất hoạt enzyme hoàn toàn. Hiểu rõ ảnh hưởng của các ion kim loại đến ulvan lyase giúp tối ưu hóa điều kiện xúc tác và cải thiện hiệu suất enzyme trong các ứng dụng công nghiệp.

1.3. TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG CỦA ULVAN LYASE

Ulván lyase ngày càng thu hút sự quan tâm rộng rãi nhờ vào tiềm năng ứng dụng đa dạng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Enzyme này không chỉ đóng vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất oligosaccharide ulvan, mà còn góp phần phân tích cấu trúc ulvan cũng như hỗ trợ chiết xuất các hợp chất có giá trị từ rong lục.

1.3.1. Sản xuất oligosaccharide ulvan

Một trong những ứng dụng quan trọng nhất của ulvan lyase là sản xuất oligosaccharide ulvan thông qua quá trình phân cắt ulvan thành các đoạn oligosaccharide có hoạt tính sinh học cao. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng oligosaccharide ulvan có thể mang lại nhiều lợi ích sinh học quan trọng:

Kháng virus: Chi và cộng sự phát hiện rằng oligosaccharide ulvan được phân giải bằng ulvan lyase thuộc họ PL25 có khả năng ức chế sự lây nhiễm và nhân lên của vi-rút viêm miệng mụn nước (*vesicular stomatitis virus - VSV*) ở nồng độ 100 µg/mL [41].

Chống viêm và kích thích tăng sinh tế bào: Kidgell và cộng sự cho thấy ulvan có khối lượng phân tử thấp có thể thúc đẩy sự tăng sinh tế bào và ức chế phản ứng viêm, tạo tiềm năng ứng dụng trong y dược [42].

Chống oxy hóa, chống ung thư và điều hòa miễn dịch: Oligosaccharide ulvan còn được ghi nhận có khả năng chống oxy hóa, ức chế sự phát triển của tế bào ung thư, và tăng cường điều hòa miễn dịch, mở ra cơ hội ứng dụng trong điều trị bệnh và sản xuất thực phẩm chức năng [43, 44].

Hoạt tính sinh học của oligosaccharide ulvan phụ thuộc vào cấu trúc hóa học, trong đó khối lượng phân tử và mức độ sulfate hóa đóng vai trò quan trọng trong việc xác định các đặc tính sinh học của hợp chất này [45, 46].

So với phương pháp hóa học và vật lý, việc sản xuất oligosaccharide ulvan bằng enzym ulvan lyase có nhiều ưu điểm như điều kiện phản ứng nhẹ, hiệu suất cao, thu được sản phẩm đặc hiệu và không tạo sản phẩm phụ có hại. Do đó, phương pháp thủy phân enzym sẽ là xu hướng tiềm năng trong sản xuất oligosaccharide ulvan phục vụ cho y dược, thực phẩm chức năng và mỹ phẩm trong tương lai.

1.3.2. Ứng dụng trong phân tích cấu trúc ulvan

Bên cạnh vai trò trong sản xuất oligosaccharide, ulvan lyase còn được sử dụng để phân tích cấu trúc ulvan, giúp làm sáng tỏ mối quan hệ giữa thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của polysaccharide này.

Chi và cộng sự [47] đã sử dụng ulvan lyase thuộc họ PL25 để khám phá cấu trúc tinh vi của ulvan, cung cấp thông tin quan trọng về sự phân bố monosaccharide và liên kết hóa học trong phân tử. Ulvan lyase cũng có thể hỗ trợ quá trình chiết xuất protein từ rong lục, giúp gia tăng hiệu suất thu nhận protein có giá trị từ *U. lactuca* [48].

Ngoài ra, oligosaccharide ulvan sau khi được phân cắt bởi ulvan lyase có thể tiếp tục được thủy phân thành monosaccharide bởi các enzyme thuộc họ

GH105, tạo điều kiện thuận lợi cho việc nghiên cứu sâu hơn về sản phẩm phân giải của ulvan [49].

1.3.3. Tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm

Nhờ vào khả năng tạo ra oligosaccharide ulvan có tính sinh học cao, ulvan lyase mở ra nhiều cơ hội ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Oligosaccharide ulvan sau khi được phân giải có kích thước nhỏ hơn, dễ hấp thu hơn và mang lại nhiều lợi ích sinh lý quan trọng như:

Ứng dụng trong thực phẩm: Oligosaccharide ulvan có thể được bổ sung vào thực phẩm chức năng để hỗ trợ sức khỏe tiêu hóa, tăng cường miễn dịch và cải thiện chuyển hóa lipid.

Ứng dụng trong dược phẩm: Oligosaccharide ulvan có tiềm năng hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến stress oxy hóa, rối loạn miễn dịch và viêm nhiễm, đặc biệt là trong lĩnh vực điều trị bệnh tim mạch và ung thư.

Ứng dụng trong mỹ phẩm: Nhờ vào đặc tính giữ ẩm, chống oxy hóa và bảo vệ tế bào, oligosaccharide ulvan có thể được sử dụng trong các sản phẩm chăm sóc da và chống lão hóa.

Mặc dù ulvan lyase có nhiều tiềm năng ứng dụng, nhưng hầu hết các enzyme hiện nay vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu của sản xuất công nghiệp do thiếu thông tin về trình tự gen, độ ổn định và hoạt tính enzyme còn thấp. Do đó, trong tương lai, việc tối ưu hóa đặc tính enzyme, hoàn thiện dữ liệu trình tự gen và cải tiến công nghệ sản xuất ulvan lyase tái tổ hợp sẽ là những hướng nghiên cứu quan trọng nhằm nâng cao ứng dụng của enzyme này trong nhiều lĩnh vực.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Chúng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp có Plasmid pET-28a (+) mang gene *P30_PL28* mã hoá ulvan lyase mã số (WP_038530530) và có nguồn gốc từ vi khuẩn biển *Formosa agariphila* KMM 3901^T.

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-faly được đặt tên dựa trên ba thành phần chính: *E. coli* BL21 (DE3) là chủng vi khuẩn biểu hiện; pET-28a(+) là vector biểu hiện chứa promoter T7; faly là tên mã gene. Chủng vi khuẩn này đã được tạo dòng thành công trong khuôn khổ thực hiện của đề tài mã số VAST06.01/23-24. Chủng này được đặt tên là *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)-faly và ulvan lyase biểu hiện bởi chủng vi khuẩn này được đặt tên là Faly.

2.1.2. Vật liệu nghiên cứu

Ulván từ 02 loài rong lục *U. lactuca* và *U. papenfussii* đã được điều chế và tinh sạch, do nhóm nghiên cứu của phòng Hóa phân tích và Phát triển công nghệ, Viện Hải dương học cung cấp.

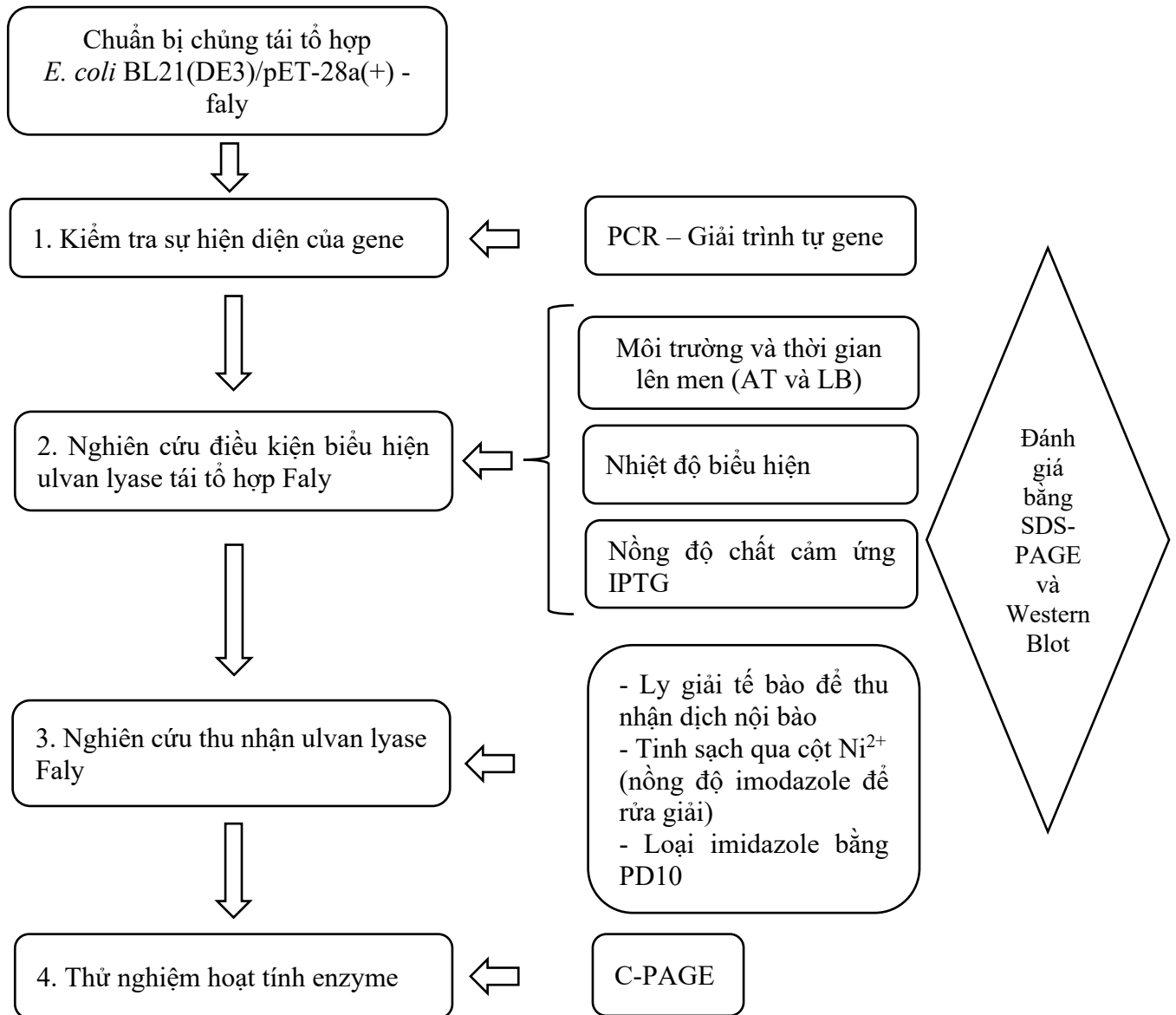
Môi trường vi sinh, hóa chất được cung cấp bởi hãng Merk, Sigma (Phụ lục 1).

Môi trường nuôi cấy: LB (Lysogeny Broth), AT (Autoinduction Medium) (Phụ lục 2).

Dụng cụ phân tích và thiết bị: Máy ly tâm lạnh, thiết bị điện di SDS-PAGE, Western blot, máy đo UV-VIS, hệ thống sắc ký HisTrap HP Ni²⁺.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đề tài được thực hiện theo sơ đồ nghiên cứu tổng quát như sau:



Hình 2.1 Sơ đồ nghiên cứu tổng quát của đề tài

2.2.1. Phương pháp kiểm tra sự hiện diện và khả năng biểu hiện của gene mã hóa ulvan lyase trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp

2.2.1.1. Kiểm tra sự hiện diện của gene *P30_PL28* trong chủng vi khuẩn tái tổ hợp

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng chủng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp mang plasmid pET-28a (+) chứa gene *P30_PL28* (Faly), mã hóa enzyme ulvan lyase. Gene *P30_PL28* có chiều dài 1.324 bp, được thiết kế để biểu hiện trong hệ thống vi khuẩn *E. coli* với sự điều hòa bởi promoter T7.

Trước khi tiến hành các thí nghiệm biểu hiện protein, chúng tôi kiểm tra sự hiện diện của gene *P30_PL28* trong plasmid tái tổ hợp của chủng *E. coli*

BL21(DE3) nhằm xác nhận thành công của quá trình tạo dòng. Vi khuẩn Faly được nuôi cấy trên môi trường thạch LB bổ sung kanamycin (100 µg/mL) để chọn lọc các dòng mang plasmid. Các khuẩn lạc phát triển riêng rẽ trên đĩa thạch được lựa chọn để thực hiện PCR khuếch đại gene *P30_PL28*. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu như sau:

- Mồi xuôi (Forward primer): 5'-
AATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCAT-3'
- Mồi ngược (Reverse primer): 5'-
CATGGTTAATTCTCCTGTTAGCCCCAAAAA-3'

Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kích thước (~1.324 bp), sau đó được tinh sạch và gửi giải trình tự để xác nhận chính xác sự hiện diện và toàn vẹn của gene *P30_PL28* so với trình tự tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank.

2.2.1.2. Phương pháp biểu hiện enzyme tái tổ hợp

Sau khi xác nhận gen mục tiêu đã được tạo dòng thành công, quá trình biểu hiện protein được tiến hành theo các bước sau:

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-faly được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 100 µg/mL kanamycin và 0,05% (w/v) arabinose ở 37°C, với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong điều kiện ủ qua đêm. Sau đó, dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường LB mới theo tỷ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi lắc ở 37°C với cùng tốc độ cho đến khi OD₆₀₀ đạt từ 0,6 đến 0,8. Khi mật độ tế bào đạt ngưỡng mong muốn, quá trình cảm ứng được thực hiện bằng cách bổ sung 2 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Hỗn hợp tiếp tục được nuôi lắc ở 20°C với tốc độ 180 vòng/phút trong 1 giờ. Sau thời gian cảm ứng, sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm ở 7.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Sự biểu hiện của ulvan lyase được đánh giá bằng điện di hỗn hợp sinh khối tế bào theo SDS-PAGE và Western Blot [50].

Kết thúc quá trình biểu hiện, tiến hành ly tâm dịch lên men (7.000 vòng/phút, 15 phút, 4°C) để thu nhận sinh khối tế bào. Huyền phù sinh khối tế bào trong dịch đệm 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7,4, sau đó bổ sung thêm lysozyme 0,2 mg/ml để hỗ trợ quá trình phá vỡ tế bào.

Các tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm (UP400S Hielscher, Teltow, Germany) chu kỳ 0,5 và cường độ 100% trong 2 phút, sau đó để ở nhiệt độ phòng 15 phút. Dịch nội bào được thu nhận bằng cách ly tâm thu dịch nổi (19.000 vòng/phút, 4°C, 20 phút), dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,22 µm để loại xác tế bào. Phần dịch nội bào thu nhận được tiến hành đo hàm lượng protein theo phương pháp Bradford với chất chuẩn là albumin huyết thanh bò [50].

Phần dịch lên men (canh trường), dịch ngoại bào (phần dịch bên ngoài tế bào) và dịch nội bào (phần dịch bên trong tế bào) đều được thu nhận xác định vị trí thu nhận enzyme bằng SDS-PAGE và Western Blot.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến điều kiện biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp

Hai môi trường khác nhau gồm LB (yeast extract 0,5%, peptone 1,0%, NaCl 1,0%, pH 7,5) và môi trường tự cảm ứng AT (0,6% w/w Na₂HPO₄; 0,3% w/w KH₂PO₄; 2,0% w/w tryptone; 0,5% w/w yeast extract; 0,5% w/w NaCl; 0,06% v/v glycerol; 0,05% w/v glucose và 0,04% w/v α-lactose, pH 7,5) được khảo sát cho sự biểu hiện gene mã hóa ulvan lyase. Đối với môi trường LB được thực hiện theo các thông số của điều kiện chuẩn nêu trên; đối với môi trường AT, quá trình cấy chuyển từ ống 5 ml sang môi trường biểu hiện AT được thực hiện ở 20°C, 180 vòng/phút. Song song với quá trình khảo sát điều kiện môi trường biểu hiện, tiến hành kiểm tra sự biểu hiện ulvan lyase theo thời gian với các mốc thời gian là 5 giờ, 10 giờ, 15 giờ và 20 giờ. Môi trường và thời gian biểu hiện sự phù hợp được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Sự biểu hiện của ulvan lyase bằng điện di hỗn hợp sinh khối tế bào theo SDS-PAGE và Western Blot.

Đối với môi trường biểu hiện được lựa chọn, nồng độ chất cảm ứng được khảo sát là IPTG từ 0,5 - 3,0 mM, nhiệt độ biểu hiện được đánh giá tại các điểm 14°C; 16°C; 18°C; 20°C; 25°C và 30°C. Sự biểu hiện của ulvan lyase được đánh giá thông qua kết quả điện di hỗn hợp sinh khối tế bào theo phương pháp SDS-PAGE và Western Blot.

2.2.3. Tinh sạch protein ulvan lyase bằng phương pháp sắc ký ái lực

Enzyme được tinh sạch bằng hệ thống cột Ni²⁺ Sepharose HisTrap HP (GE Healthcare, Uppsala, Thụy Điển), với chất rửa giải là imidazole nồng độ

20 - 500 mM (không liên tục) trong dịch đệm 20 mM Tris-HCl, NaCl 250 mM, pH 7,4. Phân đoạn có hàm lượng protein cao được thu nhận và kiểm tra độ sạch thông qua kỹ thuật SDS-PAGE.

Sau khi qua cột, phân đoạn chứa enzyme mục tiêu được loại imidazole bằng cột PD10 (GE Healthcare, USA) trong đệm UB4 20mM, pH 8.0 và 250 mM NaCl, dựa trên quy trình của nhà sản xuất. Enzyme tinh sạch được xác định nồng độ protein, chia nhỏ vào các ống eppendorf và giữ ở -80°C cho thí nghiệm tiếp theo.

2.2.4. Phương pháp thử nghiệm hoạt tính ulvan lyase tái tổ hợp

2.2.4.1. Thử nghiệm hoạt tính enzyme bằng phương pháp điện di C-PAGE (Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Hỗn hợp phản ứng chứa dung dịch enzyme có nồng độ 0,05 g/l trong môi trường đệm UB4 20 mM, pH 8,0, 250 mM NaCl và 10 mM CaCl₂ (đệm A), và 1% w/v ulvan (cơ chất ulvan chiết xuất từ hai loại rong là *U. lactuca* và *U. papenfussii*) trong đệm A. Các mẫu được ủ ở 35°C trong vòng 24 giờ. Hỗn hợp phản ứng (5 µl) được pha trộn với 5 µl đệm tải (20 % glycerol và 0,02% phenol đỏ). Sau đó, sử dụng 5 µl mẫu để thực hiện điện di trên gel polyacrylamide 20% (w/v) dày 1 mm với đệm chạy là Tris-borate 100 mM, pH 8,3 trong 1 giờ. Quá trình nhuộm gel được thực hiện qua hai bước: đầu tiên là với dung dịch chứa 0,05 % alcian blue 8GX (Panreac, Barcelona, Tây Ban Nha) trong 2% axit acetic trong 45 phút, sau đó là với dung dịch 0,01% O-toluidine blue (Sigma-Aldrich, Steinheim, Đức) trong 50% ethanol và 1% axit acetic. Mẫu chuẩn (đối chứng dương) là sản phẩm phản ứng của FFA2 trên ulvan từ rong nâu *Fucus evanescens* do Khoa Công nghệ kỹ thuật Sinh học và Y sinh học, Trường Đại học Khoa học Kỹ thuật Đan Mạch cung cấp.

2.2.4.2. Xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp UV-VIS

Hoạt tính ulvan lyase được xác định bằng sự gia tăng các sản phẩm không bão hòa (liên kết đôi trong hỗn hợp phản ứng), khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm [51] trong điều kiện xác định. Các thí nghiệm được thực hiện trong hỗn hợp phản ứng 200 µl, chứa 0,025 mg/ml enzyme và 2 mg/ml ulvan trong dung dịch đệm UB4 20 mM, pH 8,0 và 250 mM NaCl, phản ứng được thực hiện ở 30 °C trong 30 phút, vận tốc ban đầu (phạm vi tuyến tính trong thời gian chạy)

được quy đổi thành mM/s bằng cách sử dụng hệ số extinction $6150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [52].

Một đơn vị (U) hoạt tính của ulvan lyase được định nghĩa là lượng protein cần thiết để tạo ra $1 \text{ } \mu\text{mol}$ glucuronyl (hệ số hấp thụ, $4800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) mỗi phút [32].

2.2.5. Các kỹ thuật dùng chung

2.2.5.1. Phương pháp điện di protein SDS-PAGE

Điện di được thực hiện trên gel acrylamide 12% với đệm tải Laemmli (4x), điện di được thực hiện với $40 \text{ } \mu\text{g}$ protein thô và $5 \text{ } \mu\text{g}$ protein tinh sạch cùng với 5 mM DTT. Điện di tổng protein nội bào bằng cách sử dụng sinh khối tế bào của $300 \text{ } \mu\text{l}$ dịch nuôi cấy, sau đó thêm $100 \text{ } \mu\text{l}$ đệm tải 4×Laemmli, sử dụng $10 \text{ } \mu\text{l}$ mẫu để điện di trên gel acrylamide 12%. Thang protein chuẩn sử dụng có khối lượng phân tử 10-250 kDa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

2.2.5.2. Phương pháp chuyển màng lai kháng thể miễn dịch Western Blot

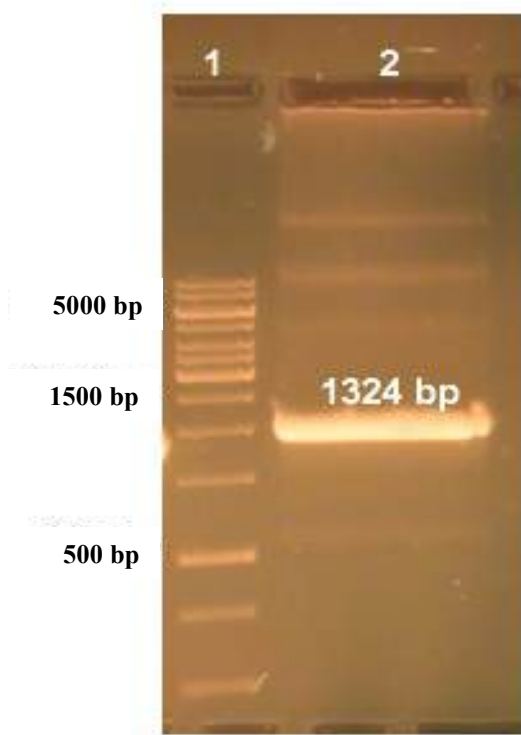
Tổng lượng protein được điện di trên gel acrylamide 12%. Sau quá trình điện di, bản gel chứa protein đã phân chia được chuyển sang màng lai PVDF (GE Healthcare No. 1060022) và quá trình chuyển màng được thực hiện trong dung dịch chạy là Tris-glycine pH 8,3 ở điện áp 100V trong 45 phút. Đầu tiên, màng lai được chặn bằng skim milk 2% trong dung dịch TBS (Tris-based sodium chloride pH 7,6) có chứa 0,1% Tween-20 (dung dịch TBS_T) trong 60 phút. Sau đó, màng lai được ủ trong dung dịch TBS_T với kháng thể đơn dòng được kết hợp với peroxidase anti-polyhistidine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Đức) với tỷ lệ pha loãng 1:10.000 trong tổng thể tích 30 ml trong 1 giờ. Màng lai được rửa trong dung dịch TBS_T 3 lần trong 10 phút và TBS với 0,1% Tween-20 trong 20 phút. Các kháng thể liên kết được phát hiện bằng nhuộm màu sử dụng AEC Kit (Sigma-Aldrich, Steinheim, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ KIỂM TRA SỰ HIỆN DIỆN CỦA GENE MÃ HÓA ULVAN LYASE TRONG CHỦNG VI KHUẨN TÁI TỔ HỢP

Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy băng DNA có kích thước khoảng 1.324 bp, tương ứng với kích thước dự kiến của gene *P30_PL28* mã hóa enzyme ulvan lyase được thiết kế trong vector tái tổ hợp (Hình 3.1). Điều này xác nhận gene mục tiêu đã được khuếch đại thành công từ vi khuẩn tái tổ hợp.

Để kiểm tra độ chính xác của quá trình tạo dòng, sản phẩm PCR được tinh sạch và tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự được đối chiếu với trình tự gene tham chiếu trên cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLASTn. Phân tích chuỗi nucleotide cho thấy mức độ tương đồng đạt trên 99,9%, không phát hiện đột biến nào ảnh hưởng khung mã hóa (open reading frame - ORF) hoặc cấu trúc gene. Kết quả này khẳng định gene *P30_PL28* đã được nhân bản chính xác và đã tích hợp thành công vào vector biểu hiện của chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3).



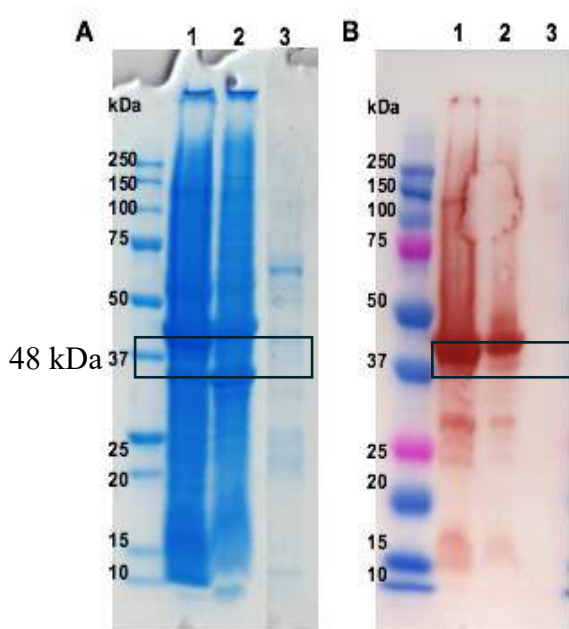
Chú thích:

1. Thang chuẩn kích thước DNA (*GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder*, *Thermo Scientific*, Mỹ).
2. Sản phẩm PCR của đoạn gene ulvan lyase của vi khuẩn *Faly*.

Hình 3.1 Hình ảnh điện di agarose 1% sản phẩm PCR khuếch đại gene mã hóa ulvan lyase từ chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp

Từ đó, có thể kết luận rằng chủng *E. coli* tái tổ hợp mang gene mã hóa ulvan lyase *P30_PL28* có hệ biểu hiện ổn định và sẵn sàng cho các bước khảo sát điều kiện biểu hiện trong các thí nghiệm tiếp theo. Việc tối ưu hóa các yếu tố như môi trường nuôi cấy, nồng độ IPTG và nhiệt độ cảm ứng sẽ được thực hiện nhằm đạt hiệu suất biểu hiện enzyme cao nhất. Lưu ý rằng bước xác nhận tạo dòng chỉ mới đảm bảo sự hiện diện của gene, chưa chứng minh được sự biểu hiện thành công của enzyme. Do đó, các bước đánh giá tiếp theo là cần thiết để khẳng định sự biểu hiện và hoạt tính enzyme [29].

Việc xác nhận vị trí thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp không chỉ giúp đảm bảo quá trình biểu hiện enzyme thành công mà còn hỗ trợ trong việc tinh sạch, và định hướng ứng dụng thực tiễn của enzyme này. Do đó, sau khi kết thúc quá trình biểu hiện theo như mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu mục 2.2.1.2, các nghiệm thức bao gồm: sinh khối tế bào (whole cell), dịch nội bào và dịch ngoại bào được thu nhận để tiến hành thí nghiệm. Kết quả khảo sát vị trí thu nhận ulvan lyase sau quá trình biểu hiện được thể hiện ở **Hình 3.2**.



Chú thích:

1. Sinh khối *E.coli*.
2. Dịch nội bào.
3. Dịch ngoại bào.

Hình 3.2 Phân tích biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).

Từ kết quả điện di trên SDS-PAGE và Western blot cho thấy, dịch enzyme thô được biểu hiện và thu nhận là phần dịch nội bào của các tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang gen ulvan lyase tái tổ hợp. Kết quả cho thấy xuất hiện vạch tín hiệu màu đỏ tại vị trí tương ứng với protein có khối lượng

phân tử 48 kDa, phù hợp với kích thước khoảng 1.324 bp của quá trình kiểm tra DNA tạo dòng. Phần dịch ngoại bào là phần dịch nổi sau khi ly tâm thu sinh khối tế bào từ canh trường lên men không thể hiện kết quả biểu hiện trên các bản gel SDS-PAGE và Western blot. Cho đến nay, hầu như các ulvan lyase tái tổ hợp đều được thu nhận từ dịch nội bào [29]. Như vậy, kết quả trong nghiên cứu này đều tương đồng với các công bố trước đó, cũng như phù hợp với quá trình tổng hợp trong hệ thống biểu hiện *E. coli* BL21(DE3).

Kết quả điện di SDS-PAGE và Western blot cho thấy enzyme ulvan lyase tái tổ hợp Faly được biểu hiện chủ yếu trong dịch nội bào của *E. coli* BL21(DE3) sau khi cảm ứng bởi IPTG. Việc phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm và ly tâm thu nhận dịch nội bào cho thấy lượng protein mục tiêu đáng kể, trong khi dịch ngoại bào và dịch lên men không phát hiện tín hiệu rõ ràng. Điều này xác nhận rằng enzyme Faly được sản xuất với hiệu suất cao và chủ yếu được thu nhận từ pha nội bào, phản ánh khả năng biểu hiện hiệu quả của hệ thống tái tổ hợp.

Phân tích kết quả Western blot sử dụng kháng thể kháng polyhistidine (His-tag) cho thấy một băng tín hiệu rõ nét xuất hiện tại vị trí khoảng 43 kDa, phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của enzyme ulvan lyase tái tổ hợp Faly. Băng tương ứng được phát hiện rõ rệt trong dịch nội bào, trong khi không quan sát được tín hiệu đặc hiệu ở mẫu dịch ngoại bào và dịch lên men. Điều này cho thấy enzyme Faly được biểu hiện hiệu quả nhưng không bài tiết ra môi trường nuôi cấy, mà chủ yếu được giữ lại trong tế bào chết.

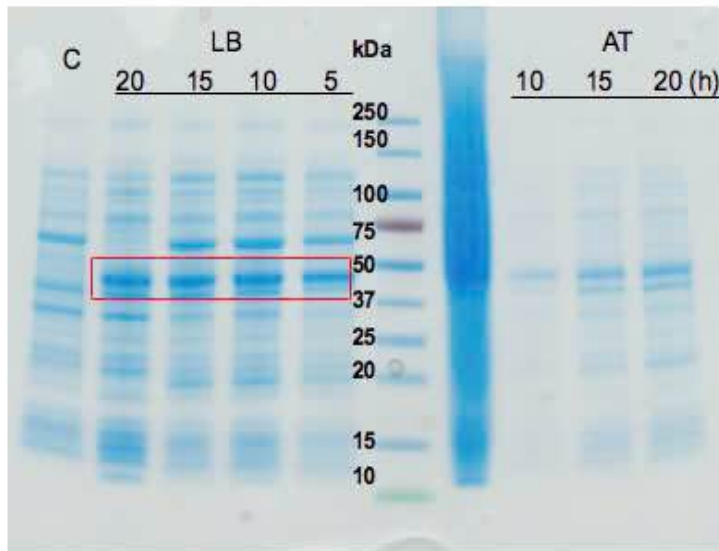
Sự tương quan giữa kết quả SDS-PAGE và Western blot càng khẳng định tính đặc hiệu của tín hiệu phát hiện được là do protein Faly gắn His-tag. Ngoài ra, kết quả này cũng gợi ý rằng quá trình biểu hiện không bị ảnh hưởng đến cấu trúc gắn thẻ His, giúp thuận lợi cho quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực sau này.

3.2. NGHIÊN CỨU KHẢO SÁT MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ BIỂU HIỆN CỦA ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY

3.2.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường lên men và thời gian lên men đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Việc so sánh giữa hai loại môi trường – tự cảm ứng và LB cảm ứng bằng IPTG – là bước quan trọng nhằm tối ưu hóa điều kiện biểu hiện enzyme ulvan lyase tái tổ hợp. Môi trường tự cảm ứng có ưu điểm nổi bật là giảm chi phí vận hành và loại bỏ nhu cầu bổ sung chất cảm ứng bên ngoài, giúp đơn giản hóa quy trình sản xuất và giảm sai số thao tác. Ngược lại, môi trường LB kết hợp IPTG cho phép điều khiển chính xác thời điểm và mức độ biểu hiện gene mục tiêu, nhờ đó dễ dàng đánh giá ảnh hưởng của từng yếu tố đến sinh trưởng vi khuẩn và hiệu suất tổng hợp enzyme. Kết quả khảo sát hai môi trường cho phép đánh giá hiệu suất biểu hiện enzyme, ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp, cũng như khả năng ứng dụng trên quy mô lớn. Từ các phân tích này, điều kiện biểu hiện phù hợp nhất có thể được lựa chọn nhằm đảm bảo hiệu suất sản xuất enzyme cao, ổn định và có tính khả thi về mặt kinh tế.

Kết quả khảo sát hai loại môi trường nuôi cấy, bao gồm môi trường tự cảm ứng) và môi trường cảm ứng LB cảm ứng bởi IPTG, cùng với sự thay đổi thời gian lên men, cho thấy sự khác biệt rõ rệt trong mức độ biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp. Trong môi trường tự cảm ứng AT, với hàm lượng nitơ và carbon (glucose/glycerol) cao, lượng ulvan lyase Faly thu được trong 300 μ L sinh khối lên men thấp hơn so với môi trường LB có bổ sung IPTG (**Hình 3.3**).



Hình 3.3 Ảnh hưởng của môi trường lên men và thời gian lên men đến sự biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Chú thích:

St - Thang protein chuẩn,

AT - Môi trường tự cảm ứng; 10 h, 15 h, 20 h - thời gian lên men,

LB - Môi trường lên men *E. coli* được cảm ứng bởi IPTG; 5 h, 10 h, 15 h, 20 h - thời gian lên men,

C - Không cảm ứng biểu hiện (IPTG 0mM).

Sự khác biệt này có thể bắt nguồn từ đặc điểm điều hòa biểu hiện trong hệ thống pET-28a(+) sử dụng promoter T7, vốn phụ thuộc vào sự hoạt hóa bởi IPTG thông qua cơ chế giải phóng chất ức chế LacI. Khi IPTG được bổ sung, nó gắn vào LacI, làm mất khả năng ức chế promoter lac, từ đó kích hoạt hoạt động của RNA polymerase T7 và dẫn đến quá trình phiên mã mạnh mẽ của gene mục tiêu. Trong khi đó, môi trường tự cảm ứng kích hoạt biểu hiện thông qua cơ chế cảm ứng chậm bởi lactose, nên tốc độ tổng hợp protein có thể chậm hơn và không kiểm soát được như IPTG. Những kết quả thu được phù hợp với các nghiên cứu trước đây về biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp trên hệ thống *E. coli* BL21(DE3) [26]. Do đó, để đạt hiệu suất biểu hiện ulvan lyase Faly cao nhất, môi trường LB cảm ứng bằng IPTG phù hợp hơn so với môi trường tự cảm ứng AT.

Trong các thí nghiệm tiếp theo, môi trường LB được lựa chọn để biểu hiện protein Faly ulvan lyase tái tổ hợp do khả năng tổng hợp protein cao và ổn định nhất. Môi trường LB là môi trường nuôi cấy phổ biến, dễ chuẩn bị, cung cấp đầy đủ các peptide, axit amin thiết yếu và muối khoáng natri cần thiết cho sự phát triển của *E. coli*, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp. Điều này góp phần nâng cao khả năng ứng dụng của ulvan lyase Faly trong công nghệ sinh học và sản xuất enzyme.

Quá trình khảo sát thời gian biểu hiện cho thấy enzyme ulvan lyase Faly bắt đầu được tổng hợp sau khoảng 5 giờ nuôi cấy và tiếp tục tăng dần theo thời gian. Sau 10-15 giờ cảm ứng, lượng protein đạt mức cao nhất, biểu hiện mạnh và không thay đổi đáng kể khi kéo dài thời gian lên đến 20 giờ. Do đó, thời điểm tối ưu để thu nhận enzyme là sau 15 giờ cảm ứng, giúp đảm bảo hiệu suất biểu hiện cao và ổn định, đồng thời tối ưu hóa quy trình sản xuất.

Faly có thời gian biểu hiện nhanh hơn một số enzyme, đặc biệt so với các ulvan lyase cần 16–18 giờ để đạt mức biểu hiện tối đa. Thời gian biểu hiện của Faly (10–15 giờ) nằm trong khoảng trung bình khi so sánh với các ulvan lyase thuộc họ PL24, và PL25 [29]; tuy nhiên, lại nhanh hơn từ 1–4 giờ khi so sánh trong cùng họ ulvan lyase PL28 [33]. Đây là cơ sở khoa học cho việc định hướng ứng dụng Faly trong các lĩnh vực công nghiệp sản xuất oligosaccharide ulvan có giá trị sinh học cao, hoặc các ứng dụng khác trong thực phẩm, y dược và môi trường.

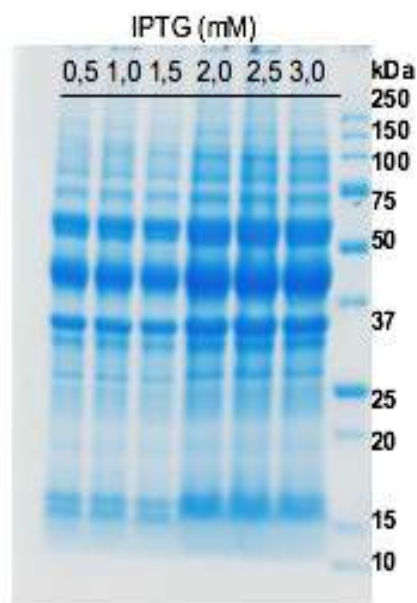
Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy và thời gian lên men có ảnh hưởng đáng kể đến mức độ biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly. Môi trường LB và môi trường tự cảm ứng AT đều hỗ trợ biểu hiện enzyme, nhưng LB kết hợp với cảm ứng IPTG cho hiệu suất cao hơn. Thời gian lên men tối ưu được xác định là 15 giờ, đảm bảo lượng enzyme biểu hiện đạt mức tối đa mà không gây suy giảm chất lượng protein.

Dựa trên kết quả này, nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung vào khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG nhằm xác định điều kiện cảm ứng tối ưu cho quá trình biểu hiện ulvan lyase Faly.

3.2.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Quá trình tổng hợp protein tái tổ hợp được điều khiển bởi promoter T7 trên vector pET-28a (+), trong đó sự biểu hiện của gene mục tiêu được kích hoạt bởi IPTG. Nồng độ IPTG đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh mức độ biểu hiện protein, vì nếu nồng độ quá cao, nó có thể gây ức chế sinh trưởng tế bào, trong khi nếu quá thấp, lượng protein tổng hợp sẽ không đạt mức tối ưu. Để xác định nồng độ IPTG thích hợp nhất, chúng tôi đã tiến hành thử

nghiệm với các mức nồng độ khác nhau: 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM và 3 mM, kết quả được thể hiện trong **Hình 3.4**.



Hình 3.4 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Kết quả cho thấy, tại nồng độ 2 mM IPTG, mức biểu hiện của enzyme Faly cao nhất. Khi tiếp tục tăng nồng độ IPTG lên 2,5mM và 3 mM, mức độ biểu hiện không có sự cải thiện đáng kể, cho thấy hệ thống đã đạt đến ngưỡng bão hòa. Ngược lại, ở nồng độ thấp hơn (0,5–1,5 mM), băng protein ~48 kDa xuất hiện ở mức độ yếu hơn rõ rệt.

Sự bão hòa trong biểu hiện protein tại nồng độ 2 mM IPTG có thể được giải thích bởi giới hạn năng lực phiên mã của RNA polymerase T7 hoặc khả năng gấp cuộn và ổn định của protein trong tế bào chủ. Việc sử dụng IPTG vượt quá ngưỡng tối ưu không những không mang lại lợi ích về hiệu suất biểu hiện mà còn làm tăng chi phí sản xuất và nguy cơ gây stress tế bào.

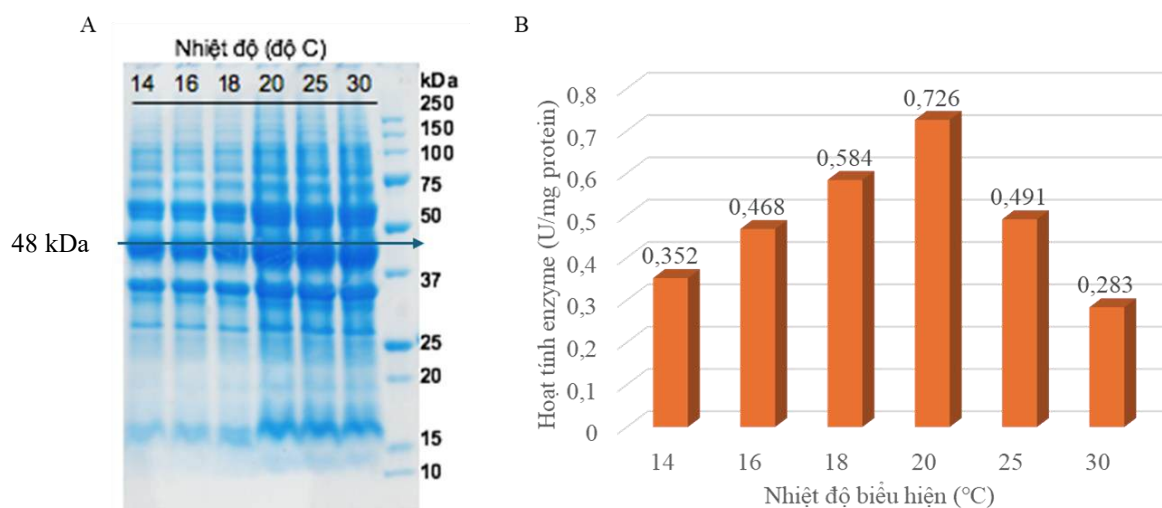
Do đó, nồng độ IPTG 2 mM được lựa chọn là điều kiện tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo, đảm bảo cân bằng giữa hiệu suất tổng hợp enzyme và khả năng sinh trưởng ổn định của *E. coli* tái tổ hợp.

3.2.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Nhiệt độ là một yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất và trạng thái hòa tan của protein tái tổ hợp trong hệ thống *E. coli*. Một phần do nhiệt độ tác

động đến tốc độ phiên mã, dịch mã và khả năng gấp cuộn chính xác của chuỗi polypeptide, đồng thời cũng ảnh hưởng đến tính ổn định của plasmid trong tế bào chủ. Ở nhiệt độ cao, nguy cơ mất plasmid tăng do áp lực sinh lý lên tế bào, dẫn đến giảm hiệu suất biểu hiện. Ngoài ra, nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến sự ổn định của mRNA, từ đó tác động đến quá trình dịch mã và tổng hợp protein.

Để tối ưu hóa điều kiện thu nhận enzyme Faly với sản lượng cao và tỷ lệ hòa tan tốt, đồng thời hạn chế protein nội sinh, chúng tôi đã khảo sát hiệu suất biểu hiện enzyme ở các mức nhiệt độ khác nhau: 14°C, 16°C, 18°C, 20°C, 25°C và 30°C. Mức độ biểu hiện được đánh giá qua SDS-PAGE và hoạt tính enzyme được xác định từ các mẫu tương ứng. Kết quả thu được được trình bày trong **Hình 3.5**.



Hình 3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự biểu hiện (A) và hoạt tính của enzyme Faly tái tổ hợp (B)

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi nhiệt độ tăng, mức độ biểu hiện của cả protein tái tổ hợp và các protein nội sinh của *E. coli* đều tăng theo. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme ulvan lyase bị ảnh hưởng đáng kể bởi nhiệt độ biểu hiện. Khi kiểm tra hoạt tính enzyme từ các điều kiện nuôi cấy khác nhau, chúng tôi nhận thấy enzyme có hoạt tính cao nhất khi được biểu hiện ở 20°C.

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ có tác động quan trọng đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp Faly. Ở nhiệt độ cao (30°C), mức độ biểu hiện enzyme giảm đáng kể, trong khi ở nhiệt độ thấp hơn (16–20°C), enzyme được biểu hiện mạnh mẽ hơn và chủ yếu ở dạng hòa tan. Nhiệt độ tối ưu được xác

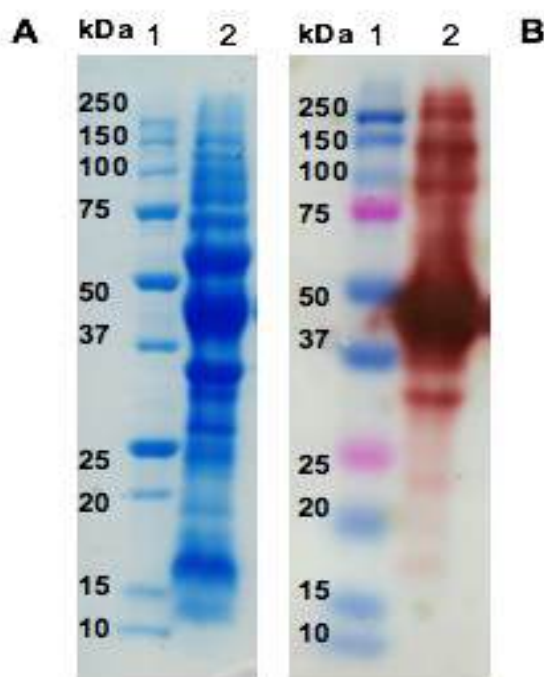
định là 20°C, đảm bảo sự biểu hiện ổn định và hạn chế sự kết tụ protein không mong muốn.

3.2.4. Biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly ở điều kiện tối ưu

Sau khi khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp Faly, bao gồm môi trường nuôi cấy, nồng độ IPTG và nhiệt độ, điều kiện tối ưu đã được xác định. Ở điều kiện này, enzyme được biểu hiện với hiệu suất cao nhất và chủ yếu ở dạng hòa tan, giúp thuận lợi cho quá trình thu nhận và tinh sạch.

Trong phần này, quá trình biểu hiện ulvan lyase Faly sẽ được tiến hành theo điều kiện tối ưu đã xác định, đồng thời đánh giá mức độ biểu hiện thông qua SDS-PAGE và Western blot, nhằm xác nhận sự thành công của quá trình sản xuất enzyme tái tổ hợp (**Hình 3.6**).

Kết quả phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (**Hình 3.6A**) cho thấy protein Faly ulvan lyase được biểu hiện có khối lượng phân tử khoảng 48 kDa, phù hợp với giá trị dự kiến dựa trên kích thước của đoạn gene mục tiêu (~1.324 bp) theo kết quả tạo dòng đã nêu trên. Để xác nhận sự có mặt của protein tái tổ hợp, phản ứng Western blot đã được thực hiện (**Hình 3.6B**).



Chú thích:

(A): Điện di SDS-PAGE;

(B): Western blot.

1. Thang chuẩn.

2. Mẫu sinh khối sau biểu hiện.

Hình 3.6 Phân tích ulvan lyase tái tổ hợp Faly sau biểu hiện ở điều kiện tối ưu bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).

Kết quả cho thấy xuất hiện vạch tín hiệu màu đỏ tại vị trí tương ứng với protein có khối lượng phân tử 48 kDa. Điều này chứng tỏ protein Faly ulvan lyase đã được biểu hiện thành công trong hệ thống *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a (+)-faly. Sự xuất hiện của vạch màu đỏ trong phản ứng Western blot là kết quả của tương tác đặc hiệu giữa protein tái tổ hợp mang đuôi His-tag và kháng thể đơn dòng anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody. Phản ứng lai miễn dịch này giúp khẳng định chính xác rằng protein thu nhận được chính là ulvan lyase tái tổ hợp mong muốn. Bên cạnh đó, khi tiến hành thí nghiệm tương tự với chủng vi khuẩn không được biểu hiện cảm ứng (được xem là mẫu đối chứng âm), kết quả cho thấy không xuất hiện vạch protein mục tiêu tại vị trí 48 kDa ở trên gel điện di protein SDS-PAGE và phản ứng lai miễn dịch Western blot cũng không xuất hiện bất cứ phản ứng biểu hiện màu nào.

Khi so sánh khối lượng phân tử của protein ulvan lyase Faly với các enzyme ulvan lyase tái tổ hợp đã được công bố trước đây, có thể thấy rằng giá trị này nằm trong khoảng phổ biến từ 30 đến 60 kDa. Cụ thể, một số nghiên cứu đã báo cáo về các ulvan lyase có kích thước phân tử tương tự, chẳng hạn như PLSV_3875 từ *Pseudoalteromonas* sp. (59 kDa) [25, 53], NLR48 từ *Nonlabens ulvanivorans* NLR48 (30 kDa) [33], LOR_29 từ *Alteromonadales* sp. (52 kDa) [38] và NLR42 từ *Nonlabens ulvanivorans* (46 kDa) [39].

Kết quả thực nghiệm thu nhận được cho thấy rằng protein mục tiêu của chủng vi khuẩn Faly thu nhận được có kích thước phân tử gần tương đương với các ulvan lyase trước đó, việc này chứng tỏ rằng các trình tự axit amin của Faly gần như là các vùng domain nhằm duy trì đặc tính và hoạt tính của enzyme này. Bên cạnh đó, kích thước phân tử của Faly (48 kDa) từ *Formosa agariphila* KMM 3901^T hầu như tương đồng với NLR42 từ *Nonlabens ulvanivorans* (46 kDa) và cả hai ulvan lyase tái tổ hợp này đều thuộc họ PL28 ulvan lyase; điều này cho thấy một số vùng trình tự axit amin từ hai enzyme này là bảo thủ cho đặc tính và hoạt tính của ulvan lyase thuộc họ PL28 [39]. Như vậy, kích thước của protein Faly phù hợp với đặc điểm chung của các ulvan lyase đã biết. Điều này giúp củng cố nhận định rằng ulvan lyase Faly có thể có cơ chế hoạt động tương tự với các enzyme cùng họ đã được nghiên cứu trước đây.

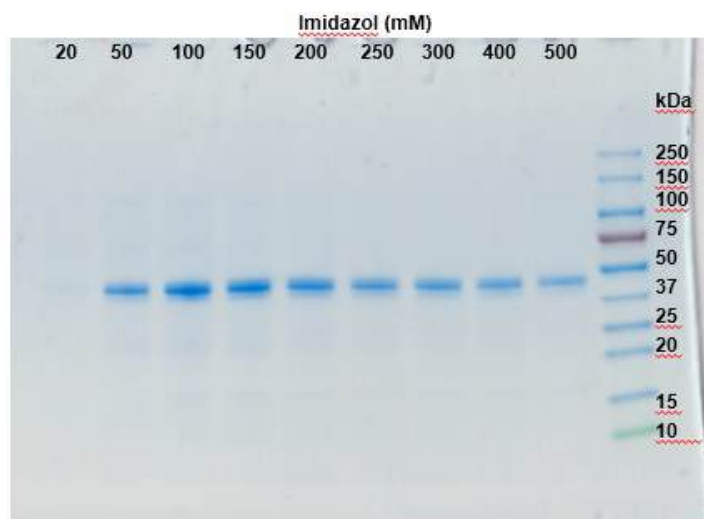
Một trong các công bố về ulvan lyase KUL17 đã chỉ ra rằng: việc loại bỏ một phần trình tự axit amin của KUL17 đã được thực hiện, kết quả là thu được

ulvan lyase có hoạt tính cao nhất [24]. Với kết quả này sẽ gợi ý cho chúng ta việc phân tích sâu hơn các vùng axit amin có trong Faly để tiến hành cắt ngắn có chủ đích nhằm xác định chức năng của các vùng trình tự cũng như so sánh các đặc tính và hoạt tính của ulvan lyase tái tổ hợp này.

3.3. KẾT QUẢ TÍNH SẠCH ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY

Quá trình tinh sạch được thực hiện nhằm loại bỏ các tạp chất và thu được ulvan lyase Faly có độ tinh khiết cao, phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Phương pháp sắc ký ái lực sử dụng cột Ni^{2+} Sepharose được áp dụng để tinh sạch enzyme nhờ vào thẻ His-tag gắn trên protein tái tổ hợp.

Trong phần này, hiệu quả tinh sạch enzyme sẽ được đánh giá thông qua phân tích SDS-PAGE và xác định hàm lượng protein thu được, từ đó tối ưu hóa quá trình tinh sạch nhằm đảm bảo sản phẩm enzyme có chất lượng tốt nhất để thử nghiệm hoạt tính. Hình ảnh SDS-PAGE cho thấy kết quả tinh sạch protein Faly bằng hệ thống cột Ni^{2+} Sepharose HisTrap HP với chất rửa giải là imidazole ở các nồng độ khác nhau (20 - 500 mM) (**Hình 3.7**).



Hình 3.7 Phân tích SDS-PAGE các phân đoạn chứa enzyme Faly thu được từ sắc ký ái lực trên cột Ni^{2+} Sepharose HisTrap HP với các nồng độ khác nhau

Điều này khẳng định rằng phương pháp sắc ký ái lực với Ni^{2+} là phù hợp và có độ chọn lọc tốt cho quá trình tinh sạch Faly. Việc tối ưu nồng độ imidazole giúp đạt hiệu suất thu hồi cao, đồng thời giảm thiểu sự rửa giải các protein không đặc hiệu.

Kết quả cho thấy protein mục tiêu bắt đầu rửa giải rõ ràng từ nồng độ 50 mM và đạt cường độ mạnh nhất trong khoảng 150 - 250 mM imidazole. Khi nồng độ imidazole tăng lên từ 300 mM trở đi, cường độ dải protein dần giảm, cho thấy hầu hết protein Faly đã được thu nhận ở nồng độ thấp hơn. Ở mức 20 mM, xuất hiện một số dải protein mờ, có thể do còn lẫn nhiều tạp chất, trong khi ở nồng độ từ 150 mM trở lên, protein mục tiêu thể hiện rõ ràng với ít tạp chất đi kèm, chứng tỏ phương pháp tinh sạch có độ chọn lọc tốt. Thang chuẩn protein (marker) cho thấy protein thu nhận có kích thước phù hợp với dự đoán, và không xuất hiện nhiều dải protein không đặc hiệu ở nồng độ imidazole cao hơn (≥ 250 mM). Như vậy, nồng độ imidazole tối ưu để rửa giải protein Faly khỏi cột sắc ký nằm trong khoảng 150-250 mM, đảm bảo hiệu quả tinh sạch cao và loại bỏ đáng kể tạp chất.

Sau khi tinh sạch ulvan lyase tái tổ hợp Faly bằng sắc ký ái lực Ni^{2+} Sepharose, enzyme thu nhận được vẫn còn chứa một lượng đáng kể imidazole từ dung dịch rửa giải. Imidazole có thể ảnh hưởng đến hoạt tính enzyme, gây cản trở các thí nghiệm đánh giá hoạt tính thủy phân ulvan. Vì vậy, để loại bỏ imidazole và đảm bảo enzyme thu được ở dạng hoạt động ổn định, bước lọc qua cột PD10 được thực hiện. Cột PD10 hoạt động theo nguyên lý lọc gel, giúp tách imidazole ra khỏi dung dịch protein mà không làm mất đi enzyme. Kết quả thu được là ulvan lyase Faly có độ tinh sạch cao, thích hợp cho các thí nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme và nghiên cứu ứng dụng tiếp theo. Kết quả tinh sạch Faly qua cột PD10 được trình bày trong bảng số liệu 3.1.

Bảng 3.1 Hoạt tính của Faly thô và sau khi tinh sạch qua cột PD10

Bước tinh sạch	Tổng protein (mg)	Tổng hoạt tính (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Enzyme thô	32,92	30,61	0,93	1.00	100,00
Ni^{2+} Sepharose HisTrap/ PD10	8,07	12,38	1,53	1,65	40,44

Kết quả cho thấy hiệu quả làm giàu enzyme nhưng đi kèm với sự suy giảm tổng hoạt tính. Cụ thể, tổng lượng protein giảm mạnh từ 32,92 mg xuống còn 8,07 mg sau quá trình tinh sạch, chứng tỏ cột Ni^{2+} Sepharose HisTrap đã

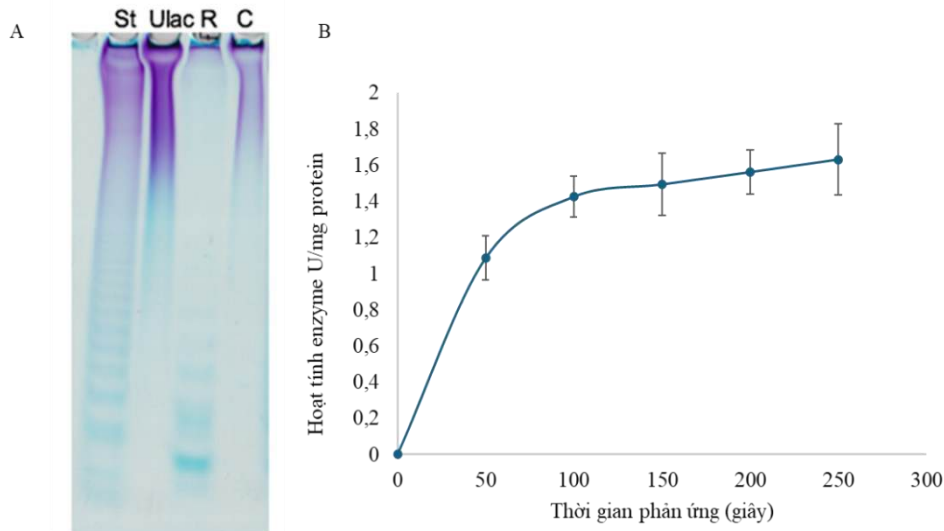
loại bỏ đáng kể các tạp chất không mong muốn. Tuy nhiên, tổng hoạt tính enzyme cũng giảm từ 30,61 U xuống 12,38 U, dẫn đến hiệu suất thu hồi enzyme chỉ đạt 40,44%. Mặc dù vậy, hoạt tính riêng tăng từ 0,93 U/mg lên 1,53 U/mg, cho thấy enzyme đã được làm giàu đáng kể. Độ tinh sạch đạt 1,65 lần so với enzyme thô, phản ánh mức độ tinh khiết cao hơn của sản phẩm thu được. Tuy nhiên, mức thu hồi tương đối thấp gợi ý rằng phương pháp tinh sạch này có thể cần được tối ưu hóa thêm để giảm tổn thất enzyme và cải thiện hiệu suất thu hồi.

Như vậy, ulvan lyase tái tổ hợp Faly đã được tinh sạch thành công, và kết quả SDS-PAGE cho thấy chỉ có một dải protein duy nhất, chứng tỏ độ tinh khiết cao (**Hình 3.7**). Kết quả phân tích khối lượng phân tử xác định Faly có kích thước khoảng 48 kDa, tương đồng với các ulvan lyase thuộc họ PL28 đã được báo cáo trước đó, như NLR42 (46 kDa) [39]. Hoạt tính đặc hiệu của Faly đạt 1,53 U/mg protein với hiệu suất thu hồi 40,44% (**Bảng 3.1**). Trong khi đó ALT 3695 ulvan lyase tái tổ hợp đã được tinh sạch tương tự bằng cách sử dụng cột BeaverBeads™ IDA-Nickel, tuy nhiên enzyme này không sử dụng cột PD10 để loại imidazole, do đó mà hiệu suất thu hồi đạt 52% [29]. Để có thể so sánh hoạt tính giữa các ulvan lyase tái tổ hợp với nhau cần nghiên cứu về động học phản ứng của enzyme, tuy nhiên hiện nay trên thị trường chưa có ulvan thương mại, vì vậy các nhà khoa học ngày nay vẫn đang tìm kiếm một định hướng cho vấn đề này.

3.4. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH THỦY PHÂN ULVAN CỦA ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP FALY

3.4.1. Kết quả thử nghiệm khả năng thủy phân ulvan của Faly thu nhận được

Ulvan lyase Faly dạng chiết xuất thô đã được sử dụng để đánh giá khả năng cắt mạch ulvan được tách chiết từ loài rong lục *U. lactuca*. Kết quả phân tích (**Hình 3.8**) cho thấy sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu ulvan chưa thủy phân (U_{lac}) và mẫu đã thủy phân (R).



Hình 3.8 Khả năng thủy phân ulvan của ulvan lyase Faly trên các cơ chất ulvan chiết từ rong *U. lactuca* và thời gian phản ứng của enzyme

Chú thích:

(A) Kết quả điện di (C-PAGE) cho thấy hoạt động thủy phân ulvan của enzyme Faly.

(B) Thời gian phản ứng của Faly

Ulac – ulvan được điều chế từ rong lục *U. lactuca*.

St - đối chứng dương của điện di C-PAGE (phản ứng giữa fucoidan từ rong *Fucus evanescens* với enzyme FFA2).

R - Sản phẩm của phản ứng thủy phân ulvan bởi Faly ulvan lyase.

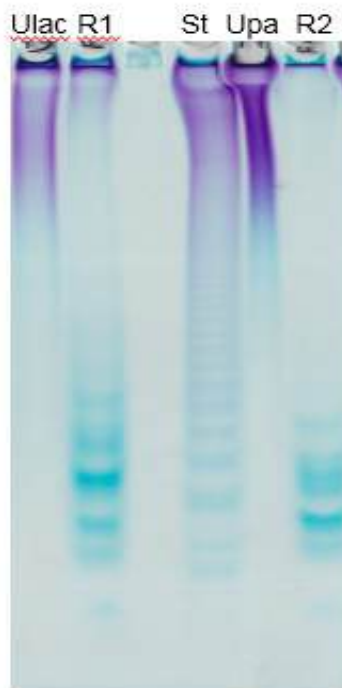
C – đối chứng âm: phản ứng giữa dịch chiết thô của vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) không được biểu hiện và cơ chất ulvan.

Đặc biệt, mẫu đối chứng âm (C) hoàn toàn không xuất hiện phản ứng, khẳng định rằng hoạt tính cắt mạch chỉ xuất phát từ ulvan lyase tái tổ hợp Faly, thay vì từ bất kỳ protein nội sinh nào khác có trong *E. coli* tái tổ hợp. Kết quả điện di minh chứng rằng ulvan lyase Faly đã thủy phân ulvan thành các oligomer sulfate hóa với kích thước khác nhau. Điều này không chỉ chứng tỏ hiệu quả của enzyme trong việc xử lý ulvan mà còn mở ra tiềm năng ứng dụng trong quá trình chế tạo oligosaccharide ulvan từ rong lục Việt Nam. Bên cạnh đó, quá trình thủy phân trong nghiên cứu này còn được đánh giá thông qua phương pháp quang phổ. Cụ thể, hoạt tính của ulvan lyase được xác định dựa trên sự gia tăng của các sản phẩm không bão hòa có liên kết đôi trong hỗn hợp

phản ứng theo thời gian, được đo bằng độ hấp thụ quang. Kết quả cho thấy ulvan lyase Faly thu nhận đã thể hiện hoạt tính thủy phân đối với ulvan chiết xuất từ *U. lactuca* qua ba lần lặp lại thí nghiệm, khẳng định tính ổn định và tiềm năng ứng dụng của enzyme này trong nghiên cứu và sản xuất oligosaccharide dạng ulvan (**Hình 3.8B**).

3.4.2. Kết quả thử nghiệm hoạt tính thủy phân ulvan từ hai loại rong lục khác nhau của ulvan lyase tái tổ hợp Faly

Ulvan lyase Faly dạng tinh sạch đã được sử dụng để thử nghiệm khả năng cắt mạch ulvan được tách chiết từ hai loài rong lục *U. lactuca* và *U. papenfussii* có cấu trúc vừa có phần tương đồng vừa có phần khác biệt này, ngoài mục đích thu nhận oligosaccharide dạng ulvan còn hướng tới xác định một phần các đặc điểm cấu trúc đặc hiệu. Kết quả của thí nghiệm này được thể hiện trong **Hình 3.9** đã cho thấy đã có sự khác biệt giữa các sản phẩm thủy phân bởi cùng một enzyme trên hai cơ chất có cấu trúc khác nhau.



Hình 3.9 Phân tích sản phẩm thủy phân ulvan bởi enzyme ulvan lyase Faly bằng điện di C-PAGE

Chú thích:

Ulac – ulvan được điều chế từ rong lục *U. lactuca*.

St - đối chứng dương của điện di C-PAGE.

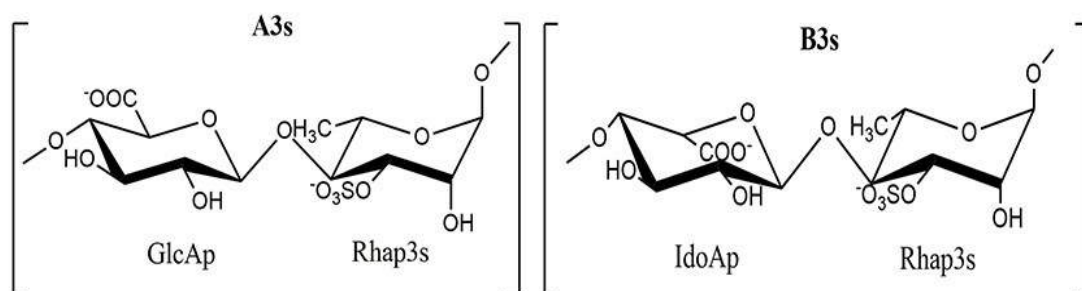
R1 - Sản phẩm của phản ứng thủy phân ulvan từ rong lục U. lactuca bởi Faly ulvan lyase.

Upa – ulvan được điều chế từ rong lục U. papenfussii.

R2 - Sản phẩm của phản ứng thủy phân ulvan từ rong lục U. papenfussii bởi Faly ulvan lyase.

Các cấu trúc khác nhau của ulvan thường có bộ khung cơ bản thuộc các dạng A3s, B3s hoặc U2,3s, với sự khác biệt chủ yếu đến từ các nhánh phân tử như Xylp và GlcAp gắn tại vị trí C2 hoặc C4 của D-glucuronosyl và L-rhamnopyranosyl, cũng như các nhóm sulfate liên kết với đơn vị đường hoặc nhóm acid tại vị trí O-2 và O-3 [54]. Nhìn chung, cấu trúc ulvan rất phức tạp và đa dạng, bị ảnh hưởng bởi tỷ lệ monosaccharide, cấu hình, mức độ phân nhánh cũng như kiểu sulfate hóa. Những yếu tố này phụ thuộc vào loài tảo nguồn và phương pháp chiết xuất, dẫn đến sự khác biệt trong đặc điểm cấu trúc của ulvan.

Ulván chiết xuất từ *U. lactuca* sử dụng trong nghiên cứu này chủ yếu chứa khung cấu trúc ulvanobiuronic acid A3s với disaccharide $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcA-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rha3S-(1} \rightarrow]$ (**Hình 3.10**), trong đó các nhánh phân tử được gắn tại vị trí C-2 của rhamnose [16]. Ngoài ra, ulvan này còn chứa một lượng nhỏ disaccharide $\beta\text{-GlcAp-(1} \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Xylp}$. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng cấu trúc polysaccharide của *U. lactuca* rất phức tạp và có sự biến đổi đáng kể [55, 56].



Hình 3.10 Đặc điểm cấu trúc của ulvan chiết xuất từ rong lục *U. lactuca* và *U. papenfussii* [16, 54]

Trong khi đó, ulvan tách chiết từ *U. papenfussii* sử dụng trong nghiên cứu này được xác định là một hỗn hợp gồm hai dạng cấu trúc chính: (A3s) với đơn vị disaccharide lặp lại $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3S-(1} \rightarrow]_n$ và (B3s) với đơn vị disaccharide lặp lại $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdoAp-(1} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap 3S-(1} \rightarrow]_n$. Kết quả này lần đầu tiên được ghi nhận nên chưa có tham khảo với các công bố trước đó.

Faly thuộc họ PL28 nên có khả năng cắt đứt liên kết glycoside giữa GlcA-Rha3S và IdoA-Rha3S. Ulvan lyase chủ yếu phân hủy polysaccharide ở các đơn vị disaccharide ở đầu không khử để hình thành nối đôi, trong đó sản phẩm chính thu được sau quá trình cắt mạch là disaccharide. Tuy nhiên, hiện tại, enzyme này chưa có khả năng phân cắt liên kết glycoside giữa Xyl và Rha3S, dẫn đến sự xuất hiện của các tetrasaccharide chứa Xyl trong sản phẩm thủy phân bằng enzyme [32]. Do đó, có thể một phần đặc điểm cấu trúc của phần sản phẩm tạo thành sau thủy phân này sẽ chỉ thuộc về R2. Ngoài ra, vị trí Xyl từ lượng nhỏ disaccharide $\beta\text{-GlcAp-(1} \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-Xylp}$ chỉ có trong ulvan từ rong lục *U. lactuca*, cũng rất có thể đã tạo ra các band điện di có kích thước khác biệt của R1 (khi so với R2). Bên cạnh đó, sản phẩm sau thủy phân R1 và R2 cũng thể hiện sự tương đồng ở một số vị trí band; kết quả này có thể có được từ sự tương đồng của cấu trúc A3s trong cả hai cơ chất ulvan từ các rong lục được nghiên cứu.

Những phân tích này cung cấp hiểu biết sâu hơn về khả năng cắt mạch của Faly cũng như sự khác biệt về sản phẩm sau thủy phân, góp phần định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. KẾT LUẬN

Môi trường LB bổ sung IPTG là điều kiện tối ưu để biểu hiện enzyme ulvan lyase với hiệu suất cao. Việc sử dụng nồng độ IPTG 2 mM kết hợp với nhiệt độ 20°C giúp duy trì sự ổn định của quá trình biểu hiện protein và hoạt tính enzyme là cao nhất. Hơn nữa, thời gian cảm ứng 15 giờ được xác định là khoảng thời gian thích hợp để đạt được hiệu suất tối ưu, đảm bảo sản phẩm enzyme được thu nhận với chất lượng tốt nhất. Các điều kiện trên có thể được ứng dụng trong sản xuất và nghiên cứu ulvan lyase nhằm tối ưu hóa quy trình thu nhận enzyme một cách hiệu quả.

Kết quả thu nhận enzyme thô từ dịch nội bào của *E. coli* BL21 (DE3) mang gen ulvan lyase cho thấy phương pháp biểu hiện và tinh sạch enzyme đạt hiệu quả cao. Việc sử dụng sắc ký ái lực với cột Ni²⁺Sepharose HisTrap HP giúp thu nhận protein mục tiêu với độ tinh khiết tốt. Đặc biệt, khi áp dụng nồng độ imidazole rửa giải từ 150-250 mM, hiệu suất thu hồi enzyme được cải thiện đáng kể, đảm bảo lượng sản phẩm thu nhận đủ cho các ứng dụng nghiên cứu và sản xuất tiếp theo. Những điều kiện trên đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa quy trình tinh sạch enzyme, góp phần nâng cao hiệu quả ứng dụng của ulvan lyase trong công nghệ sinh học.

Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme ulvan lyase Faly thô có khả năng thủy phân ulvan từ *U. lactuca*, tạo ra các oligomer sulfate với kích thước đa dạng. Khi sử dụng enzyme dạng tinh sạch, quá trình cắt mạch ulvan từ *U. lactuca* và *U. papenfussii* diễn ra hiệu quả hơn, giúp xác định một số đặc điểm cấu trúc đặc hiệu của hai loại ulvan này.

4.2. KIẾN NGHỊ

Trong điều kiện cho phép, nghiên cứu nên tiếp tục khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính xúc tác của enzyme ulvan lyase Faly, bao gồm nhiệt độ, pH và thời gian phản ứng, nhằm xác định sơ bộ dải điều kiện phản ứng tối ưu. Việc làm rõ các thông số này sẽ góp phần hoàn thiện đặc trưng hoạt tính của enzyme và tạo cơ sở cho việc lựa chọn điều kiện phản ứng phù hợp trong

các ứng dụng thủy phân ulvan. Bên cạnh đó, cần tiến hành phân tích sơ bộ sản phẩm thủy phân bằng các phương pháp định tính đơn giản như sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc điện di polyacrylamide không biến tính để kiểm tra khả năng tạo oligosaccharide – nhóm hợp chất có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực dược sinh học và công nghệ sinh học biển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đa dạng sinh học và nguồn lợi rong biển Việt Nam. Accessed: Dec. 15, 2024. [Online]. Available: <https://vjst.vn/vn/tin-tuc/4201/da-dang-sinh-hoc-va-nguon-loi-rong-bien-viet-nam.aspx>.
- [2] A. Robic, C. Gaillard, J. F. Sassi, Y. Leral, and M. Lahaye, 2009, Ultrastructure of Ulvan: A polysaccharide from green seaweeds, *Biopolymers*, 91(8), pp. 652–664.
- [3] Phân loại một số loài rong biển thuộc chi *Ulva* (Chlorophyta) phân bố tại khu vực Hải Phòng. Accessed: Dec. 15, 2024. [Online]. Available: <https://fr.slideshare.net/slideshow/phn-loi-mt-s-loi-rong-bin-thuc-chi-ulva-chlorophyta-phn-b-ti-khu-vc-hi-phngpdf/251969694>.
- [4] R. L. Chapman, 2013, Algae: The world’s most important ‘plants’-an introduction, *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), pp. 5–12.
- [5] M. L. Nguyen, M. S. Kim, N. T. N. Nguyen, X. T. Nguyen, V. L. Cao, X. V. Nguyen, C. Vieira, 2023, Marine Floral Biodiversity, Threats, and Conservation in Vietnam: An Updated Review, *MDPI*, 12(9), pp. 1862.
- [6] Lê Đình Trà, 2023, *Nghiên cứu chiết tách và đặc trưng cấu trúc của ulvan từ rong lục ulva papenfussii*, Luận văn Thạc sĩ hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.
- [7] C. Li ,T. Tang, Y. Du, L. Jiang, Z. Yao, L. Ning, B. Zhu, 2023, Ulvan and Ulva oligosaccharides: a systematic review of structure, preparation, biological activities and applications, *Springer*, 10(1), pp. 66.
- [8] T. Tang, S. Cao, B. Zhu, and Q. Li, 2021, Ulvan polysaccharide-degrading enzymes: An updated and comprehensive review of sources category, property, structure, and applications of ulvan lyases, *Algal Research*, 60, pp. 102477.

- [9] Quách Thị Minh Thu, 2017, *Nghiên cứu cấu trúc của ulvan có hoạt tính sinh học từ rong lục ulva lactuca và ulva reticulata*, Luận án tiến sỹ hóa học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.
- [10] M. S. Prabhu, A. Israel, R. R. Palatnik, D. Zilberman, and A. Golberg, 2020, Integrated biorefinery process for sustainable fractionation of *Ulva ohnoi* (Chlorophyta): process optimization and revenue analysis, *Journal Applied Phycology*, 32(4), pp. 2271-2282.
- [11] H. Fernandes, J. M. Salgado, N. Martins, H. Peres, A. Oliva-Teles, and I. Belo, 2019, Sequential bioprocessing of *Ulva rigida* to produce lignocellulolytic enzymes and to improve its nutritional value as aquaculture feed, *Bioresource Technology*, 281, pp. 277-285.
- [12] R. Trentin, L. Custódio, M. J. Rodrigues, E. Moschin, K. Sciuto, J. P. D. Silva, I. Moro, 2020, Exploring *Ulva australis* Areschoug for possible biotechnological applications: In vitro antioxidant and enzymatic inhibitory properties, and fatty acids contents, *Algal Research*, 50, pp. 101980.
- [13] A. del Olmo, A. Picon, and M. Nuñez, 2018, The microbiota of eight species of dehydrated edible seaweeds from North West Spain, *Food Microbiology*, 70, pp. 224–231.
- [14] W. Li, N. Jiang, B. Li, M. Wan, X. Chang, H. Liu, L. Zhang, S. Yin, H. Qi, S. Liu, 2018, Antioxidant activity of purified ulvan in hyperlipidemic mice, *International Journal Biological Macromolecules*, 113, pp. 971–975.
- [15] Y.H. Chiu, Y.L. Chan, T.L. Li, and C.J. Wu, 2012, Inhibition of Japanese Encephalitis Virus Infection by the Sulfated Polysaccharide Extracts from *Ulva lactuca*, *Marine Biotechnology*, 14(4), pp. 468–478.
- [16] T. T. T. Thanh, T. M. T. Quach, T. N. Nguyen, D. Vu Luong, M. L. Bui, and T. T. Van Tran, 2016, Structure and cytotoxic activity of ulvan

- extracted from green seaweed *Ulva lactuca*, *International Journal Biological Macromolecules*, 93, pp. 695–702.
- [17] A. A. Arsianti, F. Fadilah, Y. Fatmawaty, L. K. Wibisono, 2016, Phytochemical composition and anticancer activity of seaweeds *Ulva lactuca* and *Eucheuma cottonii* against breast MCF-7 and colon HCT-116 cells, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(6), pp. 115–119.
 - [18] A. L. Al-Malki, 2020, In vitro cytotoxicity and pro-apoptotic activity of phycocyanin nanoparticles from *Ulva lactuca* (Chlorophyta) algae, *Saudi Journal Biological Sciences*, 27(3), pp. 894–898.
 - [19] M. Kosanić, B. Ranković, and T. Stanojković, 2015, Biological activities of two macroalgae from Adriatic coast of Montenegro, *Saudi Journal Biological Sciences*, 22(4), pp. 390–397.
 - [20] C. Boisvert, L. Beaulieu, C. Bonnet, and É. Pelletier, 2015, Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of three species of edible seaweeds, *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), pp. 377–387.
 - [21] A. M. Deveau, Z. M. Hope, E. Lloyd, B. S. Williams, C. Bolduc, J. M. Meader, F. Weiss, K. M. Burkholder, 2016, Antimicrobial activity of extracts from macroalgae *Ulva lactuca* against clinically important *Staphylococci* is impacted by lunar phase of macroalgae harvest, *Letters in Applied Microbiology*, 62(5), pp. 363–371.
 - [22] M. M. de Carvalho, M. D. Nosedá, J. C. C. Dallagnol, L. G. Ferreira, D. R. B. Ducatti, A. G. Goncalves, R. A. D. Freitas, M. E. R. Duarte, 2020, Conformational analysis of ulvans from *Ulva fasciata* and their anticoagulant polycarboxylic derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp. 599–608.
 - [23] O. Coste, E. Jan Malta, J. C. López, and C. Fernández-Díaz, 2015, Production of sulfated oligosaccharides from the seaweed *Ulva* sp. using a new ulvan-degrading enzymatic bacterial crude extract, *Algal Research*, 10, pp. 224–231.

- [24] C. He, H. Muramatsu, S. I. Kato, and K. Ohnishi, 2017, Characterization of an *Alteromonas* long-type ulvan lyase involved in the degradation of ulvan extracted from *Ulva ohnoi*, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 81(11), pp. 2145–2151.
- [25] M. Kopel, W. Helbert, Y. Belnik, V. Buravenkov, A. Herman, and E. Banin, 2016, New family of ulvan lyases identified in three isolates from the alteromonadales order, *Journal of Biological Chemistry*, 291(11), pp. 5871–5878.
- [26] A. Huang, X. Wu, F. Lu, and F. Liu, 2024, Sustainable Production of Ulva Oligosaccharides via Enzymatic Hydrolysis: A Review on Ulvan Lyase, *Foods*, 13(17), pp. 2820.
- [27] C. He and K. Ohnishi, 2017, Efficient renaturation of inclusion body proteins denatured by SDS, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 490(4), pp. 1250–1253.
- [28] H. M. Qin, P. Xu, Q. Guo, X. Cheng, D. Gao, D. Sun, Z. Zhu, F. Lu , 2018, Biochemical characterization of a novel ulvan lyase from: *Pseudoalteromonas* sp. strain PLSV, *RSC Advances*, 8(5), pp. 2610–2615.
- [29] J. Gao, C. Du, Y. Chi, S. Zuo, H. Ye, and P. Wang, 2019, Cloning, expression, and characterization of a new PL25 family ulvan lyase from marine bacterium *Alteromonas* sp. A321, *Marine Drugs*, 17(10), pp. 568.
- [30] T. Ulaganathan, M. T. Boniecki, E. Foran, V. Buravenkov, N. Mizrachi, E. Banin, W. Helbert, M. Cygler., 2017, New Ulvan-Degrading Polysaccharide Lyase Family: Structure and Catalytic Mechanism Suggests Convergent Evolution of Active Site Architecture, *ACS Chemical Biology*, 12(5), pp. 1269–1280.
- [31] E. Foran, V. Buravenkov, M. Kopel, N. Mizrachi, S. Shoshani, W. Helbert, E. Banin, 2017, Functional characterization of a novel ‘ulvan

- utilization loci' found in *Alteromonas* sp. LOR genome, *Algal Research*, 25, pp. 39–46.
- [32] L. Reisky, C. Stanetty, M. D. Mihovilovic, T. Schweder, J. H. Hehemann, and U. T. Bornscheuer, 2018, Biochemical characterization of an ulvan lyase from the marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), pp. 6987–6996.
- [33] T. S. Ulaganathan, E. Banin, W. Helbert, and M. Cygler, 2018, Structural and functional characterization of PL28 family ulvan lyase NLR48 from *Nonlabens ulvanivorans*, *Journal of Biological Chemistry*, 293(29), pp. 11564–11573.
- [34] Y. Xu, J. Li, L. An, Y. Qiu, A. Mao, Z. He, J. Guo, H. Yan, H. Li, Z. Hu, 2024, Biochemical characterization of a novel thermostable ulvan lyase from *Tamlana fucoidanivorans* CW2-9 Supplementary materials, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 72(20), pp. 11773–11781
- [35] V. R. Konasani, C. Jin, N. G. Karlsson, and E. Albers, 2018, A novel ulvan lyase family with broad-spectrum activity from the ulvan utilisation loci of *Formosa agariphila* KMM 3901, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–11.
- [36] A. J. Mann, R. L. Hahnke, S. Huang, J. Werner, P. Xing, T. Barbeyton, B. Huettel, K. Stüber, R. Reinhardt, J. Harder, F. O. Glöckner, R. I. Amann, H. Teeling, 2013, The genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), pp. 6813–6822.
- [37] B. G. Hall, 2013, Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA, *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), pp. 1229–1235.
- [38] E. Foran, V. Buravenkov, M. Kopel, N. Mizrachi, S. Shoshani, W. Helbert, E. Banin, 2017, Functional characterization of a novel 'ulvan

- utilization loci' found in *Alteromonas* sp. LOR genome, *Algal Research*, 25, pp. 39–46. [39] P. N. Colle, J. F. Sassi, H. Rogniaux, H. Marfaing, and W. Helbert, 2011, Ulvan lyases isolated from the flavobacteria *Persicivirga ulvanivorans* Are the first members of a new polysaccharide lyase family, *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), pp. 42063–42071.
- [40] H. M. Qin, D. Gao, M. Zhu, C. Li, Z. Zhu, H. Wang, W. Liu, M. Tanokua, F. Lu, 2020, Biochemical characterization and structural analysis of ulvan lyase from marine *Alteromonas* sp. reveals the basis for its salt tolerance, *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, pp. 1309–1317.
- [41] Y. Chi, M. Zhang, X. Wang, X. Fu, H. Guan, and P. Wang, 2020, Ulvan lyase assisted structural characterization of ulvan from *Ulva pertusa* and its antiviral activity against vesicular stomatitis virus, *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, pp. 75–82.
- [42] J. T. Kidgell, C. R. K. Glasson, M. Magunusson, G. Vamvounis, I. M. Sims, S. M. Carnachan, S. F. R. Hinkley, A. L. Lopata, 2020, The molecular weight of ulvan affects the in vitro inflammatory response of a murine macrophage, *Int J Biol Macromol*, 150, pp. 839–848.
- [43] A. A. Matloub, H. A. Aglan, S. S. Mohamed El Souda, M. E. Aboutabl, A. S. Maghraby, and H. H. Ahmed, 2016, Influence of bioactive sulfated polysaccharide-protein complexes on hepatocarcinogenesis, angiogenesis and immunomodulatory activities, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(12), pp. 1200–1211.
- [44] M. Tabarsa, S. G. You, E. H. Dabaghian, and U. Surayot, 2018, Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities, *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), pp. 599–608.
- [45] B Kaeffer, C Bénard, M Lahaye, H M Blottière, C Cherbut, 1999, Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated

- polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells, *Planta Medica*, 65(6), pp. 527-531.
- [46] M. Tabarsa, J. H. Han, C. Y. Kim, and S. G. You, 2011, Molecular Characteristics and Immunomodulatory Activities of Water-Soluble Sulfated Polysaccharides from *Ulva pertusa*, *Journal of Medicinal Food*, 15(2), pp. 135–144.
 - [47] Y. Chi, H. Li, P. Wang, C. Du, H. Ye, S. Zuo, H. Guan, P. Wang, 2020, Structural characterization of ulvan extracted from *Ulva clathrata* assisted by an ulvan lyase, *Carbohydrate Polymers*, 229, pp. 115497.
 - [48] J. V Vilg and I. Undeland, 2017, pH-driven solubilization and isoelectric precipitation of proteins from the brown seaweed *Saccharina latissima*—effects of osmotic shock, water volume and temperature, *Journal of Applied Phycology*, 29, pp. 585.
 - [49] R. Mondal and K. Ohnishi, 2020, Characterization of *Glaciecola* sp. enzymes involved in the late steps of degradation of sulfated polysaccharide ulvan extracted from *Ulva ohnoi*, *Biochemical and Biophysical Research Communications Journal*, 523(2), pp. 441–445.
 - [50] H. T. T. Cao, M. D. Mikkelsen, Mateusz J. M. Lezyk, L. M. Bui, T. T. Van Tran, A. S. Silchenko, M. I. Kusaykin, T. D. Pham, B. H. Truong, J. Holck, A. S. Meyer, 2018, Novel Enzyme Actions for Sulphated Galactofucan Depolymerisation and a New Engineering Strategy for Molecular Stabilisation of Fucoidan Degrading Enzymes, *Marine Drugs*, 16(11), pp. 422.
 - [51] D. Manns, C. Nyffenegger, B. Saake, and A. S. Meyer, 2016, Impact of different alginate lyases on combined cellulase-lyase saccharification of brown seaweed, *RSC Advances*, 6(51), pp. 45392–45401.
 - [52] E. G. P. Stender, C. D. Andersen, F. Fredslund, J. Holck, A. Solberg, D. Teze, G. H. J. Peters, B. E. Christensen, F. L. Aachmann, D. H. Welner, B. Svensson, 2019, Structural and functional aspects of

- mannuronic acid-specific PL6 alginate lyase from the human gut microbe *Bacteroides cellulosilyticus*, *Journal of Biological Chemistry*, 294(47), pp. 17915–17930.
- [53] H. M. Qin, H. M. Qin, P. Xu, Q. Guo, X. Cheng, D. Gao, D. Sun, Z. Zhu, F. Lu, 2018, Biochemical characterization of a novel ulvan lyase from: *Pseudoalteromonas* sp. strain PLSV, *RSC Advances*, 8(5), pp. 2610–2615.
- [54] V. H. N. Tran, M. D. Mikkelsen, H. B. Truong, H. N. M. Vo, T. D. Pham, H. T. T. Cao, T. T. Nguyen, A. S. Meyer, T. T. T. Thanh, T. T. T. Van, 2023, Structural Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation of Ulvan Polysaccharides Extracted from the Green Algae *Ulva papenfussii*, *Marine Drugs*, 21(11), pp. 556.
- [55] H. Yaich, H. Garna, S. Besbes, M. Paquot, C. Blecker, and H. Attia, 2013, Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*, *Food Hydrocoll*, 31(2), pp. 375–382.
- [56] M. Lahaye, D. Jegou, and A. Buleon, 1994, Carbohydrate Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green alga *Ulva Lactuca* (L.) Thuret, *Carbohydrate Research*, 262(1), pp. 115-125.
- [57] Q. Li, F. Hu, B. Zhu, F. Ni, and Z. Yao, 2020, Insights into ulvan lyase: review of source, biochemical characteristics, structure and catalytic mechanism, *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), pp. 432-441

PHỤ LỤC 1. VẬT TƯ HÓA CHẤT CHÍNH
SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

STT	Tên vật tư	Xuất xứ hóa chất
1	Tris-HCL	Sigma, Mỹ
2	Tris-borate	Sigma-Aldrich, Đức
3	Bisacrylamide	Sigma, Mỹ
4	Acrylamide	Sigma, Mỹ
5	Red phenol	Sigma, Mỹ
6	Lysozyme	Sigma, Mỹ
7	N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma, Mỹ
8	Glycerol	Sigma, Mỹ
9	Alcian Blue 8GX	Panreac, Tây Ban Nha
10	O-Toluidine Blue	Sigma-Aldrich, Đức
11	Kanamycin	Mỹ
12	Arabinose	Mỹ
13	Chất cảm ứng IPTG (Isopropyl β -D thiogalactoside)	Mỹ
14	Imidazole	Mỹ
15	Màng lai Polyvinylidene difluoride (PVDF)	Mỹ
16	Peroxidase anti-polyHistidine	Sigma-Aldrich, Đức
17	Kit thuốc nhuộm AEC Kit	Sigma-Aldrich, Đức

PHỤ LỤC 2. THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG

P2.1. Môi trường LB (Lysogeny Broth)

Công thức pha 1 lít dung dịch

Thành phần	Hàm lượng
Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Nước cất	1000 mL
pH	Điều chỉnh về 7.0 bằng NaOH 1 N

Ghi chú: Có thể bổ sung kháng sinh kanamycin 100 µg/mL và IPTG (nếu cần cảm ứng).

P2.2. Môi trường tự cảm ứng AT (Autoinduction Medium)

Công thức pha 1 lít dung dịch, theo công thức Studier, 2005

Thành phần	Hàm lượng
Na ₂ HPO ₄	6.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	5.0 g
Tryptone	20.0 g
Yeast extract	5.0 g
Glycerol	5.0 mL (0.5% v/v)
Glucose	0.5 g (0.05% w/v)

α -Lactose monohydrate	2.0 g (0.2% w/v)
Nước cất	1000 mL
pH	Điều chỉnh về 7.5 bằng NaOH 1 N

Ghi chú: Sau khi tiệt trùng, nên lọc bổ sung glucose và lactose qua màng 0,22 μ m để tránh phân hủy nhiệt.



BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

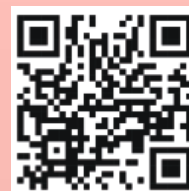
TÀI TRỢ KIM CƯƠNG



TÀI TRỢ VÀNG



TÀI TRỢ BẠC



ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

**BÁO CÁO KHOA HỌC
PROCEEDINGS**
HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024
Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào; Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp; Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào

NXB ĐẠI HỌC HUẾ



ĐẠI HỌC HUẾ
NHIỀU TÁC GIẢ

BÁO CÁO KHOA HỌC PROCEEDINGS

HỘI NGHỊ KHOA HỌC TOÀN QUỐC VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC 2024
NATIONAL BIOTECHNOLOGY CONFERENCE 2024

Thành phố Huế, ngày 25 - 26 tháng 9 năm 2024

Công nghệ gen; Công nghệ hóa sinh và protein; Công nghệ tế bào;
Công nghệ vi sinh, thực phẩm và môi trường; Công nghệ sinh học nông nghiệp;
Công nghệ sinh học y dược; Y học tái tạo và trị liệu tế bào



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC HUẾ

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN ULVAN LYASE TÁI TỔ HỢP TỪ VI KHUẨN BIỂN *Formosa agariphila* VỚI HOẠT TÍNH PHÂN CẮT ULVAN

Trần Nguyễn Hà Vy^{1*}, Cao Thị Thúy Hằng¹, Huỳnh Hoàng Như Khánh¹,
Nguyễn Thị Thuận¹, Phạm Đức Thịnh¹, Trần Hoàng Hải²

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

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

TÓM TẮT

Ulván lyase là enzyme xúc tác thủy phân ulvan thông qua cắt các liên kết glycoside trong mạch chính của phân tử ulvan, polysaccharide sulfate hóa được chiết xuất từ rong lục. Hiện nay, ulvan có khối lượng phân tử thấp thu hút sự quan tâm chú ý đặc biệt của các nhà khoa học do chúng thể hiện nhiều hoạt tính sinh học quý như chống oxy hóa, virus, ung thư, chống tăng lipid máu; kháng viêm, tăng hoạt tính điều hòa miễn dịch... Vì thế, hướng tìm kiếm các công cụ hiện đại để bẻ gãy mạch ulvan là một trong những hướng nghiên cứu có giá trị khoa học và mang tính thực tiễn cao. Trong nghiên cứu này, gene mã hóa ulvan lyase *FA28* có nguồn gốc từ vi khuẩn biển *Formosa agariphila* được tuyển chọn trên dữ liệu online, được thiết kế tái tổ hợp vào *E. coli* BL21 (DE3), được nghiên cứu điều kiện biểu hiện gồm môi trường biểu hiện, nồng độ IPTG và nhiệt độ. Kết quả cho thấy *E. coli* BL21(DE3)-*FA28*-pET-28a(+) biểu hiện tốt trong môi trường LB, 15 h, 20 °C, nồng độ IPTG cảm ứng 2 mM. Ulvan lyase tái tổ hợp thu được có kích thước 48 kDa và có hoạt tính trên cơ chất ulvan chiết từ rong lục (*Ulva lactuca*). Đối chứng âm được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid *FA28*-pET-28a(+) không được cảm ứng biểu hiện, đã không biểu hiện protein mục tiêu và không có hoạt tính thủy phân cơ chất ulvan trong tất cả các thí nghiệm. Kết quả này cung cấp thêm một công cụ tiềm năng để điều chế ulvan khối lượng phân tử thấp định hướng ứng dụng trong lĩnh vực y dược.

Từ khóa: ulvan lyase, *Escherichia coli* BL21 (DE3)-*FA28*-pET-28a(+); biểu hiện gene; tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

Ulván là sulfate polysaccharide có trong rong lục chi *Ulva* và *Enteromorpha*. Cũng giống như các sulfate polysaccharide từ rong biển khác, ulvan có cấu trúc rất phức tạp, nó được cấu tạo bởi các thành phần chủ yếu là các đường rhamnose, xylose, các acid glucuronic, acid iduronic và nhóm sulfate. Trong những năm gần đây một số công bố khoa học đã cho thấy cấu trúc và thành phần của ulvan đóng vai trò quan trọng trong chức năng sinh học của chúng. Các nghiên cứu này chỉ ra ulvan có trọng lượng phân tử thấp thể hiện hoạt tính sinh học cao hơn, ví dụ như có hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn (Qì *et al.*, 2005), hoạt động điều hòa miễn dịch tốt hơn (Peasure *et al.*, 2016; Tabarse *et al.*, 2018), và tác dụng chống tăng lipid máu cao hơn (Pengzhan *et al.*, 2003).

Để điều chế oligosaccharide dạng ulvan, các phương pháp xử lý truyền thống như hóa học và vật lý đã được sử dụng (Zhu *et al.*, 2021). So với các phương pháp bẻ gãy mạch polysaccharide truyền thống thì phương pháp cắt mạch bằng enzyme có các điều kiện phản ứng nhẹ hơn (axit thấp đến trung tính) và giúp giảm thiểu tác hại không tốt cho môi trường. Cùng với đó, enzyme có tính đặc hiệu phản ứng cao nên các oligosaccharide tạo thành vẫn giữ được cấu trúc toàn vẹn ban đầu (Zhu *et al.*, 2021; Wijesinghe *et al.*, 2012). Do đó hướng nghiên cứu sử dụng enzyme như là một công cụ tiềm năng để chuyển hóa các polysaccharide thành các oligosaccharide với các hoạt tính sinh học ưu việt hơn là một trong những hướng nghiên cứu có giá trị khoa học và mang tính thực tiễn cao.

Ulván lyase, một loại enzyme có khả năng phân hủy ulvan. Ulvan lyase thuộc họ polysaccharide lyase, có khả năng cắt các liên kết glycosid trong polysaccharide theo cơ chế loại bỏ liên kết β. Ulvan lyase phá vỡ liên kết giữa rhamnose 3-sulfat và acid uronic trong ulvan, tạo ra oligosaccharide với axit uronic không bão hòa ở đầu không khử.

Theo hiểu biết của chúng tôi, tất cả các ulvan lyase đã xác định đặc tính xúc tác đều được phân lập và tinh chế từ vi khuẩn biển và là enzyme tái tổ hợp (Qin *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2024). Đó là do, ulvan lyase là một loại enzyme khó thu nhận và tinh sạch từ các nguồn tự nhiên do dễ bị mất hoạt tính trong quá trình tinh sạch. Trong phương pháp sản xuất enzyme tái tổ hợp, hệ biểu hiện *E. coli* là phổ biến nhất để tổng hợp protein tái tổ hợp do nhiều lợi ích, bao gồm dễ nuôi cấy, tốc độ sinh trưởng nhanh, đặc điểm di truyền được nghiên cứu kỹ lưỡng, sự tồn tại của nhiều vector tách dòng và chủng đột biến thương mại cho hệ thống này, cũng như việc thu nhận protein mục tiêu dễ dàng. Để thuận tiện cho quá trình tinh sạch, ulvan lyase cần được tổng hợp một cách hiệu quả và ổn định, cùng với cải tiến quá trình sinh khối tế bào. Biểu hiện protein ngoại lai trong chủng chủ bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó, điều kiện lên men có tác động lớn, dẫn đến hiệu suất

tổng hợp protein không hiệu quả, sai lệch cấu trúc protein và mất chức năng sinh học. Việc này có thể được khắc phục bằng cách kiểm soát chặt chẽ các thông số trong quá trình lên men.

Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung khảo sát các yếu tố (môi trường lên men, nồng độ chất cảm ứng, nhiệt độ biểu hiện, pH môi trường và thời gian lên men) ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện của gene ulvan lyase FA28, được tìm kiếm trên ngân hàng dữ liệu online từ *Formosa agariphila* KMM 3901^T, một vi khuẩn biển thuộc nhóm *Favobacterium*, được phân lập từ một loài rong lục ở biển Nhật Bản (Glasson *et al.*, 2017).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng *E. Coli* DH 5alpha được sử dụng làm chủng nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *E. Coli* BL21 được sử dụng làm chủng biểu hiện ulvan lyase tái tổ hợp. Khuôn gene được tổng hợp nhân tạo từ trình tự tối ưu hoá cho việc biểu hiện trong hệ chủng *E. coli* BL21 (DE3). Plasmid pET-28a(+) được sử dụng để dòng hoá mang gene FA28 mã hóa ulvan lyase có trình tự protein được lấy từ ngân hàng dữ liệu mã số (WP_038530530), và sự biểu hiện gene được kiểm soát bởi promotor T7 thông qua chất cảm ứng IPTG. Gene này đã được thiết kế mã hóa protein không có tín hiệu peptide ở đầu N-terminal nhưng bổ sung thêm 10x histidine để thuận lợi cho quá trình tinh sạch enzyme tái tổ hợp. Tất cả các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi Khoa Công nghệ kỹ thuật Sinh học và Y sinh học, Trường Đại học Khoa học Kỹ thuật Đan Mạch, Đan Mạch.

Phương pháp

Tạo dòng chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp FA28-pET-28a(+)

Trình tự gen thiết kế được tổng hợp bởi hãng Genscript (Piscataway, NJ, USA) và khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu mang trình tự nhận biết của hai enzyme cắt giới hạn XhoI và NdeI. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, nhuộm màu bằng ethidium bromide và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống Dual Intensity UV Transilluminator. Sau đó, sản phẩm PCR được tách và gửi đi giải trình tự để kiểm tra lại độ chính xác của gene mục tiêu (Macrogen Europe B.V., Hà Lan). Sản phẩm plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5alpha bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau đó được trải trên môi trường Luria Bertani Broth (LB) có chứa 100 µg/mL kháng sinh kanamycin, nuôi ủ 37 °C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc chèn thành công plasmid có chứa gen mã hóa được nuôi tăng sinh, thu sinh khối tế bào và tách chiết plasmid tổ hợp bằng bộ kits Mix & Go Kit (Zymo Research).

Vector tái tổ hợp pET28a(+) cùng được cắt bởi cặp enzyme giới hạn XhoI và NdeI để tạo đầu dính tương hợp với gen ulvan lyase. Sau đó, sản phẩm PCR được xử lý bởi cặp enzyme cắt giới hạn XhoI và NdeI để tạo đầu dính và thực hiện phản ứng nối nhờ vào enzyme T4 DNA ligase, nối với pET-28a(+) đã được cắt mở vòng bởi hai enzyme tương ứng.

Plasmid FA28-pET-28a(+) được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) bằng Mix & Go Kit (Zymo Research). Sau khi biến nạp, chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp FA28-pET-28a(+), được gọi là chủng *E. coli* BL21 (DE3) / FA28-pET-28a(+) được nuôi cấy trên môi trường thạch LB có kháng sinh kanamycin nồng độ cuối 100 µg/mL để tách dòng và chọn lọc dòng vi khuẩn mang gene mục tiêu. Các chủng vi khuẩn mọc được trên môi trường LB có chứa 100 µg/mL kháng sinh kanamycin được lựa chọn để kiểm tra kết quả tạo dòng thông qua kỹ thuật PCR, sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự để kiểm tra lại độ chính xác của gene FA28 ulvan lyase (Macrogen Europe B.V., Hà Lan) (Tran *et al.*, 2022).

Biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp

Sau khi kiểm tra đúng gene mục tiêu đã được tạo dòng thành công, quá trình biểu hiện được thực hiện như sau: Khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3)/ FA28-pET-28a(+) được chọn lọc và nuôi tăng sinh trong 5 mL môi trường LB lỏng có bổ sung 50 µg/mL kanamycin, 34 µg/mL chloramphenicol và 0,05% (w/v) arabinose ở nhiệt độ 37 °C, lắc 180 rpm qua đêm. Sau đó, dịch nuôi cấy vi khuẩn được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng 500 mL với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37°C, 180 rpm cho đến khi OD₆₀₀ đạt giá trị 0,8-1,0 thì bổ sung chất cảm ứng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ở các nồng độ khác nhau ở 20°C, tốc độ lắc 180 rpm. Sau 15 h cảm ứng, sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm với tốc độ 7.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Đánh giá khả năng biểu hiện của ulvan lyase bằng điện di hỗn hợp sinh khối tế bào (whole cells) theo SDS-PAGE và nhận diện protein tái tổ hợp bằng phản ứng Western blot.

Đối chứng âm được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid FA28-pET-28a(+) không được cảm ứng biểu hiện.

Ảnh hưởng điều kiện biểu hiện gene FA28 ulvan lyase tái tổ hợp

Hai môi trường khác nhau gồm LB (yeast extract 0,5%, peptone 1,0%, NaCl 1,0%, pH 7,5) và môi trường tự cảm ứng AT (0,6% w/w Na₂HPO₄; 0,3% w/w KH₂PO₄; 2,0% w/w tryptone; 0,5% w/w yeast extract; 0,5% w/w NaCl; 0,06% v/v glycerol; 0,05% w/v glucose và 0,04% w/v α-lactose, pH 7,5) được khảo sát cho sự biểu hiện gene FA28 mã hóa ulvan lyase. Đối với môi trường LB được thực hiện theo các thông số của điều kiện chuẩn nêu trên;

đối với môi trường AT, quá trình cấy chuyển từ ống 5 mL sang môi trường biểu hiện AT được thực hiện ở 20 °C, 180 rpm trong 20 h. Song song với quá trình khảo sát điều kiện môi trường biểu hiện, tiến hành kiểm tra sự biểu hiện ulvan lyase theo thời gian với các mốc thời gian là 5 h, 10 h, 15 h và 20 h. Môi trường và thời gian biểu hiện phù hợp được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Sự biểu hiện của ulvan lyase bằng điện di hỗn hợp sinh khối tế bào (whole cells) theo SDS-PAGE và Western blot.

Đối với môi trường biểu hiện LB, nồng độ chất cảm ứng được khảo sát là IPTG 0-2 mM, nhiệt độ biểu hiện được đánh giá tại các điểm 14°C; 16°C; 18°C; 20°C; 25°C; và 30°C. Sự biểu hiện của ulvan lyase được đánh giá bằng điện di enzyme thô thu nhận được theo SDS-PAGE và Western blot và hoạt tính enzyme theo phương pháp C-PAGE trên cơ chất fucoidan chiết xuất từ rong *S. mcclurei*.

Chiết xuất enzyme thô

Kết thúc quá trình biểu hiện, tiến hành ly tâm dịch lên men (7.000 rpm, 15 phút, 4°C) để thu nhận sinh khối tế bào. Huyền phù sinh khối tế bào trong dịch đệm 20 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 7,4, sau đó bổ sung thêm lysozyme 0,2 mg/mL để hỗ trợ quá trình phá vỡ tế bào. Các tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm (UP400S Hielscher, Teltow, Germany) chu kỳ 0,5 và cường độ 100% trong 2 phút, sau đó để ở nhiệt độ phòng 15 phút. Dịch enzyme thô được thu nhận bằng cách ly tâm thu dịch nổi (19.000 rpm, 4°C, 20 phút), dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,22 µm để loại xác tế bào. Enzyme thô thu nhận được tiến hành đo hàm lượng protein theo Bradford với chất chuẩn là albumin huyết thanh bò (Bradford, 1976), sau đó thực hiện SDS-PAGE và Western blot.

Thử nghiệm hoạt tính enzyme bằng C-PAGE (Carbohydrate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

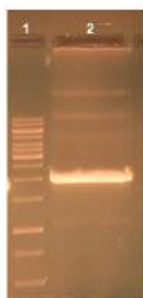
Hỗn hợp phản ứng chứa dung dịch enzyme có nồng độ 0,5 g/L trong môi trường đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, 250 mM NaCl và 10 mM CaCl₂ (đệm A), và 1% w/v fucoidan trong đệm A. Các mẫu được ủ ở 35°C trong vòng 24 h. Hỗn hợp phản ứng (5 µL) được pha trộn với 5 µL đệm tải (20% glycerol và 0,02% phenol đỏ). Sau đó, sử dụng 5 µL mẫu để thực hiện điện di trên gel polyacrylamide 20% (w/v) dày 1 mm với đệm chạy là Tris-borate 100 mM, pH 8,3 trong 1 h. Quá trình nhuộm gel được thực hiện qua hai bước: đầu tiên là với dung dịch chứa 0,05% alcian blue 8GX (Panreac, Barcelona, Tây Ban Nha) trong 2% axit acetic trong 45 phút, sau đó là với dung dịch 0,01% O-toluidine blue (Sigma-Aldrich, Steinheim, Đức) trong 50% ethanol và 1% axit acetic. Mẫu chuẩn (đối chứng dương) là sản phẩm phản ứng của FFA2 trên fucoidan từ rong nâu *Fucus evanescens* do Khoa Công nghệ kỹ thuật Sinh học và Y sinh học, Trường Đại học Khoa học Kỹ thuật Đan Mạch, Đan Mạch cung cấp.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

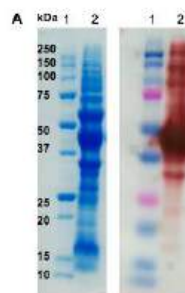
Tạo dòng và biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp

Plasmid FA28-pET-28a(+) được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3), khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch LB chọn lọc có chứa 100 µg/mL kanamycin được lựa chọn để tiến hành PCR khuếch đại đoạn gene FA28 nhằm kiểm tra lại sự thành công của quá trình tạo dòng. Kết quả điện di DNA cho thấy sản phẩm PCR của gene FA28 ulvan lyase có kích thước khoảng 1324 bp, tương đồng với kích thước của DNA được thiết kế (Hình 1). Đồng thời sản phẩm PCR cũng được gửi đi giải trình tự và sau đó so sánh trình tự với trình tự gene ban đầu để kiểm tra độ chính xác của gene đã được biểu hiện, sự tương đồng cao giữa gene trước và sau khi biểu hiện. Như vậy, rõ ràng FA28 ulvan lyase đã được tạo dòng thành công, khuẩn lạc đều đã mang vector tái tổ hợp.

Kết quả biểu hiện protein FA28 ulvan lyase ở điều kiện tiêu chuẩn được thể hiện ở Hình 2. Từ kết quả điện di trên SDS-PAGE (Hình 2A) cho thấy, protein FA28 ulvan lyase biểu hiện có khối lượng phân tử khoảng 48 kDa. Đây cũng chính là khối lượng phân tử tương đương với khối lượng phân tử protein mục tiêu FA28. Để xác định chính xác sự có mặt của protein tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi tiến hành phản ứng lai miễn dịch Western blot (Hình 2B), kết quả cho thấy, xuất hiện vạch màu đỏ tương ứng với protein kích thước 48 kDa ngay tại vị trí biểu hiện của protein mục tiêu. Vệt màu đỏ trong phản ứng lai Western blot là kết quả cho thấy sự biểu hiện thành công protein tái tổ hợp mục tiêu FA28 ulvan lyase, do chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3)-FA28-pET-28a(+) sản xuất. Phản ứng màu sẽ xuất hiện khi có sự liên kết giữa protein tái tổ hợp mang đuôi His-tag và kháng thể monoclonal anti-polyHistidine peroxidase-conjugated antibody. Ngoài ra, khi tiến hành thí nghiệm tương tự với chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid FA28-pET-28a(+) không được cảm ứng biểu hiện, chúng tôi nhận thấy không có xuất hiện vạch protein mục tiêu (vị trí 48 kDa) ở trên gel điện di SDS-PAGE và phản ứng lai miễn dịch Western blot cũng không xuất hiện bất cứ vệt có màu đỏ nào (số liệu không nêu lên ở bài báo này).



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR gene FA28 ulvan lyase
Thang chuẩn kích thước DNA (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Mỹ).



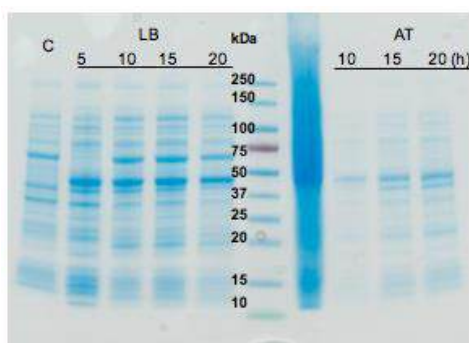
Hình 2. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp FA28
(A) - Điện di SDS-PAGE; (B) - Western blot. Trong đó: 1. Thang chuẩn; 2. Mẫu sinh khối sau biểu hiện.

Ảnh hưởng của điều kiện biểu hiện gene FA28 ulvan lyase tái tổ hợp

Kết quả khảo sát 02 công thức môi trường AT và LB thể hiện như Hình 3 cho thấy, ở các môi trường khác nhau thì sự biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp là khác nhau. Môi trường AT, là môi trường tự cảm ứng, bao gồm nguồn nitơ cao, nguồn carbon glucose/glycerol nhưng lượng ulvan lyase thu được trong 300 μ L môi trường lên men thấp hơn so với môi trường LB (Hình 3). Do đó, môi trường LB được lựa chọn cho sự biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp do lượng protein được tổng hợp là nhiều nhất và ổn định nhất. LB là một môi trường cơ bản cho sự biểu hiện của protein tái tổ hợp, dễ chuẩn bị, thành phần môi trường cung cấp đầy đủ các peptide, axit amin thiết yếu và muối khoáng natri cho sự sinh trưởng của vi khuẩn *E. coli*. Kết quả khảo sát thời gian biểu hiện FA28 ulvan lyase cho thấy, sau 5 h lên men, enzyme đã biểu hiện và lượng protein tăng dần theo thời gian, sau 10-15 h cảm ứng protein FA28 ulvan lyase tái tổ hợp được tổng hợp nhiều và biểu hiện mạnh và không thay đổi nhiều khi tăng thời gian biểu hiện lên 20 h. Do đó trong khoảng thời gian 15 h sau khi cảm ứng được lựa chọn là thời gian tối ưu cho sự biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp.

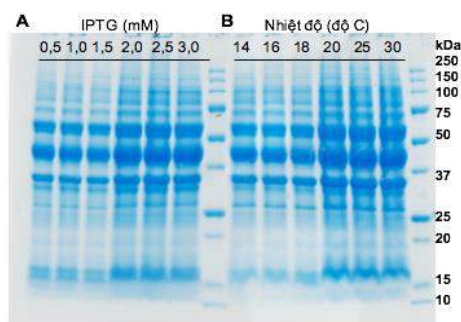
Đối chứng âm được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid FA28-pET-28a(+) không được cảm ứng biểu hiện. Kết quả thể hiện trên Hình 3, ở vị trí đối chứng âm – được kí hiệu là C cho thấy, hoàn toàn không có xuất hiện vạch protein mục tiêu (vị trí 48 kDa) ở trên gel điện di SDS-PAGE, trong khi các protein khác của chủng vi khuẩn *E. coli* đều được thể hiện. Điều này chứng tỏ, vạch protein kích thước 48 kDa chính là protein mục tiêu.

Protein tái tổ hợp được điều khiển tổng hợp bởi promoter T7 trên vector pET-28a(+). Promoter này được cảm ứng bởi sự có mặt của IPTG trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ chất này ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp mục tiêu. Ở nồng độ quá cao nó gây độc cho tế bào, trong khi ở nồng độ quá thấp protein thường được tổng hợp kém. Do đó, chúng tôi đã tiến hành bổ sung IPTG với các nồng độ khác nhau là 0,5 mM; 1 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM và 3 mM, kết quả thể hiện ở Hình 4A. Kết quả cho thấy với nồng độ 2 mM, IPTG FA28 ulvan lyase được tổng hợp mạnh nhất. Khi tăng IPTG lên đến 3 mM quá trình biểu hiện hầu như không đổi. Do đó, chúng tôi chọn nồng độ cảm ứng IPTG 2 mM cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường lên men đến sự biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp

St - Thang protein chuẩn, AT - môi trường tự cảm ứng, LB - môi trường lên men *E. coli* được cảm ứng bởi IPTG; 5 h, 10 h, 15 h, 20 h - thời gian lên men, C - Không cảm ứng biểu hiện (IPTG 0mM).

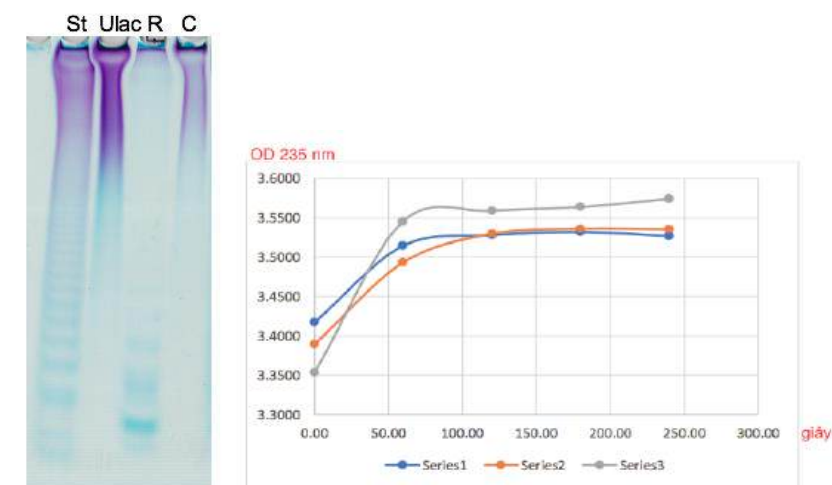


Hình 4. Ảnh hưởng của điều kiện lên men đến sự biểu hiện và hoạt tính của FA28 ulvan lyase tái tổ hợp
(A) Nồng độ IPTG, (B) Nhiệt độ.

Nhiệt độ là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất và chất lượng protein tái tổ hợp. Một trong những nguyên nhân là do nhiệt độ làm ảnh hưởng đến tính ổn định của plasmid trong tế bào. Nhiệt độ càng cao thì khả năng

đào thải plasmid của chủng chủ càng lớn. Đồng thời nhiệt độ còn làm cho mRNA dễ bị phá hủy. Để thu protein FA28 ulvan lyase tái tổ hợp có lượng lớn mà không lẫn quá nhiều protein của *E. coli*, nhằm làm tăng hiệu quả hoặc giảm lược cho quá trình tinh sạch này, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng tổng hợp protein FA28 ulvan lyase ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau tại 14°C, 16°C, 18°C, 20°C, 25°C và 30°C. Kết quả của thí nghiệm này được thể hiện như trên Hình 4B. Từ kết quả trên cho thấy rằng, nhiệt độ nuôi cấy càng tăng thì mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp và các protein khác của *E. coli* càng tăng. Tuy nhiên, hoạt tính của ulvan lyase bị ảnh hưởng rất lớn bởi nhiệt độ, khi sử dụng enzyme trong khảo nghiệm này để thử hoạt tính, chúng tôi nhận thấy enzyme thể hiện hoạt tính tốt nhất khi biểu hiện ở 20°C (số liệu không nêu lên ở bài báo này). Do đó, với mục đích thu nhận protein FA28 ulvan lyase tái tổ hợp thể hiện hoạt tính tốt chúng tôi chọn nhiệt độ cho quá trình biểu hiện là 20°C.

Kết quả hoạt tính thủy phân ulvan của FA28 ulvan lyase tái tổ hợp



Hình 5. Hoạt tính của FA28 ulvan lyase

Ulac – ulvan được điều chế từ rong lục *Ulva lactuca*; St - đối chứng dương của điện di C-PAGE;

R - Sản phẩm của phản ứng thủy phân ulvan bởi FA28 ulvan lyase;

C – đối chứng âm: phản ứng giữa dịch chiết thô của vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) không được biểu hiện và cơ chất ulvan.

Ulván lyase FA28 chiết xuất thô được sử dụng để thử nghiệm khả năng bẻ mạch ulvan chiết xuất từ loài rong *U. lactuca* thu nhận tại vùng biển Nha Trang-Khánh Hoà, kết quả thể hiện ở Hình 5. Kết quả cho thấy sự khác biệt của mẫu ulvan chưa thủy phân (Ulac) và mẫu thủy phân (R). Bên cạnh đó, mẫu đối chứng âm (C) hoàn toàn không xảy ra phản ứng, do đó chứng tỏ rằng chỉ có ulvan lyase tái tổ hợp thể hiện hoạt tính chứ không phải thành phần protein nào khác trong *E. coli* tái tổ hợp. Hình ảnh C-PAGE ở Hình 5 cho thấy, ulvan lyase FA28 đã bẻ mạch ulvan thành những oligomer sulfate hóa có kích thước khác nhau trên C-PAGE. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng của ulvan lyase FA28 để điều chế ulvan chiết xuất từ rong lục Việt Nam. Quá trình phân cắt để tạo oligosaccharide dạng ulvan này còn được đánh giá thông qua phương pháp quang phổ. Hoạt tính ulvan lyase được xác định bằng sự gia tăng các sản phẩm không bão hòa (liên kết đôi trong hỗn hợp phản ứng), khi đo độ hấp thụ ở bước sóng 235 nm (Manns *et al.*, 2013). Kết quả ở Hình 5 cho thấy, ulvan lyase FA28 chiết thô từ dịch nội bào đã thể hiện rõ hoạt tính thủy phân ulvan từ rong lục *U. lactuca* trong thí nghiệm lặp lại 3 lần.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện ulvan lyase FA28 bằng môi trường LB và thời gian để enzyme biểu hiện tốt là 15 h sau khi cảm ứng bằng IPTG ở nồng độ 2 mM ở nhiệt độ 20 °C. Enzyme có kích thước là 48 kDa, đồng thời enzyme này đã bẻ mạch ulvan thành các oligomer sulfate hóa có kích thước khác nhau. Điều này chứng tỏ tiềm năng ứng dụng của ulvan lyase FA28 trong việc điều chế ulvan từ rong lục Việt Nam. Cần tiến hành thêm các nghiên cứu xác định đặc điểm xúc tác của enzyme và tối ưu hóa quá trình tạo oligosaccharide để có thể thu nhận được sản phẩm hiệu quả cao nhất. Nghiên cứu này cung cấp những thông tin quan trọng về biểu hiện và hoạt tính của ulvan lyase FA28, đồng thời hướng tới cho các nghiên cứu tiếp theo về ứng dụng của enzyme này trong lĩnh vực công nghệ sinh học và y học.

Lời cảm ơn: Kết quả bài báo được hỗ trợ thực hiện bằng nguồn kinh phí từ Đề tài thuộc các hướng KHCN ưu tiên cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST06.01/23-24.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Gao J, Du C, Chi Y, Zuo S, Ye H, Wang P (2019). Cloning, Expression, and Characterization of a New PL25 Family Ulvan Lyase from Marine Bacterium *Alteromonas* sp. A321. *Mar Drugs*, 17(10): 568.

- Glasson CRK, Sims IM, Carnachan SM, et al. A cascading biorefinery process targeting sulfated polysaccharides (ulvan) from *Ulva ohnoi*. *Algal Res*, 2017; 27: 383-391.
- Mann AJ, Hahnke RL, Huang S, Werner J, Xing P, Barbeyron T (2013). The genome of the alga associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901 reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*, 79: 6813- 6822.
- Peasura N, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O (2016). Assessment of biochemical and immunomodulatory activity of sulphated polysaccharides from *Ulva intestinalis*. *Int J Biol Macromol*, 91: 269–277.
- Pengzhan Y, Ning L (2003). Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol Res*, 48: 543–549.
- Qi H, Zhao T (2005). Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J Appl Phycol*, 17, 527–534.
- Qin HM, Xu P, Guo Q, Cheng X, Gao D, Sun D, Zhu Z, Lu F (2018). Biochemical characterization of a novel ulvan lyase from *Pseudoalteromonas* sp. strain PLSV. *RSC Adv*, 8(5): 2610-2615.
- Rodrigues VJ, Jouanneau D, Fernandez-Fuentes N et al (2024). Biochemical characterisation of a PL24 ulvan lyase from seaweed-associated *Vibrio* sp. FNV38. *J Appl Phycol*, 36: 697-711.
- Tabarsa M, You S, Dabaghian EH, Surayot U (2018). Water-soluble polysaccharides from *Ulva intestinalis*: Molecular properties, structural elucidation and immunomodulatory activities. *J Food Drug Anal*. 26: 599-608.
- Tran VHN, Nguyen TT, Meier S, Holck J, Cao HTT, Van TTT, Meyer AS, Mikkelsen MD (2022) The Endo- α (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans. *Marine Drugs*, 20(5): 305.
- Wijesinghe W, Jeon YJ (2012). Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83: 6–12.
- Zhu B (2021). Marine oligosaccharides originated from seaweeds: Source, preparation, structure, physiological activity and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 61: 60-74.

STUDY ON EXPRESSION CONDITIONS OF RECOMBINANT ULVAN LYASE FROM MARINE BACTERIA *Formosa agariphila* WITH ULVAN DEGRADING ACTIVITY

Tran Nguyen Ha Vy^{1*}, Cao Thi Thuy Hang¹, Huynh Hoang Nhu Khanh¹,
 Nguyen Thi Thuan¹, Pham Duc Thinh¹, Tran Hoang Hai²

¹Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

SUMMARY

Ulvan lyase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of ulvan by cleaving glycosidic linkages within the main chain of the ulvan molecule, a sulfated polysaccharide extracted from green seaweed. Nowadays, low molecular weight ulvan attracts special attention from modern scientists because it has many valuable biological activities such as: anti oxidation, anti virus, anti cancer, anti inflammatory, anti increased blood lipids, anti inflammation, increased immune regulatory activity... Therefore, the study on modern tools to degrade ulvan into ulvan oligosaccharides is one of the research directions with high scientific value and practicality. In this study, the gene encoding the ulvan lyase FA28, sourced from the marine bacterium *Formosa agariphila*, was selected based on online data and recombined into *E. coli* BL21 (DE3). The expression conditions, including the expression medium, IPTG concentration, and temperature were investigated. The results showed that *E. coli* BL21 (DE3)/ FA28 pET 28a(+) expressed well in LB medium, for 15 hours at 20 °C, 2 mM IPTG. The reassembled ulvan lyase obtained had a size of 48 kDa and exhibited activity on ulvan substrates extracted from green seaweed *Ulva lactuca*. The negative control used in this study was the *E. coli* strain BL21 (DE3) carrying the uninduced expression plasmid FA28 pET-28a(+), which did not express the target protein in all experiments. Besides, the negative control sample had absolutely no enzyme-substrate reaction, thus proving that only recombinant ulvan lyase showed activity and not any other protein components in *E. coli* recombinant. These findings provide an additional potential tool for the production of low molecular weight ulvan, with potential applications in the field of medicine.

Keywords: Ulvan lyase, *E. coli* BL21 (DE3)-FA28-pET-28a(+), gene expression, recombinant.

* Author for correspondence: Tel: 0901973350; Email: havy158@gmail.com

Số: 351 /QĐ-HVKHCN

Hà Nội, ngày 09 tháng 05 năm 2025

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 364/QĐ-VHL ngày 01/03/2025 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 đợt 1 năm 2021;

Căn cứ Quyết định số 66/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 1288/QĐ-HVKHCN ngày 21/11/2024 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ về việc gia hạn thời gian học tập lần 3 cho học viên Trần Hoàng Hải;

Xét đề nghị của Trường khoa Sinh học, Trường phòng Đào tạo.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận văn thạc sĩ cho học viên Trần Hoàng Hải với đề tài: “Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia coli*”

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 có hiệu lực kể từ ngày ký đến trước ngày 31/05/2025.

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

Điều 3. Trường phòng Tổ chức - Hành chính, Trường phòng Đào tạo, Trường phòng Kế toán, Trường Khoa 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. /s. *[Chữ ký]*

Nơi nhận:

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



GIÁM ĐỐC *[Chữ ký]*

GS.TS. Vũ Đình Lâm



DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

(Kèm theo Quyết định số 351 /QĐ-HVKHCN ngày 09 / 5 /2025
của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ)

Chợ luận văn của học viên: Trần Hoàng Hải

Tên đề tài: Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên
Escherichia coli

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Người hướng dẫn: 1. TS. Cao Thị Thúy Hằng

- Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm KHCNVN

2. TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

- Viện Hải dương học, 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 Nông nghiệp và Môi trường	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 Hải dương học, 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)./. *Ja*

Nha Trang, ngày 22 tháng 05 năm 2025

BIÊN BẢN HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN VĂN THẠC SĨ

Thực hiện Quyết định số: 351/QĐ-HVKHCN ngày 09/05/2025 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 Hoàng Hải

Tên đề tài: Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia coli*.

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

Hôm nay, ngày 22/05/2025 Hội đồng đã họp tại Phòng họp tầng 1, Viện Hải dương học (cơ sở số 02 Hùng Vương) vào lúc 14h00, Hội đồng gồm 05 thành viên:

1. PGS.TS. Đào Việt Hà
2. TS. Phan Thị Hoài Trinh
3. TS. Lê Đình Hải
4. TS. Nguyễn Xuân Vy
5. TS. Phan Quốc Thông

Chủ tịch hội đồng
Thư ký hội đồng
Phản biện 1
Phản biện 2
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

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

- Đề tài nghiên cứu về enzyme ulvan lyase tái tổ hợp trên *E. coli* có hoạt tính bẻ gãy mạch ulvan có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, là cơ sở khoa học để nghiên cứu tạo ra các sản phẩm sinh học có hoạt tính ứng dụng trong y học.

- 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:

- Xác định được điều kiện biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp trên *E. coli*.
- Xác định được điều kiện thu nhận và tinh sạch ulvan lyase tái tổ hợp.
- Đánh giá hoạt tính enzyme ulvan lyase và khả năng bẻ gãy mạch ulvan.
- Những điểm cần chỉnh sửa trong luận văn:
 - + Trong phần đặt vấn đề, học viên cần bổ sung trích dẫn tài liệu tham khảo, làm rõ ý nghĩa khoa học và thực tiễn của vấn đề nghiên cứu.
 - + Cần tách riêng mục đối tượng và vật liệu nghiên cứu.
 - + Phương pháp nghiên cứu cần trình bày gắn liền với nội dung và kết quả nghiên cứu.
 - + Phần kết quả cần trình bày và bố cục lại cho logic hơn.
 - + Rà soát tài liệu tham khảo, trình bày đúng theo quy định của Học viện.

*** Kết luận chung:**

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

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:
 - + Phần mở đầu cần trình bày ngắn gọn lại. Ulvaes là bộ, cần chỉnh sửa lại.
 - + Phần tổng quan cần xem xét chỉnh sửa thông tin giới thiệu về rong Lục.
 - + Phần phương pháp nghiên cứu cần làm rõ mẫu thu nhận là nước ớt ở ruộng muối.
 - + Phần kết quả nghiên cứu: Chỉnh sửa tên mục 3.2 thành “Ảnh hưởng của một số yếu tố” thay cho cụm từ “Nghiên cứu khảo sát”.
 - + Trình bày lại kết luận và kiến nghị.
 - + Định dạng tài liệu tham khảo theo đúng quy định.

*** Kết luận chung:**

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

7. Ý kiến của các thành viên Hội đồng

* **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.
- Làm rõ cơ sở để xác định sự khác biệt về cấu trúc của các sản phẩm thủy phân bởi cùng một enzyme trên hai cơ chất cấu trúc khác nhau.
- Trình bày phần kết quả và thảo luận.

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

- Bổ sung tài liệu tham khảo cho các phương pháp nghiên cứu.
- Bổ sung môi trường LB và AT vào phụ lục hóa chất.
- Nêu rõ tỉ lệ enzyme : cơ chất ở phần phương pháp xác định hoạt tính ulvan lyase (Trang 24).
- Bổ sung tài liệu tham khảo cho ý “ulvan lyase tái tổ hợp đều được thu nhận từ dịch nội bào” (Trang 38).
- Thống nhất định dạng tài liệu tham khảo.
- Cơ sở để lựa chọn điều kiện nuôi cấy lắc ở 20°C sau khi bổ sung chất cảm ứng IPTG?
- Phần kết luận và kiến nghị cần trình bày ngắn gọn và súc tích.

* **PGS.TS Đào Việt Hà** có các ý kiến:

- Bổ sung thảo luận về các kết quả nghiên cứu.
- Bổ cục lại các nội dung trong phần phương pháp và kết quả nghiên cứu cho logic hơn.
- Kiểm tra và lại các tên hình 3.5 và 3.9.
- Rà soát các lỗi chính tả, kiểm tra lại độ chuẩn xác khoa học của một số câu văn trong phần thảo luận. Bổ sung nội dung phần thảo luận.
- Viết lại kết luận và kiến nghị.

8. Học viên trả lời:

Câu hỏi 1: Cơ sở để lựa chọn điều kiện nuôi cấy lắc ở 20°C sau khi bổ sung chất cảm ứng IPTG?

Trả lời 1: Điều kiện nuôi cấy lắc ở 20°C sau khi bổ sung IPTG được lựa chọn nhằm giảm tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn, giúp protein tái tổ hợp có thời gian gấp cuộn đúng cấu trúc không gian, hạn chế tạo thể vùi. Nhiệt độ thấp sau cảm ứng thường được áp dụng để tăng khả năng biểu hiện protein tan, đặc biệt với các protein có cấu trúc phức tạp.

Câu hỏi 2: Nguyên tắc của sắc ký ái lực là gì? Trong nghiên cứu này tại sao lại dùng sắc ký ái lực để tinh sạch enzyme tái tổ hợp.

Trả lời: Nguyên tắc của sắc ký ái lực là dựa trên sự tương tác đặc hiệu giữa phân tử mục tiêu (như enzyme) với một ligand cố định trên pha rắn của cột sắc ký. Trong nghiên cứu này, enzyme tái tổ hợp mang đuôi His-tag nên có khả năng bắt đặc hiệu với ligand là ion kim loại (như Ni^{2+}) gắn trên cột sắc ký ái lực. Phương pháp này được sử dụng vì cho phép tinh sạch enzyme tái tổ hợp một cách hiệu quả, chọn lọc cao và giữ được hoạt tính sinh học của enzyme.

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 hợp kín và cho điểm

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

Trưởng ban: TS. Lê Đình Hải

Ủy viên: TS. Phan Quốc Thông

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: 37,9

Điểm trung bình: 7,58

Điểm thưởng công trình công bố: 0,8

Tổng điểm đánh giá luận văn và thưởng công trình công bố: 8,38

- 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, súc tích các phần mở đầu, kết luận và kiến nghị.

+ Rà soát chỉnh sửa các thuật ngữ 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 16 giờ 45 phút ngày 22/5/2025.

Nha Trang, ngày 22 tháng 5 năm 2025

THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



Phan Thị Hoài Trinh

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Đào Việt Hà

XÁC NHẬN CỦA CƠ SỞ ĐÀO TẠO

**KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC**



Nguyễn Thị Trung



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 Hoàng Hải

Tên đề tài: “Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia coli*.”

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:

Ulvan là một hợp chất tiềm năng với nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như chống oxy hóa, chống viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, kháng vi-rút, điều hòa miễn dịch, chống tăng lipid máu, chống đông máu và ứng dụng trong kỹ thuật mô. Tuy nhiên, việc ứng dụng nó vẫn gặp một số hạn chế đó là trọng lượng phân tử lớn của ulvan, làm giảm khả năng thâm nhập vào tế bào và ảnh hưởng đến tính sinh học của chúng. Để tạo được hoạt tính của ulvan các nhà khoa học đã nghiên cứu sử dụng các enzym để tạo ra ulvan có khối lượng phân tử thấp. Trong đó, việc sử dụng ulvan lyase là một enzym có thể cắt ulvan thành mạch ngắn.

Mặc dù ulvan lyase có thể điều chế từ nguồn tự nhiên, nhưng quá trình này gặp nhiều khó khăn như: dễ lẫn tạp chất, hiệu suất thu nhận thấp và hoạt tính enzym dễ bị ảnh hưởng trong quá trình thu nhận và tinh sạch. Do đó, việc nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch ulvan lyase tái tổ hợp là cần thiết.

Đề tài có ý nghĩa khoa học và thực tiễn đó là cơ sở khoa học để nghiên cứu phát triển các loại tái tổ hợp khác. Sản phẩm của đề tài là ulvan lyase có bề ngắn mạch ulvan để từ đó có thể tạo ra các sản phẩm sinh học có hoạt tính sinh học cao ứng dụng vào trong y học, đồng thời có thể nghiên cứu phát triển nguồn dược liệu biển phong phú và tiềm năng từ rong biển Việt Nam.

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:

Xét về đối tượng, phạm vi nghiên cứu, kết quả thu được thì đề tài nghiên cứu chưa thấy có sự trùng lặp với các kết quả nghiên cứu trong nước và thế giới.

Luận văn là một phần của đề tài cấp Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số VAST06.01/23-24; các kết quả được trình bày rõ ràng, có nhiều hình ảnh minh họa; được thực hiện tại phòng thí nghiệm của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công

nghe Nha Trang (nay là Viện Hải Dương Học) nên đảm bảo được tính trung thực và độ chính xác cao. Các trích dẫn tài liệu được thể hiện khá đầy đủ, và cập nhật.

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 nghiên cứu, 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 luận án, tác giả đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau gồm: xác định lại gen mã hóa enzyme ulvan lyase trong chủng vi khuẩn BL21 tái tổ hợp, trong hệ thống biểu hiện vector pET28 bằng phương pháp PCR, tác giả đã sử dụng phương pháp SDS- PAGE, Western blot để đánh giá khả năng và các điều kiện tối ưu biểu hiện enzyme mong muốn của chủng vi khuẩn tái tổ hợp. Như vậy các phương pháp là hiện đại và phù hợp với nội dung và kết quả nghiên cứu.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Kết quả của luận văn bao gồm:

- Đã xác định được điều kiện biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp trên *E. coli*.
- Đã xác định được quy trình thu nhận và tinh sạch ulvan lyase tái tổ hợp Faly.
- Đánh giá hoạt tính enzyme và khả năng bẻ gãy mạch ulvan của ulvan lyase tái tổ hợp.

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

- Trong phần đặt vấn đề, tác giả cần bổ sung trích dẫn các tài liệu tham khảo. Tác giả cũng nên bổ sung mục tiêu nghiên cứu, ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

- Trong phần đối tượng nghiên cứu tác giả cần tách phần nguyên vật liệu ra, không để chung.

- Trong phần phương pháp: tác giả nên mô tả phương pháp gắn liền với nội dung và kết quả để cho người đọc dễ theo dõi.

- Tác giả nên ra soát lại giữa phương pháp và kết quả, một số phương pháp có nêu trong phần phương pháp, nhưng phần kết quả không trình bày. Một số kết quả có trình bày, nhưng không có trong phương pháp.

- Đối với phần kết quả: tác giả đã trình bày được những kết quả nghiên cứu có chất lượng. Tuy nhiên việc trình bày còn chưa thực sự được logic. Tác giả đã đầu tư tham khảo rất nhiều tài liệu để biện luận, tuy nhiên có một số biện luận mặc dù có liên quan đến kết quả nhưng đã vượt quá kết quả mà tác giả thu được. Một số biện luận nặng về lý thuyết chung.

Trong phần kết quả theo tôi tác giả nên đưa kết quả thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp Faly (enzyme thô) (mục 3.3.1) lên phần đầu để xác nhận rằng protein mà mình nghiên cứu là ở nội bào hay ngoại bào. Để từ đó mới nghiên cứu các điều kiện biểu hiện khác.

Cũng trong phần kết quả tác giả nên biện luận vì sao chọn 15 giờ là tối ưu, bởi vì theo hình điện di (hình 3.2) thì sau 5 giờ lượng protein mong muốn cũng tương tự như sau 15 giờ.

Trong kết quả nghiên cứu tác giả cho rằng nồng độ IPTG phù hợp để cảm biến 2 mM, nhưng ở trang 37 tác giả lại kết luận là 0,5 mM.

Phần tài liệu tham khảo: tác giả cần rà soát lại cách trình bày cho đúng với quy định của cơ sở đào tạo.

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?

Các kết quả nghiên cứu đã được tác giả có 1 báo cáo khoa học trình bày ở Hội nghị Khoa học toàn quốc về Công nghệ Sinh học năm 2024..

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, được thực hiện tại những phòng thí nghiệm có uy tín nên kết quả đạt được đáng tin cậy. Luận văn có ý nghĩa khoa học, thực tiễn cao trong tình hình hiện nay và có đóng góp mới.

Luận văn được trình bày 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.

Nha...Trang..., ngày 22. tháng 5.. năm 2025

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 Hoàng Hải
Tên đề tài: Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên
Escherichia coli
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:
Đề tài này có tính mới và có ý nghĩa khoa học và thực tiễn khi thu nhận enzyme ulvan lyase thông qua tái tổ hợp. Tác giả đã sử dụng enzyme này để bẻ gãy mạch ulvan tạo thành oligosaccharide, đây là nguyên liệu quan trọng trong quá trình chế biến thuốc, thực phẩm chức năng có giá trị cao.

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 xác định điều kiện biểu hiện, cảm ứng của ulvan lyase họ PL28 có nguồn gốc từ *Formosa agariphila* thông qua chùng biến nạp *E. coli* là mới, mặc dù có các nghiên cứu tương tự về nguồn gốc gen là từ vi khuẩn *Alterpmonas*.
Các nghiên cứu trước đã được trích dẫn một cách cập nhật và đầy đủ.

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, nội dung nghiên cứu phù hợp với chuyên ngành đào tạo.

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

- Việc thẩm định lại gen P30-PL28 trong plasmid thông qua PCR và giải trình tự có độ chính xác cao và hiện đại.
- Phương pháp xác định hàm lượng IPTG, nhiệt độ và thời gian là các phương pháp thường quy đã được thực hiện trên các nghiên cứu trước.
- Quy trình thu nhận và tinh sạch ulvan lyase dựa trên phương pháp sắc ký ái lực, rửa giải cũng được thực hiện bằng các phương pháp hiện đại, tương tự các nghiên cứu trước đây.
- Về phương pháp đánh giá hoạt tính và khả năng bẻ gãy mạch thông qua điện di SDS-PAGE, lai phân tử, tinh sạch bằng cột là các phương pháp hiện đang sử dụng phổ biến.

5. Kết quả nghiên cứu của luận văn:

Nghiên cứu này đã thực hiện thành công ba nội dung:

- Xác định điều kiện biểu hiện của ulvan lyase: Môi trường LB chứa IPTG có hàm lượng 2 mM, thời gian 15h và nhiệt độ là 20°C.
- Đề tài đã xác định được quy trình thu nhận và tinh sạch enzyme, nồng độ imidazole rửa giải là 150-200 mM.
- Ulván lyase thô đã được thử nghiệm cắt ulvan từ rong *Ulva lactuca* thành công; enzyme sau khi tinh sạch cũng đã thử nghiệm cắt ulvan của hai loài rong lục thành công.

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

Nhìn chung đề tài được viết khá tốt, ít sai sót, nội dung nghiên cứu đa dạng, logic với nhau. Tuy nhiên cần chỉnh sửa lại chút ít cho rõ ràng hơn:

- Phần mở đầu: Tương đối dài, nên hạn chế các thông tin vì trong phần tổng quan đã thể hiện. Chú ý Ulvales là bộ chứ không phải họ.
- Phần tổng quan: Nên chỉnh câu đầu tiên khi giới thiệu về rong Lục. Khi trích dẫn, số thứ tự nên để ngay sau tên tác giả. Nếu có trích dẫn 2 tài liệu trở lên thì số nhỏ trước và số lớn sau.
- Phần phương pháp: Vì trong phần Kết quả có kết quả của 3.1: Kiểm tra quá trình tạo dòng, nên chuyển một số đoạn trong 3.1 phần kết quả qua phần phương pháp cho phù hợp.
- Phần Kết quả: Ở mục 3.2 nên chỉnh thành “Ảnh hưởng của một số yếu tố” thay vì “Nghiên cứu khảo sát” vì đây là phần kết quả.
- Phần kết luận nên chuyển thành đoạn văn thì vì thể hiện theo cách tóm tắt kết quả.
- Phần tài liệu tham khảo cần hoàn thiện thêm: ví dụ TLTK số 1 thiếu thông tin tên tác giả và nguồn, Số 5, Học viện KHCN, Hà Nội thay vì Nha Trang; in nghiêng tên la tinh

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 trong công trình về Hội nghị Khoa học toàn quốc tại Huế

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 có thể đưa ra bảo vệ để nhận học vị Thạc sĩ được

Nha. Trang., ngày 22 tháng 5... năm 2025

Người nhận xét
(Ký, ghi rõ họ tên)

Nguyễn Xuân Vỹ

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

Họ tên học viên: TRẦN HOÀNG HẢI

Lớp: BIO21A

Tên đề tài luận văn: **Xác định điều kiện biểu hiện và thu nhận ulvan lyase tái tổ hợp trên *Escherichia Coli*.**

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8420114

Người hướng dẫn khoa học: Hướng dẫn 1: TS. Cao Thị Thúy Hằng

Hướng dẫn 2: TS. Huỳnh Hoàng Như Khánh

Ngày bảo vệ luận văn: 22/05/2025

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	Phần mở đầu tương đối dài, cần hạn chế thông tin vì trong phần tổng quan đã thể hiện	Đã viết súc tích, ngắn gọn lại theo góp ý
2	Phần tổng quan, điều chỉnh thông tin về rong lục	Đã điều chỉnh thông tin về rong lục theo góp ý
3	Bổ sung trích dẫn tài liệu tham khảo trong phần Đặt vấn đề. Bổ sung mục tiêu nghiên cứu, ý nghĩa thực tiễn	Đã bổ sung trích dẫn tài liệu tham khảo trong phần Đặt vấn đề. Bổ sung mục tiêu nghiên cứu, ý nghĩa thực tiễn
4	Trong phần Đối tượng nghiên cứu, cần tách phần Nguyên vật liệu	Đã chỉnh sửa mục 2.1 Đối tượng nghiên cứu

5	Mô tả phần phương pháp gắn liền với nội dung và kết quả	Đã chỉnh sửa các phần theo góp ý
6	Mục 3.2 nên chỉnh thành “Ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp faly”	Đã chỉnh sửa theo góp ý
7	Đưa mục 3.3.1 lên đầu phần phương pháp	Đã đưa mục 3.3.1 lên đầu phần phương pháp
8	Bổ sung tài liệu tham khảo cho các phương pháp nghiên cứu	Đã bổ sung tài liệu tham khảo cho các phương pháp nghiên cứu
9	Còn ít các thảo luận về kết quả	Đã trình bày phân tích lại kết quả nghiên cứu
10	Phần kết quả trình bày chưa logic, một số biện luận vượt quá kết quả thu được	Đã chỉnh sửa phần kết quả theo góp ý, biện luận bám sát kết quả thu được
11	Phần kết luận nên chuyển thành đoạn văn	Đã viết lại phần kết luận thành đoạn văn
12	Bổ sung tài liệu tham khảo cho ý “ulvan lyase tái tổ hợp đều được thu nhận từ dịch nội bào”	Đã bổ sung tài liệu tham khảo theo góp ý
13	Định dạng tài liệu tham khảo theo đúng quy định của cơ sở đào tạo	Đã chỉnh sửa tài liệu tham khảo theo đúng quy định của cơ sở đào tạo
14	Khi trích dẫn tài liệu tham khảo, số thứ tự nên để sau tên tác giả, nếu có 2 trích dẫn thì số nhỏ trước, số lớn sau	Đã rà soát, chỉnh sửa toàn bộ luận văn theo góp ý
15	Chỉnh sửa lại các lỗi trình bày ở các mục và tiểu mục theo đúng định dạng	Đã chỉnh sửa lại các lỗi trình bày ở các mục và tiểu mục theo đúng định dạng
16	Thiếu tính logic trong cách viết, bố cục các phần của luận văn	Đã rà soát, chỉnh sửa luận văn
17	Tên của các hình chưa phù hợp, chưa chính xác	Đã điều chỉnh lại đúng tên các hình

18	Bổ sung môi trường LB và AT vào phụ lục hóa chất	Đã bổ sung môi trường LB và AT vào phụ lục hóa chất
----	--	---

Hà Nội, ngày 12 tháng 06 năm 2025

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG



Đào Việt Hà

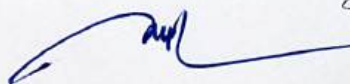
TẬP THỂ HƯỚNG DẪN

Hướng dẫn 1



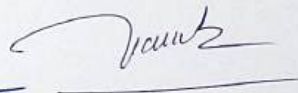
Cao Thị Thúy Hằng

Hướng dẫn 2



Huỳnh Hoàng Như Khánh

HỌC VIÊN



Trần Hoàng Hải