

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG ĐĨA THẠCH FUCOIDAN ĐỂ SÀNG LỌC VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH FUCOIDANASE TỪ VI SINH VẬT BIỂN

Nguyễn Thị Thuận*, Cao Thị Thúy Hằng, Huỳnh Hoàng Như Khánh, Trương Hải Bằng, Phạm Đức Thịnh, Trần Thị Thanh Vân, Bùi Minh Lý

Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam,

*nguyenthuan@nitra.vast.vn

TÓM TẮT: Khả năng sinh enzyme phân cắt fucoidan của vi sinh vật biển được sàng lọc bởi phương pháp đĩa thạch fucoidan. Vi sinh vật được nuôi cấy trên đĩa thạch chứa fucoidan, chủng vi khuẩn có hoạt tính là khi vùng nuôi cấy không bị nhuộm bởi hexadecyltrimethylammonium bromide (cetavlon) 1% (w/v) mà hình thành vùng trong suốt. Trong số 44 chủng vi sinh vật được phân lập từ hải sâm, sò ốc và cầu gai, 2 chủng có khả năng sinh enzyme phân cắt fucoidan từ cả hai loại rong *Sargassum mcclurei* và *Sargassum polycystum*, 4 chủng sinh enzyme chỉ phân cắt fucoidan của một loại rong biển. Tất cả các chủng vi khuẩn này đều sinh enzyme phân cắt fucoidan nội bào.

Từ khóa: *Sargassum mcclurei*, *Sargassum polycystum*, fucoidan, fucoidanase, vi sinh vật biển.

MỞ ĐẦU

Fucoidan là nhóm sulphat polysaccharit có hoạt tính sinh học đa dạng: kháng virus [12], chống huyết khối [21], kháng viêm và kháng ung thư [1, 5]. Hoạt tính sinh học của fucoidan phụ thuộc vào nguồn phân lập. Fucoidan từ rong nâu thuộc họ homo- và heteropolysaccharide, có thành phần chính là các gốc fucose được sulphat hóa tại vị trí C2 và C4 và liên kết với nhau bởi các liên kết (1→3) và/hoặc (1→4). Ngoài ra trong phân tử fucoidan cũng có mặt một lượng nhỏ galactose, mannose, xylose, glucose, glucuronic acid [3, 8].

Fucoidan có hoạt tính dược học đa dạng, tuy nhiên chúng vẫn chưa được sử dụng thành công trong việc chế tạo thuốc do khối lượng phân tử lớn và cấu trúc không rõ ràng [19]. Việc tạo ra các oligosaccharide khối lượng phân tử thấp sẽ giúp giải quyết được vấn đề này. Gần đây, cũng đã có một số nghiên cứu về sử dụng enzyme làm công cụ bẻ gãy mạch fucoidan thành các oligosaccharide theo định hướng sử dụng trong dược học [2, 9]. Enzyme phân cắt fucoidan bao gồm 2 nhóm: fucoidanase và α -L-fucoidanase. Các enzyme này cắt các liên kết glycosidic đặc hiệu trong chuỗi polysaccharide, do đó bảo tồn được các nhóm sulphate, là nhóm có vai trò quan trọng đối với hoạt tính sinh học của fucoidan [15].

Cho đến nay, enzyme phân cắt fucoidan đã được tìm thấy ở một số sinh vật biển: vi khuẩn [7, 10, 19], nấm [16, 20] và động vật thân mềm [6, 18]. Tuy nhiên, fucoidanase từ các sinh vật này có hoạt tính thấp. Việc tìm kiếm các fucoidanase mới và nghiên cứu các đặc điểm động học của chúng sẽ giúp làm rõ mối quan hệ giữa cấu trúc và hoạt tính sinh học của fucoidan cũng như phát triển công nghệ sản xuất các fuco-oligosaccharide có hoạt tính sinh học quan trọng. Một trong những khó khăn chính trong nghiên cứu fucoidanase hiện nay là chưa có phương pháp đơn giản và nhạy để xác định hoạt tính xúc tác của chúng. Tất cả các phương pháp nghiên cứu hoạt tính thủy phân của enzyme hiện nay đều chưa phù hợp với fucoidanase [17]. Hoạt tính fucoidanase có thể được xác định bằng phương pháp đo độ nhớt đặc hiệu cho các enzyme phân cắt nội phân tử [11], phương pháp đo sự gia tăng hàm lượng đường khử theo Nelson et al. (1962) [14] hoặc sử dụng 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) [13] hoặc phương pháp pháp điện di (C-PAGE) [4].

Phân lập và sàng lọc vi sinh vật có khả năng sinh enzyme phân cắt fucoidan là bài toán quan trọng trong quá trình tìm kiếm các enzyme mới. Để sàng lọc hoạt tính fucoidanase trên một lượng lớn vi sinh vật, cần phát triển phương pháp đơn giản, có khả năng sàng lọc mẫu trong thời gian ngắn, chi phí thấp và phù hợp với điều

kiện phòng thí nghiệm. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp đĩa thạch fucoidan để sàng lọc hoạt tính fucoidanase của vi sinh vật.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các chủng vi sinh vật biển được phân lập từ các nguồn sinh học khác nhau được sử dụng để sàng lọc hoạt tính bề ngăn mạch fucoidan từ cả hai loại rong *Sargassum mcclurei* và *Sargassum polycystum*.

Phân lập vi sinh vật biển

Vi sinh vật từ các nguồn sinh học khác nhau: cầu gai, ruột hải sâm, sò và ốc biển được phân lập trên 3 loại môi trường: (1) có thành phần nước biển 500 ml, nước cất 500 ml, K₂HPO₄ 0,2 g, MgSO₄ 0,05 g, glucose 1 g, pepton 5 g, cao nấm men 1 g, agar 20 g, điều chỉnh pH 7-7,2); (2) môi trường 1 bổ sung fucoidan 0,1% và (3) chỉ chứa fucoidan (1g/100ml nước biển) và agar (2 g/100ml). Các mẫu được ủ ở 30°C cho đến khi thấy xuất hiện khuẩn lạc vi sinh vật thì tiến hành làm thuần trên môi trường (1). Các chủng sạch được giữ trong môi trường bán rắn có thành phần tương tự như môi trường (1) với agar 0,3%.

Sàng lọc hoạt tính fucoidanase của vi sinh vật biển bằng phương pháp đĩa thạch fucoidan

Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được cấy trên đĩa thạch chứa fucoidan từ rong *Sargassum mcclurei* và *Sargassum polycystum* 0,5%. Các mẫu thí nghiệm được ủ ở 30°C trong 3 ngày. Sau đó, tiến hành loại bỏ sinh khối vi khuẩn và đĩa thạch được nhuộm bởi cetavlon. Fucoidan tạo kết tủa với cetavlon nên bề mặt

đĩa thạch sẽ có màu trắng sữa, các chủng vi khuẩn được xác định là có hoạt tính fucoidanase khi vùng nuôi cấy chúng không bị nhuộm màu bởi cetavlon mà tạo ra vùng trong suốt. Nồng độ fucoidan 0,5% được xác định là nồng độ tối ưu. Tại các nồng độ thấp hơn (0,1 đến 0,4 %), fucoidan kém tạo phức với cetavlon, do đó việc xác định hoạt tính fucoidanase gặp khó khăn [17].

Xác định vị trí sản sinh của enzyme (nội bào hay ngoại bào)

Vi khuẩn được nuôi cấy ở điều kiện lắc 150 vòng/phút trên môi trường lỏng bổ sung fucoidan 0,5% trong 24 giờ. Sau đó tiến hành ly tâm để thu dịch nuôi cấy và sinh khối. Dịch ly tâm được sử dụng như dịch chiết enzyme ngoại bào của vi khuẩn. Sinh khối vi khuẩn được phá vỡ bằng sóng siêu âm và chiết bằng đệm phosphat 0,02M, pH 7,2, dịch chiết này được sử dụng như dịch chiết enzyme nội bào của vi khuẩn. Tiếp theo, sử dụng 100µl dịch chiết nội bào và ngoại bào cho vào các lỗ đã được đục trên đĩa thạch fucoidan. Hoạt tính enzyme được xác định bằng sự xuất hiện vùng trong suốt xung quanh lỗ thử nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi sinh vật biển

Từ các mẫu cầu gai, ruột hải sâm, sò và ốc biển, chúng tôi đã phân lập được 44 chủng vi sinh vật (bảng 1). Các chủng vi khuẩn được phân lập có đặc điểm khuẩn lạc khác nhau nên sơ bộ các chủng này được cho là khác nhau. Các chủng này được dùng để sàng lọc hoạt tính bề ngăn mạch fucoidan.

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật được phân lập

STT	Nguồn phân lập	Môi trường	Ký hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc
1	Cầu gai		S1.1	Khuẩn lạc tròn, lồi, màu vàng nhạt
2	Cầu gai		S1.2	Khuẩn lạc trong, tròn, bóng
3	Hải sâm		S3.1	Khuẩn lạc màu vàng nhạt, tròn, lồi, bóng
4	Lambis	Môi trường 1	S4.2	Khuẩn lạc màu vàng sữa, lồi, bóng
5			S4.3	Khuẩn lạc màu vàng sữa, lồi, bóng
7			S4.6	Khuẩn lạc trong, li ti
8			S4.7	Khuẩn lạc trong suốt
10			S4.9	Khuẩn lạc trong suốt, dẹp, nhỏ
11			S4.10	Khuẩn lạc trong suốt, li ti

12		S4.11	Khuẩn lạc màu trắng sữa, tròn, lồi, bóng	
13		S4.12	Khuẩn lạc màu vàng nhạt, tròn, lồi, bóng	
14		S4.13	Khuẩn lạc trong suốt, nhỏ	
15		S4.14	Khuẩn lạc trong suốt, tròn, lồi	
16		S5.1	Khuẩn lạc màu vàng nhạt, dẹp, tròn	
17		S5.2	Khuẩn lạc tròn, lồi, bóng	
18	Ruột hải sâm	S5.3	Khuẩn lạc tròn, lồi, bóng	
19		S5.4	Khuẩn lạc màu vàng, lồi, bóng	
20		S5.5	Khuẩn lạc màu trắng, dẹp	
21		S5.6	Khuẩn lạc màu trắng sữa, dẹp, tròn, có nhân	
22	Sò ghé	S6.1	Khuẩn lạc tròn, màu trắng, lồi, bóng	
23		S6.2	Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi, bóng	
24		Môi trường 2	S7.1	Khuẩn lạc tròn, màu vàng nhạt, lồi, bóng
25	Sò ngọt		S7.2	Khuẩn lạc màu trắng, lồi, bóng
26			S7.5	Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi, bóng
34	Sò ngọt	M6.2	Khuẩn lạc tròn, màu vàng, lồi, bóng	
35		M6.3	Khuẩn lạc tròn, màu trắng, lồi, bóng	
36		M6.4	Khuẩn lạc màu trắng sữa, lồi, bóng	
37	Sò ghé	Môi trường 3	M7.1	Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi
38			M7.2	Khuẩn lạc màu kem, lồi, bóng
39			M7.3	Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi, bóng
40			M7.4	Khuẩn lạc tròn, màu trắng sữa, lồi, bóng
41			M7.5	Khuẩn lạc tròn, màu vàng cam, li ti
42			M7.6	Khuẩn lạc tròn, màu trắng, li ti
43			M7.7	Khuẩn lạc tròn, màu vàng, lồi, bóng
44			M7.8	Khuẩn lạc tròn, màu kem, lồi, bóng

Kết quả sàng lọc hoạt tính fucoidanase của vi sinh vật biển bằng phương pháp đĩa thạch fucoidan

Khả năng sinh enzyme phân cắt fucoidan của vi sinh vật biển đã được chúng tôi tiến hành sàng lọc bằng phương pháp đĩa thạch fucoidan.

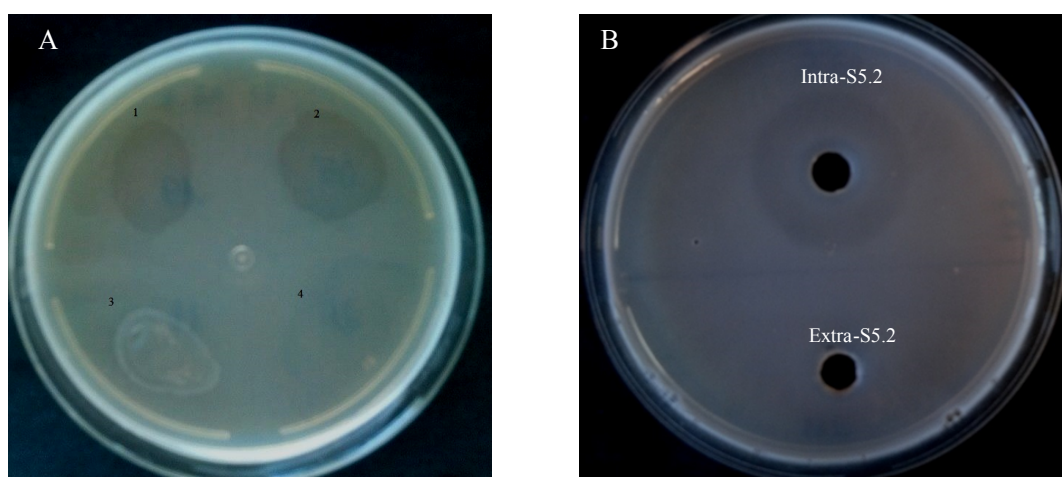
Kết quả thí nghiệm cho thấy chỉ có 6 chủng thể hiện hoạt tính fucoidanase (bảng 2). Trong đó, hoạt tính fucoidanase của các chủng S4.12, S5.1, S5.2, M7.7 chỉ tác động trên một trong hai

cơ chất, hoặc fucoidan từ *S. mcclurei*, hoặc fucoidan từ *S. polycystum*. Điều này có thể do có các enzyme từ các chủng này có tính đặc hiệu cơ chất khác nhau. Hai chủng S5.3 và S5.4 có khả năng sinh enzyme cắt fucoidan từ cả hai loại fucoidan chiết từ rong *S. mcclurei* và *S. polycystum*. Điều này có thể được giải thích do hai chủng vi khuẩn này có thể sinh ra nhiều hơn một loại enzyme tác động lên cơ chất fucoidan.

Bảng 2. Hoạt tính fucoidanase của các chủng vi sinh vật được phân lập

STT	Ký hiệu chủng	Hoạt tính fucoidanase trên đĩa thạch Fucoidan 0,5%	
		Fucoidan từ <i>S. mcclurei</i>	Fucoidan từ <i>S. polycystum</i>
1	S4.12	+	-
2	S5.1	+	-
3	S5.2	-	+
4	S5.3	+	+
5	S5.4	+	+
6	M7.7	+	-

(+). Có hoạt tính; (-). Không có hoạt tính.



Hình 1. Hoạt tính enzyme bề mặt fucoidan

A. Tác động lên cơ chất từ rong *S. macleuri*: 1 - Chủng S4.12 (dương tính); 2 - Chủng S5.1 (dương tính); 3 - Chủng S5.2 (âm tính); 4 - Chủng M7.7 (dương tính); B. Hoạt tính của dịch chiết hoạt tính nội bào và ngoại bào của chủng S5.2.

Kết quả xác định vị trí sản sinh của enzyme (nội bào hay ngoại bào)

Cùng với quá trình sàng lọc tìm kiếm nguồn sinh enzyme phân cắt fucoidan tiềm năng, việc xác định vị trí sản sinh enzyme cũng có ý nghĩa lớn để tách chiết enzyme sau này. Các chủng vi khuẩn được lựa chọn ở trên được tiến hành tách chiết dịch chiết ngoại bào và nội bào. Sau đó các dịch chiết này được kiểm tra hoạt tính phân cắt fucoidan. Kết quả thử nghiệm được thể

hiện ở bảng 3 và hình 1b.

Cho đến nay, hầu hết các enzyme fucoidanase đã được nghiên cứu đều được sản sinh bên trong tế bào [17]. Trong nghiên cứu này, kết quả cũng cho thấy enzyme bề mặt fucoidan từ tất cả các chủng vi khuẩn tuyển chọn là enzyme nội bào. Trong đó, S5.2 là chủng sinh enzyme nội bào tác động lên cơ chất fucoidan từ rong *S. polycystum* với đường kính lớn nhất.

Bảng 3. Vị trí sản sinh enzyme của vi khuẩn tuyển chọn

STT	Ký hiệu chủng	Vị trí sản sinh enzyme	
		Nội bào	Ngoại bào
1	S4.12	+	-
2	S5.1	+	-
3	S5.2	+	-
4	S5.3	+	-
5	S5.4	+	-
6	M7.7	+	-

(+). Có hoạt tính; (-). Không có hoạt tính.

KẾT LUẬN

Như vậy, phương pháp đĩa thạch fucoidan là phương pháp thực hiện nhanh với số lượng mẫu lớn nên thích hợp cho việc sàng lọc hoạt tính enzyme bề mặt fucoidan.

Trong số 44 chủng vi khuẩn chúng tôi phân

lập được, bằng phương pháp đĩa thạch fucoidan dùng để sàng lọc hoạt tính bề mặt fucoidan, có 6 chủng vi khuẩn có hoạt tính, và tất cả đều là enzyme nội bào. Chủng S5.2 và cơ chất fucoidan từ rong *S. polycystum* sẽ được lựa chọn để khảo sát điều kiện lên men tối ưu nhằm

thu nhận enzyme có hoạt tính và hiệu suất cao, đồng thời nghiên cứu quá trình tách chiết và tinh sạch enzyme, xác định đặc tính xúc tác của enzyme cũng như nghiên cứu điều chế oligosaccharide từ fucoidan của loài rong này.

Lời cảm ơn: Tập thể tác giả xin cảm ơn tài trợ kinh phí của Hợp phần nhánh số 3, thuộc dự án VAST.ĐA47.12/16-19 của Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alekseyenko T. V., Zhanayeva S. Y., Venediktova A. A., Zvyagintseva T. N., Kuznetsova T. A., Besednova N. N., Korolenko T. A., 2007. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 147: 730-732.
- Bakunina I., Nedashkovskaya O. I., Alekseeva S. A., Ivanova E. P., Romanenko L. A., Gorshkova N. M., Isakov V. V., Zvyagintseva T. N., Mikhailov V. V., 2002. Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*. *Mikrobiologiia*, 71: 49-55.
- Bilan M. I., Usov A. I., 2009. Structural analysis of fucoidans. *ChemInform*, 40: 34.
- Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolot Y., Kervarec N., Yvin J., Barbeyron T., Michel G., Kloareg B., 2006. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology*, 16(11): 1021-1032.
- Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E.; D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Uatuyzhanina N.E., 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, anti-angiogenic and anti-adhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17: 541-552.
- Daniel R., Berteau O., Jozefonvicz J., Goasdoue N., 1999. Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusk *Pecten maximus*. *Carbohydr. Res.*, 322: 291-297.
- Descamps V., Colin S., Lahaye M., Jam M., Richard C., Potin P., Barbeyron T., Yvin J. C., Kloareg B., 2006. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Mar. Biotechnol. (N. Y.)*, 8: 27-39.
- Duarte M. E., Cardoso M. A., Nosedá M. D., Cerezo A. S., 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333(4): 281-293.
- Kim W. J., Koo Y. K., Jung M. K., Moon H.R., Kim S.M., Synytsya A., Yun-Choi H. S., Kim Y. S., Park J.P., Park Y. I., 2010. Anticoagulating Activities of Low-Molecular Weight Fuco-Oligosaccharides Prepared by Enzymatic Digestion of Fucoidan from the *Sporophyll* of Korean *Undaria pinnatifida*. *Arch Pharm Res.*, 33(1): 125-131.
- Kim W. J., Park J. W., Park J. K., Choi D. J., Yong Il Park Y. I., 2015. Purification and Characterization of a Fucoidanase (FNase S) from a Marine Bacterium *Sphingomonas paucimobilis* PF-1. *Mar. Drugs*, 13: 4398-4417.
- Kitamura K., Matsuo M., Yasui T., 1992. Enzymatic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56: 490-494.
- Makarenkova I., Deriabin P., L'vov D., Zviagintseva T., Besednova N., 2010. Antiviral activity of sulfated polysaccharide from the brown algae *Laminaria japonica* against avian influenza A (H5N1) virus infection in the cultured cells. *Voprosy Virusologii*, 55(1): 41-45.
- Miller G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31(3): 426-428.

14. Nelson T. E., Scarlett J. V., Smith F., Kirkwood S., 1962. Can. J. Chem., 245: 1671-1678.
15. Qiu X., Amarasekara A., Doctor V., 2006. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. Carbohydr. Polym., 63: 224-228.
16. Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto S. I., Pastrana L., Aguilar C. N., Teixeira J. A., 2010. Fucoidan-degrading fungal strains: Screening, morphometric evaluation, and influence of medium composition. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 2177-2188.
17. Silchenko A. S., 2014. Fucoidanase and alginate lyase of marine bacteria *Formosa algae* KMM 3553T and marine mollusk *Lambis* sp. Dissertation, Vladivostok, Russia, 141.
18. Silchenko A. S., Kusaykina M. I., Zakharenko A. M., Menshova R. R., Huynh H. N. Khanh, Dmitrenok P. S., Isakov V. V., Zvyagintseva T. N., 2014. Endo-1,4-fucoidanase from Vietnamese marine mollusk *Lambis* sp. which producing sulphated fucooligosaccharides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 102: 154-160.
19. Silchenko A. S., Kusaykin M. I., Kurilenko V. V., Zakharenko A. M., Isakov V. V., Zaporozhets T. S., Gazha A. K., Zvyagintseva T. N., 2013. Hydrolysis of Fucoidan by Fucoidanase Isolated from the Marine Bacterium, Formosa algae. Mar. Drugs, 11: 2416-2430.
20. Wu Q., Zhang M., Wu K., Liu B., Cai J., Pan R., 2011. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94. J. Appl. Phycol., 23: 197-203.
21. Zhu Z., Zhang Q., Chen L., Ren S., Xu, P., Tang Y., Luo D., 2010. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation. Thrombosis Research, 125(5): 419-426.

STUDY OF USING THE FUCOIDAN-CONTAINING SOLID MEDIA PLATES FOR SCREENING AND IDENTIFYING FUCOIDANASE FROM MARINE MICROORGANISMS

Nguyen Thi Thuan, Cao Thi Thuy Hang, Huynh Hoang Nhu Khanh, Truong Hai Bang, Pham Duc Thinh, Tran Thi Thanh Van, Bui Minh Ly

Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST

SUMMARY

Screening of microorganisms that are capable to produce fucoidan degrading enzymes was carried out by investigating their abilities to grow on fucoidan-containing solid media plates. The activities were identified by the occurrence of a transparent areas after staining the plates with hexadecyltrimethylammonium bromide (cetavlon) 1% (w/v), which can form complexes with fucoidan. Among 44 isolated marine microorganisms strains from sea cucumber, molluscs and sea urchin, two strains produced enzyme that enable to degrade fucoidan from both seaweeds *Sargassum mcclurei* and *S. polycystum*, four strains produced enzyme degrading fucoidan only from *S. mcclurei* or *S. polycystum*. All these strains produced intracellular fucoidan-degrading enzymes.

Keywords: *Sargassum mcclurei*, *Sargassum polycystum*, fucoidan, fucoidanase, marine microorganisms.

Ngày nhận bài: 21-9-2015