

TỔNG HỢP MORIN-3-O-RHAMNOPYRANOSIDE Ở VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* CẢI BIẾN DI TRUYỀN

Nguyễn Huy Thuần¹ ✉, Nguyễn Thành Trung¹, Đồng Văn Quyền², Vũ Thị Thu Hằng³, Jae Kyung Sohng⁴

¹Viện Nghiên cứu và Phát triển, Đại học Duy Tân, Việt Nam

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

³Trường Đại học Y-Dược, Đại học Thái Nguyên, Việt Nam

⁴Viện Tài cấu trúc phân tử, Đại học Sun Moon, Hàn Quốc

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nguyenhuythuan@dtu.edu.vn

Ngày nhận bài: 24.6.2016

Ngày nhận đăng: 20.02.2017

TÓM TẮT

Flavonoid là các hợp chất trao đổi thứ cấp có mặt phổ biến ở thực vật có mạch. Chúng được phát hiện có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng như kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa, kháng khối u v.v.. Do đó, người ta thường tìm cách chiết xuất và tinh sạch flavonoid từ thực vật và sử dụng nhiều trong các thử nghiệm sinh dược học. Tuy nhiên, phương pháp tách chiết truyền thống thường đòi hỏi lượng mẫu lớn, kỹ thuật tinh sạch phức tạp và sản lượng thấp. Hiện nay, sự phát triển mạnh của các kỹ thuật di truyền và protein tái tổ hợp đã tạo ra nền tảng cho phép sinh tổng hợp nhiều loại hợp chất flavonoid cũng như dẫn xuất mới của chúng với sản lượng cao, trong thời gian ngắn. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tổng hợp morin-3-O-rhamnopyranoside (thuộc loại flavonol) thông qua chuyển hóa sinh học (biotransformation) ở vi khuẩn *Escherichia coli* cải biến di truyền. Vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang các gen ngoại lai của chuỗi tổng hợp đường hoạt hóa TDP-L-rhamnose và đồng thời mang gen glycosyltransferase xúc tác cho phản ứng chuyển phân tử đường rhamnose sang cơ chất nhận được sử dụng làm vật chủ trong nghiên cứu này. Cơ chất morin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với lượng thích hợp sẽ được vi khuẩn hấp thụ và chuyển hóa tạo ra sản phẩm. Sự có mặt của morin-3-O-rhamnopyranoside tạo thành được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký TLC, HPLC và LC-ESI-MS/MS. Kết quả định tính và định lượng sự chuyển hóa sản phẩm cho thấy, hàm lượng sản phẩm lớn nhất thu được là 56,5 μ M sau 48 h nuôi cấy trong điều kiện 32 °C, pH = 7,2-8,0. Kết quả thí nghiệm chứng tỏ rằng hợp chất morin-3-O-rhamnopyranoside đã được tổng hợp thành công bằng sử dụng kỹ thuật sinh tổng hợp tổ hợp (combinatorial biosynthesis) ở vi khuẩn *E. coli* cải biến di truyền và cho phép nghiên cứu tổng hợp chất ở quy mô lớn hơn (pilot).

Từ khóa: *Escherichia coli* tái tổ hợp, morin, morin-3-O-rhamnopyranoside, sinh tổng hợp tổ hợp

MỞ ĐẦU

Morin (3,5,7,2',4'-pentahydroxyflavone), hợp chất thuộc loại flavonol, có mặt phổ biến ở các thành viên thuộc họ Đậu tằm (Moraceae). Nghiên cứu tính chất dược lý cho thấy hợp chất này có vai trò quan trọng trong việc ức chế sự tích lũy các amyloid β -peptide ở bệnh nhân mắc Alzheimer giai đoạn đầu (Lemkul *et al.*, 2012). Tương tác giữa morin và bovine serum albumin (BSA) đã được sử dụng làm mô hình mẫu mô tả cơ chế dẫn truyền thuốc (drug delivery) để tìm hiểu rõ hơn về cơ chế phản ứng dược lý giữa thuốc và protein trong hệ plasma (Hu *et al.*, 2012). Ngoài ra, hợp chất này cũng được phát

hiện có vai trò trong nhiều quá trình sinh lý khác như hoạt tính ức chế hình thành amyloid ở bệnh nhân tiểu đường type 2 (Noor *et al.*, 2012), hoạt tính chống oxy hóa và hạ huyết áp (Prahalthan *et al.*, 2012; Pogula *et al.*, 2012) hoặc kháng khối u (Karthick *et al.*, 2010).

Cho tới nay, người ta đã phân lập được hai dẫn xuất của morin bao gồm morin-3-O-lyxoside và morin-3-O-arabinoside từ quả ôi (*Psidium guajava* L.) (Arima *et al.*, 2002). Ngoài ra, morin-3-O-rhamnopyranoside cũng được phân lập từ cây Trúc tiết (*Muehlenbeckia platyclada*) và nghiên cứu dược lý cho thấy chất này có hoạt tính kháng viêm (với ion âm superoxide) cao hơn 15 lần so với chất đối

chứng dương là phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Yen *et al.*, 2009). Tuy nhiên, ngoại trừ morin, hầu hết các dẫn xuất của nó mặc dù có hoạt tính sinh dược quan trọng nhưng vẫn chưa được thương mại hóa rộng rãi trên thị trường. Nguyên nhân là do việc tách chiết và tinh chế chúng từ nguồn thực vật gặp nhiều khó khăn.

Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã thiết kế vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen tổng hợp đường hoạt hóa và gen mã hóa cho enzyme glycosyltransferase. Glycosyltransferase (GT) là enzyme xúc tác cho phản ứng chuyển nhóm phân tử đường sang các phân tử chất nhận để tạo ra các sản phẩm đường hóa. Cho tới nay, người ta đã biết được cấu trúc và mối liên hệ giữa hoạt tính và cấu trúc của nhiều loại GT. Thực nghiệm cho thấy hầu hết các enzyme này có một trình tự đặc trưng nằm ở đầu C (C-terminal) gọi là hộp PSPG (plant secondary product glycosyltransferase) bao gồm 44 amino acid có chứa túi gắn phân tử đường (Offen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Brazier-Hicks *et al.*, 2007). Sau đó, một số loại flavonoid như myricetin, apigenin và baicalein đã được sử dụng làm cơ chất cho quá trình cải biến sinh học thông qua phản ứng *in-vivo* nhằm thu nhận sản phẩm tương ứng (flavonoid glycoside) (Thuan *et al.*, 2013a; 2013b).

Flavonoid là sản phẩm trao đổi chất thứ cấp đặc trưng của thực vật bậc cao. Cho tới nay, dựa trên trình tự giải mã hệ gen ở vi khuẩn *E. coli* người ta biết chắc chắn rằng chúng không có sẵn các gen tổng hợp flavonoid và dẫn xuất. Bởi vậy vi khuẩn này được sử dụng làm vật chủ sẽ cung cấp các ưu điểm như không tạo ra flavonoid nội sinh, có ít sản phẩm trao đổi chất thứ cấp, chu trình sống ngắn, tốc độ sinh trưởng cao và đặc biệt người ta đã hiểu rất rõ về các cơ chế trao đổi chất, các kỹ thuật di truyền và protein tái tổ hợp. Do đó, cho tới nay có rất nhiều nghiên cứu sinh tổng hợp flavonoid ở *E. coli* (Simkhada *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2012). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày phương pháp tổng hợp, định tính và định lượng morin-3-*O*-rhamnopyranoside từ cơ chất là morin.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

DNA, plasmid vector và chủng vi khuẩn

Chủng *E. coli* BL21 (DE3) đã bị đột biến hai gen là *pgi* (Glucose-6-phosphate isomerase) và *zwf* (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) nhằm tăng sinh tiền chất glucose-1-phosphate. Sau đó, chủng

đột biến này được chuyển hai vector mang gen tăng cường tổng hợp UDP-L-rhamnose (pCD-TGSDH mang gen kháng Streptomycin và pAC-EPKR mang gen kháng Chloramphenicol) và một vector tái tổ hợp pETGT3 (chứa gen kháng kanamycin) mang gen mã hóa cho glycosyltransferase. Enzyme chuyển này chịu trách nhiệm gắn phân tử đường UDP-L-rhamnose vào cơ chất nhận (Thuan *et al.*, 2013a).

Môi trường nuôi cấy và hóa chất

LB (Luria-Bertani) và TB (terific broth) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp. Các loại chất kháng sinh bao gồm Ampicillin, Kanamycin và Chloramphenicol (Biobasics, Canada) được sử dụng với nồng độ cuối cùng trong dịch nuôi vi khuẩn lần lượt là 100, 50 và 30 µg/mL. Các hóa chất tách chiết như ethylacetate, axit sulfuric, toluen, dimethylsulfoxide v.v có nguồn gốc từ Đài Loan, Indonesia hoặc Mỹ. Bàn mỏng sắc ký (Merck, Đức), máy phân tích sắc ký lỏng cao áp (HPLC, Agilent, Mỹ), máy phân tích sắc ký lỏng ghép khối phổ (Waters/Micromass Quattro micro/MS, Mỹ).

Phương pháp nuôi cấy và chuyển hóa cơ chất

Vi khuẩn *E. coli* cải biến di truyền được nuôi qua đêm trong 3 mL môi trường LB có chứa kháng sinh là Kanamycin, Chloramphenicol và Streptomycin ở 37 °C, 220 vòng/phút. Tiếp theo, 0,5 mL dịch nuôi được sử dụng để cấy chuyển sang bình tam giác thể tích 250 mL có chứa 50 mL môi trường LB. Tiếp tục nuôi cấy ở 37 °C cho đến khi OD_{600nm} đạt 0,6, bổ sung 0,5 mM IPTG đồng thời hạ nhiệt độ xuống 30 °C và nuôi tiếp trong 3-5 h để tạo điều kiện cho các protein tái tổ hợp biểu hiện. Tiếp theo, bổ sung morin (đã hoà tan trong methanol) với nồng độ cuối cùng là 100 µM. pH và nhiệt độ của dịch nuôi được duy trì ở mức 7,0-8,2 và 32 °C.

Tách chiết và phát hiện sản phẩm

Phương pháp tách chiết và phát hiện sản phẩm được tiến hành theo Thuan *et al.* (2013a) có cải tiến. Cụ thể, lấy 3 mL dịch chiết trộn với 6 mL ethyl acetate (v/v = 1:2). Lắc đều ở 250 vòng/phút trong 3 h. Thu dịch lớp trên, ly tâm tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút, lọc qua màng lọc có đường kính 0,25 µm (Sartorius, Mỹ).

Kiểm tra bằng sắc ký bản mỏng TLC

Sắc ký TLC được sử dụng để kiểm tra định tính sự có mặt của sản phẩm bằng cách sử dụng dung môi là ethylacetate: methanol: nước: dichloromethane (v:v = 8 : 1 : 1 : 0,2-0,8).

Tinh sạch bằng sắc ký bản mỏng điều chế (prep-TLC).

Dịch chiết được phân đoạn qua sắc ký cột sử dụng hạt silica pha thường. Sau đó phân đoạn chứa sản phẩm sẽ được chấm thành vệt dài trên bản mỏng prep-TLC và cho chạy trong hệ dung môi tương tự như với sắc ký bản mỏng. Thu phân đoạn chứa sản phẩm và kiểm tra lại độ tinh sạch.

Kiểm tra định tính bằng HPLC

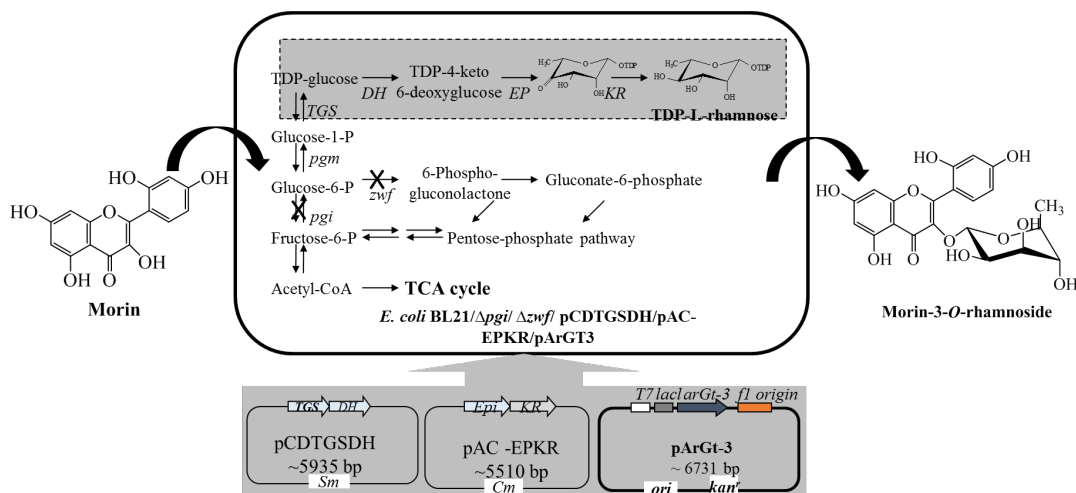
Sử dụng hệ dung môi gồm A: nước chứa 0,1% trifluoroacetic acid (TFA) và B: acetonitrile chứa 0,1% TFA. Hệ chương trình chạy HPLC gồm dung môi B: 10% (0–5 phút), 10–30% (5–10 phút), 30–80% (10–15 phút), và 80–100% (15–20 phút). Tốc độ dòng và bước sóng phát hiện lần lượt là: 1,0 mL/min và 280 nm.

Định lượng sản phẩm bằng HPLC

Morin-3-O-rhamnoside được tinh sạch bằng prep TLC, sau đó được pha với các nồng độ lần lượt là 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 và 1 mg/mL. Sử dụng các nồng độ trên để xây dựng đường chuẩn chúng tôi thu được phương trình $Y = 21095.8034 X + 1441.6294$ trong đó X là nồng độ, Y là diện tích của peak, hệ số $R^2 = 0,9722$.

Kiểm tra bằng LC-ESI-MS/MS

Sản phẩm được kiểm tra trên máy HPLC-ESI-MS/MS sử dụng cột Phenomenex Synergi Polar-RP column (150 × 4,6 mm, 4 μm) chế độ ion âm (negative-ion mode) tại phòng thí nghiệm của đại học Sun Moon (Hàn Quốc).



Hình 1. Sơ đồ tạo thể tái tổ hợp *E. coli* BL21(DE3)/ Δ *pgi*/ Δ *zwf* phục vụ tổng hợp morin-3-O-rhamnopyranoside. TGS: TDP glucose synthase; DH:dehydrogenase; EP:epimerase; KR:ketoreductase; ArGT3: glycosyltransferase.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thí nghiệm chuyển hóa cơ chất morin

Phân tử morin, như đã mô tả ở trên, thuộc loại flavonol và đã được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học đáng chú ý. Bởi vậy, việc cải biến cấu trúc phân tử cơ chất thông qua chuyển hóa sinh học (gắn thêm nhóm đường, methyl hoặc hydroxyl) nhờ sử dụng enzyme xúc tác đặc hiệu giúp tạo ra nhiều dẫn xuất mới và cung cấp nguyên liệu cho các thử nghiệm dược lý. Quá trình chuyển hóa cơ chất morin

xảy ra ở vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp được mô tả ở hình 1. Cụ thể, vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp được nuôi trong điều kiện đầy đủ chất dinh dưỡng, sinh trưởng tốt và các protein tái tổ hợp được biểu hiện đầy đủ. Sau đó, morin được bổ sung nhiều lần để đạt tới nồng độ 100 μM (tính dựa theo thể tích nuôi cấy ban đầu). Vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3)/ Δ *pgi*/ Δ *zwf* bị đột biến hai gen tham gia trong chuỗi trao đổi chất nhánh của glucose-6-phosphate là *pgi* (glucose-6-phosphate isomerase) và *zwf* (glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase) do đó sẽ dẫn đến tăng cường tích lũy glucose-1-phosphate. Mặt khác, chủng vi khuẩn

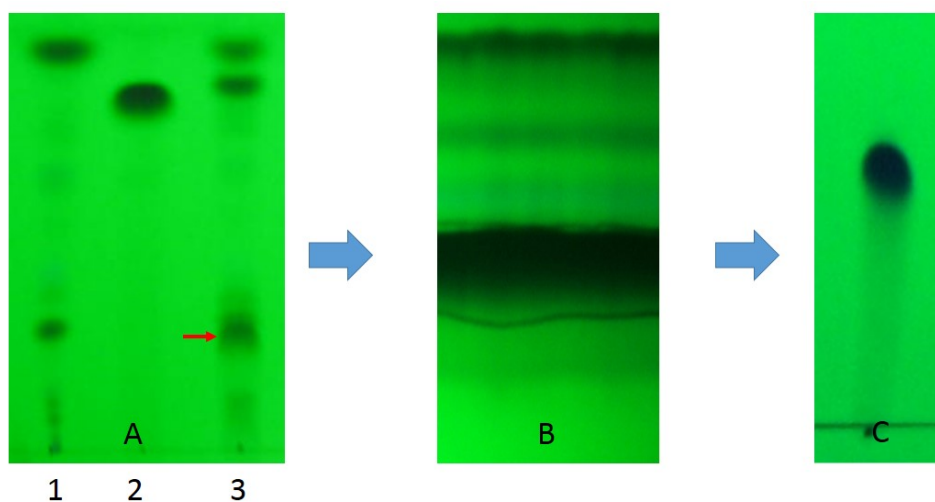
E. coli BL21(DE3) thường tổng hợp lượng đường rhamnose thấp vì đây là loại đường hiếm. Do đó chúng tôi đã đưa vào chuỗi gen tham gia sinh tổng hợp TDP-L-rhamnose bằng cách sử dụng plasmid tái tổ hợp mang các gen *tgS* (TDP glucose synthase), *dh* (dehydrogenase), *ep* (epimerase) và *kr* (ketoreductase) để nhằm tăng cường hàm lượng gen. Kết quả định lượng trước đây ở chủng tái tổ hợp cho thấy hàm lượng TDP-L-rhamnose đã tăng lên 8,77 lần so với đối chứng là *E. coli* BL21(DE3) (Thuan *et al.*, 2013a). Enzyme glycosyltransferase tái tổ hợp được sinh ra sẽ làm nhiệm vụ xúc tác cho phản ứng gắn phân tử đường TDP-rhamnose vào cơ chất nhận để tạo ra sản phẩm là morin-3-*O*-rhamnopyranoside.

Nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng, trong quá trình nuôi cấy, *E. coli* thường tạo ra các muối acetate do đó làm giảm pH của dịch nuôi. Do đó, trong quá trình nuôi cấy chúng tôi phải liên tục duy trì pH trong khoảng 7,0-

8,2 để vi khuẩn phát triển bình thường. Nhiệt độ tối ưu cho *E. coli* phát triển thường là 35-38 °C. Tuy nhiên, vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp mang gen glycosyltransferase thường biểu hiện tốt ở trong khoảng 25-33 °C nên chúng tôi chọn mức nhiệt 32 °C để đảm bảo vi khuẩn vừa phát triển tăng sinh khối và đồng thời tổng hợp enzyme (Thuan *et al.*, 2013a).

Định tính và định lượng sản phẩm bằng các phương pháp sắc ký

Dịch chiết chứa sản phẩm chuyển hóa được tách chiết như mô tả ở trên. Sự có mặt của morin-rhamnoside và cơ chất dư thừa được nhận biết thông qua sử dụng sắc ký bản mỏng TLC (Hình 2A). Chúng tôi đã sử dụng sắc ký TLC điều chế (prep TLC) để tinh sạch sản phẩm như trong Hình 2B và kiểm tra lại bằng sắc ký TLC (Hình 2C).



Hình 2. Kiểm tra sự tạo thành sản phẩm và tinh sạch bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). (A) 1: Dịch chiết vi khuẩn không bổ sung morin; (2) morin; (3) dịch chiết vi khuẩn có bổ sung morin. (B) Tinh sạch morin-3-*O*-rhamnopyranoside bằng sắc ký prep-TLC. (C) Hình ảnh sắc ký sản phẩm (morin-3-*O*-rhamnopyranoside) thu được.

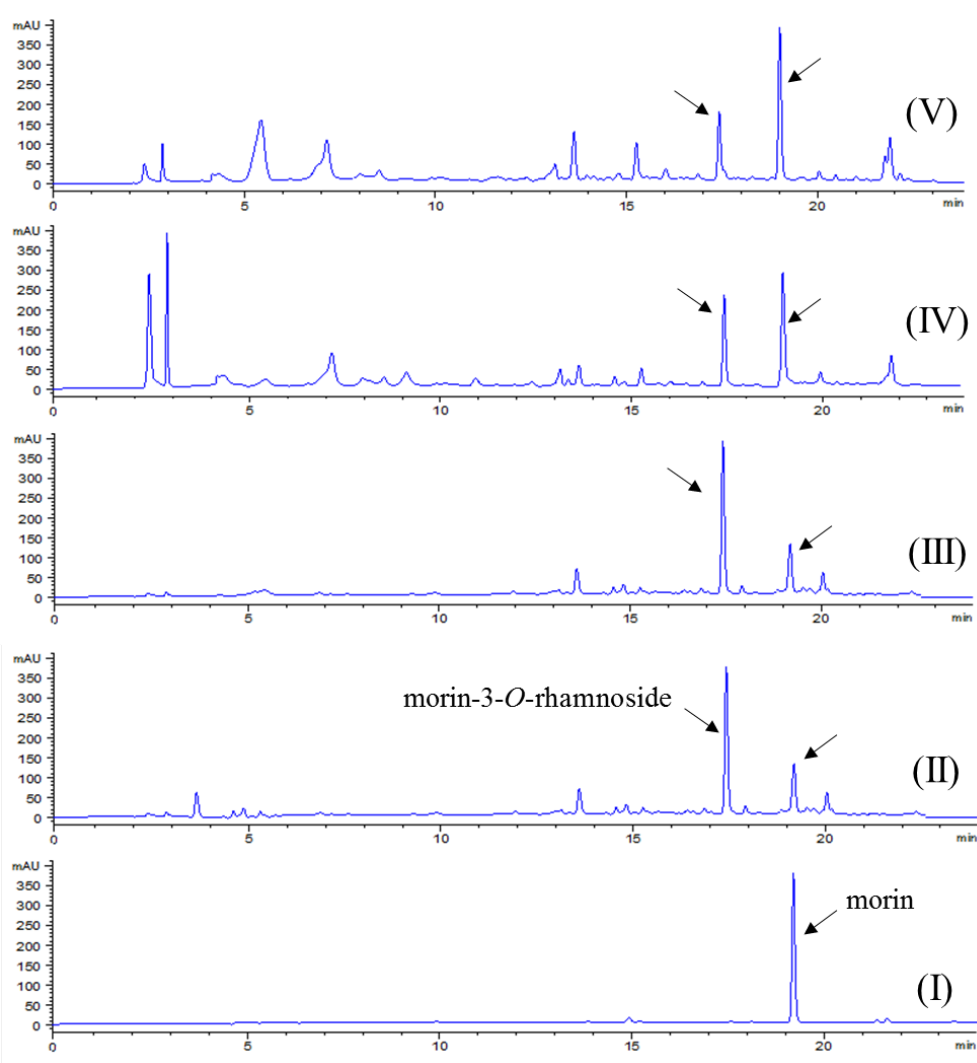
Dịch chiết chứa sản phẩm cũng được phân tích trên máy sắc ký lỏng cao áp HPLC để phân tích động học sự chuyển đổi cơ chất thành sản phẩm sau 24, 36, 48 và 60 h. Morin-3-*O*-rhamnopyranoside và cơ chất morin xuất hiện lần lượt ở các phút thứ 17,5 và 18,3 (Hình 3). Kết quả cho thấy hàm lượng morin glycoside tăng lên dần và đạt ngưỡng tối đa sau khi bổ sung cơ chất 48 h. Sau đó hàm lượng sản phẩm không tăng thêm khi kéo dài thời gian nuôi cấy cảm ứng tới thời điểm 60 h (Hình 3). Bằng cách so sánh với phương trình đường chuẩn, chúng tôi

tính được nồng độ của morin-3-*O*-rhamnopyranoside đạt mức tối đa là 56,5 μM (hiệu suất chuyển hóa 56,5%). Mức độ chuyển hóa này gần tương đương với trường hợp sử dụng cơ chất flavonol khác loại như myricetin (55,6%) (Thuan *et al.*, 2013a). Trong khi đó, nhóm nghiên cứu của Ren đã sử dụng UGT78D1 xúc tác cho các phản ứng của flavonol với UDP-glucose và kết quả cho thấy hiệu suất chuyển hóa với quercetin, fisetin, kaempferol, isorhamnetin theo các mức độ giảm dần là 100, 76, 69 và 20% (Ren *et al.*, 2012).

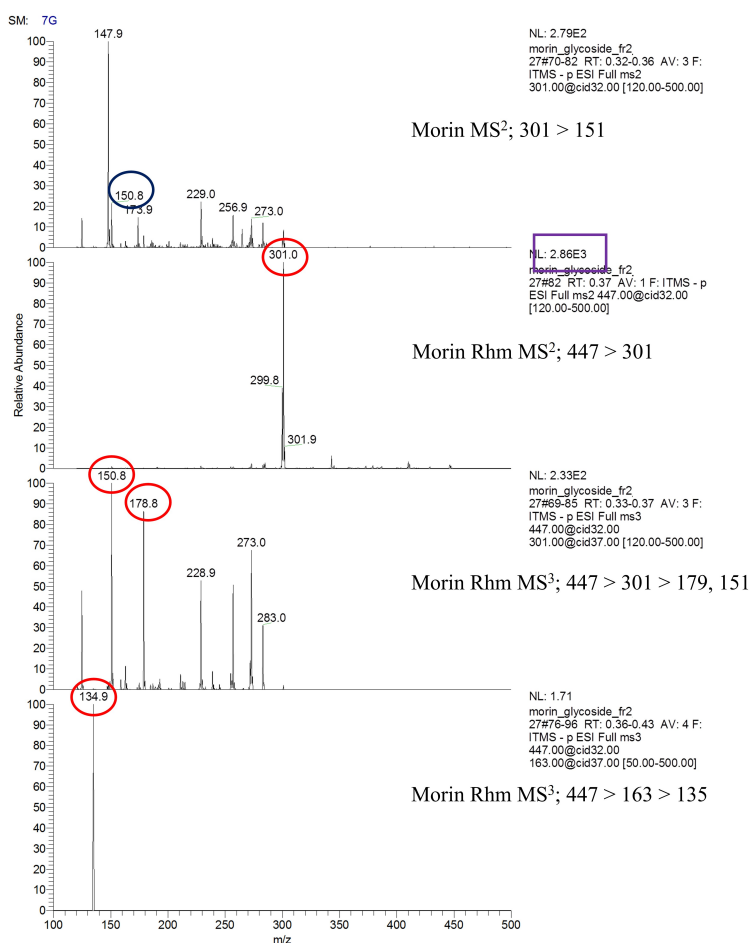
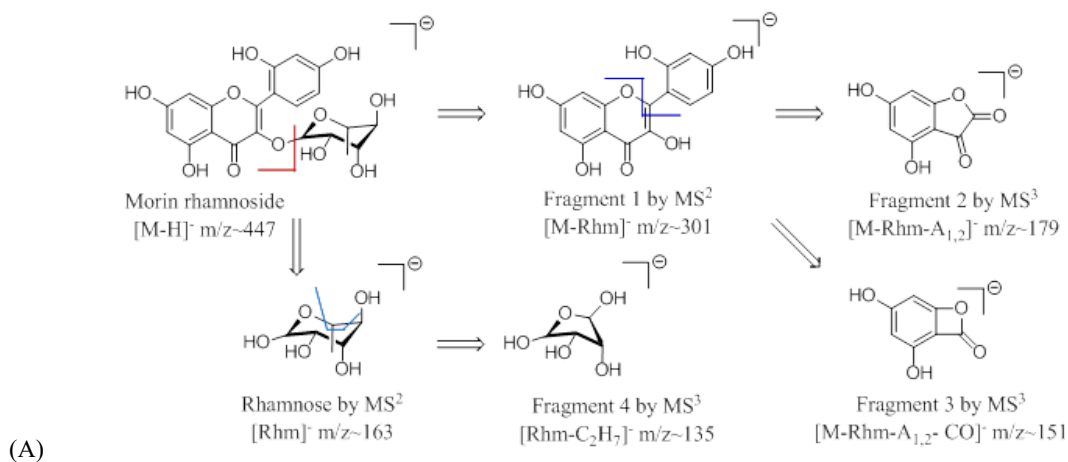
Phân tích dữ liệu LC-ESI-MS/MS

Hình 4A và 4B cho thấy khối lượng phân tử tổng số của morin-3-*O*-rhamnopyranoside ở dạng ion $[M-H]^-$ tại $m/z = 447$. Phân mảnh MS^2 bao gồm 2 ion peak tại m/z 301 và 163 lần lượt tương ứng với mảnh cấu trúc bị mất phân tử đường rhamnose $[M-rhamnose]^-$ ở vị trí 3-OH của vòng phenol và sự hình thành ion âm đường rhamnose, $[rhamnose]^-$.

Ion tại m/z 135 là kết quả của ion rhamnose bị mất gốc $-C_2H_7$, $[rhamnose-C_2H_7]^-$. Ngoài ra, đỉnh (peak) con tại m/z 179 được sinh ra từ việc tách nhân A của ion tại $m/z = 301$ và nhân C (6C) được chuyển thành vòng 5C do sự gắn của nhóm ketone, $[M-rhamnose-C_7H_6O_3]^-$. Cuối cùng, trong phân mảnh MS^3 , ion ở $m/z = 301$ bị mất rhamnose, $-C_7H_6O_3$ và CO dẫn đến tạo ra peak tại $m/z = 151$, $[M-rhamnose-C_7H_6O_3-CO]^-$.



Hình 3. Kiểm tra sự chuyển hóa morin và tạo thành sản phẩm morin-3-*O*-rhamnopyranoside trong dịch chiết thu được nhờ sắc ký HPLC. (I): sắc ký đồ HPLC của cơ chất chuẩn morin; (II), (III), (IV) và (V): sắc ký đồ HPLC mô tả quá trình chuyển hóa morin thành sản phẩm sau thời gian nuôi cấy lần lượt là 24, 36, 48 và 60 h.



Hình 4. Dữ liệu LC-ESI-MS/MS của morin và sản phẩm morin-3-O-rhamnopyranoside. Trong đó, (A) sơ đồ phân mảnh của các thành phần cấu trúc và (B) Sơ đồ peak ESI-MS/MS của các phân mảnh.

KẾT LUẬN

Cho tới nay, kỹ thuật sinh tổng hợp tổ hợp (combinatorial biosynthesis) đã được ứng dụng rộng rãi để tổng hợp rất nhiều hợp chất thứ cấp như flavonoid, polyketide, acid béo, terpenoid v.v. Do việc tách chiết hợp chất flavonoid glycoside từ thực vật còn có nhiều khó khăn về mặt kỹ thuật và sản lượng nên việc sử dụng kỹ thuật sinh tổng hợp tổ hợp đã khắc phục hoàn toàn hạn chế trên. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sinh tổng hợp được morin-3-*O*-rhamnopyranoside, trong đó tận dụng tối đa hệ biểu hiện dị dòng các gen khác nguồn mã hóa cho glycosyltransferase, các enzyme tham gia tổng hợp đường hiếm từ thực vật, vi sinh vật khác ở vi khuẩn *E. coli* cải biến di truyền. Kết quả nghiên cứu mở ra triển vọng tổng hợp dẫn xuất của morin ở quy mô lớn hơn bằng kỹ thuật cải biến di truyền ở *E. coli*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) với đề tài mã số: 106-NN.02-2014.25.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ablajan K, Tuoheti A (2013) Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol *O*-rhamnosides using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27(3): 451–460.

Arima H, Danno G (2002) Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.) and their structural elucidation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1727–1730.

Brazier-Hicks M, Offen WA, Gershter MC, Revett TJ, Lim EK, Bowles DJ, Davies GJ, Edwards R (2007) Characterization and engineering of the bifunctional *N*- and *O*-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20238–20243.

Chen WP, Hu PF, Bao JP, Wu LD (2012) Morin exerts antiosteoarthritic properties: an in vitro and in vivo study. *Exp Biol Med* 237: 380–386.

Lemkul JA, Bevan DR (2012) Morin inhibits the early stages of amyloid β -peptide aggregation by altering tertiary and quaternary interactions to produce "off-pathway" structures. *Biochemistry* 51: 5990–6009.

Li L, Modolo LV, Escamilla-Trevino LL, Achnine L, Dixon RA, Wang X (2007) Crystal structure of *Medicago truncatula* UGT85H2—insights into the structural basis of a

multifunctional (iso)flavonoid glycosyltransferase. *J Mol Biol* 370: 951–963.

Hu YJ, Yue HL, Li XL, Zhang SS, Tang E, Zhang LP (2012) Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin. *J Photochem Photobiol B* 112: 16–22.

Noor H, Cao P, Raleigh DP (2012) Morin hydrate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide and disaggregates amyloid fibers. *Protein Sci* 21: 373–382.

Offen W, Martinez-Fleites C, Yang M, Kiat-Lim E, Davis B G, Tarling C A, Ford C M, Bowles D J, Davies GJ (2006) Structure of a flavonoid glucosyltransferase reveals the basis for plant natural product modification. *EMBO J* 25: 1396–1405.

Park SR, Paik JH, Ahn MS, Park JW, Yoon YJ (2010) Biosynthesis of plant-specific flavones and flavonols in *Streptomyces venezuelae*. *J Microbiol Biotechnol* 20(9): 1295–1299.

Pandey RP, Malla S, Simkhada D, Kim BG, Sohng JK (2013) Production of 3-*O*-xylosyl quercetin in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(5): 1889–901.

Prahalathan P, Kumar S, Raja B (2012) Morin attenuates blood pressure and oxidative stress in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Metabolism* 61: 1087–1099.

Pogula BK, Maharajan MK, Oddepalli DR, Boini L, Arella M, Sabarimuthu DQ (2012) Morin protects heart from beta-adrenergic-stimulated myocardial infarction: an electrocardiographic, biochemical, and histological study in rats. *J Physiol Biochem* 68: 100–105.

Ren G, Hou J, Fang Q, Sun H, Liu X, Zhang L, Wang PG (2012) Synthesis of flavonol 3-*O*-glycoside by UGT78D1. *Glycoconj J* 29(5-6): 425–432.

Simkhada D, Lee HC, Sohng JK (2010) Genetic engineering approach for the production of rhamnosyl and allosyl flavonoids from *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 107: 154–162.

Thuan NH, Pandey RP, Thuy TT, Park JW, Sohng JK (2013a) Improvement of regio-specific production of myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside in engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 171(8): 1956–1967.

Thuan NH, Park JW, Sohng JK (2013b) Towards the production of flavone-7-*O*- β -D-glucopyranosides using *Arabidopsis* glycosyltransferase in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 48: 1744–1748.

Yen CT, Hsieh PW, Hwang TL, Lan YH, Chang FR, Wu YC (2009) Flavonol glycosides from *Muehlenbeckia platyclada* and their anti-inflammatory activity. *Chem Pharm Bull* 57(3): 280–282.

BIOSYNTHESIS OF MORIN-3-*O*-RHAMNOPYRANOSIDE IN A GENETICALLY ENGINEERED *ESCHERICHIA COLI*

Nguyen Huy Thuan¹, Nguyen Thanh Trung¹, Dong Van Quyen², Vu Thi Thu Hang³, Jae Kyung Sohng⁴

¹*Institute of Research and Development, Duy Tan University, Vietnam*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Vietnam*

³*Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, Vietnam*

⁴*Institute of Biomolecule Reconstruction, Sun Moon University, Republic of Korea*

SUMMARY

Flavonoids are significant secondary metabolites of vascular plants. They have been proven to possess numerous types of anti-bacterial, anti-tumor, anti-oxidant and anti-inflammatory bioactivities etc. Thereby, there are many flavonoids extracted and purified from plants and have been used for biological tests. Nevertheless, the traditional extraction methods require a large amount of initial sample, tedious and professional techniques and low yield of target compound. Until present, the advanced development of genetic engineering and recombinant protein as platform allow synthesis of high amount of different types of flavonoid in short time. *Escherichia coli* is one of the most popular host for whole-cell biotransformation of flavonoids and their derivatives due to its simple genetical, physiological system and fast growth. In this paper, we described the biosynthetic method of morin-3-*O*-rhamnopyranoside from a genetically engineered *E. coli* using morin as substrate. In particular, the *E. coli* harboring biosynthetic gene cluster of activated TDP-L-rhamnose and gene encoding for glycosyltransferase was used as host for biotransformation. Morin was fed into the culture broth of recombinant *E. coli* for rhamnosylation. The formation of morin-3-*O*-rhamnopyranoside was then quantified and qualified using Thin Layer Chromatography (TLC), Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric (LC-ESI-MS/MS) assays. The highest yield of product (56.5 μ M) was achieved after 48h, 32 °C and pH = 7.2-8.0. This result showed that morin-3-*O*-rhamnopyranoside was successfully synthesized in the genetically engineered *E. coli*. Furthermore, metabolic engineering of intra-cellular system for improving absorption of substrate as well as excretion of product or enhancement of glycosyltransferase activity may increase the final yield of biotransformation process.

Keywords: recombinant *Escherichia coli*, morin, morin-3-*O*-rhamnopyranoside, combinatorial biosynthesis