

SỰ PHÂN BỐ ENZYME THỦY PHÂN FUCOIDAN TRONG ĐỘNG VẬT KHÔNG XƯƠNG SỐNG THUỘC VÙNG BIỂN VIỆT NAM

Huỳnh Hoàng Như Khánh¹, Bùi Minh Lý¹, Cao Thị Thúy Hằng¹, Phạm Đức Thịnh¹,
Ngô Thị Duy Ngọc¹, Phan Thị Hoài Trinh¹, Võ Thị Diệu Trang¹, Lê Thị Hoa¹,
Lê Nhã Uyên²

¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
Số 02 Hùng Vương, Nha Trang, Khánh Hòa.

²Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nha Trang.
Email: hnhkhanh@gmail.com

TÓM TẮT:

Sự phân bố enzyme thủy phân fucoidan đã được nghiên cứu trong 85 mẫu động vật không xương biển Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme thủy phân fucoidan phân bố rộng rãi trong các mẫu động vật nghiên cứu. Trong số đó, có 47,1% số mẫu có hoạt tính thủy phân fucoidan từ rong *Fucus evanescent* có chứa liên kết 1 → 3 và 1 → 4 luân phiên trong khi đó chỉ có 41,2% số mẫu có hoạt tính thủy phân fucoidan từ rong *Sargassum meclurei* chỉ chứa liên kết là 3 trong phân tử. Các mẫu *Trochus maculatus* (thuộc lớp Chân bụng Gastropoda), *Tridacna squamosa* và *Pteria penguin* (thuộc lớp Hai mảnh vỏ Bivalvia) và Nhím biển sea urchin (thuộc lớp Echinoidea) đặc biệt có hoạt tính thủy phân fucoidan từ cả hai loại rong *Fucus evanescent* và *Sargassum meclurei*.

1. MỞ ĐẦU

Rong nâu là nguồn các polysaccharide đa dạng về cấu trúc và hoạt tính sinh học. Bên cạnh polysaccharide được biết đến nhiều như axit alginic thì laminaran và fucoidan cũng là những polysaccharide tan trong nước và có chứa nhiều hoạt tính quý. Trong đó, fucoidan là một fucan sulfate hóa được chiết xuất từ nhiều loài rong nâu. Ngoài fucose, polysaccharide này còn chứa glucose, galactose, mannose, xylose, rhamnose và acid uronic. Mặc dù fucoidan thể hiện nhiều hoạt tính sinh học như kháng đông tụ, chống nghẽn mạch, kháng virus (bao gồm cả kháng virus HIV, kháng viêm gan

và kháng rirus herpes) nhưng cấu trúc hóa học của loại polysaccharide này vẫn chưa được xác định một cách rõ ràng [1,2].

Các enzyme đặc hiệu thủy phân fucoidan như fucoidanase, sulfatase, glycosidase ... cũng là những công cụ quan trọng trong nghiên cứu cấu trúc của loại polysaccharide này. Ngoài ra, nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học được tạo ra từ sự thủy phân của các polysaccharide bằng phương pháp sử dụng enzyme. Chẳng hạn như thủy phân laminaran bằng phương pháp enzyme đã tạo ra một loại oligosaccharide mới có đặc tính chống phóng xạ và kháng ung thư [3]. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy

nhiều oligosaccharide thủy phân từ fucoidan bằng phương pháp enzyme cũng chứa nhiều hoạt tính sinh học quý như polysaccharide ban đầu, như sản phẩm của phản ứng thủy phân fucoidan bằng enzyme chiết từ con sò biển *Patinopecten yessoensis* cũng thể hiện hoạt tính kháng u và kháng đông tụ [4]. Cho đến nay, nhiều loại enzyme thủy phân fucoidan cũng đã được phân lập từ vi sinh biển và một số loài động vật không xương sống biển như *Mizuhopecten yessoensis* [5], *Pecten maximus* [6], và *Haliotis tuberculata* [7]....

Tại Việt Nam, chưa có một nghiên cứu nào về enzyme thủy phân fucoidan từ sinh vật biển. Vì vậy, để có cơ sở cho những nghiên cứu sâu hơn về việc tinh sạch, tách chiết các enzyme có khả năng thủy phân fucoidan từ động vật không xương sống biển cũng như việc nghiên cứu điều chế các oligosaccharide từ fucoidan bằng phương pháp enzyme, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sàng lọc enzyme thủy phân fucoidan trên đối tượng là động vật không xương sống biển và đánh giá sự phân bố của enzyme này trên các đối tượng nghiên cứu.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu sinh vật biển được thu khi còn tươi và bảo quản bằng đá khô trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm, được giữ ở -20°C cho đến khi sử dụng. Các bộ phận tiêu hóa được tách riêng để chiết và đánh giá hoạt tính enzyme.

2.2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu:

- Acid acetic, Acid succinic, NaOH
- Thuốc thử Nelson A, B, C (Chuẩn bị theo phương pháp Nelson-Somogy cải tiến, 1989).
- Fucoidan từ rong *Fucus evanescen* (do phòng Hóa enzyme, Viện Hóa sinh Hữu cơ Thái Bình Dương, Viễn đông, LB Nga cung cấp).
- Fucoidan từ rong *Sargassum meclurei* (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang cung cấp).

Thu dịch chiết enzyme

Thu bộ phận tiêu hóa (gan, tụy, sọt thủy tinh thể) của mẫu sinh vật biển và rửa bằng dung dịch đệm acetate natri 0,02M pH 5,2 đã được giữ lạnh ở 4°C. Sau đó, mẫu được nghiền trong dung dịch đệm acetate natri 0,02M pH 5,2 (tỉ lệ 1:1, w/v). Dịch mẫu được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Thu hồi phần dịch trong và cho qua cột Sephadex G-25 ở 4°C nhằm loại bớt muối và các phân tử nhỏ. Phần dịch sau khi qua cột được bảo quản ở 4°C để tiến hành thử hoạt tính enzym.

Thử hoạt tính enzyme

- Chuẩn bị các cơ chất: Các cơ chất fucoidan được pha trong đệm acetat natri 0,02M pH 5,2, nồng độ 2mg/ml.

- Phương pháp thử hoạt tính fucoidanase (Nelson – Somogy cải tiến, 1989): dựa trên sự oxi hoá lượng đường khử tạo thành sau quá trình phân giải cơ chất bằng thuốc thử somod trong môi trường kiềm (pH = 9) với sự tạo thành oxit đồng và sự oxi hoá của thuốc thử arsenmolybdat trong môi trường axit (pH = 1,7 - 2) với sự tạo thành màu xanh molybdat.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Việc nghiên cứu sàng lọc hoạt tính thủy phân fucoidan từ các đối tượng sinh vật biển đã được tiến hành tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng công nghệ Nha Trang từ năm 2007 đến nay. Gần đây nhất, tập thể tác giả cũng đã công bố kết quả sàng lọc enzyme thủy phân fucoidan từ 45 mẫu vật động vật thân mềm biển thu thập tại một số địa phận của tỉnh Khánh Hòa [8]. Cho đến nay, chúng tôi đã sàng lọc được 85 mẫu động vật không xương biển Việt Nam, kết quả được thể hiện trên bảng 1. Nhiều kết quả nghiên cứu trên thế giới cho thấy, fucoidan là một loại polysaccharide có cấu trúc phức tạp, thành phần hóa học của fucoidan thay đổi tùy thuộc vào loài rong tách chiết và mùa vụ thu hoạch rong. Vì vậy, để có cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi lựa chọn hai loại cơ

chất fucoidan có cấu trúc khác nhau để khảo sát, fucoidan chiết từ rong *Fucus evanescen* có chứa liên kết là 3 và là 4 luân phiên và fucoidan từ rong *Sargassum mcclurei* chỉ chứa liên kết là 3 trong phân tử

Đối với lớp Chân bụng Gastropoda (khoảng 60.000 đến 80.000 loài), chúng tôi đã sàng lọc 46 mẫu vật. Số loài có hoạt tính thủy phân fucoidan từ rong *F. evanescen* chiếm tỷ lệ 45% và 35% số mẫu khảo sát có khả năng thủy phân fucoidan từ rong *S. mcclurei*. Lớp Hai mảnh vỏ Bivalvia (khoảng 30.000 loài) có 24 mẫu đã được sàng lọc hoạt tính, trong đó tỷ lệ số loài được khảo sát có hoạt tính thủy phân fucoidan từ rong *F. evanescen* và fucoidan từ rong *S.*

mcclurei tương ứng là 60% và 65%. Có 12 mẫu thuộc lớp Cầu gai Echinoidea được khảo sát, trong đó 25% số mẫu khảo sát có hoạt tính thủy phân fucoidan từ rong *F. evanescen* và 16% có hoạt tính với fucoidan từ rong *S. mcclurei*. Trong khi đó đối với 2 lớp Giun nhiều tơ Vermes và Chân khớp Arthropoda thì các mẫu khảo sát đều có hoạt tính thủy phân fucoidan từ cả hai loại rong trên. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy enzyme thủy phân fucoidan phân bố rộng rãi trong các loài động vật không xương sống biển. Các đối tượng thuộc nhóm động vật thân mềm, chân khớp, cầu gai hay giun nhiều tơ đều có thể là nguồn phân lập và nghiên cứu enzyme thủy phân fucoidan.

Bảng 1: Hoạt tính thủy phân fucoidan ở động vật không xương sống biển Việt Nam.

S T T	Lớp	Họ	Tên loài	Bộ phận thu mẫu	Hoạt tính enzyme ($\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ protein)	
					Fucoidan từ <i>F. evanescen</i>	Fucoidan từ <i>S. mcclurei</i>
1	ARTHROPODA	Crustacea	<i>Bolanus sp.</i>	Gan tụy	0	0
2		Polyplacophora	<i>Loricata</i>	Gan tụy	1,11	6,47
3	BIVALVIA	Bopyroidae	<i>Cucullaea labiata</i>	Gan tụy	1,44	3,11
4		Gryphaeidae	<i>Hyotissa sp.</i>	Gan tụy	2,07	9,51
5		Isognomonidae	<i>Isognima isognomus</i>	Gan tụy	0,05	0,05
6			<i>Isognomon isognomum</i>	Gan tụy	0	9,79
7		Mytilidae	<i>Perna viridis</i>	Gan tụy	0	0
8			<i>Septifer bicularis</i>	Gan tụy	2,73	15,89
9		Ostreidae	<i>Crassostrea sp.</i>	Gan tụy	0	6,97
10			<i>Crassostrea sp.</i>	Gan tụy	2,59	9,82
11			<i>Crassostrea sp.</i>	Gan tụy	1,08	2,67
12		Pinnidae	<i>Atrina vexillum</i>	Gan tụy	0	Oxđ
13			<i>Pina bicolor</i>	Gan tụy	0,04	Oxđ
14		Pteriidae	<i>Pinctada margaritifera</i>	Gan tụy	0	0
15			<i>Pinctada sp.</i>	Gan tụy	1,86	6,8
16			<i>Pinctada sp.</i>	Gan tụy	0,18	4,25
17			<i>Placuma sp.</i>	Gan tụy	0,84	6,11
18			<i>Pteria penguin</i>	Gan tụy	78,53	60,96
19			sợi thủy tinh thể	0,17	0,32	

20		Spondylidae	<i>Spondylus sinensis</i>	Gan tụy	0	0	
21		Trapeziidae	<i>Trapezium oblongum</i>	Gan tụy	0	0	
22		Tridacnidae	<i>Tridacna crocea</i>	Gan tụy	0,6	21,99	
23				sợi thủy tinh thể	0,1	0,69	
24			<i>Tridacna squamosa</i>	Gan tụy	5,24	7,43	
25				sợi thủy tinh thể	0,06	0,74	
26		Veneridae	<i>Tapes literata</i>	Gan tụy	0	0	
27	ECHINOIDEA	Asteroidea	<i>Culcita sp.</i>	tuyến tiêu hóa	0	0	
28				<i>Hehodega sp.</i>	tuyến tiêu hóa	0,03	0,05
29				<i>Leisolemus lima</i>	tuyến tiêu hóa	0,06	Oxđ
30		Diadematidae	<i>Diaderma setasum</i>	ruột	0,07	0,07	
31				<i>Diaderma setasum</i>	trứng	(-)	(-)
32		Echinoidea	<i>Diaderma (Acheura) sp.</i>	tuyến tiêu hóa	0,12	0,03	
33				<i>Sea urchin</i>	tuyến tiêu hóa	17,24	9,62
34				<i>Sea urchin</i>	tuyến tiêu hóa	0,05	0,05
35				<i>Sea urchin</i>	tuyến tiêu hóa	5,62	10,84
36			Holothuroidea	<i>Cucumariidae</i>	tuyến tiêu hóa	0	0
37		Taxopneustidae	<i>Trypneuster gratila</i>	ruột	0,04	0,04	
38				<i>Trypneuster gratila</i>	trứng	0,07	0,07
39		GASTROPODA	Bursidae	<i>Tutufa bubo</i>	Gan tụy	0,12	Oxđ
40					<i>Tutufa rubeta</i>	Gan tụy	0
41			Cassidae	<i>Phalium glaucum</i>	Gan tụy	0,21	Oxđ
42	Cerithiidae		<i>Cerithium nodulosum</i>	Gan tụy	0	0	
43				<i>Rhinoclavis sinensis</i>	Gan tụy	0	0
44	Conidae		<i>Conus betulinus</i>	Gan tụy	0	Oxđ	
45				<i>Conus quercinus</i>	Gan tụy	0,13	0,10
46				<i>Conus striatus</i>	Gan tụy	0	Oxđ
47				<i>Conus textile</i>	Gan tụy	0	0
48				<i>Conus vexillum</i>	Gan tụy	0	0
49			Cyclophoriidae	<i>Serpulorbis sp.</i>	Gan tụy	0,04	Oxđ
50			Cypraeidae	<i>Leporicypraea mappa</i>	Gan tụy	2,51	9,21
51	Fascioliariidae		<i>Pleuroploca filamentosa</i>	Gan tụy	2,25	2,67	
52				<i>Pleuroploca trapezium</i>	Gan tụy	0	0
53				<i>Rapana rapiformis</i>	Gan tụy	0,33	Oxđ
54	Ficidae		<i>Ficus gracilis</i>	Gan tụy	0,18	Oxđ	
55				<i>Laritus sp.</i>	Gan tụy	1,38	2,38
56	Haliotidae		<i>Haliotis asinina</i>	Gan tụy	0,04	Oxđ	
57			<i>Haliotis ovina</i>	Gan tụy	0	0,43	
58	Malleidae	<i>Malleus malleus</i>	Gan tụy	5,14	6,78		
59			<i>Malleus regula</i>	Gan tụy	7,19	11,53	

60		Muricidae	<i>Chicoreus asianus</i>	Gan tụy	0	Oxđ
61			<i>Chicoreus brunneus</i>	Gan tụy	0	0
62			<i>Drupa sp.</i>	Gan tụy	0,64	1,75
63			<i>Haustellum haustellum</i>	Gan tụy	0,55	Oxđ
64		Nacellidae	<i>Cellana sp.</i>	Gan tụy	0,35	1,3
65		Neritidae	<i>Nerita sp.</i>	Gan tụy	0,66	2,32
66		Olividae olividae	<i>Olivia miniacea miniacea</i>	Gan tụy	0	0
67		Ovulidae	<i>Orula ovum</i>	Gan tụy	0,14	Oxđ
68		Ranellidae	<i>Cymatium pyrum</i>	Gan tụy	0	0
69		Surpulimorphiidae	<i>Serpularia sp.</i>	Gan tụy	0,04	Oxđ
70		Strombidae	<i>Lambis chiragra</i>	Gan tụy	0,40	Oxđ
71			<i>Lambis lambis</i>	Gan tụy	0	0
72			<i>Lambis scorpius</i>	Gan tụy	0,18	Oxđ
73			<i>Lambis sp.</i>	Gan tụy	0,48	22,76
74				sợi thủy tinh thể	0,31	0,63
75			<i>Strombus aratrum</i>	Gan tụy	0	0
76			<i>Strombus lentiginosus</i>	Gan tụy	0	0
77			<i>Strombus luhuanus</i>	Gan tụy	0	0,61
78		Terebridae	<i>Oxymuris maculata</i>	Gan tụy	0	0
79			<i>Terebra maculata</i>	Gan tụy	0,61	0
80	Trochidae	<i>Tectus conus</i>	Gan tụy	0	0	
81		<i>Tectus pyramis</i>	Gan tụy	0	0	
82		<i>Trochus maculatus</i>	Gan tụy	4,29	8,43	
83	Turbinidae	<i>Turbo chrysotomus</i>	Gan tụy	0	0,65	
84		<i>Turbo sp.</i>	Gan tụy	0	31,32	
85	VERMES	Polychaeta	<i>Chaetoptorus sp.</i>	tuyển tiêu hóa	6,51	15,32

Chú thích: Oxđ: không xác định

4. KẾT LUẬN

Động vật không xương sống thuộc vùng biển Việt Nam có khả năng sinh enzyme phân giải fucoidan khá rõ rệt và khá đa dạng. Kết quả nghiên cứu tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong mục đích tìm kiếm nguồn enzyme phân giải các polysaccharide có hoạt tính sinh học chiết từ rong biển nhằm tạo ra các sản phẩm có ý nghĩa sử dụng cao hơn phục vụ đời sống.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này được thực hiện bởi sự tài trợ kinh phí từ Chương trình hợp tác giữa Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) với Quỹ Nghiên cứu cơ bản L.B.Nga (VAST- RFBR), nhiệm vụ VAST.HTQT.NGA. 06/16-17 “Phát triển cơ sở khoa học để tạo ra các loại thuốc cho y sinh sử dụng các polysaccharit và enzym chuyển hóa chúng từ nguồn nguyên liệu biển có khả năng tự tái tạo”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Myra O. McClure, John P. Moore, Dominique F. Blanc, Paul Scotting, Geoffrey M.W. Cook, Roger J.Keynes, Jonathan N. Weber, Donald Davies and Robin A. Weiss, “Investigations into the Mechanism by Which Sulfated Polysaccharides Inhibit HIV Infection In Vitro”, AIDS Research and Human Retroviruses, Vol. 8, No. 1: 19-26 (1992).
2. T. Nishino, T. Nagumo, H. Kiyohara, H. Yamada, “Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*”, Carbohydrate Research, Vol. 211, Issue. 1: 77-90 (1991).
3. A. M. Zakharenko, M. I. Kusaykin, Bui Minh Ly, Pham Van Huyen, Huynh Hoang Nhu Khanh, V. V. Sova, T. N. Zvyagintseva, “Catalytic properties of endo-1,3- β -D-glucanase from the Vietnamese edible mussel *Perna viridis*”, Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 35, No.1: 55-61 (2009).
4. K. Kitamura, M. Matsuo, T. Yasui, “Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancrease of *Patinopecten yessoensis*”, Biosci., Biotechnol., Biochem., 56: 409-494 (1992).
5. Svetlana N. Kovalchuk et al., “Purification, cDNA cloning and homology modeling of endo-1,3-b-D-glucanase from scallop *Mizuhopecten yessoensis*”, Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 143: 473-485. (2005).
6. Berteau O. et al., “Characterization of a new α -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* hat catalyzes the hydrolysis of α -L-fucose from *Ascophylum nodosum*.” Glycobiology, Vol.12, No 4: 273-282, (2002).
7. Valérie Lépagnot-Descamps et al., “Purification and determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* laminaranase”. Carbohydrate Research 310: 283-289, (1998)
8. Huỳnh Hoàng Như Khánh, Bùi Minh Lý, Thái Thị Hòa, Cao Thị Thúy Hằng, Lê Mai Hương, “Sàng lọc hoạt tính enzyme của động vật thân mềm biển Việt Nam có khả năng phân giải fucoidan và laminaran từ rong nâu”, Tuyển tập Nghiên cứu biển, XVII: 178-182 (2010).
9. Huynh Hoang Nhu Khanh, Bui Minh Ly, Le Quang Huan, Mikhail Kusaykin, Yu V Dubrovskay, Cao Thi Thuy Hang, Pham Duc Thinh, Ngo Thi Duy Ngoc, “Screening of O-glycoside hydrolase from Vietnam marine invertebrates”, Tạp chí Công nghệ sinh học 11(2): 275-283. (2013).
10. Artem S. Silchenko, Huynh Hoang Nhu Khanh, Cao Thi Thuy Hang, Valeriya V. Kurilenko, Alexander M. Zakharenko, Anastasiya O. Zueva, Bui Minh Ly, Mikhail I. Kusaykin, “A simple plate method for the screening and detection of fucoidanases”. Achievements in the Life Sciences 9: 104 -106 (2015) .