

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

Đến toà soạn 15-05-2024

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

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

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

³ Đại học Nha Trang

*Email: khanhhuynh@nitra.vast.vn

SUMMARY

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

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

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

1. GIỚI THIỆU

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

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

enzyme chuyển hóa fucoidan trong đó có fucoidanase đang nhận được rất nhiều sự quan tâm nghiên cứu. Fucoidanase (EC 3.2.1.-) là các enzyme xúc tác thủy phân liên kết đường giữa các gốc fucose hoặc sulfated fucose trong mạch chính của phân tử fucoidan. Dựa vào khả năng xúc tác thủy phân liên kết đường ở các vị trí carbon khác nhau giữa các gốc fucose hoặc sulfated fucose trong mạch chính của phân tử cơ chất fucoidan mà fucoidanase được phân thành 2 nhóm chính là $\alpha(1\rightarrow4)$ fucoidanase và $\alpha(1\rightarrow3)$ fucoidanase [2]. Fucoidanase tái tổ hợp được tạo ra bằng kỹ thuật sinh học phân tử giúp tạo ra các enzyme có hoạt tính mạnh và độ bền cao. Trong những năm gần đây, nhờ vào sự phát triển của các phần mềm phân tích tin sinh học mà thông tin của các vùng bảo thủ của phân tử protein fucoidanase cũng như cấu trúc của enzyme này đã được làm sáng tỏ, qua đó giúp nâng cao khả năng tìm kiếm các trình tự fucoidanase tiềm năng hướng đến nghiên cứu thành công fucoidanase tái tổ hợp [3-6]. Công bố của Vicker và cộng sự về cấu trúc tinh thể 3D của 02 phân tử fucoidanase P5AFcnA và MfFcnA từ vi khuẩn biển *Psychromonas* SW5A và *Mariniflexile fucanivorans* sp. nov. đã chỉ ra vùng bảo thủ chịu trách nhiệm hoạt tính của fucoidanase là vùng D1, đó là một đoạn polypeptide gồm khoảng 400 axit amin có cấu trúc dạng xoắn và tấm kết hợp (β/α)₈ tính từ đầu tận cùng amino của chuỗi protein, mỗi vùng đều chứa 02 gốc axit amin là Aspartic (D) và Histidine (H) chịu trách nhiệm xúc tác của enzyme fucoidanase (tương ứng với vị trí D226 và H294 của trình tự MfFcnA, D201 và H276 của trình tự P5AFcnA), cùng với các vị trí liên kết khác trong đó có liên kết với ion Ca^{2+} [5].

Nhờ vào công bố về trung tâm hoạt động, vị trí xúc tác và cấu trúc 3D của fucoidanase từ nhóm nghiên cứu của

Vicker và cộng sự, một loạt các fucoidanase khác cũng đã được xác định và tái tổ hợp thành công trong thời gian ngắn sau đó, như 04 fucoidanase từ vi khuẩn biển *W. fucanilytica* CZ1127T [6], fucoidanase P19DFcnA từ vi khuẩn *Psychromonas* sp. [5], fucoidanase Fhf1, Fhf2 từ *F. haliotis* [3,4]. Các fucoidanase này không phải được sàng lọc, phân lập, tách chiết trực tiếp từ tế bào sinh vật như các nghiên cứu trước đây, mà được tổng hợp bằng kỹ thuật sinh học phân tử nhờ vào việc dự đoán các trình tự protein tiềm năng sẵn có trên Ngân hàng gen thế giới (National Center for Biotechnology Information - NCBI). Trong các nghiên cứu này, bên cạnh vùng D1 và trung tâm hoạt động của fucoidanase, một số vùng bảo thủ khác như vùng peptide tín hiệu (signal peptide), vùng Cadherin-like domain (IgR) hay vùng Type IX secretion system (T9SS) cũng được xác định, mặc dù vậy cho đến nay vai trò của các vùng bảo thủ này (loại trừ vùng D1) đối với hoạt tính của fucoidanase vẫn chưa được làm rõ [4-7].

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

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

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

2.2 Phương pháp

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

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

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

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

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

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

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

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

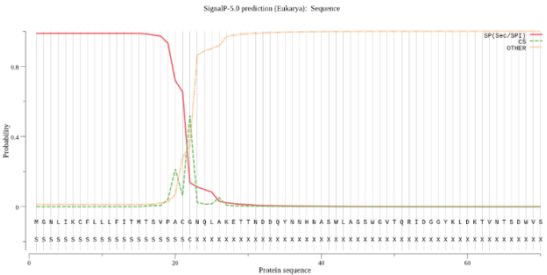
Enzyme	Nguồn vi khuẩn	Phân loại	Genbank
MfFcnA [7]	<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5T	Endo- α (1 $\rightarrow$ 4)	CAI47003.1
FFA1 [8]	<i>Formosa algae</i>		WP_057784217.1
FFA2 [9]	<i>Formosa algae</i>		WP_057784219.1
Fhf1 [4]	<i>Formosa haliotis</i>		WP_066217780.1
Fhf2 [3]	<i>Formosa haliotis</i>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

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

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

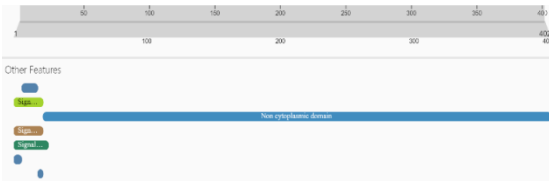
Theo kết quả phân tích bằng SignalIP 5.0 (mã số tra cứu: 6677967F0016A135EBF45AA6, ngày 23/06/2024) và InterproScan (mã số tra cứu: iprscan5-R20240622-121812-0969-222055-p1m, ngày 22/06/2024), PF1 là một protein gồm 402 axit amin, có chứa đoạn signal peptide gồm 22 axit amin (vị trí cắt- cleavage site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



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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

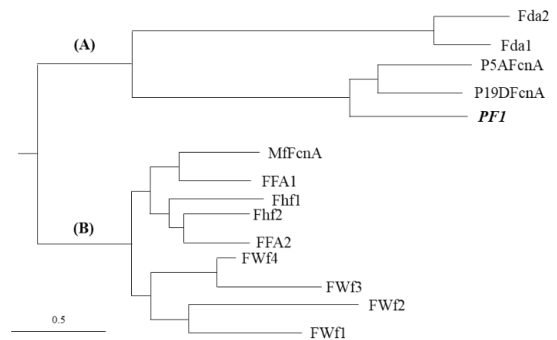
gốc axit amin còn lại của MfFcna là N270, được biến đổi thành S231 trong trình tự PF1 (Bảng 2).

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

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

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

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



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

4. KẾT LUẬN

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

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

Tài liệu tham khảo

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

- Trang, Holck J., Ermakova S.P., Meyer A.S., Mikkelsen M.D., (2020). Functional Characterization of a New GH107 Endo- α -(1,4)-Fucoidanase from the Marine Bacterium *Formosa haliotis*. *Marine Drugs*, **18**, 562.
- [5]. Vickers C., Liu F., Abe K., Salama-Alber O., Jenkins M., Springate C.M.K., Burke J.E., Withers S.G., Boraston A.B., (2018). Endo-fucoidan hydrolases from glycoside hydrolase family 107 (GH107) display structural and mechanistic similarities to α -L-fucosidases from GH29. *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 18296-18308.
- [6]. Zueva A.O., Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Usoltseva R.V., Kalinovskiy A.I., Kurilenko V.V., Zvyagintseva T.N., Pham Duc Thinh, Ermakova S.P., (2020). Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127T. *International Journal of Biological Macromolecules*, **164**, 3025-3037.
- [7]. Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolut Y., Kervarec N., Yvin J.C., Barbeyron T., Michel G., Kloareg B., (2006). Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: Definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans. *Glycobiology*, **16**, 1021-1032.
- [8]. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Malyarenko O.S., Shevchenko N.M., Zueva A.O., Kalinovskiy A.I., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P., (2018). Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydrate Polymers*, **193**, 189-195.
- [9]. Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R. V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N., (2017). Expression and biochemical characterization and substrate specificity of the fucoidanase from *Formosa algae*. *Glycobiology*, **27**, 1-10.
- [10]. Sakai T., Kawai T., Kato I., (2004). Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. *Marine Biotechnology*, **6**, 335-346.
- [11]. Cao Thi Thuy Hang, Mikkelsen M.D., Lezyk M.J., Bui Minh Ly, Tran Thi Thanh Van, Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Pham Duc Thinh, Truong Hai Bang, Holck J., Meyer A.S., (2018). Novel Enzyme Actions for Sulphated Galactofucan Depolymerisation and a New Engineering Strategy for Molecular Stabilisation of Fucoidan Degrading Enzymes. *Marine Drugs*, **16**, 1-18.
- [12]. Zhu C., Liu Z., Ren L., Jiao S., Zhang X., Wang Q., Li Z., Du Y., Li J.J., (2021). Overexpression and biochemical characterization of a truncated endo- α (1 $\rightarrow$ 3)-fucoidanase from *Alteromonas* sp. SN-1009, *Food Chemistry*, **353**, 129460.
- [13]. Silchenko A.S., Rasin A.B., Kusaykin M.I., Kalinovskiy A.I., Miansong Z., Changheng L., Malyarenko O., Zueva A.O., Zvyagintseva T.N., Ermakova S.P., (2017). Structure, enzymatic transformation, anticancer activity of fucoidan and sulphated fucooligosaccharides from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers*, **175**, 654-660.