

# 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<sup>1\*</sup>, Cao Thị Thúy Hằng<sup>1</sup>, Huỳnh Hoàng Như Khánh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Thuận<sup>1</sup>, Phạm Đức Thịnh<sup>1</sup>, Trần Hoàng Hải<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## TÓM TẮT

Ulvan 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

Ulvan 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 (Qi *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.

Ulvan 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  $\beta$ . 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<sup>T</sup>, 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 ở 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 tái 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 OD<sub>600</sub> 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,3% w/w KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 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. macleuri*.

### **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)**

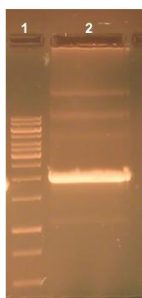
Hỗn hợp phản ứng chứa dung dịch enzyme có nồng độ 0,5 g/L trong môi trường đệm Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, 250 mM NaCl và 10 mM CaCl<sub>2</sub> (đệm A), và 1% w/v fucoidan trong đệm A. Các mẫu được ủ ở 35°C trong vòng 24 h. Hỗn hợp phản ứng (5 µL) được pha trộn với 5 µL đệm tải (20% glycerol và 0,02% phenol 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**

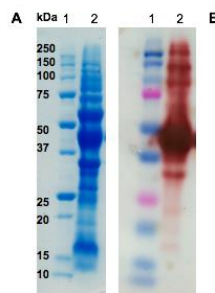
### **Tạo dòng và biểu hiện FA28 ulvan lyase tái tổ hợp**

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).



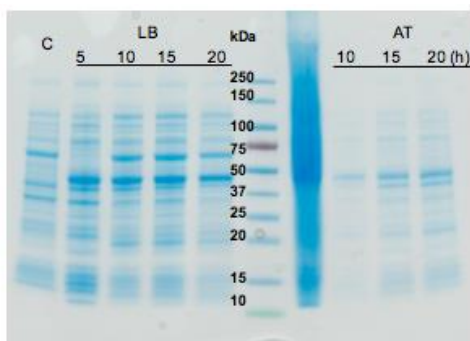
**Hình 2. Kết quả kiểm tra khả năng biểu hiện của ulvan lyase tái tổ hợp FA28**  
(A) - Điện di SDS-PAGE; (B) - Western blot. Trong đó: 1. Thang chuẩn; 2. Mẫu sinh khối sau biểu hiện.

### 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  $\mu$ 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.

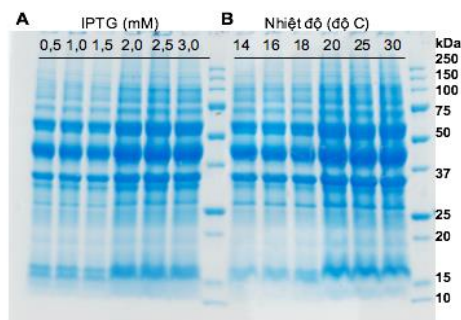
Đối chứng âm được sử dụng trong nghiên cứu này là chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid FA28-pET-28a(+) không được cảm ứng biểu hiện. Kết quả thể hiện trên Hình 3, ở vị trí đối chứng âm – được kí hiệu là C cho thấy, hoàn toàn không có xuất hiện vạch protein mục tiêu (vị trí 48 kDa) ở trên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

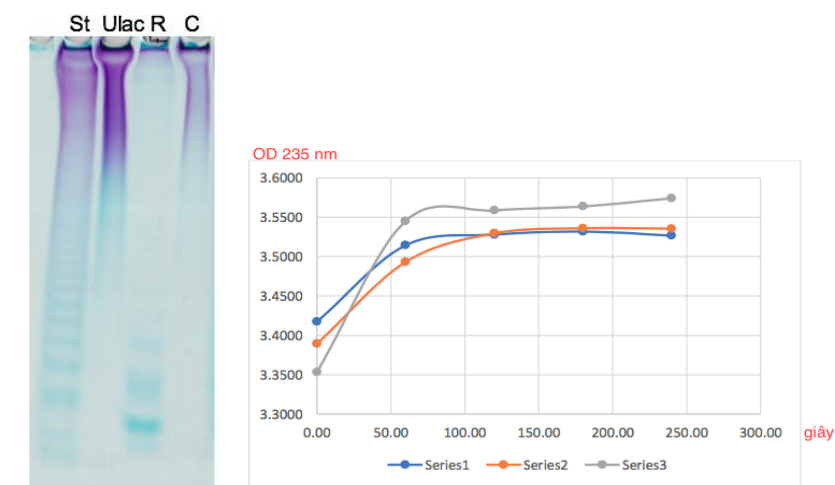


**Hình 4. Ảnh hưởng của điều kiện lên men đến sự biểu hiện và hoạt tính của FA28 ulvan lyase tái tổ hợp**  
(A) Nồng độ IPTG, (B) Nhiệt độ.

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 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.

Ulvan 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 chúng tôi 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- $\alpha$ (1,3)-Fucoidanase Mef2 Releases Uniquely Branched Oligosaccharides from *Saccharina latissima* Fucoidans. *Marine Drugs*, 20(5): 305.
- Wijesinghe W, Jeon YJ (2012). Enzyme-assistant 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<sup>1\*</sup>, Cao Thi Thuy Hang<sup>1</sup>, Huynh Hoang Nhu Khanh<sup>1</sup>,  
 Nguyen Thi Thuan<sup>1</sup>, Pham Duc Thinh<sup>1</sup>, Tran Hoang Hai<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nha Trang Institute of Technology Research and Application, VAST

<sup>2</sup>Graduate 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