

SÀNG LỌC HOẠT TÍNH ENZYM CỦA ĐỘNG VẬT THÂN MỀM BIỂN VIỆT NAM PHÂN GIẢI FUCOIDAN VÀ LAMINARAN TỪ RONG NÂU

¹Huỳnh Hoàng Như Khánh, ¹Bùi Minh Lý, ¹Thái Thị Hòa,
¹Cao Thị Thúy Hằng, ²Lê Mai Hương
¹Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang
²Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên

Tóm tắt 45 mẫu vật động vật thân mềm biển tại một số địa phận của tỉnh Khánh Hòa (Nha Trang, Cam Ranh, Ninh Hòa) được thu thập cho mục đích sàng lọc hoạt tính enzym fucoidanase và laminaranase. Sau khi thu thập, các mẫu vật được định danh và bảo quản lạnh ở 4°C trong khi vận chuyển về phòng thí nghiệm. Các tuyến tiêu hóa được tách ra khỏi mẫu vật, đồng nhất trong dung dịch đệm, ly tâm thu dịch trong. Phần dịch trong sau khi chạy qua cột sắc ký lọc gel (Gel Sephadex G25; 1,2 x 20cm) được sử dụng để sàng lọc hoạt tính fucoidanase và laminaranase. Trong số 45 mẫu thử nghiệm, các mẫu thu được từ các loài *Haustellum haustellum*, *Terebra maculate*, *Strombus luhuanus* biểu hiện hoạt tính fucoidanase cao, trong khi các mẫu thuộc loài *Perna viridis*, *Lambis scorpius*, *Orula ovum* lại có hoạt tính laminaranase cao. Tuy nhiên, có sự sai khác về hoạt tính enzym phân giải cơ chất fucoidan và laminaran có nguồn gốc Việt Nam và CHLB Nga.

SCREENING ENZYME ACTIVITY OF VIETNAMESE MARINE MOLLUSCA DEGRADING FUCOIDAN AND LAMINARAN FROM BROWN ALGAE

¹Huynh Hoang Nhu Khanh, ¹Bui Minh Ly, ¹Thai Thi Hoa,
¹Cao Thi Thuy Hang, ²Le Mai Huong
¹Nhatrang Institute of Technological Research and Application
²Institute of the Natural Product Chemistry

Abstract 45 marine mollusca specimens were collected in Khanh Hoa province (Nha Trang, Cam Ranh, Ninh Hoa) for screening forward fucoidanase and laminaranase activities. After collecting, the specimens were identified, kept at 4°C and transferred to the laboratory. The digestive gland was separated, homogenised in the buffer and centrifuged to obtain the crude extract. The crude extract was applied on a Sephadex G-25 column (1.2 x 20 cm), then enzymological activity was screened with brown algae's fucoidan and laminaran. Among 45 specimens, the extracts of *Haustellum haustellum*, *Terebra maculate*, *Strombus luhuanus* exhibited the high fucoidanase activity, while the extracts of *Perna viridis*, *Lambis scorpius* and *Orula ovum* showed the high laminaranase activity. However, there is the difference in enzymological activity of the fucoidan and laminaran substrates isolated from Vietnam and Russia.

I. MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, các polysaccharide từ rong nâu đã được nghiên cứu chiết xuất thành công tại Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang. Hoạt tính sinh học của các polysaccharide này cũng đã được nhiều nhà khoa học trên thế giới phát hiện và công bố rộng rãi. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng một số polysaccharide từ rong nâu như fucoidan, laminaran, axit alginic,... có nhiều hoạt tính sinh học như kháng viêm nhiễm, kháng virus, kháng đông tụ, kháng u, giải độc và giảm đau..., do đó được áp dụng trong y học, dược học và thực phẩm (Adachi, 2002; Bo Li và cs., 2008)

Tuy nhiên, đặc tính độ nhớt cao và cấu trúc mạch chưa rõ ràng của các polysaccharide này đã gây cản trở không nhỏ đến khả năng ứng dụng của chúng vào lĩnh vực y và dược học... Vì vậy, việc sàng lọc và tinh sạch các enzym phân giải polysaccharide chiết từ rong nâu là hướng nghiên cứu thiết yếu cho khoa học và thực tiễn.

Do nguồn thức ăn chủ yếu của các động vật thân mềm ở biển là rong nên chúng có khả năng tiết ra một số enzym phân giải các polysaccharide có trong rong để tiêu hóa chúng. Vào thập niên 70, đã có một số công bố trên thế giới về nghiên cứu tinh sạch và khảo sát các đặc tính của enzym chiết từ động vật thân mềm biển. Từ đó đến nay, nhiều công trình nghiên cứu cũng đã lần lượt công bố về khả năng tiết enzym phân giải các polysaccharide chiết từ rong biển ở các loài động vật thân mềm biển như fucoidanase chiết từ gan của một loài hai mảnh vỏ *Pantinopecten vessoensis*, β -1,3-glucan glucanohydrolase cũng được chiết từ sợi thủy tinh thể của loài hai mảnh vỏ *Spisula sachalinensis* (Sova và cs., 1970). Và nhiều loại enzym phân giải các polysaccharide cũng được phân lập từ vi khuẩn biển hoặc nấm (Shin-ichi Furukawa và cs., 1992; Saravanan và cs., 2007).

Tại Việt Nam, chưa có một công trình nghiên cứu nào về enzym có khả

năng phân giải các polysaccharide có nguồn gốc rong biển. Vì thế, chúng tôi đã tiến hành sàng lọc một số enzym có khả năng phân giải polysaccharide chủ yếu là fucoidan và laminaran của rong nâu từ bộ phận tiêu hóa của một số loài động vật thân mềm biển Việt Nam.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

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 enzym.

2. Hóa chất:

Acid acetic, Acid succinic, NaOH

Thuốc thử Nelson A, B, C (Chuẩn bị theo phương pháp Nelson-Somogy, 1989)

Fucoidan 1, laminaran 1 (Viện Hóa sinh Hữu cơ Thái Bình Dương, Vladivostok, Cộng Hòa Liên Bang Nga cung cấp)

Fucoidan 2, laminaran 2 (Viện Nghiên cứu và Ứng dụng Công nghệ Nha Trang cung cấp)

3. Phương pháp:

3.1. Thu dịch chiết enzym:

Thu bộ phận tiêu hóa (gan, tụy, sợi 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 (tỉ lệ 1/10 (w/v)). 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.

3.2. Thử hoạt tính enzym:

Chuẩn bị các cơ chất: Các cơ chất fucoidan 1, fucoidan 2, laminaran 1, laminaran 2 được pha trong đệm acetat natri 0,02M pH 5,2 (tỉ lệ 1:1 (w/v)).

Phương pháp thử hoạt tính fucoidanase và laminaranase dựa trên sự oxi hóa 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 hóa của thuốc thử arsenmolybdat trong môi trường axit (pH=1,7 – 2) với sự tạo thành màu xanh molybdat.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

45 mẫu sinh vật biển được thu tại vùng biển Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa (tỉnh Khánh Hòa) từ tháng 5 đến tháng 8 năm 2008. Các đối tượng thu thập được tiến hành định danh tại Viện Hải dương học (Nha Trang). Kết quả phân loại cho thấy 45 mẫu vật thuộc 3 lớp động vật thân mềm biển với 16 họ thuộc lớp chân bụng (Gastropoda), 5 họ thuộc lớp hai mảnh vỏ (Bivalvia) và 2 họ thuộc lớp cầu gai (Echinoidea).

Đối với lớp chân bụng (Gastropoda), chúng tôi đã sàng lọc trên 31 mẫu vật. Số loài có hoạt tính chiếm tỷ lệ trung bình (48% số loài khảo sát có hoạt tính fucoidanase và 70% số loài khảo sát có hoạt tính laminaranase). Lớp hai mảnh vỏ (Bivalvia) có 9 loài đã được sàng lọc hoạt tính, trong đó số loài có hoạt tính chiếm tỷ lệ tương đối thấp (11% có hoạt tính fucoidanase và 55% có hoạt tính laminaranase). Đối với lớp cầu gai (Echinoidea), chỉ khảo sát trên 2 loài và cả hai đều có hoạt tính.

Các kết quả phân loại định tên và sàng lọc hoạt tính phân giải fucoidan và laminaran từ 45 đối tượng thân mềm thu thập được tại vùng biển Nha Trang- Khánh Hòa được tổng kết trong bảng 1.

Nhận xét chung: trong số các mẫu thử nghiệm, số mẫu có hoạt tính

laminaranase vượt trội so với số mẫu có hoạt tính fucoidanase, cụ thể là:

- Hoạt tính fucoidanase: các mẫu thuộc các loài *Strombus luhuanus*, *Conus vexillum*, *Lambis scorpius*, *Ficus gracilis*, *Orula ovum*, *Phalium glaucum*, *Rapana rapigormis*, *Tutuga bubo*, *Haustellum haustellum*, *Terebra maculata*, *Lambis chiragra* và *Turbo chrysotomus* có hoạt tính fucoidanase. Tuy nhiên, các mẫu này chỉ hoạt tính trên cơ chất fucoidan có xuất xứ từ Nga, còn trên fucoidan nguồn gốc Việt Nam lại âm tính chỉ trừ mẫu *Strombus luhuanus* và *Turbo chrysotomus*. Điều này có thể là do sự khác nhau về cấu trúc của các cơ chất có nguồn gốc từ những loài rong khác nhau. Ngoài ra, có thể fucoidan của Việt Nam vẫn chưa được tinh sạch và chứa nhiều polyphenol, alginat-Na,...

- Hoạt tính laminaranase: tương tự như vậy, số mẫu có hoạt tính laminaranase trên cơ chất laminaran của Nga tương đối nhiều, bao gồm các mẫu thuộc loài: *Pleuroploca trapezium*, *Pinctada margaritifera*, *Tectus conus*, *Strombus aratrum*, *Strombus luhuanus*, *Strombus lentiginosus*, *Conus textile*, *Tapes listerata*, *Civus betulinus*, *Lambis scorpius*, *Chicoreus asianus*, *Cymatium pyrum*, *Ficus gracilis*, *Orula ovum*, *Phalium glaucum*, *Rapana rapigormis*, *Tutuga bubo*, *Lambis chiragra*, *Terebra maculata*, *Haustellum haustellum*, *Haliotis ovina*, *Diaderma setasum*, *Trypneuster gratila*, *Perna viridis*, trong đó hoạt tính cao nhất ở hai mẫu *Orula ovum*, *Lambis scorpius*. Một số mẫu có hoạt tính laminaranase đối với cơ chất laminaran của Việt Nam là các mẫu *Lambis lambis*, *Pleuroploca trapezium*, *Pinctada margaritifera*, *Tapes listerata*, *Strombus aratrum*, *Strombus luhuanus*, *Tectus conus*.

Bảng 1. Hoạt tính enzym phân giải fucoidan và laminaran từ sinh vật biển
Table1. Enzymological activity for degrading fucoidan and laminaran from marine organism

Lớp	Họ	Tên loài	Fucoidanase		Laminaranase	
			1 (IU)	2 (IU)	1(IU)	2 (IU)
G A S T R O P O D A	Cerithiidae	<i>Cerithium nodulosum</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
	Muricidae	<i>Chicoreus asianus</i>	(-)	oxđ	0,06	oxđ
		<i>Chicoreus brunneus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
	Conidae	<i>Haustellum haustellum</i>	0,55	oxđ	0,28	oxđ
		<i>Conus betulinus</i>	(-)	oxđ	(-)	oxđ
		<i>Conus striatus</i>	(-)	oxđ	(-)	oxđ
		<i>Conus textile</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
		<i>Conus vexillum</i>	0,13	0,10	(-)	(-)
	Ranellidae	<i>Cymatium pyrum</i>	(-)	(-)	0,38	(-)
	Ficidae	<i>Ficus gracilis</i>	0,18	oxđ	0,11	oxđ
	Haliotidae	<i>Haliotis ovina</i>	(-)	oxđ	0,31	oxđ
		<i>Haliotis asinina</i>	0,04	oxđ	0,03	oxđ
	Strombidae	<i>Lambis chiragra</i>	0,40	oxđ	0,23	oxđ
		<i>Lambis lambis</i>	(-)	(-)	(-)	0,05
		<i>Lambis scorpius</i>	0,18	oxđ	0,60	oxđ
		<i>Strombus aratum</i>	(-)	(-)	0,19	0,08
		<i>Strombus lentiginosus</i>	(-)	(-)	0,05	(-)
	Ovulidae	<i>Strombus luhuanus</i>	(-)	0,61	0,18	0,04
		<i>Orula ovum</i>	0,14	oxđ	0,31	oxđ
	Cassidae	<i>Phalium glaucum</i>	0,21	oxđ	0,16	oxđ
	Fascioliariidae	<i>Pleuroploca trapezium</i>	(-)	(-)	(-)	0,04
		<i>Rapana rapiformis</i>	0,33	oxđ	0,18	oxđ
	Trochidae	<i>Tectus conus</i>	(-)	(-)	0,30	0,24
		<i>Tectus pyramis</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
		<i>Trochus maculatus</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
	Terebridae	<i>Terebra maculata</i>	0,61	(-)	0,24	oxđ
Turbinidae	<i>Turbo chrysotomus</i>	(-)	0,65	(-)	0,07	
Bursidae	<i>Tutufa bubo</i>	0,12	oxđ	0,10	oxđ	
	<i>Tutufa rubeta</i>	(-)	(-)	(-)	(-)	
Cyclophoriidae	<i>Serpulorbis sp.</i>	0,04	oxđ	0,12	oxđ	
Surpulimorphiidae	<i>Serpularia sp.</i>	0,04	oxđ	0,22	oxđ	
B I V A L V I A	Tridacnidae	<i>Tridacna squamosa</i>	(-)	(-)	(-)	(-)
	Pteriidae	<i>Pinatada margaritifera</i>	(-)	(-)	0,09	0,08
	Veneridae	<i>Tapes literata</i>	(-)	(-)	(-)	0,05
	Mytilidae	<i>Perna viridis</i>	(-)	(-)	0,33	(-)
	Pinnidae	<i>Pina bicolor</i>	0,04	oxđ	0,22	oxđ
		<i>Atrina vexillum</i>	(-)	oxđ	0,04	oxđ
E C H I N O I D E A	Taxopneustidae	<i>Trypneuster gratila</i> (ruột)	0,04	0,04	0,38	oxđ
		<i>Trypneuster gratila</i> (trúng)	0,07	0,07	0,26	oxđ
	Diadematidae	<i>Diaderma setasum</i> (ruột)	0,07	0,07	0,67	oxđ
		<i>Diaderma setasum</i> (trúng)	(-)	(-)	0,09	(-)
		<i>Hehodeima sp.</i>	0,03	0,05	oxđ	oxđ
	<i>Sea urchin</i>	0,05	0,05	0,14	oxđ	
	<i>Leisolemus lima</i>	0,06	oxđ	0,2	oxđ	
<i>Isognima isognomus</i>	0,05	0,05	oxđ	oxđ		

Ghi chú: (-): âm tính, Oxđ: không xác định, IU: đơn vị hoạt độ

IV. NHẬN XÉT

Các động vật thân mềm biển Việt Nam có khả năng sinh enzym phân giải fucoidan và laminaran khá rõ rệt và đa dạng. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu làm tinh sạch và tiêu chuẩn hóa fucoidan và laminaran của rong biển Việt Nam. Kết quả nghiên cứu tạo cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo trong mục đích tìm kiếm nguồn enzym 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

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Thạc sỹ Bùi Quang Nghị, Phòng chuyên môn bảo tàng, Viện Hải dương học đã giúp đỡ chúng tôi trong quá trình thu thập và định danh mẫu.

Người nhận xét:
- TS. Đào Việt Hà

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adachi, 2002. New effects of oligosaccharides from brown seaweed. *Fragr J.*, 30(5): 73-83.
- Bo Li, Fei Lu, Xinjun Wei, Ruixiang Zhao, 2008. Fucoidan: Structure and bioactivity. *Molecules*, 13: 167-1695.
- Saravanan, R., V.P. Devi, A. Shanmugam, D. S. Kumar, 2007. Isolation and partial purification of extracellular enzyme (1,3) - β - D-glucanase from *Trichoderma reesei* (3239). *Biotechnology*, 6(3): 440-443.
- Shin-ichi Furukawa, Tatsuo Fujikawa, Daizo Koga, Akio Ide, 1992. Purification and some properties of exo-type fucoidanase from *Vibrio* sp. N-5. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56 (11): 1.829-1.834.
- Sova, V. V., L. A. Elyakova, V. E. Vaskovsky, 1970. Purification and some properties of β -1,3-glucan glucanohydrolase from the crystalline style of *Bivalvia*, *Spisula sachalinensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, 212: 111-115.