

PHÂN LẬP VI KHUẨN CHO HOẠT TÍNH NATTOKINASE CAO VÀ KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG MỘT SỐ YẾU TỐ ĐỐI VỚI QUÁ TRÌNH LÊN MEN THU NHẬN NATTOKINASE

Đỗ Thị Hoàng Tuyền⁽¹⁾, Lê Thị Bích Phượng⁽¹⁾, Lê Trần Nhật Anh⁽¹⁾,
Nguyễn Thị Mỹ Trang⁽¹⁾

⁽¹⁾Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

Ngày nhận bài 20/4/2017; Ngày gửi phản biện 2/5/2017; Chấp nhận đăng 31/7/2017

Email: hoangtuyendo86@gmail.com

Tóm tắt

Các chủng vi khuẩn có hoạt tính nattokinase phân lập từ sản phẩm Natto thị trường và thực phẩm lên men tự chế biến, kết quả đã thu được 12 chủng trong đó có 11/12 chủng có hoạt tính tiêu huyết. Thực hiện sàng lọc trên môi trường thạch máu thu nhận được 3 chủng cho vòng phân giải mạnh là A1, A8, A11, trong đó chủng A11 cho hoạt tính cao nhất (5,17 FU/ml) khi nuôi cấy trên môi trường MPA, định danh cho kết quả là *Bacillus subtilis*. Khi khảo sát ảnh hưởng của các nguồn N và nguồn C khác nhau đối với hoạt tính enzyme cho kết quả cao nhất men 20 g/l và maltose 15 g/l cho hoạt tính nattokinase cao nhất (8,6 FU/ml)

Từ khóa: nattokinase, *Bacillus subtilis*, máu đông, maltose, cao nấm men

Abstract

ISOLATION OF NATTOKINASE PRODUCING BACTERIA AND EXAMINATION EFFECTS OF SOME FACTORS ON NATTOKINASE ACTIVITY

12 Nattokinase producing bacteria species were isolated from commercial Natto and fermented soybean. There are 11 in 12 species show blood – analyzing activity. Screening on rabbit blood agar, species named A1, A8, A11 show large clearing zones. The A11 species produce highest nattokinase activity when cultivating in MPA medium and was indentified as *Bacillus subtilis* A11. Cultivating *Bacillus subtilis* A11 in media with a variety of nitrogen and carbon sources, the yeast extract 20 g/L and maltose 15 g/L bring about highest nattokinase activity (8.6 FU/ml).

1. Giới thiệu

Ngày nay, tỷ lệ số người mắc các bệnh do sự hình thành của các khối máu đông như tai biến mạch máu não, đột quy... ngày càng tăng cao. Để phòng ngừa và điều trị những căn bệnh này, ngoài việc thực hiện lối sống khoa học, chúng ta nên sử dụng những sản phẩm chứa hoạt chất làm tan huyết khối. Nattokinase là enzyme có khả năng làm tan huyết khối, được tìm thấy trong thực phẩm Natto vào năm 1980 bởi GS. Sumi Hiroyuki. Nattokinase được đưa vào thị trường Việt Nam ở hai dạng: dạng viên uống và thực phẩm. Tuy nhiên, viên uống được nhập khẩu từ nước ngoài nên giá thành cao và thực phẩm chứa nattokinase của người Nhật có khẩu vị không hợp với người Việt Nam gây khó khăn trong việc điều trị và phòng ngừa bệnh. Do vậy, bài nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu chủ động tạo ra nattokinase từ chủng *Bacillus*

sp. được phân lập từ thực phẩm natto, góp phần vào công nghệ sản xuất các sản phẩm chứa nattokinase phù hợp với người tiêu dùng Việt Nam, tạo điều kiện thuận lợi hơn trong việc phòng và điều trị các bệnh liên quan đến sự hình thành huyết khối.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu: Thực phẩm Natto truyền thống ngoài thị trường. Thực phẩm lên men tự chế biến: đậu nành được luộc chín, bọc trong rơm, để lên men tự nhiên trong 72 giờ. Môi trường sử dụng trong phân lập là môi trường thạch máu: tryptone 10g/l, soytone 5g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l, máu thỏ 5 g/l. Môi trường cơ bản trong lên men là MPA: cao thịt 5g/l, soytone 10 g/l, NaCl 5 g/l (có hoặc không bổ sung agar 15 g/l)

2.2. Phương pháp

Phương pháp phân lập: Từ 2 nguồn thực phẩm lên men, tiến hành cân và nghiền 10 g mẫu cho vào bình tam giác chứa 90 ml nước cất vô trùng để được mẫu pha loãng 10-1, ly tâm ở 2000v/phút, 15 phút, thu dịch nổi. Tiếp tục pha loãng để được các nồng độ 10-2, 10-3, 10-4, 10-5. Mẫu đã pha loãng được cấy trải trên môi trường MPA, đặt ở nhiệt độ 370C trong 48 giờ sau đó phân tách và làm thuần các khuẩn lạc đặc trưng có hình thái nghi ngờ là *Bacillus* sp.

Sàng lọc chủng vi khuẩn có hoạt tính nattokinase: Sàng lọc các chủng có hoạt tính nattokinase bằng cách định tính trên đĩa thạch máu. Dùng khoan nút chai khoan lỗ trên bề mặt thạch máu trong các đĩa petri, nhỏ vào mỗi lỗ khoan 0,1 ml dịch lên men, ủ ở 37oC và đo đường kính vòng phân giải sau 24h. Chọn 3-5 chủng có đường kính phân giải huyết khối cao nhất từ mẫu phân lập để thực hiện quá trình sàng lọc thứ cấp. Sàng lọc thứ cấp chủng có hoạt tính nattokinase cao bằng cách nuôi cấy chìm trong môi trường MPA lỏng ở 370C trên máy lắc 150 vòng/phút, 24 giờ. Dịch sau nuôi cấy được thu nhận bằng ly tâm và định lượng hoạt tính nattokinase theo phương pháp so màu (Wang et al., 2009). Một đơn vị hoạt độ Nattokinase (FU - fibrinolytic unit) được định nghĩa là sự gia tăng 0,01 độ hấp thụ trong một phút của dung dịch phản ứng. (Japan Bio Science Laboratory Co., Ltd). 0,4 ml enzyme được cho phản ứng với 1ml dung dịch fibrin 2,62 g/L pha trong 2,6ml Tris – HCl 1M, để ở 15 phút ở 370C sau đó thêm 2ml dd TCA 0,11M, ly tâm 10 phút ở 10.000 vòng/phút, rồi đo mẫu ở bước sóng 275nm (AT). Mẫu trắng được thực hiện bằng cách cho 2ml TCA 0,11 M vào cùng dung dịch cơ chất, ủ ở 370C trong 15 phút, sau đó thêm 0,4 ml enzyme, ly tâm ở 10000 vòng/phút, 10 phút và đo ở bước sóng 275 nm (AB).

$$\text{Hoạt tính nattokinase (FU/ml)} = \frac{A_T - A_B}{0} \cdot 0,01 \times \frac{1}{15} \times \frac{1}{0,4} \times D$$

Thời gian lên men: Cấy giống vào 50ml môi trường có thành phần cao thịt 5 g/l, peptone đậu nành 10 g/l, NaCl 5 g/l. Sau đó tiến hành nuôi trên máy lắc 370C, tốc độ lắc 150 vòng/phút trong 12, 24, 36, 48h và thu dịch lên men. Dựa vào hoạt tính nattokinase (FU/ml) của dịch canh trường sau lên men để xác định thời gian nuôi cấy tốt nhất.

Nguồn nitrogen: Cấy giống vào 50ml môi trường MPA lỏng (thành phần gồm..) có bổ sung 3 nguồn nitơ gồm cao nấm men, urea, (NH₄)₂SO₄ với các nồng độ 5 g/l, 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l, điều kiện nuôi cấy tương tự như trên. Dựa vào hoạt tính nattokinase (FU/ml) của dịch canh trường sau lên men để lựa chọn nguồn nito với nồng độ tốt nhất.

Nguồn carbon: Cấy giống vào 50ml môi trường MPA lỏng có bổ sung glucose, maltose và sucrose nồng độ 5g/l, 10g/l, 15g/l, 20g/l, điều kiện nuôi cấy tương tự như trên. Dựa vào hoạt

tính nattokinase (FU/ml) của dịch canh trường sau lên men để lựa chọn nguồn carbon nồng độ tốt nhất.

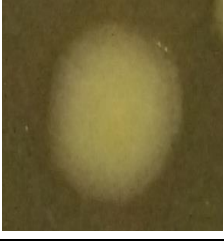
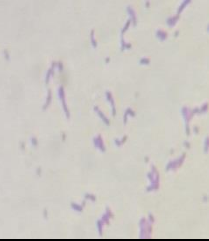
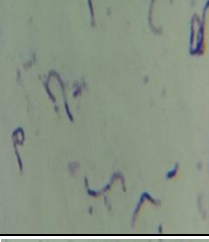
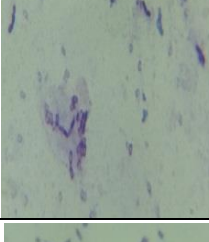
Phương pháp xử lý số liệu: Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, các số liệu được đánh giá sai số chuẩn bằng chương trình STATGRAPHICS Centurion XV.I xử lý 1 nhân tố ANOVA.

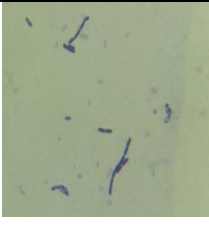
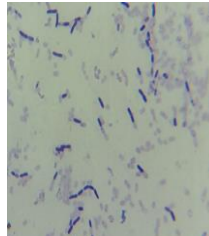
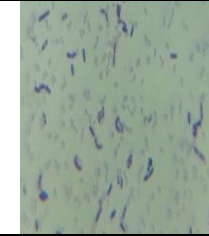
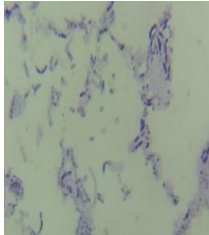
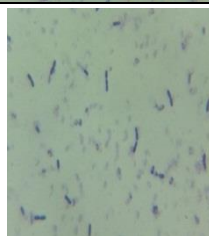
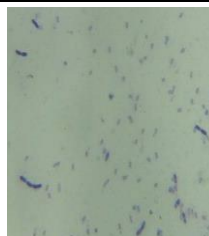
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp nattokinase

Từ thực phẩm Natto đã phân lập được 12 chủng nghi ngờ là *Bacillus* sp, mô tả ở bảng 1.

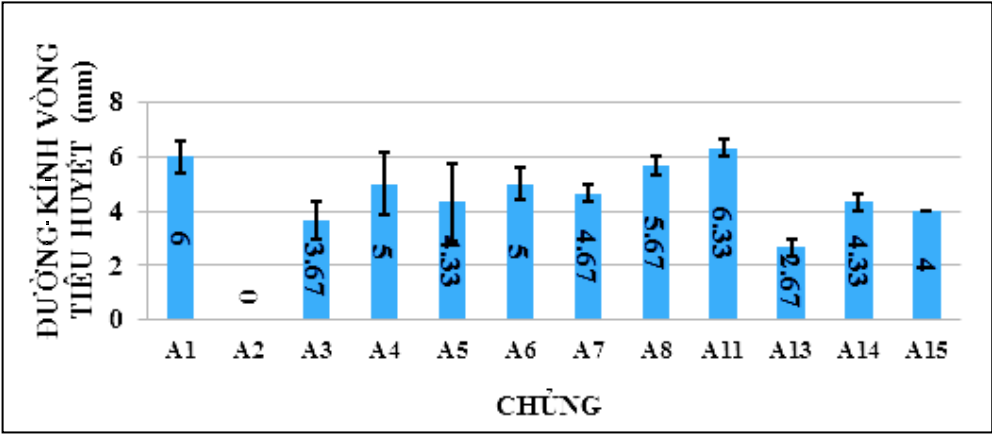
Bảng 1. Các chủng vi khuẩn phân lập từ thực phẩm Natto

Tên chủng	Hình thái đại thể và vi thể	Mô tả khuẩn lạc	Khả năng tiêu huyết	Hình thái tế bào	Gram
A1	 	Khuẩn lạc khô, nhám, màu trắng sữa, có lớp màng mịn lan ra bề mặt thạch, làm đổi màu môi trường	+	Que	+
A2	 	Khuẩn lạc màu vàng, trơn nhẵn, nhầy	-	Que	+
A3	 	Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nếp nhăn, lõi lõm, tâm không nhẵn, bám chặt vào môi trường thạch	+	Que	+
A4	 	Khuẩn lạc màu trắng sữa, viền nhẵn lớn, bề mặt lõi lõm, tâm không nhẵn, có lớp màng trong lan ra bề mặt thạch	+	Que	+
A5	 	Khuẩn lạc màu trắng sữa, nhầy, bám chặt vào môi trường thạch, làm đổi màu môi trường	+	Que	+

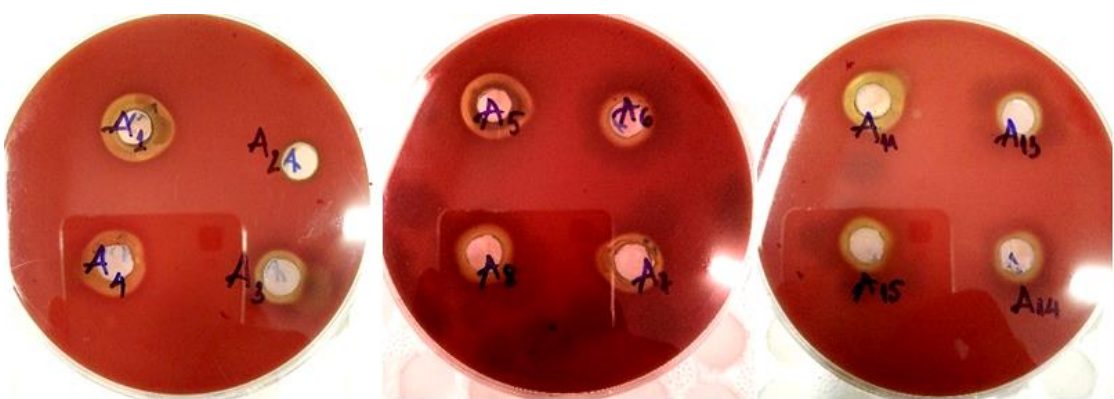
A6			Khuẩn lạc màu trắng sữa, lõi ở tâm, mép răng cưa, bám chặt vào môi trường thạch	+	Que	+
A7			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nếp nhăn lớn, bám chặt vào môi trường thạch	+	Que	+
A8			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nhiều nếp nhăn nhỏ, tâm nhẵn lớn, bám chặt vào môi trường thạch	+	Que	+
A11			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nhiều nếp nhăn dạng bông xù, tâm được bao bởi nếp nhăn lớn, nhầy, bám chặt vào môi trường thạch	+	Que	+
A13			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nếp nhăn, có lớp màng mịn lan ra bề mặt thạch	+	Que	+
A14			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nếp nhăn, nhăn nhiều ở viền, tâm không nhăn, mép răng cưa	+	Que	+
A15			Khuẩn lạc màu trắng sữa, bề mặt có nếp nhăn	+	Que	+

Các chủng phân lập được có màu trắng đục đến vàng nhạt, bề mặt của khuẩn lạc trơn hoặc có nếp nhăn với các hình dạng khác nhau. Kết quả thử nghiệm sinh hóa trên 12 chủng cho thấy chỉ có chủng A2 là không có khả năng tiêu huyết, đây là đặc tính quan trọng giúp chọn lọc chủng có hoạt tính nattokinase.

Thực hiện sàng lọc vi khuẩn có hoạt tính trên môi trường thạch máu cho thấy có 11/12 chủng tạo vòng phân giải (biểu đồ 1) trong đó 3 chủng A1, A8 và A11 cho vòng phân giải mạnh nhất được chọn để thực hiện sàng lọc thứ cấp. Khi khảo sát định lượng hoạt tính nattokinase tạo ra trong môi trường nuôi cấy 3 chủng A1, A8 và A11 chúng tôi nhận thấy hoạt tính của chủng A11 là cao nhất (bảng 2)



Biểu đồ 1. Đường kính vòng tiêu huyết của 12 chủng vi khuẩn trên môi trường thạch máu



Hình 1. Khả năng tiêu huyết của 12 chủng vi khuẩn trên môi trường thạch máu

Bảng 2. Hoạt tính nattokinase của chủng A1, A8, A11

Chủng	Hoạt tính natokinase (FU/ml)
A1	1,2 ± 0,31 ^a
A8	3,13 ± 0,24 ^b
A11	5,17 ± 0,24 ^c

Định danh chủng A11 theo phương pháp giải trình tự gen 16S – rRNA và tra cứu trên ngân hàng gen BLAST SEARCH, kết luận chủng A11 là *Bacillus subtilis*, chúng tôi sử dụng chủng này cho các khảo sát điều kiện và môi trường nuôi cấy.

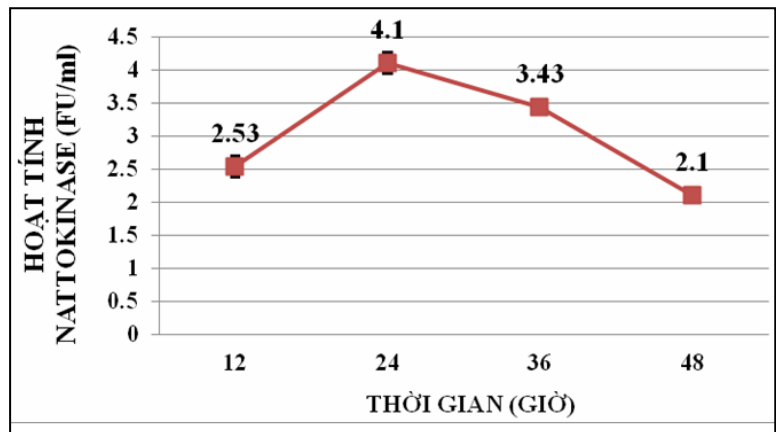
3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng thời gian và môi trường lên men

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy

Kết quả khảo sát cho thấy hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng B.subtilis A11 thể hiện cao nhất là 4,1 FU/ml với thời gian lên men là 24h.

Bảng 3: Hoạt tính nattokinase của chủng A11 tạo ra trong canh trường theo thời gian lên men

Thời gian (h)	Hoạt tính nattokinase (FU/ml)
12	2,53 $\pm$ 0,15 ^b
24	4,1 $\pm$ 0,15 ^d
36	3,43 $\pm$ 0,09 ^c
48	2,1 $\pm$ 0,06 ^a



Biểu đồ 2: Hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng B.subtilis A11 theo thời gian lên men

Ở 12 giờ chưa đủ thời gian để vi sinh vật phát triển nên hoạt tính enzyme chưa cao. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy ở 36 và 48 giờ thì hoạt tính enzyme giảm mạnh vì thành phần môi trường thay đổi mật độ vi sinh vật giảm làm giảm lượng enzyme được sản xuất, ngoài ra do cạn kiệt cơ chất nên vi sinh vật có thể đã chuyển hóa những sản phẩm tạo ra trước đó (trong đó có nattokinase) khiến cho hàm lượng các chất này giảm.

Kết quả phù hợp với nghiên cứu của Rasagnya et al.,(2013) cho rằng chủng Bacillus subtilis khi lên men dịch thể cho hoạt tính enzyme nattokinase cao nhất sau 24 giờ.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Môi trường cơ bản MPA đã chứa nguồn đạm đậu nành, khảo sát các nguồn bổ sung N có bản chất vô cơ và hữu cơ cho kết quả cao nấm men nồng độ 20 g/l cho hoạt tính enzyme nattokinase tốt nhất (5,5 FU/ml).

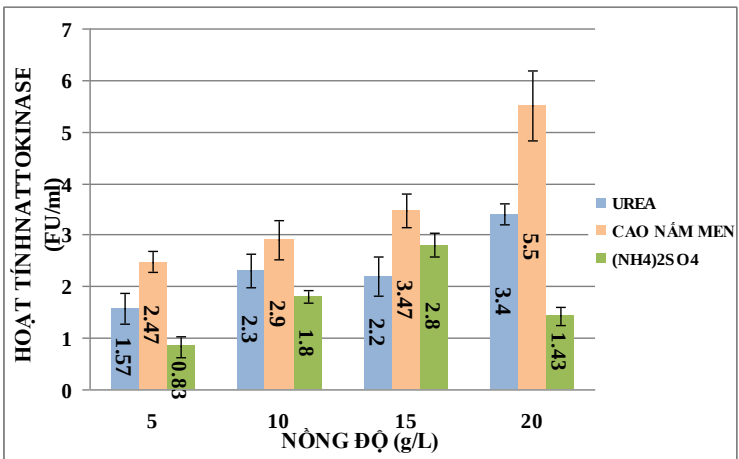
Bảng 4: Hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng B.subtilis A11 theo các nguồn nitơ ở các nồng độ khác nhau.

Nồng độ (g/l)	Urea	Cao nấm men	(NH ₄) ₂ SO ₄
5	1,57 $\pm$ 0,29 ^a	2,47 $\pm$ 0,203 ^a	0,83 $\pm$ 0,203 ^a
10	2,3 $\pm$ 0,32 ^a	2,9 $\pm$ 0,38 ^a	1,8 $\pm$ 0,12 ^b
15	2,2 $\pm$ 0,38 ^a	3,47 $\pm$ 0,32 ^a	2,8 $\pm$ 0,23 ^c
20	3,4 $\pm$ 0,21 ^b	5,5 $\pm$ 0,68 ^b	1,43 $\pm$ 0,17 ^{ab}

Với nguồn N hữu cơ là cao nấm men có chứa nhiều các protein, các acid amin, các vitamin đặc biệt là vitamin nhóm B và các chất khoáng từ nấm men, sẽ rất dễ dàng cho các vi khuẩn dị dưỡng hoá năng như Bacillus subtilis sử dụng để tổng hợp thành phần protein của tế bào. Trong khi đó, các nguồn nitơ vô cơ như urea, (NH₄)₂SO₄ cho thấy sự không thích hợp cho quá trình lên men của Bacillus subtilis vì trước hết khi sử dụng các hợp chất này vi khuẩn sẽ tốn nhiên liệu và năng lượng hơn để tổng hợp nên các thành phần có bản chất là protein. Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy, các muối amon như (NH₄)₂SO₄ sau khi đồng hóa gốc

NH_4^+ trong môi trường sẽ tích lũy các anion vô cơ (SO_4^{2-}) làm giảm pH môi trường. Do đó, vi khuẩn không thể sinh trưởng và phát triển tốt. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wang et al., (2009).

Biểu đồ 3: Hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng *B.subtilis* A11 theo các nguồn nitơ với nồng độ khác nhau.

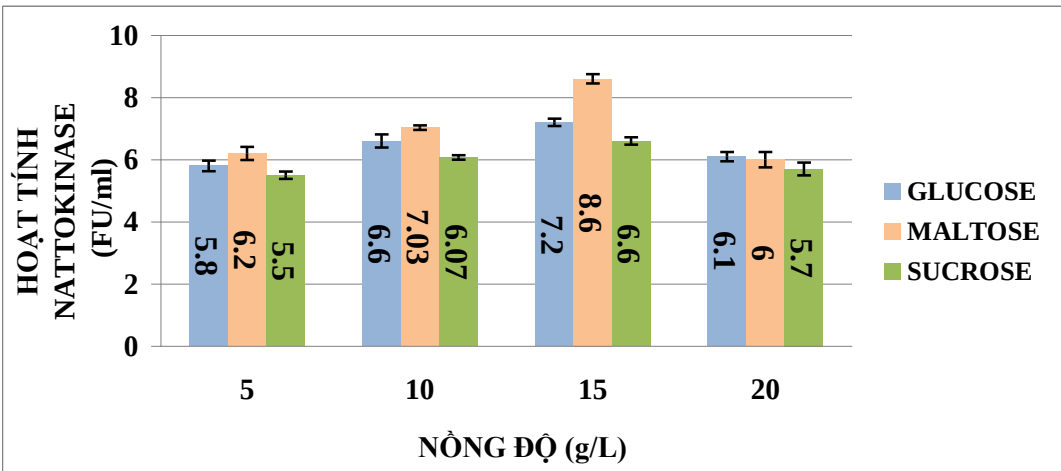


Ảnh hưởng của nguồn carbon

Bảng 5: Hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng *B.subtilis* A11 theo các nguồn carbon ở các nồng độ khác nhau.

Nồng độ (g/l)	Glucose	Maltose	Sucrose
5	5,8 $\pm$ 0,17 ^a	6,2 $\pm$ 0,21 ^a	5,5 $\pm$ 0,12 ^a
10	6,6 $\pm$ 0,21 ^b	7,03 $\pm$ 0,07 ^b	6,07 $\pm$ 0,07 ^b
15	7,2 $\pm$ 0,12 ^c	8,6 $\pm$ 0,15 ^c	6,6 $\pm$ 0,12 ^c
20	6,1 $\pm$ 0,15 ^{ab}	6,0 $\pm$ 0,25 ^a	5,7 $\pm$ 0,21 ^{ab}

Biểu đồ 4: Biểu đồ thể hiện hoạt tính nattokinase (FU/ml) của chủng *B.subtilis* A11 theo các nguồn carbon với nồng độ khác nhau



Tùy từng loại đường mà vi sinh vật có những khả năng sử dụng khác nhau: sucrose là một loại đường đôi nên vi sinh vật phải sử dụng năng lượng để phân cắt thành glucose và fructose làm tiêu tốn một phần năng lượng nên kết quả sinh tổng hợp enzyme không được cao; glucose là đường đơn dễ hấp thu cho nên được sử dụng làm nguồn carbon cho phần lớn vi sinh

vật; maltose cũng là đường đôi nhưng vì *Bacillus subtilis* có hệ thống chuyển phospho không cần phosphoenolpyruvate (the phosphoenolpyruvate (PEP) – dependent phosphotransferase system – PST) hoạt động thông qua 1 loại enzyme đặc hiệu (enzyme IICB) có khả năng cảm ứng và chuyển hoá maltose (Stefan Schonert et al., 2006) đã giúp cho maltose trở thành nguồn carbon thích hợp đối với *Bacillus subtilis*. Kết quả nghiên cứu cho thấy nguồn đường maltose 15 g/l cho hoạt tính nattokinase cao nhất (8,6 UI/ml), khi tăng nồng độ đường maltose lên 20 g/l thì hoạt tính enzyme thu được giảm vì nồng độ đường quá cao sẽ tạo áp suất thẩm thấu trong môi trường gây bất lợi cho quá trình sinh tổng hợp của vi sinh vật. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Liu et al., (2005), Wang Jau-Kai, (2009), Cong Wang et al., (2009).

4. Kết luận

Từ nguồn thực phẩm đậu nành lên men là natto thương phẩm, nhóm đã phân lập được 12 chủng vi sinh vật, trong đó có 11 chủng có hoạt tính làm tiêu huyết khối. Qua các thí nghiệm định lượng, lựa chọn được chủng A11 có hoạt tính nattokinase cao nhất, được định danh là chủng *Bacillus subtilis* A11 và tiếp tục sử dụng chủng này để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men thu nhận enzyme nattokinase như thời gian lên men, nguồn nito, nguồn carbon, pH. Các thí nghiệm khảo sát điều kiện lên men vi khuẩn thu enzyme nattokinase cho kết quả hoạt tính enzyme cao nhất với các nguồn dinh dưỡng lần lượt là nguồn nito: cao nấm men (20 g/l), nguồn carbon: maltose (15 g/l) trong điều kiện pH môi trường là 7.5 và nuôi cấy trong 24h. Sau khi chọn các điều kiện cũng như thành phần môi trường tốt nhất thu được hoạt độ enzyme nattokinase (10,6 FU/ml) cao hơn môi trường cơ bản ban đầu (5,17 FU/ml) là 2,05 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bai Z., Xu M., Han S., Liu K. (2004), *Purification and characterization of nattokinase*, Journal of Northeast Agriculture University, 35, 667–673.
- [2] Cong Wang, Ming Du, Dongmei Zheng, Fandong Kong, Guoren Zu, Yibing Feng (2009), *Purification and Characterization of Nattokinase from Bacillus subtilis Natto B-12*, Journal of Agriculture and Food Chemistry Article.
- [3] Liu Hui-Zhou, Liu Junguo, Xing Jianmin, Chang Tianshi (2005), *Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by Bacillus natto NLSSE using statistical experimental methods*, Process Biochemistry, p. 2757-2762.
- [4] Rasagnya P.Siva, Vangalapati Meena (2013), *Studies on Optimization of Process Parameters for Nattokinase Production by Bacillus subtilis NCIM 2724 and Purification by Liquid-Liquid Extraction*, International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology.
- [5] Stefan Schonert, Sabine Seitz, Holger Krafft, Eva-Anne Feuerbaum, Iris Andernach, Gabriele Witz, and Michael K. Dahl (2006), *Maltose and Maltodextrin Utilization by Bacillus subtilis*, Journal of bacteriology.
- [6] UK Standards for Microbiology Investigations (2015), *Identification of Bacillus species*, The Standards Unit, Microbiology Services, PHE.
- [7] Wang Jau-Kai, Chiu Hua-Hsien, Hsieh Ching-Shieh (2009), *Optimization of the Medium Components by Statistical Experimental Methods to Enhance Nattokinase Activity*, Technology Development Center of Molecular Diagnosis and Fermentation Engineering, Fooyin University, Kaohsiung, Taiwan.