

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus subtilis* CÓ KHẢ NĂNG PHÂN GIẢI FIBRIN TRONG SẢN PHẨM ĐẬU NÀNH LÊN MEN

Lý Huỳnh Liên Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Huỳnh Kim Ngân<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>2</sup>, \*

### TÓM TẮT

Sự phân giải fibrin trong sản phẩm lên men từ đậu nành của các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được đánh giá thông qua kết quả đánh giá hoạt tính enzyme nattokinase do vi khuẩn sinh tổng hợp trong quá trình lên men và khả năng tạo vòng phân giải trên đĩa fibrin. Có 19 chủng vi khuẩn được phân lập từ các sản phẩm lên men truyền thống từ đậu nành mang đặc điểm của vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, trong đó có 8 chủng mang đặc điểm sinh hóa gần với *Bacillus subtilis* được thử nghiệm khả năng phân giải fibrin để đánh giá khả năng sinh enzyme nattokinase của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn TO46 phân lập từ cháo Phước Hòa có khả năng phân giải fibrin cao nhất, với hoạt tính phân giải 42,26 FU/mL. Định danh chủng vi khuẩn này bằng phương pháp giải trình tự gene cho kết quả tương đồng 99,5% với chủng *Bacillus subtilis* mã số MK855415.1.

**Từ khóa:** *Bacillus sp.*, fibrin, huyết khối, nattokinase, phân giải fibrin.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Huyết khối bệnh lý do cục máu đông hình thành từ sợi fibrin gây tắc nghẽn mạch máu là một trong những nguyên nhân chủ yếu gây nên nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ. Bệnh có tỷ lệ tử vong cao và để lại cho người bệnh những di chứng nặng nề [1]. Thực phẩm natto lên men từ đậu nành với vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* đã được sử dụng từ rất lâu ở Nhật Bản để ngăn ngừa và hỗ trợ điều trị huyết khối bệnh lý. Theo Dubey (2011) [2] và Sumi (1995) [3], tác dụng này có được nhờ vào khả năng phân giải fibrin làm tan huyết khối của enzyme nattokinase.

Theo Pais (2006) [4] và Suwanmanon (2014) [5], hoạt tính sinh học phổ biến của nattokinase là khả năng phân giải fibrin - một protein tham gia vào quá trình đông máu. Nghiên cứu của Sumi (1987) [6] cho thấy, nattokinase tăng cường khả năng tự nhiên của con người trong việc chống lại huyết khối và an toàn hơn thuốc làm loãng máu vì có tác dụng kéo dài mà không có tác dụng phụ.

Việc tiêm tĩnh mạch urokinase và streptokinase đã được sử dụng rộng rãi trong điều trị tiêu huyết khối, nhưng Sumi (1987) [6] cho rằng, các enzyme này có độ đặc hiệu thấp đối với fibrin. Lakshmaiah (2016) [7] cho rằng, nattokinase đã được phát triển để điều trị huyết khối vì hiệu quả và ái lực mạnh hơn với fibrin, tương tự như việc uống NAT của subtilisin có tác dụng tăng cường hoạt tính phân giải fibrin trong huyết tương. Ngoài các cơ chế phân giải huyết khối của nattokinase được Sumi (1987) [6] nghiên cứu không chỉ có hoạt tính kích hoạt plasminogen và phân cắt chất hoạt hóa plasminogen-1 thành các mảnh có khối lượng phân tử thấp, Singh (2018) [8] đã ghi nhận nattokinase còn có thể phân giải trực tiếp fibrin.

Vì những lợi ích đối với sức khỏe con người, nhiều nghiên cứu về nattokinase ở Việt Nam đã được báo cáo trong thời gian gần đây. Lê Thị Bích Phượng (2012) [9] chọn lọc được hai chủng *Bacillus* 7.2 và *Bacillus* NP3 có khả năng sinh tổng hợp mạnh enzyme nattokinase làm tan huyết khối, Tuan (2015) [10] tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* thu nhận nattokinase tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt, Ngô Thị Tường Châu (2007) [11] tối ưu

<sup>1</sup> Khoa Y, Trường Đại học Nam Cần Thơ

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Email: nvthanh@ctu.edu.vn

hóa thành phần môi trường lên men cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp, Đỗ Thị Hoàng Tuyền (2017) [12] 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. Nguyễn Thị Diệu Thu và cs (2020) [13] đã so sánh các phương pháp đánh giá hoạt tính của enzyme nattokinase, bao gồm phương pháp tiêu sợi huyết, phương pháp huyết thanh học, phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử và đã tối ưu hoá phương pháp quang phổ hấp thụ phân tử xác định hoạt độ enzyme nattokinase trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

Mặc dù trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh enzyme nattokinase phân giải fibrin, nhưng việc tìm kiếm các chủng vi khuẩn bản địa của Việt Nam sinh enzyme vẫn là việc làm cần thiết, nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu khởi động cho sản xuất enzyme nattokinase. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính phân giải fibrin cao được phân lập và tuyển chọn thông qua việc đánh giá vòng phân giải trên đĩa fibrin và định lượng hoạt tính phân giải fibrin của enzyme nattokinase. Từ đó chọn ra chủng vi khuẩn tiềm năng, tạo tiền đề cho việc nghiên cứu các chế phẩm sinh học đóng vai trò hỗ trợ phân giải fibrin trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh lý huyết khối.

## **2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu nghiên cứu**

- Vi khuẩn *Bacillus* sp. được phân lập từ các sản phẩm đậu nành lên men thu nhận từ tháng 3 đến tháng 4/2020 ở các tỉnh/thành phố: An Giang, Cần Thơ, Sóc Trăng và Vĩnh Long, bao gồm: 3 mẫu tương hạt, 2 mẫu tương xay thương phẩm, 3 mẫu chao thương phẩm, 2 mẫu nước mắm chay trong quá trình lên men, 4 mẫu tương trong quá trình lên men, 1 mẫu chao trong quá trình lên men, 1 mẫu đậu nành ngâm để qua đêm và 1 mẫu nước chua tàu hũ để qua đêm.

- Vi khuẩn đối chứng là *Bacillus subtilis* ATCC 15245.

### **2.2. Hóa chất và môi trường**

- Môi trường TSA dùng trong phân lập vi khuẩn *Bacillus* sp. chứa tryptone 1,5%, soya peptone 0,5%, NaCl 0,5% và agar 1,5%.

- Môi trường LB lỏng chứa tryptone 1%, yeast extract 0,5% NaCl 1%, 0,5% casein dùng trong nuôi cấy thu enzyme ngoại bào [10].

- Môi trường huyết thanh thỏ chứa 50% glycerol dùng để bảo quản vi khuẩn.

- Hóa chất phân tích hoạt tính enzyme gồm fibrinogen (Sigma, F8630) và thrombin (Sigma, T6634).

### **2.3. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. trong sản phẩm lên men**

Mẫu vi khuẩn được phân lập bằng phương pháp pha loãng đến  $10^{-8}$  và trải trên môi trường TSA (Sigma, 14432). Nuôi vi khuẩn ở nhiệt độ 35°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc mục tiêu được làm thuần và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở 4°C. Theo Dworkin (2006) [14], các chủng *Bacillus* sp. mục tiêu được xác định sơ bộ dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa và được so sánh với đặc điểm của vi khuẩn *Bacillus* sp. được mô tả trong khóa phân loại của Bergey được biên soạn bởi Vos và cs (2011) [14].

### **2.4. Đánh giá định tính khả năng phân giải fibrin**

Khả năng phân giải fibrin của vi khuẩn *Bacillus* sp. được đánh giá dựa trên khả năng tạo vòng phân giải trên đĩa thạch thrombin-fibrinogen (đĩa fibrin) của enzyme nattokinase sinh ra trong quá trình sinh tổng hợp của vi khuẩn [5].

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. sau khi được làm thuần sẽ được cấy truyền để lưu giữ giống và được bảo quản trong môi trường huyết thanh thỏ chứa 50% glycerol để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB lỏng ở 37°C trong 48 giờ, sau đó dịch enzyme ngoại bào được thu hồi bằng phương pháp ly tâm và bảo quản lạnh ở nhiệt độ 4-8°C.

Enzyme nattokinase được định tính theo phương pháp khuếch tán trên lỗ thạch. Đục lỗ

thạch chứa hỗn hợp 5 ml dung dịch 0,96% (w/v) fibrinogen, 5 ml dung dịch 2,35% (w/v) agarose và 0,1 mL dung dịch thrombin (20 UI/ml). Mỗi lỗ được cho vào 20 µl dịch chiết enzyme ở độ pha loãng 100 lần, ủ ở 37°C trong 21 giờ. Hoạt tính làm tan fibrin của các dịch enzyme được so sánh bằng cách đo kích thước vòng phân giải xung quanh các lỗ thạch [5].

### 2.5. Đánh giá hoạt tính phân giải fibrin (hoạt tính enzyme nattokinase)

Khả năng phân giải fibrin được đánh giá theo quy trình do Hiệp hội Nattokinase Nhật Bản thiết lập [15].

Lấy 0,4 ml dung dịch fibrinogen 0,72% (w/v) và 1,4 mL đệm borate 0,05 mM ở pH 8,5 được trộn và ủ ở 37°C trong 5 phút. Sau đó, 0,1 mL (20 U/ml) thrombin được thêm vào và hỗn hợp được ủ thêm 10 phút ở 37°C. Cuối cùng, 0,1 mL mẫu được thêm vào và hỗn hợp cuối cùng này được ủ thêm 60 phút. Phản ứng dừng lại bằng cách thêm 0,2 mL axit tricloacetic 0,2 M. Sau khi ly tâm (ở 16.000 g trong 5 phút), độ hấp thụ của phần nổi ở bước sóng 275 nm được đọc và ghi lại. Một đơn vị (1 FU) được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết phân giải sợi fibrin (hình thành sau phản ứng giữa fibrinogen và thrombin) để tạo ra mức tăng độ hấp thụ của dịch thủy phân tại bước sóng 275 nm bằng 0,01 trong thời gian 1 phút dưới các điều kiện phản ứng [5].

### 2.6. Kỹ thuật giải trình tự định danh vi khuẩn có hoạt tính phân giải fibrin cao

Các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*, bao gồm vi khuẩn *B. subtilis* và các loài có quan hệ gần như *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* và *B. pumilus* được nhận biết dựa vào kết quả PCR khuếch đại đoạn gene 16S rRNA với cặp mồi Bsub5F (5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3') và Bsub3R (5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3') [16].

Chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính enzyme nattokinase cao nhất trong các dòng phân lập sẽ được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [17]. Cặp mồi Bsub5F và Bsub3R được thiết kế

trên vùng bảo tồn 16S rRNA của vi khuẩn với mục đích khuếch đại đoạn gene 16S rRNA có trình tự khoảng 600 bp. Hỗn hợp 25 µL/phản ứng PCR bao gồm: 2,5 µl Dream Taq buffer; 0,5 µl dNTP (40 mM); 0,5 µl F-Primer (Bsub5F); 0,5 µl R-Primer (Bsub3R); 0,25 µl Dream Taq; 1 µl DNA (20 ng/µl) và 19,75 µl nước cất 2 lần. Tiến hành PCR với các chu kỳ nhiệt: 94°C/4 phút, 35 chu kỳ (94°C/30 giây, 56°C/35 giây, 72°C/90 giây), 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8% [16]. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit Isolate II PCR và Gel Kit của hãng Bioline và tiến hành giải trình tự với cặp mồi Bsub5F và Bsub3R bằng phương pháp Sanger bởi Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Trình tự được xử lý và phân tích bằng phần mềm BioEdit và sử dụng công cụ BLAST để so sánh với các trình tự ADN trong ngân hàng gene NCBI.

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập và tuyển chọn *Bacillus* sp.

Từ các nguồn phân lập, có 19 chủng vi khuẩn có đặc điểm khuẩn lạc giống như các mô tả về hình thái của vi khuẩn *Bacillus* spp. Theo Lu (2010) [18] và Vlamakis (2013) [19], khuẩn lạc của vi khuẩn *Bacillus* spp. có hình tròn, sần sùi thô ráp, mép răng cưa, màu trắng sữa hoặc trắng mờ, đôi khi đục và ngả vàng, sau một thời gian nuôi cấy thì bề mặt trở nên lồi chồm đặc trưng. Kết quả quan sát vi thể cho thấy, các chủng vi khuẩn này bắt màu Gram dương, có dạng tế bào hình que, có thể hình thành bào tử, lúc tạo thành bào tử thì không bắt màu thuốc nhuộm.

Các chủng này mang đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *Bacillus* sp., phù hợp với nghiên cứu của Sumi và cs (1995) [3], Lu và cs (2018) [18], là trực khuẩn hiếu khí, có khả năng thủy phân tinh bột và casein, cho phản ứng Voges Proskauer dương tính, Methyl Red âm tính, sinh enzyme catalase, có thể sử dụng được citrate, lên men đường lactose và tồn tại trong điều kiện môi trường bổ sung NaCl 6,5%. 19 chủng *Bacillus* sp. đã phân lập được trình bày trong bảng 1 có sự khác biệt về khả năng lên men đường lactose trước 12 giờ nuôi cấy và khả năng sống sót ở nhiệt độ 55°C.

**Bảng 1. Đặc điểm sinh hóa khác biệt của các chủng vi khuẩn phân lập**

| TT | Vi khuẩn | Lên men Lactose trước 12 giờ | Sống sót ở 55°C |
|----|----------|------------------------------|-----------------|
| 1  | CO02     | -                            | +               |
| 2  | CO14     | -                            | -               |
| 3  | CO18     | -                            | -               |
| 4  | CO25     | +                            | -               |
| 5  | CO45     | -                            | +               |
| 6  | CO58     | -                            | -               |
| 7  | CO59     | +                            | -               |
| 8  | CO68     | -                            | -               |
| 9  | MO15     | +                            | -               |
| 10 | MO22     | +                            | -               |
| 11 | MO39     | -                            | -               |
| 12 | MO58     | -                            | -               |
| 13 | MO68     | -                            | -               |
| 14 | MO69     | +                            | -               |
| 15 | TO11     | -                            | +               |
| 16 | TO17     | -                            | +               |
| 17 | TO24     | +                            | -               |
| 18 | TO46     | -                            | -               |
| 19 | TO51     | +                            | -               |

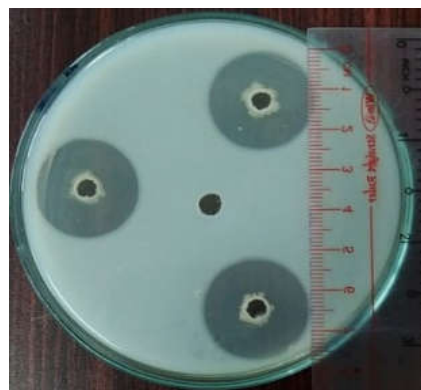
Theo khóa phân loại Bergey thì các chủng có đặc điểm nêu trên thuộc chi *Bacillus*. Có 3 loài *Bacillus* spp. có đặc điểm sinh hóa tương đối giống nhau là *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus licheniformis*. Tuy nhiên, có 4 dòng *Bacillus* sp. trong nghiên cứu này sống sót được ở nhiệt độ trên 55°C mang đặc điểm của *Bacillus licheniformis* phù hợp với nghiên cứu của Duc (2004) [20] và Dworkin (2006) [21]. Có 7 dòng *Bacillus* sp. mang đặc điểm của *Bacillus amyloliquefaciens*. Việc phân biệt *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* tương đối khó vì hầu như các đặc điểm sinh hóa giữa hai loài tương đương với nhau, tuy nhiên có một điểm khác biệt chính là thời gian lên men đường lactose của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* rất nhanh, trước 12 giờ nuôi cấy [22]. Do đó, có 8 dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. có đặc điểm sinh hóa gần giống với đặc điểm vi khuẩn *Bacillus subtilis* nhất, nên 8 dòng này được chọn để tiến hành đánh giá hoạt tính phân giải fibrin của enzyme nattokinase do vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh tổng hợp trong quá trình trao đổi chất.

### 3.2. Định tính khả năng phân giải fibrin của vi khuẩn

**Bảng 2. Đường kính vòng phân giải của vi khuẩn trên đĩa fibrin**

| TT | Chủng vi khuẩn | Đường kính vòng phân giải (cm)<br>(Bao gồm đường kính giếng 0,6 cm) |
|----|----------------|---------------------------------------------------------------------|
| 1  | CO14           | 0,87 <sup>c</sup> ± 0,02                                            |
| 2  | CO18           | 1,77 <sup>c</sup> ± 0,03                                            |
| 3  | CO58           | 0,73 <sup>g</sup> ± 0,05                                            |
| 4  | CO68           | 1,03 <sup>c</sup> ± 0,05                                            |
| 5  | MO39           | 1,40 <sup>d</sup> ± 0,08                                            |
| 6  | MO58           | 0,93 <sup>f</sup> ± 0,00                                            |
| 7  | MO68           | 0,90 <sup>f</sup> ± 0,03                                            |
| 8  | TO46           | 2,07 <sup>a</sup> ± 0,05                                            |
| 9  | ĐC-ATCC 15245  | 1,33 <sup>b</sup> ± 0,07                                            |

Ghi chú: Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Các số trung bình trong cột theo sau bởi chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. ĐC-ATCC 15245 là chủng vi khuẩn đối chứng *Bacillus subtilis natto* có mã số ATCC 15245.



**Hình 1. Vòng phân giải của chủng TO46 trên đĩa thạch thrombin-fibrinogen**

Sự hiện diện của enzyme nattokinase được biểu hiện thông qua quá trình ly giải fibrin của dịch trích enzyme ngoại bào của vi khuẩn đã phân lập. Khả năng ly giải fibrin được xác định thông qua khả năng tạo vòng phân giải trên đĩa fibrin, được thể hiện trong bảng 2. Kết quả cho thấy, chủng TO46 tạo vòng phân giải lớn nhất trên đĩa fibrin với đường kính 1,47 cm và khác biệt có ý

ngĩa thống kê trong khoảng tin cậy 95% so với các chủng được so sánh và cao hơn cả chủng vi khuẩn đối chứng *Bacillus subtilis natto* mã số 15245 của ATCC (Hình 1).

### 3.3. Hoạt tính phân giải fibrin của enzyme nattokinase thu nhận từ vi khuẩn

Ngoài chủng đối chứng (ĐC), có 3 chủng vi khuẩn phân lập được có đường kính vòng phân giải trên đĩa fibrin >0,5 cm, bao gồm CO18, MO39 và TO46 được phân lập lần lượt trên nước mắm chay trong quá trình lên men, nước chua tàu hũ và chao Phước Hòa. Đây là những chủng có tiềm năng trong việc thu nhận enzyme nattokinase. Do đó, các chủng này được xác định hoạt tính để đánh giá khả năng sinh enzyme nattokinase phân giải fibrin. Kết quả định lượng hoạt tính phân giải fibrin của enzyme nattokinase được trình bày trong bảng 3.

**Bảng 3. Hoạt tính phân giải fibrin của enzyme nattokinase ở các chủng phân lập**

| TT | Chủng vi khuẩn | Hoạt tính phân giải fibrin (FU/mL) |
|----|----------------|------------------------------------|
| 1  | CO18           | 34,92 <sup>c</sup> ± 1,06          |
| 2  | MO39           | 17,73 <sup>d</sup> ± 1,12          |
| 3  | TO46           | 42,26 <sup>a</sup> ± 1,23          |
| 4  | ĐC             | 36,19 <sup>b</sup> ± 0,40          |

*Ghi chú: Số liệu là kết quả trung bình của 3 lần lặp lại. Các số trung bình trong cột theo sau bởi chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%. ĐC là chủng vi khuẩn đối chứng Bacillus subtilis natto ATCC 15245.*

Hoạt tính phân giải fibrin của 3 chủng vi khuẩn phân lập được là khá cao. Các giá trị hoạt tính phân giải fibrin (hoạt tính enzyme nattokinase) đều khác biệt có ý nghĩa thống kê trong khoảng tin cậy 95%. Trong đó, chủng TO46 có hoạt tính cao nhất là 42,26 FU/mL, cao hơn cả chủng đối chứng ATCC-15245 có hoạt tính 36,19 FU/mL. Mặc dù chủng CO18 được phân lập từ hỗn hợp đậu nành đang lên men nước mắm chay được 2 tháng có hoạt tính 34,92 FU/mL, thấp hơn chủng đối chứng, tuy nhiên hoạt tính phân giải fibrin của chủng này vẫn khá cao so với hoạt tính phân giải fibrin của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* sau khi

được tối ưu hóa trong nghiên cứu tối ưu hóa môi trường lên men thu nhận nattokinase là 27,58 FU/mL của Nguyễn Thị Minh Nguyệt (2017) [23]. Kết quả định lượng hoạt tính phân giải fibrin cũng cho thấy, cùng là mẫu enzyme thô, nhưng hoạt tính của TO46 và CO18 cao hơn cả hoạt tính enzyme nattokinase trước khi tinh sạch của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* DB104 là chủng tái tổ hợp trong nghiên cứu về sự tinh sạch và đặc điểm của nattokinase tái tổ hợp từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* là 18,16 FU/mL của Tuan (2015) [10]. Kết quả này cũng cao hơn hoạt độ enzyme nattokinase của dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* B060 phân lập từ rom rạ trước khi tối ưu hóa trong nghiên cứu phân lập và tối ưu hóa môi trường lên men GABA và nattokinase của Suwanmanon (2014) [5].

### 3.4. Kết quả định danh vi khuẩn *Bacillus* sp.

Chủng vi khuẩn TO46 là chủng có hoạt tính phân giải fibrin cao nhất và chủng này cũng mang nhiều đặc điểm sinh hóa gần với mô tả về *Bacillus subtilis*. Tuy nhiên, để định danh chính xác đến cấp độ loài của chủng này thì cần giải trình tự vùng 16S rRNA.

PCR khuếch đại vùng 16 S rRNA bằng cặp mồi Bsub5F và Bsub3R có thể khuếch đại một đoạn trình tự dài khoảng 600 bp trên vùng 16 S rRNA. Đây là vùng có tính chuyên biệt cao để định danh vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Dòng vi khuẩn TO46 được phân lập có kích thước 602 bp. Giải trình tự gene vùng 16S rRNA của chủng vi khuẩn TO46 với cặp mồi Bsub5F và Bsub3R và so sánh trình tự này với các trình tự 16S rRNA của vi khuẩn trong cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLAST cho kết quả giải trình tự gene của chủng phân lập có độ phủ 100% và độ tương đồng lên đến 99,5% so với trình tự vùng 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis* mã số MK855415.1 và tương đồng với trình tự của nhiều chủng vi khuẩn thuộc loài *Bacillus subtilis* có trên cơ sở dữ liệu (bảng 4). Trình tự vi khuẩn cho thấy, vi khuẩn thuộc nhánh thứ 2 trên cây phát sinh loài *Bacillus*, thuộc nhóm *Bacillus subtilis*. Như vậy, kết hợp với đặc điểm hình thái, sinh hóa và trình tự nucleotide của đoạn gene 16S rRNA, chủng TO46 đã được xác định là *Bacillus subtilis*.

**Bảng 4. So sánh độ tương đồng của chủng phân lập TO46 với cơ sở dữ liệu NCBI**

| Tên chủng vi khuẩn                                                                 | Tên khoa học             | Kích thước trình tự 16S rRNA | Độ phủ | Độ tương đồng | Mã số trình tự |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------|--------|---------------|----------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> strain KUBOTAB15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <i>Bacillus subtilis</i> | 1550 bp                      | 100%   | 99,5%         | MK855415.1     |
| <i>Bacillus subtilis</i> strain NTB-107 16S ribosomal RNA gene, partial sequence   | <i>Bacillus subtilis</i> | 1512 bp                      | 100%   | 99,5%         | MN888748.1     |



**Hình 2. Tế bào vi khuẩn *Bacillus subtilis* TO46 nhuộm với Carbon fuchsin**

*Ghi chú: Hình ảnh tế bào vi khuẩn dưới kính hiển vi quang học (E100). Tế bào chất bắt màu đỏ hồng khi vi khuẩn không tạo bào tử; khi vi khuẩn có bào tử, tế bào chất không bắt màu, bào tử bắt màu đỏ hồng*

#### **4. KẾT LUẬN**

Có 19 chủng vi khuẩn đặc trưng cho chi *Bacillus* được phân lập từ nguồn đậu nành trong các sản phẩm lên men truyền thống, trong đó có 8 chủng vi khuẩn có đặc điểm hình thái và sinh hóa gần với *Bacillus subtilis*. Chủng TO46 là chủng vi khuẩn có tiềm năng nhất trong các chủng đã phân lập bởi khả năng tạo vòng phân giải trên đĩa fibrin đến 1,47 cm và khả năng sinh enzyme nattokinase phân giải fibrin lên đến 42,26 FU/mL, cao nhất trong các chủng phân lập và cao hơn cả chủng đối chứng *Bacillus subtilis* natto ATCC 15245. Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA cho thấy, chủng TO46 có độ tương đồng 99,5% với chủng *Bacillus subtilis* mã số MK855415.1 có thông tin trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI.

Với khả năng sinh enzyme nattokinase có hoạt tính phân giải fibrin cao, chủng *Bacillus subtilis* TO46 có tiềm năng lớn trong việc ứng dụng vi

khuẩn *Bacillus subtilis* để lên men thu nhận enzyme nattokinase. Đây là tiền đề cho những nghiên cứu về tối ưu hóa, tinh sạch enzyme nattokinase, sản xuất chế phẩm sinh học giúp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị huyết khối bệnh lý.

#### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Chen, C., Duan, H., Gao, C., Liu, M., Wei, Y., Zhang, X., & Liu, Z. (2014). Non-covalent modification of thrombolytic agent nattokinase: simultaneous improvement of fibrinolysis activity and enzymatic stability. *RSC Advances*, 4(52), 27422-27429.
2. Dubey, R., Kumar, J., Agrawala, D., Char, T., & Pusp, P. (2011). Isolation, production, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (Nattokinase, Streptokinase and Urokinase) from bacterial sources. *African Journal of Biotechnology*, 10(8), 1408-1420.

3. Sumi, H., Nakajima, N., & Yatagai, C. (1995). A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack “Shiokara” a Japanese traditional fermented food. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(3), 543-547.
4. Pais, E., Alexy, T., Holsworth Jr, R. E., & Meiselman, H. J. (2006). Effects of nattokinase, a pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 35(1-2), 139-142.
5. Suwanmanon, K., & Hsieh, P. C. (2014). Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production. *CyTA-Journal of Food*, 12(3), 282-290.
6. Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., & Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 43(10), 1110-1111.
7. Lakshmaiah P., Rao D. S. and Spandana U. (2016). Purification and characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* from coconut field soils. *International Journal of Research and Scientific Innovation*, 3(7), 2321-05.
8. Singh, P., Negi, R., Sharma, V., Rani, A., Pallavi, & Prasad, R. (2018). Production of fibrinolytic enzyme (nattokinase) from *Bacillus* sp. *Indo American journal of pharmaceutical sciences*, 5(1), 379-383.
9. Lê Thị Bích Phượng, Võ Thị Hạnh, Trần Thanh Phong, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân, Lê Thị Hương (2012). Phân lập và tuyển chọn một số chủng *Bacillus* sinh tổng hợp nattokinase. *Tạp chí Sinh học*, 34, (3se). Tr 99 – 104.
10. Tuan, T. Q., Hiep, D. M. & Dong, T. C. (2015). Purification and characterization of recombinant nattokinase from *Bacillus subtilis*. *Academia Journal of Biology*, 37(1se), 75-84.
11. Ngô Thị Tường Châu, Hoàng Thị Bích Vân, Nguyễn Hoàng Tâm, Lê Văn Thiện, Hồ Tuyên, Nguyễn Đăng Khôi (2007). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Các Khoa học Trái đất và Môi trường*. Tập 33, Số 1S (2017) 129-135.
12. Đỗ Thị Hoàng Tuyền, Lê Thị Bích Phượng, Lê Trần Nhật Anh, Nguyễn Thị Mỹ Trang (2017). 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. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Thủ Dầu Một*, số 4(35)-2017.
13. Thu, N. T. D., Dung, H. V., Ngọc, N. T. H., An, V. T. T., Khanh, C. C., & Son, T. H. (2020). Optimization of spectrophotometric method for determination Nattokinase activity in dietary supplements. *Vietnamese Journal of Food Control*, 3(2).
14. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A.... & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media.
15. Japan Nattokinase Association (2000). Degradation of artificial thrombus by nattokinase. [http://j-nattokinase.org/en/jnka\\_nattou\\_01.html](http://j-nattokinase.org/en/jnka_nattou_01.html) Retried May 18, 2022.
16. Trần Thùy Trang, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Nguyễn Tấn Đức, Phạm Nguyễn Đức Hoàng, Dương Hoa Xô (2020). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở thành phố Hồ Chí Minh. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh - Kỹ thuật và Công nghệ*, 15(1), 72-86.
17. Sambrook J. and Russell D. W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
18. Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. (2018). Isolation, identification, and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 16-0572.

19. Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157-168.
20. Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2161-2171.
21. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes, A handbook on the Biology of Bacteria, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer, New York.
22. Welker, N. E., & Campbell, L. L. (1967). Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 94(4), 1124-1130.
23. Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Trương Thị Minh Hạnh, Bùi Viết Cường (2017). Xây dựng và lựa chọn mô hình toán học tối ưu cho quá trình lên men natto bởi *Bacillus subtilis* natto để thu nhận enzyme nattokinase. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 66-70.

ISOLATION AND SELECTION OF THE FIBRINOLYTIC *Bacillus* sp.  
FROM FERMENTED SOY PRODUCTS

Ly Huynh Lien Huong<sup>1</sup>, Nguyen Huynh Kim Ngan<sup>1</sup>, Nguyen Van Thanh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical faculty, Nam Can Tho University

<sup>2</sup>Biotechnology and Food Institute, Can Tho University

Summary

The fibrinolysis of nattokinase enzyme from *Bacillus subtilis* bacteria that were isolated from fermented soy products was determined by clear zones forming on the fibrin plate and the nattokinase enzyme activity. 19 strains that were isolated from traditional fermented soy products, comprise characteristics of the *Bacillus* genus. The results of the biochemical test illustrated that 8 strains had characteristics of *Bacillus subtilis*. These strains were tested of fibrinolysis to determine fibrinolytic activity. The strain TO46 was isolated from “Phuoc Hoa fermented tofu” contained the highest fibrinolytic activity at 42,26 FU/mL. Identification of this strain TO46 by 16S rRNA sequencing showed a percentage of 99,5% similarity with *Bacillus subtilis* (accession MK855415.1).

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, fibrin, fibrinolytic, nattokinase, thrombosis.

**Người phản biện:** PGS.TS. Trần Thị Thuý

**Ngày nhận bài:** 16/01/2023

**Ngày thông qua phản biện:** 17/02/2023

**Ngày duyệt đăng:** 10/5/2023