

NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ CHỌN LỌC CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* NATTO CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME NATTOKINASE TỪ NATTO THƯƠNG PHẨM

RESEARCH ON PROCESS OF ISOLATING, IDENTIFYING AND SELECTING *BACILLUS SUBTILIS* NATTO BACTERIA THAT CAN SYNTHESIZE NATTOKINASE ENZYME FROM NATTO PRODUCTS

Trương Thị Minh Hạnh¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt², Văn Hà Vy³, Võ Việt Lai⁴

¹Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng; ttmhanh@dut.udn.vn; tminhhanh2001@yahoo.com

²Học viên cao học ngành Công nghệ Thực phẩm K29 Đại học Đà Nẵng; nguyetminhnguyen88@gmail.com

³Công ty trách nhiệm hữu hạn Viesky, Đà Nẵng; vahavy@gmail.com

⁴Trung tâm Kỹ thuật Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng 2, Đà Nẵng; vo.vietlai@gmail.com

Tóm tắt - Nattokinase là enzyme có khả năng làm tan huyết khối, được chiết từ natto, thực phẩm lên men truyền thống của Nhật Bản. Nghiên cứu đã chứng minh chủng vi sinh vật chính tìm thấy trong natto thương phẩm là *Bacillus subtilis natto*. Nghiên cứu đồng thời đã phân lập và định danh thành công 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* từ 2 sản phẩm natto thương phẩm có nguồn gốc Nhật Bản (N₁) và từ cửa hàng Nhật Bản tại Việt Nam (N₂). Nghiên cứu đã chứng minh được chủng N₂ có khả năng sinh tổng hợp enzyme protease hoạt lực cao hơn chủng N₁ bằng phương pháp chọn lọc trên thạch với cơ chất là caseine. Dịch chiết enzyme nattokinase thô thu nhận sau quá trình lên men natto bởi chủng N₂ có khả năng làm tan huyết khối rất mạnh (1g huyết khối tan gần như hoàn toàn sau 8 giờ sau khi dịch chiết enzyme thô được cho vào với tỉ lệ 1:3 (w/v)).

Từ khóa - Enzyme nattokinase; natto; *Bacillus subtilis natto*; phân lập; định danh; tuyển chọn; huyết khối.

Abstract - Nattokinase is one of enzymes that has ability to dissolve blood clots. It is extracted from natto which is traditionally fermented food of Japan. This study has shown that the major microorganism found in natto is *Bacillus subtilis natto*. The isolation and identification of *Bacillus subtilis natto* is successful with Japanese natto (N₁) and Vietnamese natto (N₂). *Bacillus subtilis natto* isolated from Vietnamese natto (N₂) can synthesize enzymes better than that from Japanese natto based on the selection result on agar media with casein as a substrate. The extracted crude Nattokinase enzyme from fermentation process with N₂ makes blood clots be rapidly converted into liquid phase (1g of blood clots is almost dissolved with the presence of crude Nattokinase enzyme of N₂ stain at 8h with ratio of blood clots to crude Nattokinase enzyme of 1:3 (w/v)).

Key words - Nattokinase enzyme; natto; *Bacillus subtilis natto*; isolation; identification; selection; blood clots.

1. Đặt vấn đề

Những năm gần đây, ở Việt Nam nói riêng cũng như trên thế giới nói chung, tỷ lệ người mắc các bệnh liên quan đến tim mạch ngày càng tăng cao. Ví dụ: nhồi máu cơ tim, nhồi máu não, đột quỵ... Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới, hàng năm có khoảng 17 triệu người chết do mắc phải các bệnh nói trên, nguyên nhân chính là tắc nghẽn động mạch do huyết khối [6].

Các loại thuốc làm tan huyết khối trên thị trường hiện nay như Urokinase, Streptokinase, Ataphylokinase và Alteplase... chỉ có tác dụng lên những nơi đã hình thành huyết khối, thời gian tác dụng ngắn và có thể gây phản ứng phụ. Hơn nữa, những bệnh do huyết khối rất khó nhận biết bằng phương pháp thông thường dẫn đến nguy cơ tử vong cao [9, 10]. Vì vậy, việc tìm ra loại thuốc vừa có khả năng ngăn ngừa sự hình thành, vừa làm tan huyết khối mà không gây tác dụng phụ, giá thành thấp là điều rất cần thiết hiện nay.

Nattokinase là một serine protease gồm 275 acidamine, hoạt động ở pH tối ưu 8 - 10, nhiệt độ tối ưu 30 - 37°C, có trọng lượng phân tử 27,7 - 44 kDa [10]. Khả năng làm tan huyết khối của enzyme nattokinase được tiến sĩ Hyroyuki Sumi phát hiện vào năm 1980 và nhiều nghiên cứu sau này đã có cùng kết luận với tiến sĩ Hyroyuki Sumi [9, 14].

Hoạt tính làm tan huyết khối của nattokinase mạnh gấp 4 lần plasmin (enzyme duy nhất trong cơ thể có khả năng làm tan huyết khối). Cơ chế hoạt động của nattokinase theo hai hướng: trực tiếp phân cắt sợi fibrin trong huyết khối,

gián tiếp hoạt hóa urokinase và mô plasminogen hoạt hóa (t-PA) để tăng cường sản xuất plasmin. Fibrin là một protein nội sinh hình sợi có khả năng làm đông máu (tụ máu) để ngăn chứng xuất huyết, là chất sợi buộc các tiểu cầu vốn kết lại với nhau hình thành cục máu đông. Enzyme nattokinase phân cắt sợi fibrin tạo thành polypeptide và acid amine, làm tan cục máu đông [16].

Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh enzyme nattokinase còn có khả năng làm giảm huyết áp, giảm cholesterol, hạ mỡ máu và cải thiện trí nhớ. Chính những ưu điểm vượt trội nói trên, nattokinase là một enzyme được lựa chọn hàng đầu cho việc ngăn ngừa và điều trị các bệnh liên quan đến huyết khối [16]. Enzyme nattokinase chiết xuất từ natto nên dễ dàng được áp dụng trong lĩnh vực y học.

Các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được phân lập từ các loại thực phẩm lên men truyền thống như *Bacillus subtilis natto* phân lập từ natto (Nhật Bản); *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 từ Douchi (Trung Quốc) và *Bacillus sp. DJ-4* từ Doe-Jang (Hàn Quốc)... là nguồn giống quan trọng để sản xuất enzyme nattokinase [3].

Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu bước đầu phân lập, định danh để lựa chọn ra chủng *Bacillus subtilis natto* từ natto của Nhật Bản và cửa hàng Nhật Bản tại Việt Nam. Trên cơ sở đó, quá trình so sánh và đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme giữa 2 chủng được tiến hành và lựa chọn chủng tốt nhất để khảo sát khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme thô thu được sau quá

trình lên men với đậu nành.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

- Nguyên liệu phân lập: Natto mua tại Nhật Bản (ký hiệu N₁) và cửa hàng Nhật Bản tại Việt Nam (ký hiệu N₂).



Hình 1. Mẫu natto N₁



Hình 2. Mẫu natto N₂

- Nguyên liệu lên men: đậu nành hạt (Công ty Sữa đậu nành Việt Nam - Vinasoy),
- Môi trường phân lập và giữ giống NA (cao thịt, peptone, NaCl, agar),
- Môi trường tăng sinh: sữa đậu nành bổ sung 5% đường lactose (w/v).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập

Natto được hòa với peptone loãng và đun cách thủy đến 80°C, pha loãng mẫu trong dung dịch peptone ở các độ pha loãng 10^{-1} - 10^{-10} , cấy trang trên môi trường NA, ủ ở 37°C trong vòng 24 giờ để thu được các khuẩn lạc riêng lẻ. Từ các khuẩn lạc riêng lẻ trên, tiến hành cấy trang, cấy rìa nhiều lần nhằm mục đích làm thuần, tạo các chủng vi sinh vật thuần khiết. Chủng vi sinh vật thuần khiết sau khi làm thuần được giữ giống trên các ống thạch nghiêng ở 4°C [1, 2].

2.2.2. Phương pháp định danh

a. Phương pháp nhuộm gram

Các vi khuẩn đã phân lập được nhuộm Gram để kiểm tra đặc tính Gram (+) và quan sát hình dạng vi khuẩn, thí nghiệm được tiến hành như sau [2]:

- Cố định tiêu bản vi khuẩn bằng ngọn lửa đèn cồn.
- Nhuộm bằng dung dịch tím tinh thể trong 1 phút.
- Nhuộm tiếp bằng dung dịch Lugol trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất.
- Phủ cồn 96° lên vết bôi trong 30 - 40 giây, rửa lại bằng nước cất.
- Nhuộm tiếp bằng Fuchsin Ziehl trong 30 - 60 giây, rửa lại bằng nước cất.

- Để khô tự nhiên hoặc hơi trên ngọn lửa đèn cồn, sau đó quan sát dưới kính hiển vi.

b. Phương pháp thử catalase

Cấy rìa các giống đã làm thuần, có khả năng là vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* lên môi trường NA, ủ ở 37°C trong 24 giờ, sau đó nhỏ trực tiếp H₂O₂ 3% lên bề mặt khuẩn lạc. Quan sát hiện tượng sủi bọt khí trên đĩa petri [4].

c. Phương pháp kiểm tra khả năng di động

Vi khuẩn phân lập được cấy trên môi trường thạch mềm NA. Dùng que cấy đầu nhọn lấy khuẩn lạc nghi ngờ là *Bacillus subtilis natto* cấy đâm sâu vào môi trường thạch mềm, ngay giữa ống nghiệm đến độ sâu khoảng 2cm, ủ ở 37°C quan sát khả năng di động của vi khuẩn sau 24 giờ [4].

d. Phương pháp thử khả năng phân giải tinh bột

Môi trường NA có bổ sung 2% tinh bột tan (w/v), hấp tiệt trùng môi trường ở 121°C, 15 phút và phân phối vào đĩa petri. Vi khuẩn mới hoạt hóa được cấy chấm lên đĩa, ủ ở 37°C trong 48 giờ. Nhỏ thuốc thử Lugol lên vết cấy để quan sát khả năng phân giải tinh bột [4].

e. Phương pháp thử khả năng lên men đường

Ống nghiệm chứa môi trường NB (cao thịt, peptone, NaCl) có bổ sung 1% đường glucose và chỉ thị cresol brom, hấp tiệt trùng ở 121°C, 15 phút, cấy vi khuẩn vào các ống nghiệm, giữ ở 37°C trong 18-20 giờ. Quan sát sự chuyển màu của môi trường [4].

f. Phương pháp kiểm tra khả năng đồng hóa citrate [4]

Việc kiểm tra khả năng đồng hóa citrate là rất cần thiết để định danh chủng *Bacillus subtilis natto*.

Môi trường (g/1000ml nước cất):

NH₄H₂PO₄: 1g

NaCl : 5g

MgSO₄: 0,2g

Agar : 15g

K₂HPO₄: 1g

Bromothymol blue: 0,08g

Natricitrate: 2g

Đun nhẹ môi trường đến khi hòa tan, hấp tiệt trùng môi trường ở 121°C trong 15 phút và phân phối vào đĩa petri.

Cấy chấm khuẩn lạc có khả năng là vi khuẩn *Bacillus subtilis natto*, ủ ở 37°C và quan sát sau 24 giờ.

Kết quả (+): Màu sắc môi trường chuyển từ màu xanh lục sang xanh lam.

g. Phương pháp kiểm tra khả năng phân cắt fibrin [14]

Tăng sinh vi khuẩn trên môi trường sữa đậu nành với 5% đường lactose trong 24 giờ. Đục lỗ trên môi trường NA thạch đĩa có bổ sung 1% fibrin.

Phương pháp thu sợi fibrin:

Huyết lợn: bổ sung 0,5% K₂C₂O₄, thêm 150ml NaCl 0,8%, 5ml dung dịch CaCl₂ (2,5g/100ml H₂O). Đổ 10 - 15 phút. Lọc qua giấy lọc.

Rửa mẫu trên giấy lọc bằng NaCl 0,8% đến khi sợi fibrin không còn máu.

Sấy khô hoàn toàn ở 40°C.

- Nhỏ dịch tăng sinh vi khuẩn vào, ủ ở 37°C trong 24h.
- Nhỏ Folin pha loãng 5 lần lên bề mặt thạch, kiểm tra vòng phân giải fibrin.

Đọc kết quả:

- Phản ứng (+): Môi trường xung quanh vi khuẩn xuất hiện màu xanh.
- Phản ứng (-): Không bắt màu với thuốc thử Folin.

h. Phương pháp kiểm tra khả năng thủy phân casein

Các chủng vi khuẩn sau khi làm thuần được cấy chấm trên môi trường NA bổ sung 10% casein, giữ ở 37°C trong 24 giờ. Quan sát vòng thủy phân casein [4].

2.2.3. Phương pháp lên men natto với đậu nành

Đậu nành để nguyên vỏ và ngâm 12h. Hấp ở 121°C, 1atm trong 30 phút. Tiến hành lên men natto bằng phương pháp lên men rắn, chủng vi khuẩn sau khi phân lập, định danh và xác định chính xác là *Bacillus subtilis natto* được cấy vào 100g đậu nành đã hấp chín, tỷ lệ 5% (v/v). Quá trình lên men rắn được tiến hành ở 37°C, nhiệt độ của quá trình lên men được duy trì bởi tủ ấm. Sản phẩm natto được thu nhận sau 20-24 giờ lên men [16].

2.2.4. Thu nhận dịch chiết enzyme thô

Canh trường sau lên men được hòa với dung dịch đệm Tris-HCl 0,05M, pH = 9 (tỷ lệ 1:2, w/v), khuấy đều ở 4°C trong 30 phút. Gạn bỏ phần rắn, dịch lỏng đem ly tâm ở điều kiện 4°C, 8000 vòng/phút, 15 phút [13].

2.2.5. Phương pháp thử khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme thô

Huyết lợn thu nhận từ cơ sở chế biến, khi mang về phòng thí nghiệm đã đông thành huyết khối, được cắt cho vào các đĩa để thử khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme thu được. Khối lượng huyết khối trước và sau thử khả năng làm tan huyết khối được xác định bằng cân phân tích.

Tiến hành thí nghiệm với 2 mẫu. Mẫu thử: Lấy 1g huyết khối, bổ sung dịch chiết enzyme thô (đã được cho đệm Tris-HCl 0,05M, như mục 2.2.4) với tỷ lệ 1:3 (w/v), ủ ở 37°C trong 8 giờ. Mẫu đối chứng: Lấy 1g huyết khối, bổ sung đệm Tris-HCl với tỷ lệ 1:3 (w/v), ủ ở 37°C trong 8 giờ.

Sau 8 giờ, quan sát khả năng làm tan huyết khối ở 2 mẫu [5] và tiến hành cân lại 2 mẫu huyết khối lợn còn lại trên đĩa.

* Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả

3.1.1. Kết quả phân lập

Từ 2 mẫu natto thương phẩm, phân lập được 2 chủng vi khuẩn có thể là *Bacillus subtilis natto*.

Kết quả quan sát hình thái khuẩn lạc 2 chủng phân lập được cho thấy:

- Khuẩn lạc vi khuẩn phân lập từ mẫu natto mua tại Nhật Bản (N₁) và mua tại Việt Nam (N₂) lan rộng trên bề mặt thạch, có mép nhẵn bám chặt lên môi trường thạch. Khuẩn lạc lớn, có hình dạng bất định, phát triển lan rộng.

Do đó, đây có thể là khuẩn lạc của vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* (Hình 3 và Hình 4).



Hình 3. Khuẩn lạc vi khuẩn N₁ (trái) và N₂ (phải) cấy trang

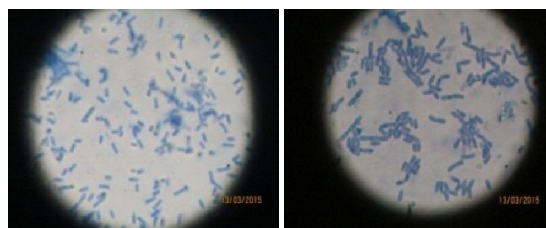


Hình 4. Khuẩn lạc vi khuẩn N₁ (trái) và N₂ (phải) cấy ria

3.1.2. Kết quả định danh

a. Phương pháp nhuộm gram

Cả 2 chủng N₁ và N₂ đều bắt màu tím của thuốc nhuộm (Hình 5). Do đó, N₁ và N₂ là vi khuẩn Gram (+). N₁ và N₂ có hình que ngắn, 2 đầu bầu, xếp thành chuỗi hay đứng riêng lẻ, phù hợp với hình dạng của *Bacillus subtilis natto*.



Hình 5. Kết quả nhuộm gram chủng N₁ (trái) và N₂ (phải)

b. Phương pháp thử catalase

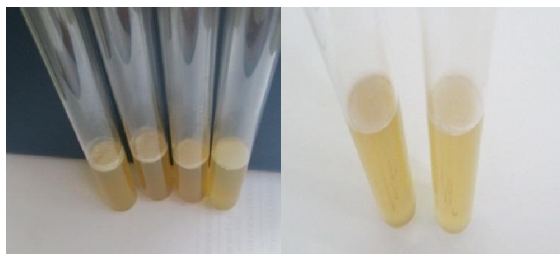
Cả 2 chủng N₁ và N₂ đều có phản ứng catalase, đều phân giải H₂O₂ thành H₂O và O₂. Do có hiện tượng sủi bọt khí trên bề mặt khuẩn lạc khi cho H₂O₂ 3% vào. Kết quả phù hợp với đặc điểm sinh hóa của vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* (Hình 6).



Hình 6. Kết quả thử catalase chủng N₁ (trái) và N₂ (phải)

c. Kết quả kiểm tra khả năng di động

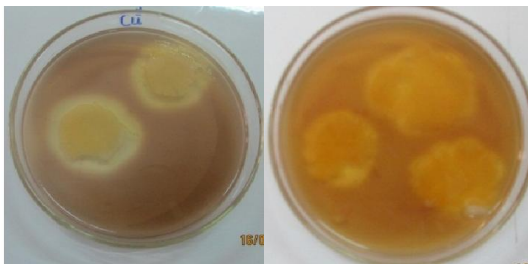
Cả 2 chủng vi khuẩn N₁ và N₂ đều mọc lan ra khỏi vết cấy, mọc trên bề mặt thạch, chứng tỏ cả 2 chủng đều có khả năng di động, phù hợp với đặc tính di động của *Bacillus subtilis natto* (Hình 7).



Hình 7. Kết quả kiểm tra khả năng di động của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

d. Kết quả kiểm tra khả năng phân giải tinh bột

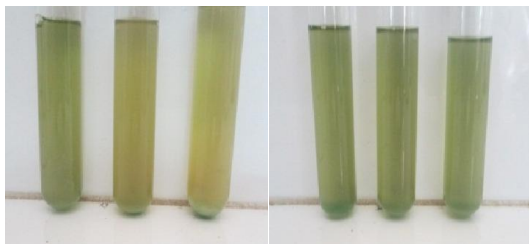
Kết quả Hình 8 cho thấy Thuốc thử lugol không bắt màu xung quanh khuẩn lạc của 2 chủng N_1 và N_2 , do đó cả 2 chủng đều có khả năng phân giải tinh bột. Điều này phù hợp với đặc tính hóa sinh của *Bacillus subtilis natto*.



Hình 8. Kiểm tra khả năng phân giải tinh bột của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

e. Kết quả thử khả năng lên men đường glucose

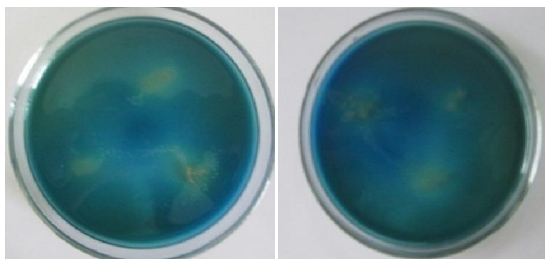
Môi trường sau khi cấy vì khuẩn chuyển từ màu xanh sang vàng lục với thời gian 20 giờ (Hình 9). Do đó, 2 chủng đều có khả năng lên men đường glucose, phù hợp với đặc tính sinh hóa của *Bacillus subtilis natto*.



Hình 9. Kết quả thử khả năng lên men đường glucose của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

f. Kết quả kiểm tra khả năng đồng hóa citrate

Kết quả ở Hình 10 cho thấy cả 2 chủng vì sinh vật đều có khả năng làm cho môi trường trên đĩa petri chuyển từ màu xanh lục sang xanh lam sau 24 giờ. Kết quả này phù hợp với đặc tính đồng hóa citrate của vi khuẩn *Bacillus subtilis natto*.



Hình 10. Kết quả kiểm tra khả năng đồng hóa citrate của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

g. Kết quả thử khả năng thủy phân casein

Kết quả kiểm tra khả năng thủy phân casein thể hiện ở Hình 11 cho thấy:

Xuất hiện vòng thủy phân xung quanh khuẩn lạc của 2 chủng N_1 và N_2 , do đó cả 2 chủng đều có khả năng thủy phân casein. Phù hợp với đặc tính sinh hóa của *Bacillus subtilis natto*.

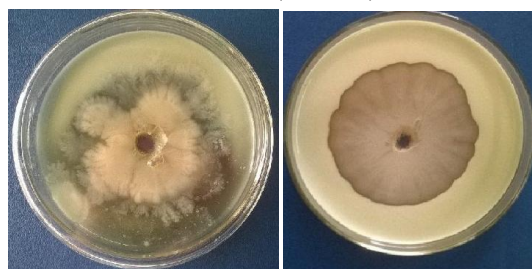
Vòng thủy phân casein của chủng N_2 lớn hơn N_1 , do đó chủng N_2 có khả năng sinh tổng hợp enzyme để thủy phân protein mạnh hơn.



Hình 11. Kết quả kiểm tra khả năng thủy phân casein của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

h. Kết quả kiểm tra phản ứng fibrin

Môi trường xung quanh khuẩn lạc xuất hiện màu xanh sau khi thuốc thử Folin được nhỏ lên bề mặt thạch, chứng tỏ vì khuẩn có khả năng phân giải fibrin. Đây chính là vì khuẩn *Bacillus subtilis natto* (Hình 11).



Hình 12. Kiểm tra phản ứng fibrin của chủng N_1 (trái) và N_2 (phải)

Sự phân giải fibrin của chủng N_2 thể hiện ở Hình 12 đồng đều và rộng hơn so với chủng N_1 . Ở chủng N_1 sự phân giải fibrin xảy ra không giống chủng N_2 bên phải, tức là không có xu hướng lan tỏa từ tâm ra mép đĩa, vòng thủy phân không đồng ở tâm và không sắc nét. Do đó khả năng phân giải fibrin của chủng N_2 tốt hơn so với chủng N_1 .

Từ các kết quả trên (phân lập, nhuộm Gram, thử catalase, kiểm tra khả năng di động, kiểm tra khả năng phân giải tinh bột, thử khả năng lên men đường glucose, kiểm tra khả năng đồng hóa citrate, thử khả năng thủy phân casein, kiểm tra phản ứng fibrin) cho phép chúng tôi đưa ra kết luận hai chủng N_1 và N_2 phân lập được từ 2 loại natto thương phẩm Nhật Bản và Việt Nam là vi khuẩn *Bacillus subtilis natto*.

3.1.3. Kết quả chọn lọc chủng vi khuẩn

Từ kết quả của phản ứng thử khả năng thủy phân casein và phản ứng thử khả năng phân giải fibrin tại mục 3.2 cho thấy:

Chủng N_1 và N_2 đều có khả năng thủy phân protein và chủng N_2 có khả năng thủy phân protein mạnh hơn chủng N_1 .

Chủng N_1 và N_2 đều có khả năng phân giải fibrin và khả năng phân giải fibrin chủng N_2 có khả năng thủy phân

protein mạnh tốt hơn chủng N₁.

Do đó, chủng N₂ được chọn để lên men natto thu enzyme nattokinase.

3.1.4. Kết quả lên men thử nghiệm natto với nguyên liệu đậu nành

Sử dụng chủng N₂ để lên men thử nghiệm natto. Natto thu được sau quá trình lên men với thời gian 24 giờ có đặc điểm gần như tương tự natto thương phẩm,

- Màu nâu,
- Mùi đặc trưng của natto,
- Xuất hiện các sợi tơ, nhớt.



Hình 13. Natto lên men thử nghiệm

3.1.5. Kết quả thử khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme

Natto thu được sau lên men được tiến hành chiết thu enzyme thô. Kết quả thử khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme ở mẫu đối chứng và mẫu thử được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thử khả năng làm tan huyết khối của dịch chiết enzyme

Thời gian	Mẫu đối chứng (g)	Mẫu thử (g)
Ban đầu	1	1
Sau 8 giờ	0,95±0,02	0,11±0,03

Kết quả cho thấy huyết khối ở mẫu thử gần như tan hoàn toàn, huyết khối ở mẫu đối chứng gần như không tan. Do đó, enzyme thô thu nhận từ quá trình lên men natto bởi chủng N₂ chính là enzymenattokinase, có khả năng làm tan huyết khối rất mạnh như những nghiên cứu trước đây đã công bố.

3.2. Thảo luận

Từ hai mẫu natto thương phẩm của Nhật Bản và Việt Nam chúng tôi đã phân lập trên môi trường đặc hiệu và định danh thành công 2 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis natto* (N₁ và N₂). Kết quả cũng cho thấy *Bacillus subtilis natto* là chủng vi sinh vật chính được tìm thấy trong natto.

Chủng N₂ khả năng thủy phân protein mạnh hơn so với chủng N₁, kết luận được dựa trên khả năng phân giải casein. Vì vậy, chủng N₂ được sử dụng để lên men natto thu enzym nattokinase.

Dịch chiết enzym thô sau ly tâm được sử dụng để kiểm tra khả năng tan huyết khối, sau 8 giờ 1g huyết khối tan gần như hoàn toàn, do đó enzym thô thu được sau lên men natto bởi chủng N₂ là nattokinase.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh thành công 2 chủng *Bacillus subtilis natto* từ natto thương phẩm của Nhật Bản (N₁) (N₂).

Chủng N₂ có khả năng phân giải protein cũng như khả năng làm tan huyết khối cao hơn so với chủng N₁,

Dịch chiết enzyme nattokinase thô sau khi lên men natto bởi chủng N₂ có khả năng làm tan hoàn toàn 1g huyết khối sau 8 giờ (tỷ lệ 1:3, w/v),

Nghiên cứu đã góp phần làm tăng nguồn giống vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzyme nattokinase hoạt lực cao cho Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Trương Thị Như Hiếu (2010), *So sánh tác dụng thủy phân đậu hũ bằng phức hệ enzyme của Bacillus subtilis sp. và Bacillus subtilis Natto sp. để chế biến thức uống chức năng*, Luận văn thạc sĩ vi sinh vật.
- [2] Lê Xuân Phương (2008), *Bài giảng thí nghiệm vi sinh vật học*, Đại học Đà Nẵng.
- [3] 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), pp. 99-104.
- [4] Trần Linh Thuộc (2006), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
- [5] Alaa Eldin Fadul Elseid Obeid, Aisha Mudawi Alawad, Hanan Moawia Ibrahim (2015), "Isolation and Characterization of Bacillus Subtilis with Potential Production of Nattokinase", *International Journal*, 3(3), pp. 94-101.
- [6] 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 agricultural and food chemistry*, 57(20), pp. 9722-9729.
- [7] Hiroyuki Sumi, Hiroki Hamada, Koichiro Nakanishi, Hajime Hiratani (1990), "Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinases", *Acta haematologica*, 84(3), pp. 139-143.
- [8] Martin Milner, Kouhei Makise (2002), "Natto and its active ingredient nattokinase: A potent and safe thrombolytic agent", *Alternative & complementary therapies*, 8(3), pp. 157-164.
- [9] M Maruyama, H Sumi (1998), "Effect of natto diet on blood pressure", *Japan Technology Transfer Association (JTTAS)*, pp. 1-3.
- [10] M Haritha, V Meena (2011), "Nattokinase: A review of fibrinolytic enzyme", *Chemical, environmental and pharmaceutical research*, 2(1), pp. 61-66.
- [11] Prevent Heart Attack (2002), "Stroke with Potent Enzyme that Dissolves Deadly Blood Clots in Hours", Health Sciences Institute.
- [12] Rodney A Rhoades, David R Bell (2012), *Medical physiology: Principles for clinical medicine*, Lippincott Williams & Wilkins.
- [13] Rohit Kapoor, Bibhu Prasad Panda (2013), "Production of nattokinase from Bacillus sp. by solid state fermentation", *International Journal of Medical Science and Biotechnology*, 1(2), pp. 61-65.
- [14] Stephen T Sinatra, James C Roberts (2010), *Reverse Heart Disease Now: Stop Deadly Cardiovascular Plaque Before It's Too Late*, John Wiley & Sons.
- [15] Yasuhiro Suzuki, Kazunao Kondo, Hideyuki Ichise, Yoshinori Tsukamoto, Tetsumei Urano, Kazuo Umemura (2003), "Dietary supplementation with fermented soybeans suppresses intimal thickening", *Nutrition*, 19(3), pp. 261-264.
- [16] Yiu H Hui, Lisbeth Meunier-Goddik, Jytte Josephsen, Wai-Kit Nip, Peggy S Stanfield (2004), *Handbook of food and beverage fermentation technology*, CRC Press.

(BBT nhận bài: 07/07/2016, phản biện xong: 11/08/2016)