Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Các Khoa học Trái đất và Môi trường, Tập 33, Số 1S (2017) 129-135

Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp

Ngô Thị Tường Châu[1*], Hoàng Thị Bích Vân[1], Nguyễn Hoàng Tâm[1], Lê Văn Thiện[1], Hồ Tuyên[2]

[1]*Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

[2]*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 30 tháng 9 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 07 tháng 11 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 13 tháng 11 năm 2017

Tóm tắt: Nattokinase là một protease kiềm có hoạt tính phân hủy fibrin, đã được chứng minh lâm sàng về hiệu quả và an toàn trong điều trị huyết khối ở người qua đường uống. Trong nghiên cứu này, thành phần môi trường lên men đã được tối ưu hóa cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase từ chủng *Bacillus subtillis* BD170 tái tổ hợp. Các nguồn carbon, nitơ và muối khoáng thích hợp cho hoạt tính nattokinase lần lượt là maltose, đậu nành, $MgSO_4$ và $CaCl_2$. Sau đó các yếu tố này được tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng. Kết quả cho thấy môi trường tối ưu cho quá trình sinh tổng hợp nattokinase tái tổ hợp của chủng *B. subtillis* BD170 gồm 15 g/l maltose, 45 g/l đậu nành, 0,75 g/l $MgSO_4$ và 0,75 g/l $CaCl_2$. Sau 48 giờ lên men ở pH 7,0, hoạt tính nattokinase tái tổ hợp tối đa đạt 342 FU/ml, cao gấp 1,3 lần so với trước khi tối ưu.

Từ khóa: Bacillus subtilis, hoạt tính phân hủy fibrin, nattokinase tái tổ hợp.

1. Đặt vấn đề

Tắc nghẽn mạch do huyết khối dẫn đến nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong ở người [1]. Nattokinase, một protease kiềm có hoạt tính phân hủy fibrin, đã được chứng minh lâm sàng về hiệu quả và an toàn trong điều trị huyết khối qua đường uống. Nattokinase được thu nhận theo con đường lên men truyền thống thường có hàm lượng không cao và hoạt tính ít ổn định. Hướng nghiên cứu sản xuất nattokinase tái tổ hợp bước đầu cho thấy hiệu quả vì enzyme tái tổ hợp được biểu hiện có hoạt tính và tiết ngoại bào [2, 3]. Việc thương mại hóa nattokinase tái tổ hợp đòi hỏi sự tối ưu hóa thành phần môi trường lên men để đạt sản lượng tối đa. Trong nghiên cứu này,

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-917691012.
Email: ngotuongchau@hus.edu.vn

https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4163

thành phần môi trường lên men cho sinh tổng hợp nattokinase của chủng *B. subtillis* BD170 tái tổ hợp đã được tối ưu hóa theo phương pháp bề mặt đáp ứng, một hướng tiếp cận mới đã được ứng dụng trong vài nghiên cứu gần đây [4-7].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp mang vector pHT43/*Nat05* dòng R4, trong đó gen mã hóa nattokinase *Nat05* (mã số truy cập KU341115 tại GenBank) có nguồn gốc từ chủng tự nhiên *B. subtilis* Natto5 (mã số truy cập KR140153 tại GenBank) được phân lập từ đậu tương lên men thu thập tại tỉnh Bắc Giang.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường lên men cơ sở: là môi trường MT2 (g/l) gồm: maltose 30; đậu nành 20; $MgSO_4$ 0,2; $CaCl_2$ 0,5; pH 7,0 (hạt đậu nành được ngâm với nước 6 giờ cho mềm và xay nhuyễn thành sữa).

Chuẩn bị giống: Giống vi khuẩn được bảo quản trong ống eppendorf chứa glycerin 30% ở -86°C. Giống được hoạt hóa ngay trước khi sử dụng bằng cách nuôi cấy trong môi trường LB lỏng (1% tryptone; 0,5% dịch chiết nấm men và 1% NaCl) qua đêm ở 37°C với tốc độ lắc 220 vòng/phút.

Phương pháp lên men: Phân phối 3% thể tích dịch giống vào bình tam giác 500 ml có chứa 150 ml môi trường. Bổ sung isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) nồng độ 1mM khi lên men để kích thích sinh tổng hợp nattokinase tái tổ hợp. Nuôi trên máy lắc ở 200 vòng/phút, 30°C trong 48 giờ. Thu nhận dịch chiết enzyme bằng cách ly tâm ở 10.000 vòng/phút, 4°C trong 10 phút.

Phương pháp xác định khả năng hòa tan huyết khối: Dựa vào khả năng hòa tan huyết khối lợn. Cho 1 ml dịch chiết enzyme vào 5 g huyết lợn đông, ủ 37°C trong 4 giờ. Cân trọng lượng cục huyết đông còn lại sau khi ủ và tính lượng huyết khối tan theo % so với lượng huyết khối ban đầu [8].

Phương pháp xác định hoạt tính nattokinase: Hoạt tính nattokinase được xác định bởi sự tăng các sản phẩm có trọng lượng phân tử thấp và tan trong acid mà được tạo ra trong quá trình phân hủy fibrin. Sự tăng này được xác định bằng cách đo độ hấp thụ ở tia cực tím (275 nm). Một đơn vị hoạt độ nattokinase (FU-fibrinolytic unit) được định nghĩa là lượng nattokinase được cần để làm gia tăng 1,0 độ hấp thụ trong 60 phút của dung dịch phản ứng [7, 9].

Phương pháp lựa chọn các nguồn carbon (C), nitơ (N) và muối khoáng: Chủng vi khuẩn tái tổ hợp được lên men trong môi trường cơ sở có (i) nguồn C được thay thế bằng một lượng tương đương của tinh bột tan, glucose, maltose, xylose, sucrose và fructose; (ii) nguồn N được thay thế bằng một lượng tương đương của đậu nành, pepton, cao nấm men, casein, $(NH_4)_2SO_4$, và $NaNO_3$; (iii) nguồn muối khoáng được thay thế hoặc sử dụng với các nồng độ khác nhau của NaCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$ và K_2HPO_4. Sau 48 giờ, xác định khả năng hòa tan khối huyết của dịch lên men.

Phương pháp tối ưu hóa bề mặt đáp ứng (Response Surface Methodology- RSM): Sử dụng kỹ thuật mô hình thống kê thực nghiệm để phân tích hồi quy đa điểm. Tập hợp dữ liệu định lượng nhận được từ thiết kế yếu tố nhằm giải đồng thời các phương trình đa biến. Các thành phần môi trường đã lựa chọn có ảnh hưởng đến sinh tổng hợp nattokinase được tối ưu hóa sử dụng thiết kế phức hợp tại tâm điểm. Dữ liệu được phân tích bởi phần mềm thống kê Design Expert (DX7 version 7.1).

Phương pháp xử lý số liệu: Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và Ducan's test theo chương trình SPSS 16.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Lựa chọn nguồn C

Trong số các nguồn C được khảo sát, nguồn maltose cho kết quả hòa tan huyết khối cao nhất, theo sau là nguồn glucose và sucrose ($P < 0,05$). Nguồn tinh bột tan cho hoạt tính nattokinase thấp nhất, chứng tỏ nguồn này không thích hợp cho sự phát triển của chủng vi khuẩn tái tổ hợp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jau và cs. (2009) [5], Liu và cs. (2005) [6]. Hàm lượng maltose tối ưu cho hoạt tính nattokinase cũng đã được xác định là 30 g/L (Bảng 1).

3.2. Lựa chọn nguồn N

Trong số các nguồn N được khảo sát, nguồn đậu nành (được ngâm và xay thành sữa đậu nành) cho kết quả hòa tan huyết khối cao nhất ($P < 0,05$). Các nguồn nitrogen hữu cơ khác như pepton, cao nấm men, tryptone và casein cho giá trị hoạt tính thấp hơn, khoảng 66-92% so với nguồn đậu nành. Nguồn $NaNO_3$ không thích hợp cho sự sinh tổng hợp nattokinase của chủng vi khuẩn tái tổ hợp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jau và cs. (2009) [5], Liu và cs. (2005) [6]. Hàm lượng đậu nành tối ưu cho hoạt tính nattokinase cũng đã được xác định là 30 g/L (Bảng 2).

3.3. Lựa chọn nguồn muối khoáng

Trong số các nguồn muối khoáng với các hàm lượng khác nhau được khảo sát, sự bổ sung đồng thời $MgSO_4$ và $CaCl_2$ với hàm lượng là 0,5 g/l cho giá trị hoạt tính nattokinase cao nhất ($P < 0,05$). Hai nguồn còn lại NaCl và K_2HPO_4 cho giá trị hoạt tính thấp hơn (Bảng 3).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn C đến sinh tổng hợp nattokinase

Nguồn C	T. bột	Glucose	Maltose	Xylose	Sucrose	Fructose	Maltose			
(g/l)	30						20	25	35	40
Lượng huyết tan (%)	8,1	27,7	30,6	14,8	18,1	16,1	20,2	26,6	30,6	30,3

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn N đến sinh tổng hợp nattokinase

Nguồn N (g/l)	Đậu nành	Pepton	Cao nấm men	Casein	$(NH_4)_2SO_4$	$NaNO_3$	Đậu nành			
	20						15	25	30	35
Lượng huyết tan (%)	30,6	25,7	28,1	20,3	14,9	12,7	24,7	34,1	36,8	36,6

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn muối khoáng đến sinh tổng hợp nattokinase

Muối khoáng	$MgSO_4$			$CaCl_2$			NaCl			K_2HPO_4			$MgSO_4$: $CaCl_2$
(g/l)	0,2	0,5	1,0	0,2	0,5	1,0	1,0	2,5	5,0	0,2	0,5	1,0	0,5:0,5
Lượng huyết tan (%)	36,7	39,1	38,8	37,6	38,9	38,6	29,5	28,7	27,4	25,1	29,9	29,6	40,7

Bảng 4. Các phương án trong vùng tối ưu các yếu tố ảnh hưởng

TN số	Maltose (g/l)	Đậu nành (g/l)	$MgSO_4$ (g/l)	$CaCl_2$ (g/l)	Hoạt tính nattokinas (FU/ml)
1	45,00	15,00	0,75	0,25	99,5
2	45,00	45,00	0,75	0,25	325,4
3	45,00	45,00	0,25	0,75	249,3
4	15,00	15,00	0,25	0,25	104,0
5	15,00	45,00	0,25	0,75	285,1
6	30,00	30,00	0,50	0,50	182,8
7	45,00	15,00	0,25	0,25	131,6
8	15,00	15,00	0,75	0,75	86,1
9	15,00	45,00	0,75	0,25	322,7
10	45,00	45,00	0,25	0,25	292,5
11	45,00	15,00	0,25	0,75	81,9
12	45,00	45,00	0,75	0,75	304,6
13	15,00	45,00	0,75	0,75	342,0
14	15,00	45,00	0,25	0,25	288,3
15	15,00	15,00	0,75	0,25	73,3
16	45,00	15,00	0,75	0,75	72,3
17	15,00	15,00	0,25	0,75	94,2
18	41,35	17,23	0,53	0,54	131,4
19	30,66	38,27	0,70	0,37	248,6
20	33,52	21,59	0,62	0,28	109,6
21	26,45	22,03	0,59	0,57	132,2
22	35,41	15,68	0,34	0,58	112,4
23	23,53	15,48	0,38	0,71	84,9
24	21,70	28,22	0,62	0,57	178,0
25	41,73	33,77	0,58	0,48	228,4
26	16,73	32,69	0,46	0,75	186,0
27	28,48	42,97	0,47	0,30	275,1
28	16,34	31,85	0,71	0,59	221,9
29	37,56	23,92	0,39	0,44	153,6
30	33,48	40,94	0,40	0,61	255,5
31	21,51	24,89	0,65	0,41	153,0
32	27,47	29,69	0,65	0,57	179,2
33	17,88	22,89	0,41	0,65	142,4
34	17,17	33,06	0,65	0,70	210,4
35	39,16	43,85	0,69	0,58	318,4
36	17,77	40,75	0,64	0,53	306,6
37	26,51	31,41	0,47	0,39	188,8
38	41,41	25,42	0,55	0,66	143,8

39	17,22	34,61	0,74	0,69	228,8
40	41,46	19,68	0,59	0,31	129,2
41	15,92	24,21	0,73	0,51	167,2
42	40,65	31,87	0,54	0,70	172,5
43	19,54	27,86	0,65	0,50	183,4
44	22,90	40,49	0,44	0,67	255,8
45	16,01	43,87	0,46	0,57	332,9
46	38,91	37,50	0,50	0,74	200,4
47	16,73	33,93	0,29	0,72	190,1

Bảng 5. Kiểm chứng sự tương thích của mô hình với kết quả thực nghiệm

TN số	Maltose (g/l)	Đậu nành (g/l)	$MgSO_4$ (g/l)	$CaCl_2$ (g/l)	Hoạt tính lý thuyết (FU/ml)	Hoạt tính thực tế (FU/ml)
10	45,00	45,00	0,25	0,25	292,5	297
11	45,00	15,00	0,25	0,75	81,9	80,3
12	45,00	45,00	0,75	0,75	304,6	300
13	15,00	45,00	0,75	0,75	341,9	342
14	15,00	45,00	0,25	0,25	288,3	284

3.4. Tối ưu hóa giá trị các yếu tố ảnh hưởng lên hoạt tính nattokinase

Từ kết quả nêu trên, miền khảo sát của 4 yếu tố được lựa chọn để tối ưu hóa thành phần môi trường lên men được xác định như sau: maltose (A): 15,0÷45,0 (g/l); đậu nành (B): 15,0÷45,0 (g/l); $MgSO_4$ (C): 0,25÷0,75 (g/l), $CaCl_2$ (D): 0,25÷0,75 (g/l). Sử dụng phần mềm tối ưu hoá Design Expert (DX7 version 7.1) để thiết kế 30 thí nghiệm và xử lý kết quả thực nghiệm. Sự có nghĩa của các hệ số và sự thích ứng của mô hình được kiểm tra bằng phân tích hồi quy. Kết quả cho thấy chuẩn F mô hình có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 99,99% ($P < 0,0001$). Chuẩn F "sự không tương thích" bằng 2,38 cho thấy mô hình tương thích với thực nghiệm. Lần lượt xét ảnh hưởng của từng yếu tố (khi các yếu tố khác giữ ở mức trung tâm) đến sinh tổng hợp nattokinase cho thấy yếu tố có ảnh hưởng mạnh nhất là B (đậu nành), sau đó đến A (maltose), tiếp đến là C ($MgSO_4$) và cuối cùng là D ($CaCl_2$).

Phương trình đa thức bậc hai tổng thể cho sinh tổng hợp nattokinase là: Y = +96,89189 - 7,75747 * A - 4,98930 * B - 59,95320 * C + 902,46992 * D - 0,036944 * A * B - 0,15000 * A * C - 75000 * A * D + 6,15000 * B * C + 0,68333 * B * D + 125,00000 * C * D + 0,17642 * A2 + 0,20874 * B2 - 47,01018 * C2 - 916,20599 * D2. Trong đó: Y: hoạt tính nattokinase (FU/ml); A: maltose (g/l); B: đậu nành (g/l); C: $MgSO_4$ (g/l); D: $CaCl_2$ (g/l). Vùng tối ưu của tất cả các yếu tố ảnh hưởng gồm 47 phương án (Bảng 4), trong đó phương án sinh tổng hợp nattokinase cao nhất là phương án 13, bao gồm các thành phần: maltose 15,0 g/l, đậu nành 45,0 g/l, $MgSO_4$ và $CaCl_2$ đều là 0,75 g/l. Hoạt tính đạt được theo mô hình tối ưu là 342 FU/ml, tăng gấp 1,3 lần so với trước khi tối ưu.

Để kiểm tra lại tính đúng đắn của phương trình tối ưu, tiến hành thí nghiệm kiểm chứng tại 5 điểm tối ưu thu được bất kì (các điểm tối ưu này có các thông số của các biến và cả kết quả về hoạt độ thu được theo lý thuyết) (Bảng 5). Kết quả cho thấy trong các thí nghiệm sự sai khác về hoạt tính nattokinase giữa lý thuyết và thực nghiệm kiểm chứng tương đối nhỏ (< 5

FU/ml). Như vậy, kết quả tối ưu của mô hình được xem là chính xác.

4. Kết luận

Bằng phương pháp tối ưu hóa bề mặt đáp ứng, thành phần môi trường lên men tối ưu cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *B. subtillis* BD170 tái tổ hợp được xác định như sau (g/l): maltose 15,0; đậu tương 45,0; $MgSO_4$ 0,75; $CaCl_2$ 0,75; pH 7,0. Hoạt tính tối đa đạt được là 342 FU/ml. Kết quả làm tiền đề cho nghiên cứu sản xuất nattokinase tái tổ hợp với quy mô pilot ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài "Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzyme nattokinase tái tổ hợp ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm" mã số ĐT.04.15/CNSHCB thuộc Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020 của Bộ Công thương.

Tài liệu tham khảo

[1] WHO, Global status report on noncommunicable diseases 2010, Geneva, 2011.

[2] P.T. Chen, C.J. Chiang, Y.P. Chao, Strategy to approach stable production of recombinant nattokinase in Bacillus subtilis, Biotechnology Progress 23(4) (2007) 808.

[3] J. Lee, S. Park, W.A. Choi, K.H. Lee, Y.K. Jeong, I.S. Kong, S. Park, Production of a fibrinolytic enzyme in bioreactor culture by Bacillus subtilis BK- 17, Journal of Microbiology and Biotechnology 9(4) (1999) 443.

[4] P.T. Chen, C.J. Chiang, Y.P. Chao, Medium optimization for the production of recombinant nattokinase by Bacillus subtilis using response surface methodology, Biotechnology Progress 23(6) (2007) 1327.

[5] K.W. Jau, H.C. Hua, S.H. Ching, Optimization of the medium components by statistical experimental methods to enhance nattokinase activity. Fooyin Journal of Health Sciences 1(1) (2009) 21.

[6] J. Liu, J. Xing, T. Chang, Z. Ma, H. Liu, Optimization of nutritional condition for nattokinase production by Bacillus natto NLSSE using statistical experimental methods. Process Biochemistry 40 (2005) 2757.

[7] V. Deepak, K. Kalishwaralal, S. Ramkumarpandian, B.S. Venkatesh, S.R. Senthilkumar, G. Sangiliyandi, Optimization of media composition for Nattokinase production by Bacillus subtilis using response surface methodology, Bioresource Technology 99 (2008) 8170.

[8] Lê Thị Bích Phượng, Võ Thị Hạnh, Trần Thạnh Phong, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân, Lê Thị Hương, Phân lập và tuyển chọn một số chủng Bacillus subtilis sinh tổng hợp Nattokinase, Tạp chí Sinh học 34(3SE) (2012) 99.

[9] T. Shinsaku, Bacillus natto culture extract, Patent No.: US 7,435,565 B2. Oct. 14, 2008.

Optimization of the Medium Components for Recombinant Nattokinase Production by *Bacillus Subtilis* BD170

Ngo Thi Tuong Chau[1], Hoang Thi Bich Van[1], Nguyen Hoang Tam[1], Le Van Thien[1], Ho Tuyen[2]

[1] *Faculty of Environmental Sciences, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*
[2]*Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Nattokinase is a serine protease with fibrinolytic activity whose clinical efficacy and safety for human by the oral route has been proven. In present study, we optimized the medium components for recombinant nattokinase production by *Bacillus subtillis* DB170. Carbon, nitrogen and mineral sources suitable for the recombinant nattokinase production were maltose, soybean, $MgSO_4$ and NaCl, respectively. These factors were subsequently optimized by using the response surface methodology (RSM). The obtained results showed the optimal medium components for the nattokinase biosynthesis contained 15 g/l maltose, 45 g/l soybean, 0.75 g/l $MgSO_4$ and 0.75 g/l $CaCl_2$. After 48 hrs of fermentation at initial pH 7.0, nattokinase activity reached the highest level of 342 FU/ml, 1.3 folder higher than that in the pre-optimized one.

Keywords: Bacillus subtilis, fibrinolytic activity, recombinant nattokinase.