

PHÂN LẬP VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* TỪ NATTO NHẬT BẢN LÀM GIỐNG SẢN XUẤT NATTO

Bùi Thị Nhung⁽¹⁾, Nguyễn Hữu Phúc⁽²⁾

(1) Trường Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh, (2) Viện Sinh học Nhiệt đới

TÓM TẮT

Bài báo trình bày kết quả phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ Natto Nhật Bản, kết quả chọn lọc khả năng sinh protease của từng chủng và chọn lọc được hai chủng, đồng thời định danh chúng thuộc loài *Bacillus subtilis*. Hai chủng *B.subtilis* N18 và *B.subtilis*. N441 đã được sử dụng sản xuất Natto, chủng *B.subtilis* N18 thích hợp để sản xuất chế phẩm enzyme giàu Nattokinase còn chủng *B.subtilis* N441 thích hợp để sản xuất natto.

Từ khóa: phân lập, vi khuẩn, định danh

*

1. Mở đầu

Theo Tổ chức Y tế thế giới (WHO), hàng năm có khoảng 17 triệu người chết do các bệnh tim mạch (nhồi máu cơ tim, và đột quỵ), mà nguyên nhân là hậu quả của chứng huyết khối. Theo ước tính thị trường toàn cầu về các thuốc làm tan huyết khối là gần 14 tỷ USD (Cong et al., 2009). Các loại thuốc làm tan huyết khối như Alteplase (t-PA), Streptokinase, Urokinase (UK), Tenecteplase... có hiệu lực tức thì sau khi tiêm tĩnh mạch. Tuy nhiên hiệu lực hoạt động sinh học của các loại thuốc này tồn tại không lâu sau khi tiêm, giá đắt, đồng thời cũng có nguy cơ biến chứng gây xuất huyết (Thomas et al., 1996). Nattokinase là enzyme có trong sản phẩm natto của Nhật Bản. Nattokinase là protease chuỗi đơn chứa 275 amino acid (trọng lượng phân tử 27,727Da) đã được Hyroyuki Sumi phát hiện về khả năng làm tan huyết khối năm 1980 (Sumi et al., 1987). Do có nguồn gốc thực phẩm, nên dễ được chấp nhận về mặt y tế, và người tiêu dùng sử dụng các chế phẩm Nattokinase như một thực phẩm chức năng để phòng bệnh huyết

khối. Hoạt tính làm tan huyết khối của nattokinase tương đối mạnh, và kéo dài, giảm chứng cao huyết áp (Kim et al., 2011), phân giải protein dạng amyloid liên quan đến bệnh Alzheimer, bệnh bò điên (Rui- Lin Hsu, 2009), tăng cường hoạt hóa plasminogen và làm bất hoạt plasminogen activator inhibitor (Sumi et al., 1987, Urano et al. 2001). Nhiều tác giả trên thế giới và trong nước đã phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* từ Natto hoặc các thực phẩm lên men để nghiên cứu sản xuất nattokinase (Chang et al., 2004, Cong et al., 2009, Deepak et al., 2008, Egwin et al., 2012, Lê Thị Bích Phương et al., 2012).

Nghiên cứu này nhằm mục đích phân lập vi khuẩn *Bacillus subtilis* từ natto Nhật Bản để sản xuất natto.

2. Phương pháp nghiên cứu

• Nguyên liệu

Natto Nhật Bản mua tại Tokyo shop 15A8 Lê Thánh Tôn, Quận 1, thành phố Hồ Chí Minh. Đậu nành mua ở siêu thị Co.opmart, do công ty TNHH thương mại dịch vụ Xuân Hồng cung cấp.

• *Phương pháp nghiên cứu*

Phương pháp làm natto với đậu nành:

Đậu nành ngâm qua đêm. Cho vào hấp vô trùng ở 1 kg/cm² trong 1 giờ để đậu chín nhừ, không xát vỏ, để nguyên hạt. Đậu đã chín để nguội. Cấy giống *B.subtilis* N18 hoặc *B.subtilis* N441 vào đậu nành hấp chín để nguội, sau đó bỏ vào hộp polypropylen, mỗi hộp khoảng 40 - 50 gram đậu nành. Phủ hộp bằng vải màn. Ủ ở 40°C. Sau 20 - 24h thu được sản phẩm natto, đánh giá kết quả.

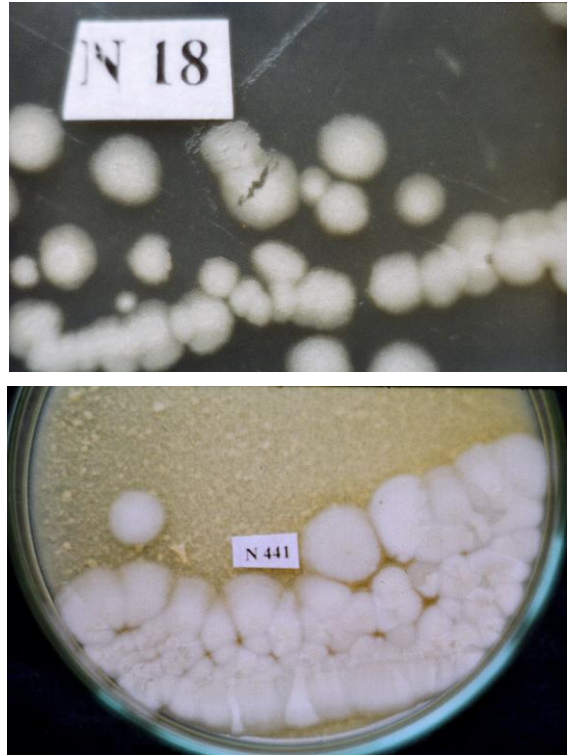
• *Phương pháp làm natto bằng đậu nành và cơm gạo lức:* Gạo lức, ngâm qua đêm, sáng mai cho vào nồi cơm điện nấu chín. Trộn đều cơm gạo lức và hạt đậu nành đã hấp chín với tỉ lệ 5 đậu nành/ 4 gạo lức. Cấy giống, ủ tương tự như tiến trình đối với cách làm natto đậu nành. Đánh giá chất lượng cảm quan và hoạt tính protease của từng nghiệm thức. Xác định hoạt tính protease theo phương pháp Anson cải tiến.

3. Kết quả và thảo luận

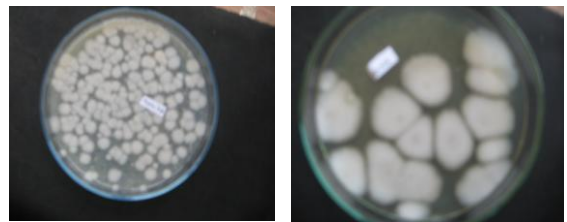
• *Phân lập vi khuẩn Bacillus từ Natto của Nhật Bản*

Natto là thực phẩm lên men truyền thống của Nhật Bản được cho là có lịch sử trên 1.000 năm. Natto được sản xuất trên nguyên liệu đậu nành với vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto. Hiện nay hàng năm Nhật Bản sản xuất trên 300.000 tấn. Natto làm giảm đông máu, nhờ phân giải fibrin của huyết khối và ức chế hoạt hóa plasminogen giúp phòng tránh chứng huyết khối. Qua bốn đợt phân lập cho thấy vi khuẩn *Bacillus* trong Natto của Nhật Bản có mật độ cao, từ 1-2 x 10⁹ cfu trong một gam sản phẩm tươi, hình thái khuẩn lạc khá đồng đều, là những khuẩn lạc *Bacillus* điển hình. Sau khi phân lập, làm thuần, chúng tôi đã chọn lựa được 20 cá thể. Các cá thể phân lập được đều

phát triển tốt hơn trên môi trường có nước chiết đậu nành hoặc sữa đậu nành so với môi trường peptone-glucose.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc *Bacillus* trong Natto Nhật Bản

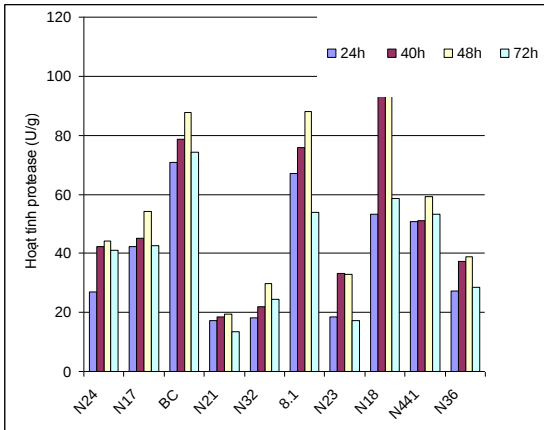


Hình 2. Hình thái khuẩn lạc các vi khuẩn phân lập từ Natto Nhật Bản

• *Tuyển chọn các vi khuẩn Bacillus sp. có hoạt tính protease cao*

Để đánh giá khả năng cho hoạt tính protease của từng cá thể phân lập được, chúng tôi đã thử nghiệm trên môi trường lên men bán rắn, sau từng thời gian lên men 24h, 48h và 72h, chiết protease của từng môi trường nuôi cấy với từng chủng khác nhau khác nhau. Xác định hoạt tính

protease theo phương pháp Anson cải tiến. Kết quả trình bày ở hình 3.



Hình 3. Hoạt tính protease của 10 mẫu vi khuẩn đã tuyển chọn

Kết quả được trình bày ở hình 3 cho thấy đa số các chủng nghiên cứu sinh tổng hợp protease cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy với hoạt tính cực đại là 110,53 U/g (ở chủng N18). Tùy theo hình thức

lên men dịch thể hay lên men bán rắn mà thời điểm đạt được hoạt tính enzyme cao nhất sẽ khác nhau. Dong Mingsheng et al., (2001) cho rằng chủng *Bacillus subtilis* khi lên men dịch thể cho hoạt tính cao nhất sau 24 giờ. Chang Jin Liu et al., (2004) đã nghiên cứu sinh tổng hợp Nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* SBS (J) đạt tối ưu tại 44 giờ.

3. Định danh hai chủng vi khuẩn N18 và N441

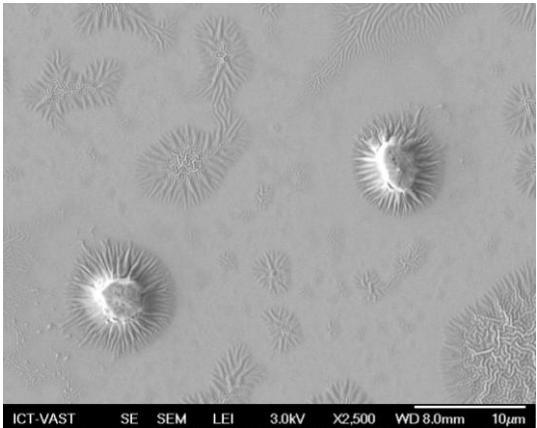
3.1. Đặc điểm hình thái

Để nghiên cứu đặc điểm sinh học và định danh 2 mẫu N18 và N441, chúng tôi tiến hành cấy trên môi trường thạch đĩa ở 37°. Sau 24 giờ, quan sát hình dạng, màu sắc, bề mặt khuẩn lạc, làm tiêu bản, nhuộm Gram và nhuộm bào tử. Kết quả được nêu trong bảng 1.

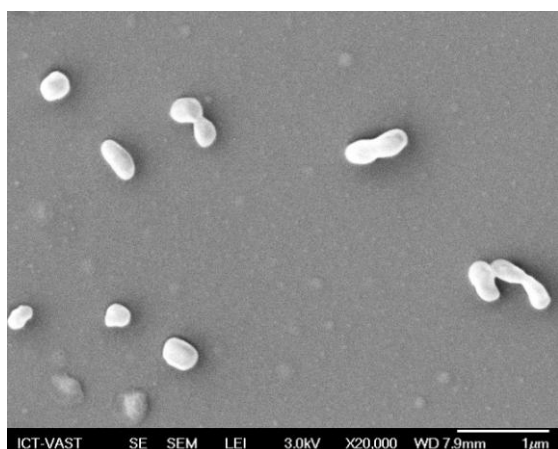
Đặc điểm	Đặc điểm hình thái mẫu N18	Đặc điểm hình thái mẫu N441
Hình thái khuẩn lạc	Bề mặt hơi nhẵn, khô, màu hơi vàng, ở giữa có một núm nhỏ hình tròn có màu vàng nhạt hơn, mép hình răng cưa, lan trên bờ mặt thạch	Bề mặt nhẵn, nhầy và có các gợn sóng, màu trắng đục, mép hơi nhẵn và bám chặt vào bề mặt thạch
Hình thái TB	Hình que, ngắn, nhỏ, xếp đơn hoặc đôi, bắt màu tím chứng tỏ chủng này là VKG(+)	Hình que, mảnh, xếp đơn hoặc đôi, bắt màu tím chứng tỏ chủng này là VKG(+)
Hình thành nội bào tử	Hình thành nội bào tử, phân bố chính tâm	Hình thành nội bào tử, phân bố chính tâm

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của hai chủng N18 và N441

Hình dạng tế bào và bào tử đã được xử lý bằng cách cố định tế bào bằng 0,25% glutaraldehyde trong dung dịch đệm phosphate pH=7,2 và khử nước bằng ethanol ở các nồng độ đậm đặc tăng dần từ 30% đến 100%. Mẫu vi khuẩn chụp bằng kính hiển vi điện tử quét do Viện công nghệ Hóa, Viện hàn lâm khoa học Việt Nam thực hiện. Tế bào hình que ngắn điển hình của *B.subtilis*, bào tử thấy rõ phần trung tâm, còn các phần vỏ bị biến đổi



a) Bào tử *B.subtilis* N18



b) Tế bào *B.subtilis* N18

Hình 4. Tế bào và bào tử *B.subtilis* N18 chụp trên kính hiển vi điện tử quét (SEM)

3.2. Định danh hai chủng vi khuẩn N18 và N441 bằng sinh học phân tử

Chúng tôi gửi hai mẫu N18 và N441 đến công ty xét nghiệm Nam Khoa để định danh bằng cách giải trình tự gen 16S-rARN và so sánh với ngân hàng gen. Kết quả, trình tự gen 16S rRNA của hai chủng như sau:

• Chủng N441:

ATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGC
GTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAC
AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC
GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTA
ACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTG
TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAG
GTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGA
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTA
GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATC
GTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
GTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGA
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGC

• Chủng N18:

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTG
CTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAT
GGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGA
ACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGC
TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGG
CTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGA
CGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTT
CGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG

So sánh với trình tự 16S-rARN của loài vi khuẩn đã được định danh trong ngân hàng gen BLAST SEARCH. Kết quả cho thấy mức độ giống nhau của hai mẫu N18 và N441 với loài *B. subtilis* là 100%. Kết này có thể kết luận mẫu N18 và N441 đã phân lập được là *B. Subtilis*.

3.3. Sản xuất natto bằng đậu nành hấp chín với hai chủng *B.subtilis* N18 và *B.subtilis* N441

Từ hai chủng *B.subtilis* N18 và *B. subtilis* N441 đã phân lập được, chúng tôi tiến hành làm Natto, với các nghiệm thức khác nhau. Kết quả xác định hoạt tính protease của các nghiệm thức trình bày ở bảng 2.

Chủng	Hoạt độ protease (U/g ướt)
N18, ĐN	57,952
N18, ĐN -GL	50,979
N441, ĐN	49,534
N441, ĐN + GL	42,561

N18 & N441, ĐN	55,604
N18 & N441, ĐN + GL	49,317
Natto của Nhật Bản	58,169

Bảng 2

Kết quả thử nghiệm lên men đậu nành hạt hấp chín làm Natto cho thấy cả hai chủng *B.subtilis* N18 và *B. subtilis* N441 đều có khả năng sử dụng làm Natto. Hoạt lực protease trong các sản phẩm Natto làm ra đều tương đương với hoạt lực protease trong Natto của Nhật bản. Đánh giá cảm quan chấp nhận tốt. Do Natto sản xuất bằng chủng *B.subtilis* N18 có hoạt tính protease cao hơn, nhưng độ nhớt thấp so với Natto sản xuất với chủng *B. subtilis* N441, vì vậy chủng *B. subtilis* N18 thích hợp để sản xuất protease (Nattokinase) còn chủng *B. subtilis* N441 thích hợp để sản xuất Natto. Kết quả thí nghiệm cũng thấy rằng khi kết hợp thêm gạo lúc hoạt tính enzyme giảm so với nghiệm thức chỉ một mình đậu nành hấp chín. Ở nghiệm thức đậu nành hấp chín cùng với cơm gạo lúc hoạt lực enzyme thấp hơn so với nghiệm thức chỉ một mình đậu nành hấp chín, nhưng khi ăn ở nghiệm thức có gạo lúc dễ ăn hơn, thích hợp cho một số đối tượng. Mùi vị của Natto

không hấp dẫn nhiều người (20% người Nhật không thích mùi natto), cũng như nước mắm, mắm tôm, chao đối với nhiều người trong chúng ta, tất cả do thói quen, natto là một món ăn rất tốt cho sức khỏe do enzyme Nattokinase trong Natto có hoạt tính mạnh gấp bốn lần plasmin nội sinh, có khả năng làm tan cục máu đông và giảm huyết áp. Natto sẽ là thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao và phòng chống các bệnh tim mạch tốt đối với người Việt Nam, nếu được sản xuất trong nước với giá bán phải chăng.

4. Kết luận

Natto Nhật Bản bán tại Việt Nam có mật độ tế bào cao, khá thuần khiết, có thể sử dụng trực tiếp để làm giống sản xuất Natto tại gia đình, hoặc sử dụng trực tiếp sẽ cung cấp Nattokinase có ảnh hưởng tốt cho sức khỏe. Mật độ vi khuẩn *Bacillus subtilis* cao trong Natto có tác dụng probiotic tốt cho hệ đường ruột. Hai chủng *B.subtilis* N18 và *B. subtilis* N441 đã được chọn lọc có khả năng sử dụng để sản xuất Natto hoặc sản xuất chế phẩm enzyme giàu Nattokinase, một loại thực phẩm chức năng giúp đề phòng chứng huyết khối nguy hiểm.

ISOLATING BACILLUS SUBTILIS BACTERIA FROM JAPANESE NATTO TO MAKE BREED FOR NATTO PRODUCTION

Bui Thi Nhung⁽¹⁾, Nguyen Huu Phuc⁽²⁾

(1) Ho Chi Minh City University of Pedagogy (2) Institute of Tropical Biology

ABSTRACT

This paper presents the results of isolation of bacillus bacterial strains from Japanese Natto. The results selected protease fertility of each strain. Two strains were selected and identified them as Bacillus subtilis species. The two strains of B. subtilis N18 and B. subtilis. N441 have been used to produce Natto. B.subtilis N18 strain was suitable for the production of rich nattokinase enzyme preparations and B.subtilis N441 was suitable for the production of Natto.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Thị Bích Phương, 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), 99-104.

- [1] Cong Wang, Ming Du, Dongmei Zheng, Fandong Kong, Guoren Zu, Yibing Feng (2009), *Purification and characterization of nattokinase from Bacillus subtilis natto B12*, J.Agric.Food Chem 57, 9722-9729.
- [2] Dubey R., Kumar J., Agrawala D., Char T., and Pusp P. (2011), *Isolation, profuction, purification, assay and characterization of fibrinolytic enzymes (nattokinase, streptokinase, and Urokinase) from bacterial sources*, Americam journal of Biotechnology 10(8), 1408-1420.
- [3] Ruei-Lin Hsu , Kung-Ta lee, jung-Hao Wang, Lily Y.-L. Lee, and Ria P.-y. Chen (2009), *Amyloid degradatingability of nattokinase from Bacillus subtilis Natto*, J. Agric Food Chem 57, 503- 508.
- [4] Sumi H., Hamada H., Tsushima 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, 1110-1111.
- [5] Sumi H, Yoshikawa M, Baba T, Kubota H (1999), *Elastase activity and Nattokinase in Natto*, Agricultural Chemistry, 73, 1187-1190.
- [6] Sumi H., Hamada H., Nakanishi K., Hiratani H. (1990), *Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of Nattokinase*, Acta Haematol, 84, 139-143.
- [7] Sumi H., H. Hamada*, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki*, *A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet Experientia*, Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-16 (Japan), 1987, Oct 15; 43(10):1110-1.
- [8] Xiaoyan Zu, Zhenya Zhang, Yingnan Yang, Haitao Che, Guihua zhang Ji Li (2010), *Thrombolytic activities of nattokinase extracyed from Bacillus subtilis fermented soybean cird residues*, International Journal of Biology 2(2), 120-125.
- [9] Yeon Kyoung Kim, Sang Mi Kim, Ji Yeon Kim, and Oran Kwon (2011), *The culture filtrates from Bacillus subtilis natto lowers blood pressure via rennin – angiotensin system in spontaneously hypertensive rats fed with a high cholesterol diet*, J. Korean Soc appl Biol. Chem 54(6), 959-965.