

ĐẶC TÍNH PROBIOTIC VÀ KHẢ NĂNG LÀM TAN HUYẾT KHỐI CỦA CHŨNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* NATTO

Đoàn Thị Ngọc Thanh*, Phạm Nguyễn Kim Lài và Phạm Thị Thúy Ngoan

Khoa Nông nghiệp và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Tiền Giang

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đoàn Thị Ngọc Thanh (email: dmthanh@tgu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 13/12/2019

Ngày duyệt đăng: 28/02/2020

Title:

Probiotic properties and fibrinolysis ability of *Bacillus subtilis* natto strain

Từ khóa:

Bacillus subtilis natto, kháng khuẩn, probiotic, tan huyết

Keywords:

Antibacterial activity, *Bacillus subtilis* natto, fibrinolytic, probiotic

ABSTRACT

Bacillus subtilis natto is one of bacteria generally recognized as safe and produces nattokinase, a fibrinolytic enzyme. It so could potentially be used as probiotic for prevention and treatment of cardiovascular diseases. In this study, the bacteria's probiotic properties such as bile salt tolerance, simulated gastric fluid tolerance and fibrinolysis ability were tested. The results showed that the bacteria survival highly remained under survey conditions. After 3 hours incubating in 0.3% and 0.6% bile salt containing media, survival percentage of bacteria were 96.8% and 85.5% corresponding to 7.87 ± 0.08 and 6.95 ± 0.10 log CFU/mL, respectively. After exposure to pH 2 for 3 hours, survival density of bacteria was 6.73 ± 0.04 log CFU/mL or 79.11% of initial density. After 3-hour incubation in simulated gastric conditions, pH 2.5 and 0.3% pepsin, survival density of bacteria was 6.71 ± 0.02 log CFU/mL or 83.31% of initial density. *B. subtilis* showed antibacterial activity against 4 pathogenic bacteria: *Escherichia coli* ATCC 8739 (8,00±0,76 mm), *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (9,00±0,40 mm), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (10,00±0,58 mm) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 (8,00±0,29 mm). Fibrinolytic activity was determined via clotted degradation; 25% clotted weight was lost after 2-hour incubation with 36-hour cultured broth.

TÓM TẮT

Bacillus subtilis natto là dòng vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn an toàn và có khả năng tổng hợp nattokinase, một enzyme phân giải huyết khối. Chúng có tiềm năng ứng dụng làm probiotic trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh liên quan đến tim mạch. Nghiên cứu này kiểm tra đặc tính probiotic như khả năng chịu muối mật, khả năng chịu đựng điều kiện dịch dạ dày nhân tạo và khả năng làm tan huyết khối của *B. subtilis* natto. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn chịu được các điều kiện khảo sát. Sau 3 giờ ủ trong môi trường chứa 0,3% và 0,6% muối mật; mật độ duy trì lần lượt là 96,8% và 85,5% so với ban đầu tương ứng với $7,87 \pm 0,08$ và $6,95 \pm 0,10$ log CFU/mL. Sau 3 giờ ủ ở môi trường pH 2, vi khuẩn có khả năng tồn tại với mật độ đạt $6,73 \pm 0,04$ log CFU/mL tương ứng tỷ lệ sống là 79,11% so với ban đầu. Sau 3 giờ ủ trong môi trường dịch dạ dày nhân tạo pH 2,5 có bổ sung 0,3% enzyme pepsin, mật độ duy trì $6,71 \pm 0,02$ log CFU/mL ứng với tỷ lệ 83,31% so với mật độ ban đầu. *B. subtilis* natto có khả năng kháng lại 4 loại vi khuẩn gây bệnh trong nghiên cứu này *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 với vòng vô khuẩn tương ứng là 8,0; 9,0; 10,0 và 8,0 mm. Khả năng hòa tan huyết khối được khẳng định khi dịch nuôi cấy sau 36 giờ có khả năng làm tan 25% lượng huyết khối tươi sau 2 giờ ủ.

Trích dẫn: Đoàn Thị Ngọc Thanh, Phạm Nguyễn Kim Lài và Phạm Thị Thúy Ngoan, 2020. Đặc tính probiotic và khả năng làm tan huyết khối của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(1B): 104-110.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Đột quỵ là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ ba sau các bệnh lý về tim mạch và ung thư, nhưng đứng hàng đầu về tỷ lệ tàn tật ở người trưởng thành (Feigin *et al.*, 2009). Theo Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), mỗi năm có 15 triệu người mắc đột quỵ não trên toàn cầu, trong đó có 5 triệu ca tử vong và 5 triệu người khác phải chịu đựng những khuyết tật vĩnh viễn do đột quỵ não gây ra, đặt gánh nặng lên gia đình và xã hội, đặc biệt là ở các nước đang phát triển, trong đó có Việt Nam (Feigin *et al.*, 2014). Năm 1980, Sumi Hiroyuki đã phát hiện ra natto – một loại thực phẩm truyền thống của người Nhật được lên men bằng cách ủ đậu tương nấu chín với *B. subtilis* natto. Vi khuẩn này tiết ra enzyme nattokinase có khả năng tiêu sợi huyết mạnh, enzyme trực tiếp tác động lên tơ huyết và làm tan các tơ huyết đồng thời giúp cải thiện chức năng của các enzyme làm tan huyết khối của cơ thể. Dựa trên nguồn gốc thực phẩm và hoạt tính làm tan huyết khối mạnh, nattokinase được nghiên cứu, sản xuất và thương mại hóa nhờ tác dụng phòng ngừa đột quỵ và có hiệu quả kéo dài (Sumi *et al.*, 1990). Việc bổ sung vi khuẩn có thể sản sinh nattokinase vào bữa ăn là cách hiệu quả để phòng ngừa cục máu đông - hiện tượng dẫn đến các nguy cơ tai biến đột quỵ. Bên cạnh đó, *B. subtilis* natto thuộc loài *B. subtilis* được WHO đánh giá là an toàn và được dùng trong thực phẩm. Đồng thời, vi khuẩn này cũng có tác dụng giảm aldehyde trong quá trình phân giải rượu trong máu người uống rượu giúp giải độc nhanh (Sumi *et al.*, 1995). Nhờ đó, chúng là probiotic tiềm năng trong sản xuất thực phẩm chức năng, có thể sử dụng trong phòng ngừa nguy cơ đột quỵ. Một nghiên cứu chỉ ra rằng các chủng *B. subtilis* natto có khả năng bám dính, một trong những đặc tính của vi khuẩn có lợi cho đường ruột (Le and Nguyen, 2016). Mặt khác, một chủng vi sinh vật có tính chất probiotic cần có những đặc tính có lợi cho vật chủ, đồng thời phải sống sót qua được điều kiện khắc nghiệt của dạ dày và hệ tiêu hóa của vật chủ. Giá trị pH của dạ dày người thường dao động trong khoảng 1 đến 3. Một số nghiên cứu khảo sát khả năng sống sót của chủng vi khuẩn dùng cho probiotic ở người trong điều kiện dịch dạ dày nhân tạo với giá trị pH từ 1 đến 3 hoặc từ 2 đến 2,5, nồng độ muối mật từ 0,3% đến 0,5% (Cenci *et al.*, 2006, Sangtiago *et al.*, 2008), nồng độ pepsin từ 0,2% đến 0,3% (Agung *et al.*, 2015). Vì vậy, đề tài này tiến hành khảo sát những đặc tính có lợi của chủng *B. subtilis* natto được phân lập tại Việt Nam như tính kháng khuẩn, khả năng tan huyết, tính kháng kháng sinh, đồng thời khảo sát khả năng chống chịu lại các điều kiện khắc nghiệt của hệ tiêu hóa đường ruột ở người.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu

Đậu nành (chợ Mỹ Tho) được luộc chín và chủng vi khuẩn *B. subtilis* natto (được cung cấp bởi Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh). Sau 24 giờ, vi khuẩn *B. subtilis* natto trong sản phẩm lên men được phân lập lại, làm thuần và sử dụng để khảo sát các đặc tính probiotic trong nghiên cứu này. Các chủng *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas agurinosa* ATCC 25853 được cung cấp bởi Trường Đại học Bách Khoa, Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. Kháng sinh được cung cấp bởi công ty Nam Khoa, Việt Nam. Hóa chất và môi trường được cung cấp bởi hãng Himedia, Ấn Độ.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto

Nuôi vi khuẩn *B. subtilis* natto trong 10 mL môi trường NB (10 g/L cao thịt; 10 g/L pepton; 5 g/L NaCl) lắc ở 150 rpm, 37°C trong 24 giờ. Ly tâm thu sinh khối ở 5.000 rpm, 15 phút, 4°C. Huyền phù sinh khối *B. subtilis* natto thu được trong 10 mL dung dịch đệm PBS (8,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄, pH 7,4). Sử dụng huyền phù này cho các thí nghiệm, mật số vi khuẩn được xác định theo các nghiệm thức trong thí nghiệm.

2.2.2 Khảo sát khả năng chống chịu pH thấp, dịch dạ dày nhân tạo và muối mật

Đối với điều kiện pH thấp: Hút 2 mL huyền phù vào các ống nghiệm chứa 2 mL dung dịch PBS có pH 2; pH 3 và pH 7. Ủ ở 37°C (mỗi giá trị pH lặp lại 3 lần). Sau 0, 1, 2 và 3 giờ ủ, 0,1 mL dịch vi khuẩn được đem kiểm tra mật số vi khuẩn trên môi trường thạch nutrient agar (NA) bằng phương pháp đếm khuẩn lạc. Đối với điều kiện dịch dạ dày nhân tạo: thực hiện như trên nhưng các ống nghiệm có điều kiện là pH 2,5 và chứa các nồng độ pepsin lần lượt là 0%; 0,2% và 0,3% (Agung *et al.*, 2015). Đối với điều kiện muối mật: thực hiện như trên nhưng các ống nghiệm có nồng độ muối mật là 0%; 0,3% và 0,6% (Quách Đức Tín và *ctv.*, 2013).

2.2.3 Xác định mật độ tế bào bằng phương pháp đếm khuẩn lạc

Mẫu được lấy từ các thời điểm trước và sau khi ủ ở trên được trích ra 100 µL và pha loãng bậc 10 đến 10⁻⁷. Trãi 100 µL của dịch pha loãng ở ba nồng độ cuối trên môi trường NA, ủ ở 37°C. Sau 18 giờ, tiến hành đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa và tính mật độ tế bào theo công thức $N = \frac{n.D}{v}$ với N (CFU/mL)

là mật độ tế bào, n là số khuẩn lạc trung bình ở nồng độ được chọn, V (mL) là thể tích mẫu cấy trải, D là hệ số pha loãng được chọn. Đơn vị của mật độ tế bào trong phần kết quả được biểu diễn bằng $\log N$.

2.2.4 Khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

Khảo sát khả năng của *B. subtilis* natto kháng lại 4 chủng gây bệnh *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas agurinosa* ATCC 25853. Vi khuẩn *B. subtilis* natto được nuôi cấy trong môi trường NB trong 24 giờ, ly tâm lấy dịch, bỏ sinh khối. Vi khuẩn gây bệnh cũng được nuôi cấy trong NB lỏng qua đêm, ly tâm và hòa với nước muối sinh lý sao cho dịch khuẩn có độ đục bằng 0,5 Mc Farland. Trải 100 μ L dịch khuẩn này lên bề mặt đĩa môi trường NA. Đục các lỗ thạch có đường kính 5 mm. Cho vào mỗi lỗ thạch 50 μ L dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* natto, lặp lại 3 lần với mỗi loại vi khuẩn gây bệnh, mỗi đĩa thạch có một giếng đối chứng chứa 50 μ L nước muối sinh lý. Để yên 30 phút để dịch ngấm vào thạch và đem ủ ở 37°C. Đo đường kính vòng vô khuẩn sau 24 giờ. Đường kính vòng vô khuẩn là hiệu của đường kính lớn nhất có hiện tượng vô khuẩn trừ đường kính lỗ thạch. Mỗi chủng thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy đối chứng âm là nước muối sinh lý.

2.2.5 Khảo sát khả năng kháng kháng sinh

Phương pháp đĩa khuếch tán theo hướng dẫn của Hội đồng quốc gia Hoa kỳ về các tiêu chuẩn lâm sàng phòng thí nghiệm (Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2012) được sử dụng để đánh giá tính kháng kháng sinh. *B. subtilis* natto được nuôi trong môi trường NB, lắc ở điều kiện 150 rpm, 37°C trong 24 giờ. Thu sinh khối và hòa với nước muối sinh lý để đạt độ đục bằng 0,5 Mc Farland. Dùng tăm bông vô trùng thấm vào dịch khuẩn và quét đều lên bề mặt đĩa thạch môi trường MHA (Mueller Hinton Agar – 300 g/L cao thịt bò, 17,5 g/L casein, 1,5 g/L tinh bột, 17 g/L agar pH 7,3), để khô mặt thạch trong 10 phút. Đĩa kháng sinh được đặt lên mặt thạch và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Đường kính vòng vô khuẩn được so sánh với tiêu chuẩn của CLSI, 2012 để kết luận tính nhạy cảm kháng sinh. Các loại kháng sinh sử dụng là amoxicillin 10 μ g (Ax), cefotaxime 30 μ g (Ct), ciprofloxacin 5 μ g (Ci), clindamycine 2 μ g (cL), chloramphenicol 30 μ g (Cl), erythromycin 15 μ g (Er), streptomycine 10 μ g (Sms), tetracycline 30 μ g (Te), vancomycine 30 μ g (Va). Mỗi thí nghiệm được lặp lại ba lần và tính giá trị trung bình.

2.2.6 Khảo sát khả năng hòa tan huyết khối

Nuôi vi khuẩn *B. subtilis* natto trong môi trường

NB ở 37°C, lắc 150 rpm. Sau 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ nuôi, ly tâm 5.000 rpm trong 15 phút, bỏ sinh khối, thu dịch vi khuẩn. Cân 2 g huyết heo tươi vào ống nghiệm, bổ sung thêm 2 mL dịch chiết vi khuẩn thu được ở trên vào ống nghiệm, mẫu đối chứng dương bổ sung 2 mL dịch enzyme nattokinase thương phẩm (công ty dược Hậu Giang, Việt Nam. Hòa một viên nattokinase thương phẩm có hoạt tính 670 FU/viên vào 2 mL nước muối sinh lý), mẫu đối chứng âm bổ sung 2 mL nước cất vô trùng. Ủ ở 37°C, sau 2 giờ và 4 giờ, cân lại khối lượng khối huyết còn lại và tính tỷ lệ hòa tan huyết khối. Mỗi thí nghiệm lặp lại ba lần (Lê Thị Bích Phượng và *ctv.*, 2012).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Khả năng chống chịu môi trường pH thấp

Chủng *B. subtilis* natto có khả năng sống sót trong điều kiện pH thấp, mật độ tế bào sống sót sau 3 giờ ủ ở giá trị pH thấp duy trì ở mức 10^6 CFU/mL. Giá trị pH 7 thích hợp cho vi khuẩn phát triển, mật độ tế bào sau 3 giờ ủ là $8,35 \pm 0,06 \log$ CFU/mL, tương ứng với tỷ lệ 98,24% so với mật độ ban đầu là $8,50 \pm 0,09 \log$ CFU/mL. Tại giá trị pH 3, tỷ lệ tế bào sống sót sau 1 giờ lên đến 98,16% tương ứng với mật độ $8,35 \pm 0,04 \log$ CFU/mL. Sau 3 giờ ủ, tỷ lệ sống giảm xuống còn 81,11% tương ứng với mật độ vi khuẩn $6,90 \pm 0,05 \log$ CFU/mL. Trong một nghiên cứu khác, khi kiểm tra một số hoạt tính probiotic của chủng *B. subtilis* natto cho thấy khả năng sống sót chủng vi khuẩn sau 2 giờ ở pH 3 là 81,15% (Huynh and Nguyen, 2016). Trong khi kết quả của đề tài cho thấy vi khuẩn còn duy trì đến 92,98% sau 2 giờ ủ, và sau 3 giờ, tỷ lệ sống đạt 81,11% so với ban đầu.

Tại giá trị pH 2, đây được xem là điều kiện pH khắc nghiệt, và là nhân tố chọn lọc cho những vi khuẩn chịu acid và có thể tồn tại trong dạ dày. Khi vi sinh vật rơi vào môi trường có pH thấp, các protein kênh màng sẽ bị tổn hại, nước và các chất dinh dưỡng ra vào màng không được điều hòa, áp suất thẩm thấu của màng thay đổi, enzyme nội bào bị ức chế, pH càng thấp, màng tế bào sẽ càng nhanh chóng bị phá vỡ dẫn đến trao đổi chất bị đình trệ từ đó dẫn đến các tế bào sẽ bị chết đi (Agung *et al.*, 2015). Do đó, mật độ vi khuẩn *B. subtilis* natto giảm đáng kể sau khi ủ trong môi trường có pH 2. Sau 2 giờ và 3 giờ ủ, mật độ vi khuẩn sống sót giảm lần lượt là 90,98% và 79,11%. Trong nghiên cứu về chủng *B. subtilis* B20.1 cho thấy chủng có khả năng sống sót ở pH 3 sau 3 giờ là trên 90% (Hồ Thị Trường Thy và *ctv.*, 2015)

Bảng 1: Mật độ tế bào *B. subtilis* natto trong dịch pH khác nhau sau thời gian ủ

Thời gian ủ (giờ)	pH 7		pH 3		pH 2	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,50±0,09	100,00	8,50±0,09	100,00	8,50±0,08	100,00
1	8,46±0,02	99,49	8,35±0,04	98,16	8,25±0,03	97,02
2	8,43±0,02	99,10	7,91±0,04	92,98	7,74±0,05	90,98
3	8,35±0,06	98,24	6,90±0,05	81,11	6,73±0,04	79,11

3.2 Khả năng chống chịu dịch dạ dày nhân tạo của chủng *Bacillus subtilis* natto

Chủng *B. subtilis* natto có khả năng sống sót trên 80% trong môi trường có dịch dạ dày nhân tạo với nồng độ pepsin lần lượt là 0%, 0,2% và 0,3% (Bảng 2). Tuy nhiên tỷ lệ sống sót giảm dần theo thời gian từ 0 giờ đến 3 giờ khảo sát. Trong môi trường pH 7 không chứa pepsin, mật độ tế bào vi khuẩn ban đầu là 8,05±0,01 log CFU/mL, mật độ vi khuẩn sau 3 giờ ủ không có sự khác biệt có ý nghĩa, duy trì ở mức 8,07±0,01 log CFU/mL. Trong môi trường pH 2,5 và nồng độ pepsin 0,2%, mật độ vi khuẩn sau 1 giờ ủ giảm còn 7,75±0,04 log CFU/mL tương ứng với 96,31%. Sau 2 giờ và 3 giờ ủ, số lượng tế bào vi khuẩn sống sót tiếp tục giảm xuống, còn lại lần lượt là 7,13±0,04 log CFU/mL (88,61%) và 6,75±0,06 log CFU/mL (83,93%). Trong môi trường có 0,3% pepsin, số lượng tế bào còn sống sót thấp hơn trong môi trường có 0,2% pepsin. Cụ thể,

sau 1 giờ ủ mật độ tế bào đạt 7,35±0,04 log CFU/mL (91,14%). Sau 2 giờ và 3 giờ ủ, mật số tế bào còn lại lần lượt là 7,04±0,02 log CFU/mL (87,49%) và 6,71±0,02 log CFU/mL (83,31%). Trong khi ở nghiên cứu của Huynh and Nguyen (2016) cho thấy trong điều kiện dịch dạ dày nhân tạo có nồng độ pepsin 0,3% và pH 2, mật độ vi khuẩn *B. subtilis* natto giảm từ 8,06±0,11 log CFU/mL xuống còn 4,81±0,14 log CFU/mL sau 2 giờ ủ. Mặt khác, ở điều kiện pH 3 và pepsin 0,3%, mật độ vi khuẩn trong nghiên cứu trên giảm từ 8,01±0,05 log CFU/mL còn 6,50±0,13 log CFU/mL sau 2 giờ ủ. Kết quả cho thấy chủng *B. subtilis* natto trong nghiên cứu này thích nghi tốt hơn trong điều kiện dịch dạ dày nhân tạo. Nhìn chung, nếu mật số tế bào ban đầu là 10⁸ CFU/mL, sau khi chịu tác động của dịch dạ dày nhân tạo suốt 3 giờ, mật số tế bào vẫn còn trên 10⁶ CFU/mL, đây là điều kiện tiêu chuẩn để chế phẩm vi khuẩn phát huy tác dụng trong đường tiêu hóa của người (Boylston *et al.*, 2004).

Bảng 2: Mật độ tế bào *Bacillus subtilis* natto trong dịch dạ dày nhân tạo sau thời gian ủ

Thời gian ủ (giờ)	0% Pepsin		0,2% Pepsin		0,3% Pepsin	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,05±0,01	100,00	8,05±0,02	100,00	8,05±0,01	100,00
1	8,02±0,02	99,63	7,75±0,04	96,31	7,35±0,04	91,14
2	8,04±0,02	99,83	7,13±0,04	88,61	7,04±0,02	87,49
3	8,07±0,01	100,29	6,75±0,06	83,93	6,71±0,02	83,31

3.3 Khả năng chống chịu môi trường muối mật của chủng *Bacillus subtilis* natto

Kết quả từ Bảng 3 cho thấy mật độ tế bào trong dịch chứa 0,3% muối mật sau 1 giờ giảm từ 8,13±0,07 còn 7,99±0,12 log CFU/mL, sau 2 giờ còn 7,96±0,11 log CFU/mL và sau 3 giờ còn 7,87±0,08 log CFU/mL tương ứng với 96,80% so với mật độ ban đầu. Trong môi trường có muối mật, áp suất thẩm thấu thay đổi làm ảnh hưởng đến quá trình vận chuyển các chất ra vào màng dẫn đến sinh lý thay đổi. Đồng thời, sự hiện diện của muối mật làm giảm sức căng bề mặt của các phân tử lipid trên màng tế bào, với tác động của nhu động ruột, các hạt lipid sẽ vỡ ra, cấu trúc lipoprotein xuyên màng bị phá hủy và tế bào sẽ bị diệt (Verónica and Josep, 2017). Do đó, điều kiện muối mật trong ruột thường là một tiêu chí đánh giá đặc tính probiotic của một chủng vi sinh. Trong dịch chứa 0,6% muối mật, khả

năng sống của chủng *B. subtilis* natto giảm dần theo thời gian. Mật độ ban đầu là 8,11±0,12 log CFU/mL giảm còn 7,77±0,11 log CFU/mL tương ứng với 95,57% sau 1 giờ ủ. Sau 2 giờ ủ, mật độ tế bào giảm nhẹ còn 95,20% và giảm nhiều sau 3 giờ ủ, còn lại 6,95±0,10 log CFU/mL, tương ứng với tỷ lệ là 85,49% so với giá trị ban đầu. Trong nghiên cứu của Sangtiago *et al.*, 2006, kết quả khảo sát khả năng kháng muối mật từ 51 chủng vi khuẩn gồm những vi khuẩn lactic hay *Bifidobacteria* chịu được pH 2, chỉ có 40 chủng chịu được nồng độ muối mật 0,3%. Một nghiên cứu khác cho thấy tại nồng độ muối mật 0,5%, vi khuẩn *B. clausii* giảm 30% khả năng sinh trưởng và *B. subtilis* giảm gần 40% khả năng sinh trưởng (Centi *et al.*, 2008). Trong khi đó, kết quả từ nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ sống của vi khuẩn trong dung dịch chứa 0,3% và 0,6% muối mật sau thời gian ủ 1 đến 3 giờ dao động từ 85,49% -

100,25%; mật độ tế bào sau 3 giờ ù đều trên mức 10^6 CFU/mL. Điều này có thể khẳng định *B. subtilis*

natto có khả năng sống sót ở điều kiện muối mặn trong hệ tiêu hóa của con người.

Bảng 3: Mật độ tế bào *Bacillus subtilis* natto ở các nồng độ muối mặn khác nhau

Thời gian ủ (giờ)	0% muối mặn		0,3% muối mặn		0,6% muối mặn	
	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)	Mật độ (log CFU/mL)	Tỷ lệ (%)
0	8,13 ± 0,05	100	8,13 ± 0,07	100	8,11 ± 0,12	99,75
1	8,10 ± 0,13	99,63	7,99 ± 0,12	98,28	7,77 ± 0,11	95,57
2	8,12 ± 0,03	99,88	7,96 ± 0,11	97,91	7,74 ± 0,04	95,20
3	8,15 ± 0,02	100,25	7,87 ± 0,08	96,80	6,95 ± 0,10	85,49

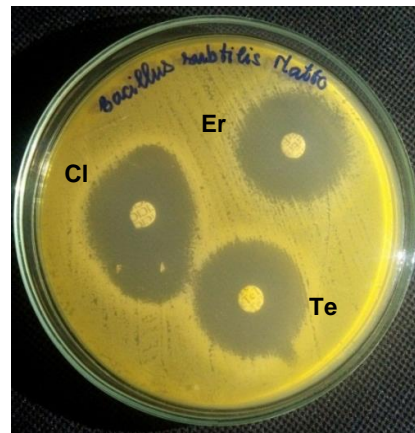
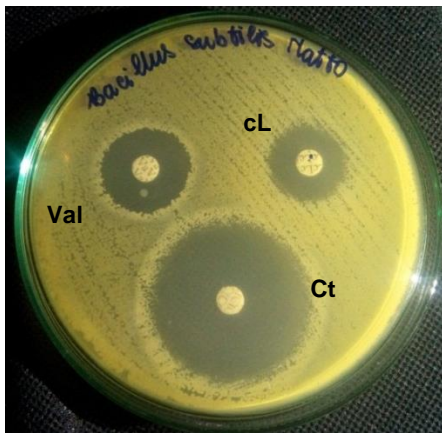
3.4 Khả năng kháng khuẩn của chủng *Bacillus subtilis* natto

Đường kính vòng kháng khuẩn của *B. subtilis* natto đối với vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853 lần lượt là $8,00 \pm 0,76$; $9,00 \pm 0,40$; $10,00 \pm 0,58$ và $8,00 \pm 0,29$. Kết quả này cho thấy, vi khuẩn *B. subtilis* natto có khả năng sinh ra các hợp chất kháng lại các vi khuẩn gây bệnh. Kết quả này không quá khác biệt với nghiên cứu của Huynh and Nguyen (2016), khi cho thấy vòng vô khuẩn do *B. subtilis* natto kháng *Salmonella* sp. và *E. coli* lần lượt là $10,64 \pm 0,16$ và $9,42 \pm 0,12$ mm.

Tuy nhiên, kết quả kháng khuẩn trong nghiên cứu này thấp hơn so với tính kháng khuẩn của các chủng *B. subtilis* từ các nghiên cứu khác. Cụ thể, trong nghiên cứu của Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền (2016) tính kháng đối với vi khuẩn *E. coli* như sau: *B. subtilis* AG 27 (18 mm), *B. subtilis* AG 60 (18 mm), *B. subtilis* VL 05 (17 mm) và *B. subtilis* VL 28 (27 mm). Đây là điểm cần cải thiện trong quá trình làm giống *B. subtilis* natto trong tương lai.

3.5 Khả năng kháng kháng sinh của chủng *Bacillus subtilis* natto

Kết quả khảo sát tính kháng kháng sinh được thể hiện trong Hình 1 và Bảng 4.



Hình 1: Đĩa giấy kháng sinh trên đĩa môi trường nuôi vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto

B. subtilis natto kháng 1/9 loại kháng sinh được khảo sát là clindamycine thuộc nhóm lincosamide (nhóm này có tác dụng ức chế sinh tổng hợp protein) và nhạy với 8/9 loại kháng sinh được khảo sát là streptomycin thuộc nhóm amino glycosides, ciprofloxacin thuộc nhóm quinolone, chloramphenicol thuộc nhóm phenicol, erythromycin thuộc nhóm macrolines, tetracycline thuộc nhóm tetracycline (5 nhóm này có tác dụng ức

chế sinh tổng hợp protein); amoxicillin thuộc nhóm β – lactam, vancomycin thuộc nhóm glycopeptide và cefotaxime thuộc nhóm cephalosporin (3 nhóm này có tác dụng ức chế tổng hợp vách tế bào vi khuẩn). Điều này cho thấy chủng vi khuẩn khảo sát an toàn, không có hiện tượng kháng nhiều kháng sinh, tránh được nguy cơ lan truyền gen kháng cho vi khuẩn khác.

Bảng 4: Đường kính vòng vô khuẩn của *Bacillus subtilis* natto với kháng sinh

Loại kháng sinh	Đường kính vòng kháng khuẩn (mm)	Độ nhạy kháng sinh			Kết quả
		Kháng R (Resistant)	Trung gian I (Intermediate)	Nhạy S (Susceptible)	
Amoxicillin	28,67±1,53	≤ 13	14 – 17	≥ 18	S
Streptomycin	17,00±1,73	≤ 11	12 – 14	≥ 15	S
Ciprofloxacin	26,00±2,65	≤ 15	16 – 20	≥ 21	S
Chloramphenicol	29,00±2,00	≤ 12	13 – 17	≥ 18	S
Erythromycin	28,67±0,58	≤ 13	14 – 22	≥ 23	S
Tetracycline	30,33±2,52	≤ 11	12 – 14	≥ 15	S
Cefotaxime	37,33±3,21	≤ 22	23 – 25	≥ 26	S
Vancomycin	20,33±3,21	≤ 14	15 – 16	≥ 17	S
Clindamycin	13,33±2,52	≤ 15	16 -18	≥ 19	R

Vi khuẩn có thể kháng với clindamycin, đây là một kháng sinh thuộc nhóm lincosamide thường được sử dụng để điều trị các ca nhiễm trùng do vi sinh vật kỵ khí, ngoài ra còn điều trị mụn trứng cá và có thể có ích trong điều trị các ca nhiễm khuẩn *Staphylococcus aureus* đã kháng với thuốc methicillin (MRSA). Do đó, trong quá trình điều trị bệnh có dùng clindamycin vẫn có thể dùng vi khuẩn

B. subtilis natto để tăng cường sức đề kháng của cơ thể trong quá trình phục hồi.

3.6 Khả năng hòa tan huyết khối của chủng *Bacillus subtilis* natto

Điểm đặc trưng của chủng *B. subtilis* natto là khả năng hòa tan huyết khối. Kết quả khảo sát cho thấy khả năng tan huyết của dịch vi khuẩn chứa Nattokinase sinh ra sau 24, 36 và 48 giờ nuôi là khác nhau (Bảng 5).

Bảng 5: Khả năng hòa tan huyết khối của dịch vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto

Mẫu	2 giờ ủ		4 giờ ủ	
	Khối lượng huyết giảm (g)	Tỷ lệ (%)	Khối lượng huyết giảm (g)	Tỷ lệ (%)
Nattokinase 670 FU	1,46±0,26	73,0	1,52±0,17	76,0
Dịch chiết sau 24 giờ nuôi	0,28±0,10	14,0	0,43±0,10	21,5
Dịch chiết sau 36 giờ nuôi	0,40±0,04	20,0	0,49±0,03	24,5
Dịch chiết sau 48 giờ nuôi	0,49±0,05	24,5	0,50±0,05	25,0
Nước cất	0,01±0,01	0,5	0,02±0,01	1,0

Vi khuẩn được nuôi cấy càng lâu trong thời gian khảo sát càng sản sinh nhiều enzyme, thể hiện qua khả năng làm tan huyết khối của các dịch chiết vi khuẩn. Dịch vi khuẩn sau 24 giờ nuôi làm giảm 24,5% khối lượng huyết ban đầu sau 4 giờ ủ. Dịch nuôi cấy sau 36 giờ có tỷ lệ hoà tan huyết khối sau 2 giờ ủ là 20% và sau 4 giờ tăng lên 24,5% tương ứng với khối lượng huyết tan 0,40±0,04 g và 0,49±0,03 g. Dịch nuôi cấy sau 48 giờ có khả năng làm tan huyết cao hơn dịch nuôi sau 36 giờ, tỷ lệ huyết tan là 24,5% sau 2 giờ ủ. Như vậy thời gian để vi khuẩn sản sinh nhiều enzyme khoảng từ 36 đến 48 giờ. Lê Thị Bích Phượng và ctv. (2012) kết luận rằng 40 giờ là thời gian thích hợp để vi khuẩn *Bacillus sp.*7.2 và *Bacillus* NP3 sản sinh enzyme cao nhất trên môi trường hạt đậu nành. Nattokinase sinh ra trong nghiên cứu trên có hoạt tính tương đương 470 FU/g. Đáng chú ý rằng, khi pha loãng hàm lượng của viên enzyme nattokinase thương phẩm tương ứng với 111,7 FU, khả năng làm tan huyết của dịch enzyme này tương tự với dịch vi khuẩn sau khi

nuôi 36 giờ. Kết quả này cho thấy chủng vi khuẩn khảo sát có khả năng sinh nattokinase làm tan huyết khối nhưng chưa có hoạt tính cao. Do đó, điều kiện nuôi cấy cần được khảo sát để vi khuẩn sản sinh nattokinase nhiều hơn, như việc nuôi trong 45°C, pH 5,0 sẽ cho lượng enzyme cao hơn (Kawther et al., 2015).

4 KẾT LUẬN

Vi khuẩn *B. subtilis* natto được khảo sát có khả năng sống sót trong các điều kiện khắc nghiệt như môi trường pH thấp, dịch dạ dày nhân tạo, dịch muối mật, có khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh, kháng lại kháng sinh và khả năng hòa tan huyết khối. Với mật độ ban đầu là 10⁸ CFU/mL, sau thời gian 3 giờ ủ trong các môi trường có điều kiện mô phỏng điều kiện dạ dày nhân tạo, mật độ vi khuẩn vẫn duy trì trên 10⁶ CFU/mL, mật độ này đảm bảo cho vi khuẩn phát huy tác dụng có lợi cho cơ thể. Ngoài ra, vi khuẩn khảo sát có khả năng kháng lại 4 chủng vi khuẩn gây bệnh thông thường và chỉ kháng 1/9 loại

kháng sinh khảo sát. Đặc biệt, chủng vi khuẩn khi sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy có thể sản sinh nattokinase làm tan huyết khối. Những đặc tính trên cho thấy chủng *B. subtilis* natto có tiềm năng để sản xuất probiotic hoặc làm chất bổ sung cho thực phẩm chức năng, góp phần giảm thiểu các bệnh tai biến mạch máu não, đột quỵ do huyết khối và bảo vệ sức khỏe cộng đồng.

LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn Bộ môn Công nghệ Sinh học Trường Đại học Bách Khoa đã cung cấp các chủng giống vi khuẩn dùng trong đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agung, Y.I.B., Tyas, U. and Endang, S.R., 2015. Resistance of lactic acid bacteria isolated from Indonesian fermented foods in simulated gastric juice and bile solution. *Jurnal Virgin*. 1 (2): 134 – 141.

Boylston, T.D., Vinderola, C.G., Ghodusi, H.B. and Reinheimer, J.A., 2004. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*. 14 (5): 375–387.

Cenci, G., Trotta, F. and Caldini, G., 2006. Tolerance to challenges miming gastrointestinal transit by spores and vegetative cells of *Bacillus clausii*. *Journal of Applied Microbiology*. 101 (2006): 1208 – 1215.

Feigin, V.L., Lawes, C.M., Bennett, D.A., Barker-Collo S.L. and Parag V., 2009. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population- based studies: a systematic review. *The Lancet Neurology*. 8 (4): 355 – 369.

Feigin, V.L., Forouzanfar, M.H., Krishnamurthi, R., et al., 2014. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 383 (9913): 245 – 254.

Hồ Thị Trường Thy, Nguyễn Nữ Trang Thùy và Võ Minh Sơn, 2015. Khảo sát một số đặc tính chủng *Bacillus subtilis* B20.1 làm cơ sở cho việc sản xuất probiotic phòng bệnh gan thận mỡ do *Edwardseilla ictaluti* trên cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) nuôi thâm canh. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp*. 2: 225 – 233.

Huynh, T.H.N. and Nguyen, T.H., 2016. Examining Some Probiotics Activities of *Bacillus subtilis*

natto, *International Journal of Modern Engineering Research*. 6 (5): 33 – 37.

Kawther, I.E., Hanan, M.I., Elrashied, E.E. and Hassan, B.E., 2015. Optimization of Culture Conditions to Enhance Nattokinase Production Using RSM. *American Journal of Microbiological Research*. 3 (5): 165 – 170.

Le, V.H. and Nguyen, T.H., 2016. Survey and determination of probiotic activity of *Bacillus subtilis* natto strain. *International Journal of Modern Engineering Research*. 6 (1): 73 – 78.

Lê Thị Bích Phương, Võ Thị Hạnh, Trần Thanh Phong, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân và 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.

Lê Thị Hải Yến và Nguyễn Đức Hiền, 2016. Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Nông nghiệp*. 2: 26 – 32.

Quách Đức Tính, Tống Thành Trung, Nguyễn Ngọc Duy và Nguyễn Thúy Hương, 2013. Khảo sát một số hoạt tính probiotic của Kefir chanh dây truyền thống và Kefir chanh dây bổ sung *Lactobacillus casei* VTCC186. *Science and Technology Development*. 16 (3): 40 – 47.

Sangtiago, R.M., Alberto, M., Marias, J.B., Francisco, P.N. and Maria, G.C., 2008. Screening of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria* for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*. 80 (3): 715 – 721.

Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K. and Hiratani, H., 1990. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of Nattokinase. *Acta Haematologica*. 84 (3): 139-143.

Sumi, H., Yatagai, C., Wada, H., Yoshida, E. and Maruyana, M., 1995. Effect of *Bacillus natto* - fermented product (BIOZYME) on blood alcohol, aldehyde concentrations after whisky drinking in human volunteers, and acute toxicity of acetaldehyde in mice. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison*, 30 (2): 69 – 79.

Verónica, U. and Josep, C., 2017. Interactions between bacteria and bile salts in the gastrointestinal and hepatobiliary tracts. *Frontiers in Medicine*, 4 (163): 1 – 13.