

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NAM CẦN THƠ**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ THỬ  
NGHIỆM VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH  
ENZYME NATTOKINASE VÀ ACID  
GLUCURONIC**

**Mã số: (C21.01)**

**Chủ nhiệm đề tài: ThS. Lý Huỳnh Liên Hương**

**Thành viên: ThS Tô Thị Ngọc Anh  
ThS. Lê Văn Ril**

**Năm 2024**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NAM CẦN THƠ**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP CƠ SỞ**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ THỬ  
NGHIỆM VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH  
ENZYM NATTOKINASE VÀ ACID  
GLUCURONIC**

**Mã số: (C21.01)**

**Chủ nhiệm đề tài: ThS. Lý Huỳnh Liên Hương**

**Thành viên: ThS Tô Thị Ngọc Anh  
ThS. Lê Văn Ril**

**Năm 2024**

## MỤC LỤC

MỤC LỤC BẢNG.....	III
MỤC LỤC HÌNH.....	III
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT .....	IV
DANH MỤC TỪ TIẾNG ANH .....	IV
TÓM TẮT.....	V
ABSTRACT.....	VI
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PHẦN 1: MỞ ĐẦU .....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.1 GIỚI THIỆU VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. ....	3
1.1.1 Đặc điểm và vai trò của vi khuẩn <i>Bacillus</i> trong tự nhiên .....	3
1.1.2 Đặc điểm của vi khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> .....	4
1.1.3 Phân loại khoa học vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	7
1.2 GIỚI THIỆU VI KHUẨN SINH ACID GLUCURONIC .....	8
1.2.1 Đặc điểm phân bố.....	8
1.2.2 Đặc điểm hình thái và sinh hóa .....	9
1.2.3 Phân loại khoa học vi khuẩn acetic .....	10
1.3 HUYẾT KHỐI VÀ TÁC ĐỘNG CỦA STRESS OXY HÓA ĐỐI VỚI SỨC KHỎE... 11	
1.3.1 Huyết khối .....	11
1.3.2 Phân loại huyết khối.....	11
1.3.3 Cơ chế hình thành huyết khối.....	12
1.3.4 Biểu chứng của bệnh huyết khối .....	17
1.4 VAI TRÒ CỦA CHẤT KHÁNG OXY HÓA ĐỐI VỚI CƠ THỂ NGƯỜI..... 18	
1.4.1 Chất kháng oxy hóa .....	18
1.4.2 Cơ chế chất kháng oxy hóa bảo vệ cơ thể trước stress oxy hóa .....	19
1.4.3 Mối quan hệ giữa stress oxy hóa và ung thư .....	20
1.4.4 Mối quan hệ giữa stress oxy hóa và xơ vữa động mạch.....	22
1.5 TIỀM NĂNG LY GIẢI HAYED KHỐI CỦA ENZYME NATTOKINASE .....	23
1.5.1 Đại cương về enzyme nattokinase.....	233
1.5.2 Cơ chế tác dụng của nattokinase trên huyết khối .....	255
1.5.3 Khả năng ly giải huyết khối của enzyme nattokinase .....	277
1.6 TIỀM NĂNG LY GIẢI HUYẾT KHỐI CỦA ACID GLUCURONIC.....	277
1.6.1 Đại cương về acid glucuronic.....	277
1.6.2 Khả năng kháng oxy hóa của acid glucuronic.....	29
1.6.3 Khả năng hỗ trợ làm tan huyết khối của của acid glucuronic .....	30
1.7 TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC LIÊN QUAN ĐỀ TÀI..... 30	
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP VÀ PHƯƠNG TIỆN NGHIÊN CỨU .ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.8	
2.1 THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU .....	388
2.1.1 Thời gian nghiên cứu.....	388
2.1.2 Địa điểm nghiên cứu.....	388
2.2 VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU .....	388
2.2.1 Nguồn phân lập vi khuẩn.....	388
2.2.2 Dụng cụ và thiết bị .....	388
2.3 SỐ ĐỒ NGHIÊN CỨU .....	39
2.4 PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. ....	400
2.4.1 Phân lập vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b> 0
2.4.2 Định tính khả năng ly giải fibrin của vi khuẩn trên đĩa fibrin .....	422
2.4.3 Đánh giá hoạt tính phân giải huyết khối của enzyme ngoại bào .....	433

2.4.4 Định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. có khả năng ly giải huyết khối cao.....	433
2.4.5 Xác định trình tự mã hóa nattokinase của vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	444
2.5 PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN SINH ACID GLUCURONIC.....	<b>Error!</b>
<b>Bookmark not defined.4</b>	
2.5.1 Phân lập vi khuẩn sinh acid glucuronic .....	44
2.5.2 Tuyển chọn dòng vi khuẩn sinh acid glucuronic cao .....	46
2.5.3 Định danh vi khuẩn sinh acid glucuronic .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.6 PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH THỐNG KÊ .....	47
<b>PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>48</b>
3.1 KHẢ NĂNG LÀM TAN HUYẾT KHỐI CỦA VI KHUẨN <i>Bacillus</i> sp. ....	48
3.1.1 Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. ....	48
3.1.2 Định tính khả năng ly giải fibrin của vi khuẩn trên đĩa fibrin.....	50
3.1.3 Đánh giá hoạt tính phân giải huyết khối của enzyme ngoại bào .....	51
3.1.4 Định danh vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp. có khả năng ly giải huyết khối cao.....	53
3.1.5 Xác định trình tự mã hóa nattokinase của vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.....	54
3.2 HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN SINH ACID GLUCURONIC .....	55
3.3.1 Xác định vi khuẩn sinh acid glucuronic trong mẫu phân lập .....	55
3.3.2 Tuyển chọn vi khuẩn sinh acid glucuronic.....	56
3.3.3 Định danh vi khuẩn sinh acid glucuronic .....	57
<b>PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....</b>	<b>59</b>
4.1 KẾT LUẬN .....	59
4.2 KIẾN NGHỊ .....	60
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO.....</b>	<b>61</b>
Tiếng Việt.....	61
Tiếng Anh.....	62

## MỤC LỤC BẢNG

<b>Bảng 1.1</b> Đặc điểm sinh hóa của <i>Bacillus subtilis</i> .....	7
<b>Bảng 1.2</b> Các thuốc sử dụng trong dự phòng huyết khối .....	18
<b>Bảng 2.1</b> Các thí nghiệm sinh hóa dùng trong định danh <i>Bacillus</i> sp. ....	41
<b>Bảng 3.1</b> Khả năng hình thành vòng tan máu phân giải fibrin của các dòng vi khuẩn. ....	50
<b>Bảng 3.2</b> Hoạt tính phân giải fibrin của các chủng vi khuẩn phân lập .....	51
<b>Bảng 3.3</b> So sánh độ tương đồng của chủng phân lập TO46 với cơ sở dữ liệu NCBI .....	55
<b>Bảng 3.4</b> Đặc điểm của các dòng vi khuẩn tạo màng trên môi trường LGIP .....	57
<b>Bảng 3.5</b> Hàm lượng acid glucuronic ( $\mu\text{g/mL}$ ) của các dòng vi khuẩn .....	58

## MỤC LỤC HÌNH

<b>Hình 1.1</b> Hình thái vi khuẩn <i>B. subtilis</i> 168 dưới KHV điện tử .....	5
<b>Hình 1.2</b> Trục khuẩn <i>Bacillus subtilis</i> dưới KHV .....	7
<b>Hình 1.3</b> Vi khuẩn <i>Gluconacetobacter xylinus</i> .....	10
<b>Hình 1.4</b> Quá trình đông máu .....	15
<b>Hình 1.5</b> Biểu chứng của bệnh huyết khối .....	18
<b>Hình 1.6</b> Xơ vữa động mạch làm hẹp lòng mạch máu .....	23
<b>Hình 1.7</b> Cơ chế xúc tác điển hình của một Serine protease (chymotrypsin) .....	24
<b>Hình 1.8</b> Các bước xúc tác cơ bản của nhóm serine protease .....	25
<b>Hình 1.9</b> Con đường phân cắt fibrin của enzyme nattokinase .....	26
<b>Hình 1.10</b> Công thức cấu tạo của acid glucuronic .....	28
<b>Hình 1.11</b> Sự oxy hóa glucose tạo thành acid glucuronic .....	29
<b>Hình 2.1</b> Sơ đồ nghiên cứu thu nhận sản phẩm lên men phối hợp có khả năng hỗ trợ làm tan huyết khối và khử gốc tự do .....	39
<b>Hình 2.2</b> Vòng phân giải trên đĩa thạch thrombin-fibrinogen .....	43
<b>Hình 2.3</b> Phản ứng màu Carbazole âm tính (A) và dương tính (B,C) .....	46
<b>Hình 2.4</b> Sơ đồ tiên hành mô hình gây huyết khối đuôi chuột .....	58
<b>Hình 3.1</b> Biểu đồ so sánh sự tương quan giữa hoạt tính enzyme nattokinase và đường kính vòng phân giải của vi khuẩn .....	53
<b>Hình 3.2</b> Tế bào vi khuẩn <i>B. subtilis</i> TO46 nhuộm bằng kỹ thuật Ziehl – Neelsen .....	55
<b>Hình 3.3</b> Điện di để đánh giá gene mã hóa nattokinase .....	56
<b>Hình 3.4</b> Sự tương đồng của đoạn mã gen mã hóa enzyme phân giải sợi trong <i>Bacillus subtilis</i> TO46 với các trình tự đã được công bố trên NCBI .....	56
<b>Hình 3.5</b> So sánh trình tự 16S rDNA của vi khuẩn TD6 và vi khuẩn <i>Gluconacetobacter nataicola</i> (mã số NR_041012.1) .....	59

## DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

KHV - Kính hiển vi  
XVĐM - Xơ vữa động mạch  
PAI-1: Chất ức chế chất kích hoạt plasminogen-1  
DIC: Hội chứng đông máu rải rác trong lòng mạch  
TTP: Xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối  
NOAs: thuốc chống đông máu đường uống mới

## DANH MỤC TỪ TIẾNG ANH

WHO - World Health Organization  
DNA - Deoxyribonucleic acid  
CFU - Colony-forming unit  
NA - Nutrient Agar  
mRNA - Messenger RNA  
MR - Methyl Red  
VP - Voges-Proskauer  
GluA - Glucuronic acid  
DIC - Disseminated Intravascular Coagulation  
TTP - Thrombotic Thrombocytopenic Purpura  
NOAs - New oral anticoagulants  
SOD - Superoxide dismutase  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
DFP - Di-isopropyl phosphorofluoridate  
PMSF - Phenylmethanesulphosphate  
PA - Plasminogen activator  
PAI-1 - Plasminogen activator inhibitor-1  
t-PA - Tissue plasminogen activator  
ACE - Angiotensin-converting enzyme  
ACEI - Angiotensin-converting enzyme inhibitors  
HA - Hyaluronan  
LDL-C - Low-density lipoprotein cholesterol  
RAA - Renin-angiotensin-aldosterone  
RSM - Response surface methodology  
CCD - Central composite design  
LGIP - Luria-Bertani-Glycerol-IPTG-Petroleum ether  
YPGD - Yeast extract-Peptone-Glucose-Dextrose

## TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã thành công trong việc phân lập và định danh các dòng vi khuẩn có khả năng sản xuất enzyme nattokinase và acid glucuronic từ các nguồn mẫu bản địa. Chúng tôi đã phân lập thành công 46 dòng vi khuẩn có đặc điểm hình thái giống *Bacillus* sp. và 17 dòng vi khuẩn có đặc điểm hình thái của vi khuẩn sinh acid glucuronic.

Đặc biệt, dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* TO46 đã được xác định là có hoạt tính enzyme nattokinase cao nhất. Việc phân tích gene 16S rRNA cho thấy dòng vi khuẩn này có độ tương đồng 99,5% với *Bacillus subtilis* đã được biết đến có khả năng sản xuất enzyme nattokinase. Thông tin về dòng vi khuẩn TO46 và khả năng sản xuất enzyme nattokinase đã được đăng ký trong cơ sở dữ liệu NCBI với số đăng ký 2788923.

Bên cạnh đó, chúng tôi đã phân lập và tuyển chọn được dòng vi khuẩn *Gluconacetobacter nataicola* TD6 có hàm lượng acid glucuronic cao nhất. Việc phân tích gene cho thấy dòng vi khuẩn này có độ tương đồng 100% với *Gluconacetobacter nataicola*. Acid glucuronic được sản xuất bởi dòng vi khuẩn này đã được tinh chế và xác định sự hiện diện bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Các dòng vi khuẩn đã phân lập từ nghiên cứu này có tiềm năng rất lớn để ứng dụng trong lĩnh vực lên men và thử nghiệm hoạt tính sinh học, nhằm tạo ra các chế phẩm sinh học từ vi sinh vật nhằm hỗ trợ phòng và điều trị bệnh, đồng thời bảo vệ và nâng cao sức khỏe con người.

## ABSTRACT

This study has successfully isolated and identified bacterial strains capable of producing nattokinase enzyme and glucuronic acid from native sample sources. We have successfully isolated 46 bacterial strains with morphological characteristics similar to *Bacillus* sp., as well as 17 bacterial strains with morphological characteristics of glucuronic acid-producing bacteria.

In particular, *Bacillus subtilis* TO46 strain has been identified as having the highest activity of nattokinase enzyme. Analysis of the 16S rRNA gene showed that this bacterial strain has a 99.5% similarity to *Bacillus subtilis*, which is known to have the ability to produce nattokinase enzyme. Information about the TO46 strain and its ability to produce nattokinase enzyme has been registered in the NCBI database under the registration number 2788923.

Additionally, we have isolated and selected the *Gluconacetobacter nataicola* TD6 strain with the highest content of glucuronic acid. Gene analysis revealed that this bacterial strain has a 100% similarity to *Gluconacetobacter nataicola*. The glucuronic acid produced by this bacterial strain has been refined and its presence has been determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) technique.

The isolated bacterial strains from this study have great potential for application in fermentation and biological activity testing, aiming to create bio-based products from microorganisms to support disease prevention and treatment, as well as to protect and improve human health.