

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 THU NHẬN CHẾ PHẨM CÓ KHẢ NĂNG PHÂN  
GIẢI SỢI FIBRIN GÂY HUYẾT KHỐI TỪ VI KHUẨN SINH  
ENZYME NATTOKINASE**

**Mã số: (C21.02)**

**Chủ nhiệm đề tài: ThS. TÔ THỊ NGỌC ANH**

**Thành viên:**

- 1. ThS. LÝ HUỲNH LIÊN HƯƠNG**
- 2. ThS. LÊ VĂN RIL**

**Cần Thơ, 08 tháng 7 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 THU NHẬN CHẾ PHẨM CÓ KHẢ NĂNG PHÂN  
GIẢI SỢI FIBRIN GÂY HUYẾT KHỐI TỪ VI KHUẨN SINH  
ENZYME NATTOKINASE**

**Mã số: (C21.02)**

**Chủ nhiệm đề tài: ThS. TÔ THỊ NGỌC ANH**

**Thành viên:**

- 1. ThS. LÝ HUỲNH LIÊN HƯƠNG**
- 2. ThS. LÊ VĂN RIL**

**Cần Thơ, 08 tháng 7 năm 2024**

## MỤC LỤC

<b>DANH MỤC HÌNH .....</b>	<b>IV</b>
<b>DANH MỤC BIỂU ĐỒ .....</b>	<b>IV</b>
<b>DANH MỤC BẢNG .....</b>	<b>V</b>
<b>DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT .....</b>	<b>V</b>
<b>TÓM TẮT .....</b>	<b>VI</b>
<b>ĐẶT VẤN ĐỀ .....</b>	<b>1</b>
<b>PHẦN 1: GIỚI THIỆU.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 GIỚI THIỆU VỀ ENZYME NATTOKINASE (NK).....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Cấu trúc và tính chất hóa học của NK .....	3
1.1.2 Cơ chế hoạt động .....	5
1.1.3 Ứng dụng và tính an toàn của NK .....	7
<b>1.2 SẢN XUẤT NATTOKINASE.....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Vi khuẩn lên men sinh NK.....	10
1.2.2 Sản xuất NK bằng phương pháp lên men rắn.....	11
1.2.3 Các yếu tố ảnh hưởng quá trình lên men sinh tổng hợp NK .....	13
<b>1.3 PHƯƠNG PHÁP ĐÁP ỨNG BỀ MẶT (RSM) .....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Giới thiệu về phương pháp RSM.....	14
1.3.2 Ứng dụng phương pháp RSM trong nghiên cứu trên thế giới.....	15
<b>1.4 TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC .....</b>	<b>16</b>
<b>PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP VÀ PHƯƠNG TIỆN.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Phương tiện.....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Địa điểm và thời gian thực hiện thí nghiệm .....	19
2.1.2 Dụng cụ:.....	19

2.1.3 Thiết bị: .....	19
2.1.4 Hóa chất: .....	19
<b>2.2 Phương pháp nghiên cứu .....</b>	<b>20</b>
2.2.1 Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn .....	20
2.2.2 Tối ưu hóa các điều kiện để lên men sinh tổng hợp NK .....	21
2.2.3 Phân lập, tinh sạch NK từ dịch lên men vi khuẩn .....	24
2.2.4 Thử nghiệm sự phân giải fibrin invitro và thử nghiệm khả năng làm tan huyết khối trên chuột thí nghiệm.....	27
2.2.5 Phương pháp phân tích .....	29
2.2.6 Phương pháp xử lý số liệu .....	32
<b>PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Khảo sát các yếu tố đơn ảnh hưởng đến hoạt tính NK.....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Nguồn carbon và hàm lượng carbon (%) bổ sung.....	33
3.1.2 Nguồn nitơ và hàm lượng nitơ bổ sung.....	34
3.1.3 Mật độ vi khuẩn ban đầu .....	35
3.1.4 Nhiệt độ.....	37
3.1.5 pH môi trường.....	38
3.1.6 Yếu tố thời gian.....	38
<b>3.2 Tối ưu hóa quá trình lên men sinh tổng hợp NK .....</b>	<b>40</b>
3.2.1 Thiết kế ma trận sàng lọc Plackett-Burman.....	40
3.2.2 Tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án đáp ứng có tâm (RSM – CCD).....	42
<b>3.3 Thu nhận enzyme NK.....</b>	<b>45</b>
3.3.1 Thu nhận NK từ quá trình tủa ammonium sulfate.....	45

3.3.2 Tinh sạch NK bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion âm.....	46
<b>3.4 Thử nghiệm sự phân giải fibrin invitro và trên chuột thử nghiệm .....</b>	<b>47</b>
3.4.1 Thử nghiệm sự phân giải fibrin invitro.....	48
3.4.2 Thử nghiệm ly giải huyết khối trên chuột thí nghiệm .....	48
<b>PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....</b>	<b>52</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>54</b>

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1 Thực phẩm lên men Natto.....	3
Hình 1.2 Cấu trúc hóa học của NK.....	5
Hình 1.3 Con đường phân cắt fibrin của enzyme NK.....	6
Hình 1.4 Hai cách biểu diễn mặt đáp ứng.....	15
Hình 2.1 Quy trình trích ly dịch enzyme thô.....	25
Hình 3.1 Biểu đồ Pareto.....	40
Hình 3.2 Kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn sau sắc ký trên cột Q-FF.....	46
Hình 3.3 Sự thay đổi màu sắc trên đuôi chuột theo thời gian sau khi tiêm $\kappa$ -carrageenan.....	49
Hình 3.4 Hình ảnh cắt lát mô tai chuột với các mạch máu cho thấy huyết khối.....	50

## DANH MỤC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 3.1 Ảnh hưởng của nguồn carbohydrate và hàm lượng carbohydrate bổ sung (%) đến hoạt tính của NK (FU/ml).....	34
Biểu đồ 3.2 Ảnh hưởng của nguồn nitrogen và hàm lượng nitrogen bổ sung (%) đến hoạt tính NK (FU/ml).....	35
Biểu đồ 3.3 Ảnh hưởng nhiệt độ lên men đến hoạt tính NK (FU/ml).....	37
Biểu đồ 3.4 Ảnh hưởng pH môi trường đến hoạt tính NK (FU/ml).....	38
Biểu đồ 3.5 Phần trăm tan máu theo thời gian (giờ).....	48
Biểu đồ 3.6 Sự thay đổi hàm lượng FDP (pg/ml) và D-dimer (ng/ml) trên các nhóm chuột khác nhau.....	49

## DANH MỤC BẢNG

<b>Bảng 2.1 Thành phần môi trường tăng sinh .....</b>	<b>19</b>
<b>Bảng 2.2 Thành phần môi trường Trypic Soybean Agar (TSA) .....</b>	<b>19</b>
<b>Bảng 2.3 Kế hoạch thực nghiệm (dự kiến) tối ưu hóa hàm lượng enzyme NK .....</b>	<b>23</b>
<b>Bảng 3.1 Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến hoạt tính NK (FU/ml) .....</b>	<b>36</b>
<b>Bảng 3.2 Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy (giờ) đến hoạt tính NK .....</b>	<b>39</b>
<b>Bảng 3.3 Khoảng giá trị khảo sát của các thông số tối ưu .....</b>	<b>40</b>
<b>Bảng 3.4 Thiết kế thí nghiệm Plackett-Burman .....</b>	<b>41</b>
<b>Bảng 3.5 Thiết kế và kết quả thí nghiệm RSM-CCD .....</b>	<b>43</b>
<b>Bảng 3.6 Mức ảnh hưởng và độ tin cậy các yếu tố .....</b>	<b>44</b>
<b>Bảng 3.7 Kết quả tủa phân đoạn muối ammonium sulfate ở nồng độ từ 40 – 80% .</b>	<b>46</b>
<b>Bảng 3.8 Đánh giá kết quả tinh sạch NK bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion</b>	<b>47</b>

## DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

AS	Ammonium sulfate
CCD	Central Composite Design
EDTA	ethylenediamin tetraacetic acid
NK	Nattokinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PS	Phosphatydul serine
RSM	Response surface methodology
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis



## TÓM TẮT

Nghiên cứu đã thành công trong việc khảo sát những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh enzyme nattokinase (NK) của chủng vi khuẩn CO phân lập từ bản địa là: nguồn carbohydrate và nồng độ bổ sung, nguồn đạm và hàm lượng đạm bổ sung, pH, mật độ vi khuẩn ban đầu, nhiệt độ lên men và thời gian nuôi cấy. Dựa trên kết quả khảo sát, nghiên cứu thiết kế được mô hình Plackett-Burman sàng lọc được 4 yếu tố ảnh hưởng thực sự đến quá trình lên men sinh NK là: pH, thời gian lên men, nguồn đạm peptone và mật độ vi khuẩn chủng ban đầu. Từ kết quả sàng lọc, mô hình tối ưu hóa bằng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án cấu trúc có tâm (RSM – CCD) được xây dựng cho kết quả tại: pH 5,5, mật độ vi khuẩn ban đầu là  $10^4$  CFU/ml, peptone 2,8% với thời gian nuôi cấy là 31 giờ cho giá trị hoạt tính NK cao nhất theo mô hình  $Y_{max} = 199,23$  FU/ml và giá trị thực nghiệm là  $Y'_{max} = 191,26$  FU/ml.

Nghiên cứu đã tách chiết được NK từ dịch lên men vi khuẩn CO bằng phương pháp tủa ammonium tại nồng độ 60%, với hiệu suất thu hồi đạt giá trị cao nhất là 61,54%. Enzyme sau khi tủa được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion âm với hiệu suất thu hồi đạt cao nhất là 21,81% và hoạt tính riêng là 390,63 FU/g.

Enzyme tinh sạch được sử dụng để khảo sát khả năng ly giải huyết khối trên mô hình chuột được tiêm  $\kappa$ -carrageenan để tạo huyết khối trong vi mạch. Khi so sánh khả năng ly giải huyết khối giữa các liều dùng NK: thấp (20 FU/kg), trung bình (30 FU/kg), cao (40 FU/kg) với Aspirin (3 mg/kg), kết quả ghi nhận cho thấy NK (3 mg/kg) liều cao có khả năng ly giải huyết khối tương tự sử dụng Aspirin (3 mg/kg) với chỉ số FDP và D-dimer đo được lần lượt là 2,04 pg/ml và 9,08 ng/ml.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới, bệnh tim mạch và đột quỵ (như nghẽn mạch phổi, nghẽn tĩnh mạch sâu, nhồi máu cơ tim, tai biến mạch máu não) là hai nguyên nhân hàng đầu gây tử vong không chỉ ở Việt Nam mà còn ở trên toàn thế giới trong nhiều năm liền. Một trong những nguyên nhân quan trọng của bệnh tim mạch là tắc nghẽn mạch máu, với tình trạng ứ đọng mạch máu với cục máu đông, có thể dẫn tới nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ và cả hai đều dẫn đến tử vong. Trước đây, để ngăn chặn các cơn đau tim do nghẽn mạch, người ta thường sử dụng một số thuốc có bản chất hóa học như aspirin, ticlopidine, hoặc phẫu thuật để lấy hoặc thông tắc nghẽn, hoặc tạo ra mạch phụ để cấp mới máu. Tuy nhiên, con đường điều trị bằng thuốc hóa học không làm tan huyết khối mà là làm loãng máu để máu di chuyển qua nơi tụ huyết khối dễ dàng hơn. Điều này sẽ phát sinh một số rủi ro không mong muốn trong quá trình điều trị. Việc điều trị bằng thuốc có phản ứng phụ ảnh hưởng đến sức khỏe bệnh nhân và gây phụ thuộc vào thuốc hóa học; các biện pháp phẫu thuật hoặc tái tạo mạch máu thường chỉ tiến hành khi bệnh đã trở nặng và thường rất tốn kém (1), (2).

Trong những năm gần đây, trên thế giới đã có một cuộc cách mạng trong liệu pháp điều trị làm tan huyết khối do những rối loạn tuần hoàn máu gây ra bằng ứng dụng các sản phẩm của vi sinh vật tạo ra như: enzyme nattokinase (NK) để phân giải các sợi fibrin trong máu mà không gây phản ứng phụ (3), (4). Ở Nhật Bản, từ lâu người dân đã được tiếp cận với các sản phẩm lên men truyền thống với thành phần chính là NK (Natto enzyme) – một peroxydase có khả năng phân giải fibrin, ngăn ngừa và xử lý cục máu đông. Tuy nhiên, các sản phẩm Natto enzyme tại thị trường Việt Nam vẫn chưa phổ biến. Các sản phẩm nhập khẩu thường có giá rất cao, đại bộ phận người dân khó tiếp cận. Trong nước có một số đơn vị cung cấp chính là Công ty tư vấn Dược quốc tế IMC (sản phẩm Nattopes) và Công ty cổ phần Dược Hậu Giang (sản phẩm Natto enzyme), USA Pharma (sản phẩm Natto Q10), nhưng các sản phẩm này hiện tại vẫn chưa được sản xuất ở Việt Nam mà chủ yếu là nhập

nguyên liệu thô từ Nhật Bản nên giá thành sản phẩm vẫn khá cao so với mặt bằng thu nhập của đại bộ phận bệnh nhân.

Với tình hình thực tế như trên, việc nghiên cứu một chế phẩm làm tan huyết khối có nguồn gốc sinh học ít tác dụng phụ và chi phí sản xuất thấp từ nguồn nguyên liệu tại chỗ được đặt ra, nhằm góp phần đưa ra những giải pháp hỗ trợ điều trị ít tác dụng phụ cùng với giá thành hợp lý hơn. Đồng thời việc nghiên cứu sản xuất toàn bộ quy trình tại chỗ giúp chủ động hơn trong quá trình sản xuất cũng như quá trình điều trị.

Từ đó, đề tài: “*Nghiên cứu thu nhận chế phẩm có khả năng phân giải sợi fibrin gây huyết khối từ vi khuẩn sinh enzyme nattokinase*” được đề xuất với mục tiêu nghiên cứu quy trình sản xuất và thu nhận enzyme NK từ nguồn giống và nguyên liệu bản địa, thông qua việc kiểm soát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men thu nhận sản phẩm để tối ưu hóa quy trình thu nhận enzyme NK và thử nghiệm đánh giá hiệu quả lâm sàng về khả năng phân giải huyết khối từ chế phẩm nghiên cứu.

### **Nội dung nghiên cứu**

- Tối ưu hóa quá trình lên men sản xuất NK bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm.
- Tách chiết và tinh sạch enzyme NK từ chế phẩm lên men.
- Thử nghiệm sự phân giải fibrin invitro và khả năng làm tan huyết khối trên chuột thí nghiệm.