

# TINH SẠCH, SẢN XUẤT CHẾ PHẨM LUMBROKINASE VÀ NGHIÊN CỨU GIỚI HẠN NHIỄM KHUẨN THEO DẠNG ĐIỂN V TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN

Nguyễn Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Trung<sup>2</sup>, Đỗ Thị Tuyên<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup> Học Viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

## TÓM TẮT

Lumbrokinase là một enzyme thủy phân fibrin gồm một nhóm isozyme có kích thước phân tử khoảng từ 25 đến 45 kDa, được nghiên cứu để sử dụng tạo ra các chế phẩm điều trị các bệnh huyết khối. Trong bài báo này, chúng tôi đã tinh sạch được enzyme lumbrokinase từ giun quế qua 3 bước tinh sạch: tủa muối ammonium sulfate nồng độ 50%, cột sắc ký lọc gel sephadex G100, cột cut off 10 kDa và 50 kDa. Kết quả trên điện di SDS-PAGE cho thấy đã thu được nhóm enzyme lumbrokinase có kích thước từ 25 kDa đến 45 kDa, hoạt tính đặc hiệu đạt 33.495 IU/mg protein. Đã tạo được bột chế phẩm lumbrokinase từ dịch enzyme tinh sạch bằng phương pháp đông khô tạo hai mẻ riêng biệt. Chế phẩm thu được đạt tiêu chuẩn thử giới hạn nhiễm khuẩn theo dược điển Việt Nam với tổng số vi sinh vật hiếu khí mẻ 1 đạt  $95 \times 10^2$  CFU/g, mẻ 2 đạt  $50 \times 10^3$  CFU/g; tổng số nấm cả hai mẻ đều đạt  $2 \times 10^1$  CFU/g; tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật đạt  $< 10^2$  CFU/g; không phát hiện *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* trong 1 g; không phát hiện *Salmonella* trong 10 g. Sau thời gian bảo quản 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng ở 4°C và nhiệt độ phòng chế phẩm lumbrokinase vẫn ổn định về chất lượng và đạt các chỉ tiêu giới hạn nhiễm khuẩn theo dược điển Việt Nam V.

*Từ khóa:* Huyết khối, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Lumbrokinase.

## MỞ ĐẦU

Rối loạn tim mạch và mạch máu dẫn đến khoảng 26 triệu ca tử vong mỗi năm trên toàn thế giới. Các rối loạn tim mạch và não không chỉ có tỷ lệ tử vong cao trên toàn cầu mà còn dẫn đến các biến chứng sau đó như tan huyết khối có thể ảnh hưởng xấu hoặc đe dọa tính mạng như nhồi máu cơ tim, huyết khối tĩnh mạch não và huyết khối tĩnh mạch (Mahendra, Pulicherla 2011). Tại Việt Nam, theo thống kê của hội tim mạch, nước ta có khoảng 16% dân số mắc các bệnh tim mạch và đột quỵ. Có nhiều nguyên nhân gây ra các bệnh tim mạch như: cao huyết áp, tràn mạch máu não, xơ cứng động mạch. Nguyên nhân chủ yếu là do cục máu đông gây tắc động mạch và cản trở lưu thông máu, do đó việc làm tan cục máu đông đóng vai trò rất quan trọng trong việc điều trị các bệnh này. Việc bào chế các thuốc để phục vụ cho việc điều trị các bệnh tim mạch là nhiệm vụ cấp thiết và vô cùng quan trọng cho ngành dược và các ngành nghiên cứu sinh y. Tuy nhiên, các thuốc tan huyết khối hiện nay chủ yếu là thuốc tiêm, gây khó khăn cho người sử dụng, giá thành cao và có nhiều tác dụng phụ không mong muốn, nên việc bào chế một loại thuốc sử dụng được đường uống, an toàn, hiệu quả, giá thành rẻ là cấp thiết. Năm 1991, Mihara và cộng sự đã nghiên cứu và phát hiện thành công một enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin cao từ giun đất *Lumbricus rubellus*, bao gồm 6 isozyme được đặt tên chung là lumbrokinase. Lumbrokinase có khả năng thủy phân rất mạnh các sợi fibrin - một loại protein có trong máu để làm tan cục máu đông trong các chứng tai biến mạch máu não. Lumbrokinase được xem là thuốc tan huyết khối đặc hiệu, sử dụng làm thuốc uống vì có thể hấp thu từ ruột vào máu và hoạt hóa hệ thống fibrin nội sinh (Mihara *et al.*, 1991). Trên thị trường hiện nay các thuốc điều trị huyết khối cũng đã được nghiên cứu và phát triển, tuy nhiên các nghiên cứu về độ an toàn hay phương pháp kiểm nghiệm các chế phẩm này chủ yếu từ các enzyme khác như nattokinase, streptokinase (Nguyễn Thanh Thảo *et al.*, 2010; Nguyễn Thị Hằng *et al.*, 2019),... việc nghiên cứu về các chế phẩm từ lumbrokinase còn hạn chế. Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tinh sạch tạo sản phẩm lumbrokinase được tách chiết từ giun quế *Perionyx excavatus* và nghiên cứu độ ổn định về chỉ tiêu vi sinh vật trong quá trình bảo quản sản phẩm nhằm hướng đến một sản phẩm thuốc điều trị bệnh huyết khối chất lượng cao, giá thành rẻ nâng cao chất lượng sống.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu và hóa chất

Giun quế *Perionyx excavatus* được xác định hình thái và phân loại theo nghiên cứu trước đây (Lê Đình Quyền *et al.*, 2013). Nguyên liệu được lựa chọn kỹ loại bỏ các con giun bị chết, giun được ngâm và rửa sạch trong nước

khoảng 4 - 5 lần, sau đó được rửa lại trong nước cất hoặc nước muối sinh lý loãng. Giun được nghiền đồng thể, chiết enzyme bằng nước cất đã khử trùng, ly tâm loại bỏ cặn thu dịch trong chứa enzyme lumbrokinase thô.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu đều ở dạng tinh khiết của các hãng uy tín như: thrombin, fibrinogen, plasmin, bộ thuốc nhuộm Gram (Merck- Đức); Bộ Kit API 20E, reagent kit (Biomerieux- Pháp); Thuốc thử N, N-dimethyl-phenylen diamin dihydroclorid (Merck- Đức)...

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật là môi trường đông khô, đã được trộn sẵn các thành phần theo đúng công thức của dược điển Việt Nam V (Hội đồng Dược Điển Việt Nam 2017): môi trường thạch casein đậu tương, môi trường lỏng casein đậu tương, môi trường thạch Sabouraud - dextrose, môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria - Mossel, môi trường muối mật violet-red, môi trường lỏng Mac-Conkey,... được mua từ hãng Schalau (Tây Ban Nha). Trong nghiên cứu có sử dụng các chủng vi sinh vật làm đối chứng dương, là các chủng vi sinh vật chuẩn của hãng Biologic (Mỹ): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

### Tinh sạch enzyme lumbrokinase

Sử dụng các cột lọc cut off 10 kDa (để cô đặc); cột cut off 50 kDa để loại bỏ các protein không mong muốn. Protein sau tinh sạch được kiểm tra trên điện di polyacrylamid 12,5% theo phương pháp điện di biến tính của Leammli và đồng tác giả (1970).

Hàm lượng protein tổng số được xác định theo phương pháp Bradford (Bradford 1976).

### Xác định hoạt tính thủy phân fibrin

Hoạt tính enzyme được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của Astrup và Mullertz, sử dụng plasmin (yếu tố thủy phân fibrin có sẵn trong cơ thể người) làm chuẩn (Astrup, Mullertz 1952). Dựa trên sự thủy phân fibrin bằng Lumbrokinase tạo vòng tròn trong suốt. Đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng. Hoạt tính thủy phân fibrin của Lumbrokinase được xác định dựa trên đường chuẩn plasmin.

#### Các bước tiến hành:

**Chuẩn bị đĩa:** Mỗi đĩa petri đường kính 10 cm chứa 10 ml dung dịch fibrinogen tinh khiết trong NaCl 0,9% (nồng độ 0,2%) được ngưng kết bằng 15  $\mu$ L thrombin (100 UI/mL). Chú ý, đĩa đặt ở vị trí phẳng, dung dịch được đổ cho đồng đều, tránh tạo bọt khí. Đĩa được để ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ để fibrin đông tụ hoàn toàn.

**Ủ phản ứng:** Nhỏ từng giọt 10  $\mu$ L dịch enzyme lên đĩa (giọt phải tròn), ủ 37°C trong 5 giờ. Khi đông tụ, fibrin có màu trắng đục, do đó, các vùng bị thủy phân trở nên trong suốt, dễ dàng quan sát bằng mắt thường. Sau 5 giờ, đo đường kính, tính diện tích vòng phản ứng. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần để lấy giá trị trung bình.

### Thử giới hạn nhiễm khuẩn

Áp dụng phương pháp đĩa thạch cho chế phẩm dùng đường uống có nguồn gốc tự nhiên, theo phụ lục 13.6, dược điển Việt Nam V (Hội đồng Dược Điển Việt Nam 2017) .

Tổng số vi sinh vật hiếu khí được đếm trên môi trường thạch casein đậu tương ở các nồng độ pha loãng  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , tổng số vi nấm được đếm trên môi trường thạch Sabouraud dextrose có bổ sung chloramphenicol ở các nồng độ  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , mỗi nồng độ tiến hành trên hai đĩa khác nhau, kết quả được lấy trung bình hai đĩa có số khuẩn lạc cao nhất và nhỏ hơn 250 CFU đối với vi sinh vật hiếu khí và dưới 50 CFU đối với nấm.

Tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật được thực hiện theo phương pháp MPN, với các nồng độ 0,1 g; 0,01 g chế phẩm trên môi trường lỏng tăng sinh Enterobacteria –Mossel, sau đó cấy chuyển sang thạch muối mật violet-red.

*Staphylococcus aureus* được phân lập trong 1 g chế phẩm qua quá trình tăng sinh trên môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển lên môi trường thạch muối manitol. *Escherichia coli* được phân lập trong 1 g chế phẩm qua quá trình tăng sinh trên môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển qua các môi trường lỏng Mac-conkey, thạch Mac-conkey, thạch Levine - eosin - xanh methylen, nhuộm Gram, sử dụng kit Api 20E của hãng Biomerieux. *Salmonella* được phân lập trong 10 g chế phẩm qua quá trình tăng sinh trên môi trường lỏng casein đậu tương, cấy chuyển qua các môi trường lỏng tăng sinh *Salmonella* Rappaport Vassiliadis, thạch xylose – lysin – desoxycholat, thạch xanh Brilliant và thạch - sắt - ba đường. Chế phẩm được thử nghiệm ngay sau khi đông khô và tảo suất lặp lại thí nghiệm sau 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng ở điều kiện bảo quản 4°C và nhiệt độ phòng (khoảng từ 20 đến 25°C) toàn bộ các chỉ tiêu: tổng số vi sinh vật hiếu khí, tổng số nấm, tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật, xác định sự có mặt của *S. aureus*, *E. coli* trong 1 g chế phẩm, *Salmonella* trong 10 g chế phẩm.

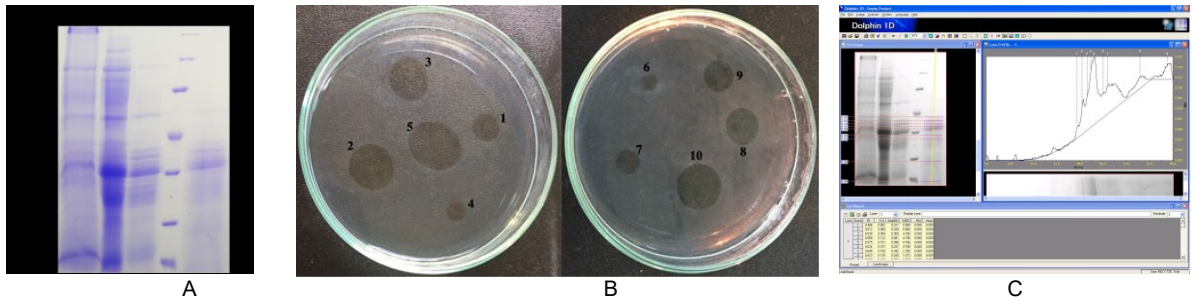
### Xử lý số liệu

Phần mềm ApiWeb được sử dụng để tính kết quả kit Api 20E trong quá trình phân lập vi khuẩn gây bệnh.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tinh sạch tạo sản phẩm enzyme lumbrokinase**

Enzyme thô sau khi tủa phân đoạn bằng muối amonium sulphate ở nồng độ 50%, được thẩm tích loại muối và đưa lên cột sắc ký lọc gel sephadex G100, sử dụng đệm 20 mM potassium phosphate pH 7,4 để thu mẫu. Trong 24 phân đoạn qua cột sephadex trên sắc ký đồ cho thấy protein tập trung chủ yếu ở đỉnh số 5 (phân đoạn 5), với hàm lượng protein đạt 0,053 mg/ml, đây cũng là đỉnh có hoạt tính thủy phân fibrin cao nhất đạt 3091,17 IU/ml (không dẫn hình). Protein ở phân đoạn 5 được qua cột cut off 10 kDa, thu toàn bộ pha trên, sau đó tiếp tục cho qua cột cut off 50 kDa, ly tâm 4000 vòng/phút, trong 15 phút. Thu pha dưới. Sản phẩm thu được sau tinh sạch qua cột 50 kDa được thử hoạt tính fibrin (Hình 1B) và điện di để xác định khối lượng phân tử bằng SDS - PAGE (Hình 1A).



Hình 1. (A) Điện di đồ mẫu enzyme tinh sạch qua cột cut - off (1: dịch enzyme thô; 2: mẫu tủa muối 50%; 3: phân đoạn 5 sau khi qua cột sephadex; 4: marker; 5: qua cột 50 kDa); (B): Hoạt tính thủy phân fibrin của các phân đoạn enzyme lumbrokinase sau khi qua cột sephadex G100 pha loãng 10x (1: phân đoạn 4; 2: phân đoạn 5; 3: phân đoạn 6; 4: phân đoạn 9; 6: phân đoạn 2; 7: phân đoạn 3; 8: phân đoạn 7; 9: phân đoạn 8; 5,10: đối chứng (C): Hình ảnh đánh giá độ sạch protein bằng phần mềm dolphin 1D

**Bảng 1. Tóm tắt quá trình tinh sạch enzyme lumbrokinase từ giun quế *Perionyx escavatus***

Các bước tinh sạch	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (IU)	Hoạt tính riêng (IU/mg)	Độ sạch	Hiệu suất (%)
Dịch thô	2,625	15617,38	5949,5 ± 918,4	1	100
Tủa amonium sulfate 50%	0,365	2498625	68184,3 ± 17081,8		
Sephadex G100 phân đoạn 5	0,0795	4636,76	58745,9 ± 0,00	9,87	29,7
Cut off	0,0528	1784,12	33495,51 ± 1874,0	5,63	11,42

Kết quả trên điện di đồ ta thấy sản phẩm thu được gồm các băng tập trung kích thước từ khoảng 25 đến 45 kDa. Điều này cũng tương tự như các kết quả thu được theo các công bố trước đó của một số tác giả: Cho và đồng tác giả (2004) đã tách được 6 phân đoạn của enzyme lumbrokinase có kích thước từ 24,6 đến 33 kDa (Cho *et al.*, 2004). Mahendra (2011) đã công bố tìm được 6 isozyme có kích thước từ 25 đến 32 kDa (Mahendra, Pulicherla 2011). Phan Thị Bích Trâm và đồng tác giả (2008) đã tinh sạch nhóm enzyme lumbrokinase từ giun đất bằng việc sử dụng phương pháp tủa acetone, phối hợp với sắc ký trao đổi ion và tương tác kỵ nước cho thấy thành phần protease trong giun đất khá phức tạp, có đến 10 phân đoạn enzyme khác nhau với trọng lượng phân tử từ 24,0 kDa đến 58,3 kDa (Phan Thị Bích Trâm *et al.*, 2008). Như vậy, qua ba bước tinh sạch tủa muối nồng độ 50%, cột sắc ký lọc gel sephadex G100 và cột cut off 10 kDa và 50 kDa, chúng tôi đã thu được sáu phân đoạn enzyme có kích thước từ 25 đến 45 kDa với độ tinh sạch cao và hoạt tính thủy phân fibrin đạt 33 495 IU/mg protein, hiệu suất đạt 11,42%, độ sạch 5,63 lần. Nhóm enzyme lumbrokinase sạch có kích thước phân tử đạt từ 25 đến 45 kDa được đánh giá bằng phần mềm Dolphin 1D. Kết quả cho thấy độ sạch của nhóm enzyme này đạt 78,5 % (Hình 1C). Mẫu enzyme này được bảo quản trong lạnh và thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

**Sản xuất chế phẩm lumbrokinase**

Dịch enzyme sau khi tinh sạch, được bổ sung phụ gia là bột gạo đã được sấy cốm với tỉ lệ dịch tinh sạch: bột gạo là 5:1, sau đó đông khô 48 giờ, thu chế phẩm. Sản xuất hai mẻ chế phẩm riêng biệt. Tiến hành thử hoạt tính sản phẩm như sau: cân 100 mg bột sản phẩm pha vào 1 mL đệm potassium phosphate pH 7,4, thử với 10 µL dung dịch trên đĩa fibrin. Tiến hành theo dõi độ ổn định hoạt tính sản phẩm tạo được sau thời gian bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng, sau thời gian 3 tháng.

**Bảng 2. Hoạt tính thủy phân fibrin của chế phẩm lumbrokinase trong quá trình bảo quản**

Điều kiện Thời gian bảo quản	Bảo quản ở 4°C		Bảo quản ở nhiệt độ phòng	
	Mề 1 (IU/g)	Mề 2 (IU/g)	Mề 1 (IU/g)	Mề 2 (IU/g)
Thời điểm T0	4112,0 ± 0,00	3848,8 ± 372,2	4112,0 ± 0,00	3848,8 ± 372,2
Sau 3 tháng	3848,8 ± 372,2	3715,2 ± 183,3	3848,8 ± 372,2	3848,8 ± 372,2
Hiệu suất bảo quản (%)	93,6	96,5	93,6	100

Kết quả cho thấy sản phẩm thu được có hoạt tính thủy phân fibrin đạt 4112,0 IU/g, sau thời gian 3 tháng bảo quản thì hoạt tính sản phẩm có giảm nhẹ từ 0 đến 6,33% ở cả nhiệt độ phòng và 4°C. Điều này chứng tỏ sản phẩm lumbrokinase tương đối bền (Bảng 2).

**Tổng số vi sinh vật hiếu khí và vi nấm**

Sau thời gian nuôi cấy 5 ngày đối với tổng số vi sinh vật hiếu khí trên môi trường thạch casein đậu tương và 7 ngày đối với nấm trên môi trường thạch Sabouraud, và thử nghiệm lại sau thời gian bảo quản, kết quả thu được theo bảng 3 và bảng 4.

**Bảng 3. Tổng số vi sinh vật hiếu khí (CFU/g) của chế phẩm sau thời gian bảo quản**

Điều kiện Thời gian bảo quản	Bảo quản ở 4°C		Bảo quản ở nhiệt độ phòng	
	Mề 1	Mề 2	Mề 1	Mề 2
Thời điểm T0	95 x 10 <sup>2</sup>	50 x 10 <sup>3</sup>	95 x 10 <sup>2</sup>	50 x 10 <sup>3</sup>
Sau 1 tuần	85 x 10 <sup>2</sup>	47 x 10 <sup>3</sup>	89 x 10 <sup>2</sup>	43 x 10 <sup>3</sup>
Sau 1 tháng	91 x 10 <sup>2</sup>	44 x 10 <sup>3</sup>	79 x 10 <sup>2</sup>	53 x 10 <sup>3</sup>
Sau 2 tháng	88 x 10 <sup>2</sup>	57 x 10 <sup>3</sup>	91 x 10 <sup>2</sup>	49 x 10 <sup>3</sup>
Sau 3 tháng	71 x 10 <sup>2</sup>	43 x 10 <sup>3</sup>	90 x 10 <sup>2</sup>	47 x 10 <sup>3</sup>

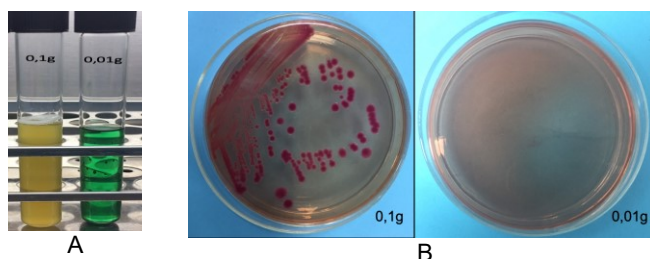
**Bảng 4. Tổng số vi nấm (CFU/g) của chế phẩm sau thời gian bảo quản**

Điều kiện Thời gian bảo quản	Bảo quản ở 4°C		Bảo quản ở nhiệt độ phòng	
	Mề 1	Mề 2	Mề 1	Mề 2
Thời điểm T0	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>
Sau 1 tuần	2 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
Sau 1 tháng	3 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	3 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>
Sau 2 tháng	2 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>
Sau 3 tháng	2 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	3 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>

Đối chiếu với yêu cầu trong Dược Điển Việt Nam V, sản phẩm đạt yêu cầu chất lượng về chỉ tiêu tổng số vi sinh vật hiếu khí và vi nấm. Sau thời gian bảo quản ở 4°C và nhiệt độ phòng tổng số vi sinh vật hiếu khí và vi nấm ổn định, hầu như không tăng lên và vẫn trong giới hạn cho phép của Dược Điển Việt Nam V.

**Tổng số vi khuẩn Gram âm dung nạp mật**

Tiến hành với 2 nồng độ thí nghiệm là 0,1 g và 0,01 g chế phẩm, tăng sinh trong môi trường lỏng Enterobacteria - Mossel (Hình 2).



**Hình 2. (A) Hình ảnh mẫu thử trong môi trường tăng sinh Enterobacteria - Mossel; (B) Mẫu thử trên môi trường muối mật violet-red**

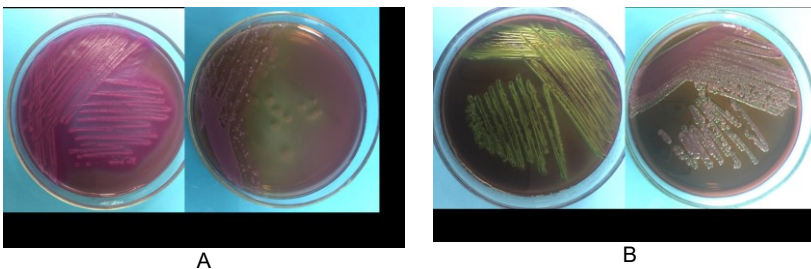
Kết quả cho thấy với lượng mẫu thử là 0,1 g môi trường đục và đã có sự đổi màu môi trường từ xanh sang vàng, chứng tỏ đã có vi sinh vật phát triển trong môi trường này, với lượng mẫu thử 0,01 g không có sự đổi màu của môi trường, chúng tôi tiếp tục tiến hành cấy ria từ từng ống môi trường trên sang môi trường muối mật violet-red. Trên môi trường muối mật violet-red cho thấy, với lượng mẫu 0,1 g có sự xuất hiện của vi sinh vật có màu hồng

tím với vòng mật bao quanh, lượng mẫu 0,01 g không có sự xuất hiện của vi sinh vật trên môi trường nuôi cấy. Như vậy, tổng số vi khuẩn gram âm trong mẫu thử là  $> 10^1$  CFU/g và  $< 10^2$  CFU/g. Đối chiếu với yêu cầu của được điển Việt Nam 5 với các thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên, tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật không được quá  $10^2$  CFU/g thì chế phẩm đạt yêu cầu chất lượng. Thí nghiệm được lặp lại theo tần suất và thời gian bảo quản mẫu 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng, kết quả thu được không thay đổi. Sau thời gian bảo quản, sản phẩm đạt chỉ tiêu tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật trong 1 g chế phẩm.

### Phân tích các vi khuẩn gây bệnh

#### Phân lập *E. coli*

Sau khi tăng sinh trên môi trường lỏng Casein đậu tương, tiếp tục cấy chuyển canh thang sang môi trường lỏng Mac-Conkey, sau thời gian nuôi cấy, môi trường đục và chuyển màu từ hồng tím sang vàng. Tiếp tục cấy chuyển từ lỏng Mac-conkey sang thạch Mac-conkey, thu được khuẩn lạc màu hồng trên môi trường này. Nghi ngờ có *E. coli* trong chế phẩm, chúng tôi tiếp tục tiến hành nhuộm soi bằng phương pháp nhuộm Gram, soi trên vật kính dầu, phóng đại 1.000 lần, thấy hình ảnh là trực khuẩn Gram âm, và cấy chuyển khuẩn lạc nghi ngờ trên môi trường Mac-Conkey sang môi trường thạch Levine - eosin - xanh methylen, thu được khuẩn lạc đen có một phần ánh kim trên môi trường phân lập. Song song với mẫu thử chúng tôi sử dụng chủng *E. coli* ATCC 8739 làm chuẩn (Hình 3).



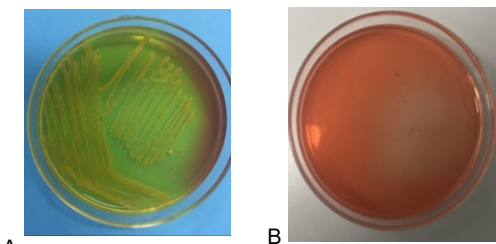
Hình 3. (A) Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường Mac-Conkey agar; (B) Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch Levine - eosin - xanh methylen

Các kết quả thu được qua nhuộm Gram và trên hai môi trường đặc hiệu Mac-Conkey agar và thạch Levine - eosin - xanh methylen cho thấy vi khuẩn trong mẫu thử có thể là *E.coli*, tiếp tục tiến hành thử trên kit API 20E gồm 20 phản ứng sinh hóa và thực hiện phản ứng oxydase là phản ứng số 21 để tính kết quả Kit trên phần mềm Apiweb. Song song tiến hành Kit với vi sinh vật chuẩn là *E.coli* ATCC 8739 (không dẫn hình). Kết quả kit API 20E cho thấy vi sinh vật phân lập được trong mẫu thử là *Enterobacter cloacae* với % ID đạt 95,1%, như vậy vi sinh vật phân lập được ở các môi trường trên không phải là *E.coli*. Điều này chứng tỏ không phát hiện thấy có *E.coli* trong 1 g chế phẩm. Thí nghiệm được lặp lại theo tần suất và thời gian bảo quản mẫu 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng, kết quả thu được không thay đổi. Sau thời gian bảo quản không phát hiện *E.coli* trong 1 g chế phẩm.

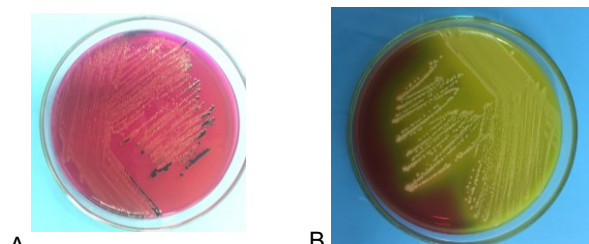
#### Phân lập *Staphylococcus aureus* và *Salmonella*

Sau khi tăng sinh mẫu trên môi trường lỏng Casein đậu tương, cấy rìa canh thang sang môi trường thạch muối Manitol, sau thời gian nuôi cấy không thấy có vi sinh vật đặc trưng mọc trên môi trường này, chứng tỏ không phát hiện thấy có *Staphylococcus aureus* trong 1g chế phẩm. Thí nghiệm được lặp lại theo tần suất và thời gian bảo quản mẫu 1 tuần, 2 tháng và 3 tháng, kết quả thu được không thay đổi. Sau thời gian bảo quản không phát hiện *Staphylococcus aureus* trong 1 g chế phẩm (Hình 4).

Sau khi tăng sinh mẫu trên môi trường lỏng Casein đậu tương, cấy rìa canh thang sang môi trường lỏng Rappaport vassiliadis, cấy rìa từ môi trường này sang môi trường thạch xylose – lysin – desoxycholat, sau thời gian nuôi cấy phát hiện thấy có khuẩn lạc màu vàng, tròn mọc trên môi trường này, không có màu sắc hình thái giống với vi sinh vật chuẩn nhưng chúng tôi vẫn tiếp tục tiến hành cấy chuyển tiếp sang một số môi trường đặc trưng cho phân lập *Salmonella* gồm môi trường thạch xanh Brilliant, môi trường thạch sắt 3 đường và cấy song song với chủng chuẩn (Hình 5).

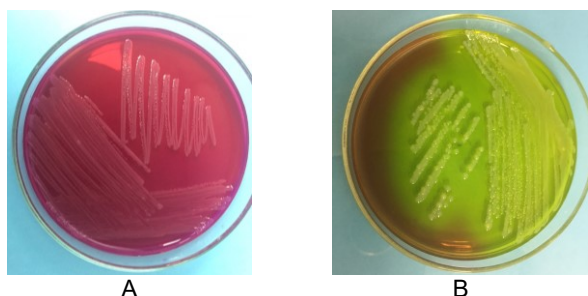


Hình 4. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch muối Manitol (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 và (B) Môi trường đã cấy mẫu thử



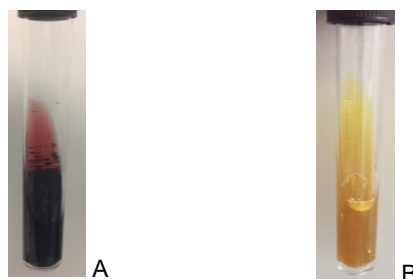
Hình 5. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch muối xylose - lysin - desoxycholat (A) *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028; (B) Vi sinh vật phân lập từ mẫu thử

Các kết quả trên các môi trường cho thấy, vi sinh vật thu được trong mẫu thử không có màu sắc và hình thái đặc trưng của *Salmonella*. Cụ thể là trên môi trường thạch muối xylose - lysin - desoxycholat không thấy xuất hiện khuẩn lạc đỏ có thể có hoặc không có nhân màu đen, trên môi trường thạch xanh brilliant khuẩn lạc màu xanh hơi vàng, làm chuyển màu môi trường từ hồng sang vàng, không có màu hồng đặc trưng tương tự như vi sinh vật chuẩn (Hình 6). Trên môi trường thạch - sắt - ba đường nếu là *Salmonella* sẽ sinh khí H<sub>2</sub>S khí này sẽ kết hợp với sắt trong môi trường tạo thành sắt sunfit có màu đen, lên men đường glucose nên phần môi trường thạch đứng sẽ có màu vàng, không lên men lactose hoặc sucrose nên phần môi trường bề mặt sẽ vẫn có màu hồng. Tuy nhiên, vi sinh vật phân lập được trong mẫu thử có sinh khí, lên men glucose và cả lactose hoặc sucrose làm phần môi trường bề mặt cũng như toàn bộ phần thạch đứng chuyển sang màu vàng (Hình 7). Điều này chứng tỏ vi sinh vật phân lập được không phải là *Salmonella*. Vì vậy, mẫu thử được kết luận không phát hiện *Salmonella* trong 10 g chế phẩm.



Hình 6. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch xanh brilliant

(A) *Salmonella* *tiphymurium* ATCC 14028; (B) Vi sinh vật phân lập từ mẫu thử



Hình 7. Hình ảnh vi sinh vật phân lập trên môi trường thạch - sắt - ba đường

(A) *Salmonella* *tiphymurium* ATCC 14028; (B) vi sinh vật phân lập từ mẫu thử

Thí nghiệm được lặp lại theo tần suất và thời gian bảo quản mẫu 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng, kết quả thu được không thay đổi. Sau thời gian bảo quản không phát hiện *Salmonella* trong 10 g chế phẩm.

Bảng 5. Kết quả thử giới hạn nhiễm khuẩn chế phẩm lumbrokinase theo dược điển Việt Nam V dành cho thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên

Chỉ tiêu	Yêu cầu theo dược điển Việt Nam 5	Mẫu thử ở thời điểm ban đầu (CFU/g)		Mẫu thử sau bảo quản 3 tháng ở 4°C (CFU/g)		Mẫu thử sau bảo quản 3 tháng ở nhiệt độ phòng (CFU/g)		Kết luận theo dược điển Việt Nam 5
		Mề 1	Mề 2	Mề 1	Mề 2	Mề 1	Mề 2	
Tổng số vi sinh vật hiếu khí trong 1 g	≤ 10 <sup>4</sup> CFU/g	95 x 10 <sup>2</sup>	50 x 10 <sup>3</sup>	71 x 10 <sup>2</sup>	43 x 10 <sup>3</sup>	90 x 10 <sup>2</sup>	47 x 10 <sup>3</sup>	Đạt
Tổng số nấm trong 1 g	≤ 10 <sup>2</sup> CFU/g	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	3 x 10 <sup>1</sup>	10 <sup>1</sup>	Đạt
Tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật trong 1 g	≤ 10 <sup>2</sup> CFU/g	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	< 10 <sup>2</sup>	Đạt
Định tính <i>E.coli</i> trong 1 g	Không được có trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Đạt
Định tính <i>S.aureus</i> trong 1 g	Không được có trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Không phát hiện trong 1 g	Đạt
Định tính <i>Salmonella</i> trong 10 g	Không được có trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Không phát hiện trong 10 g	Đạt

Như vậy, sau thời gian bảo quản 3 tháng, sản phẩm enzyme lumbrokinase vẫn ổn định và đạt các chỉ tiêu về vi sinh vật theo quy định của dược điển Việt Nam hiện hành, có thể sử dụng làm nguyên liệu bào chế các thuốc và thực phẩm chức năng để điều trị và hỗ trợ điều trị các bệnh huyết khối.

### KẾT LUẬN

Đã tinh sạch thành công nhóm enzyme lumbrokinase từ giun quế *Perionyx escavatus* có hoạt tính thủy phân fibrin cao sau khi qua ba bước: rửa muối ammonium sulfate 50%, sắc ký lọc gel sephadex G100 và cột cut off 10 kDa và 50 kDa. Enzyme lumbrokinase thu được có kích thước phân tử từ 25 kDa đến 45 kDa được thể hiện trên điện di SDS-PAGE, mức độ biểu hiện protein đạt 78,5% sau khi đánh giá bằng phần mềm dolphin 1D.

Lumbrokinase sạch có hoạt tính thủy phân fibrin đạt 33495,51 IU/mg, hiệu suất 11,2%. Sản xuất được hai mẻ sản phẩm enzyme lumbrokinase đạt tiêu chuẩn về chỉ tiêu vi sinh vật theo được điển Việt Nam hiện hành với tổng số vi sinh vật hiếu khí mẻ 1 đạt  $95 \times 10^2$  CFU/g, mẻ 2 đạt  $50 \times 10^3$  CFU/g; tổng số nấm cả hai mẻ đều đạt  $2 \times 10^1$  CFU/g; tổng số vi khuẩn gram âm dung nạp mật đạt  $< 10^2$  CFU/g; không phát hiện *S. aureus*, *E. coli* trong 1 g; không phát hiện *Salmonella* trong 10 g. Theo dõi độ ổn định của sản phẩm sau thời gian 1 tuần, 1 tháng, 2 tháng và 3 tháng thấy chế phẩm vẫn ổn định về giới hạn nhiễm khuẩn, đạt tiêu chuẩn dành cho thuốc uống có nguồn gốc tự nhiên theo được điển Việt Nam V, có thể sử dụng làm nguyên liệu để bào chế thuốc hoặc thực phẩm chức năng điều trị các bệnh huyết khối.

**Lời cảm ơn:** Công trình có sự hỗ trợ kinh phí của Dự án Phát triển sản phẩm thương mại, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam “*Phát triển sản phẩm Lumbrokinase chất lượng cao làm nguyên liệu thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị chống tắc nghẽn mạch máu*”. 2019 - 2020.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Astrup T, Mullertz S (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40(2):346-51.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Cho IH, Choi ES, Lim hg, Lee hh (2004). Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol* 37(2):199-205.
- Hội đồng Dược Điển Việt Nam (2017). Dược Điển Việt Nam, vol 2. Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- Lê Đình Quyền, Đỗ Thị Tuyên, Lý Thị Bích Thủy, Quyền Đình Thi (2013). Thu thập và định danh một số loài giun đất có hoạt tính thủy phân fibrin tại Việt Nam. Hội nghị CNSH Toàn quốc năm 2013:436-440.
- Mahendra KV, Pulicherla KK (2011 ) Lumbrokinase - a potent and stable fibrin-specific plasminogen activator. *Int J Bio-Sci Bio-Technol* 3(2):57-70.
- Mihara H, Sumi H, Yoneta T, et al. (1991). A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Jpn J Physiol* 41(3):461-72.
- Nguyễn Thanh Thảo, Nguyễn Thị Kim Hương, Đoàn Cao Sơn (2010) Xác định hoạt tính enzyme streptokinase trong chế phẩm hỗn hợp chứa streptokinase và streptodornase bằng phương pháp đo vòng ly giải. *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc* 8(29):19-22.
- Nguyễn Thị Hằng, Nguyễn Thị Liên, Tạ Mạnh Hùng (2019) Thảm định quy trình xác định hoạt tính enzyme nattokinase bằng phương pháp đo quang. *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc* 17(65):11-16.
- Phan Thị Bích Trâm, Dương Thị Hương Giang, Hà Thanh Toàn, Phạm Thị Ánh Hồng (2008). Chiết tách và tinh sạch enzyme thủy phân fibrin từ trùn quế *Perionyx excavatus*. Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ IV: 661- 665.

## PURIFICATION, PRODUCTION OF LUMBROKINASE PREPARATION AND STUDYING ON LIMITING INFECTION ACCORDING TO VIETNAMESE PHARMACOPOEIA V DURING PRODUCT STORAGE

Nguyen Thi Thu Huong<sup>1</sup>, Nguyen Thị Trung<sup>2</sup>, Do Thi Tuyen<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> National Institute of Drug Quality Control (NIDQC)

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

<sup>3</sup> Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Lumbrokinase is a fibrin hydrolytic enzyme including an isozyme group of about 25 to 45 kDa. This enzyme has been studied for preparations for the treatment of thrombotic diseases. In this study, lumbrokinase was purified from earthworm *Perionyx excavatus* through three steps: precipitate of ammonium sulfate at 50% concentration, sephadex G100 gel filtration chromatography and cut off 10 kDa and 50 kDa column. The molecular mass of the purified lumbrokinase determined by SDS-PAGE was 25-45 kDa with hydrolysis fibrin activity of 33 495 IU/mg. We created lumbrokinase products from purified enzyme lumbrokinase by freeze-drying on two separate batches. The product obtained meets the quality of microbial limit test according to Vietnamese Pharmacopoeia. The results for batch 1 and batch 2 are  $95 \times 10^2$  CFU /g and  $50 \times 10^3$  CFU/g of the total number of aerobic microorganisms, respectively. The total number of yeasts and moulds are  $2 \times 10^1$  CFU/g in both of batches. Total bile tolerant gram-negative bacteria are  $< 10^2$  CFU/g; Not detected *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* in 1 g, *Salmonella* in 10 g. The products meet the requirement of quality according to Vietnamese Pharmacopoeia V after 1 week, 1 month, 2 months, and 3 months under storage condition (4°C, and room temperature, respectively).

**Keywords:** Thrombosis, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, Lumbrokinase.

\* Author for correspondence: Tel: 024.37568260; E-mail: dtuyen@ibt.ac.vn