

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG POLY-GAMMA-GLUTAMIC ACID TRONG LÀM BỀN NATTOKINASE

Nguyễn Thị Hiền Trang¹, Lê Linh Chi², Đỗ Thị Tuyên¹, Nguyễn Sỹ Lê Thanh^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nattokinase (NK), còn được gọi là subtilisin (EC 3.4.21.14), là một serina protease có hoạt tính thủy phân fibrin hiệu quả, đồng thời có tác dụng kép tăng cường giải phóng chất hoạt hóa plasminogen nội sinh ở cả mô hình động vật và người nên được ứng dụng trong điều trị các bệnh tim mạch. Nhu cầu sử dụng nattokinase trong y dược kéo theo nhu cầu cố định làm bền enzyme. Một trong những chất mang thích hợp cho mục đích này là poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) - một polyme sinh học tự nhiên, tự phân hủy, không độc, không tạo phản ứng miễn dịch và ăn được. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành trộn NK với γ -PGA dạng muối theo tỉ lệ 2:1 tạo hỗn hợp NK-Na- γ -PGA và khảo sát độ bền hoạt tính nattokinase trong hỗn hợp NK-Na- γ -PGA so với NK ở các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau. Kết quả khảo sát ban đầu với tỉ lệ 2NK: 1Na- γ -PGA cho thấy hiệu quả rõ rệt của γ -PGA trong việc tăng cường hoạt tính và làm bền enzyme, hỗn hợp NK-Na- γ -PGA có hoạt tính cao hơn so với NK ở môi trường pH 8, γ -PGA cũng làm tăng khả năng chịu nhiệt của NK, ở nhiệt độ cao 50°C trong 1h hoạt tính enzyme ở mẫu NK bị mất 50% trong khi đó ở mẫu NK-Na- γ -PGA vẫn giữ nguyên hoạt tính.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, Nattokinase, làm bền, Poly- γ -glutamic acid.

MỞ ĐẦU

Nattokinase là một serine protease ngoại bào được sản xuất từ *Bacillus natto* lên men trên đậu tương. Nattokinase là hợp chất duy nhất có đồng thời nhiều tác dụng dược lý phòng ngừa và giảm nhẹ bệnh tim mạch cụ thể là bên cạnh việc trực tiếp thủy phân fibrin làm tan cục máu đông, NK còn có tác dụng kép làm tăng sự giải phóng tPA, kích thích cơ thể tăng cường sản xuất plasmin do đó chống hình thành cục máu đông. NK cũng ức chế pAL-1 yếu tố ức chế sự hoạt động của plasminogen. Như vậy NK vừa chống huyết khối, hạ huyết áp, chống đông máu và chống xơ vữa động mạch. Ngoài ra, NK là một sản phẩm tự nhiên đã được chứng minh an toàn có thể được sử dụng qua đường miệng, so với thuốc chống huyết khối và thuốc hạ huyết áp, NK có độ an toàn hơn, thời gian bán hủy dài hơn trong khi chi phí rẻ hơn, quy trình sản xuất đơn giản hơn. Do đó, nó có tiềm năng được phát triển như một loại thuốc thế hệ mới để phòng ngừa, điều trị và chăm sóc bệnh tim mạch lâu dài. Tại Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc và các nước phương Tây bao gồm Úc, Hoa Kỳ, Canada và châu Âu, các sản phẩm NK được sử dụng rộng rãi dưới dạng viên nén hoặc viên nang để bổ sung dinh dưỡng, tăng cường sức khỏe, ngăn ngừa cục máu đông và cải thiện lưu thông (Chen *et al.*, 2018). Tuy nhiên, NK bất ổn định với sự thay đổi của nhiệt độ và pH, cần thiết phải có những nghiên cứu thêm để NK đạt độ ổn định cao hơn, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình sản xuất, bảo quản NK, hơn nữa giúp enzyme bền hơn trong trình tiêu hóa cũng sẽ giúp tăng hiệu quả hoạt động của enzyme trong máu (Deepak *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2007).

Cho đến nay, đã có nhiều phương pháp khác nhau để ổn định enzyme và tăng cường hoạt động của enzyme như cố định enzyme, biến đổi hóa học enzyme... Enzyme cố định có nhiều ưu điểm hơn hẳn enzyme tự do, có thể sử dụng lặp đi lặp lại nhiều lần trong một thời gian dài, enzyme cố định khá bền với nhiệt độ, pH, dung môi hữu cơ... Các chất polyol, saccharide, chất hoạt động bề mặt và polyme tan trong nước đã được báo cáo có khả năng hoạt động như chất ổn định enzyme hoặc tăng cường hoạt động của enzyme (Adlercreutz, 1993; Yoon *et al.*, 2005). Tuy nhiên, hiệu quả phụ thuộc vào mức độ tương tác của enzyme với polymer sử dụng, yếu tố quan trọng là lựa chọn polymer phù hợp. Poly glutamic acid (γ -PGA) là một polyme sinh học hòa tan trong nước có khả năng tự phân hủy, được tạo thành từ các đơn vị D- và L-glutamic acid (Shih *et al.*, 2001). PGA được chia thành hai dạng α -PGA và γ -PGA tùy thuộc vào việc gắn nhóm carboxyl. So với α -PGA, γ -PGA được sản xuất rộng rãi hơn bởi vi khuẩn đặc biệt là những loài thuộc chi *Bacillus*. Với ưu thế là một polyme tự nhiên, không độc với con người, không gây đáp ứng miễn dịch nên γ -PGA được ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực ví dụ như: trong công nghiệp môi trường γ -PGA được sử dụng làm chất kết tụ, hỗ trợ quá trình lắng; trong sản xuất thực phẩm γ -PGA được sử dụng như một dạng phụ gia ổn định chất lượng sản phẩm, chất chống kết tinh...; trong y dược γ -PGA được dùng như các chất mang, chất giữ ẩm... (Ogunleye *et al.*, 2015). PGA đã được chứng minh có khả năng làm bền một số enzyme trong đó có cả nattokinase (Hsieh *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Hơn nữa, PGA cũng là sản phẩm thu được trong quá trình lên men natto sản xuất nattokinase từ *Bacillus subtilis*, do đó thực sự thích

hợp trong việc làm chất mang phối trộn với nattokinase tăng độ bền enzyme trong quá trình sản xuất chế phẩm nattokinase. Trong nghiên cứu này chúng tôi tách chiết thu nhận PGA từ *B. subtilis* và tiến hành khảo sát khả năng làm bền nattokinase của PGA thu được.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vật chủ: Chủng *B. subtilis* do Phòng Công nghệ Sinh học enzyme, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Môi trường: LB (1% (w/v) pepton, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) yeast extract); LB agar (LB, 1,2% (w/v) agar); GSP (1% (w/v) pepton; 1,5% (w/v) glucose; 1,5% (w/v) glutamic acid);

Hóa chất: Methylene blue; 23% (v/v) ethanol, 0,008% (w/v) KOH, thuốc thử Folin, tricloacetic acid (Merk), Thrombin, Fibrinogen (Merk)

Phương pháp

Tinh sạch Nattokinase từ *B. subtilis*: Chủng *B. subtilis* M5 (từ bộ sưu tập chủng giống Phòng Công nghệ Sinh học Emzyme, Viện Công nghệ Sinh học) được nuôi cấy ở 37°C trong bình tam giác 1 L chứa 250 ml môi trường LB với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi cấy sau 48 h được ly tâm 6000 vòng/ phút trong 10 phút để loại tế bào thu dịch trong chứa nattokinase. Dịch enzyme được tinh sạch qua hai bước: bước 1 tủa với 60% amoniumsulfat, bước hai tủa với 80% ethanol, tủa thu được hòa trong đệm PBS và tiếp tục được tinh sạch qua cột sắc ký lọc gel sử dụng hạt sephadex G100, sau đó điện di kiểm tra bằng SDS-PAGE.

Tách chiết poly- γ -glutamic -acid (γ -PGA): Chủng *B. subtilis* được nuôi cấy ở 37°C qua đêm trong bình tam giác 500 ml chứa 100 ml môi trường GSP với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Dịch nuôi cấy được ly tâm 6.000 vòng/ phút trong 10 phút để loại tế bào. Dịch trong được bổ sung 5M NaCl và 70% ethanol để tủa γ -PGA theo tỉ lệ 1V dịch nuôi: 1,25V 1 M NaCl : 2,5V 70% ethanol. Hỗn hợp được ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó được ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C để thu tủa γ -PGA. Tủa được làm khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng, sau đó được hòa trong nước. Dịch γ -PGA được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel 1% agarose và nhuộm bằng xanh methylen. Để tạo γ -PGA dạng muối, dịch γ -PGA được trộn với 0,1 M NaOH, sau đó thẩm tích trong nước để thu được Na- γ -PGA.

Phối trộn Nattokinase và Na- γ -PGA: Nattokinase ở dạng hòa tan (0,096 mg/ml) được bổ sung vào dịch Na- γ -PGA (0,03 mg/ml) theo tỉ lệ khối lượng 2 NK : 1 Na- γ -PGA, và khuấy từ trong 1h ở nhiệt độ phòng.

Xác định hoạt độ enzyme: Hoạt tính nattokinase được xác định theo phương pháp đĩa fibrin của Astrup và Mullertz, (Astrup *et al.*, 1952) đĩa petri chứa dung dịch fibrinogen tinh khiết được ngưng kết bằng thrombin (100 UI/ml), sau khi dịch trên đĩa đông tụ, nhỏ từng giọt 10 μ L enzyme lên đĩa, ủ 37°C trong 30 phút, fibrin đông tụ có màu trắng đục sẽ bị thủy phân bằng NK tạo vòng tròn trong suốt, đồng thời hoạt độ nattokinase được xác định theo phương pháp Anson cải tiến (Anson, 1938). Hỗn hợp phản ứng thủy phân gồm dung dịch enzyme và dung dịch casein 1%, tỷ lệ 1:2 (v/v) được ủ ở 37°C, 30 phút; ngưng phản ứng bằng dung dịch tricloacetic acid (TCA) 5% theo tỷ lệ 5 thể tích dung dịch acid cho 1 thể tích enzyme; ly tâm thu dịch nổi để thực hiện phản ứng tạo màu với thuốc thử Folin 0,2 N có mặt Na_2CO_3 6% (tỷ lệ dịch nổi: dung dịch Na_2CO_3 : Folin 0,2 N = 1:4:1). Thực hiện đồng thời mẫu kiểm tra bằng cách cho dung dịch TCA vào enzyme trước khi ủ với cơ chất. Độ hấp thụ ánh sáng (OD) của dung dịch màu thu được sau phản ứng được xác định ở bước sóng 750 nm. Dựa vào đồ thị chuẩn tyrosine, để tính sản phẩm tạo thành tương ứng dưới tác dụng của enzyme. Một đơn vị hoạt độ enzyme (U) được định nghĩa là lượng enzyme mà trong một phút ở 37°C có khả năng phân giải protein tạo thành các sản phẩm hoà tan trong tricloacetic acid, cho phản ứng màu tương đương với 1 μ mol tyrosine.

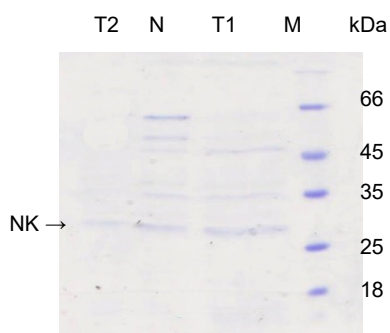
Xác định hàm lượng protein: Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford (Bradford, 1976).

Đánh giá ảnh hưởng của pH và nhiệt độ tới hoạt độ nattokinase: Để kiểm tra khả năng làm bền enzyme của PGA với pH mẫu NK- Na- γ -PGA và mẫu NK cùng được ủ đồng thời ở pH khác nhau 2; 4; 6; 8 và 10 trong 1h và 24h, sau đó xác định hoạt độ enzyme còn lại. Tương tự với nhiệt độ NK-Na- γ -PGA và NK ủ đồng thời nhiệt độ khác nhau 28, 37 và 50°C trong 1h và 24h, sau đó xác định hoạt độ enzyme còn lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh sạch Nattokinase

Dịch enzyme thô thu được sau lên men được tinh sạch qua hai bước tủa và sắc ký. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy qua các bước tủa đã loại được một số protien ngoại bào, dịch tinh sạch thu được (T2) xuất hiện băng nattokinase kích thước 27 kDa tương đối sạch (Hình 1).

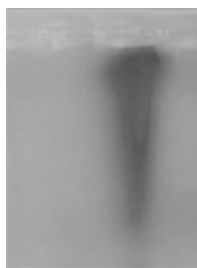


Hình 1. Điện di SDS-PAGE kiểm tra nattokinase

N: Dịch nổi, T1: Sau rửa amonium sunfat, T2: Sau rửa Ethanol, M: Marker protein

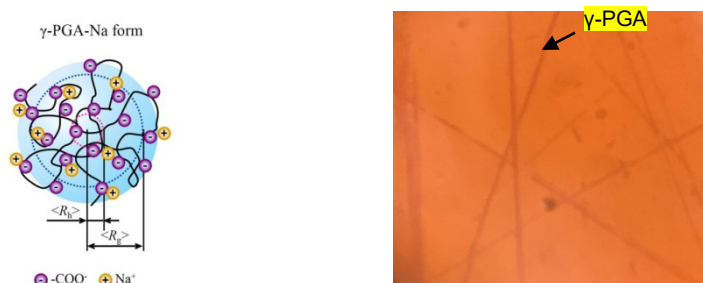
Tách và tinh chế PGA dạng muối

Một nguồn tự nhiên của γ -PGA là chất nhầy của natto được sản xuất bởi *B. subtilis*. Trong nghiên cứu này chúng tôi cũng tách chiết γ -PGA từ dịch nuôi cấy *B. subtilis* như đã miêu tả ở phần phương pháp. Kết quả điện di kiểm tra γ -PGA sau tách chiết được thể hiện trên hình 2 cho thấy đã tách chiết và thu nhận được γ -PGA. Bởi vì cấu tạo của dạng Natri- γ -PGA (Na- γ -PGA) giống như hình cầu (Wang *et al.*, 2017), sẽ bền hơn và phù hợp sử dụng cho việc bao gói nên PGA thu được đã tiến hành tạo phức với Na thành dạng Na- γ -PGA sử dụng trong nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Điện di kiểm tra khả năng thủy phân γ -PGA

Cấu trúc cuộn ngẫu nhiên hình thành bởi phân tử Na- γ -PGA hình 3 có thể được tạo bởi hai yếu tố. Đầu tiên, các nhóm carboxylate tích điện yếu và do đó không sẵn sàng để hình thành liên kết hydro giữa các mạch nhánh và mạch chính. Thứ hai, mỗi mạch γ -PGA phân tử đơn có một carboxylate nhóm và nhóm carboxylate tích điện âm này có lực đẩy tĩnh điện mạnh, có khả năng chống lại tương tác nội phân tử của liên kết hydro giữa CO và NH của nhóm amide (Hình 3).

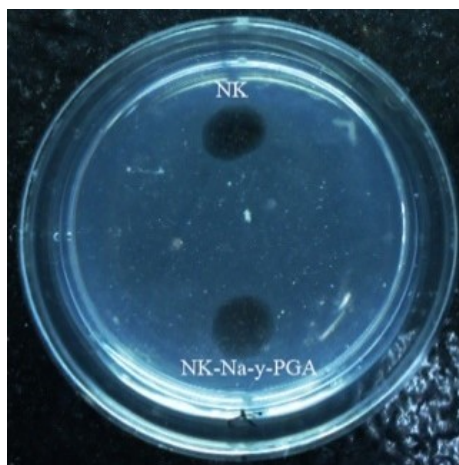


Hình 3. Hình ảnh Na- γ -PGA dưới kính hiển vi độ phóng đại 100x

Chuẩn bị hỗn hợp NK-Na- γ -PGA

Nghiên cứu của Guo và đồng tác giả trong sử dụng γ -PGA để làm bền protein đậu tương cho kết quả tỉ lệ khối lượng tối ưu là 3 protein: 1 γ -PGA (Guo *et al.*, 2019), trong khi nghiên cứu của Hsies và đồng tác giả sử dụng γ -PGA để bao gói NK lại lựa chọn tỉ lệ này là 0,5 NK : 1 pGA (Hsieh *et al.*, 2009). Dựa trên cơ sở đó trong nghiên cứu này bước đầu chúng tôi sẽ khảo sát ở tỉ lệ 2 NK : 1 Na- γ -PGA.

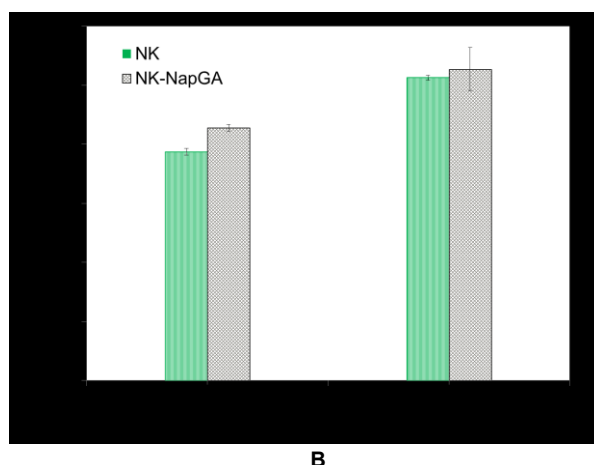
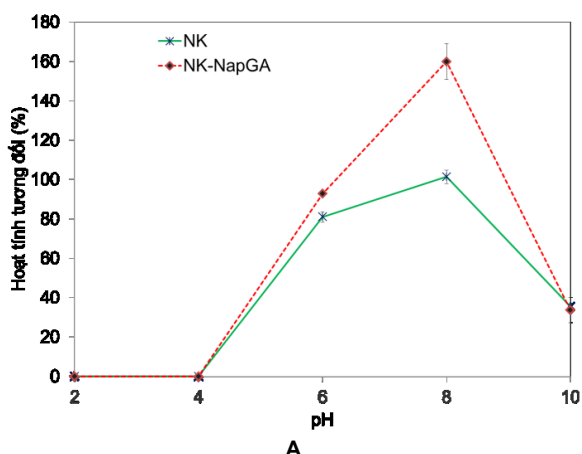
Nattokinase có hàm lượng khoảng 0,096 mg/ml được cho vào dịch Na- γ -PGA thu được có hàm lượng khoảng 0,03 mg/ml cho đến khi đạt tỉ lệ khối lượng 2 NK : 1 Na- γ -PGA tạo hỗn hợp NK-Na- γ -PGA. Kết quả xác định hoạt tính thủy phân fibrin trên đĩa cũng cho thấy vòng hoạt tính của NK và NK-Na- γ -PGA tương đương nhau (Hình 4). Đồng thời kết quả kiểm tra hoạt độ riêng của enzyme trong dung dịch NK-Na- γ -PGA tương đương với NK. Như vậy PGA hoàn toàn không ảnh hưởng đến hoạt tính của NK. Việc đồng nhất NK-Na- γ -PGA trong cùng một dung dịch có thể tạo ra các tương tác vật lý hoặc hóa học với enzyme bảo vệ protein không bị phân hủy ở các điều kiện khắc nghiệt.



Hình 4. Hoạt tính thủy phân fibrin của NK và NK-Na- γ -PGA

Xác định khả năng làm bền nattokinase của PGA dưới ảnh hưởng của pH

Trong dải pH được khảo sát từ 2 - 10 có thể quan sát thấy enzyme kém bền ở pH acid, cả hai mẫu NK và NK-Na- γ -PGA đều mất hoàn toàn hoạt tính ở pH 2 và 4 sau 1h ủ. Enzyme cũng tương đối kém bền ở pH kiềm cao (pH 10), sau 1h ủ hoạt tính enzyme còn lại ở mẫu có Na- γ -PGA và không có Na- γ -PGA tương đương nhau 33 và 35%. Ở pH 6-8, enzyme hoạt động tương tốt, pH 6 hoạt tính còn lại ở hai mẫu có và không có Na- γ -PGA tương đương nhau lần lượt là 92 và 81% sau 1h ủ. Tuy nhiên, ở pH 8 có sự khác biệt rõ rệt giữa mẫu có bổ sung Na- γ -PGA và mẫu không bổ sung, ở mẫu NK hoạt tính enzyme còn lại đạt 100%, trong khi đó ở mẫu NK-Na- γ -PGA hoạt tính enzyme đạt 160%, (Hình 5A). Rõ ràng là mẫu có bổ sung Na- γ -PGA không những ổn định mà còn tăng cường hoạt tính enzyme, điều này có thể giải thích là do trong điều kiện pH thích hợp, liên kết peptide trong phân tử Na- γ -PGA tương tác với các liên kết peptide của phân tử enzyme làm tăng hoạt tính enzyme. Lee và đồng tác giả cũng đã chứng minh Na- γ -PGA có khả năng làm tăng cường hoạt tính của carbonic anhydrase thông qua sự gia tăng của tốc độ phản ứng, tác giả đã chứng minh Na- γ -PGA ngăn cản khả năng liên kết của cơ chất đồng thời sự tương tác giữa Na- γ -PGA và enzyme gây ra sự thay đổi về hình dạng của enzyme, dẫn đến tăng cường hoạt động và cải thiện sự ổn định (Lee *et al.*, 2010). Thêm vào đó, pH 8 cũng đã được nghiên cứu là pH tối ưu cho hoạt động của nattokinase (Wang *et al.*, 2009)



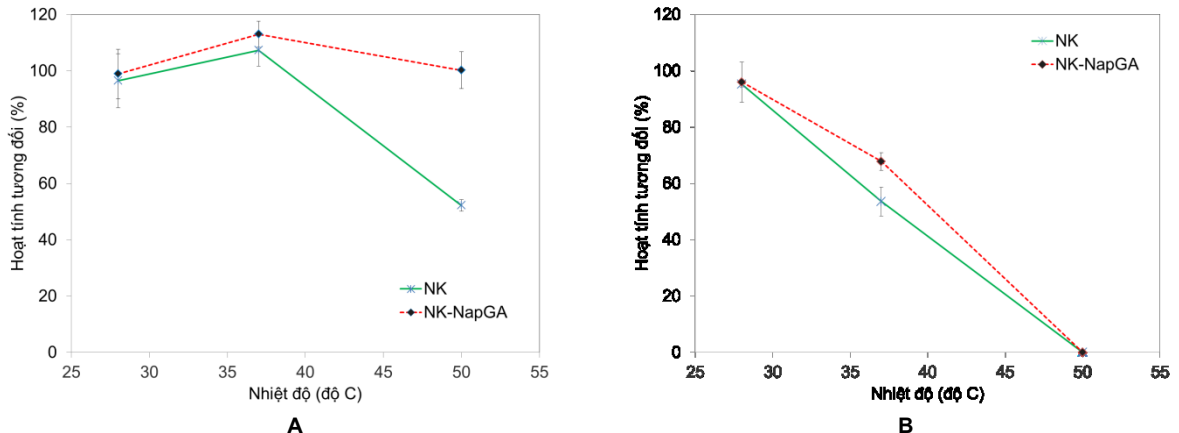
Hình 5. Độ bền của NK và NK-Na- γ -PGA (NK-NapGA) với các pH khác nhau sau 1h (A) và 24h (B)

Tiếp tục tiến hành khảo sát độ bền enzyme ở pH 6 và 8 sau 24h cho thấy ở cả hai pH hoạt tính enzyme còn lại ở mẫu NK-Na- γ -PGA đều cao hơn mẫu NK. Sự chênh lệch thể hiện rõ ràng hơn ở pH 6 (85% và 77% tương ứng với NK-Na- γ -PGA và NK), và ở pH 8 không có sự khác biệt nhiều như so với 1h đầu (Hình 5B). Như vậy, Na- γ -PGA cũng đã thể hiện khả năng tăng cường độ bền enzyme mặc dù hiệu quả chưa cao.

Nghiên cứu Hsieh và đồng tác giả về khảo sát hoạt tính của nattokinase đóng gói siêu nhỏ trong Na- γ -PGA ở điều kiện pH < 5 trong 1h cho thấy NK tự do mất hoạt tính trong khi NK đóng gói trong Na- γ -PGA còn lại 34-60% hoạt tính (Hsieh *et al.*, 2009). So sánh với nghiên cứu của chúng tôi Na- γ -PGA chưa thể hiện khả năng tăng cường độ bền của enzyme trong môi trường acid có thể là do mới chỉ một phần enzyme được gắn với Na- γ -PGA, cần phải thay đổi tỉ lệ và điều kiện cố định để tăng hiệu suất cố định enzyme trong Na- γ -PGA.

Xác định khả năng làm bền nattokinase của Na- γ -PGA dưới ảnh hưởng của nhiệt độ

Hiệu quả của Na- γ -PGA với enzyme bị biến tính bởi nhiệt độ đã được kiểm tra bằng cách xử lý hai mẫu NK và NK-Na- γ -PGA ở 28, 37 và 50°C, kiểm tra hoạt tính enzyme còn lại sau 1h và 24h ủ. Kết quả hình 6 cho thấy enzyme tương đối bền ở 28°C, với cả hai mẫu NK và NK-Na- γ -PGA hoạt tính enzyme sau 24h mất đi không đáng kể, hoạt tính còn lại khoảng 95-98%. Ở 37°C, sau 1h đầu tiên enzyme ở cả hai mẫu không bị ảnh hưởng thậm chí hoạt tính còn vượt mức 100% do khoảng nhiệt này (~40°C) đã được nghiên cứu là nhiệt độ tối ưu cho hoạt động của enzyme (Wang *et al.*, 2009). Tuy nhiên, sau 24h ở 37°C hoạt tính enzyme giảm nhiều, mẫu NK enzyme chỉ còn lại 53% hoạt tính, mẫu NK-Na- γ -PGA enzyme còn lại 67% cao hơn so với mẫu không có Na- γ -PGA. Khi nhiệt độ xử lý tăng lên đến 50°C sự khác biệt giữa hai mẫu NK và NK-Na- γ -PGA rất rõ ràng, sau 1h ủ mẫu NK-Na- γ -PGA vẫn giữ được hoàn toàn hoạt tính enzyme, trong khi đó mẫu NK hoạt tính enzyme chỉ còn lại 52%, tiếp tục ủ đến 24h cả hai mẫu enzyme bị biến tính mất hoàn toàn hoạt tính.



Hình 6. Độ bền của NK và NK-Na- γ -PGA (NK-NapGA) với các nhiệt độ khác nhau A: Sau 1h ủ, B: Sau 24 h ủ

Hiệu quả bảo vệ enzyme với nhiệt độ của γ -PGA cũng đã được công bố bởi Lee và đồng tác giả, với lipase ở dải 55 - 85°C hoạt tính của enzyme khi có mặt γ -PGA cao hơn so với không có γ -PGA, thậm chí hoạt tính tương đối của enzyme khi bổ sung γ -PGA cao hơn 100% ở 70°C. Với α -amylase ở nhiệt độ 23, 37 và 50°C, hoạt tính của enzyme khi có mặt γ -PGA cũng cao hơn so với khi không có γ -PGA (Lee *et al.*, 2010). Hsieh và đồng tác giả cũng cho thấy khả năng chịu nhiệt của NK vi nang trong γ -PGA cao hơn so với dạng tự do. NK tự do mất hoạt tính khi xử lý 1h ở 60°C trong khi NK vi nang trong γ -PGA giữ lại 18% - 25% hoạt tính (Hsieh *et al.*, 2009). Những kết này tương tự như nghiên cứu của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Như vậy khảo sát với tỉ lệ 2 NK:1 Na- γ -PGA đã cho thấy hiệu quả rõ ràng của Na- γ -PGA trong việc làm tăng cường hoạt tính và ổn định độ bền của enzyme với nhiệt độ. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu khảo sát thêm một số tỉ lệ phối trộn của Na- γ -PGA và NK cũng như các điều kiện cố định NK trong Na- γ -PGA để tăng cường hiệu quả của Na- γ -PGA đối với việc làm bền NK. Kết quả thu được bước đầu đã cho thấy tiềm năng sử dụng Na- γ -PGA trong việc bao gói natokinase, đây là một cách tiếp cận đơn giản khả thi và đầy hứa hẹn trong sản xuất NK quy mô công nghiệp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được viện trợ không hoàn lại bởi Đại học Liên hợp quốc cùng Tập đoàn Kirin với mã số 611UU-1218 và TS Keitarou Kimura là đại diện phía Nhật bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adlercreutz P (1993) Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochim Biophys Acta* 1163: 144-148.
- Anson ML (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* 22: 79-89.
- Astrup T, Mullertz S (1952) The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
- 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: 248-254.
- Chen H, McGowan EM, Ren N, Lal S, Nassif N, Shad-Kaneez F, Qu X, Lin Y (2018) Nattokinase: A promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Biomark Ins* 13: 1177271918785130.
- Deepak V, Pandian S, Kalishwaralal K, Gurunathan S (2009) Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. *Bioresour Technol* 100: 6644-6646.
- Guo Q, Su J, Yuan F, Mao L, Gao Y (2019) Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes. *LWT - Food Sci Technol* 101: 476-482.
- Hsieh CW, Lu WC, Hsieh WC, Huang YP, Lai CH, Ko WC (2009) Improvement of the stability of nattokinase using γ -polyglutamic acid as a coating material for microencapsulation. *Food Sci Technol* 42: 144-149.
- Law D, Zhang Z (2007) Stabilization and target delivery of Nattokinase using compression coating. *Drug Dev Ind Pharm* 33: 495-503.
- Lee EH, Tsujimoto T, Uyama H, Sung MH, Kim K, Kuramitsu S (2010) Enhancement of enzyme activity and stability by poly (γ -glutamic acid). *Polymer J* 42: 818-822.
- Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, Hill D, Williams C, Radecka I (2015) Poly-gamma-glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiol* 161: 1-17.
- Shih IL, Van YT (2001) The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour Technol* 79: 207-225.
- Wang C, Du M, Zheng D, Kong F, Zu G, Feng Y (2009) Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* natto B-12. *J Agric Food Chem* 57: 9722-9729.
- Wang LL, Chen JT, Wang LF, Wu S, Zhang GZ, Yu HQ, Ye XD, Shi QS (2017) Conformations and molecular interactions of poly- γ -glutamic acid as a soluble microbial product in aqueous solutions. *Sci Rep* 7: 1-11.
- Yoon SH, Roby JF (2005) Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. *Enz Microb Technol* 37: 556-562.

APPLICATION OF POLY-GAMMA-GLUTAMIC ACID FOR ENHANCEMENT NATTOKINASE STABILIZATION

Nguyen Thi Hien Trang¹, Le Linh Chi², Do Thi Tuyen¹, Nguyen Sy Le Thanh¹

¹ Institute of Biotechnology, VAST

² University of Science and Technology of Ha Noi, VAST

SUMMARY

Nattokinase (NK), also known as subtilisin (EC 3.4.21.14), is a serine protease that not only degrades fibrin directly and effectively but also increases the release of tPA with a subsequent enhancing the formation of plasmin. Nattokinase is a promising alternative in the management of cardiovascular diseases. Therefore, the protection of nattokinase against environmental stresses is required in the medical and pharmaceutical industries. One of the carriers suitable for this purpose is poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) - a natural, biodegradable, edible, non-toxic, non-immunogenic. In this study, NK and γ -PGA in salt form were mixed with ratio of 2: 1 to create NK-Na- γ -PGA and investigated nattokinase activity of NK-Na- γ -PGA compared to NK under temperature conditions and pH varies. The results indicated the ratio of 2 NK: 1Na- γ -PGA showed effectiveness on enzyme stability enhancement. The NK-Na- γ -PGA maintained nattokinase activity higher than control at pH 8. γ -PGA showed strong effect on nattokinase protection against the thermal denaturation, especially at the high temperature of 50°C for 1 h which enzyme activity lost 50%. Meanwhile the NK-Na- γ -PGA remains 100% activity.

Keywords: *Bacillus subtilis*, nattokinase, poly- γ -glutamic acid, stability.

* Author for corresspondence: Tel: 024 37568260; Email: nslthanh@ibt.ac.vn