

# NÂNG CAO HOẠT ĐỘ NATTOKINASE CỦA CHỦNG *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* TVY.04 BẰNG TÁC NHÂN GÂY ĐỘT BIẾN NGẪU NHIÊN

Lê Tuấn, Nguyễn Mai Hiền, Nguyễn Lan Hương\*

Khoa Kỹ thuật Sinh học, Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

## TÓM TẮT

Các bệnh liên quan đến tim mạch gây ra những hậu quả vô cùng nguy hiểm. Theo Tổ chức Y tế thế giới, đây là nguyên nhân cướp đi sinh mạng của 17,9 triệu người mỗi năm, chiếm khoảng 31% tổng số ca tử vong trên toàn cầu. Nguồn gốc của các bệnh này là do sự hình thành cục máu đông gây tắc nghẽn mạch máu. Với khả năng làm tan cục máu đông, nattokinase có tiềm năng lớn để ứng dụng phòng ngừa và điều trị các bệnh liên quan huyết khối. Đây là một loại enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp bởi một số chủng thuộc loài *Bacillus*. Trong tự nhiên, các chủng sinh tổng hợp nattokinase với hoạt độ chưa cao và thường kèm theo nhiều sản phẩm phụ của quá trình trao đổi chất. Trong nghiên cứu này chủng *B. amyloliquefaciens* TVY.04 phân lập từ mẫu tương lấy từ tỉnh Vĩnh Yên được gây đột biến bằng tác nhân vật lý (chiếu tia UV) và hóa học (sử dụng đồng thời Ethyl methanesulfonate và Ethidium bromide) nhằm cải thiện khả năng sinh tổng hợp nattokinase. Sau quá trình đột biến, các biến chủng được sàng lọc định tính trên môi trường thạch LB có bổ sung 1% sữa gầy. Tiếp theo, tiến hành sàng lọc định lượng bằng phương pháp lên men lỏng và tiến hành đo hoạt độ enzyme với cơ chất fibrin. Cuối cùng các chủng đột biến tốt nhất được nuôi cấy 5 chu kỳ để đánh giá tính ổn định. Kết quả sàng lọc từ 100 biến chủng đã thu được chủng UV1.15 có hoạt độ Nattokinase tăng 19% so với chủng gốc.

*Từ khóa:* *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04, đột biến ngẫu nhiên, nattokinase, ethidium bromide, ethyl methanesulfonate, UV.

## MỞ ĐẦU

Nattokinase (NK) (E.C.3.4.21.62) là một serine protease thuộc họ subtilisin gồm 275 axit amin và có khối lượng phân tử xấp xỉ 28 kDa, pI 8,6 (Weng *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018). Nattokinase có khả năng làm tan cục máu đông bằng cách phân giải trực tiếp fibrin, chuyển đổi prourokinase thành urokinase và làm tăng mức độ chất hoạt hóa plasminogen t-PA (Milner and Makise, 2002; Weng *et al.*, 2017). Hơn nữa, hoạt tính làm tan huyết khối của NK được chứng minh cao gấp 4 lần so với plasmin (Chen *et al.*, 2018) và thời gian hiệu lực cao, đạt từ 8 - 12 giờ trong cơ thể, so với t - PA chỉ có hiệu quả cao nhất sau 3 - 6 giờ và urokinase từ 4 - 20 phút sau khi khởi phát (Milner and Makise, 2002). Chính từ những ưu điểm kể trên, NK đã được quan tâm nghiên cứu trên thế giới từ nhiều năm nay. Một trong số các hướng nghiên cứu tiềm năng là tạo ra các đột biến ngẫu nhiên hoặc có định hướng, nhằm cải thiện hoạt độ hoặc các tính chất của protein enzyme (Li *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2024).

Vi sinh vật có thể tạo ra đặc tính di truyền mới bằng hai cách là đột biến và tái tổ hợp di truyền. Phương pháp phổ biến nhất được sử dụng để tạo đột biến cho năng suất cao là xử lý một quần thể bằng tác nhân gây đột biến cho đến khi đạt được tỷ lệ sống sót mong muốn. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng tần số đột biến thu được cao khi tỷ lệ sống sót nằm trong khoảng từ 0.1 - 10% (Jun *et al.*, 2012). Các đột biến ngẫu nhiên có thể được tạo ra khi sử dụng các tác nhân vật lý hoặc hóa học. Với phương pháp hóa học, các hóa chất như ethyl methanesulfonate (EMS), Ethidium bromide (EtBr) là những tác nhân gây đột biến mạnh với cơ chế gây ra sự thay đổi trong quá trình sao chép DNA. EMS tạo ra các đột biến ngẫu nhiên trong DNA bằng cách thay thế nucleotide, đặc biệt là bằng cách alkyl hóa guanine. EtBr gây đột biến bằng cách chèn vào giữa các sợi DNA và làm biến dạng DNA. Các đột biến hóa học làm tăng tần số đột biến và dễ dàng xử lý hơn (Latif *et al.*, 2018). Với các tác nhân đột biến hóa học, liều lượng và thời gian xử lý được báo cáo là những yếu tố chính ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của tế bào và hiệu quả đột biến. Theo các công bố, đột biến hóa học có thể làm tăng hoạt độ enzyme của chủng từ 1,5 đến trên 9 lần (Latif *et al.*, 2018; Prihanto *et al.*, 2019; Sasi *et al.*, 2020).

Với phương pháp vật lý, các nguồn UVB (280 - 320 nm) và UVC (100 - 280 nm) có thể gây ra cả sự phá hủy trực tiếp và gián tiếp do khả năng hấp thụ mạnh mẽ của các phân tử DNA (Mohsin *et al.*, 2017). Phản ứng phổ biến nhất được chỉ ra là việc hình thành liên kết giữa các thymine liền kề tạo thành cấu trúc thymine dimer (T - T). Các dimer này dẫn đến những thay đổi cấu trúc trong DNA, ngăn cản quá trình phiên mã và sao chép DNA của vi sinh vật dẫn đến đột biến hoặc có thể gây chết tế bào (Prihanto *et al.*, 2020). Khoảng cách, thời gian và cường độ chiếu tia UV là các yếu tố mang tính quyết định đến hiệu quả của phương pháp đột biến này. Jun và đồng tác

giả (2012) thực hiện đột biến chủng *Bacillus subtilis* LD-8547 bằng tác nhân UV để nâng cao khả năng sinh tổng hợp enzyme phân giải fibrin, kết quả thu nhận được biến chủng có hoạt độ cao gấp 1,27 lần so với chủng gốc. Nhìn chung, phương pháp đột biến bằng tia UV có thể làm tăng rõ rệt hoạt độ enzyme của các chủng vi sinh vật (Sasi *et al.*, 2020; Tuly *et al.*, 2022). Một điểm đáng lưu ý là sau khi chiếu UV, việc giữ tế bào trong bóng tối có thể giúp hạn chế kích hoạt cơ chế tự sửa chữa, qua đó thu được nhiều biến chủng hơn (Mohsin *et al.*, 2017).

Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus amiloliquefaciens* TVY.04 được đột biến ngẫu nhiên bằng các tác nhân vật lý và hóa học nhằm tìm kiếm biến chủng có khả năng sinh tổng hợp nattokinase cao hơn chủng gốc.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus amiloliquefaciens* TVY.04, có trình tự 16S rRNA ký hiệu Genbank OQ225003, được phân lập từ mẫu tương bản thu thập tại tỉnh Vĩnh Yên. Các hóa chất khác có nguồn gốc từ Sigma, Himedia.

### Phương pháp

#### Hoạt hóa và tăng sinh chủng

Chủng TVY.04 được hoạt hóa trên môi trường LBW (peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L, sữa gầy 10 g/L, agar 18 g/L) sau đó được nuôi tĩnh ở 37°C, 16h. Chọn một khuẩn lạc riêng rẽ, có vòng phân giải rõ rệt và cấy chuyển vào 20 mL môi trường LB (peptone 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L) và nuôi lắc ở điều kiện 37°C, 150 rpm. Sau khi tăng sinh, canh trường vi khuẩn được ly tâm 10000 rpm, 5 phút, 4°C, loại bỏ dịch nổi và rửa sinh khối tế bào 3 lần bằng NaCl 0,9% để thu huyền phù vi khuẩn.

#### Đột biến bằng hóa chất

2 mL dịch huyền phù vi khuẩn được xử lý bằng hỗn hợp EMS và EtBr với hàm lượng của từng tác nhân bằng nhau và bằng 75 hoặc 100 µg/mL, thời gian xử lý ( $\Delta T$ ) 10 - 60 phút; tiến hành đồng thời mẫu kiểm chứng thay tác nhân đột biến bằng nước cất. Tế bào sau đột biến được rửa 3 lần bằng NaCl 0,9% (ly tâm 10000 rpm, 5 phút, 4°C) để loại bỏ tác nhân đột biến. Tiếp đó, tế bào được pha loãng, trải trên môi trường LBW và được nuôi tĩnh trong 16 h ở 37°C.

#### Đột biến bằng UV

2 mL dịch huyền phù vi khuẩn được trải trên đĩa Petri sạch. Một đĩa được giữ trong tối dùng làm mẫu kiểm chứng, các đĩa còn lại được chiếu UV (Toshiba GL15,  $\lambda = 253,7$  nm) ở khoảng cách (D) 30 cm hoặc 40 cm trong thời gian ( $\Delta T$ ) từ 2 - 90 phút. Sau chiếu xạ, huyền phù được giữ trong điều kiện tối, 4°C trong 24h nhằm ổn định cấu trúc pyrimidine dimers (Mohsin *et al.*, 2017). Huyền phù sau đột biến được pha loãng, trải trên môi trường LBW và nuôi tĩnh trong 10 h ở 37°C.

#### Sàng lọc biến chủng

Từ các đĩa petri có khuẩn lạc thu được sau đột biến, sàng lọc cấp 1 chọn các khuẩn lạc có vòng phân giải rõ ràng, xác định tỷ lệ D1/D2 với D1 là đường kính vòng phân giải cơ chất, D2 là đường kính khuẩn lạc. Các khuẩn lạc có D1/D2 lớn nhất được cấy chấm điểm sang đĩa môi trường LBW rắn, nuôi tĩnh ở 37°C, 12 h. Các khuẩn lạc tiếp tục được lựa chọn dựa trên tỷ lệ đường kính vòng phân giải và đường kính khuẩn lạc. Các khuẩn lạc này sẽ được sàng lọc cấp 2 bằng cách lên men trên môi trường GPY (peptone 10 g/L, cao nấm men 10 g/L, glucose 10 g/L, NaCl 5 g/L, CaCl<sub>2</sub> 1 g/L,) ở điều kiện 37°C, 150 rpm trong 24 h. Lấy mẫu đo hoạt độ enzyme nattokinase.

#### Xác định tỷ lệ tế bào sống sót

Tỷ lệ tế bào sống sót (SR) được tính toán dựa trên số khuẩn lạc thu được sau đột biến so với mẫu đối chứng không được xử lý chiếu UV hoặc hóa chất (Prihanto *et al.*, 2019).

#### Xác định hoạt độ Nattokinase

Phương pháp định lượng sử dụng cơ chất là fibrin 4 g/L điều kiện phản ứng: pH 7,4, nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Một đơn vị hoạt độ fibrin (FU) được định nghĩa là lượng enzyme xúc tác phản ứng thủy phân fibrin tạo thành lượng sản phẩm tương ứng với 1 µg tyrosine trong thời gian 1 phút ở điều kiện thử nghiệm (Huong *et al.*, 2011). Hoạt độ tương đối của các biến chủng được định nghĩa là tỷ số giữa hoạt độ (FU/mL) của biến chủng và hoạt độ (FU/mL) của chủng gốc trong cùng điều kiện nuôi cấy.

#### Xác định độ ổn định của biến chủng

Chủng đột biến lựa chọn được ria trên môi trường LBW, nuôi tĩnh ở 37°C trong 24 h, lặp lại 5 chu kỳ. Lựa chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy chuyển vào môi trường LB sau đó lên men trên môi trường GYP ở điều kiện 37°C, 150 rpm trong 24 h và đo hoạt độ enzyme để đánh giá khả năng tái sửa chữa (Jun *et al.*, 2012).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

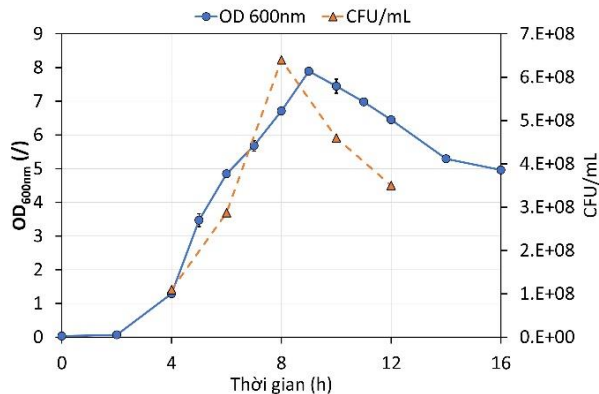
**Sinh trưởng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04**

Đồ thị Hình 1 cho thấy chủng TVY.04 có pha log kéo dài từ thời điểm 2 h đến 9 h với giá trị OD 600 nm đạt cực đại xấp xỉ 8,0. Kết quả xác định mật độ khuẩn lạc bằng phương pháp trải đĩa cho thấy pha log chậm hơn, mật độ CFU/mL đạt cực đại sau 12 h nuôi cấy. Sự khác biệt có thể được giải thích do giá trị OD 600 nm phản ánh tổng lượng tế bào ở trạng thái huyền phù, trong khi giá trị CFU/mL chỉ đặc trưng cho các tế bào sống. Từ đồ thị sinh trưởng, dịch nuôi cấy sau 7 h được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm đột biến ngẫu nhiên.

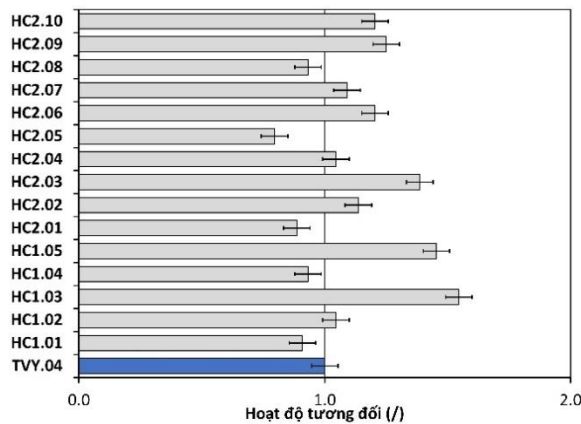
**Đột biến bằng hóa chất**

Với tác nhân đột biến là hỗn hợp EMS và EtBr cùng hàm lượng 100 µg/mL, ΔT = 10 - 60 phút, hầu hết các tế bào bị tiêu diệt, giá trị SR đều chỉ đạt dưới 0,02%. Khi giảm liều lượng tác nhân xuống 75 µg/mL, tỷ lệ sống sót của tế bào tăng đáng kể và đạt xấp xỉ 0,2% với thời gian xử lý ΔT = 10 phút và 30 phút. Kết quả tỷ lệ sống sót thu được có sự tương đồng với công bố của Prihanto và đồng tác giả (2020) trên đối tượng là chủng *Bacillus subtilis* RRM1.

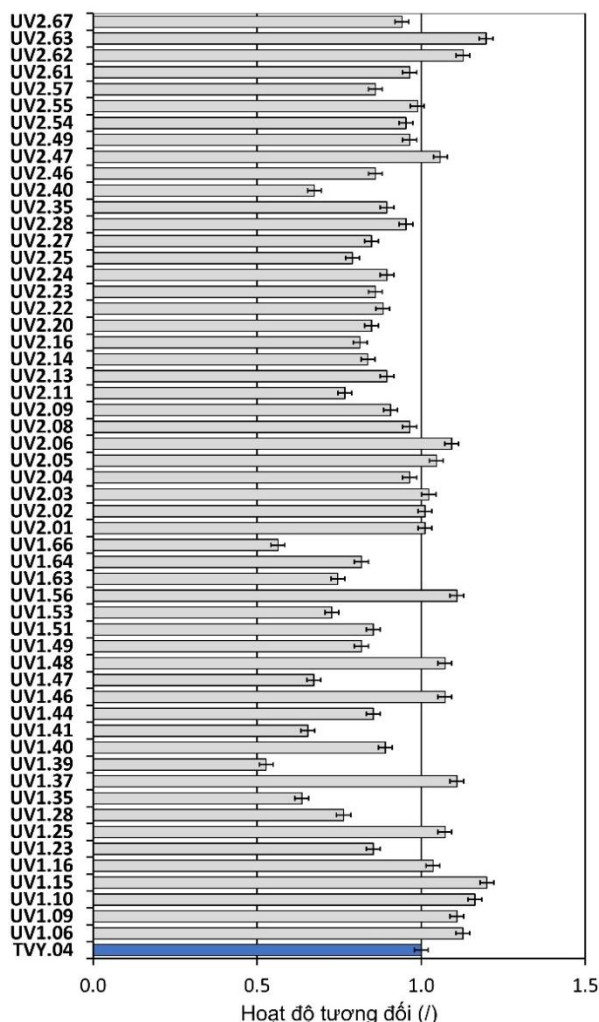
Do tỷ lệ sống sót của đột biến hóa học rất thấp, toàn bộ 15 khuẩn lạc thể hiện rõ ràng vòng phân giải cơ chất trong bước sàng lọc cấp 1 đều được lựa chọn để nuôi cấy trong môi trường lỏng. Kết quả xác định hoạt độ enzyme Nattokinase (Hình 2) cho thấy phần lớn các biến chủng có hoạt độ tương đương hoặc thấp hơn chủng gốc Chủng đột biến HC1.03 và HC1.05 đạt hoạt độ cao nhất, lần lượt gấp 1,55 và 1,44 lần chủng ban đầu. Biến chủng HC1.03 thu được ở chế độ đột biến ứng với hàm lượng tác nhân EMS và EtBr 100 µg/mL, ΔT = 10 phút, SR = 0,02%. Điều đáng lưu ý là biến chủng này chỉ có giá trị tỷ lệ D1/D2 đạt 1,9, thấp hơn đáng kể so với một số khuẩn lạc khác (D1/D2 đạt từ 2,0 đến 2,3). Điều này có thể được giải thích bởi sự hình thành vòng phân giải cơ chất còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố như khả năng khuếch tán của enzyme ngoại bào, độ dày lớp thạch. Với các chủng sinh nattokinase thuộc chi *Bacillus*, enzyme ngoài bào thường được tiết ra cùng các exopolysaccharide tạo độ nhớt cao qua đó ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán của enzyme trên đĩa thạch. Công bố của Rahman và đồng tác giả (2017) cũng kết luận không có mối quan hệ tuyến tính giữa tỷ lệ D1/D2 và hoạt độ enzyme khi nuôi lỏng. Như vậy, có thể thấy phương pháp sàng lọc các biến chủng dựa trên vòng phân giải cơ chất chỉ có ý nghĩa trong việc định tính và phân loại sơ bộ các biến chủng. Sàng lọc bằng phương pháp đo hoạt độ enzyme là cần thiết để thu được các kết quả định lượng tin cậy.



Hình 1. Sinh trưởng của chủng TVY.04 trên môi trường LB

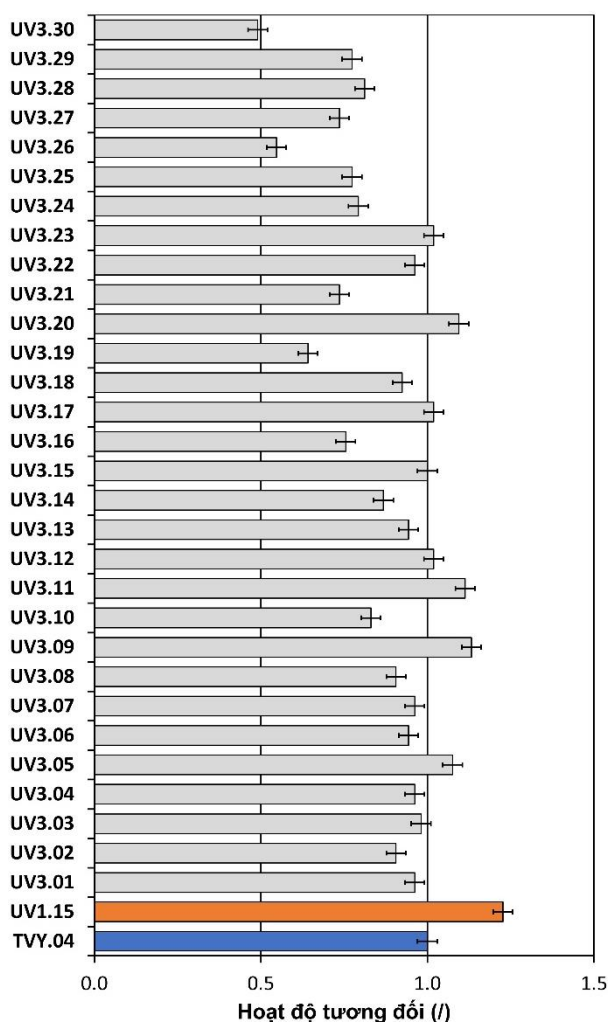


Hình 2. Hoạt độ tương đối của chủng đột biến hóa học so với chủng gốc TVY.04  
 HC1: Hàm lượng EMS và EtBr 100 µg/ml, HC2: Hàm lượng EMS và EtBr 75 µg/ml.



Hình 3. Hoạt độ tương đối của các chủng đột biến bằng UV so với chủng gốc TVY.04

UV1: Khoảng cách chiếu UV 30 cm, UV2: Khoảng cách chiếu 40 cm.



Hình 4. Hoạt độ tương đối của các chủng đột biến kép so với chủng gốc TVY.04

UV3: Đột biến kép với khoảng cách chiếu 30 cm, thời gian 2 phút.

### Đột biến bằng UV

Quá trình chiếu UV cho thấy tỷ lệ sống sót giảm dần theo thời gian chiếu UV với cả 2 khoảng cách chiếu là 30 cm (SR giảm từ 8,76% xuống dưới 0,01%) và 40 cm (SR giảm từ 7,71% xuống dưới 0,01%) với thời gian chiếu từ 2 – 20 phút. Khi tăng khoảng cách chiếu UV từ 30 cm lên 40 cm, tỷ lệ sống sót sau đột biến của chủng không có sự khác biệt đáng kể. Với các thời gian chiếu từ 30 đến 90 phút, không có tế bào sống sót nào thu được ở cả 2 khoảng cách chiếu đã nêu. Theo nghiên cứu trên chủng *B. subtilis* LD-8547, ở chế độ chiếu UV với D = 30 cm và ΔT = 3 - 15 phút, tỷ lệ sống sót đạt từ 0,17 – 39,74%. Ở cùng thời gian xử lý là 5 phút tỷ lệ sống sót của chủng *B. subtilis* LD-8547 đạt 23,08% (Jun *et al.*, 2012). Trong công bố của Prihanto và đồng tác giả (2020) khi thực hiện đột biến với chủng *B. subtilis* RRM-1 ở chế độ khắc nghiệt hơn với D = 15 cm và ΔT = 30 - 120 phút, tỷ lệ sống sót đạt 0,9 – 4,36%. Trong nghiên cứu này, hầu hết các tế bào của chủng TVY.04 đã bị tiêu diệt sau 20 phút và không có khuẩn lạc nào ghi nhận được với thời gian chiếu UV từ 30 đến 90 phút. Như vậy, chủng TVY.04 nhạy cảm hơn một số chủng sinh tổng hợp nattokinase thuộc cùng chi *Bacillus*. Tỷ lệ sống sót thấp khi tiến hành chiếu UV cũng cho thấy mức độ tác động mạnh mẽ của tác nhân đột biến đến tế bào TVY.04.

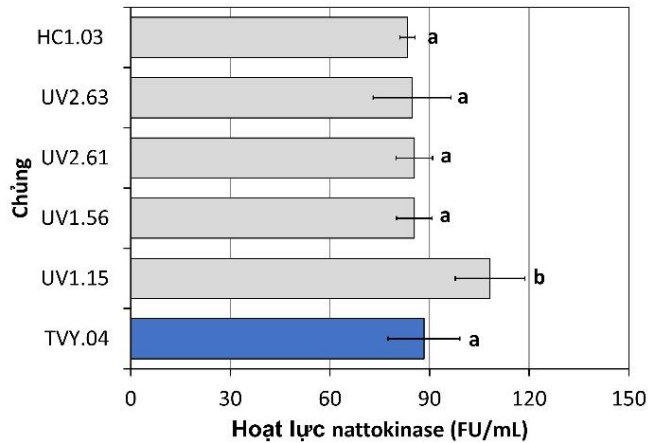
Từ các thí nghiệm chiếu UV, quá trình sàng lọc cấp 1 đã lựa chọn được 55 biến chủng có tỷ lệ D1/D2 tương đồng hoặc tốt hơn chủng gốc TVY.04. Tiếp tục tiến hành sàng lọc cấp 2 trên 55 biến chủng này (Hình 3). Hoạt độ tương đối (so với chủng gốc) của các chủng đột biến nằm trong khoảng từ 0,51 – 1,2. Trong đó các biến chủng UV1.15 và số UV2.63 đạt hoạt độ cao nhất. Trong một số nghiên cứu tương tự khi đột biến bằng tác nhân UV, biến chủng của *Bacillus subtilis* có hoạt độ protease tăng gấp 1,14 lần chủng gốc (Mohsin *et al.*, 2017), biến chủng của *Bacillus licheniformis* có hoạt độ chitinase tăng từ 3 đến 4 lần so với chủng gốc (Sasi *et al.*, 2020).

Biến chủng UV1.15 thu được ở chế độ chiếu xạ  $D = 30$  cm,  $\Delta T = 2$  phút,  $SR = 8,76\%$  được lựa chọn làm đối tượng tiến hành đột biến kép với cùng chế độ chiếu xạ ( $D = 30$  cm và thời gian  $\Delta T = 2$  phút).

Kết quả thực nghiệm cho thấy tỷ lệ sống sót của thí nghiệm đột biến kép đạt chỉ đạt 0,39%, thấp hơn đáng kể so với đột biến lần 1 trong cùng điều kiện. Điều này khẳng định thêm một lần nữa sự nhạy cảm với tác nhân UV của chủng *B. amyloliquefaciens* TVY.04. Do tỷ lệ sống sót thấp, tổng cộng 30 khuẩn lạc có vòng phân giải cơ chất rõ ràng trên môi trường sàng lọc cấp 1 đều được lựa chọn để nuôi cấy lỏng và hoạt độ tương đối được trình bày trên Hình 4. Có thể thấy tất các biến chủng đều có hoạt độ thấp hơn so với chủng UV1.15, thậm chí phần lớn có hoạt độ thấp hơn cả chủng gốc TVY.04. Như vậy quá trình đột biến kép có thể là không cần thiết hoặc đột biến xảy ra ngẫu nhiên nên số lượng khuẩn lạc sàng lọc cần nhiều hơn để có khả năng xuất hiện biến chủng tốt.

**Đánh giá độ ổn định của các chủng đột biến**

Từ kết quả đột biến hóa chất (Hình 2) và đột biến UV (Hình 3) các biến chủng có hoạt độ cao nhất được lựa chọn để đánh giá độ ổn định bao gồm HC1.61, UV1.15, UV1.56, UV2.62 và UV2.63. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng đều có giá trị hoạt độ nattokinase trở về tương đương chủng gốc sau 5 chu kỳ cấy chuyển trên đĩa thạch LBW. Duy nhất UV1.15 là biến chủng giữ được hoạt độ nattokinase cao hơn 1,19 lần so với chủng gốc, đạt 108,2 FU/mL. Như vậy, có khả năng các biến chủng đã kích hoạt quá trình tự sửa chữa những đột biến sinh ra khi xử lý chiếu tia UV hoặc với hóa chất EMS, EtBr. Gần đây, nghiên cứu của Sheng và đồng tác giả (2024) khi đột biến *B. subtilis* ZZ-S1 bằng phương pháp chiếu xạ chùm carbon đã thu được biến chủng có hoạt độ cao gấp 1.66 lần chủng gốc và khả năng sinh tổng hợp enzyme được kiểm chứng ổn định qua 150 chu kỳ cấy chuyển. Như vậy, công đoạn kiểm tra độ ổn định của biến chủng là cần thiết để sàng lọc và chọn ra các biến chủng ổn định.



Hình 5. Hoạt độ nattokinase của chủng gốc TVY.04 và các biến chủng thu được từ đột biến UV và hóa chất sau 5 chu kỳ cấy chuyển trên đĩa thạch  
 Các chữ cái thể hiện khác biệt có nghĩa ( $p < 0,05$ ) được kiểm tra bằng Duncan test với số lần lặp tối thiểu 4.

**KẾT LUẬN**

Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04 sinh tổng hợp nattokinase đã được đột biến bởi các tác nhân vật lý (chiếu tia UV) hoặc hóa học (sử dụng hỗn hợp EMS/EtBr). Qua sàng lọc bằng phương pháp lên men lỏng đã thu được biến chủng UV1.15 có hoạt độ nattokinase cao nhất, đạt 108,2 FU/mL, cao gấp 1,19 lần chủng gốc *B. amyloliquefaciens* TVY.04 và ổn định qua 5 chu kỳ cấy chuyển. Biến chủng này thu nhận được từ quá trình đột biến bằng tác nhân UV với khoảng cách chiếu  $D = 40$  cm, thời gian  $\Delta T = 2$  phút. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ tiếp tục nâng cao hoạt độ của biến chủng UV1.15 bằng kỹ thuật tối ưu điều kiện lên men.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

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 Insights*, 13: 1-8.

Chen L, Yu K, Ma A, Zhu W, Wang H, Tang X, Tang Y, Li Y, Li J (2024). Enhanced Thermostability of Nattokinase by Computation-Based Rational Redesign of Flexible Regions. *J Agric Food Chem*, 72: 14241-14254.

Huong NL, Phuong HT, Luan PQ (2011). Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn sinh tổng hợp enzym nattokinaza từ một số thực phẩm đậu tương lên men. *Journal of Science & Technology Technical Universities*, 81: 175-179.

Jun Y, Guo-liang L, Rong-qiang S, Zhen-hong Z, Yan-ling Y (2012). Mutation of douchi fibrinolytic enzyme producing strain *Bacillus subtilis* LD-8547. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 34: 1251-1255.

Latif A, Iqbal M, Asgher M (2018). Ethyl Methane Sulfonate chemical mutagenesis of *Bacillus subtilis* for enhanced production of protease. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 5: 555664.

- Li Y, Tang X, Chen L, Ma A, Zhu W, Huang W, Li J (2023). Improvement of the fibrinolytic activity, acid resistance and thermostability of nattokinase by surface charge engineering. *Int J Biol Macromol*, 253: 127373.
- Milner M, Makise K (2002). Natto and its active ingredient nattokinase a potent and safe thrombolytic agent. *Altern Complement Ther*, 8: 158-164.
- Mohsin I, Muhammad A, Fareeha B (2017). Development of *Bacillus subtilis* mutants for overproduction of protease. *J Microb Biochem Technol*, 9: 174-180.
- Prihanto AA, Firdaus M, Jatmiko YD (2019). Chemical mutation of *Bacillus subtilis* RRM1 increases L-asparaginase activity. *J Biotech Res*, 10: 250-254.
- Prihanto AA, Muyasyaroh H, Puspita FI (2020). Increasing the production of L-asparaginase from *Bacillus subtilis* RRM-1 by UV-mutation. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, 493: 012012.
- Rahman CH, Soltana F, Abdelwaheb C (2017). Enhancement of protease production by *Bacillus sp.* and *Micrococcus varians* induced by UV-mutagenesis. *Int J Environ Agric Biotechnol*, 2: 2348-2353.
- Sasi A, Duraipandiyar N, Marikani K, Dhanasekaran S, Al-Dayyan N, Venugopal D (2020). Identification and characterization of a newly isolated chitinase-producing strain *Bacillus licheniformis* SSCL-10 for chitin degradation. *Archaea*, 2020: 8844811.
- Sheng Y, Zhang S, Li X, Wang S, Liu T, Wang C, Yan L (2024). Phenotypic and genomic insights into mutant with high nattokinase-producing activity induced by carbon ion beam irradiation of *Bacillus subtilis*. *Int J Biol Macromol*, 271: 132398.
- Tuly JA, Ma H, Zayed HM, Dong Y, Janet Q, Golly MK, Feng L, Li T, Chen G (2022). Harnessing the keratinolytic activity of *Bacillus licheniformis* through random mutagenesis using ultraviolet and laser irradiations. *Appl Biochem Biotechnol*, 194: 1546-1565.
- Weng Y, Yao J, Sparks S, YuejuWang K (2017). Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *Int J Mol Sci*, 18: 523.

## ENHANCE NATTOKINASE ACTIVITY OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* TVY.04 BY RANDOM MUTAGENESIS.

**Tuan Le, Mai Hien Nguyen, Lan Huong Nguyen\***

*Department of Bioengineering, School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

### SUMMARY

Cardio vascular diseases (CVDs) cause extremely dangerous consequences. According to the World Health Organization, this deadly disease is responsible for 17.9 million deaths each year, accounting for about 31% of total deaths globally. The origin of these diseases is the formation of blood clots that block blood vessels. With the ability to dissolve blood clots, nattokinase has great potential for application in prevention and treatment of blood clot-related diseases. This is an extracellular protease biosynthesized by certain strains of the *Bacillus* species. In nature, wild type strains synthesize nattokinase with low activity and often mixed with several byproducts of metabolism. In this study, strain *B. amyloliquefaciens* TVY.04 isolated from a Tuong Ban origin from Vinh Yen province was treated using physical agents (UV irradiation) and chemical agents (simultaneous use of Ethyl methanesulfonate and Ethidium bromide) to improve the nattokinase activity. After the mutagenesis process, mutants were first screened by proteolytic halo formation on LB agar medium supplemented with 1% skim milk. Next, the potential mutants were cultivated in a liquid medium to assess their nattokinase activities using fibrin as the substrate. Finally, the best mutants were cultured for 5 cycles to evaluate their stability. By screening 100 mutants using the mentioned procedure, the best mutant UV1.15 was obtained, having nattokinase activity increased by 19% compared to the original strain TVY.04.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens* TVY.04, random mutagenesis, nattokinase, ethidium bromide, ethyl methanesulfonate, UV.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0903247172; Email: huong.nguyenlan@hust.edu.vn