

TỐI ƯU HÓA CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP ENZYME FIBRINOLYTIC CỦA DÒNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* MLO1

Lê Thị Ngọc Hân^{1,2,*}, Võ Thị Ngọc Diệp¹, Nguyễn Văn Thành¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng thu nhận enzyme fibrinolytic từ *Bacillus subtilis* ML01 sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) với phương án cấu trúc có tâm (CCD). Thiết kế thí nghiệm Plackett - Burman được sử dụng để sàng lọc các yếu tố chính tác động đến quá trình sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic trong 10 yếu tố được chọn, bao gồm: Glucose, maltose, sucrose, soya peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, pH và mật độ vi khuẩn ban đầu. Kết quả cho thấy, maltose, soya peptone, K₂HPO₄ và mật độ vi khuẩn là 4 yếu tố có ảnh hưởng nhiều nhất (p-value < 0,05). Trên cơ sở đó, khi sử dụng phương pháp RSM - CCD đã tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic với các giá trị tối ưu được xác định là maltose 18,15 g/L, soya peptone 9,59 g/L, K₂HPO₄ 2,33 g/L và mật độ vi khuẩn 2,6 x 10⁶ tế bào/mL, sau 48 giờ lên men ở 37°C cho hoạt tính enzyme fibrinolytic cao nhất là 25,56 FU/mL, cao hơn trước khi tối ưu 2,9 lần (8,89 FU/mL). Ma trận Plackett - Burman kết hợp với RSM - CCD được đánh giá là công cụ phù hợp để tối ưu hóa giá trị của các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, enzyme fibrinolytic, RSM - CCD, sinh tổng hợp, tối ưu hóa.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tắc nghẽn mạch do huyết khối dẫn đến nhồi máu cơ tim, đột quỵ và các rối loạn tim mạch khác là một trong những nguyên nhân chính gây tử vong ở người. Năm 2012, khoảng 17,6 triệu người chết vì bệnh tim mạch (CVD), chiếm 31,43% tổng số ca tử vong trên toàn cầu [1]. Huyết khối được hình thành do sự tích tụ fibrin thông qua quá trình đông máu bởi nhiều yếu tố, fibrin chủ yếu được tạo thành từ fibrinogen do tác động của thrombin [2]. Các liệu pháp điều trị sử dụng thuốc làm tan huyết khối đang được sử dụng rộng rãi nhưng chi phí ứng dụng lâm sàng đắt và có các tác dụng phụ không mong muốn như xuất huyết tiêu hóa hay dị ứng [3]. Do đó, việc tìm kiếm các phương pháp mới làm tan huyết khối an toàn, tiết kiệm và hiệu quả hơn đang được tiến hành. Enzyme từ vi sinh vật đã được lựa chọn nghiên cứu rộng rãi vì đây có

thể xem là nguồn nguyên liệu rẻ tiền và an toàn [4].

Enzyme fibrinolytic là enzyme phân hủy huyết khối được sản xuất từ nhiều loại vi sinh vật khác nhau trong đó có chi *Bacillus* là một chi lớn của vi khuẩn có khả năng sinh enzyme hiệu quả trong việc làm tan huyết khối [5]. Điều kiện nuôi cấy và thu nhận enzyme từ chi *Bacillus* đơn giản, chế phẩm enzyme có độ bền cao, hoạt động trong khoảng nhiệt độ và pH phù hợp ứng dụng trong công nghiệp [6].

Việc sử dụng thống kê trong thiết kế thí nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến môi trường nuôi cấy vi khuẩn như nguồn nitơ, các bon, nguồn khoáng và tối ưu hóa các yếu tố được chọn nhằm tìm ra môi trường tối ưu để thu nhận enzyme fibrinolytic đạt năng suất cao là hướng tiếp cận của các nghiên cứu gần đây [7 - 10]. Trong đó, tối ưu đa yếu tố theo ma trận của Plackett và Burman (1946) [11] là phương pháp giúp tiết kiệm thời gian nghiên cứu và số lượng thí nghiệm cần thực hiện [9] nhờ vào khả năng phát hiện các yếu tố quan trọng trong các thành phần được khảo sát

¹ Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

² Trường Cao đẳng Kinh tế - Kỹ thuật Cần Thơ

*Email: ltnhan@ctec.edu.vn

[10]. Trong nghiên cứu này, các yếu tố ảnh hưởng của quá trình nuôi cấy *Bacillus* sp. được sàng lọc theo ma trận Plackett - Burman và tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) - phương án cấu trúc có tâm (CCD), với mục tiêu tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình tổng hợp enzyme fibrinolytic, làm tiền đề tạo sinh phẩm ứng dụng vào thực tế sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống vi khuẩn: Dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01 được phân lập, định danh và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Vi sinh vật công nghiệp, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ [12]. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01 được nuôi cấy tăng mật độ vi khuẩn trên môi trường NB (Nutrient Broth, Merck). Mật độ vi khuẩn được xác định bằng phương pháp đếm trực tiếp trên buồng đếm hồng cầu (Neubauer - Improved, Bright - line), dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 100X.

Hóa chất: Fibrinogen, thrombin, sodium tetraborate decahydrate, trichloroacetic acid - TCA (Sigma - Aldrich, Merck).

Môi trường lên men trước tối ưu: Glucose 2 g/L, maltose 20 g/L, soya peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4$ 1 g/L [7].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp lên men

Cho 99 mL môi trường lên men lỏng có thành phần như trên vào bình tam giác 250 mL, dùng nút bông không thấm nước đậy kín miệng bình tam giác (phía trên đậy nắp giấy) và tiến hành khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau khi để nguội hoàn toàn, bổ sung 1 mL dịch tăng sinh vi khuẩn với mật độ 1×10^6 tế bào/mL (tb/mL) vào môi trường. Tất cả các mẫu được ủ lắc liên tục với tốc độ 150 vòng/phút ở 37°C. Sau 48 giờ lên men, các mẫu được đem ly tâm 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, thu lấy phần dịch lỏng đem phân tích hoạt tính enzyme.

Chỉ tiêu phân tích: Hoạt tính enzyme fibrinolytic (FE) theo phương pháp Japan Bio

Science Laboratory Co., Ltd. (JBSL) (Japan Nattokinase Association, 2000).

2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính enzyme fibrinolytic sử dụng phương pháp định lượng theo sự thủy phân fibrin

Thí nghiệm được tiến hành trong các ống nghiệm, mỗi mẫu enzyme có một mẫu đối chứng (mẫu chứa enzyme bất hoạt) và lặp lại 3 lần. Cho 0,4 mL dung dịch fibrinogen 0,72% và 1,4 mL đệm borate vào ống nghiệm, ủ trong bể cách thủy 37 ± 0,3°C trong 5 phút. Thêm 0,1 mL dung dịch thrombin 20 U/mL, lắc đều. Sau 10 phút, tiến hành cho 0,1 mL enzyme thu nhận, ủ 37 ± 0,3°C. Sau 20 phút và 40 phút kể từ thời điểm phản ứng bắt đầu (khi cho mẫu thử vào), lắc đều ống nghiệm. Sau 60 phút, thêm 2 mL dung dịch TCA 0,2 M (để ngừng phản ứng), tiếp tục ủ trong bể cách thủy 37 ± 0,3°C thêm ít nhất 20 phút nữa. Ly tâm 15.000 vòng trong 10 phút, thu nhận dịch trong. Đo độ hấp thụ của dịch trong ở bước sóng 275 nm. Một đơn vị (1 FU - fibrinolytic unit) được định nghĩa là lượng enzyme làm tăng sự hấp thụ của dịch sau phản ứng enzyme tại bước sóng 275 nm bằng 0,01 trong thời gian một phút dưới các điều kiện phản ứng.

2.2.3. Sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett - Burman để sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic

Thí nghiệm được thiết kế theo ma trận Plackett - Burman để sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng chính trong các yếu tố ảnh hưởng của quá trình tối ưu, mỗi yếu tố ảnh hưởng được kiểm tra ở hai cấp độ: Mức thấp (-1) và mức cao (+1). Các yếu tố được chọn trong nghiên cứu này là glucose, maltose, sucrose, soya peptone, yeast extract, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, pH và mật độ tế bào vi khuẩn (tb/mL) được thể hiện trong bảng 1. Do số lần chạy hay nghiệm thức (n) trong thiết kế Plackett - Burman luôn là bội số của 4 và số lượng các yếu tố ảnh hưởng (k) có thể ít hơn một số so với số lần chạy ($k \leq n - 1$) [11], nên từ 10 yếu tố ảnh hưởng được chọn sẽ cho 12 nghiệm thức để sàng lọc yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến khả năng sinh hoạt tính enzyme fibrinolytic của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01 (Bảng 2). Kết thúc quá trình lên men, xác định hoạt tính enzyme

fibrinolytic (FU/mL). Xử lý số liệu bằng phần tác động ý nghĩa đến quá trình lên men. mềm Design - Expert 7.0 để xác định các nhân tố

Bảng 1. Các biến trong ma trận Plackett - Burman

STT	Yếu tố	Đơn vị	Mức	
			-1 (Thấp)	+1 (Cao)
1	Glucose	g/L	13	33
2	Maltose	g/L	10	30
3	Sucrose	g/L	25	45
4	Soya peptone	g/L	5	15
5	Yeast extract	g/L	10	20
6	K ₂ HPO ₄	g/L	1	3
7	MgSO ₄	g/L	0,25	0,75
8	CaCl ₂	g/L	0,25	1,25
9	pH		5	9
10	Mật độ	tb/mL	10 ⁴	10 ⁷

Bảng 2. Các nghiệm thức được thiết kế theo ma trận Plackett - Burman

STT	Glucose	Maltose	Sucrose	Soya peptone	Yeast extract	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	pH	Mật độ
1	13	30	45	15	10	1	0,25	1,25	5	10 ⁷
2	13	30	45	5	20	3	0,75	0,25	5	10 ⁴
3	33	30	25	5	10	3	0,25	1,25	9	10 ⁴
4	33	10	45	15	10	3	0,75	1,25	5	10 ⁴
5	33	30	45	5	10	1	0,75	0,25	9	10 ⁷
6	33	30	25	15	20	3	0,25	0,25	5	10 ⁷

7	13	10	45	5	20	3	0,25	1,25	9	10 ⁷
8	13	30	25	15	20	1	0,75	1,25	9	10 ⁴
9	13	10	25	15	10	3	0,75	0,25	9	10 ⁷
10	33	10	45	15	20	1	0,25	0,25	9	10 ⁴
11	13	10	25	5	10	1	0,25	0,25	5	10 ⁴
12	33	10	25	5	20	1	0,75	1,25	5	10 ⁷

2.2.4. Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic và kiểm định thực nghiệm mô hình tối ưu hóa đã chọn

Các yếu tố có ảnh hưởng nhất đến kết quả khảo sát sẽ được chọn để tiến hành thí nghiệm theo RSM - CCD để xác định giá trị tối ưu [13]. Từ kết quả xử lý thống kê dựa trên mô hình Plackett - Burman, các nhân tố có tác động ý nghĩa đến quá trình lên men được tối ưu hóa theo RSM - CCD bởi phần mềm Design - Expert 7.0. Mỗi nhân tố được xác định với 5 giá trị (-a, -1, 0, +1, +a) và thực hiện 3 lần lặp lại. Cuối cùng, dựa vào kết quả thực nghiệm thu được từ thí nghiệm theo RSM - CCD, phần mềm Design - Expert 7.0 đã phân tích và đề xuất các nghiệm thức để thu được hoạt tính enzyme fibrinolytic cao nhất dựa trên các yếu tố khảo sát. Sau đó, thí nghiệm kiểm định mô hình được thực hiện với 3 lần lặp lại để xác nhận lại các

điều kiện tối ưu với 3 nghiệm thức dự đoán kết quả cao nhất.

2.3. Phân tích thống kê

Phần mềm Design - Expert (phiên bản 7.0, Stat - Ease Inc., USA) được sử dụng để phân tích phương sai (ANOVA), tính toán hệ số của phương trình hồi quy và đề xuất giải pháp cho mô hình tối ưu hóa.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic sử dụng thiết kế thí nghiệm Plackett - Burman

Nhằm sàng lọc các yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến khả năng sinh hoạt tính enzyme fibrinolytic của vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01, ma trận Plackett - Burman [11, 14] đã được thiết kế với 12 nghiệm thức dựa trên 10 yếu tố được chọn. Kết quả hoạt tính enzyme fibrinolytic được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Hoạt tính enzyme fibrinolytic của 12 nghiệm thức thiết kế bởi ma trận Plackett - Burman

STT	G	M	S	SP	YE	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄	CaCl ₂	pH	Mật độ	Hoạt tính enzyme fibrinolytic (FU/mL)
1	13	30	45	15	10	1	0,25	1,25	5	10 ⁷	12,22
2	13	30	45	5	20	3	0,75	0,25	5	10 ⁴	16,11
3	33	30	25	5	10	3	0,25	1,25	9	10 ⁴	14,22

4	33	10	45	15	10	3	0,75	1,25	5	10 ⁴	12,78
5	33	30	45	5	10	1	0,75	0,25	9	10 ⁷	13,89
6	33	30	25	15	20	3	0,25	0,25	5	10 ⁷	14,44
7	13	10	45	5	20	3	0,25	1,25	9	10 ⁷	19,44
8	13	30	25	15	20	1	0,75	1,25	9	10 ⁴	8,89
9	13	10	25	15	10	3	0,75	0,25	9	10 ⁷	17,78
10	33	10	45	15	20	1	0,25	0,25	9	10 ⁴	12,78
11	13	10	25	5	10	1	0,25	0,25	5	10 ⁴	16,67
12	33	10	25	5	20	1	0,75	1,25	5	10 ⁷	12,78
CV (%)											1,11

Ghi chú: Đơn vị của glucose (G), maltose (M), sucrose (S), soya peptone (SP), yeast extract (YE), K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂ là g/Lít; đơn vị mật độ vi khuẩn là tế bào/mL.

Bảng 4. Phân tích phương sai kết quả hoạt tính enzyme fibrinolytic thiết kế bởi thí nghiệm Plackett - Burman từ phần mềm Design - Expert 7.0

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do (df)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P Pro > F	
Mô hình	88,28	10	8,83	350,20	0,0416	Có ý nghĩa
A-Glucose	9,28	1	9,28	367,94	0,0332	
B-Maltose	13,63	1	13,63	540,77	0,0274	
C-Sucrose	0,64	1	0,64	25,36	0,1248	
D-Soya peptone	16,08	1	16,08	637,79	0,0252	
E- Yeast extract	0,65	1	0,65	25,73	0,1239	

F-K ₂ HPO ₄	24,68	1	24,68	979,12	0,0203	
G-MgSO ₄	4,33	1	4,33	171,85	0,0485	
H-CaCl ₂	11,35	1	11,35	450,21	0,0300	
J-pH	0,23	1	0,23	9,22	0,2025	
K-Mật độ vi khuẩn	7,41	1	7,41	293,97	0,0371	
Phần dư	0,025	1	0,025			
Tổng tương quan	88,30	11				

Bảng 4 cho thấy, mô hình có ý nghĩa thống kê với giá trị của p-value: 0,0416 < 0,05. Điều này chứng minh các yếu tố được chọn của thí nghiệm có tác động mạnh đến sự sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic.

Bảng 5. Mức độ ảnh hưởng của các yếu tố dựa vào hoạt tính enzyme fibrinolytic

Kí hiệu	Yếu tố	Mức		Mức độ ảnh hưởng	
		-1	+1	Hệ số ảnh hưởng	P- value
A	Glucose	13	33	-0,88	0,0332
B	Maltose	10	30	-1,07	0,0274
C	Sucrose	25	45	0,23	0,1248
D	Soya peptone	5	15	-1,16	0,0252
E	Yeast extract	10	20	-0,23	0,1239
F	K ₂ HPO ₄	1	3	1,43	0,0203
G	MgSO ₄	0,25	0,75	-0,60	0,0485
H	CaCl ₂	0,25	1,25	-0,97	0,0300
J	pH	5	9	0,14	0,2025
K	Mật độ	10 ⁴	10 ⁷	0,79	0,0371

Hệ số ảnh hưởng của từng yếu tố được tính toán bằng phần mềm Design - Expert 7.0 (Bảng 5). Nếu hệ số ảnh hưởng của một yếu tố là số dương, có nghĩa là yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức cao và ngược lại, giá trị ảnh hưởng là số âm thì yếu tố đó ảnh hưởng nhiều hơn ở mức thấp đến kết quả khảo sát [9]. Căn cứ vào hệ số ảnh hưởng (chọn các hệ số có giá trị tuyệt đối lớn hơn), xác định được 4 yếu tố có tác động mạnh nhất đến sự sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic với độ tin cậy trên 95% (p-value < 0,05) là: Maltose (-1,07), soya peptone (-1,16), K₂HPO₄ (1,43), mật độ (0,79). Do

đó, 4 yếu tố maltose, soya peptone, K₂HPO₄, mật độ vi khuẩn được chọn cho thiết kế thí nghiệm RSM - CCD.

3.2. Giá trị tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic

Dựa trên kết quả thí nghiệm theo ma trận Plackett - Burman, thí nghiệm RSM - CCD với 4 yếu tố được chọn (Bảng 6) đã được tiến hành để xác định giá trị tối ưu của môi trường lên men và số liệu được xử lý bằng phần mềm Design - Expert 7.0.

Bảng 6. Các biến được chọn cho thiết kế thí nghiệm RSM - CCD

STT	Yếu tố	Đơn vị	Mức	
			-1 (Thấp)	+1 (Cao)
1	Maltose	g/L	10	30
2	Soya peptone	g/L	5	15
3	K ₂ HPO ₄	g/L	1	3
4	Mật độ	tb/mL	10 ⁴	10 ⁷

Phần mềm thống kê Design - Expert 7.0 đánh giá sự phù hợp và có ý nghĩa của mô hình thí nghiệm qua phân tích phương sai (ANOVA) và các chỉ số tương quan. Mức độ ý nghĩa của các hệ số hồi quy được kiểm định với các giá trị p-value < 0,05 cho biết các hệ số hồi quy có ý nghĩa. Kết quả phân tích ANOVA được trình bày trong bảng 7, với p-value của mô hình là 0,0038 < 0,05 (có ý nghĩa thống kê), điều đó cho thấy mô hình hoàn toàn có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%.

Ngoài ra, để xác định mức độ phù hợp của mô hình thì hệ số xác định R² là một thước đo quan trọng và giá trị này càng gần với 1 thì mối tương quan giữa giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán càng tốt [15]. Trong mô hình này, giá trị R² là 0,8024, tuy nhiên R² không hoàn toàn quyết

định giá trị nghiên cứu của mô hình vì còn phụ thuộc vào nhiều giá trị khác. Bên cạnh chỉ số R² thì chỉ số R² hiệu chỉnh thường được sử dụng vì giá trị này phản ánh sát hơn mức độ phù hợp của mô hình hồi quy. Bảng 7 cho thấy, R² hiệu chỉnh là 0,6181, điều này có nghĩa là các nhân tố khảo sát giải thích được 61,81% sự biến thiên của hoạt tính enzyme fibrinolytic và 39,19% còn lại ảnh hưởng bởi các nhân tố khác ngoài mô hình cũng như sai số ngẫu nhiên. Mặt khác, độ chính xác phù hợp (Adeq Precision) của mô hình này bằng 5,420 được cho là tốt nhất khi ≥ 4 vì nó thể hiện tỷ lệ tín hiệu nhiễu và R² dự đoán có giá trị “âm” đã thể hiện giá trị trung bình tổng thể là một dự đoán phản hồi tốt hơn so với mô hình hiện tại [16].

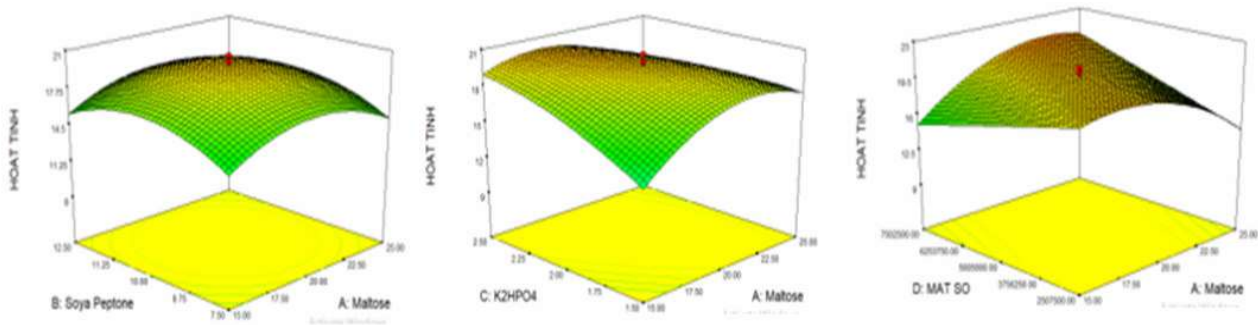
Bảng 7. Kết quả phân tích phương sai tối ưu quá trình tổng hợp các yếu tố

Yếu tố	Tổng bình phương	Bậc tự do (df)	Trung bình bình phương	Giá trị F	Giá trị P Prob>F
Mô hình	442,43	14	31,60	4,35	0,0038
A-Maltose	0,63	1	0,63	0,087	0,7723
B- Soya Peptone	2,89	1	2,89	0,40	0,5375
C-K ₂ HPO ₄	19,60	1	19,60	2,70	0,1212
D-Mật độ	3,71	1	3,71	0,51	0,4860
AB	0,019	1	0,019	2,604E-003	0,9600
AC	42,61	1	42,61	5,87	0,0285
AD	102,87	1	102,87	14,17	0,0019
BC	4,32	1	4,32	0,59	0,4527
BD	2,33	1	2,33	0,32	0,5792
CD	14,08	1	14,08	1,94	0,1841
A ²	149,29	1	149,29	20,56	0,0004
B ²	123,77	1	123,77	17,74	0,0009
C ²	17,74	1	17,74	2,44	0,1389
D ²	0,045	1	0,045	6,202E-003	0,9383
Phần dư	108,92	15	7,26		
Sự thiếu phù hợp (Lack of Fit)	104,73	10	10,47	12,50	0,0061
Sai số	4,19	5	0,84		
Tổng tương quan	551,35	29			

Độ lệch chuẩn	2,69	R ²	0,8024
Trung bình	15,48	R ² hiệu chỉnh	0,6181
Độ biến động (CV %)	17,41	R ² dự đoán	-0,1051

Bảng 7 cho thấy, maltose×K₂HPO₄, maltose × mật độ, maltose × maltose, soya peptone × soya peptone là tác động có ý nghĩa đến khả năng sinh enzyme, với giá trị P-value lần lượt là 0,0285; 0,0019; 0,0004; 0,0009 (đều nhỏ hơn 0,05). Bên

cạnh đó, kết quả sự tương tác giữa maltose và soya peptone, K₂HPO₄ và mật độ vi khuẩn cũng được thể hiện trong biểu đồ bề mặt đáp ứng hoạt tính enzyme fibrinolytic theo các yếu tố ảnh hưởng được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Biểu đồ bề mặt đáp ứng thể hiện sự tương quan lẫn lượt giữa maltose và soya peptone, K₂HPO₄ và mật độ vi khuẩn đến hoạt tính enzyme fibrinolytic

Dựa trên các kết quả phân tích, sự tương quan của các yếu tố khảo sát được thể hiện qua phương trình hồi quy được xây dựng bằng phần mềm Design - Expert 7.0 như sau: HOẠT TINH = +19,72 + 0,16 * A + 0,35 * B + 0,90 * C + 0,39 * D - 0,034 * A * B - 1,63 * A * C + 2,54 * A * D + 0,52 * B * C + 0,38 * B * D - 0,94 * C * D - 2,33 * A² - 2,12 * B² - 0,80 * C² - 0,041 * D². Trong đó: A, B, C, D lần lượt là các giá trị maltose, soya peptone, K₂HPO₄ và mật độ vi khuẩn. Mật khác, dựa vào các nghiệm thức được thiết kế sẵn từ mô hình tối ưu hóa CCD, phần mềm đã xử lý và cho kết quả các thành phần

tối ưu hóa với 30 nghiệm thức. Trong 30 nghiệm thức phần mềm đề xuất, 4 tổ hợp maltose, soya peptone, K₂HPO₄ và mật độ vi khuẩn tại 3 nghiệm thức có số thứ tự là 4, 9, 21 cho hoạt tính enzyme fibrinolytic cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, để xác nhận tính đúng đắn của mô hình tối ưu hoạt tính enzyme fibrinolytic được sinh ra bởi dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01, cần tiến hành các thí nghiệm kiểm chứng 3 nghiệm thức tối ưu mô hình đưa ra (Bảng 8). Từ đó, chọn ra nghiệm thức cho kết quả hoạt tính enzyme mong đợi tối ưu nhất.

Bảng 8. Kết quả kiểm tra hoạt tính enzyme fibrinolytic thu được từ mô hình và thực tế

STT mô hình	Maltose (g/L)	Soya peptone (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	Mật độ vi khuẩn (tb/mL)	Hoạt tính FE theo thuật toán (FU/mL)	Hoạt tính FE theo thực tế (FU/mL)
4	16,83	11,39	2,42	3,1 × 10 ⁶	20,86	24,44
9	18,35	10,45	2,19	3,1 × 10 ⁶	20,41	25,00
21	18,15	9,59	2,33	2,6 × 10 ⁶	20,95	25,56

Ghi chú: Số liệu ở cột trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại.

Bảng 8 cho thấy, hoạt tính enzyme fibrinolytic thu được từ thực tế cao hơn so với thuật toán. Điều này chứng tỏ sự tính toán của mô hình và thực nghiệm tương đối thống nhất, mô hình tối ưu tương thích với thực nghiệm.

Với các giá trị maltose, soya peptone, K_2HPO_4 và mật độ vi khuẩn dao động trong các khoảng giá trị phù hợp (Bảng 8), kết quả thực tế cho thấy, hoạt tính enzyme fibrinolytic cao, dao động từ 24,44 - 25,56 FU/mL. Trong đó, nghiệm thức số 21 với các giá trị maltose 18,15 g/L; soya peptone 9,59 g/L; K_2HPO_4 2,33 g/L và mật độ vi khuẩn $2,6 \times 10^6$ tb/mL cho hoạt tính enzyme fibrinolytic cao nhất là 25,56 FU/mL. Nghiệm thức số 21 với các giá trị maltose 18,15 g/L phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Tường Châu và cs (2017) khi sử dụng

maltose trong môi trường lên men với hàm lượng 15 g/L [17]. Hàm lượng soya peptone 9,59 g/L cũng ở mức phù hợp với kết quả nghiên cứu của Trần Quốc Tuấn và cs (2014), khi sử dụng soya peptone với hàm lượng 10 g/L để tối ưu việc sản xuất nattokinase bằng phương pháp đáp ứng bề mặt phương án cấu trúc có tâm [8]. Bên cạnh đó, việc bổ sung khoáng K_2HPO_4 với hàm lượng 2,33 g/L cũng có tác động đến hoạt tính của enzyme fibrinolytic, kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Tuan và Huong (2014) [18] khi sử dụng 2,125 g/L K_2HPO_4 trong môi trường lên men sản xuất enzyme nattokinase. Từ kết quả trên cho thấy, đây là nghiệm thức tối ưu nhất cho khả năng lên men sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic của dòng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ML01.

Bảng 9. So sánh hoạt tính fibrinolytic enzyme trong môi trường trước và sau tối ưu

Thử nghiệm	Nguồn các bon (g/L)	Nguồn nitơ (g/L)	Nguồn khoáng (g/L)	Mật độ (tb/mL)	Hoạt tính FE (FU/mL)
Trước tối ưu	Maltose: 20 Glucose: 2	Soya peptone: 10 Yeast extract: 10	K_2HPO_4 : 2 MgSO ₄ : 1	1×10^6	8,89
Sau tối ưu	Maltose: 18,15	Soya peptone: 9,59	K_2HPO_4 : 2,33	$2,6 \times 10^6$	25,56

So sánh với khi chưa tối ưu thì việc tối ưu hóa thành phần môi trường lên men đã góp phần làm tăng hoạt tính của enzyme fibrinolytic từ 8,89 FU/mL (trước tối ưu) lên 25,56 FU/mL (sau tối ưu), tăng khoảng 2,9 lần (Bảng 9). Kết quả này chứng tỏ việc tối ưu hóa sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt theo phương án cấu trúc có tâm có ý nghĩa thực tiễn trong nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp sử dụng ma trận Plackett - Burman và tối ưu hóa theo phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) với phương án cấu trúc có tâm (CCD), thành phần môi trường lên men tối ưu cho khả năng sinh tổng hợp enzyme fibrinolytic của chủng *B. subtilis* ML01 được xác định với các thông số bao gồm: Hàm lượng maltose 18,15 g/L, soya peptone 9,59 g/L, K_2HPO_4 2,33 g/L, mật độ vi khuẩn $2,6 \times 10^6$ tb/mL cho hoạt tính enzyme

fibrinolytic cao nhất là 25,56 FU/mL. Kết quả này làm tiền đề cho nghiên cứu sản xuất enzyme fibrinolytic tạo chế phẩm ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- McAloon, C. J., Boylan, L. M., Hamborg, T., Stallard, N., Osman, F., Lim, P. B. & Hayat, S. A. (2016). The changing face of cardiovascular disease 2000 - 2012: An analysis of the world health organisation global health estimates data. *International Journal of Cardiology*. Vol. 224, pp. 256 - 264.
- Simkhada, J. R., P. Mander, S. S. Cho and J. C. Yoo (2010). Novel fibrinolytic protease from streptomyces sp. CS684. *Journal of Process Biochemistry*. Vol. 45, pp. 88 - 93.
- Mahajan, P. M. , S. Nayak, S. S. Lele (2012). Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine

- bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 113, No. 3, pp. 307 - 314.
4. Peng, Y., Q. Huang, R. H. Zhang and Y. Z. Zhang (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 134, pp. 45 - 52.
5. Yogesh, D. and P. M. Halami (2017). Fibrinolytic enzymes of *Bacillus* sp.: An overview. *International Food Research Journal*. Vol. 24, pp. 35 - 47.
6. Sharma, A., N. Aggarwal, S. Rastogi, R. Choudhury, S. Tripathi (2017). Effectiveness of platelet-rich fibrin in the management of pain and delayed wound healing associated with established alveolar osteitis (dry socket). *European Journal of Dentistry*. Vol. 11, No. 4, pp. 508 - 513.
7. Eldeen, K. I., H. M. Ibrahim, E. E. Elkhidir and H. B. Elamin (2015). Optimization of culture conditions to enhance nattokinase production using RSM. *American Journal of Microbiological Research*. Vol. 3, No. 5, pp. 165 - 170.
8. Trần Quốc Tuấn, Nguyễn Thị Thu Kiều, Lê Thị Thúy Ái, Đinh Minh Hiệp và Trần Cát Đông (2014). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men chủng *Bacillus subtilis* thu nhận nattokinase tái tổ hợp bằng phương pháp đáp ứng bề mặt. *Tạp chí Sinh học*. Tập 36, số 1, trang 130 - 137.
9. Kai, W. and Y. Peisheng (2016). Optimization of lipase production from a novel strain *Thalassospira permensis* M35 - 15 using response surface methodology. *Bioengineered*. Vol. 7, No. 5, pp. 298 - 303.
10. Borges, P. R. S., E. G. Tavares and I. C. Guimarães (2016). Obtaining a protocol for extraction of phenolics from açai fruit pulp through Plackett - Burman design and response surface methodology. *Food Chemistry*. Vol. 210, pp. 189 - 199.
11. Plackett, R. L. and J. P. Burman (1946). The design of optimum multifactorial Experiments. *Biometrika*. Vol. 33, No. 4, pp. 305 - 325.
12. Lê Thị Ngọc Hân, Võ Thị Ngọc Diệp, Trịnh Thị Tuyết Hoa và Nguyễn Văn Thành (2021). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* sp. có khả năng sinh tổng hợp protease từ các sản phẩm đậu nành lên men. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*. Tập 63, số 8, trang 49 - 54.
13. Castillo, E. D. (2007). Process optimization a statistical approach. *Springer Science*. 462 pages.
14. Tuan, N. A., D. T. H. Thuan, T. T. M. Tam and N. T. Huong (2015). Determination the optimum fermentation in obtaining nattokinase by *Bacillus subtilis* Natto. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. Vol. 13, No. 3, pp. 663 - 668.
15. Myers, R. H., D. C. Montgomery & C. M. Anderson - Cook (2016). Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons.
16. Njoku, C. N., and S. K. Otisi (2023). Application of central composite design with Design Expert v13. In *Process Optimization*. Intech Open.
17. Ngô Thị Tường Châu, Hoàng Thị Bích Vân, Nguyễn Hoàng Tâm, Lê Văn Thiện và Hồ Tuyên (2017). Tối ưu hóa thành phần môi trường lên men cho khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội: Các Khoa học Trái đất và Môi trường*. Tập 33, số 1S, trang 129 - 135.
18. Tuan, N. A. and N. T. Huong (2014). Optimization of the fermentation medium to receive the highest biomass yield by *Bacillus subtilis* natto and the initial test of nattokinase yield. *IOSR Journal of Engineering*. Vol. 4, pp. 35 - 40.

**OPTIMIZATION OF FACTORS AFFECTING FIBRINOLYTIC ENZYME BIOSYNTHESIS
OF *Bacillus subtilis* ML01****Le Thi Ngoc Han^{1,2}, Vo Thi Ngoc Diep¹, Nguyen Van Thanh¹**¹*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*²*Can Tho Technical Economic College***Summary**

The purpose of this study was to optimize the composition of the culture medium to obtain fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* ML01 using Response Surface Methodology (RSM) with Central Composite Design (CCD). The Plackett - Burman experimental design was used to screen the main factors affecting the biosynthesis of fibrinolytic enzymes among 10 selected factors, including glucose, maltose, sucrose, soya peptone, yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄, CaCl₂, pH and initial bacterial density. As the results, maltose, soya peptone, K₂HPO₄ and initial bacterial density were identified as significant factors (p-value < 0.05). On this basis, when using the RSM - CCD method, a suitable environment was found for the biosynthesis of fibrinolytic enzymes with the optimal values determined to be maltose 18.15 g/L, soya peptone 9.59 g/L, K₂HPO₄ 2.33 g/L and bacterial density of 2.6 x 10⁶ cells/mL at 37°C for 48 hours of fermentation, which gave the highest fibrinolytic enzyme activity of 25.56 FU/mL, which 2.9 times higher than the pre-optimized medium (8.89 FU/mL). The Plackett - Burman matrix combined with the RSM - CCD is therefore a useful tool for identifying optimal values of different factors affecting the biosynthesis of fibrinolytic enzymes.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biosynthesis, fibrinolytic enzyme, optimize, RSM - CCD.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Minh

Ngày nhận bài: 30/8/2023

Ngày thông qua phản biện: 15/9/2023

Ngày duyệt đăng: 25/12/2023