

# NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ NHÂN NHANH SINH KHỐI LOÀI VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* VAR *NATTO*

Mai Thành Luân<sup>1</sup>, Hoàng Thị Lan Thương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Mai Anh<sup>2</sup>

## TÓM TẮT

*Vi khuẩn Bacillus subtilis var natto* được phân lập từ men vi sinh lên men natto và từ đậu tương lên men, có khuẩn lạc hình tròn, màu trắng sữa, mặt hơi gồ gề, có mép răng cưa, đường kính của khuẩn lạc trên môi trường King's B rắn từ 3 mm - 7 mm sau 48 giờ nhân nuôi ở điều kiện nhiệt độ 30°C. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường King's B hoặc Luria-Bertani (LB) đều có thể sử dụng để nhân nhanh sinh khối loài vi khuẩn này. Nhiệt độ thích hợp cho việc nhân nuôi loài vi khuẩn *Bacillus subtilis var natto* từ 35°C - 38°C, thời gian nhân nuôi là 48 giờ, sử dụng máy lắc 120 vòng/phút. Mật độ khuẩn lạc sau khi nhân nuôi đạt trên 10<sup>9</sup> cfu/ml, có thể sử dụng làm men vi sinh cho quá trình sản xuất sản phẩm đậu tương lên men natto.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis var natto*, phân lập, nhân nhanh sinh khối, natto.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Bacillus* là một nhóm các loài vi khuẩn hiếu khí, Gram dương, hình que, phân bố rộng rãi trong các hệ sinh thái. *Bacillus* có khả năng sinh nội bào tử, một dạng nghỉ của tế bào để giúp vi khuẩn có thể chống chịu và tồn tại trước các điều kiện bất lợi của môi trường như khô hạn và thiếu dinh dưỡng. Theo hệ thống phân loại hiện nay, chi *Bacillus* có khoảng gần 300 loài và các loài phụ dưới loài [2]. Do có nhiều đặc điểm sinh lý và khả năng tạo ra vô số enzym, chất kháng sinh và chất chuyển hóa, các loài *Bacillus* được sử dụng trong nhiều quy trình y tế, dược phẩm, nông nghiệp và công nghiệp [7].

Thực phẩm Natto là thực phẩm lên men truyền thống từ đậu tương của người Nhật Bản có đặc điểm như mùi ammonia, chứa các chất béo, được bao phủ bởi lớp dính nhầy là các chuỗi polyme axit glutamic [4]. Vi sinh vật lên men được xác định là vi khuẩn *Bacillus subtilis var natto*, vi khuẩn hiếu khí, hình que, gram dương và có khả năng sinh bào tử, có quan hệ rất gần với loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Natto chứa lượng canxi tăng gấp đôi so với đậu tương và nhiều loại vitamin E. Có thể nói đó là “thực phẩm hoàn hảo”, tạo ra tới 18 loại amino axit và một loại enzyme quan trọng nattokinase được sản sinh bởi vi khuẩn *Bacillus subtilis* subsp. *natto* có khả năng làm tan máu đông giúp ngăn ngừa các bệnh tai biến trên người [3]. Hiện nay tỷ lệ mắc các bệnh nghẽn động mạch do cục máu đông (thrombus) như chứng nhồi máu cơ tim hay nhồi máu não đang tăng cao ở Việt Nam cũng như trên thế giới, vì vậy enzyme nattokinase được quan tâm nghiên cứu sản xuất và sử dụng rộng rãi để phòng ngừa bệnh nghẽn động mạch do các cục máu đông [9].

<sup>1</sup> Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: maithanluan@hdu.edu.vn

<sup>2</sup> Sinh viên K24 ngành Nông học, khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

Nhóm nghiên cứu Lê Thị Bích Phượng và cộng sự thuộc Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam năm 2012 đã đề xuất 02 chủng *Bacillus* sp.7.2 và *Bacillus* sp. NP3 chọn lọc được có khả năng sinh tổng hợp mạnh enzyme nattokinase trên đậu nành sau 40 giờ lên men. Lượng enzyme này chiếm 70% - 85% so với hoạt tính protease, từ đó đề xuất giải pháp chủ động sản xuất, tổng hợp enzyme nattokinase có hoạt tính cao với chi phí giá thành thấp để bảo vệ sức khỏe cho người dân mà không phụ thuộc vào thực phẩm chức năng chứa enzyme nattokinase ngoại nhập [1].

Để có thể ứng dụng loài vi khuẩn này trong sản xuất đậu tương lên men Natto và cho việc sản xuất enzyme nattokinase, cần thiết phải có những nghiên cứu phân lập và làm thuần loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*, từ đó phát triển quy trình nhân nhanh sinh khối tạo men vi sinh cung cấp cho người tiêu dùng và các cơ sở chế biến thực phẩm sử dụng làm các sản phẩm lên men natto.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương pháp phân lập và làm thuần vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* từ men natto

Hòa 0,1 gam men vi sinh lên men natto (Công ty koji-za san zaemon, Nhật Bản. <http://www.koji-za.jp>) vào 10 ml nước cất khử trùng, lắc đều cho men tan hết. Sử dụng phương pháp pha loãng và cấy vi khuẩn trên môi trường King's B rắn. Đĩa môi trường cấy vi khuẩn được ủ trong điều kiện 35°C - 37°C trong 24 - 48 giờ (đĩa cấy được úp ngược). Sử dụng phương pháp pha loãng và phương pháp cấy ria để làm thuần vi khuẩn trên môi trường King's B rắn. Vi khuẩn sau khi làm thuần được bảo quản ở nhiệt độ 5°C phục vụ các thí nghiệm tiếp theo.

### 2.2. Phương pháp phân lập và làm thuần vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* từ thực phẩm lên men natto

1g mẫu thực phẩm lên men natto được cho vào 9 ml nước cất vô trùng. Sử dụng đĩa thủy tinh khử trùng khuấy đều trong 5 phút. Quay ly tâm 3000 vòng/ phút. Sử dụng giấy lọc khử trùng để thu dung dịch vi khuẩn từ sản phẩm. Sử dụng phương pháp pha loãng và phương pháp cấy vi khuẩn trên môi trường King's B rắn. Đĩa môi trường cấy vi khuẩn được nuôi cấy trong điều kiện 35°C - 37°C trong 24 - 48 giờ (đĩa cấy được úp ngược). Sử dụng phương pháp pha loãng và phương pháp cấy ria để làm thuần vi khuẩn trên môi trường King's B.

Sau khi được phân lập và làm thuần từ men natto và thực phẩm lên men natto, vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* được nuôi cấy trên đĩa môi trường King's B rắn trong 48 giờ ở 30°C. So sánh khuẩn lạc với vi khuẩn nguồn để xác định độ thuần của vi khuẩn lên men trong sản phẩm natto. Vi khuẩn sau khi làm thuần được bảo quản ở nhiệt độ 5°C phục vụ cho các thí nghiệm.

### 2.3. Phương pháp xác định mật độ vi khuẩn

Môi trường rắn: lấy 1g sản phẩm hòa tan vào 10 ml nước cất vô trùng (SDW), ly tâm 3000 vòng/ phút bằng máy ly tâm, thu lấy 1ml dung dịch khuẩn, pha loãng lần lượt theo tỷ

lệ  $10^1$ ;  $10^2$ ;  $10^3$ ;  $10^4$ ;  $10^5$  lần với SDW. Sử dụng phương pháp trang 30  $\mu$ l - 50  $\mu$ l dung dịch vi khuẩn trên đĩa thạch môi trường King's B có đường kính 9 cm - 10 cm.

$$\text{Mật độ vi khuẩn (cfu/g)} = \frac{\text{Số khuẩn lạc} \times \text{Số lần pha loãng}}{\text{Trọng lượng mẫu (g)}}$$

$$\text{Mật độ vi khuẩn/g} = (\text{số khuẩn lạc} \times \text{số lần pha loãng}) / \text{trọng lượng mẫu (g)}$$

Môi trường lỏng: lấy 1 ml dung dịch, pha loãng lần lượt theo tỷ lệ  $10^1$ ;  $10^2$ ;  $10^3$ ;  $10^4$ ;  $10^5$  lần với SDW. Sử dụng phương pháp trang khuẩn (30  $\mu$ l - 50  $\mu$ l) trên đĩa thạch môi trường King's B có đường kính 9 cm - 10 cm. Đĩa vi khuẩn sau khi trang khuẩn được đặt trong tủ nuôi vi sinh, nhiệt độ 30°C trong 24 - 48 giờ để đếm tổng số khuẩn lạc.

$$\text{Mật độ vi khuẩn (cfu/ml)} = \frac{\text{Số khuẩn lạc} \times \text{Số lần pha loãng}}{\text{Thể tích giọt mẫu (ml)}}$$

$$\text{Mật độ vi khuẩn/ml} = (\text{số khuẩn lạc} \times \text{số lần pha loãng}) / \text{thể tích giọt mẫu (ml)}$$

#### 2.4. Phương pháp lên men lỏng nhân nhanh sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*

Công thức	Môi trường thử nghiệm (lỏng)
1	Môi trường bột đậu tương (40 g/L) và đường Sucrose (20 g/L)
2	Môi trường King'B lỏng: Pepton (20g/L); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.5g/L); MgSO <sub>4</sub> (1,5g); Glycerol (10 ml/L)
3	Môi trường Luria-Bertani: peptone (10g/L); Nấm men (5g/L); muối NaCl (10g/L)

Đổ 150 ml môi trường lên men lỏng vào bình tam giác 250 ml, hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1 atm trong 20 phút. Môi trường sau khi khử trùng được cấy với 1,5 mL nguồn vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* thuần (được chuẩn bị trước 2 ngày nuôi cấy trên môi trường King's B rắn), ủ ở nhiệt độ 30°C, trong bóng tối, lắc ở 120 vòng/ phút liên tục trong 24 - 48 giờ. Chỉ tiêu theo dõi: mật độ khuẩn lạc cfu/ ml. Các công thức được lặp lại 5 lần.

#### 2.5. Phương pháp xác định ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng nhân sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* trong môi trường King's B lỏng

Dải nhiệt độ thí nghiệm: 35°C; 38°C; 42°C và 45°C

Tốc độ lắc (rpm): 120 vòng/ phút.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ khuẩn lạc cfu/ ml. Các công thức được lặp lại 05 lần.

#### 2.6. Phương pháp xác định thời gian nhân nuôi phù hợp đối vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* trong môi trường King's B lỏng

Thời gian nuôi cấy: 24, 48, 72 giờ

Tốc độ lắc (rpm): 120 vòng/ phút.

Chỉ tiêu theo dõi: mật độ khuẩn lạc cfu/ ml. Các công thức được lặp lại ít nhất 05 lần

#### 2.7. Phương pháp xử lý số liệu thí nghiệm

Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel (2010) và Kyplot 5.0. Khác biệt giữa các giá trị trung bình được so sánh bằng Tukey's test, sự sai khác có ý nghĩa thống kê khi  $P < 0,05$ .

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

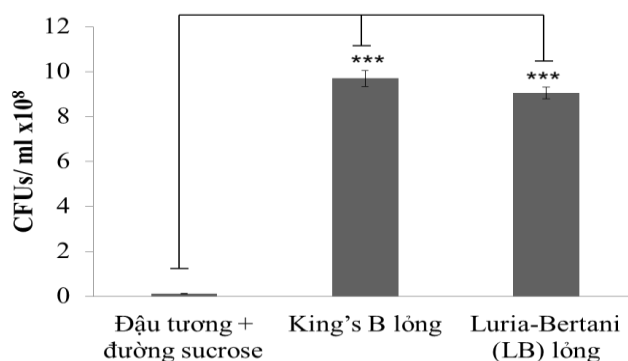
#### 3.1. Hình thái và đặc điểm của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* phân lập được



**Hình 1. Hình ảnh khuẩn lạc của vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* phân lập được sau 48 giờ nuôi trên môi trường King's B rắn**

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* được phân lập từ men vi sinh lên men natto và từ đậu tương lên men (Công ty koji-za san zaemon, Nhật Bản. <http://www.koji-za.jp>). Sau khi làm thuần và nuôi cấy trên đĩa môi trường King's B rắn trong 48 giờ ở 30°C, kiểu hình của khuẩn lạc được thể hiện như hình 1. Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng sữa, mặt hơi gồ ghề, có mép răng cưa. Đường kính của khuẩn lạc từ 3 mm - 7 mm sau 48 giờ nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C (Hình 1). Các màng trắng được hình thành trong môi trường nhân nuôi lỏng (King's B lỏng) ở trạng thái tĩnh sau 24 - 48 giờ nhân nuôi. Vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* có hình que, hình thành bào tử sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường King's B.

#### 3.2. Ảnh hưởng của yếu tố môi trường nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*



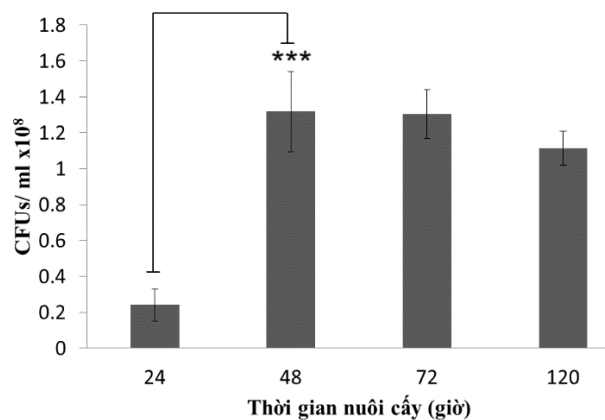
**Hình 2. Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto***

Thanh lỗi (error bars) thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình. Hình sao (\*) thể hiện mức độ sai khác có ý nghĩa thống kê đối với công thức đối chứng sử dụng phương pháp của Turkey (\*\*\*)  $P < 0,001$

Kết quả hình 2 cho thấy, môi trường nuôi cấy khác nhau ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng nhân nhanh sinh khối loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*. Mật độ khuẩn lạc trong môi trường King's B lỏng và môi trường Luria-Bertani (LB) cao hơn so với môi trường sử dụng giá thể bột đậu tương và đường sucrose. Mặc dù vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* phát triển khá mạnh trên môi trường đậu tương hạt trong sản phẩm đậu tương lên men natto, tuy nhiên sử dụng môi trường có chứa bột đậu tương lại không đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng cho quá trình nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*. Mật độ khuẩn lạc đạt khá thấp  $0,109 \times 10^8$  cfu/ml, chưa đạt được mức mật độ tối thiểu sử dụng trên  $1 \times 10^8$  cfu/ml nên không được sử dụng để làm môi trường nhân nhanh tạo men vi sinh sản xuất natto. Cả hai môi trường nuôi cấy King's B và Luria-Bertani đều cho mật độ khuẩn lạc lần lượt đạt  $9,7 \times 10^8$  cfu/ml và  $9,1 \times 10^8$  cfu/ml, vì vậy chúng đều có thể sử dụng làm môi trường nhân nuôi loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*. Trong các thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi lựa chọn môi trường King's B làm môi trường nhân nhanh sinh khối tạo nguồn vi khuẩn phục vụ cho nghiên cứu sản xuất sản phẩm đậu tương lên men natto.

Nghiên cứu của Tuan và cộng sự (2014) cho thấy, ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ , môi trường tối ưu sử dụng nhân nhanh sinh khối loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* chứa đường glucose (5,612 g/L); peptone đậu tương (13 g/L);  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2,125g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,875 g/L); NaCl (5 g/L),  $\text{CaCl}_2$ : 0,05 (g/L). Lượng sinh khối vi khuẩn dưới dạng khô sau khi nuôi đạt trọng lượng 3,033 g/L [5].

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*



**Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* trên môi trường King's B lỏng**

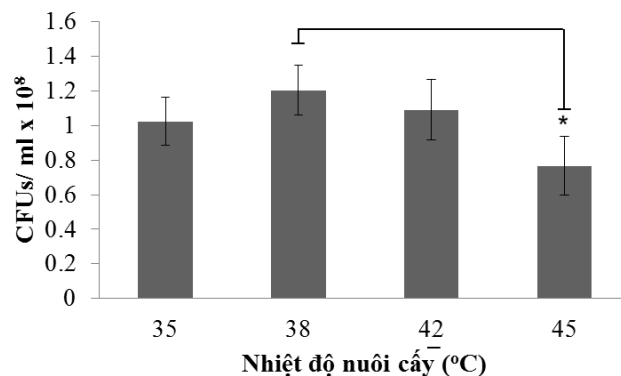
Thanh lỗi (error bars) thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình. Hình sao (\*) thể hiện mức độ sai khác có ý nghĩa thống kê đối với công thức đối chứng sử dụng phương pháp của Turkey (\*\*\*)  $P < 0.001$

Trong thí nghiệm này, chúng tôi nuôi cấy loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* trong môi trường King's B lỏng ở điều kiện  $38^\circ\text{C}$ , trên máy lắc 120 vòng/phút trong khoảng thời gian khác nhau nhằm tìm ra thời gian nhân nhanh sinh khối thích hợp cho loài vi khuẩn này.

Kết quả cho thấy, mật độ vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* tăng nhanh sau 24 giờ nuôi cấy ( $2,4 \times 10^8$  cfu/ml), đạt cao nhất ở 48 giờ ( $1,32 \times 10^9$  cfu/ml) và giảm dần sau 72 giờ và 120 giờ nuôi cấy lần lượt là  $1,30 \times 10^9$  và  $1,11 \times 10^9$  cfu/ml. Kết quả cho thấy, thời gian nhân nuôi tạo sinh khối phù hợp đối với loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* là 48 giờ (hình 3).

Kết quả nghiên cứu của Shouyong Ju và cộng sự (2019) về phân lập và tối ưu hóa điều kiện nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus subtilis* subsp. *natto* chủng WTC016 tạo enzyme nattokinase cho thấy, vi khuẩn bắt đầu tăng sinh khối sau 3 giờ nuôi cấy trong 50 ml môi trường LB lỏng, tốc độ khuấy đảo 250 vòng/ phút ở nhiệt độ 30°C. Sau đó sự phát triển của chúng đạt cực đại ở 12 giờ và ở trạng thái tĩnh sau 15 giờ nuôi cấy [8].

### 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*



**Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy tới khả năng nhân nhanh sinh khối của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto***

Thanh lỗi (error bars) thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình. Hình sao (\*) thể hiện mức độ sai khác có ý nghĩa thống kê đối với công thức đối chứng sử dụng phương pháp của Turkey (\* $P < 0.05$ )

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* được cho là loài vi khuẩn ưa nhiệt trong quá trình lên men. Trong thí nghiệm này, chúng tôi nhân nuôi loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* sử dụng môi trường King's B lỏng, trên máy lắc 120 vòng/phút ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau: 35°C, 38°C, 42°C và 45°C trong 48 giờ. Kết quả hình 4 cho thấy, nhân nuôi vi khuẩn ở nhiệt độ 35°C, mật độ khuẩn lạc đạt  $1,02 \times 10^9$  cfu/ml. Ở nhiệt độ 38°C, mật độ khuẩn lạc loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* đạt cao nhất ( $1,12 \times 10^9$  cfu/ml), sau đó giảm dần khi tăng nhiệt độ lên 42°C - 45°C. Vì sự sai khác của mật độ khuẩn lạc giữa các mức nhiệt độ từ 35°C - 42°C không có ý nghĩa về mặt thống kê, do vậy hoàn toàn có thể nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* trong khoảng nhiệt độ này. Trong thí nghiệm này, chúng tôi lựa chọn mức nhiệt độ 38°C để nhân nhanh sinh khối vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto*.

Kết quả nghiên cứu của Kanintra Suwanmanon và cộng sự (2013) về tối ưu hóa điều kiện nhân nuôi loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* tạo enzyme nattokinase cho thấy, hàm lượng enzyme nattokinase đạt cao nhất sau 72 giờ nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy lỏng chứa đường fructose và chiết xuất nấm men ở điều kiện 37°C [6].

#### 4. KẾT LUẬN

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* được phân lập từ men vi sinh lên men natto và từ đậu tương lên men, có hình que, hình thành bào tử sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường King's B. Khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng sữa, mặt hơi gồ ghề, có mép răng cưa, đường kính của khuẩn lạc từ 3 mm - 7 mm sau 48 giờ nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30°C.

Kết quả thí nghiệm nhân nhanh sinh khối loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* phân lập cho thấy, môi trường King's B hoặc Luria-Bertani (LB) hoàn toàn có thể sử dụng làm môi trường nhân nhanh sinh khối loài vi khuẩn này. Nhiệt độ thích hợp cho việc nhân nuôi loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* từ 35°C - 38°C, thời gian nuôi 48 giờ trong điều kiện tối, trên máy lắc 120 vòng/ phút. Mật độ khuẩn lạc của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* var *natto* đạt trên  $1 \times 10^9$  cfu/ml, hoàn toàn có thể sử dụng làm men vi sinh phục vụ sản xuất đậu tương lên men natto.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] L.T.B. Phương, V.T. Hạnh, T.T. Phong, L.T. Hưng, T.T.H. Vân, L.T. Hương (2012), Phân lập và tuyển chọn một số chủng *Bacillus* sinh tổng hợp nattokinase, *Tạp chí Sinh học*, 34 (3SE): 99-104.
- [2] AC Parte (2014), *LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature*, *Nucleic Acids Res* 42: D613-616.
- [3] D. R. E. Holsworth (2013), *Nattokinase and Cardiovascular Health* [Report], H30. New Mexico. [Accessed 19 July, 2013].
- [4] T. Hosoi, K. Kiuchi (2003), *Natto - a food made by fermenting cooked soybeans with Bacillus subtilis (natto)*. In E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods*, New York, NY: CRC Press, 227-245.
- [5] N.A. Tuan, 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*, 4(12).
- [6] S. Kanintra, H. Pao-Chuan (2014), Isolating *Bacillus subtilis* and optimizing its fermentative medium for GABA and nattokinase production, *CyTA - Journal of Food*, 12(3), 282-290, <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2013.848472>.
- [7] R. Radhakrishnan, A. Hashem and F. Abd\_Allah Elsayed (2017), *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments, *Front. Physiol*, 8:667. doi: 10.3389/fphys.2017.00667.
- [8] J. Shouyong, C. Zhilin, W. Christina, L. Yangyang, F.F. Mohamed, Z. Zhenyu and L. Jinshan (2019), Isolation and optimal fermentation condition of the *Bacillus subtilis* Subsp. natto strain WTC016 for nattokinase production, *Fermentation*, 5(92); doi:10.3390/fermentation5040092.
- [9] Y. Peng, X.J. Yang, Y.Z. Zhang (2005), Microbial fibrinolytic enzymes: An overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 69, 126-132.

## ISOLATION AND MASS PRODUCTION OF *BACILLUS SUBTILIS* VAR NATTO

Mai Thanh Luan, Hoang Thi Lan Thuong, Nguyen Thi Mai Anh

### ABSTRACT

*Bacillus subtilis* var natto was isolated from commercial natto starter powder and from fermented soybean product, natto. The colonies of this strain were round, milky white, with a slightly rough surface, saw tooth edges. The diameter of the bacterial colony was 3 mm - 7 mm after 48 hours of incubation at 30°C. The results of this study showed that, both of King's B broth and Luria-Bertani (LB) broth media were suitable for mass production of *Bacillus subtilis* var natto. The optimum temperature range for multiplication and growth of the bacteria was between 35°C - 38°C, with shaking at 120 rpm for 48 hours of incubation. The final bacterial population was over 10<sup>9</sup> cfu/ml and can be used as natto starter for natto production.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* var natto, isolation, mass production, natto.

\* Ngày nộp bài: 20/6/2022; Ngày gửi phản biện: 25/6/2022; Ngày duyệt đăng: 15/12/2022

\* Bài báo này là kết quả nghiên cứu từ đề tài cấp cơ sở, Mã số đề tài ĐT-2022-32 của Trường Đại học Hồng Đức.