

BIỂU HIỆN GEN *NAT05* MÃ HÓA NATTOKINASE TRONG *BACILLUS SUBTILIS* BD170

Nguyễn Thị Anh Thu^{1,2*}, Hồ Thị Trang¹

¹ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 6 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Nguyễn Thị Anh Thu <thu.dhyhue@gmail.com>
(Ngày nhận bài: 19-05-2020; Ngày chấp nhận đăng: 12-11-2020)

Tóm tắt. Nattokinase, một serine protease có trong sản phẩm Natto truyền thống của Nhật Bản, có khả năng làm tan đặc hiệu các sợi fibrin gây đông máu và rất có ích trong việc phân hủy huyết khối nội sinh ở người. Nattokinase hiện nay được sản xuất bằng phương pháp lên men lẫn công nghệ DNA tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày việc tối ưu hóa thời gian cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng IPTG của gen *nat05* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 với hoạt tính protease mạnh. Tại thời điểm 10 giờ, *nat05* biểu hiện nattokinase mạnh gấp 9,5 lần so với đối chứng. Ở nồng độ IPTG 2 mM, *nat05* sinh hàm lượng nattokinase mạnh nhất (gấp 10 lần so với đối chứng).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, nattokinase, *nat05*, biểu hiện

Expression of *nat05* encoding for a nattokinase in *Bacillus subtilis* BD170

Nguyen Thi Anh Thu^{1,2*}, Ho Thi Trang¹

¹ University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

² University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Nguyen Thi Anh Thu <thu.dhyhue@gmail.com>
(Received: 19 May 2020; Accepted: 12 November 2020)

Abstract. Nattokinase, a serine protease found in the Japanese Natto product, can specifically dissolve fibrin fibers causing coagulation and is useful in endogenous thrombolysis. Currently, nattokinase is produced with the help of traditional fermentation and recombinant DNA technology approaches. In this study, we presents the optimization of time and the inducing substance (IPTG) concentration of gene *nat05* encoding for a nattokinase in *Bacillus subtilis* BD170 with strong protease activity. After 10 hours' cultivation, *nat05* expresses 9.5 times higher than the control. At the IPTG concentration of 2 mM, *nat05* exhibits the strongest activity, which is 10 times higher than the control.

Keywords: *Bacillus subtilis*, nattokinase, *nat05*, expression

1 Đặt vấn đề

Hiện nay, tỉ lệ mắc bệnh nghẽn động mạch do các cục máu đông như chứng nhồi máu cơ tim

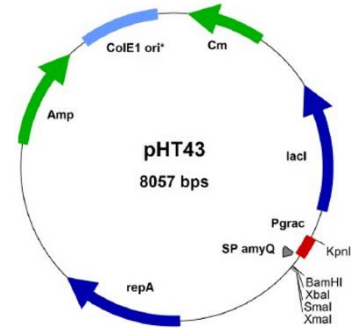
hay nhồi máu não đang tăng cao ở Việt Nam và các nước trên thế giới. Theo tổ chức Y tế Thế giới, hàng năm có khoảng 17 triệu người chết do các bệnh tim

mạch mà nguyên nhân là do hậu quả của chứng huyết khối. Căn bệnh này thật sự trở thành mối đe dọa đối với sức khỏe con người. Trước đây, người ta thường điều trị bệnh này bằng phẫu thuật hoặc dùng một số loại enzyme như urokinase, streptokinase, v.v. làm tan huyết khối có hiệu quả tức thì nhưng không kéo dài lâu, đắt tiền có nguy cơ biến chứng gây xuất huyết. Nattokinase thực sự có hiệu quả cao hơn những sản phẩm làm tan huyết tụ thông thường khác như urokinase, streptokinase và tissue plasminogen activator (t-PA). Nattokinase được thu nhận chủ yếu bằng con đường lên men bán rắn chủng *Bacillus subtilis natto* trên cơ chất đậu nành nấu chín hay lên men dịch thể. Hiện nay đã có những nghiên cứu bước đầu tạo nattokinase tái tổ hợp có hoạt tính bằng hệ thống vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus* sp.) [1]. Hướng nghiên cứu nattokinase tái tổ hợp bước đầu cho thấy hiệu quả vì enzyme tái tổ hợp được biểu hiện có hoạt tính và tiết ngoại bào [2]. Tuy nhiên, nghiên cứu trong nước theo hướng nattokinase tái tổ hợp còn rất ít trong khi nhu cầu sử dụng nattokinase ngày càng tăng cao nhờ những lợi ích của nó [3-5]. Trong nước, các công ty dược phẩm cũng bắt đầu cho ra các sản phẩm từ nattokinase với nguyên liệu ngoại nhập chủ yếu từ Nhật Bản với giá thành cao [6]. Việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu nattokinase có hoạt tính ổn định và giá cả phù hợp là định hướng của nhiều công ty trong nước. Do vậy, việc tìm hiểu và thu nhận nguồn gen mã hóa nattokinase tốt từ các chủng *B. subtilis* tái tổ hợp đã mở ra triển vọng cho công nghệ sản xuất và thu nhận nattokinase hoạt tính cao nhằm làm nguyên liệu cho dược phẩm và thực phẩm chức năng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả của các điều kiện biểu hiện tối ưu gen *nat05* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Chủng *Bacillus subtilis* BD170 đã được tạo dòng mang vector pHT43 tái tổ hợp gen *nat05* (pHT43/*nat05*) và chủng *Bacillus subtilis* BD170 (chủng hoang dại) do phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp. Vector pHT43 (MoBiTec, Mỹ) được sử dụng để biểu hiện gen trong *B. subtilis* BD170 (Hình 1).



Hình 1. Vector pHT43 (MoBiTec, Mỹ)

2.2 Phương pháp

Kiểm tra sự biểu hiện nattokinase ngoại bào trong hệ thống vector pHT43

Tách chiết plasmid tái tổ hợp pHT43

Chủng *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp được cấy trên 5 mL môi trường LB lỏng (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) qua đêm ở 37 °C với tốc độ lắc 200 vòng-phút⁻¹. Sinh khối tế bào được thu hồi bằng ly tâm 13.000 vòng-phút⁻¹/5 phút. Plasmid tái tổ hợp pHT43 của *B. subtilis* được tách chiết bằng cách sử dụng kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Sản phẩm của quá trình tách chiết được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen *nat05* tái tổ hợp trong *B. subtilis* BD170.

Kiểm tra sự có mặt vector pHT43 tái tổ hợp

Sự có mặt của vector tái tổ hợp pHT43 mang gen *nat05* được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1).

Bảng 1. Cặp mồi khuếch đại gen *nat05*

Tên gọi	Trình tự nucleotide	Kích thước (pb)
NatF	5'-GGATCCTTCAGCAACAAGTCTGC-3'	1100 pb
NatR	5'-CCCGGGTTATTGTGCAGCTGCTT-3'	

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 40 ng DNA tổng số, 10 pmol/ μ L mỗi primer, 10 μ L 2 \times PCR Master Mix (Fermentas) với tổng thể tích phản ứng là 20 μ L. Chu trình khuếch đại bao gồm biến tính ở 95 °C trong 5 phút; biến tính ở 95 °C trong 30 giây, gắn mồi ở 55 °C trong 30 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút, lặp lại với 30 chu kỳ; cuối cùng sản phẩm PCR được hoàn thiện ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được gắn đuôi A bằng cách ủ với enzyme 1U *Taq* (Thermo Fisher Scientific) trong 10 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%.

Kiểm tra biểu hiện gen *nattokinase*

Khả năng tiết *nattokinase* ra môi trường bên ngoài của chủng *B. subtilis* mang vector tái tổ hợp pHT43 và gen *nat05* được kiểm tra thông qua so sánh vòng phân giải với cơ chất skim milk.

Các khuẩn lạc đơn tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37 °C qua đêm, lắc ở tốc độ 200 vòng·phút⁻¹. Pha loãng dịch nuôi cấy với môi trường LB đến OD₆₀₀ = 0,15 và nuôi đến khi OD₆₀₀ đạt 0,7–0,8. Sinh tổng hợp *nattokinase* ngoại bào được cảm ứng với isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) với nồng độ 1 mM và ủ ở 37 °C. Thu mẫu sau mỗi hai giờ nuôi cấy để kiểm tra hoạt tính *nattokinase*. Sau khi cảm ứng sinh tổng hợp *nattokinase*, chuẩn bị đĩa môi trường LB có bổ sung 1,5% agar và 2% skim milk, tạo các lỗ trên bề mặt đĩa môi trường với đường kính 4 mm. Hút lấy 50 μ L dịch nuôi cấy cho vào lỗ, ủ ở 37 °C qua đêm. Vòng phân giải skim milk của các khuẩn lạc khác nhau được khảo sát.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên sự sinh tổng hợp *nattokinase*

Cảm ứng sinh tổng hợp *nattokinase*

Chủng *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB lỏng (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) ở 37 °C với tốc độ lắc 200 vòng·phút⁻¹. Nồng độ sinh khối của dịch nuôi cấy được đo bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 600 nm. Sau đó, dịch nuôi cấy được chuyển qua môi trường LB lỏng với thể tích sao cho giá trị quang phổ ở bước sóng 600 nm đạt 0,1 và tiến hành lắc với tốc độ 200 vòng·phút⁻¹ ở 37 °C trong 4 giờ (OD₆₀₀ ~ 0,6–0,8). *Nattokinase* tái tổ hợp được cảm ứng với IPTG nồng độ 1 mM và tiếp tục nuôi cấy cảm ứng trong 6, 8, 10, 12 và 14 giờ. Sau mỗi giờ cảm ứng, dịch môi trường chứa enzyme ngoại bào *nattokinase* được thu nhận bằng cách ly tâm 12.000 vòng·phút⁻¹ trong 10 phút ở 4 °C. Đối chứng là *B. subtilis* BD170 (chủng hoang dại).

Tinh chế protein

Dịch nuôi cấy *B. subtilis* BD170 sau khi được thu nhận và tinh chế bằng cách ly tâm 13.000 vòng·phút⁻¹/15 phút ở 4 °C được kết tủa bằng acetone theo tỷ lệ mẫu/acetone 1:4, ủ trong tủ -20 °C từ 1 đến 2 giờ. Tiếp tục ly tâm lạnh 13.000 vòng·phút⁻¹/20 phút ở 4 °C để loại bỏ dịch nổi. Cuối cùng, rửa qua kết tủa bằng nước cất và được hòa tan bằng đệm phosphate 100 mM ở pH 7,5.

Kiểm tra sự biểu hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE

Chuẩn bị separating gel (4 mL dung dịch acrylamide 30%, 2,5 mL đệm separating gel 4x, 3,5 mL DW, 50 μ L 10% APS, 5 μ L TEMED) và stacking gel (1 mL dung dịch acrylamide 30%, 1,5 mL đệm stacking gel 4x, 3,5 mL DW, 30 μ L 10% APS, 5 μ L TEMED). Mẫu protein được bổ sung đệm mẫu SDS theo tỷ lệ mẫu/đệm mẫu 3:1 và được biến tính bằng nhiệt trong 10 phút. Mẫu được tải vào giếng và chạy ở hiệu điện thế 55 V trong 1 giờ 20 phút đối với stacking gel và 85 V trong 1 giờ 50 phút đối với separating gel. Gel sau khi chạy xong, mẫu được nhuộm bằng dung dịch coomassie blue trong 30 phút và rửa bằng dung dịch rửa gel qua đêm.

Xác định hoạt độ của protein tổng số

Hoạt tính protease tổng số của dịch nuôi cấy của *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp mang gen *nat05* được thu nhận và kiểm tra bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 660 nm. Một trăm micro lít dịch nuôi cấy được ủ với 500 μ L dung dịch casein 0,65% trong đệm 50 mM potassium phosphate, pH 7,5. Phản ứng được tiến hành trong 10 phút ở 37 °C. Sau đó, phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 500 μ L dung dịch 110 mM trichloroacetic acid (TCA). Loại bỏ kết tủa từ hỗn hợp phản ứng bằng ly tâm với tốc độ 13.000 vòng·phút⁻¹/15 phút ở 4 °C. Năm trăm micro lít dịch nổi được ủ với 1,25 mL dung dịch Na₂CO₃ và 250 μ L dung dịch Folin và Ciocalteu's phenol 1 N. Sản phẩm của quá trình thủy phân casein được xác định bằng quang phổ ở bước sóng 660 nm bằng máy Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific, Mỹ). Hoạt độ protease được xác định dựa vào đường chuẩn sử dụng cơ chất tyrosine. Một đơn vị hoạt độ protease được xác định là lượng enzyme cần thiết để thủy phân tạo thành 1 μ mol tyrosine trong một phút ở điều kiện phản ứng.

Nồng độ cảm ứng IPTG đến sự sinh tổng hợp nattokinase

Cảm ứng sinh tổng hợp nattokinase

Chủng *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp được nuôi cấy qua đêm trên môi trường LB lỏng (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) ở 37 °C với tốc độ lắc 200 vòng·phút⁻¹. Dịch nuôi cấy được đo sinh khối bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 600 nm. Sau đó được chuyển qua môi trường LB lỏng với thể tích sao cho giá trị quang phổ ở bước sóng 600 nm đạt 0,1 và tiến hành nuôi cấy lắc 200 vòng·phút⁻¹ ở 37 °C trong 4 giờ (OD₆₀₀~0,6–0,8). Nattokinase tái tổ hợp được cảm ứng trong 5 bình tam giác chứa 20 mL môi trường LB với các nồng độ IPTG 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 và 4,0 mM trong thời gian 10 giờ và tốc độ lắc 180 vòng·phút⁻¹. Đối chứng là *B. subtilis* BD170 (chủng hoang dại).

Tinh chế protein

Dịch nuôi cấy *B. subtilis* BD170 sau khi được thu nhận và tinh chế bằng cách ly tâm 13.000 vòng·phút⁻¹/15 phút ở 4 °C. Dịch nổi được kết tủa bằng acetone theo tỷ lệ mẫu/acetone 1:4, ủ ở -20 °C, 1–2 giờ, tiếp tục ly tâm lạnh 13.000 vòng·phút⁻¹/20 phút ở 4 °C để loại bỏ dịch nổi. Cuối cùng, rửa kết tủa bằng nước cất và hòa tan bằng đệm phosphate 100 mM pH 7,5.

Kiểm tra sự biểu hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE

Chuẩn bị separating gel (4 mL dung dịch acrylamide 30%, 2,5 mL đệm separating gel 4x, 3,5 mL DW, 50 μ L 10% APS, 5 μ L TEMED) và stacking gel (1 mL dung dịch acrylamide 30%, 1,5 mL đệm stacking gel 4x, 3,5 mL DW, 30 μ L 10% APS, 5 μ L TEMED). Mẫu protein được bổ sung đệm mẫu SDS theo tỷ lệ mẫu/đệm mẫu 3:1 và được biến tính bằng nhiệt trong 10 phút. Mẫu được tải vào giếng và chạy 55 V trong 1 giờ 20 phút đối với stacking gel và 85 V trong 1 giờ 50 phút đối với separating gel.

Gel sau khi chạy xong, mẫu được nhuộm bằng dung dịch coomassie blue trong 30 phút và rửa bằng dung dịch rửa gel qua đêm.

Xác định hoạt độ của protein tổng số

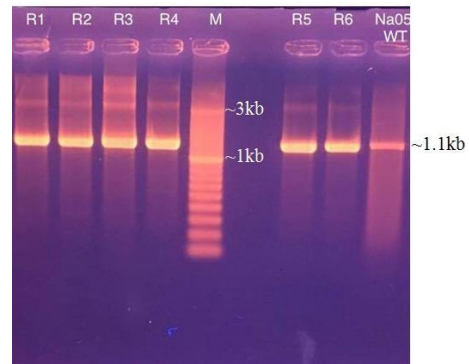
Hoạt tính protease tổng số của dịch nuôi cấy của *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp mang gen *nat05* được thu nhận và kiểm tra bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 660 nm. Một trăm micro lít dịch nuôi cấy được ủ với 500 μ L dung dịch casein 0,65% trong đệm 50 mM potassium phosphate, pH 7,5. Phản ứng được tiến hành trong 10 phút ở 37 $^{\circ}$ C. Sau đó, phản ứng được kết thúc bằng cách bổ sung 500 μ L dung dịch 110 mM trichloroacetic acid (TCA). Loại bỏ kết tủa bằng ly tâm với tốc độ 13,000 vòng·phút⁻¹/15 phút ở 4 $^{\circ}$ C. Năm trăm micro lít dịch nổi được ủ với 1,25 mL dung dịch Na₂CO₃ và 250 μ L dung dịch Folin và Ciocalteu's phenol 1 N. Sản phẩm của quá trình thủy phân casein được xác định bằng quang phổ ở bước sóng 660 nm bằng máy Evolution 60S UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific, Mỹ). Hoạt độ protease được xác định dựa vào đường chuẩn sử dụng cơ chất tyrosine. Một đơn vị hoạt độ protease được xác định là lượng enzyme cần thiết để thủy phân tạo thành 1 μ mol tyrosine trong một phút ở điều kiện phản ứng.

3 Kết quả

3.1 Kiểm tra sự biểu hiện nattokinase ngoại bào trong hệ thống vector pHT43

Kiểm tra sự có mặt vector pHT43 tái tổ hợp

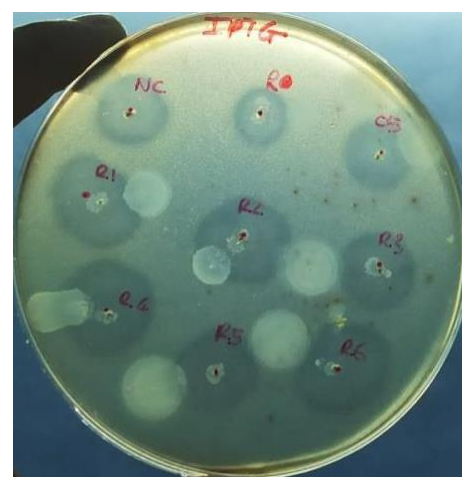
Vector tái tổ hợp pHT43 mang gen *nat05* sau khi tách chiết từ *B. subtilis* BD170 đã được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Vector tái tổ hợp pHT43 mang gen *nat05* đã biến nạp thành công vào *B. subtilis* BD170 tạo các dòng R1, R2, R3, R4, R5, R6 (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR *Nat05* WT là mẫu đối chứng; M là maker 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio-Rad); R1, R2, R3, R4, R5, R6 là các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pHT43/*nat05* sau khi đã biến nạp

Kiểm tra biểu hiện gen nattokinase

Khả năng sinh tổng hợp nattokinase của chủng *B. subtilis* chứa vector tái tổ hợp pHT43 mang gen *nat05* được kiểm tra bằng cách quan sát vòng phân giải với cơ chất skim milk. Chủng *B. subtilis* tái tổ hợp dòng R4 có vòng phân giải lớn nhất (Hình 3), chứng tỏ dòng này có khả năng sinh tổng hợp protease mạnh nhất, mạnh hơn chủng NC và chủng hoang dại *nat05*. Do đó, dòng R4 sẽ được chọn để khảo sát các điều kiện ảnh hưởng đến sự biểu hiện gen *nat05* ở chủng *B. subtilis* BD170.



Hình 3. Hình ảnh vòng phân giải skim milk của chủng *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp và chủng tự nhiên khi cảm ứng IPTG với nồng độ 1 mM

3.2 Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng đến sự sinh tổng hợp nattokinase

Chủng *B. subtilis* sau khi cảm ứng ở các thời gian khác nhau được phân tích biểu hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (Hình 4).

Sau 10 giờ, chủng *B. subtilis* BD170 tái tổ hợp biểu hiện nattokinase (~37 kDa) mạnh (Hình 4). Chủng NC biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng tái tổ hợp.

Kết quả phân tích hoạt độ protease tổng số của chủng *B. subtilis* BD170 mang vector tái tổ hợp pHT43/nat05 ở các thời gian cảm ứng khác nhau được trình bày ở Bảng 2.

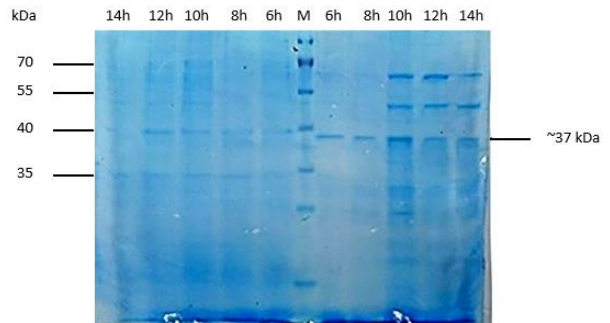
Kết quả cho thấy chủng *B. subtilis* BD170 mang vector tái tổ hợp pHT43/nat05 có hoạt độ nattokinase cao hơn so với đối chứng. Trong đó, tại thời điểm 10 giờ, vi khuẩn có hoạt độ nattokinase cao nhất.

3.3 Ảnh hưởng của nồng độ IPTG đến sự sinh tổng hợp nattokinase

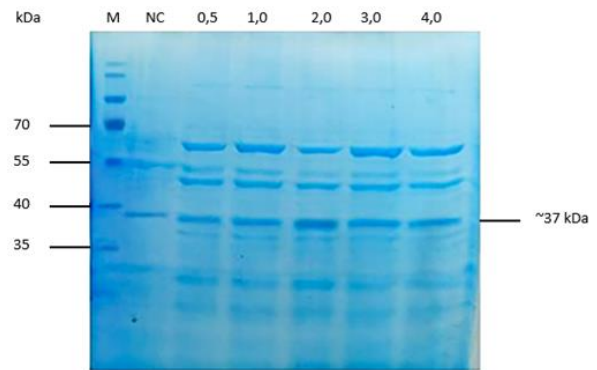
Chủng *B. subtilis* BD170 sau khi cảm ứng ở các nồng độ IPTG khác nhau được phân tích biểu hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (Hình 5).

Kết quả phân tích hoạt độ protease tổng số của chủng *B. subtilis* BD170 mang vector tái tổ hợp

pHT43/nat05 ở các nồng độ IPTG khác nhau được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy, ở nồng độ IPTG 2 mM, vi khuẩn sinh nattokinase mạnh nhất.



Hình 4. Hình ảnh điện di khả năng biểu hiện của chủng *B. subtilis* BD170 được cảm ứng sau 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 14 giờ M là marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific)



Hình 5. Hình ảnh điện di khả năng biểu hiện của chủng *B. subtilis* BD170 ở các nồng độ IPTG: 0,5, 1, 2, 3 và 4 mM. M là marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific)

Bảng 2. Hoạt độ protease tổng số khảo sát tại các thời gian khác nhau (mM)

Chủng	Thời gian cảm ứng (giờ)				
	6	8	10	12	14
NC	0,0083	0,0115	0,0172	0,0054	0,0047
R4	0,0757	0,0917	0,1630	0,1432	0,1097

Bảng 3. Hoạt độ protease tổng số khi khảo sát tại các nồng độ IPTG khác nhau (mM)

Chủng	Nồng độ IPTG (mM)				
	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
R4	0,0220	0,1198	0,1635	0,0947	0,1154
NC			0,0159		

4 Kết luận

Quá trình nghiên cứu tối ưu hóa thời gian cảm ứng và nồng độ chất cảm ứng IPTG của gen *nat05* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 cho thấy, tại thời điểm 10 giờ sau khi cảm ứng, chủng *B. subtilis* BD170 biểu hiện nattokinase mạnh nhất và mạnh hơn chủng đối chứng. Ở nồng độ IPTG 2 mM, chủng *B. subtilis* BD170 sinh nattokinase mạnh nhất.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu được thực hiện dưới sự tài trợ của đề tài Khoa học và công nghệ cấp Đại học Huế, mã số DHH 2018-04-82.

Tài liệu tham khảo

1. Mỹ LTP. Nghiên cứu khả năng sinh tổng hợp Nattokinase của *Bacillus subtilis* phân lập từ thực phẩm chức năng natto [luận văn]. Huế (VN): Đại học Khoa Học, Đại học Huế; 2015.
2. Tuấn TQ, Ái LTT, Anh NQ, Trinh NT, Anh ĐTL, Hiệp ĐM, et al. Tạo dòng và biểu hiện vượt mức enzym phân hủy huyết khối nattokinase từ chủng *Bacillus subtilis*. Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. 2014;30(6S).
3. Chen PT, Chiang C-J, Chao Y-P. Strategy to approach stable production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis*. Biotechnology Progress. 2007;23(4):808-13.
4. Liang X, Jia S, Sun Y, Chen M, Chen X, Zhong J, et al. Secretory Expression of Nattokinase from *Bacillus subtilis* YF38 in *Escherichia coli*. Molecular Biotechnology. 2007;37(3):187-94.
5. Liang X, Zhang L, Zhong J, Huan L. Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007;75(1):95-101.
6. Hương ĐT. Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy và chiết enzyme protease từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* natto [luận văn]. Hà Nội (VN): Trường đại học Dược Hà Nội; 2013.
7. Nguyen TT, Quyen TD, Le HT. Cloning and enhancing production of a detergent- and organic-solvent-resistant nattokinase from *Bacillus subtilis* VTCC-DVN-12-01 by using an eight-protease-gene-deficient *Bacillus subtilis* WB800. Microbial Cell Factories. 2013;12(1):79.