



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003101

(51) **C12P 1/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00371

(22) 13/08/2020

(67) 1-2020-04679

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/11/2020 392A

(73) 1. Vũ Duy Nhân (VN)

Viện Hóa Học- Vật liệu/Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự, 17 Hoàng Sâm,
phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

2. Lê Thị Hoàng Yến (VN)

Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy-
phường Dịch Vọng Hậu, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

3. Trịnh Đức Hoàn (VN)

Viện Hóa Học- Vật liệu/Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự, 17 Hoàng Sâm,
phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

4. Nguyễn Đức Doan (VN)

Khoa Công nghệ Thực Phẩm- Đại học Nông nghiệp Hà Nội- Trâu Quỳ- Gia Lâm- Hà
Nội

(72) Vũ Duy Nhân (VN); Lê Thị Hoàng Yến (VN); Trịnh Đức Hoàn (VN); Nguyễn Đức
Doan (VN); Nguyễn Thị Hương Nhu (VN).

(54) QUY TRÌNH LÊN MEN TAM THẮT BẮC LÀM TĂNG HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT
NHÂN SÂM RG3 BẰNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình lên men tam thất bắc bằng vi khuẩn *Bacillus
Subtilis*, qua đó làm tăng hàm lượng hoạt chất nhân sâm Rg₃.



Lĩnh vực giải pháp hữu ích được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình lên men tam thất bắc bằng vi khuẩn *Bacillus Subtilis*, qua đó làm tăng hàm lượng hoạt chất nhân sâm Rg₃.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Tam thất bắc là loài thân thảo thuộc họ Ngũ gia bì. Trong đông y, nó được gọi với nhiều tên khác nhau như là: điện thất, sâm tam thất, kim bất hoàn và được sử dụng như một phương thuốc quý trong y học dân gian từ lâu đời.

Tên khoa học của tam thất bắc là: *Panax pseudoginseng* Wall, được phát hiện đầu tiên tại Trung Quốc. Ở nước ta, tam thất bắc được trồng tại một số vùng núi cao (>1200m) có khí hậu và thổ nhưỡng phù hợp như là Cao Bằng, Lào Cai, Hà Giang.

Theo y học hiện đại, củ tam thất bắc có rất nhiều công dụng:

- (1) Bảo vệ phòng ngừa các bệnh tim mạch nhờ thành phần noto ginsenosit.
- (2) Có khả năng phòng ngừa nguy cơ đột quỵ bằng cách làm tan các cục máu đông gây tắc nghẽn động mạch khiến cho dòng chảy máu được lưu thông.
- (3) Bà mẹ sau sinh, những người bị suy nhược cơ thể thường dùng tam thất bắc để bồi bổ, an thần nâng cao sức khỏe.
- (4) Saponin trong tam thất bắc có công dụng hỗ trợ các bệnh ung thư như ung thư dạ dày, ung thư vú, ung thư phổi, nhờ khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ác tính mà không ảnh hưởng tới các tế bào lành tính xung quanh.
- (5) Ngoài ra, tam thất bắc có tác dụng làm đẹp, giúp sáng da, làm mờ vết nám đối với phụ nữ và giúp “bổ huyết ích khí, tráng dương tán hàn, tăng cường sinh lý nam giới”.

Nguyên liệu được sử dụng trong giải pháp hữu ích là tam thất bắc tại vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn, tỉnh Lào Cai. Tam thất bắc đã được trồng từ 5-7 năm và được thu

hoạch vào tháng 10. Phần lá và thân được cắt bỏ, giữ lại phần củ phơi khô để sử dụng cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

Thành phần khoa học: Thành phần chính và đem lại giá trị y học lớn đó là Saponin (4,42-12%), thuộc kiểu protopanaxadiol và protopanaxatriol. Các thành phần khác: notoginsenoit, α -guaien, β -guaien và octadecan, flavornoit, phytosterol (β -sitosterol, stigmasterol, daucosterol), polysacarit.

Phân tích thành phần trong củ tam thất bắc, các nhà khoa học đã tìm thấy nhiều dưỡng chất, hợp chất quý hiếm. Trong số các ginsenosit đã được xác định rõ hoạt tính, nhiều bằng chứng cho thấy Rg₃ thể hiện tác dụng ức chế đáng kể đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau. Tuy nhiên, hàm lượng Rg₃ chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ xấp xỉ 4,6 $\pm$ 0,3 mg/g, nhỏ hơn nhiều so với các chất khác có tác dụng chống ung thư thấp hơn như Rb₁.

Quy trình lên men nhân sâm dựa trên hoạt động thủy phân của enzym beta-glucosidaza giúp chuyển hóa và tăng hàm lượng các ginsenosit. Enzym beta-glucosidaza có thể lấy từ nhiều nguồn khác nhau như nấm, xạ khuẩn, vi khuẩn, v.v.. Các phương pháp thủy phân vi sinh hoặc enzym được coi là thuận lợi hơn so với các phương pháp hóa học thông thường do hiệu suất của chúng trong điều kiện phản ứng nhẹ hơn, các bước phản ứng đơn giản và cường độ cao. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu trước đây, một số nỗ lực sản xuất ginsenosit bằng phương pháp enzym từ nấm đã bị hạn chế bởi năng suất thấp, thời gian dài, độ phức tạp của quá trình enzym hoặc vấn đề an toàn thực phẩm. Nên việc sử dụng vi khuẩn sẽ mang đến hiệu quả tốt nhất.

Hiện nay, nhiều nghiên cứu chuyển hóa, tăng hàm lượng các ginsenosit ở nhân sâm bằng phương pháp sinh học cũng thu được nhiều thành tựu đáng kể.

+ Qing et al. (2015) công bố việc sử dụng vi khuẩn nội sinh *Bacillus polymyxa* trong chuyển hóa ginsenosit trong nhân sâm Trung Quốc cho thấy hàm lượng ginsenosit Rb₃, Re, Rd, CK, protopanaxadiol được tăng cường đáng kể.

+ Hay Luo et al. (2013) công bố phân lập được 36 chủng vi sinh vật nội sinh sâm núi Trung Quốc, trong đó có 5 chủng vi sinh vật thuộc các chi khác nhau như

Fusarium, *Nodulisporium*, *Brevundimonas* và *Bacillus* cho hiệu quả chuyển hóa và tăng cường tích lũy saponin khi nuôi cấy với sâm trong điều kiện nhân tạo.

Tóm lại, tận dụng được nguồn nhân sâm có sẵn ở các tỉnh miền núi Việt Nam là tam thất bắc, để nghiên cứu làm tăng hàm lượng các chất có khả năng chống ung thư đặc biệt là ginsenosit Rg₃. Đồng thời, để làm tăng hiệu quả chuyển hóa một cách tốt nhất, nhanh nhất, năng suất cao nhất thì quy trình lên men tam thất bắc bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* sẽ là bản chất của giải pháp hữu ích này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là xuất quy trình lên men tam thất bắc để làm tăng hàm lượng Rg₃ bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

Bước 1: Quy trình chế biến bột tam thất bắc:

+Lựa chọn: đầu tiên lựa chọn những củ tam thất hình con quay, không phân nhánh, đầu củ sần sùi, thành nhiều mấu, có nhiều vết nhăn dọc, vỏ ngoài cứng màu xám hoặc xám đen (dạng sống) sau chuyển màu đen (dạng sơ chế), ruột đặc màu xám, chắc nặng, vị ngọt nhạt, hơi đắng, mùi thơm nhẹ. Khối lượng củ tam thất khoảng 10 đến 12 củ/kg.

+Sơ chế: để đảm bảo hiệu quả cao trong việc chữa bệnh, trước hết phải vặt râu và củ riêng, sau đó rửa thật nhanh bằng nước đun sôi để nguội vài lần, không cho nước kịp ngấm vào ruột. Phơi nắng hoặc sấy ở nhiệt độ 40 đến 60°C trong 6 giờ.

+ Nghiền: nghiền tam thất bắc đã sấy khô thành dạng bột thô có đường kính hạt khoảng 0,8mm. 1kg tam thất bắc tươi thu được 300g bột tam thất bắc. Hiệu suất thu hồi khoảng 30%.

Bước 2: Quy trình chế biến cao tam thất bắc

+ Ngâm 30g bột tam thất bắc trong dung dịch hexan trong 6 giờ (tỷ lệ 1:1).

+ Ly tâm dung dịch để thu được phần bã

- + Hòa tan phần bã này trong etanol 80% để thu được hỗn hợp dung dịch
- + Cô quay hỗn hợp dung dịch này để thu được cao tam thất bắc. Khối lượng cao tam thất bắc thu được là 1,8506 g. Hiệu suất thu hồi là 6,17%.

Bước 3: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* để lên men tam thất bắc

+ Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch có bổ sung CMC ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Sau đó, sử dụng dung dịch lugol để phát hiện vòng tròn hoạt tính của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn nào có hoạt tính sinh enzym xenlulaza sẽ tạo ra vòng tròn màu trắng trên đĩa thạch, những chủng đó sẽ được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

+ Sau khi chọn được các chủng có hoạt tính sinh enzym β -glucosidaza, nuôi cấy chúng ở các loại môi trường khác nhau để tìm ra môi trường tối ưu và chủng vi khuẩn sinh nhiều enzym nhất. Sử dụng axit dinitrosalixylic (phương pháp DNS) để đánh giá khả năng sinh enzym của vi khuẩn.

+ Nuôi cấy chủng vi khuẩn tuyển chọn trên các môi trường khác nhau, tìm môi trường nuôi cấy tối ưu.

+ Chủng vi khuẩn được nuôi ở các pH khác nhau: pH= 5,5-8 để tìm ra độ pH tối ưu.

+ Tìm nhiệt độ tối ưu với vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau: 20-37°C.

+ Tìm nguồn cacbon tối ưu từ glucoza, CMC, ginsenosit dạng dung dịch, ginsenosit nguyên chất.

+ Tìm nguồn nitơ tối ưu từ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, cao nấm men, NaNO_3 .

+ Tìm thời gian tối ưu trong số: 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ, 84 giờ, 96 giờ.

Bước 4: Xác định khả năng chuyển hóa nhân sâm làm giàu hoạt chất ginsenosit Rg_3 bằng enzym thô do vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh ra bằng phân tích sắc ký khí bản mỏng (TLC).

+ Enzym sau khi thu được từ quá trình nuôi cấy vi khuẩn sẽ được tinh sạch từng phần bằng cột siêu lọc với các kích thước màng lọc 100 - 50 – 30-10 kDa.

+ Sau đó, xác định khả năng chuyển hóa ginsenosit bằng phân tích TLC qua các bước sau:

Hỗn hợp phản ứng (2,0 ml) chứa 2,0 mg ginsenosit, 0,2 ml metanol và mỗi chế phẩm enzym chứa 1,1 U β -glucosidaza hoạt động trong 1,8 ml dung dịch đệm natri axetat 0,1M (độ pH= 4,8) được ủ trong 96 giờ ở 37°C.

Hỗn hợp phản ứng được chiết xuất hai lần với 2,0 ml n-butanol bão hòa với nước. Phần n-butanol được cô đặc đến khô trong chân không và phần dư được hòa tan trong 1,0 ml metanol.

+ Tiến hành

TLC của dịch chiết metanol được thực hiện trên tấm silicagel 60 F254 với $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (ở tỷ lệ 65:35:10, pha thấp hơn). Các đốm trên TLC được phát hiện bằng cách phun 10% H_2SO_4 trong etanol và gia nhiệt đến 120°C trong 10 phút.

Bước 5: Lên men chuyển hóa tam thất bắc làm giàu hoạt tính Rg_3 bằng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Tiến hành lên men tam thất bắc bằng chủng vi khuẩn đã chọn và tìm các điều kiện tối ưu để vi khuẩn chuyển hóa ginsenosit.

+ Nguồn C tối ưu: nồng độ ginsenosit thích hợp

+ Nguồn N tối ưu

+ Độ pH thích hợp

+ Nhiệt độ thích hợp

+ Thời gian thích hợp

Xác định nồng độ saponin bằng H_2SO_4 .

Xác định khả năng chuyển hóa làm giàu hoạt chất ginsenosit Rg_3 bằng sắc ký bản mỏng (TLC)/ sắc kí khí cao áp (HPLC).

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1: mô tả quy trình lên men tam thất bắc bằng vi khuẩn *Bacillus Subtilis* theo giải pháp hữu ích

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là xuất quy trình lên men tam thất bắc để làm tăng hàm lượng Rg₃ bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

Bước 1: Quy trình chế biến bột tam thất bắc:

+Lựa chọn: đầu tiên lựa chọn những củ tam thất hình con quay, không phân nhánh, đầu củ sần sùi, thành nhiều mấu, có nhiều vết nhăn dọc, vỏ ngoài cứng màu xám hoặc xám đen (dạng sống) sau chuyển màu đen (dạng sơ chế), ruột đặc màu xám, chắc nặng, vị ngọt nhạt, hơi đắng, mùi thơm nhẹ. Khối lượng củ tam thất khoảng 10 đến 12 củ/kg.

+Sơ chế: để đảm bảo hiệu quả cao trong việc chữa bệnh, trước hết phải vặt râu và củ riêng, sau đó rửa thật nhanh bằng nước đun sôi để nguội vài lần, không cho nước kịp ngấm vào ruột. Phơi nắng hoặc sấy ở nhiệt độ 40 đến 60°C trong 6 giờ.

+ Nghiền: nghiền tam thất bắc đã sấy khô thành dạng bột thô có đường kính hạt khoảng 0,8mm. 1kg tam thất bắc tươi thu được 300g bột tam thất bắc. Hiệu suất thu hồi khoảng 30%.

Bước 2: Quy trình chế biến cao tam thất bắc

+ Ngâm 30g bột tam thất bắc trong dung dịch hexan trong 6 giờ (tỷ lệ 1:1).

+ Ly tâm dung dịch để thu được phần bã.

+ Hòa tan phần bã này trong etanol 80% để thu được hỗn hợp dung dịch

+ Cô quay hỗn hợp dung dịch này để thu được cao tam thất bắc. Khối lượng cao tam thất bắc thu được là 1,8506g. Hiệu suất thu hồi là 6,17%.

Bước 3: Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* để lên men tam thất bắc

+ Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch có bổ sung CMC ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Sau đó, sử dụng dung dịch lugol để phát hiện vòng tròn hoạt tính của vi khuẩn. Chủng vi khuẩn nào có hoạt tính sinh enzym xenulaza sẽ tạo ra vòng tròn màu trắng trên đĩa thạch, những chủng đó sẽ được tuyển chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

+ Sau khi chọn được các chủng có hoạt tính sinh enzym β -glucosidaza, nuôi cấy chúng ở các loại môi trường khác nhau để tìm ra môi trường tối ưu và chủng vi khuẩn sinh nhiều enzym nhất. Sử dụng phương pháp DNS để đánh giá khả năng sinh enzym của vi khuẩn.

+ Với môi trường và chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được, tiếp tục nuôi cấy chủng vi khuẩn ở các pH khác nhau từ 5,5-8,5.

+ Nuôi cấy vi khuẩn ở nhiệt độ 20-25°C.

+ Nguồn cacbon thích hợp là ginsenosit nguyên chất 3%.

+ Cao nấm men là nguồn ni tơ thích hợp.

+ Thời gian nuôi cấy 10-12 ngày.

Bước 4: Xác định khả năng chuyển hóa nhân sâm làm giàu hoạt chất ginsenosit Rg_3 bằng enzym thô do vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh ra bằng phân tích TLC.

+ Enzym sau khi thu được từ quá trình nuôi cấy vi khuẩn sẽ được tinh sạch từng phần bằng cột siêu lọc, kích thước màng: 100 - 50 - 30-10 kDa. Sau đó dùng $(NH_4)_2SO_4$ để tinh sạch cuối cùng.

+ Sau đó, xác định khả năng chuyển hóa ginsenosit bằng phân tích TLC qua các bước sau:

Hỗn hợp phản ứng (2,0 ml) chứa 2,0 mg ginsenosit, 0,2 ml metanol và mỗi chế phẩm enzym chứa 1,1 U β -glucosidaza hoạt động trong 1,8 ml dung dịch đệm natri axetat 0,1M (độ pH= 4,8) được ủ trong 96 giờ ở 37°C.

Hỗn hợp phản ứng được chiết xuất hai lần với 2,0 ml n-butanol bão hòa với nước. Phần n-butanol được cô đặc đến khô trong chân không và phần dư được hòa tan trong 1,0 ml metanol.

+ Tiến hành

TLC của dịch chiết metanol được thực hiện trên tấm silicagel 60 F254 với $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (ở tỷ lệ 65:35:10, pha dưới). Các đốm trên TLC được phát hiện bằng cách phun 10% H_2SO_4 trong etanol và gia nhiệt đến 120°C trong 10 phút.

Bước 5: Lên men chuyển hóa tam thất bắc làm giàu hoạt tính Rg_3 bằng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Tiến hành lên men tam thất bắc bằng chủng vi khuẩn đã chọn và tìm các điều kiện tối ưu để vi khuẩn chuyển hóa ginsenosit.

+ Nguồn C tối ưu: 3% cao tham thất bắc.

+ Nguồn N tối ưu

+ độ pH thích hợp

+ Nhiệt độ thích hợp

+ Thời gian thích hợp

Xác định nồng độ saponin bằng H_2SO_4 .

Xác định khả năng chuyển hóa làm giàu hoạt chất ginsenosit Rg_3 bằng sắc ký bản mỏng/ HPLC.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Quy trình lên men tam thất bắc làm giàu hoạt chất Rg_3 bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis* được thực hiện như sau:

Bước 1: Chế biến bột tam thất bắc

Lấy khoảng 1kg tam thất bắc tươi được trồng 5-7 năm và được thu hoạch vào tháng 10 tại núi Hoàng Liên Sơn, Lào Cai, sau đó sấy ở nhiệt độ từ 40°C đến 60°C trong 6 giờ,

Nghiền tam thất bắc đã sấy nêu trên để thu được 300g bột có đường kính hạt từ 0,7 đến 0,9mm,

Bước 2: Chế biến cao tam thất bắc

Ngâm 300g bột tam thất bắc đã nghiền trong dung dịch hexan (tỷ lệ 1:1) trong 6 giờ;

Ly tâm để loại bỏ phần dịch và thu được phần bã;

Hoà tan phần bã thu được trong etanol 80%;

Cô quay hỗn hợp dung dịch tạo thành để thu được 1,8506g cao tam thất bắc;

Bước 3: Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính cao, tìm các điều kiện nuôi cấy tối ưu.

Nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên môi trường đĩa thạch có bổ sung CMC ở nhiệt độ 25°C trong 2 ngày, sau đó sử dụng dung dịch lugol để phát hiện vòng tròn hoạt tính của vi khuẩn, chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh enzym β -glucosidaza sẽ tạo ra vòng tròn màu trắng trên đĩa thạch và tuyển chọn các chủng vi khuẩn này cho các thí nghiệm tiếp theo;

Tiếp tục nuôi cấy các chủng vi khuẩn được tuyển chọn nêu trên trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu như sau: độ pH từ 5,5 đến 8,5 và nhiệt độ từ 20°C đến 25°C, nguồn cacbon được chọn từ glucoza, CMC, ginsenosit dạng dung dịch và ginsenosit nguyên chất, nguồn nitơ được chọn từ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pepton, cao nấm men và NaNO_3 , thời gian khoảng từ 10-12 ngày.

Bước 4: Xác định khả năng chuyển hóa ginsenosit từ enzym thô của vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng TLC để tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính cao nhất dùng cho quá trình lên men

Tinh sạch từng phần enzym thu được từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn bằng thiết bị siêu lọc, kích thước màng: 100-50 – 30-10 kDa;

Xác định khả năng chuyển hóa ginsenosit bằng phân tích TLC bao gồm việc:

Ủ hỗn hợp phản ứng (2,0 ml) chứa 2,0 mg ginsenosit, 0,2 ml metanol và mỗi chế phẩm enzym chứa 1,1 U β -glucosidaza hoạt động trong 1,8 ml dung dịch đệm natri axetat 0,1M (độ pH= 4,8) trong 96 giờ ở 37°C;

Chiết xuất hỗn hợp phản ứng hai lần bằng 2,0 ml n-butanol bão hòa với nước, phần n-butanol được cô đặc đến khô trong chân không và hoàn tan phần dư trong 1,0 ml metanol;

Thực hiện phân tích TLC của dịch chiết metanol trên tấm silicagel 60 F254 với $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ (với tỷ lệ 65:35:10, pha thấp hơn), sau đó phát hiện các đốm trên TLC bằng cách phun H_2SO_4 10% trong etanol và gia nhiệt ở 120°C trong 10 phút,

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* sinh nhiều enzym nhất bằng phương pháp DNS đánh giá khả năng sinh enzym của các chủng vi khuẩn,

Bước 5: Lên men tam thất bắc chuyển hóa và làm tăng hoạt tính Rg_3 bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Tối ưu các điều kiện chuyển hóa ginsenosit và đánh giá hàm lượng Rg_3 bằng sắc ký bản mỏng/ HPLC.

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng chuyển hóa ginsenosit thành các chất nhỏ hơn khi sử dụng cao chiết tam thất bắc ở nồng độ 3%, cao nấm men là nguồn N thích hợp để tăng hàm lượng saponin trong mẫu, tỉ lệ giống cấy bổ sung thích hợp nhất là 5%, thời gian lên men thích hợp nhất là 10-12 ngày. Khi đó hiệu quả lên men chuyển hóa Rg_3 đạt hiệu quả tối ưu là 72,3%, nghĩa là từ 1g cao tam thất bắc, sau 10-12 ngày lên men thu hồi được 723mg Rg_3 .

Hiệu quả của giải pháp hữu ích

Theo quy trình thực hiện giải pháp hữu ích, sau khi hoàn thành sẽ tìm được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có hoạt tính cao nhất để lên men tam thất bắc ở các điều kiện tối ưu để chuyển hóa làm giàu Rg_3 .

Hàm lượng Rg_3 trước lên men là $12 \pm 0,3$ mg/g, sau khi lên men chuyển hóa bằng vi khuẩn, hàm lượng tăng lên $723 \pm 0,3$ mg /g.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình lên men tam thất bắc để làm giàu hoạt chất Rg_3 bằng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, quy trình này bao gồm các bước:

a) chế biến cao tam thất bắc:

lựa chọn và sơ chế khoảng 1kg tam thất bắc tươi, sau đó sấy ở nhiệt độ từ 40°C đến 60°C trong 6 giờ;

nghiền tam thất bắc đã sấy nêu trên để thu được 300g bột có đường kính hạt từ 0,7 đến 0,9mm;

ngâm 300g bột tam thất bắc đã nghiền trong dung dịch hexan (tỷ lệ 1:1) trong 6 giờ;

ly tâm để loại bỏ phần dịch và thu được phần bã;

hoà tan phần bã thu được trong etanol 80%;

cô quay hỗn hợp dung dịch tạo thành để thu được 1,8506g cao tam thất bắc;

b) tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* để làm chủng lên men cao tam thất bắc:

nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* trên môi trường đĩa thạch có bổ sung Azo-CMC (thạch có màu xanh nước biển) và azo- xylan (môi trường thạch có màu xanh đen) ở nhiệt độ 20-25°C trong 3 ngày, chủng vi khuẩn có hoạt tính sinh enzyme β -glucosidaza sẽ tạo ra vòng tròn màu trong trên đĩa thạch;

tiếp tục nuôi cấy các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme β -glucosidaza thu được này trên môi trường dịch thể trong các điều kiện nuôi cấy tối ưu như sau: độ pH = 6-7, nhiệt độ từ 20-25°C, cao nấm men là nguồn N thích hợp, bổ sung 3% cao chiết tam thất bắc, tỉ lệ giống cấy bổ sung thích hợp nhất là 5%, thời gian lên men thích hợp nhất là 10 đến 12 ngày;

tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sinh enzyme β -glucosidaza cao nhất bằng phương pháp DNS đánh giá khả năng sinh enzyme của các chủng vi khuẩn;

tinh sạch từng phần enzym thu được từ môi trường nuôi cấy vi khuẩn bằng thiết bị siêu lọc, kích thước màng lọc là 100-50 – 30-10 kDa; sau đó tinh sạch đến bước cuối cùng bằng $(\text{HN}_4)_2\text{SO}_4$;

xác định khả năng chuyển hóa ginsenosit bằng phân tích sắc khí bản mỏng (TLC) bao gồm việc:

ủ hỗn hợp phản ứng (2,0 ml) chứa 2,0 mg ginsenosit, 0,2 ml metanol và mỗi chế phẩm enzym chứa 1,1 đơn vị β -glucosidaza hoạt động trong 1,8 ml dung dịch đệm natri axetat 0,1M (độ pH= 4,8) trong 96 giờ ở 37°C;

chiết xuất hỗn hợp phản ứng hai lần bằng 2,0 ml n-butanol bão hòa với nước, phần n-butanol được cô đặc đến khô trong chân không và hoàn tan phần dư trong 1,0 ml metanol;

thực hiện phép phân tích TLC của dịch chiết metanol trên tấm silicagel 60 F254 bằng hỗn hợp dung môi gồm: CHCl_3 : CH_3OH : H_2O (với tỷ lệ 65 : 35 : 1 0), phát hiện ginsenosit Rg3 trên TLC bằng cách phun H_2SO_4 10% trong etanol và gia nhiệt ở 120°C trong 10 phút,

c) lên men chuyển hóa tam thất bắc để làm giàu hoạt tính Rg₃ bằng chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* đã tuyển chọn nêu trên:

vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng chuyển hóa ginsenosit thành các chất nhỏ hơn là Rg3 (thu được ở bước b) khi chúng được nuôi trong điều kiện môi trường chứa 3g cao tam thất bắc 3% (thu được ở bước a), có bổ sung cacbon với tỷ lệ 3% được chọn từ nguồn ginsenosit, nitơ với tỷ lệ phù hợp để làm tăng hàm lượng Rg₃ được chọn từ nguồn NaNO_3 , độ pH = 7, nhiệt độ 25°C, thời gian lên men thích hợp nhất là 10 đến 12 ngày, nồng độ Rg₃ sinh ra trong quá trình lên men chuyển hóa được xác định bằng H_2SO_4 , bằng sắc khí bản mỏng (TLC) và sắc kí khí cao áp (HPLC), hàm lượng Rg₃ trong sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men là 732mg/g cao tam thất bắc.

Hình 1

