

## TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus subtilis* NL812 CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME $\beta$ -GLUCOSIDASE ĐỂ CHUYỂN HÓA GINSENOSE TỪ TAM THẮT

Vũ Duy Nhân<sup>1</sup>, Lê Thị Hoàng Yến<sup>2</sup>, Trần Huyền Thanh<sup>2</sup>, Nguyễn Đức Doan<sup>3\*</sup>,  
Nguyễn Thị Hương Nhu<sup>3</sup>, Trịnh Đắc Hoàn<sup>1</sup>, Đỗ Vĩnh Trường<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa học - Vật liệu, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự

<sup>2</sup>Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup>Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: nd.doan@vnua.edu.vn/nguyen.ducdoan@yahoo.com

Ngày nhận bài: 03.03.2021

Ngày chấp nhận đăng: 15.07.2021

### TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase để chuyển hóa ginsenoside trong cao tam thất thành ginsenoside Rg3 và CK. Tổng số 24 chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường có chứa 0,1% azo-CMC và 0,3% Azo-avicel trong 3-7 ngày. Phân loại chủng vi khuẩn bằng hình thái và xây dựng cây chủng loại phát sinh dựa vào phân tích trình tự 16S. Hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidase được xác định bằng phương pháp DNS sử dụng cơ chất PNP- $\beta$ -D-glucopyranoside. Sự chuyển hóa ginsenoside thành ginsenoside Rg3 bởi  $\beta$ -glucosidase được xác định bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Định lượng hợp chất Rg3 và CK bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả cho thấy trong 24 chủng vi khuẩn có chủng NL812 là loài *Bacillus subtilis* và có khả năng sinh  $\beta$ -glucosidase cao nhất. Enzyme  $\beta$ -glucosidase thu nhận từ chủng *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng chuyển hóa ginsenoside tam thất tạo thành Rg3 và CK sau 30 phút với hàm lượng Rg3 tăng 50,3% và CK tăng 47,7%.

Từ khóa:  $\beta$ -glucosidase, *Bacillus subtilis*, tam thất, ginsenoside, Rg3, CK.

### Selection of *Bacillus subtilis* Strain NL812 with $\beta$ -glucosidase for Hydrolysis of Ginsenoside from *Panax pseudoginseng* Extraction

### ABSTRACT

The study aimed to select *Bacillus subtilis* strains which are capable of producing  $\beta$ -glucosidase to hydrolyse ginsenoside from the root of *Panax pseudoginseng* into the bioactive compound Rg3 and CK. Twenty four strains were primary screened for the  $\beta$ -glucosidase n using 0.1% azo-CMC and 0.3% azo-Avicel. The classification of strains based on the morphology and phylogeny was analysed by the sequence of 16S.  $\beta$ -glucosidase activity obtained from strains was determined by DNS method using PNP- $\beta$ -D-glucopyranoside substrate. The hydrolysis of ginsenoside to Rg3 with enzyme  $\beta$ -glucosidase was identified using thin layer chromatography (TLC). Rg3 and CK content were determined using high performance liquid chromatography HPLC). Results showed that *Bacillus subtilis* strain NL812 produced  $\beta$ -glucosidase with the highest activity. The  $\beta$ -glucosidase released from *Bacillus subtilis* strain NL812 hydrolyzed ginsenoside from *Panax pseudoginseng* into Rg3 and CK after 30 min. with Rg3 content increased by 50.3% and CK content increased by 47.7%.

Keywords:  $\beta$ -glucosidase, *Bacillus subtilis*, *Panax pseudoginseng*, ginsenoside, Rg3, CK.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân sâm (*Panax ginseng*) là một loại dược liệu quý dùng để chữa bệnh và tăng cường sức

khỏe cho con người, đã được sử dụng hàng ngàn năm tại các quốc gia châu Á như Hàn Quốc, Trung Quốc và Nhật Bản. Ở Việt Nam, tam thất hay còn gọi là sâm tam thất (*Panax*

*pseudoginseng*) được coi là nhân sâm quý. Nó là cây dược liệu được trồng đặc hữu ở các tỉnh Tây Bắc như Lào Cai, Hà Giang (Nguyễn Thị Thúy & cs., 2016; Trần Anh Tuấn & Trương Ngọc Kiểm, 2017). Thành phần chính trong củ tam thất là các ginsenoside Rc, Rd, Re, Rb1, Rg1 (Nguyễn Thị Thúy & cs., 2016). Đây là các hợp chất có phân tử lượng lớn, độ hòa tan thấp và độ thấm kém trên màng tế bào. Ngoài ra, chúng còn nhanh chóng bị đào thải ra khỏi cơ thể dẫn đến thời gian bán thải trong cơ thể ngắn và sinh khả dụng thấp (Nguyễn Thị Thúy & cs., 2016). Vì thế, những năm gần đây, các nhà khoa học tập trung nghiên cứu chuyển hóa ginsenoside chính trong tam thất thành các hợp chất ginsenoside có phân tử lượng thấp, dễ hấp thụ và có hoạt tính dược học cao như Rd, Rg3, Rh2, CK, F2 (Trần Bảo Trâm & cs., 2017).

Để làm giàu các hợp chất trên, nhiều phương pháp khác nhau đã được sử dụng như thủy phân bằng axit nhẹ, phân tách kiềm và lên men vi sinh vật. Bằng phương pháp lên men bởi vi sinh vật, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng các chủng vi sinh vật có khả năng sinh  $\beta$ -glucosidase cao sẽ chuyển hóa ginsenoside chính thành các ginsenoside phân tử lượng thấp hơn. Yin Chengri & cs. (2017) đã cho thấy *Sphingomonas* 2-F2 có thể chuyển hóa ginsenoside Re thành ginsenoside hiếm Rh1 và Rg1 được xúc tác bởi các enzyme đặc hiệu sinh ra từ các vi sinh vật loại bỏ một phân tử  $\beta$ -glucose tạo ra ginsenoside hiếm khác.

Ngoài ra, enzyme  $\beta$ -glucosidase của vi sinh vật cũng có thể cắt liên kết 1-6 glucoside của các chất cao phân tử (Rb1) thành các hợp chất nhỏ hơn Rg3 (Hình 1), thậm chí là CK (Song & cs., 2015; Lee & cs., 2016; Sun & cs., 2017; Yu & cs., 2017). Cho đến nay, các chủng vi sinh vật được sử dụng

trong nghiên cứu  $\beta$ -glucosidase bao gồm nấm mốc (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*,...), xạ khuẩn (*Actinomyces griseus*, *Streptomyces reticuli*,...), vi khuẩn (*Acetobacter xylinum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*,...) (Ji & cs., 2015; Lee & cs., 2016; Sun & cs., 2017; Yu & cs., 2017). Tuy nhiên, ở Việt

Nam hiện nay, việc nghiên cứu chuyển hóa ginsenoside chính từ tam thất bởi  $\beta$ -glucosidase từ vi sinh vật chưa được nghiên cứu nhiều.

Mục đích của nghiên cứu nhằm tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase chuyển hóa ginsenoside từ tam thất (*Panax pseudoginseng*) thành ginsenoside Rg3 và CK từ 24 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất rễ sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, nghiên cứu này còn khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính  $\beta$ -glucosidase thu được từ các chủng *Bacillus subtilis* tuyển chọn được. Việc tìm ra được các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase chuyển hóa ginsenoside từ tam thất thành sản phẩm giàu hoạt chất Rg3 và CK có ý nghĩa đối với các sản phẩm dược phẩm, thực phẩm có lợi hơn đối sức khỏe con người.

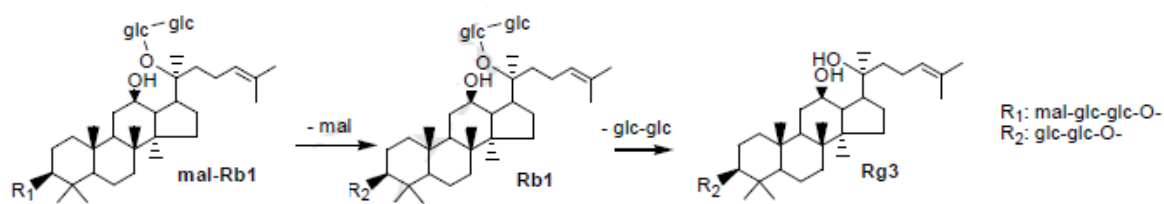
## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu và hóa chất

Tổng số 24 mẫu vi khuẩn được Phòng Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hóa học - Vật liệu, Viện Khoa học Quân sự và Công nghệ - Bộ Quốc phòng phân lập từ đất xung quanh rễ sâm Ngọc Linh tại tỉnh Kom Tum, Việt Nam. Ginsenoside tam thất được tách chiết từ củ tam thất bắc có trên thị trường Việt Nam tại Phòng Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hóa học - Vật liệu, Viện Khoa học Quân sự và Công nghệ - Bộ Quốc phòng. Chất chuẩn Rg3 (độ tinh khiết 98%) và CK (độ tinh khiết 98%) được mua từ hãng BTGIN (Daejeon, Hàn Quốc). Chất chuẩn Rb1, Re và Rd được mua từ hãng Singma-Aldrich (Mỹ).

### 2.2. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính $\beta$ -glucosidase

Các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường thạch thường, sau 24 giờ nuôi cấy, dịch vi khuẩn được chuyển sang môi trường có chứa 0,1% azo-CMC và 0,3% azo-avicel và được nuôi trong tủ ấm từ 72 giờ ở nhiệt độ 37°C. Hoạt tính enzyme của các chủng vi khuẩn được tính bằng đường kính vòng phân giải.



Nguồn: Jin & cs. (2011).

**Hình 1. Sơ đồ chuyển hóa Rb1 thành Rg3**

**Bảng 1. Bảng các môi trường nuôi cấy vi khuẩn**

Thành phần	Hàm lượng (g/l)				
	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
Pepton	3	20	-	-	-
Glucose	3	20	30	-	2
Cao nấm men	20	5	5	0,5	-
Khoai tây	-	200	-	-	-
Ligno cellulose	-	-	-	20	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	1	-	-
KCl	-	-	0,05	0,5	-
FeSO <sub>4</sub>	-	-	0,1	-	-
CuSO <sub>4</sub>	-	-	0,005	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	-	0,3	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,2	-
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	0,1	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	0,5	-
CaCO <sub>3</sub>	-	-	-	-	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	1	-

Sau khi chọn được các chủng vi khuẩn có hoạt tính thủy phân 0,1% azo-CMC và 0,3% Azo-avicel, chúng được nuôi trên các môi trường nuôi cấy MT1, MT2, MT3, MT4 và MT5 (Bảng 1) ở nhiệt độ 37°C, lắc 200 vòng/phút trong 72 giờ để xác định khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase.

### 2.3. Định danh chủng vi khuẩn có enzyme $\beta$ -glucosidase hoạt tính cao

Chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidase cao nhất được nuôi cấy trên môi trường thạch thường ở nhiệt độ phòng. Sau 48-96 giờ quan sát hình thái khuẩn lạc và phân loại vi khuẩn bằng phân tích trình tự gen rARN 16S

dùng mỗi 27F và 1495R có trình tự 27F: 5' GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'; 1495R: 5'CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA 3' (Weisberg & cs., 1991). Đoạn trình tự rRNA vùng 16S của chủng phân tích được so sánh với các loài gần gũi trên Genbank sử dụng phần mềm CLUSTAL X (Kumar & cs., 2018). Cây phân loại dựa vào trình tự rARN vùng 16S được dựng lên nhờ vào thuật toán Neighbor-joining tree (giá trị bootstrap lặp lại 100 lần) (Nei & Kumar, 2000).

### 2.4. Xác định hoạt tính enzyme $\beta$ -glucosidase

Hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidase xác định theo mô tả của Jitendra & cs. (2014) và được thực hiện như sau.

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase để chuyển hóa ginsenoside từ tam thất

#### 2.4.1. Chuẩn bị thuốc thử axit 3,5-dinitrosalicylic

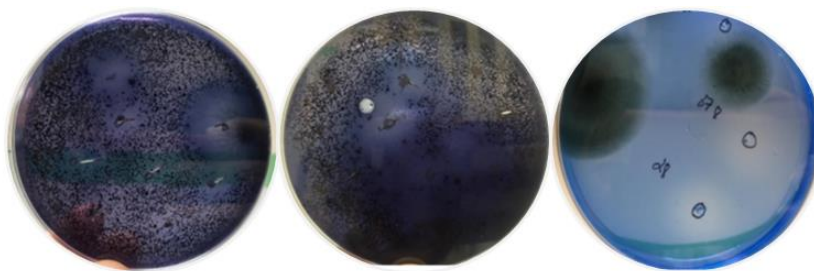
Thuốc thử DNS được chuẩn bị bao gồm 2 dung dịch A và B. Lấy 880ml axit 3,5-dinitrosalicylic (DNS) 1% và 255g muối Rochelle cho vào 300ml NaOH 4,5%. Hỗn hợp được lắc đều để hòa tan hoàn toàn (dung dịch A). Cân 10g phenol tinh thể vào bình định mức 100ml. Cho thêm 22ml NaOH 10% và thêm nước tinh khiết đến thể tích 100ml rồi lắc đều để hòa tan hết. Dùng pipette lấy 69ml hỗn hợp dung dịch này để hòa tan hoàn toàn 6,9g NaHCO<sub>3</sub> (dung dịch B). Sau khi trộn lẫn dung dịch A và B, dung dịch thuốc thử DNS được bảo quản trong bao bì tối màu trong 2 ngày trước khi sử dụng và có thể sử dụng trong vòng 1-2 tháng.

#### 2.4.2. Chuẩn bị mẫu phân tích

Dùng pipette lấy 2ml dung dịch menzyme thô cho vào ống nghiệm. Thêm 2ml dung dịch PNP-b-D-glucoopyranoside, lắc đều rồi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Dùng pipette lấy 0,2ml hỗn hợp dung dịch vào ống nghiệm rồi thêm với 0,6ml thuốc thử DNS, lắc đều. Sau khi dừng phản ứng bằng cách giữ ống nghiệm trong nước sôi trong 5 phút, hỗn hợp được làm mát bằng nước lạnh rồi tiến hành pha loãng với 4,2ml nước tinh khiết. Đo độ hấp thụ quang học UV-Vis ở bước sóng 500nm. Hoạt độ của enzyme  $\beta$ -glucosidase được biểu thị bằng lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 mmole PNP mỗi phút trong điều kiện thí nghiệm.

**Bảng 2. Kết quả sàng lọc khả năng sinh  $\beta$ -glucosidase của các chủng vi khuẩn khi thử nghiệm bằng Azo-CMC và Azo-avicel**

Ký hiệu chủng	Hoạt tính $\beta$ -glucosidase	
	Cơ chất Avi	Cơ chất CMC
NL33	Không	Không
NL**	Không	Không
NL11	Không	Không
NL10	Không	Không
NL28T	Có	Có
NL92	Không	Không
NL*	Không	Không
NL50	Không	Không
NL128	Không	Không
NL49	Không	Không
NL17	Không	Không
NL812	Có	Có
NL 4	Không	Không
NL6	Không	Không
NL100	Không	Không
NL378	Có	Có
NL91	Không	Không
NL509	Có	Có
NL485	Không	Không
NL66a	Không	Không
NL497	Có	Có
NL103	Không	Không
NLB4	Không	Không
NL86	Không	Không



Hình 2. Khả năng phân hủy Azo-CMC và Azo-avicel của một số chủng vi khuẩn

## 2.5. Xác định khả năng chuyển hóa ginsenoside tam thất bởi enzyme $\beta$ -glucosidase

### 2.5.1. Tinh sạch enzyme $\beta$ -glucosidase

Dịch môi trường nuôi cấy chứa enzyme  $\beta$ -glucosidase thô được ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/phút trong thời gian 15 phút ở nhiệt độ 4°C, sau đó cẩn thận tách lấy dịch chiết chứa enzyme  $\beta$ -glucosidase. Sau khi cô đặc bằng cách ly tâm qua cột lọc cut-off point (Ultra filter 100-50-30-10kDa), dịch chiết thu được tinh sạch bằng dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 2.5.2. Chuẩn bị dịch thủy phân ginsenoside tam thất

Lấy 2,0mg ginsenoside tam thất hòa tan trong 0,2ml methanol (MeOH) rồi lần lượt thêm dịch chiết enzyme  $\beta$ -glucosidase (khoảng 1,1U) và 1,8ml dung dịch đệm natri acetate 0,1M (pH 4,8). Sau khi được ủ ở 37°C trong 96 giờ, hỗn hợp được chiết hai lần với 2,0ml n-butanol bão hòa với nước. Cô đặc chân không đến khô dịch chiết rồi hòa tan phần còn lại bằng 1,0ml MeOH. Dịch chiết MeOH này được sử dụng để phân tích TLC.

Đối với phân tích HPLC: Dịch chiết MeOH được siêu âm 15 phút rồi tiến hành ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút trong 10 phút. Cẩn thận gạn lấy dịch trong cho vào ống HPLC để phân tích Rb1, Rd, Re, Rg3 và CK.

### 2.5.3. Phân tích sắc ký lớp mỏng

Sự chuyển hóa ginsenoside tam thất thành ginsenoside Rg3 được xác định bằng phương pháp phân tích TLC theo mô tả của Jitendra & cs. (2014). Phân tích TLC dịch chiết MeOH được thực hiện trên tấm silica gel 60 F254 với

$\text{CHCl}_3$ - $\text{CH}_3\text{OH}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (65:35:10, pha thấp hơn). Các đốm trên TLC được phát hiện bằng cách phun 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  trong ethanol và sấy khô bằng máy sấy trong 10 phút.

### 2.5.4. Phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao

Rb1, Rd, Re, Rg3 và Ck trước và sau thủy phân ginsenoside tam thất bằng enzyme  $\beta$ -glucosidase được phân tích bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) thực hiện trên hệ thống Agilent 1260 Infinity LC (Mỹ) với detector UV ở bước sóng 196 nm. Các hợp chất này được tách sử dụng cột ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250mm; 5  $\mu\text{m}$ ) ở nhiệt độ 30°C. Pha động bao gồm nước tinh khiết (A) và axetonitril (B) với chương trình chạy gradient như sau: 30% B (0-5 phút), 30% B (5-15 phút), 57% B (15-25 phút), 70 B% (25-30 phút) và 30% B (30-40 phút). Tốc độ dòng 1,2 ml/phút. Thể tích bơm là 20 $\mu\text{l}$ .

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính $\beta$ -glucosidase

Các chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase được trình bày ở bảng 2 và hình 2. 24 chủng vi khuẩn đã phân lập được nuôi cấy trên môi trường thạch chứa 1% cơ chất Azo-CMC và môi trường đĩa thạch Azo-avicel, sau đó được nuôi trong tủ ấm từ 3-7 ngày. Những chủng vi khuẩn có hoạt tính  $\beta$ -glucosidase sẽ tạo ra vòng phân hủy màu trắng.

$\beta$ -glucosidase nằm trong phức hệ enzyme cellulase của vi khuẩn, nếu endo-cellulase cắt vùng ưa nước của cellulose, exo-cellulase cắt

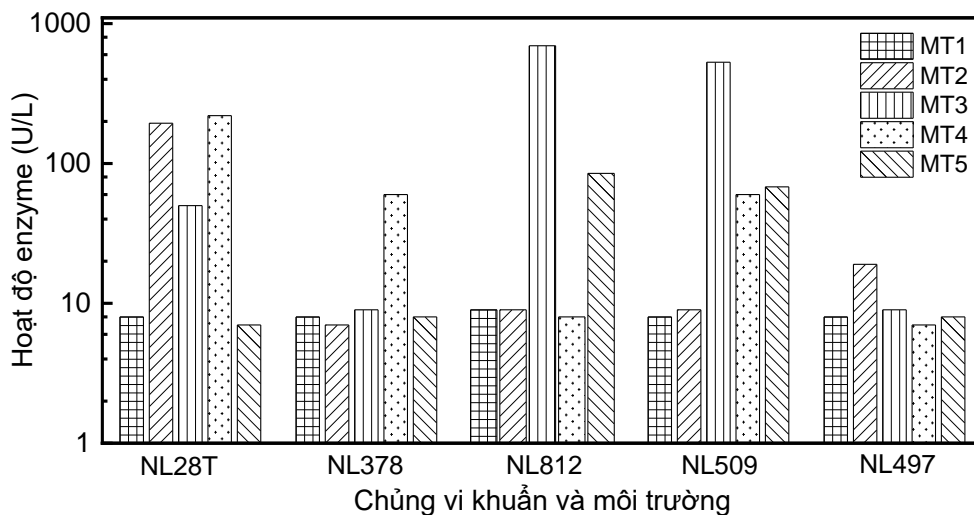
Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase để chuyển hóa ginsenoside từ tam thất

vùng kỵ nước của cellulose thành các phân tử đường mạch ngắn hơn (di, tri-, tetra-... saccharide) thì  $\beta$ -glucosidase sẽ cắt liên kết 1-6 glucoside của các phân tử đường đa này thành các phân tử đường đơn. Chính vì vậy, thông qua khảo sát đánh giá hoạt tính của enzyme cellulase trên Avi và CMC để tiến hành sàng lọc chủng vi khuẩn có khả năng sinh  $\beta$ -glucosidase.

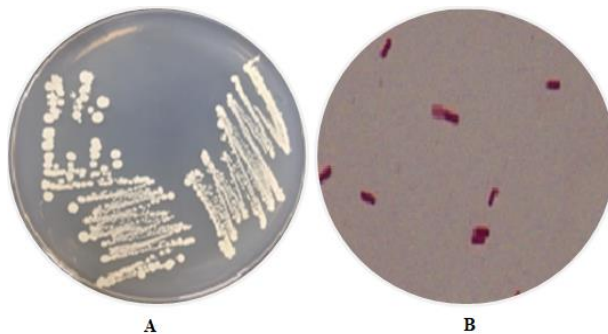
Kết quả thực nghiệm cho thấy vòng tròn phân hủy màu trắng trên đĩa petri có 5 chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase. Gồm các chủng NL28T, NL812, NL378, NL509 và NL497 (Bảng 2).

Trong các nghiên cứu trước đây, nhiều tác giả cũng đã thành công trong việc phân lập và tuyển chọn các chủng có hoạt tính sinh cellulase cao, trong đó bao gồm cả enzyme  $\beta$ -glucosidase. Theo nghiên cứu của Võ Văn Phước Quê & Cao

Ngọc Diệp (2011), khi phân lập vi khuẩn phân giải cellulose trong đất trồng lúa và dạ cỏ bò, nhóm tác giả đã phân lập được 4 dòng vi khuẩn có khả năng sinh enzyme cellulase ngoại bào gồm Q4, Q5, Q8 và Q9. Theo Behera & cs. (2014), khi phân lập các dòng vi khuẩn *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Xanthomonas* spp. và *Brucella* spp. có khả năng phân hủy cellulose ở vùng đất ngập mặn ở Ấn Độ thì thấy các vi khuẩn này có sinh enzyme thủy phân cellulose có hoạt tính rất cao. Ngoài ra, các nghiên cứu trước đây về khả năng sinh cellulase của vi khuẩn, *Bacillus* là một trong những chi có khả năng phân hủy cellulose cao nhất. Một số chủng được quan tâm nhiều nhất thuộc loài *Bacillus subtilis* (Park & cs., 2014), *Bacillus pumilus* (Padaria & cs., 2014), *Bacillus megaterium* (Shakoor, 2013) và chủng *Bacillus* sp. KMS-330 (Ozaki, 1991).



**Hình 3. Hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidase của các chủng vi khuẩn tuyển chọn nuôi cấy trong các môi trường khác nhau**



**Hình 4. Hình dạng khuẩn lạc (A) và hình thái tế bào (B) chủng NL812**

### 3.2. Ảnh hưởng môi trường nuôi cấy đến hoạt tính của enzyme $\beta$ -glucosidase

Hoạt tính enzyme  $\beta$ -glucosidase của 5 chủng vi khuẩn tuyển chọn được trình bày ở hình 3. Theo các nghiên cứu trước đây, việc chuyển hóa ginsenoside mạch dài thành loại nhỏ hơn, có hoạt tính dược lý tốt hơn phụ thuộc vào hoạt tính sinh  $\beta$ -glucosidase của các chủng vi sinh vật. Trong nghiên cứu này dựa vào sự phân hủy cơ chất PNP- $\beta$ -D-glucopyranoside để tuyển chọn chủng có khả năng thủy phân ginsenoside.

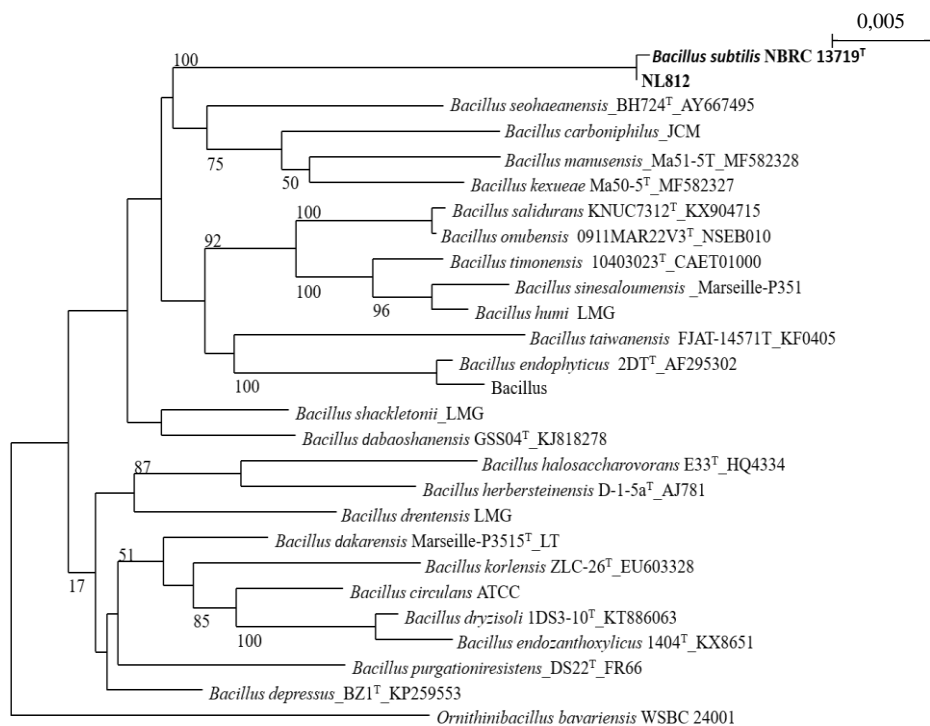
Kết quả cho thấy chủng NL28T có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase trên môi trường MT2, MT3 và MT4; chủng NL812 sinh enzyme trên môi trường MT3 và MT5; chủng NL509 trên môi trường MT3, MT4 và MT5; chủng NL378 có khả năng sinh  $\beta$ -glucosidase trên môi trường MT4 và chủng NL497 có khả năng sinh enzyme trên môi trường MT2 nhưng hoạt tính rất thấp. Hình 3 cho thấy rằng MT3 là môi trường tốt nhất để nuôi cấy chủng vi khuẩn NL812 sinh ra enzyme  $\beta$ -glucosidase có hoạt tính cao.

### 3.3. Định danh chủng vi khuẩn có hoạt tính enzyme $\beta$ -glucosidase cao

Hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng vi khuẩn NL812 được trình bày ở hình 4A và hình 4B.

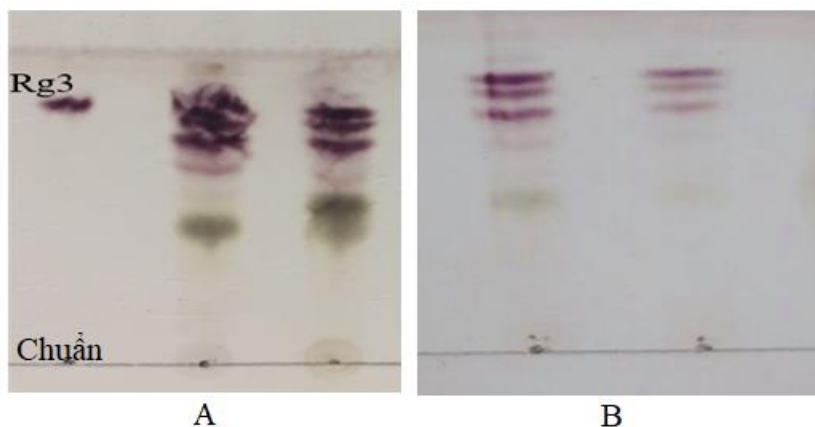
Kết quả quan sát cho thấy sau 48-96 giờ nuôi cấy trên môi trường thạch thường chủng vi khuẩn NL812 có khuẩn lạc tròn, hơi nhỏ, màu trắng ngà và kích thước 0,5-2,5 mm. Tế bào có hình que. Kết quả giải trình tự gen mã hóa cho rARN 16S của chủng NL812 được trình bày ở Hình 5. So sánh trình tự gen chủng vi khuẩn NL812 cho thấy rằng có sự tương đồng đến 99,37% với trình tự gen của loài *Bacillus subtilis*.

Xây dựng cây chủng loại phát sinh của chủng NL18 dựa vào trình tự gen 16S với các loài có mối quan hệ họ hàng gần trong chi *Bacillus*, chủng vi khuẩn NL812 nằm trên cùng một nhánh nhỏ với *Bacillus subtilis* NBRC 13719<sup>T</sup> với bootstrap 100% (Hình 5). Dựa trên các kết quả thu được, có thể kết luận rằng chủng vi khuẩn NL812 là loài *Bacillus subtilis*.

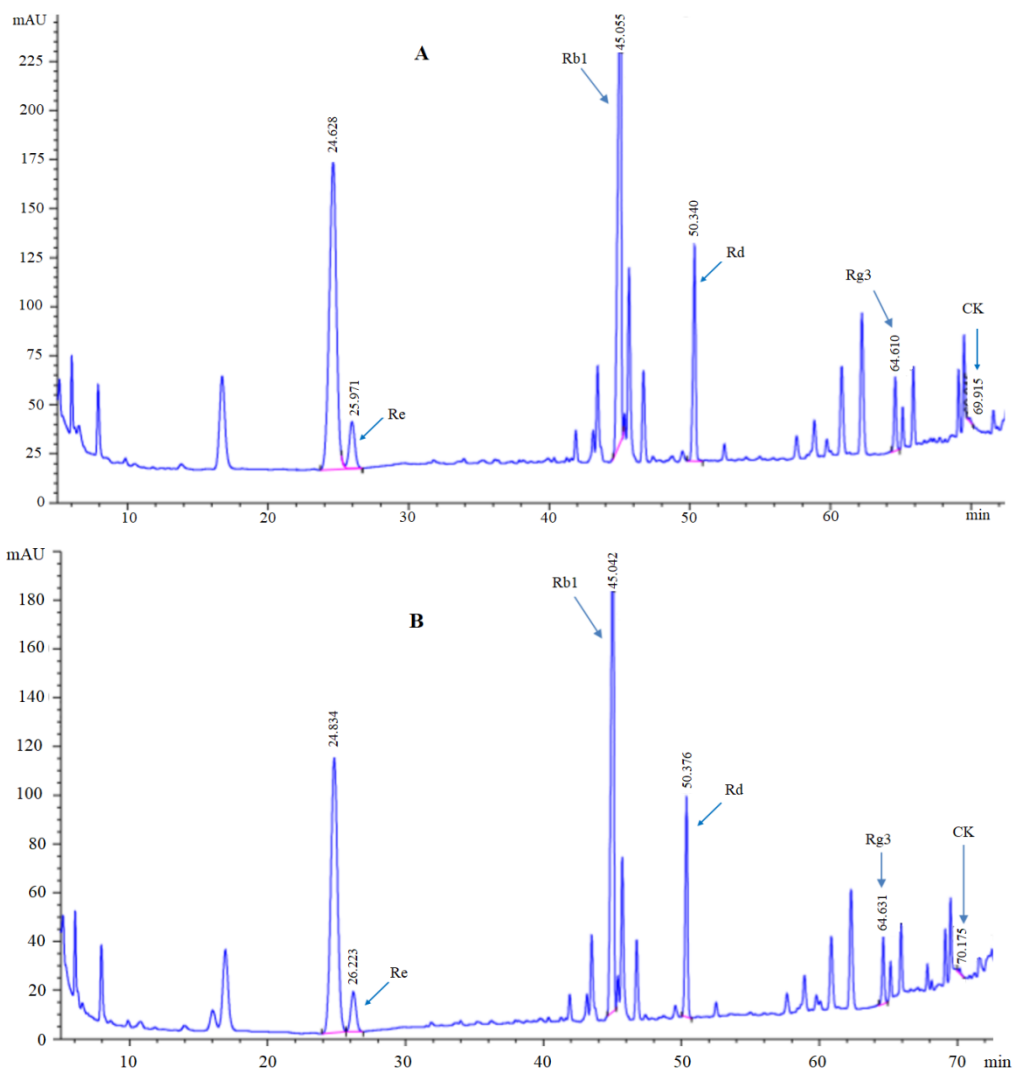


Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của chủng NL812 với các loài có mối quan hệ họ hàng gần, *Ornithinibacillus* làm nhóm ngoài

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase để chuyển hóa ginsenoside từ tam thất



Hình 6. Sắc ký đồ TLC của ginsenoside thô (A) và ginsenoside sau khi thủy phân bởi  $\beta$ -glucosidase từ chủng NL812 (B)



Hình 7. Sắc ký phổ HPLC của Re, Rb1, Rd, Rg3 và CK trước (A) và sau (B) khi thủy phân bằng enzyme  $\beta$ -glucosidase



**Bảng 3. Hàm lượng các hợp chất ginsenoside trước và sau chuyển hóa**

Hợp chất	Hàm lượng (mg/ml)	
	Trước khi thủy phân	Sau khi thủy phân
Rd	0,423	0,326
Rb1	2,041	1,571
Re	0,303	0,218
Rg3	0,330	0,496
CK	0,044	0,065

### 3.4. Sự chuyển hóa ginsenoside tam thất của enzyme $\beta$ -glucosidase

Ginsenoside tam thất có 5 chất thể hiện trên TLC (Hình 6A), các chất có trọng lượng phân tử cao nằm phía dưới và có hàm lượng tương đối lớn. Chất trên cùng có trọng lượng phân tử trùng với chất chuẩn Rg3. Tuy nhiên, sau khi bị thủy phân bởi enzyme  $\beta$ -glucosidase từ chủng *Bacillus subtilis* NL812 thì các chất có trọng lượng phân tử lớn nằm phía dưới đã gần như bị thủy phân hoàn toàn. Chất có trọng lượng phân tử lớn nhất không phát hiện được trên TLC. Rg3 được phát hiện tăng lên rõ rệt so với các chất còn lại (Hình 6B). Dựa trên kết quả thu được từ thí nghiệm này, chúng tôi tiếp tục tiến hành phân tích các hợp chất ginsenoside trong tam thất và trong dịch thủy phân bằng HPLC. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3 và hình 7.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, các hợp chất Rd, Rb1, Re tam thất giảm sau khi bị thủy phân bởi enzyme  $\beta$ -glucosidase. Hàm lượng Rg3 tăng 50,3%, từ 0,33 mg/ml trong tam thất lên 0,496 mg/ml sau khi thủy phân. Tương tự như vậy, hàm lượng CK cũng tăng 47,7%, từ 0,044 mg/ml trong tam thất lên 0,065 mg/ml sau khi thủy phân. Như vậy, rõ ràng enzyme  $\beta$ -glucosidase từ chủng *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng thủy phân ginsenoside tam thất thành các hợp chất quý Rg3 và CK

## 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NL812 có khả năng sinh enzyme  $\beta$ -glucosidase để chuyển hóa ginsenoside từ tam thất thành ginsenoside Rg3

và CK. Kết quả cho thấy, sau quá trình chuyển hóa bởi enzyme  $\beta$ -glucosidase thì hàm lượng hợp chất Rg3 và CK được tăng lên đáng kể. Trên cơ sở các số liệu thu được, đây có thể là hướng nghiên cứu tiềm năng để làm giàu thêm các chất có hoạt tính sinh học để hấp thu từ nhân sâm, trong đó có tam thất Việt Nam bằng phương pháp sinh học.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn tới Đề tài cấp Quốc gia mã số 11/HD-ĐT.11.19/CNSHCB đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Behera B.C., Parida S., Dutta S.K. & Thato H.N. (2014). Isolation and identification of cellulose degrading bacteria from mangrove soil of Mahanadi river delta and their cellulase production ability. *American Journal of Microbiology Research*. 2(1): 44-46.
- Ji Q., Gao Y., Zhao Y., He Z., Zang P., Zhu H., Yang H., Li X. & Zhang L. (2015). Determination of ginsenosides by *Bacillus polymyxa* conversions and evaluation on pharmacological activities of the conversion products. *Process Biochemistry*. 50(6): 1016-1022.
- Jin Y., Jin X.M. & YIN C.R. (2011). Biotransformation of major ginsenoside Re to minor ginsenoside Rh1 by *Sphingomonas* sp. 2-F2. *Journal of Agricultural Science Yanbian University*. 33(2): 104-107.
- Jitendra U., Min J.K., Young H.K., Sung R.K., Hee W.P. & Myung K.K. (2016). Enzymatic formation of Compound-K from ginsenoside Rb1 by enzyme preparation from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. *Journal of Ginseng Research*. 40: 105-112.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary

- Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.
- Lee T.H.V., Lee S.Y., Kim T.R., Kim J.Y., Kwon S.W., Nguyen N.K., Park J.H & Nguyen M.D. (2014). Processed Vietnamese ginseng: Preliminary results in chemistry and biological activity. *Journal of Ginseng Research*. 38(2): 154-159.
- Lý Kim Bằng, Lê Gia Hy, Tăng Thị Chính, Phan Tuyết Minh, Lê Thanh Xuân, Trần Quang Huy, Đào Ngọc Quang & Phạm Thị Cúc (1999). Sử dụng vi sinh vật có hoạt tính phân giải cellulose cao để nâng cao chất lượng phân hủy rác thải sinh hoạt và nông nghiệp. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. tr. 546-551.
- Lee I., Uh, K.K., Park J., Kim Y., Jung J., Jung H. & Jang H. (2016). Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg3 via NF- $\kappa$ B pathway in A549 cells and human asthmatic lung tissue. *Journal of Immunology Research*. pp. 1-11.
- Manabu S., Miho T., Katsuchi S., Michico T., Atsushi Y., Fusao T. (2002). Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 93(1): 88-90.
- Nei M. & Kumar S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nguyễn Lan Hương, Lê Văn Nhung & Hoàng Đình Hòa (1999). Phân lập và hoạt hóa vi sinh vật ưa nhiệt có hoạt tính xenlulaza cao để bổ sung lại vào khối ủ, rút ngắn chu kỳ xử lý rác thải sinh hoạt. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. tr. 531-536.
- Nguyễn Thị Thúy, Đào Thị Hồng Bích, Nguyễn Việt Anh, Vũ Đức Lợi, Bùi Thanh Tùng, Nguyễn Thanh Hải & Nguyễn Hữu Tùng (2016). Nghiên cứu thành phần và điều chế phytosome saponin toàn phần của củ tam thất (*Panax nitoginseng*) trồng ở Tây Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Y Dược*. 32(1): 18-24.
- Ozaki K. & Ito S. (1991). Purification and properties of an axit endo-1,4-beta-glucanase from *Bacillus* ssp. KSM-330. *Journal of Genetic Microbiology*. 137(1): 41-48.
- Padaria J.C., Sarkar K., Lone S.A. & Srivastava S. (2014). Molecular characterization of cellulose-degrading *Bacillus pumilus* from the soil of tea garden. *Indian Journal of Environmental Biology*. 35(3): 555-561.
- Park E.H., Kim Y.J., Yamabe N., Park S.H., Kim H., Jang H.J., Kim J.H., Cheon G.J., Ham J. & Kang K.S. (2014). Stereospecific anticancer effects of ginsenoside Rg<sub>3</sub> epimers isolated from heat-processed American ginseng on human gastric cancer cell. *Journal of Ginseng Research*. 38(1): 22-27.
- Shakoor S., Aftab S. & Rehman A. (2013). Characterization of cellulose degrading bacterium, *Bacillus megaterium* S3, isolated from indigenous environment. *Pakistan Journal of Zoology*. 45(6): 1655-1662.
- Sun M., Ye Y., Xiao L., Duan X., Zhang Y. & Zhang H. (2017). Anticancer effects of ginsenoside Rg3. *International Journal of Molecular Medicine*. 39(3): 507-518.
- Trần Anh Tuấn & Trương Ngọc Kiểm (2017). Đánh giá tiềm năng tài nguyên khí hậu khu vực Hoàng Liên Sơn (thuộc tỉnh Lào Cai) phục vụ quy hoạch phát triển cây Tam thất (*Panax pseudo-ginseng* Wall). *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 33(2S): 288-294.
- Trần Bảo Trâm, Nguyễn Ngọc Lan, Phạm Hương Sơn, Phạm Thế Hải, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Hiền, Nguyễn Thị Thanh Mai & Trương Thị Chiên (2017). Tình hình nghiên cứu phát hiện các loài vi khuẩn mới trong đất trồng nhân sâm (*Panax l.*) trên thế giới. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 15(3): 403-422.
- Võ Văn Phước Quê & Cao Ngọc Điệp (2011). Phân lập và nhận diện vi khuẩn phân giải cellulose. *Tạp chí Khoa học*. 18 (a): 177-184.
- Weisberg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. & Lane D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriol*. 173: 697-703.
- Xia L. & Cen P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*. 34: 909-912.
- Yu S., Zhou X., Li F., Xu C., Zheng F., Li J., Zhao H., Dai Y., Liu S. & Feng Y. (2017). Microbial transformation of ginsenoside Rb<sub>1</sub>, Re and Rg<sub>1</sub> and its contribution to the improved anti-inflammatory activity of gin-seng. *Scientific Reports*. 7(1): 138-141.

# ÁP DỤNG QUY HOẠCH TUYẾN TÍNH VÀO LẬP TIẾN TRÌNH VÀ ĐIỀU CHỈNH DỰ ÁN

Nguyễn Hải Thanh

*Khoa Quốc tế, Đại học Quốc gia Hà Nội*

*Tác giả liên hệ: nhthanh@vnu.edu.vn*

Ngày nhận bài: 07.07.2021

Ngày chấp nhận đăng: 16.09.2021

## TÓM TẮT

Kĩ thuật đánh giá và xem xét dự án và Phương pháp đường găng là các công cụ tính toán nền tảng trong lập tiến trình và điều chỉnh các hoạt động của dự án. Tuy nhiên, ở Việt Nam, về phương diện mô hình hóa và tính toán, các công cụ trên đây còn ít được tìm hiểu, trình bày một cách hệ thống, kể cả trong đào tạo, nghiên cứu và thực tế quản lí các dự án trong lĩnh vực sản xuất - kinh doanh nông nghiệp cũng như nhiều lĩnh vực khác. Cùng với việc trình bày một số kiến thức nền tảng về Kĩ thuật đánh giá và xem xét dự án và Phương pháp đường găng, bài báo này đề xuất một cách thức áp dụng quy hoạch tuyến tính vào việc lập tiến trình dự án, xác định các hoạt động găng và đường găng của dự án, cũng như vào việc điều chỉnh rút ngắn thời lượng thực hiện các hoạt động của dự án để đẩy nhanh tiến độ dự án với tổng chi phí điều chỉnh thấp nhất. Dựa trên phương pháp mô hình hóa và tính toán khoa học, các khung thuật toán mới có áp dụng quy hoạch tuyến tính được thiết lập nhằm tới mục tiêu là hỗ trợ một cách hiệu quả cho việc phân tích và quản lí dự án với Kĩ thuật đánh giá và xem xét dự án và Phương pháp đường găng.

Từ khóa: Kĩ thuật đánh giá và xem xét dự án, phương pháp đường găng, quy hoạch tuyến tính, lập tiến trình dự án, điều chỉnh dự án.

## Application of Linear Programming to Project Scheduling and Project Crashing

### ABSTRACT

Program evaluation and review technique and critical path method are powerful computing tools in project scheduling and project crashing. However, in Vietnam, modeling and computing aspects of program evaluation and review technique and critical path method have not yet been considered sufficiently and systematically in university education and applied research as well as in project management of agricultural production and business and many other fields. Besides reviewing fundamental knowledge of program evaluation and review technique and critical path method, this paper proposed the application of linear programming in project scheduling for determining project's critical activities and critical path as well as for crashing project's activities in order to shorten project completion time with a minimum total crashing cost. As a result, utilizing the modeling method and the scientific computing method, new linear-programming-based algorithm frames were constructed for efficiently supporting project analysis and management with program evaluation and review technique and critical path method.

Keywords: Program evaluation and review technique, critical path method, linear programming, project scheduling, project crashing.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kĩ thuật đánh giá và xem xét dự án (PERT) lần đầu tiên được phát triển bởi Hải quân Hoa Kỳ trong những năm 1950. Cụ thể hơn, vào năm 1957, Phòng các dự án đặc biệt của Hải quân Hoa Kỳ đã phát triển PERT để quản lí một dự án phát triển tàu ngầm hạt nhân. Phương pháp

đường găng (CPM) được phát triển lần đầu cũng vào những năm 50 của thế kỉ trước bởi tập đoàn Dupont của Hoa Kỳ, sau này được tích hợp với PERT và được coi là một thành phần không tách rời của PERT (Anderson & cs., 2010; Nguyễn Hải Thanh, 2019). Trên thế giới, cùng với việc phát triển các công cụ quản trị dữ liệu lớn và các công cụ tính toán hiện đại, đáp ứng