

PHÂN LẬP, SÀNG LỌC VI KHUẨN NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP β -GLUCOSIDASE TRONG CÂY SÂM NGỌC LINH

(*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Nguyễn Thị Tâm¹, Nguyễn Phú Tâm², Vũ Thị Hạnh Nguyễn², Nguyễn Khắc Hưng⁴,
Chu Nhật Huy³, Phạm Bích Ngọc⁴, Chu Hoàng Hà^{1,5}, Phí Quyết Tiến^{2,5*}

¹Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Phòng Công nghệ lên men, Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

³Phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường, Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

⁴Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

⁵Học Viện Khoa học và Công nghệ, VAST, Việt Nam

TÓM TẮT: Những năm gần đây, ứng dụng vi khuẩn trong chuyển hóa sinh học tạo các hoạt chất thứ cấp có giá trị đang được nghiên cứu nhiều ở các đối tượng cây dược liệu. Một trong những nguồn tiềm năng cho sàng lọc vi sinh vật có khả năng chuyển hóa là vi sinh vật nội sinh ở thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh định hướng chuyển hóa ginsenoside Rb1 trong cây sâm ngọc linh, *Panax vietnamensis*. Kết quả đã thu nhận được 45 chủng vi khuẩn nội sinh từ mẫu thân rễ (24 chủng), cuống lá (8 chủng) và lá (13 chủng) cây sâm ngọc linh. Trong đó, 27 chủng có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase, một enzyme có khả năng phân cắt các gốc glycoside liên kết với aglycone của ginsenoside Rb1. Qua đánh giá hoạt độ β -glucosidase và định danh sử dụng trình tự gen mã hóa 16S rRNA, chúng tôi đã lựa chọn được 4 chủng vi khuẩn ký hiệu SVK32 (*Enterobacter* sp.); SVK34 (*Serratia* sp.); SVK37 (*Ochrobactrum* sp.) và SVK44 (*Arthrobacter* sp.) có khả năng tổng hợp β -glucosidase có hoạt độ cao làm tiền đề cho việc nghiên cứu sự chuyển hóa ginsenoside từ Rb1 thành Rd và Rg3.

Từ khóa: Chuyển hóa sinh học, Ginsenoside Rb1, *Panax vietnamensis*, sâm ngọc linh, vi khuẩn nội sinh.

MỞ ĐẦU

Sâm ngọc linh, *P. vietnamensis* Ha & Grushv., là loại dược liệu quý hiếm, loài này chỉ phân bố ở vùng núi cao trong sơn hệ Ngọc Linh thuộc một số ít huyện của Kon Tum và Quảng Nam. Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*) cùng chi *Panax* với nhiều loài sâm quý trên thế giới như sâm *Panax ginseng* (Hàn Quốc), *Panax quinquefolius* (Mỹ). Tuy nhiên, phân tích các hợp chất hóa học rễ củ sâm ngọc linh chứa tới 50 saponin (sâm triều tiên có khoảng 25 sanopin) và cập nhật những kết quả nghiên cứu mới nhất cho thấy danh sách saponin của sâm ngọc linh lên tới 52 loại (Duc et al., 1993, 1994a; Le et al., 2015). Ngoài những saponin đặc trưng như VR-3, 4, 8, 9, MR1 và MR2 (Duc et al., 1994b), sâm ngọc linh còn chứa một số saponin có dược tính cao đã được phát hiện trong các loài sâm khác cùng chi *Panax* như ginsenoside Rb1, Rg1, Rc, Rd hay Rg3 (Lee et al., 2016; Li et al., 2016, 2017; Tian et al., 2017; Sun et al., 2017; Gao et al., 2017)

Các saponin này được cấu tạo từ các aglycon chính bao gồm protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) và khung dammaran. Tuy nhiên, các saponin trong cùng nhóm aglycone lại có những hoạt tính sinh học khác nhau. Sự khác biệt về hoạt tính được quyết định chủ yếu bởi phần glycoside kết hợp cùng với aglycon. Sự chuyển hóa các saponin nhằm tạo ra các hợp chất có hoạt tính cao có thể được xúc tác thông qua các phản ứng loại bỏ các gốc đường liên kết với aglycon (Yu et al., 2017). Một trong những phương pháp hiện đang được tập trung nghiên cứu là sử dụng các vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase, xúc tác cho phản ứng cắt các gốc đường theo liên kết β -glycoside. Hiện nay, khả năng chuyển hóa các saponin chính như Rb1 thành các hợp chất ginsenoside khác như Rd, Rg3, Rh2, Re hay Rg1 thông qua β -glucosidase đã được ghi nhận ở cả mức độ chất chuẩn và dịch chiết từ cây tự nhiên (Quan et al., 2012; Palaniyandi et al., 2016; Yu et al., 2017).

Bên cạnh một số vi sinh vật có hoạt tính β -glucosidase được phân lập từ đất (Yu et al., 2017) hay từ các sản phẩm sữa lên men (nhóm vi khuẩn *Lactobacillus* sp.) (Palaniyandi et al., 2016), các vi sinh vật nội sinh cũng là một nguồn cung cấp các chủng vi sinh vật tiềm năng cho quá trình chuyển hóa. Gần đây, vi sinh vật nội sinh đã và đang được quan tâm nghiên cứu nhiều do những tương tác hữu ích lên sự sinh trưởng của thực vật. Một số tác động có lợi của vi sinh vật nội sinh có thể liệt kê như: giúp tăng cường khả năng trao đổi chất, kích thích sinh trưởng, miễn dịch cho vật chủ bằng cách chuyển hóa hoặc tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất (Amaresan et al., 2012; Santoyo et al., 2016; Shahzad et al., 2017).

Tuy nhiên, hiện nay chưa có nghiên cứu nào trong nước khai thác nguồn vi sinh vật nội sinh trong cây sâm ngọc linh, đặc biệt là định hướng sàng lọc những chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp β -glucosidase. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích phân lập và bước đầu sàng lọc những chủng vi sinh vật có hoạt tính β -glucosidase định hướng chuyển hóa saponin có nguồn gốc từ cây sâm ngọc linh.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu được sử dụng trong nghiên cứu này là cây sâm ngọc linh, *P. vietnamensis*, có nguồn gốc tự nhiên, được thu thập tại thôn 2, xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam, Việt Nam vào tháng 4 năm 2016. Mẫu thực vật đã được định danh và phân loại bằng phương pháp hình thái học tại Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp khử trùng bề mặt

Mẫu cây sâm ngọc linh được rửa sạch dưới vòi nước để loại bỏ đất, tạp chất và làm khô mẫu tại nhiệt độ phòng trong 20 phút. Mẫu cây sâm ngọc linh được chia thành 3 phần: thân rễ, cuống lá và lá, và được khử trùng riêng rẽ trong điều kiện vô trùng. Mẫu thực vật được rửa với nước cất khử trùng 2 đến 3 lần, sau đó được khử trùng với NaClO 5% trong 5 phút. Rửa mẫu một lần $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2,0% (w/v) trong 1 phút để loại bỏ NaClO dư. Tiếp tục xử lý mẫu bằng ethanol 70% trong 10 phút, rửa lại bằng nước cất khử trùng để loại bỏ ethanol. Tiến hành thu dịch rửa mẫu lần cuối với nước cất khử trùng và cấy trải trên môi trường LB nhằm kiểm tra độ sạch của mẫu sau khi khử trùng (El-Deeb et al., 2013).

Phương pháp phân lập vi khuẩn nội sinh

Mẫu thực vật sau khi khử trùng bề mặt được thấm khô trên giấy thấm khử trùng và được nghiền thành bột mịn. Bột nghiền mẫu được cấy trải trên các môi trường MPA (g/L)-(3,0-Cao thịt; 5,0-Pepton; 5,0-NaCl); VK1 (g/L)-2,0- K_2HPO_4 ; 1,5-KCl; 1,5- NH_4Cl ; 0,3- MgSO_4 ; 0,17- CaSO_4 ; 1,0-Glutamic acid; 5,0-Cao nấm men; 5,0-Casamino acid; 5- Na_2CO_3); VK2 (g/L)-15,0-Casamino acid; 3,0-Trisodium citrate; 2,5-Glutamic acid; 2,5- MgSO_4 ; 2,0-KCl) và LB (g/L) 5,0-Cao nấm men; 10,0-Trypton; 10,0-NaCl) (Suman et al., 2016). Các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH về khoảng 6,9 đến 7,1, bổ sung 15,0 g/L thạch và khử trùng ở 121°C , 1 atm trong 15 phút.

Mẫu thực vật sau khi cấy trải trên môi trường dinh dưỡng được nuôi ở 37°C trong 72 giờ. Các khuẩn lạc riêng rẽ được cấy tạo dòng thuần trên môi trường LB và được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp sàng lọc chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase

Các chủng vi khuẩn được cấy chấm điểm trên môi trường MPA đặc có bổ sung 3 g/L Esculin; 0,2 g/L Ferric ammonium citrate và được nuôi ở 37°C trong 48 giờ (Veena et al., 2011). Các chủng vi sinh được xác định có hoạt tính β -glucosidase khi xuất hiện vòng phân giải esculin có màu đen đến nâu trên đĩa môi trường. β -glucosidase phân giải esculin tạo thành esculetin và kết hợp với ion sắt trong môi trường tạo màu đặc trưng (Edberg et al., 1985).

Phương pháp xác định hoạt độ β -glucosidase

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường lỏng MPA có bổ sung (CMC) 1% ở 37°C trên máy lắc tốc độ 200 vòng/phút trong 72 giờ, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút thu lấy dịch enzyme. Hoạt độ β -glucosidase được xác định theo (Grover & Cushley, 1977). Hoạt độ β -glucosidase được xác định theo công thức Hoạt độ (U/ml) = $(\text{OD}_{\text{mẫu thí nghiệm}} - \text{OD}_{\text{mẫu đối chứng}}) \cdot 0,0295 \cdot \text{df}$. Trong đó: df là hệ số pha loãng. Phản ứng được thực hiện ở 37°C , pH 5,0 trong thời gian 15 phút và xác định giá trị OD hấp thụ ở bước sóng 400 nm.

Phương pháp định danh vi khuẩn nội sinh dựa trên trình tự gen mã hóa tiểu phần 16S rRNA

Các chủng vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB lỏng trong 16 giờ. Sau đó, dịch nuôi

được ly tâm ở 7.000 vòng/phút trong 5 phút thu hồi sinh khối. DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp được mô tả bởi DOE Joint Genome Institute (William et al., 2012). DNA genome tách chiết được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại phân đoạn 1,5 kb gen mã hóa 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu GR1 (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và GF1 (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'). Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt (Tiền biến tính: 94°C/5p; Phản ứng: 94°C/30s; 55°C/30s, 72°C/1p, 30 chu kỳ; Hoàn thiện: 72°C/4p).

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel Agarose 0,8%, được tinh sạch sử dụng Kit PureLink™-DNA Purification (Invitrogen, Mỹ) và được giải trình tự trên máy đọc trình tự ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

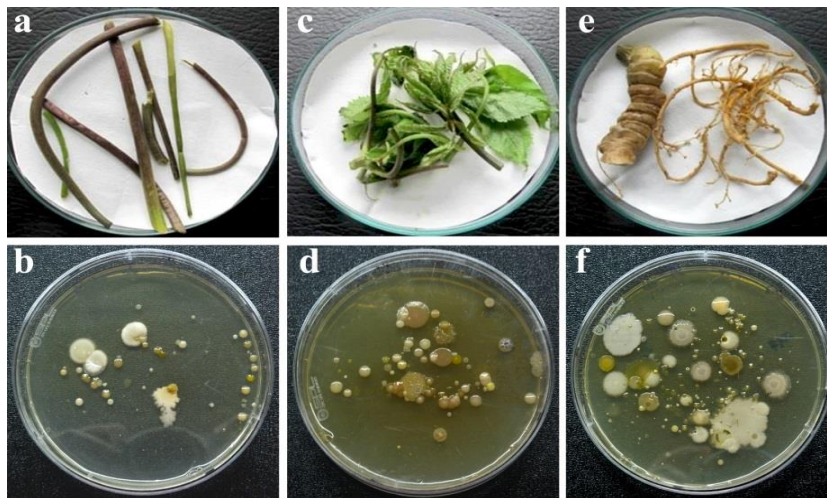
Kết quả giải trình tự gen hai chiều được

kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene Inc., Madison, WI, USA), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST. Cây phát sinh loài được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA6 bằng phương pháp Neighbor-joining tree và phân tích theo phương pháp bootstrap với $n = 1000$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn nội sinh ở cây sâm ngọc linh

Kết quả phân lập thu được 45 chủng vi khuẩn phát triển trên cả bốn loại môi trường (MPA, VK1, VK2 và LB) từ cả ba bộ phận thân củ, cuống lá và lá cây sâm. Các chủng vi khuẩn phát triển mạnh tạo các khuẩn lạc trên các môi trường phân lập sau 3 đến 5 ngày nuôi cấy (hình 1). Ngoài ra, số lượng vi khuẩn thu nhận được từ mỗi loại môi trường cũng có sự khác biệt (hình 2).



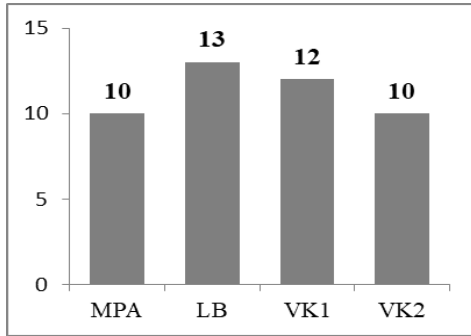
Hình 1. Sinh trưởng của vi khuẩn nội sinh phân lập từ lá, cuống lá và thân rễ cây sâm ngọc linh trên môi trường MPA

Kết quả phân lập cũng cho thấy số lượng vi khuẩn phân lập được từ thân rễ cao nhất với 24 chủng, chiếm 53%; từ lá với 13 chủng (chiếm 29%) và thấp nhất từ cuống lá, với 8 chủng (chiếm 18%) (hình 3). Kết quả của chúng tôi thu được cũng tương tự với những công bố trước đây khi phân lập vi sinh vật nội sinh từ các bộ phận khác nhau của thực vật. Gần đây, kết quả của Nawed & Ramesh (2015) cho thấy có sự khác biệt lớn về số lượng vi khuẩn phân

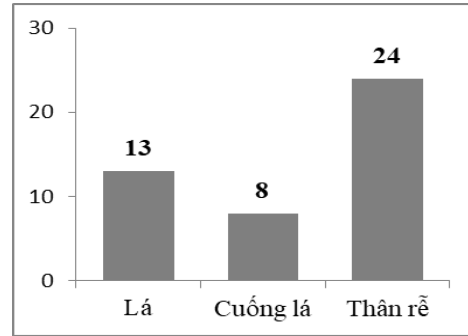
lập được từ rễ, thân và lá ở cây dứa cạn (*Catharanthus roseus*), hương nhu (*Ocimum sanctum*), húng bạc hà (*Mentha arvensis*) và cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*). Mặt khác kết quả này khác so với kết quả của El-Deeb et al. (2013) cho thấy số lượng vi khuẩn phân lập được từ lá và thân cao hơn nhiều lần so với mẫu phân lập từ rễ ($2,9 \times 10^4$ cfu/g ở mẫu lá, $2,4 \times 10^3$ cfu/g ở mẫu thân và $1,5 \times 10^2$ cfu/g ở rễ) (El-Deeb et al., 2013). Số lượng cũng như thành phần loài

vi sinh vật nội sinh phụ thuộc vào khả năng thích nghi của loài đó với điều kiện môi trường bên trong thực vật. Ngoài ra, mỗi cơ quan của thực vật đều đảm nhiệm chức năng chuyên biệt với các điều kiện sinh-lý-hóa khác nhau. Do đó, số lượng, thành phần vi sinh vật nội sinh

phân lập được ở các bộ phận khác nhau của cây thường có sự khác biệt rõ rệt. Các chủng vi khuẩn phân lập được thuần hóa, tạo lập bộ chủng và tiếp tục được sàng lọc nhằm xác định các chủng có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase.



Hình 2. Số lượng vi khuẩn phân lập tính theo loại môi trường dinh dưỡng



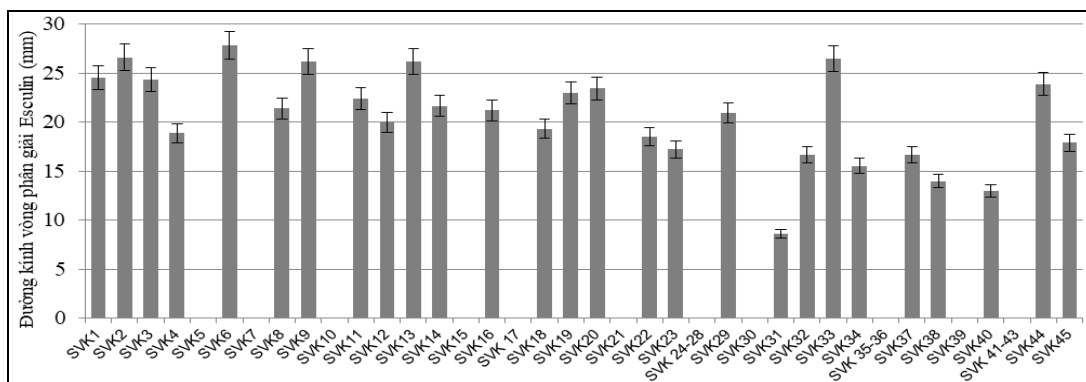
Hình 3. Số lượng vi khuẩn nội sinh phân bố theo bộ phận phân lập (thân rễ, cuống lá và lá *P. vietnamensis*)

Kết quả sàng lọc các chủng vi khuẩn nội sinh sinh tổng hợp β -glucosidase

Qua phương pháp thủy phân Esculin, chúng tôi bước đầu xác định được 27 chủng vi khuẩn có tiềm năng tổng hợp β -glucosidase, chiếm khoảng 60% tổng số chủng vi khuẩn phân lập được (hình 5). Các chủng đều tạo vòng phân giải có màu đen sau 48 giờ nuôi cấy ở 37°C. Tuy nhiên, kích thước vòng phân giải của mỗi chủng cũng có sự khác biệt (hình 4). Hiện tượng này có thể do khả năng tổng hợp enzyme của mỗi chủng vi khuẩn là khác nhau. Do đó, chúng tôi tiếp tục tiến hành xác định hoạt độ β -glucosidase của mỗi chủng được nuôi cấy ở cùng điều kiện và ở cùng hàm lượng protein tổng số.



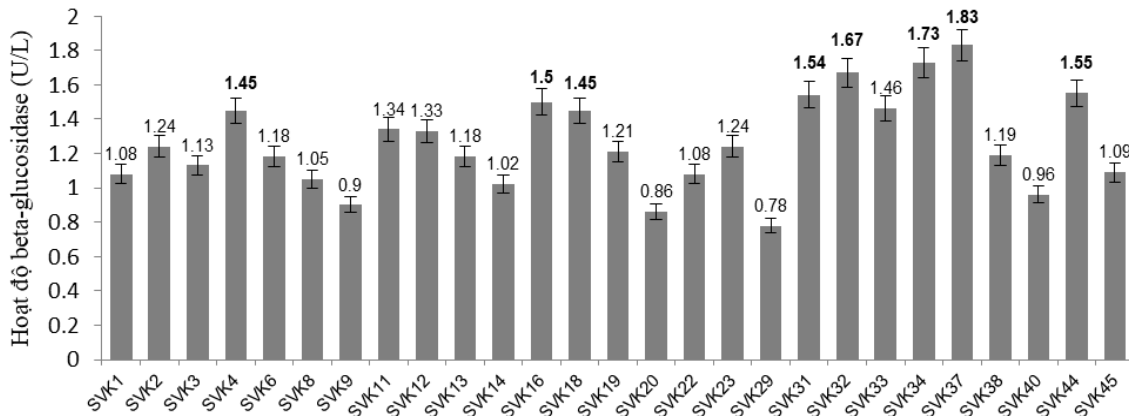
Hình 4. Kết quả sàng lọc khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase của một số chủng vi khuẩn nội sinh



Hình 5. Kết quả xác định vòng phân giải Esculin

Kết quả xác định hoạt độ enzyme cho thấy một số chủng vi khuẩn có hoạt độ β -glucosidase cao vượt trội so với các chủng còn lại như: chủng SVK4, SVK16, SVK18, SVK31, SVK32, SVK33, SVK34, SVK37 và SVK44 (hình 6).

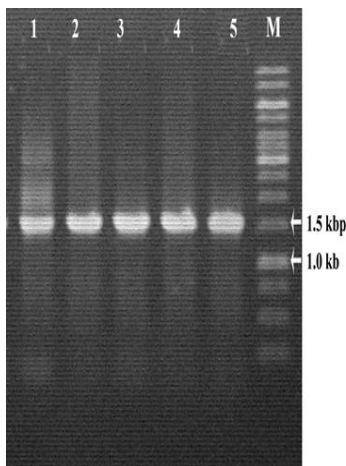
Đây là các chủng tiềm năng và có thể được ứng dụng trong chuyển hóa các hợp chất ginsenoside trong cây sâm ngọc linh. Các chủng vi khuẩn này tiếp tục được định danh sử dụng phương pháp giải trình tự đoạn DNA mã hóa 16S rRNA.



Hình 6. Kết quả xác định hoạt độ β -glucosidase sau 72 giờ nuôi cấy

Kết quả định danh các chủng vi khuẩn nội sinh dựa trên trình tự gen 16S rRNA.

Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi GF1/GR1 cho thấy một băng sáng duy nhất có kích thước khoảng 1,5 kb (hình 7). Như vậy, chúng tôi đã khuếch đại được đoạn gen mã hóa cho ribosom RNA cấu tạo tiểu phần 16S ở các chủng vi khuẩn. Sản phẩm PCR tiếp tục được thổi gel, tinh sạch và giải trình tự với hệ thống ABI PRISM®3100.



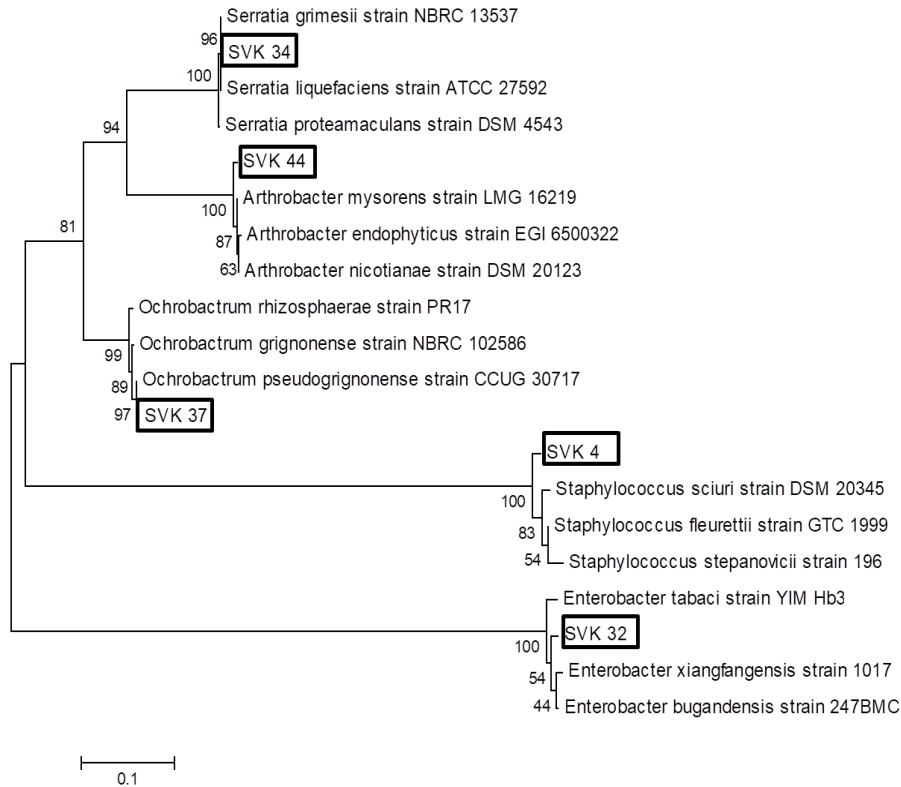
Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rRNA với cặp mồi GF1/GR1. 1-5: chủng vi khuẩn SVK4, SVK32, SVK34, SVK37 và SVK44; M: Marker 1kb Thermo Fisher Scientific

Kết quả so sánh trình tự các đoạn gen khuếch đại cho thấy chủng SVK4, SVK16 và SVK18 có độ tương đồng cao, hiện tượng tương tự cũng được ghi nhận giữa hai chủng SVK31 và SVK44. Nguyên nhân có thể do cùng một chủng vi khuẩn phát triển trên các môi trường khác nhau dẫn tới hình thái phát triển khác nhau. Ngoài ra, chủng vi khuẩn này cũng phân bố trên các bộ phận khác nhau dẫn tới việc nhận biết thông qua hình thái khó có thể loại trừ khả năng trùng lặp.

Kết quả phân tích BLAST cho thấy, các chủng phân lập được có độ tương đồng lên tới 99% với một số chủng tham chiếu có trong Genbank. Chủng SVK4 tương đồng với loài *Staphylococcus sciuri* (chủng DSM 20345); Chủng SVK32 tương đồng với loài *Enterobacter bugandensis* (chủng 247BMC); Chủng SVK34 tương đồng với loài *Serratia gremesii* (chủng NBRC 13537); Chủng SVK37 tương đồng với loài *Ochrobactrum pseudogrignonense* (chủng CCUG 30717); Chủng SVK44 tương đồng với loài *Arthrobacter nicotianae* (chủng DSM 20123).

Tuy nhiên, phân tích di truyền cho thấy các chủng thu nhận được có sai khác về khoảng cách di truyền so với chủng tham chiếu (hình 8). Nguyên nhân dẫn tới hiện tượng này có thể do mỗi chủng tham chiếu được phân lập từ nguồn

mẫu khác nhau do đó đã xuất hiện sự thay đổi về đặc tính di truyền. Do đó, chúng tôi bước đầu xác định các chủng SVK4, SVK32, SVK34, SVK37 và SVK44 thuộc năm chi *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Ochrobactrum* và *Arthrobacter* sp.



Hình 8. Cây phân loài của các chủng SVK4, SVK32, SVK34, SVK37 và SVK44 so với các chủng tham chiếu trên NCBI. 1 bar = 0,1 khoảng cách di truyền, Bootstrap với n = 1000

Kết quả phân tích của chúng tôi tương tự với các công bố trước đây về vi khuẩn nội sinh ở thực vật. *Staphylococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Ochrobactrum* và *Arthrobacter* là những chi đã từng được phát hiện nội sinh trong một số loài thực vật (El-Deeb et al., 2013; Ji et al., 2014; Rangjaroen et al., 2014; Nawed & Ramesh, 2015; Zhang et al., 2015).

Các nghiên cứu trước đây cũng đã ghi nhận sự xuất hiện của các loài thuộc các chi *Enterobacter*, *Serratia*, *Staphylococcus*, hoặc *Arthrobacter*, ở loài sâm *Panax ginseng* (Hàn Quốc). Vendan et al. (2010) đã phân lập được 51 chủng vi khuẩn nội sinh, trong đó có tới 20 chủng thuộc chi *Staphylococcus*, 21 chủng thuộc chi *Bacillus*. Một số vi khuẩn khác được ghi nhận là: *Micrococcus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., *Agrobacterium* spp. và *Paenibacillus* spp. (Vendan et al., 2010). Trước đó, Cho et al. (2007) cũng

đã phân lập được 63 chủng thuộc 13 chi vi khuẩn từ thân củ sâm *P. ginseng* 5 năm tuổi. Trong các chủng phân lập có 3 chủng thuộc chi *Arthrobacter*, 3 chủng thuộc chi *Serratia*. Tuy nhiên, *Bacillus* lại là chi chiếm ưu thế. Trong khi đó, kết quả phân lập của chúng tôi có sự sai khác đối với các công bố trước đây về vi khuẩn nội sinh ở cây sâm *P. ginseng*. Trong mẫu cây sâm ngọc linh, các chi *Enterobacter*, *Serratia*, và *Staphylococcus* (số liệu không thể hiện) lại là những chi phổ biến. Nguyên nhân dẫn tới sự sai khác này có thể do đặc điểm thổ nhưỡng và khu hệ vi sinh vật vùng đất tại nơi phát triển của mẫu sâm ngọc linh và mẫu sâm *P. ginseng* (Cho et al., 2007). Tuy nhiên, phần lớn các loài thuộc chi *Staphylococcus* đã được ghi nhận gây bệnh trên người và động vật (Hauschild et al., 2010; Beims et al., 2017). Do đó, chúng tôi chỉ lựa chọn 4 chủng vi khuẩn SVK32, SVK34, SVK37 và SVK44 cho các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT LUẬN

Có 45 chủng vi khuẩn nội sinh đã được phân lập từ các bộ phận thân rễ, lá và cuống lá cây sâm *P. vietnamensis* thu ở Quảng Nam, trong đó, đã sàng lọc được 27 chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp β -glucosidase. Qua phương pháp xác định hoạt độ enzyme, chúng tôi chọn lựa được 4 chủng vi khuẩn SVK32, SVK34, SVK37 và SVK44 thuộc về các chi *Enterobacter.*, *Serratia.*, *Ochrobactrum.* và *Arthrobacter* làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyển hóa ginsenoside Rb1 thành Rd và Rg3 tiếp theo.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn đề tài độc lập trẻ cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam: “Sàng lọc vi khuẩn nội sinh có khả năng tăng cường chuyển hóa Ginsenoside trong rễ tơ sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis*)”- mã số: VAST.ĐLT-04/16-17 đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amareesan N., Jayakumar V., Kumar K., Thajuddin N., 2012. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. *Annals of Microbiology*, 62: 805–810.
- Beims H., Overmann A., Fulde M., Steinert M., Bergmann S., 2017. Isolation of *Staphylococcus sciuri* from horse skin infection. *Open Veterinary Journal*, 6: 242.
- Cho K., Hong S., Lee S., Kim Y., Kahng G., Lim Y., Kim H., Yun H., 2007. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 54: 341–351.
- Duc N., Kasai R., Ohtani K., Ito A., Nham N., Yamasaki K., Tanaka O., 1994a. Saponins from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* HA et. GRUSHV. Collected in Central Vietnam. III. Chemical & pharmaceutical bulletin, 42: 634–640.
- Duc M., Kasai R., Ohtani K., Ito A., Nham N., Yamasaki K., Tanaka O., 1994b. Saponins from Vietnamese Ginseng, *Panax vietnamensis* HA et. Grushv. Collected in central Vietnam. II. Chemical & pharmaceutical bulletin, 42: 115–22.
- Duc N., Nham N., Kasai R., Ito A., Yamasaki K., Tanaka O., 1993. Saponins from Vietnamese ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et. Grushv. Collected in central Vietnam. I. Chemical & pharmaceutical bulletin, 41: 2010–2014.
- Edberg S., Trepeta R., Kontnick C., Torres A., 1985. Measurement of active constitutive beta-D-glucosidase (esculinase) in the presence of sodium desoxycholate. *J Clin Microbiol*, 21: 363–365.
- El-Deeb B., Fayez K., Gherbawy Y., 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal of Plant Interactions*, 8: 56–64.
- Gao Y., Chu S., Zhang Z., Chen N., 2017. Hepataprotective effects of ginsenoside Rg1 - A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 206: 178–183.
- Gao Y., Liu Q., Zang P., Li X., Ji Q., He Z., Zhao Y., Yang H., Zhao X., Zhang L., 2015. An endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer enhances growth, reduces morbidity, and stimulates ginsenoside biosynthesis. *Phytochemistry Letters*, 11: 132–138.
- Grover A., Cushley R., 1977. Studies on almond emulsin β -d-glucosidase II. Kinetic evidence for independent glucosidase and galactosidase sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 482: 109–124.
- Hauschild T., Stepanović S., Zakrzewska-Czerwińska J., 2010. *Staphylococcus stepanovicii* sp. nov., a novel novobiocin-resistant oxidase-positive staphylococcal species isolated from wild small mammals. *Systematic and Applied Microbiology*, 33: 183–187.
- Ji S., Gururani M., Chun S., 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*, 169: 83–98.
- Le T., Lee G., Vu H., Kwon S., Nguyen N., Park J., Nguyen M., 2015. Ginseng Saponins

- in Different Parts of *Panax vietnamensis*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 63: 950–954.
- Lee I., Uh I., Kim K., Kim K., Park J., Kim Y., Jung J., Jung H., Jang H., 2016. Anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg3 via NF- κ B pathway in A549 cells and human asthmatic lung tissue. Journal of Immunology Research 2016, 1–11.
- Li J., Cai D., Yao X., Zhang Y., Chen L., Jing P., Wang L., Wang Y., 2016. Protective Effect of Ginsenoside Rg1 on Hematopoietic Stem/Progenitor Cells through Attenuating Oxidative Stress and the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in a Mouse Model of d-Galactose-induced Aging. International Journal of Molecular Sciences, 17: 849.
- Li Y., Guan Y., Wang Y., Yu C., Zhai F., Guan L., 2017. Neuroprotective effect of the ginsenoside Rg1 on cerebral ischemic injury *In vivo* and *In vitro* is mediated by PPAR γ - regulated antioxidative and anti-inflammatory pathways. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017, 1–9.
- Nawed A., Ramesh C., 2015. Endophytic bacteria: Optimaization of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. Asia journal of Pharmaceutical and Clinical research, 8: 233–238.
- Palaniyandi S., Son B., Damodharan K., Suh J., Yang S., 2016. Fermentative transformation of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng* C. A. Meyer to Rg3 and Rh2 by *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerans MJM60396. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 21: 587–594.
- Quan L., Min J., Sathiyamoorthy S., Yang D., Kim Y., Yang D., 2012. Biotransformation of ginsenosides Re and Rg1 into ginsenosides Rg2 and Rh1 by recombinant β -glucosidase. Biotechnology Letters, 34: 913–917.
- Rangjaroen C., Rerkasem B., Teaumroong N., Sungthong R., Lumyong S., 2014. Comparative study of endophytic and endophytic diazotrophic bacterial communities across rice landraces grown in the highlands of northern Thailand. Archives of Microbiology, 196: 35–49.
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda M., Glick B., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiological Research, 183: 92–99.
- Shahzad R., Khan A., Bilal S., Asaf S., Lee I., 2017. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici in tomato. Peer J 5, e3107.
- Suman A., Yadav A., Verma P., 2016. Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity, 1: 117–143.
- Sun M., Ye Y., Xiao L., Duan X., Zhang Y., Zhang H., 2017. Anticancer effects of ginsenoside Rg3 (Review). International Journal of Molecular Medicine, 39: 507–518.
- Tian W., Chen L., Zhang L., Wang B., Li X., Fan K., Ai C., Xia X., Li S., Li Y., 2017. Effects of ginsenoside Rg1 on glucose metabolism and liver injury in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. Genetics and Molecular Research 16(1). Doi: 10.4238/gmr16019463.
- Veena V., Poornima P., Parvatham R., Sivapriyadharsini K., Kalaiselvi K., 2011. Isolation and characterization of β -glucosidase producing bacteria from different sources. African Journal of Biotechnology, 10(66): 14907–14912.
- Vendan R., Yu Y., Lee S., Rhee Y., 2010. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. The Journal of Microbiology, 48: 559–565.
- William S., Helene F., Copelan A., 2012. Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, CA. <http://www.jgi.doe.gov>.
- 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 Rb1, Re and Rg1 and its contribution to the improved anti-inflammatory activity of ginseng. Scientific Reports, 7(1): 138. Doi: 10.1038/s41598-017-00262-0.
- Zhang Y., Wang H., Duan Y., Hozzein W.,

Li W., Li L., Liu W., Zhou X., 2015. *Arthrobacter endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of

Salsola affinis C. A. Mey. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65: 2154–2160.

**ISOLATION AND SCREENING OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM
NGOC LINH GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)
FOR BIOSYNTHESIS β -GLUCOSIDASE**

**Nguyen Thi Tam¹, Nguyen Phu Tam², Vu Thi Hanh Nguyen², Nguyen Khac Hung⁴,
Chu Nhat Huy³, Pham Bich Ngoc⁴, Chu Hoang Ha^{2,5}, Phi Quyet Tien^{2,5*}**

¹National Key Laboratory of Gene Technology, IBT, VAST

²Department of Fermentation Technology, IBT, VAST

³Department of Environmental Bioremediation Lab, IBT, VAST

⁴Department of Plant Cell Biotechnology, IBT, VAST

⁵Graduate University of Science and Technology, VAST

SUMMARY

Biotransformation of secondary metabolites from medicinal plants by bacteria has been studied extensively in the recent years. One of the potential sources for screening bacteria is plant endophytic bacteria. In this study, we isolated and screened endophytic bacteria for transformation of ginsenoside Rb1 of Ngoc Linh ginseng collected at village number 2, Tra Linh commune, Nam Tra My district, Quang Nam province. There are 45 strains isolated from rhizobium (24 strains), petioles (8 strains) and leaves (13 strains). After screening, there are 27 strains positive with β -glucosidase test, an enzyme which catalyses the hydrolysis of terminal non-reducing residues in β -glucosides-aglycone linkage of ginsenoside Rb. By evaluating the β -glucosidase activity and identification via 16S rRNA sequence, we choosed four high β -glucosidase acitivity strains SVK32 (*Enterobacter* sp.); SVK34 (*Serratia* sp.); SVK37 (*Ochrobactrum* sp.) and SVK44 (*Arthrobacter* sp.) for futher study on biotransforming of ginsenoside Rb1 into ginsenoside Rd and Rg3.

Keywords: Biotransformation, Endophytic bacteria, Ginsenoside Rb1, Ngoc Linh ginseng, *Panax vietnamensis*.

Citation: Nguyen Thi Tam, Nguyen Phu Tam, Vu Thi Hanh Nguyen, Nguyen Khac Hung, Chu Nhat Huy, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, Phi Quyet Tien, 2018. Isolation and screening of endophytic bacteria from ngoc linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) for biosynthesis β -glucosidase. Tap chi Sinh hoc, 40(2): 153–161. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.10862>.

*Corresponding author email: tienpq@ibt.ac.vn

Received 7 November 2017, accepted 9 October 2018