

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP.HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN VÀ THỐNG KÊ KH&CN



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

XU HƯỚNG ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP – SAPONIN TỪ NHÂN SÂM



Biên soạn: Trung tâm Thông tin và Thống kê Khoa học và Công nghệ

Với sự cộng tác của:

- **TS. Hà Thị Loan**

Phó Giám đốc Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

- **Ths. Vũ Huỳnh Kim Long**

Đại học Y dược TP. Hồ Chí Minh

TP.Hồ Chí Minh, 05/2017

MỤC LỤC

I. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP.....	1
1.1. Tình hình sử dụng các hợp chất thứ cấp	1
1.2. Phương pháp sản xuất các hợp chất thứ cấp.....	2
1.3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất hợp chất thứ cấp- hoạt chất Saponin từ nhân sâm.....	5
II. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG NHÂN SÂM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ	6
2.1. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo thời gian.....	6
2.2. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại các quốc gia	9
2.3. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo các hướng nghiên cứu	12
III. NGHIÊN CỨU TẠO RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH VÀ NHÂN SÂM SINH KHỐI THU NHẬN HỢP CHẤT THỨ CẤP SAPONIN.....	14
3.1. Nghiên cứu tạo các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh	14
3.2. Thành phần hoạt chất saponin trong rễ tóc sâm Ngọc Linh	16
3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố lên sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh	17
3.4. Các phương pháp chiết xuất, phân tích và đánh giá chất lượng sâm Ngọc Linh	19

XU HƯỚNG ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP-SAPONIN TỪ NHÂN SÂM

I. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG SẢN XUẤT CÁC HỢP CHẤT THỨ CẤP

1.1. Tình hình sử dụng các hợp chất thứ cấp

Cây trồng là nguồn quan trọng để sản xuất thuốc hàng ngàn năm qua. Theo thống kê của tổ chức y tế thế giới 80% dân số thế giới dựa vào y học cổ truyền để chăm sóc sức khỏe trong đó chủ yếu thuốc từ cây cỏ. Ngoài ra, cây trồng là nguồn nguyên liệu để sản xuất nhiều loại thuốc hiện đại như sản xuất analgesic, aspirin, có nguồn gốc từ loài *Salix* và *Spiraea*; thuốc chống ung thư như paclitaxel và vinblastine.

Trong 30 năm qua có hơn 25% các loại thuốc được đăng ký mới dựa trên phân tử có nguồn gốc thực vật (hợp chất thứ cấp) và khoảng 50% thuốc bán chạy hàng đầu có nguồn gốc từ các hợp chất thứ cấp đã được biết trước (Gómez-Galera và cộng sự, 2007).

Cây trồng sẽ tiếp tục cung cấp các sản phẩm mới cũng như các hợp chất để sản xuất các loại thuốc mới trong những thế kỷ tiếp theo, bởi vì các hợp chất hóa học của đa số các loài thực vật vẫn chưa được xác định. Công nghệ hóa học tổng hợp ngày một phát triển vẫn phụ thuộc vào nguồn sinh học đối với một số chất chuyển hóa thứ cấp bao gồm dược phẩm do các đặc tính cấu trúc phức tạp của chúng rất khó tổng hợp (Rao and Ravishankar, 2002).

Ở nước ta, người dân có truyền thống sử dụng dược liệu, có một nền y học dân tộc, dân gian phong phú, đồng thời chịu ảnh hưởng của nền y học cổ truyền Trung Quốc nên sử dụng dược liệu thiên nhiên rất lớn. Hằng năm cần khoảng 60.000 tấn dược liệu cho ngành dược, nhưng trong nước có khả năng đáp ứng 20-25%. Trong những năm qua thị trường thảo dược tăng mạnh. Nạn khai thác quá mức làm nguồn dược liệu ngoài tự nhiên ngày càng cạn kiệt. Thủ tướng chính phủ đã ký quyết định 1976, quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến 2030, Việt

nam có 8 vùng trồng nguyên liệu trên cả nước. Dự kiến đến năm 2020 khả năng đáp ứng nhu cầu dược liệu trong nước 60% và năm 2030 đáp ứng 80%

1.2. Phương pháp sản xuất các hợp chất thứ cấp

a. Chiết xuất từ cây trồng

Các hợp chất thứ cấp quan trọng trong ngành dược hiện nay thu được bằng cách chiết xuất từ cây ngoài tự nhiên. Tuy nhiên, phương pháp này nó có thể dẫn đến sự tuyệt chủng của một số loài thực vật nguy cấp như *Taxus brevifolia* hoặc *Podophyllum hexandrum*, và gây ảnh hưởng sinh thái nghiêm trọng. Trồng cánh đồng mẫu lớn để cung cấp nguồn vật liệu có giá trị gặp nhiều khó khăn là lợi nhuận thấp do cây tăng trưởng chậm, yếu tố khí hậu không thích hợp canh tác ở nhiều nơi khác nhau, sâu hại, dịch bệnh cây trồng, tình trạng thiếu lao động trong canh tác và thu hái... Trong những năm gần đây xu hướng nhân sinh khối trong phòng thí nghiệm với quy mô lớn là một giải pháp thay thế dần các phương pháp truyền thống.

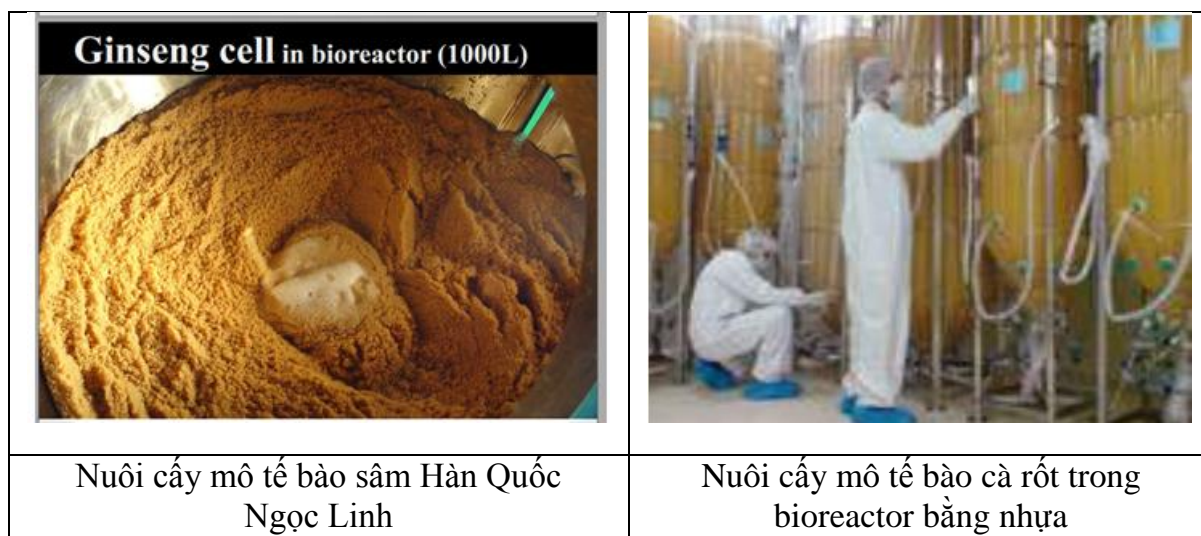
Bảng 1: Các hợp chất quan trọng trong ngành dược có nguồn gốc từ cây trồng

Sản phẩm	Công dụng	Loại cây trồng
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Cathartus roseus</i>
Artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>
Berberine	Intestinal	<i>Coptis japonica</i>
Camptothecin	Antitumour	<i>Camptotheca</i>
Capsaicin	Counterirritant	<i>Capsicum frutescens</i>
Castanospermine	Glycoside	<i>Catanospermum</i>
Codeine	Sedative	<i>Papaver</i>
Colchicine	Antitumour	<i>Colchium autumnale</i>
Digoxin	Heart stimulant	<i>Digitalis lanata</i>
Diosgenin	Steroidal	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Ellipticine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>
Forskolin	Bronchial	<i>Coleus forskolii</i>
Ginsenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>
Morphine	Sedative	<i>Papaver somniferum</i>

Podophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum</i>
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchona ledgeriana</i>
Sanguinarine	Antiplateque	<i>Sanguinaria</i>
Shikonon	Antibacterial	<i>Lithospermum</i>
Taxol	Anticancer	<i>Taxus brevifolia</i>
Vincristine	Antileukemic	<i>Catharentus roseus</i>
Vinblastine	Antileukemic	<i>Catharentus roseus</i>

b. Nuôi cấy tế bào

Sản xuất các hoạt chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào đã được thực hiện trên nhiều loài cây dược liệu khác nhau: sản xuất solasodine từ callus của *Solanum eleagnifolium*; cephaelin và emetine từ callus *Cephaelis ipecacua*; quinoline alkaloids từ nuôi cấy dịch treo tế bào *Cinchona ledgeriana*... Ở nhật đã sản xuất và thương mại hóa shikonin, berberine và saponins từ nuôi cấy tế bào.



Hình 1: Ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào

Tuy nhiên, phương pháp nuôi cấy tế bào còn tồn tại là các dòng tế bào không ổn định, tích lũy hoạt chất thấp, tăng trưởng chậm và gặp khó khăn khi sản xuất quy mô lớn. Do vậy hướng nuôi cấy rễ tóe để sản xuất các hoạt chất thứ cấp cho hệ số nhân sinh khối lớn, ổn định và chứa hàm lượng hoạt chất cao, một số trường hợp cao hơn cây ngoài tự nhiên.

c. Nuôi cấy rễ tóc

Vi khuẩn *A. rhizogenes* (chứa plasmide pRi – root inducing) là tác nhân gây bệnh tạo rễ tóc (hairy root) cho thực vật. Nó cảm ứng kích thích tạo rễ khi xâm nhiễm vào tế bào thực vật tại điểm bị thương. Những rễ tóc có thể sinh trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy in-vitro mà không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Rễ sản xuất hoạt chất thứ cấp ở mức độ tương đồng hoặc vượt xa so với khả năng của rễ cây mẹ hay rễ nuôi cấy rễ bất định in-vitro không chuyên gen.

Theo Kuzovkina and Schneider (2006), đã có 185 loại cây trồng thuộc 41 họ đã được nghiên cứu nuôi cấy rễ tóc.

Bảng 2: Nghiên cứu nuôi cấy rễ tóc ở một số loại cây trồng

Plant species	Product	References
<i>Bidens</i> spp.	Polyacetylenes	McKinely <i>et al.</i> (1993)
<i>Cinchona ledgeriana</i>	Quinolone alkaloids	Hamill <i>et al.</i> (1987)
<i>Cichorium intybus</i>	Esculetin	Bais <i>et al.</i> (1999)
<i>Datura</i> ssp.	Tropane	Rhodes (1989)
<i>Cassia</i> ssp.	Anthroquinones	Ko <i>et al.</i> (1988)
<i>Duboisia leichhardtii</i>	Tropane alkaloids	Mano <i>et al.</i> (1988)
<i>Echinacea purpurea</i>	Alkaloids	Trypsteen <i>et al.</i> (1991)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	Glycyrrhizin	Ko <i>et al.</i> (1989)
<i>Hyoscyamus albus</i>	Alkaloids	Shimomura <i>et al.</i> (1991)
<i>Panax ginseng</i>	Saponin	Yoshikawa and Furuya
<i>Salvia miltorrhiza</i>	Diterpenes	Hu and Alfermann (1993)
<i>Artemisia absinthium</i>	Volatins	Kennedy <i>et al.</i> (1993)
<i>Lithospermum</i>	Shikonin	Shimomura <i>et al.</i> (1986)
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Ajmaline, serpentine	Benjamin <i>et al.</i> (1994)
<i>Rubia cordifolia</i>	Anthroquinones	Shin and Kim (1996)
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Isoprenylated	Asada <i>et al.</i> (1998)
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenoside	Kunshi <i>et al.</i> (1998)
<i>Hyoscyamus muticus</i>	Hyoscyamine	Sevon <i>et al.</i> (1998)



Hình 2: Nuôi cấy rễ tía sâm Ngọc Linh tại trung tâm CNSH TP. HCM

1.3. Ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất hợp chất thứ cấp- hoạt chất Saponin từ nhân sâm

Qua các bài báo, công trình nghiên cứu cho thấy tình hình ứng dụng công nghệ sinh học trong sản xuất hợp chất thứ cấp- hoạt chất Saponin từ nhân sâm như sau:

Theo Yoshikawa và Furuya (1987) đã nuôi cấy rễ tía sâm Triều Tiên thì rễ tía tổng hợp saponin, ginsenoside tương tự như rễ ngoài tự nhiên và cao gấp 2,4 lần, trong trường hợp so với rễ bình thường không chuyển gen cao gấp 2 lần dựa trên khối lượng khô. Bên cạnh đó, Yu và cộng sự (2000) đã nghiên cứu tăng khả năng sản xuất ginsenoside bởi Jasmonic acid và một vài tiền chất trong rễ tía. Kết quả Jasmonic acid nồng độ 1.0 ± 5.0 mg/ l cải thiện mạnh ginsenoside tổng số. Theo nghiên cứu của Mallol và cộng sự (2001) chỉ ra rằng ảnh hưởng của gen rol gây ra các kiểu hình thái của rễ tía nhân sâm khác nhau và hàm lượng các hoạt chất ginsenoside biến đổi tùy theo kiểu hình. Kết quả nghiên cứu của Sivakumar và cộng sự (2005) đã nuôi cấy rễ tía sâm Triều tiên trong hệ thống bioreactor đã báo cáo thành phần khoáng chất đóng vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng sinh khối, trong khi đó các elicitor làm giảm sinh khối nhưng làm tăng hàm lượng ginsenoside. Jung và cộng sự (2006) đã tạo được 193 dòng rễ sâm *P. ginseng*. Các dòng rễ này được chia thành 5 nhóm tùy thuộc vào kiểu hình của chúng. Trong kết quả nghiên cứu, Zhou và cộng sự (2007) đã báo cáo rằng oligosaccharides, a heptasaccharide (HS) và an octasaccharide (OS), từ *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* kích thích sự sinh trưởng của rễ tía sâm Triều Tiên và

tích lũy saponin. Trong báo cáo của Mathur và cộng sự (2010) đã nghiên cứu rễ tóe sâm Mỹ *P. Quinquefolium*: rễ tóe có tốc độ sinh trưởng mạnh tăng 4–10 lần trong khoảng thời gian nuôi cấy từ 3–8 tuần và đã cải thiện được khả năng tổng hợp ginsenoside (saponin). Rễ tóe có thể sản xuất hoạt chất saponin tốt nhất từ tuần thứ 6 đến tuần thứ 8 sau khi nuôi cấy.

II. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG NHÂN SÂM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

Lịch sử sử dụng nhân sâm bắt đầu từ 4500 năm trước tại Trung Quốc, sau đó sâm được biết đến bởi các nước phương Tây cho đến khi phát hiện ra nhân sâm Mỹ vào năm 1716 tại Ottawa, Canada. Năm 1843, nhà thực vật học người Nga Carl A. Meyer đặt tên cho nhân sâm Châu Á tên thực vật “Panax” có nghĩa trong tiếng Hy Lạp là chữa bệnh toàn diện và được phân loại theo gia đình Panax gồm *Panax quinquefolius* (nhân sâm Mỹ), *Panax notoginseng* (nhân sâm Trung Quốc), *Panax japonicus* (nhân sâm Nhật Bản), *Panax vietnamensis* (nhân sâm Việt Nam), sâm Hàn Quốc, Siberian ginseng (nhân sâm Siberi). Nhân sâm được xem là thảo dược chăm sóc sức khỏe và điều trị bệnh tại Châu Á và ngày nay đã lan rộng đến nhiều quốc gia trên thế giới.

Tại Việt Nam, nhiều đề tài về nhân sâm cũng được nghiên cứu trong thời gian gần đây như:

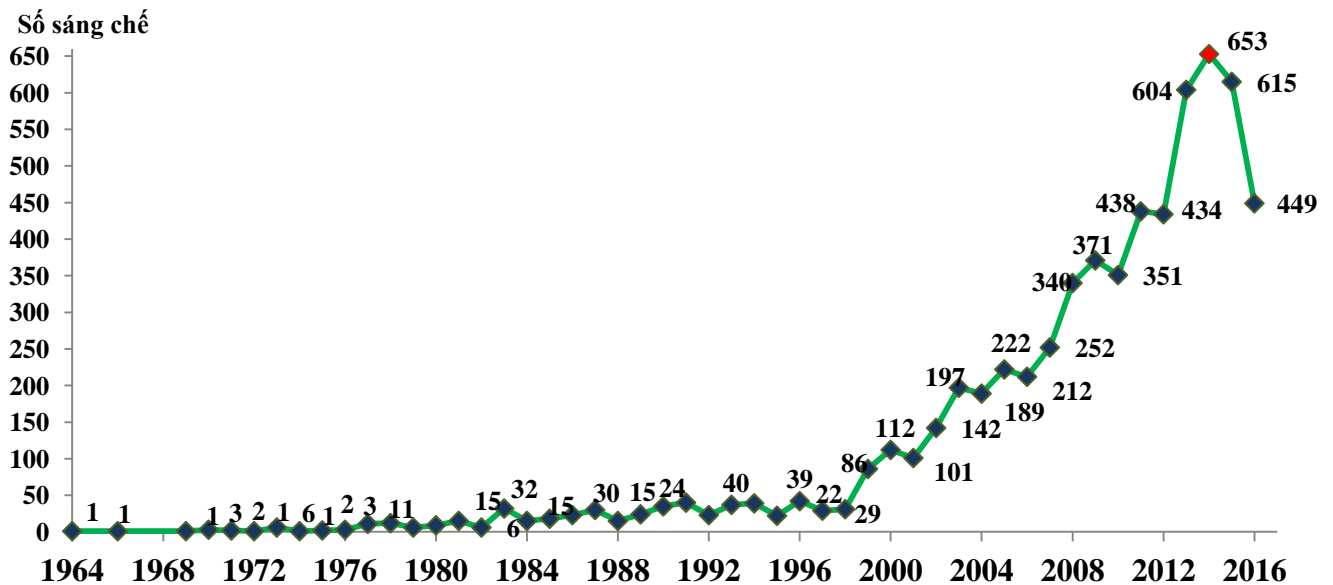
Năm 2012, Viện Sinh học Tây Nguyên có thực hiện đề tài về “Nghiên cứu nhân giống vô tính và sản xuất sinh khối rễ cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* et Grushvo)” và đề tài “Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tóe sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) làm vật liệu cho nuôi cấy bioreactor”

Năm 2002, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam thực hiện đề tài “Nghiên cứu trồng thử nghiệm nhân sâm Hàn Quốc theo công nghệ Hàn Quốc tại Sơn La”.

2.1. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo thời gian

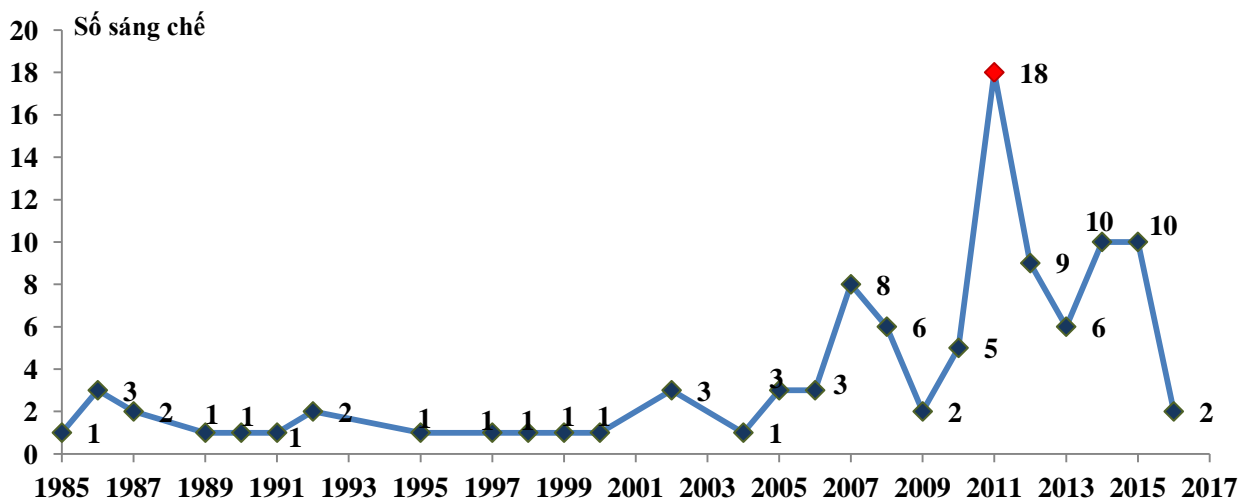
Trên cơ sở số liệu sáng chế tiếp cận được, trung tâm đã tiến hành phân tích và tra cứu được khoảng 6326 sáng chế đăng kí bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm

cho đến nay. Vào thế kỷ 19 thì đã có sáng chế nộp đơn đăng kí bảo hộ về vấn đề này, số sáng chế tăng dần từ năm 2000 và đạt số lượng nộp đơn nhiều nhất là 653 sáng chế vào năm 2014.



Biểu đồ 1: Tình hình nộp đơn bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo thời gian

Trong tổng số 6326 sáng chế đăng kí bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm thì có 103 sáng chế đăng kí bảo hộ về tổng hợp các hợp chất thứ cấp từ nhân sâm, số sáng chế có xu hướng tăng trong giai đoạn 2005 cho đến nay.

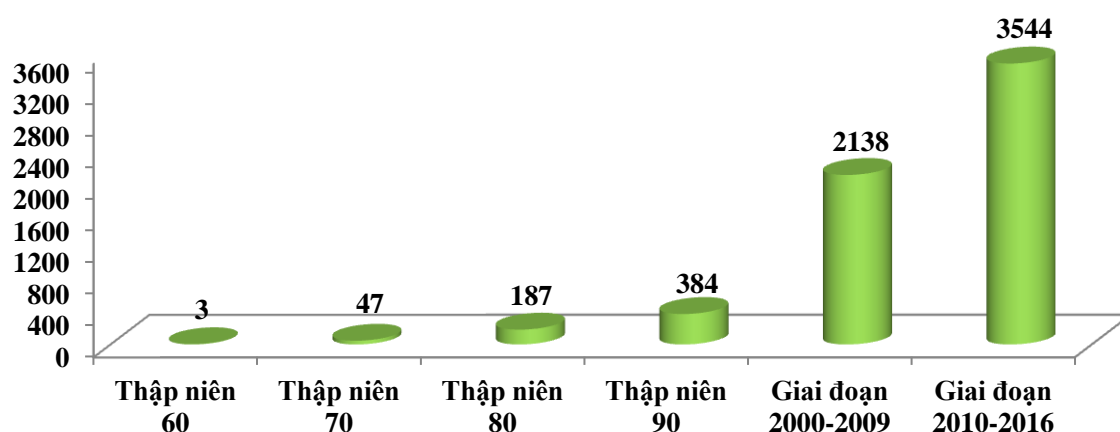


Biểu đồ 2: Tình hình nộp đơn bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và tổng hợp các hợp chất thứ cấp từ nhân sâm.

Phân tích theo từng giai đoạn thì có thể thấy rõ được sự gia tăng lượng sáng nộp đơn đăng kí bảo hộ về về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm như sau:

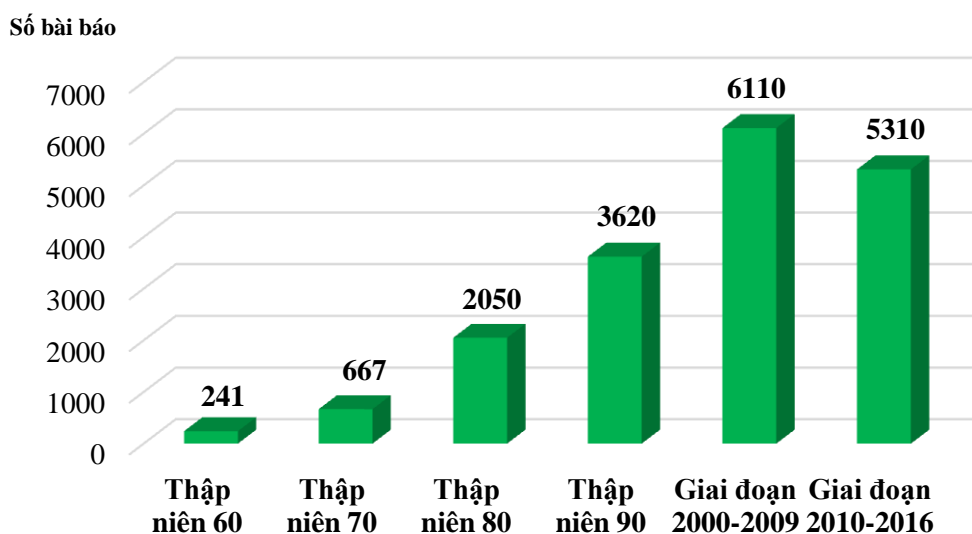
- Thập niên 60: 3 sáng chế
- Thập niên 70: 47 sáng chế
- Thập niên 80: 187 sáng chế
- Thập niên 90: 384 sáng chế
- Giai đoạn 2000-2009: 2138 sáng chế
- Giai đoạn 2010-2016: 3544 sáng chế

Số lượng sáng chế đăng kí bảo hộ tăng nhanh chóng trong giai đoạn 2000-2009 và nửa đầu thập niên 2010-2016.



Biểu đồ 3: Tình hình nộp đơn bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo từng giai đoạn.

Bên cạnh số lượng sáng chế đăng kí, xu hướng nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm còn thể hiện rõ qua số lượng bài báo khoa học được công bố.



Biểu đồ 4: Số lượng bài báo khoa học công bố về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo từng giai đoạn

Dựa trên nguồn dữ liệu Google Scholar, chúng tôi tra cứu được khoảng 241 bài báo khoa học công bố về chủ đề này trong thập niên 60, số lượng bài báo tăng theo thời gian. Đến giai đoạn 2000-2009 số lượng bài báo công bố về chủ đề này đạt nhiều nhất 6110 bài báo.

Qua số liệu về số lượng sáng chế và bài báo khoa học, ta nhận thấy xu hướng nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm vẫn là chủ đề được quan tâm nghiên cứu trên thế giới cho đến hiện nay.

2.2. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại các quốc gia

Sáng chế đăng kí bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm được nộp đơn bảo hộ tại 41 quốc gia và 2 tổ chức từ cả 5 châu lục: Châu Á, Châu Âu, Châu Mỹ, Châu Úc và Châu Phi. Trong đó đa số sáng chế tập trung nộp đơn bảo hộ tại Châu Á.



Hình 3: Sự phân bố khu vực có sáng chế nộp đơn bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm trên thế giới

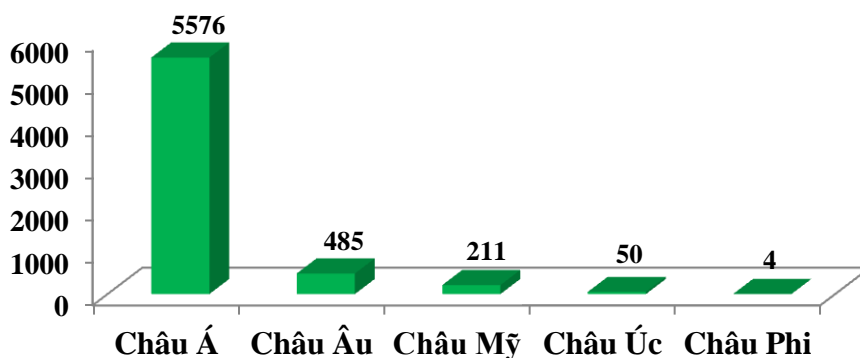
Châu Á: có 5576 sáng chế đăng kí bảo hộ tại 11 quốc gia là Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Hong Kong, Ấn Độ, Singapore, Việt Nam, Philippine, Israel và Malaysia.

Châu Âu: có 485 sáng chế đăng kí bảo hộ tại 21 quốc gia là Nga, Đức, Pháp, Tây Ban Nha, Anh, Ý, Ba Lan, Thụy Sĩ, Hungary, Hà Lan, Bỉ, Đan Mạch, Bồ Đào Nha, Thụy Điển, Áo, Czech, Croatia, Moldova, Đan Mạch, Hy Lạp, Ukraina và 2 tổ chức: EP và WO.

Châu Mỹ: có 211 sáng chế đăng kí bảo hộ tại 6 quốc gia là Mỹ, Canada, Mexico Braxin, Ecuador và Chile.

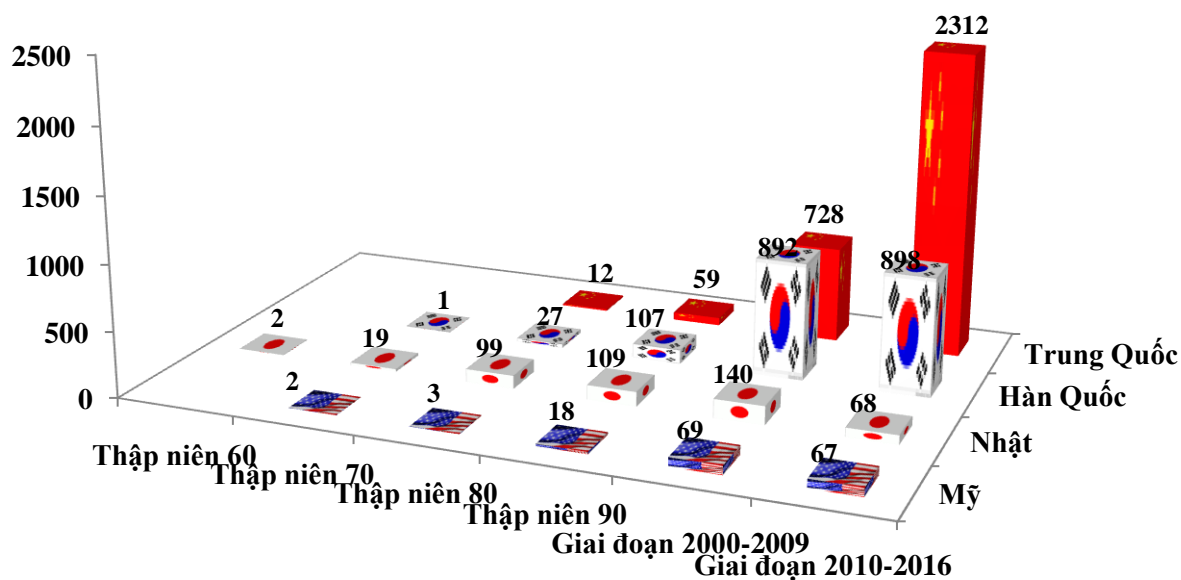
Châu Úc: có 50 sáng chế đăng kí bảo hộ tại 2 quốc gia là Úc và Newzeland.

Châu Phi: có 4 sáng chế đăng kí bảo hộ tại quốc gia duy nhất là Nam Phi.



Biểu đồ 5: Số lượng sáng chế nộp đơn bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo châu lục

Trong đó, bốn quốc gia dẫn đầu về nhận đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm là Trung Quốc (3111 SC), Hàn Quốc (1925 SC), Nhật (437 SC) và Mỹ (159 SC).



Biểu đồ 6: Tình hình nộp đơn bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại 4 quốc gia dẫn đầu theo từng giai đoạn

Do đặc điểm sinh trưởng của nhân sâm, chủ yếu được trồng ở các nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ, Canada... Đây là bốn quốc gia có sản lượng nhân sâm chiếm 99% sản lượng nhân sâm của thế giới, nguồn chủ yếu sản xuất nhân sâm cho cả thế giới: đứng đầu là Trung Quốc với 44.749 tấn, kế tiếp là Hàn Quốc 27.480 tấn, Canada xếp thứ ba 6.486 tấn và Mỹ 1.054 tấn (*J Ginseng Res Vol. 37*). Bên cạnh đó, theo báo cáo tổng quan về xu hướng nghiên cứu nhân sâm được khảo sát trong năm 2010, có tổng cộng 29 quốc gia nghiên cứu nhân sâm thì Hàn Quốc đứng đầu về số lượng bài báo công bố chiếm 35,7%, Trung Quốc xếp thứ hai với 32,3%, kế tiếp là Mỹ chiếm 11,3%, Nhật chiếm 3,4%. Từ những số liệu trên có thể lí giải tại sao Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ, Nhật là các quốc gia dẫn đầu nhận đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm.

Trung Quốc là quốc gia nhận nhiều đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm nhất cho đến hiện nay. Vào thập niên 80 có 12 sáng chế nộp đơn đăng kí bảo hộ về vấn đề này, số sáng chế tăng mạnh trong các giai đoạn sau như giai đoạn 2000-2009 là 728 sáng chế và giai đoạn 2010-2016 là 2312 sáng chế.

Tại Hàn Quốc, thập niên 70 nhận đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm đầu tiên, số lượng sáng chế nộp đơn đăng kí bảo hộ về vấn đề này tăng dần theo từng giai đoạn. Vào giai đoạn 2000-2009, Hàn Quốc vượt qua các nước về nhận nhiều đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nhân sâm nhất với 892 sáng chế.

Nhật Bản nhận 2 đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm từ rất sớm-thập niên 60, số sáng chế nộp đơn đăng kí bảo hộ về vấn đề này tăng theo từng giai đoạn. Vào thập niên 90, Nhật Bản vượt qua các nước là quốc gia nhận được nhiều đơn đăng kí bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm với 109 sáng chế.

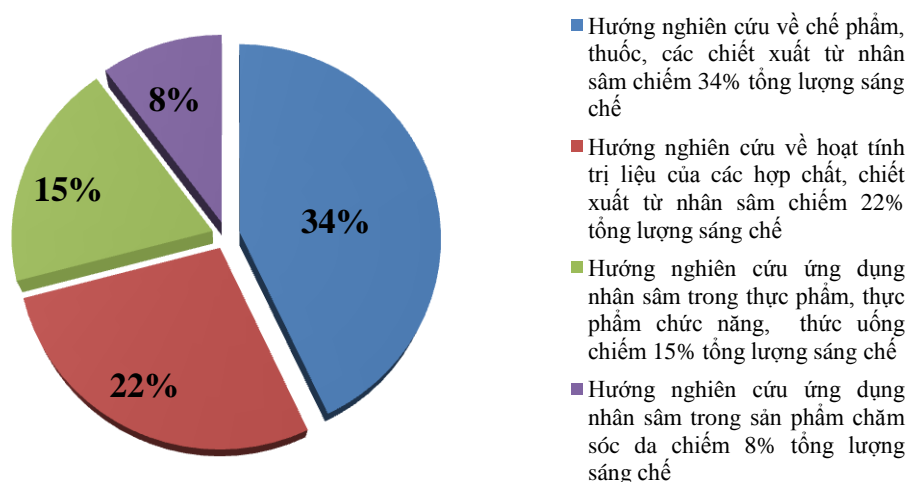
Mỹ vào thập niên 70 nhận được 2 đơn đăng kí bảo hộ sáng chế đầu tiên về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm, số sáng chế nộp đơn đăng kí bảo hộ về vấn đề này tăng theo từng giai đoạn cho đến nay.

2.3. Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo các hướng nghiên cứu

Theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC, số lượng các sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tập trung chủ yếu vào các hướng nghiên cứu sau:

- Hướng nghiên cứu về chế phẩm, thuốc, các chiết xuất từ nhân sâm chiếm 34% tổng lượng sáng chế
- Hướng nghiên cứu về hoạt tính trị liệu của các hợp chất, chiết xuất từ nhân sâm chiếm 22% tổng lượng sáng chế
- Hướng nghiên cứu ứng dụng nhân sâm trong thực phẩm, thực phẩm chức năng, thức uống chiếm 15% tổng lượng sáng chế
- Hướng nghiên cứu ứng dụng nhân sâm trong sản phẩm chăm sóc da chiếm 8% tổng lượng sáng chế.

và các hướng nghiên cứu khác

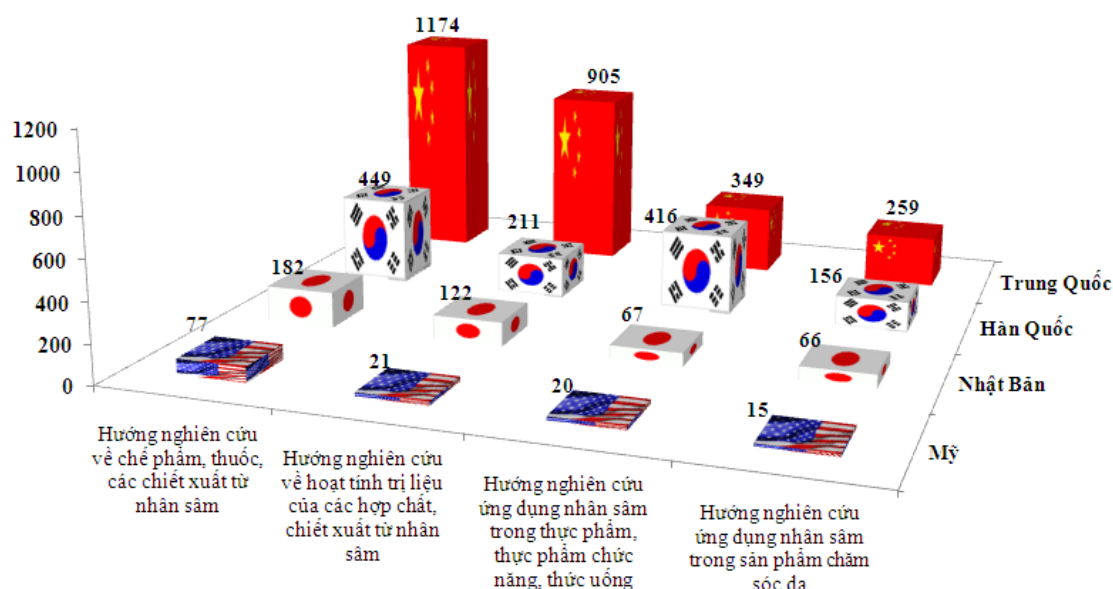


Biểu đồ 7: Tình hình nộp đơn đăng ký bảo hộ sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm theo chỉ số phân loại sáng chế quốc tế IPC.

Các sáng chế đăng kí bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại 4 quốc gia phân bố vào cả 4 hướng nghiên cứu và tập trung chủ yếu vào hướng nghiên cứu về chế phẩm, thuốc, các chiết xuất từ nhân sâm.

Trên thực tế, nhân sâm được thương mại tại các quốc gia dưới nhiều sản phẩm khác nhau như: nhân sâm tươi, nhân sâm khô, các sản phẩm liên quan như thực phẩm chức năng, thuốc, sản phẩm chế biến. Tại Trung Quốc, sản phẩm tiêu thụ chủ yếu là

rễ sâm còn tại Mỹ và Nhật Bản là sản phẩm từ rễ sâm như viên nang, viên nén, thuốc bổ sung dinh dưỡng... Tại Hàn Quốc, nhân sâm được tiêu thụ rộng rãi như thực phẩm tươi, thuốc. Các sáng chế đăng ký bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại 4 quốc gia phân bố vào cả 4 hướng nghiên cứu và tập trung chủ yếu vào hướng nghiên cứu về chế phẩm, thuốc, các chiết xuất từ nhân sâm.



Biểu đồ 8: Tình hình đăng ký sáng chế bảo hộ ở các hướng nghiên cứu về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại 4 quốc gia dẫn đầu.

Kết luận:

Nhân sâm là dược liệu đã được nghiên cứu và ứng dụng từ cách đây khoảng 4500 năm tại các quốc gia Châu Á, điển hình tại Trung Quốc. Vào thế kỷ 19 thì đã có sáng chế nộp đơn đăng ký bảo hộ, cho đến hiện nay có khoảng 6326 sáng chế nộp đơn đăng ký bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tại cả 5 Châu Lục, dẫn đầu nhận đơn bảo hộ sáng chế là các quốc gia thuộc Châu Á như (3111 SC), Hàn Quốc (1925 SC), Nhật (437 SC).

Trong tổng số sáng chế đăng ký bảo hộ về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm thì có 103 sáng chế đăng ký bảo hộ về tổng hợp các hợp chất thứ cấp saponin từ nhân sâm, số sáng chế bắt đầu tăng trong giai đoạn 2005 cho đến nay. Dựa vào bảng phân loại chỉ số sáng chế quốc tế cho thấy rằng các sáng chế về nghiên cứu và ứng dụng nhân sâm tập trung vào đăng ký bảo hộ hướng chiết xuất hợp chất (chiếm 34%) và các hoạt tính trị liệu của các hợp chất chiết xuất từ nhân sâm (chiếm 22%).

III. NGHIÊN CỨU TẠO RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH VÀ NHÂN SÂM SINH KHỐI THU NHẬN HỢP CHẤT THỨ CẤP SAPONIN

3.1. Nghiên cứu tạo các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh

Sâm Ngọc Linh là loại sâm được phát hiện ở độ cao 1500-2000 m thuộc vùng núi Ngọc Linh thuộc hai huyện Trà My (Quảng Nam) và Đak Tô (Kon Tum). Đây là loại cây thảo ưa ẩm, ưa bóng, mọc rải rác dưới tán rừng kín ẩm ướt, nhiệt độ 15-18°C, sinh trưởng mạnh vào mùa xuân-hè, mùa hoa quả tháng 5-10, phần trên mặt đất lụi tàn hàng năm.

Việc di thực trồng sâm rất khó khăn, thời gian nuôi trồng dài, sinh trưởng chậm cho năng suất thấp, thân rễ 5 năm tuổi nặng khoảng 60g/cây. Đồng thời, chi phí trồng, chăm sóc và bảo vệ cũng tốn kém rất nhiều. Vì vậy, trong nước đã có các đơn vị ứng dụng công nghệ sinh học: nuôi cấy tế bào, nuôi cấy rễ bất định, nuôi cấy rễ tóc tạo ra rễ sâm Ngọc Linh đáp ứng nhu cầu sâm ngày càng nhiều. Tại học viện Quân Y kết hợp với viện nghiên cứu của Hàn Quốc đã ứng dụng nuôi cấy tế bào sản xuất rễ sâm hay Viện Sinh học nhiệt đới cũng đã áp dụng nuôi cấy rễ bất định tạo rễ sâm. Từ 2011, trung tâm Công nghệ sinh học kết hợp với trường Đại học Picardie Jules Verne – Pháp đã nghiên cứu tạo rễ tóc sâm Ngọc Linh dựa trên nuôi cấy rễ tóc để hạn chế chất kích thích sinh trưởng.

Các phương pháp tạo rễ tóc của trung tâm Sinh học như sau:

- Phương pháp 1: sử dụng cây sâm được lấy mẫu từ Kon Tum, được khử trùng sau đó nuôi cấy invitro để tạo Calli MS sau đó nhân lên và cho lây nhiễm với 3 loại vi khuẩn dạng đại TR7, TR107, 15834 với các loại cây trồng khác thì áp dụng phương pháp này rất nhanh tạo rễ nhưng đối với sâm Ngọc Linh khó tạo rễ bằng cách này.

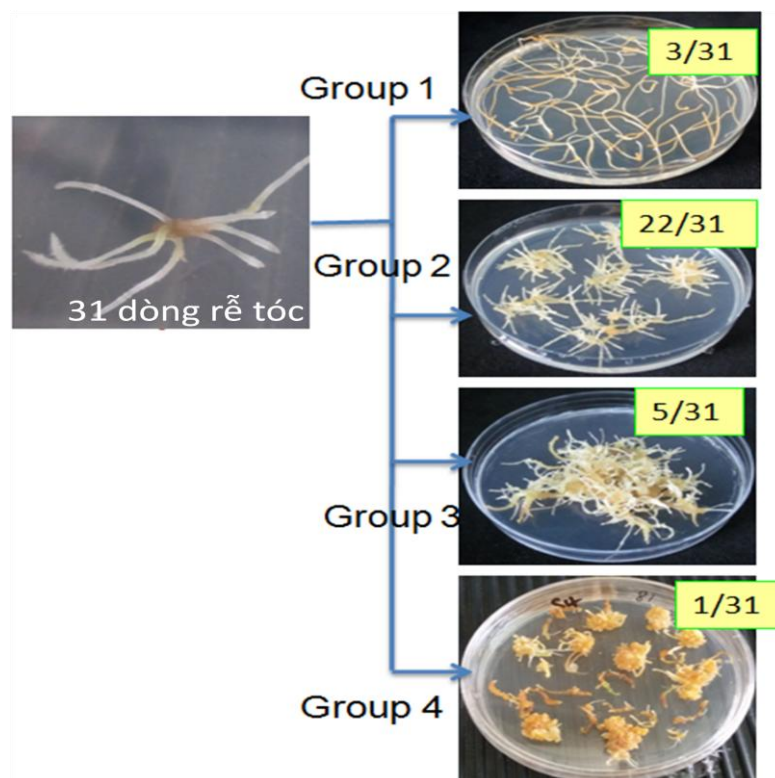
- Phương pháp 2: tiến hành trên cơ sở các kết quả nghiên cứu trên thế giới là ngâm nuôi cấy đoạn cuống lá nhưng có bổ sung acetonsyringone kích thích quá trình lây nhiễm vi khuẩn, tuy nhiên phương pháp này thì tỉ lệ thành công thấp

- Phương pháp 3: dùng cây con trong invitro, tiến hành lây nhiễm sinh ra rễ. Từ rễ thu được tiến hành kiểm tra sự hiện diện các gen vi khuẩn đưa vào, nuôi cấy và diệt vi khuẩn đi, nhân nhanh lên thu được dạng sinh khối.

Các kiểu hình của rễ tóc mà trung tâm thu được trong quá trình nghiên cứu có tỉ lệ chuyển gen vi khuẩn vào sâm Ngọc Linh rất thấp chỉ hơn 1%. Trung tâm tiến hành thử nghiệm thu được 500 rễ thì chỉ 31 dòng rễ thực chất do gene vi khuẩn đưa vào và chia làm 4 kiểu hình khác nhau:

- Nhóm 1: rễ mọc mỏng, khả năng phân nhánh kém
- Nhóm 2: phân nhánh đều, rễ đạt
- Nhóm 3: phân nhánh nhiều nhưng rễ rất to
- Nhóm 4: tạo ra các u sinh khối nhưng không tạo ra rễ

Tiếp theo, trung tâm tiến hành khảo sát xem nhóm rễ nào sinh trưởng nhanh và có hàm lượng saponin cao để chọn được dòng thích hợp mình nuôi cấy.



Hình 4: Các kiểu hình rễ tóc nuôi cấy trung tâm thu được

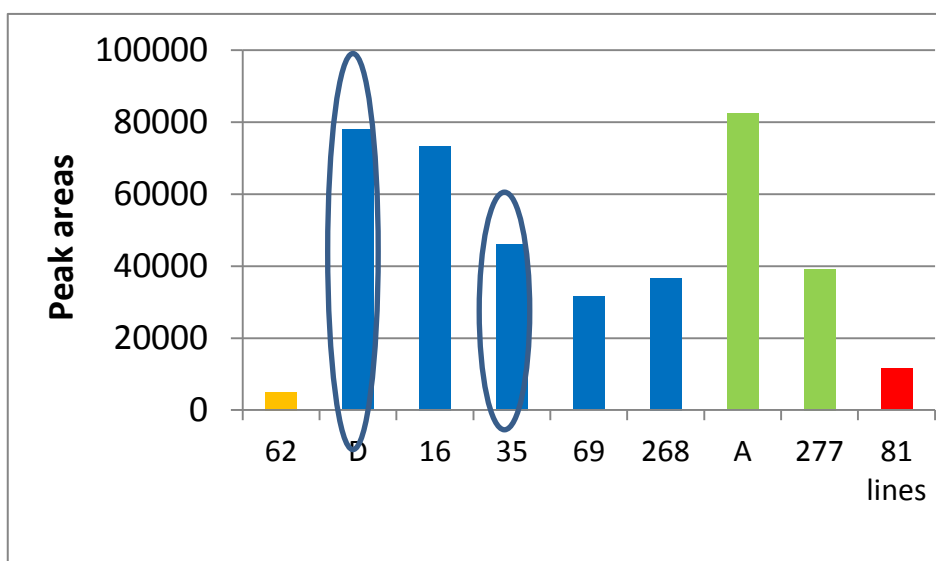
Sau đó trung tâm tiến hành phân tích PCR để kiểm tra được gen rol chuyển từ vi khuẩn vào trong cây tạo rễ (bảng 3).

Bảng 3: Kết quả phân tích kiểu hình và khả năng sinh khối của rễ tóc

Dòng rễ	Kiểu hình	Sinh khối (g) sau 60 ngày
62	Nhóm 1	2.6 ± 0.19 (e)

D	Nhóm 2	8.3 ± 0.29 (a)
16	Nhóm 2	5.7 ± 0.58 (c)
35	Nhóm 2	7.0 ± 0.13 (b)
69	Nhóm 2	5.1 ± 0.23 (c,d)
268	Nhóm 3	5.2 ± 0.67 (c,d)
A	Nhóm 3	7.3 ± 0.2 (b)
277	Nhóm 3	4.7 ± 0.32 (d)
81	Nhóm 4	3.2 ± 0.15 (e)
2	Nhóm 1	Lost

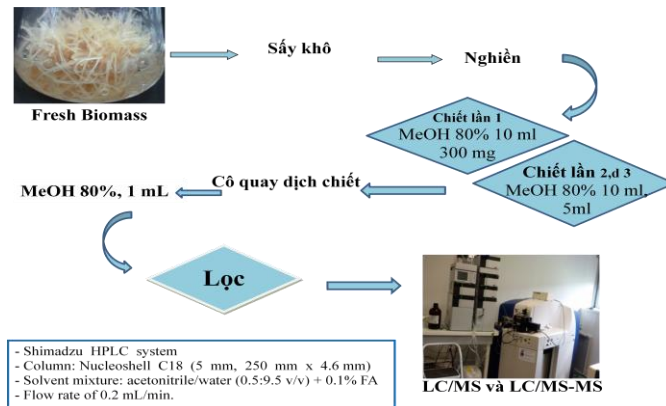
Từ kết quả phân tích, trung tâm nhận thấy các rễ có sinh khối lớn sau 60 ngày là thuộc nhóm 2 là D; 35 và nhóm 3A. Đồng thời, kết quả phân tích hàm lượng saponin ở các rễ nhóm 2 D&35 và nhóm 3A đều cao (hình 5).



Hình 5: Kết quả phân tích hàm lượng Saponin trong rễ tóc

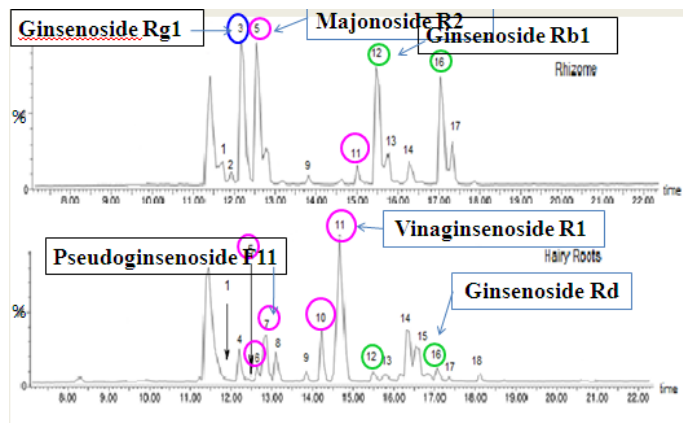
3.2. Thành phần hoạt chất saponin trong rễ tóc sâm Ngọc Linh

Hợp chất saponin được chiết xuất từ rễ tóc sau khi nuôi cấy theo quy trình như sau: rễ tóc tươi được đặt trong tủ -80°C trong vòng 24-48 tiếng để ngưng đọng quá trình chuyển hóa các hợp chất sau đó sấy khô rồi nghiền và đem chiết xuất 2 lần với methanol 80% thu được dịch chiết cô quay. Dung dịch cuối cùng đem phân tích LC/MS và thu được kết quả phân tích hàm lượng hợp chất saponin trong mẫu.



Hình 6: Quy trình tách chiết hợp chất Saponin trong rễ tóc

Kết quả phân tích hàm lượng saponin trong dòng rễ nhóm 2-35 so với rễ 6 năm tuổi ngoài tự nhiên, ta nhận thấy có sự hiện diện các chất tương tự nhau nhưng khác nhau về nồng độ như cường độ peak số 12, 16 của nhóm Ginsenoside trong rễ sâm tự nhiên cao hơn trong rễ tóc; ngược lại cường độ peak số 11 của nhóm vinaginsenoside R1 trong rễ tóc nuôi cấy lại cao hơn trong sâm tự nhiên. Ngoài ra, ở rễ tóc nuôi cấy còn xuất hiện các nhóm mới như Pseudoginsenoside F11 ở peak số 7.



Hình 7: Kết quả phân tích hợp chất saponin trong rễ tóc nuôi cấy và rễ sâm tự nhiên 6 năm tuổi

3.3. Ảnh hưởng của các yếu tố lên sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh

a. Mật độ rễ tóc

Khảo sát ảnh hưởng của mật độ rễ đến tốc độ nhân sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh được tiến hành thí nghiệm khảo sát trong 2 tháng như theo bảng sau:

Bảng 4. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy đến khối lượng và hệ số nhân rễ sâm Ngọc Linh sau 2 tháng nuôi cấy

Mật độ mẫu ban đầu (g)	Khối lượng rễ tươi (g)	Hệ số nhân (lần)
1	7,18 c	7,18 b
3	39,57 a	13,29 a
5	36,91 a	7,38 b
7	23,12 b	3,22 c
CV	22,1%	17,67%

Kết quả cho thấy với khối lượng ban đầu là 3 g cho hệ số nhân cao nhất

b. Tần suất bơm của hệ thống TIS

Khảo sát ảnh hưởng của tần suất bơm của hệ thống TIS đến tốc độ nhân sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh được tiến hành thí nghiệm khảo sát trong 2 tháng như theo bảng sau:

Bảng 5. Ảnh hưởng của tần suất bơm đến khối lượng và hệ số nhân rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 2 tháng nuôi cấy

Tần suất bơm (giờ/lần)	Khối lượng rễ tươi (g)	Hệ số nhân (lần)
4	12,32 b	4,11 b
5	40,50 a	13,50 a
6	39,46 a	13,15 a
CV	10,2%	9,8%

Kết quả: sau nuôi cấy 2 tháng, khối lượng rễ tóc và hệ số nhân đạt cao nhất với tần suất bơm từ 5 – 6 giờ/lần.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bơm của hệ thống TIS đến tốc độ nhân sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh được tiến hành thí nghiệm khảo sát trong 2 tháng như theo bảng sau:

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian bơm đến khối lượng và hệ số nhân rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 2 tháng nuôi cấy

Thời gian bơm (phút/lần)	Khối lượng rễ tươi (g)	Hệ số nhân (lần)
2	23.29 b	7.76 b
3	44.68 a	14.89 a
4	18.33 b	6.11 b
CV	13.3%	13.34%

Kết quả: Thời gian bơm của hệ thống TIS thích hợp nhất là 3 phút/lần trong nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh chuyên gen.

3.4. Các phương pháp chiết xuất, phân tích và đánh giá chất lượng sâm Ngọc Linh

a. Phương pháp chiết xuất sâm Ngọc Linh

Các phương pháp chiết xuất sâm Ngọc Linh gồm các phương pháp như sau:

- Phương pháp ngâm: là phương pháp đơn giản nhất chiết xuất các chất từ trong dược liệu. Đây là kỹ thuật chiết lạnh gián đoạn và được thực hiện ở nhiệt độ thường, dược liệu được ngâm ngập trong dung môi và sau khoảng thời gian nhất định thì rút dịch chiết ra. Phương pháp này có ưu điểm là đơn giản, rẻ tiền nhưng năng suất thấp, thời gian, không thể chiết kiệt được hoạt chất trong dược liệu.
- Phương pháp ngâm kiệt: là phương pháp chiết lạnh ở nhiệt độ thường cho dung môi chảy rất chậm và liên tục qua lớp dược liệu nằm yên. Bột dược liệu được ngâm trong dung môi, rút nhỏ giọt dịch chiết ở dưới, bổ sung dung môi phía trên. Ưu điểm là có thể chiết kiệt hoạt chất dược liệu, nhược điểm là năng suất thấp, thủ công, tổn dung môi.

- Phương pháp đun hồi lưu: là phương pháp chiết nóng, gián đoạn, có thể kèm khuấy trộn. Ưu điểm là năng suất cao nhưng dược liệu và chất chiết tiếp xúc liên tục với nhiệt tạo chất chuyển hóa, phải chiết lặp lại nhiều lần.
- Phương pháp Soxhlet: là phương pháp chiết nóng liên tục, dược liệu luôn được chiết bằng dung môi mới, chất chiết tiếp xúc liên tục với nhiệt. Ưu điểm là thiết bị tự động hóa, chiết kiệt được hoạt chất, nhược điểm là chất chiết tiếp xúc với nhiệt liên tục và chỉ áp dụng được ở quy mô nhỏ.
- Phương pháp siêu âm: Sử dụng sóng siêu âm để phá vỡ màng tế bào, tăng tiếp xúc, xáo trộn, làm nóng tại chỗ. Ưu điểm của phương pháp này là có thể chiết kiệt hoạt chất trong thời gian ngắn nhưng chỉ mới sử dụng trong phòng thí nghiệm chưa áp dụng công nghiệp.
- Chiết xuất bằng sóng vi ba: sử dụng sóng siêu âm để phá vỡ màng tế bào, tăng tiếp xúc, xáo trộn, làm nóng tại chỗ. Ưu điểm là hiệu quả chiết cao, nhược điểm là thiết bị phức tạp, quy mô nhỏ, chất tiếp xúc với nhiệt.
- Dùng chất lỏng siêu tới hạn: sử dụng chất lỏng siêu tới hạn để chiết xuất. Ưu điểm là độ nhớt thấp, khả năng khuếch tán cao, độ chọn lọc cao, thân thiện môi trường nhưng thiết bị phức tạp, đắt tiền.

b. Phương pháp phân tích sâm Ngọc Linh

Các phương pháp phân tích sâm Ngọc Linh gồm 3 nhóm chính:

- Vi học (soi bột, vi phẫu): mục đích kiểm nghiệm thực vật học, có ý nghĩa trong phân biệt các loài khác giả mạo. Ưu điểm của phương pháp này là nhanh chóng, rẻ tiền nhưng khó có thể phân biệt các loài cùng chi Pana. Đây là bước kiểm nghiệm ban đầu, cần có những bước kiểm nghiệm hóa học tiếp theo.
- Phân tích định tính có thể phát hiện ra sự hiện diện của saponin bằng phản ứng hóa học tạo bọt và Liebermann-Buchard, sắc ký lớp mỏng.
- Phân tích định lượng có thể định lượng saponin bằng phương pháp cân, phương pháp đo quang, sắc ký bản mỏng, sắc ký lỏng hiệu năng cao, đầu dò UV-PDA, đầu dò RID, đầu dò ELSD, đầu dò khối phổ MS.

c. Đánh giá chất lượng sâm Ngọc Linh.

Để đánh giá chất lượng sâm Ngọc Linh có thể dùng phương pháp định tính SKLM và phương pháp định lượng HPLC-PDA.

Kết quả định lượng cho thấy các mẫu sâm trên thị trường phần lớn không có G-Rd trong khi mẫu sâm Ngọc Linh G-Rd lại khá cao, tương đương với G-Rb1. Các mẫu sâm trên thị trường đa số có hàm lượng V-R2 cao trên 0,5% hay một số mẫu rất cao khoảng 2-4%, trong khi sâm Ngọc Linh khá thấp < 0,2 %. Các mẫu sâm trên thị trường có N-R1 cao trên 1%, trong khi mẫu sâm Ngọc Linh thì rất thấp khoảng 0,1%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alice S. T. Wong, Chi-Ming Cheb and Kar-Wah Leung, *Recent advances in ginseng as cancer therapeutics: a functional and mechanistic overview*, The Royal Society of Chemistry 2014.
2. In-Ho Baeg* and Seung-Ho So, *The world ginseng market and the ginseng (Korea)*, J Ginseng Res Vol. 37, No. 1, 1-7 (2013)
3. Si-Kwan Kim and Jeong Hill Park, *Trends in Ginseng Research in 2010*, J. Ginseng Res. Vol. 35, No. 4, 389-398 (2011)