

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 100 l

Vũ Tuấn Anh, Chử Văn Mẫn

Học viện Quân y

Để nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh, các tác giả đã tiến hành nâng cấp quy mô nuôi cấy sinh khối sâm Ngọc Linh lên 100 l. Các thành phần môi trường được tối ưu hóa gồm có: môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l; Kinetin = 0,1 mg/l; đường = 30,0 g/l, pH = 5,8; nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 45 vòng/phút, nồng độ oxy là 40%, thời gian nuôi cấy tối ưu là 24-25 ngày. Kết quả cho thấy: khối lượng tế bào đạt 459,21±48,54 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt 24,87±3,02 mg/g.

Từ khóa: MS, saponin, sâm Ngọc Linh, sinh khối.

Chỉ số phân loại 3.4

INVESTIGATING THE IMPACT OF SOME ELEMENTS ON THE PANAX VIETNAMENSIS'S BIOMASS QUALITY BASED ON 100-LITER BIOREACTOR

Summary

In this study, the authors have upgraded the *Panax vietnamensis* (Vietnamese ginseng) biomass production scale upto 100-liter bioreactor. The medium compositions which have been optimized include MS liquid medium supplemented with 1.5 mg/ml NAA, kinetin 0.1 mg/l, saccharose 30.0 g/l, pH of 5.8, temperature about 24-26°C, rotational speed at 45 rpm, oxygen content 40%, culture time about 24-25 days. The results have shown that culture yield has reached 459.21±48.54 g/l, and total saponin content has been 24.87±3.02 mg/g.

Keyword: biomass, MS, *Panax vietnamensis*, saponin.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*) thuộc họ Nhân sâm (*Araliaceae*), là dược liệu đặc hữu ở vùng núi Ngọc Linh. Hiện nay, loài sâm này đã được đưa vào Sách đỏ Việt Nam. Sâm Ngọc Linh tự nhiên chỉ mọc ở độ cao trên 1500 m, chủ yếu tập trung ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai huyện Đắc Tô (Kon Tum) và Trà My (Quảng Nam). Sâm Ngọc Linh có nhiều tác dụng sinh học như: bổ dưỡng, tăng lực, chống oxy hóa và lão hóa, bảo vệ gan... Cũng chính vì là cây thuốc có giá trị, nên sâm Ngọc Linh đã bị khai thác kiệt quệ [1, 2].

Hiện nay, công nghệ sinh khối tế bào thực vật đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực (dược phẩm, mỹ phẩm và thực phẩm chức năng). Học viện Quân y đã cùng với Đại học Ajou (Hàn Quốc) triển khai nhiệm vụ hợp tác với đề tài: *Hợp tác nghiên cứu xây dựng quy trình tạo khối sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm phục vụ sức khỏe cộng đồng* (2007) [3]. Nhiệm vụ đã được hội đồng nghiệm thu đánh giá cao và được đề nghị tiếp tục hoàn thiện để tạo ra được quy trình công nghệ hoàn chỉnh sản xuất sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh. Trên cơ sở kết quả thu được của nhiệm vụ nghiên cứu, Học viện Quân y đã được Cục Sở hữu trí tuệ (Bộ Khoa học và Công nghệ) cấp bằng độc quyền sáng chế về *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh* (2009) [4]. Năm 2010, các nhà khoa học của Học viện Quân y tiếp tục nghiên cứu đề tài cấp bộ về *bào chế chế phẩm nước tăng lực Vinatonic*, sản phẩm đã được Bộ Y tế cấp số lưu hành trên toàn quốc [5]. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu của các đề tài, Bộ Khoa học và Công nghệ đã đồng ý cho Học viện Quân y thực hiện dự án: *"Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic"*

[6]. Để thực hiện dự án, việc nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và nâng cấp quy mô sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối là rất quan trọng. Đây là giai đoạn tạo sản phẩm chủ yếu của quy trình sinh khối. Số lượng và chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh phụ thuộc nhiều nhất vào giai đoạn này. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng sâm Ngọc Linh sinh khối nuôi cấy trên bioreactor 100 l mà các nghiên cứu trước chưa đề cập tới.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất nghiên cứu

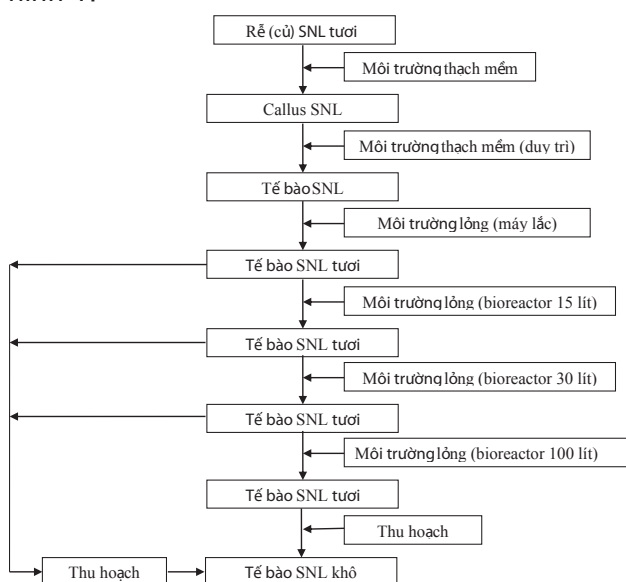
Các hoá chất dùng để pha chế môi trường nuôi cấy của hãng Sigma đạt tiêu chuẩn cho nuôi cấy tế bào thực vật. Chất chuẩn ginsenosid Rg1, Rb1, Rd (Wako - Nhật). Dung môi chạy sắc ký: acetonitril, methanol (dùng cho HPLC, Merck, Đức); nước cất (dùng cho HPLC, Prolabo, Tây Ban Nha); ethanol (tinh khiết phân tích) và một số hóa chất dung môi khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết.

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất: tủ cấy an toàn cấp 2 NU-440-400E, Máy lắc Orbital shaker, Tủ ẩm có lắc dung tích lớn ISF4-W, Bioreactor 15, 30 và 100 l Biostat (Đức).

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh (do Trung tâm Nghiên cứu y dược học quân sự cung cấp).

Phương pháp nghiên cứu: quy trình sản xuất tế bào sâm Ngọc Linh sinh khối được thể hiện trên hình 1.



Hình 1: quy trình sản xuất tế bào sâm Ngọc Linh sinh khối (SNL: sâm Ngọc Linh)

Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh: để khảo sát ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy lên sự phát triển của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l, chúng tôi khảo sát với các tốc độ khác nhau trên cùng một thời điểm với cùng một điều kiện ở các mẻ khác nhau với cùng một lượng tế bào ban đầu. Cụ thể, nhóm nghiên cứu lựa chọn các tốc độ 15, 25, 45, 60, 80, 100 và 120 vòng/phút.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ oxy đến chất lượng sâm Ngọc Linh sinh khối: so sánh khối lượng sinh khối khô, sinh khối tươi và hàm lượng hoạt chất trong sinh khối sau khi thu hoạch ở các nồng độ oxy khác nhau và lựa chọn nồng độ phù hợp nhất cho khối lượng sinh khối khô và hàm lượng hoạt chất cao nhất.

Thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối: **biện pháp 1:** môi trường nuôi cấy tế bào cuối cùng khi thu hoạch có chứa 1-NAA. Khi thu hoạch, hỗn hợp gồm tế bào và môi trường, được lọc qua thiết bị lọc, thu lấy sinh khối. Sinh khối được rửa nhiều lần với nước cất (tỷ lệ nước cất:sinh khối là 5:1), rồi sấy khô tới khối lượng không đổi. Xác định hàm lượng hoạt chất và 1-NAA trong các mẫu, từ đó xác định số lần rửa thích hợp. **Biện pháp 2:** sinh khối tế bào trước khi thu hoạch được cấy chuyển vào môi trường lỏng không bổ sung các chất kích thích sinh trưởng, nuôi cấy trong 10 ngày, sau đó lọc thu hoạch sinh khối, có đánh giá hàm lượng hoạt chất và tồn dư 1-NAA và Kinetin.

Phương pháp kiểm nghiệm NAA và Kinetin: tham khảo tài liệu [6].

Kết quả và bàn luận

Đánh giá ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Tế bào sâm Ngọc Linh là loại tế bào ưa khí, vì vậy trong nuôi cấy sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh cần thiết phải sử dụng hệ thống lên men có gắn thiết bị khuấy. Vai trò của thiết bị khuấy là để tăng diện tích và thời gian tiếp xúc với không khí được đưa vào từ hệ thống khí nén của các tế bào sâm Ngọc Linh, làm tăng độ hòa tan của oxy vào môi trường nuôi cấy, do đó làm tăng hiệu suất của quá trình trao đổi chất của tế bào, quá trình thâm nhập của các chất dinh dưỡng và các chất kích thích sinh trưởng cũng như các chất kích thích tăng hàm lượng hoạt chất cho tế bào sâm Ngọc Linh diễn ra nhanh và hiệu quả hơn. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy đến sự phát triển của tế bào

sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của tốc độ cánh khuấy tới chất lượng sinh khối sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Tốc độ cánh khuấy		Khối lượng tế bào khô (g/l)	Khối lượng saponin (mg/g)
15	(1)	7,22±0,81	20,19±2,23
25	(2)	11,46±1,32	20,31±2,28
45	(3)	31,31±3,83	24,87±3,02
60	(4)	20,56±2,48	17,20±1,74
80	(5)	18,32±2,22	18,11±1,85
100	(6)	15,42±1,86	20,22±2,25
120	(7)	9,63±1,19	21,44±2,46

Từ kết quả bảng 1 cho thấy, ở tốc độ cánh khuấy 45 vòng/phút, khối lượng tế bào sâm Ngọc Linh đạt cao nhất là 31,31 g/l, đồng thời theo kết quả xác định hàm lượng saponin toàn phần, ở tốc độ này cũng đạt cao hơn so với các tốc độ còn lại. Điều này có thể được giải thích rằng, nếu tốc độ cánh khuấy thấp thì sẽ không hòa tan được nhiều oxy vào môi trường nuôi cấy để tăng tính hấp thụ cho tế bào, làm quá trình trao đổi chất diễn ra chậm và không hiệu quả. Nếu tốc độ cánh khuấy quá cao sẽ làm mất đi một lượng oxy qua đường khí thải và làm tế bào sâm Ngọc Linh bị chết do lực va đập mạnh với cánh khuấy của hệ thống lên men. Vì vậy, ở nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn tốc độ cánh khuấy tối ưu nhất là 45 vòng/phút.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ oxy đến sự phát triển của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ oxy cung cấp tới khối lượng sâm Ngọc Linh sinh khối tươi và khô trong bioreactor 100 l được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ oxy cung cấp tới khối lượng sâm Ngọc Linh sinh khối

Thời gian (ngày)	Khối lượng sâm Ngọc Linh SK tươi (g/l)				Khối lượng sâm Ngọc Linh SK khô (g/l)			
	O ₂ 20,8%	O ₂ 30%	O ₂ 40%	O ₂ 50%	O ₂ 20,8%	O ₂ 30%	O ₂ 40%	O ₂ 50%
0	60,0	60,0	60,0	60,0	3,2	3,2	3,2	3,2
5	64,6	58,2	57,7	65,3	3,4	3,0	3,2	3,3
10	78,1	70,6	74,4	83,8	3,9	3,5	3,7	4,2
15	108,1	117,5	141,9	104,4	4,7	5,2	6,5	4,5
20	226,3	230,0	265,6	194,4	9,4	9,6	11,5	7,7
25	261,9	282,5	288,1	228,1	11,3	12,4	12,7	9,5
30	271,9	292,5	298,1	238,1	11,0	11,5	12,5	9,2

(SK: sinh khối)

Sự sinh trưởng của tế bào và tổng khối lượng tế bào khô và tươi thu được tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Khối lượng tế bào thu được nhiều nhất tại thời điểm sau 25 ngày nuôi cấy. Kết quả này tương tự với kết quả đã công bố của Zhong và cộng sự trên loài *Panax notoginseng* [7]. Khối lượng sâm sinh khối tươi thu được nhiều nhất là 298,1 g/l với hàm lượng oxy cung cấp là 40%, tăng 9% so với đối chứng (oxy 20,8%).

Đánh giá ảnh hưởng của chất kích thích tăng hàm lượng hoạt chất đến chất lượng sâm Ngọc Linh trong bioreactor 100 l

Kết quả thực nghiệm cho thấy, trong nuôi cấy sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh có thể sử dụng acid jasmonic, methyl jasmonat và dịch chiết nấm men làm chất kích thích tăng tổng hợp hoạt chất (elicitor) nhằm nâng cao hàm lượng saponin trong sản phẩm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng acid jasmonic để tiếp tục cho các nghiên cứu sau.

Lựa chọn nồng độ của elicitor: tiến hành nuôi cấy tế bào sâm Ngọc Linh, sau 14 ngày nuôi cấy cho tế bào tiếp xúc với acid jasmonic ở các nồng độ khác nhau (50 µM, 100 µM; 150 µM; 200 µM; 250 µM). Kết quả khảo sát hàm lượng các ginsenosid được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3: kết quả lựa chọn nồng độ acid jasmonic

Nồng độ (µM)	Ginsenosid (%)			KLTB khô (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
0	0,2512±0,012	0,2709±0,011	0,1421±0,005	20,22±2,33
50	0,3032±0,010	0,3308±0,013	0,1544±0,007	19,26±2,36
100	0,3494±0,013	0,3852±0,016	0,1705±0,006	18,63±2,25
150	0,3470±0,015	0,3890±0,014	0,1728±0,006	18,15±2,26
200	0,3311±0,012	0,3283±0,014	0,1614±0,007	17,87±1,89
250	0,3290±0,011	0,2761±0,009	0,1559±0,008	17,06±1,73

(KLTB: khối lượng tế bào)

Từ kết quả bảng 3 cho thấy, khi sử dụng acid jasmonic ở nồng độ 100 và 150 µM thì hàm lượng các ginsenosid tăng cao nhất khi thử nghiệm trong khoảng nồng độ 0-250 µM acid jasmonic.

Lựa chọn thời điểm tiếp xúc với elicitor: nuôi tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường MS, sau 2 ngày cho acid jasmonic, lọc tế bào, xác định khối lượng tế bào và hàm lượng các ginsenosid. Kết quả được trình bày trong bảng 4.

Bảng 4: thời điểm tiếp xúc với elicitor

Ngày thứ	Ginsenosid (%)			KLT (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
1	0,0892±0,004	0,1032±0,004	*	12,74±1,42
4	0,1201±0,004	0,1181±0,005	*	12,64±1,45
6	0,1702±0,006	0,1296±0,006	0,0518±0,002	13,02±1,59
8	0,2015±0,008	0,1795±0,006	0,0540±0,002	15,39±1,86
10	0,2864±0,010	0,3086±0,013	0,1281±0,006	17,94±2,23
12	0,3408±0,014	0,3624±0,013	0,1479±0,005	18,25±1,93
14	0,3495±0,017	0,3838±0,016	0,1714±0,007	18,58±1,92
16	0,3290±0,012	0,3686±0,012	0,1629±0,005	17,66±1,79
20	0,2506±0,010	0,2707±0,009	0,1430±0,005	16,95±1,74

(*Hàm lượng thấp không xác định được; KLT: khối lượng tươi)

Kết quả bảng 4 cho thấy, tại thời điểm 14 ngày sau nuôi cấy cho hàm lượng hoạt chất và năng suất cao nhất là 18,58±1,92 (g/l). Hàm lượng của các ginsenoside Rg1, Rb1 và Rd tương ứng là 0,3495±0,017, 0,3838±0,016 và 0,1714±0,007%.

Lựa chọn thời gian tiếp xúc của elicitor với tế bào: nuôi tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường MS. Sau 14 ngày nuôi cấy cho tế bào tiếp xúc với acid jasmonic nồng độ 100 µM với thời gian 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ, 48 giờ, 60 giờ, 72 giờ. Lọc tế bào, định lượng ginsenosid trong tế bào, kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: kết quả lựa chọn thời gian tiếp xúc của elicitor với tế bào

Thời gian tiếp xúc (giờ)	Ginsenosid (%)			KLT (g/l)
	Rg1	Rb1	Rd	
12	0,288±0,010	0,302±0,011	0,146±0,005	20,01±0,66
24	0,306±0,011	0,308±0,013	0,148±0,006	19,66±0,68
36	0,325±0,013	0,341±0,011	0,160±0,008	19,21±0,76
48	0,351±0,017	0,381±0,013	0,174±0,006	19,66±0,68
60	0,316±0,011	0,331±0,014	0,152±0,006	17,30±0,69
72	0,275±0,009	0,290±0,010	0,136±0,005	15,31±0,74

(KLT: khối lượng tươi)

Qua khảo sát thời gian tiếp xúc của acid jasmonic với tế bào sâm Ngọc Linh cho thấy: ở thời gian tiếp xúc 48 giờ (2 ngày), hàm lượng hoạt chất cao nhất là 19,66±0,68 (g/l).

Hoàn thiện quy trình thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối

Quy trình loại bỏ 1-NAA và Kinetin tồn dư: khảo sát biện pháp 1, làm lặp lại 6 lần (n = 6), cho kết quả ở bảng 6.

Bảng 6: hàm lượng 1-NAA, Kinetin tồn dư và hoạt chất trong sâm Ngọc Linh sinh khối

Số lần rửa	0	1	2	3	4
	Hàm lượng				
1-NAA (ppm)	10,6±0,7	8,1±0,5	6,1±0,4	4,9±0,3	4,7±0,3
Kinetin (ppm)	0,06±0,004	0,045±0,003	0,038±0,003	0,03±0,002	0,029±0,002
Tổng Rg1, Rb1 và Rd (%)	1,10±0,03	1,08±0,04	1,01±0,03	0,98±0,03	0,92±0,03

Từ kết quả bảng 6 cho thấy, khi tăng số lần rửa thì lượng 1-NAA tồn dư giảm dần, tuy nhiên hoạt chất cũng bị giảm theo. Rửa 3 lần thì lượng 1-NAA tồn dư là 4,9 ppm; lượng Kinetin tồn dư là 0,03 ppm. Nếu tiếp tục rửa nữa thì 1-NAA và Kinetin tồn dư giảm không đáng kể, trong khi lượng hoạt chất giảm nhiều hơn. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn quy trình rửa với nước cất 3 lần.

Tiếp tục khảo sát biện pháp 2 để loại tồn dư (môi trường nuôi cấy cuối cùng không có 1-NAA và Kinetin) và khi thu hoạch không cần rửa với nước 3 lần. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7: hàm lượng 1-NAA, Kinetin tồn dư và hoạt chất trong sâm Ngọc Linh sinh khối

Thứ tự	1	2	3	4	5	6	$\bar{X} \pm SD$
NAA (ppm)	2,8	2,5	2,7	2,5	2,4	2,4	2,6±0,16
Kinetin (ppm)	0,018	0,019	0,016	0,017	0,019	0,017	0,018±0,001
Tổng Rg1, Rb1 và Rd (%)	0,99	0,97	0,98	0,99	0,95	0,94	0,97±0,02

Kết quả ở bảng 7 cho thấy, 1-NAA và Kinetin tồn dư lần lượt là 2,6 ppm và 0,018 ppm, tổng hàm lượng hoạt chất (Rg1, Rb1, Rd) là 0,97 g tính cho 100 g bột sinh khối khô tuyệt đối. Với biện pháp này, hàm lượng hoạt chất giảm không đáng kể, trong khi lượng tồn dư 1-NAA và Kinetin giảm đáng kể. Do đó, chúng tôi lựa chọn biện pháp này để xây dựng quy trình thu hoạch sâm Ngọc Linh sinh khối.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến chất lượng của sâm Ngọc Linh sinh khối. Kết quả cho thấy, tốc độ cánh khuấy có vai trò quan trọng trong việc hòa tan oxy đảm bảo cho sự phát triển và sinh tổng hợp hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong môi trường lỏng. Qua khảo sát, với tốc độ cánh khuấy

45 vòng/phút cho kết quả tốt nhất. Với nồng độ oxy hòa tan là 40%, thời gian nuôi cấy là 24-25 ngày, hàm lượng saponin toàn phần và khối lượng sinh khối khô thu được là cao nhất, lần lượt là $24,87 \pm 3,02$ mg/g và $31,31 \pm 3,83$ g/l. Bên cạnh đó, để thu hoạch sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh thì biện pháp tốt nhất là cấy chuyển sang môi trường dinh dưỡng không bổ sung các chất kích thích sinh trưởng sẽ loại bỏ được tồn dư của chúng trong nguyên liệu sinh khối cũng như trong các chế phẩm được làm từ sinh khối tế bào sâm Ngọc Linh.

Tài liệu tham khảo

[1] Đỗ Huy Bích và cộng sự (2003), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, tập I, II, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật.

[2] Đỗ Tất Lợi (2005), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr 808-810.

[3] Học viện Quân y (2007), "*Hợp tác nghiên cứu xây dựng quy trình tạo khối sâm Ngọc Linh làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm phục vụ sức khỏe cộng đồng*".

[4] Lê Bách Quang và cs (2009), *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh*, Bằng độc quyền sáng chế.

[5] Nguyễn Văn Long và cs (2010), "*Nghiên cứu bào chế nước tăng lực Vinatonic phục vụ sức khỏe cộng đồng*", đề tài cấp Bộ Quốc phòng.

[6] Vũ Tuấn Anh và cs (2013), "*Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất Sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic*", Dự án sản xuất thử nghiệm cấp nhà nước.

[7] Zhang Y.H, Zhong J.J, Yu J.T, "Effect of osmotic pressure on cell growth and production of ginseng saponin and polysaccharides in suspension cultures of *Panax notoginseng*", *Biotechnol Lett*, **17**, pp 1347-50.