

SÀNG LỌC VÀ NHÂN NHANH SINH KHỐI RỄ TÓC SÂM NGỌC LINH TRÊN BIOREACTOR 20 LÍT TRONG SẢN XUẤT QUY MÔ LỚN

Hà Thị Loan¹, Lâm Vỹ Nguyên¹,
Trần Nguyễn Lệ Quyên¹, Huỳnh Hữu Đức¹, Dương Hoa Xô¹

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh là một loài thực vật đặc hữu, quý hiếm của Việt Nam, đồng thời là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax*. Nhằm mục tiêu khai thác một cách có hiệu quả một số dược chất có giá trị cao trong sâm Ngọc Linh thông qua nuôi sinh khối rễ tóc, 10 dòng rễ tóc Sâm Ngọc Linh có triển vọng được tiến hành đánh giá; sau đó thiết lập điều kiện nhân sinh khối thích hợp cho dòng được chọn lọc trên bioreactor 20 lít. Kết quả đánh giá, phân tích các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh sau 90 ngày nuôi cấy cho thấy tất cả các dòng đều có tăng sinh khối và có khả năng tích lũy saponin. Trong đó, các dòng 0, 2, 4, 6, 8, A đạt sinh khối 11,4 - 12,6 g/bình cao hơn các dòng còn lại; các dòng 0, 4, 5, 8, 33 tích lũy saponin cao đạt 3,2 - 3,7 mg/g. Từ các kết quả trên, dòng rễ tóc số 8 được chọn lọc tiến hành phân tích các saponin thành phần đạt tương tự sâm Ngọc Linh ngoài tự nhiên như Rg1 0,73 mg/g, MR2 0,032 mg/g, VR17,320 mg/g, Rb1 0,034 mg/g, Rd 0,002 mg/g. Kết quả đánh giá các thông số về thể tích môi trường nuôi cấy và thời gian bổ sung môi trường vào bioreactor 20 lít cho thấy thể tích môi trường 10 lít thích hợp để nuôi cấy rễ tóc sâm Ngọc Linh. Ngoài ra, việc sử dụng thể tích môi trường ban đầu là 6 lít và sau khi nuôi cấy 20 ngày bổ sung thêm 4 lít môi trường giúp cải thiện cả sinh khối (hệ số nhân 12,5 lần) và hàm lượng saponin tổng số bằng 12,27%.

Từ khóa: Bioreactor, Sâm Ngọc Linh, saponins, nuôi cấy rễ tóc

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm Ngọc Linh còn được gọi là sâm Việt Nam, sâm Khu 5 hay là cây Thuốc Giấu, có tên khoa học là *Panax vietnamensis* Ha et Grushv., mọc tập trung ở chân núi Ngọc Linh cao 2.578 m (thuộc địa phận hai tỉnh Quảng Nam và Kon Tum), do đó mà loài sâm này được đặt tên là sâm Ngọc Linh. Sâm Ngọc Linh trở thành loài quý hiếm bởi nó chứa một số hoạt chất có giá trị về mặt dược học. Sâm Ngọc Linh là một trong những loài sâm có hàm lượng saponin nhiều nhất so với các loài khác của chi *Panax* trên thế giới và có lượng saponin khung dammaran cao nhất (khoảng 12 - 15% tổng lượng saponin). Ở sâm Ngọc Linh, lượng saponin ocotillol vượt trội so với những loại sâm cùng chi *Panax* như majonoside-R2, thuộc nhóm saponin có cấu trúc mạch nhánh ocotillol tạo nên hoạt tính đặc hữu của nhân sâm Việt Nam. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Minh Đức và cộng tác viên (1993), Võ Duy Huấn (2001), Trần Lê Quan và cộng tác viên (2001), Nguyễn Thượng Dong và cộng tác viên (2007), trong thân rễ của sâm Ngọc Linh chứa hơn 52 hoạt chất saponin (ginsenoside), trong đó có 26 hợp chất có cấu trúc hoá học đã biết và 26 saponin có cấu trúc mới không có trong các loại nhân sâm khác được đặt tên là vina-ginsenoside-R1-R24. Sâm Ngọc Linh đặc biệt chứa chất majonoside-R2, đây là saponin nhóm ocotillol chiếm hơn nửa tổng số hàm lượng saponin của sâm Ngọc Linh và là nhóm chất có tác dụng quyết định đến chất lượng loài sâm Việt (Nguyễn Minh Đức và *ctv.*, 1993;

Trần Lê Quan và *ctv.*, 2001). Cũng theo nhóm tác giả này, thân củ sâm có chứa các hợp chất polyacetylen, trong đó 7 hợp chất polyacetylen được phân lập ở phân đoạn ít phân cực và 5 hợp chất đã được xác định cấu trúc. Ngoài ra, trong sâm Ngọc Linh còn chứa 17 thành phần acid béo, 18 acid amin, 20 nguyên tố vi lượng và các hợp chất sterol cụ thể là β -sitosterol và daucosterin (β -sitosteryl-3- α -D-glucopyranosid) (Đỗ Huy Bích và *ctv.*, 2004). Trong củ và rễ sâm còn chứa các hợp chất glucid như đường tự do, đường toàn phần, tinh dầu, vitamin C (Nguyễn Thượng Dong và *ctv.*, 2007).

Hiện nay trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng hệ thống nuôi cấy bioreactor trong sản xuất sinh khối rễ tóc trên đối tượng là sâm Triều tiên (Dewir *et al.*, 2010; Mallol *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2002). Trong các nghiên cứu này, các dòng rễ tóc được tạo ra và sàng lọc nhằm tìm ra các dòng tối ưu, sau đó được tiến hành nuôi cấy trên các hệ thống bioreactor khác nhau nhằm mục tiêu thu được sinh khối cao nhất. Ở Việt Nam, một số nghiên cứu về chuyển gen tạo rễ tóc sâm hay nuôi cấy rễ tóc (Nguyễn Thị Liễu và *ctv.*, 2011) đã được thực hiện và bước đầu đã thực hiện việc nhân sinh khối (Trịnh Thị Hương và *ctv.*, 2016). Tuy nhiên, hiện nay trong nước chưa có nghiên cứu thực hiện một quy trình hoàn thiện từ việc sàng lọc và đánh giá các dòng rễ tóc đến việc nuôi cấy nhân sinh khối rễ tóc theo từng giai đoạn và tiến tới sản xuất trên bioreactor thể tích lớn (20 lít) nhằm mục tiêu sản

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học TP. Hồ Chí Minh

xuất trên quy mô lớn. Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã và đang tiến hành các nghiên cứu nhằm thiết lập các điều kiện phù hợp cho việc sản xuất sinh khối sâm đạt hiệu quả. Kết quả nghiên cứu bước đầu, Trung tâm đã tạo và sàng lọc được 31 dòng rễ tóc tái sinh tốt từ hơn 350 dòng rễ chuyển gen. Kết quả nghiên cứu bước đầu về thành phần hoạt chất saponin tổng và saponin thành phần trong một số dòng rễ tóc rễ chuyển gen so với thành phần trong thân rễ sâm Ngọc Linh trồng ở Ngọc Linh 6 năm tuổi tương tự như rễ ngoài tự nhiên (Hà Thị Loan và *ctv.*, 2014, 2016). Các kết quả này đã mở ra triển vọng cho việc sản xuất sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên quy mô lớn. Trong nghiên cứu này, đã tiến hành đánh giá và sàng lọc khả năng nhân sinh khối và tích lũy saponin tổng số của 10 dòng rễ tóc có triển vọng từ đó chọn lọc dòng rễ tóc phù hợp cho việc nghiên cứu và đánh giá tiếp theo trên quy mô bioreactor 20 lít. Trong đó, năng suất và chất lượng (hàm lượng các saponin thành phần) của sinh khối rễ tóc cũng được phân tích và đánh giá nhằm đảm bảo tính hiệu quả khi áp dụng trên quy mô sản xuất lớn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Rễ tóc sâm Ngọc Linh được tạo ra bằng cách lây nhiễm vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* 15834 dạng hoang dại vào phiến lá và cuống lá cây con sâm Ngọc Linh *in vitro*. Các dòng rễ tóc được tạo ra nhờ vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* do kết quả của việc chuyển DNA (T-DNA) trong Ri- plasmid ở vi khuẩn được chuyển và biểu hiện ở tế bào chủ. Từ các dòng rễ tóc có khả năng tái sinh ban đầu, 10 dòng rễ tóc có khả năng nhân sinh khối và tích lũy saponin được tiến hành đánh giá và sàng lọc trong thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1: Đánh giá và sàng lọc các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh phù hợp cho nhân sinh khối trên quy mô bioreactor 20 lít

Vật liệu: 10 dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh có khả năng nhân sinh khối và tích lũy saponin: 0, 4, 5, 6, 7, 8, 33, 35, 59, A.

Thí nghiệm gồm 10 nghiệm thức (NT). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 6 chai nước biển chứa 500 ml môi trường làm việc. Khối lượng mẫu ban đầu: 1,0 g. Thể tích môi trường nuôi cấy là 120 ml.

Điều kiện nuôi cấy: Các mẫu cấy đặt trong phòng nuôi có ánh sáng khuếch tán 80 - 100 lux, nhiệt độ

21°C ± 2°C; độ ẩm 57% ± 5%. Môi trường nuôi cấy khoáng cơ bản SH bổ sung 60g đường/l. Thời gian nuôi cấy 90 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng rễ tươi, khối lượng rễ khô, saponin tổng số.

2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy ban đầu đến sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin trong sinh khối

Vật liệu: dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh được chọn lọc từ thí nghiệm 1.

Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức (8, 10, 12 lít môi trường) nhằm đánh ảnh hưởng của môi trường cũng như độ thông thoáng đến sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 1 bình bioreactor.

Điều kiện nuôi cấy: các mẫu cấy đặt trong phòng nuôi có ánh sáng khuếch tán 80-100 lux, nhiệt độ 21°C ± 2°C; độ ẩm 57% ± 5%. Môi trường nuôi cấy khoáng cơ bản SH bổ sung 60g đường/l. Thời gian nuôi cấy 90 ngày. Mật độ rễ nuôi cấy ban đầu 100g/bình.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng rễ tươi, khối lượng rễ khô, ginsenoside Rb1, Rg1, MR2, VR1.

Bảng 1. Các nghiệm thức thí nghiệm thể tích môi trường nuôi cấy

Nghiệm thức	Thể tích môi trường nuôi cấy
1	8 lít
2	10 lít
3	12 lít

2.2.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của thời gian bổ sung môi trường nuôi cấy đến sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin trong sinh khối

Vật liệu: Dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh được chọn lọc từ thí nghiệm 1 và sử dụng trong thí nghiệm 2.

Dựa trên kết quả thí nghiệm 2 chúng tôi chọn thể tích môi trường phù hợp để bố trí thời gian bổ sung môi trường nuôi cấy. Trong thí nghiệm này tiến hành khảo sát thời gian bổ sung môi trường 0 ngày, 20 ngày và 30 ngày (nghiệm thức bố trí được trình bày trong bảng 2). Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 1 bình bioreactor.

Điều kiện nuôi cấy: Các mẫu cấy đặt trong phòng nuôi có ánh sáng khuếch tán 80 - 100 lux, nhiệt độ 21°C ± 2°C; độ ẩm 57% ± 5%. Môi trường nuôi cấy khoáng cơ bản SH bổ sung 60g đường/l. Thời gian nuôi cấy 90 ngày. Mật độ rễ nuôi cấy ban đầu 100g/bình.

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng rễ tươi, khối lượng rễ khô, ginsenoside Rb1, Rg1, MR2, VR1.

Bảng 2. Các nghiệm thức thí nghiệm thời gian bổ sung môi trường nuôi cấy

TT	Thể tích môi trường ban đầu (lít)	Thời gian bổ sung môi trường (ngày)	Thể tích môi trường bổ sung (lít)	Tổng thể tích môi trường nuôi cấy (lít)
1	10	-	-	10
2	6	20	4	10
3	6	30	4	10
4	6	20	6	12
5	6	30	6	12

2.2.4. Phương pháp phân tích saponin

- Định lượng saponin bằng phương pháp cân:

+ Mẫu thu được tiến hành rửa sạch môi trường nuôi cấy bằng nước máy sau đó xử lý lạnh -80°C tối thiểu trong khoảng thời gian 24 giờ trước khi tiến hành xử lý khô, nghiền và tách chiết saponin.

+ Quy trình tách chiết saponin: Cân chính xác 8 g bột sâm, chiết với 80 ml (× 6 lần) MeOH 70%. Lọc thu lấy dịch, cô thu hồi dung môi đến cạn. Cặn được hòa trong 25 ml nước cất trong bình định mức 25 ml. Rút chính xác 10 ml tinh chế bằng cột SPE C18, thu lấy phân đoạn MeOH 100%. Cô thu hồi dung môi đến cạn, sấy chân không. Cân cặn thu được. Hòa tan cặn với MeOH 70%, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Hàm lượng saponin toàn phần được tính theo công thức:

Saponin toàn phần × 100%

Trong đó: m1: khối lượng được liệu cân (mg); m2: khối lượng cặn thu được (mg).

- Định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC):

+ Hệ thống HPLC: Water 2695 kèm đầu dò Water PDA 2996.

+ Cột: Phenomenex Gemini C18 (250 × 4,6 mm, 5 µm).

+ Pha động: Gồm cetonitril (A) và nước (B) rửa giải theo chương trình gradient.

+ Chuẩn: ginsenoside Rb1, Rg1, MR2, VR1.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 năm 2018 đến tháng 6 năm 2019 tại Trung tâm Công nghệ sinh học Tp. Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc các dòng rễ tóc sâm Ngọc Linh có khả năng tạo sinh khối nhanh và hàm lượng saponin cao

Sau 3 tháng nuôi cấy, các dòng rễ 0, 4, 5, 6, 7, 8, 33, 35, 59, A đều có khả năng nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin (Bảng 1). Trong đó, các dòng rễ 0, 4, 6, 8 và A có khả năng tạo sinh khối tốt hơn các dòng rễ còn lại, sinh khối đạt cao nhất là dòng rễ 0, kế đến là dòng rễ A, 3 dòng rễ còn lại 4, 6, 8 có tốc độ tăng sinh tương đương nhau. Kết quả phân tích hàm lượng saponin tổng số ở 10 dòng rễ thí nghiệm cho thấy: Hàm lượng saponin ở các dòng rễ 0, 4, 5, 8, 33, A có hàm lượng saponin cao hơn các dòng rễ còn lại. Từ các kết quả này, 5 dòng rễ 0, 4, 5, 8, A được tiếp tục duy trì và nhân nhanh, tiếp tục đánh giá tính ổn định để phục vụ cho quá trình sản xuất rễ tóc *in vitro*.

Bảng 4. Kết quả nuôi cấy các dòng rễ tóc sau 90 ngày nuôi cấy trên môi trường SH

STT	Nghiệm thức	Khối lượng tươi (g)	Saponin tổng số
1	0	12,61 a	3,7 a
2	4	11,64 b	3,7 a
3	5	10,39 d	3,6 a
4	6	11,76 ab	3,0 c
5	7	10,65 cd	3,0 c
6	8	11,42 bc	3,2 b
7	33	10,62 cd	3,2 b
8	35	9,77 d	3,0 c
9	59	8,93 e	2,9 cd
10	A	12,04 ab	3,53 a

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, c, d) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan test.

Kết quả phân tích tính ổn định của các dòng rễ tóc cho thấy dòng số 08 cho kết quả tốt nhất. Trên cơ sở đó, tiến hành đánh giá sơ bộ hàm lượng các thành phần saponin chính MR2, VR1 - đại diện cho nhóm Ocotillol, Rg1- đại diện cho nhóm Protopanaxatriol, Rb1- Protopanaxatriol trên dòng rễ số 08 có chứa hàm lượng saponin tổng số 3,2% cho thấy, saponin MR2 xuất hiện dạng vết, nhưng khi bổ sung ligochitosan vào môi trường nuôi cấy kích thích hình thành MR2 là 0,14 mg/g rễ khô, hàm lượng Rg1 là 0,035 mg/g, hàm lượng VR1 là 0,021 mg/g; Rb1 là 0,077 mg/g; Rđ là 0,022 mg/g. Tương tự trên sâm Triều Tiên, việc sàng lọc và đánh giá khả năng nhân nhanh sinh khối đồng thời tích

lũy saponin trong các dòng rễ tóc trước khi thực hiện sản xuất trên quy mô lớn nhằm sản xuất các dược chất cũng được thực hiện bởi Woo và cộng tác viên (2004).

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy ban đầu đến sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin trong sinh khối

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của thể tích môi trường nuôi cấy đến sinh khối thu được, hàm lượng saponin tích lũy trong rễ. Từ khối lượng mẫu ban đầu là 100 g, rễ tóc sâm Ngọc Linh được bổ sung 10 và 12 lít môi trường cho kết quả tốt cho sự nhân nhanh sinh khối (tương ứng với khối lượng tươi là 1.067 g và 1.007 g). Hệ số nhân nhanh sinh khối ở nghiệm thức sử dụng 10 lít môi trường cho hệ số nhân cao nhất đạt 10,7 lần; Ở nghiệm thức sử dụng 12 lít môi trường cho hệ số nhân là 10,07 lần. Nghiệm thức sử dụng 8 lít môi trường nuôi cấy cho kết quả thấp nhất với 797 g sinh khối và hệ số nhân là 7,97. Nguyên nhân có thể do dinh dưỡng trong môi trường không đủ cung cấp cho sự tăng trưởng của rễ tóc.

Kết quả sinh khối khô cho thấy ở thể tích nuôi cấy 10 lít môi trường thu được sinh khối khô cao nhất (105,7 g), kể đến nghiệm thức 12 lít môi trường nuôi cấy và nghiệm thức nuôi cấy 8 lít môi trường có khối lượng khô thấp nhất (Bảng 4).

Bảng 6. Ảnh hưởng thể tích nuôi cấy đến hàm lượng saponin toàn phần và các saponin chính

NT	% saponin toàn phần	Khối lượng (mg/g dược liệu)					Hàm lượng các saponin chính (mg)
		G-Rg1	M-R2	G-Rd	G-Rb1	V-R1	
1	2,87	0,057	0,257	0,042	0,044	4,099	4,499
2	4,76	0,031	0,372	0,110	0,010	4,025	4,548
3	3,12	0,063	0,279	0,178	0,047	3,733	4,300

Các kết quả trên cho thấy, thể tích nuôi cấy 10 lít thích hợp cho sự nhân nhanh sinh khối và tích lũy saponin của dòng rễ tóc số 08 trên quy mô bioreactor 20 lít. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu trên quy mô bioreactor 15 lít của tác giả Dương Tấn Nhật (2016), Choi và cộng tác viên (2003) ghi nhận sự gia tăng đáng kể sinh khối rễ tóc sau 6 và 8 tuần nuôi cấy.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung môi trường lên sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống Bioreactor

Dòng rễ tóc số 08 được nuôi cấy trên bioreactor 20 lít với thể tích môi trường ban đầu 6 lít và bổ sung thêm môi trường sau 20 hoặc 30 ngày với thể tích 4 lít hoặc 6 lít cho kết quả nhân sinh khối và saponin khác biệt (Bảng 7, bảng 8).

Bảng 5. Ảnh hưởng của thể tích môi trường đến sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống Bioreactor

NT	Sinh khối tươi		Sinh khối khô
	Khối lượng tươi/bình (g)	Hệ số nhân sinh khối tươi/bình (g)	Khối lượng khô/bình (g)
1	797 b	7,9 b	82,9 c
2	1067 a	10,7 a	105,7 a
3	1007 a	10,07 a	96,1 b
CV (%)	8,33	8,33	3,6

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, c) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong LSD test.

Kết quả phân tích hàm lượng saponin cho thấy thể tích nuôi cấy từ 8 - 12 lít môi trường ban đầu có sự khác nhau về hàm lượng saponin. Đặc biệt là hàm lượng saponin tổng số bằng phương pháp cân (Bảng 5). Thể tích 8 lít có lượng saponin tổng thấp nhất (2,87%) trong khi nghiệm thức nuôi cấy 10 và 12 lít là 4,76% và 3,12% Hàm lượng saponin thành phần có sự thay đổi nhưng không đáng kể. Hàm lượng 5 saponin thành phần chính biến thiên từ 4,300 - 4,548. Giá trị cao nhất ở nghiệm thức 10 lít với hàm lượng 5 saponin thành phần cao nhất là 4,810. Do vậy, thể tích nuôi cấy 10 lít cho hàm lượng saponin thành phần cao nhất.

Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian bổ sung môi trường đến sự nhân nhanh sinh khối rễ tóc sâm Ngọc Linh trên hệ thống Bioreactor

NT	Sinh khối tươi		Sinh khối khô
	Khối lượng tươi (g)	Hệ số nhân sinh khối tươi	Khối lượng khô (g)
1	1066,7 bc	10,7bc	105,7 b
2	1250,0 a	12,5 a	113,8 a
3	1016,7 c	10,17 c	89,8 c
4	1190,0 ab	11,9 ab	82,2 d
5	956,7 c	9,57 c	74,1 e
CV (%)	7,32	7,32	1,6

Ghi chú: Những chữ cái khác nhau (a, b, c) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong LSD test.

Kết quả sinh khối tươi cho thấy có sự khác biệt giữa các nghiệm thức thí nghiệm giữa việc nuôi cấy ổn định với một thể tích môi trường ban đầu với việc nuôi cấy với giai đoạn đầu 20 - 30 ngày chứa một ít môi trường nhưng sau giai đoạn này tiến hành bổ sung thêm 4 - 6 lít. Ở nghiệm thức 1 là nghiệm thức đối chứng được chọn ra từ nghiệm thức tối ưu của thí nghiệm 1. Với nghiệm thức này môi trường nuôi cấy ban đầu cho đến kết thúc là 10 lít. Nghiệm thức 2 môi trường nuôi cấy ban đầu 6 lít sau 20 ngày nuôi cấy bổ sung thêm 4 lít môi trường cho kết quả tốt nhất (mỗi bình thu được bình quân 1250 g sinh khối rễ khô) và hệ số nhân 12,5 lần. Kế đến là nghiệm thức 4 với thể tích môi trường ban đầu là 6 lít, sau khi nuôi cấy 20 ngày tiến hành bổ sung thêm 6 lít cũng cho kết quả tốt với 1190 g sinh khối rễ tươi và hệ số nhân là 11,9%. Kết quả phân tích thống kê cho thấy không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa 2 nghiệm thức này. Tuy nhiên xét về hiệu quả kinh tế thì nghiệm thức 4 tiêu tốn nhiều môi trường hơn và xét về mặt thống kê nghiệm thức 4 và nghiệm thức đối chứng không có sự khác biệt.

Ở nghiệm thức 3 và 5, bổ sung môi trường tương ứng 4 và 6 lít vào ngày thứ 30 sau cấy cho sinh khối thấp (1016,7 g và 956,7 g). Hai nghiệm thức này không có sự khác biệt về mặt thống kê và không khác biệt so với đối chứng.

Từ kết quả thí nghiệm có thể thấy rằng việc bổ sung môi trường ở giai đoạn 20 ngày nuôi cấy với thể tích 4 lít nâng thể tích lên 10 lít sẽ tốt hơn so với nuôi cấy ổn định với 10 lít môi trường. Trường hợp bổ sung 6 lít môi trường và thời gian bổ sung 30 ngày

sau nuôi cấy không mang lại hiệu quả nguyên nhân có thể giai đoạn 20 ngày cây chuẩn bị cho quá trình phân hóa rễ mới cần môi trường bổ sung. Giai đoạn 30 ngày sau cấy cây vừa phát sinh rễ nhánh bổ sung môi trường có thể đã gây stress làm ảnh hưởng đến sự tăng sinh

Một nguyên nhân khác làm cho nhân nhanh sinh khối khi bổ sung thêm 4 lít môi trường sau 20 ngày là có thể do trong giai đoạn đầu được cấy vào, rễ tóc đang quá trình thích nghi từ môi trường ngập chìm theo chu kỳ sang môi trường ngập hoàn toàn. Lúc này sinh khối rễ tóc còn thấp, nên ở cùng một lưu lượng khí bơm vào thì ở thể tích 6 lít nồng độ oxy hòa tan trong môi trường sẽ cao hơn. Điều này giúp cho quá trình thông thoáng của rễ tóc sinh khối tăng nhanh hơn. Tuy nhiên, việc bổ sung môi trường sau một giai đoạn nuôi cấy cần cẩn thận tránh bị nhiễm nấm do thao tác. Về sinh khối khô, tương tự như sinh khối tươi, sinh khối dòng số 8 đạt cao nhất ở nghiệm thức nuôi cấy ban đầu 6 lít sau 20 ngày bổ sung 4 lít môi trường. Kết quả phân tích hàm lượng saponin (bảng 5) cho thấy bổ sung môi trường trong quá trình nuôi cấy không chỉ làm tăng sinh khối mà còn làm tăng hàm lượng saponin tổng và các thành phần saponin chính. Trong đó, nghiệm thức 2 ngoài cho sinh khối 12,5 lần, saponin tổng số cao (12,89%) và rễ còn chứa đầy đủ các saponin chính. Ngoài ra, khi đánh giá các thành phần saponin chính trong các điều kiện thí nghiệm cũng cho thấy rễ tóc vẫn chứa các thành phần tương tự như rễ sâm trong tự nhiên (Nguyễn Thới Nhâm và *ctv.*, 1979).

Bảng 8. Ảnh hưởng thể tích nuôi cấy đến hàm lượng saponin toàn phần và các saponin chính

NT	% saponin toàn phần	Khối lượng (mg/g dược liệu)					Hàm lượng 5 saponin chính (mg)
		<i>G-Rg1</i>	<i>M-R2</i>	<i>G-Rd</i>	<i>G-Rb1</i>	<i>V-R1</i>	
1	4,76	0,031	0,372	0,110	0,010	4,025	4,548
2	12,27	0,073	0,032	0,002	0,034	7,320	7,461
3	12,89	0,021	0,015	0,009	0,020	4,740	4,805
4	12,04	0,025	0,024	0,000	0,040	6,840	6,929
5	8,42	0,110	0,052	0,000	0,034	11,358	11,554

Kết quả nghiên cứu trên cũng phù hợp với các kết quả của Sivakumar và cộng tác viên (2005), Yu và cộng tác viên (2000), Kochan và cộng tác viên (2013), Zhou và cộng tác viên (2007), Washida và cộng tác viên (1998, 2004) cho thấy khi đã xây dựng được điều kiện môi trường thích hợp cho việc nhân sinh khối rễ tóc của sâm trên bioreactor thì các

ginsenoside thành phần được tạo ra tương ứng với cây ngoài tự nhiên, tuy nhiên có một số khác biệt nhất định về hàm lượng. Kết quả này chứng minh có thể nuôi cấy và sản xuất sinh khối rễ tóc Sâm Ngọc Linh trên bioreactor 20 lít đảm bảo các thông số chất lượng của saponin tổng số và các saponin thành phần.

- Washida D., Shimomura K., Nakajima Y., Takido M., Kitanaka S., 1998. Ginsenosides in hairy roots of a Panax Hybrid. *The Phytochemistry*, 49: 2331-2335.
- Washida D., Shimomura K., Takido M., Kitanaka S., 2004. Auxins Affected Ginsenoside Production and Growth of Hairy Roots in Panax Hybrid. *The Biol. Pharm. Bull.*, 27: 657-660.
- Woo S.S., Song J.S., Lee J.Y., In D.S., Chung H.J., Liu J.R., Choi D.W., 2004. Selection of high ginsenoside producing ginseng hairy root lines using targeted metabolic analysis. *The Phytochemistry*, 65: 2751-2761.
- Yu K.W., Gao W.Y., Son S.H., Kee Y.P., 2000. Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 36: 424-428.
- Zhou L., Cao X., Zhang R., Wu J., 2007. Stimulation of saponin production in *Panax ginseng* hairy roots by two oligosaccharides from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Biotechnol. Lett.*, 29: 631-634.

Screening and fast biomass proliferation of Ngoc Linh ginseng hairy root on 20L bioreactor for large scale production

Ha Thi Loan, Lam Vy Nguyen,
Tran Nguyen Le Quyen, Huynh Huu Duc, Duong Hoa Xo

Abstract

Ngoc Linh ginseng is a rare and endemic plant of Vietnam and one of the ginseng species with the highest saponin content in comparison to other species of Panax genus. In order to effectively exploit the high-value pharmaceuticals in Ngoc Linh ginseng through hairy root biomass production, 10 promising hairy root lines were investigated and screened to select a suitable one; then biomass production condition was established in 20-liter bioreactor. The screening results showed that all hairy root lines increased their biomass and accumulated saponins after 90 days of culture. For fresh biomass, lines 0; 2; 4; 6; 8 and A reached 11.4 - 12.6 g/bottle and were higher than the other lines; for total saponin accumulation capacity, lines 0; 4; 5; 8; 33 reached 3.2 - 3.7 mg/g. From the results, the No. 8 hairy root line was selected for saponin testing, and the result showed that its saponin components was similar to natural Ngoc Linh ginseng root such as Rg1 0.73 mg/g, MR2 0.032 mg/g, VR1 7.320 mg/g, Rb1 0.034 mg/g, Rd 0.002 mg/g. The results of medium volume and medium adding time for 20 liter bioreactor showed that the 10 liters beginning culture medium was suitable for Ngoc Linh ginseng hairy root culture. In addition, the use of an initial medium volume of 6 liters and an additional 4 liters of culture medium after 20 days of culturing improved both biomass (12.5 times) and total saponin content by 12.27%.

Keywords: Bioreactor, Ngoc Linh ginseng, saponins, hairy root culture

Ngày nhận bài: 18/9/2019
Ngày phản biện: 3/10/2019

Người phản biện: PGS. TS. Lê Hùng Lĩnh
Ngày duyệt đăng: 8/11/2019

HIỆU QUẢ PHÒNG TRỪ CÂY BÌM BÌM VÀ TÁC ĐỘNG MÔI TRƯỜNG CỦA THUỐC TRỪ CỎ TẠI ĐÀ NẴNG

Cù Thị Thanh Phúc¹, Đặng Thị Phương Lan¹,
Nguyễn Thị Hằng Nga¹, Đinh Xuân Tùng¹, Phạm Thị Tâm¹,
Nguyễn Thị Thảo¹, Lại Thị Thu Hằng¹, Lê Thanh Tùng¹

TÓM TẮT

Mô hình phòng trừ cây Bìm bìm tại khu Bảo tồn thiên nhiên bán đảo Sơn Trà được thiết lập để đánh giá hiệu quả kỹ thuật và tác động môi trường của biện pháp diệt trừ cây bìm bìm hiện đang phát tán và xâm lấn nặng các khu rừng ở ven biển miền Trung. Kết quả triển khai cho thấy biện pháp sử dụng thuốc trừ cỏ lưu dẫn thuộc hoạt chất Glyphosate và Metsulfuron methyl để đưa thuốc vào thân cây bìm bìm thông qua kỹ thuật truyền dịch và bơm trực tiếp thuốc vào thân cây (sau khi đã cắt bỏ phần ngọn) có thể diệt tận gốc cây bìm bìm ở các kích thước khác nhau; hiệu quả diệt trực tiếp đều đạt 100%. Trường hợp bơm thuốc vào thân nhưng không cắt gốc cũng mang lại hiệu quả tới 99,76%. Việc cải tiến kỹ thuật đưa các thuốc vào thân cây không chỉ mang lại hiệu quả cao mà còn an toàn với môi trường do thuốc hoàn toàn không bị phát tán ra bên ngoài nên kết quả phân tích mẫu đất ở sát gốc cây không

¹ Viện Môi trường Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam