

Ảnh hưởng của thời gian và số lần cấy chuyển đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Vũ Tuấn Anh*, Chủ Văn Mến

Học viện Quân y

Ngày nhận bài 20.4.2015, ngày chuyển phản biện 27.4.2015, ngày nhận phản biện 5.6.2015, ngày chấp nhận đăng 10.6.2015

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 30 lít đã được xác định. Với môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l; kinetin = 0,1 mg/l; đường = 30,0 g/l, pH = 5,6-5,8; nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút, thời gian nuôi cấy tối ưu trên bioreactor 30 lít là 24 ngày, khối lượng tế bào thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt 24,97 mg/g tế bào khô. Sau lần cấy chuyển thứ 2, tế bào cần được chuyển sang môi trường mới ở quy mô cao hơn để đảm bảo tốc độ phát triển tối ưu.

Từ khóa: hoạt chất, số lần cấy chuyển, tế bào sâm Ngọc Linh, thời gian nuôi cấy.

Chỉ số phân loại 3.4

THE EFFECTS OF CULTIVATION TIME AND NUMBER OF TRANSPLANTATIONS IN 30-LITER BIOREACTOR SYSTEM ON THE GROWTH AND BIOACTIVE CONTENT OF PANAX VIETNAMENSIS CELLMASS

Summary

In this study, the effects of cultivation time and number of transplantations in 30-liter bioreactor system on the growth and bioactive content of *Panax vietnamensis* cell mass have been evaluated. The medium composition includes: MS liquid medium supplemented with NAA 1.5 mg/l, kinetin 0.1 mg/l, saccharose 30.0 g/l, pH of 5.6-5.8 at temperature of 24-26°C, speed at 50 rpm, and culture time as variable. The results have shown that: the optimal culture time is 24 days; the cell mass is 31.24 g/l; and total saponin content is 24.97 mg/g dry weight. After the second transplantation, the cells need to be transferred to new and bigger system to get optimal growth and bioactive content.

Keywords: bioactive, cultivation time, number of transplantations, *Panax vietnamensis* cellmass.

Classification number 3.4

Đặt vấn đề

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv) thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae), chủ yếu mọc ở vùng núi Ngọc Linh thuộc hai huyện Đắc Tô (Kon Tum) và Trà My (Quảng Nam). Sâm Ngọc Linh là cây thuốc có nhiều tác dụng sinh học như: bổ dưỡng, tăng lực, chống oxy hóa, chống lão hóa và bảo vệ gan... nên đã bị khai thác kiệt quệ trong tự nhiên [1, 2].

Từ năm 2007, Học viện Quân y đã phối hợp với một số đơn vị trong và ngoài nước thực hiện các đề tài nghiên cứu về nuôi cấy, sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và các chế phẩm liên quan [3-5]. Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu đã thực hiện, Bộ Khoa học và Công nghệ đã đồng ý cho Học viện Quân y thực hiện dự án sản xuất thử nghiệm cấp nhà nước: “Hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất sâm Ngọc Linh sinh khối và chế phẩm tăng lực Vinatonic”. Để thực hiện dự án này, việc nghiên cứu xây dựng quy trình nuôi cấy sâm Ngọc Linh quy mô 30 lít/mẻ rất quan trọng, bởi đây là giai đoạn trung gian tạo giống cấp 2 cho các bước nuôi cấy tiếp theo. Trong bài viết này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất trong sinh khối sâm Ngọc Linh quy mô 30 lít/mẻ.

*Tác giả chính: Email: tuananhb15@yahoo.com

Thực nghiệm

Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Thiết bị: tủ cấy vi sinh - an toàn cấp 2 NU-440-400E, máy lắc Orbital shaker, tủ ẩm có lắc dung tích lớn ISF4-W, Bioreactor 30 lít Biostat C200 (Đức).

- Hóa chất: myo-inositol, acid nicotinic, glycin, pyridoxin hydroclorid, thiamin hydroclorid, kinetin, glucose, sucrose, acid 2,4-dichloro phenoxy acetic, kali nitrat, amoni nitrat, magnesi sulfat, kali dihydro phosphat và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn nuôi cấy.

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: đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít: pha 25 lít môi trường MS, bổ sung thêm NAA 1,5 mg/l, kinetin 0,1 mg/l và saccharose 30 g/l, pH môi trường = 5,8. Hấp diệt khuẩn ở 121°C/25'. Cấy vào bioreactor lượng tế bào theo tỷ lệ 80 g tế bào sâm/lít môi trường. Nuôi cấy tế bào ở điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 24-26°C, độ ẩm 50-60% và tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút. Vào các ngày nuôi cấy thứ 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 tiến hành thu hoạch tế bào. Cân xác định khối lượng tế bào sâm tươi và khối lượng tế bào khô (sấy khô tế bào sâm ở 45-50°C đến khối lượng không đổi). Quy đổi số gam tế bào trong 1 lít môi trường.

Các chỉ tiêu đánh giá:

- Tốc độ phát triển của tế bào theo thời gian dựa trên các chỉ tiêu: khối lượng tế bào tươi, khối lượng tế bào khô và tỷ lệ sinh trưởng.

- Khả năng thích nghi của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít: xác định sau bao nhiêu lần cấy chuyển thì tế bào sâm Ngọc Linh thích nghi với môi trường nuôi cấy trong bioreactor 30 lít.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Chọn môi trường lỏng MS có bổ sung NAA 1,5 mg/l, kinetin 0,1 mg/l và 30 g/l saccharose. Sau ngày thứ 4, 8, 12, 16, 20, 24 và 28, thu hoạch tế bào. Sấy khô và cân xác định khối lượng tế bào cũng như định lượng hàm lượng saponin. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hàm lượng saponin toàn phần của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Khối lượng tế bào khô (g/l)	Khối lượng saponin (mg/g)
4	(1) 7,12±0,73	20,17±2,23
8	(2) 11,36±1,26	20,34±2,28
12	(3) 15,33±1,72	22,14±2,69
16	(4) 20,44±2,48	17,17±2,07
20	(5) 27,26±3,06	18,07±2,23
24	(6) 31,24±3,79	24,97±2,66
28	(7) 29,53±3,56	21,34±2,25

Kết quả thực nghiệm ở bảng 1 cho thấy, không có sự khác biệt giữa kết quả sau các lần thu hoạch tế bào ở các ngày theo kế hoạch nghiên cứu. Khi nuôi tế bào ở môi trường đã được tối ưu, sau 24 ngày khối lượng tế bào khô thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt cao nhất là 24,97 mg/g tế bào khô. Kết quả nghiên cứu thu được chỉ ra rằng, hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh trong bioreactor 30 lít thay đổi không đáng kể so với thời gian nuôi cấy 28 ngày.

Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển trong bioreactor 30 lít đến sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh

Khi nuôi cấy ở quy mô càng lớn thì lượng tế bào ban đầu cho vào càng cao, do vậy mà khả năng cạnh tranh môi trường dinh dưỡng càng lớn. Cần khảo sát mức độ thích nghi và số lần cấy chuyển tế bào ở quy mô này để có được sinh khối tế bào khi thu hoạch đạt số lượng lớn nhất và chất lượng cao nhất. Tiến hành nuôi cấy tế bào sâm Ngọc Linh theo đúng quy trình như đã trình bày trong các nội dung nghiên cứu trước, theo dõi sự phát triển, đến thời điểm thu hoạch sinh khối tế bào tiến hành cân khối lượng tươi và khô. Xác định hàm lượng saponin toàn phần bằng phương pháp cân. Kết quả đánh giá khả năng thích nghi tế bào với điều kiện nuôi cấy trên môi trường lỏng trong bioreactor 30 lít bằng cách cấy chuyển tế bào nhiều lần trên cùng loại môi trường được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2: tỷ lệ sinh trưởng của tế bào sâm Ngọc Linh sau các lần cấy chuyển

Lần cấy chuyển	N	Khối lượng tế bào sâm (g/l)		Tỷ lệ sinh trưởng (lần)	Hàm lượng saponin (%)
		Khối lượng tươi	Khối lượng khô		
Lần 1	10	440,8±9,63	31,30±1,21	4,51±0,10	2,14±0,24
Lần 2	10	442,4±10,21	30,97±1,03	4,53±0,13	2,12±0,21
Lần 3	10	425,6±8,56	29,80±0,97	4,32±0,15	2,15±0,24
Lần 4	10	409,6±7,48	28,67±0,85	4,12±0,11	2,19±0,22
P		$p_{4-1, 4-2, 4-3, 3-1, 3-2} < 0,05; p_{3-4} > 0,05$			

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, ở lần cấy chuyển thứ 2, tốc độ phát triển của tế bào đạt cao nhất là 4,53±0,13 lần; ở lần cấy chuyển thứ 3, tốc độ phát triển của tế bào có xu hướng giảm đi so với các lần trước (4,32±0,15 lần) và tiếp tục giảm ở lần cấy chuyển thứ 4 (4,12±0,11 lần). Các tế bào sau lần cấy chuyển thứ 4 không còn liên kết với nhau nữa, hình thái các tế bào sáng, màng tế bào mỏng. Tuy nhiên, tốc độ phát triển của tế bào ở lần cấy chuyển thứ 4 tiếp tục giảm so với lần cấy chuyển thứ 3, điều đó chứng tỏ qua các lần cấy chuyển ở các môi trường thạch khi nuôi cấy trong bình tam giác, trong môi trường lỏng ở các quy mô khác nhau các tế bào có xu hướng già đi và thoái hóa. Do vậy, đến lần cấy chuyển thứ 2 cần phải chuyển tế bào sang môi trường mới ở quy mô lớn hơn hoặc tiếp tục cấy chuyển ở quy mô đó đến lần cấy chuyển 4 và tiến hành thu hoạch sinh khối tế bào.

Theo kết quả ở bảng 2, sau lần cấy chuyển thứ 4, khi định lượng hàm lượng saponin chúng tôi thấy rằng, không có sự khác biệt rõ ràng ở hàm lượng saponin

toàn phần giữa lần cấy chuyển thứ 1, 2, 3 và lần cấy chuyển thứ 4, do vậy có thể kết luận rằng số lần cấy chuyển không ảnh hưởng lớn tới hàm lượng hoạt chất của tế bào sâm Ngọc Linh khi không bổ sung elicitor.

Kết luận

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy và số lần cấy chuyển tới sự phát triển và hàm lượng hoạt chất của sinh khối sâm Ngọc Linh trên hệ thống bioreactor 30 lít đã được xác định. Với môi trường MS bổ sung NAA = 1,5 mg/l, kinetin = 0,1 mg/l, đường = 30,0 g/l, pH = 5,6-5,8, nhiệt độ nuôi cấy là 24-26°C, không có ánh sáng, tốc độ cánh khuấy là 50 vòng/phút, thời gian nuôi cấy tối ưu trên bioreactor 30 lít là 24 ngày, khối lượng tế bào thu được là 31,24 g/l và khối lượng saponin toàn phần đạt 24,97 mg/g tế bào khô. Sau lần cấy chuyển thứ 2, tế bào cần được chuyển sang môi trường mới ở quy mô cao hơn để đảm bảo tốc độ phát triển tối ưu.

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.
- [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 cộng sự (2009), *Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh*, Bằng độc quyền sáng chế.
- [5] Nguyễn Văn Long và cộng sự (2010), *Nghiên cứu bào chế nước tăng lực Vinatonic phục vụ sức khỏe cộng đồng*, đề tài cấp Bộ Quốc phòng.