

SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY TẾ BÀO THỰC VẬT

Phạm Thị Mỹ Trâm⁽¹⁾, Ngô Kế Sương⁽³⁾, Lê Thị Thuỷ Tiên⁽²⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một, (2) Trường Đại học Bách Khoa (VNU-HCM);

(3) Viện Sinh học Nhiệt đới TP HCM

Ngày nhận bài 21/03/2019; Ngày gửi phản biện 29/03/2019; Chấp nhận đăng 02/05/2019

Email: tramptm@tdmu.edu.vn

Tóm tắt

Nuôi cấy tế bào thực vật là một trong những phương được quan tâm nghiên cứu để thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị, được sử dụng làm phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm. Sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật in vitro hoàn toàn được kiểm soát chặt chẽ, độc lập với sự thay đổi của khí hậu và điều kiện đất trồng. Nhiều trường hợp việc tổng hợp hóa học các hợp chất thứ cấp là không thể hoặc không khả thi về mặt kinh tế. Hơn nữa, các chất phụ gia thực phẩm tự nhiên được người tiêu dùng ưa thích hơn so với những sản phẩm được sản xuất nhân tạo. Trong bài báo này, chúng tôi tổng quan về các hợp chất thứ cấp chính có trong thực vật cũng như vai trò của chúng trong đời sống. Đồng thời, ghi nhận các ưu điểm của phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật thu nhận hợp chất có hoạt tính sinh học, cùng với việc giới thiệu các hợp chất thực vật đã được sản xuất thương mại.

Từ khoá: dược liệu, hợp chất thứ cấp, nuôi cấy tế bào thực vật, phụ gia thực phẩm, mỹ phẩm

Abstract

PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES IN PLANT CELL CULTURE METHOD

Plant cell culture is one of the interesting methods to produce valuable secondary metabolites, such as food additives, cosmetics and pharmaceuticals. The synthesis of secondary metabolites from plant cell culture in vitro is strictly controlled, independent of climate change and soil conditions. In many cases, chemical synthesis of secondary metabolites is not possible or economically feasible. Moreover, natural food additives are preferred by consumers to manufactured products. In this paper, we have an overview of the major secondary metabolites in plant as well as their roles in life. And the advantages of plant cell culture methods that are used to collect bioactive compounds were noted, along with the introduction of commercially plant compounds.

1. Giới thiệu

Thực vật, với khoảng 250.000 loài, là nguồn cung cấp các hợp chất dùng làm dược liệu hoặc phụ gia thực phẩm có giá trị. Những sản phẩm này được biết như là các chất trao đổi thứ cấp, thường được hình thành với một lượng rất nhỏ trong cây và chức năng trao đổi chất chưa được biết

đến đầy đủ. Chúng dường như là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với môi trường (bảo vệ chống lại các mầm bệnh, bảo vệ chống lại tia cực tím) (Mulbagal & Tsay, 2004). Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), 80% dân số thế giới dựa vào y học cổ truyền để chăm sóc sức khỏe, trong đó chủ yếu là thuốc từ cây cỏ. Ngoài ra, thực vật là nguồn nguyên liệu để sản xuất nhiều loại thuốc hiện đại như analgesic, aspirin, có nguồn gốc từ loài *Salix* và *Spiraea*; thuốc chống ung thư như paclitaxel và vinblastine (Pant, 2014).

Khoảng 25 - 28% các loại thuốc hiện tại có nguồn gốc từ thực vật bậc cao và hơn 60% thuốc chống ung thư có nguồn gốc trực tiếp hoặc gián tiếp từ thực vật. Theo BBC, thuốc có nguồn gốc từ thực vật sẽ tăng từ 29,3 tỷ đô la trong năm 2017 lên khoảng 39,2 tỷ đô la vào năm 2022 với tốc độ tăng trưởng hàng năm là 5,9% (Gonçalves & Romano, 2018). Các hợp chất thứ cấp quan trọng trong ngành dược hiện nay được thu nhận 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. Hơn nữa, việc trồng dược liệu có thể gặp nhiều khó khăn như: lợi nhuận thấp do cây tăng trưởng chậm, yếu tố khí hậu không thích hợp khi canh tác ở nhiều nơi khác nhau, sâu hại, dịch bệnh cây trồng, tình trạng thiếu lao động trong chăm sóc 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. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật là một phương pháp tiêu biểu cho tiềm năng thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị. Hiện nay, sản xuất các hợp chất thứ cấp trên qui mô lớn bằng phương pháp nuôi cấy tế bào đã được thực hiện trên nhiều loài cây dược liệu khác nhau như shikonin từ nuôi cấy tế bào của *Litospersum erythrorhizon*, berberine từ *Coptis japonica* và sanguinarine từ *Papaver somniferum* (Smetanska, 2008). Xuất phát từ cơ sở trên, bài viết này mong muốn cung cấp thêm những thông tin về “**thu nhận hợp chất thứ cấp bằng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật**”, qua đó chúng ta thấy rõ hơn vai trò của hợp chất thứ cấp từ thực vật cũng như ứng dụng công nghệ sinh học vào trong đời sống.

2. Hợp chất thứ cấp từ thực vật

Cây dược liệu là một trong những nguồn thuốc cứu sống phần lớn dân số thế giới. Hợp chất có hoạt tính sinh học được chiết xuất từ thực vật hiện đang được ứng dụng rất nhiều trong công nghiệp như: hóa chất nông nghiệp, phụ gia thực phẩm, dược phẩm (bảng 1). Các hợp chất này thuộc về một nhóm được gọi là hợp chất thứ cấp (Mulbagal & Tsay, 2004).

Bảng 1. Tầm quan trọng của các sản phẩm từ thực vật trong công nghiệp
(Bhojwani & Razdan, 1996)

1. Dược phẩm	Ajmalicine, atropine, berberine, codeine,
a. Alkaloid	reserpine, vincristine, vinblastine
b. Steroid	Diosgenin
c. Cardenolide	Digitoxin, digoxin
2. Phụ gia thực phẩm	Stevioside, thaumatin
a. Chất tạo vị ngọt	Quinine
b. Chất tạo vị đắng	Crocin
c. Chất màu	
3. Chất màu và tinh dầu	Shikonin, anthocyanin, betalin

a. Chất màu b. Tinh dầu	Hoa hồng, hoa lài, oải hương
4. Hóa chất nông nghiệp và hóa chất tinh chế a. Hóa chất nông nghiệp b. Hóa chất tinh chế	Pyrethrin, salannin, azadirachtin Protease, vitamin, lipid, dầu

Các hợp chất thứ cấp có thể được phân loại đơn giản, bao gồm các nhóm chính: terpene, phenolic và alkaloid (Agostini-Costa và cs., 2014).

Nhóm terpene: Terpene, hoặc isoprenoid, là một trong những loại hợp chất thứ cấp đa dạng nhất. Theo từ điển “Dictionary of Natural Products” đã liệt kê trên 30000 sản phẩm thuộc nhóm này, chủ yếu có nguồn gốc thực vật, bao gồm các chất mùi vị, kháng sinh, hóc môn động thực vật, lipid màng, chất kháng côn trùng,... (Anurag và cs., 2015). Terpenoid là nhóm sản phẩm tự nhiên lớn nhất và đa dạng nhất, có cấu tạo từ các phân tử tuyến tính đến đa phân tử và có kích thước từ 5-carbon hemiterpene đến cao su tự nhiên, bao gồm hàng nghìn đơn vị isoprene. Tất cả các terpenoid được tổng hợp thông qua việc ngưng tụ các đơn vị isoprene (C5) và được phân loại theo số lượng năm đơn vị carbon có trong cấu trúc lõi (Agostini-Costa và cs., 2014). Nhiều tinh dầu thực vật, như menthol, linalool, geraniol và caryophyllene được tạo thành bởi các monoterpene (C10), với hai đơn vị isoprene, và sesquiterpene (C15), với ba đơn vị isoprene. Các hợp chất khác, như diterpenes (C20), triterpenes (C30) và tetraterpene (C40) cũng có đặc tính rất đặc biệt (Anurag và cs., 2015).

Nhóm phenolic: Tất cả các chất thuộc nhóm phenol có đặc trưng là đều chứa ít nhất một vòng thơm gắn với một hoặc nhiều nhóm hydroxyl. Hơn 8000 cấu trúc phenol đã được tìm thấy và chúng được phân bố rộng rãi ở các loài thực vật. Chúng có cấu trúc từ đơn giản với một vòng thơm cho đến các polymer phức tạp như tannin, lignin. Chúng có thể được phân loại dựa trên số lượng và sự bố trí của các nguyên tử carbon và chúng được tìm thấy kết hợp với đường và các acid hữu cơ. Nhóm phenol có thể được phân thành hai nhóm nhỏ hơn là: flavonoid và phi flavonoid. Các hợp chất phenol từ thực vật là một trong những nhóm hợp chất thứ cấp lớn nhất có ở rau quả, chè, ca cao,... Chúng có nhiều tính chất có lợi nên được nghiên cứu nhiều trong các lĩnh vực hóa học, sinh học, nông nghiệp và y học. Chúng được đặc trưng bởi các tính chất chống oxy hoá, chống viêm, chống lại các chất gây ung thư và một số bệnh khác. Các chất phenol đơn giản là các chất diệt khuẩn và gây mê (Justin và cs., 2014).

Nhóm alkaloid: Các alkaloid có dạng tinh thể là các hợp chất chứa nitơ, có thể được tách chiết bằng cách dùng dung dịch acid. Alkaloid có hoạt tính sinh lý trên tất cả động vật và được sử dụng trong công nghiệp dược (Nguyễn Hoàng Lộc, 2007). Ngoài carbon, hydro và nitơ, nhóm này cũng có thể chứa oxy, lưu huỳnh và hiếm khi có các nguyên tố khác như clo, brom và phospho. Alkaloid được tạo ra bởi rất nhiều sinh vật, như vi khuẩn, nấm, động vật nhưng chủ yếu từ thực vật. Hầu hết trong số chúng là độc đối với các sinh vật khác. Chúng có tác dụng dược lý đa dạng và được sử dụng làm thuốc chữa bệnh từ rất lâu (Justin và cs., 2014).

3. Nuôi cấy tế bào thực vật

Những nghiên cứu về các hợp chất thứ cấp có nguồn gốc từ thực vật đã phát triển từ cuối những năm 50 của thế kỷ XX. Các hợp chất thứ cấp quan trọng trong công nghiệp như: nước hoa, thuốc diệt côn trùng, thuốc trị liệu, thuốc kháng sinh... Chúng có thể được thu nhận từ phương pháp

nuôi cấy mô tế bào thực vật như một sự thay thế cho cây trồng. Việc sản xuất quy mô lớn đầu tiên đã được thực hiện thành công đối với hợp chất shikonin được chiết xuất từ cây *Lithospermum erythrorhizon*. Kể từ đó, nhiều hợp chất thứ cấp có giá trị như taxol, berberine,... đã được thu nhận bằng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật (Misawa, 1994).

Nuôi cấy tế bào thực vật được khởi đầu thông qua sự hình thành một khối các tế bào không phân hóa, gọi là "mô sẹo". Mô sẹo hình thành từ các mô hoặc cơ quan đã phân hóa dưới điều kiện đặc biệt (vết thương, xử lý các chất điều hòa sinh trưởng,...). Sau đó, mô sẹo sẽ được chuyển vào môi trường lỏng, được lắc liên tục trên máy lắc vòng với tốc độ thích hợp nhằm cung cấp đầy đủ oxy cho tế bào. Trong quá trình nuôi cấy, tế bào có thể tách rời hoặc kết thành cụm nhỏ, gọi là huyền phù tế bào (Nguyễn Đức Lượng & Lê Thị Thủy Tiên, 2006).

Nuôi cấy tế bào thực vật có thể giúp cho quá trình thu nhận hợp chất thứ cấp được liên tục và ổn định. Phương pháp này có nhiều ưu điểm mà các nhà khoa học quan tâm như (Fischer và cs., 1999; Smetanska, 2008; Vijaya Sree và cs., 2010): (1) Hợp chất thứ cấp có giá trị được sản xuất trong điều kiện có kiểm soát chặt chẽ, độc lập với sự thay đổi của khí hậu và điều kiện đất trồng; (2) Hàm lượng của một số hợp chất thứ cấp được thu nhận từ nuôi cấy tế bào có thể cao hơn so với cây ngoài tự nhiên; (3) Tránh ảnh hưởng sinh học (vi sinh vật và côn trùng) đến các tế bào thực vật được nuôi cấy; (4) Các tế bào của bất kỳ loài thực vật nào cũng có thể được nuôi cấy để phục vụ cho mục đích sản xuất các hợp chất thứ cấp; (5) Thiết bị có thể tự động kiểm soát sự tăng trưởng của tế bào và điều hòa các quá trình chuyển hóa do vậy sẽ làm giảm chi phí lao động và cải thiện năng suất; (6) Quá trình tách chiết các hợp chất thứ cấp từ tế bào thực vật *in vitro* khá đơn giản. Đây là một ưu điểm để áp dụng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật với mục đích thương mại; (7) Nuôi cấy tế bào thực vật có khả năng tổng hợp các chất mà những chất này có thể không được tìm thấy trong cây nguyên vẹn; (8) Bên cạnh đó, những kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy kỹ thuật nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật cũng được sử dụng để sản xuất các sản phẩm protein tái tổ hợp.

Việc khám phá ra phương pháp nuôi cấy tế bào có khả năng sản xuất các hợp chất dùng làm thuốc với một lượng tương tự hoặc nhiều hơn so với thực vật nguyên vẹn đã tăng tốc nhiều năm qua. Một số khảo sát về nuôi cấy tế bào thực vật để sản xuất các loại dược phẩm quan trọng được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Một số hợp chất thứ cấp được sản xuất từ nuôi cấy tế bào thực vật (Misawa, 1994)

Hợp chất thứ cấp	Loài thực vật	Hiệu suất (% trọng lượng khô)		Loại nuôi cấy
		Nuôi cấy tế bào	Thực vật nguyên vẹn	
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1,5	s
Ginsenoside	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	c
Anthraquinones	<i>Morinda citrifolia</i>	18	0,3	s
Ajmalicine	<i>Catharanthus roseus</i>	1,0	0,3	s
Rosmarinic acid	<i>Coleus blumei</i>	15	3	s
Ubiquinone-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,036	0,003	s
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoides</i>	2	2	s
Benzylisoquinoline Alkaloids	<i>Coptis japonica</i>	11	5 - 10	s

Berberine	<i>Thalictrum minor</i>	10	0,01	s
Berberine	<i>Coptis japonica</i>	10	2 - 4	s
Anthraquinones	<i>Galium verum</i>	5,4	1,2	s
Anthraquinones	<i>Galium aparine</i>	3,8	0,2	s
Nicotine	<i>Nicotiana tabacum</i>	3,4	2,0	c
Bisoclaurine	<i>Stephania cepharantha</i>	2,3	0,8	s
Triptolide	<i>Tripterygium wilfordii</i>	0,05	0,001	s

Chú thích: * s = suspension (nuôi cấy huyền phù tế bào); c = callus (nuôi cấy mô sẹo)

4. Những thành tựu về thu nhận hợp chất thứ cấp được thương mại hoá bằng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật

Hệ thống nuôi cấy tế bào thực vật có tiềm năng cải thiện việc thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị trong y dược, hương liệu, nước hoa và chất màu mà không thể được sản xuất bởi các tế bào vi khuẩn hoặc tổng hợp bằng con đường hóa học. Những năm gần đây, sự phát triển của hợp chất thứ cấp có giá trị kinh tế cao là kết quả được mong đợi nhất trong lĩnh vực nghiên cứu này. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào được khởi xướng từ cuối những năm 60 của thế kỷ XX như một công cụ hữu ích để nghiên cứu và sản xuất hợp chất thứ cấp thực vật.

Taxol: Một trong những hợp chất thứ cấp rất có giá trị trong điều trị ung thư là taxol. Năm 1962, Barclay đã thu thập mẫu từ loài thông đỏ Thái Bình Dương *Taxus brevifolia* và ban đầu cho thấy vỏ của cây này có khả năng gây độc đối với dòng tế bào ung thư biểu mô. Đến năm 1971, hai nhà khoa học Wall và Wani đã công bố cấu trúc hoàn chỉnh của taxol, một hợp chất có khả năng chống ung thư đầy hứa hẹn. Năm 1979, Susan Horwitz, một dược sĩ thuộc Đại học Y khoa Albert Einstein ở New York đã phát hiện ra phương thức hoạt động độc đáo của taxol. Nếu như các chất chống ung thư trước đây đã tiêu diệt các tế bào ung thư bằng cách ức chế sự phân chia của tế bào nhờ ngăn chặn việc sản xuất các sợi vi ống thì taxol lại kích thích sự phát triển của chúng. Các tế bào được xử lý bằng taxol tạo ra rất nhiều vi ống đến mức chúng không thể phối hợp phân chia tế bào. Kết quả là, các tế bào chết vì tiếp tục cố gắng sao chép DNA của chúng trong trường hợp không có khả năng phân chia. Nhưng phải mất hơn 20 năm để hợp chất taxol tiếp cận thị trường dưới dạng thuốc hoá trị. Có nhiều lí do cho sự chậm trễ này, nhưng một trong những nguyên chính là nguồn cung cấp: chiết xuất taxol từ *T. brevifolia* rất khó khăn và cây phát triển rất chậm nên chỉ mang lại một lượng nhỏ hợp chất. Hơn nữa, khi vỏ cây bị khai thác thì cây sẽ chết (Ginsberg, 2003). Hiện nay, taxol đã được sản xuất trên quy mô lớn bằng sự bán tổng hợp từ các tiền chất DAB và baccatin III hoặc nuôi cấy tế bào thực vật. Fett-Neto và cs. (1992) đã khởi đầu việc nuôi cấy huyền phù tế bào *Taxus cuspidate* để thu nhận hợp chất taxol. Srinivasan và cs. (1995) đã nghiên cứu quá trình sản xuất taxol bằng nuôi cấy tế bào của *T. baccata* trong các bioreactor 1 l có cánh khuấy hay bổ sung hỗn hợp khí nén. Hàm lượng taxol đạt 1,5 mg/l. Navia-Osorio và cs. (2002) đã nuôi cấy tế bào *T. baccata* var. *fastigiata* và *T. wallichiana* trong bioreactor 20 l có sục khí ở đáy bình. Hàm lượng taxol và baccatin III cao nhất đạt 21,04 mg/l và 25,67 mg/l ở ngày thứ 28 của quá trình nuôi cấy tế bào *T. Wallichian*. Sự sản xuất taxol đã đạt đến mức độ cao (295 mg/l) khi nuôi cấy hai giai đoạn tế bào *T. x. media* trong hệ thống nuôi cấy qui mô lớn (Tabata, 2004). Như vậy, để sản xuất taxol thương mại, phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật trong các bioreactor được thiết kế tối ưu hoá là một lựa chọn. Phyton Biotech là công ty nuôi cấy tế bào thực vật đạt chuẩn GMP lớn nhất thế

giới đang sử dụng bioreactor 75000 l để sản xuất taxol với năng suất 880000 l mỗi năm (Gonçalves & Romano, 2018).

Camptothecin: Camptothecin là một alkaloid được chiết xuất từ cây *Camptotheca acuminata* vào năm 1966 bởi Wall, Wani và cs.. Nhưng mãi đến năm 1985 thì cơ chế tác động của camptothecin mới được xác định. Camptothecin có khả năng bẫy enzyme topoisomerase I, trong phức hợp với DNA. Điều này ngăn chặn sự sao chép DNA của tế bào ung thư và dẫn đến cái chết của tế bào ung thư. Hiện nay, các sản phẩm tan trong nước được bán tổng hợp từ camptothecin như topotecan, irinotecan, là các chất gây ức chế enzyme topoisomerase I duy nhất được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ cấp phép làm thuốc chống ung thư buồng trứng, phổi, vú và ruột kết (Asano và cs., 2004). Saito và cs. (2001) đã nghiên cứu sản xuất camptothecin từ rễ tơ *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae) với sự lây nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* 15834. Sinh khối rễ tơ tăng lên gấp 16 lần sau 5 tuần nuôi cấy. Hàm lượng camptothecin đạt 0,1% so với trọng lượng khô của tế bào rễ. Sudo và cs. (2002) đã tiến hành nuôi cấy rễ tơ *Ophiorrhiza pumila* qui mô lớn bằng cách sử dụng bioreactor 3 l. Hàm lượng camptothecin đạt 22 mg/mẻ sau 8 tuần nuôi cấy. Trong đó, hàm lượng camptothecin tiết vào môi trường khoảng 17%.

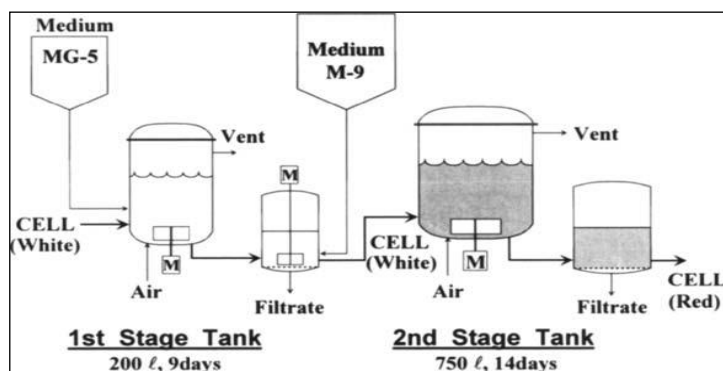
Podophyllotoxin: Không phải từ bây giờ mà từ hàng ngàn năm trước, con người đã sử dụng các loại thực vật trong việc điều trị nhiều loại bệnh khác nhau. Hai loại thực vật đầu tiên được nghiên cứu vào những năm 1950 là *Podophyllum peltatum* (táo ma) và *Catharanthus roseus* (dừa cạn) (Gonçalves & Romano, 2018). Nghiên cứu này khởi nguồn từ bài thuốc dân gian của người Ấn Độ tại Mỹ sử dụng dịch chiết từ rễ cây táo ma để điều trị ung thư da và bệnh sùi mào gà. Các nghiên cứu chỉ ra rằng thành phần chính của cây táo ma là Podophyllotoxin. Podophyllotoxin là một hợp chất có độc tính cao nên nó thường không được sử dụng trong điều trị ung thư. Nhưng các dẫn xuất của nó, như etoposide và teniposide, được sử dụng trong điều trị ung thư phổi, ung thư tinh hoàn, u não, ung thư máu và đã được FDA chấp nhận sử dụng làm thuốc điều trị bệnh (Misawa, 1994). Tuy nhiên, trong tự nhiên, những cây này tăng trưởng chậm nên đã hạn chế việc cung cấp podophyllotoxin và bắt buộc chúng ta phải tìm kiếm các phương pháp sản xuất thay thế. Nuôi cấy tế bào *P. peltatum* để sản xuất podophyllotoxin lần đầu tiên được thực hiện bởi Kadkade và cs. (1982). Để tăng sản lượng của podophyllotoxin, Woerdenberg và cs. (1990) đã sử dụng phức hợp tiền chất là coniferyl alcohol và β -cyclodextrin bổ sung trong môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào của *P. hexandrum*. Bổ sung phức hợp 3 mM coniferyl alcohol đã tăng hiệu suất podophyllotoxin lên 0,013% theo khối lượng khô, trong khi mẫu đối chứng chỉ sản xuất được 0,0035% podophyllotoxin. Smolny và cs. (1992) đã thông báo mô sẹo và tế bào huyền phù của *Lilium album* đã sản xuất được 0,3% podophyllotoxin. Sakata và cs. (1994) đã tạo ra rễ bất định từ mô sẹo của cây *P. peltatum* trong môi trường MS lỏng bổ sung NAA 1 mg/l, kinetin 0,2 mg/l và casein thủy phân 500 mg/l. Sau đó, rễ được chuyển sang môi trường không có chất điều hoà sinh trưởng. Hàm lượng podophyllotoxin thu được là 1,6% so với sinh khối rễ khô, cao gấp 6 lần so với cây mẹ. Chayopadhyay và cs. (2002) đã nuôi cấy huyền phù tế bào *P. hexandrum* trong bioreactor 3 l. Hàm lượng podophyllotoxin đạt 0,19 mg/l/ngày, tăng 27% so với hiệu suất nuôi trong bình lắc sau khi tối ưu hóa nguồn carbon, điều kiện ánh sáng và tốc độ khuấy trộn.

Vinca alkaloid: Vinca alkaloid (alkaloid dừa cạn) là một họ các hợp chất indole dạng dimer, bao gồm khoảng 130 hợp chất được chiết xuất hoặc bán tổng hợp từ cây dừa cạn *Catharanthus*

roseus, đại diện cho một trong những lớp chất chống ung thư quan trọng nhất. Đặc biệt, hai loại alkaloid là vincristine và vinblastine, có hoạt tính chống ung thư, còn các hợp chất đơn phân như ajmalicine và serpentine được sử dụng trong điều trị bệnh tim mạch và giúp lưu thông máu. Cơ chế hoạt động gây độc tế bào của chúng là ức chế sự hình thành vi ống bằng cách gắn với protein tubulin, làm ngừng chu trình tế bào ở giai đoạn nguyên phân. Chúng hiện được sản xuất thương mại bằng cách chiết xuất từ lá cây dừa cạn *Catharanthus roseus*, nhưng quá trình này không hiệu quả do nồng độ các alkaloid trong cây thấp, chỉ khoảng 0,0005% (1 tấn lá dừa cạn thu được khoảng 50 g vincristine thô). Như vậy, để sản xuất hiệu quả hơn, nhiều nhà khoa học đã thử áp dụng công nghệ nuôi cấy mô thực vật. Nghiên cứu đầu tiên được thực hiện bởi Carew vào năm 1966. Tuy nhiên, việc sản xuất cả hai alkaloid (vincristine và vinblastine) bằng cách nuôi cấy mô sẹo hoặc huyền phù tế bào *C. roseus* cho đến nay không có triển vọng vì năng suất sinh khối tế bào thấp (Misawa, 1994; Vijaya Sree & cs., 2010). Phân tử vinblastine có nguồn gốc từ hai loại alkaloid là catharanthine và vindoline. Trong khi đó, hàm lượng vindoline trong cây *C. roseus* nguyên vẹn là 0,2% so với trọng lượng khô, cao hơn nhiều so với hàm lượng catharanthine và chi phí chiết xuất vindoline ít tốn kém hơn so với catharanthine và vinblastine. Năm 1987, Smith và cs. đã sử dụng acid abscisic để kích thích sản sinh catharanthine và ajmalicine nội bào của quá trình nuôi cấy tế bào huyền phù tế bào trong bình lên men 30 l. Hàm lượng catharanthine sau 10 ngày nuôi cấy đạt 85,25 mg/l (Smith và cs., 1987). Endo và cs. (1988) đã thiết lập được một quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào *C. roseus* nhằm thu nhận các enzyme xúc tác sự kết hợp giữa vindoline và catharanthine để tạo ra 3',4'-anhydrovinblastine. Fulzele và Heble (1994) đã sử dụng môi trường giàu tryptophan để nuôi cấy tế bào *C. roseus* trong bioreactor 20 l. Hàm lượng ajmalicine 315 µg/g trọng lượng tế bào khô sau 14 ngày nuôi cấy. Ramani và Jayabaskaran (2008) đã sử dụng kích thích tố phi sinh học là tia UV-B để kích ứng sự gia tăng hàm lượng catharanthine và vindoline trong quá trình nuôi cấy huyền phù tế bào *C. roseus* ở giai đoạn tăng trưởng cuối phase lũy thừa và phase ổn định. Kết quả cho thấy nuôi cấy ở phase ổn định đáp ứng nhanh hơn với tia UV-B. Hàm lượng catharanthine tăng gấp 3 lần, còn hàm lượng vindoline tăng gấp 12 lần khi được chiếu tia UV-B trong 5 phút. Pliankong và cs. (2018) đã bổ sung chitosan vào trong môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào *Catharanthus roseus* (L.) G. Don để kích thích sự sinh tổng hợp vinblastine và vincristine. Khi bổ sung chitosan có nồng độ 100 mg/l vào môi trường sẽ làm gia tăng hàm lượng vinblastine và vincristine ở mức tương ứng là 4,15 và 5,48 µg/mg so với trọng lượng khô tế bào. Khi không bổ sung chitosan thì hàm lượng 2 alkaloid này chỉ thu được là 2,43 và 2,49 µg/mg so với trọng lượng khô tế bào.

Shikonin: Shikonin và các dẫn xuất của nó là các hợp chất thứ cấp quan trọng về mặt thương mại, được biết đến với các hoạt động sinh học như kháng khuẩn, diệt côn trùng, chống ung thư, chống oxy hóa. Các hợp chất này thường có màu và do đó có ứng dụng làm phụ gia thực phẩm thực phẩm, phẩm nhuộm và mỹ phẩm (son môi). Các loài thực vật chứa shikonin như: *Litospermum*, *Arnebia*, *Alkanna*, *Anchusa*, *Echium* và *Onosma*. Shikonin trong rễ cây *Lithospermum erythrorhizon* có ở Nhật Bản, Triều Tiên, Trung Quốc. Cây này trồng 5-7 năm, chiết rễ lấy được 1-2% chất khô. Do đó, các nhà khoa học đã sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào để nghiên cứu, thử nghiệm và sản xuất shikonin. Đến năm 1984, shikonin là sản phẩm thương mại đầu tiên được sản xuất qui mô công nghiệp từ việc nuôi cấy tế bào rễ *Litospermum erythrorhizon* trong bioreactor 750 l bởi công ty Hoá dầu Mitsui (nay là công ty Hoá chất Mitsui), Nhật Bản (Malik và cs., 2014).

Hình 1. Hệ thống bioreactor dùng để sản xuất shikonin từ tế bào *Lithospermum erythrorhizon* bằng phương pháp nuôi cấy 2 giai đoạn (Bhojwani & Razdan, 1996).



Gingsengnoside: Nhân sâm, *Panax ginseng* thuộc họ *Araliaceae*, là một trong những loại thảo dược phương Đông có giá trị. Nó (thường dùng là rễ khô) đã được sử dụng làm thuốc chữa bệnh và thuốc bổ sức khỏe ở các quốc gia như Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc từ thời cổ đại. Thành phần hoạt tính sinh học chính của nhân sâm được xác định là các ginsenoside, một nhóm saponin triterpenoid. Trong những năm gần đây, nhân sâm đã được sử dụng ngày càng nhiều như một loại thuốc bổ cho sức khỏe, dưới dạng các sản phẩm y tế thương mại phân phối trên toàn thế giới như viên nang nhân sâm, súp, đồ uống và mỹ phẩm (Sahraroo và cs., 2016; Vijaya Sree và cs., 2010). Tuy nhiên, trồng nhân sâm ít nhất 4-5 năm mới thu hoạch rễ. Sâm phải trồng trong điều kiện đặc biệt về độ cao, độ ẩm, ánh sáng. Ngoài ra phải giải quyết vấn đề bệnh hại và phải thường xuyên chuẩn bị các cánh đồng trồng sâm mới cho vụ mùa sau để đảm bảo chất lượng và sản lượng (Dương Tấn Nhựt & Hoàng Xuân Chiến, 2012). Do đó, sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật cây nhân sâm đã và đang được các nhà khoa học quan tâm nhằm tìm kiếm nguồn nguyên liệu dồi dào cho ngành dược liệu. Các sản phẩm nhân sâm được nuôi cấy có nguồn gốc từ nuôi cấy tế bào *Panaxginseng* đã được sản xuất thương mại bởi Công ty Nitto Denko tại Nhật Bản từ những năm 1980 trong các bioreactor có dung tích từ 2000 đến 20000 l với hiệu suất thu nhận rễ từ 500 – 700 mg/l/ngày (Vijaya Sree và cs., 2010). Hiện nay, tại Hàn Quốc, một số công ty đang sản xuất rễ tơ nhân sâm với bioreactor có dung tích 10000 đến 20000 l (Dương Tấn Nhựt & Hoàng Xuân Chiến, 2012). Ở Việt Nam, mặc dù chúng ta có nguồn lợi từ thực vật vô cùng phong phú nhưng do thiếu thốn về thiết bị nghiên cứu, các chuyên gia đầu ngành trong lĩnh vực nghiên cứu sàng lọc các hợp chất thứ cấp từ thực vật có hoạt tính sinh học, cũng như các phương pháp tiến hành thu nhận hợp chất, mà cụ thể là phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật. Các kỹ thuật nuôi cấy tế bào trên qui mô công nghiệp, sử dụng các bioreactor để sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học vẫn còn là một con đường đầy tiềm năng chưa được khai phá hết đối với nền công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật ở nước ta.

5. Kết luận

Các hợp chất thứ cấp từ thực vật thường được tạo ra với một lượng rất nhỏ, nhưng lại có hoạt tính sinh học rất cao, đặc biệt quan trọng đối với con người do được sử dụng trong các lĩnh vực thực phẩm và y học. Nhiều loại hợp chất thứ cấp từ thực vật có tác dụng hiệu quả trong điều trị ung thư như vincristin, vinblastin, taxol,... Tuy nhiên, các quá trình phân tách và tinh sạch hợp chất thứ cấp rất phức tạp và tốn thời gian, đặc biệt khi hợp chất chỉ tồn tại một lượng rất nhỏ trong tế bào. Chính

vì vậy, việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu chủ động chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học cao, phương pháp tách chiết và tinh sạch phù hợp để phục vụ cho nhu cầu con người là vấn đề đang được các nhà khoa học quan tâm. Hiện nay, phương pháp nuôi cấy tế bào đang được nghiên cứu rộng rãi để cải thiện tiềm năng thu nhận các chất có hoạt tính sinh học ở nhiều loài thực vật trong điều kiện có kiểm soát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Agostini-Costa, T. da S., Vieira, R. F., Bizzo, H. R., Silveira, D. & Gimenes, M. A. (2012). *Secondary Metabolites. In Chromatography and Its Applications.* (S. Dhanarasu, Ed.) InTechOpen.
- [2] Anurag, K. et al. (2015). Metabolites in plants and its classification. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 287-305.
- [3] Asano, T., Watase, I., Sudo, H., Kitajima, M., Takayama, H., Aimi, N., Yamazaki, M. & Saito, K. (2004). Camptothecin production by *in vitro* cultures of *Ophiorrhiza liukiensis* and *O. kuroiwai*. 21, 275–281.
- [4] Bhojwani, S. S & Razdan, M. K. (1996). *Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition* (Vol. 5). Elsevier Science B. V.
- [5] Chattopadhyay, S., Srivastava, A. K., Bhojwani, S. S. & Bisaria, V. S. (2002). Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 215-220.
- [6] Dương Tân Nhứt và Hoàng Xuân Chiến (2012). Công nghệ sinh học thực vật trong thế kỉ XXI: Triển vọng và thách thức. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 50(6), 859-874.
- [7] Endo, T., Goodbody, A., Vukovic, J. & Misawa, M. (1988). Enzymes from *Catharanthus roseus* cell suspension cultures that couple vindoline and catharanthine to form 3',4'-anhydrovinblastine. *Phytochemistry*, 27(7), 2147-2149.
- [8] Fett-Neto, A. G., DiCosmo, F., Reynolds, W. F. & Sakata, K. (1992). Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. *Biotechnology*, 10(12), 1572-5157.
- [9] Fischer, R., Liao, Y. C., Hoffmann, K., Schillberg, S. & Emans, N. (1999). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol Chem*, 380, 825-839.
- [10] Fulzele, D. P. & Heble, M. R. (1994). Large-scale cultivation of *Catharanthus roseus* cells: production of ajmalicine in a 20-l airlift bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 35(1):1-7. (1), 1-7.
- [11] Ginsberg, J. (2003). The discovery of camptothecin and taxol. *American Chemical Society*. <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/camptothecin/taxol.html>
- [12] Gonçalves, S. & Romano, A. (2018). Production of Pplant secondary metabolites by using biotechnological tools. In R. Vijayakumar, *Secondary Metabolites - Sources and Applications* (pp. 81-99). IntechOpen.
- [13] Justin, N. K., Edmond, S., Ally, R. M. & Xin He. (2014). Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- [14] Malik, S., Bhushan, S., Sharma, M. & Ahuja, P. S. (2014). Biotechnological approaches to the production of shikonins: A critical review with recent updates. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (2), 327-340.
- [15] Misawa, M. (1994). *Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolites.* Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- [16] Mulbagal, V. & Tsay, H. S. (2004). Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48.
- [17] Navia-Osorio, A., Garden, H., Cusido, R. M., Palazon, J., Alfermann, A. W. & Pinol, M.T. . (2002). Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor . *Journal of Plant Physiology*, 159(1), 97-102.
- [18] Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2006). *Công nghệ tế bào*. Đại học Quốc gia TP HCM.
- [19] Nguyễn Hoàng Lộc (2007). *Giáo trình công nghệ tế bào*. Đại học Huế.
- [20] Pant, B. (2014). Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* , 808, 25-39.
- [21] Pliankong, P., Suksa-Ard, P. & Wannakrairoj, S. (2018). Chitosan elicitation for enhancing of vincristine and vinblastine accumulation in cell culture of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don . *Journal of Agricultural Science*, 10(12), 287-293.
- [22] Ramani, S. & Jayabaskaran, C. (2008). Enhanced catharanthine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light . *Journal of Molecular Signaling*, 3(9), 1-6.
- [23] Sahraroo, A., Mirjalili, M. H., Corchete, P., Babalar, M. & Fattahi Moghadam, M. R. (2016). Establishment and characterization of a *Satureja khuzistanica* Jamzad (*Lamiaceae*) cell suspension culture: a new *in vitro* source of rosmarinic acid . *Cytotechnology*, 68(4), 1415–1424.
- [24] Saito, K., Sudo, H., Yamazaki, M., Koseki-Nakamura, M., Kitajima, M., Takayama, H. & Aimi, N. (2001). Feasible production of camptothecin by hairy root culture of *Ophiorrhiza pumila*. *Plant Cell Reports*, 20(3), 267-271.
- [25] Sakata, K., Morita, E. & Takezono, T. (1994). Production of podophyllotoxins using *Podophyllum*.
- [26] Smetanska, I. (2008). Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 111, 187-228.
- [27] Smith, J. I., Smart, N. J., Kurz, W. G. & Misawa, M. (1987). Stimulation of indole alkaloid production in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by abscisic acid, 53(5), 470-474.
- [28] Srinivasan, V., Pestchanker, L., Moser, S., Hirasuna, T. J., Taticek, R. A. & Shuler, M. L. (1995). Taxol production in bioreactors: Kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspensions of *Taxus baccata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 47(6), 666-676.
- [29] Sudo, H., Yamakawa, T., Yamazaki, M., Aimi, N. & Saito, K. (2002). Bioreactor production of camptothecin by hairy root cultures of *Ophiorrhiza pumila*. *Biotechnology Letters*, 24(5), 359-363 .
- [30] Tabata, H. (2004). Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Advances in Biochemical Engineering*, 87, 1-23.
- [31] Vijaya Sree, N. et al . (2010). Advancements in the production of secondary metabolites . *Journal of Natural Products*, 3, 112-123.