

# NUÔI CÂY TẾ BÀO ĐỂ SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP

OANH VŨ



**C**ây xanh bao phủ hành tinh như một nhà máy lọc sạch bầu khí quyển. Cây xanh còn là "nhà máy" sản xuất ra rất nhiều chất hữu cơ có giá trị dùng làm thực phẩm hoặc dược phẩm (khoảng 25% các loại dược phẩm có nguồn gốc thực vật). Tuy nhiên, sử dụng các dược liệu này vẫn rất hạn chế do chỉ có thể chiết xuất trực tiếp một lượng rất ít từ thực vật nên cần có giải pháp để sản xuất, tăng hàm lượng và ổn định nguồn cung cấp. Giải pháp đó chính là ứng dụng công nghệ sinh học, mà cụ thể là công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật.

## Hợp chất thứ cấp và nuôi cấy tế bào

Những nghiên cứu về hợp chất thứ cấp thực vật phát triển từ những năm 1950. Có khoảng hơn 30.000 hợp chất được chiết xuất từ thực vật có hoạt tính và rất có giá trị đối với cuộc sống. Những hợp chất này như các alkaloid, terpenoid, phenolic... được biết đến như là các hợp chất thứ cấp. Các hợp chất thứ cấp thường chỉ được tạo ra ở một số loại tế bào nhất định như các tế bào rễ tơ, biểu mô, hoa, lá...

Một trong những hợp chất thứ cấp rất có giá trị trong điều trị ung thư là taxol. Nhu cầu taxol trên thế giới rất cao nhưng hàm lượng chiết xuất từ các loại thông tự nhiên rất ít do lớp vỏ mỏng của cây thông đỏ chứa khoảng 0,001% taxol. Các hợp chất thứ cấp có giá trị như vậy có thể được sản xuất bằng công nghệ nuôi cấy tế bào. Đây là một kỹ thuật quan trọng trong công nghệ sinh học mà ưu điểm lớn nhất là có thể chủ động tăng nguồn cung cấp các nguồn dược liệu bằng cách tách chiết một tỷ lệ lớn lượng hoạt chất từ tế bào thực vật nuôi cấy.

Năm 1959, báo cáo đầu tiên về nuôi cấy tế bào thực vật trên quy mô lớn đã được công bố bởi Tulecke và Nickell (Mỹ). Trong số hàng trăm các sản phẩm thứ cấp có nguồn gốc từ tế bào thực vật,



Cây thông đỏ *Taxus wallichiana*

các hoạt chất rất có giá trị như shikonin, ginsenosid và berberin đã được sản xuất trên quy mô lớn, và đây thực sự là những thành công rực rỡ trong công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật.

## Quy trình nuôi cấy tế bào sản xuất hợp chất thứ cấp

Quy trình nuôi cấy tế bào để chiết xuất hợp chất thứ cấp thường qua ba bước cơ bản là nuôi cấy callus, nuôi cấy dịch huyền phù và nuôi cấy bioreactor.

Callus là dòng tế bào ban đầu, tương tự mô sẹo tạo ra để hàn gắn vị trí tổn thương của cây. Khi đã có callus, tiến hành cấy chuyển nhiều lần trong môi trường thạch mềm rồi được cấy chuyển sang môi trường lỏng chuyển động bằng cách lắc hoặc khuấy (nuôi cấy dịch huyền phù). Đây là giai đoạn rất quan trọng, nghiên cứu khảo sát được môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp cho tế bào phát triển tốt nhất và có hàm lượng hoạt chất cao nhất có tính chất quyết định thành công của quá trình nuôi cấy tế bào.

Trong quá trình nuôi cấy, các tế bào sẽ dần dần tách ra khỏi mẫu do những chuyển động xoáy của môi trường. Sau một thời gian ngắn trong dịch huyền phù sẽ có các tế bào đơn, các cụm tế bào với kích thước khác nhau, các mẫu nuôi cấy còn thừa chưa phát triển và các tế bào chết. Tuy nhiên, cũng có những dịch huyền phù hoàn hảo, chứa tỷ lệ cao các tế bào đơn và tỷ lệ nhỏ các cụm tế bào.

Khi tìm được điều kiện thích hợp, các nhà khoa học có thể phát triển quy mô nuôi cấy trên hệ thống bình nuôi cấy sinh học-bioreactor có dung tích khác nhau. Sau khi nghiên cứu thành công quy trình nuôi cấy tế bào trong phòng thí nghiệm, các nhà khoa học



tiếp tục triển khai các phòng sinh khối tế bào thực vật. Từ đó sử dụng các kỹ thuật chiết tách để thu nhận các hợp chất cần thiết.

Quy trình trên được ứng dụng trong nuôi cấy tế bào sâm Ngọc Linh *Panax vietnamensis* do học viện Quân y Việt Nam triển khai trong chương trình hợp tác với Hàn Quốc. Sâm Ngọc Linh là loại sâm thứ 20 được tìm thấy trên thế giới, có tác dụng phòng chống ung thư, bảo vệ tế bào gan, kích thích hệ miễn dịch, chống stress và trầm cảm, chống oxy hóa, lão hóa. Sâm Ngọc Linh sinh trưởng chậm, từ 5-7 năm mới có thể sử dụng. Trong tự nhiên, loài cây này bị khai thác cạn kiệt và có nguy cơ tuyệt chủng (sâm Ngọc Linh nằm trong sách đỏ Việt Nam). Trên thị trường, giá sâm Ngọc Linh khoảng 50 triệu đồng/kg.

Sau khi nghiên cứu thành công quy



Tạo callus sâm Ngọc Linh

trình nuôi cấy tế bào trong phòng thí nghiệm, các nhà khoa học ở học viện Quân y tiếp tục triển khai hệ thống các phòng sinh khối tế bào thực vật với trang thiết bị hiện đại, năng công suất sinh khối từ 5lít/mê lên thành 100 lít/mê (tương đương 35 kg sinh khối sâm tươi). Hệ thống này bao gồm phòng pha chế sản xuất môi trường, phòng cấy chuyển tế bào, phòng nuôi cấy tế bào, phòng thanh trùng, hệ thống nuôi cấy bioreactor thể tích 5 lít, 15 lít, 100 lít; phòng thu hoạch chiết xuất hoạt chất; phòng phân tích đánh giá kiểm nghiệm dược; phòng nghiên cứu được lý thực nghiệm...

### Một số phương pháp tăng năng suất nuôi cấy tế bào

**Chọn lọc dòng tế bào cho năng suất cao:** chọn lọc tế bào dựa vào khả năng tổng hợp một vài hợp chất có giá trị cao trong nuôi cấy đã được Berlin và Sasse công bố năm 1985, sau đó phương pháp này đã được ứng dụng rộng rãi. Với dòng tế bào của cây bát tiên *Euphorbia milli* sau 24 lần chọn lọc đã tích lũy gấp 7 lần lượng anthocyanin so với nuôi cấy tế bào bố mẹ. Yamada và Sato (Nhật) đã chọn lọc được một dòng tế bào của cây *Coptis japonica*, chiết tách lượng chất berberin đạt 1,2 g/l, có khả năng sinh trưởng gấp 6 lần sau 3 tuần nuôi cấy.

**Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy:** các

thông số hóa học, vật lý như thành phần và pH môi trường, chất điều hòa sinh trưởng, nhiệt độ nuôi cấy, sự thông khí, sự lắc hoặc khuấy, ánh sáng... đều có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng các hợp chất thứ cấp. Một vài sản phẩm tích lũy trong tế bào ở mức cao hơn so với ở trong cây trồng tự nhiên khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu. Các thông số vật lý và yếu tố dinh dưỡng trong một mẻ gần như là yếu tố cơ bản cho việc tối ưu hóa hiệu suất nuôi cấy.

**Cung cấp tiền chất:** bổ sung các tiền chất của quá trình sinh tổng hợp nội bào vào môi trường nuôi cấy cũng có thể tăng lượng sản phẩm mong muốn do một số hợp chất trung gian nhanh chóng bắt đầu sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp và vì thế làm tăng lượng sản phẩm cuối cùng. Phương pháp này hữu ích khi dùng các tiền chất có giá thành rẻ. Bổ sung phenylalanin khi nuôi cấy tế bào huyền phù cây hoa xôan *Salvia officinalis* đã kích thích tạo ra acid rosmarinic, cung cấp acid ferulic trong nuôi cấy tế bào cây *Vanilla planifolia* đã tăng tích lũy vanillin, hoặc bổ sung leucine làm tăng các monoterpen để bay hơi trong nuôi cấy cây tía tô *Perilla frutescens*.

**Phương pháp gợi kích thích (elicitation):** các chất kích kháng bảo vệ thực vật – elicitor báo hiệu việc hình thành các hợp chất thứ



Cây bát tiên *Euphorbia milli*





Cây hoa xô  
*Salvia officinalis*

cấp. Các elicitor có thể là các peptid, oligosaccharid, lipid, glycopeptid hay các ion kim loại nặng... Sử dụng các elicitor là phương thức để thu được các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học một cách hiệu quả nhất. Trong số các elicitor được biết đến nhiều nhất là jasmonat, được dùng để tăng hàm lượng taxol trong tế bào thông đỏ.

**Cố định tế bào:** phương pháp cố định tế bào giúp các tế bào tiếp xúc với nhau tạo thành khối tế bào lớn hơn, giúp làm tăng hiệu suất hợp chất. Cố định tế bào thường dùng alginate trong một hộp xốp đồng nhất, hoặc cố định tự nhiên cho tế bào phát triển thành cụm.

### Những thành tựu trong công nghệ nuôi cấy tế bào sản xuất hợp chất thứ cấp

Nuôi cấy tế bào các loài *Taxus* được xem như là một phương pháp ưu thế để cung cấp ổn định nguồn taxol và dẫn xuất. Ở 100 cây thông đỏ một trăm năm tuổi, trung bình thu được 3 kg vỏ, chiết xuất được khoảng 300

mg taxol. Hiện nay, sản xuất taxol bằng nuôi cấy tế bào các loài *Taxus* đã trở thành một trong những ứng dụng rộng rãi của nuôi cấy tế bào thực vật và có giá trị thương mại đáng kể. Các dòng tế bào thu được từ callus sau khi được bổ sung các tiền chất vào môi trường nuôi cấy, thì sau 6 tuần cứ một lít dịch huyền phù tế bào sẽ có khoảng 200 mg taxol.

Năm 1994, Yeh và cộng sự (Trung Quốc) đã nghiên cứu sản xuất diosgenin bằng nuôi cấy tế bào huyền phù của cây *Dioscorea doryophora*. Nuôi cấy tế bào huyền phù được thiết lập bằng cách đưa callus vào môi trường có 0,2 mg/l chất 2,4-D. Nồng độ saccharose thích hợp cho tổng hợp diosgenin là 3%. Lượng diosgenin thu được trong trường hợp này đạt tới 3,2% khối lượng khô. Sản xuất diosgenin từ cây *D. doryophora* bằng nuôi cấy tế bào huyền phù hiện nay đã được ứng dụng trên quy mô công nghiệp.

Shikonin, một loại hoạt chất sắc tố đỏ có khả năng diệt khuẩn, có trong rễ cây *Lithospermum erythrorhizon* có ở Nhật Bản, Triều Tiên. Cây này trồng 5-7 năm, chiết rễ lấy được 1-2% chất khô, giá 1 kg là 4.500 USD. Con đường nuôi cấy mô và tế bào hiệu quả gấp 800 lần so với nuôi trồng tự nhiên. Dùng nồi lên men 750 lít để nuôi tế bào trong



Cây *Lithospermum erythrorhizon*

15 ngày thu được 5 kg shikonin. Chọn dòng tế bào có màu đỏ đậm thì tỉ lệ shikonin càng cao. Nhật Bản đã tạo được dòng tế bào rễ cây *Lithospermum* có khả năng tích lũy đến 15% shikonin và đã hoàn chỉnh công nghệ nuôi cấy.

Ở Việt Nam, công nghệ nuôi cấy tế bào phát triển vào những năm 1970. Từ đó đến nay đã đạt được nhiều thành công, đáng kể nhất chính là quy trình sản xuất sâm Ngọc Linh do Học viện Quân y khai thác. Chỉ với một vài tế bào từ rễ củ sâm Ngọc Linh, bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào, các nhà khoa học của Học viện Quân y đã có thể sản xuất sâm Ngọc Linh với số lượng lớn trong vòng 10-20 ngày. Cụ thể là đã hoàn chỉnh quy trình nuôi cấy tế bào, xây dựng được quy trình định tính và định lượng các thành phần ginsenosid trong sinh khối sâm Ngọc Linh bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC), so sánh với sâm Ngọc Linh tự nhiên và chất chuẩn; đánh giá tính an toàn và tác dụng dược lý của sâm Ngọc Linh, bào chế thành công được một số chế phẩm từ hoạt chất chiết xuất từ sâm Ngọc Linh sinh khối như nước uống tăng lực và viên nang mềm. Các công nghệ này đang được Công ty Nước khoáng Tiên Hải (Thái Bình) để xuất chuyển giao để sản xuất nước tăng lực. Phương pháp sản xuất sinh khối tế bào rễ sâm Ngọc Linh được cấp bằng độc quyền sáng chế số 7523 vào ngày 11/02/2009 tại Việt Nam.

Việt Nam cũng đang triển khai các dự án nuôi cấy và chiết xuất taxol từ cây thông đỏ ở Lâm Đồng. Ngoài ra còn có "Nghiên cứu sản xuất artemisinin dùng kỹ thuật nuôi cấy tế bào từ cây thanh hao hoa vàng" của Viện Sinh học Nhiệt đới trong nghị định thư hợp tác với Malaysia (2007-2010) hay đại học Huế "Nghiên cứu khả năng tích lũy glycoalkaloid ở callus cây cà gai leo *Solanum hainanense*". Tuy nhiên, những dự án nói trên vẫn còn ở quy mô phòng thí nghiệm. Phát triển các kỹ thuật nuôi cấy trong các bioreactor ở quy mô công nghiệp 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 của nền công nghệ nuôi cấy tế bào của Việt Nam. □