Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ
Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học
website: sj.ctu.edu.vn

DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.018

ỨNG DỤNG CÁC HỢP CHẤT HỮU CƠ THAY THẾ NGUỒN NITRATE VÔ CƠ TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY SINH KHỐI VÀ THỬ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CÂY LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus formosanus* HAYATA) *in vitro*

Nguyễn Thị Huyền Trang, Đặng Thị Kim Thúy, Đỗ Đức Thăng, Trần Thị Mỹ Trâm, Trần Trọng Tuấn và Đỗ Đăng Giáp*

Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đỗ Đăng Giáp (email: dodanggiap@gmail.com)*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 13/11/2018
Ngày nhận bài sửa: 21/03/2019
Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:
The application of organic compounds in replacing inorganic nitrate in biomass culture medium and bioactive test of Anoectochilus formosanus Hayata in vitro

Từ khóa:
Anoectochilus formosanus Hayata, casein hydrolysate, cao nấm men, muối nitrate vô cơ, sinh khối in vitro

Keywords:
Anoectochilus formosanus Hayata, biomass in vitro, casein hydrolysate, inorganic nitrate salts, yeast extract

ABSTRACT

Anoectochilus formosanus Hayata is a high medicinal as well as commercial plant. It is necessary to study and apply several organic compounds such as yeast extract and casein hydrolysate to replace inorganic nitrate source in culture medium in the process of production of in vitro A. formosanus biomass for supplying safe medicinal resource. In this study, A. formosanus shoots were cultured on Albert's medium which was decreased nitrate-containing salt, vitamin supplement MS medium, 30 g. L^{-1} sucrose and organic compounds (yeast extract and casein hydrolysate) with different concentrations (1.0, 3.0, 5.0, 7.0 g. L^{-1}). The obtained biomass was assessed its bioactivity via antimicrobial and antioxidant activities. The results showed that the most suitable medium for the rapid multiplication of A. formosanus biomass was Albert's medium which had the decrease of 50% of nitrate-containing salt and the addition of 30 g. L^{-1} sucrose, 7.0 g. L^{-1} yeast extract, with explant height, fresh weight and dry weight after 6 weeks of culture were 9.411 cm, 1.824 g per explant and 0.186 g per explant, respectively. Biomass obtained on this medium also had the highest bioactivity with high antioxidant activity (IC50 = 2.4023 mg. mL^{-1}) and resistance to 4 following microbial strains: Pseudomonas aeruginosa; Salmonella typhi; Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis.

TÓM TẮT

Lan kim tuyến Anoectochilus formosanus Hayata là loại cây có giá trị dược liệu và thương mại cao. Việc nghiên cứu, sử dụng các hợp chất hữu cơ như cao nấm men và casein hydrolysate nhằm thay thế nguồn muối nitrate vô cơ trong môi trường nuôi cấy sinh khối lan kim tuyến in vitro để tạo nguồn dược liệu an toàn là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chồi lan kim tuyến được cấy trên môi trường Albert's có thành phần muối chứa gốc nitrate theo các tỉ lệ (100%, 75%, 50% và 25%), bổ sung vitamin của môi trường MS, 30 g/L sucrose và các hợp chất hữu cơ (cao nấm men và casein hydrolysate) có nồng độ 1,0; 3,0; 5,0 và 7,0 g/L. Sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên các môi trường cho hiệu quả nhân sinh khối được đánh giá hoạt tính sinh học. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, môi trường thích hợp nhất cho sự nhân nhanh sinh khối lan kim tuyến là môi trường Albert's có thành phần muối nitrate giảm 50% và 7 g/L cao nấm men với chiều cao cây đạt 9,4 cm/cây; khối lượng tươi đạt 1,82 g/mẫu và khối lượng khô đạt 0,18 g/mẫu. Sinh khối thu nhận được trên môi trường này có hoạt tính sinh học tốt nhất với khả năng kháng oxi hoá cao (IC_{50} = 2,40 mg/mL) và có khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn là Pseudomonas aeruginosa; Salmonella typhi; Staphylococcus aureus và Bacillus subtilis.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Huyền Trang, Đặng Thị Kim Thúy, Đỗ Đức Thăng, Trần Thị Mỹ Trâm, Trần Trọng Tuấn và Đỗ Đăng Giáp, 2019. Ứng dụng các hợp chất hữu cơ thay thế nguồn nitrate vô cơ trong môi trường nuôi cấy sinh khối và thử hoạt tính sinh học của cây lan kim tuyến (*Anoectochilus formosanus* Hayata) *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 134-141.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi lan kim tuyến *Anoectochilus* có số loài phong phú với khoảng 30 - 40 loài, trong đó loài lan kim tuyến *Anoectochilus formosanus* Hayata có giá trị dược liệu và thương mại cao nhất thế giới hiện nay (Martin *et al*., 2005). Theo y học hiện đại, tác dụng dược lý của lan kim tuyến bao gồm các hoạt động chống viêm và bảo vệ gan (Lin *et al*., 1993), các hoạt động chống oxy hóa (Lin *et al*., 2000), chống khối u (Tseng *et al*., 2006). Dịch chiết từ *Anoectochilus formosanus* (*A. formosanus)* có tác dụng kích thích hệ miễn dịch (Lin and Hsieh, 2005). Cây lan kim tuyến *A. formosanus* chứa các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học, trong đó kinsenoside là một loại alkaloid được sử dụng để điều trị bệnh tiểu đường, tăng lipaza máu và ung thư vú... (Du *et al.*, 2001; Shyur *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007).

Các thành phần dinh dưỡng khoáng của môi trường nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả nuôi cấy mô thực vật. Bên cạnh đó, việc bổ sung các loại hợp chất hữu cơ nhằm hạn chế sử dụng khoáng vô cơ cũng như chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, đặc biệt là trong qui trình sản xuất sinh khối các loại cây có giá trị dược liệu ngày nay đang được các nhà khoa học quan tâm. Điều này có thể loại bỏ một phần hóa chất vô cơ và chất điều hòa sinh trưởng thực vật mà con người có khả năng đưa vào và tích lũy trong cơ thể nếu như sử dụng sinh khối cây trồng từ qui trình nuôi cấy *in vitro*. Hiện nay, các loại hợp chất hữu cơ được bổ sung vào môi trường nuôi cấy bao gồm: cao nấm men, casein hydrolysate, peptone, trypton… Các hợp chất hữu cơ này thường bao gồm các protein có trọng lượng phân tử nhỏ, acid amin, vitamin và các chất tăng trưởng thực vật. Do đó, chúng có khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật bằng cách cung cấp cho tế bào thực vật nguồn nitơ hữu cơ (George *et al.*, 2008).

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá vai trò của các hợp chất hữu cơ trong việc thay thế các muối nitrate vô cơ trong môi trường nuôi cấy để từ đó tạo nguồn sinh khối lan kim tuyến *in vitro* đảm bảo an toàn cho người sử dụng.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Khảo sát vai trò thay thế nguồn muối nitrate vô cơ của một số hợp chất hữu cơ lên khả năng gia tăng sinh khối cây lan kim tuyến in vitro

Mục tiêu: xác định vai trò của cao nấm men và casein hydrolysate trong việc thay thế nguồn nitrate vô cơ trong môi trường khoáng nhằm mục đích gia tăng sinh khối cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Vật liệu: chồi lan gấm *in vitro* có chiều cao 2,5 - 3 cm và có khối lượng 0,3 – 0,4 g, được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm khu vực phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới.

Môi trường nuôi cấy: môi trường Albert's (Võ Thị Bạch Mai, 2003) có thành phần muối chứa gốc nitrate được giảm, bổ sung vitamin MS (Murashige and Skoog, 1962), 30 g/L sucrose kết hợp với các hợp chất hữu cơ (cao nấm men (yeast extract) và casein hydrolysate) có nồng độ khác nhau (1,0; 3,0; 5,0; 7,0 g/L) theo các nghiệm thức ở Bảng 1.

Phương pháp: chồi lan kim tuyến được cấy vào các hộp sigma (hộp nhựa có đường kính đáy lớn 11,5 cm; đường kính đáy nhỏ 8,8 cm và chiều cao hộp 10,5 cm) có chứa 100 mL môi trường nuôi cấy (50 mL môi trường rắn và 50 mL môi trường lỏng). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại ba lần, mỗi lần cấy 5 bình, mỗi bình 10 mẫu.

Bảng 1: Tên nghiệm thức bổ sung các hợp chất hữu cơ kết hợp với thay đổi hàm lượng muối nitrate vô cơ

Tỷ lệ muối nitrate	Nồng độ cao nấm men (g/L)					Nồng độ casein hydrolysate (g/L)				
sử dụng	0	1	3	5	7	0	1	3	5	7
100%	N1	M1N1	M2N1	M3N1	M4N1	N1	C1N1	C2N1	C3N1	C4N1
75%	N2	M1N2	M2N2	M3N2	M4N2	N2	C1N2	C2N2	C3N2	C4N2
50%	N3	M1N3	M2N3	M3N3	M4N3	N3	C1N3	C2N3	C3N3	C4N3
25%	N4	M1N4	M2N4	M3N4	M4N4	N4	C1N4	C2N4	C3N4	C4N4

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi cấy: 25 ± 2^0C; thời gian chiếu sáng: 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng: 26,20 ± 2 µmol. m^{-2}. s^{-1} và độ ẩm phòng nuôi cấy: 55 - 60%.

Chỉ tiêu theo dõi: sau 6 tuần nuôi cấy, mẫu cấy được ghi nhận các chỉ tiêu về chiều cao cây (cm); số lượng lá (lá/mẫu); khối lượng tươi (g); khối lượng khô (g)

Phương pháp thống kê số liệu: các số liệu thu nhận được thống kê bằng phần mềm Excel và phần mềm của chương trình thống kê SPSS phiên bản 22 theo phương pháp Duncan (Duncan, 1955) với $p \leq 0,05$.

2.2 Khảo sát một số hoạt tính sinh học của sinh khối cây lan kim tuyến nuôi cấy in vitro

Mục tiêu: đánh giá hoạt tính kháng khuẩn và kháng oxi hoá của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên các môi trường đạt hiệu quả tốt từ thí nghiệm 1, từ đó có đánh giá về tác động của loại chất hữu cơ đối với hoạt tính sinh học của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Phương pháp: khả năng kháng khuẩn và kháng oxi hóa của sinh khối lan kim tuyến được kiểm tra lần lượt thông qua phương pháp của Smânia *et al.* (1999); phương pháp của Mensor *et al.* (2001) và có một số thay đổi cho phù hợp với đối tượng nghiên cứu.

3 KẾT QUẢ

3.1 Khảo sát ảnh hưởng của một số hợp chất hữu cơ lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến

3.1.1 Ảnh hưởng của cao nấm men (yeast extract) lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến

Môi trường nuôi cấy bao gồm các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin. Việc bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng hàm lượng nitơ trong môi trường có chứa hàm lượng nitơ tương đối thấp hoặc không có nitơ để thúc đẩy sự tăng trưởng của cây trồng (Morel and Muller, 1964). Trong thí nghiệm này, ảnh hưởng của cao nấm men lên khả năng tăng sinh khối cây lan kim tuyến được khảo sát. Kết quả theo dõi được ghi nhận và trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2: Ảnh hưởng của cao nấm men lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến

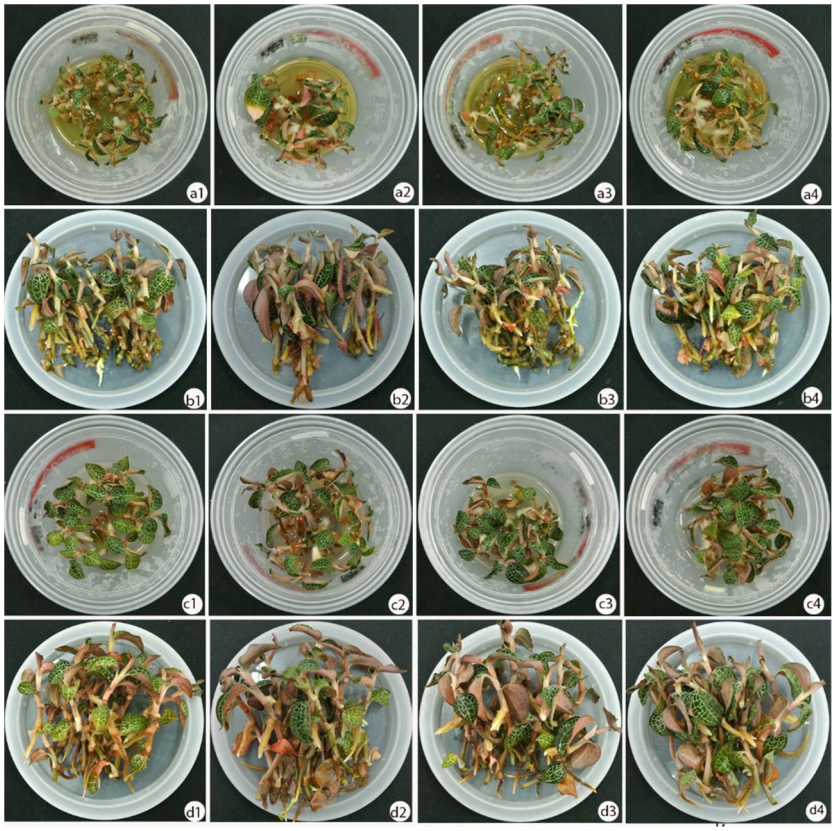
Nghiệm thức	Nồng độ các chất bổ sung vào môi trường MS	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
N1	100% muối nitrate	1,20de	7,76defg	5,43cde	0,12de
N2	75% muối nitrate	1,19de	7,56efgh	5,70abcd	0,12de
N3	50% muối nitrate	1,14de	7,23gh	5,64abcd	0,12de
N4	25% muối nitrate	1,11e	7,69defgh	5,68abcd	0,11e
M1N1	1 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	1,14de	7,09h	5,18e	0,12de
M1N2	1 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	1,63ab	8,50bc	5,90ab	0,17ab
M1N3	1 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	1,35cde	8,15cd	5,30de	0,14cde
M1N4	1 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	1,21de	7,42fgh	5,40cde	0,12de
M2N1	3 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	1,35cde	7,73defg	5,80abc	0,14cd
M2N2	3 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	1,37cde	7,81def	5,65abcd	0,14cd
M2N3	3 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	1,39cd	8,74b	5,70abcd	0,14cd
M2N4	3 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	1,22de	7,85def	5,45bcde	0,13de
M3N1	5 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	1,79a	9,77a	5,50bcde	0,18a
M3N2	5 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	1,81a	9,62a	5,80acb	0,19a
M3N3	5 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	1,75ab	9,48a	5,70abcd	0,18a
M3N4	5 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	1,68ab	8,05cde	5,45bcde	0,17ab
M4N1	7 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	1,35cde	8,10cde	5,67abcd	0,14cde
M4N2	7 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	1,82a	9,27a	5,43cde	0,19a
M4N3	7 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	1,82a	9,41a	5,78abc	0,19a
M4N4	7 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	1,54bc	8,40bc	5,97a	0,16bc

Các mẫu ký tự khác nhau (a, b…) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ bằng phép thử Duncan

Sau 6 tuần nuôi cấy, mẫu cấy trên các môi trường có bổ sung cao nấm men tăng trưởng tốt hơn so với môi trường không bổ sung cao nấm men. Kết quả ghi nhận được cho thấy, cây lan kim tuyến tăng trưởng tốt nhất trên môi trường Albert's chứa muối nitrate theo các tỉ lệ (100%; 75%; 50% và 25%) kết hợp bổ sung 5 g/L cao nấm men. Mẫu cấy trên môi trường này có khối lượng tươi đạt được lần lượt 1,79; 1,81; 1,75; 1,68 g/mẫu, chiều cao trung bình của cây đạt lần lượt 9,77; 9,62; 9,48; 8,05 cm, số lá trên cây lần lượt là 5,50; 5,80; 5,70; 5,45 và khối lượng khô tương ứng lần lượt là 0,18; 0,19; 0,18; 0,17 g/mẫu. Ở nghiệm thức bổ sung 1 g/L và 3 g/L cao nấm men, các chỉ tiêu tăng trưởng ghi nhận được thấp hơn và có sự khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức bổ sung cao nấm men với nồng độ 5 g/L. Khi tăng nồng độ cao nấm men lên 7 g/L, kết quả cho thấy cao nấm men bắt đầu có sự ức chế tăng trưởng cây lan kim tuyến ở mức sử dụng 100% muối nitrate với khối lượng tươi đạt 1,35 g/mẫu, chiều cao cây đạt 8,10 cm, số lá trên mỗi mẫu đạt 5,67 và khối lượng khô là 0,14 g/mẫu. Nguyên nhân có thể do khi

bổ sung cao nấm men ở nồng độ cao và thành phần muối nitrate 100% trong môi trường đã gây ra sự dư thừa nguồn nitơ dẫn đến ngăn cản sự tăng trưởng của cây. Khi giảm tỉ lệ sử dụng muối nitrate xuống mức 25%, khối lượng tươi đạt được là 1,54 g/mẫu, chiều cao cây đạt 8,40 cm với số lá 5,97 lá/mẫu và khối lượng khô là 0,16 g/mẫu. Điều này xảy ra có thể do nồng độ muối nitrate sử dụng thấp (25%) và thành phần nấm men bổ sung vẫn chưa cung cấp đủ lượng nitơ cần thiết cho cây phát triển (Bianco *et al.*, 2015). Mẫu cấy tăng trưởng tốt hơn trên các môi trường có hàm lượng muối nitrate 75% và 50% có bổ sung cao nấm men nồng độ 7 g/L. Tuy nhiên, sự gia tăng này không có sự khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức bổ sung 5 g/L cao nấm men ở cả hai tỉ lệ (75% và 50%) muối nitrate sử dụng trong môi trường Albert's.

Chiết xuất nấm men được sử dụng trong nuôi cấy mô thực vật nhờ vào khả năng kích thích các cơ chế bảo vệ của cây trồng, qua đó kích thích sản xuất các hợp chất thứ cấp ở thực vật (Abraham *et al.*, 2011). Cao nấm men chứa nhiều chất dinh dưỡng thiết yếu cho cây trồng. Ngoài acid amin, vitamin (vitamin B, glutathione) trong cao nấm men còn chứa các khoáng chất (Zn, Ca và Co), carbohydrate và muối (Ertola and Hours, 1998). Nhiều công trình nghiên cứu trước đây đã chứng minh, cao nấm men có tác động tích cực lên sự tăng trưởng của cây trồng cũng như giúp cây trồng tổng hợp các hợp chất thứ cấp nhiều hơn. Do đó, mẫu cấy trên các môi trường nuôi cấy có bổ sung cao nấm men phát triển tốt hơn môi trường không có bổ sung cao nấm men.



Hình 1: Ảnh hưởng của cao nấm men lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến (a1-a4; b1-b4: Sinh khối lan kim tuyến trong môi trường có thành phần muối nitrate vô cơ lần lượt là 100%; 75%; 50% và 25%; c1-c4; d1-d4: Sinh khối lan kim tuyến trong môi trường có bổ sung 7 g/L cao nấm nem và muối nitrate vô cơ lần lượt là 100%; 75%; 50% và 25%)

3.1.2 Ảnh hưởng của casein hydrolysate lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến

Casein hydrolysate với các nồng độ khác nhau (0, 1, 3, 5, 7 g/L) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đã cho thấy hiệu quả đối với sự gia tăng sinh khối lan kim tuyến. Sau 6 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu tăng trưởng của cây được theo dõi, ghi nhận và trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy nồng độ casein hydrolysate thích hợp cho sự tăng trưởng của cây lan kim tuyến khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy là 5

g/L với các chỉ tiêu tăng trưởng tương ứng với các tỉ lệ muối nitrate sử dụng (100%; 75%; 50% và 25%) là khối lượng tươi lần lượt 1,70; 1,67; 1,65; 1,31 g/mẫu, chiều cao cây tương ứng 8,85; 8,69; 8,35; 8,14 cm, số lá trên mẫu là 5,05; 5,50; 5,80; 5,20 và khối lượng khô tương ứng 0,17; 0,17; 0,17; 0,13 g/mẫu.

Bảng 3: Ảnh hưởng của casein hydrolysate lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến

Nghiệm thức	Nồng độ các chất bổ sung vào môi trường MS	Khối lượng tươi (g/mẫu)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá/mẫu)	Khối lượng khô (g/mẫu)
N1	100% muối nitrate	1,20e	7,76efghi	5,43bcdef	0,12e
N2	75% muối nitrate	1,19e	7,56fghi	5,70abc	0,12e
N3	50% muối nitrate	1,14e	7,23i	5,64abcd	0,12e
N4	25% muối nitrate	1,11e	7,69efghi	5,68abcd	0,11e
C1N1	1 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	1,53abcd	8,68abc	5,43bcdef	0,16abcd
C1N2	1 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	1,37cde	7,46ghi	5,13cdef	0,14cde
C1N3	1 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	1,37cde	7,42hi	5,30bcdef	0,14cde
C1N4	1 g/L casein hydrolysate + 25% muối nitrate	1,34cde	7,67efghi	5,15cdef	0,14cde
C2N1	3 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	1,53abc	9,17a	5,30bcdef	0,16abc
C2N2	3 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	1,53abc	8,17bcdef	5,50bcdef	0,16abc
C2N3	3 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	1,51abcd	8,36bcde	5,30bcdef	0,16abc
C2N4	3 g/L casein hydrolysate + 25% muối nitrate	1,26cde	8,12cdefg	5,60abcde	0,13cde
C3N1	5 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	1,70a	8,85ab	5,05ef	0,17ab
C3N2	5 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	1,66ab	8,69abc	5,50bcdef	0,17ab
C3N3	5 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	1,65ab	8,35bcde	5,80ab	0,17ab
C3N4	5 g/L casein hydrolysate + 25% muối nitrate	1,31cde	8,32bcde	5,20cdef	0,13cde
C4N1	7 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	1,72a	8,21bcdef	6,10a	0,18a
C4N2	7 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	1,39bcde	8,74abc	5,00f	0,14bcde
C4N3	7 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	1,30cde	7,96defgh	5,00f	0,13cde
C4N4	7 g/L casein hydrolysate + 25% muối nitrate	1,24de	8,64abcd	5,10def	0,13de

Các mẫu ký tự khác nhau (a, b…) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $p \leq 0,05$ bằng phép thử Duncan

Hình 2: Ảnh hưởng của casein hydrolysate lên khả năng tăng sinh khối và giảm sử dụng nguồn nitrate vô cơ trong qui trình sản xuất sinh khối cây lan kim tuyến (k1-k4; m1-m4: 5 g/L casein hydrolysate + muối nitrate vô cơ lần lượt là 100%; 75%; 50% và 25%)

Đối với nghiệm thức bổ sung 3 và 5 g/L casein hydrolysate có mức độ gia tăng sinh khối không có sự khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên, sự gia tăng sinh khối của cây lan kim tuyến ở hai nghiệm thức này cao hơn và có sự khác biệt về mặt thống kê so với nghiệm thức bổ sung 1 và 7 g/L casein

hydrolysate. Khi đánh giá về khả năng giảm sử dụng nguồn muối nitrate vô cơ, tất cả các nghiệm thức có bổ sung casein hydrolysate với các chỉ tiêu theo dõi đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Các chỉ tiêu đạt cao nhất trên môi trường sử dụng 100% muối nitrate ở tất cả các nghiệm thức. Trong môi trường có bổ sung casein hydrolysate, chỉ tiêu tăng trưởng của các mẫu cấy trên các môi trường có hàm lượng muối nitrate sử dụng 75% hoặc 50% thấp hơn so với môi trường sử dụng 100% muối nitrate. Tuy nhiên, sự suy giảm này không khác biệt về mặt thống kê. Khi giảm hàm lượng muối nitrate sử dụng xuống còn 25%, các chỉ tiêu khối lượng tươi, chiều cao cây, số lá và khối lượng khô giảm mạnh so với môi trường sử dụng 100%; 75% hoặc 50% hàm lượng muối nitrate.

Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy rằng, việc bổ sung casein hydrolysate vào môi trường nuôi cấy *in vitro* là cơ sở cho việc giảm sử dụng nguồn nitơ vô cơ, bởi vì casein hydrolysate có thể chứa một lượng tương đối lớn glutamine. Môi trường khi được bổ sung casein hydrolysate đã khắc phục được tình trạng thiếu glutamine khi không có đủ phosphor cho sự sinh tổng hợp của cây trồng. Một số ý kiến cho rằng casein hydrolysate còn có thể mang lại nhiều hiệu quả tốt đối với quá trình nuôi cấy *in vitro* hơn là việc bổ sung một số loại acid amin vào môi trường. Điều này có thể giải thích là trong thành phần của casein hydrolysate có chứa một số yếu tố thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật chưa xác định được (George *et al.,* 2008). Do đó, mẫu cấy trên các môi trường bổ sung casein hydrolysate đều phát triển tốt hơn so với mẫu cấy trên môi trường không bổ sung casein hydrolysate.

3.2 Khả năng kháng oxi hoá của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung hợp chất hữu cơ

Cao chiết methanol thu nhận được từ sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên các môi trường cảm ứng hiệu quả cho sự gia tăng sinh khối cây lan kim tuyến theo thống kê ở thí nghiệm 1 được dùng để khảo sát hoạt tính ức chế gốc tự do theo phương pháp DPPH. Từ đường tuyến tính hoạt tính ức chế gốc tự do ở các nồng độ khác nhau tính được giá trị IC_{50} của các mẫu cần khảo sát. Giá trị IC_{50} của mẫu càng thấp thì khả năng ức chế gốc tự do tức khả năng kháng oxi hóa của mẫu đó càng cao.

Bảng 4: Giá trị IC_{50} của các mẫu sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung hợp chất hữu cơ

Nghiệm thức	Nồng độ các chất bổ sung vào môi trường MS	IC_{50} (mg/mL)
N1	100% muối nitrate	5,72
C3N1	5 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	3,67
C3N2	5 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	3,96
C3N3	5 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	6,41
C4N1	7 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	5,08
M1N2	1 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	5,83
M3N1	5 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	2,73
M3N2	5 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	5,46
M3N3	5 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	6,30
M3N4	5 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	2,56
M4N2	7 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	3,70
M4N3	7 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	2,40

Kết quả thể hiện ở Bảng 4 cho thấy tất cả các mẫu thử đều có khả năng kháng oxi hóa. Mẫu lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung cao nấm men 7 g/L và có thành phần muối nitrate vô cơ giảm còn 50% có khả năng kháng oxi hoá cao nhất với giá trị IC_{50} là 2,40 mg/mL, thấp hơn nhiều so với nghiệm thức đối chứng (IC_{50} = 5,72 mg/mL). Các nghiệm thức bổ sung 7 g/L cao nấm men cho thấy hiệu quả kháng oxi hoá cao hơn hẳn các nghiệm thức bổ sung 1 g/L và 5 g/L cao nấm. Với thành phần cao nấm men là 7 g/L kết hợp với tỉ lệ muối nitrate sử dụng là 50%, mẫu cấy cho kết quả kháng oxi hoá tốt hơn nghiệm thức có hàm lượng muối nitrate sử dụng là 75%. Tương tự, với cùng thành phần cao nấm men bổ sung là 5 g/L, nghiệm thức có hàm lượng muối nitrate sử dụng 25% có kết quả kháng oxi hoá tốt hơn các nghiệm thức có hàm lượng muối nitrate sử dụng cao hơn. Đối với các nghiệm thức bổ sung casein hydrolysate thì hiệu quả gia tăng khả năng kháng oxi hoá xảy ra đối với nghiệm thức có tỉ lệ muối nitrate vô cơ 100% và 75% kết hợp 5 g/L casein hydrolysate. Khi so sánh ở cùng một hàm lượng muối nitrate vô cơ sử dụng là 100%, nghiệm thức bổ sung casein hydrolysate 7 g/L có kết quả kháng oxi hoá cao hơn nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, kết quả này thấp hơn nghiệm thức có nồng độ casein hydrolysate 5 g/L.

3.3 Khả năng kháng khuẩn của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy trên môi trường bổ sung hợp chất hữu cơ

Khả năng kháng khuẩn của các mẫu sinh khối lan kim tuyến thu nhận từ các môi trường nuôi cấy hiệu quả cho sự gia tăng sinh khối được thực hiện thông qua phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch với 4 chủng vi khuẩn khảo sát: 2 vi khuẩn gram (-) là *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* và 2 vi khuẩn gram (+) là *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định dựa vào đường kính vòng vô khuẩn trên đĩa thạch (Bảng 5).

Bảng 5: Đường kính vòng kháng khuẩn của các mẫu sinh khối lan kim tuyến được khảo sát ở các nồng độ khác nhau (mm)

Mẫu	Nồng độ các chất bổ sung vào môi trường MS	*Pseudomonas aeruginosa*		*Salmonella typhi*		*Staphylococcus aureus*		*Bacillus subtilis*	
		100 mg/mL	500 mg/mL	100 mg/mL	500 mg/mL	100 mg/mL	500 mg/mL	100 mg/mL	500 mg/mL
N1	100% muối nitrate	-	13	15	18	-	17	8	10
C3N1	5 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	-	9	-	-	-	9	-	12
C3N2	5 g/L casein hydrolysate + 75% muối nitrate	-	11	-	8	-	9	-	11
C3N3	5 g/L casein hydrolysate + 50% muối nitrate	8	12	-	7,5	-	-	-	8,5
C4N1	7 g/L casein hydrolysate + 100% muối nitrate	-	10	-	13	-	13	-	9
M1N2	1 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	-	9	-	-	-	10	-	11
M3N1	5 g/L cao nấm men + 100% muối nitrate	-	9	-	15	-	12	-	-
M3N2	5 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	-	9	12	18	-	-	-	11
M3N3	5 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	8	10	-	10	-	12	-	10
M3N4	5 g/L cao nấm men + 25% muối nitrate	10	11	-	-	-	10	-	11
M4N2	7 g/L cao nấm men + 75% muối nitrate	7	9	-	8	-	10	-	9
M4N3	7 g/L cao nấm men + 50% muối nitrate	8	10	8	11	-	12	7,5	10

Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu đều có hoạt tính kháng khuẩn ở nồng độ 500 mg/mL. Ở nồng độ 100 mg/mL, hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu thấp hoặc không thể hiện. Đối với chủng *Pseudomonas aeruginosa,* tất cả các nghiệm thức khảo sát đều thể hiện có khả năng kháng chủng này ở nồng độ 500 mg/mL. Đối với các nghiệm thức C3N3; M3N3; M3N4; M4N2 và M4N3, khả năng kháng chủng *Pseudomonas aeruginosa* cũng được thể hiện ở nồng độ 100 mg/mL. Đối với chủng *Salmonella typhi*, nghiệm thức C3N1; M1N2 và M3N4 không cho thấy có hiệu quả kháng khuẩn ở cả 2 nồng độ khảo sát. Nhìn chung, các nghiệm thức khảo sát đều thể hiện được hoạt tính kháng *Salmonella typhi* ở nồng độ 500 mg/mL. Khả năng kháng vi khuẩn gram (+) *Staphylococcus aureus* cũng chỉ được thể hiện ở nồng độ khảo sát là 500 mg/mL ở tất cả các nghiệm thức, loại trừ nghiệm thức C3N3 và M3N2, tất cả các nồng độ 100 mg/mL đều không kháng được chủng vi khuẩn này. Nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức M4N3 là 2 nghiệm thức kháng lại *Bacillus subtilis* ở nồng độ 100 mg/mL, các nghiệm thức còn lại thể hiện khả năng kháng được chủng vi khuẩn này ở nồng độ 500 mg/mL, trừ nghiệm thức M3N1 không cho thấy hiệu quả kháng khuẩn ở cả 2 nồng độ khảo sát.

Ở thí nghiệm này, sinh khối nuôi cấy trên môi trường có nồng độ muối nitrate 100% đều cho hiệu quả kháng khuẩn tốt hơn sinh khối nuôi cấy trên môi trường có bổ sung hợp chất hữu cơ. Điều này có thể do sự tích lũy hợp chất thứ cấp có khả năng kháng khuẩn trong sinh khối nuôi cấy trên môi trường đối chứng diễn ra sớm hơn so với sinh khối nuôi cấy trên môi trường có bổ sung các hợp chất hữu cơ. Trong khi sinh khối ở môi trường đối chứng phát triển đến cuối pha cân bằng và bắt đầu vào pha suy vong thì sinh khối nuôi cấy trong môi trường có bổ sung hợp

chất hữu cơ đang trong pha tăng trưởng và bắt đầu vào pha cân bằng.

4 KẾT LUẬN

Cao nấm men và casein hydrolysate đều cho thấy hiệu quả tích cực khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ thích hợp. Từ những kết quả đạt được cho thấy môi trường thích hợp nhất cho sự nhân nhanh sinh khối cây lan kim tuyến là môi trường Albert's có thành phần muối nitrate giảm 50% và bổ sung 30 g/L sucrose, 7 g/L cao nấm men với chiều cao cây đạt được là 9,41 cm; khối lượng tươi đạt 1,82 g/mẫu, khối lượng khô đạt 0,19 g/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy. Sinh khối thu nhận được trên môi trường này cũng có hoạt tính sinh học tốt nhất với khả năng kháng oxi hoá cao (IC_{50} = 2,40 mg/mL) và khả năng kháng 4 chủng vi khuẩn là *Pseudomonas aeruginosa; Salmonella typhi; Staphylococcus aureus* và *Bacillus subtilis.*

LỜI CẢM TẠ

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Trọng điểm khu vực phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abraham, F., Bhatt, A., Keng, C.L., Indrayanto, G. and Sulaiman, S., 2011. Effect of yeast extract and chitosan on shoot proliferation, morphology and antioxidant activity of curcuma mangga in vitro plantlets. African Journal of Biotechnology. 10 (40): 7787-7795.

Bianco, M.S., CecílioFilho, A.B. and de Carvalho, L.B., 2015. Nutritional status of the cauliflower cultivar Verona grown with omission of out added macronutrients. Plos One. 10 (4): 1-17.

Du, X.M., Sun, N.Y., Tamura, T. et al., 2001. Higher yielding isolation of Kinsenoside in Anoectochilus and its anti-hyperliposis effect. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 24 (1): 65-69.

Duncan, D.B., 1955. Multiple range and F tests. Biometrics. 11: 1 - 42.

Ertola, R.J. and Hours, R., 1998. Role of yeast extract components in microbial cultures not associated with amino acid, vitamins and minerals a review. Applied Biological Science. 4: 1-15.

George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J., 2008. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (Eds). Plant propagation by tissue culture, 3rd edition. Springer. The Netherlands, 115-173.

Lin, C.C., Huang, P.C. and Lin, J.M., 2000. Antioxidant and hepatoprotective effects of Anoectochilus formosanus and Gynostemma pentaphyllum. The American journal of Chinese medicine. 28 (1): 87-96.

Lin, J.M., Lin, C.C., Chiu, H.F., Yang, J.J. and Lee, S.G., 1993. Evaluation of the anti-inflammatory and liverprotective effects of Anoectochilus formosanus, Ganderma lucidum and Gynostemma pentaphyllum. The American journal of Chinese medicine. 21 (1), 59-69.

Lin, W.C. and Hsieh, C.C., 2005. Commercial application of Anoectochilus formosanus immunomodulating activities. International Journal of Applied Science and Engineering. 3 (3): 175-178.

Võ Thị Bạch Mai, 2003. Thủy canh cây trồng. Nhà xuất bản Đại học quốc gia. Thành phố Hồ Chí Minh, 126 trang.

Martin, K.P., Geevarghese, J., Joseph, D. and Madassery, J., 2005. In vitro propagation of Dendrobium hybrids using flower stalk node explants. Indian Journal of Experimental Biology. 43: 280-285.

Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitao, G.G. et al., 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy research. 15 (2): 127-130.

Morel, G. and Muller, J.F., 1964. In vitro culture of the apical meristem of the potato. Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 258: 5250-5252.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum. 15 (3): 473-497.

Shyur, L.F., Chen, C.H., Lo, C.P. et al., 2004. Induction of apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by phytochemicals from Anoectochilus formosanus. Journal of Biomedical Science. 11 (6): 928-939.

Smânia, A., Monache, F.D., Smânia, E.F.A. and Cuneo, R.S. 1999. Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from Ganoderma applanatum (Pers.) Pat. (Aphyllophoro-mycetideae) Fruit body. International Journal of medicinal mushrooms, 1 (4): 325-330.

Tseng, C.C., Shang, H.F., Wang, L.F. et al., 2006. Antitumor and immunostimulating effects of Anoectochilus formosanus Hayata. Phytomedicine. 13 (5): 366-370.

Zhang, Y., Cai, J., Ruan, H., Pi, H. and Wu, J., 2007. Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from Anoectochilus roxburghii in streptozotocin diabetic rats. Journal of ethnopharmacology. 114 (2): 141-145.