



# NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SINH KHỐI VÀ GYPENOSIDE TỪ NUÔI CÂY TẾ BÀO CÂY GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum*)

Đặng Ngọc Sáng<sup>1,2</sup>, Phạm Thị Diễm Thi<sup>1</sup>, Trần Thị Thoa<sup>1</sup>,  
Trần Quốc Dung<sup>3</sup>, Hoàng Tấn Quảng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường THPT Chuyên Võ Nguyên Giáp, Trần Quang Khải, Đồng Hới, Quảng Bình, Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ: Hoàng Tấn Quảng <htquang@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 9-01-2025; Ngày chấp nhận đăng: 20-2-2025)

**Tóm tắt.** Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) được sử dụng như một loại dược liệu hay làm trà uống với tác dụng giảm mỡ máu. Giảo cổ lam còn có nhiều tác dụng có lợi như hạ đường huyết, chống ung thư, bảo vệ tim mạch, gan và thần kinh, chống tiểu đường và viêm. Thành phần có hoạt tính sinh học chính là flavonoid và saponin. Trong nghiên cứu này, xác định môi trường nuôi cấy phù hợp và thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor tế bào huyền phù để sản xuất sinh khối và gypenoside đã được thực hiện. Khi nuôi cấy trong bình tam giác, môi trường nuôi cấy tế bào giảo cổ lam tốt nhất là MS cơ bản bổ sung 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA, sucrose 3% với sinh khối tươi đạt 3,693 g/50 mL môi trường, hàm lượng gypenoside đạt 40,240 mg/g và Rb1 đạt 0,041 mg/g khô sau 18 ngày nuôi cấy. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor chứa 6 L môi trường cho thấy sinh khối tế bào đạt cao nhất sau 18 ngày, với 45,611 g tươi. Trong khi đó, hàm lượng gypenoside và Rb1 đạt cao nhất vào ngày thứ 16, với giá trị tương ứng là 40,090 mg/g và 0,038 mg/g khô. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể nuôi tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam để sản xuất sinh khối, cung cấp nguyên liệu cho quá trình sản xuất gypenoside.

**Từ khóa:** bioreactor, giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, tế bào huyền phù

# Study on biomass and gypenoside production of *Gynostemma pentaphyllum* via suspension cell culture

Dang Ngoc Sang<sup>1,2</sup>, Pham Thi Diem Thi<sup>1</sup>, Tran Thi Thoa<sup>1</sup>,  
Tran Quoc Dung<sup>3</sup>, Hoang Tan Quang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Vo Nguyen Giap Gifted High School, Tran Quang Khai St., Dong Hoi, Quang Binh, Vietnam

<sup>3</sup> University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Hoang Tan Quang <htquang@hueuni.edu.vn>

(Submitted: January 9, 2025; Accepted: February 20, 2025)

**Abstract.** *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino can be used for both medicinal and tea and has lipid-lowering properties. It has many beneficial effects such as hypolipidemic, anti-cancer, cardioprotective, hepatoprotective, neuroprotective, anti-diabetic and anti-inflammatory. Its main bioactive components are flavonoids and saponins. In this study, determining a suitable culture medium and testing the bioreactor culture of suspension cells for biomass and gypenoside production were performed. In Erlenmeyer flasks cultivation, the suitable culture medium is basic MS supplemented with 2 mg/L KIN combined with 0.5 mg/L IBA, 3% sucrose with fresh biomass value of 3.693 g/50 mL medium, gypenoside and Rb1 content reached 40.240 mg/g and 0.041 mg/g dry weight after 18 days of culture, respectively. Preliminary cultivation in bioreactor containing 6 L of medium showed that fresh cell biomass reached the highest after 18 days, reaching 45,611 g. Meanwhile, gypenoside and Rb1 content reached the highest on day 16, with values of 40.090 mg/g and 0.038 mg/g dry weight, respectively. The results show that it is possible to grow suspension cell of jiaogulan in bioreactor to produce biomass, providing raw materials for the gypenoside production process.

**Keywords:** bioreactor, jiaogulan, *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, suspension cell

## 1 Đặt vấn đề

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một loài dược liệu quý thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae), phân bố rộng rãi tại Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và các quốc gia Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam [1]. Giảo cổ lam có tác dụng hạ đường huyết, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu, ... [2]. Thành phần hoạt tính sinh học chính là flavonoid và saponin, trong đó saponin dạng dammarane-triterpene được cho là thành phần có vai trò chính [2, 3]. Hiện nay, có hơn 180 loại saponin được tìm thấy trong cây Giảo cổ lam, được gọi chung là gypenoside; trong đó nhiều thành phần có cấu trúc giống với saponin của nhân sâm (*Panax ginseng*) [4].

Do có vai trò tương tự nhân sâm nhưng giá thành rẻ hơn, nên Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy triển vọng [5]. Tuy nhiên, nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm. Theo sách đỏ Việt Nam năm 2007,

Giáo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d). Do đó, việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giáo cổ lam tự nhiên là cần thiết. Trong đó, nuôi cấy huyền phù tế bào được xem là giải pháp hiệu quả và đã được áp dụng thành công trên nhiều đối tượng khác nhau [6].

Nuôi cấy tế bào huyền phù có nhiều lợi thế hơn so với khai thác cây tự nhiên như sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, chủ động trong cung cấp nguyên liệu, không bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, cần ít diện tích sản xuất, ... [7]. Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giáo cổ lam như Jala và cs. [8] hay Ao và cs. [9], tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào cây này chưa được các tác giả trên thực hiện. Trong thời gian qua, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tạo và nuôi cấy thành công tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam, một số yếu tố điều kiện nuôi cấy cũng đã được xác định như tỷ lệ tiếp giống, tốc độ lắc, thời gian nuôi, ... Trong đó, các loại gypenoside, đặc biệt là Rb1, đã được chứng minh là xuất hiện trong tế bào huyền phù [10, 11]. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục trình bày các kết quả nghiên cứu xác định môi trường nuôi cấy tế bào và kết quả bước đầu về nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam trong bioreactor.

## 2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### Vật liệu

Tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) hình thành từ cây *in vitro*, đây là cây có nguồn gốc tự nhiên tại xã Trà Nam, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam [12].

### Phương pháp nghiên cứu

#### Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nuôi cấy tế bào huyền phù được thực hiện bằng cách cấy chuyển 2 g callus (30 ngày tuổi) vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng, tốc độ lắc là 120 vòng/phút trên máy lắc SM 30A (Edmund Buhler, Đức) [10] để đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù.

- Chất điều hòa sinh trưởng: phối hợp giữa 0,5 mg/L IBA (3-indolebutyric acid) và các cytokinin riêng lẻ là BAP (6-benzylaminopurine - BAP) hoặc KIN (Kinetin) ở các nồng độ 1,0–3,0 mg/L tương tự như trong thí nghiệm đối với callus [12].

- Nguồn carbon: bao gồm sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose và glycerol được bổ sung riêng lẻ vào môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào ở nồng độ 3%.

Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, nhiệt độ phòng nuôi  $25 \pm 2$  °C, chu kỳ chiếu sáng 12h/12h

sáng/tối, cường độ chiếu sáng 2.000 lux. Môi trường nuôi cấy là môi trường Murashige và Skoog, 1962 (MS) [13] cơ bản có chứa 3% đường sucrose, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo từng thí nghiệm, pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C trong thời gian 15 phút.

Sinh khối tế bào được thu sau 18 ngày nuôi cấy để xác định khối lượng tươi và khối lượng khô. Tế bào được lọc và rửa sạch môi trường với nước cất bằng hệ thống lọc chân không, cân để xác định trọng lượng tươi. Tế bào sau đó được sấy ở 50 °C đến trọng lượng không đổi, cân để xác định trọng lượng khô [14].

Các tiêu chí được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô, và hàm lượng gypenoside.

### **Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor**

Để thử nghiệm khả năng sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào trong bioreactor, chúng tôi sử dụng hệ thống LiFlux GX (thể tích bình 14 lít, Hanil, Hàn Quốc) để tiến hành nuôi cấy; thể tích nuôi cấy 6 lít, tỷ lệ tiếp giống 10% (v/v) (tương đương với khoảng 6 g khối lượng tươi/L môi trường), tốc độ khuấy 150 vòng/phút, các thông số khác được cài đặt mặc định [15]. Môi trường sử dụng trong thử nghiệm là môi trường lỏng tốt nhất thu được trong thí nghiệm ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng. Điều kiện nhiệt độ, ánh sáng phòng nuôi tương tự thí nghiệm nuôi cấy tế bào trong bình tam giác.

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, mẫu được thu sau mỗi hai ngày nuôi từ ngày thứ 10 (10 mL dịch huyền phù, mỗi lần lấy 3 mẫu) thông qua van thu mẫu trên bioreactor, các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng gypenoside. Sinh khối và sự sinh trưởng của tế bào trong hệ lên men được quy đổi từ sinh khối tươi và sinh khối khô trong mỗi lần thu.

### **Xác định hàm lượng gypenoside**

*Tách chiết gypenoside:* Sinh khối khô tế bào Giảo cổ lam (thu từ bình nuôi cấy hoặc hệ lên men) được sử dụng để tách chiết gypenoside theo tỉ lệ 0,5 g mẫu: 10 mL methanol 80% và siêu âm (S10H, Elmasonic) ở 40 °C trong thời gian 30 phút, lặp lại 3 lần. Dịch chiết thu được để bay hơi đến khô ở 50 °C. Cao chiết được cân và tái hòa tan trong methanol đến nồng độ 5 mg/mL, lọc qua màng lọc 0,22 µm sau đó bảo quản ở 4 °C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo [16].

*Xác định hàm lượng gypenoside:* Hàm lượng gypenoside được xác định bằng phản ứng màu với vanillin. 50 µL dịch chiết gypenoside được chuyển vào ống nghiệm sau đó bổ sung 250 µL dung dịch vanillin 8% (pha trong ethanol). Hỗn hợp phản ứng được đặt trong nước đá, tiếp tục bổ sung 2,5 mL sulphuric acid 72%, trộn đều và để trên đá ít nhất 3 phút. Ống nghiệm chứa hỗn hợp phản ứng được làm nóng đến 60 °C trong 10 phút sau đó được làm lạnh trên nước đá. Phản ứng so màu được thực hiện trên máy quang phổ (UV-2650, Labomed, Mỹ) ở bước sóng 544 nm. Chất chuẩn được sử dụng trong phân tích là ginsenoside Rb1 (Rb1) (Y0001347, CRS) [17].

*Xác định hàm lượng Rb1:* Rb1 được định lượng bằng phương pháp HPLC thực hiện trên hệ thống Alliance E2695 với cột Symmetry®C18 (4,6 mm × 250 mm × 5 mm). Pha động bao gồm nước và acetonitrile (34%) trong thời gian 20 phút, nhiệt độ chạy 30 °C, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, thể tích chạy 20 µL. Tín hiệu được thu nhận bằng đầu dò PDA2998 ở bước sóng 203 nm. Hàm lượng Rb1 được xác định dựa trên diện tích của peak có thời gian lưu trùng với peak chuẩn [17].

### Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test với  $p < 0,05$  sử dụng phần mềm SPSS ver 20.0.

## 3 Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào.

Trong quá trình nuôi cấy, các điều kiện nuôi cấy thường được tối ưu cho sự sinh trưởng và sản xuất hợp chất thứ cấp của tế bào. Sự lựa chọn các thành phần môi trường phù hợp đóng một vai trò quan trọng trong việc sản xuất hợp chất thứ cấp. Các thành phần dinh dưỡng đa lượng và vi lượng, vitamin, nguồn carbon, amino acid, các chất điều hòa sinh trưởng (cytokinin, auxin) đều ảnh hưởng lên quá trình sản xuất hợp chất thứ cấp [18]. Để thăm dò ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sinh trưởng và tích lũy saponin của tế bào, chúng tôi sử dụng 10 môi trường với các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng khác nhau, kết quả trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của BAP hoặc KIN kết hợp với 0,5 mg/L IBA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
1	-	3,203 <sup>b</sup>	0,149 <sup>ab</sup>	26,360 <sup>d</sup>	0,025 <sup>d</sup>
1,5	-	2,822 <sup>c</sup>	0,120 <sup>c</sup>	34,601 <sup>b</sup>	0,043 <sup>b</sup>
2	-	2,997 <sup>bc</sup>	0,138 <sup>b</sup>	34,932 <sup>b</sup>	0,049 <sup>a</sup>
2,5	-	3,501 <sup>a</sup>	0,161 <sup>a</sup>	35,850 <sup>b</sup>	0,048 <sup>a</sup>
3	-	2,732 <sup>c</sup>	0,113	25,053 <sup>d</sup>	0,019 <sup>e</sup>
-	1	2,573 <sup>cd</sup>	0,121 <sup>c</sup>	23,287 <sup>d</sup>	0,025 <sup>d</sup>
-	1,5	2,860 <sup>c</sup>	0,118 <sup>c</sup>	40,900 <sup>a</sup>	0,034 <sup>c</sup>
-	2	3,693 <sup>a</sup>	0,157 <sup>a</sup>	40,240 <sup>a</sup>	0,041 <sup>b</sup>
-	2,5	3,274 <sup>b</sup>	0,144 <sup>ab</sup>	31,733 <sup>c</sup>	0,032 <sup>c</sup>
-	3	2,369 <sup>d</sup>	0,095 <sup>d</sup>	24,190 <sup>d</sup>	0,013 <sup>f</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Duncan's test).

Về sinh khối, có 2 môi trường cho sinh khối cao nhất sau 18 ngày nuôi cấy, đó là môi trường bổ sung 2,5 mg/L BAP kết hợp với 0,5 mg/L IBA (sinh khối tươi đạt 3,501 g/bình) và môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA (sinh khối tươi đạt 3,693 g/bình). Các môi trường còn lại đều cho hiệu quả thấp hơn.

Đối với quá trình tích lũy gypenoside, các môi trường chứa KIN và IBA có hiệu quả tích lũy cao hơn các môi trường chưa BAP và IBA, trong đó nồng độ KIN từ 1,5–2 mg/L cho hiệu quả cao nhất (40–41 mg gypenoside/g khô), hàm lượng Rb1 cao nhất thu được ở môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA (0,041 mg/g khô).

Như vậy, sau khi thăm dò các điều kiện nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA phù hợp nhất cho nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam, đây cũng chính là môi trường tốt nhất khi nuôi cấy callus [12].

Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào.

Nguồn carbon được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* với vai trò vừa là nguồn năng lượng, vừa là chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào [19]. Ngoài ra, chúng cũng có thể là phân tử tín hiệu và đóng vai trò tương tự chất điều hoà sinh trưởng thực vật, giúp điều chỉnh quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và phát triển của tế bào bằng sự kích thích biểu hiện hoặc ức chế các gene mã hoá enzyme [20]. Mặc dù sucrose và glucose được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, mỗi loài lại thích hợp với một nguồn carbon khác nhau cần cho quá trình hình thành các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Trong nuôi cấy tế bào thực vật, nhiều loại đường đơn cũng đã được sử dụng như glucose, fructose, sorbitol, galactose... [21]. Do đó, việc khảo sát nguồn cung cấp carbon và nồng độ thích hợp là cần thiết.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các nguồn carbon được sử dụng là sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose, và glycerol ở nồng độ 3%. Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy sucrose vẫn là nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng (3,641 g tươi/bình) và tích lũy gypenoside của tế bào (39,845 mg gypenoside/g khô), tiếp theo là glucose. Ở tất cả các nguồn carbon khác, tế bào đều sinh trưởng và tích lũy gypenoside không tốt bằng.

Sucrose được xem là nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào thực vật, nồng độ thường dùng là từ 20–70 g/L. Sucrose vừa cung cấp năng lượng vừa là một thành phần trong sinh tổng hợp các chất thứ cấp. Tốc độ tăng trưởng sinh khối thực vật luôn liên quan trực tiếp tới sự tiêu thụ sucrose. Vai trò của sucrose trong việc tăng tích lũy sinh khối khô tế bào có thể do ảnh hưởng của nó lên tubulin, một protein chịu trách nhiệm trong sinh trưởng và phát triển của tế bào. Trên môi trường mà tất cả các nguồn dinh dưỡng ở mức dư thừa, sự gia tăng nồng độ sucrose sẽ dẫn đến tăng sinh khối khô. Tuy nhiên, khi nồng độ sucrose quá cao sẽ dẫn đến áp suất thẩm thấu vượt giới hạn cho phép của tế bào vì thế ảnh hưởng xấu lên sinh trưởng của chúng [22]. Trên một số đối tượng khác, nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng và tích lũy hợp chất thứ cấp không phải là sucrose mà là các loại đường khác. Chẳng hạn, fructose 5% giúp tăng sinh trưởng của tế bào cây *Morinda elliptica*. Trong nuôi cấy tế bào cây ngô fructose được

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nguồn carbon	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
Sucrose	3,641 <sup>a</sup>	0,157 <sup>a</sup>	39,845 <sup>a</sup>	0,037 <sup>a</sup>
Glucose	3,247 <sup>b</sup>	0,106 <sup>b</sup>	22,349 <sup>d</sup>	0,031 <sup>b</sup>
Fructose	2,383 <sup>c</sup>	0,095 <sup>b</sup>	27,862 <sup>c</sup>	0,030 <sup>b</sup>
Galactose	2,795 <sup>c</sup>	0,114 <sup>b</sup>	15,033 <sup>e</sup>	0,034 <sup>b</sup>
Lactose	2,311 <sup>c</sup>	0,091 <sup>b</sup>	31,397 <sup>b</sup>	0,034 <sup>b</sup>
Glycerol	2,471 <sup>c</sup>	0,094 <sup>b</sup>	29,905 <sup>bc</sup>	0,031 <sup>b</sup>

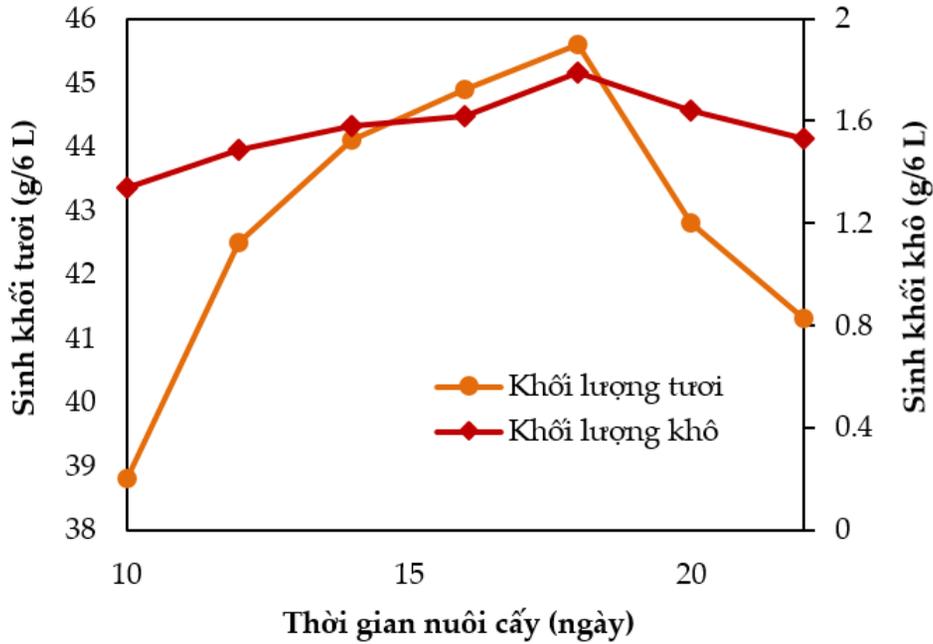
*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Duncan's test).

vận chuyển nhanh nhất, tiếp đến là glucose và sau cùng là sucrose. Một số nghiên cứu khác cũng thu được kết quả tương tự như khi nuôi cấy tế bào của cây cà độc dược lá bạc (*Solanum eleagnifolium*), *Ficus deltoide* và dây thần thông (*Tinospora cordifolia*) [23].

#### Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor

Các khối callus Giảo cổ lam trước khi nuôi cấy trong bioreactor được chuyển vào nuôi cấy trong các bình tam giác chứa môi trường lỏng, đây là bước chuyển tiếp quan trọng để tạo dịch huyền phù tế bào. Sau 7 ngày nuôi cấy, sinh khối tế bào Giảo cổ lam chưa tăng trưởng nhiều, khối lượng tươi thu được là khoảng 3,1 g.

Trong 10 ngày đầu của quá trình nuôi cấy, sinh khối tươi của tế bào tăng chậm, chỉ đạt 38,860 g trong khi khối lượng đầu vào khoảng 37,221 g. Sau quá trình thích nghi ban đầu, sinh khối tế bào tăng nhanh trong những ngày tiếp theo, từ 38,860-45,611 g (1,341 - 1,792 g sinh khối khô), trong đó sinh khối đạt đỉnh ở ngày thứ 18 (Hình 1). Trong giai đoạn này sinh khối có màu vàng đậm, kết thành nhiều khối nhỏ (Hình 2). Sau giai đoạn này tế bào bắt đầu chuyển sang giai đoạn chết do dinh dưỡng trong bình nuôi cấy bắt đầu cạn, sinh khối tươi và khô của tế bào huyền phù giảm dần theo thời gian (từ 45,611 g tươi giảm xuống 41,370 g sau 4 ngày). Tế bào chuyển màu đậm hơn. Sau 22 ngày nuôi cấy, chúng tôi tiến hành dừng và thu sinh khối. Các mẫu sinh khối khô thu từng giai đoạn được sử dụng để phân tích hàm lượng gypenoside tích lũy. Ở thí nghiệm nuôi cấy trong bioreactor, thể tích mẫu thu trong mỗi đợt là 30 mL, chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ so với thể tích nuôi (> 6 L) nên không ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của tế bào.



. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù nuôi cấy trong bioreactor



A

B

C

A. Tế bào sinh trưởng trong bioreactor, B. Sinh khối tươi, C. Sinh khối khô. bar = 1 cm  
 ấy tế bào huyền phù *Giáo cổ lam* trong bioreactor 12 lít

Sinh khối khô thu được từ các ngày nuôi cấy khác nhau trong bioreactor được chiết với methanol để thu gypenoside tổng số. Kết quả phân tích hàm lượng gypenoside tích lũy trong tế bào huyền phù được thể hiện ở Bảng 3.

Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù *Giáo cổ lam* nuôi cấy trong bioreactor tăng trưởng nhanh bắt đầu từ ngày thứ 10 của quá trình nuôi cấy. Trong khi đó, sự tích lũy gypenoside tăng nhanh và đạt cực đại ở ngày nuôi cấy thứ 16 với hàm lượng đạt từ 26,412–40,090 mg/g khô. Sau đó, hàm lượng bắt đầu giảm trong các ngày nuôi cấy tiếp theo. Hàm lượng Rb1 tích lũy cũng đạt cực đại ở ngày thứ 16 (0,038 mg/g khô). Tế bào thực vật thường có sự tích lũy nhiều các hợp

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù trong bioreactor

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
10	26,412	0,013
12	31,524	0,017
14	34,483	0,022
16	40,090	0,038
18	38,121	0,032
20	32,675	0,030
22	28,736	0,026

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Duncan's test).

chất thứ cấp khi tế bào chuẩn bị bước vào pha ổn định của quá trình sinh trưởng. Trong pha sinh trưởng tế bào tập trung chất dinh dưỡng cho quá trình phân chia và nhân lên. Cuối pha sinh trưởng, tế bào tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp nhằm bảo vệ tế bào tránh khỏi những tác động xấu từ môi trường như sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, sự tích lũy nhiều hơn các chất độc của quá trình trao đổi chất... [7].

#### 4 Kết luận

Nuôi tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam có thể được thực hiện để sản xuất sinh khối, cung cấp nguyên liệu cho quá trình sản xuất gypenoside ở quy mô bioreactor. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor chứa 6 L môi trường cho thấy sinh khối tế bào đạt cao nhất sau 18 ngày, với 45,611 g tươi. Trong khi đó, hàm lượng gypenoside và Rb1 đạt cao nhất vào ngày thứ 16, với giá trị tương ứng là 40,090 mg/g và 0,038 mg/g khô.

#### Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhóm Nghiên cứu mạnh, Đại học Huế (mã số NCM.DHH2020.12).

#### Tài liệu tham khảo

1. Cui W. Y., Jin Y., Liu H., Zu M. L., Zhai X. F., Yang C., Gu Y. L., Cheng Y., Piao X. L. (2021), Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities, *Natural Product Research*, 35(22), 4433–4441.
2. Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền, Ngô Xuân Bình (2015), Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma*

- pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 15, 249–256.
3. Xie P., Luo H. T., Pei W. J., Xiao M. Y., Li F. F., Gu Y. L., Piao X. L. (2024), Saponins derived from *Gynostemma pentaphyllum* regulate triglyceride and cholesterol metabolism and the mechanisms: A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 319(Pt 1), 117186.
  4. Chen P. Y., Chang C. C., Huang H. C., Zhang L. J., Liaw C. C., Lin Y. C., Nguyen N. L., Vo T. H., Cheng Y. Y., Morris-Natschke S. L., Lee K. H., Kuo Y. H. (2019), New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *Molecules*, 24(7).
  5. Liang T., Zou L., Sun S., Kuang X., Wei J., Wang L., Li Y., Sun C. (2019), Hybrid sequencing of the *Gynostemma pentaphyllum* transcriptome provides new insights into gypenoside biosynthesis, *BMC Genomics*, 20(1), 632.
  6. Nguyễn Hữu Nhân, Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Hoàng Lộc (2019), Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của callus cây Bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack), *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Khoa học tự nhiên*, 128, 69–76.
  7. Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng*. NXB Đại học Huế.
  8. Jala A., Patchpoonporn W. (2012), Effect of BA NAA and 2,4D on Micropropagation of Tiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum* Makino), *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 3(4), 363–370.
  9. Ao Z., Qin Z. (1998), Effect of some stress factors on gypenoside accumulation in callus of *Gynostemma pentaphyllum*, *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 4(1), 10–14.
  10. Nguyen-Thanh T., Dang-Ngoc S., Tran-Quoc D., Hoang-Tan Q. (2023), Gypenosides production and spermatogenesis recovery potentials of extracts from cell Suspension cultures of *Gynostemma pentaphyllum*, *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 15(4), 216–22.
  11. Anh T. T. N., Thi P. T. D., Lan T. T., Dung T. Q., Vu N. Q. H., Phuong T. T. B., Quang H. T. (2020), Affect of culture conditions on growth and accumulation of saponin Rb1 in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino suspension cells, *Proceedings of Vietnam National Conference of Biotechnology*, 885–890 (in Vietnamese).
  12. Hoàng Tấn Quảng, Phạm Thị Diễm Thi, Trần Thúy Lan, Phạm Mai Thu Thủy, Vũ Đức Hoàng, Phan Thị Á Kim (2021), Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của callus cây giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)-một loại thảo dược quý, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 130(1C), 127–137.
  13. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
  14. Nhan N. H., Loc N. H. (2018), Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment, *J Plant Biotechnol*, 45(4), 340–346.

15. Loc N. H., Nhat N. T. D. (2013), Production of asiaticoside from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cells in bioreactor, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 806–810.
16. Wu Q., Jang M., Piao X. L. (2014), Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(2), 311–316.
17. Quang H. T., Thi P. T. D., Sang D. N., Tram T. T. N., Huy N. D., Dung T. Q., The Q. T. T. (2022), Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*), *Molecules*, 27(9), 2972.
18. Chandran H., Meena M., Barupal T., Sharma K. (2020), Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds, *Biotechnology Reports*, 26, e00450.
19. André S. B., Mongomake K., Kouassi M., Edmond K. K., Kone T., Kouakou T., Kouadio J. (2015), Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenacea), *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8, 118–127.
20. Ilczuk A., Jagiełło-Kubiec K., Jacygrad E. (2013), The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (*Physocarpus opulifolius* (L.) Maxim.) 'Diable D' or', *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus*, 12(3), 23–33.
21. Mello M. O., Dias C. T. S., Amaral A. F. C., Melo M. (2001), Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension cultures with carbon sources, *Scientia Agricola*, 58, 481–485.
22. Bùi Văn Lê, Nguyễn Ngọc Hồng (2006), Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và đường saccharose lên dịch nuôi cấy huyền phù tế bào dừa cạn (*Catharanthus roseus*), *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 9(6), 59–66.
23. Rao B., Kumar V., Amrutha N., Jalaja N., Vaidyanath K., Rao A., Polavarap S., Kishor P. (2008), Effect of growth regulators, carbon source and cell aggregate size on berberine production from cell cultures of *Tinospora cordifolia* Miers, *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 2(2), 269–276.