

BÀI TỔNG QUAN

ỨNG DỤNG ELICITOR VÀO SẢN XUẤT SAPONIN TRONG NUÔI CÂY *IN VITRO* CÁC LOÀI THUỘC CHI NHÂN SÂM

Nguyễn Thị Nhật Linh^{1,2}, Nguyễn Hoàng Lộc², Dương Tấn Nhật^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học khoa học, Đại học Huế

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 29.3.2017

Ngày nhận đăng: 25.01.2018

TÓM TẮT

Các loài nhân sâm là các loài cây thuốc truyền thống có giá trị cao, có thành phần dược chất chính là các ginsenoside thuộc nhóm saponin, đây là các triterpene glycoside loại dammarane, chứa tetracyclic aglycone. Trong cây, các saponin là các chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng để cây phát triển. Trong công nghiệp y dược, các saponin được dùng để sản xuất các loại thuốc để điều trị bệnh và phục hồi sức khỏe. Tuy nhiên, để ứng dụng thương mại còn gặp nhiều trở ngại vì năng suất thấp và khó nuôi trồng, nguồn sâm tự nhiên lại rất hiếm. Hơn nữa, các hợp chất saponin có cấu trúc phức tạp, khó hóa tổng hợp trên quy mô công nghiệp. Giải pháp thay thế tối ưu nhất hiện nay là ứng dụng nuôi cấy mô *in vitro* để sản xuất được lượng lớn nguồn tế bào hay rễ sâm trong thời gian ngắn. Nhưng khó khăn lớn nhất khi sản xuất *in vitro* là hàm lượng saponin thấp hơn rất nhiều so với ngoài tự nhiên. Để tăng hàm lượng saponin, các chất kích kháng (elicitor) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Dựa vào tác động của elicitor, công nghệ sản xuất các hợp chất thứ cấp có thể làm tăng biểu hiện của các gen mã hóa cho các tín hiệu hay các enzyme tổng hợp saponin trong con đường isoprenoid, từ đó nâng cao được sản lượng saponin hoặc điều chỉnh sản xuất các loại saponin theo mong muốn. Do đó, bài tổng quan này đã tổng hợp những nghiên cứu gần đây về lĩnh vực này ở trong nước và trên thế giới để tìm hiểu và nâng cao được hiệu quả ứng dụng của elicitor vào sản xuất các saponin từ nuôi cấy *in vitro*.

Từ khóa: Chi nhân sâm, công nghệ chuyển hóa thứ cấp, *in vitro*, kích kháng, saponin

GIỚI THIỆU

Việt Nam có hơn 4000 loài cây thuốc nằm trải dài khắp đất nước và đa số những loài thuốc quý này chứa dược chất chính là các hợp chất saponin. Công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật là một phương thức hữu hiệu để sản xuất các chất chuyển hóa thực vật chuyên biệt và phức tạp giống như saponin. Các loài thuốc chi nhân sâm là một trong những loài cây thuốc nổi tiếng chứa nhiều hợp chất saponin quý có giá trị rất cao của phương Đông (Liang, Zhao, 2008). Từ thời cổ đại, ở nhiều nước châu Á, rễ nhân sâm khô đã được sử dụng như một thần dược để bồi bổ và tăng cường sức khỏe. Nhân sâm đã được biết đến trên toàn thế giới với các công dụng như tăng cường miễn dịch, bồi bổ sức khỏe và chống stress, ngoài ra còn có tác dụng trong điều trị tiểu đường và các bệnh nan y như ung thư (Faizal, Geelen, 2013). Saponin không chỉ có vai trò quan trọng trong ngành sản xuất

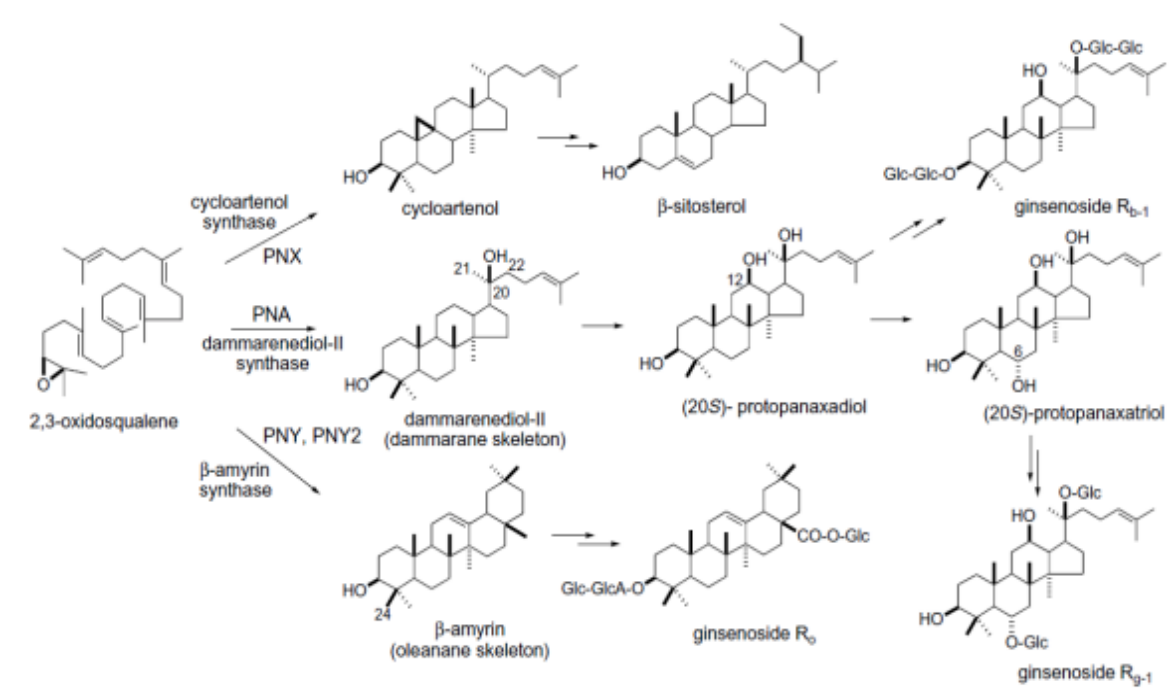
được phẩm, mà còn được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác như chế biến thực phẩm và mỹ phẩm (Langhansová *et al.*, 2005; Faizal, Geelen, 2013). Tuy nhiên, hiệu quả tích lũy saponin của sâm ngoài tự nhiên còn rất thấp cho nên khó có thể thương mại hóa các sản phẩm có saponin chiết xuất từ các loài sâm quý hiện nay. Do sản xuất các saponin từ chi nhân sâm đang phải đối mặt với nhiều vấn đề, chẳng hạn như hàm lượng saponin được tích lũy trong nuôi cấy *in vitro* thấp, nguồn sâm tự nhiên thì rất hiếm, đa số các cây sâm rất khó trồng và thời gian thu hái dài, tối thiểu phải mất 4 năm. Vì vậy, những nỗ lực nghiên cứu nhằm tìm cách để tăng cường quá trình tích lũy các saponin hoặc thúc đẩy biểu hiện gen tổng hợp các saponin ở chi nhân sâm có ý nghĩa rất thiết thực cho ngành sản xuất y dược. Vì thế, để có thể thu được nguồn saponin cao từ các chi nhân sâm, một trong những biện pháp đầy hứa hẹn là nuôi cấy *in vitro* trên diện rộng. Với việc bổ

sung các chất kích kháng (elicitor) vào môi trường dinh dưỡng thích hợp trong nuôi cấy *in vitro*, khả năng tích lũy saponin được kích thích (Paek *et al.*, 2009). Theo con đường truyền tín hiệu, các gen phòng vệ và các enzyme xúc tác các phản ứng tổng hợp các triterpene saponin được kích hoạt khi các thụ thể trên màng tế bào nhận diện được các elicitor. Bản chất của các elicitor chính là các mầm bệnh hay là các yếu tố do thực vật tạo ra để nhận biết được các tác nhân gây hại, và các yếu tố này có thể được tổng hợp nhân tạo hay thu nhận từ tự nhiên. Có thể nói, các elicitor rất đa dạng và phong phú nhưng mỗi elicitor thì chỉ có thể được nhận biết bởi một thụ thể và tương ứng với từng enzyme, từng gen cụ thể trong từng loài sâm. Chính vì thế, những nghiên cứu ứng dụng của elicitor để kích hoạt các gen sản xuất

saponin trong nuôi cấy *in vitro* các loài thuộc chi nhân sâm đang được quan tâm rất nhiều và có vai trò đặc biệt quan trọng trong ngành công nghiệp tách chiết, sản xuất hóa dược phẩm.

SAPONIN

Saponin là một hợp chất glycoside tự nhiên có hoạt tính bề mặt. Đây là một nhóm đa dạng của terpenoid được đặc trưng bởi các cấu trúc khác nhau. Saponin được cấu tạo từ một hoặc nhiều chuỗi đường. Một cây nhân sâm có thể chứa hàng chục loại saponin có cấu trúc liên quan chặt chẽ với nhau (Ali *et al.*, 2006). Chính sự đa dạng về cấu trúc đã tạo ra hàng loạt các saponin khác nhau đang được khai thác và ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực.



Hình 1. Sinh tổng hợp các ginsenoside thuộc nhóm dammaran ở cây *Panax ginseng* từ 2,3-oxidosqualene, Gen PNA mã hóa enzyme dammarenediol-II synthase, P450: cytochrome P450 oxygenase (Pimpimon *et al.*, 2006).

Ngày nay, nhiều nghiên cứu đã xác định rằng các saponin là các thành phần hoạt hóa quan trọng trong con đường chuyển hóa các chất. Đa số các saponin có tính kháng khuẩn, diệt vi rút, hoặc chống lại côn trùng. Theo quan điểm này, có thể nói saponin là một trong những thành phần quan trọng trong cơ chế bảo vệ thực vật và có thể được xếp vào nhóm phytoprotectant và chủ yếu thuộc phân nhóm phytoalexin (Langhansová *et al.*, 2005; Namdeo, 2007). Phytoalexin là những chất không

có sẵn trong cây khỏe mạnh nhưng được tổng hợp để đáp ứng lại với các cuộc tấn công của mầm bệnh hoặc stress như là một phần của phản ứng bảo vệ thực vật và được giới hạn trong các mô xâm chiếm bởi các loại nấm và xung quanh vùng tế bào bị nhiễm trùng.

Trong cây nhân sâm, các ginsenoside saponin tập trung chủ yếu ở ngoài tầng phát sinh của rễ và nhiều nhất ở phần vỏ ngoài periderm và ngoài vỏ cortex bên ngoài phloem (Langhansová *et al.*, 2005).

Cho đến nay đã có hơn 50 loại ginsenoside saponin được xác định có trong các loài *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. quinquefolius* và *P. vietnamensis*.

Sinh tổng hợp terpene trong thực vật là một quá trình phức tạp và khó hóa tổng hợp, chủ yếu qua hai con đường sinh tổng hợp trung gian: mevalonate và methyl-erythritol (Langhansová *et al.*, 2005), cả hai đều hình thành isopentenyl diphosphate (IPP) và đồng phân dimethylallyl diphosphate (DMAPP), đó là những tiền chất hình thành tất cả terpene. Tích hợp nhóm gen mở đầu đến kết thúc của IPP và DMAPP giúp hình thành các geranyl diphosphate (GPP) và bước này tạo sản phẩm trung gian là GPP synthase (GPS). Dưới xúc tác FPP synthase (FPS), một đơn vị IPP được gắn vào GPP tạo FPP. Sau đó, squalene synthase (SS) xúc tác cho phản ứng ngưng tụ hai đơn vị FPP tổng hợp squalene, tiền thân của steroid và triterpene saponin (Christensen, 2009). Sau đó, squalene được oxy hóa thành oxidosqualene, điểm khởi đầu thường thấy để tạo vòng trong sinh tổng hợp triterpene saponin. Oxidosqualene chuyển hóa thành các dẫn xuất theo chu kỳ tạo carbocation, có thể trải qua một số loại phản ứng tạo vòng. Các loại cyclase xúc tác phản ứng tạo vòng và hình thành nên bộ khung triterpene saponin. Các enzyme quan trọng nhất giúp tăng các saponin của nhóm dammarane là dammarenyliol synthase (DDS), β -amyrin synthase (β AS) và α -amyrin synthase (α AS) (Hình 1). Sau đó, phụ thuộc vào từng enzyme khác nhau sẽ xúc tác phản ứng tạo ra từng loại saponin cụ thể như G-Rb1, MR2, G-Rg1, ... Tuy nhiên, các enzyme cụ thể cho từng con đường vẫn chưa rõ ràng.

ELICITOR

Saponin triterpenoid trong nhân sâm có cấu trúc phức tạp, khó hóa tổng hợp nên không thể cạnh tranh kinh tế khi sản xuất trên quy mô lớn. Nguồn cung hiện tại của saponin chủ yếu được chiết xuất từ cây trồng ngoài tự nhiên nhưng phải đối mặt với rất nhiều khó khăn vì quá trình sản xuất và thu nhận tốn nhiều công sức, thời gian và năng suất lại thấp. Ngoài ra, sản lượng saponin còn chịu tác động bởi các biến đổi địa lý và mùa vụ. Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật là giải pháp tối ưu để sản xuất saponin dễ dàng và nhanh chóng vì nuôi cấy nhân sâm *in vitro* có thể khắc phục nhiều vấn đề mắc phải khi thu hái ngoài đồng và năng suất còn được cải thiện rõ rệt (Paek *et al.*, 2009). Tuy nhiên, lượng saponin trong nuôi cấy *in vitro* thấp hơn ngoài tự nhiên rất nhiều. Để cải thiện điều này, việc gây kích kháng bằng các elicitor mang lại hiệu quả vô cùng to lớn.

Elicitor (chất kích kháng) là một thuật ngữ phổ biến dùng để chỉ các hóa chất hay các tác nhân có nguồn gốc khác nhau từ sinh học hoặc phi sinh học, cũng như từ các yếu tố vật lý có thể gây ra phản ứng trong cơ thể sống dẫn đến tích tụ các chất chuyển hóa thứ cấp. Ngoài ra, chất kích kháng thực vật còn là các phân tử kích thích phản ứng phòng vệ hoặc cảm ứng chống chịu ở thực vật. Việc tạo ra kích thích để tăng cường quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp bằng cách bổ sung một lượng nhỏ các chất kích kháng được gọi là sự kích kháng (Namdeo, 2007).

Elicitor có thể được phân loại dựa vào bản chất tự nhiên có thể phân thành elicitor phi sinh học và elicitor sinh học, hoặc dựa vào nguồn gốc là elicitor ngoại sinh và elicitor nội sinh (Bảng 1).

CƠ CHẾ GÂY KÍCH KHÁNG Ở CHI NHÂN SÂM

Các elicitor có nguồn gốc khác nhau, có khả năng gây nên các đáp ứng về mặt hình thái, sinh lý và tích lũy phytoalexin (chất được sinh ra ở thực vật khi chịu tác động của các tác nhân gây bệnh). Việc thực hiện gây kích kháng các cây nhân sâm bởi các elicitor hoặc sự tấn công của mầm bệnh gây ra một loạt các phản ứng phòng vệ, bao gồm sự tích lũy các hợp chất saponin để bảo vệ cây ở tự nhiên cũng như trong nuôi cấy *in vitro* (Liang, Zhao, 2008). Mặc dù đã có những nghiên cứu sâu về cơ chế ảnh hưởng của elicitor lên sự sản xuất hợp chất thứ cấp ở thực vật, tuy nhiên cơ chế của sự kích kháng vẫn chưa được hiểu đầy đủ. Có nhiều giả thuyết đã được đưa ra để giải thích tác động của elicitor như cơ chế truyền tin bởi Ca^{2+} , các yếu tố ảnh hưởng đến sự nguyên vẹn của màng tế bào, con đường ức chế/hoạt hóa nội bào hay thay đổi áp suất thẩm thấu (Namdeo, 2007; Ali *et al.*, 2006).

Một số giả thiết cho rằng có sự liên kết giữa elicitor với các thụ thể trên màng sinh chất để kích hoạt quá trình kích kháng. Ca^{2+} gắn vào màng nguyên sinh chất từ môi trường bên ngoài tế bào và nguồn Ca^{2+} bên trong tế bào. Một số tác giả nhấn mạnh đến sự thay đổi nhanh quá trình phosphoryl hóa protein và kích hoạt protein kinase chính là cơ chế của quá trình kích kháng (Zhao *et al.*, 2005). Trong khi đó, nhiều tác giả khác nhận thấy có sự tích lũy mitogen-activated protein kinase (MAPK) và kích hoạt G-protein trong quá trình kích kháng ở nhân sâm. Hu và đồng tác giả (2004) cho thấy các hoạt động gây ra bởi elicitor sinh học chitosan (CHN) lên MAPK cần cho việc tổng hợp saponin.

EGTA và LaCl₃ đã ức chế hoạt động MAPK 39 kD và 42 kD. Những kết quả này còn chỉ ra rằng sự gia tăng canxi cytosolic do CHN gây ra là cần thiết cho sự tổng hợp saponin bao gồm tăng hoạt tính của NADPH oxidase và sản sinh H₂O₂ cản trở phản ứng oxy hoá. Ngoài ra, elicitor còn bất hoạt H⁺-ATPase, làm giảm sự phân cực của màng, tăng pH bên ngoài màng. Việc sản xuất các ROS (reactive oxygen species) như anion superoxide và H₂O₂ tạo ra hiệu ứng kháng khuẩn trực tiếp cũng như góp phần tạo ra các dẫn xuất của acid béo có hoạt tính sinh học (Hu *et al.*, 2003a,b). Tương tự, ROS tham gia vào quá trình liên kết với protein giàu proline gắn trên thành

tế bào sau đó hoạt động như là tín hiệu thứ cấp và kích hoạt dịch mã các gen phòng vệ.

Theo các giả thuyết khác, sự tích lũy các protein liên quan đến việc bảo vệ khỏi tác nhân gây bệnh như chitinase và glucanase, endo-polygalacturonase giúp giải phóng các tín hiệu pectic oligomer (elicitor nội sinh), glycoprotein giàu hydroxyproline và chất ức chế protease (Hu *et al.*, 2004). Kích hoạt sự phiên mã của các gen phòng vệ trong quá trình kích kháng cũng đã được công bố trên các đối tượng là nhân sâm (Wu, Zhong, 1999; Kim *et al.*, 2005; Liang, Zhao, 2008; Kochan *et al.*, 2012).

Bảng 1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp (Namdeo, 2007).

A. Theo bản chất elicitor	
Các elicitor sinh học	Các elicitor phi sinh học
<ul style="list-style-type: none"> - Được giải phóng trực tiếp từ vi sinh vật và được nhận diện bởi tế bào thực vật (các enzyme, các mảnh thành tế bào) - Được tạo thành bởi hoạt động của vi sinh vật trên thành tế bào thực vật (các đoạn pectin)... - Được tạo thành từ hoạt động của enzyme thực vật trên thành tế bào vi khuẩn (chitosan, glucan) - Các hợp chất: nội sinh và tạo thành trong tự nhiên; được hình thành hoặc tiết ra bởi tế bào thực vật khi đáp ứng kích thích khác nhau 	<ul style="list-style-type: none"> - Tác dụng của các tác nhân vật lý hoặc hóa học tự nhiên theo đường nội sinh tạo thành các elicitor sinh học - Tia UV - Protein biến tính (Rnase) - Đông và rã đông - Các thành phần không thiết yếu của môi trường (agarose, thiếc...) - Kim loại nặng - Hóa chất: + Có ái lực cao với DNA + Có hoạt tính phá vỡ màng tế bào + Thuốc diệt nấm (maneb, butylamin, benomyl) + Thuốc diệt cỏ (acifluorofen)
B. Theo nguồn gốc của kích kháng	
Các elicitor ngoại sinh	Các elicitor nội sinh
<ul style="list-style-type: none"> - Hình thành từ bên ngoài tế bào, bao gồm phản ứng trực tiếp hoặc qua các chất nội sinh trung gian - Polysaccharide: glucomanose, glucan, chitosan - Peptide và chuỗi các ion dương: monilicolin, poly-L-lysine, polyamine, glycoprotein - Enzyme: polygalacturonase, endo-polygalacturonase acid lyase, cellulase - Acid béo: acid arachidonic, acid eicosapentanoic 	<ul style="list-style-type: none"> - Được tạo thành qua các phản ứng thứ cấp, cảm ứng bằng một tín hiệu sinh học hoặc phi sinh học trong tế bào - Dodeca-β-1,4-D-galacturonide - Hepta-β-glucoside - Alginate oligomer

ELICITOR TRONG NUÔI CÂY CHI NHÂN SÂM *IN VITRO*

Elicitor trong nuôi cấy tế bào nhân sâm *in vitro*

Năng suất sản xuất saponin trong nuôi cấy tế bào nhân sâm rất cao, đặc biệt nuôi cấy huyền phù tế bào trong bioreactor lên đến 4,3% trong khi nuôi cấy mô sẹo chỉ đạt 1,3% (Bảng 2) (Langhansová *et al.*, 2005). Ngoài ra, nuôi cấy huyền phù tế bào đã xác

định được một loạt các saponin riêng lẻ trong tế bào, trong đó có chứa các ginsenoside Rb1 và Rg1 với hàm lượng rất cao. Do đó, hệ thống này sẽ phù hợp hơn cho việc sản xuất các hợp chất riêng lẻ. Việc tối ưu hóa sản lượng saponin trong nuôi cấy tế bào là kết quả cuối cùng của việc tối ưu hóa cả điều kiện tăng trưởng sinh khối và tối đa hóa sản xuất saponin, nhiều phương pháp tiếp cận đã cố gắng tăng sản lượng saponin và tăng trưởng tế bào. Các nghiên cứu này bao gồm việc tối ưu hóa các thành phần dinh

đưỡng (Liu, Zhong 1997; Zhang, Zhong 1997; Joshi, Teng 2000), bổ sung các tiền chất và các chất điều chỉnh (Furuya *et al.*, 1983a,b,c) và sử dụng các elicitor (Ciddi *et al.*, 1995; He, 1996; Furuya, Ushiyama, 1994). Khả năng gia tăng hàm lượng saponin của các elicitor đã chứng tỏ vượt trội hơn tất cả yếu tố khác khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro*. Theo Lu và đồng tác giả (2001), cả elicitor sinh học như dịch chiết nấm men và methyl jasmonate đều có khả năng gia tăng đáng kể hàm lượng saponin, hàm lượng cao nhất của 7 ginsenoside khảo sát trong nuôi cấy tế bào *Panax ginseng* chiếm đến 2,07% khối lượng khô, gấp 28 lần so với mẫu không xử lý với elicitor. Hu và đồng tác giả (2003) còn cho thấy chỉ cần bổ sung 0,2 mM jasmonic acid làm tăng sản xuất ginsenoside gấp 1,8-3,1 lần trong nuôi cấy huyền phù tế bào sâm *Panax ginseng*. Wang và đồng tác giả (2005) đã nghiên cứu sự khác biệt về sản xuất ginsenoside trong nuôi cấy tế bào sâm Tam thất trong bình tam giác và bioreactor. Trong bình tam giác, có sự gia tăng mạnh trong tổng hàm lượng ginsenoside từ ngày 8 đến ngày 15 sau khi cảm ứng, mức tối đa đạt vào ngày 15 cao gấp 2,6 lần so với đối chứng. Ngược lại, các tế bào trưởng thành trong bioreactor sự sản xuất saponin thì chậm hơn với lượng saponin cao hơn gấp 1,8 lần so với đối chứng. Tuy nhiên, với thí nghiệm tương tự sau 5 ngày bổ sung methyl jasmonate và kết hợp với nồng độ sucrose thích hợp không những có hiệu quả khi nuôi cấy trong bioreactor mà còn giúp tăng cường sản xuất ginsenoside (Wang *et al.*, 2005).

Ngoài dịch chiết nấm men và các dẫn xuất của jasmonic acid, NO (Nitric monoxide) gần đây cũng được đánh giá là một elicitor mạnh có tác dụng tăng cường các hợp chất thứ cấp (Ben *et al.*, 2012). Trong nuôi cấy tế bào *Panax ginseng*, NO đã chứng tỏ hiệu quả trong việc gia tăng hàm lượng các saponin so với các elicitor khác khi nuôi cấy bổ sung oligogalacturonic acid (OGA) tinh chế từ acid hydrolysate ở lớp vỏ pectin của quả chanh (Huet *et al.*, 2003b). Hu *et al.* (2004) khi sử dụng chitosan trong nuôi cấy tế bào *Panax ginseng* đã tăng hàm lượng saponin lên đáng kể thông qua việc kích thích phản ứng oxy hóa của mitogen-activated protein kinase. Ngoài ra, còn rất nhiều elicitor khác có hiệu quả lên con đường tổng hợp các saponin trong chi nhân sâm.

Elicitor trong nuôi cấy rễ bất định và rễ tơ chi nhân sâm *in vitro*

Nuôi cấy rễ bất định hay rễ tơ nhân sâm là phương pháp được chú trọng nhiều nhất hiện nay,

do các nuôi cấy này thu nhận được lượng sinh khối hiệu quả và nhiều nhất trong thời gian rất ngắn. Hơn nữa, các ginsenoside quý từ nhân sâm cũng chủ yếu tập trung và tích trữ trong rễ nhân sâm cho nên lượng saponin thu được cũng cao hơn nhiều so với các nuôi cấy khác. So với nuôi cấy rễ tơ chuyển gen hay rễ trồng, nuôi cấy rễ bất định cũng có nhiều ưu điểm hơn vì việc quản lý quy trình nuôi cấy rõ ràng, đơn giản hơn và các nuôi cấy cũng ổn định và an toàn hơn (Kim *et al.*, 2004). Tuy nhiên, khả năng phát triển nhanh chóng của rễ tơ cũng là một ưu thế được nhiều người quan tâm và nghiên cứu đến. Mặc dù hàm lượng saponin trong nuôi cấy rễ bất định cao hơn các nuôi cấy khác nhưng vẫn thấp hơn nhiều so với củ trồng ngoài tự nhiên, trong nuôi cấy rễ bất định *Panax ginseng* C. A. Meyer, lượng saponin thu được chỉ bằng 1/3 so với ngoài tự nhiên (Yu, 2000). Cho nên, việc cải tiến môi trường, hệ thống nuôi cấy để tăng sản lượng saponin đã có nhiều bước tiến và ứng dụng elicitor vào nuôi cấy rễ bất định chi nhân sâm trở nên rất phổ biến. Langhansová và đồng tác giả (2005) đã thiết lập được hệ thống nuôi cấy rễ bất định của *P. ginseng* nhằm so sánh và đánh giá khả năng phát triển và sản xuất saponin trong bình tam giác trên quy mô lớn. Tổng hàm lượng ginsenoside cũng như việc sản xuất các ginsenoside cụ thể có nhiều khác biệt trong từng hệ thống và tính chất và thành phần các hợp chất ginsenoside đặc biệt tương tự như trong củ sâm thu ngoài tự nhiên. Tuy nhiên, tổng hàm lượng saponin là chỉ có 1,8% khối lượng khô trong bình tam giác và 1,5% trong bioreactor thấp hơn so với tổng hàm lượng củ nhân sâm ngoài tự nhiên (3,3% khối lượng khô).

Kích kháng tổng hợp saponin triterpene được nghiên cứu ở rễ bất định cây *P. ginseng* khá nhiều (Bảng 2). MeJA ở nồng độ 0,2 mM làm tăng sản xuất ginsenoside gấp 4 lần trong rễ bất định so với đối chứng (Ellen *et al.*, 2011). Trong phản ứng với 0,2 mM SA, saponin tăng gấp 3 lần trong nuôi cấy rễ bất định *P. ginseng* (Christensen, 2009). Hơn nữa, một số nghiên cứu cho thấy các elicitor sinh học cũng có hiệu quả mạnh lên khả năng tích lũy các hợp chất saponin trong nhân sâm, khi sử dụng 100 mg/l chitosan trong nuôi cấy rễ bất định giúp tăng hàm lượng saponin rõ ràng (Hu *et al.*, 2002). Ngoài ra, một số elicitor sinh học khác cũng được ứng dụng rộng rãi trong nuôi cấy nhân sâm *in vitro*. Hao và đồng tác giả (2013) xác định trong 38 chủng nấm phân lập được từ rễ nhân sâm thì *Fusarium sp.* có tiềm năng lớn trong việc gia tăng

hàm lượng saponin.

Năm 2006, Jeong và đồng tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng kích kháng của oxygen, carbon

dioxide và ethylene lên sự tăng trưởng và quá trình sản xuất thành phần dược chất trên quá trình nuôi cấy rễ bất định sâm Triều Tiên bằng bioreactor.

Bảng 2. Một số nghiên cứu về các elicitor trong nuôi cấy chi nhân sâm.

Loài	Hệ thống nuôi cấy	Xử lý Elicitor			Lượng saponin tăng lên	Tài liệu tham khảo
		Loại	Nồng độ	Ngày		
<i>P. ginseng</i>	RBD/bioreactor	MeJA	0,2 mM	7	4,0×	Ali <i>et al.</i> , 2006
		SA	0,2 mM	7	3,0×	
<i>P. ginseng</i>	RBD	IBA	0,025 mM	10	16×	Zhong, Zhang, 2005
<i>P. notoginseng</i>	TB	MeJA	0,2 mM	4	3,0×	Hu, Zhong, 2008
		HEJ	0,2 mM	4	2,0×	
<i>P. notoginseng</i>	TB/Bioreactor	MeJA	0,2 mM	4	2,6×	Zhong, Zhang, 2005
<i>P. notoginseng</i>	TB	MeJA	0,2 mM	15	2,6×	Wang <i>et al.</i> , 2005
	TB/bioreactor	MeJA	0,2 mM	15	1,8×	
<i>P. notoginseng</i>	TB	MeJA	0,2 mM	14	3,1×	Hu <i>et al.</i> , 2007
		HEJ	0,2 mM	14	4,4×	
<i>P. vietnamensis</i>	Mô sẹo	JA	10 mg/l	48	2×	Dương Tấn Nhựt <i>et al.</i> , 2012
<i>P. vietnamensis</i>	RT	MeJA	200 µg/l	60	1,5×	Trịnh Thị Hương, 2017
		SA	200 µg/l	60	1,5×	
		ABA	5 mg/l	60	1,5×	

MeJA: Methyl jasmonate, HEJ: 2-hydroxyethyl jasmonate, YE: Yeast extract, RBD: Rễ bất định, RT: rễ tơ chuyển gen, TB: Huyền phù tế bào, SA: Salicylic acid, JA: jasmonic acid, ABA: Abscisic acid.

Kích kháng với MeJA hoặc SA thường làm giảm tăng trưởng trong nuôi cấy. Đối với nuôi cấy rễ *P. ginseng*, sinh khối rễ sụt giảm nghiêm trọng khi kích kháng dài hơn 9 ngày với 0,2 mM MeJA hoặc SA (Ellen *et al.*, 2011). Ngoài ra, nhiều nuôi cấy nhân sâm *in vitro* có thể bổ sung thêm các phytohormone kết hợp với các elicitor để tăng tích lũy saponin. Kim và đồng tác giả (2005) đã chứng minh rằng việc bổ sung 0,025 mg/l thidiazuron có thể ngăn chặn những tác động tiêu cực của MeJA lên tăng trưởng toàn bộ cây và tăng sản lượng saponin cao hơn với việc chỉ dùng MeJA. Tuy nhiên, mức tăng này trong cây có lẽ là do tăng sinh khối hơn là kích thích trao đổi chất thứ cấp, bởi vì, chỉ có sự tăng trưởng được khảo sát khi thêm MeJA. Xiang-Yang và đồng tác giả (2003) đã xác định được một số tác động của enzyme NADPH oxidase, H₂O₂ và elicitor nội sinh lên khả năng trao đổi chất của màng tế bào trong việc sinh tổng hợp saponin. Ngoài những elicitor phổ biến trên, Kim và đồng tác giả (2009) cho thấy tia γ cũng là một elicitor có hiệu quả không những thúc đẩy sinh tổng hợp các saponin mà còn làm tăng sinh khối, hiệu quả chiếu

xạ cho tỉ lệ phát sinh rễ bất định cao nhất đến 75% ở mức chiếu xạ 30 Gy, các dòng đột biến có sinh khối gấp 100 lần và có sự gia tăng cả 7 loại ginsenoside so với đối chứng.

Các nghiên cứu ứng dụng elicitor vào nuôi cấy *in vitro* sâm Ngọc Linh nhằm sản xuất quy mô lớn và nâng cao hàm lượng các chuyển hóa thứ cấp còn rất hạn chế. Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2012) chỉ bước đầu nghiên cứu đánh giá tác động của elicitor, jasmonic acid lên việc tích lũy saponin của mô sẹo và rễ bất định của cây sâm Ngọc Linh đã cho thấy hiệu quả của các elicitor trong việc tăng cường khả năng sản sinh các sản phẩm thứ cấp trên loài sâm này. Từ những thành công trong việc chuyển gen sâm Ngọc Linh, Trịnh Thị Hương (2017) cũng đã cho thấy một số elicitor phi sinh học như MeJA, SA và ABA đã giúp tăng cường được các hợp chất saponin trong nuôi cấy rễ tơ sâm Ngọc Linh.

TÁC ĐỘNG CỦA CÁC ELICITOR Ở MỨC ĐỘ DI TRUYỀN PHÂN TỬ

Nhiều nghiên cứu ở mức độ di truyền phân tử

khi các nuôi cấy bị kích kháng cũng đã được thực hiện ở *P. ginseng*. Dựa vào con đường sinh tổng hợp các triterpene saponin, khi theo dõi tác động của 200 mM 2-hydroxyethyl jasmonate (HEJ) so với hoạt động của 2 enzyme SS (squalene synthase) và SE (squalene epoxidase) cho thấy mức phiên mã của 2 enzyme này đã tăng gấp 9-6 lần sau 24 h xử lý và tổng số ginsenoside tăng từ 12 h đến 10 ngày sau khi bổ sung HEJ hoặc MeJA (Hu, Zhong, 2008). Khi bổ sung các chất ức chế jasmonate DIECA (NA-diethyl-dithio-carbamat), jasmonic acid giảm đi và hàm lượng ginsenoside cũng giảm theo. DIECA cũng ức chế sinh tổng hợp HEJ cần cho việc tạo SS và SE liên quan đến con đường truyền tín hiệu jasmonate trong tổng hợp saponin (Hu, Zhong, 2008). Trong nuôi cấy tế bào sâm Tam thất, khi tăng hoạt động enzyme UGRdGT (glucosyl transferase) sẽ tăng xúc tác chuyển hóa Rd1 thành Rb1 ở nhân sâm (Wang *et al.*, 2005). Ginsenoside- α -arabinofuranase xúc tác thủy phân ginsenoside Rc thành Rd vẫn chưa được phát hiện. Những kết quả này cho thấy rằng con đường sinh tổng hợp từ Rd để tạo Rb1 hiện diện trong các dòng tế bào và methyl jasmonate là tác nhân kích hoạt quá trình này thông qua hoạt động UGRdGT (Wang *et al.*, 2005). Các kết quả khác cũng được ghi nhận bởi Hu, Zhong (2008), khi tiến hành kích kháng với methyl jasmonate hoặc HEJ làm hoạt động gen UGRdGT gia tăng và hàm lượng tăng lên tương đương.

CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP

Dựa vào những nghiên cứu về con đường chuyển hóa sinh tổng hợp saponin và tác động của elicitor ở mức độ di truyền phân tử, công nghệ sản xuất các hợp chất thứ cấp hay công nghệ chuyển hóa thứ cấp được xây dựng thông qua việc ứng dụng các elicitor để hoạt hóa và gây biểu hiện quá mức các gen tạo ra các enzyme xúc tác các phản ứng dẫn tới tổng hợp saponin. Chúng tôi xin giới thiệu một số enzyme và yếu tố tăng cường sinh tổng hợp saponin được xác định nhờ ứng dụng của elicitor.

Farnesyl diphosphate synthase

FPS trước đây vẫn chưa được xác định là một enzyme điều tiết quan trọng trong sinh tổng hợp triterpene. Yun-Soo và đồng tác giả (2009) đã cho thấy vai trò của FPS trong sinh tổng hợp triterpene ở nhân sâm. Một cấu trúc cDNA mã hóa gen PgFPS tạo FPS của nhân sâm gắn với promoter 35S của vi rút gây khảm ở súp lơ (p35S) đã được chuyển vào tế bào rau má, khi phân tích mRNA

của *CaDDS* và *CaCYS* cho thấy biểu hiện cao trong tất cả các dòng rẽ chuyển gen khi so sánh với đối chứng (Kim *et al.*, 2010). Tuy nhiên, không có sự thay đổi biểu hiện gen *CaSQS* ở mạch ngược của *CaDDS* và *CaCYS*. Trong điều hòa ngược các gen mã hóa cho *CaDD*, *FPS*, có sự tham gia của một số enzyme quan trọng giúp sinh tổng hợp các triterpene saponin, từ đó làm gia tăng lượng saponin lên cao ở những dòng biến đổi gen (gấp 1,5 lần). Các kết quả này chỉ ra rằng tăng cường gen mã hóa cho *FPS* là hữu ích để nâng cao không chỉ triterpene saponin mà còn có phytosterol khác trong cây (Kim *et al.*, 2010).

Squalene synthase

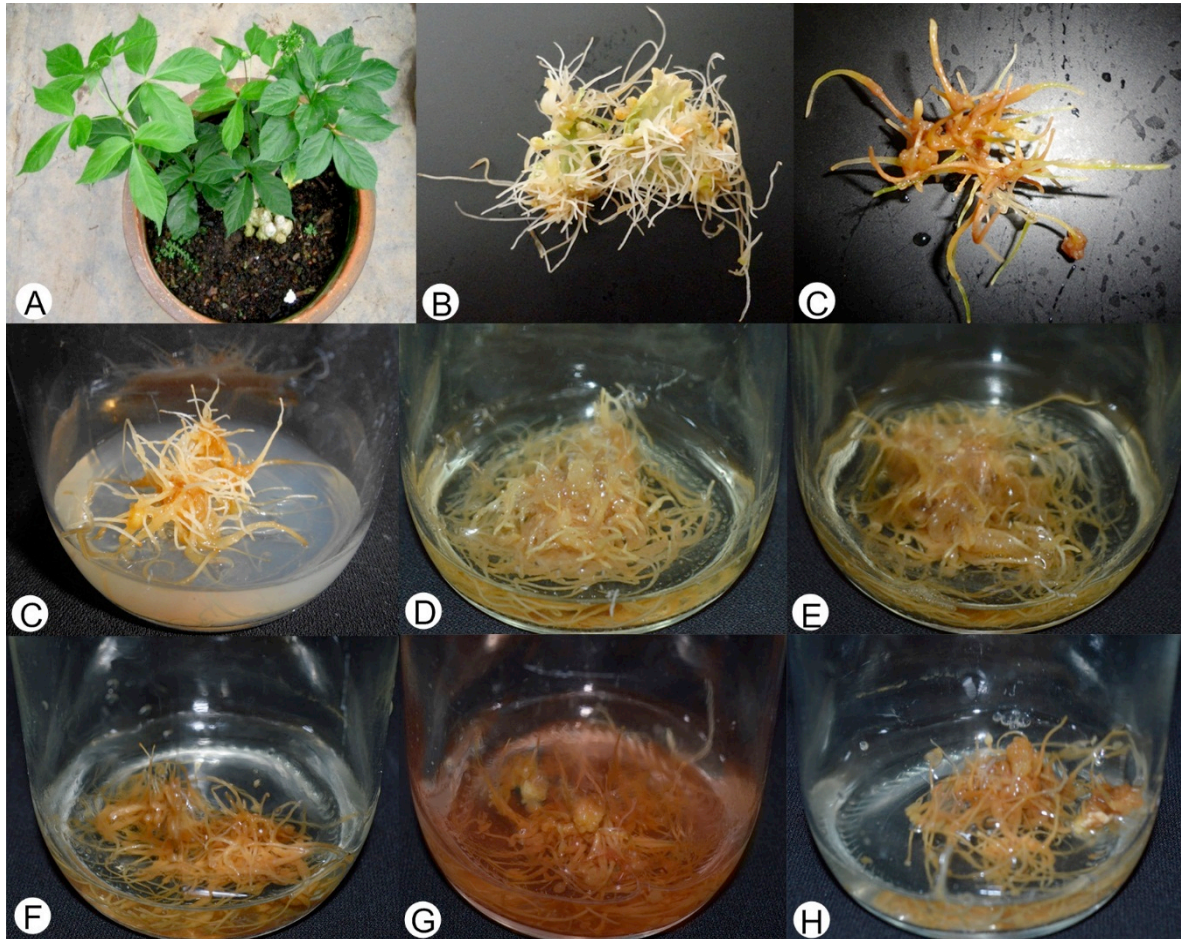
Ở nhân sâm, SS (squalene synthase) xúc tác bước đầu tiên giúp hình thành sterol để sinh tổng hợp triterpenoid do các gen SS quy định (Yun-Soo *et al.*, 2009). Gen SS là chủ yếu nằm ở chồi nhưng không khác biệt với phân tích lũy ở các bộ phận khác. Tăng cường biểu hiện gen PgSS1 trong rễ bất định nhân sâm chuyển gen giúp gia tăng điều hòa phiên mã mạch xuôi của các gen thông qua squalene epoxidase, dammarenediol synthase, β -amyrin synthase và cycloartenol synthase. Theo kết quả này, PgSS1 là một enzyme điều hòa quan trọng cho cả hai con đường sinh tổng hợp phytosterol và triterpenoid saponin. Gen PgSS1 bắt nguồn từ *P. ginseng* cũng đã được đưa vào sâm Siberia (Christensen, 2009).

Squalene epoxidase

Squalene epoxidase (SE), còn được gọi là squalene monooxygenase, xúc tác các bước oxy hóa đầu tiên trong phytosterol và triterpenoid saponin. Ở thực vật, có hai hay nhiều mẫu gen SE khác nhau. Sáu đồng dạng của SE đã được xác định cho thấy rằng gen SE có chức năng phụ thuộc các đồng vị khác nhau (Christensen, 2009). Vai trò của hai gen epoxidase squalene (PgSQ1 và PgSQ2) đã được nghiên cứu ở *P. ginseng* với trình tự amino acid rút ra từ PgSQ1 và PgSQ2 tương đồng đến 80%, nhưng vùng N-terminal (đầu 60 amino acid) là rất khác nhau. PgSQ1 được tích lũy nhiều trong tất cả các bộ phận cây, trong khi PgSQ2 chủ yếu ở cuống lá và nụ hoa. RNAi của PgSQ1 trong *P. ginseng* chuyển gen hoàn toàn bị ức chế biểu hiện PgSQ1, do đó làm giảm sản xuất ginsenoside. Đặc biệt là, vùng PgSQ1 điều hòa ngược mạnh PgSQ2 và cycloartenol synthase dẫn đến tăng cường tích lũy phytosterol. Những kết quả này cho thấy những biểu hiện của PgSQ1 và PgSQ2 được quy định khác nhau. Hơn nữa, PgSQ1 chỉ quy định sinh tổng hợp ginsenoside

và không phải là của phytosterol trong *P. ginseng*. Vì vậy, tăng cường biểu hiện PgSQ1 có thể là hữu ích

để tăng sản xuất ginsenoside ở *P. ginseng* (Yun-Soo *et al.*, 2009).



Hình 3. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số elicitor trong nuôi cấy rễ thứ cấp sâm Ngọc Linh từ nguồn rễ bất định. **A.** Cây sâm Ngọc Linh, **B.** Rễ bất định, **C.** Rễ thứ cấp trên môi trường thạch, **D.** Rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lác, **E.** Kích kháng với dịch chiết nấm men, **F.** Kích kháng với salicylic acid, **G.** Kích kháng với chitosan, **H.** Kích kháng với methyl jasmonate (Dương Tấn Nhật *et al.*, 2015, Nguyễn Thị Nhật Linh *et al.*, 2017).

β -Amyrin synthase

Các triterpenes nghiên cứu nhiều nhất được tìm thấy trong thực vật bậc cao là từ các loại oleanane (β -amyrin), ursane (α -amyrin) và dammarane (dammaranediol) (Pimpimon *et al.* 2006). Ngoài ra, bước đầu tiên trong sinh tổng hợp saponin trong cây liên quan đến việc tạo vòng của 2,3-oxidosqualene thành các loại saponin đề cập ở trên. Những chuyển hóa xúc tác nhóm enzyme: β -amyrin synthase mã hóa β -amyrin synthase đã được xác định ở *P. ginseng* (Yun-Soo *et al.*, 2009).

Cytochrome P450

Các aglycon của triterpene saponin là những hợp chất C30 được hình thành trong quá trình tạo vòng của 2,3-oxidosqualene oxy hóa tiếp theo của bộ khung triterpene sản xuất đa dạng về cấu trúc và các oxy hóa được cho là xúc tác bởi mono-oxygenase cytochrome P450 (P450s). Nhiều P450s đã được đề xuất để tham gia vào quá trình tổng hợp và trao đổi chất của triterpenoid saponin (Christensen, 2009). Trong *P. ginseng*, ginsenoside được tổng hợp từ dammarenediol-II sau hydroxyl hóa bởi cytochrome P450 (Yun-Soo *et al.*, 2009). Cytochrome P450 tham

gia vào các hydroxyl hóa của vị trí C-12 của dammarenediol để tổng hợp protopanaxadiol và vị trí C-6 của protopanaxadiol để tổng hợp protopanaxatriol. Cả hai hợp chất này được sử dụng như là bộ khung của các ginsenoside.

Sự tiến bộ của kỹ thuật giải trình tự DNA đã tạo ra một cơ hội tuyệt vời để xác định vô số các trình tự gen ứng với P450. Các nghiên cứu bộ gen ở các cây mô hình đã cung cấp nền tảng cho các nghiên cứu khám phá ra các chức năng của P450. So với những trình tự này, đến nay chỉ mới xác định được một số đặc tính sinh hóa của P450 trong nhân sâm (Yun-Soo *et al.*, 2009). Cuối cùng, từ những nghiên cứu này, hoạt động P450 liên quan đến hoạt động của các enzyme do gen quy định. Con đường sinh tổng hợp saponin ở nhân sâm có thể chỉ do một gen quy định nhưng cũng có thể liên quan đến một số tổ hợp nhiều gen (Christensen, 2009).

KẾT LUẬN

Hiện nay, ngoài methyl jasmonate được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy nhân sâm *in vitro*, nhiều elicitor sinh học và phi sinh học khác cũng cho thấy có khả năng tăng cường sản xuất saponin nhờ tăng cường biểu hiện những gen cụ thể. Ngoài ra, con đường chuyển hóa thứ cấp của từng giống sâm cũng rất khác nhau và tương ứng với những elicitor khác nhau. Mặc dù con đường xúc tác bởi các enzyme này đã xây dựng được trên một số loài sâm nhưng hiện nay chỉ mới tìm ra một số enzyme và gen liên quan nên cần có những nghiên cứu sâu hơn nữa.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (VAST) và Trường Đại học Khoa học (Đại học Huế) đã giúp đỡ và hỗ trợ cho chúng tôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006) Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in Bioreactors. *Plant Cell Rep* 25(6): 613–620.

Ben Z, Li PZ, Jian WW (2012) Nitric oxide elicitation for secondary metabolite production in cultured plant cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 455–466.

Christensen LP (2009) Ginsenosides: Chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects. *Adv Food Nutr Res* 55: 1–99.

Ciddi V, Srinivasan V, Shuler ML (1995) Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of taxol. *Biotechnol Lett* 17: 1343–1346.

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Bá Phong, Lê Nữ Minh Thùy, Hoàng Văn Cường, Hoàng Xuân Chiến, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận (2012) Bước đầu đánh giá ảnh hưởng của methyl jasmonic acid lên khả năng tích lũy saponin trong mô sẹo sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(A): 867–875.

Dương Tấn Nhựt (2015) *Công nghệ sinh học trong nghiên cứu chọn tạo giống sâm Ngọc Linh (Panax vietnamensis Ha et Grushv.)*. NXB. Đại học Quốc gia Hà Nội.

Ellen L, Ahmad F, Danny G (2011) Modulation of triterpene saponin production: *in vitro* cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Appl Biochem Biotechnol* 164: 220–237.

Faizal A, Geelen D (2013) Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev* 12(4): 877–893.

Furuya T, Ushiyama K (1994) *Ginseng production in cultures of Panax ginseng cells*. In: Shargool P, Ngo TT (eds) *Biotechnological application of plant cultures*. CRC, Boca Raton.

Furuya T, Yoshikawa T, Ishii T, Kajii K (1983a) Effects of auxins on growth and saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Plant Med* 47: 183–187.

Furuya T, Yoshikawa T, Ishii T, Kajii K (1983b) Regulation of saponin production in callus cultures of *Panax ginseng*. *Plant Med* 47: 200–204.

Furuya T, Yoshikawa T, Orihara Y, Oda H (1983c) Saponin production in cell suspension cultures of *Panax ginseng*. *Plant Med* 48: 83–87.

Hao W, Yang HY, You XL, Li YH (2013) Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities. *SpringerPlus* 2: 107–116.

He SY (1996) Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. *Plant Physiol* 112: 865–869.

Hu FX, Zhong JJ (2008) Role of jasmonic acid in alteration of ginsenoside heterogeneity in elicited cell cultures of *Panax notoginseng*. *Process Biochem* 43: 113–118.

Hu Steven JN, Fang J, Cai W, Tang Z (2004) Mitogen-activated protein kinases mediate the oxidative burst and saponin synthesis induced by chitosan in cell cultures of *P. ginseng*. *Sci China C Life Sci* 47(4): 303–312.

Hu X, Neill SJ, Cai W, Tang Z (2003a) Hydrogen peroxide and jasmonic acid mediate oligogalacturonic acid-induced saponin synthesis in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Physiol Plant* 118: 414–421.

- Hu X, Neill SJ, Cai W, Tang Z (2003b) Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Funct Plant Biol* 30: 901–907.
- Hu XY, Zhang WQ, Fang JY (2002) Chitosan treatment raises the accumulation of saponin and the transcriptional level of genes encoding the key enzymes of saponin synthesis in cultured *Panax ginseng* cells. *Plant Physiol Mole Biol* 28:485-490.
- Jeong CS, Chakrabarty D, Hahn EJ, Lee HL, Paek KY (2006) Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochem Engin J* 27: 252-263.
- Joshi A, Teng WL (2000) Cryopreservation of *Panax ginseng* embryogenic cells. *Plant Cell Rep* 19: 971-977.
- Kim DS, Kim SY, Jeong IY, Kim JB, Lee GJ, Kang SY, Kim W (2009) Improvement of ginsenoside production by *Panax ginseng* adventitious roots induced by γ -irradiation. *Biologia Plantarum* 53(3): 408-414.
- Kim HJ, Chang EJ, Oh HI (2005) Saponin production in submerged adventitious root culture of *Panax ginseng* as affected by culture conditions and elicitors. *Asia Pac Mole Biol Biotechnol* 13: 87–91.
- Kim OT, Kim SH, Ohya K, Muranaka T, Choi YE, Lee HY (2010) Upregulation of phytosterol and triterpene biosynthesis in *Centella asiatica* hairy roots overexpressed ginseng farnesyl diphosphate synthase. *Plant Cell Rep* 29: 403–411.
- Kim YS, Hahn EJ, Murthy HN, Paek KY (2004) Adventitious root growth and ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* cultures as affected by methyl jasmonate. *Biotechnol Lett* 26: 1619–1622.
- Kochan E, Królicka A, Chmiel A (2012) Growth and ginsenoside production in *Panax quinquefolium* hairy roots cultivated in flasks and nutrient sprinkle bioreactor. *Acta Physiol Plant* 34: 1513–1518.
- Langhansová L, Marsik P, Vanek T (2005) Production of saponins from *Panax ginseng* suspension and adventitious root cultures. *Biologia Plantarum* 49: 463–465.
- Liang Y, Zhao S (2008) Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis. *Plant Biol* 10: 415–421.
- Liu S, Zhong JJ (1997) Simultaneous production of ginseng saponin and polysaccharide by suspension cultures of *Panax ginseng*: nitrogen effects. *Enzyme Microbiol Technol* 21: 518–524.
- Lu MB, Wong HL, Teng WL (2001) Effects of elicitation on the production of saponin in cell culture of *Panax ginseng*. *Plant Cell Rep* 20:674–677.
- Namdeo AG (2007) Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. *Phcog Rev* 1(1): 69–79.
- Nguyễn Thị Nhật Linh, Dương Tấn Nhựt, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc (2017) Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối và hàm lượng saponin của rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lắc rễ bắt định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 16: 567–575.
- Paek KY, Murthy HN, Hahn EJ, Zhong JJ (2009) Large scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides. *Biotechnology in China I. Adv Biochem Eng Biotechnol* 113:151–176.
- Pimpimon T, Masaaki S, Tetsuo K, Yutaka E (2006) Dammarenyol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng*. *FEBS J* 580: 5143–5149.
- Trịnh Thị Hương (2017) Nghiên cứu chuyển gen tạo rễ tơ sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) làm vật liệu cho nuôi cấy sinh khối. Luận án Tiến sĩ sinh học, Hà Nội.
- Wang W, Zhang ZY, Zhong JJ (2005) Enhancement of ginsenoside biosynthesis in high-density cultivation of *Panax notoginseng* cells by various strategies of methyl jasmonate elicitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 752–758.
- Wu JY, Zhong JJ (1999) Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: Current technological and applied aspects. *J Biotech* 68: 89–99.
- Xiang-Yang HU, Neill SJ, Wei-Ming CAI, Zhang-Cheng T (2003) Activation of plasma membrane NADPH oxidase and generation of H₂O₂ mediate the induction of PAL activity and saponin synthesis by endogenous elicitor in suspension-cultured cells of *Panax ginseng*. *Acta Botanica Sinica* 45(12): 1434–1441.
- Yu KW (2000) *Production of the Useful Metabolites through Bioreactor Culture of Korean Ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer)*, Doctor Thesis, Chungbuk National University, Korea.
- Yun-Soo K, Jung-Yeon H, Soon L, Yong-Eui C (2009), Ginseng metabolic engineering: regulation of genes rel to ginsenoside biosynthesis. *J Med Plants Res* 3: 1270–1276.
- Zhang YH, Zhong JJ (1997) Hyperproduction of ginseng saponin and polysaccharide by high density cultivation of *Panax notoginseng* cells. *Enzyme Microbiol Technol* 21: 59–63.
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23: 283–333.
- Zhong JJ, Zhang ZY (2005) High density cultivation of *Panax notoginseng* cell cultures with methyl jasmonate elicitation in a centrifugal impeller bioreactor. *Eng Life Sci* 5: 471–474.

APPLICATION OF ELICITOR FOR PRODUCTION OF SAPONINS FROM *IN VITRO* PANAX CULTURES

Nguyen Thi Nhat Linh^{1,2}, Nguyen Hoang Loc², Duong Tan Nhut¹

¹*Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*University of Sciences, Hue University*

SUMMARY

The *Panax ginseng* species are traditional medicinal herbs having high value. The major pharmacologically active components are the ginsenosides of saponin group, which are dammarane type triterpene glycosides containing a tetracyclic glycoside. Ginseng saponin, one of the secondary metabolites, is necessary for the growth and development of *Panax* genus plants. In pharmaceutical industry, triterpene saponins were purified to produce drugs for its promising healing and restorative properties. However, commercial applications are still obstacle for practical problems, because ginseng natural resources are rarely precious; and ginseng resources from field have low and variable yields dependent on season or quality of soil. Moreover, triterpene saponins have complex structures, making chemical synthesis an economically uncompetitive option for large-scale production. A current alternative optimal solution that is popular in the world is the application of cell and tissue culture to produce a large of cell or root yield in short time. But the difficulty in producing triterpene saponins from *in vitro* culture is that the triterpene saponin content is much lower than natural. To increase the triterpene saponin content, elicitors are added to the culture medium. Based on the effect of the elicitor, metabolic engineering *in vitro* is also able to enhance the overexpression of genes which translated enzymes or signals producing saponin in the isoprenoid pathway. Application of elicitor researches could improve triterpene saponin yields or adjust specific desired triterpene saponins from *in vitro* ginseng culture. Therefore, we review the recent studies of elicitor in *Panax* genus cultures and saponin biosynthetic gene to study and assess the efficiency of elicitors in triterpene saponin production and metabolic engineering of triterpene saponins.

Keywords: *Elicitation, in vitro, metabolic engineering, Panax genus, saponin*