

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA CAO CHIẾT CÂY LAN KIM TUYẾN (*Anoectochilus roxburghii*) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Trịnh Thị Hương^{1*}, Trần Hoàng Ngâu¹, Nguyễn Thành Trục¹,
Huỳnh Trung Hậu¹, Phan Phụng Thanh¹, Ngô Thị Hồng Nhung¹,
Trương Thị Thanh Ngân¹, Nguyễn Thanh Nhật Minh¹, Trần Trọng Tuấn²

¹Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Khoa học Sự sống - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: huongtt@huit.edu.vn

Ngày nhận bài: 02/10/2023; Ngày chấp nhận đăng: 10/11/2023

TÓM TẮT

Lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall) L.) là một loại thảo dược quý dùng để làm thuốc và một số thực phẩm chức năng. Tuy nhiên, ngoài tự nhiên loài cây này đang bị đe dọa và việc nhân giống, trồng bên ngoài môi trường nhân tạo có năng suất thấp. Do đó, để có thể thu nhận sinh khối của lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* làm nguyên liệu thực vật thay thế, nghiên cứu này đã tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng đơn sắc (Light Emitting Diode - LED) đến sự sinh trưởng của cây và thử nghiệm nuôi cấy trong hệ thống bioreactor. Đồng thời nghiên cứu cũng bước đầu đánh giá một số hoạt tính sinh học từ sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* thu nhận được. Kết quả thu được cho thấy, các chồi lan kim tuyến được đặt dưới điều kiện 70% LED đỏ kết hợp với 30% LED xanh đạt chỉ tiêu sinh trưởng tốt hơn các điều kiện chiếu sáng còn lại. Đối với quá trình nuôi cấy ở hệ thống bioreactor, khối lượng mẫu nuôi cấy ban đầu thích hợp là 20 g (trong bình bioreactor có thể tích 2 lít chứa 1 lít môi trường). Hệ số tăng sinh đạt được là 2,7 lần sau 4 tuần nuôi cấy ở hệ thống bioreactor. Để đánh giá chất lượng của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*, các thí nghiệm định tính và định lượng một số một số nhóm chất cũng được thực hiện. Trong mẫu lan kim tuyến có sự hiện diện của các nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học là phytosterol, carbohydrate, saponin, flavonoid, phenolic và tanin. Hàm lượng phenolic tổng số đạt được là 8,82 mg GAE/g DW. Hoạt tính chống oxy hóa DPPH của cao chiết toàn phần đạt được là 203,44 µg/mL. Trong bốn chủng vi khuẩn thuộc nhóm ESKAPE khảo sát thì cao chiết lan kim tuyến có khả năng kháng đối với hai chủng là *S. aureus* và *E. agglomerans*. Các kết quả đạt được của nghiên cứu cho thấy rằng nguồn sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* có thể được xem như là một nguồn dược liệu tiềm năng để bổ sung cho nguồn lan kim tuyến ở tự nhiên đang ngày càng khan hiếm.

Từ khoá: Bioreactor, kháng khuẩn, kháng oxy hoá, lan kim tuyến, LED, phenolic.

1. MỞ ĐẦU

Chi lan kim tuyến *Anoectochilus* bao gồm hơn 40 loài phân bố rộng khắp các vùng nhiệt đới [1]. Tại Việt Nam, lan kim tuyến hiện thống kê được 12 loài, chúng được phân bố rộng hầu hết các tỉnh từ Bắc tới Nam [2]. Lan kim tuyến là loài cây đặc biệt ưa âm và ưa bóng. Thường mọc dưới tán rừng nguyên sinh, hầu hết là nguyên thủy, ở độ cao 500 - 1600 m, rải rác thành từng nhóm vài ba cây trên đất ẩm, rất giàu mùn và lá cây rụng. Trong *A. roxburghii* có một số hợp chất chính như polysaccharide, flavonoid, glycoside, steroid, triterpene, alkaloid, amino acid, acid hữu cơ [3, 3], và có vai trò trong phòng ngừa và hỗ trợ điều trị các bệnh đái tháo đường, vảy nến, viêm gan và khối u [4]. Đặc biệt, kinsenoside trong *A. roxburghii* là một hợp chất có tác dụng bảo vệ mạch máu trong điều kiện glucose cao, có thể sửa chữa các tế bào và khôi phục lại sự tiết insulin thông thường [5]. Ngoài ra, kinsenoside có thể hạ thấp mức đường huyết và cholesterol một cách hiệu quả và đã được tìm thấy để tăng khả năng chống oxy hoá của chuột bị tiểu đường gây ra bởi streptozotocin [7]. Là một loại thảo dược có giá trị

và tiềm năng rất lớn, đồng thời cũng được dùng làm cảnh nên lan kim tuyến được thu hái nhiều đến mức cạn kiệt ngoài tự nhiên [8]. Hiện nay, nuôi cấy *in vitro* mô tế bào thực vật là một kỹ thuật được sử dụng khá rộng rãi để nhân giống, bảo tồn các loài cây quý hiếm. Đồng thời kỹ thuật này cũng ứng dụng trong nuôi cấy thu nhận sinh khối các loài cây dược liệu nhằm thu nhận được nguồn sinh khối được liệu một cách chủ động, trong thời gian ngắn mà không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Các hệ thống bioreactor thường được sử dụng cho mục đích nuôi cấy thu nhận sinh khối mô tế bào thực vật, bởi ưu điểm là hệ thống này cho phép nuôi cấy mẫu với quy mô lớn và có thể tự động hóa, từ đó giảm thiểu được chi phí cho nhân công cũng như thời gian nuôi cấy và thu được số lượng lớn sinh khối thực vật. Các mẫu được nuôi cấy trong môi trường lỏng ở các hệ thống bioreactor cũng phát triển tốt hơn nhờ khả năng tiếp xúc của mẫu cây với môi trường dinh dưỡng nhiều hơn. Ngoài ra, việc mẫu thực vật được nuôi cấy ngập chìm và di chuyển tự do trong môi trường cũng làm giảm hiện tượng ưu thế ngọn dẫn đến chồi phát triển đồng đều hơn [9]. Đã có một số nghiên cứu về việc nhân giống cũng như sản xuất sinh khối ở chi lan kim tuyến như Wu và cộng sự nuôi cấy chồi *A. formosanus* trong bioreactor 3 lít để tạo ra số lượng lớn cây con phục vụ cho nhân giống và trồng bên ngoài *ex vitro* [10], Yoon và cộng sự đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến việc sản xuất sinh khối từ chồi *A. formosanus* trong hệ thống bioreactor [11], hay một số hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng như kinsenoside và polysaccharide trong *A. roxburghii* cũng đã được sản xuất trên quy mô lớn bằng cách nuôi cấy thân rễ trong bioreactor [12]. Tuy nhiên hệ thống bioreactor cũng có nhược điểm là mẫu dễ bị nhiễm vi sinh vật và dễ bị hiện tượng thủy tinh thể do mẫu ngập chìm liên tục trong môi trường lỏng và chi phí đầu tư ban đầu cao nên hệ thống bioreactor vẫn tiếp tục được cải tiến để phù hợp với từng nuôi cấy [9].

Trong nuôi cấy *in vitro*, môi trường nuôi cấy thường là yếu tố chính quyết định hiệu quả, sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cây. Thành phần môi trường khoáng thích hợp với từng đối tượng nghiên cứu tùy vào nhu cầu dinh dưỡng của loài thực vật đó. Môi trường dinh dưỡng cũng có vai trò quyết định thành phần các chất tích lũy trong mẫu cây [13]. Ngoài ra, ánh sáng cũng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật [13]. Cho đến ngày nay, ánh sáng đèn huỳnh quang, đèn halogen... vẫn đang được sử dụng như là một nguồn ánh sáng nhân tạo cho quá trình sinh trưởng ở thực vật trong nuôi cấy *in vitro* cũng như trồng bên ngoài vườn ươm. Tuy nhiên, những loại đèn này có một số nhược điểm như hiệu suất phát sáng thấp, tiêu thụ điện năng cao và phân bố quang phổ không đồng đều [14]. Công nghệ ánh sáng LED có một số ưu điểm bao gồm tuổi thọ cao, khối lượng nhỏ, phát nhiệt thấp, cường độ ánh sáng có thể điều chỉnh, hiệu suất chuyển đổi năng lượng cao và độ đặc hiệu bước sóng [16]. Bên cạnh đó, đèn LED chứa nguồn sáng đơn sắc và có bước sóng trùng với dải quang phổ tạo ra sự phát sinh hình thái ở thực vật [16]. Với những đặc điểm đó, LED đã được ứng dụng trong nghiên cứu và sản xuất các loại cây trồng khác nhau, hay được dùng trong tủ vi khí hậu, các mô hình nhà máy thực vật (plant factory) [17, 18]. Đèn LED cũng đóng một vai trò quan trọng trong sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng hợp chất ở một số loài cây dược liệu khác nhau. Nghiên cứu của Bantis và cộng sự đã chỉ rằng, tổng sinh khối của *Ocimum basilicum* tăng lên dưới ánh sáng LED và tổng hàm lượng phenolic cũng cao hơn trong các nghiệm thức sử dụng ánh sáng xanh [19]. Tương tự, Li và cộng sự cũng báo cáo rằng màu sắc khác nhau ảnh hưởng khác nhau đối với sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loại thực vật, hầu hết các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào ánh sáng đỏ và xanh [20]. Việc sử dụng ánh sáng là một chiến lược đầy hứa hẹn để tăng cường sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Theo Winson và cộng sự, mô sẹo màu vàng và màu đỏ của cây thanh long (*Hylocereus costaricensis*) được nuôi dưới đèn LED đỏ đều tăng cường tổng hàm lượng betalain lên 3,8 lần và 4,8 lần, cao hơn đáng kể so với đèn LED trắng [21].

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu trước đó về cây lan kim tuyến, nhưng loài cây này vẫn là một loài dược liệu quý và hấp dẫn các nhà nghiên cứu. Nghiên cứu này tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của đèn LED đến sự sinh trưởng của loài cây này, và ứng dụng phương pháp nuôi cấy bằng hệ thống bioreactor nhằm nâng cao quy mô nuôi cấy thu nhận nguồn sinh khối lan kim tuyến, góp phần vào việc cung cấp nguồn dược liệu thực vật bổ sung cho nguồn dược liệu tự nhiên chưa đáp ứng được nhu cầu hiện nay.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Nguồn vật liệu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là các chồi ngọn lan kim tuyến (*A. roxburghii*) nuôi cấy *in vitro* có chiều cao 3,0 cm với đường kính thân trung bình là 2,0 mm, được cung cấp bởi Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng để nhân nhanh chồi ở nghiên cứu này là môi trường Murashige và Skoog (MS) [13] bổ sung 15% nước dừa, 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar [23]. Đối với thí nghiệm ở hệ thống bioreactor thì sử dụng môi trường lỏng. Tất cả môi trường được điều chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, 1 atm trong 15 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu thu nhận nguồn sinh khối cây lan kim tuyến

Đánh giá ảnh hưởng của các tỷ lệ ánh sáng khác nhau đến sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến

Đoạn chồi ngọn cây lan kim tuyến được cấy vào môi trường thạch MS. Mỗi bình môi trường được cấy 3 mẫu chồi, sau đó các bình mẫu này được đặt vào các tỷ lệ chiếu sáng khác nhau (Bảng 1) để theo dõi sự sinh trưởng của chồi. Hệ thống đèn LED được thiết kế theo mô tả của Hương và cộng sự [24] với bước sóng ánh sáng LED đỏ là 630 nm và bước sóng ánh sáng LED xanh là 462 nm.

Bảng 1. Bảng bố trí các tỷ lệ ánh sáng khác nhau

Ký hiệu	Tỷ lệ ánh sáng
T	100% ánh sáng trắng
Đ	100% ánh sáng LED đỏ
9Đ:1X	90% ánh sáng LED đỏ + 10% LED xanh dương
8Đ:2X	80% ánh sáng LED đỏ + 20% LED xanh dương
7Đ:3X	70% ánh sáng LED đỏ + 30% LED xanh dương
6Đ:4X	60% ánh sáng LED đỏ + 40% LED xanh dương
5Đ:5X	50% ánh sáng LED đỏ + 50% LED xanh dương
4Đ:6X	40% ánh sáng LED đỏ + 60% LED xanh dương
3Đ:7X	30% ánh sáng LED đỏ + 70% LED xanh dương
2Đ:8X	20% ánh sáng LED đỏ + 80% LED xanh dương
1Đ:9X	10% ánh sáng LED đỏ + 90% LED xanh dương
X	100% ánh sáng LED xanh dương

Thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu như chiều cao cây (cm), khối lượng tươi cây (g), hàm lượng diệp lục (chỉ số SPAD) và hình thái cây được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy. Trong đó, chỉ số SPAD được đo bằng máy Hansatech CL – 01 (Anh), vị trí đo ở lá số 2 từ ngọn xuống.

Đánh giá khối lượng nuôi cấy ban đầu đến sự tăng sinh khối lan kim tuyến ở hệ thống bioreactor thể tích 2 lít

Thiết lập hệ thống bình nuôi cấy bioreactor tự tạo có sục khí: Sử dụng bình duran thể tích 2 lít có gắn đầu lọc Syringe PTFE lỗ lọc 0,2 µm (Hình 1). Không khí được đưa vào bình nuôi cấy nhờ áp lực của máy bơm, sử dụng loại máy bơm Air compressor 45 W, 220 V/50 Hz, lưu lượng khí 70 lít/phút, áp lực > 0,025 Mpa. Lưu lượng khí đưa vào bình nuôi cấy được điều chỉnh bằng lưu lượng kế: LZB – 6WB. Mỗi bình bioreactor chứa 1,0 lít môi trường nuôi cấy, và hệ thống được cài đặt tốc độ sục khí là 0,5 lít/phút. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS có bổ sung 5,0 mg/L nano oxit sắt từ (Fe₃O₄-NMs), 15% nước dừa và 30 g/L sucrose.

Mẫu chồi lan kim tuyến được cân với các khối lượng tươi khác nhau: 10, 15, 20 g, sau đó được cấy vào các bình bioreactor. Thí nghiệm được ghi nhận sau trong 4 tuần nuôi cấy với các chỉ tiêu theo dõi là khối lượng tươi, khối lượng khô và hệ số tăng sinh.

Hệ số tăng sinh (lần) = Khối lượng khô mẫu thu được sau nuôi cấy / Khối lượng khô mẫu cây ban đầu.



Hình 1. Hệ thống bioreactor tự tạo thể tích 2 lít.

2.2.2. Đánh giá một số hoạt tính sinh học từ sinh khối lan kim tuyến

Sinh khối lan kim tuyến thu nhận được từ hệ thống bioreactor sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu để tiến hành xác định một số hoạt tính sinh học như: định tính một số nhóm chất hoá học, xác định hàm lượng phenolic tổng số, đánh giá khả năng kháng oxy hoá và khả năng kháng khuẩn. Tiến hành thu nhận dịch chiết bằng cách nghiền nhuyễn sinh khối khô lan kim tuyến và ngâm với dung môi ethanol 70% theo tỉ lệ 1 : 40 (w/v), tiếp theo ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 60 °C, rồi đem đi lọc lấy dịch chiết. Cao chiết toàn phần lan kim tuyến được thu nhận bằng cách nghiền mịn sinh khối khô và ngâm với dung môi ethanol 80% theo tỷ lệ nguyên liệu và dung môi là 1 : 10 (w/v), kết hợp với sóng siêu âm trong 12 giờ (sử dụng bể rửa siêu âm - S180-Elma, tần số 37 kHz), ngâm trong 72 giờ và để trong tối để tránh bị oxy hóa. Sau đó hỗn hợp được lọc, thu dịch lọc và tiến hành cô quay chân không ở nhiệt độ 50 °C và đông khô bằng máy đông khô chân không để thu cao chiết. Cuối cùng bảo quản cao chiết thu được ở nhiệt độ 4 °C [25] để sử dụng cho các thí nghiệm của nghiên cứu.

Sự hiện diện của một số nhóm hợp chất hoá học hữu ích trong dịch chiết lan kim tuyến như alkaloid, phytosterol, carbohydrate, saponin, flavonoid, phenonic và tanin được xác định bằng chất chỉ thị màu với thuốc thử đặc trưng [26, 26, 28]. Hàm lượng phenolic tổng số (mg GAE/g chất khô) được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu theo mô tả của Ainsworth và Gillespie [29]. Khả năng kháng oxy của cao chiết lan kim tuyến thể hiện thông qua khả năng làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 517 nm theo mô tả Wong và cộng sự [30].

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch [31]. Bốn chủng vi khuẩn thuộc nhóm ESKAPE Pathogen được sử dụng để đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết lan kim tuyến, bao gồm: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter agglomerans*. Các chủng vi khuẩn được cung cấp bởi Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh. Cao chiết lan kim tuyến được hoà tan trong DMSO 10% và pha loãng trong nước cất vô trùng thành các nồng độ 100, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/mL để xác định nồng độ ức chế tối thiểu đối với vi khuẩn. Hút lần lượt 100 μ L dung dịch khuẩn mỗi chủng, với nồng độ vi khuẩn từ $10^6 - 10^8$ CFU/mL, cấy dàn đều trên môi trường NA (Nutrient Agar). Mỗi đĩa petri đục 5 giếng thạch với đường kính 3 mm, trong đó 3 giếng chứa 100 μ L dịch cao chiết lan kim tuyến với các nồng độ khác nhau, 1 giếng chứa 100 μ L DMSO 10% vô trùng (đối chứng âm), 1 giếng chứa 100 μ L ampicillin 0,1% (đối chứng dương). Các đĩa petri sau đó được đặt trong tủ ẩm ở nhiệt độ 37 °C. Ghi nhận kết quả được thực hiện sau 24 giờ với chỉ tiêu theo dõi là đường kính vòng ức chế vi sinh vật (mm).

2.3. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi có thiết lập các điều kiện: nhiệt độ 25 ± 2 °C, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 1.000 – 1.500 lux.

2.4. Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, các thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại. Số liệu thô thu thập sẽ được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion 18.1.12 với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các tỷ lệ chiếu sáng khác nhau đến khả năng sinh trưởng của cây lan kim tuyến

Mặc dù, đèn LED đã được ứng dụng nghiên cứu cho nhiều loại cây khác nhau như cây lan thạch hộc, cây sâm Ngọc Linh,... [24, 32]. Tuy nhiên, có rất ít nghiên cứu về tác động của đèn LED lên sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy sự ảnh hưởng của đèn LED ở các tỷ lệ ánh sáng khác nhau lên các chỉ tiêu sinh trưởng của cây lan kim tuyến ($p < 0,05$). Sau 8 tuần nuôi cấy, chiều cao cây trung bình cao nhất là 6,92 cm tại nghiệm thức 100% ánh sáng LED đỏ (Đ) và chiều cao trung bình thấp nhất là 5,27 cm ở nghiệm thức 100% ánh sáng trắng (T). Các mẫu lan kim tuyến được nuôi cấy dưới điều kiện có tỷ lệ ánh sáng đỏ cao đều có chiều cao cây cao vượt trội hơn các điều kiện chiếu sáng còn lại (Bảng 2). Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự Hương và cộng sự, chiều cao chồi cây thạch hộc tía (*Dendrobium officinale*) cũng đạt cao nhất ở nghiệm thức sử dụng ánh sáng đỏ cao [24]. Tương tự, trong một nghiên cứu khác cũng chỉ ra rằng, chiều cao trung bình của cải xoăn và rau diếp tăng lên khi tỷ lệ đèn LED đỏ ngày càng tăng và chiều cao cây con cao nhất được quan sát thấy ở nghiệm thức sử dụng 100% đèn LED đỏ [33]. Ở các điều kiện có tỷ lệ ánh sáng xanh cao (X, 1Đ:9X; 2Đ:8X; 3Đ:7X) cây có lá lớn nhưng chiều cao cây thu được thấp. Ngược lại, ở những điều kiện có tỷ lệ ánh sáng đỏ cao (Đ; 9Đ:1X) thì chiều cao cây phát triển mạnh nhưng lá nhỏ hơn các cây đặt ở những tỷ lệ ánh sáng khác (Hình 2). Các kết quả này chỉ ra rằng, ánh sáng đỏ thích hợp cho sự phát triển về chiều cao, trong khi đó ánh sáng xanh đương lại hỗ trợ cho sự phát triển của lá. Vì vậy, sự phối hợp tỷ lệ ánh sáng LED đỏ và LED xanh ở tỷ lệ phù hợp sẽ giúp cho sự phát triển toàn diện của cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Tương tự, khối lượng tươi của các mẫu cây lan kim tuyến nuôi cấy ở điều kiện có tỷ lệ ánh sáng đỏ cao (Đ, 9Đ:1X; 8Đ:2X; 7Đ:3X) cũng cao hơn các điều kiện chiếu sáng khác. Nguyên nhân là do chiều cao của cây ở các điều kiện chiếu sáng này cao nên khối lượng tươi của mẫu thu được cũng cao hơn so với các điều kiện chiếu sáng khác. Khối lượng tươi của cây đạt giá trị cao nhất là 0,60 - 0,62 g tại các nghiệm thức ánh sáng Đ; 9Đ:1X; 8Đ:2X; 3Đ:7X và không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức này ($p < 0,05$). Khối lượng tươi của mẫu lan kim tuyến đạt thấp nhất (0,53 g) ở điều kiện ánh sáng trắng (T) (Bảng 2). Các kết quả này cũng cho thấy rằng, ánh sáng trắng không phù hợp cho sự trưởng của cây lan kim tuyến.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đến sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến sau 8 tuần nuôi cấy

Tỷ lệ ánh sáng	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng tươi (g)	Chỉ số SPAD
T	5,27 ^f	0,53 ^f	9,62 ^f
Đ	6,92 ^a	0,60 ^{ab}	5,22 ^k
9Đ:1X	6,71 ^b	0,59 ^{bc}	6,93 ⁱ
8Đ:2X	6,36 ^c	0,61 ^{ab}	8,68 ^h
7Đ:3X	6,35 ^c	0,62 ^a	9,16 ^g
6Đ:4X	5,96 ^d	0,59 ^{bc}	11,88 ^b
5Đ:5X	5,83 ^d	0,59 ^{bc}	13,35 ^a
4Đ:6X	5,79 ^d	0,56 ^{de}	11,58 ^{bc}
3Đ:7X	5,79 ^d	0,59 ^{bc}	11,38 ^{cd}
2Đ:8X	5,53 ^e	0,58 ^{bcd}	11,05 ^{de}
1Đ:9X	5,46 ^e	0,57 ^{cd}	10,99 ^e
X	5,41 ^{ef}	0,54 ^{ef}	9,97 ^f

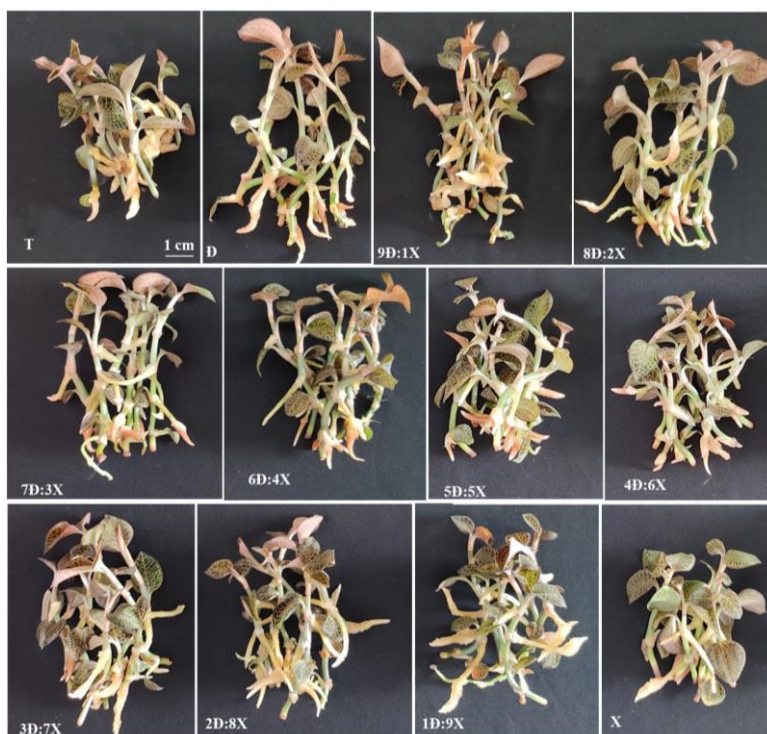
(Các chữ cái a, b,... trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%.

T: trắng; X: xanh; Đ: đỏ)

Ngược lại với hai chỉ tiêu chiều cao và khối lượng tươi đều đạt các giá trị cao ở các điều kiện chiếu sáng có tỷ lệ ánh sáng LED đỏ cao, thì chỉ số SPAD ghi nhận được ở các tỷ lệ chiếu sáng này thấp hơn ánh sáng khác. Cụ thể ở các điều kiện ánh sáng Đ, 9Đ:1X, 8Đ:2X, 7Đ:3X, chỉ số SPAD thấp hơn ánh sáng trắng; và chỉ số này tăng dần khi tỷ lệ ánh sáng xanh gia tăng (0 – 50% LED xanh), sau đó lại có xu hướng giảm xuống nếu tiếp tục gia tăng ánh sáng LED xanh (60 – 100% LED xanh). Chỉ

số SPAD phản ánh khả năng quang hợp ở thực vật từ đó ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối thực vật, kết quả đạt được ở nghiên cứu này cho thấy chỉ số SPAD ghi nhận đạt cao nhất ở điều kiện ánh sáng 5Đ:5X, nhưng khối lượng tươi của mẫu lan nuôi cấy không ghi nhận được giá trị cao nhất ở nghiệm thức này, nguyên nhân là do chiều cao cây thu được ở nghiệm thức này thấp hơn so với các điều kiện ánh sáng có tỷ lệ ánh sáng LED đỏ cao.

Tại nghiệm thức ánh sáng 100% LED đỏ, chiều cao cây và khối lượng tươi của cây thu nhận được đều đạt giá trị cao nhất, nhưng quan sát về hình thái cho thấy, các cây lan kim tuyến thường kéo dài lóng và thân mảnh, lá nhỏ. Trong khi đó, ở nghiệm thức ánh sáng 8Đ:2X và 7Đ:3X có chiều cao đạt được thấp hơn nghiệm thức 100% LED đỏ, nhưng khối lượng tươi đạt được đạt giá trị cao nhất, kết hợp với hình thái quan sát được cũng cho thấy cây có thân và lá lớn hơn. Giữa hai nghiệm thức ánh sáng 8Đ:2X và 7Đ:3X không có sự khác biệt nhau về chiều cao và khối lượng tươi, nhưng chỉ số SPAD ghi nhận được ở ánh sáng 7Đ:3X cao hơn (Bảng 2). Do vậy tỷ lệ ánh sáng 7Đ:3X được lựa chọn là tỷ lệ chiếu sáng phù hợp cho sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*.



Hình 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ ánh sáng đến sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến sau 8 tuần nuôi cấy *in vitro*. T: trắng; X: xanh; Đ: đỏ.

3.2. Khảo sát sự tăng sinh của sinh khối chồi cây lan kim tuyến nuôi cấy trong hệ thống bioreactor

Trong quá trình nhân sinh khối mô, tế bào thực vật, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của thực vật, một trong những yếu tố quan trọng là khối lượng ban đầu hay mật độ nuôi cấy. McClelland và Smith đã chỉ ra rằng, tỷ lệ khối lượng mẫu cây/thể tích môi trường ảnh hưởng đến tốc độ tăng sinh của mẫu cây [34]. Trong nghiên cứu này, kết quả thu được sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, hệ số tăng sinh ở nghiệm thức sử dụng 15 g và 20 g mẫu cây ban đầu cao hơn so với nghiệm thức sử dụng 10 g, và không có sự khác biệt đáng kể giữa hai nghiệm thức 15 g và 20 g (Bảng 3). Kết quả nghiên cứu của Jin và cộng sự cũng cho thấy ở nghiệm thức sử dụng mật độ nuôi cấy cao (12,5 g/L và 15 g/L) thì sinh khối cao hơn so với nghiệm thức sử dụng 10 g/L [12]. Do không có sự khác biệt về hệ số tăng sinh giữa hai nghiệm thức 15 g và 20 g, nên với khối lượng nuôi cấy ban đầu là 20 g sẽ thu được lượng sinh khối lớn hơn mà không yêu cầu thêm về thể tích môi trường nuôi cấy, điều này sẽ giúp tiết kiệm chi phí môi trường nuôi cấy hơn. Do vậy khối lượng mẫu nuôi cấy ban đầu thích hợp để nuôi cấy trong hệ thống bioreactor ở nghiên cứu này là 20 g.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của khối lượng mẫu ban đầu đến sự tăng sinh của sinh khối lan kim tuyến ở hệ thống bioreactor sau 4 tuần nuôi cấy

Khối lượng tươi mẫu ban đầu (g)	Khối lượng tươi sau nuôi cấy (g)	Khối lượng khô (g)	Hệ số tăng sinh (lần)
10	26,80 ± 1,36	3,82 ± 0,16	2,54 ^b
15	43,00 ± 2,35	6,36 ± 0,31	2,77 ^a
20	57,94 ± 0,98	8,11 ± 0,15	2,70 ^{ab}

(Khối lượng tươi và khối lượng khô được biểu diễn theo giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các chữ cái a, b,... trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%).

3.3. Đánh giá một số hoạt tính sinh học của cây lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*

3.3.1. Định tính sự hiện diện của một số nhóm hợp chất trong dịch chiết của sinh khối lan kim tuyến

Kết quả thu được ở nghiên cứu này cho thấy, trong dịch chiết của sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* có sự hiện diện của các nhóm chất: phytosterol, carbohydrate, saponin, flavonoid, phenolic và tanin; nhưng không có sự hiện diện của nhóm alkaloid (Bảng 4). Trong một báo cáo khác lại chỉ ra rằng, thành phần hóa học chính của *A. roxburghii* là polysaccharide, flavonoid, glycoside, axit hữu cơ, hợp chất dễ bay hơi, steroid, triterpene, alkaloid và nucleoside [3]. Nguyễn và cộng sự khi tiến hành sàng lọc các nhóm hợp chất có trong dịch chiết loài *A. formosanus* nuôi trồng ở hệ thống thủy canh trên môi trường dinh dưỡng Hydro Bee (HB) cho thấy rằng, trong cây *A. formosanus* có sự hiện diện của các nhóm chất alkaloid, flavonoid, glycoside, terpenoid, steroid nhưng không có sự hiện diện của tannin và phenolic, saponin [35]. Kết quả nghiên cứu cao chiết nước và ethanol của cây lan kim tuyến loài *Lusidia discolor* thu thập tại vùng Thất Sơn, tỉnh An Giang cho thấy có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, terpenoid, phenol và tanin [25]. Kết quả của các nghiên cứu này cho thấy có một số khác biệt nhau về thành phần các nhóm chất, nguyên nhân có thể do nhiều yếu tố như sự khác biệt về xuất xứ, loài, điều kiện nuôi trồng, độ tuổi của các mẫu hay dung môi lựa chọn để chiết xuất giữa các nghiên cứu.

Bảng 4. Kết quả xác định sự hiện diện của một số nhóm hợp chất trong dịch chiết cây lan kim tuyến

Nhóm hợp chất	Thuốc thử	Kết quả
Alkaloid	Mayer/Dragendorff	-
Phytosterol	Libermann	+
Carbohydrate	Fehling	+
Saponin	Xà phòng hoá	+
Flavonoid	Mg + HCl	+
Phenolic và Tannin	FeCl ₃ (5%)	+

(+): có sự hiện diện; (-): không có sự hiện diện.

3.3.2. Xác định hàm lượng phenolic tổng số của mẫu sinh khối lan kim tuyến

Trong nghiên cứu này, hàm lượng phenolic tổng số (mg GAE/g DW) được xác định bằng phương pháp Folin-Ciocalteu [29], với phương trình đường chuẩn acid galic là $y = 0,003x + 0,0052$, hệ số tương quan $R^2 = 0,9951$. Từ phương trình đường chuẩn, xác định được hàm lượng phenolic tổng số trong mẫu lan kim tuyến đạt được là 8,82 mg GAE/g DW. So sánh với hàm lượng phenolic tổng số trong cây lan kim tuyến *L. discolor* thu thập tại xã Cô Tô, huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang (55,16 mg GAE/g DW) ở nghiên cứu của Nguyễn Công Kha và cộng sự [36], thì hàm lượng phenolic tổng số của sinh khối lan kim tuyến (*A. roxburghii*) nuôi cấy *in vitro* trong nghiên cứu này thấp hơn. Sự tích lũy các nhóm hợp chất thứ cấp ở thực vật thường liên quan đến cơ chế phòng vệ, trong khi đó điều kiện nuôi cấy *in vitro* luôn được xác định để tối ưu cho sự sinh trưởng của mẫu thực vật nuôi cấy. Điều này giải thích một phần cho sự thấp hơn về hàm lượng phenolic tổng số của mẫu lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* ở nghiên cứu này so với mẫu nuôi trồng ở điều kiện tự nhiên. Tuy nhiên, nuôi cấy sinh khối cây được liệu ở điều kiện *in vitro* cho phép chủ động điều khiển được quá trình nuôi cấy, từ đó tối ưu được điều kiện môi

trường để thu nhận được lượng sinh khối lớn trong thời gian ngắn mà không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Vì vậy, sinh khối lan kim tuyến thu nhận được từ quá trình nuôi cấy *in vitro* vẫn được xem là một nguồn dược liệu tiềm năng để khai thác phục vụ các ngành có liên quan.

3.3.3. Đánh giá khả năng kháng oxy hóa của cao chiết cây lan kim tuyến

Hoạt tính chống oxy hóa của một số hợp chất thứ cấp ở lan kim tuyến được thể hiện qua tỷ lệ giảm nồng độ của DPPH trước và sau phản ứng, được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng 517 nm. Kết quả thu được cho thấy, phần trăm khử gốc tự do của cao chiết tỷ lệ thuận với nồng độ cao chiết. Cụ thể ở nồng độ 50 µg/mL thì phần trăm khử gốc tự do đạt 43,34%, khi tăng nồng độ cao chiết thì phần trăm khử gốc tự do cũng gia tăng, ở nồng độ cao 250 µg/mL thì phần trăm khử gốc tự do đạt 52%. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận đối với đối chứng dương là vitamin C (Bảng 5).

Bảng 5. Kết quả khảo sát khả năng khử gốc tự do của cao chiết lan kim tuyến bằng phương pháp DPPH

Mẫu	Nồng độ cao chiết (µg/mL)	Phần trăm khử gốc tự do (%)	Nồng độ vitamin C (µg/mL)	Phần trăm khử gốc tự do (%)
1	50	43,34	2	9,29
2	100	45,71	4	24,83
3	150	47,59	6	44,73
4	200	49,89	8	54,46
5	250	52,00	10	62,19

Từ các kết quả ghi nhận được ở bảng 5, xây dựng được phương trình đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm khử gốc tự do với nồng độ cao chiết là $y = 0,043x + 41,252^{(*)}$ với $R^2 = 0,9981$, và phương trình đường chuẩn biểu diễn sự phụ thuộc phần trăm khử gốc tự do với nồng độ vitamin C là $y = 6,7715x - 1,529^{(**)}$ với $R^2 = 0,9689$. Hiệu suất loại bỏ gốc tự do của cao chiết toàn phần lan kim tuyến và vitamin C thông qua giá trị IC_{50} được tính toán dựa vào hai phương trình đường chuẩn $(*)$ và $(**)$. Kết quả thu được giá trị IC_{50} của cao chiết của cây lan kim tuyến và vitamin C tương ứng là 203,44 µg/mL và 7,61 µg/mL. Một số nghiên cứu trên các loài khác nhau của chi lan kim tuyến cũng cho thấy khả năng kháng oxy của chi này. Chẳng hạn, Nguyen và cộng sự báo cáo rằng, hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết cây lan kim tuyến (*A. formosanus*) nuôi ở hệ thống thủy canh chứa môi trường dinh dưỡng HB có giá trị IC_{50} là 136,19 µg/mL [35]. Đỗ Thị Gấm và cộng sự bước đầu đánh giá hoạt tính kháng oxy hoá của ba loài lan kim tuyến thông qua phản ứng oxy hóa indigocarmin bởi enzym peroxylase trên nhóm máu O cho thấy, chế phẩm flavonoid chiết xuất từ ba loài lan kim tuyến thể hiện hoạt tính chống oxy hoá tốt. Trong đó, khả năng chống oxy hóa của loài *A. roxburghii* (Wall.) Lindl đạt cao nhất, sau đó tới loài *A. lylei* Rolfe ex Downiex, và đạt thấp nhất là ở loài *A. anamensis* Aver [37].

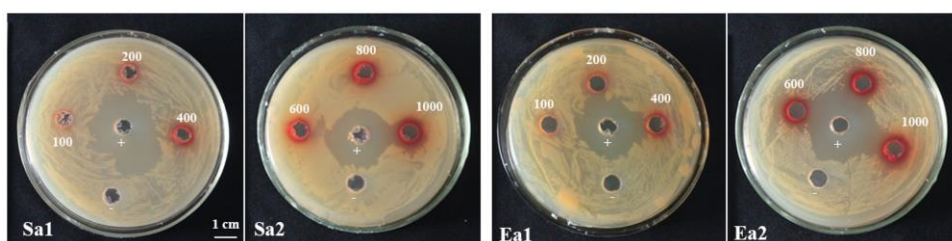
3.3.4. Đánh giá khả năng kháng khuẩn của cao chiết cây lan kim tuyến

Cao chiết ethanol lan kim tuyến được thử nghiệm về khả năng kháng đối với bốn loài vi khuẩn thuộc nhóm gây bệnh ESKAPE là *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. agglomerans*. Hầu hết chúng là các chủng phân lập kháng nhiều loại kháng sinh và đây là một trong những thách thức lớn nhất trong lâm sàng [38]. Kết quả thu được cho thấy, cao chiết lan kim tuyến không thể hiện khả năng kháng đối với hai chủng *K. pneumoniae* và *A. baumannii*, nhưng có khả năng kháng đối với hai chủng *S. aureus* và *E. agglomerans* (Bảng 6, Hình 3). Đường kính vòng vô khuẩn tăng dần theo nồng độ của cao chiết. Đối với chủng *E. agglomerans*, khả năng kháng khuẩn ghi nhận được đối với nồng độ cao chiết từ 400 - 1000 mg/mL, với đường kính vòng vô khuẩn đạt được cao nhất ở nghiên cứu này là 12,7 cm ở nồng độ cao chiết 1000 mg/mL, thấp hơn so với đối chứng dương là kháng sinh ampicilin 0,1%, có đường kính vòng kháng khuẩn là 32,2 mm. Đối với vi khuẩn tụ cầu vàng *S. aureus*, đây là chủng tụ cầu kháng lại hết 15 loại kháng sinh được sử dụng trong kháng sinh đồ, cũng là các loại kháng sinh phổ biến được dùng hiện nay trong các cơ sở y tế trong nước [39], thì cao chiết lan kim tuyến có khả năng kháng ở nồng độ từ 200 - 1000 mg/mL. Tại nồng độ cao chiết 1000 mg/mL cao chiết, đường kính vòng vô khuẩn đạt được là 13,8 mm, thấp hơn so với đối chứng dương (30,5 mm). Tuy nhiên các kết quả này cũng gợi ra tiềm năng sử dụng nguồn sinh khối lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* hỗ trợ trong việc điều trị các bệnh liên quan đến vi khuẩn đa kháng sinh hiện nay.

Bảng 6. Khả năng kháng *S. aureus* và *E. agglomerans* của cao chiết lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*

Đối chứng	Nồng độ cao chiết (mg/mL)	Đường kính vòng vô khuẩn <i>S. aureus</i> (mm)	Đường kính vòng vô khuẩn <i>E. agglomerans</i> (mm)
-	100	0,0 ^f	0,0 ^d
-	200	7,5 ^e	0,0 ^d
-	400	9,3 ^d	9,5 ^c
-	600	11,0 ^c	12,5 ^b
-	800	11,8 ^c	12,7 ^b
-	1000	13,8 ^b	13,3 ^b
Ampicillin (0,1%)	-	30,5 ^a	32,2 ^a
DMSO (10%)	-	0,0 ^f	0,0 ^d

(Các chữ cái a, b,... trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%).



Hình 3. Khả năng kháng *S. aureus* và *E. agglomerans* của cao chiết lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro*.

Sa: *S. aureus*; Ea: *E. agglomerans*; (-): đối chứng âm (DMSO 10%); (+): đối chứng dương (ampicillin 0,1%); 100, 200, 400, 600, 800, 1000: nồng độ cao chiết (mg/mL).

4. KẾT LUẬN

Đối với quá trình nuôi cấy *in vitro* cây lan kim tuyến, tỷ lệ ánh sáng 7Đ:3X là thích hợp cho sự sinh trưởng của cây lan kim tuyến. Trong giai đoạn nuôi cấy sinh khối bằng bioreactor thể tích 2 lít, sử dụng 20 g sinh khối tươi ban đầu (với tỷ lệ khối lượng : môi trường là 20 g : 1000 mL) là thích hợp cho quá trình nuôi cấy sinh khối lan kim tuyến, với hệ số tăng sinh đạt được là 2,7 lần sau 4 tuần nuôi cấy. Trong dịch chiết từ mẫu lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* có sự hiện diện của các nhóm chất có hoạt tính sinh học như: flavonoid, phenolic và tanin, saponin, carbohydrate, phytosterol. Hàm lượng phenolic tổng số tích lũy trong lan kim tuyến là 8,82 mg GAE/g DW. Hoạt tính chống oxy hóa DPPH của cao chiết lan kim tuyến thu được là 203,44 µg/mL. Cao chiết lan kim tuyến có khả năng kháng đối với hai chủng vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* và *E. agglomerans*. Các kết quả đạt được của nghiên cứu cho thấy rằng lan kim tuyến nuôi cấy *in vitro* là một nguồn dược liệu tiềm năng có thể được sử dụng thay thế cho nguồn cây trồng ở tự nhiên đang ngày càng khan hiếm.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh (nay là Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh) bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 158/HĐ-DCT ngày 01 tháng 10 năm 2022.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Hồng Hoàng, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Xuân Tuấn, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Kim Loan, Dương Tân Nhựt - Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Khoa học và Phát triển **13** (3) (2015) 337-344.
2. Phạm Hoàng Hộ - Cây cỏ Việt Nam III, in lần thứ 2. Nhà xuất bản Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh (2000) 1027.

3. Gong X.H., Xu M., Dong H.Z., Lin Z.C., Zhang Y.J. and Zhao P. - Comparative study of the chemical constituents of *Anoectochilus* spp. from different origins. *Medicinal Plant* **4** (3) (2013) 50-52.
4. Ye S., Shao Q., Zhang A. - *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications. *Journal of Ethnopharmacology* **209** (2017) 184-202. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.032>
5. Cui S.C., Yu J., Zhang X.H., Cheng M.Z., Yang L.W. and Xu J.Y. - Antihyperglycemic and antioxidant activity of water extract from *Anoectochilus roxburghii* in experimental diabetes. *Experimental and Toxicologic Pathology* **65** (5) (2013) 485-488. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2012.02.003>
6. Ito A., Kasai R., Yamasaki K. and Sugimoto H. - Aliphatic and aromatic glucosides from *Anoectochilus koshunensis*. *Phytochemistry* **33** (5) (1993) 1133-1137. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85037-R](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85037-R)
7. Li Y.D., Ye H.X., and Chen L.P. - Study on tissue culture and rapid propagation techniques of *Anoectochilus roxburghii*. *Acta Agriculturae Jiangxi* **25** (4) (2013) 52-54.
8. Nguyễn Tiến Bân - Danh lục các loài thực vật Việt Nam, Tập 3. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội (2005).
9. Dương Tấn Nhứt, Nguyễn Thành Hải - Hệ thống nuôi cấy bioreactor trong công nghệ sinh học thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **4** (3) (2006) 265-283.
10. Wu R.Z., Baque M.A. and Paek K.Y. - Establishment of a large-scale micropropagation system for *Anoectochilus formosanus* in bioreactors. *Acta Horticulture* **878** (2010) 167-173. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.878.18>
11. Yoon Y.J., Murthy H.N., Hahn E.J. and Paek K.Y. - Biomass production of *Anoectochilus formosanus* Hayata in a bioreactor system. *Journal of Plant Biology* **50** (2007) 573-576. <https://doi.org/10.1007/BF03030711>
12. Jin M.Y., Han L., Li H., Wang H.Q., Piao X.C. and Lian M.L. - Kinsenoside and polysaccharide production by rhizome culture of *Anoectochilus roxburghii* in continuous immersion bioreactor systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **131** (2017) 527-535. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1302-8>
13. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15** (1962) 473-497.
14. Rehman M., Ullah S., Bao Y., Wang B., Peng D. and Liu L. - Light-emitting diodes: Whether an efficient source of light for indoor plants? *Environmental Science and Pollution Research* **24** (2017) 24743-24752. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0333-3>
15. Silva S.T., Bertolucci S.K.V., Cunha S.H.B.D., Lazzarini L.E.S. and Tavares M.C. - Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.). *Spreng. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **129** (2017) 501-510. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1195-6>
16. Massa G.D., Kim H.H., Wheeler R.M. and Mitchell C.A. - Plant productivity in response to LED lighting. *HortScience* **43** (7) (2008) 1951-1956. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.7.1951>
17. Manivannan A., Soundararajan P., Park Y.G., Wei H., Kim S.H. and Jeong B.R. - Blue and red light-emitting diodes improve the growth and physiology of *in vitro*-grown carnations 'Green Beauty' and 'Purple Beauty'. *Horticulture Environment and Biotechnology* **58** (2017) 12-20. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0051-2>
18. Wojciechowska R., Kołton A., Długosz-Grochowska O., Żupnik M. and Grzesiak W. - The effect of LED lighting on photosynthetic parameters and weight of lamb's lettuce (*Valerianella locusta*). *Folia Horticulture* **25** (1) (2013) 41-47. <https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0005>
19. Meng Q. and Runkle E.S. - Moderate-intensity blue radiation can regulate flowering, but not extension growth, of several photoperiodic ornamental crops. *Environment and Experimental Botany* **134** (2017) 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.006>

20. Bantis F., Ouzounis T. and Radoglou K. - Artificial LED lighting enhances growth characteristics and total phenolic content of *Ocimum basilicum*, but variably affects transplant success. *Scientia Horticulturae* **198** (2016) 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.11.014>
21. Li Y., Xin G., Wei M., Shi Q., Yang F. and Wang X. - Carbohydrate accumulation and sucrose metabolism responses in tomato seedling leaves when subjected to different light qualities. *Scientia Horticulturae* **225** (2017) 490-497. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.053>
22. Winson K.W.S., Chew B.L., Sathasivam K., Subramaniam S. - Effect of amino acid supplementation, elicitation and LEDs on *Hylocereus costaricensis* callus culture for the enhancement of betalain pigments. *Scientia Horticulturae* **289** (2021) 110459. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110459>
23. Giap D.D., Thai T.D., Thang D.D., Trang N.T.H., Tuan T.T., Xuyen N.T. and Hieu D.D. - Effects of several organic extracts on the growth, yield and quality of *Anoectochilus formosanus* biomass. *International Journal of Agricultural Technology* **14** (2) (2018) 171-182.
24. Huong T.T., Hang N.T.T., Trang N.T.H., Giap D.D., Tuan T.T., Tung H.T., Khai H.D., Mai N.T.N. and Nhut D.T. - Influence of led light, salicylic acid and yeast extract on growth and phenolic content of *Dendrobium officinale* plantlets. *Asian Journal of Plant Sciences* **22** (2023) 13-24. <https://doi.org/10.3923/ajps.2023.13.24>
25. Nguyễn Công Kha, Nguyễn Phạm Tuấn, Lâm Bảo Như Phương, Nguyễn Phạm Tú - Phân tích hàm lượng flavonoid, phenolic, polysaccharide và kinsenoside của cây lan gấm thu thập ở vùng Thất Sơn, An Giang và tỉnh Lâm Đồng. Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học Toàn quốc năm 2019.
26. Nguyễn Kim Phi Phụng - Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học quốc gia TP Hồ Chí Minh (2007).
27. Alqethami A., Aldhebiani A.Y. - Medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia: Phytochemical screening. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28** (1) (2021) 805-812. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.013>
28. Nguyễn Đức Hùng, Từ Quang Tân, Chu Hoàng Mậu. Định tính thành phần hóa học và phân lập saponin từ lá loài *Weigela florida* (Bunge) A. DC. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* **65** (3) (2023) 23-29. [https://doi.org/10.31276/VJST.65\(3\).23-29](https://doi.org/10.31276/VJST.65(3).23-29)
29. Ainsworth E.A., Gillespie K.M. - Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* **2** (4) (2007) 875-877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
30. Wong S.P., Leong L.P. and Koh J.H.W. - Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry* **99** (4) (2006) 775-783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>
31. Hadacek F., Greger H. - Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical analysis* **11** (3) (2000) 137-147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I)
32. Nhut D.T., Huy N.P., Tai N.T., Nam N.B. and Luan V.Q., Hien V.T., Ting H.T., Vinh B.T. and Luan T.C. - Light-emitting diodes and their potential in callus growth, plantlet development and saponin accumulation during somatic embryogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **29** (2) (2015) 299-308. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.1000210>
33. Naznin M.T., Lefsrud M., Gravel V. and Azad M.O.K. - Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. *Plants* **8** (4) (2019) 93. <https://doi.org/10.3390/plants8040093>
34. McClelland M.T. and Smith M.A.L. - Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience* **25** (7) (1990) 797-800. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.7.797>
35. Nguyen H.C., Tran Q.M.N., Dung P.V., Nguyen D.H., Tran T.T., Phan X.H., Dieu-Hien T. - Evaluation of changes in the growth and chemical constituents of *Anoectochilus formosanus* Hayata

- grown under hydroponic conditions. *BioTechnology* **99** (4) (2018) 375-383. <https://doi.org/10.5114/BTA.2018.79968>
36. Nguyễn Công Kha, Đỗ Thị Hồng Tươi, Nguyễn Lê Thanh Tuyền - Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của cao chiết cây lan gấm (*Lusidia discolor*) tại An Giang. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam* **04** (125) (2021) 131-138.
37. Đỗ Thị Gấm, Hà Việt Hải, Chu Hoàng Hà, Phạm Bích Ngọc - Khảo sát một số đặc điểm hóa học và tác dụng chống oxy hóa (antioxydant) của các hợp chất flavonoid chiết xuất từ một số loài lan kim tuyến của Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội* **33** (1S) (2004) 104-113.
38. Santajit S., Indrawattana N. - Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International* **2016** (1) (2016) 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
39. Bùi Thị Thơ, Trần Quang Dân, Võ Châu Tuấn - Nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của cao chiết lá cây thuốc thương (*Phaeanthus vietnamensis* Ban). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng* **20** (7) (2022) 99-103.

ABSTRACT

RESEARCH ON PRODUCTION AND EVALUATION OF SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *Anoectochilus roxburghii* IN VITRO CULTURE

Trinh Thi Huong^{1*}, Tran Hoang Ngau¹, Nguyen Thanh Truc¹, Huynh Trung Hau¹,
Phan Phuong Thanh¹, Ngo Thi Hong Nhung¹, Truong Thi Thanh Ngan¹,
Nguyen Thanh Nhat Minh¹, Tran Trong Tuan²

¹Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

²Institute of Life Science, Vietnam Academy of Science and Technology

*Email: huongtt@huit.edu.vn

Anoectochilus roxburghii (Wall) L. is a valuable medicine herb and some functional foods. However, *A. roxburghii* in the wild has become endangered, and cultivation in nurseries results in low yields. Therefore, to provide *A. roxburghii* biomass as an alternative plant material, this study focused on the effects of monochromatic light (Light Emitting Diode - LED) on plant growth and the proliferation of biomass in the bioreactor system. At the same time, the study also initially evaluated some biological activities of *in vitro* cultured plant biomass. The results showed that the growth criteria for *A. roxburghii* shoots placed under 70% red LED combined with 30% blue LED were better than under other lighting conditions. In bioreactor systems (a bioreactor tank with a volume of 2 liters containing 1 liter of medium), the treatment using 20 g fresh weight of initial material was found appropriate and effective for biomass production of *A. roxburghii*. The proliferation coefficient achieved was 2.7 times after 4 weeks of culture in this bioreactor system. To evaluate the quality of *A. roxburghii* biomass, qualitative and quantitative tests of some secondary compounds were also performed. The results indicated the presence of flavonoid, phenolic, tannin, saponin, carbohydrate, and phytosterol in the *A. roxburghii* extract. The total phenolic content of *A. roxburghii* biomass was 8.82 mg GAE/g DW, and the DPPH antioxidant activity of the extract was 203.44 µg/mL. Among the four bacterial strains in the ESKAPE group surveyed, the *A. roxburghii* extract was resistant to two strains: *S. aureus* and *E. agglomerans*. These results show that *in vitro* cultured *A. roxburghii* biomass can be considered a potential medicinal source to supplement the scarce natural *A. roxburghii* supply.

Keywords: *A. roxburghii*, antibacterial, antioxidant, biomass, bioreactor, LED, phenolic compounds.