

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG VÀ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY LÊN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA TẾ BÀO HUYỀN PHÙ CÂY BÁCH BỆNH (*Eurycoma longifolia* Jack)

Nguyễn Hữu Nhân^{1,3}, Hoàng Tấn Quảng⁴, Nguyễn Hoàng Lộc^{1,2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Viện nghiên cứu hoạt chất sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³Trường Cao đẳng Lương thực – Thực phẩm, Đà Nẵng

⁴Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

*Email: nhloc@hueuni.edu.vn

Ngày nhận bài: 31/10/2019; ngày hoàn thành phản biện: 23/12/2019; ngày duyệt đăng: 02/4/2020

TÓM TẮT

Cây bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) là một cây thuốc phổ biến, có các đặc tính dược lý như chống co thắt, gây độc tế bào, chống khối u, chống loét, kháng khuẩn và kích thích tình dục. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh dưới ảnh hưởng của môi trường và các điều kiện nuôi cấy khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy điều kiện nuôi cấy tốt nhất là môi trường MS cơ bản có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1 mg/L KIN, 3% sucrose, pH 5,75, tỷ lệ tiếp giống 3 g/bình, tốc độ lắc 120 vòng/phút. Sau 14 ngày nuôi cấy, sự tích lũy sinh khối tươi và khô đều đạt cao nhất, tương ứng là 17,27 g/bình và 0,76 g/bình. Phân tích HPLC cho thấy hàm lượng eurycomanone trong tế bào là 1,672 mg/g chất khô, bằng khoảng 80% so với mẫu rễ cây tự nhiên và cao hơn nhiều lần so với callus. Eurycomanone đã được tổng hợp rất tốt trong tế bào cây bách bệnh và dòng tế bào này có thể sử dụng để sản xuất eurycomanone ở quy mô lớn.

Từ khóa: bách bệnh, điều kiện nuôi cấy, *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, tế bào huyền phù.

1. MỞ ĐẦU

Bách bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack) là cây thảo mộc, thường xanh, sinh trưởng chậm, là cây bụi hoặc cây gỗ nhỏ, chiều cao tối đa 15-18 m và ra quả sau 2-3 năm trồng. Trong tự nhiên, cây trưởng thành hoàn toàn có thể mất đến 25 năm [5]. Cây bách bệnh có phổ phân bố theo độ cao biến thiên từ điểm thấp nhất khoảng 200 m cho đến độ cao

1.129 m, phân bố tập trung trong khoảng độ cao từ 500 m đến 900 m. Bách bệnh thường phân bố theo từng dải và đôi khi mọc thành cụm khoảng 3-8 cây ở ven các rừng lá rộng [3].

Hầu như tất cả các bộ phận của cây bách bệnh đều được sử dụng trong các phương thuốc dân gian. Dịch chiết của rễ được sử dụng để phục hồi năng lượng và sinh lực, tăng cường lưu thông máu, được bổ sung vào thành phần thảo dược cho phụ nữ sau khi sinh. Lá được sử dụng để điều trị sốt rét, khối u, bệnh về nướu răng [19]. Dịch chiết cây bách bệnh chứa tanin, polysaccharid trọng lượng phân tử cao, glycoprotein và mucopolysaccharid. Các hợp chất như eurycomanone; 9-methoxycanthin 6-one; 14,15- β -dihydroxyklaineanone và 13,21-epoxyeurycomanone thường được sử dụng như chất chuẩn để tiêu chuẩn hóa các sản phẩm của cây bách bệnh [6].

Ở Việt Nam, các tác giả mới tập trung nghiên cứu về sự phân bố và thành phần hóa học của cây bách bệnh và các công trình công bố cũng chưa nhiều. Trong khi đó, các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào huyền phù cây bách bệnh để sản xuất hợp chất thứ cấp chưa được tìm thấy. Trên thế giới, rất nhiều công trình nghiên cứu về các phương pháp chiết xuất, xác định thành phần hóa học và thử nghiệm hoạt tính sinh học của cây bách bệnh đã được công bố [12], [17]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào cây bách bệnh thì chưa nhiều. Vì vậy, nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy tế bào cây bách bệnh để thu một lượng sinh khối lớn, có khả năng tích lũy cao các hợp chất có hoạt tính sinh học nhằm chủ động nguồn nguyên liệu, đảm bảo cho việc tách chiết các dược chất là có ý nghĩa lớn về mặt khoa học và thực tiễn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên sự sinh trưởng của tế bào cây bách bệnh, đây là nguyên liệu để sản xuất các hợp chất thứ cấp.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Callus của cây bách bệnh mà chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Viện nghiên cứu hoạt chất sinh học, Trường đại học Khoa học, Đại học Huế [4].

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy huyền phù tế bào

Callus có màu vàng nhạt, rời được cấy chuyển lên bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng để nuôi cấy tế bào huyền phù. Công thức môi trường cho callus sinh trưởng tốt nhất (MS cơ bản có chứa 3% sucrose, bổ sung 1,25 mg/L NAA và

1 mg/L KIN) được sử dụng để nuôi cấy huyền phù tế bào [4]. Quá trình nuôi cấy được thực hiện với cường độ chiếu sáng khoảng 500 lux, thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày, tốc độ lắc 120 vòng/phút.

Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy cho đến 20 ngày để xác định đường cong sinh trưởng của tế bào. 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.

Đối với thí nghiệm thăm dò tỷ lệ tiếp giống, lượng callus được đưa vào mỗi bình nuôi cấy là 2-4 g tươi/bình. Sau khi chọn được tỷ lệ tiếp giống tối ưu tối ưu, chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau (sucrose, fructose và glucose ở các nồng độ từ 2-4%) lên khả năng sinh trưởng của tế bào. Để khảo sát ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng của tế bào, chúng tôi sử dụng các môi trường có giá trị pH từ 4,75 đến 6,75, khoảng chênh lệch pH giữa các môi trường là 0,25.

Chiết xuất eurycomanone

Eurycomanone được chiết xuất theo phương pháp của Mohamad và cs (2013) [14] có điều chỉnh để phù hợp với điều kiện cụ thể của phòng thí nghiệm. Sinh khối khô của callus được nghiền thành bột mịn, sau đó chiết bằng cách ngâm 0,5 g mẫu trong 10 mL methanol, lắc 120 vòng/phút ở 60°C trong 8 giờ, sau đó để lắng và thu dịch chiết. Quy trình chiết được lặp lại 3 lần. Dịch chiết (khoảng 30 mL) được lọc qua giấy lọc Whatman (No.1) và cô đặc ở 50°C. Sau đó, kết tủa được hòa tan trong 5 mL methanol, lọc qua màng lọc Minisart 0,2 μ m (Sartorius, Goettingen, Đức), để xác định hàm lượng eurycomanone.

Xác định hàm lượng eurycomanone

Hàm lượng eurycomanone được xác định bằng máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo Norhidayah và cs (2015) [16] có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. 20 μ L dịch chiết được tiêm vào máy HPLC bằng Hamilton syringe. Điều kiện chạy HPLC ở nhiệt độ phòng, cột C18 (Xbridge: 5 μ m, 4,6 x 250 mm), tốc độ chạy: 0,8 mL/phút, thời gian chạy: 17,5 phút, detector đọc ở bước sóng 245 nm, pha tĩnh là silica gel và pha động là acetonitril: H₂O (15:85).

Quy trình phân tích HPLC được thực hiện trên máy LC-20 Prominence (Shimadzu, Kyoto, Nhật Bản), với SPD-20A UV-VIS detector, sử dụng phần mềm LC-Solution. Các hóa chất sử dụng để phân tích HPLC được mua từ hãng Merck & Co.Inc. (Darmstadt, Đức). Đường chuẩn của eurycomanone (Santa Cruz, CA, Mỹ) được sử dụng để xác định hàm lượng eurycomanone chứa trong mẫu phân tích.

Xử lý thống kê

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu trung bình được phân

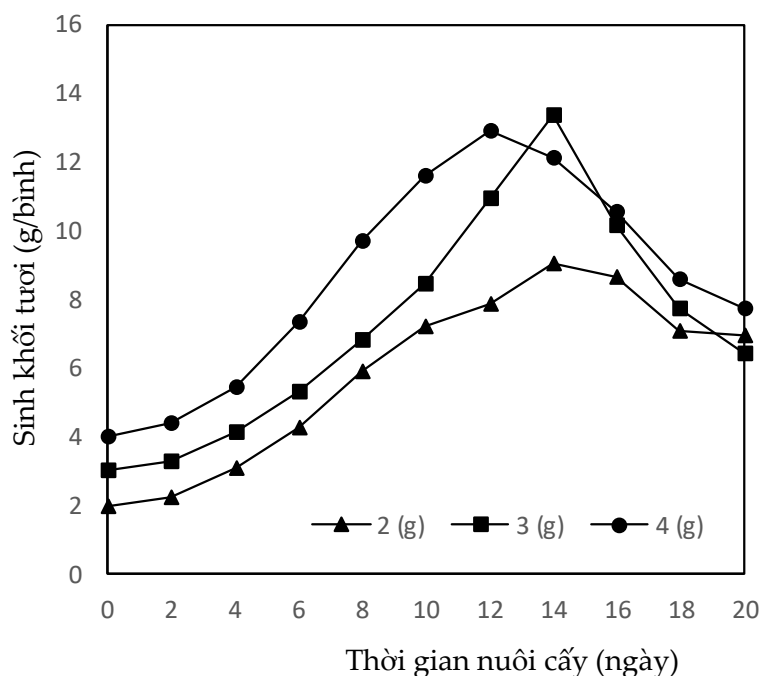
Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng ...

tích one-way ANOVA (Duncan's test, $p < 0,05$) bằng chương trình SPSS (ver. 20).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

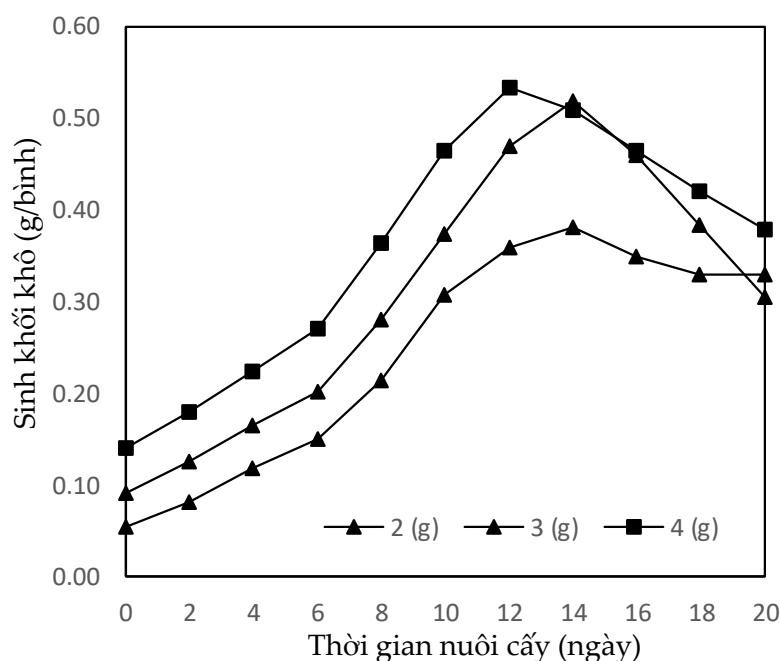
3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống đến sự sinh trưởng của tế bào

Chuyển 2-4 g callus vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường MS lỏng bổ sung 3% sucrose; 1,25 mg/L NAA và 1,0 mg/L KIN với tốc độ lắc 120 vòng/phút để theo dõi đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù trong 20 ngày. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong các hình từ 1-3 cho thấy pha thích nghi diễn ra ngắn (khoảng 2 ngày), sau đó là pha sinh trưởng nhanh (kéo dài đến ngày thứ 12 đến 14), pha ổn định diễn ra ngắn sau đó nhanh chóng chuyển qua pha chết.



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của tế bào theo sinh khối tươi

Kết quả thể hiện ở các đồ thị cho thấy với tỷ lệ cấy giống ban đầu là 2 g, sinh khối tế bào tăng dần đến 14 ngày nhưng trọng lượng tươi chỉ đạt 9,09 g (tương ứng với 0,38 g khô), cao gấp 4,55 lần sinh khối tươi ban đầu. Với tỷ lệ tiếp giống 3 g, sinh tế bào cũng đạt cực đại vào ngày thứ 14, khối lượng tươi thu được là 13,40 g (0,52 g khô), cao gấp 4,47 lần sinh khối ban đầu. Trong khi đó, với tỷ lệ tiếp giống 4 g tế bào sinh trưởng nhanh hơn, đạt sinh khối cực đại ở thời điểm 12 ngày, sinh khối tươi đạt 12,92 g (0,51 g khô), cao hơn 3,23 lần so với ban đầu. Tuy nhiên, với lượng sinh khối ban đầu là 3 g cho hình thái tế bào tốt hơn, tế bào có màu vàng sáng trong khi với lượng sinh khối tế bào ban đầu là 4 g, tế bào có màu nâu nhạt. Vì vậy, tỷ lệ tiếp giống ban đầu 3 g là phù hợp để nuôi cấy tế bào cây bách bệnh.



Hình 2. Đường cong tích lũy sinh khối khô của tế bào



Hình 3. Tế bào huyền phù, sinh khối tươi và sinh khối khô của cây bách bệnh

So với các đối tượng khác đã được công bố, thời gian sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh tương đương với tế bào cây nghệ đen là 14 ngày [11], nhưng ngắn hơn các loại tế bào khác như rau má 24 ngày [10] hay cà gai leo 28 ngày [9].

3.2. Ảnh hưởng nguồn carbon đến sự sinh trưởng của tế bào

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...[13].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các nguồn carbon được sử dụng là sucrose, fructose và glucose ở nồng độ 2-4%. Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy glucose

thích hợp cho sinh trưởng của tế bào, đặc biệt là ở nồng độ 3% (sinh khối tươi đạt 20,30 g), tuy nhiên ở môi trường này sự tích lũy sinh khối khô không tốt (chỉ đạt 0,59 g). Trong khi đó, sucrose ở nồng độ 3% sự sinh trưởng của tế bào không tốt bằng glucose (sinh khối tươi đạt 17,62 g) nhưng sự tích lũy sinh khối khô lại tốt hơn rất nhiều (0,72 g). Trong khi đó, khi nuôi cấy tế bào trên môi trường chứa fructose tế bào không sinh trưởng, hóa nâu và chết sau vài ngày. Trong nuôi cấy sinh khối để sản xuất hợp chất thứ cấp, sự tích lũy sinh khối khô đóng vai trò rất quan trọng, vì thế công thức môi trường có sự tích lũy sinh khối khô cao nhất là sucrose 3% được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sự sinh trưởng của tế bào cây bách bệnh

Nguồn carbon	Sinh khối tươi (g)	Sinh khối khô (g)
Glucose 20	17,58 ^b	0,43 ^c
Glucose 30	20,30 ^a	0,59 ^b
Glucose 40	12,57 ^c	0,44 ^c
Sucrose 20	17,62 ^b	0,44 ^c
Sucrose 30	17,43 ^b	0,72 ^a
Sucrose 40	18,00 ^b	0,61 ^b
Fructose 20	-	-
Fructose 30	-	-
Fuctose 40	-	-

Sucrose được xem là nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào thực vật, nồng độ thường dùng là từ 2-7%. 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. Một số nghiên cứu như nuôi cấy tế bào cây *Solanum eleagnifolium*, *Solanum chrysotrichum* hay *Psoralea corylifolia*... tế bào tăng sinh khối khô cùng với việc tăng nồng độ sucrose. 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 [1].

Trong nghiên cứu của chúng tôi nồng độ sucrose 3% là thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào. Kết quả này cũng tương tự với kết quả nuôi cấy tế bào cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) [18], dây thìa canh [8], hay cây sâm Ấn Độ (*Withania somnifera*) [15].

3.3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng của tế bào

Tế bào và mô thực vật đòi hỏi pH tối ưu cho sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy. Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion và đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy, pH 5,0-6,0 trước khi khử trùng được xem là tối ưu. Độ pH của môi trường còn ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình hấp thụ các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào [2]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh giao động trong khoảng 4,75-6,75. Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 2 cho thấy sự tích lũy sinh khối tươi và sinh khối khô đều tốt nhất ở pH 5,75. Ở công thức môi trường này, sự tích lũy sinh khối tươi và khô đều đạt cao nhất, tương ứng là 17,27 g/bình và 0,76 g/bình.

Bảng 2. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự sinh trưởng của tế bào

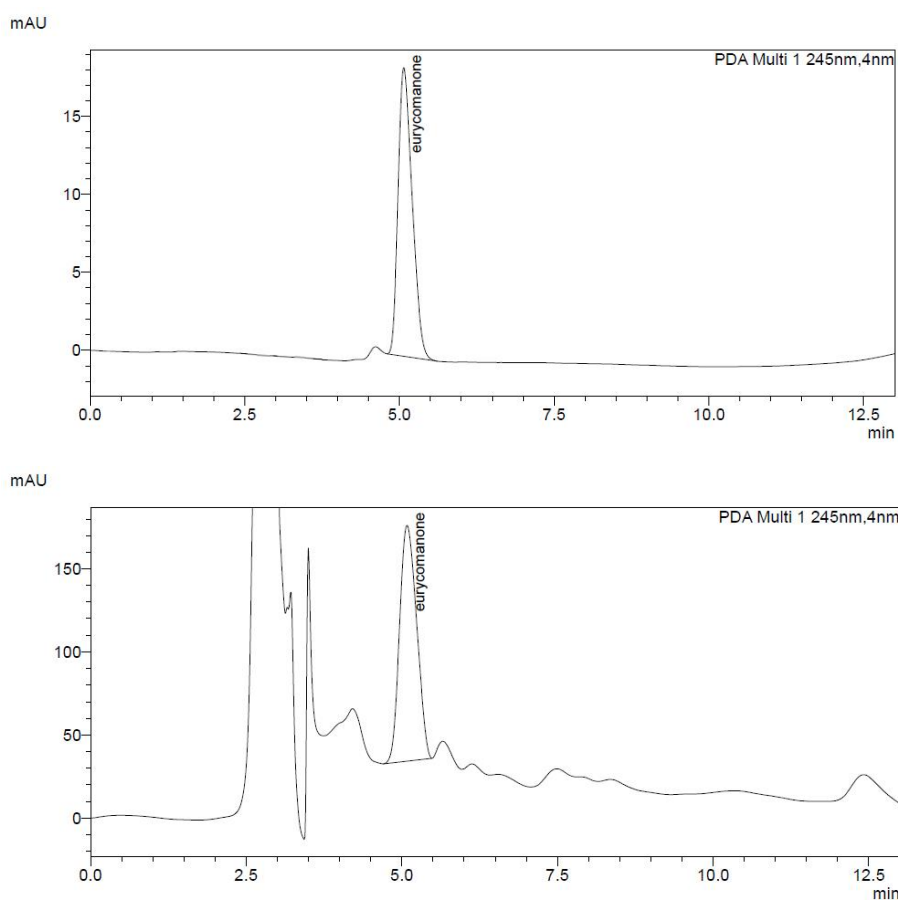
pH	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)
4,75	11,04 ^d	0,49 ^d
5,25	15,47 ^b	0,68 ^b
5,75	17,27 ^a	0,76 ^a
6,25	13,68 ^c	0,60 ^c
6,75	13,52 ^c	0,60 ^c

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi thu được tương tự như kết quả nghiên cứu của Siregar và cs (2004), khi nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên sự sản xuất canthin-6-one alkaloid từ nuôi cấy tế bào cây bách bệnh, tác giả nhận thấy pH 5,75 là tối ưu cho nuôi cấy tế bào cây này [17].

3.4. Sự tích lũy eurycomanone trong tế bào cây bách bệnh

Eurycomanone là chất đặc trưng của cây bách bệnh, có hoạt tính chính trong tăng cường sinh lý ở nam giới, cảm ứng quá trình apoptosis ở tế bào ung thư,... [5], [7]. Kết quả phân tích HPLC mẫu dịch chiết từ tế bào 14 ngày tuổi trong điều kiện nuôi cấy tốt nhất (tỷ lệ tiếp giống 3 g, môi trường MS cơ bản có bổ sung 1,25 mg/L NAA và 1 mg/L KIN, 3% sucrose, pH 5,75) cho thấy mẫu xuất hiện 1 peak có thời gian lưu giống với chất chuẩn eurycomanone (khoảng 5,07 phút). Hàm lượng eurycomanone trong tế bào là 1,672 mg/g chất khô, bằng khoảng 80% so với mẫu rễ cây tự nhiên (2,09 mg/g) và cao hơn nhiều lần so với callus (0,17 mg/g) [4]. Như vậy, eurycomanone đã được tổng hợp rất tốt trong tế bào cây bách bệnh và dòng tế bào này có thể sử dụng để sản xuất eurycomanone.

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng ...



Hình 4. Phổ HPLC phân tích eurycomanone.

A. Eurycomarone chuẩn, B. Dịch chiết tế bào cây bách bệnh

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù cây bách bệnh. Kết quả thu được tốt nhất khi nuôi tế bào trong bình tam giác chứa 50 mL môi trường lỏng chứa 3% sucrose, pH 5,75, với tỷ lệ tiếp giống là 3 g. Sinh khối tươi, sinh khối khô và hàm lượng eurycomanone thu được tương ứng là 17,27 g/bình, 0,76 g/bình và 1,672 mg/g chất khô.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. 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*). *TC Phát triển Khoa học và Công nghệ*, Vol. 9(6), pp. 5-66.
- [2]. Nguyễn Hoàng Lộc (2011). Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng. NXB Đại học Huế.
- [3]. Nguyễn Thành Mến, Hoàng Thanh Trường, Huỳnh Thị Mỹ Trang, Nguyễn Đặng Thông (2014). Đặc điểm phân bố, sinh thái của Hoàng Liên Ô Rô (*Mahonia nepalensis* DC.), Bá Bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack.) ở Lâm Đồng. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, Vol. 3, pp. 3424-3432.
- [4]. Nguyễn Hữu Nhân, Hoàng Tấn Quang, Nguyễn Hoàng Lộc (2019). Nghiên cứu 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*, Vol. 128(1E), pp. 5-10.
- [5]. R. Bhat, and A. A. Karim (2010). Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack): A review on its ethnobotany and pharmacological importance. *Fitoterapia*, Vol. 81(7), pp. 669-679.
- [6]. K. L. Chan, C. Y. Choo, N. R. Abdullah, and Z. Ismail (2004). Antiplasmodial studies of *Eurycoma longifolia* Jack using the lactate dehydrogenase assay of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 92(2), pp. 223-227.
- [7]. N. Hasnida (2012). Micropropagation and production of eurycomanone, 9-methoxycanthin-6-one and canthin-6-one in roots of *Eurycoma longifolia* plantlets. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11, pp.
- [8]. E. J. Lee, M. Mobin, E. J. Hahn, and K. Y. Paek (2006). Effects of sucrose, inoculum density, auxins, and aeration volume on ceil growth of *Gymnema sylvestre*. *J. Plant Biol.*, Vol. 49(6), pp. 427-431.
- [9]. N. H. Loc, N. H. T. Anh, L. T. M. Khuyen, and T. N. T. An (2014). Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, Vol. 3(1), pp. 1-6.
- [10]. N. H. Loc, and N. T. Giang (2012). Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban). *Chemical Papers*, Vol. 66(7), pp. 642-648.
- [11]. N. H. Loc, T. T. T. Ha, and Y. Hirata (2006). Effect of several factors on cell biomass production of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) in bioreactor. *Vietamese J. Biotechnol.*, Vol. 4(2), pp. 213-220.
- [12]. M. Mahmood, and R. Noormi (2009). The production of 9-methoxycanthin-6-one from callus cultures of (*Eurycoma longifolia* Jack) Tongkat Ali. Pages 359-369 in Jain S. M., Saxena P. K., eds. *Protocols for In vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants*. Totowa, NJ: Humana Press.
- [13]. M. O. Mello, C. T. S. Dias, A. F. C. Amaral, and M. Melo (2001). Growth of *Bauhinia forficata*

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng ...

- Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension cultures with carbon sources. *Scientia Agricola*, Vol. 58, pp. 481-485.
- [14]. M. Mohamad, M. W. Ali, A. Ripin, and A. Ahmad (2013). Effect of extraction process parameters on the yield of bioactive compounds from the roots of *Eurycoma Longifolia*. *Jurnal Teknologi (Science and Engineering)*, Vol. 60, pp. 51-57.
- [15]. P. Nagella, and H. N. Murthy (2010). Establishment of cell suspension cultures of *Withania somnifera* for the production of withanolide A. *Biores. Technol.*, Vol. 101(17), pp. 6735-6739.
- [16]. A. Norhidayah, J. Vejayan, and M. M. Yusoff (2015). Detection and quantification of eurycomanone levels in Tongkat Ali herbal products. *Journal of Applied Sciences*, Vol. 15(7), pp. 999-1005.
- [17]. L. A. M. Siregar, L. K. Chan, and P. L. Boey (2004). Effect of cell source and pH of culture medium on the production of canthin-6-one alkaloids from the cell cultures of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia* Jack). *Plant Biotechnol*, Vol. 6, pp. 125-130.
- [18]. N. T. Thanh, N. V. Ket, and K. Y. Paek (2007). Effecting of medium composition on biomass and ginsenoside production in cell suspension culture of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv. *VNU Journal of Science, Natural Sciences and Technology*, Vol. 23, pp. 269-274.
- [19]. I. Zhari, I. Norhayati, and L. Jaafar (1999). Malaysian herbal monograph. Volume 1. Malaysian Monograph Committee (Kementerian Kesihatan Malaysia), Kuala Lumpur.

EFFECTS OF CULTURE MEDIA AND CONDITIONS ON GROWTH ABILITY OF *Eurycoma longifolia* Jack SUSPENSION CELLS

Nguyen Huu Nhan^{1,3}, Hoang Tan Quang⁴, Nguyen Hoang Loc^{1,2*}

¹Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

²Institute of Bioactive compounds, University of Sciences, Hue University

³College of Food Industry, Da Nang

⁴Institute of Biotechnology, Hue University

*Email: nhloc@hueuni.edu.vn

ABSTRACT

Eurycoma longifolia Jack is a popular medicinal plant, pharmacological properties of this plant have shown antiplasmodial, cytotoxic, anti-tumor, antiulcer, antimicrobial and aphrodisiac properties. In this study, we evaluated the growth ability of suspension cells under the influence of different media and culture conditions. The results showed that the optimal culture conditions were liquid basic MS medium supplemented with 1.25 mg/L NAA and 1 mg/L KIN, 3% sucrose, pH 5.75, inoculum size of 3 g callus/bottle, and shaking speed of 120 rpm. After 14 days of culture, the accumulation of fresh and dry biomass reached the highest with the value of 17.27 g/bottle and 0.76 g/bottle, respectively. HPLC analysis showed that the eurycomanone content of dry biomass was 1,672 mg/g, approximate of 80% of natural roots sample and many times higher than that of callus. Eurycomanone has been well biosynthesized in suspension cells and this cell line can be used to produce eurycomanone on a large scale.

Keywords: Culture conditions, *Eurycoma longifolia* Jack, eurycomanone, inoculum size, suspension cells.



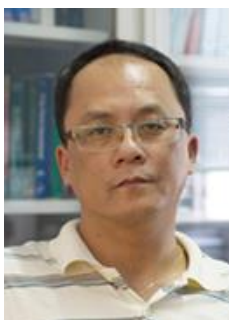
Nguyễn Hữu Nhân sinh ngày 23/8/1981 tại Quảng Nam. Ông tốt nghiệp đại học năm 2003 ngành Sinh học, tốt nghiệp Thạc sĩ năm 2012 chuyên ngành Sinh học thực nghiệm, năm 2013 đến nay học tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý học thực vật tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Hiện nay, ông công tác tại Trường Cao đẳng Lương thực – Thực phẩm, Đà Nẵng.

Lĩnh vực nghiên cứu: Công nghệ sinh học thực vật.



Hoàng Tấn Quảng sinh ngày 26/3/1980 tại Quảng Bình. Ông tốt nghiệp đại học năm 2003 ngành Sinh học, tốt nghiệp Thạc sĩ năm 2007 chuyên ngành Sinh học thực nghiệm, tốt nghiệp tiến sĩ chuyên ngành Sinh lý học thực vật năm 2013 tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế. Từ năm 2006 đến nay, ông công tác tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Công nghệ gen, Công nghệ sinh học thực vật, Chi thị phân tử



Nguyễn Hoàng Lộc sinh ngày 22/11/1962 tại Lâm Đồng. Ông tốt nghiệp cử nhân ngành Sinh học năm 1984. Năm 1992, ông nhận học vị tiến sĩ tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Ông nhận chức danh phó giáo sư năm 2003 và giáo sư năm 2013. Từ năm 1984 đến nay, ông công tác tại Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Vaccine thực vật, Các hợp chất chuyển hóa thứ cấp, Enzyme tái tổ hợp.