HNUE JOURNAL OF SCIENCE DOI: 10.18173/2354-1059.2021-0071
Natural Sciences 2021, Volume 66, Issue 4F, pp. 82-91
This paper is available online at http://stdb.hnue.edu.vn

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ BỔ SUNG MỘT SỐ NGUỒN NITƠ VÀ CARBON VÀO MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN VÀ KHẢ NĂNG TÍCH LUỸ HOẠT CHẤT CỦA NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO *Cordyceps militaris*

Lê Thị Tươi, Lê Thị Huệ, Cao Tuấn Kiệt, Nguyễn Đức Hiếu, Đỗ Thị Hồng, Lê Thị Tuyết Mai và Vũ Thị Bích Huyền
Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Tóm tắt. *Cordyceps militaris*, loài nấm kí sinh trên côn trùng, có giá trị dược liệu cao tương tự như nấm *Cordyceps sinensis* và có giá trị kinh tế rất lớn. Việc đảm bảo sự hài hoà giữa phát triển sinh khối và khả năng tích lũy hoạt chất trong quả thể nấm có ý nghĩa quan trọng trong việc phát triển các sản phẩm chất lượng từ loại nấm dược liệu này. Trong nghiên cứu này, hiệu quả sử dụng các nguồn nitơ (nhộng tằm tươi, pepton, cao nấm men) và bổ sung carbon trong môi trường nuôi cấy nhân tạo nấm Đông trùng hạ thảo *C. militaris* đến phát triển sinh khối và hàm lượng cordycepin, adenosin trong quả thể nấm đã được đánh giá. Kết quả cho thấy, môi trường N1 sử dụng 20 g/L nhộng tằm tươi, 0,5 g/L KH_2PO_4 và 0,5 g/L $MgSO_4$ cho năng suất và hàm lượng hoạt chất cao nhất, đạt 17,01 mg cordycepin/bình nuôi cấy. Bổ sung thêm các nguồn carbon (glucose và sucrose) với hàm lượng (10, 20, 40 g/L) vào môi trường N1 có thể rút ngắn thời gian lan sợi và thời gian hình thành quả thể nấm, nhưng làm giảm rõ rệt hàm lượng cordycepin. Kết quả nghiên cứu có vai trò quan trọng trong việc định hướng lựa chọn thành phần tối ưu của môi trường nuôi cấy *C. militaris* để có nấm thành phẩm đáp ứng yêu cầu về chất lượng cảm quan và hàm lượng hoạt chất cordycepin cao.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, Đông trùng hạ thảo, nhộng tằm tươi, môi trường nuôi cấy.

1. Mở đầu

Cordyceps militaris (L.) Link là một loài của chi *Cordyceps* trong ngành nấm túi (Ascomycota). Hai loài thuộc chi nấm này, *C. sinensis, C. militaris*, được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền ở các nước châu Á, đặc biệt nấm *C. sinensis* được coi là "thần dược" trong việc bồi bổ sức khỏe. Tuy nhiên, trong khi nguồn tự nhiên của nấm *C. sinensis* gần như đã cạn kiệt, song nuôi trồng nhân tạo nấm này quá khó khăn, trong khi đó, *C. militaris* được biết có thành phần hoạt chất tương tự *C. sinensis*, [1, 2] lại dễ nuôi trồng nhân tạo hơn rất nhiều so với *C. sinensis*, vì vậy *C. militaris* ngày càng được nuôi trồng phổ biến [2]. Quả thể nấm *C. militaris* chứa nhiều loại hoạt chất (cordycepin, adenosine, polysaccharides, ergosterol và các chất tương tự ergosterol, mannitol, và peptides) đã được coi là đối tượng cho cuộc cách mạng dược phẩm xanh, an toàn và thân thiện với môi trường [3]. Cordycepin (3-deoxyadenosine) là một trong những hoạt chất chính có trong *C. militaris* có nhiều tính chất dược học như điều hòa miễn dịch [4-6], kháng virus [7], giảm mỡ máu [5], kháng nấm [8], kháng tế bào ung thư máu,

Ngày nhận bài: 8/9/2021. Ngày sửa bài: 19/10/2021. Ngày nhận đăng: 26/10/2021.
Tác giả liên hệ: Lê Thị Tươi. Địa chỉ e-mail: tuoilt@hnue.edu.vn

ung thư da [9, 10]. Có lẽ vì thế, nấm Đông trùng hạ thảo *C. mitaris* (ĐTHT) và các sản phẩm hóa dược, thực phẩm chức năng có sử dụng nấm ĐTHT rất được người dùng ưa chuộng sử dụng.

Tuy vậy, trong khi nấm ĐTHT và các sản phẩm từ ĐTHT được bán tràn lan trên thị trường nhưng công tác quản lý chất lượng còn bất cập đã ảnh hưởng không nhỏ đến hiệu quả sử dụng của người tiêu dùng. Phân tích của chúng tôi về hàm lượng cordycepin và adenosin của một số sản phẩm nấm ĐTHT không rõ nguồn gốc xuất xứ nhưng có mẫu mã quả thể nấm đẹp, đóng gói bắt mắt, giá bán lại rẻ cho thấy hàm lượng các hoạt chất này rất thấp (số liệu chưa được công bố). Do đó, đảm bảo phát triển cân đối giữa năng suất, hình thái quả thể và hàm lượng hoạt chất của nấm thành phẩm là rất quan trọng để vừa đảm bảo nâng cao sức khỏe cho người dùng vừa mang lại lợi nhuận cho nhà sản xuất nấm và chế biến sản phẩm từ nấm ĐTHT.

Nhiều nghiên cứu cho thấy thành phần môi trường nuôi cấy *C. militaris* có ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ sợi nấm. Lee và cs (2013) đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon, nguồn nitơ hữu cơ, vô cơ đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris* chủng 'Yedang 3' [11]. Dang và cs (2015) nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng đến sự phát triển hệ sợi nấm và khả năng chống oxi hoá của *C. militaris* [12]. Gần đây, điều kiện lên men *C. militaris* tối ưu cho việc tăng khả năng sinh exo-polysacharide đã được Wang và cs báo cáo (2019) [13]. Raethong và cs (2020) dựa trên phân tích hệ gen và dữ liệu trao đổi chất sử dụng phần mềm POPCORN để tối ưu điều kiện lên men cho sự sinh trưởng hệ sợi nấm và khả năng sinh cordycepin của nấm *C. militaris* [14]. Đáng chú ý, kết quả nghiên cứu của Wen và cs (2014) cho thấy có sự khác nhau ở thành phần môi trường nuôi quả thể và thành phần môi trường tạo hoạt chất [15]. Ở Viêt Nam cũng đã có các báo cáo của Trịnh Thị Xuân và cs (2016) [16], Nguyễn Thị Minh Hằng và cs (2017) [17], Đỗ Tuấn Bách và cs (2017) [18], Lê Văn Vẻ và cs (2015) [19]. Nhìn chung, các nghiên cứu thường chú trọng đánh giá ảnh hưởng của các công thức môi trường khác nhau đến năng suất, hình thái; đánh giá các yếu tố môi trường nuôi cấy đến sự lan nhanh của hệ sợi nấm, năng suất quả thể và độ đồng đều, hầu như chưa có các đánh giá về sự biến động hàm lượng các hoạt chất trong quả thể tạo ra. Báo cáo này trình bày hiệu quả bổ sung một số nguồn carbon và nitơ khác nhau vào môi trường nuôi cấy đến các chỉ tiêu về năng suất, hình thái quả thể và khả năng tích luỹ cordycepin, adenosin của nấm *C. militaris*, làm cơ sở cho các lựa chọn thành phần dinh dưỡng tối ưu trong nuôi trồng nấm *C. militaris* để có sản phẩm với hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosin cao.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

**** Vật liệu nghiên cứu***

Chủng nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* được chọn lọc và lưu giữ trong điều kiện -80^{o}C tại Bộ môn Di truyền Hoá sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

**** Phương pháp nghiên cứu***

- *Hoạt hóa chủng giống và nuôi tạo quả thể nấm C. militaris:*

Chủng *C. militaris* được hoạt hóa trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) thạch nghiêng ở nhiệt độ 24^{o}C trong điều kiện tối 7 ngày, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng 12h/12h (sáng/tối) trong 14 ngày. Bào tử vô tính từ ống giống được chuyển sang bình tam giác chứa 100 ml môi trường PDA lỏng và nuôi ở nhiệt độ 24^{o}C, 120 v/phút trong 7 ngày trước khi được cấy lên môi trường gạo-nhộng.

Môi trường nền gồm có 25 g gạo tẻ lứt, 45 ml dung dịch 0,5 g/L KH_2PO_4 và 0,5 g/L $MgSO_4$ và thành phần dinh dưỡng khác nhau thay đổi theo công thức thí nghiệm được đưa vào bình thể tích 700 mL và hấp khử trùng ở 121^{o}C trong 35 phút, để nguội xuống nhiệt độ phòng

trước khi cấy 2 mL dung dịch chủng nấm giống. Bình cấy giống sau đó được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn trong 10 ngày trước khi chuyển sang giai đoạn chiếu sáng (12h sáng/12 tối) ở 25 ^{o}C.

- Đánh giá ảnh hưởng của các nguồn nitơ và hàm lượng nitơ đến sự phát triển và khả năng tích luỹ hoạt chất của nấm C. militaris:

Các thí nghiệm bổ sung môi trường nền các nguồn nitơ khác nhau (nhộng tằm tươi, pepton, và cao nấm men) ở các nồng độ khác nhau (Bảng 1) được tiến hành để đánh giá hiệu quả của nguồn dinh dưỡng nitơ và hàm lượng của nitơ trong môi trường đến sự phát triển của chủng nấm *C. militaris*.

Bảng 1. Công thức thí nghiệm môi trường có bổ sung các nguồn nitơ khác nhau

Stt	Công thức	Nitơ tổng số (g/L)*	Nguồn nitơ bổ sung (g/L)		
			Nhộng tằm	***Pepton***	***Cao nấm men***
1	N1	10	20	0	0
2	N2	15	30	0	0
3	N3	20	40	0	0
4	P1	11,2	20	10	0
5	P2	12,4	20	20	0
6	P3	14,8	20	40	0
7	C1	11,2	20	0	10
8	C2	12,4	20	0	20
9	C3	14,8	20	0	40

*Ghi chú: * Tổng lượng N (g/L) trong môi trường. Hàm lượng nitơ thành phần (pepton, cao nấm men, nhộng tằm) được quy đổi theo phương pháp của Dronachari và cs (2017), Kang và cs (2017) [20, 21].*

Khối lượng quả thể tươi, khô, kích thước quả thể (chiều dài, đường kính) và hàm lượng hoạt chất (cordycepin, adenosin) được xác định sau 60 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần đánh giá trên 15 bình cho mỗi công thức môi trường.

- Đánh giá hiệu quả bổ sung nguồn carbon vào môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của C. Militaris:

Môi trường cho hiệu quả sinh trưởng sinh khối và hoạt chất cao nhất được xác định trong thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nguồn nitơ và hàm lượng nitơ được dùng làm môi trường nuôi cấy để bổ sung thêm các nguồn carbon khác nhau từ glucose/sucrose (Bảng 2) để đánh giá hiệu quả đến sinh trưởng sinh khối và hoạt chất tích luỹ của nấm ĐTHT *C. militaris*.

Bảng 2. Công thức môi trường bổ sung nguồn carbon

Stt	Tên công thức môi trường	Tỉ lệ C/N	Nguồn carbon bổ sung (g/L)	
			Glucose	***Sucrose***
1	MT tối ưu*	**	0	0
2	G1	4/10	10	0
3	G2	8/10	20	0
4	G3	16/10	40	0
5	S1	4/10	0	10
6	S2	8/10	0	20
7	S3	16/10	0	40

*Ghi chú: *: Môi trường được xác định cho hiệu quả cao nhất về sinh khối và hoạt chất trong thí nghiệm bổ sung nguồn nitơ.*

***: Hàm lượng C, N được xác định theo Dronachari và cs (2017), Kang và cs (2017) [20,21].*

Sự phát triển của hệ sợi nấm được đánh giá thông qua thời gian cần thiết (ngày) để hệ sợi lan kín bề mặt giá thể và thời gian xuất hiện mầm quả thể sau nuôi cấy.

Đánh giá sinh trưởng sinh khối (khối lượng quả thể tươi, khô, kích thước quả thể (chiều dài, đường kính) và hàm lượng hoạt chất (cordycepin, adenosine) được xác định sau 60 ngày nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần đánh giá trên 15 bình cho mỗi công thức môi trường.

- Phương pháp xác định hàm lượng cordycepin và adenosine bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC):

Quả thể sau khi thu hoạch được đông khô và nghiền thành bột mịn. Mỗi mẫu thí nghiệm (5 mg) được trộn với 2 mL dung môi gồm nước: acetonitrile (9:1) (v/v), trong 1 giờ, ở 60 ^{o}C trong bể siêu âm. Mẫu được li tâm 13,000 v/p trong 10 phút, và phần dịch chiết được lọc qua màng lọc đường kính lỗ 0,22 µm (Chromdisc, Daegu, Hàn Quốc) để sử dụng cho phân tích sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC). Phân tích HPLC được thực hiện trên máy Thermo Fisher UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific) với Cột Shiseido Capcell Pak C18 AQ (250 × 4,6 mm, 5 m; Shiseido).

Chất chuẩn cordycepin, adenosine (Sigma-Aldrich) được hòa tan trong nước cất ở nồng độ khác nhau từ 0,039 đến 12,5 µg/mL và được phân tích trên máy HPLC để xác định đường chuẩn. Dung môi pha động gồm nước: acetonitril (tỉ lệ thể tích 9:1) với tốc độ dòng 0,5 ml/phút, ở bước sóng UV 260 nm [22].

Số liệu được phân tích bằng sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013 và phần mềm SPSS 20, so sánh trung bình One-way ANOVA (Turkey's test).

2.2. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của nguồn nitơ và hàm lượng nitơ bổ sung môi trường nuôi cấy đến năng suất, hình thái quả thể và hàm lượng hoạt chất cordycepin, adenosin của chủng nấm *C. militaris*

Kết quả đánh giá hiệu quả bổ sung nguồn dinh dưỡng nitơ và hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi cấy được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả Bảng 3 cho thấy, nguồn nitơ khác nhau có ảnh hưởng đến năng suất quả thể tươi. Nguồn nitơ là nhộng tằm tươi cho khối lượng quả thể cao nhất, dao động trong khoảng từ 16 - 20,4 g/bình, xu hướng tăng theo sự tăng của hàm lượng nitơ bổ sung, từ 10 g/L (N1) lên 15 và 20 g/L (N2, N3). Khi kết hợp nguồn niơ nhộng tằm và pepton/cao nấm men khối lượng tươi của quả thể/bình giảm, dao động trong khoảng 12,9 - 17,4 g/bình ở công thức thí nghiệm P1-P3, và 11,3 - 17,6 g/bình ở công thức C1-C3. Tuy nhiên, khối lượng quả thể khô/bình hầu như không bị ảnh hưởng nhiều bởi nguồn nitơ sử dụng.

Tương tự đối với chỉ tiêu số lượng và hình thái quả thể nấm cũng chịu ảnh hưởng bởi các nguồn nitơ khác nhau. Nguồn nitơ là nhộng tằm cho 143 - 178 quả thể/bình, hàm lượng N càng cao thì số lượng quả thể càng giảm. Số lượng quả thể giảm khi kết hợp nhộng tằm với pepton/cao nấm men, và cũng có xu hướng giảm dần khi tăng hàm lượng N (Bảng 3). Trong khi đó, hình thái quả thể ở các công thức kết hợp nhộng tằm và pepton lớn hơn (dài 58 mm và rộng 2,7 mm ở công thức P2) so với các công thức khác. Sử dụng nhộng tằm kết hợp cao nấm men quả thể ngắn và to hơn so với công thức chỉ sử dụng nhộng tằm. Như vậy nguồn nitơ khác nhau có ảnh hưởng đến số lượng và hình thái quả thể. Nguồn nitơ là nhộng tằm tươi là phù hợp hơn với sự phát triển quả thể nấm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ, hàm lượng N tổng số đến năng suất, hình thái và hàm lượng hoạt chất

Môi trường	Nitơ tổng số (g/L)	Khối lượng nấm/bình			Số lượng quả thể/bình	Kích thước quả thể (mm)		Hàm lượng hoạt chất (mg/g khô)	
		Tươi (g)	*Khô (g)*	*Tỉ lệ % khô/tươi*		*Chiều dài*	*Đường kính*	*Cordycepin*	*Adenosin*
N1	10	16,0±3,59^{a}	2,7±0,54^{a}	14,6±1,3^{a}	178,4±43,19^{a}	45,8±8,4^{a}	1,7±0,1^{a}	6,3±0,65^{a}	2,3±0,54^{a}
N2	15	20,4±2,40^{a}	3,1±0,65^{a}	14,8±1,89^{a}	165,8±30,33^{a,e}	57,4±6,0^{a}	1,8±0,2^{a}	3,2±0,5^{b}	1,5±0,84^{b}
N3	20	20,4±0,90^{a}	2,8±0,40^{a}	13,6±2,06^{a}	143,5±13,21^{b,e}	56,3±5,2^{a}	1,7±0,2^{a}	2,8±0,3^{b}	0,7±0,51^{c}
P1	11,2	12,9±0,60^{a}	2,9±0,60^{a}	15,8±3,7^{a}	100,8±19,70^{c}	54,9±7,2^{a}	2,5±0,3^{a}	2,5±0,5^{b}	1,6±0,35^{b}
P2	12,4	17,4±3,34^{a}	2,9±0,52^{a}	17,0±2,9^{a}	70,8±20,39^{c,d}	58,6±8,4^{a}	2,7±0,4^{b}	1,9±0,7^{c}	1,4±0,67^{b}
P3	14,8	14,4±3,86^{a,c}	2,5±0,77^{a}	16,8±1,24^{a}	66,9±20,06^{c,d}	47,8±16,7^{a}	2,1±0,6^{a}	3,1±0,3^{b}	1,1±0,3^{b}
C1	11,2	17,6±4,63^{a}	2,7±0,78^{a}	15,1±1,2^{a}	86,4±21,03^{c,d}	49,1±8,3^{a}	2,7±0,6^{b}	2,7±0,4^{b}	1,7±0,24^{b}
C2	12,4	15,6±4,20^{a}	2,5±0,74^{a}	15,7±1,6^{a}	68,9±16,90^{c}	45,1±6,1^{a}	2,0±0,3^{a}	2,8±0,6^{b}	1,9±0,11^{b}
C3	14,8	11,3±4,52^{b}	2,0±0,91^{a,b}	16,8±2,5^{a}	48,2±23,79^{d}	23,7±4,4^{b}	2,0±0,6^{a}	1,6±0,4^{c}	1,7±0,41^{b}

Chi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD.

Các chữ cái cùng cột khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức p < 0,05.

Kết quả đánh giá hàm lượng hoạt chất tích luỹ trong quả thể khô (bảng 3) nhận thấy, nấm thu được trên môi trường ở công thức N1 cho hàm lượng cordycepin và adenosin cao nhất, tương ứng lần lượt là 6,3 mg/g và 2,3 mg/g. Việc tăng hàm lượng N bằng cách tăng hàm lượng nhộng hoặc bổ sung thêm pepton/cao nấm men làm giảm hàm lượng hai hoạt chất này ở mức ý nghĩa ($p < 0,05$). Ở cùng hàm lượng N (~ 15 g/L) trong các công thức môi trường khác nhau N2, P3 và C3, khối lượng khô, hàm lượng hoạt chất tích lũy được có sai khác nhau có ý nghĩa. Như vậy, nguồn gốc nitơ có vai trò lớn hơn so với hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng khác nhau đến năng suất, hình thái và hàm lượng hoạt chất tích luỹ. Nguồn nitơ trong môi trường nuôi cấy là từ pepton (P) hoặc từ cao nấm men (C) có khối lượng tươi, số lượng quả thể tươi thu được cũng như hàm lượng cordycepin, adenosin giảm so với môi trường sử dụng nguồn nitơ từ nhộng tằm. Trên môi trường nuôi cấy nhộng tằm với hàm lượng 20 g/L (N1) cho hiệu quả sinh khối và tích luỹ hoạt chất cao nhất. Môi trường này vì thế được lựa chọn làm "môi trường tối ưu" dùng trong nghiên cứu đánh giá hiệu quả bổ sung thêm carbon lên sự phát triển hệ sợi, năng suất, hình thái quả thể và hàm lương hoạt chất tích luỹ của nấm *C. militaris* khi nuôi cấy trên môi trường nhân tạo.

Trong nghiên cứu của Đỗ Tuấn Bách, hàm lượng cordycepin tương đối cao, 4,33 mg/g chất khô, đạt được trong quả thể nấm nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng có 40 g/L glucose, 5 g/L peptone, 1,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 1,5 g/L K_2HPO_4, 1 mg/L NAA. Tuy nhiên, nghiên cứu không có báo cáo kết quả so sánh hàm lượng hoạt chất giữa các công thức thí nghiệm để đánh giá được hiệu quả bổ sung của các yếu tố dinh dưỡng đến sự tích luỹ hoạt chất cordycepin [18].

2.2.2. Đánh giá hiệu quả bổ sung nguồn carbon vào môi trường nuôi cấy đối với sinh trưởng của hệ sợi nấm, năng suất, hình thái quả thể và hàm lượng hoạt chất của chủng nấm *C. militaris*

Hiệu quả đối với sinh trưởng của hệ sợi nấm

Dựa trên kết quả đánh giá hiệu quả của nguồn nitơ và hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi cấy đến năng suất, hình thái và hàm lượng hoạt chất tích luỹ của nấm *C. militaris*, môi trường N1 được lựa chọn như một môi trường tối ưu để bổ sung thêm nguồn carbon nhằm đánh giá hiệu quả của nguồn carbon đến tốc độ phát triển hệ sợi nấm, kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Hiệu quả bổ sung nguồn carbon đến tốc độ phát triển của hệ sợi nấm

Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ C/N	Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày)	Thời gian bắt đầu xuất hiện mầm quả thể (ngày)
N1	0/10	$7,6 \pm 0,5^{a}$	$18,3 \pm 0,5^{a}$
G1	4/10	$5,3 \pm 0,5^{b}$	$16,3 \pm 0,5^{a,b}$
G2	8/10	$5,7 \pm 0,5^{b}$	$17,3 \pm 0,5^{a}$
G3	16/10	$5,3 \pm 0,5^{b}$	$15,6 \pm 0,5^{b,c}$
S1	4/10	$5,0 \pm 0,0^{b}$	$16,0 \pm 1,0^{b}$
S2	8/10	$6,3 \pm 0,5^{a,b}$	$15,7 \pm 0,5^{b}$
S3	16/10	$5,3 \pm 0,5^{b}$	$15,3 \pm 0,5^{b}$

Chi chú: Giá trị trong bảng là giá trị trung bình ± SD.

Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức p<0,05

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy, trên các môi trường có bổ sung thêm nguồn carbon, hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển nhanh hơn, thời gian để hệ sợi nấm phát triển kín bề mặt môi trường khoảng 5 - 6 ngày, so với trên môi trương không bổ sung carbon (N1), trung bình cần 7,6 ngày. Không nhận thấy có sự khác biệt ý nghĩa về tốc độ phát triển hệ sơi nấm trên môi trường sử dụng nguồn carbon từ glucose hay sucrose, cũng như giữa các môi trường có tỉ lệ C/N khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $p < 0,05$ cũng quan sát thấy ở thời gian bắt đầu xuất hiện mầm quả thể. Trên môi trường có bổ sung carbon thời gian xuất hiện mầm quả thể cũng ngắn hơn (khoảng 15 - 17 ngày), trong khi ở công thức N1 không bổ sung carbon là 18,3 ngày. Kết quả nghiên cứu tương tự cũng đã được Lee và cs (2013) công bố khi đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. sinensis* trong nuôi cấy chìm [20]. Theo các tác giả, nguồn carbon là sucrose, manitol, và fructose là phù hợp với sự phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris* chủng "Yedang 3" trên môi trường thạch [23]. Thực tế, sucrose là nguồn carbon dễ kiếm, dễ sử dụng và giá thành thấp hơn so với các nguồn khác, do đó, sử dụng sucrose như một nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy nấm ĐTHT không chỉ tiện lợi mà có thể mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn trong thực tiễn sản xuất nấm ĐTHT với số lượng lớn.

**** Hiệu quả đối với năng suất, hình thái quả thể và hàm lượng hoạt chất tích lũy***

Kết quả đánh giá hiệu quả tác động bổ sung nguồn carbon vào N1 đến khối lượng quả thể, hình thái và hàm lượng cordycepn, adenosin của chủng nấm *C. militaris* được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Hiệu quả bổ sung nguồn carbon đến năng suất, hình thái và hàm lượng hoạt chất

Môi trường	Khối lượng nấm /bình			Số lượng quả thể/bình	Kích thước quả thể (mm)		Hàm lượng hoạt chất (mg/g khô)	
	Tươi (g)	*Khô (g)*	*Tỉ lệ % khô/tươi*		*Chiều dài*	*Đường kính*	*Cordycepin*	*Adenosine*
N1	16,8±3,6^{a}	2,7±0,5^{a}	14,6±1,3^{a}	178,0±43,2^{a}	45,8±8,4^{a}	1,7±0,1^{b}	6,3±0,65^{a}	2,3±0,54^{a}
G1	18,5±2,6^{a}	2,8±0,3^{a}	15,5±2,5^{a}	185,9±20,5^{a}	52,3±8,9^{a,b}	1,8±0,3^{b}	3,9±0,4^{b}	2,3±0,33^{a}
G2	17,6±3,1^{a}	2,4±0,5^{a}	13,8±1,4^{a}	174,0±32,8^{a}	52,4±7,2^{a,b}	2,0±0,2^{b}	3,6±0,52^{b}	2,0±0,47^{a}
G3	19,6±3,3^{a}	2,9±0,7^{a}	14,7±1,3^{a}	166,4±9,7^{a}	58,6±6,7^{a,b}	2,0±0,3^{b}	3,0±0,8^{b}	1,9±0,68^{a}
S1	19,5±3,6^{a}	2,9±0,6^{a}	14,7±1,3^{a}	222,0±44,7^{b}	52,9±6,7^{a,b}	1,8±0,2^{b}	3,2±0,54^{b}	2,0 ±0,65^{a}
S2	15,1±2,7^{a,b}	2,2±0,5^{a}	14,6±1,1^{a}	166,6±39,3^{a}	42,7±4,1^{a,c}	1,8±0,4^{b}	4,4±0,91^{c}	1,5 ±0,46^{b}
S3	19,8±2,9^{a}	3,1±0,5^{b}	15,6±0,7^{a}	185,0±29,3^{a}	51,2±8,6^{a,b}	1,8±0,4^{b}	4,9±0,2^{c}	2,8±0,54^{a}

Chi chú: - Giá trị trong bảng là giá trị trung bình ±SD.

Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa ở mức p < 0,05.

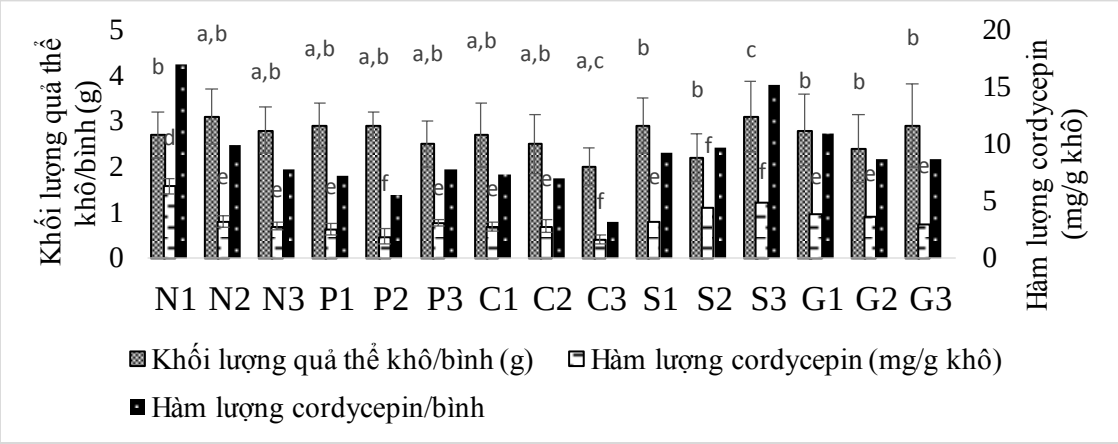
Kết quả Bảng 5 cho thấy, khối lượng nấm tươi/bình thu được trên các môi trường có bổ sung các nguồn carbon tăng cao hơn so với môi trường không bổ sung carbon, dao động từ 15,1 - 19,8 g/bình so với 16,8 g/bình ở môi trường không bổ sung carbon (N1), tuy nhiên những sai khác tăng này là không có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Kết quả tương tự cũng nhận thấy sự tăng khối lượng khô/bình, ngoại trừ đối với công thức thí nghiệm S3 là sai khác có ý nghĩa, đạt 3,1 g/bình so với đối chứng, 2,7 g/bình.

Đối với chỉ tiêu số lượng quả thể, các công thức bổ sung carbon duy trì số lượng quả thể/bình trong khoảng 166 - 222 quả thể/bình, và không sai khác nhiều với công thức đối chứng (N1) đạt 178 quả thể/bình. Chiều dài quả thể có xu hướng tăng lên trong các công thức bổ sung carbon, đặc biệt trên môi trường bổ sung carbon từ glucose (đạt 52 - 58 mm trên công thức môi trường G1-G3) so với 45,8 mm trên môi trường không bổ sung carbon (N1). Không thấy sự sai khác về chỉ tiêu đường kính quả thể trong các công thức thí nghiệm.

Hàm lượng hoạt chất cordycepin tích luỹ trong quả thể nấm ở các công thức thí nghiệm dao động trong khoảng từ 3,0 - 4,9 mg/g khô, giảm ở mức có ý nghĩa thống kê so với ở công thức thí nghiệm không bổ sung carbon (N1) đạt 6,3 mg/g nấm khô. Hàm lượng cordycepin giảm mạnh hơn ở các công thức bổ sung glucose (3,0 - 3,9 mg/g khô) so với công thức bổ sung sucrose (3,2 - 4,9 mg/g khô). Trong khi đó hàm lượng adenosin tích lũy được là tương đối ổn định giữa các công thức nghiên cứu (Bảng 5).

Như vậy có thể nhận thấy rằng, việc bổ sung thêm carbon vào môi trường nuôi *C. militaris*, có hiệu quả thúc đẩy sự sinh trưởng tạo sinh khối, quả thể dài hơn, nhưng làm giảm hàm lượng cordycepin tích luỹ. Kết quả này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Wen và cs (2014) khi nghiên cứu thành phần môi trường tối ưu cho sự phát triển quả thể và cho sự tích luỹ cordycepin. Theo Wen và cs, môi trường tốt hơn cho sự phát triển của quả thể có thành phần carbon cao hơn nitơ (40 g/L glucose, 5 g/Lpepton) và ngược lại trong môi trường tối ưu cho sự tích luỹ cordycepin (10 g/Lglucose, 10 g/Lpepton) [15]. Điều này có thể giải thích phần nào sự không tương quan giữa phát triển sinh khối và khả năng tích luỹ hoạt chất của chủng nấm *C. militaris*. Tác động tích cực của các nguồn carbon như sucrose, fructose đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. sinensis* và *C. militaris* cũng được báo cáo bởi Dong và cs (2005), Lee và cs (2013) khi nuôi cấy nấm theo hình thức lên men chìm [20, 23].

Kết quả so sánh khối lượng khô, hàm lượng cordycepin và năng suất cordycepin/bình của các công thức thí nghiệm trong nghiên cứu này được tổng hợp trong biểu đồ Hình 1. Có thể thấy rõ môi trường N1 chỉ sử dụng nguồn nitơ nhộng tằm tươi với hàm lượng 20 g/L cho năng suất cordycepin/bình cao nhất đạt 17,01 mg/bình.



Hình 1. Khối lượng quả thể khô và hàm lượng cordycepin của chủng nấm C. militaris trên các môi trường nghiên cứu

(N1,N2,.....: tên các công thức thí nghiệm; Với mỗi công thức thí nghiệm, các cột có kí hiệu chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê (p < 0,05))

3. Kết luận

Nguồn nitơ và hàm lượng nitơ trong môi trường nuôi nấm ĐTHT *C. militaris* có ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng quả thể nấm thương phẩm. Môi trường có sử dụng nguồn nitơ từ nhộng tằm tươi với hàm lượng 20 g/L (N1) là phù hợp nhất cho sự phát triển sinh khối và tích lũy hoạt chất cordycepin trong quả thể nấm.

Bổ sung thêm nguồn carbon vào môi trường nhộng tằm tươi (môi trường N1) làm tăng sự phát triển của hệ sợi nấm, tác động tích cực đến sinh khối và hình thái quả thể, nhưng làm giảm rõ rệt hàm lượng cordycepin tích lũy.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện với nguồn kinh phí từ Quỹ International Foundation for Science (IFS) với mã số I-3-D-6233-1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Li, N., J.G. Song, J.Y. Liu, and H. Zhang, 1995. Compared chemical composition between *Cordyceps militaris* and *Cordycpes sinensis*. *Journal of Jilin Agriculture University*, 17, pp. 80-83.

[2] Wang, L., W.M. Zhang, B. Hu, Y.Q. Chen, and L.H. Qu, 2008. Genetic variation of Cordyceps militaris and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data. *Fungal Diversity*, 31, pp. 147-155.

[3] Das, S.K., M. Masuda, A. Sakurai, and M. Sakakibara, 2010. Medicinal uses of the mushroom Cordyceps militaris: current state and prospects. *Fitoterapia*, 81(8), pp. 961-968.

[4] Zhou, X., C.U. Meyer, P. Schmidtke, and F. Zepp, 2002. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Pharmacol*., 453(2-3), pp. 309-317.

[5] De Silva, D.D., S. Rapior, K.D. Hyde, and H. Bahkali, 2012. Medical mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56, pp. 1-29.

[6] Noh, E.M., J.S. Kim, H. Hur, B.H. Park, E.K. Song, M.K. Han, K.B. Kwon, W.H. Yoo, I.K. Shim, S.J. Lee, H.J. Youn, and Y.R. Lee, 2009. Cordycepin inhibits IL-1beta-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*, 48(1), pp. 45-48.

[7] Hashimoto, K. and B. Simizu, 1976. Effect of cordycepin on the replication of western equine encephalitis virus. *Arch Virol*., 52(4), pp. 341-345.

[8] Sugar, A.M. and R.P. McCaffrey, 1998. Antifungal activity of 3'-deoxyadenosine (cordycepin). *Antimicrob Agents Chemother,* 42(6), pp. 1424-1427.

[9] Thomadaki, H., C.M. Tsiapalis, and A. Scorilas, 2008. The effect of the polyadenylation inhibitor cordycepin on human Molt-4 and Daudi leukaemia and lymphoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 61(4), pp. 703-711.

[10] Yoshikawa, N., S. Yamada, C. Takeuchi, S. Kagota, K. Shinozuka, M. Kunitomo, and K. Nakamura, 2008. Cordycepin (3'-deoxyadenosine) inhibits the growth of B16-BL6 mouse melanoma cells through the stimulation of adenosine A3 receptor followed by glycogen synthase kinase-3beta activation and cyclin D1 suppression. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377(4-6), pp. 591-595.

[11] Lee, B.-J.L., M-H. Kim, Y-G. Lee, K-W. Choi, Y-S. Lee, B-E. Song, H-Y., 2013. Cultural characteristics of Cordyceps militaris strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *J. Mushroom Sci. Prod*., 11(3), pp. 124-130.

[12] Dang, H.-N., C.-L. Wang, and H.-L. Lay, 2019. Effect of nutrition, vitamin, grains, and temperature on the mycelium growth and antioxidant capacity of Cordyceps militaris (strains AG-1 and PSJ-1). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences,* 11(2), pp. 130-138.

[13] Wang, C.C., J.Y. Wu, C.Y. Chang, S.T. Yu, and Y.C. Liu, 2019. Enhanced exopolysaccharide production by Cordyceps militaris using repeated batch cultivation, *J. Biosci. Bioeng*., 127(4), pp. 499-505.

[14] Raethong, N., H. Wang, J. Nielsen, and W. Vongsangnak, 2020. Optimizing cultivation of Cordyceps militaris for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media. *Comput. Struct. Biotechnol. J*., 18, pp. 1-8.

[15] Wen, T.C., G.R. Li, J.C. Kang, C. Kang, and K.D. Hyde, 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordecepin Production by Cordyceps militaris. *Chiang Mai J. Sci.*, 41(4), pp. 858-872.

[16] Xuân, T.T. and L.A. Tuấn, 2016. Nghiên cứu môi trường thích hợp cho sản xuất quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris* (Clavicipitaceae: Hypocreales). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ,* Nông nghiệp 2016.

[17] Hằng, N.T.M.T., Bùi Văn., 2017. Nghiên cứu nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên giá thể tổng hợp và nhộng tằm. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 4, pp. 10-16.

[18] Bách, Đ.T., V.H. Nam, M.T. Trang, H.V. Hướng, N.M. Cường, N.H. Thuần, and D.V. Cường, 2017. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của

nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris. Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3), pp. 445-454.

[19] Vẻ, L.V., T.T. Hà, N.T.B. Thuỳ, and N.X. Nghiễn, 2015. Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nhộng Trùng thảo (*Cordyceps militaris* L.ex Fr.) ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3), pp. 445-454.

[20] Dong, C.H. and Y.J. Yao, 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of Cordyceps sinensis in submerged culture. *J. Appl. Microbiol*., 99(3), pp. 483-492.

[21] Dronachari, M. and Shriramulu, 2017. Evaluation of Nutritional Quality Parameters of Silk Worm Breed (Multivoltine & Bivoltine Breed) in Multi-Purpose Solar Tunnel Dryer. *Int. J. Pure App. Biosci.*, 5(4), pp. 742-748.

[22] Kang, N., H.H. Lee, I. Park, and Y.S. Seo, 2017. Development of High Cordycepin-Producing Cordyceps militaris Strains. *Mycobiology*, 45(1), pp. 31-38.

[23] Lee, B.-J., M.-H. Lee, Y.-G. Kim, K.-W. Lee, Y.-S. Choi, B.-E. Lee, and H.-Y. Song, 2013. Cultural characteristics of Cordyceps militaris strain 'Yedang 3' on various media and nutritional conditions. *J. Mushroom Sci. Prod.*, 11(3), pp. 124-130.

ABSTRACT

Effect of coordination nutritional ingredients on the development and cordycepin, adenosin production of *Cordyceps militaris*

Le Thi Tuoi, Le Thi Hue, Cao Tuan Kiet, Nguyen Duc Hieu, Do Thi Hong, Le Thi Tuyet Mai, Vu Thi Bich Huyen

Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

Cordyceps militaris is an insect parasitic fungus with high medicinal value similar to *Cordyceps sinensis* and has great economic value. Ensuring the balance between the biomass and the bioactive potential of *C. militaris* plays an important role in the development of quality products from this medicinal fungus. In this study, nitrogen sources (fresh silkworm pupae, peptone, yeast extract) with different concentrations were used to evaluate the effect on yield, morphology and content of cordycepin, adenosine of *C. militaris*. The results showed that the N1 medium using 20 g/L fresh silkworm pupae, 0.5g/L KH_2PO_4 and 0.5g/L $MgSO_4$ gave the highest yield and active ingredient content, with cordycepin yield of 17.01 mg/jar. Adding carbon sources (glucose and sucrose) at concentrations (10, 20, 40 g/L) to N1 medium can shorten the time of filamentous spreading and the time of fruit body formation, but significantly reduce cordycepin content. This result has important implications for medium optimization for *C. militaris* culturing.

Keywords: *Cordyceps militaris*, Dong trung ha thao, fresh silkworm pupae, culture medium.