

EFFECTS OF MICRONUTRIENTS (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, B) SUPPLEMENTED MEDIA ON YIELD, MORPHOLOGY AND BIOACTIVE INGREDIENT CONTENT OF *Cordyceps militaris*

Nguyen Duc Hieu¹, Nguyen Truong Khoa², Nguyen Thi Tra My¹, Nguyen Thi Minh Anh¹,
Le Thi Linh¹, Tran Thi Phuong Thuy¹, Ha Huy Cong¹, Le Thi Tuoi^{1*}

¹Hanoi National University of Education, ²Agricultural Genetics Institute

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 22/10/2024	<i>Cordyceps militaris</i> is an entomopathogenic fungus that contains many active ingredients beneficial to health and is commonly cultivated artificially to meet human consumption needs. Nutritional factors can affect the yield and quality of <i>C. militaris</i> . In this study, rice-pupa medium formulations supplemented with micronutrients ((iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), molybdenum (Mo), cobalt (Co), and boron (B)) on the yield, morphology, and cordycepin and adenosine content of two fungal strains (K7 and BioG) were evaluated. The basic rice-pupa medium (control) was supplemented with each nutrient component (formulas from C2 to C5), including trace elements 2 mL.L ⁻¹ , peptone 5 g.L ⁻¹ , potato-bean sprout broth 100 g.L ⁻¹ each, and sucrose 40 g.L ⁻¹ . The results showed that each added nutrient had a positive effect on dry biomass in both studied strains with the highest results reaching 5.76 g.jar ⁻¹ (K7) and 6.00 g.jar ⁻¹ (BioG); dry/fresh weight ratios reached 17.4% and 16.6% respectively in the C5 formula, which was designed with the full addition of the studied nutritional factors. C4, C5 increased fruiting body length and diameter of BioG and K7 strains, respectively. The cordycepin and adenosine contents of strain K7 increased significantly when micronutrients were added (formula C2), with respective contents reaching 1.84 µg.mL ⁻¹ and 0.55 µg.mL ⁻¹ . These findings suggested that the supplementation of micronutrients to the culture medium may be a suitable approach in improving the morphology, productivity and bioactive ingredient content of <i>C. militaris</i> .
Revised: 06/02/2025	
Published: 07/02/2025	
KEYWORDS	
Adenosine	
Cordycepin	
<i>Cordyceps militaris</i>	
Medium	
Trace element	

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG BỔ SUNG VI LƯỢNG (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co, B) ĐẾN NĂNG SUẤT, HÌNH THÁI VÀ HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT CỦA CHỦNG NẤM *Cordyceps militaris*

Nguyễn Đức Hiếu¹, Nguyễn Trường Khoa², Nguyễn Thị Trà My¹, Nguyễn Thị Minh Anh¹, Lê Thị Linh¹,
Trần Thị Phương Thuy¹, Hà Huy Công¹, Lê Thị Tươi^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, ²Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 22/10/2024	Nấm <i>Cordyceps militaris</i> là loại nấm kí sinh côn trùng, chứa nhiều hoạt chất có lợi cho sức khỏe, được nuôi trồng nhân tạo phổ biến nhằm đáp ứng nhu cầu tiêu dùng của con người. Yếu tố dinh dưỡng có thể ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng của nấm <i>C. militaris</i> . Trong nghiên cứu này, công thức môi trường gạo-nhộng có bổ sung vi lượng ((iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), manganese (Mn), molybdenum (Mo), cobalt (Co), và boron (B)) đến năng suất, hình thái và hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosin của hai chủng nấm (K7 và BioG) đã được đánh giá. Công thức môi trường gạo-nhộng cơ bản (đối chứng) được bổ sung lần lượt từng thành phần dinh dưỡng (công thức từ C2 đến C5) gồm vi lượng 2 mL/L, peptone 5 g/L, nước luộc khoai tây-già đồ 100 g/L mỗi loại, sucrose 40 g/L. Kết quả cho thấy từng thành phần dinh dưỡng bổ sung đều có ảnh hưởng tích cực đến việc tích lũy sinh khối khô ở cả hai chủng nấm nghiên cứu với kết quả cao nhất đạt 5,76 g/bình (K7) và 6,00 g/bình (BioG), tỉ lệ khối lượng khô/tươi tương ứng đạt 17,4% và 16,6% ở công thức C5-công thức được thiết kế với việc bổ sung đầy đủ các yếu tố dinh dưỡng nghiên cứu. Công thức C4 và C5 làm tăng chiều dài và đường kính quả thể của chủng BioG và K7 tương ứng. Hàm lượng cordycepin và adenosine của chủng K7 tăng khi bổ sung yếu tố vi lượng vào môi trường cơ bản, với hàm lượng tương ứng đạt 1,84 µg/mL và 0,55 µg/mL (công thức C2). Những kết quả nghiên cứu này cho thấy việc bổ sung vi lượng vào môi trường nuôi cấy có thể là cách tiếp cận phù hợp trong việc cải thiện hình thái, năng suất và hàm lượng hoạt chất của chủng nấm <i>C. militaris</i> .
Ngày hoàn thiện: 06/02/2025	
Ngày đăng: 07/02/2025	
TỪ KHÓA	
Adenosine	
Cordycepin	
<i>Cordyceps militaris</i>	
Môi trường	
Yếu tố vi lượng	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11373>

* Corresponding author. Email: tuoilt@hnue.edu.vn

1. Giới thiệu

Ngày nay, nhu cầu sử dụng các sản phẩm dược liệu có nguồn gốc thiên nhiên như nấm linh chi, sâm ngọc linh, đông trùng hạ thảo, v.v. đang ngày càng tăng cao, do các sản phẩm dược liệu chiết xuất từ thiên nhiên thân thiện với người sử dụng và ít tác dụng phụ. Đặc biệt những năm trở đây, nhu cầu sử dụng nấm đông trùng hạ thảo tự nhiên *Cordyceps sinensis* tăng cao, khiến loài này nguy cơ tận diệt ngoài tự nhiên. *C. sinensis* không có khả năng nuôi trồng thành quả thể trong phòng thí nghiệm mà chỉ có thể tìm thấy ở môi trường tự nhiên. Nhiều nghiên cứu đã công bố nấm *C. militaris* cũng có các hoạt chất tương tự như *C. sinensis* như: cordycepin, adenosine, v.v. và có khả năng nuôi trồng để thu hoạch quả thể trong điều kiện nhân tạo [1]. Cordycepin là một chất có nhiều hoạt tính sinh học như kháng tế bào ung thư [2], chống lão hoá, hỗ trợ điều trị tiểu đường, hỗ trợ giảm cân, tăng cường sức khoẻ, tăng hoạt lực của tinh trùng [3]. Adenosine là một nucleotide nội sinh điều chỉnh nhiều chức năng sinh lý liên quan tới hệ thống tim mạch [4]. Đặc tính bảo vệ tim mạch của adenosine liên quan đến khả năng cân bằng cholesterol, tác động đến sự tập kết tiểu cầu và ức chế phản ứng viêm, ức chế quá trình viêm xương khớp [5]. Với các hoạt chất sinh học tương tự *C. sinensis* và dễ dàng nuôi trồng quả thể trong điều kiện nhân tạo nên hiện nay nấm *C. militaris* được nuôi trồng phổ biến, phục vụ nhu cầu ngày càng cao của con người.

Đến nay, nhiều nghiên cứu trong nước đã tiến hành đánh giá môi trường thích hợp để nhân nuôi quả thể nấm *C. militaris* bằng các nguồn dinh dưỡng khác nhau như nuôi trồng trên môi trường có giá thể là gạo-nhộng [6], [7], nghiên cứu nuôi quả thể trên các đối tượng vật chủ là nhộng của sâu chít, bướm tằm, đuông dừa [8]. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu phát triển môi trường cũng như ảnh hưởng của các điều kiện ánh sáng và nhiệt độ tới phát triển nấm *C. militaris*. Các nghiên cứu cũng đã chứng minh được rằng *C. militaris* dễ dàng sinh trưởng trong phòng thí nghiệm với nhiều nguồn dinh dưỡng (nitrogen, carbon) khác nhau. Trong số các loại giá thể được sử dụng trong nuôi trồng quả thể đã được nghiên cứu, giá thể gạo lứt là giá thể phù hợp nhất với sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris* [9]. Quả thể *C. militaris* được kích thích hình thành khi thay đổi yếu tố chiếu sáng [10]. Nghiên cứu của Dong [11] đã đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố dinh dưỡng trong đó có các nguyên tố đa lượng (Ca, K, Mg, và Na) và vi lượng (Cu, Fe, Mn, Zn) đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. sinensis* trong điều kiện lên men chìm.

Các nguyên tố vi lượng là yếu tố cần thiết trong quá trình sinh trưởng của nấm, tham gia vào các phản ứng hoá sinh, trao đổi chất của tế bào. Nhiều loài nấm cần đến Fe, Zn, Mn cho quá trình sinh trưởng phát triển [12]. Sự thiếu hụt Mn ảnh hưởng trực tiếp đến sự hình thành và phát triển của hệ sợi nấm [13]. Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào đánh giá ảnh hưởng của các công thức môi trường gạo-nhộng khác nhau có bổ sung vi lượng đến năng suất của nấm *C. militaris*. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm đánh giá một số công thức môi trường gạo-nhộng có bổ sung vi lượng đến các chỉ tiêu năng suất và hình thái quả thể và hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosine của nấm *C. militaris*, từ đó định hướng tối ưu điều kiện nuôi trồng loại nấm này.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Chủng nấm BioG và K7 được thu thập từ cơ sở nuôi trồng nấm tại Lạng Sơn và Hà Nội, được lưu giữ và bảo quản tại Bộ môn Di truyền – Hoá Sinh, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập chủng nấm *C. militaris* và cấy giống

Quả thể nấm tươi *C. militaris* thu từ cơ sở nuôi trồng được rửa 3 - 5 lần bằng nước cất tiệt trùng. Quả thể được cắt lát và nuôi trên ống thạch nghiêng chứa môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) có bổ sung vi lượng gồm có: 400 mL/L nước luộc khoai tây (200 g/L), 20 g/L glucose, 15 g/L agar,

2 mL/L dung dịch vi lượng. Dung dịch vi lượng (1 lit) gồm có: EDTA disodium salt 50 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22 g, H_3BO_3 11,4 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5,06 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,61 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,57 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,99 g [14]. Các ống thạch nghiêng sau khi đặt các lát cắt được để tối 10 ngày ở nhiệt độ 22-25°C, sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng ngày/đêm (12/12) ở cùng nhiệt độ trong vòng 2 tuần. Theo dõi để loại bỏ các ống giống nhiễm.

Hệ sợi *C. militaris* sau khi sinh bào tử được dùng làm giống nhân nuôi trong môi trường PDB (Potato Dextrose Broth) có bổ sung 2 mL/L dung dịch vi lượng, nuôi lắc 120 vòng/phút trong tối ở 25°C trong 5 ngày. Dung dịch giống sau đó được dùng để cấy trên môi trường thí nghiệm [9].

Môi trường gạo-nhộng tạo quả thể được chuẩn bị với 35 gam gạo lứt tẻ, và 70 mL dung dịch dinh dưỡng theo như bố trí thí nghiệm ở Bảng 1. Môi trường được đựng trong hộp nhựa thể tích 700 mL, hấp khử trùng 121°C trong 30 phút. Sau khi để nguội ở nhiệt độ phòng, mỗi bình được cấy 2 mL dung dịch giống lỏng và để tối ở nhiệt độ 22°C trong vòng 7-10 ngày (khi hệ sợi lan kín bề mặt giá thể) trước khi chuyển sang điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thành phần các chất của dung dịch dinh dưỡng của các công thức thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần các chất của dung dịch dinh dưỡng của các công thức thí nghiệm

Thành phần	Công thức	C1 (ĐC)	C2	C3	C4	C5
Nhộng tằm (20 g/L)		+	+	+	+	+
KH_2PO_4 (1,0 g/L)		+	+	+	+	+
MgSO_4 (1,0 g/L)		+	+	+	+	+
Vi lượng (2,0 mL/L)			+	+	+	+
Peptone (5,0 g/L)				+	+	+
400 mL/L nước luộc giá đỗ (100 g/L), khoai tây (100 g/L)					+	+
Sucrose (40 g/L)						+

Dấu “+”: có bổ sung thành phần dinh dưỡng

Sau 45 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu hình thái được đánh giá qua số lượng quả thể/bình, chiều dài và đường kính quả thể. Năng suất quả thể/bình được đánh giá qua khối lượng nấm tươi/bình, khối lượng nấm khô/bình. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, 15 bình/công thức/lần lặp lại, khoảng 10-15 quả thể ngẫu nhiên mỗi bình được đo chiều dài và đường kính quả thể.

2.2.3. Phương pháp chiết xuất và xác định hàm lượng hoạt chất

Mẫu quả thể sau khi thu hoạch sẽ được làm đông khô và nghiền thành bột mịn. Mẫu (10 mg bột mịn) ngâm trong 2 mL dung môi với tỉ lệ nước: acetonitrile (9:1) (v/v) ở 60°C trong 1 giờ với máy rung siêu âm. Mẫu được ly tâm 13000 v/p trong 10 phút, và phần dịch chiết được lọc qua màng lọc đường kính lỗ 0,22 μm (Chromdisc, Daegu, Hàn Quốc).

Phân tích HPLC được thực hiện trên máy Thermo Fisher UltiMate 3000 HPLC (Thermo Scientific) với cột Extrasil AQ-C18, 5 μm x 4,6 mm x 250 mm (ChromaPure™).

Chất chuẩn cordycepin, adenosine (Sigma-Aldrich) sẽ được hòa tan trong nước cất ở nồng độ khác nhau để lập đường chuẩn. Pha động là nước: acetonitril = 90:10 (v/v) với tốc độ dòng 0,5 mL/phút, ở bước sóng UV 260 nm [15].

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm SPSS 26.0.0 qua phân tích ANOVA ở mức $p < 0,05$ dùng kiểm định Turkey hoặc Dunnett's T3.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các môi trường đến năng suất quả thể

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các môi trường khác nhau có bổ sung vi lượng (công thức C2 đến C5) đến năng suất của hai chủng nấm nghiên cứu (K7 và BioG) được trình bày ở Bảng 2.

Đối với chủng nấm K7, các công thức thí nghiệm không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về chỉ tiêu khối lượng tươi/bình với giá trị từ 32,54 g/bình (công thức C4) đến 33,37 g/bình (công thức C3) khi so sánh với công thức đối chứng C1 (33,8 g/bình). Tuy vậy, ở chỉ tiêu khối lượng khô/bình của chủng nấm K7, có sự tăng dần giá trị từ công thức C1 (4,67 g/bình) đến C5 (5,76 g/bình) tương ứng với việc bổ sung thêm từng thành phần dinh dưỡng khác nhau. Khối lượng khô của C1 (4,67 g/bình) tăng lên 4,88 g/bình (C2) khi bổ sung thêm yếu tố vi lượng vào C1. Khối lượng khô của C3 đạt 5,13 g/bình có sự tăng lên so với C2 khi bổ sung thêm peptone (5 g/l) vào C2. Tương tự như vậy với công thức C4 (5,48 g/bình) có sự tăng lên so với C3 khi bổ sung nước luộc khoai tây, giá đỗ vào C3. Công thức C5 đạt khối lượng khô 5,76 g/bình tăng lên so với C4 khi bổ sung thêm sucrose (40 g/l) vào C4. Có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) khi so sánh khối lượng khô/bình của C5 so với đối chứng (C1) (Bảng 2).

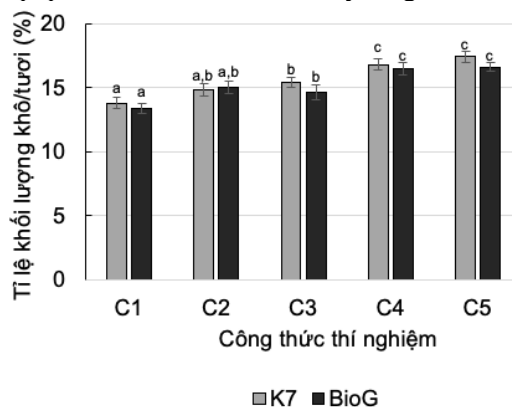
Bảng 2. Khối lượng tươi và khô chủng nấm K7 và BioG

Công thức	Khối lượng (g/bình)				
	C1	C2	C3	C4	C5
Khối lượng tươi -K7	33,80 ^a ± 3,34	33,15 ^a ± 0,70	33,37 ^a ± 4,04	32,54 ^a ± 4,11	33,05 ^a ± 2,86
Khối lượng khô- K7	4,67 ^a ± 0,46	4,88 ^{a,b} ± 0,10	5,13 ^{a,b} ± 0,62	5,48 ^{a,b} ± 0,69	5,76 ^b ± 0,5
Khối lượng tươi- BioG	33,53 ^{a,b} ± 1,9	28,60 ^a ± 4,02	37,12 ^b ± 3,12	34,25 ^{a,b} ± 5,39	36,22 ^b ± 1,05
Khối lượng khô- BioG	4,48 ^{a,b} ± 0,26	4,29 ^a ± 0,60	5,41 ^{b,c} ± 0,45	5,65 ^c ± 0,89	6,00 ^c ± 0,17

Giá trị trong bảng là giá trị trung bình ±SD.

Các chữ theo sau số trong cùng một hàng khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với phép thử Turkey (mức $p < 0,05$).

Đối với chủng nấm BioG, có thể thấy rõ sự khác nhau giữa các công thức thí nghiệm đối với cả chỉ tiêu khối lượng tươi/bình và khối lượng khô/bình (Bảng 2). Chỉ số khối lượng tươi/bình đạt 28,6 g/bình (công thức C2) đến 37,12 g/bình (công thức C3), có sự khác biệt với công thức đối chứng C1 (33,53 g/bình). Tương tự với chủng nấm K7, ở chủng nấm BioG chỉ số khối lượng khô/bình tăng dần từ C2 (4,29 g/bình) đến C5 (6,0 g/bình), tương ứng với việc bổ sung thêm từng thành phần dinh dưỡng như peptone, nước luộc khoai tây và giá đỗ, sucrose.



Hình 1. Biểu đồ tỉ lệ khối lượng khô/tươi của chủng nấm K7 và BioG

Như vậy, các công thức môi trường có bổ sung vi lượng (C2-C4) với thành phần khác nhau có tác động rõ ràng đến năng suất sinh khối khô đối với cả hai chủng nấm nghiên cứu. Sinh khối khô đạt cao nhất ở công thức C5 (5,76 g/bình chủng K7, và 6,00 g/bình chủng BioG) với việc bổ sung đầy đủ thêm yếu tố vi lượng, nguồn nitrogen (peptone 5g/l), nguồn carbon (sucrose 40 g/l) và nước luộc khoai tây, giá đỗ so với công thức đối chứng C1 ở mức có ý nghĩa ($p < 0,05$). Tương ứng với kết quả này là tỉ lệ khối lượng khô/tươi cũng tăng dần ở các công thức thí nghiệm từ C1 đến C5 đối với cả hai chủng nấm nghiên cứu (Hình 1) và thấy rõ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của công

thức C3, C4, C5 so với công thức đối chứng C1. Trong hình 1, với mỗi chủng nấm, các chữ cái khác nhau trên cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Giá trị tỉ lệ khô/tươi cao nhất đạt 17,4% (chủng K7) và 16,6% (chủng BioG) ở công thức C5.

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các môi trường đến số lượng, hình thái quả thể

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các môi trường đến số lượng và hình thái quả thể của chủng nấm K7 và BioG được thể hiện ở Bảng 3.

Khi bổ sung thêm yếu tố vi lượng vào công thức C1, kết quả cho thấy công thức C2 có sự giảm số lượng quả thể so với đối chứng (công thức C1: 113-114 quả thể/bình), cả hai chủng đạt khoảng 80 quả thể/bình ở C2. Tuy nhiên, đường kính quả thể của cả hai chủng tăng lên rõ rệt so với đối chứng, đặc biệt ở chủng BioG, đường kính quả thể đạt 5,72 mm (C2), có sai khác có ý nghĩa so với 3,97 mm ở công thức C1. Trong khi đó, chiều dài quả thể ở công thức C2 không có sự sai khác nhiều so với đối chứng, cả hai chủng nấm nghiên cứu đều đạt trung bình khoảng 40 mm chiều dài.

Khi thêm dần từng thành phần dinh dưỡng ở các công thức C3-C5, số lượng quả thể không có sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng, quan sát được trên cả hai chủng nấm nghiên cứu, số lượng dao động từ 102-121 quả thể/bình (K7) và từ 137-163 quả thể/bình (BioG). Chiều dài quả thể cao nhất quan sát được ở công thức C5 đối với chủng K7 (đạt 46,58 mm) và ở công thức C4 đối với chủng BioG (đạt 46,94 mm) đều khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chiều dài quả thể ở công thức đối chứng (C1) tương ứng với từng chủng.

Việc bổ sung vi lượng vào trong môi trường nuôi quả thể giúp tăng đường kính quả thể rõ rệt ở cả hai chủng nấm nghiên cứu (C2). Bổ sung thêm nguồn nitrogen từ peptone làm tăng hàm lượng nitrogen trong môi trường nuôi cấy có xu hướng làm tăng chiều dài quả thể ở cả K7 và BioG. Nước luộc khoai tây-giá đỗ được bổ sung ở công thức C4 làm cải thiện rõ rệt hình thái quả thể của BioG nhưng kết quả chưa rõ đối với chủng K7. Sự thay đổi hình thái của K7 được thể hiện ở công thức C5 khi được bổ sung cả nước luộc khoai tây-giá đỗ và sucrose (40g/L) so sánh với C3.

Bảng 3. Số lượng và hình thái quả thể của chủng nấm K7 và BioG

	Chủng nấm K7			Chủng nấm BioG		
	Số lượng quả thể*	Chiều dài quả thể (mm)	Đường kính quả thể (mm)	Số lượng quả thể	Chiều dài quả thể (mm)	Đường kính quả thể (mm)*
C1	113,0±12,4 ^a	37,32±9,1 ^a	4,32±1,5 ^a	114,2±23,1 ^a	42,0±6,6 ^a	3,97±1,7 ^a
C2	80,2±8,4 ^b	40,96±7,8 ^{a,b}	5,18±1,7 ^a	80,4±25,7 ^a	40,32±8,0 ^a	5,72±2,3 ^b
C3	103,8±10,84 ^a	43,98±9,8 ^{b,c}	4,98±1,7 ^a	163,6±90,3 ^a	42,6±10,1 ^{a,b}	3,69±1,7 ^{b,c}
C4	121,0±26,8 ^a	37,98±6,8 ^a	5,14±1,6 ^a	137,2±25,9 ^a	46,94±7,2 ^b	4,72±1,6 ^{b,d}
C5	102,0±13,8 ^a	46,58±8,7 ^c	5,16±1,8 ^a	137,6±49,7 ^a	41,7±7,5 ^a	4,4±1,6 ^{b,e}

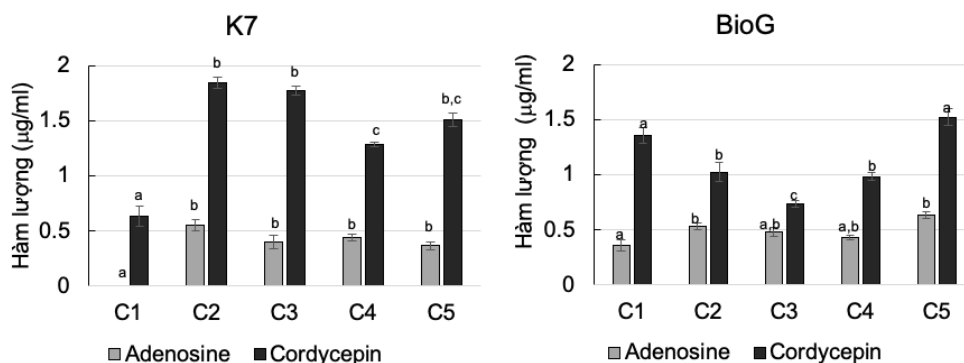
Giá trị trong bảng là giá trị trung bình $\pm$ SD.

Các chữ theo sau số trong cùng một cột khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với phép thử Turkey (mức $p < 0,05$). * Phép thống kê với phép thử Dunnett's T3.

3.3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của các môi trường đến hàm lượng hoạt chất

Ảnh hưởng của các công thức môi trường đến hàm lượng adenosine và cordycepin của chủng nấm K7 và BioG được thể hiện ở Hình 2. Kết quả cho thấy, sự bổ sung vi lượng có ảnh hưởng tích cực đối với chủng nấm K7 với sự tăng lên rõ rệt hàm lượng adenosine và cordycepin của tất cả các công thức từ C2 đến C5 so với công thức đối chứng C1. Trong đó có thể thấy rõ ở công thức C2, sự bổ sung thêm chỉ thành phần vi lượng có thể làm tăng hàm lượng adenosine và cordycepin ở chủng K7. Đối với chủng BioG, bổ sung các yếu tố vi lượng và các thành phần dinh dưỡng ở công thức C5 làm tăng hàm lượng adenosine và duy trì được hàm lượng cordycepin so với đối chứng C1. Trong khi các công trình nghiên cứu khác định lượng được từ cao chiết quả thể nấm có hàm lượng adenosine cao, khoảng 0,64-0,77 mg/g khô [8], [16] thì trong nghiên cứu này không xác định được hàm lượng adenosine trong dịch chiết ở công thức C1, nguyên nhân có thể do dịch chiết

mẫu được chuẩn bị từ 5 mg bột mẫu khô/mL dung môi và được đo trực tiếp mà không qua giai đoạn làm cao chiết nên nồng độ có thể loãng so với hàm lượng có thể khảo sát được bằng HPLC.



Hình 2. Hàm lượng adenosine và cordycepin của chủng K7 và BioG

3.4. Thảo luận

Vai trò của các nguyên tố vi lượng cũng được nghiên cứu ở một số loài nấm. Nghiên cứu của Dong [11] chỉ ra rằng các nguyên tố vi lượng như Fe, Mn, Cu, và Zn là cần thiết cho sự sinh trưởng hệ sợi của nấm *C. sinensis* với sinh khối hệ sợi cao nhất thu được ở môi trường đầy đủ các yếu tố vi lượng này. Người ta cũng quan sát thấy rằng kẽm là yếu tố không thể thiếu để sản xuất rubratoxin B bởi *Penicillium rubrum* Sopp và có thể làm tăng trọng lượng khô của sợi nấm lên gấp hai hoặc gấp ba lần [17]. Kẽm là một thành phần chức năng của nhiều loại enzyme khác nhau, từ những enzyme tham gia vào quá trình trao đổi chất trung gian đến quá trình tổng hợp DNA và RNA [18]. Vai trò của các nguyên tố như Fe, Zn, và Mn trong sự sinh trưởng của nấm mối (*Termitomyces striatus*) cũng được khẳng định trong nghiên cứu của Simerjit [13], có sự tương đồng với nhu cầu của nhiều loại nấm khác. Trong nghiên cứu đó, môi trường thiếu Mn làm tăng tốc độ phân nhánh của hệ sợi nấm, phản ánh gián tiếp sự xuất hiện các yếu tố thúc đẩy sự phân nhánh quá mức, có thể liên quan đến việc làm mềm thành sợi nấm. Nguyên tố Co cũng được khẳng định là có vai trò đối với sự sinh trưởng của loài nấm mối *T. striatus*. Các nguyên tố vi lượng có vai trò quan trọng trong các quá trình sinh hoá, trao đổi chất của tế bào, được chứng minh qua sự giảm hàm lượng đường tổng số, lượng protein hoà tan, và tăng lượng amino acid tự do trong môi trường thiếu nguyên tố vi lượng [13]. Nhìn chung, các nguyên tố Fe, Zn và Cu đóng vai trò cấu trúc trong protein và vai trò xúc tác trong các enzyme, ví dụ, metallothionein và superoxide dismutase. Một loạt các metalloprotein khác nhau yêu cầu Mn cho chức năng, bao gồm các chất oxy hóa, các DNA polymerase DNA và RNA polymerase và các protein kinase. Nguyên tố Mo là một đồng yếu tố cần thiết cho các enzyme xúc tác các phản ứng chính trong quá trình chuyển hóa carbon, lưu huỳnh và nitrogen. Nguyên tố Co đóng một vai trò quan trọng trong các chức năng sinh học dưới dạng vitamin B12 và một số metalloprotein. Tầm quan trọng của các ion kim loại trong sinh học được chứng minh bằng thực tế là 25% protein trong Ngân hàng Dữ liệu Protein (Protein Data Bank) có sự phối hợp với một ion kim loại và gần một nửa số enzyme yêu cầu một cofactor kim loại để thực hiện chức năng [19], [20].

Một số môi trường hữu cơ như nước luộc khoai tây, giá đỗ được dùng phổ biến trong các môi trường nuôi nấm, ví dụ như môi trường đường-khoai tây (PDA, PDB) thường được lựa chọn là môi trường phân lập và nuôi hệ sợi sinh dưỡng của nhiều loại nấm. Giá đỗ xanh có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy thay thế cho các loại nấm được báo cáo gần đây [21] với kết quả đánh giá hiệu quả trên nấm men và các loài nấm sợi khác khi so sánh với các môi trường có sẵn trên thị trường (Potato extract và Yeast extract). Giá đỗ xanh có ưu thế là nguồn nguyên liệu rẻ tiền, giàu protein và carbohydrate tương ứng khoảng 30 và 60% trọng lượng khô [21]. Đối với môi trường nuôi cấy nấm *C. militaris*, một số nghiên cứu sử dụng nước luộc khoai tây, nước dừa [6], [16]. Kết

qua nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, bổ sung thêm nước luộc khoai tây, giá đỗ (100 g/L mỗi loại) vào công thức C3 làm tăng sinh khối khô ở cả hai chủng nấm và cải thiện rõ ràng hình thái quả thể, đặc biệt đối với chủng BioG.

Nitrogen là nguyên tố thiết yếu để tổng hợp nucleic acid và protein. Nhiều nguồn nitrogen khác nhau được sử dụng trong nuôi trồng nấm *C. militaris* như nhộng tằm, peptone, cao nấm men, cao chiết thịt bò, v.v. trong đó nguồn nhộng tằm là nguồn nitrogen được sử dụng phổ biến và được chứng minh là thích hợp cho sự phát triển và tích lũy hàm lượng hoạt chất. Nấm *C. militaris* yêu cầu hàm lượng nitrogen tương đối thấp. Như kết quả nghiên cứu của Lê Thị Tươi và cộng sự [22] cho thấy việc bổ sung thêm peptone, hoặc cao nấm men hàm lượng cao (10-40 g/l) vào môi trường gạo-nhộng (20 g/l nhộng tằm tươi) làm giảm số lượng và biến đổi hình thái quả thể. Tuy nhiên, rất nhiều nghiên cứu vẫn sử dụng nguồn nitrogen là bột nhộng tằm và có bổ sung thêm peptone hoặc cao nấm men với tỉ lệ khoảng 1-10%, như nghiên cứu của Đỗ Tuấn Bách và cộng sự [7], Vũ Hoài Nam và cộng sự [23]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với các báo cáo trước đây rằng việc sử dụng bổ sung thêm nguồn nitrogen ngoài bột nhộng tằm có thể làm tăng sinh khối nấm *C. militaris*, như kết quả sinh khối khô của công thức C3 (bổ sung 5 g/L peptone) tăng lên ở mức có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với công thức đối chứng C1 ở cả hai chủng nấm K7 và BioG.

Nấm yêu cầu một lượng lớn carbon trong quá trình sinh trưởng và phát triển, là cơ sở để tổng hợp chất hữu cơ và các amino acid, đồng thời là nguồn năng lượng quan trọng. Những nghiên cứu cho thấy, những nguồn carbon có thể sử dụng để nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo *C. militaris* là đường mía, đường glucose, đường mạch nha, pectin, v.v. trong đó thích hợp nhất là những loại đường có cấu trúc phân tử nhỏ. Theo kết quả nghiên cứu của Dong [11] cho thấy nguồn carbon là disaccharide có ảnh hưởng tích cực hơn so với monosacchride (trừ glucose) đến sự phát triển của hệ sợi nấm *C. sinensis* trong lên men chìm, và trong số các loại đường đôi, sucrose là nguồn nguyên liệu dễ tìm, rẻ và dễ sử dụng nhất khi so sánh với các loại đường đôi khác như mannitol, maltose. Cũng tương tự với kết quả đó, nghiên cứu của nhóm tác giả Lê Thị Tươi và cộng sự [22] cũng cho thấy tác động tích cực của việc bổ sung thêm nguồn carbon có thể làm ngắn thời gian lan sợi và tạo quả thể nấm *C. militaris* trên môi trường gạo-nhộng, làm quả thể dài hơn và sucrose (40 g/L) là hiệu quả hơn so với glucose trong việc tích lũy hoạt chất cordycepin.

4. Kết luận

Các công thức môi trường bổ sung các nguyên tố vi lượng đều làm tăng năng suất sinh khối khô ở cả hai chủng nấm K7 và BioG. Công thức C5 với thành phần gồm có: 20 g/L nhộng tằm, 1 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L MgSO_4 , 2 mL/L dung dịch vi lượng, 5 g/L peptone, nước luộc khoai tây-giá đỗ (100 g/L mỗi loại) và 40 g/L sucrose là môi trường phù hợp cho việc thu sinh khối và hoạt chất của chủng nấm K7 và BioG. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng của việc bổ sung yếu tố vi lượng vào môi trường nuôi cấy trong chiến lược làm tăng hàm lượng hoạt chất hoặc cải thiện hình thái và năng suất ở nấm *C. militaris*. Việc khảo sát ảnh hưởng của các hàm lượng khác nhau đối với từng yếu tố dinh dưỡng này là cần thiết trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu hóa điều kiện dinh dưỡng cho từng chủng nấm nghiên cứu.

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện với nguồn kinh phí từ đề tài của Quỹ International Foundation for Science (IFS) mã số I-3-D-6233-1. Cảm ơn sự đóng góp của PGS. TS Nguyễn Phi Hùng, Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Wang, W. M. Zhang, and B. Hu, "Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data," *Fungal Divers*, vol. 31, pp. 147-155, 2008.

- [2] H. H. Lee, S. Lee, K. Lee, Y. S. Shin, H. Kang, and H. Cho, "Anti-cancer effect of *Cordyceps militaris* in human colorectal carcinoma RKO cells via cell cycle arrest and mitochondrial apoptosis," *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 23, no. 1, p. 35, 2015.
- [3] G. Das, H. S. Shin, G. Leyva-Gómez, M. D. L. Prado-Audelo, H. Cortes, Y. D. Singh, M. K. Panda, A. P. Mishra, M. Nigam, S. Saklani, P. K. Chatur, M. Martorell, N. Cruz-Martins, V. Sharma, N. Garg, R. Sharma, and J. K. Patra, "Cordyceps spp.: A Review on Its Immune-Stimulatory and Other Biological Potentials," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, 2021, Art. no. 602364.
- [4] A. B. Reiss, D. Grossfeld, L. J. Kasselmann, H. A. Renna, N. A. Vernice, W. Drewes, J. König, S. E. Carsons, and J. DeLeon, "Adenosine and the Cardiovascular System," *American Journal of Cardiovascular Drugs*, vol. 19, no. 5, pp. 449-464, 2019.
- [5] C. Corciulo, M. Lendhey, T. Wilder, H. Schoen, A. S. Cornelissen, G. Chang, O. D. Kennedy, and B. N. Cronstein, "Endogenous adenosine maintains cartilage homeostasis and exogenous adenosine inhibits osteoarthritis progression," *Nature Communications*, vol. 8, 2017, Art. no. 15019.
- [6] T. M. H. Nguyen and V. T. Bui, "Cultivation of *Cordyceps militaris* on artificial substrates and silkworm pupae," *Forestry science and Technology Journal*, vol. 4, pp. 10-16, 2017.
- [7] T. B. Do, H. N. Vu, T. T. Ma, V. H. Ha, M. C. Nguyen, H. T. Nguyen, and V. C. Duong, "Evaluation on cultivation techniques to fruiting body formation of *Cordyceps militaris*," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 161, no. 01, pp. 113-118, 2017.
- [8] T. T. Tran and V. V. Le, "Research on suitable medium for cultivation of *Cordyceps militaris* on hosts," *Can Tho University Science Journal*, vol. 56, no. 5B, pp. 125-134, 2020.
- [9] S. Y. Kim, B. Shrestha, G. H. Sung, S. K. Han, and J. M. Sung, "Optimum conditions for artificial fruiting body formation of *Cordyceps cardinalis*," *Mycobiology*, vol. 38, no. 2, pp. 133-136, 2010.
- [10] T. C. Wen, G. R. Li, J. C. Kang, C. Kang, and K. D. Hyde, "Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*," *Chiang Mai J Sci*, vol. 4, no. 4, pp. 858-872, 2014.
- [11] C. H. Dong and Y. J. Yao, "Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture," *J Appl Microbiol*, vol. 99, no. 3, pp. 483-492, 2005.
- [12] I. B. Prasher and G. S. Rawla, "Trace element requirements of some members of Saprolegniaceae", In Rawla (Ed) *Advances in Mycology*, Panjab University, pp. 224-236, 1988.
- [13] K. Simerjit, "Effect of carbon, nitrogen and trace elements on growth and sporulation of the *Termitomyces striatus* (Beeli) Heim," *Journal of Yeast and Fungal Research*, vol. 2, no. 9, pp. 127-131, 2011.
- [14] S. H. Hutner, L. Provasoli, A. Schatz, and C. P. Haskins, "Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms," *Proc Amer Philosophical Soc*, vol. 94, pp. 152-170, 1950.
- [15] N. Kang, H. H. Lee, I. Park, and Y. S. Seo, "Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains," *Mycobiology*, vol. 45, no. 1, pp. 31-38, 2017.
- [16] M. D. Nguyen, T. P. D. Nguyen, T. T. H. Tran, D. K. Tran, and H. T. Khuat, "Effect of the nutritional medium and environment on artificial fruiting body formation of *Cordyceps militaris*," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 20, no. 9, pp. 6-12, 2017.
- [17] A. W. Hayes, P. W. Elwanda, and A. K. Patricia, "Environmental and nutritional factors affecting the production of rubratoxin B by *Penicillium rubrum* stoll," *Appl Microbiol*, vol. 20, pp. 469-473, 1970.
- [18] M. O. Garraway and R. C. Evans, *Fungal Nutrition and Physiology*, New York: Wiley, p. 401, 1984.
- [19] K. J. Waldron, J. C. Rutherford, D. Ford, and N. J. Robinson, "Metalloproteins and metal sensing," *Nature*, vol. 460, no. 7257, pp. 823-830, 2009.
- [20] S. Wehmeier, E. Morrison, A. Plato, A. Raab, J. Feldmann, T. Bedekovic, D. Wilsom, and A. C. Brand, "Multi trace element profiling in pathogenic and non-pathogenic fungi," *Fungal Biol*, vol. 124, no. 5, pp. 516-524, 2020.
- [21] M. Ilmi, L. K. Putri, A. A. K. Muhamad, A. Cholishoh, and S. A. Ardiansyah, "Use of mung bean sprout (Tauge) as alternative fungal growth medium," *J. Phys.: Conf. Ser.*, vol. 1241, 2019, Art. no. 012015.
- [22] T. T. Le, T. H. Le, T. K. Cao, D. H. Nguyen, T. H. Do, T. T. M. Le, and T. B. H. Vu, "Effect of coordination nutritional ingredients on the development and cordycepin, adenosin production of *Cordyceps militaris*," *HNUE Journal of Science, Natural Science*, vol. 66, no. 4F, pp. 82-91, 2021.
- [23] H. N. Vu, T. T. Ma, V. P. Tran, H. T. Nguyen, and V. C. Duong, "Effect of agar plate method on the formation of *Cordyceps militaris* fruiting body," *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 62, no. 2, pp. 40-43, 2019.