

ĐẶC ĐIỂM CỦA NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*CORDYCEPS MILITARIS*) NUÔI TRỒNG TRÊN CƠ CHẤT BÃ ĐẬU NÀNH

CHARACTERISTICS OF *CORDYCEPS MILITARIS* CULTIVATED ON THE SOYBEAN RESIDUE SUBSTRATE

Nguyễn Thị Bích Hằng^{1*}, Triệu Thy Hòa², Đoàn Chí Cường¹

¹Trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng

²Trường Đại học Quảng Nam

*Tác giả liên hệ: ntbbhang@ued.udn.vn

(Nhận bài: 23/11/2022; Chấp nhận đăng: 10/01/2023)

Tóm tắt - *Cordyceps militaris* là một loại nấm dược liệu chứa nhiều hoạt chất sinh học được sử dụng làm thuốc trong hỗ trợ điều trị nhiều loại bệnh và làm thực phẩm chức năng cho con người. Nghiên cứu sự sinh trưởng và phát triển của nấm Đông trùng hạ thảo trên cơ chất là bã đậu nành cho thấy, với công thức thí nghiệm bao gồm: Gạo lứt 20 g/hộp + bã đậu nành 20 g/hộp + dịch nhộng tằm 100 g/L + 40 g/L glucose + 5 g/L peptone + 5 g/L Cao nấm men + 1 g/L KH₂O₄ + 1 g/L MgSO₄ + 0,2 g/L VTM B1 (CT4) cho số lượng mầm quả thể đạt 203,7 ± 9,6 mầm/hộp, chiều dài quả thể đạt 8,8 ± 0,8 cm, khối lượng quả thể tươi 28,5 ± 0,8 g/hộp và năng suất sinh học cao nhất đạt 24,3 ± 1,3%, lớn hơn công thức đối chứng (CT1) là 2,6%. Tuy nhiên, hàm lượng cordycepin và adenosine ở CT4 lần lượt 3,15 mg/g và 1,75 mg/g, thấp hơn so với công thức đối chứng CT1, 5,07 mg/g và 2,67 mg/g.

Từ khóa - Bã đậu nành; Đông Trùng hạ thảo; cơ chất; năng suất sinh học

1. Đặt vấn đề

Nấm *Cordyceps militaris* với tên thường được gọi là Đông trùng hạ thảo (ĐTT) từ lâu đã sử dụng rộng rãi trong thực phẩm hoặc làm dược liệu ở các nước như Trung Quốc, Nhật Bản và một số nước của Châu Á [1]. Có nhiều hoạt chất sinh học được tìm thấy trong các chủng nấm này như adenosine, cordycepin, polysaccharide, các sterol, protein, acid amin, vitamin và nhiều nguyên tố đa lượng, vi lượng thiết yếu khác cho con người [2-4] với công dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng các tế bào ung thư, tăng sản sinh testosterone và hạ đường huyết [5]. Nhu cầu sử dụng ĐTT để tăng cường hệ miễn dịch cho con người ngày càng lớn với nhiều tiềm năng về thị trường tiêu thụ. Nguồn cung nấm *C. militaris* nói chung còn khan hiếm nếu chỉ dựa vào nguồn thu hái từ tự nhiên dẫn đến giá của sản phẩm này thường rất cao. Một số nghiên cứu đã sử dụng nhộng tằm (*Bombyx mori*) để làm môi trường nhân giống và sản xuất ĐTT thương mại nhưng một số vấn đề lại phát sinh khi sử dụng sản phẩm này như sự dị ứng do thành phần kitin có trong nhộng tằm; Một số người tiêu dùng khác cho rằng, vị tanh của nhộng tằm vẫn còn trong ĐTT khi chế biến gây ảnh hưởng đến hương vị khi sử dụng; bên cạnh đó, quy trình nuôi trồng ĐTT mất thời gian khá dài ngày và chưa tiếp cận được khách hàng ăn chay hay những người có thu nhập thấp [1, 4].

Abstract - *Cordyceps militaris* is a medicinal mushroom containing biologically active substances used as medicine in the treatment of many diseases and as a functional food for humans. Study on the growth and development of *C. militaris* on the medium supplemented soybean residue showed that, with the experimental formula containing: Brown rice 20g/box + soybean residue 20g/box + silkworm pupae 100 g/L + 40 g/L glucose + 5 g/L peptone + 5 g/L yeast extract + 1 g/L KH₂O₄ + 1 g/L MgSO₄ + 0.2 g/L vitamin B1 (CT4) had the amount of fruiting bodies reached 203.7 ± 9.6 sprouts/box, the fruit body length was 8.8 ± 0.8 cm, the fresh fruit body weight was 28.5 ± 0.8 g/box and the highest biological productivity gained 24.3 ± 1.3%, 2.6% higher than the control formula (CT1). However, the contents of cordycepin and adenosine in CT4 were 3.15 mg/g and 1.75 mg/g, lower than CT1, which were 5.07 mg/g and 2.67 mg/g, respectively.

Key words - Soybean residue; *Cordyceps militaris*; substrate; biological productivity

Nhằm giải quyết những vấn đề này, một số môi trường hữu cơ đã được tuyển chọn để thay thế nhộng tằm trong quy trình nhân giống và nuôi tạo quả thể ĐTT theo hướng hữu cơ như trong nghiên cứu của Mai Hải Châu và cộng sự [5]. Do đó, việc tìm ra phương pháp cũng như môi trường nuôi trồng thích hợp để thu được hoạt tính nhiều nhất là thực sự cần thiết. Bên cạnh những môi trường truyền thống thì việc tận dụng nguồn nguyên liệu sẵn có, rẻ tiền, sử dụng tiện lợi, thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của ĐTT đang là một hướng tiếp cận mới trong nghiên cứu hiện nay. Từ thực tế đó, nhiều nhà nghiên cứu đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng phát triển nấm *C.militaris*. Trong số các loại nguyên liệu chứa hàm lượng đạm cao cần thiết cho sự tăng trưởng hệ sợi nấm thì bã đậu nành (BĐN) là nguồn nguyên liệu đầy tiềm năng dùng để nuôi trồng ĐTT. Việc bổ sung BĐN sẽ giảm lượng nhộng tằm được sử dụng vào môi trường nuôi ĐTT do BĐN cũng là nguồn cơ chất cung cấp giàu đạm cho ĐTT sinh trưởng và phát triển.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Giống nấm *C. militaris* được lấy tại phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học nấm, khoa Sinh - Môi trường, trường Đại học Sư phạm - Đại học Đà Nẵng. Giống nấm này được lưu giữ và bảo quản ở 4°C trên môi trường PDA (200 g/L

¹ The University of Danang - University of Science and Education (Nguyen Thi Bich Hang, Doan Chi Cuong)

² Quangnam University (Trieu Thy Hoa)

khoai tây, 10 g/L glucose, 16 g/L agar).

Đường glucose, cao nấm men (CNM), peptone, K_2HPO_4 , $MgSO_4$, KH_2PO_4 , Vitamin B1 (VTM B1), khoai tây, nhộng tằm, gạo lứt đỏ, agar, BDN.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nhân giống *C. militaris* trên môi trường rắn

Nuôi trồng nấm trên môi trường PDA cải tiến gồm: Khoai tây 200 g/L, 20 g/L glucose, 2 g/L peptone, 2 g/L CNM, 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $MgSO_4$, agar 16 g/L. Ủ ở 22°C trong tối hoàn toàn. Giống cấp 1 sau khi cây xong được định kỳ kiểm tra thường xuyên 2 – 3 ngày/lần, loại bỏ các ống giống bị nhiễm khuẩn, nhiễm mốc, chùn sợi hoặc những ống phát triển không đồng đều so với các ống khác.

2.2.2. Nhân giống *C. militaris* trên môi trường dịch thể

Nuôi trồng nấm trên môi trường dịch thể gồm: Khoai tây 200 g/L, 20 g/L glucose, 2 g/L peptone, 2 g/L CNM, 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $MgSO_4$, nuôi cấy lắc trong điều kiện tối với tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ 22°C. Giống dịch thể sau khi cấy được kiểm tra hàng ngày. Loại bỏ các bình bị nhiễm khuẩn, nhiễm mốc, giữ lại các bình giống có hệ sợi sinh trưởng khỏe, khuẩn lạc cầu phát triển đồng đều.

2.2.3. Khảo sát sự phát triển của *C. militaris* trên cơ chất BDN

Thí nghiệm được bố trí với 4 công thức (CT). Mỗi CT gồm 20 hộp nhựa polypropylene (cao 8,5 cm, đường kính 11,5 cm) và lặp lại 3 lần. Trộn đều các nguyên liệu trước khi đổ vào hộp nhựa polypropylene. Hấp diệt trùng trong 30 phút ở 121°C rồi làm nguội về nhiệt độ phòng. Trong quá trình cấy chuyên, chủng giống lỏng đã được trộn đều trên một máy khuấy từ sau đó chuyển 5 mL chủng giống lỏng vào hộp chứa môi trường. Các hộp nuôi được đóng kín nắp và được nuôi qua 3 giai đoạn: (1) Giai đoạn ươm tơ nấm được tiến hành ở điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ 20°C, không tạo ẩm độ; (2) Giai đoạn kích mầm được tiến hành ở nhiệt độ 22°C, tạo ẩm độ 80-85%, chiếu sáng 14h/ngày với cường độ 1200 lux; và (3) Giai đoạn chăm sóc quả thể ở nhiệt độ 20-22°C, tạo ẩm độ 85-90%, chiếu sáng 12h/ngày với cường độ 1000 lux. Quả thể *C. militaris* khi thành thực được thu hoạch và phân tích một số thành phần được liệt.

2.2.4. Bố trí thí nghiệm

CT1: (đối chứng): Gạo lứt 40 g/hộp + nhộng tằm 20g/hộp + 50mL dịch dinh dưỡng (40 g/L glucose + 5 g/L peptone + 5 g/L CNM + 1 g/L KH_2PO_4 + 1 g/L $MgSO_4$ + 0,2 g/L VTM B1).

CT2: Gạo lứt 40 g/hộp + BDN 20g/hộp + 50mL dịch dinh dưỡng (40g/L glucose + 5g/L peptone + 5g/L CNM + 1g/L KH_2PO_4 + 1g/L $MgSO_4$ + 0,2g/L VTM B1).

CT3: Gạo lứt 40 g/hộp + BDN 10 g/hộp + nhộng tằm 10 g/hộp + 50 mL dịch dinh dưỡng (40 g/L glucose + 200 g/L dịch chiết khoai tây + 0,2 g/L VTM B1).

CT4: Gạo lứt 20 g/hộp + BDN 20 g/hộp + nhộng tằm 20g/hộp + 50mL dịch dinh dưỡng (40g/L glucose + 5 g/L peptone + 5 g/L CNM + 1 g/L KH_2PO_4 + 1 g/L $MgSO_4$ + 0,2 g/L VTM B1).

2.2.5. Theo dõi các chỉ tiêu sinh trưởng

Thời gian lan tơ (ngày): Khi tơ nấm bắt đầu ăn tơ đến khi phủ kín bề mặt môi trường nuôi cấy.

Thời gian xuất hiện quả thể (ngày): Được tính khi có quả thể xuất hiện ở hộp đầu tiên ở mỗi nghiệm thức.

Đếm tổng số mầm xuất hiện, đo chiều dài quả thể (LS), và cân khối lượng quả thể (FW).

Năng suất sinh học (BE) được tính như sau:

$$BE = \frac{FW}{MV} \times 100$$

Trong đó: FW: Trọng lượng quả thể tươi; MW: Trọng lượng cơ chất môi trường.

2.2.6. Định lượng cordycepin và adenosine

Công thức đối chứng và CT có năng suất sinh học tối ưu nhất được lấy để phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể tươi bằng phương pháp HPLC. Hai hoạt chất này được chiết bằng ethanol/nước (tỉ lệ 1:1), phá vỡ cấu trúc bằng sóng siêu âm 15 phút, không gia nhiệt. Sau khi lọc và được tách qua cột pha đảo C18. Dung dịch chiết có chứa chất bảo quản được xác định bằng đầu dò UV ở bước sóng 260 nm. Pha động sử dụng dung dịch đệm methanol-acetate (pH = 5,2; tỉ lệ 1:9 v/v) trên máy HPLC đầu dò UV. Việc thu thập và phân tích dữ liệu được thực hiện bằng phần mềm Empower PDA (Waters Corporation) [6-7].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến tốc độ phát triển, đặc điểm hình thái sợi nấm

Tốc độ phát triển sợi nấm là một trong những chỉ tiêu liên quan chặt chẽ đến điều kiện nuôi trồng (độ thoáng khí, độ ẩm, nhiệt độ) cũng như thành phần dinh dưỡng của cơ chất nuôi trồng. Trong các yếu tố dinh dưỡng, hàm lượng nitơ và cacbon được chú ý hơn cả. Theo Gao (2000), trong môi trường nuôi trồng ĐTT, nhu cầu hàm lượng nitơ tương đối thấp. Nếu hàm lượng nitơ quá cao sẽ làm chậm quá trình phát triển của sợi và quá trình biệt hóa hình thành quả thể [8]. Peptone và nhộng tằm là thành phần bổ sung nitơ cho nấm, ngoài ra trong nghiên cứu này BDN cũng được xem là một nguồn bổ sung nitơ cho nấm *C. militaris*.

Tốc độ phát triển, mật độ và đặc điểm hình thái của hệ sợi của nấm *C. militaris* khi được nuôi trên 4 công thức môi trường được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm sinh trưởng hệ sợi nấm trên các công thức dinh dưỡng

Công thức	Thời gian hệ sợi phát triển kín cơ chất (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi
CT1 (n=60)	10,34 ± 0,61 ^a	Hệ sợi phát triển mạnh ăn lan ra bề mặt môi trường, dày, màu trắng, bề mặt hệ sợi mịn, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
CT2 (n=60)	11,67 ± 0,57 ^b	Hệ sợi phát triển lan bề mặt môi trường đều, màu trắng, bề mặt hệ sợi dày, vàng cam nhạt khi chiếu sáng.
CT3 (n=60)	11,30 ± 0,70 ^b	Hệ sợi phát triển mạnh lan bề mặt môi trường đều, màu trắng, bề mặt hệ sợi dày, vàng nhạt khi chiếu sáng.
CT4 (n=60)	10,30 ± 0,47 ^a	Hệ sợi phát triển mạnh ăn lan ra bề mặt môi trường, dày, màu trắng ngả vàng, bề mặt hệ sợi mịn, vàng cam đậm khi chiếu sáng.

Ghi chú: các chữ cái a, b thể hiện mức độ sai khác giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

Thời gian hệ sợi ăn kín môi trường nhanh nhất là $10,3 \pm 0,47$ ngày và $10,34 \pm 0,61$ ngày ở lần lượt CT 4 và CT1. Xét về tốc độ lan và đặc điểm hình thái của hệ sợi nấm, so sánh với môi trường không bổ sung BDN (CT1), hệ sợi ở CT4 phát triển mạnh, ăn lan ra bề mặt môi trường, tơ nấm dày, màu vàng trắng bông, bề mặt hệ sợi mịn hơn so với CT1 không bổ sung BDN.

Yếu tố giúp hệ sợi phát triển lan ra bề mặt nhanh là sự thông thoáng của cơ chất. Ngoài ra, thành phần dinh dưỡng ở các môi trường đều cung cấp đủ các dưỡng chất với tỷ lệ khác nhau cũng ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng hệ sợi. Có thể ở CT4 bổ sung BDN và giảm lượng nhộng tằm giúp cân bằng hàm lượng đạm trong cơ chất, ngoài ra BDN còn chứa nhiều chất xơ, khoáng, vitamin giúp sợi nấm hấp thụ tốt hơn.

Bên cạnh đó, ở CT2 bổ sung BDN và khoáng, không sử dụng nhộng tằm thì hệ sợi vẫn phát triển tốt tương tự như CT3 có sử dụng BDN với nhộng cùng với dịch chiết khoai tây. Điều này cho thấy, tiềm năng sử dụng BDN để thay thế nguồn nhộng và giảm lượng gạo lứt trong môi trường trồng nấm *C. militaris*. Nghiên cứu Nguyễn Thị Minh Hằng và cộng sự về ảnh hưởng môi trường tổng hợp đến sự phát triển quả thể nấm gồm gạo lứt, dịch khoáng, dịch nhộng xay cho thấy thời gian để hệ sợi nấm kín môi trường khoảng ngày và xuất hiện quả thể từ 10-19 ngày [9]. Trong nghiên cứu của Sofi, đường kính khuẩn lạc của sợi nấm *C. militaris* trong các loại ngũ cốc khác nhau bị ảnh hưởng đáng kể bởi chất nền [10]. Các tác giả cũng chỉ ra rằng, diện tích bề mặt lớn hơn và bào tử của chất nền là nguyên nhân dẫn đến tốc độ phát triển sợi nấm nhiều hơn.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trồng đến số lượng và đặc điểm hình thái mầm quả thể nấm *C. militaris*

Thành phần môi trường dinh dưỡng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự phát triển quả thể của nấm *C. militaris* [11].

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường đến số lượng mầm và đặc điểm hình thái quả thể sau 50 ngày

Công thức	Tổng số lượng mầm	Đặc điểm hình thái và phát triển mầm quả thể
CT1 (n=60)	$197 \pm 3,1^a$	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh.
CT2 (n=60)	$119 \pm 19,7^b$	Đỉnh nhọn, màu vàng cam nhạt, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh.
CT3 (n=60)	$152,3 \pm 11,0^c$	Đỉnh nhọn, màu vàng cam nhạt, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh.
CT4 (n=60)	$203,7 \pm 9,6^d$	Đỉnh nhọn, màu vàng cam, hướng quang mạnh, tốc độ phát triển nhanh.

Ghi chú: các chữ cái a, b, c, d thể hiện mức độ sai khác giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Số lượng mầm quả thể nấm *C. militaris* khi được nuôi trồng trên các CT môi trường dinh dưỡng khác nhau được trình bày tại Bảng 2. Số lượng mầm quả thể dao động trong khoảng từ 119 – 203 mầm, cao nhất ở CT4 và thấp nhất ở CT2. Bên cạnh đó, đặc điểm hình thái của mầm quả thể nấm ở từng CT môi trường cũng có sự phân biệt khá rõ

ràng. Ở CT4 ghi nhận thấy, số lượng mầm đạt $203,7 \pm 9,6$ và quả thể nấm có đỉnh nhọn, màu vàng cam và hướng sáng mạnh tương tự đặc điểm ghi nhận như trong CT1, tuy nhiên số lượng mầm lại đạt cao hơn 6% so với CT1. Kết quả này cho thấy, việc bổ sung BDN vào môi trường nuôi trồng nấm *C. militaris* đã làm tăng về số lượng mầm quả thể.

BDN chứa nhiều khoáng, chất xơ, đạm và một số vitamin E, K, B1, B2 có vai trò trong sinh trưởng của *C. militaris*. Do nấm ĐTT không có khả năng tự tổng hợp các vitamin, vì vậy trong quá trình nuôi trồng người ta thường bổ sung thêm một số vitamin cần thiết. Ở CT2 – là CT môi trường thay thế hoàn toàn dịch nhộng tằm bằng BDN thì số lượng mầm giảm xuống (119 mầm) và màu sắc quả thể có màu vàng nhạt. Điều đó chứng tỏ việc thay thế hoàn toàn dịch nhộng tằm bằng BDN để nuôi trồng nấm *C. militaris* có thể làm giảm số lượng và chất lượng về mặt cảm quan của ĐTT. Chính vì lý do này, BDN chỉ nên được sử dụng với vai trò là chất bổ sung để giảm bớt một phần chi phí trong nuôi trồng nấm. Theo nghiên cứu của Lê Văn Vê về công nghệ nuôi trồng nấm ĐTT trên cơ chất nền gạo lứt và nhộng tằm cho số lượng mầm quả thể giao động trong khoảng 62,83 – 90,94 mầm [12]. Nghiên cứu của Trần Thanh Thủy cho thấy, nuôi trồng ĐTT trên môi trường có bổ sung SBG (ngũ cốc đã qua sử dụng – spent brewery grain) thì số lượng mầm quả thể giao động khoảng 182,7 – 214,3 mầm [13].

3.3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trồng đến chiều dài và đặc điểm hình thái quả thể nấm *C. militaris*

Đặc điểm hình thái, chiều dài và đường kính quả thể là các chỉ tiêu quan trọng để đánh giá sự sinh trưởng của nấm *C. militaris*. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, quả thể nấm *C. militaris* được nuôi trên môi trường CT4 có chiều dài $8,8 \pm 0,8$, gần gấp đôi so với chiều dài quả thể ở các CT còn lại, đồng thời quả thể có màu vàng cam đậm hơn.

Bảng 3. Chiều dài và đặc điểm hình thái quả thể nấm

Công thức	Chiều dài	Đặc điểm hình thái
CT1 (n=60)	$4,7 \pm 0,8^a$	Đỉnh nhọn, thân cây thon, màu vàng
CT2 (n=60)	$4,3 \pm 1,0^a$	Đỉnh nhọn, thân mập, lùn, màu vàng nhạt
CT3 (n=60)	$4,7 \pm 1,0^a$	Đỉnh tròn, thân chia nhiều nhánh, màu vàng nhạt
CT4 (n=60)	$8,8 \pm 0,8^b$	Đỉnh nhọn, thân cây mập, màu vàng đậm

Ghi chú: các chữ cái a, b thể hiện mức độ sai khác giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Ở CT2 và CT3 có bổ sung BDN thay thế cho nguồn nguyên liệu nhộng tằm và khoáng thì quả thể nấm có màu vàng nhạt và dị dạng. Điều này cho thấy, đặc điểm của môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng rõ rệt đến kích thước, đặc điểm hình thái và màu sắc quả thể nấm. Việc bổ sung BDN, giảm lượng nhộng tằm và gạo lứt trong môi trường nuôi trồng nấm *C. militaris* đã đem lại những ưu thế rõ ràng, vừa tăng chất lượng nấm đồng thời giảm được chi phí sản xuất. Kết quả nghiên cứu của Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh cho thấy, môi trường SDAY1 (bao gồm 10 g peptone, 40 g dextrose, 2 g CNM, 20 g agar) và SDAY3 (bao gồm môi trường SDAY1 có bổ sung thêm 1 g KH_2PO_4 , 0,5 g $MgSO_4$) là thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của

nấm *C. militaris*, việc sử dụng gạo trắng (ST20) có chứa hàm lượng protein cao kết hợp bổ sung chitin và VTM B1, B2 cho chiều dài quả thể nấm đạt từ 5,82 cm đến 7,94 cm sau 60 ngày nuôi trồng [14]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Shrestha, hai chỉ tiêu chiều dài quả thể và năng suất sinh học khi nuôi trồng ĐTT phụ thuộc vào từng giống nấm *C. Militaris*; Trong đó, chiều dài quả thể nấm giao động từ 4,9 – 10,6 cm và năng suất sinh học đạt 13,68 – 27,25 % [15]. Nghiên cứu tương tự được thực hiện bởi Kim trên chủng nấm *Cordyceps cardinalis* cũng cho thấy, việc bổ sung nhộng tằm vào môi trường nuôi làm tăng chiều cao quả thể nấm nhưng lượng bổ sung lớn hơn làm cho quả thể ngắn hơn và giảm năng suất [16].



Hình 1. Đặc điểm hình thái, chiều dài và đường kính quả thể ở các CT môi trường sau 50 ngày

3.4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trồng đến khối lượng quả thể và năng suất sinh học nấm ĐTT

Tiến hành cân khối lượng nấm để đánh giá sự phát triển hệ sợi nấm và quả thể đến khối lượng nấm *C.militaris* khi thu hoạch cũng như sự ảnh hưởng khi dùng BDN để giảm lượng nhộng tằm trong môi trường trồng nấm *C.militaris*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trồng đến khối lượng quả thể và năng suất sinh học nấm ĐTT

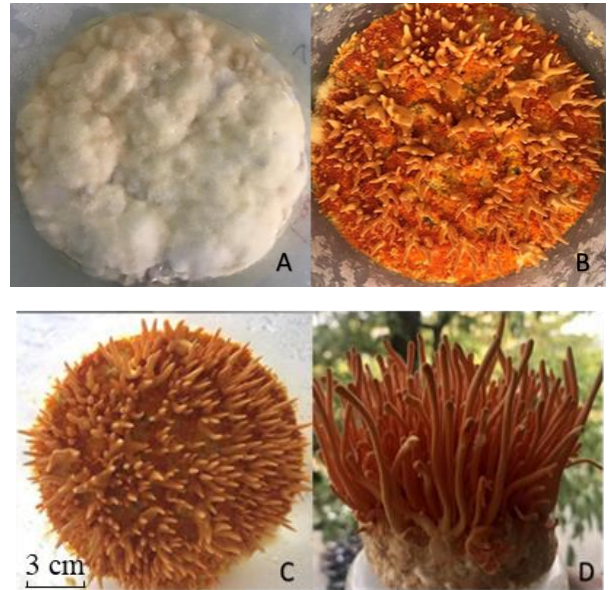
Môi trường	Khối lượng quả thể tươi (FW, g)	Năng suất sinh học (BE, %)
CT1 (n=60)	21.5 ± 1.3 ^a	21,7 ± 0,6 ^a
CT2 (n=60)	18.7 ± 0.8 ^a	18,8 ± 0,6 ^a
CT3 (n=60)	21.4 ± 0.5 ^a	21,4 ± 0,9 ^a
CT4 (n=60)	28.5 ± 0.8 ^b	24,3 ± 1,3 ^b

Ghi chú: các chữ cái a, b, c thể hiện mức độ sai khác giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khối lượng quả thể tươi nấm *C. militaris* ở CT4 tăng rõ rệt so với các CT còn lại, đạt 28,5 g. Điều này cho thấy, việc bổ sung BDN vào môi trường nuôi trồng có thể mang lại hiệu quả cao trong trồng nấm ĐTT. Khối lượng quả thể tươi ở CT2, đạt 18,7 g thấp nhất so với các CT còn lại. Kết quả này một lần nữa chỉ ra rằng, việc loại bỏ nhộng tằm ra khỏi môi trường nuôi nấm ĐTT có thể làm giảm khối lượng nấm thu hoạch được, BDN có thể thay thế một phần nguồn nguyên liệu nhộng tằm.

Năng suất sinh học nấm ĐTT cao nhất ở CT4 (24,3%), tiếp theo là CT1 (21,7%), CT3 (21,4%), và CT2 (18,8%). Kết quả nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Trần Thanh Thủy khi bổ sung SBG vào cơ chất rắn nuôi trồng nấm nhưng không làm tăng khối lượng rõ rệt so với cơ chất

không bổ sung SBG, trọng trọng lượng quả thể giao động khoảng 19,8-23,4 g [13]. Việc bổ sung BDN đã cho thấy, sự tăng lên về năng suất sinh học, bên cạnh đó vừa làm giảm lượng nhộng tằm trong môi trường trồng nấm *C.militaris* vừa rút ngắn thời gian nuôi trồng. Theo Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh khi nuôi nấm *C.militaris* trên cơ chất là gạo lứt có bổ sung khoáng thì trọng lượng quả thể tươi đạt $16,52 \pm 0,09$ g [14]. Kết quả nghiên cứu Xie về nuôi trồng *C.militaris* bằng các thành phần tự nhiên như gạo, mạch nha và đậu nành là nguồn dinh dưỡng tốt hơn cho *C. militaris* so với các môi trường hóa học khác [1].

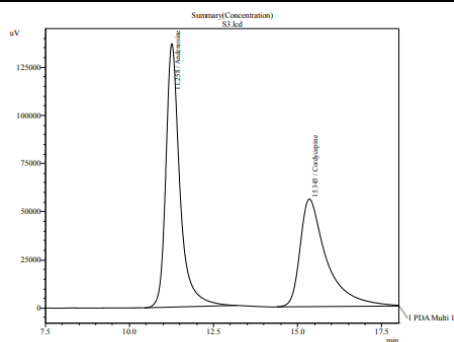


Hình 2. Sự phát triển của nấm *C.militaris* trên môi trường CT4

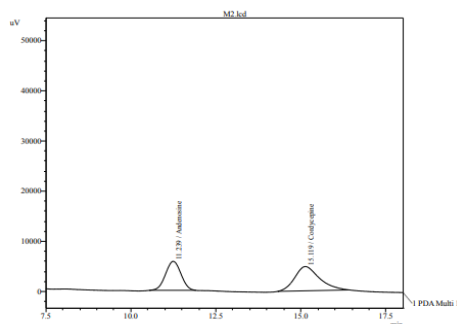
Ghi chú: A – giai đoạn hình thành pha sợi; B – giai đoạn nhũ mầu quả thể; C - giai đoạn sinh trưởng quả thể; và D – quả thể trưởng thành.

3.5. Định lượng cordycepin và adenosine

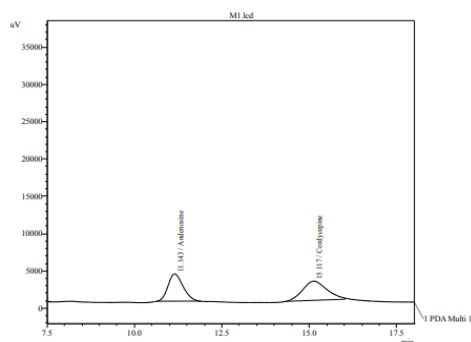
Hàm lượng cordycepin và adenosine khi phân tích quả thể nấm tươi trên CT4 là 3,15 mg/g và 1,75 mg/g; Còn ở CT1 là 5,07 mg/g và 2,67 mg/g. Có thể thấy, cả hàm lượng cordycepin và adenosine ở CT4 có bổ sung BDN đều thấp hơn so với CT1. Điều này có thể là do khi giảm lượng nhộng tằm ở CT4 đã ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất trong nấm. Việc bổ sung BDN vào môi trường để nuôi trồng *C. militaris* và giảm lượng nhộng tằm không dẫn đến kết quả làm tăng lượng cordycepin và adenosine. Nhìn chung, hàm lượng cordycepin và adenosine ở CT4 cao hơn so với các báo cáo trước đây về hàm lượng của hai hoạt chất này. Trong nghiên cứu của Đỗ Hải Lan thì hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể nấm khi nuôi trồng ở 20°C lần lượt là: 1,25 mg/g và 0,12 mg/g; ở 25°C là 4,86 mg/g và 0,79 mg/g [17]. Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh nuôi *C. militaris* trên cơ chất là gạo lứt có bổ sung dinh dưỡng khoáng thì hàm lượng cordycepin cao nhất trong quả thể tươi là 5,56 mg/g [14]. Trong nghiên cứu của Trần Thanh Thủy, hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể nấm sấy khô đạt 5,25 mg/g và 0,71 mg/g, 6,1 mg/g và 0,52 mg/g, 5,34 mg/g và 0,58 mg/g tương ứng khi nuôi nấm ĐTT ký sinh trên vật chủ trong điều kiện bán nhân tạo [11].



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn cordycepin và adenosine



Hình 4. Sắc ký đồ HPLC của cordycepin và adenosine trong mẫu CT4



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC của cordycepin và adenosine trong mẫu CT1

4. Kết luận

Thành phần môi trường tổng hợp ở CT4, có bổ sung Gạo lứt 20 g/hộp + BDN 20 g/hộp + nhộng tằm 20 g/hộp + 50mL dịch dinh dưỡng (40g/L glucose + 5 g/L peptone + 5 g/L CNM + 1 g/L KH_2PO_4 + 1 g/L MgSO_4 + 0,2 g/L VTM B1 cho thấy tiềm năng cho sự sinh trưởng của nấm *C. militaris*. Số lượng mầm quả thể nhiều, chiều dài quả thể lớn, khối lượng tươi và năng suất sinh học cao hơn công thức đối chứng 2,6%. Kết quả định lượng cordycepin và adenosine trong quả thể nấm ĐTT ở CT4 lần lượt 3,15 mg/g và 1,75 mg/g, thấp hơn so với công thức đối chứng CT1, 5,07 mg/g và 2,67 mg/g.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Hội đồng vật học Frankfurt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Xie, C., G Liu, Z. Gu, G. Fan, L. Zhang, and Y. Gu, "Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium". *Ann Microbiol*, 59, 2009, 293–299.
- Zhou L.H., Luo L.M., "Preparation and regeneration of protoplasts from *Cordyceps militaris*", *Hubei Agricultural Science*, 48, 2009, 1621–1624.
- Holliday J.C., Cleaver M., "Medicinal Value of the Caterpillar Fungi Species of the Genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A Review". *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10(3), 2008, 219–234.
- Shashidhar, M. G., Giridhar, P., Udaya Sankar, K., and Manohar, B.. Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: a potent food supplement – a review, 2013.
- Mai Hải Châu, Đặng Thị Ngọc, "Xác định môi trường nhân giống và nuôi tạo quả thể nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) theo hướng hữu cơ", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2, 2022, 3–13.
- Yang Q., Yin Y., Yu G., Jin Y., Ye X., Shrestha A., "A novel protein with anti-metastasis activity on 4T1 carcinoma from medicinal fungus *Cordyceps militaris*", *Int. J. Biol. Macromol*, 80, 2015a, 385–391.
- Lei Huang, Qizhang Li, Yiyuan Chen, Xuefei Wang and Xuanwei Zhou, "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.", *African Journal of Microbiology Research*, 3(12), 2009, 957–961.
- Gao X.H., Wu W., Qian G.C., "Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*", *Acta Agric Shanghai*, 16(Suppl), 2000, 93–98.
- Nguyễn Thị Minh Hằng, Bùi Văn Thắng, "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, 2017, 10–16.
- Sofi B., Ahmad M., Khan M., "Effect of different grains and alternate substrates on oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) production", *African Journal of Microbiology Research*, 8, 2014, 1475–1479.
- Trần Thanh Thy và Lê Văn Vàng, "Nghiên cứu môi trường thích hợp nhân nuôi nấm *Cordyceps militaris* trên vật chủ", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(5B), 2020, 125–134.
- Lê Văn Vê, Trần Thu Hà, Nguyễn Thị Bích Thùy, Ngô Xuân Nghiễn, "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), 2015, 445–454.
- Trần Thanh Thùy, "Nghiên cứu môi trường rắn làm tăng hàm lượng cordycepin và adenosine của nấm *Cordyceps militaris*", *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(2), 2019, 27–33.
- Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh, "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*, 3, 2016, 88–92.
- Shrestha B., Han S.K., Sung J.M., and Sung G.H., "Fruiting body formation of cordyceps militaris from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains", *Mycobiology*, 40(2), 2012, 100-106.
- Kim H.S., Kim J.Y., Kang J.S., Kim H.M., Kim Y.O., Hong I.P., Lee M.K., Hong J.T., Kim Y., Han S.B., "Cordlan polysaccharide isolated from mushroom *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signalings", *Food Chem. Toxicol.*, 48, 2010, 1926–1933.
- Đỗ Hải Lan, Phạm Văn Nhã, Phạm Thị Lan, Nguyễn Thị Kim Thu, Bùi Thanh Tùng, "Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự sinh trưởng, phát triển, hình thành thể quả và hoạt chất cordycepin và adenosin của nấm *Cordyceps militaris* NBRC 100741 trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo", *Tạp Chí Dược học*, 57(2), 2017, 73–78.