

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* bạch tạng (albino) phân lập tại Việt Nam

Đỗ Thị Kim Trang¹, Đào Ngọc Ánh¹, Trần Bảo Trâm¹, Trương Thị Chiên¹, Nguyễn Minh Nam², Trần Văn Tuấn³, Vũ Xuân Tạo^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ, 25 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 13/6/2023; ngày chuyển phản biện 15/6/2023; ngày nhận phản biện 6/7/2023; ngày chấp nhận đăng 10/7/2023

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là một loài nấm dược liệu quan trọng trong y học cổ truyền. Quả thể nấm *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất quý có tác dụng tăng cường sức khỏe và hỗ trợ điều trị nhiều loại bệnh. Do đó, loài nấm này được coi là nguồn dược liệu tiềm năng cho phát triển các sản phẩm chăm sóc sức khỏe. Việc tìm kiếm các chủng nấm *C. militaris* mới có năng suất, chất lượng cao và độc đáo luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm. Bài báo đưa ra những kết quả mới về một số đặc điểm sinh học của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng (albino) phân lập tại Việt Nam. Chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ được phân lập và định danh chính xác dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA. Hệ sợi chủng nấm *C. militaris* SHBTQ có màu trắng và duy trì ổn định qua 5 thế hệ liên tiếp. Nguồn carbon và nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ tương ứng là saccarose và cao nấm men. Đặc biệt, chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ có khả năng hình thành quả thể với năng suất trung bình đạt 30 g/hộp, năng suất sinh học đạt 12,2% và hàm lượng cordycepin đạt 10,45 mg/g quả thể khô. Đây là chủng nấm mới có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất.

Từ khóa: cordycepin, *Cordyceps militaris* bạch tạng, đặc điểm sinh học, năng suất, quả thể.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

Nhiều loài trong chi nấm *Cordyceps* là loại dược liệu quan trọng, được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền của nhiều nước châu Á [1, 2]. Các loài thuộc chi *Cordyceps* phân bố trải rộng từ châu Á sang châu Âu và Bắc Mỹ. Tuy nhiên, phân tích trình tự ITS rDNA các chủng *C. militaris* phân bố tại các quốc gia khác nhau cho thấy vị trí địa lý không ảnh hưởng nhiều tới khoảng cách di truyền giữa các chủng [3]. Trong chi nấm *Cordyceps*, *C. militaris* là loài nấm dược liệu nghiên cứu và nuôi trồng phổ biến nhất. Quả thể nấm *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất có hoạt tính sinh học như adenosine, cordycepin, pentostatin, polysaccharide... [4, 5]. Đây là những hoạt chất đã được chứng minh có khả năng kháng ung thư, kháng virus, hỗ trợ điều trị tiểu đường [6-8]. Do vậy, *C. militaris* được coi là loài nấm có giá trị kinh tế cao và đang được nuôi trồng với quy mô lớn tại nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Việt Nam... Việc tìm kiếm các chủng *C. militaris* mới với năng suất, hàm lượng hoạt chất cao và có những đặc điểm độc đáo được coi là chìa khóa then chốt nắm giữ thành công của các doanh nghiệp/đơn vị nuôi trồng thương mại loài nấm này.

Trong tự nhiên hay nuôi trồng, quả thể nấm *C. militaris* có màu vàng tới vàng cam do trong quả thể nấm chứa carotenoid (bao gồm lutein, zeaxanthin và 4 cordyxanthin) [9]. Tuy nhiên trong quá trình nuôi trồng nấm *C. militaris*, một số nghiên cứu

trên thế giới đã ghi nhận sự phát sinh các chủng bạch tạng với hàm lượng carotenoid rất thấp. Tuy hàm lượng carotenoid của chủng *C. militaris* bạch tạng thấp nhưng hàm lượng cordycepin, flavonoid và chất chống oxy hóa lại cao hơn nhiều so với chủng ban đầu có quả thể màu vàng cam đặc trưng [10, 11]. Các nghiên cứu phân tích transcriptome cho thấy, sự hình thành chủng *C. militaris* bạch tạng liên quan tới một số cytochrome P450 và methyltransferases [11]. Tuy nhiên, cơ chế cụ thể về việc tạo ra các chủng đột biến bạch tạng vẫn chưa được làm rõ ở nấm *C. militaris*. Nhìn chung, các công bố về chủng nấm *C. militaris* bạch tạng rất ít. Nhưng với các dữ liệu đã công bố đều cho thấy, các chủng *C. militaris* bạch tạng có xu hướng tăng cường các hoạt chất chính như cordycepin, flavonoid, tăng khả năng chống oxy hóa và đây là các chủng nấm rất tiềm năng cho nghiên cứu và khai thác ứng dụng.

Trong khi đó, tại các cơ sở nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo của Việt Nam đều đang nhân nuôi chủng nấm *C. militaris* cho quả thể màu vàng cam, chưa có nghiên cứu nào công bố về chủng nấm *C. militaris* bạch tạng phân lập tại nước ta. Nghiên cứu này xác định một số đặc điểm sinh học cũng như khả năng hình thành quả thể và hàm lượng hoạt chất cordycepin trong quả thể chủng nấm *C. militaris* bạch tạng phân lập tại Việt Nam làm căn cứ khoa học cho việc triển khai nuôi trồng và khai thác nguồn nấm *C. militaris* bạch tạng.

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

Study on some biological characteristics of the albino strain of medicinal fungus *Cordyceps militaris* isolated in Vietnam

Thi Kim Trang Do¹, Ngọc Anh Dao¹, Bao Tram Tran¹,
Thi Chien Truong¹, Minh Nam Nguyen²,
Van Tuan Tran³, Xuan Tao Vu^{1*}

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, C6, Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology, 25 Le Thanh Tong, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 13 June 2023; revised 6 July 2023; accepted 10 July 2023

Abstract:

Cordyceps militaris is one of the important medicinal fungi in traditional medicine. The fruiting body of *C. militaris* contains various bioactive compounds that have health-enhancing effects and support the treatment of various diseases. Therefore, this fungus is a potential source of medicinal materials for the development of healthcare products. The search for new strains of *C. militaris* with high yield, quality, and uniqueness is always of great interest. This study has provided new findings on some biological characteristics of an albino strain of *C. militaris* isolated in Vietnam. The albino strain of *C. militaris* SHBTQ was isolated and accurately identified based on morphological characteristics and the ITS (internal transcribed spacer) sequence of ribosomal DNA. The mycelial of *C. militaris* SHBTQ is white and remains stable for five successive generations. The most suitable carbon and nitrogen sources for the growth of the albino SHBTQ strain were sucrose and yeast extract, respectively. Notably, the SHBTQ strain is capable of forming fruiting bodies, with an average fresh fruiting body yield of 30 g/box, a biological efficiency of 12.2%, and a cordycepin content of 10.45 mg/g of dried fruiting bodies. This newly discovered strain offers great potential for further applications in production.

Keywords: albino *Cordyceps militaris*, biological characteristics, cordycepin, fruiting bodies, productivity.

Classification number: 1.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Hộp quả thể tươi chủng nấm *C. militaris* SHQ có xuất hiện mẫu quả thể nấm màu trắng (ký hiệu SHBTQ) được thu thập tại một đơn vị sản xuất nấm ở Bắc Ninh. Mẫu được bảo quản trong túi nylon sạch. Sau khi thu thập, mẫu được đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập chủng nấm bạch tạng.

2.2. Phương pháp phân lập chủng nấm bạch tạng

Mẫu quả thể SHBTQ (được tách ra từ hộp quả thể *C. militaris* SHQ) được cắt thành các lát nhỏ và đặt lên bề mặt môi trường PDA (Potatose dextrose agar) chứa kháng sinh chloramphenicol với nồng độ 100 µg/ml (có tác dụng ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn). Đã được ủ ở 22-25°C trong tối, trong 5 ngày. Hệ sợi nấm màu trắng xuất hiện từ các lát quả thể được cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới để thuần khiết [12].

2.3. Định danh chủng nấm bạch tạng dựa trên các đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA

Chủng nấm bạch tạng SHBTQ đã phân lập được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25°C sau 7 ngày để thu bào tử nấm. Quy trình thu bào tử nấm chủng SHBTQ được tiến hành theo quy trình của T.X. Vu và cs (2018) [13]. Dịch bào tử nấm được xác định nồng độ bằng buồng đếm Thoma. Đặc điểm hình thái hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử của chủng SHBTQ được xác định bằng cách nuôi cấy trực tiếp bào tử chủng nấm trên tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA trong 2-3 ngày ở 25°C và quan sát dưới kính hiển vi quang học [13].

Đồng thời, 500 µl dịch bào tử chủng SHBTQ (10⁵ bào tử/ml) được nuôi trong 50 ml môi trường PDB (lắc 150 vòng/phút ở 25°C trong tối), sau 4 ngày tiến hành thu hệ sợi nấm sử dụng cho việc tách chiết DNA. DNA tổng số được tách chiết từ hệ sợi nấm theo V.T. Tran và cs (2017) [14]. Mẫu DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [15]. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra và tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch DNA của Hãng Promega. Sản phẩm sau tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trên Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA7.

2.4. Đánh giá khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng

Tiến hành nhỏ 5 µl dịch bào tử (10⁵ bào tử/ml) của mỗi chủng nấm (chủng SHQ và chủng bạch tạng SHBTQ) vào giữa đĩa môi trường PDA (đĩa petri Φ9) và nuôi ở 25°C với các điều kiện chiếu sáng khác nhau (12 ngày tối, 10 ngày tối và 2 ngày chiếu sáng). Sau 12 ngày, tiến hành xác định đường kính sinh trưởng của chủng nấm. Sau đó tiến hành xác định mật độ bào tử nấm bằng cách bổ sung 15 ml nước cất đã khử trùng lên mỗi đĩa để thu dịch bào tử. Quá trình thu bào tử nấm được tiến hành theo quy trình của T.X. Vu và cs (2018) [13]. Nồng độ của dịch bào tử nấm được xác định bằng buồng đếm Thoma.

2.5. Đánh giá sự ổn định tính trạng màu sắc của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng

Đánh giá sự ổn định tính trạng màu sắc qua 5 thế hệ của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng SHBTQ đã phân lập được tiến hành dựa theo nghiên cứu của F. Wang và cs (2018) [11]. Bào tử mỗi chủng nấm (chủng SHQ và SHBTQ) được dùng để cấy chuyển liên tiếp trên môi trường thạch PDA để thu bào tử liên tục 5 thế hệ. Tiến hành nhỏ 5 μ l dịch bào tử (10^5 bào tử/ml) 5 thế hệ của mỗi chủng nấm vào giữa đĩa môi trường PDA và nuôi ở 25°C trong điều kiện có chiếu sáng (8 ngày trong tối - 2 ngày trong sáng). Sau 10 ngày, tiến hành quan sát hình thái màu sắc của mỗi chủng nấm qua 5 thế hệ.

2.6. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ tới sự sinh trưởng của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ tới sự sinh trưởng của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng SHBTQ được đánh giá dựa theo nghiên cứu của N.V. Giang và cs (2021) [16] có cải tiến. Nguồn carbon (saccharose - 3%) của môi trường CD (Czapek-Dox agar) được thay thế lần lượt bằng glucose, maltose, lactose, galactose và tinh bột. Tiến hành nhỏ 5 μ l dịch bào tử (10^5 bào tử/ml) của chủng SHBTQ vào giữa đĩa môi trường và nuôi ở 25°C trong điều kiện không chiếu sáng. Tiến hành xác định đường kính sinh trưởng của chủng nấm sau 3, 5 và 7 ngày. Sau khi xác định được nguồn carbon, tiến hành xác định ảnh hưởng của nguồn nitơ tới sự sinh trưởng của chủng SHBTQ. Nguồn nitơ (NaNO_3 - 0,3%) của môi trường CD được thay thế lần lượt bằng cao nấm men, pepton, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.7. Đánh giá khả năng hình thành quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng

Để đánh giá khả năng hình thành quả thể, chủng nấm *C. militaris* bạch tạng SHBTQ được nuôi trồng dựa theo quy trình của V.X. Tao và cs (2022) [17]. Sau 60 ngày nuôi trồng, tiến hành xác định các chỉ tiêu: khối lượng quả thể tươi/hộp nuôi (650 ml) và năng suất sinh học (Biological Efficiency - BE). Chỉ tiêu BE được xác định dựa theo nghiên cứu B. Shrestha và cs (2012) [18]: $\text{BE} (\%) = (\text{Khối lượng quả thể khô} / \text{Khối lượng cơ chất}) \times 100$. Khối lượng quả thể khô là khối lượng quả thể của 1 hộp nuôi sau khi sấy đông khô (độ ẩm đạt 5-7%); khối lượng cơ chất là khối lượng khô của nguyên liệu sử dụng cho 1 hộp nuôi.

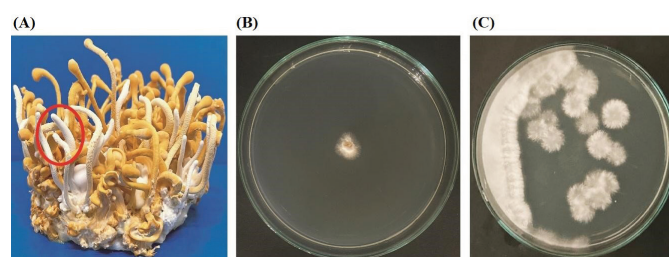
Mẫu quả thể tươi sau khi nuôi cấy 60 ngày được thu và sấy khô bằng máy sấy thăng hoa ở nhiệt độ -40°C tới khi độ ẩm đạt 5-7%. Hàm lượng cordycepin được xác định theo nghiên cứu của V.X. Tao và cs (2022) [17] trên hệ thống thống HPLC (Hãng

Shimadzu, Nhật Bản). Đồng thời, chủng nấm *C. militaris* SHQ được tiến hành nuôi trồng và phân tích cordycepin trong quả thể để so sánh với chủng bạch tạng SHBTQ.

3. Kết quả và bàn luận

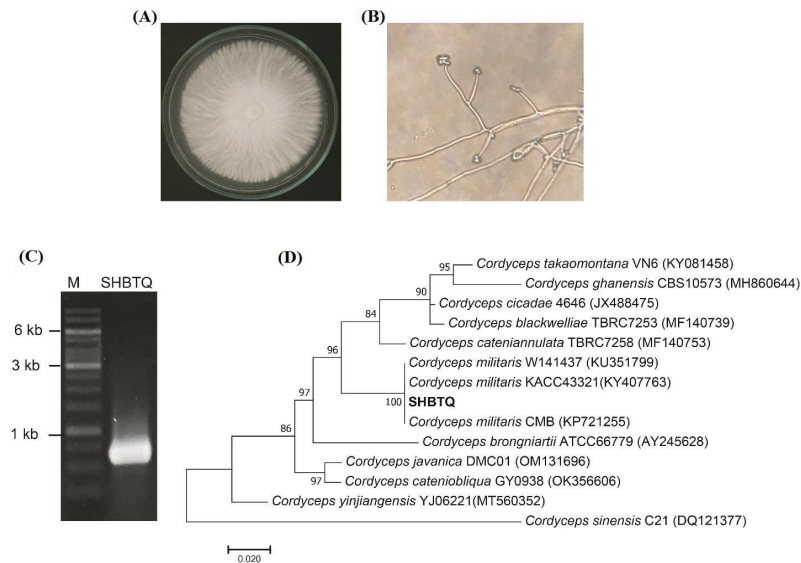
3.1. Phân lập và định danh chủng nấm *C. militaris* bạch tạng

Trong nghiên cứu này, chủng nấm bạch tạng được phân lập từ mẫu quả thể màu trắng thu được trong quá trình nuôi trồng quả thể chủng *C. militaris* SHQ (hình 1A). Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung kháng sinh chloramphenicol ở 25°C, mẫu quả thể sinh trưởng tạo hệ sợi có màu trắng (hình 1B). Hệ sợi nấm tiếp tục được cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới để thuần khiết (hình 1C).

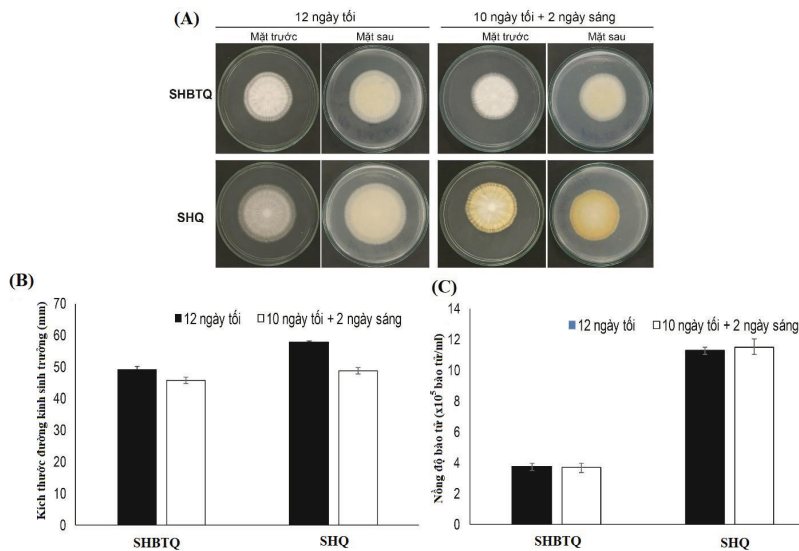


Hình 1. Phân lập chủng nấm bạch tạng từ mẫu quả thể *C. militaris* đang được nuôi trồng tại Việt Nam. (A) Mẫu quả thể nấm thu thập; (B) Phân lập chủng nấm từ mẫu quả thể màu trắng; (C) Khuẩn lạc chủng nấm trên môi trường PDA. Phân khoanh đỏ là phần quả thể màu trắng được tách ra dùng để phân lập chủng nấm bạch tạng.

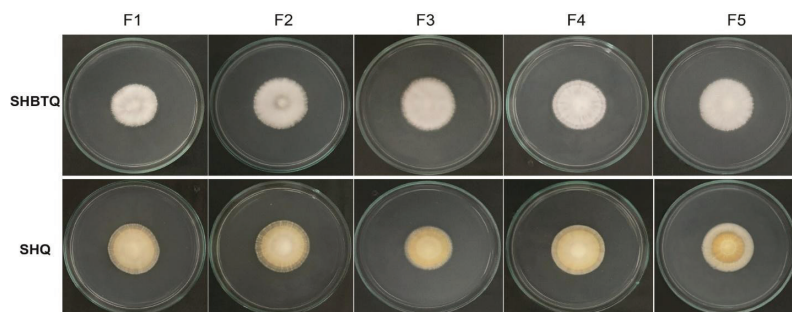
Để có thể sử dụng chủng nấm bạch tạng SHBTQ trong các nghiên cứu tiếp theo, chủng SHBTQ được định danh tới loài dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS. Chủng SHBTQ phát triển hệ sợi màu trắng trên môi trường PDA (hình 2A). Tiêu bản hệ sợi được quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, hệ sợi nấm phát triển kéo dài hình thành cuống sinh bào tử, bào tử có dạng hình trứng (hình 2B). Dựa trên hình thái mẫu quả thể thu thập, các đặc điểm về hệ sợi và cấu trúc sinh bào tử cho thấy đây là những đặc điểm hình thái điển hình của loài nấm *C. militaris* [19, 20]. Đồng thời, chủng nấm bạch tạng SHBTQ được tiến hành tách chiết DNA tổng số dùng cho PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp môi ITS1/ITS4. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di, kết quả cho thấy xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 550 bp (hình 2C). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được giải trình tự bởi Công ty 1st BASE (Singapore). Trình tự ITS của chủng SHBTQ thu được tương đồng 100% với các trình tự ITS của nấm *C. militaris* trên cơ sở dữ liệu GenBank. Trình tự ITS được sử dụng cho xây dựng cây phát sinh chủng loại với phần mềm MEGA7 xác nhận chủng SHBTQ thuộc loài *C. militaris* (hình 2D). Như vậy, đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam ghi nhận chủng nấm *C. militaris* bạch tạng xuất hiện trong quá trình nuôi trồng nấm *C. militaris*.



Hình 2. Định danh chủng nấm SHBTQ dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự vùng ITS của rDNA. (A) Hệ sợi chủng nấm SHBTQ trên môi trường PDA; (B) Cấu trúc hệ sợi và cường độ sinh bào tử; (C) Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR vùng ITS của chủng nấm SHBTQ; (D) Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA7 dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA với hệ số bootstrap 1000; M: DNA marker 1 kb.



Hình 3. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của chủng nấm SHBTQ và SHQ sau 12 ngày nuôi cấy ở các điều kiện ánh sáng. (A) Hệ sợi các chủng nấm trên môi trường PDA; (B) Kích thước đường kính sinh trưởng; (C) Khả năng hình thành bào tử.



Hình 4. Đặc điểm màu sắc hệ sợi của 2 chủng nấm SHBTQ và SHQ qua 5 thể hệ. F1-F5: thể hệ thứ 1 đến thể hệ thứ 5.

3.2. Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ

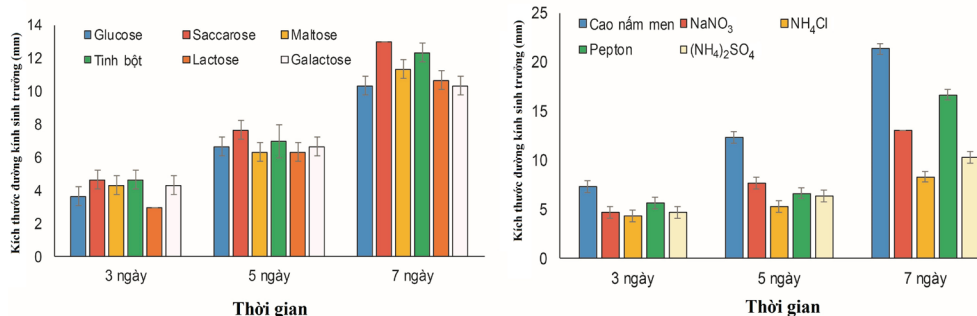
Khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ được đánh giá và so sánh với chủng nấm ban đầu *C. militaris* SHQ. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trong điều kiện nuôi tối (12 ngày) hệ sợi của cả 2 chủng SHBTQ và SHQ đều có màu trắng và sinh trưởng mạnh hơn so với điều kiện có chiếu sáng. Ở điều kiện có chiếu sáng (10 ngày trong tối - 2 ngày trong sáng), hệ sợi của chủng *C. militaris* SHBTQ vẫn giữ màu trắng trong khi đó hệ sợi của chủng SHQ chuyển sang màu vàng (hình 3A). Chủng nấm *C. militaris* bạch tạng đã được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp carotenoid rất thấp so với chủng bình thường [11], đây có thể là nguyên nhân chính dẫn tới sự khác biệt về màu sắc hệ sợi giữa 2 chủng SHBTQ và SHQ. Ở cả 2 điều kiện ánh sáng, chủng SHBTQ sinh trưởng và hình thành bào tử kém hơn chủng SHQ (hình 3). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của F. Wang và cs (2018) [11] khi tiến hành so sánh khả năng sinh trưởng và hình thành bào tử của chủng đột biến bạch tạng *C. militaris* 505 và chủng bình thường *C. militaris* 498.

3.3. Đặc điểm ổn định tính trạng màu sắc hệ sợi của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ

Sự ổn định các tính trạng (năng suất, chất lượng) là yếu tố quan trọng cần có đối với một chủng nấm dùng trong sản xuất. Trong nghiên cứu này, sự ổn định tính trạng của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ được xác định thông qua đặc điểm màu sắc hệ sợi. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hệ sợi chủng nấm SHQ ở cả 5 thế hệ đều chuyển sang màu vàng. Trong khi đó, hệ sợi chủng SHBTQ vẫn giữ được màu trắng ở cả 5 thế hệ. Hệ sợi *C. militaris* giữ được màu trắng ở điều kiện có chiếu sáng là đặc điểm đặc trưng của chủng nấm bạch tạng [11]. Như vậy, chủng nấm *C. militaris* SHBTQ bước đầu cho thấy sự ổn định về màu sắc hệ sợi (hình 4). Đặc tính ổn định màu sắc hệ sợi cũng đã được ghi nhận với chủng nấm bạch tạng *C. militaris* 505 [11]. Với đặc tính ổn định tính trạng màu sắc, các chủng nấm bạch tạng rất tiềm năng để đưa vào sản xuất.

3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ tới khả năng sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ

Nguồn carbon và nitơ đã được chứng minh là yếu tố quan trọng đối với sự sinh trưởng hệ sợi và sinh tổng hợp cordycepin ở nấm *C. militaris* [21]. Để đánh giá ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ tới khả năng sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng, chủng *C. militaris* SHBTQ được nuôi trên các nguồn carbon, nitơ khác nhau và xác định khả năng sinh trưởng dựa trên đường kính sinh trưởng của chủng nấm. Kết quả nghiên cứu



Hình 5. Khả năng sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ trên các nguồn carbon và nitơ khác nhau. (A) Các nguồn carbon; (B) Các nguồn nitơ.

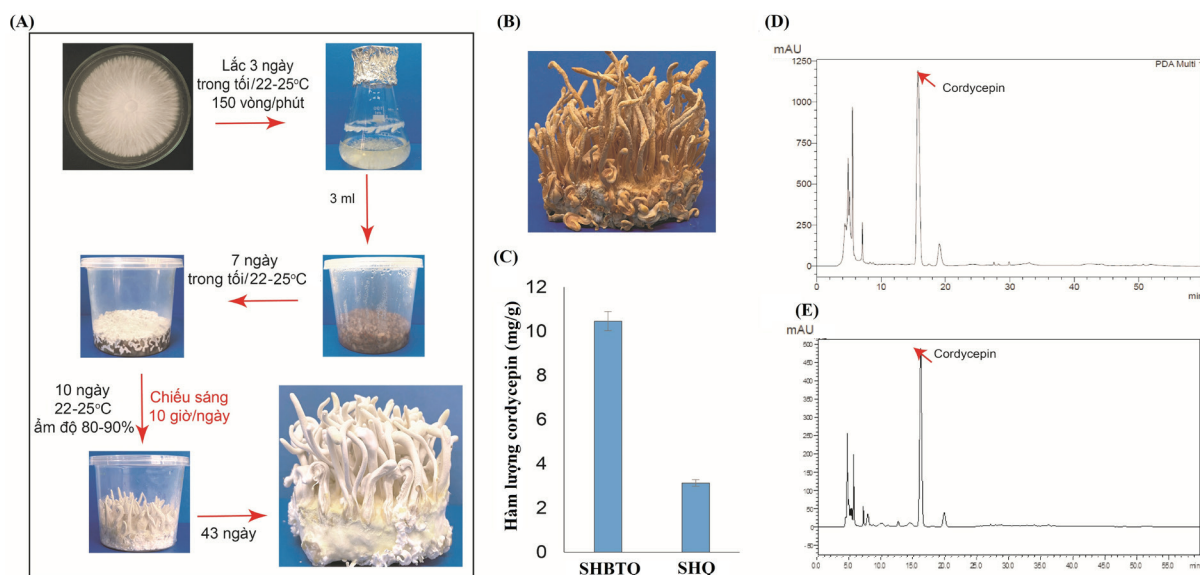
cho thấy, trên môi trường có nguồn carbon là saccarose và nguồn nitơ là cao nấm men, chủng SHBTQ sinh trưởng mạnh nhất (hình 5). Như vậy, saccarose và cao nấm men được xác định là nguồn carbon và nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ.

3.5. Khả năng hình thành quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ

Chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ được đánh giá khả năng hình thành quả thể, năng suất và hàm lượng cordycepin sau 60 ngày nuôi trồng. Quy trình và thành phần môi trường nuôi trồng được thực hiện theo nghiên cứu của V.X. Tao và cs (2022) [17]. Với kết quả xác định nguồn carbon và nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng, nghiên cứu này đã cải tiến thành phần dịch dinh dưỡng dùng trong nuôi trồng. Thành phần 1 l dịch dinh dưỡng đã cải tiến gồm: dịch chiết 200 g khoai tây, 30 g sucrose, 1 g MgSO₄, 1 g KH₂PO₄, 1 g pepton, 3 g cao nấm men, 100 g nhộng tằm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng SHBTQ có khả năng hình thành quả thể bình thường có màu trắng với

năng suất đạt trung bình 30 g quả thể tươi/hộp, tương ứng với năng suất sinh học đạt 12,2% (tương đương với chủng nấm SHQ) (hình 6A và 6B). Nghiên cứu của F. Wang và cs (2018) [11] cho thấy, chủng đột biến bạch tạng *C. militaris* 505 hình thành quả thể bất thường so với chủng 498 ban đầu và nghiên cứu chưa đề cập tới năng suất quả thể của chủng nấm bạch tạng 505. Như vậy, kết quả nghiên cứu này cung cấp thêm dữ liệu mới về khả năng hình thành và năng suất quả thể của chủng nấm *C. militaris* bạch tạng.

Hàm lượng hoạt chất cordycepin là chỉ tiêu chính để đánh giá chất lượng quả thể nấm được liệu *C. militaris*. Trong nghiên cứu này, quả thể của 2 chủng nấm *C. militaris* SHBTQ và SHQ được tiến hành xác định hàm lượng cordycepin trên hệ thống HPLC. Kết quả cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể của chủng SHBTQ đạt trung bình 10,45 mg/g, cao hơn 3,34 lần so với chủng SHQ ban đầu (3,13 mg/g) (hình 6B, 6C và 6D). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của F. Wang cùng cs (2018) [11] khi xác định hàm lượng cordycepin từ chủng nấm bạch tạng *C. militaris* 505 cao hơn so với chủng 498. Tuy nhiên, hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ cao hơn 1,56 lần so với chủng nấm bạch tạng *C. militaris* 505 (6,7 mg/g). Tại Việt Nam, một số giả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm *C. militaris* nuôi trồng đạt 4,33-4,54 mg/g quả thể khô [22, 23]. Như vậy, chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ là chủng nấm có chất lượng cao, tiềm năng cho nuôi trồng ở quy mô công nghiệp.



Hình 6. Khả năng hình thành quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ so với chủng SHQ. (A) Quá trình nuôi trồng quả thể và khả năng hình thành quả thể của chủng SHBTQ; (B) Quả thể chủng SHQ; (C) Hàm lượng cordycepin trong quả thể chủng SHBTQ và SHQ; (D) Sắc ký đồ phân tích cordycepin của mẫu quả thể chủng SHBTQ và (E) chủng SHQ.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã phân lập và định danh được chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ từ nguồn nấm đang được nuôi trồng tại Việt Nam, chủng nấm có hệ sợi màu trắng và duy trì ổn định qua 5 thế hệ liên tiếp. Nguồn carbon và nitơ thích hợp cho sự sinh trưởng của chủng nấm bạch tạng SHBTQ tương ứng là saccarose và cao nấm men. Đặc biệt, chủng nấm bạch tạng *C. militaris* SHBTQ có khả năng hình thành quả thể với năng suất quả thể tươi bình đạt 30 g/hộp, năng suất sinh học đạt 12,2% và hàm lượng cordycepin đạt 10,45 mg/g quả thể khô.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ của Bộ Khoa học và Công nghệ: "Nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm dược liệu *Cordyceps militaris* bạch tạng (albino) thu thập tại Việt Nam nhằm tạo nguyên liệu sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe". Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Martel, Y.F. Ko, J.C. Liao, et al. (2017), "Myths and realities surrounding the mysterious caterpillar fungus", *Trends in Biotechnology*, **35**(11), pp.1017-1021, DOI: 10.1016/j.tibtech.2017.06.011.
- [2] X. Qiu, C. Li, H. RiChou (2016), "The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis*", *Journal of Environmental Entomology*, **38**(1), pp.1-23.
- [3] L. Wang, B. Hu, L. Qu, et al. (2008), "Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of rDNA ITS sequence data", *Fungal Divers*, **31**, pp.147-155.
- [4] L. Huang, Q.Z. Li, Y. Chen, et al. (2009), "Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.", *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961, DOI: 10.1021/acsomega.0c03403.
- [5] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, et al. (2017), "Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin", *Cell Chemical Biology*, **24**(12), pp.1479-1489, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.001.
- [6] M. Masuda, E. Urabe, A. Sakurai, et al. (2006), "Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Enzyme and Microbial Technology*, **39**(4), pp.641-646, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.010.
- [7] A.K. Verma, R. Aggarwal (2021), "Repurposing potential of FDA approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm", *Chemical Biology & Drug Design*, **97**(4), pp.836-853, DOI: 10.1111/cbdd.13812.
- [8] S. Shin, S. Lee, J. Kwon, et al. (2009), "Cordycepin suppresses expression of diabetes regulating genes by inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages", *Immune Network*, **9**(3), pp.98-105, DOI: 10.4110/in.2009.9.3.98.
- [9] J.Z. Dong, S.H. Wang, X.R. Ai, et al. (2013), "Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies", *Journal of Functional Foods*, **5**(3), pp.1450-1455, DOI: 10.1016/j.jff.2013.06.002.
- [10] Z. XiWen, Z. Bo, Z. Guocai, et al. (2017), "Analysis of active components and antioxidant activity of albino *Cordyceps militaris*", *Journal of Jilin Agricultural University*, **39**(5), pp.585-595, DOI: 10.1590/fst.127022.
- [11] F. Wang, Q. Liu, J. Zhang, et al. (2018), "Comparative transcriptome analysis between a spontaneous albino mutant and its sibling strain of *Cordyceps militaris* in response to light stress", *Frontiers in Microbiology*, **9**, DOI: 10.3389/fmicb.2018.01237.

- [12] T.V. Tuan, V.X. Tao (2020), "Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **62**(5), pp.60-64 (in Vietnamese).
- [13] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, et al. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.
- [14] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.
- [15] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18**(1), pp.315-322, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- [16] N.V. Giang, N.T.B. Thuy, V.T.K. Linh, et al. (2021), "The effect of culture conditions for the mycelium growth of *Phyllinus linteus*", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **63**(2), pp.39-43, DOI: 10.31276/VJST.63(2).39-43 (in Vietnamese).
- [17] V.X. Tao, T.B. Tram, T.T. Chien, et al. (2022), "Identification of mating-type (*MAT*) gene, productivity and cordycepin content in medicinal *Cordyceps militaris* strains cultivated in Vietnam", *Vietnam Journal of Science and Technology - MOST*, **64**(7), pp.60-64, DOI: 10.31276/VJST.64(7).60-64 (in Vietnamese).
- [18] B. Shrestha, S.K. Han, J.M. Sung, et al. (2012), "Fruiting body formation of *Cordyceps militaris* from multi-ascospore isolates and their single ascospore progeny strains", *Mycobiology*, **40**(2), pp.100-106, DOI: 10.5941/MYCO.2012.40.2.100.
- [19] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2012), "Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine", *Genome Biology*, **12**(11), DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.
- [20] J.J. Luangsa-ard, K.Tasanathai, S. Mongkolsamrit, et al. (2008), *Atlas of Invertebrate-Pathogenic Fungi of Thailand: Volume 2*, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand, 88pp.
- [21] X.B. Mao, T. Eksriwong, S. Chauvatcharin, et al. (2005), "Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Process Biochemistry*, **40**(5), pp.1667-1672, DOI: 10.1016/j.procbio.2004.06.046.
- [22] D.T. Bach, V.H. Nam, M.T. Trang, et al. (2017), "Evaluating the influence of growing conditions on the ability to produce fruiting bodies of *Cordyceps militaris* mushroom", *TNU Journal of Science and Technology*, **161**(1), pp.113-118 (in Vietnamese).
- [23] P.T. Lan, D.H. Lan, N.T.H. Hanh, et al. (2016), "Study the effect of temperature and light on growth, fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris* NBRC 100741 on silkworm", *VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences*, **32**(2), pp.63-72 (in Vietnamese).