

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA OLIGOCHITOSAN TỚI SINH TRƯỞNG, PHÁT TRIỂN VÀ HÀM LƯỢNG HOẠT CHẤT CORDYCEPIN CỦA NẤM CORDYCEPS MILITARRIS

Đoàn Thị Tuyết Lê¹, Phạm Thị Sinh¹, Tô Công Thắng¹

Ngày nhận bài: 14/06/2023; Ngày phản biện thông qua: 19/12/2023; Ngày duyệt đăng: 20/12/2023

TÓM TẮT

Nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* là loài nấm ký sinh trên sâu non, nhưng có giá trị dược liệu quý và kinh tế cao nên bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm ngoài tự nhiên. Vì thế nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* hướng đến nâng cao chất lượng *C. militaris* phục vụ nhu cầu tiêu dùng. Kết quả cho thấy môi trường có bổ sung 2% oligochitosan thích hợp cho quá trình nhân giống cấp I nấm *C. militaris* với thành phần bao gồm: 200g khoai tây + 20g glucose + 2.5g pepton + 2.5g cao nấm men + 20g agar + 1.75g oligochitosan. Môi trường nhân giống cấp II gồm: 200g khoai tây + 10% glucose + 1.25% pepton + 1.25% cao nấm men + 1% oligochitosan. Môi trường tổng hợp gồm 45g gạo lứt/bình + 10% nước dừa + 10% khoai tây + 10% nhộng tươi + 1% bột đậu nành + 2% glucose + 1% B1 + 0.15% B6 + 0.05% MgSO₄.7H₂O + 0.025% KH₂PO₄ + 2% oligochitosan phù hợp cho quá trình hình thành quả thể nấm, hệ sợi phát triển nhanh, thời gian hình thành quả thể ngắn, cho số lượng quả thể nhiều, và hàm lượng được tính cordycepin cao 308 mg/kg.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, oligochitosan, môi trường nuôi cấy, hệ sợi nấm, điều kiện nuôi cấy.

1. GIỚI THIỆU

Nấm dược liệu đã được sử dụng rộng rãi nhờ giá trị dinh dưỡng cao và hiệu quả trong ngăn ngừa và điều trị bệnh. Ngoài ra, chúng còn được đánh giá cao về ứng dụng y học và trị liệu, đặc biệt là các loài thuộc giống *Cordyceps* có chứa nhiều dược chất (Chang et al, 2004, p.1). Trong đó, loài *C. militaris* chứa hàm lượng các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao như cordycepin, mannitol, adenosin, axit amin,... đồng thời loài này cũng dễ nuôi trồng trong môi trường nhân tạo cho hiệu quả kinh tế cao (Dong et al., 2012, p.1215-1224). Do chứa nhiều hoạt chất sinh học quý nên *C. militaris* rất tốt cho sức khỏe với công dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng dòng tế bào ung thư, chống oxy hóa, tăng sinh sản testosterone và hạ đường huyết (Kim et al., 2006, p.354-360)... Do đó nhu cầu sử dụng chúng để bồi bổ sức khỏe, tăng cường miễn dịch ngày càng tăng. Tuy nhiên, việc sử dụng *Cordyceps* nói chung còn gặp nhiều hạn chế vì giá sản phẩm thường cao do nguồn vật liệu nuôi trồng. Vì thế, cần phát triển các nghiên cứu về nuôi trồng *C. militaris* trong điều kiện nhân tạo nhằm chủ động về công nghệ và tăng quy mô sản xuất, nâng cao năng suất, chất lượng, góp phần giảm giá thành sản phẩm để nhiều người có thể sử dụng.

Oligochitosan là một dẫn xuất của chitosan, một loại polymer sinh học có nguồn gốc từ

chitin được tìm thấy trong bộ xương của động vật giáp xác và côn trùng (Kontogiannatos et al., 2021, p.986). Chitin là thành phần chính của thành tế bào nấm. Ở một số nhóm nấm, chitin thay thế cellulose làm polysaccharide cấu trúc (Brown et al., 2020, p.83-111). Oligochitosan đã được nghiên cứu về các ứng dụng tiềm năng trong nông nghiệp, làm thuốc trừ sâu sinh học và làm chất tăng trưởng thực vật. Mặc dù có rất ít nghiên cứu cụ thể về tác dụng của oligochitosan đối với quá trình nuôi trồng *Cordyceps militaris*, một số đặc tính chung của oligochitosan đối với quá trình này là giúp loài nấm này sinh trưởng tốt như cung cấp thêm nguồn dinh dưỡng đồng thời giúp duy trì môi trường không mầm bệnh cho *C. militaris*. Oligochitosan có thể hoạt động như thuốc trừ sâu sinh học và kiểm soát mầm bệnh. Sự hiện diện của mầm bệnh trong môi trường nuôi cấy có thể tác động tiêu cực đến sự phát triển của *C. militaris*.

Mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới ảnh hưởng phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris*.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống *Cordyceps militaris* được cung cấp bởi Công ty CNSH Sơn Tiên.

¹Khoa Khoa học và Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại học Lạc Hồng

Tác giả liên hệ: Đoàn Thị Tuyết Lê; ĐT: 0918697967; Email: tuyetledt@lhu.edu.vn.

Các loại nguyên liệu: gạo lứt huyết rồng được cung cấp bởi công ty TNHH Đại dương xanh, TP. Hồ Chí Minh; nhộng được cung cấp bởi công ty nhộng tằm Kinh Thành, Tp. Bảo Lộc; khoai tây; nước dừa; đậu nành được cung cấp bởi siêu thị Coopmart, Việt Nam.

Các khoáng chất và vitamin: oligochitosan được cung cấp bởi CTCP dược phẩm Thiên Tuế, TP. Hồ Chí Minh; vitamin B1, B6 bởi Công ty cổ phần Dược phẩm Đại Uy (Chương Mỹ, Hà Nội); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , pepton, cao nấm men, glucose (Merck, Đức); Agar (Mina, Việt Nam).

Các thiết bị được dùng trong nghiên cứu này gồm: Tủ cấy vi sinh, phòng nuôi cấy có thiết bị điều hoà, máy lạnh, máy phun ẩm, kim tiêm dùng 1 lần, hệ thống đèn, nồi hấp tiệt trùng, tủ sấy.

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng phát triển, hàm lượng cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn nhân giống cấp 1

Thí nghiệm được bố trí gồm 11 nghiệm thức ký hiệu từ A0 đến A10, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Chuẩn bị 11 môi trường khác nhau từ A0 đến A10. A0: 200g khoai tây + 10% glucose + 1.25% pepton + 1.25% cao nấm men + 10% agar; A1: A0 + 0.5% oligochitosan; A2: A0 + 1% oligochitosan; A3: A0 + 1.5% oligochitosan; A4: A0 + 2% oligochitosan; A5: A0 + 2.5% oligochitosan; A6: A0 + 3% oligochitosan; A7: A0 + 3.5% oligochitosan; A8: A0 + 4% oligochitosan; A9: A0 + 4.5% oligochitosan; A10: A0 + 5% oligochitosan.

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 30 phút. Sau đó, đổ môi trường vào đĩa petri (đường kính 10cm) có độ dày 2 mm rồi để nguội trong 2 giờ. Cây vào mỗi đĩa môi trường rắn một mảng nấm 0,5 cm² ở chính giữa tâm đĩa petri. Nuôi cấy trong 15 ngày ở điều kiện tối hoàn toàn, độ ẩm 65 - 75%, nhiệt độ từ 18°C đến 20°C.

Chỉ tiêu theo dõi:

Tốc độ phát triển hệ sợi: là khả năng kéo dài của hệ sợi trên bề mặt thạch trong đơn vị thời gian. Đơn vị: cm/ngày. (Kể từ khi nấm hình thành sau 3,6,9,12,15 ngày dùng để đo, ghi nhận lại sự phát triển của nấm theo thời gian).

Hình thành hệ sợi: màu sắc hệ sợi nấm, quan sát bằng mắt thường và đánh giá màu sắc hệ sợi nấm.

Mật độ hệ sợi nấm: quan sát bằng mắt thường và đánh giá mật độ hệ sợi nấm theo thang điểm:

(+) mật độ sợi mỏng, (++) mật độ sợi trung bình, (+++) mật độ sợi dày.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển của nấm *Cordyceps militaris* trong giai đoạn nhân giống lỏng

Thí nghiệm được bố trí gồm 11 nghiệm thức. Sử dụng chai thủy tinh 500ml chứa 200 ml dịch môi trường lỏng ký hiệu từ B0 đến B10, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần.

Chuẩn bị 11 môi trường khác nhau từ B0 đến B10. B0: 200g khoai tây + 10% glucose + 1.25% pepton + 1.25% cao nấm men; B1: B0 + 0.5% oligochitosan; B2: B0 + 1% oligochitosan; B3: B0 + 1.5% oligochitosan; B4: B0 + 2% oligochitosan; B5: B0 + 2.5% oligochitosan; B6: B0 + 3% oligochitosan; B7: B0 + 3.5% oligochitosan; B8: B0 + 4% oligochitosan; B9: B0 + 4.5% oligochitosan; B10: B0 + 5% oligochitosan.

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 30 phút. Để nguội sau 4 giờ rồi cấy 2 mảng nấm *Cordyceps militaris* (mỗi mảng có kích thước 1 cm²) được nuôi cấy trên môi trường rắn chọn ra ở thí nghiệm 1. Nuôi trong điều kiện lác trong 7 ngày ở điều kiện tối hoàn toàn, độ ẩm 65 - 75%, nhiệt độ từ 18°C đến 25°C.

Chỉ tiêu theo dõi: Khả năng tạo hệ sợi nấm (15 ngày), thời gian xuất hiện sợi nấm, thời gian xuất hiện mảng nấm, kích thước mảng nấm sau 15 ngày, giá trị OD sau 15 ngày nuôi cấy.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* trên môi trường nuôi cấy quả thể

Thí nghiệm được bố trí gồm 11 nghiệm thức ký hiệu từ C0 đến C10, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức được bố trí trong lọ thủy tinh chịu nhiệt có dung tích 500 ml, đường kính 7 cm.

Chuẩn bị 11 môi trường nghiệm thức khác nhau. Mỗi nghiệm thức gồm 45g gạo lứt huyết rồng + 75 ml dịch khoáng cho vào lọ thủy tinh. Thành phần dịch khoáng như sau. C0: 10% nước dừa + 10% khoai tây + 10% nhộng tươi + 1% bột đậu nành + 2% glucose + 1% B1 + 0.15% B6 + 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0.025% KH_2PO_4 ; C1: C0 + 0.5% oligochitosan; C2: C0 + 1% oligochitosan; C3: C0 + 1.5% oligochitosan; C4: C0 + 2% oligochitosan; C5: C0 + 2.5% oligochitosan; C6: C0 + 3% oligochitosan; C7: C0 + 3.5% oligochitosan; C8: C0 + 4% oligochitosan; C9: C0 + 4.5% oligochitosan;

C10: C0 + 5% oligochitosan. Hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Sau đó để nguội sau 1 giờ rồi cấy vào mỗi nghiệm thức 5 ml dung dịch môi trường lỏng được chọn ở thí nghiệm 2. Nuôi trong điều kiện tối ở 18°C, độ ẩm 60 - 70% trong 5 ngày. Rồi sau đó kích sáng và tiếp tục nuôi trong 20 - 25°C, độ ẩm 75 - 85 % trong 35 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi:

Thời gian phát triển của hệ sợi: Là thời gian hệ sợi phát triển kín toàn bộ môi trường. Đơn vị: ngày

Thời gian xuất hiện mầm quả thể: Là thời gian tính từ khi cấy giống đến khi xuất hiện mầm quả thể đầu tiên. Đơn vị: ngày

Số lượng quả thể: Là mầm quả thể có khả năng sinh trưởng và phát triển tiếp để hình thành quả thể trưởng thành. Đơn vị: quả thể/lo.

Tốc độ sinh trưởng: Là khả năng kéo dài của quả thể trên bề mặt cơ chất trong một đơn vị thời gian. Đơn vị: cm/ngày

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển của nấm *C.militaris* trên giai đoạn nhân giống cấp I

Từ kết quả bảng 1 cho thấy trên 11 môi trường dinh dưỡng nấm đều sinh trưởng, phát triển. Nhưng trên mỗi môi trường với thành phần dinh dưỡng khác nhau thì cũng cho ra sự khác nhau giữa tốc độ lan tơ, hình thái và thời gian lan kín bề mặt thạch. A0 là môi trường đối chứng nên sợi màu vàng phát triển đồng đều xung quanh vị trí giống ban đầu cấy vào. Đối với nghiệm thức A1, A2, A3, ban đầu hệ sợi có màu trắng dần chuyển sang màu vàng từ trong ra ngoài. A4 bổ sung với tỷ lệ dinh dưỡng cân đối nên cho ra kết quả ổn định hơn, có sự khác biệt rõ rệt, hệ sợi có tốc độ lan tơ mạnh, mật độ tốt (lan kín trong 12 ngày), phù hợp cho nhân giống *C.militaris*. Các nghiệm thức từ A5 đến A10 được bổ sung với tỷ lệ dinh dưỡng cao nên hệ sợi có xu hướng nhô lên, đến 12 ngày không lan nữa mà chuyển vàng, già hóa đi. Qua hình 1 cho ta thấy có thể bổ sung oligochitosan với tỷ lệ 0,8 - 1% là phù hợp với nhu cầu của nấm. Nấm phát triển trên môi trường PDA tốt vì đây là môi trường thông dụng để nấm phát triển. Tuy nhiên Nachon Raethong el at (2020,p1-8) đã chứng minh rằng đối với nấm *C.militaris* thì điều đó vẫn chưa đạt hiệu quả cao nên khi bổ sung oligochitosan vào với tỷ lệ phù hợp sẽ giúp tăng trưởng tốt hơn. Còn khi bổ sung vào 1.2 - 2% tốc độ lan tơ chậm rõ rệt, có xu hướng

đi lên và không lan mạnh là do nấm *C.militaris* chỉ cần lượng C/N phù hợp. Nếu quá nhiều sẽ làm chậm quá trình lan tơ cũng như già hóa. Như vậy môi trường phù hợp để nhân giống nấm *C.militaris* là môi trường A4 (PDA bổ sung 0.8% oligochitosan).

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển *C.militaris* trên giai đoạn nhân giống cấp II

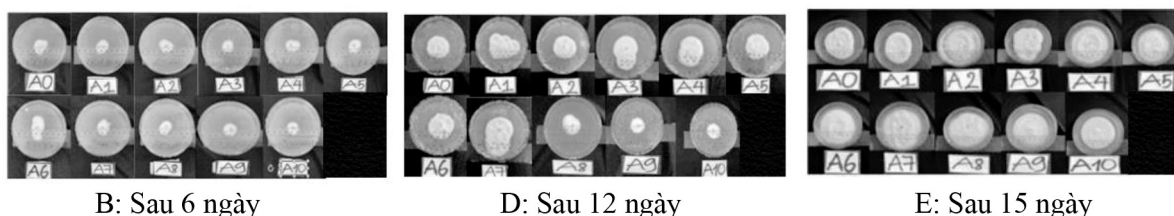
Kết quả ghi nhận của *C.militaris* nuôi cấy trên 11 loại môi trường thể hiện ở hình 2 và bảng 2. Kết quả cho thấy trên 11 loại môi trường nấm đều sinh trưởng, tuy nhiên chúng có sự khác nhau về thời gian mật độ hệ sợi và kích thước mảng nấm. Nguồn dinh dưỡng carbon và nito trong môi trường giúp tăng trưởng hệ sợi nấm, peptone và cao nấm men là 2 nguồn dinh dưỡng thích hợp cho *C.militaris* tổng hợp cordycepin trong quá trình nuôi cấy. Mao et al (2005, p.1667-1672) cho biết glucose cũng là nguồn cacbon tối ưu để sản xuất cordycepin. Việc tăng sinh tổng hợp các chất, đặc biệt là cordycepin trong giai đoạn nhân giống cấp 2 là quan trọng giúp hình thành và là tiền đề cho giai đoạn tiếp theo (nuôi quả thể) có thể đạt được hàm lượng được tính cao nhất. Bên cạnh đó Lang-Ying-Wang et al (2019,p.741-747) cho rằng khi bổ sung oligochitosan vào sẽ thúc đẩy quá trình sinh trưởng của hệ sợi nấm. Và trong nghiên cứu này, khi bổ sung oligochitosan vào môi trường nuôi cho thấy hệ sợi sinh trưởng mạnh, nhất là B2 được thể hiện qua kết quả đo OD là 2.576 và kích thước mảng nấm của B2 có kích thước vượt trội hơn hẳn các nghiệm thức còn lại. Vậy khi bổ sung 1% oligochitosan vào môi trường cơ bản chứa 2.5% glucose/l + 1.25g peptone/l + 1.25%g cao nấm men/l là phù hợp.

Bảng 1. Kết quả sự sinh trưởng phát triển trên 11 loại môi trường

Nghiem thức	Tốc độ phát triển hệ sợi (cm/ ngày)	Mật độ hệ sợi	Thời gian lan kín mặt (ngày)	Đặc điểm hình thái (15 ngày)
A0	0.49 ^{bcd}	++	14	Hệ sợi màu vàng phát triển đồng đều xung quanh giống ban đầu cấy vào
A1	0.45 ^{bc}	++	14	Hệ sợi có màu vàng nhạt, xung quanh có hệ sợi màu trắng, mịn
A2	0.48 ^{bcd}	++	14	Hệ sợi có màu trắng bông đều xung quanh, hệ sợi hơi gồ lên ở giữa
A3	0.43 ^{ab}	++	15	Hệ sợi có màu trắng, mịn, bề mặt láng
A4	0.6 ^{cd}	+++	12	Hệ sợi phát triển mạnh, phân bố đồng đều quanh giống được cấy ban đầu. Hệ sợi trắng, chính giữa gồ lên
A5	0.5 ^d	+++	12	Hệ sợi có xu hướng vàng từ trong ra ngoài, lan mỏng xung quanh giống được cấy vào ban đầu
A6	0.48 ^{bcd}	++	13	Hệ sợi có màu vàng đều từ trong ra ngoài, bề mặt hệ sợi dày
A7	0.49 ^{ab}	++	15	Hệ sợi có màu vàng đều, bề mặt láng, dày, phân bố không đều
A8	0.31 ^a	+	KL	Hệ sợi màu trắng, vàng nhẹ, sợi tơ hơi bông
A9	0.33 ^{ab}	+	KL	Hệ sợi màu vàng đậm, có xu hướng nhô lên, hơi khô
A10	0.31 ^a	+	KL	Hệ sợi phát triển yếu, có màu vàng đậm, phân bố không đều

Ghi chú: (+) Mật độ sợi mỏng (++) Mật độ sợi trung bình (+++) Mật độ sợi dày

KL: Không lan kín hết



Hình 1. Kết quả nấm sinh trưởng trên 11 môi trường rắn

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển *C.militaris* trên giai đoạn nhân giống cấp II

Kết quả ghi nhận của *C.militaris* nuôi cấy trên 11 loại môi trường thể hiện ở hình 2 và bảng 2. Kết quả cho thấy trên 11 loại môi trường nấm đều sinh trưởng, tuy nhiên chúng có sự khác nhau về thời gian mật độ hệ sợi và kích thước mảng nấm. Nguồn dinh dưỡng carbon và nito trong môi trường giúp tăng trưởng hệ sợi nấm, peptone và cao nấm men là 2 nguồn dinh dưỡng thích hợp cho *C.militaris* tổng hợp cordycepin trong quá trình

nuôi cấy. Mao et al (2005, p.1667-1672) cho biết glucose cũng là nguồn carbon tối ưu để sản xuất cordycepin. Việc tăng sinh tổng hợp các chất, đặc biệt là cordycepin trong giai đoạn nhân giống cấp 2 là quan trọng giúp hình thành và là tiền đề cho giai đoạn tiếp theo (nuôi quả thể) có thể đạt được hàm lượng dược tính cao nhất. Bên cạnh đó Lang-Ying-Wang et al (2019, p.741-747) cho rằng khi bổ sung oligochitosan vào sẽ thúc đẩy quá trình sinh trưởng của hệ sợi nấm. Và trong nghiên cứu này, khi bổ sung oligochitosan vào môi trường nuôi cho thấy hệ sợi sinh trưởng mạnh, nhất là B2 được thể

hiện qua kết quả đo OD là 2.576 và kích thước mạng nấm của B2 có kích thước vượt trội hơn hẳn các nghiệm thức còn lại. Vây khi bổ sung 1%

oligochitosan vào môi trường cơ bản chứa 2.5% glucose/l + 1.25g peptone/l + 1.25%g cao nấm men/l là phù hợp.

Bảng 2. Kết quả sự sinh trưởng phát triển trên 11 loại môi trường

Nghiệm thức	OD _{600nm}	Thời gian xuất hiện sợi nấm(ngày)	Thời gian xuất hiện mạng nấm(ngày)	Kích thước mạng nấm sau 7 ngày (cm)
B0	0.550	3	4	3
B1	1.927	3	4	1
B2	2.576	3	4	5
B3	2.299	3	4	2
B4	2.116	3	4	1
B5	1.122	3	4	1
B6	1.978	4	5	1
B7	1.673	5	5	0.5
B8	1.479	5	6	0.5
B9	1.775	6	7	1
B10	1.521	6	7	1



Hình 2. Đặc điểm hệ sợi và mạng nấm của nấm *C.militaris* trong 11 môi trường lỏng

3.3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan tới sinh trưởng, phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* trên môi trường nuôi cấy quả thể

Từ bảng 3 cho thấy tốc độ lan tơ nhanh nhất là 5 ngày, thời gian xuất hiện mầm quả thể đầu tiên là 11 ngày, nhanh nhất là C1, C2, C4, C5 (11 ngày), chậm nhất là C9, C10 (15 ngày). Môi trường C4 (2% oligochitosan) cho sinh trưởng tốt nhất về chiều cao, số lượng quả thể cũng như là năng suất sinh học. Tiếp là môi trường C10 (5% oligochitosan) cho kết quả chiều cao kém phát triển nghiêng về phát triển đường kính thân, năng suất sinh học kém. Dựa vào hình 3 cho thấy chiều cao quả thể theo từng ngày và kích thước quả thể nấm phụ thuộc rất nhiều tỷ lệ dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy. Gao et al (2000, p.93-98) cho biết nguồn dinh dưỡng nitơ thích hợp cho nấm là hỗn hợp giữa gạo và nhộng tằm khô. Nhu cầu về hàm lượng nitơ cung cấp cho nấm tương đối thấp, nếu hàm lượng nitơ quá cao sẽ làm chậm quá trình phát triển của sợi và có thể làm biệt hóa hình thành quả thể. Tuy nhiên Dimitrios Kontogiannatos et al (2021, p.986) cho rằng ngoài hỗn hợp giữa gạo và bột nhộng khô là nguồn nitơ thích hợp cho nấm thì còn hỗn hợp giữa gạo và dẫn xuất của chitin

là nguồn nitơ thích hợp ngoài ra còn giúp nấm có tốc độ tăng trưởng cao. Oligochitosan được xem là chất khi bổ sung vào sẽ làm tốc độ phát triển của nấm được tối ưu. Tuy nhiên, không phải cứ bổ sung nhiều là nấm sinh trưởng càng nhanh, mà nên cho liều lượng phù hợp với nhu cầu của nấm là từ 2% - 2.5%, liều lượng này không những cho năng suất tốt, quả thể to mà còn cho hàm lượng cordycepin tương đối (308 mg/kg). Nhưng nếu môi trường có quá nhiều dinh dưỡng thì chiều cao của quả thể sẽ kém phát triển chiều cao (như ở môi trường C10) mà chỉ phát triển đường kính thân. Nếu hàm lượng quá thấp, cơ chất không đủ dinh dưỡng cung cấp cho nấm phát triển, sợi nấm yếu làm giảm khả năng chuyển hóa các hoạt chất có sẵn trong nấm. Vì vậy cần chọn loại môi trường phù hợp cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho nấm phát triển một cách cân đối về chất lượng và số lượng như ở nghiệm thức C4. Qua kết quả phân tích, hàm lượng cordycepin ở nghiệm thức C4 đạt 308mg/kg cao hơn các nghiệm thức còn lại trừ C0. Tuy hàm lượng cordycepin C4 không cao như C0 nhưng ở nghiệm thức C4 thì tốc độ phát triển được tối ưu nhanh hơn C0 (khoảng 10 ngày). Điều đó cho thấy nếu như nuôi trồng ở quy mô công nghiệp sẽ tiết kiệm được nhiều chi phí và thời gian nhưng vẫn

giữ được chất lượng ổn định. Kết quả này có ý nghĩa rất lớn vì nó là cơ sở cho việc nghiên cứu lựa chọn giá thể nhân tạo thích hợp để nuôi *C. militaris* sao cho vừa cung cấp đủ dinh dưỡng để nấm phát triển kích thước một cách cân đối, vừa cho năng suất, chất lượng tốt, vẫn giữ được

tính. Từ các kết quả trên nhận thấy môi trường C4 (45g gạo lứt/bình + 2% oligochitosan + 75ml dịch khoáng) là thích hợp cho sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi, hình thành quả thể cũng như khả năng tổng hợp cordycepin.

Bảng 3. Đặc điểm sinh trưởng, phát triển của nấm *C.militaris*

Nghiệm thức	Thời gian hệ sợi lan kín (ngày)	Thời gian xuất hiện mầm quả thể	Tốc độ phát triển (cm/ngày)	Số lượng quả thể	Hàm lượng cordycepin
C0	5	13	0.171 ^{bc}	127,66 ^{cdef}	463
C1	5	11	0.192 ^{cd}	129 ^{def}	172
C2	5	11	0.158 ^{abc}	127 ^{ef}	164
C3	5	12	0.15 ^{abc}	101 ^{ab}	219
C4	5	11	0.213 ^c	150 ^f	308
C5	5	11	0.192 ^{bc}	112 ^{bcd}	132
C6	5	12	0.158 ^{abc}	112 ^{bc}	93.6
C7	6	13	0.142 ^{ab}	117,66 ^{bcd}	78.8
C8	6	12	0.150 ^{ab}	111,75 ^b	83.2
C9	7	15	0.129 ^a	125 ^a	100
C10	7	15	0.122 ^a	84 ^a	115



Hình 3. Quá trình sinh trưởng và phát triển quả thể nấm *C.militaris*

(a) Ủ tối sau 7 ngày; (b) Nấm phát triển sau 10 ngày chiếu sáng; (c) Nấm phát triển sau 25 ngày chiếu sáng; (d) Giai đoạn thu hoạch.

4. KẾT LUẬN

Oligochitosan có ảnh hưởng tới sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris*. Cụ thể như sau:

Môi trường nhân giống cấp I thích hợp cho nấm *C.militaris* là A4 với thành phần: 200g khoai tây + 10% glucose + 1.25% pepton + 1.25% cao nấm men + 10% agar + 2.5% oligochitosan.

Môi trường nhân giống cấp II thích hợp cho nấm *C.militaris* là B2 với thành phần: 200g khoai tây + 10% glucose + 1,25% pepton + 1.25% cao nấm men + 1% oligochitosan.

Môi trường nuôi cấy quả thể gồm: 45g gạo lứt/bình + 10% nước dừa + 10% khoai tây + 10% nhộng tươi + 1% bột đậu nành + 2% glucose + 1% B1 + 0.15% B6 + 0.05% MgSO₄.7H₂O + 0.025% KH₂PO₄ + 2% oligochitosan.

THE EFFECTS OF OLIGOCHITOSAN ON GROWTH, DEVELOPMENT, AND CORDYCEPIN CONTENT OF CORDYCEPS MILITARIS

Doan Thi Tuyet Le¹, Pham Thi Sinh¹, To Cong Thang¹

Received Date: 14/06/2023; Revised Date: 19/12/2023; Accepted for Publication: 20/12/2023

ABSTRACT

Cordyceps militaris, a parasitic fungus on insect larvae, is a valuable medicinal and economically significant species, which has been excessively exploited, leading to scarcity in the wild. Therefore, this research was conducted to investigate the influence of oligochitosan on the growth, development, and cordycepin content of *Cordyceps militaris*, aiming to enhance the quality of *C. militaris* to meet consumer demands. The results indicate that an environment supplemented with 2% oligochitosan is suitable for the first-stage cultivation of *C. militaris*, with the composition including: 200g potatoes + 20g glucose + 2.5g peptone + 2.5g yeast extract + 20g agar + 1.75g oligochitosan. The second-stage cultivation medium consists of: 200g potatoes + 10% glucose + 1.25% peptone + 1.25% yeast extract + 1% oligochitosan. The synthetic medium comprises 45g brown rice/bottle + 10% coconut water + 10% potatoes + 10% fresh larvae + 1% soybean powder + 2% glucose + 1% B1 + 0.15% B6 + 0.05% MgSO₄.7H₂O + 0.025% KH₂PO₄ + 2% oligochitosan, suitable for the formation of fungal fruiting bodies, rapid mycelial development, short fruiting body formation time, high fruiting body quantity, and a cordycepin medicinal content of 308 mg/kg.

Keywords: *Cordyceps militaris*, oligochitosan, culture medium, mycelium, culture conditions.

TÀI LIỆU KHAM KHẢO

- Chang, S.T. and Miles, P.G. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2nd ed, CRC Press,1.
- Dong, J.Z., et al (2012). Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166, 1215-1224.
- Kim, G.Y., et al (2006). Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (2), 354-360.
- Raethong, N., et al (2020). Optimizing cultivation of *Cordyceps militaris* for fast growth and cordycepin overproduction using rational design of synthetic media. *Elsevier*. 18, 1-8.
- Trần Thu Hà và cs (2016). Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm Đông trùng hạ thảo trong môi trường nhân giống dịch thể. *Khoa học và công nghệ*. 58 (8).
- Mao, X.B., et al (2005). Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochem*. 40(5), 1667-1672.
- Wang, L.Y., et al (2019). Dynamic Analysis of nucleosides and carbohydrates during developmental stages of *Cordyceps militaris* in silkworm (*Bombyxmori*). *Journal of Aoac International*. 102(3), 741-747.
- Gao, X., et al (2000). Qian, Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*. *Acta Agriculture Shanghai*. 16 (Suppl), 93-98.
- Kontogiannatos, D., et al (2021). Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* - A review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus. *Journal of Fungi*. 7(11), 986.
- Brown, H. E., Esher, S. K., & Alspaugh, (2020). Chitin: a “hidden figure” in the fungal cell wall. The fungal cell wall: an armour and a weapon for human fungal pathogens. *Springer International Publishing*, 83-111.

¹Faculty of Food Science and Engineering, Lac Hong University, Dong Nai, Vietnam;

Corresponding author: Doan Thi Tuyet Le; Tel: 0918697967; Email: tuyetledt@lhu.edu.vn.