

Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng tới sinh trưởng, phát triển và hàm lượng hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* NBRC 100741 trên nhộng tằm

Phạm Thị Lan, Đỗ Hải Lan, Nguyễn Thị Hồng Hạnh,
Bạc Thị Thu, Phạm Văn Nhã*

Khoa Sinh - Hóa, Trường Đại học Tây Bắc,
Phường Quyết Tâm - thành phố Sơn La, Việt Nam

Tóm tắt

Cordyceps militaris (L.) Link được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền ở châu Á nhờ có nhiều tá dụng dược lý quan trọng. Nuôi cấy nấm *C.militaris* được nghiên cứu rộng rãi nhằm tạo thể quả đạt số lượng và chất lượng để sử dụng trong y học và thực phẩm bổ dưỡng. Nhiệt độ và ánh sáng là hai trong nhiều yếu tố môi trường quan trọng cho quá trình sinh trưởng, phát triển hình thành thể quả và sinh tổng hợp hàm lượng cordycepin của nấm *Cordyceps militaris*. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá yếu tố nhiệt độ và ánh sáng đến khả năng hình thành thể quả và hoạt chất cordycepin của nấm *Cordyceps militaris* NBRC 100741 trên nhộng tằm. Kết quả cho thấy nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng, phát triển, hình thành thể quả và hàm lượng cordycepin của nấm *C. militaris* trên nhộng tằm là 25°C. Ngoài ra, loại ánh sáng từ đèn compact (công suất 20W, tương đương 350 lx) và thời gian chiếu sáng (12 giờ sáng: 12 giờ tối) cho hiệu suất hình thành thể quả (số lượng và kích cỡ) và hàm lượng cordycepin cao hơn so với ánh sáng từ nguồn đèn LED màu xanh dương, màu đỏ (750 bóng, mỗi bóng có công suất 0,05W, 716 lx). Hàm lượng cordycepin trong thể quả từ loại ánh sáng của đèn compact là 4.54 mg/g.

Nhận ngày 02 tháng 10 năm 2016, Chỉnh sửa ngày 01 tháng 11 năm 2016, Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 12 năm 2016

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, nhiệt độ, ánh sáng, thể quả, nhộng tằm.

1. Đặt vấn đề

Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* có hình thức sống ký sinh trên cơ thể côn trùng và sâu bọ [1]. *Cordyceps militaris* là một trong những loài hiện đang thu hút mối quan tâm của nhiều nhà khoa học, vì khả năng nuôi cấy dễ dàng hơn trong điều kiện *in vitro* so với nấm *C. sinensis* [2]. Giá thể nhân tạo và giá thể tự nhiên là hai loại môi trường chính mà nấm *C.*

militaris có thể sinh trưởng tạo thể quả. Một số loại giá thể nhân tạo thường được áp dụng trong nuôi cấy nấm *C. militaris* gồm: môi trường SDAY có bổ sung bột nhộng hoặc tằm, môi trường gạo lứt có bổ sung thêm môi trường SDAY hoặc bột nhộng/tằm... Giá thể tự nhiên chính là cơ thể tằm dâu hoặc nhộng [3]. Khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *C. militaris* và hàm lượng cordycepin trên giá thể nhộng tằm phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố trong đó có thể kể đến như: nhiệt độ nuôi cấy, loại, cường độ và thời gian chiếu sáng, độ ẩm và trạng thái sinh lý của nhộng, tằm. Để đảm bảo

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-1693514789
Email: phamvannhadhtb@gmail.com

sản phẩm tạo ra có hàm lượng hoạt chất cao, cần xác định được nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng và phát triển của nấm trên giá thể tự nhiên [3]. Hiện nay, tại Việt Nam có rất ít các nghiên cứu về ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng tới sự sinh trưởng, phát triển và hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học được tổng hợp bởi nấm *C. militaris*. Vì vậy, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ và ánh sáng tới sự sinh trưởng, phát triển và hình thành hoạt chất của nấm *C. militaris* nghiên cứu trên nhộng tằm nhằm xác định điều kiện tối ưu cho qui trình nuôi cấy *C. militaris*.”

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Chủng nấm sử dụng là chủng *Cordyceps militaris* NBRC 100741 được mua vào tháng 4/2015, tại Trung Tâm Nguồn Sinh Học Quốc Gia (NBRC), Nhật Bản. Nhộng và tằm dâu được thu mua tại hộ gia đình có truyền thống nuôi tằm dâu. Nhộng được thu mua cả kén để đảm bảo tránh nhiễm vi sinh vật thêm trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu này gồm: tủ âm lạnh (Jeio Tech - SI300), buồng cấy vi sinh (Telstar), máy đo pH (Schott Instrument Lab 850), nồi hấp (Sturdy SA-300VF), phòng nuôi cấy có trang bị điều hoà nhiệt độ, que cấy, kim tiêm vô trùng (đường kính kim $\Phi = 1,2$ mm), bơm tiêm dùng một lần (dung tích 5 mL), dàn để mẫu có hệ thống chiếu sáng bằng đèn compact (công suất 1 bóng: 20W) và dàn để mẫu được chiếu sáng bằng đèn LED (gồm có hai màu: xanh dương và đỏ. Tỷ lệ giữa hai màu tương ứng lần lượt là: 1 xanh dương: 2 đỏ).

2.1. Chuẩn bị giống *Cordyceps militaris* NBRC 100741

5 ml giống nghiên cứu được cấy vào 150 ml môi trường SDAY lỏng (40 g/L glucose, 10 g/L pepton, 10g/L cao nấm men pH = 7,0) trong box cấy vô trùng. Bình nuôi cấy sau đó được chuyển sang máy lắc (Jeio Tech - SI300) và

lắc ở tốc độ 150 rpm trong điều kiện nhiệt độ môi trường 25°C. Thời gian nuôi giống là 4 - 5 ngày.

2.2. Nuôi cấy *C. militaris* trên giá thể tự nhiên nhộng tằm

Giá thể tự nhiên được sử dụng trong nghiên cứu này là tằm/nhộng tằm sống. Giống *Cordyceps militaris* NBRC 100741 được tiêm vào phần đầu của nhộng trong điều kiện vô trùng. Thể tích giống tiêm cho một cơ thể nhộng sống là 0,1 ml. Các bước chuẩn bị và nuôi cấy *C. militaris* được tiến hành như sau:

- *Chuẩn bị giá thể nhộng tằm*: Tiến hành cắt kén tằm trong box cấy vô trùng thu lấy nhộng.

- *Lây nhiễm nấm *C. militaris* vào giá thể nhộng tằm*: Tiêm 0,1 ml (2.10^5 CFU bào tử/mL) giống nấm *C. militaris* vào phần đầu nhộng tằm. Sau khi tiêm, nhộng được trải rộng ra trên một miếng giấy ẩm (vô trùng) và được đặt trong lọ thủy tinh trong suốt có nắp đậy.

- *Ủ tối tạo hệ sợi nấm *C. militaris* trên giá thể nhộng tằm*: Nhộng tằm sau khi được lây nhiễm thì được bảo quản trong bóng tối ở nhiệt độ 23 - 25°C, độ ẩm 80 - 90%. Khoảng 4 - 5 ngày sau khi tiêm giống nấm, hệ sợi nấm dần dần bao kín giá thể nhộng tằm.

2.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng và phát triển của nấm *Cordyceps militaris*

Tiến hành nuôi cấy tạo thể quả nấm *C. militaris* vào các cá thể nhộng tằm, sau đó chuyển các cá thể này sang các nhiệt độ khác nhau: 7°C; 15°C; 20°C; 25°C; 30°C, mỗi nhiệt độ được dao động trong khoảng $\pm 1^\circ\text{C}$, đồng thời cần đảm bảo các điều kiện về độ ẩm, ánh sáng. Mỗi dải nhiệt độ, bố trí 30 cá thể nhộng/tằm, lặp lại thí nghiệm 3 lần. Theo dõi kết quả trong vòng 2 tháng.

Các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá:

- + Thời gian hình thành mầm thể quả sau khi ra sáng (ngày)
- + Số lượng thể quả/con
- + Khối lượng thể quả/con (g)
- + Kích thước thể quả (mm)
- + Hình dạng thể quả
- + Màu sắc thể quả

2.4. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng, phát triển và hình thành thể quả của nấm *Cordyceps militaris*

Sau khi tiêm *Cordyceps militaris* NBRC 100741 vào phần đầu của nhộng, nhộng được đặt trong điều kiện không được chiếu sáng, nhiệt độ 25°C và độ ẩm 80 - 90%. Sau 14 ngày, nhộng được chuyển ra điều kiện chiếu sáng với loại ánh sáng khác nhau. Thời gian chiếu sáng là 12 giờ sáng: 12 giờ tối. Có hai lô thí nghiệm với hai loại ánh sáng khác nhau:

Lô 1 - được chiếu sáng bằng đèn compact có công suất 20W, tương đương với 350 lx.

Lô 2 - được chiếu sáng bằng đèn LED màu gồm 750 bóng nhỏ (gồm bóng cho ánh sáng xanh dương và bóng cho ánh sáng đỏ với tỉ lệ 1:2) mỗi bóng có công suất 0,05W tương đương với 716 lx.

Mỗi lô thí nghiệm gồm 30 cá thể nhộng. Sau 60 ngày nuôi cấy, chúng tôi xác định số lượng và kích thước thể quả phát triển trên giá thể nhộng.

Các chỉ tiêu theo dõi, đánh giá:

- + Thời gian hình thành mầm thể quả sau khi ra sáng (ngày)
- + Số lượng thể quả/con
- + Khối lượng thể quả/con (g)
- + Kích thước thể quả (mm)
- + Hình dạng thể quả
- + Màu sắc thể quả

2.5. Định lượng cordycepin

Theo phương pháp được mô tả trước đây với một số thay đổi nhỏ cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm [3]. Mẫu chuẩn: cordycepin (C3394, Sigma, Singapore) được hòa tan trong nước cất và pha loãng thành các nồng độ khác nhau bao gồm 5, 10, 12.5, 25, 50, và 100 µg /mL để lập đường chuẩn. Mẫu nghiên cứu (thể quả) được làm khô 1h tại 85°C,

sau đó nghiền thành bột. Hòa 1 g bột khô vào 20 mL nước cất và siêu âm 1h tại 50°C. Dem ly tâm tại 4000 rpm trong vòng 15 phút tại 4°C. Lấy dịch nổi, lọc qua màng lọc 0.45 µm và được dùng để tiêm vào hệ thống HPLC. Nồng độ cordycepin được định lượng bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC Agilent 1260 infinity. Cột phân tích: Cột RP C18 Eclipse plus C18 (4.6 x 250 mm, kích thước hạt 5 µm). Nhiệt độ cột duy trì ở 25°C. Pha động gồm nước cất và methanol (tiêu chuẩn HPLC) với tỷ lệ 87:13 (v/v). Tốc độ dòng: 1ml/phút. Detector UV-VIS, bước sóng 260 nm. Thể tích tiêm 10 µL.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý trên phần mềm Iristat 4.0. Kết quả được trình bày dưới dạng trung bình ± SD. So sánh được sử dụng theo phương pháp t-student.

3. Kết quả

3.1. Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin thể quả nấm *Cordyceps militaris*

Khảo sát về tính thích hợp của hệ thống HPLC tại phòng thí nghiệm

- Độ chọn lọc - đặc hiệu

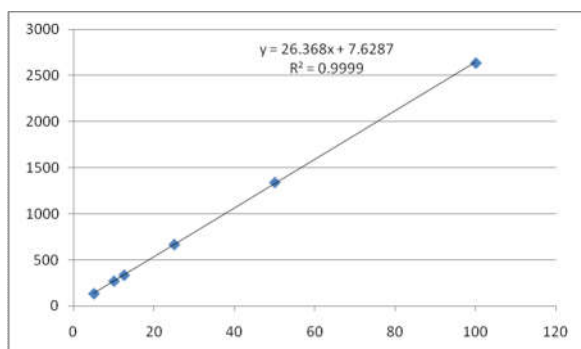
Tiến hành phân tích mẫu chuẩn cordycepin có nồng độ 10 µg/mL, mẫu trắng và mẫu thử. Trên sắc ký đồ mẫu trắng, tại vị trí tương ứng với thời gian lưu của cordycepin (14.60 phút) không xuất hiện pic như ở mẫu chuẩn. Các pic của chất phân tích trong mẫu thử tách hoàn toàn khỏi pic tạp. Như vậy, phương pháp có tính chọn lọc tốt và độ đặc hiệu cao.

- Độ tuyến tính

Pha một dãy dung dịch chuẩn cordycepin có nồng độ khoảng 5 - 100 µg/ml, và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã lựa chọn (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của cordycepin

Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	5	10	12,5	25	50	100
Diện tích pic (mAU*s)	134.2	270.8	334.2	667.5	1341.2	2637.4
Phương trình hồi quy: $y = 26.368x + 7.6287$ $R^2=0.9999$						



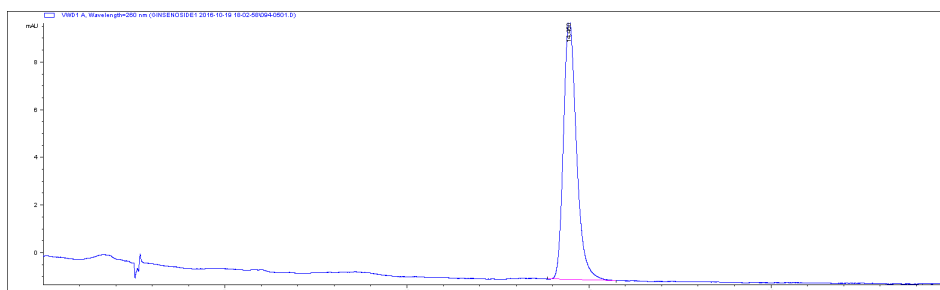
Hình 1. Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic của cordycepin.

Kết quả cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ cordycepin trong khoảng khảo sát với hệ số tương quan $R^2 \sim 1$, đáp ứng yêu cầu của đường chuẩn trong phân tích định lượng.

- Độ đúng

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng cordycepin

Nồng độ biểu kiến ($\mu\text{g/ml}$)	TRONG NGÀY (n=3)			KHÁC NGÀY (n=3)		
	Nồng độ ngoại suy ($\mu\text{g/ml}$)	Độ đúng (%)	RSD (%)	Nồng độ ngoại suy ($\mu\text{g/ml}$)	Độ đúng (%)	RSD (%)
5	5.02 ± 0.03	102.0	2.94	4.98 ± 0.015	98.6	1.53
50	50.01 ± 0.13	100.02	0.32	49.89 ± 0.76	99.22	1.95
100	99.66 ± 0.62	99.66	0.62	99.32 ± 1.12	98.32	1.15



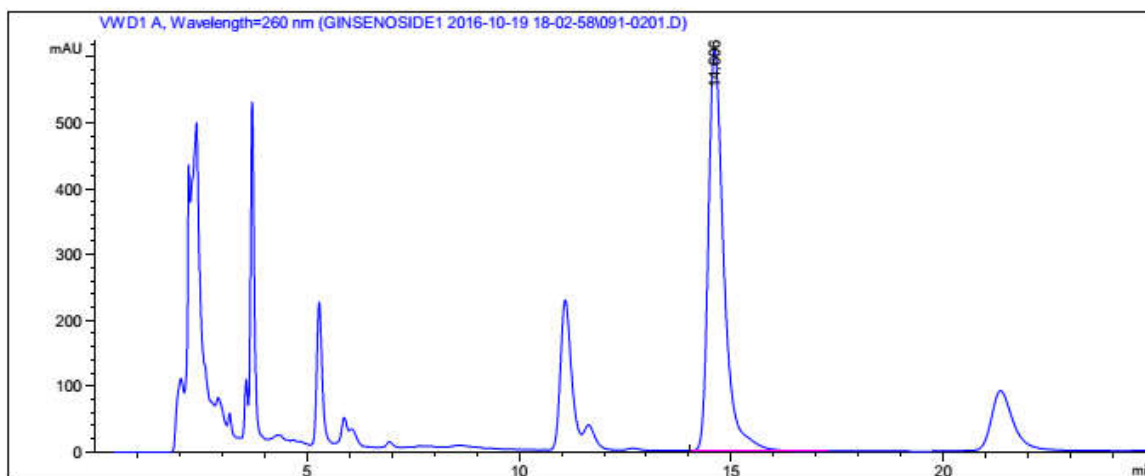
Hình 2. Sắc ký đồ HPLC của mẫu chuẩn cordycepin.

Xác định độ đúng dựa vào phân tích mẫu kiểm soát ở các nồng độ khác nhau trong đường chuẩn: 5,0 $\mu\text{g/ml}$, 50,0 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$. Chuẩn bị 3 dãy mẫu kiểm soát. Xác định độ đúng là tỷ lệ % giữa nồng độ ngoại suy từ đường chuẩn so với nồng độ thực tế (Bảng 2).

Kết quả cho thấy: ở điều kiện trong ngày và khác ngày, độ đúng của phương pháp đều đạt > 98.6%. Độ lặp lại trong ngày và khác ngày của phương pháp được xác định với hệ số RSD nhỏ.

- Giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ

Dựa vào độ nhiễu đường nền của mẫu trắng và đường chuẩn để ngoại suy giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của cordycepin. Tiến hành pha thử 4 - 5 nồng độ quanh điểm dự kiến. Kết quả cho thấy: giới hạn phát hiện của cordycepin là 0,1 $\mu\text{g/ml}$; giới hạn định lượng dưới của cordycepin là 0,4 $\mu\text{g/ml}$.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu thử.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng, phát triển và hình thành thể quả của nấm *Cordyceps militaris* trên nhộng tằm

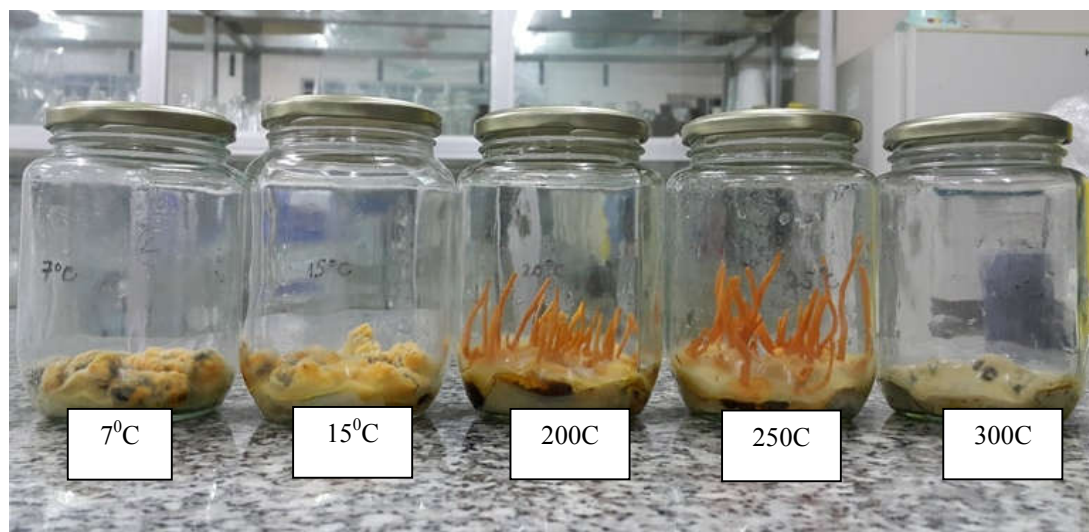
Sau 2 tháng tiến hành thí nghiệm, kết quả thể hiện trong bảng 3 và hình 4.

Dựa vào kết quả ở bảng 3 và hình 4, kết hợp với theo dõi quá trình hình thành thể quả, nhận thấy: ở 7°C và 15°C nhiệt độ quá thấp, hệ sợi nấm chuyển màu từ trắng sang vàng cam nhưng không hình thành mầm thể quả. Ở 30°C, sau 2 - 3 ngày ra sáng, hệ sợi nấm màu trắng chuyển

sang màu cam nhạt. Tuy nhiên, do nhiệt độ cao không thích hợp cho hệ sợi nấm sinh trưởng và phát triển, hệ sợi nấm bị chết, không hình thành mầm thể quả. Nhiệt độ môi trường nuôi 20°C, 25°C thích hợp cho hệ sợi nấm sinh trưởng, phát triển và hình thành thể quả, sau 2 - 3 ngày ra sáng, hệ sợi nấm chuyển màu, thời gian hình thành mầm thể quả ở 25°C nhanh hơn ở 20°C. Kích thước, khối lượng trung bình thể quả của nấm *C. militaris* khi nuôi ở nhiệt độ 25°C cũng lớn hơn khi nuôi ở 20°C.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự sinh trưởng, phát triển của nấm *Cordyceps militaris* trên nhộng tằm

Các chỉ tiêu theo dõi	Nhiệt độ (°C)				
	7	15	20	25	30
Thời gian hình thành mầm thể quả sau khi ra sáng (ngày)	-	-	8 - 10	6 - 8	-
Số lượng thể quả/con	-	-	4,63±0,25	4,75±0,10	-
Khối lượng thể quả/con (g)	-	-	1,4±0,03	1,72±0,04	-
Kích thước thể quả (mm)	-	-	26,48±0,04x2±0,02	27,56±0,03x2±0,02	-
Hình dạng thể quả	-	-	Hình trụ đôi khi phân nhánh	Hình trụ đôi khi phân nhánh	-
Màu sắc thể quả	-	-	Vàng sậm	Vàng sậm	-



Hình 4. Thể quả nấm *C. militaris* trên nhộng tằm ở các dải nhiệt độ khác nhau.

Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin trong thể quả nấm *Cordyceps militaris*

Phân tích hàm lượng cordycepin của thể quả mẫu nấm *C. militaris* nuôi cấy tạo thể quả ở 20°C và 25°C. Kết quả được trình bày ở bảng 4 cho thấy tại 25°C thì thể quả cho hàm lượng cordycepin cao hơn, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tại nhiệt độ 20°C

Bảng 4. Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin

	20°C	25°C
Hàm lượng Cordycepin	1,13 ± 0,17 mg/g	4,79 ± 0,26 mg/g*

*: khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

3.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng, phát triển và hình thành thể quả của nấm *Cordyceps militaris* trên nhộng tằm

Sau khi nuôi cấy nhộng trong điều kiện không được chiếu sáng (4-5 ngày), hệ sợi của nấm *C. militaris* đã phát triển tốt trên giá thể này (hình 5).

Số lượng, kích thước trung bình và các chỉ tiêu theo dõi của thể quả của nấm *C. militaris* ở hai lô thí nghiệm được trình bày trên bảng 5 và hình 6.



Hình 5. Hệ sợi của nấm *C. militaris* phát triển trên giá thể nhộng trong điều kiện không được chiếu sáng.

Bảng 5. Ảnh hưởng của ánh sáng đèn compact và ánh sáng đèn led trắng lên sự hình thành thể quả của nấm *C. militaris* trên nhộng tằm

Các chỉ tiêu theo dõi	Ánh sáng đèn compact	Ánh sáng đèn led trắng
Thời gian hình thành mầm thể quả	6 - 8	6 - 8
Số lượng thể quả/lọ	4,70 ± 0,02	3,82 ± 0,27
Khối lượng thể quả/lọ	1,74 ± 0,18	1,35 ± 0,60
Kích thước thể quả (dài x rộng)	(26,87 ± 0,23) x (2 ± 0,02)	(21,46 ± 0,54) x (2 ± 0,03)
Hình dạng thể quả	Hình trụ, đôi khi phân nhánh	Hình trụ, đôi khi phân nhánh
Màu sắc thể quả	Vàng sậm	Vàng nhạt



Hình 6. Thể quả nấm *C. militaris* trên nhộng tằm dâu khi nuôi trồng trong điều kiện ánh sáng đèn compact và ánh sáng đèn led trắng.

Theo kết quả thu được trên bảng 5 và hình 6, lô thí nghiệm gồm các bình được chiếu sáng bằng đèn compact cho kết quả tốt hơn so với lô còn lại được chiếu sáng bằng đèn led trắng cả về hiệu suất, kích thước và khối lượng thể quả.

Sự khác biệt về kích thước thể quả trong hai điều kiện chiếu sáng khác nhau được trình bày trên hình 7.

4. Phân tích hàm lượng cordycepin của thể quả mẫu nấm *C. militaris*

Tiến hành phân tích hàm lượng cordycepin của thể quả mẫu nấm *C. militaris* nuôi cấy tạo thể quả của lô 1 và lô 2. Kết quả được trình bày ở bảng 6. Kết quả cho thấy lô 1 thì thể quả cho hàm lượng cordycepin cao hơn, và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với lô 2.

Bảng 6. Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin

	Lô 1 (Ánh sáng đèn compact)	Lô 2 (Ánh sáng đèn LED)
Hàm lượng cordycepin	4,54 ± 0,21 mg/g*	0,98 ± 0,13 mg/g

* khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Từ những kết quả thu được ở trên, chúng tôi xác định được loại ánh sáng thích hợp cho

sinh trưởng của nấm *C. militaris* là ánh sáng từ đèn compact.

5. Bàn luận

C. militaris từ lâu đã được sử dụng trong y học cổ truyền ở châu Á nhờ có các tác dụng sinh học đa dạng như chống ung thư, tăng cường và điều hòa hệ miễn dịch, chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn... do sự có mặt của các hoạt chất như cordycepin. Thể quả của *C. militaris* trong tự nhiên rất đắt, vì đặc điểm vật chủ của nấm *C. militaris* rất đặc hiệu và hiếm gặp trong tự nhiên. Nấm *C. militaris* phát triển rất chậm trong tự nhiên, sự tăng trưởng có giới hạn và kích thước nhỏ. Rất khó để thu được một số lượng để có thể dùng làm thuốc hay thực phẩm chức năng. Nhộng tằm đã được sử dụng làm vật chủ cho nuôi cấy nấm *C. militaris* trong một số nghiên cứu [4]. Phương pháp tiêm cấy vào nhộng tằm cho thấy hiệu quả cao hơn các phương pháp khác như phun sấy hay nhúng [5]. Do đó, chúng tôi sử dụng phương pháp tiêm trong nghiên cứu của mình. Nhộng tằm khi bị tiêm cấy giống *C. militaris* chết trong vòng 2 ~ 3 ngày, trở nên cứng trong khoảng 7 ngày sau tiêm, và sau đó sản sinh thể quả. Thể quả trong tự nhiên của *C. militaris* có màu cam, hình trụ và dao động 2,5-4,5 cm chiều dài [6]. Kết quả của chúng tôi cho thấy thể quả cũng có các đặc điểm tương tự, cho thấy rằng nhộng tằm cũng có khả năng sản sinh ra thể quả của nấm *C. militaris* tương tự trong tự nhiên.

Đã có một số nghiên cứu được tiến hành nhằm tối ưu điều kiện nuôi cấy để cho nấm *C. militaris*. Hung và cs. đã đánh giá yếu tố nhiệt độ đến hàm lượng cordycepin của nấm *C. militaris* nuôi cấy trong các bình Erlenmeyer. Nhóm tác giả này cho thấy nhiệt độ 20°C - 25°C là nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của nấm *C. militaris* và cho hàm lượng cordycepin cao nhất trên sợi nấm và thể quả [7]. Nhiệt độ 30°C ức chế sự sinh trưởng của nấm, do đó ngăn cản quá trình sinh tổng hợp cordycepin. Kết quả của chúng tôi cũng tương tự của nhóm tác giả này, cho thấy nhiệt độ 25°C là nhiệt độ tối ưu cho nuôi cấy nấm *C. militaris*.



Hình 7. Kích thước thể quả của nấm *C. militaris* NBRC 100741 trên giá thể nhộng trong các điều kiện chiếu sáng khác nhau. Lô1 - điều kiện chiếu sáng bằng đèn compact; Lô2 - điều kiện chiếu sáng bằng đèn LED (gồm tỉ lệ màu: xanh dương: đỏ là 1:2).

Một số nghiên cứu khác đã được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của ánh sáng đến sinh trưởng của nấm *C. militaris* trên giá thể tự nhiên và nhân tạo [8-11]. Kết quả của các nghiên cứu này cho thấy rằng ánh sáng có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và phát triển của nấm *C. militaris* đồng thời cũng có ảnh hưởng đến hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học có trong thể quả của nấm *C. militaris*. Theo Dong và cs, ánh sáng có màu hồng (gồm 1/3 ánh sáng có bước sóng 450 - 460 nm và 2/3 ánh sáng có bước sóng 650 - 660 nm) cho thể quả có kích thước lớn hơn và hàm lượng cordycepin nhiều

hơn so với ánh sáng xanh dương (xanh blue) hoặc ánh sáng đỏ [9].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của Dong và cs [9]. Đèn compact tạo ra ánh sáng trắng có bước sóng kết hợp giữa bước sóng của tia tử ngoại (400 - 450 nm) và ánh sáng nhìn thấy được (600 - 700 nm), do đó cho kết quả sinh trưởng, phát triển và hình thành thể quả của nấm *C. militaris* cao hơn so với ánh sáng từ đèn LED phối hợp hai loại ánh sáng màu xanh dương và ánh sáng màu đỏ với tỉ lệ tương ứng là 1:2.

6. Kết luận

Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu và tạo thể quả trên nhộng tằm tốt nhất ở 24-26°C, ở nhiệt độ này cho kết quả hình thành thể quả tốt nhất và hàm lượng cordycepin trong thể quả là cao nhất so với các dải nhiệt độ khác. Trong nuôi cấy *C. militaris* nếu sử dụng ánh sáng từ đèn compact thì thu được kết quả sinh trưởng tốt hơn so với khi sử dụng ánh sáng từ đèn LED có pha trộn giữa hai loại ánh sáng màu xanh dương và ánh sáng màu đỏ với tỉ lệ tương ứng là 1:2 do thu được số lượng và kích thước thể quả cao hơn, cũng như hàm lượng cordycepin cao hơn.

Lời cảm ơn

Đề tài được tài trợ bởi Chương trình Khoa học và Công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Bắc, ĐHQGHN, mã số đề tài: KHCN-TB.03C/13-18.

Tài liệu tham khảo

- [1] Kobayashi Y. The genus *Cordyceps* and its allies. *Sci Rep Tokyo Bunrika Daigaku Sect B* 5((1941) 53.
- [2] Sung J-M, Choi Y-S, Lee H-K, Kim S-H, Kim Y-O, Sung G-H. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *The Korean Journal of Mycology* 27(1) (1999) 15.
- [3] Mao X-B, Eksriwong T, Chauvatcharin S, Zhong J-J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry* 40(5) (2005) 1667.
- [4] Hong I-P, Kang P-D, Kim K-Y, Nam S-H, Lee M-Y, Choi Y-S, *et al.* Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology* 38(2) (2010) 128.
- [5] Chen R, Ichida M. Infection of the silkworm, *Bombyx mori*, with *Cordyceps militaris*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 71(1) (2002) 61.
- [6] Sung J. The insects-born fungus of Korea in color. (1996).
- [7] Hung L, Keawsompong S, Hanh V, Sivichai S, Hywel-Jones N. Effect of temperature on cordycepin production in *Cordyceps militaris*. *Thai J Agric Sci* 42(2) (2009) 219.
- [8] Yi ZL, Huang WF, Ren Y, Onac E, Zhou GF, Peng S, *et al.* LED lights increase bioactive substance at low energy cost in culturing fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Scientia Horticulturae* 175((2014) 139.
- [9] Dong JZ, Lei C, Zheng XJ, Ai XR, Wang Y, Wang Q. Light wavelengths regulate growth and active components of *Cordyceps militaris* fruit bodies. *J Food Biochem* 37((2013) 578.
- [10] Chen YS, Liu BL, Chang YN. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruiting body growth in rice grain-based cultivation. *Korean J Chem Eng* 28(3) (2011) 875.
- [11] Dong JZ, Liu MR, Lei C, Zheng XJ, Wang Y. Effects of selenium and light wavelengths on liquid culture of *Cordyceps militaris* Link. *Applied biochemistry and biotechnology* 166(8) (2012) 2030.

Study the Effect of Temperature and Light on Growth, Fruiting Body and Cordycepin Production by *Cordyceps Militaris* NBRC 100741 on Silkworm

Pham Thi Lan, Do Hai Lan, Nguyen Thi Hong Hanh,
Bac Thi Thu, Pham Van Nha

Faculty of Biochemistry, Tay Bac University, Quyet Tam District - Son La City, Vietnam

Abstract: *Cordyceps militaris* (L.) Link is widely used as a folk medicine in Asia due its many pharmacological functions. Cultivation of *C.militaris* is extensively studied. Temperature and light are

an important factor for the growth, fruiting body and cordycepin production by *Cordyceps militaris*. In this study, the temperature and light conditions for the *Cordyceps militaris* NBRC 100741 strain on silkworm was evaluated on growth, fruiting body and the production of cordycepin. Our results showed that optimum temperature for growth, fruiting body and cordycepin production of *C.militaris* was 25°C. The light from compact fluorescent light (20W power, equivalent to 350 lx), 12 h light/dark cycle conditions is better for growth, fruiting body and cordycepin production than light-emitting diode (LED) blue and red light (750 lightbulbs, each bulb 0,05W power, equivalent to 716 lx) in terms of size and amount of fruiting bodies. The cordycepin content in the fruiting body under light from compact fluorescent light was 4.54 mg/g.

Keywords: *Cordyceps militaris*, silkworm, temperature, light, fruit body.