

Nghiên cứu môi trường nuôi trồng tạo stroma nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*)

Nguyễn Thị Ngọc Sương*, Trần Minh Mẫn, Nguyễn Đỗ Thanh Phương

Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao

Ngày nhận bài 22/6/2016, ngày chuyển phản biện 30/6/2016, ngày nhận phản biện 11/8/2016, ngày chấp nhận đăng 15/8/2016

Trong nghiên cứu này, nấm *Cordyceps militaris* được sử dụng là chủng CM3 được lưu trữ trong bộ sưu tập của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao. Kết quả thu được khi nghiên cứu trên 9 môi trường cho thấy môi trường tối ưu nhất là M9 (có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml). Trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma thu được ở môi trường M9 có kết quả lần lượt là 19,54 g/bình, 3,8404 g/bình, 70,3 stroma/bình. Hàm lượng một số hoạt chất chủ yếu có trong stroma đã được xác định, bao gồm cordycepin (7,7551 mg/g), adenosine (2,0027 mg/g), polysaccharide (166,20 mg/g), ergosterol (1,7369 mg/g).

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, môi trường nuôi trồng thích hợp.

Chỉ số phân loại 4.6

A study into stroma cultivation medium of *Cordyceps militaris*

Summary

In this study, *Cordyceps militaris* strain CM3 stored in the collection of Research and Development Center for High Technology Agriculture was used. 9 media for *C. militaris* cultivation were investigated, and the optimal cultivation medium was found as M9 which consisted of the following components: brown rice 60 g, silkworm pupae 10 g, CaCl_2 0.1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, distilled water 90 ml; this medium is suitable for stroma production of *C. militaris*. Fresh weight, dry weight, and the number of stroma reached 19.54 g/bottle, 3.8404 g/bottle, 70.3 stroma/bottle, respectively. Biologically active substance contents of *Cordyceps militaris* stroma are adenosine (2.0027 mg/g), cordycepin (7.7551 mg/g), polysaccharide (166.20 mg/g), ergosterol (1.7369 mg/g).

Keywords: *Cordyceps militaris*, cultivation medium.

Classification numbers 4.6

Đặt vấn đề

Nhộng trùng thảo là loài nấm thuộc chi nấm *Cordyceps* (Fr.) Link thuộc lớp Ascomycetes, được tìm thấy trên ấu trùng, côn trùng trưởng thành. *Cordyceps* có một lịch sử lâu đời như một loại nấm được liệu quý hiếm. Hầu hết người phương Tây chỉ biết đến *Cordyceps* trong vòng 20 năm gần đây, trong suốt khoảng thời gian này, các phương pháp khoa học hiện đại được ứng dụng mạnh mẽ để nghiên cứu phạm vi ứng dụng rộng rãi trong y học của nhóm nấm này [1]. Nấm *Cordyceps* được cho là có khả năng chống ung thư, chống di căn, chống oxy hóa, chống viêm, diệt khuẩn, hạ đường huyết, chống lão hóa, bảo vệ thần kinh và bảo vệ thận [2, 3], tăng cường hệ thống miễn dịch và ức chế khối u [4]. *Cordyceps* đã được thu mẫu và miêu tả trên 400 loài khác nhau ở các vùng khác nhau trên thế giới. Trong đó có nhiều loài được chú ý nhiều đến dược lý và dùng làm thuốc chữa bệnh với 2 loài chính là *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris*.

Hiện nay, Nhộng trùng thảo có nguồn gốc tự nhiên rất hiếm, giá rất cao, trong khi đó nhu cầu của con người ngày càng tăng. Do đó, cần có một nguồn cung cấp Nhộng trùng thảo số lượng lớn với chất lượng cao. Để đáp ứng yêu cầu này, mô hình công nghệ sản xuất Nhộng trùng thảo *in vitro* trên nguồn cơ chất sẵn có, dễ tìm, giá thành thấp đã được quan tâm nghiên cứu.

Cordyceps là dạng nấm ký sinh có thể nuôi cấy nhân tạo trên cơ thể côn trùng nhưng côn trùng có giá cao và

*Tác giả liên hệ: ngocsuongnguyen10@gmail.com

không có nguồn cung liên tục [5], thêm vào đó thao tác trên côn trùng khó và dễ nhiễm khuẩn nên những chất hữu cơ thay thế được nghiên cứu và thử nghiệm cho việc sản xuất thương mại stroma *C. militaris*. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định môi trường nuôi trồng thích hợp cho Nhộng trùng thảo, từ đó ứng dụng vào sản xuất tạo ra một lượng lớn stroma Nhộng trùng thảo trong thời gian ngắn, với chi phí thấp nhưng chất lượng cao.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: *C. militaris* CM3 thuộc bộ sưu tập giống vi sinh vật của Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nông nghiệp công nghệ cao.

Môi trường thí nghiệm có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, nước cất 90 ml có bổ sung chất khoáng 0,1 g/l và vitamin 5 µg/l. Chất khoáng được sử dụng là KH_2PO_4 , MgSO_4 hoặc CaCl_2 . Vitamin được sử dụng là thiamin, biotin hoặc folic acid.

Các nghiệm thức bao gồm:

M0 (đối chứng): không bổ sung khoáng và vitamin;

M1: có bổ sung KH_2PO_4 + thiamin;

M2: có bổ sung KH_2PO_4 + biotin;

M3: có bổ sung KH_2PO_4 + folic acid;

M4: có bổ sung MgSO_4 + thiamin;

M5: có bổ sung MgSO_4 + biotin;

M6: có bổ sung MgSO_4 + folic acid;

M7: có bổ sung CaCl_2 + thiamin;

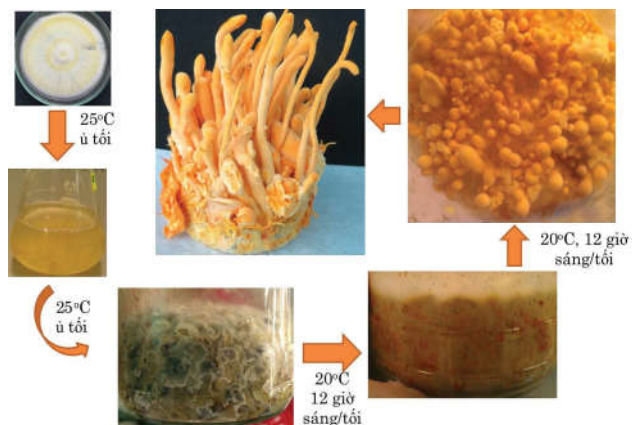
M8: có bổ sung CaCl_2 + biotin;

M9: có bổ sung CaCl_2 + folic acid.

C. militaris CM3 được nuôi cấy tĩnh trên môi trường PGB (potato glucose broth) trong 5 ngày ở nhiệt độ 25°C, ủ tối để tạo nguồn giống cho thí nghiệm. Môi trường PGB có thành phần gồm khoai tây 200 g/l, glucose 20 g/l.

Môi trường nuôi trồng được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 40 phút. Giống dạng lỏng được cấy vào môi trường cơ chất với lượng giống là 5 ml/bình. Các bình nuôi cấy được ủ ở nhiệt độ 25°C trong tối. Sau khi tơ phủ kín cơ chất, các mẫu thí nghiệm được nuôi trồng trong điều kiện 20°C, chu kỳ chiếu sáng 12

giờ sáng/tối, cường độ ánh sáng 700-1.000 lux, độ ẩm không khí 80-90%.



Sơ đồ: quy trình nuôi trồng *C. militaris*

Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu thập sau 50 ngày nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi là trọng lượng tươi (g/bình), trọng lượng khô (g/bình), số lượng stroma (stroma/bình), hàm lượng adenosine (mg/g), hàm lượng cordycepin (mg/g), hàm lượng ergosterol (mg/g) và hàm lượng polysaccharide (mg/g).

Trọng lượng tươi của stroma được ghi nhận ngay sau khi stroma được lấy ra khỏi bình nuôi cấy. Stroma của từng bình được đem sấy khô ở nhiệt độ 50°C đến trọng lượng không đổi. Các chỉ tiêu này được thu nhận bằng cân phân tích có độ chính xác cao. Số lượng stroma được đếm là số stroma có chiều cao lớn hơn 3 cm.

Stroma được phân tích hàm lượng hoạt chất cordycepin, adenosine và ergosterol bằng phương pháp HPLC-DAD và hàm lượng polysaccharide bằng phương pháp so màu tại Viện Công nghệ hóa học (Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam).

Tất cả số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1.3.

Kết quả và thảo luận

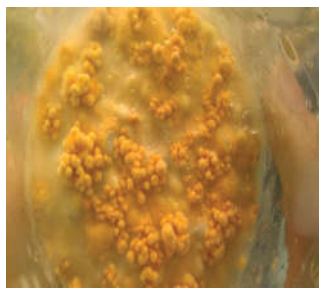
Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp

Ở nghiên cứu này, sau 50 ngày nuôi cấy stroma được thu hoạch. Tuy nhiên, chỉ có môi trường M2, M8, M9 tạo stroma rõ ràng. Các môi trường M0, M1, M3, M4, M5, M6, M7 tuy có tạo mầm stroma nhưng không tạo được stroma lớn. Sau khi phát triển đến chiều cao

hơn 1 cm, mầm stroma ở các công thức thí nghiệm này bị bao bọc bởi sợi nấm dày đặc và ngừng phát triển.



Hình 1: tơ nấm *C. militaris* phát triển trên môi trường gạo



Hình 2: mầm stroma hình thành trên môi trường gạo

Sau khi kết thúc thí nghiệm, stroma được cân đo trọng lượng tươi, trọng lượng khô và đếm số lượng stroma. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: ảnh hưởng của một số môi trường đến sự tạo thành stroma Nhộng trùng thảo (*C. militaris*)

Môi trường	FW (g/bình)	DW (g/bình)	FB	F (%)
M0 (đối chứng)	-	-	-	-
M1 (KH ₂ PO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M2 (KH ₂ PO ₄ + biotin)	11,78 ^c	2,3735 ^b	9,5 ^b	5,08
M3 (KH ₂ PO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M4 (MgSO ₄ + thiamin)	-	-	-	-
M5 (MgSO ₄ + biotin)	-	-	-	-
M6 (MgSO ₄ + folic acid)	-	-	-	-
M7 (CaCl ₂ + thiamin)	-	-	-	-
M8 (CaCl ₂ + biotin)	12,70 ^b	2,1666 ^b	8,9 ^b	4,64
M9 (CaCl ₂ + folic acid)	19,54 ^a	3,8404 ^a	70,3 ^a	8,23

Các trung bình cùng ký tự không khác biệt có nghĩa thống kê ở mức xác suất $p < 0,05$

FW: trọng lượng tươi của stroma trên một bình nuôi cấy;

DW: trọng lượng khô của stroma trên một bình nuôi cấy;

FB: số stroma trên một bình nuôi cấy;

F: tỷ lệ giữa trọng lượng khô của stroma và cơ chất = $DW \times 100 / 46,66$

Theo kết quả ở bảng 1, môi trường M9 (gạo và nhộng tằm bổ sung CaCl₂ và folic acid) có trọng lượng tươi, trọng lượng khô và số lượng stroma cao hơn các môi trường còn lại. Ở nghiên cứu này, kết quả chỉ thu được ở 3/9 nghiệm thức nên chưa thể nêu lên tác động của khoáng và vitamin đến sự hình thành và phát triển stroma Nhộng trùng thảo trên môi trường gạo và nhộng tằm.

Trong nghiên cứu của Kang và cs (2014), 1 bình môi trường gồm 20 g gạo và 32 ml dung dịch dinh dưỡng (10 g/l glucose, 10 g/l peptone, 1 g/l MgSO₄·7H₂O, 1 g/l K₂HPO₄ và 1 mg/l NAA, 1.000 ml nước cất, pH

6,0) trọng lượng khô stroma thu được là 1,73 g sau 60 ngày nuôi cấy. Hàm lượng cordycepin trong stroma cao nhất là 9,17 mg/g sau 72 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ trọng lượng khô của stroma và trọng lượng của gạo (cơ chất tạo stroma) là $F = 8,65\%$ [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, $F = 8,23\%$. Như vậy kết quả thu được không chênh lệch đáng kể so với nghiên cứu của Kang và cs (2014).

Số lượng stroma của môi trường M9 ở các bình dao động khá lớn (30-150 stroma). Những bình có số lượng stroma ít thì kích thước stroma to và dài. Những bình có số lượng stroma nhiều (trên 100) thì chỉ có một số stroma to, đa số là stroma nhỏ và ngắn. Số lượng stroma trung bình của môi trường M9 cao gấp 7-8 lần so với môi trường M2 và M8 nhưng trọng lượng khô và trọng lượng tươi chỉ cao gấp 1,5 lần.



Môi trường M2



Môi trường M8



Môi trường M9



Môi trường đối chứng



Stroma bị tơ nấm bao phủ

Hình 3: stroma của *C. militaris* hình thành trên môi trường nuôi trồng

Tuy stroma thu được có số lượng stroma to ít nhưng có một số ưu điểm là sau khi được sấy khô, stroma màu cam đậm, cứng và đặc ruột. Một số sản phẩm

Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có một số đặc tính cảm quan như: nhỏ và mềm; to, mềm và rỗng ruột, màu vàng nhạt. Như vậy, có thể xem đây là sản phẩm vượt trội hơn về mặt cảm quan.



Hình 4: stroma *C. militaris* khô thu được từ thí nghiệm

Một số hoạt chất sinh học trong stroma Nhộng trùng thảo

Stroma khô sau khi thu hoạch được phân tích tại Viện Công nghệ hóa học để khảo sát hàm lượng một số hoạt chất có trong stroma nhằm đánh giá sơ bộ chất lượng. Kết quả thu được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: hàm lượng một số hoạt chất sinh học có trong stroma và môi trường nuôi trồng Nhộng trùng thảo (*C. militaris*)

Tên hoạt chất	Hàm lượng (mg/g)
Cordycepin	7,7551
Adenosine	2,0027
Polysaccharide	166,20
Ergosterol	1,7369

Kết quả thu được cho thấy hàm lượng các hoạt chất cordycepin, adenosine, polysaccharide, ergosterol có trong stroma *C. militaris* CM3 trên môi trường M9 tương đối cao. Trong nghiên cứu của Lo và cs (2013), hàm lượng adenosine trong stroma *C. militaris* là $2,45 \pm 0,03$ mg/g [7]. Theo nghiên cứu của Hur (2008), hàm lượng adenosine trong stroma là 1,8 mg/g và trong hệ sợi nấm là 0,6 mg/g; hàm lượng cordycepin trong stroma là 9,7 mg/g và trong hệ sợi nấm là 3,6 mg/g [8]. Theo nghiên cứu của Kang và cs (2014), hàm lượng cordycepin là 9,17 mg/g, adenosine là 1,21 mg/g [6]. Còn theo Zhoua và cs (2009), hàm lượng ergosterol trong stroma nhân tạo của *Cordyceps* rất cao (10,68 mg/g) [9]. Tuy nhiên, một số sản phẩm Nhộng trùng thảo trên thị trường Việt Nam có hàm lượng cordycepin là 2,9 mg/g; hàm lượng adenosine là 0,43 và 1,1 mg/g. Như vậy, stroma thu được từ nghiên cứu này có hàm

lượng hoạt chất chưa cao bằng một số nghiên cứu trên thế giới nhưng không thua kém một số sản phẩm Nhộng trùng thảo Việt Nam.

Kết quả thu được ở nghiên cứu này là đã tạo được stroma trên môi trường nhân tạo năng suất tương đối cao nhưng hàm lượng hoạt chất chưa cao. Vì vậy cần có nghiên cứu tiếp về phương pháp làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhằm làm tăng giá trị kinh tế của sản phẩm.

Kết luận

- Môi trường thích hợp cho nuôi trồng Nhộng trùng thảo có thành phần gồm gạo lức 60 g, nhộng tằm 10 g, CaCl_2 0,1 g/l, folic acid 5 $\mu\text{g/l}$, nước 90 ml. Stroma thu được có trọng lượng tươi là 19,54 g/bình, trọng lượng khô là 3,8404 g/bình và số lượng stroma là 70,3 stroma/bình.

- Hàm lượng một số hoạt chất có stroma Nhộng trùng thảo là cordycepin 7,7551 mg/g, adenosine 2,0027 mg/g, polysaccharide 166,20 mg/g, ergosterol 1,7369 mg/g.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. Holliday, M. Cleaver, S.P. Wasser (2005), "Cordyceps", *Encyclopedia of dietary supplements*, pp.1-13.
- [2] M.G. Shashidhara, P. Giridhara, S.K. Udaya, B. Manohar (2013), "Bioactive principles from *Cordyceps sinensis*: A potent food supplement - A review", *Journal of Functional foods*, **5**(3), pp.1013-1030.
- [3] R. Yu, L. Song, Y. Zhao, W. Bin, L. Wang, H. Zhang, Y. Wu, W. Ye, and X. Yao (2004), "Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured *Cordyceps militaris*", *Fitoterapia*, **75**, pp.465-472.
- [4] Z.Z. Zhao, J.P.S. Yuen, J.L. Wu, et al (2006), "A systematic study on confused species of Chinese Materia Medica in the Hong Kong market", *Ann Acad Med Singap*, **35**, pp.764-769.
- [5] Q.Y. Lin, Y.J. Zhong, T.H. Li et al (2006), "Recent research advances in *Cordyceps* biology", *Acta Edulis Fungi*, **13**(2), pp.93-98.
- [6] J.C. Kang, T.C. Wen, G.R. Li, C. Kang and K.D. Hyde (2014), "Optimization of solid-state fermentation for fruiting body growth and cordycepin production by *Cordyceps militaris*", *Chiang Mai J. Sci.*, **41**(4), pp.858-872.
- [7] H.C. Lo, H. Chienyan, Y.L. Fang and T.H. Hsu (2013), "A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in DongChong XiaXao and Relates Bioactive ingredients", *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, **3**(1), pp.16-32.
- [8] H. Hur (2008), "Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*", *Mycobiology*, **36**(4), pp.233-235.
- [9] X. Zhoua, Z. Gong, Y. Sua, J. Linb and K. Tang (2009), "Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **61**(3), pp.279-291.