



XÂY DỰNG QUY TRÌNH NUÔI TRỒNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*CORDYCEPS MILITARIS*) TRÊN GIÁ THỂ NHỘNG TẦM (*BOMBYX MORI*)

Establishing the Process for Cultivating *Cordyceps militaris* on *Bombyx mori*

Nguyễn Thị Hồng Nghi^{1a*}, Nguyễn Thị Huệ^{2,b}, Đoàn Thị Tuyết Lê^{3,c}

¹Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

²Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

³Khoa Kỹ thuật Hóa học và Môi trường, Trường Đại học Lạc Hồng, Đồng Nai, Việt Nam

^aNguyennghi1408@gmail.com, ^bNguyenhue11101995, ^ctuyetledt@gmail

TÓM TẮT. *Cordyceps militaris* (*C. militaris*) là loài nấm ký sinh trên sâu non, nhộng 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 xây dựng được quy trình nuôi trồng ĐTHT (Đông trùng hạ thảo) trên giá thể nhộng tằm (*Bombyx mori*) từ đó đáp ứng được nhu cầu về ĐTHT trên thị trường. Giống được tiêm 0,1ml vào phần đầu của nhộng sau khi cắt kén. Sau khi tiêm, đặt nhộng vào 3 hộp nhựa nuôi cấy T0 (không lót giấy), T1 (lót giấy không bổ sung dinh dưỡng), T2 (lót giấy và bổ sung dinh dưỡng) sau đó đậy nắp lại. Điều kiện nuôi cấy cho hệ sợi nấm phát triển, hình thành quả thể là ở nhiệt độ 20 – 25 °C, thời gian chiếu sáng 12h sáng/12h tối và độ ẩm không khí là 65 - 85%. Kết quả cho thấy T1 (lót giấy nhưng không bổ sung dinh dưỡng) cho hiệu quả nhiễm nấm cao nhất, hệ sợi nấm phát triển tốt (12 ngày) và thời gian xuất hiện quả thể nhanh (15 ngày). Hàm lượng cordycepin của quả thể nấm sau 45 ngày nuôi cấy đạt 0,523mg/g.

TỪ KHOÁ: *Cordyceps militaris*; nhộng tằm; điều kiện nuôi cấy; quả thể nấm; môi trường dịch thể; cordycepin

ABSTRACT. *Cordyceps militaris* is a parasitic fungus in insects or pupae with valuable medicinal value and high economic value, thus overexploitation leads to scarcity in nature. This study was conducted to develop the culture of *C. militaris* on the silkworm (*Bombyx mori*), thus meets the demand for *C. militaris* in the market. The strain was injected with 0.1 ml of the head of the pupa after the cocoon was cut. After injection, place the capsules in 3 culture methods T0 (without liner paper), T1 (liner paper without nutritional supplement), T2 (liner paper and nutritional supplement) and then cover. Cultivation conditions for mycelial growth system, fruit development at 20-25 °C, lighting time 12h/12h and air humidity 65 - 85%. The results of T1 (liner paper without nutritional supplement) with the highest efficiency for fungal infections. The yarn was well-developed (12 days) and the appearance of fruit was fast (15 days). Cordycepin content after 45 days cultured was 0,523 mg /g.

KEYWORDS: *Cordyceps militaris*; *Bombyx mori*; culture conditions; mushroom fruit; secondary culture medium; cordycepin

1. GIỚI THIỆU

Từ lâu nấm dược liệu đã trở thành một phần quan trọng của văn hoá và nền văn minh nhân loại, đặc biệt là các loài thuộc giống *Cordyceps* được đánh giá cao do chúng chứa nhiều dược chất [1]. Trong đó, loài *C. militaris* chứa hàm lượng các hoạt chất có hoạt tính sinh học cao như cordycepin, mannitol, axit amin, adenosine, ... và nhiều thành phần khác. Đồng thời loài này dễ dàng nuôi trồng thành công trong môi trường nhân tạo [2, 3]. Do chứa nhiều dược chất quý nên nấm đông trùng hạ thảo (ĐTHT) rất tốt cho cơ thể, giúp điều trị và bồi bổ cho các hệ thống miễn dịch, tiêu hóa, tuần hoàn, thần kinh, hô hấp và hệ sinh dục của cơ thể [4, 5, 6]. Với giá trị dược liệu cao, nấm ĐTHT ngoài tự nhiên đang bị khai thác quá mức dẫn đến cạn kiệt ki khan hiếm và giá cả vô cùng đắt đỏ. Vì thế, việc phát triển các nghiên cứu về nuôi trồng nấm ĐTHT 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 tầng lớp người tiêu dùng có thể tiếp cận đến sản phẩm cho việc chăm sóc sức khỏe là rất cần thiết. Mục tiêu của nghiên cứu này là xây dựng quy trình nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên giá thể nhộng tằm đạt hiệu quả cao. Tính mới của nghiên cứu này được thể hiện ở thời gian nuôi cấy ĐTHT trên giá thể nhộng tằm ngắn ngày (45 ngày), tiết kiệm và kinh

tế hơn nhưng vẫn giữ được dược tính vốn có cao và quy trình dễ thực hiện.

2. NỘI DUNG

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Giống Đông trùng hạ thảo: Giống *Cordyceps militaris* được cung cấp bởi Công ty TNHH Đà Lạt HQ farm tại địa chỉ 23/2, Quang Trung – P.9 – Tp. Đà Lạt – T. Lâm Đồng.

Các loại nguyên liệu: Khoai tây, agar, peptone, cao nấm men, glucose (các nguyên liệu được sản xuất tại Việt Nam). Nhộng tằm do cơ sở nhộng tằm Kinh Thành tại địa chỉ 37/7 Phan Đăng Lưu, Phường 1, TP. Bảo Lộc cung cấp.

Các chất khoáng và vitamin: MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄.

Các thiết bị được dùng trong nghiên cứu này gồm: Tủ cấy vi sinh, phòng nuôi cấy có thiết bị điều hòa, máy lạnh, kim tiêm dùng một lần, hệ thống đèn.

Received: Month, day, year

Accepted: Month, day, year

*Nguyễn Thị Hồng Nghi

Email: Nguyennghi1408@gmail.com

2.2 Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm Đông trùng hạ thảo (*C. Militaris*) trong giai đoạn nhân giống cấp I

Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng (môi trường thạch):

Tiến hành nuôi cấy nấm trên 5 loại môi trường khác nhau, thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, mỗi 1 công thức làm 3 đĩa petri.

P0: PDA

P1: PDA cải tiến

P2: PDA cải tiến + 5% bột nhộng tằm

P3: PDA cải tiến + 10% bột nhộng tằm

P4: PDA cải tiến + 15% bột nhộng tằm

P5: PDA cải tiến + 20% bột nhộng tằm

PDA (Potato dextrose agar) cải tiến: 200g/l khoai tây + 20g/l dextrose + 20g/l agar + 0,1g/l KH_2PO_4 + 0,1g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, pH = 5,5 hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 30 phút.

Nuôi cấy trong 15 ngày:

+ Ánh sáng: tối hoàn toàn

+ Độ ẩm: 65 - 75%.

+ Nhiệt độ: 18-20°C

Chỉ tiêu theo dõi:

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

Hình thái hệ sợi: Màu sắc hệ sợi nấm, quan sát bằng mắt thường và đánh giá màu sắc của 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 Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trong giai đoạn nhân giống cấp II

Chuẩn bị môi trường lỏng:

Mỗi thí nghiệm được bố trí như sau: 1 công thức/2 lọ. Trong thí nghiệm này khảo sát 2 nguồn dinh dưỡng hữu cơ khác nhau được chia như sau:

• L1: 20g/l glucose + **5g/l peptone** + **5g/l cao nấm men** + 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,25g/l KH_2PO_4 . pH=6

• L2: 20g/l glucose + **5g/l bột đậu nành** + 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,25g/l KH_2PO_4 . pH=6

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 30 phút.

Nuôi cấy:

Chai giống sau khi cấy được lắc với chế độ 200 vòng/phút. Thời gian nuôi giống 7 ngày.

Nhiệt độ: 22 - 25°C.

Chế độ ánh sáng: Không cần ánh sáng

Độ ẩm: 70 – 90%

Chỉ tiêu theo dõi:

Thời gian hình thành hệ sợi nấm: Được tính bằng thời gian để hệ sợi nấm hình thành. Đơn vị: ngày.

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

2.4 Nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển của nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên giá thể nhộng tằm (*Bombyx mori*)

Cách thức thực hiện:

Nhộng tằm được sử dụng nguyên kén để đảm bảo tránh lây nhiễm vi sinh vật trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

Chuẩn bị giá thể nhộng tằm: Dùng dao phẫu thuật nhỏ rạch 1 đường bên ngoài kén tằm (không mạnh tay tránh làm tằm bị thương) thu lấy nhộng tươi trong tủ cấy vô trùng.

Giống *C. militaris* được tiêm vào phần đầu của nhộng trong điều kiện vô trùng. Thể tích giống tiêm cho một cơ thể nhộng sống là 0,1ml. Sử dụng kim tiêm vô trùng (đường kính kim 1,2mm), bơm tiêm dùng một lần (dung tích 5mL). Sau khi tiêm nhộng được đưa vào trong lọ như thí nghiệm.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí với 3 công thức tiếp giống khác nhau, thí nghiệm lặp lại 3 lần, 1 công thức/ 3 con nhộng tằm. Tất cả được nuôi trong điều kiện hoàn toàn giống nhau.

T0: Đặt nhộng vào hộp nhựa không có lót giấy

T1: Đặt nhộng vào hộp nhựa có lót giấy nhưng không bổ sung dinh dưỡng

T2: Đặt nhộng vào hộp nhựa có lót giấy có bổ sung thêm nguồn dinh dưỡng bên dưới (nguồn dinh dưỡng dịch thể)

Chỉ tiêu theo dõi:

Thời gian phát triển của hệ sợi: Được tính bằng thời gian để hệ sợi phát triển kín toàn bộ thân nhộng. Đơn vị tính: Ngày

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

Tốc độ phát triển quả thể: Là chiều dài được tính từ bề mặt cơ chất đến đỉnh sinh trưởng của quả thể. Đơn vị tính: cm/ngày.

Năng suất sinh học: Là số g nấm khô thu được trên 100g cơ chất nuôi trồng. Đơn vị tính: gam (g)

Phân tích được tính: Dem nhộng đi phân tích sau 35 ngày nuôi cấy tại Trung tâm kỹ thuật tiêu chuẩn đo lường chất lượng 3

Điều kiện nuôi cấy:

Giai đoạn nuôi tơ:

+ Ánh sáng: tối hoàn toàn

+ Nhiệt độ: 18 – 20°C

+ Độ ẩm: 65-75%

Giai đoạn nảy chồi đến tạo quả thể:

+ Ánh sáng: 12h chiếu sáng

+ Nhiệt độ: 20 – 25°C

+ Độ ẩm: 75 – 90%

Phương pháp xử lý số liệu: Sử dụng các dụng cụ như thước đo, cân phân tích để xác định kích thước và trọng lượng của quả thể, đếm số lượng quả thể. Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2016 và Statgraphics Centurion XVI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm (*C. militaris*) trong giai đoạn nhân giống cấp I

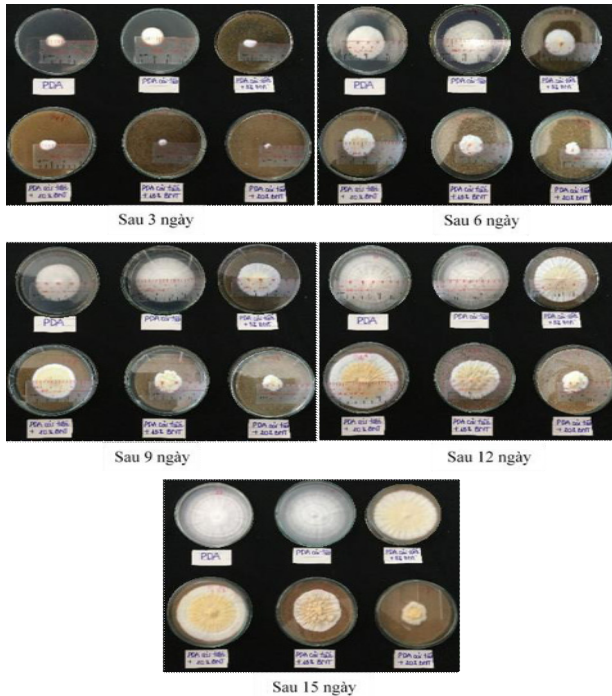
Ghi chú: (+): Mật độ sợi mỏng
 (++): Mật độ sợi trung bình
 (+++): Mật độ sợi dày
 KL: Không lan kín hết

Các mẫu tự khác nhau a, b, c, d... biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ bằng phép thử LSD

Bảng 1. Kết quả ĐHTH được nuôi cấy trong giai đoạn nhân giống cấp I

NT	Tốc độ phát triển hệ sợi (cm/ngày)	Mật độ hệ sợi	Thời gian lan kín mặt (ngày)
P0	0,48±0,01 ^{de}	++	12
P1	0,50±0,01 ^e	+++	10
P2	0,46±0,01 ^d	+++	13
P3	0,40±0,04 ^c	++	15
P4	0,36±0,02 ^b	+	KL
P5	0,19±0,01 ^a	+	KL

Từ kết quả Bảng 1 cho thấy trên cả 6 môi trường dinh dưỡng nấm đều sinh trưởng, phát triển. Tuy nhiên chúng có sự sai khác nhau về tốc độ lan tơ, thời gian lan kín mặt cũng như là hình thái hệ sợi. Yếu tố dẫn đến sự khác nhau là do thành phần dinh dưỡng. P0 có thành phần dinh dưỡng nghèo nên mật độ hệ sợi trung bình, P1 thêm khoáng nên nấm lan nhanh và ổn định hơn (lan kín mặt trong vòng 10 ngày). P2 và P3 có mật độ hệ sợi không chênh lệch nhau, nhưng giữa hai môi trường này nấm lại có xu hướng già hóa (chuyển vàng). Cuối cùng là P4 và P5 mật độ hệ sợi thấp, không thể lan kín bề mặt, có xu hướng chuyển sang vàng và xù bông lên.



Hình 1. Kết quả tốc độ lan tơ của ĐHTH

Bổ sung bột nhộng tằm dao động từ 5 – 10% là phù hợp với nhu cầu của nấm. Nấm phát triển trên môi trường PDA tốt vì đây là môi trường thông dụng để nuôi cấy nấm. Tuy nhiên Hư và cs vào năm 2008 đã chứng minh đối với ĐHTH thì điều đó vẫn chưa đạt được hiệu quả cao, nên khi bổ sung thêm khoáng K^+ , Mg^{2+} ở nồng độ thích hợp có thể làm tăng

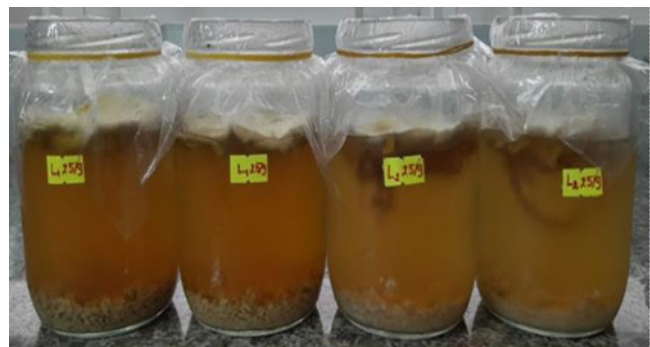
khả năng lan tơ [7]. Còn khi bổ sung vào 15% và 20% tốc độ lan tơ chậm rõ rệt, có xu hướng đi lên và không lan mạnh đó là do nấm *C. militaris* yêu cầu về hàm lượng nito tương đối thấp, nếu quá nhiều sẽ làm chậm quá trình lan tơ cũng như là biệt hóa. Như vậy, môi trường phù hợp cho nhân giống ĐHTH là môi trường P1 (PDA cải tiến) (Hình 1).

3.2 Kết quả sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trong giai đoạn nhân giống cấp II

Bảng 2. Đặc điểm của ĐHTH trong môi trường L1 và L2

Nghiệm thức	Thời gian hình thành hệ sợi nấm (ngày)	Đặc điểm dịch thể
L1	4	Dịch sánh, có sự liên kết giữa các hệ sợi mạnh, đồng thời cho ra lượng lớn sinh khối, màu vàng đậm
L2	6	Dịch sánh, có sự liên kết giữa các sợi nấm, tạo được sinh khối tốt, màu vàng nhạt.

Dựa vào kết quả có được ở Bảng 2 và Hình 2 cho thấy cả 2 môi trường dịch thể nấm đều sinh trưởng tốt, tuy nhiên chúng có sự sai khác nhau về thời gian tạo hệ sợi và đặc điểm dịch thể. Lý do dẫn đến sự khác nhau là do thành phần dinh dưỡng. Môi trường L1 có màu vàng đậm, dịch sánh, có sự liên kết giữa các hệ sợi, thời gian hình thành hệ sợi ngắn (4 ngày), trong khi L2 thời gian hình thành hệ sợi lâu hơn (6 ngày). Theo Shih và cs (2007), nguồn nito ảnh hưởng tới sự phát triển hệ sợi và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa và cao nấm men được xem là dinh dưỡng tối ưu nhất với hàm lượng sinh khối sợi lớn nhất (1,5 g/l), sau đó là peptone [8]. Bên cạnh đó khoáng cũng đóng vai trò thiết yếu trong quá trình sinh trưởng của sợi nấm dịch thể. Park và cs (2009) nhận định rằng nhóm hỗn hợp chứa KH_2PO_4 0,5 g/L và $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5g/l được xác định là tối ưu cho sợi nấm sinh trưởng [9]. Như vậy để rút ngắn được thời gian nuôi trồng nhưng vẫn đạt hiệu quả cao thì môi trường dịch thể L1 được cho là phù hợp.



Hình 2. Đặc điểm hệ sợi và màu sắc của ĐHTH trong môi trường L1 và L2

3.3 Kết quả nghiên cứu sự sinh trưởng, phát triển của nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) trên giá thể nhộng tằm (*Bombyx mori*)

Bảng 3. Đặc điểm của ĐHTH khi cấy vào thân nhộng tằm nguyên con

Môi trường	Thời gian mọc kín (ngày)	Thời gian xuất hiện mầm quả thể đầu tiên (ngày)
T0	11	17
T1	12	15
T2	12	16

Những nghiên cứu ban đầu được thực hiện với mục đích đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy trong chu kỳ sống của nấm *Bombyx mori* đến hình thành quả thể của nấm *C. militaris*. Các mẫu tự khác nhau a, b biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ bằng phép thử LSD.

Bảng 4. Kết quả của ĐHTH được nuôi cấy trên 3 môi trường khác nhau

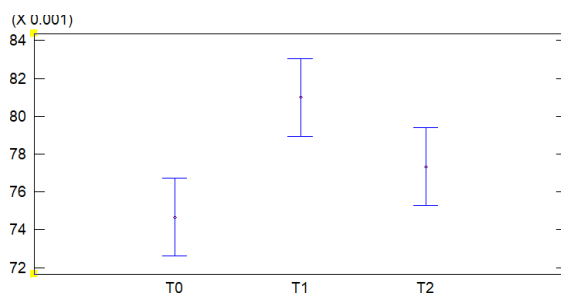
NT	Chiều cao (cm/ngày)	Số lượng quả thể (Quả thể/con)	Khối lượng quả thể (g)
T0	0,075 ± 0,003 ^a	45,88 ± 1,32 ^a	1,13 ± 0,10 ^a
T1	0,081 ± 0,002 ^b	51,54 ± 1,66 ^b	1,52 ± 0,05 ^b
T2	0,077 ± 0,002 ^{ab}	47,17 ± 1,02 ^a	1,26 ± 0,09 ^a

Theo dõi sự sinh trưởng, phát triển nhộng trùng thảo trong 45 ngày được ghi nhận ở Bảng 3, Bảng 4.

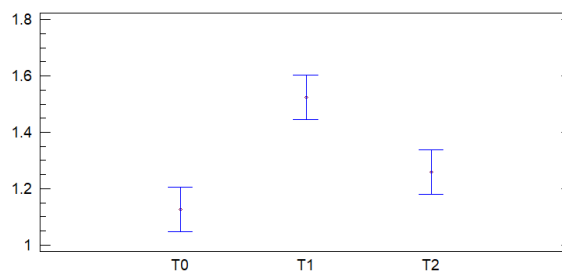
Hình 3 và Hình 4 cho thấy phương pháp nuôi cấy T0 đến ngày thứ 11 hệ sợi nấm ăn kín thân nhộng, sau 17 ngày mầm quả thể nấm đầu tiên nảy mầm trên thân nhộng. Ở nghiệm thức này tỷ lệ nhộng nhiễm nấm khá thấp, tốc độ phát triển chiều chậm 0,075cm/ngày, số lượng quả thể ít (45,88 quả thể/con). Phương pháp nuôi cấy T1, sau 12 ngày hệ sợi nấm lan kín trên thân nhộng, đến ngày thứ 15 thì quả thể bắt đầu xuất hiện trên thân nhộng. Tỷ lệ nhộng nhiễm nấm nghiệm thức này rất cao, quả thể thu được có kích thước lớn (1,52g), có màu cam đậm, với tốc độ cao trung bình là 0,08cm/ngày. Phương pháp nuôi cấy T2, sau 12 ngày hệ sợi nấm lan kín và sau 16 ngày thì bắt đầu xuất hiện quả thể. Tỷ lệ nhiễm nấm vào thân nhộng cũng khá cao, quả thể thu được có số lượng tương đối, quả thể có màu cam (Hình 5).

Thời gian nấm bắt đầu mọc quả thể dao động từ 15 – 17 ngày. Kết quả phân tích của bảng 1 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thời gian bắt đầu hình thành quả thể giữa các nghiệm thức. Tuy nhiên, ở bảng 2 cho kết quả của sự sai khác nhau về số lượng quả thể và kích thước quả thể giữa 3 nghiệm thức. Nghiệm thức T1 cho kết quả tốt nhất so với các nghiệm thức còn lại.

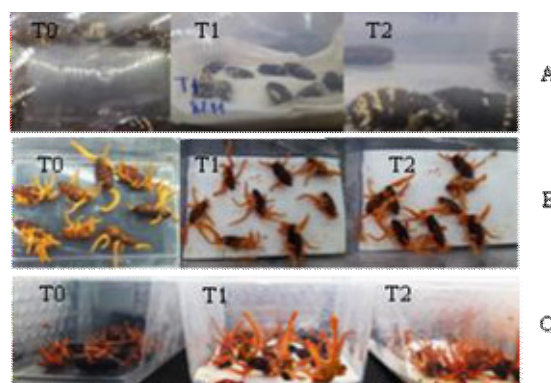
Nguyên nhân của sự khác biệt là do cách nuôi trồng sau khi cấy giống có sự khác nhau. T0 không lót giấy phía dưới có biểu hiện nấm mọc lan tỏa toàn thân nhộng (Hình 5), nhưng quả thể lại không được cao, do ở nghiệm thức này không có đệm lót để khiến cho các quả thể gãy đổ, không được che lại nên quả thể mọc theo nhiều hướng khi có ánh sáng từ nhiều phía, nên nhộng tằm không đủ dinh dưỡng nuôi các quả thể khác cao lên. Nghiệm thức T1 tốt hơn T2, vì giá trị dinh dưỡng của nhộng rất cao (Theo Hur và cs 2008 thì trong 100g nhộng có 79,7g nước; 13g protid; 6,5g lipid; nhiều vitamin và chất khoáng [7]) không thua kém các loại thịt cá thông thường nên nấm *C. militaris* sinh trưởng và phát triển rất tốt. Dựa trên sự quan sát có được trong quá trình thực hiện, việc bổ sung thêm dịch trong quá trình nuôi cấy làm phí nguồn dịch thể, dễ nhiễm mốc xanh (*Trichoderma spp.*) trong giai đoạn nuôi sợi (môi trường T2). Từ những kết quả trên, nghiệm thức T1 được chọn đi phân tích và xác định hàm lượng codycepin đạt được là 0,523mg/g (đối với quả thể được thu hoạch sau 45 ngày) khá cao khi so với một số nghiên cứu khác như hàm lượng codycepin ngoài tự nhiên là khoảng 0,006 mg/g, của tiến sĩ Phạm Văn Nhạ là 0,14 mg/g và của Aloha 0,49mg/g (đối với quả thể được thu hoạch sau 65 ngày).



Hình 3. Kết quả tốc độ phát triển quả thể



Hình 4. Kết quả khối lượng quả thể



Hình 5. Sự sinh trưởng phát triển của ĐHTH trên giá thể nhộng tằm

A-Mầm quả thể sinh trưởng sau 7 ngày đưa ra sáng; B-Nhộng trùng thảo sau 30 ngày nuôi cấy; C-Sau 45 ngày nuôi cấy

Tuy nhiên trong một nghiên cứu khác của nhóm tác giả Nguyễn Minh Đức (Viện Di truyền nông nghiệp), hàm lượng codycepin đạt được là 10.6mg/g (đối với quả thể được thu hoạch sau 65 ngày).

Từ những số liệu về hàm lượng dược tính của những nghiên cứu trên, kết quả nghiên cứu của nhóm có cao hơn cũng có thấp hơn so với các kết quả khác. Nguyên nhân dẫn đến sự khác nhau này là do trong quá trình nuôi cấy có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng dược tính, trong đó thứ nhất có thể kể đến thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến hàm lượng dược tính. Theo Wang và cs 2006 nhận thấy quả thể thường được tạo ra trong khoảng 35 – 70 ngày, từ đó các chất trong quả thể cũng bắt đầu được chuyển hóa trong khoảng thời gian đó để hình thành dược tính và chúng suy giảm sau 70 ngày [6]. Vì vậy, dược tính có thể tăng theo thời gian trong giai đoạn ra quả thể đến khi quả thể phóng bào tử. Thứ hai, có thể kể đến là giống ban đầu. Đây là yếu tố tiên quyết ảnh hưởng đến chất lượng đồng trùng hạ thảo nói chung và hàm lượng dược tính nói riêng. Bản chất của giống sẽ quyết định đến khả năng sinh trưởng phát triển cũng như khả năng tạo dược tính. Theo Sung và cs (2006) một giống khỏe sẽ sinh trưởng thuận lợi trên các nguồn cơ chất khác nhau và khả năng hình thành dược tính trên quả thể tốt [10]. Trong nghiên cứu này, nhóm chỉ phục vụ ở quy mô nghiên cứu để đưa ra quy trình

nuôi cấy ĐTHT trên giá thể nhộng tằm, vì thế nhóm chỉ sử dụng giống được phân lập lại từ quả thể của công ty, nên chất lượng giống đạt được không cao sau nhiều lần cấy chuyển. Tuy nhiên, hàm lượng dược tính của nghiên cứu cũng đạt được khá cao (0,523mg/g), cho thấy phương pháp nuôi cấy mang tính khả thi. Vì vậy, nuôi cấy theo nghiệm thức T1 (lót giấy nhưng không bổ sung nguồn dinh dưỡng dịch thể) vừa dễ thực hiện, vừa tiết kiệm nguồn dịch thể và rút ngắn thời gian nuôi cấy nhưng vẫn đạt hiệu quả tốt.

4. KẾT LUẬN

Thành phần môi trường nhân giống cấp I là PDA cải tiến: 200g khoai tây + 20g đường dextrose + 20g agar + 0,1 g/l KH_2PO_4 + 0,1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH = 5,5.

Môi trường dịch thể cấp II phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm Đông trùng hạ thảo (*C. militaris*) là 20g/l glucose + 5g/l peptone + 5g/l cao nấm men + 0,5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,25g/l KH_2PO_4 . pH=6

Nuôi cấy ĐTHT trên giá thể nhộng tằm (*Bombyx mori*) là đặt nhộng vào hộp có lót giấy nhưng không bổ sung dinh dưỡng cho hiệu quả nhộng tằm nhiễm nấm cao nhất, quả thể cao, ra đều, kích thước quả thể lớn và phát triển quả thể tốt.

5. CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu Trường Đại học Lạc Hồng, Lãnh đạo Khoa Kỹ thuật hóa Học và Môi trường Trường Đại học Lạc Hồng, Trung tâm Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] McKenna, DJ, Jones, K, Hughes, K. *Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements*. 2nd edn, Haworth, **2002**.
- [2] Choi, YS, Lee, HK, Kim, SH. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Korean Journal of Mycology*, **2009**, 27, 15-19.
- [3] Dong, JZ, Lei, C, Ai XR et al. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2012**, 166, 1215-1224.
- [4] Das, SK, Masuda, M, Mikio, S. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*, **2010**, 81, 961-968.
- [5] Kim, GY, Ko, WS, Lee, JY, Lee, JO, Ryu, CH, Choi, BT, Park, YM, Jeong, YK, Lee, KJ, Choi, KS, Heo, MS, Choi, YH. Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow- derived dendritic cells in vitro. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **2006**, 29, 354-360.
- [6] Wang, JF, Yang, CQ. Research survey on artificial cultivation and product development of *Cordyceps militaris*. *Lishizhen Medicine and Material Medical Research*, **2006**, 17, 268-269.
- [7] Hur, H. Chemical ingredient of *Cordyceps Militaris*. *Mycobiology*, **2008**, 36, 4, 233-235.
- [8] Shih, IL, Tsai, KL and Hsieh, C. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps Militaris*. *Biochemical engineering journal*, **2007**, 33, 3, 193-201.
- [9] Park, BT, Na, KH, Jung, EC and Kim, HH. Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean Journal Physiol Pharm*, **2009**, 13, 49-54.
- [10] Sung, JM, Park, YJ, Lee, JO, Han, SK, Lee, WH, Choi, SK and Shrestha, B. Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro. *Mycobiology*, **2006**, 34, 4, 196-199.