

# KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN SINH KHỐI NẤM *CORDYCEPS PRUINOSA* (PETCH, 1924)

Lê Việt Kỳ<sup>1,\*</sup>, Giang Sỹ Chung<sup>2</sup>, Trần Tình<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Công nghệ Sinh học và Nông nghiệp Công Nghệ Cao, Trường Đại học Phan Thiết, Việt Nam

<sup>2</sup>Phòng Quản lý Khoa học và Hợp tác Quốc Tế, Trường Đại học Phan Thiết, Việt Nam

**Tóm tắt:** *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) là loài nấm ký sinh côn trùng chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học giá trị, nhưng các dữ liệu về đặc điểm sinh học và nuôi cấy sinh khối tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Nghiên cứu này nhằm khảo sát các điều kiện môi trường trong hệ thống nuôi lỏng tĩnh thông qua đánh giá năng suất thu nhận sinh khối hệ sợi nấm của chủng bản địa phân lập tại Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà. Bằng phương pháp tiếp cận khảo sát đơn yếu tố (OFAT), kết quả thực nghiệm đã xác lập được điều kiện nuôi cấy tối ưu trong nghiên cứu bao gồm: nhiệt độ  $25 \pm 1$  °C; pH môi trường 6,0; sucrose là nguồn carbon lý tưởng; peptone là nguồn nitrogen hữu cơ phù hợp nhất; nồng độ vitamin B1 ở mức 0,1 g/L và thời gian thu hoạch là 25 ngày. Tại các điều kiện này, sinh khối khô đạt giá trị cực đại  $6,77 \pm 0,11$  g/L với hệ số biến thiên  $CV = 1,62\%$ . Dữ liệu thu được làm tiền đề cơ bản để chuẩn hóa công thức môi trường nuôi cấy ở quy mô lớn hơn, đồng thời là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về loài nấm này trong tương lai.

**Từ khóa:** *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924), khảo sát đơn yếu tố, nuôi lỏng tĩnh, sinh khối hệ sợi

## 1. GIỚI THIỆU

Nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) thuộc lớp Sordariomycetes, phân lớp Hypocreomycetidae, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae, chi *Cordyceps*. Quả thể nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) thường ở dạng đơn hoặc vài quả thể có hình chùy, ít phân nhánh. Cuống quả thể có màu vàng cam đỏ đến màu đỏ, kích thước 3-12 x 0,5-1,5 mm. Đầu quả thể có kích thước 2-8 x 1-3 mm, màu cam đến cam đỏ, có sự khác biệt với cuống quả thể. Thê chén (Perithecia) dày đặc, được sắp xếp có trật tự ngập trong dung dịch, có màu đỏ, có dạng hình trứng đến hình thoi, kích thước

360-400 x 130-200  $\mu$ m. Túi bào tử (Asci) có chứa 8 bào tử, trong suốt, hình trụ, phân đỉnh có nắp đậy (Petch, 1924).

Hiện nay, phần lớn các nghiên cứu và ứng dụng thương mại tại Việt Nam chủ yếu tập trung vào các loài phổ biến như *Cordyceps militaris* hay *Cordyceps sinensis*. Mặc dù tiềm năng ứng dụng của *C. pruinosa* đã được ghi nhận qua nhiều nghiên cứu trên thế giới, các dữ liệu về đặc điểm sinh học và nuôi cấy sinh khối của loài nấm này tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế. Để góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu và khai thác nguồn gen bản địa, nghiên cứu này tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy dịch thể trên chủng

nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924). Đây là nguồn giống gốc được phân lập trực tiếp từ hệ sinh thái Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà (tỉnh Lâm Đồng) và đã được lưu trữ, kiểm chứng độ thuần chủng trước khi đưa vào các thí nghiệm tối ưu hóa.

Trong điều kiện nuôi lỏng, *C. pruinosa* thể hiện khả năng thích nghi mạnh mẽ với các nguồn carbon và nitrogen hữu cơ. Việc tối ưu hóa dinh dưỡng có thể đẩy nhanh tốc độ nhân sinh khối hệ sợi, tạo lợi thế lớn cho sản xuất quy mô công nghiệp với chi phí thấp hơn so với các loài nấm ký sinh côn trùng có yêu cầu khắt khe về môi trường (Kim và cộng sự, 2003a).

Do đó, nghiên cứu này đóng vai trò cung cấp bộ dữ liệu cơ sở về các yếu tố dinh dưỡng và môi trường thiết yếu, từ đó mở ra hướng đi mới trong việc bảo tồn và thương mại hóa nguồn gen nấm dược liệu đặc hữu tại địa phương.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm: giống nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) được thu nhận tại Vườn quốc gia Bidoup-Núi Bà (tỉnh Lâm Đồng). Giống lưu giữ trong môi trường PGA tại Trường Đại học Đà Lạt.

Hoá chất: Các hoá chất glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ), maltose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$  hãng Xilong (Trung Quốc). Các hoá chất Peptone, Cao nấm men, Vitamin B1 (Thiamine hydrochloride) hãng Himedia (Ấn Độ).

Môi trường YMKA - Yeast Magnesium Potassium Agar (20 g/l glucose, 5 g/l cao nấm men, 1 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2 g/l  $KH_2PO_4$ , vitamin B1 0,1 g/L, agar 15 g/L, nước cất 1 lít) được sử dụng để nuôi cấy trên thạch. Môi trường YMK (không agar) để nuôi cấy dịch thể. Hấp khử trùng môi trường trong điều kiện áp suất 1atm, nhiệt độ 121 °C, thời gian 20 phút.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Kỹ thuật nuôi cấy lỏng tĩnh được sử dụng trong nghiên cứu này do phù hợp với đặc điểm sinh trưởng của nấm ký sinh côn trùng. Trong điều kiện tĩnh, hệ sợi có xu hướng hình thành lớp thảm trên bề mặt môi trường, giúp tối ưu hóa khả năng tiếp xúc với oxy mà không cần sục khí cưỡng bức. Đồng thời, việc không khuấy trộn giúp hạn chế tác động của lực cắt cơ học, vốn có thể làm biến dạng hệ sợi và ảnh hưởng đến quá trình tích lũy sinh khối. Những đặc điểm này đã được ghi nhận trong các nghiên cứu trên *Cordyceps militaris*, cho thấy nuôi tĩnh không chỉ cải thiện sinh trưởng mà còn nâng cao hiệu suất tích lũy hoạt chất (Kang và cộng sự, 2014; Masuda và cộng sự, 2007).

Mặc dù phương pháp tiếp cận khảo sát đơn yếu tố (OFAT) chưa đánh giá được toàn diện hiệu ứng tương tác đồng thời giữa các thông số môi trường, nhưng đây là bước sàng lọc nền tảng và bắt buộc. Nhờ cách tiếp cận này, nghiên cứu đã khoanh vùng được chính xác các biên độ tới hạn và lựa chọn được các nguồn cơ chất tối ưu trong giới hạn hẹp. Đây là bộ thông số cơ sở vững chắc và có độ tin cậy cao để thiết lập các mô hình thực nghiệm đa biến nhằm tối ưu

hóa đồng thời và nâng quy mô sản xuất sinh khối ở các nghiên cứu tiếp theo.

Các thí nghiệm được tiến hành tuần tự theo nguyên tắc: yếu tố khảo sát ở thí nghiệm trước mang lại giá trị về tốc độ lan tở ở thí nghiệm 1, khối lượng sinh khối khô trung bình cao nhất (g/L) ở các thí nghiệm tiếp theo và có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê sẽ được lựa chọn làm thông số cố định cho thí nghiệm kế tiếp.

**Thí nghiệm 1:** Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường thạch.

Nguồn giống *Cordyceps pruinosa* được nuôi giữ trên môi trường PGA (13-15 ngày). Khối thạch mang tở (2 x 2 mm) tại vị trí cách rìa khuẩn lạc 5 mm được tách và chuyển vào giữa đĩa Petri chứa môi trường YMKA. Quy trình thực hiện trong điều kiện vô trùng và các đĩa sau cấy được bọc bằng parafilm.

Thí nghiệm được triển khai với 3 nghiệm thức nhiệt độ:  $20 \pm 1$  °C,  $25 \pm 1$  °C,  $30 \pm 1$  °C. Mỗi nghiệm thức bao gồm 20 đĩa Petri và được lặp lại 3 lần. Đường kính hệ sợi được đo đặc định kỳ vào các ngày thứ 5, 10, 15, 20 và 25, dữ liệu thu được là cơ sở để phân tích sự tương quan giữa nhiệt độ và tốc độ lan tở của chủng nấm khảo sát.

**Thí nghiệm 2:** Khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường nuôi lỏng tĩnh.

Quy trình thực hiện 01 mẫu thí nghiệm như sau: khối thạch mang tở (5 x 5 mm) tại

vị trí cách rìa khuẩn lạc 5 mm được tách và chuyển vào hộp nuôi chứa 200 ml môi trường YMK, thao tác được thực hiện trong điều kiện vô trùng.

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của pH được thiết kế với 5 nghiệm thức tương ứng với các giá trị pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 và 8,0, mỗi nghiệm thức bao gồm 20 mẫu và được lặp lại 3 lần.

Độ pH của môi trường được điều chỉnh bằng dung dịch NaOH 1M hoặc HCl 1M. Sau 30 ngày nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, toàn bộ sinh khối hệ sợi được thu nhận, làm sạch bằng nước cất và sấy ở 55 °C cho đến khi đạt khối lượng không đổi. Khối lượng sinh khối khô (g/L) thu được là dữ liệu quan trọng để xác lập điều kiện tối ưu cho sự tăng sinh hệ sợi của chủng nấm khảo sát.

**Thí nghiệm 3:** Khảo sát ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng carbon đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường nuôi lỏng tĩnh.

Các thao tác kỹ thuật được thực hiện tương tự thí nghiệm 2 với 3 nghiệm thức nguồn carbon gồm: glucose, sucrose và maltose ở nồng độ 20 g/L. Mỗi nghiệm thức bao gồm 20 mẫu và được thực hiện lặp lại 3 lần.

**Thí nghiệm 4:** Khảo sát ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitrogen đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường nuôi lỏng tĩnh.

Quy trình thao tác được tiến hành tương tự thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen được đánh giá thông qua 3 loại cơ

chất: cao nấm men, peptone và bột nhộng tằm (được cố định ở nồng độ 5 g/L). Thí nghiệm được thiết kế với 20 mẫu cho mỗi loại cơ chất và tiến hành lặp lại 3 lần.

**Thí nghiệm 5:** Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ vitamin B1 đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường nuôi lỏng tĩnh.

Các thao tác kỹ thuật được thực hiện tương tự thí nghiệm 2 với 3 nghiệm thức nồng độ vitamin B1 ở mức: 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,15 g/L. Mỗi nghiệm thức bao gồm 20 mẫu và được thực hiện lặp lại 3 lần.

**Thí nghiệm 6:** Khảo sát ảnh hưởng của yếu tố thời gian nuôi cấy đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường nuôi lỏng tĩnh.

Quy trình thực hiện giống các thao tác tại thí nghiệm 2. Nhiệt độ tối ưu, pH tối ưu, nguồn carbon tối ưu, nguồn nitrogen tối ưu, nồng độ vitamin B1 tối ưu giúp nấm đạt sinh khối cao nhất ở các

thí nghiệm trước được sử dụng cho thí nghiệm này.

Bố trí 4 nghiệm thức thí nghiệm tương đương với thời gian thu sinh khối khác nhau ở 20 ngày, 25 ngày, 30 ngày, 35 ngày. Mỗi nghiệm thức 20 mẫu, lặp lại 3 lần.

### 2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng Mean  $\pm$  SD, xử lý bằng phần mềm Excel 2016 và Minitab 16. Sử dụng kiểm định One-way ANOVA (hậu định Tukey) để so sánh các giá trị trung bình ở mức ý nghĩa  $p < 0,05$ .

## 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

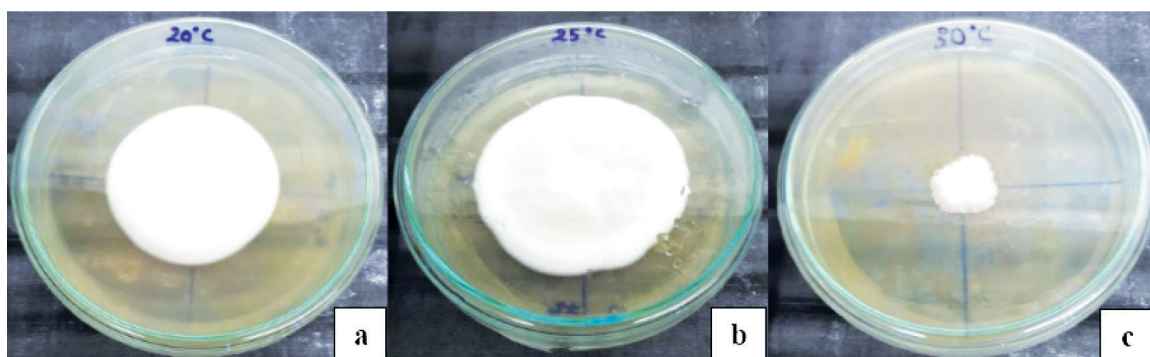
### 3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường thạch

Kết quả thực nghiệm từ Bảng 1 cho thấy nấm *Cordyceps pruinosa* có thể sinh trưởng trong những điều kiện nhiệt độ khác nhau, đường kính khuẩn lạc tăng dần theo thời gian và khác nhau rõ rệt ở các điều kiện nhiệt độ.

**Bảng 1. Đường kính của khuẩn lạc nấm *Cordyceps pruinosa* ở các mức nhiệt độ khác nhau**

Thời gian Nhiệt độ	Đường kính khuẩn lạc (mm) trung bình				
	Sau 5 ngày	Sau 10 ngày	Sau 15 ngày	Sau 20 ngày	Sau 25 ngày
20 °C	18,81 <sup>b</sup> $\pm$ 0,23	38,88 <sup>b</sup> $\pm$ 0,46	50,20 <sup>b</sup> $\pm$ 0,42	60,79 <sup>b</sup> $\pm$ 0,43	68,42 <sup>b</sup> $\pm$ 0,61
25 °C	21,90 <sup>a</sup> $\pm$ 0,17	43,41 <sup>a</sup> $\pm$ 0,42	65,93 <sup>a</sup> $\pm$ 0,68	76,09 <sup>a</sup> $\pm$ 0,65	88,24 <sup>a</sup> $\pm$ 0,77
30 °C	0	0	10,50 <sup>c</sup> $\pm$ 0,10	23,46 <sup>c</sup> $\pm$ 0,28	35,90 <sup>c</sup> $\pm$ 0,48
CV (%)	1,00	1,08	0,94	0,92	1,03

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phát triển của hệ sợi nấm *Cordyceps pruinosa* sau khi cấy 15 ngày. Trong đó: (a) 20 °C, (b) 25 °C, (c) 30 °C**

Ở nhiệt độ  $25 \pm 1$  °C, khuẩn lạc đạt đường kính tối đa  $88,24 \pm 0,77$  mm sau 25 ngày nuôi cấy. Đồng thời, quan sát hình thái cho thấy mép hệ sợi phát triển thưa, vươn dài theo dạng phóng xạ, phản ánh trạng thái sinh trưởng mạnh và khả năng thích nghi tốt với điều kiện môi trường nuôi cấy (Hình 1). Khi nhiệt độ lệch khỏi mức tối ưu  $25 \pm 1$  °C, đường kính khuẩn lạc giảm đáng kể. Cụ thể, ở  $20 \pm 1$  °C, khuẩn lạc đạt  $68,42 \pm 0,61$  mm, trong khi ở  $30 \pm 1$  °C chỉ đạt  $35,90 \pm 0,48$  mm sau 25 ngày nuôi cấy. Sự suy giảm mạnh hơn ở nhiệt độ cao cho thấy *Cordyceps pruinosa* nhạy cảm với stress nhiệt. Về mặt cơ chế, nhiệt độ cao có thể gây biến tính protein, làm giảm hoạt tính enzyme và ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của màng tế bào, từ đó ức chế quá trình kéo dài sợi nấm. Ngược lại, ở nhiệt độ thấp, tốc độ phản ứng sinh hóa giảm nhưng không gây tổn thương cấu trúc tế bào nghiêm trọng, do đó mức độ ức chế sinh trưởng ít hơn.

Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đây trên các loài thuộc chi *Cordyceps*. Nghiên cứu của Sung và cộng sự (1999, 2002) trên *Cordyceps militaris* cho thấy nhiệt độ trên 25 °C làm giảm đáng

kể sinh trưởng sinh khối và năng suất quả thể, cũng cố thêm nhận định về tính nhạy cảm nhiệt của nhóm nấm này.

Từ các kết quả thu được, có thể khẳng định nhiệt độ  $25 \pm 1$  °C là điều kiện tối ưu cho sinh trưởng hệ sợi của chủng nghiên cứu. Việc xác định chính xác ngưỡng nhiệt độ thích hợp không chỉ có ý nghĩa trong tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy in vitro mà còn là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo về sinh lý, sinh hóa và sản xuất sinh khối hoặc hoạt chất từ nấm.

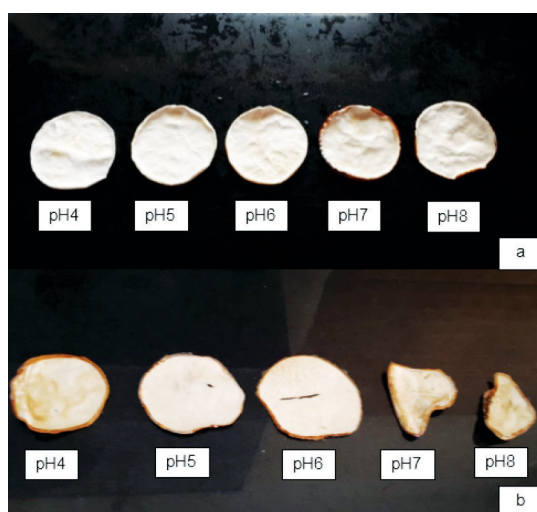
### **3.2. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) trong môi trường nuôi lỏng tĩnh**

Kết quả (Bảng 2, Hình 2) cho thấy pH môi trường ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tích lũy sinh khối của *Cordyceps pruinosa*. Sau 30 ngày nuôi cấy, sinh khối đạt cao nhất tại pH 6,0 ( $5,78 \pm 0,05$  g/L), không sai khác có ý nghĩa so với pH 5,0 và 4,0, nhưng giảm rõ rệt ở pH 7,0 và 8,0 ( $p < 0,05$ ). Quan sát hình thái cho thấy hệ sợi phát triển mạnh, phân bố đồng đều và duy trì màu trắng sữa đặc trưng ổn định trong khoảng pH 4,0 - 6,0, trong khi ở pH  $\geq 7,0$  xuất hiện sinh trưởng kém và dấu hiệu thoái hóa.

**Bảng 2. Sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* ở các mức pH khác nhau**

pH	Sinh khối khô ( g/L)	CV (%)
4,0	5,46 <sup>b</sup> ± 0,06	1,10
5,0	5,63 <sup>a,b</sup> ± 0,08	1,42
6,0	5,78 <sup>a</sup> ± 0,05	0,87
7,0	4,82 <sup>c</sup> ± 0,09	1,87
8,0	4,16 <sup>d</sup> ± 0,11	2,64

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 2. Sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* sau 30 ngày trên môi trường YMK với mức pH khác nhau. Trong đó: (a) trước khi sấy, (b) sau khi sấy**

Sự tối ưu sinh trưởng ở pH acid nhẹ (4,0–6,0) có thể liên quan đến việc duy trì hoạt tính enzyme nội bào và gradient proton qua màng tế bào, qua đó tăng hiệu quả hấp thu dinh dưỡng và chuyển hóa năng lượng. Ngược lại, môi trường trung tính–kiềm làm thay đổi trạng thái ion hóa của protein, giảm hoạt tính enzyme và ảnh hưởng đến tính ổn định của màng, dẫn đến suy giảm sinh trưởng và tích lũy sinh khối.

Kết quả này phù hợp với xu hướng chung ở các loài thuộc chi *Cordyceps*, Lê

Thị Anh Đào (2010) xác định pH 6,0 là tối ưu cho *Cordyceps pseudomilitaris*. Điều này cho thấy đặc điểm thích nghi của các loài trong chi *Cordyceps* với môi trường acid nhẹ, tương ứng với điều kiện sinh thái tự nhiên.

Từ các kết quả thu được, pH 6,0 được xác định là điều kiện tối ưu cho tích lũy sinh khối của *Cordyceps pruinosa*, làm cơ sở cho việc tối ưu hóa môi trường nuôi cấy và triển khai các thí nghiệm tiếp theo.

**3.3. Ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng carbon đến sinh khối nấm Cordyceps pruinosa trong môi trường dịch thể**

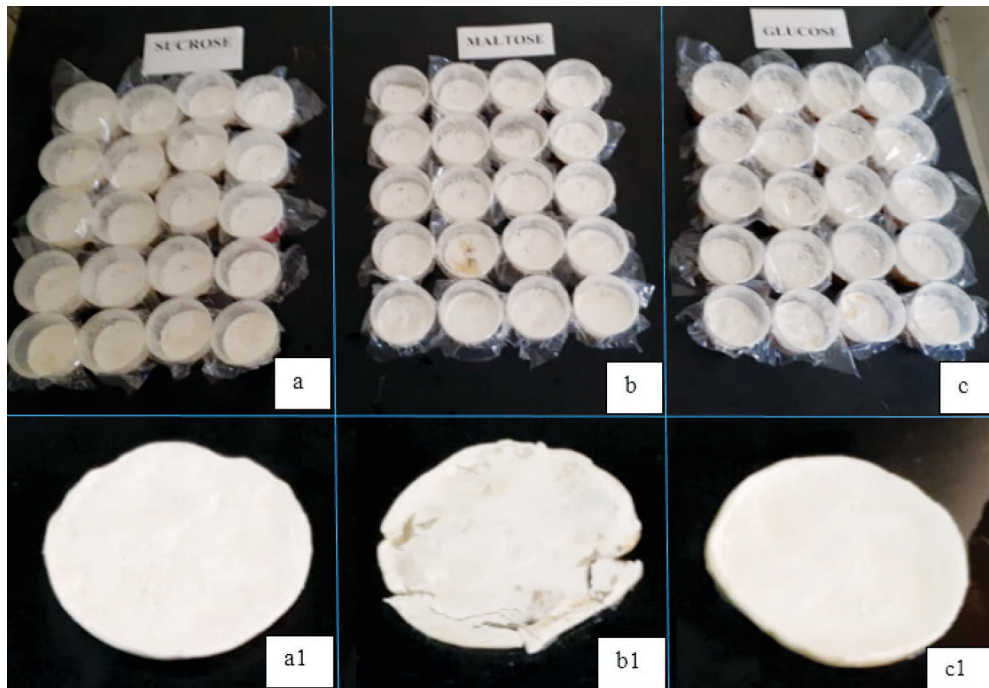
Kết quả (Bảng 3, Hình 3) cho thấy nguồn carbon ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tích lũy sinh khối của *Cordyceps pruinosa*. Trong ba nguồn khảo sát, sucrose cho sinh khối cao nhất ( $6,27 \pm$

$0,06$  g/L), tiếp đến là glucose ( $5,84 \pm 0,03$  g/L), trong khi maltose cho giá trị thấp nhất ( $4,34 \pm 0,04$  g/L), sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Quan sát hình thái cho thấy hệ sợi phát triển dày và đồng đều trên môi trường chứa sucrose và glucose, trong khi ở maltose hệ sợi sinh trưởng kém và có dấu hiệu thoái hóa.

**Bảng 3. Sinh khối nấm Cordyceps pruinosa trên các nguồn carbon khác nhau**

Nguồn carbon	Sinh khối khô (g/L)	CV (%)
Glucose	$5,84^b \pm 0,03$	0,51
Sucrose	$6,27^a \pm 0,06$	0,96
Maltose	$4,34^c \pm 0,04$	0,92

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 3. Sinh khối nấm Cordyceps pruinosa nuôi cấy trên môi trường dịch thể có nguồn carbon khác nhau Trong đó: (a, a1) nguồn sucrose, (b, b1) nguồn maltose, (c, c1) nguồn glucose**

Sự khác biệt này có thể liên quan đến khả năng sử dụng cơ chất và đặc điểm chuyển hóa carbon của nấm. Sucrose dễ dàng bị thủy phân bởi enzyme invertase thành glucose và fructose - hai dạng đường đơn được hấp thu trực tiếp và nhanh chóng tham gia vào con đường đường phân và chu trình Krebs. Ngược lại, maltose cần được chuyển hóa qua enzyme maltase trước khi sử dụng, có thể làm giảm tốc độ cung cấp năng lượng và tích lũy sinh khối.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Jian và cộng sự (2004), trong đó sucrose được xác định là nguồn carbon thích hợp cho sinh tổng hợp polysaccharide ở các loài thuộc chi *Cordyceps*. Tương tự, Dong và Yao (2005) cũng cho thấy các chi *Cordyceps* có khả năng sử dụng hiệu quả các nguồn đường dễ phân giải như sucrose và glucose trong môi trường nuôi lỏng, góp phần gia tăng sinh khối và hợp chất thứ cấp. Những kết quả này cho thấy xu hướng chung về ưu tiên sử dụng nguồn carbon dễ đồng hóa ở

các loài trong chi *Cordyceps*.

Từ các kết quả thu được, sucrose được lựa chọn là nguồn carbon tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo, góp phần nâng cao hiệu suất sinh khối và định hướng tối ưu hóa môi trường nuôi cấy.

### 3.4. Ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitrogen đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường dịch thể

Kết quả (Bảng 4, Hình 4) cho thấy nguồn nitrogen ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tích lũy sinh khối của *Cordyceps pruinosa*. Trong ba nguồn khảo sát, peptone cho sinh khối cao nhất ( $6,66 \pm 0,07$  g/L), tiếp đến là cao nấm men ( $6,37 \pm 0,11$  g/L), trong khi bột nhộng cho giá trị thấp nhất ( $5,22 \pm 0,10$  g/L), sai khác có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ). Quan sát hình thái cho thấy hệ sợi phát triển dày, đồng đều và ổn định trong môi trường peptone và cao nấm men, trong khi ở bột nhộng hệ sợi phân bố không đồng nhất và xuất hiện dấu hiệu thoái hóa sau thời gian nuôi cấy kéo dài.

**Bảng 4. Sinh khối hệ sợi nấm *Cordyceps pruinosa* trên môi trường YMK có bổ sung các nguồn nitrogen khác nhau**

Nguồn nitrogen	Sinh khối khô (g/L)	CV (%)
Peptone	$6,66^a \pm 0,07$	1,05
Cao nấm men	$6,37^b \pm 0,11$	1,73
Bột nhộng	$5,22^c \pm 0,10$	1,92

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 4. Sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* nuôi cấy trên môi trường dịch thể có nguồn nitrogen khác nhau sau 30 ngày nuôi**

Sự khác biệt này có thể liên quan đến dạng tồn tại và khả năng đồng hóa nitrogen của nấm. Peptone cung cấp nguồn nitrogen hữu cơ ở dạng peptide và acid amin dễ hấp thu, giúp rút ngắn quá trình chuyển hóa và tăng hiệu quả tổng hợp protein và sinh khối. Cao nấm men ngoài nitrogen còn cung cấp vitamin và yếu tố sinh trưởng, tuy nhiên thành phần phức tạp có thể làm giảm hiệu quả sử dụng nitrogen so với peptone. Trong khi đó, bột nhộng chứa nitrogen ở dạng phức tạp (protein cấu trúc, chitin), đòi hỏi hệ enzyme ngoại bào phân giải trước khi hấp thu, làm giảm tốc độ sinh trưởng và tích lũy sinh khối.

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Hoàng Mai (2013), trong đó peptone được xác định là nguồn nitrogen tối ưu cho sinh trưởng hệ sợi của *Cordyceps* sp. Tương tự, Dong và Yao (2005) cũng cho thấy các nguồn nitrogen hữu cơ dễ đồng hóa như peptone và cao nấm men có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sinh trưởng và tích lũy sinh khối ở các loài thuộc chi *Cordyceps*. Ngoài ra, Shin và cộng sự

(2004) khi nghiên cứu trên *C. pruinosa* cũng ghi nhận các nguồn nitrogen hữu cơ hỗ trợ tốt hơn cho sinh trưởng hệ sợi so với các nguồn phức tạp.

Từ các kết quả thu được, peptone được lựa chọn là nguồn nitrogen tối ưu cho các thí nghiệm tiếp theo, góp phần nâng cao hiệu suất sinh khối và định hướng tối ưu hóa môi trường nuôi cấy.

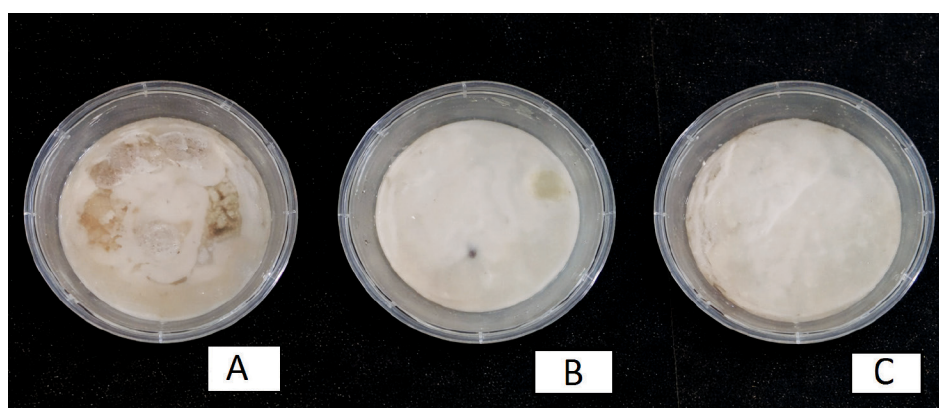
### **3.5. Ảnh hưởng của nồng độ Thiamine (vitamin B1) đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường dịch thể**

Kết quả thực nghiệm tại Bảng 5 cho thấy sự gia tăng nồng độ thiamine từ 0,05 g/L lên 0,1 g/L đã tạo ra bước ngoặt về hiệu suất đồng hóa: sinh khối khô tăng từ  $6,00 \pm 0,07$  g/L lên mức cực đại  $6,68 \pm 0,10$  g/L (CV = 1,50%). Tại các ngưỡng nồng độ cao (0,1 - 0,15 g/L), hệ sợi biểu hiện sức sống mạnh mẽ với mật độ dày đặc, sắc tố trắng sữa đặc trưng và tốc độ chiếm lĩnh bề mặt cơ chất nhanh chóng. Ngược lại, ở nồng độ thấp (0,05 g/L), sự phát triển của hệ sợi bị đình trệ rõ rệt do thiếu hụt xúc tác sinh học.

**Bảng 5. Sinh khối hệ sợi nấm *Cordyceps pruinosa* ở các nồng độ vitamin B1 khác nhau**

Nồng độ vitamin B1 (g/L)	Sinh khối khô (g/L)	CV (%)
0,05	6,00 <sup>b</sup> ± 0,07	1,17
0,1	6,68 <sup>a</sup> ± 0,10	1,50
0,15	6,69 <sup>a</sup> ± 0,09	1,35

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 5. Ảnh hưởng nồng độ vitamin B1 lên sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* sau 15 ngày nuôi. Trong đó: (A) 0,05 g/L, (B) 0,1g/L, (C) 0,15 g/L**

*Cordyceps pruinosa* nói riêng và các loài nấm thuộc chi *Cordyceps* nói chung thường mang đặc tính khuyết dưỡng thiamine ở các mức độ khác nhau. Thiamine đóng vai trò là tiền chất bắt buộc để tổng hợp coenzyme Thiamine pyrophosphate (TPP), xúc tác trực tiếp cho các phản ứng khử carboxyl trong chu trình Krebs nhằm chuyển hóa triệt để nguồn carbon thành năng lượng ATP. Kết quả tối ưu tại nồng độ 0,1 g/L trong nghiên cứu này hoàn toàn nhất quán với công bố của Mao và cộng sự (2005) khi khảo sát trên *C. militaris*, nhóm tác giả này cũng xác lập rằng thiamine là yếu tố tăng trưởng không

thể thay thế, giúp tăng đáng kể vận tốc phân bào và tích lũy sinh khối so với các mẫu đối chứng không bổ sung vitamin. Theo nghiên cứu của Dong và Yao (2005) về động học dinh dưỡng của chi nấm *Cordyceps* trong môi trường dịch thể, việc bổ sung thiamine ngoại sinh không chỉ bù đắp sự thiếu hụt trong con đường sinh tổng hợp nội bào mà còn kích thích mạnh mẽ sự phân chia tế bào và tích lũy các hợp chất cao phân tử như polysaccharide.

Vì kết quả thí nghiệm vitamin B1 không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) giữa nồng độ 0,1 g/L và 0,15 g/L,

chúng tôi quyết định chọn nồng độ vitamin B1 là 0,1 g/L cho các thí nghiệm tiếp theo (yếu tố kinh tế).

### 3.6. Ảnh hưởng của yếu tố thời gian nuôi cấy đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* trong môi trường dịch thể

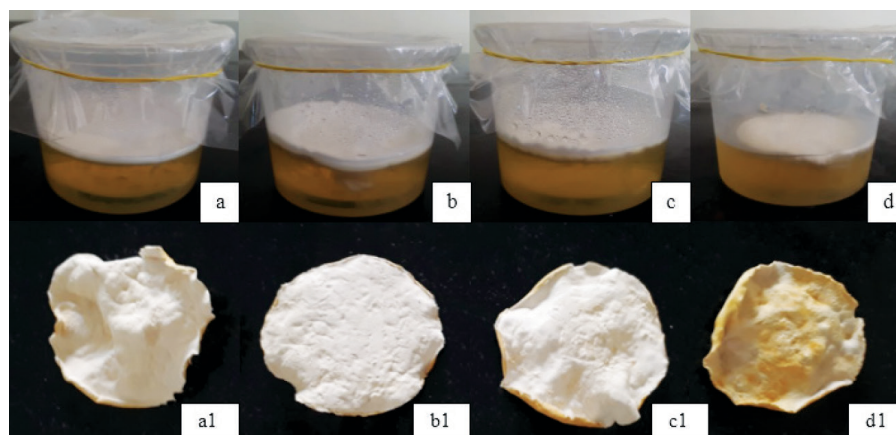
Từ các kết quả thí nghiệm trên, môi trường tối ưu để nuôi nấm *Cordyceps pruinosa*

như sau: nguồn carbon là sucrose, nguồn nitrogen là peptone, nồng độ vitamin B1 0,1 g/L, pH môi trường 6,0, nhiệt độ 25°C. Tiến hành thu nấm ở các mốc thời gian sau 20 ngày, 25 ngày, 30 ngày, 35 ngày nuôi cấy, mỗi lần thu 20 mẫu. Mẫu nấm được rửa sạch với nước cất, sấy khô ở 55 °C đến khối lượng không đổi. Kết quả thực nghiệm được thể hiện trên Bảng 6.

**Bảng 6. Sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* theo thời gian**

Thời gian (ngày)	20	25	30	35
Sinh khối khô (g/L)	5,86 <sup>b</sup> ± 0,13	6,77 <sup>a</sup> ± 0,11	6,64 <sup>a</sup> ± 0,08	5,07 <sup>c</sup> ± 0,09
CV (%)	2,22	1,62	1,20	1,78

Ghi chú: số liệu trong Bảng là trung bình của 3 lần lặp lại, các chữ cái khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo kiểm định One-way ANOVA ( $p < 0,05$ )



**Hình 6. Ảnh hưởng thời gian nuôi cấy đến sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa*. Trong đó: (a, a1) 20 ngày; (b, b1) 25 ngày; (c, c1) 30 ngày; (d, d1) 35 ngày**

Kết quả thực nghiệm (Bảng 6) xác lập thời điểm thu hoạch tối ưu là 25 ngày với sinh khối khô đạt cực đại  $6,77 \pm 0,11$  g/L (CV = 1,62%). Ở giai đoạn 20 ngày, hệ sợi đang trong tiến trình đồng hóa mạnh mẽ nhưng chưa đạt đến điểm bão hòa sinh khối do chưa khai thác triệt để nguồn carbon và

nitrogen trong môi trường. Ngược lại, sau 30 ngày, sinh khối sụt giảm mạnh xuống còn  $5,07 \pm 0,09$  g/L vào ngày thứ 35.

Sự suy giảm sinh khối sau ngưỡng 30 ngày là hệ quả tất yếu của quá trình tự phân. Khi các nguồn dinh dưỡng thiết yếu bị cạn kiệt, nấm kích hoạt hệ enzyme nội

bào (protease, glucanase) để phân giải chính các thành phần cấu trúc tế bào nhằm duy trì năng lượng sống cơ bản. Biểu hiện cảm quan về sự thay đổi sắc tố sang màu vàng và mật độ sợi thưa dần là minh chứng cho sự lão hóa sinh lý và tích lũy các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp có độc tính.

Động thái sinh trưởng này thể hiện tính đặc thù chủng loại rõ rệt khi đối chiếu với các công bố trước đây. Kết quả của chúng tôi có sự tương đồng nhất định với nghiên cứu của Nguyễn Thị Ánh Ngọc (2013) trên chủng *Cordyceps* sp. DL0082 (26 ngày). Tuy nhiên, chu trình phát triển của chủng *C. pruinosa* trong nghiên cứu này ngắn hơn đáng kể so với mốc 50 ngày mà Nguyễn Hoàng Mai (2013) xác lập trên chủng *Cordyceps* sp. DL0093. Sự biến thiên này phản ánh sự khác biệt về năng lực di truyền trong việc điều tiết tốc độ trao đổi chất và khả năng thích nghi với điều kiện nuôi lỏng tĩnh.

Mặc dù không ghi nhận sự sai khác biệt về mật thống kê giữa ngày 25 và ngày 30 ( $p > 0,05$ ), việc lựa chọn thu hoạch tại thời điểm 25 ngày giúp tiết kiệm thời gian sản xuất, giảm thiểu rủi ro tạp nhiễm vi sinh vật cơ hội và đảm bảo sinh khối đạt giá trị tối ưu nhất về mặt hoạt tính sinh học.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến sinh khối nấm thông qua các khảo sát đơn yếu tố độc lập. Kết quả thực nghiệm cho thấy động thái tăng trưởng của hệ sợi đạt hiệu suất cao nhất tại các giá trị định lượng cụ thể:

hiệt độ nuôi cấy  $25 \pm 1$  °C; pH môi trường 6,0; nguồn carbon tối ưu là sucrose; nguồn nitrogen hữu cơ là peptone; bổ sung vitamin B1 ở nồng độ 0,1 g/L và chu kỳ nuôi lỏng tĩnh kéo dài 25 ngày.

Cần lưu ý rằng các giá trị tối ưu nêu trên được xác lập trong điều kiện các yếu tố môi trường vận hành riêng rẽ, chưa xem xét đến hiệu ứng tương tác đa chiều. Tuy nhiên, các dữ liệu này là tiền đề khoa học quan trọng, phản ánh đầy đủ đặc tính sinh lý học của chủng nấm *Cordyceps pruinosa* bản địa và cung cấp bộ thông số nền tảng để chuẩn hóa công thức môi trường nuôi cấy ở quy mô lớn hơn.

Mặc dù mục tiêu trọng tâm là tối ưu hóa sinh khối, việc xác lập sucrose và peptone làm cơ chất chủ đạo mang hàm ý về khả năng kích hoạt các con đường chuyển hóa thứ cấp. Theo Kim và cộng sự (2003): sự tương thích của các nguồn dinh dưỡng này không chỉ thúc đẩy tăng trưởng hệ sợi mà còn là tác nhân then chốt điều tiết hiệu suất tổng hợp polysaccharide ngoại bào. Tương tự: Mao và cộng sự (2005) khẳng định sự phối hợp giữa disaccharide và nitrogen hữu cơ tạo ra trạng thái cân bằng sinh lý lý tưởng cho việc tích lũy cordycepin và các dẫn xuất adenosine trong nuôi cấy dịch thể.

Đây là nghiên cứu bước đầu về môi trường tối ưu để nuôi cấy sinh khối nấm *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924), kết quả này là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo, trong đó việc định lượng các nhóm hợp chất như cordycepin, adenosine. Ngoài ra, chúng

tôi sẽ tiếp tục tiến hành các nghiên cứu như: khảo sát thêm một số nguồn carbon và nitrogen lên quá trình tích lũy sinh khối hệ sợi nấm; Khảo sát nồng độ sucrose, nồng độ peptone; Nghiên cứu nuôi trồng thu quả thể loài nấm *Cordyceps pruinosa* trên các loại môi trường khác nhau; Tiềm năng ứng dụng của loài nấm này trong lĩnh vực y dược, bảo vệ môi trường, đối kháng sinh học - bảo vệ thực vật.

**Thông tin tác giả:**

**ThS. Lê Việt Kỳ\***(*Tác giả liên hệ*), Trường Đại học Phan Thiết, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

Email: lvky@upt.edu.vn

**ThS. Giang Sỹ Chung**, Trường Đại học Phan Thiết, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

Email: gschung@upt.edu.vn

**TS. Trần Tinh**, Trường Đại học Phan Thiết, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam.

Email: tinh@upt.edu.vn

**Thông tin bài báo:**

**Ngày nhận bài:** 07/03/2026

**Ngày hoàn thiện biên tập:** 21/05/2026

**Ngày duyệt đăng:** 25/05/2026

**Ghi chú**

Các tác giả xác nhận không có tranh chấp về lợi ích đối với bài báo này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dong, C., & Yao, Y. (2005). Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 483-492.

Jian, H. X., Dai, X. C., Yu, X., Jin, W. L., Zu, L. L., Wei, H. W., Ning, F., Bing, B. T., Zong, Q. L., & Ai, Y. L. (2004). Optimization of submerged culture conditions for mycelial polysaccharide production in *Cordyceps pruinosa*. *Process Biochemistry*, 39(12), 2241-2247.

Kang, C., Wen, T.-C., Kang, J.-C., Meng, Z.-B., Li, G.-R., & Hyde, K. D. (2014). Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture. *The Scientific World Journal*, 2014, 510627. <https://doi.org/10.1155/2014/510627>

Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., & Yun, J. W. (2003a). Optimization of culture conditions for the production of exo-polysaccharides by submerged culture of *Cordyceps pruinosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1), 76-81.

Lê Thị Anh Đào (2010). *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của loài Cordyceps sp2. được tìm thấy tại Đà Lạt*. Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Đà Lạt, tr. 51-59.

Mao, X. B., Jiao, T., Chi, Q., & Tan, C. P. (2005). Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1667-1672.

Masuda, M., Urabe, E., Honda, H., Sakurai, A., & Sakakibara, M. (2007). Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1199–1205. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.008>

Nguyễn Hoàng Mai (2013). *Khảo sát tối ưu hóa môi trường nuôi trồng loài nấm ký sinh côn trùng Cordyceps spp. (DL0093)*. Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Đà Lạt, tr. 54-56.

Nguyễn Thị Ánh Ngọc (2013). *Bước đầu xây dựng quy trình nuôi trồng loài nấm ký sinh côn trùng Cordyceps spp. (DL0082)*. Luận văn Thạc sĩ, Trường Đại học Đà Lạt, tr. 52-53.

Petch, T. (1924). Studies in entomogenous fungi: IV. Some Ceylon *Cordyceps*. *Transactions of the British Mycological Society*, B10, 28-45.

Shin, J. C., Shrestha, B., Lee, W. H., Park, Y. J., Kim, S. Y., Jeong, G. R., Kim, H. K., Kim, T. W., & Sung, J. M. (2004). Distribution and favorable conditions for mycelial growth of *Cordyceps pruinosa* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 32(2), 79–88.

Sung, J. M. (1996). *The insect-borne fungus of Korea in color*. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul, pp. 247-258.

Sung, J. M., Choi, Y. S., Shrestha, B., & Park, Y. J. (2002). Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Korean Journal of Mycology*, 30, 6-10.

# STUDYING THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS ON *CORDYCEPS PRUINOSA* (PETCH, 1924) BIOMASS

Le Viet Ky<sup>1,\*</sup>, Giang Sy Chung<sup>2</sup>, Tran Tinh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Biotechnology and High-Tech Agriculture Center, University of Phan Thiet, Vietnam*

<sup>2</sup>*Department of Science Management and International Cooperation, University of Phan Thiet, Vietnam*

**Abstract:** *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924) is an entomopathogenic fungus rich in valuable bioactive compounds; however, data on its biological characteristics and biomass cultivation in Vietnam remain limited. This study aimed to investigate the environmental conditions in a static liquid culture system by evaluating the mycelial biomass yield of a native strain isolated from Bidoup-Nui Ba National Park. Using a one-factor-at-a-time (OFAT) approach, the optimal culture conditions were identified: temperature at  $25 \pm 1$  °C, medium pH of 6.0, sucrose as the ideal carbon source, peptone as the most suitable organic nitrogen source, vitamin B<sub>1</sub> at 0.1 g/L, and a harvest time of 25 days. Under these conditions, the maximum dry biomass yield reached  $6.77 \pm 0.11$  g/L (coefficient of variation = 1.62%). These findings provide a foundation for standardizing the culture medium for larger-scale production and support further research on this fungal species.

**Keywords:** *Cordyceps pruinosa* (Petch, 1924), liquid-static culture, mycelial biomass, one-factor-at-a-time optimization

Author Information:

**MSc. Le Viet Ky** (\*Corresponding author), University of Phan Thiet, Lam Dong Province, Vietnam  
Email: lvky@upt.edu.vn

**MSc. Giang Sy Chung**, University of Phan Thiet, Lam Dong Province, Vietnam

Email: gschung@upt.edu.vn

**Dr. Tran Tinh**, University of Phan Thiet, Lam Dong Province, Vietnam

Email: ttinh@upt.edu.vn

## Note

The authors declare no competing interests regarding this article.