

# Nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015

Võ Thị Xuyên, Đinh Minh Hiệp, Trương Bình Nguyên, Vũ Thị Ngân,  
Đỗ Quang Dương, Ngô Kế Sương

**Tóm tắt**— Sinh khối nấm *Cordyceps* rất giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như adenosin, cordycepin, polisaccarit, protein... Vì thế, nhiều loài trong đó đã được nuôi trồng thu sinh khối để làm thuốc hoặc thực phẩm chức năng. Trong các nghiên cứu trước đã tiến hành nghiên cứu phân lập, định danh nấm *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015 và xác định môi trường tối ưu cho nuôi cấy. Tiếp theo là kết quả nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chủng nấm này để thu sinh khối giàu adenosin, polisaccarit và protein bằng việc sử dụng phần mềm BCPharSoft. 19 nghiệm thức dự đoán các thông số được thiết lập theo phần mềm BCPharSoft đã được thử nghiệm. Kết quả cho thấy các thông số đầu vào đạt tối ưu là: pH 6,7, chế độ chiếu sáng theo chu kỳ ngày đêm, nhiệt độ nuôi cấy  $25 \pm 2^\circ\text{C}/16$  ngày, tiếp theo  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày, sau đó  $25 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày; các thông số đầu ra: sinh khối khô, hàm lượng adenosin, polisaccarit và protein đạt tương ứng là: 19,98g/l, 835,50mg/kg, 11,24% và 0,27%.

**Từ khóa**— *Cordyceps pseudomilitaris*, sinh khối, adenosin, polisaccarit, protein, BCPharSoft.

## 1 MỞ ĐẦU

**C**ordyceps là nhóm nấm ký sinh trên côn trùng, từ lâu được sử dụng trong y học cổ truyền do giàu các hợp chất có hoạt tính sinh học như adenosin, cordycepin, polisaccarit, sterol... Ngoài ra còn có các protein, peptit, axit amin,

*Bài báo đã nhận vào ngày 15 tháng 3 năm 2017, đã được phân biên chỉnh sửa vào ngày 01 tháng 11 năm 2017.*

Võ Thị Xuyên, Trường ĐH Văn Lang, Khoa Môi trường - Công nghệ Sinh học (email: [vothixuyen@vanlanguni.edu.vn](mailto:vothixuyen@vanlanguni.edu.vn))  
Đinh Minh Hiệp, Ban quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP. Hồ Chí Minh (email: [dingminhhiiep@gmail.com](mailto:dingminhhiiep@gmail.com))

Trương Bình Nguyên, Trường Đại học Đà Lạt (email: [nguyentb@dlu.edu.vn](mailto:nguyentb@dlu.edu.vn))

Vũ Thị Ngân và Đỗ Quang Dương Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, VNU-HCM

Ngô Kế Sương, Viện Sinh học nhiệt đới TP.HCM, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

vitamin, nhiều nguyên tố khoáng đa lượng và vi lượng. Trong đó adenosin, cordycepin, polisaccarit, protein ... thể hiện đa dạng các hoạt tính [1, 2].

Tuy nhiên, sự tạo thành các hoạt chất từ nấm *Cordyceps* thường chịu sự tác động mạnh bởi điều kiện nuôi cấy gồm các yếu tố như pH, ánh sáng, nhiệt độ [3-7]. Hiện nay, có một số loài *Cordyceps* đã được nuôi cấy ở qui mô công nghiệp ở Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản, Thái Lan... Từ sinh khối đã tạo được nhiều sản phẩm có giá trị phục vụ bảo vệ sức khỏe cộng đồng [2]. Ở Việt Nam, nghiên cứu nấm *Cordyceps* đã quan tâm nhiều đến việc phát hiện loài mới [8-11], tìm môi trường nuôi cấy thích hợp [12-14], khảo sát một số hoạt tính sinh học từ các cao chiết [15-18]. Tuy nhiên, những nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy nấm *Cordyceps*, đặc biệt là việc sử dụng phần mềm tối ưu hóa còn chưa được áp dụng. Từ những kết quả bước đầu trong nghiên cứu về môi trường nuôi cấy [14], việc tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy gồm các yếu tố pH, ánh sáng, nhiệt độ đến việc thu sinh khối hệ sợi, các hợp chất có hoạt tính sinh học như adenosin, polisaccarit và protein của *C. pseudomilitaris* DL0015 được phân lập từ vùng núi Langbian - tỉnh Lâm Đồng [8] bằng phần mềm tối ưu hóa - BCPharSoft OPT được thực hiện trong nghiên cứu này.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

*C. pseudomilitaris* DL0015 được phân lập từ vùng núi Langbian - tỉnh Lâm Đồng, được định danh bằng phương pháp so sánh mô tả và giải phẫu hình thái [8].

Môi trường nuôi cấy trong nước chiết khoai tây gồm g/L: Saccharose-60, Pepton-15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,5 và  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,5 [14].

Điều kiện nuôi cấy với các mức được khảo sát: pH (5,2 – 6,7 – 8,7), Ánh sáng: (1) chiếu sáng liên tục; (2) Chu kỳ sáng tối theo ngày đêm (3) liên tục trong tối; Nhiệt độ gồm: (1):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/23$  ngày, tiếp theo  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày; (2):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/30$  ngày; (3):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/16$  ngày, tiếp theo  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày, sau đó  $25 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày.

## 2.2 Phương pháp

### 2.2.1 Chuẩn bị giống

*C. pseudomilitaris* DL0015 được cấy trên môi trường PGA. Sau 2 tuần nuôi cấy ở nhiệt độ phòng, dùng dụng cụ vô trùng lấy khối thạch (5mm) có sợi nấm chuyển vào bình tam giác 250ml chứa 100ml môi trường PG đã vô trùng (200g potato + 20g glucose/1 lít nước cất), ủ 7 ngày ở  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau đó, đồng nhất dịch nuôi cấy trước khi cho vào môi trường nuôi cấy chính.

### 2.2.2 Nuôi cấy và thu sinh khối hệ sợi

Bổ sung 4% dịch giống (V/V) vào các hộp 500ml chứa 200ml môi trường, ủ nuôi 30 ngày ở các điều kiện như mô tả ở trên. Sinh khối hệ sợi thu được bằng cách lọc qua giấy lọc Whatman No.1, rửa vài lần với nước cất và đem sấy ở  $60 - 70^\circ\text{C}$ . Tiến hành xác định trọng lượng sinh khối khô (SKK) bằng cách đem sấy ở  $105^\circ\text{C}$  cho đến khi trọng lượng không đổi.

### 2.2.3 Thiết kế mô hình thực nghiệm và xác định công thức điều kiện tối ưu

Thiết kế mô hình bằng phần mềm Design-Expert (Trial) 8.0v (2009, Stat-Ease, Inc, USA) gồm 19 lô thí nghiệm, mỗi lô 10 lít môi trường. Các thông số đầu vào được khảo sát gồm: pH, ánh sáng, nhiệt độ. Các thông số đầu ra là trọng lượng sinh khối khô (SKK), hàm lượng adenosin, polisaccarit và protein.

Sử dụng phần mềm tối ưu hoá BCPharSoft [19] để xác định điều kiện môi trường tối ưu.

Thực nghiệm kiểm chứng: kết quả thực nghiệm công thức điều kiện môi trường tối ưu được so sánh với kết quả dự đoán. Phân tích thống kê được thực hiện theo phần mềm SPSS.

### 2.2.4 Định lượng polisaccarit

Phương pháp định lượng polisaccarit được tiến hành dựa trên phản ứng màu đặc trưng giữa đường với sự hiện diện của phenol và axit sulfuric đậm đặc. Đo độ hấp thụ màu của dung dịch được đo ở bước sóng 490nm.

### 2.2.5 Định lượng protein theo phương pháp

#### Bradford

Phương pháp này dựa trên sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại của thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue (CBB) khi tạo phức với

protein. Trong điều kiện môi trường acid, khi chưa kết hợp với protein thì thuốc nhuộm có bước sóng hấp thụ cực đại 465nm; khi kết hợp với protein thì thuốc nhuộm hấp thụ cực đại sẽ ở bước sóng 595nm, cường độ màu tỷ lệ với nồng độ protein trong dung dịch.

### 2.2.6 Định lượng adenosin

Hàm lượng adenosin được định lượng bằng sắc ký lỏng kèm khối phổ (LC/MS/MS) tại phòng Phân tích Sắc ký, Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.HCM.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Thiết kế mô hình thực nghiệm

Mô hình thực nghiệm được thiết kế gồm 19 lô thí nghiệm ở (Bảng 1), với các thông số như đã nêu ở mục 2.1.

Thông số đầu ra: trọng lượng sinh khối khô (SKK) (g/l); hàm lượng adenosin (mg/kg SKK); hàm lượng polisaccarit và protein (% SKK).

Môi trường nuôi cấy như đã nêu ở mục 2.1. Nuôi ủ ở các điều kiện theo Bảng 1, sau 30 ngày nuôi cấy, hệ sợi được thu nhận. Tiến hành xác định SKK, adenosin, polisaccarit và protein. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Kết quả trên cho thấy, các điều kiện nuôi cấy khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến tích lũy SKK, adenosin, polisaccarit và protein tại TN 14 và đạt tương ứng là 19,98g/l, 835,50mg/kg, 11,24% và 0,27% (không khác nhau về mặt thống kê -  $p > 0,05$  so với hàm lượng protein ở TN 5 - 0,29% và thí nghiệm 16 - 0,25%). Ở các nghiệm thức khác, khi lượng sinh khối tăng thì hàm lượng adenosin, polisaccarit và protein cũng tăng theo như nghiệm thức 13, 14, 15, 16. Tuy nhiên vẫn có trường hợp không tuân theo quy luật này như nghiệm thức 3, 8, 17 và 19. Điều này có thể là do ảnh hưởng của một trong các điều kiện nuôi cấy hay có thể là do sự kết hợp giữa các điều kiện nuôi cấy không tương thích với nhau đã dẫn đến các sự khác biệt này.

### 3.2 Tối ưu hóa công thức

#### 3.2.1 Kết quả tối ưu

Dựa trên các kết quả về tích lũy sinh khối (SKK), adenosin, polisaccarit và protein phần mềm BCPharSoft dự đoán các thông số tối ưu thể hiện ở Bảng 2.

#### 3.2.2 Kiểm chứng thực nghiệm

Các thông số tối ưu dự đoán đạt được xấp xỉ với kết quả của nghiệm thức 14, vì thế nghiệm thức này được chọn là nghiệm thức tối ưu. Các

thông số đầu ra theo dự đoán và kiểm chứng từ phần mềm BCPharSoft được trình bày ở Bảng 3.

Phân tích thống kê cho thấy kết quả dự đoán và kết quả kiểm chứng không khác nhau về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.3 Phân tích ảnh hưởng của các thông số đầu vào đối với các thông số đầu ra bằng biểu đồ 3D

Với điều kiện chiếu sáng cố định ở mức 2 (chế độ chiếu sáng theo ngày sáng/đêm tối) như Bảng 2 đã phân tích ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đối với sự tích lũy SKK, adenosin, polisaccarit và protein như trên biểu đồ 3D (Hình 1).

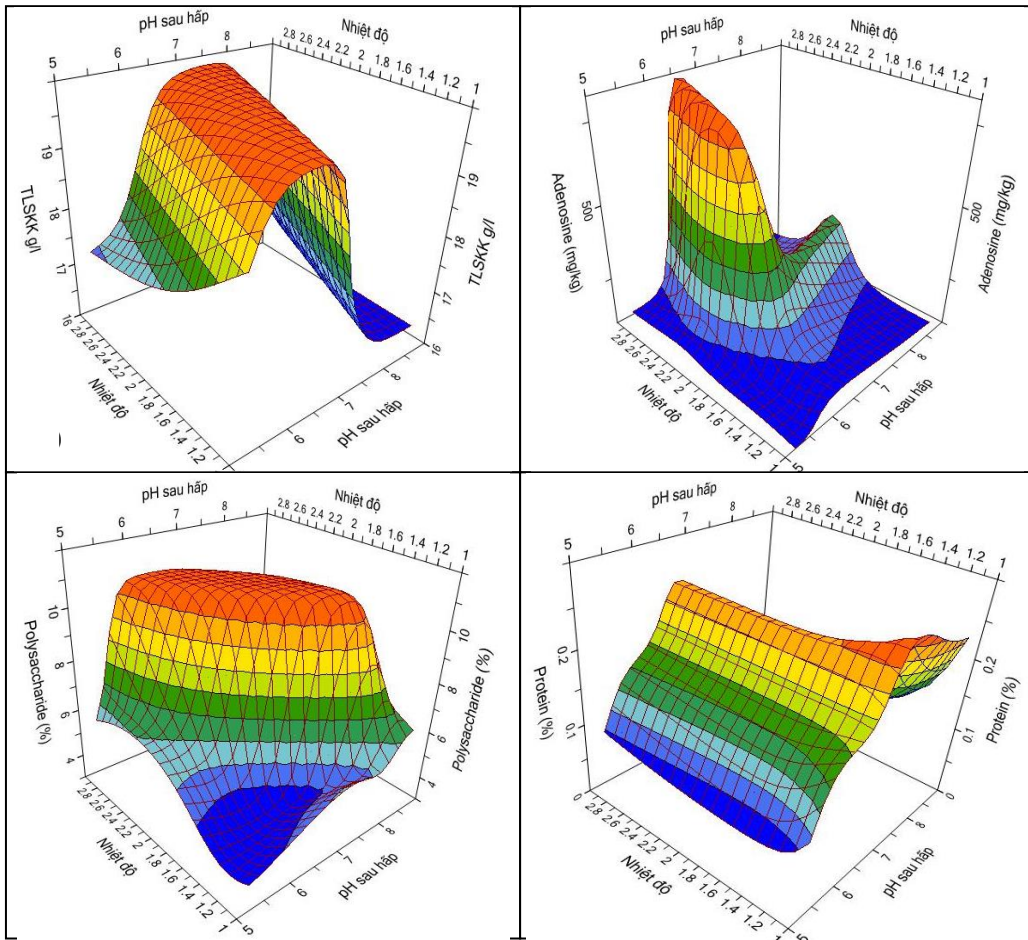
BẢNG 1  
DỮ LIỆU CỦA CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY THEO THIẾT KẾ VÀ KẾT QUẢ THỰC NGHIỆM

Stt (TN)	pH (sau khử trùng)	Chế độ chiếu sáng	Nhiệt độ	SKK (g/l)	Adenosin (mg/kg SKK)	Polisaccarit (% SKK)	Protein (% SKK)
1	8,7	3	3	14,45	78,00	6,54	0,17
2	8,7	1	3	13,50	88,00	6,41	0,13
3	5,2	2	3	18,25	86,60	5,46	0,10
4	8,7	2	2	17,00	298,00	7,84	0,12
5	8,7	1	2	16,00	122,00	4,23	0,29
6	6,7	3	1	16,50	98,20	4,12	0,18
7	6,7	1	1	17,50	173,00	6,30	0,19
8	5,2	1	1	19,00	140,00	5,40	0,21
9	8,7	3	2	13,05	300,00	8,78	0,21
10	8,7	3	1	14,90	125,00	5,46	0,18
11	5,2	3	1	16,80	118,00	4,02	0,15
12	5,2	2	2	17,00	143,00	5,95	0,06
13	6,7	3	2	17,00	398,00	7,61	0,20
<b>14</b>	<b>6,7</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>19,98</b>	<b>835,50</b>	<b>11,24</b>	<b>0,27</b>
15	6,7	1	3	18,35	300,00	10,18	0,13
16	6,7	2	2	19,10	368,00	10,24	0,25
17	5,2	3	3	16,02	68,50	2,22	0,16
18	5,2	1	2	15,00	175,00	5,04	0,09
19	5,2	2	1	18,90	48,00	3,53	0,11

Ghi chú: Ánh sáng gồm: (1) sáng liên tục; (2) sáng tối theo ngày đêm; (3) tối liên tục. Nhiệt độ gồm: (1):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/23$  ngày, tiếp theo  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày; (2):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/30$  ngày; (3):  $25 \pm 2^\circ\text{C}/16$  ngày, tiếp theo  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày, sau đó  $25 \pm 2^\circ\text{C}/7$  ngày.

BẢNG 2  
CÁC THÔNG SỐ TỐI ƯU DỰ ĐOÁN BỞI PHẦN MỀM BCPHARSOFT

Thông số đầu vào		Thông số đầu ra			
		SKK (g/l)	Adenosin (mg/kg SKK)	Polysaccharid (% SKK)	Protein (% SKK)
pH	6,7				
Chế độ chiếu sáng	Sáng và tối theo ngày đêm	19,71	825,93	10,66	0,25
Nhiệt độ	Mức 3				



Hình 1. Biểu đồ 3D biểu diễn sự ảnh hưởng của lên: (a) SKK, (b) adenosin, (c) polisaccarit và (d) protein

BẢNG 3  
CÁC THÔNG SỐ ĐẦU RA THEO DỰ ĐOÁN VÀ KIỂM CHỨNG

Thông số đầu ra	Dự đoán	Kiểm chứng (NT14)
SKK (g/l)	19,71	19,98
Adenosin (mg/kg SKK)	825,93	835,50
Polisaccarit (% SKK)	10,66	11,24
Protein (% SKK)	0,25	0,27

Biểu đồ 3D dự đoán từ BCPharSoft cho thấy, muốn tăng giá trị SKK thì *C. pseudomilitaris* DL0015 phải được nuôi cấy trong môi trường có pH trong khoảng từ 6 – 7,5 với nhiệt độ ở mức từ 1 đến 3 (hình 1a). Hình này cũng cho thấy khi pH từ 5,2 – 5,8 với nhiệt độ từ mức 2,5 đến 3 thì SKK không tăng; hoặc khi pH từ 8 – 8,7 với nhiệt độ ở khoảng mức 1 thì SKK giảm thấp nhất. Hình này cũng còn cho thấy khi pH trong khoảng 6,5 – 7 thì nhiệt độ hầu như ít ảnh hưởng đến giá trị SKK. Như vậy có thể thấy cả pH và nhiệt độ đều ảnh hưởng mạnh đến sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm trong đó pH ảnh hưởng có phần mạnh hơn.

Hình 1b cho thấy muốn tăng tích lũy adenosin thì *C. pseudomilitaris* DL0015 phải được nuôi trong môi trường với pH giới hạn trong khoảng từ 6 – 7 và nhiệt độ ở mức từ 2 đến 3. Hình này cũng cho thấy khi pH ở mức từ thấp đến cao (từ 5,2 – 8,7) với nhiệt độ ở khoảng mức 1 sự tích lũy adenosin đạt giá trị thấp nhất. Từ hình 1b có thể thấy cả pH và nhiệt độ đều có ảnh hưởng mạnh đến việc sản xuất adenosin.

Hình 1c: Muốn giá trị polisaccarit đạt mức cao thì *C. pseudomilitaris* DL0015 phải được nuôi trong môi trường có pH trong khoảng 6 – 7 với nhiệt độ ở khoảng mức 3. Hình này còn cho thấy nếu nhiệt độ ở khoảng mức 1 kết hợp với pH trong khoảng 5,2 – 7,5 sự tích lũy polisaccarit đạt giá trị thấp nhất. Như vậy có thể thấy cả pH và nhiệt độ đều có ảnh hưởng đến việc tích lũy polysaccharit.

Hình 1d: Để protein đạt mức khá cao thì *C. pseudomilitaris* DL0015 phải được nuôi trong môi trường có pH trong khoảng 6,5 – 7 với nhiệt độ ở mức 3. Hình 1d còn cho thấy so với nhiệt độ thì pH ảnh hưởng lên việc tích lũy protein có phần mạnh hơn. Như vậy với ánh sáng được cố định ở mức 2 và để phù hợp với các kết quả phân tích ở hình 1a, 1b và 1c thì pH thích hợp được xác định trong khoảng từ 6,5 – 7 với nhiệt độ ở mức 3 để thu được protein ở mức cao.

Như vậy công thức tối ưu phù hợp với công thức 14 trong thực nghiệm và không khác nhau về mặt thống kê ( $p > 0,05$ ) so với kết quả dự đoán từ phần mềm. Do vậy công thức 14 được chọn là công thức tối ưu.

Giá trị pH xác định được trong nuôi cấy *C. pseudomilitaris* DL0015 tương đồng với báo cáo của Xiao & cs [20], Ghatnur & cs [3], Lee & cs [4], trong đó các tác giả cho rằng pH trung tính là thích hợp cho sự phát triển nấm sợi và sản xuất các chất biến dưỡng ở nhiều loài nấm túi (Ascomycetes) và nấm đảm (Basidiomycetes); trong đó có *Cordyceps*. Ngoài ra, sự phát triển của *C. pseudomilitaris* 4671 trong nuôi cấy tĩnh có khoảng pH từ 4 – 7 đã được Plaingam & cs (1998) đề cập [5].

Có tác giả cho biết ở môi trường lỏng trong điều kiện tối *Cordyceps* phát triển tốt hơn so với điều kiện sáng liên tục [6]; ngoài ra Dong & Yao (2011) cũng cho biết *O. sinensis* (*C. sinensis*) nuôi cấy liên tục trong tối thì trọng lượng khô sinh khối tích lũy nhiều hơn so với khi nuôi cấy trong điều kiện chu kỳ chiếu sáng ngày/đêm (12 giờ sáng/12 giờ tối) [21]. Với *C. pseudomilitaris* DL0015, điều kiện chiếu sáng theo chu kỳ ngày đêm (ở mức 2) là thích hợp nhất cho cả tích lũy sinh khối lẫn tích lũy các thành phần mục tiêu khác như đã nêu ở trên.

Nhiệt độ nuôi cấy cũng là một trong những yếu tố quan trọng cho sự phát triển hệ sợi nấm: tốc độ tăng trưởng và quá trình trao đổi chất [22]. Theo Kim & cs (2003), Xu & Yun (2005), hầu hết nấm ký sinh côn trùng đều phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 20 – 25°C [6]. Bên cạnh đó, Plaingam & cs (1998) cũng cho thấy nhiệt độ thích hợp cho tăng trưởng tốt nhất của 5 chủng *C. pseudomilitaris* là ở 25°C, không phát triển ở 37°C [7]. Điểm khác biệt trong nghiên cứu này là đã xác định được nhiệt độ ở mức 3 là thích hợp nhất cho việc thu sinh khối và các thành phần mục tiêu, trong suốt 30 ngày nuôi cấy, thì 23 ngày *C. pseudomilitaris* DL0015 được nuôi cấy ở 25 ± 2°C và 7 ngày được nuôi ở nhiệt độ thấp 8 ± 2°C và đây có lẽ là một trong những yếu tố dẫn đến việc tích lũy được nhiều adenosin trong sinh khối. Cho đến nay vẫn chưa có một công bố nào về xác định điều kiện nuôi cấy *C. pseudomilitaris* tối ưu cho cả thu sinh khối lẫn adenosin, polisaccarit và protein.

Kết quả thu được cũng cho thấy, khi *C. pseudomilitaris* DL0015 được nuôi cấy trong môi trường và điều kiện nuôi cấy tối ưu thì lượng sinh khối khô, adenosin, polisaccarit và protein thu

được đều tăng; đặc biệt là hàm lượng adenosin (835,50mg/kg) tăng gấp hơn 2 lần so với hàm lượng adenosin (352,93mg/kg) thu được khi chỉ dựa vào tối ưu hóa các thành phần môi trường [14].

#### 4 KẾT LUẬN

Sự sinh trưởng phát triển của *C. pseudomilitaris* DL0015 cùng với sự tạo thành adenosin, polisaccarit và protein chịu tác động mạnh bởi các điều kiện nuôi cấy.

Trong môi trường nước chiết khoai tây với các thành phần (g/L): Saccharose - 60, Pepton - 15, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 0,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 0,5, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O - 0,5; việc sử dụng phần mềm BCPharSoft đã xác định công thức điều kiện tối ưu cho nuôi cấy *C. pseudomilitaris* DL0015 với các điều kiện: pH 6,7; chiếu sáng theo chu kỳ ngày/đêm; nhiệt độ là 25 ± 2°C/16 ngày, tiếp theo 8 ± 2°C/7 ngày và trở lại 25 ± 2°C/7 ngày tiếp theo thì lượng sinh khối khô, adenosin, polisaccarit và protein đạt tương ứng là 19,98g/l, 835,50mg/kg, 11,24% và 0,27%.

#### REFERENCES

- [1]. Y. Liu, J. Wang, W. Wang, H. Zhang, X. Zhang, C. Han, "Review Article: The Chemical Constituents and Pharmacological Actions of *Cordyceps sinensis*," *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.*, pp. 1- 12, Sep. 2015.
- [2]. J. Holliday and M. Cleaver, "Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review," *Int. J. Med. Mushrooms*, vol. 10, no. 3, pp. 219 – 234, Aug. 2008.
- [3]. S. M. Ghatnur, G. Parvatam and M. Balaraman, "Culture conditions for production of biomass, adenosine, and cordycepin from *Cordyceps sinensis* CS1197: Optimization by desirability function method," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 11, no. 44, pp. 448 – 456, Nov. 2015.
- [4]. H.S. Lee, H.S. Hwang and W.J. Yun, "Production of polisaccarites by submerged mycelial culture of entomopathogenic fungus *Cordyceps taomontana* and their apoptotic effects on human neuroblastoma cells," *Korean J. Chem. Eng.*, vol. 26, no. 4, pp. 1075 – 1083, Jan. 2009.
- [5]. N. Plaingam, Y. Lertwerawat and M. Tanticharoen, "Growth optimization and characteristics of *Cordyceps pseudomilitaris* 4671," *Asia-Pacific on Biodiversity and Biotechnology*, Thailand, Jul. 1998
- [6]. A.K. Sehgal and A. Sagar, "In vitro isolation and influence of nutritional conditions on the mycelial growth of the entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps militaris*," *Plant Pathol. J.*, vol. 5, no.3, pp. 315 – 321, 2006.
- [7]. N. Plaingam, P. Pongpanumaporn, Y. Letwerawat and M. Tonticharoen, "Differentiation of growth characteristic between *Cordyceps pseudomilitaris* và *Cordyceps militaris*," in *The 10<sup>th</sup> Annual General Meeting of the Thai Society for Biotechnology for a Self- Sufficient Economy*, Bangkok, Thailand, Nov. 1998.
- [8]. L.T.A. Đào, P.N.K. Hoàng, N.T.K. Khương, L.H.A. Thúy, Đ.M. Hiệp, T.B. Nguyễn, "Phát hiện loài nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps pseudomilitaris* Hywel-Jones & Sivichai, 1994 tại vùng núi Langbian ở Đà Lạt, Việt Nam," *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 8, no. 3B, pp. 1507 – 1511, 2010.
- [9]. S.K. Han, K. Y. Jeong, J.M. Sung, P.T. Vuong and L.V. Ha, "Diversity of *Cordyceps* and Its Allies in Cuc Phuong National Park," *Vietnam MushWorld.com.*, 2005.
- [10]. P.T. Hạnh, L.H.A. Thúy, Đ.M. Hiệp và T.B. Nguyễn, "Phát hiện loài mới thuộc chi *Cordyceps*, *Ophiocordyceps langbianensis* tại núi Langbian, tỉnh Lâm Đồng," *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 9, no. 4B, pp. 825 – 829, 2011.
- [11]. L.T. Liên, P.N.K. Hoàng, Đ.T.T. Lý, L.H.A. Thúy, Đ.M. Hiệp và T.B. Nguyễn, "Phát hiện loài nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps neovolkiana* tại núi Langbian - Đà Lạt, Việt Nam," *Tạp chí Công nghệ sinh học*, vol. 8, no. 3A, pp. 1007 – 1013, 2010.
- [12]. L.V. Vè, T.T. Hà, N.T.B. Thùy và N.X. Nghiễn, "Bước đầu nghiên cứu công nghệ nuôi rỗng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris* L.ex Fr) ở Việt Nam," *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, vol. 13, no. 3, pp. 445 – 454, Apr. 2015.
- [13]. V.T. Xuyên, V.T. Ngân, Đ.M. Hiệp, T.B. Nguyễn và N.K. Suong, "Ảnh hưởng của nguồn cacbon, nitơ đến sinh khối hệ sợi và các hợp chất sinh học từ *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015," *Tạp chí Khoa học Đại học quốc gia Hà Nội*, vol. 31, no. 4S, pp. 497 – 502, Oct. 2015.
- [14]. V.T. Xuyen, V.T. Ngan, D.Q. Duong, D.M. Hiep, T.B. Nguyen và N.K. Suong, "Medium optimization for culturing *C. pseudomilitaris* DL0015", *Journal of Science and Technology – Vietnam Academy of Science and Technology*, vol. 53, no. 6B, pp. 81-89, 2015.
- [15]. Đ.H. Quyên, T.P.H. Yển, V.T. Xuyên, Đ.M. Hiệp và T.B. Nguyễn, "Khảo sát hoạt tính kháng cholinesterase của các cao chiết từ sinh khối của một số chủng nấm *Cordyceps* sp. phân lập tại Việt Nam", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 10, no. 4A, pp. 1033- 1039, 2012.
- [16]. Đ.H. Quyên, T.P.H. Yển, V.T. Xuyên, Đ.M. Hiệp, T.B. Nguyễn, "Khảo sát khả năng cải thiện suy giảm trí nhớ của cao chiết từ sinh khối *Cordyceps* spp. Trên chuột nhắt", *Tạp chí Sinh học*, vol. 36, no. 1se, pp. 203- 208, Mar. 2014.
- [17]. H. Thư, N.Đ. Nghiệp, V.T. Xuyên, Đ.M. Hiệp, T.B. Nguyễn, "Nghiên cứu tiềm năng của *Cordyceps* sp. trong việc bảo vệ tế bào HEPG2 chống lại tác nhân oxy hóa," *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, vol. 51, no. 5B, pp. 339 – 343, Oct. 2012.
- [18]. H. Thư, N.Đ. Nghiệp, V.T. Xuyên, Đ.M. Hiệp và T.B. Nguyễn, "Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa của cao chiết từ một số chủng nấm *Cordyceps* sp. phân lập tại Việt Nam," *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, vol. 10, no. 4A, pp. 1041- 1046, 2012.
- [19]. Đ.Q. Dương và C.K. Kiệt, "Xây dựng phần mềm BCPharSoft giải quyết bài toán tối ưu hoá công thức và quy trình sản xuất dược phẩm", *Tạp chí Dược học*, no. 4, pp. 48 – 51, Oct. 2010.
- [20]. H. Xiao, D.X. Chen, Y. Xiao, J.W. Liu, Z.L. Liu, W.H. Wan, N. Fang and B.B. Tan, "Optimization of submerged culture conditions for mycelial polisaccarite production in *Cordyceps pruinoso*," *Process Biochemistry*, vol. 39, pp. 2241–2247, Oct. 2004.

- [21]. C.H. Dong and Y.J. Yao, "On the reliability of fungal materials used in studies on *Ophiocordyceps sinensis*", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 38, no. 8, pp. 1027-1035, Sep. 2010.
- [22]. S. Yang, L. Jin, X. Ren, J. Lu and Q. Meng, "Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polisaccarites *in vitro*," *J. Food. Drug. Anal.*, vol. 22, pp 468 – 476, Dec. 2014.

**Võ Thị Xuyên** sinh ngày 20/11/1975, tại Tiền Giang. Tốt nghiệp Đại học ngành Sư phạm sinh, Trường Đại học Cần Thơ, Tp. Cần Thơ năm 1996. Tốt nghiệp Thạc sỹ chuyên ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2006. Năm 2011 đến hiện tại - Học nghiên cứu sinh, chuyên ngành Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM.

Từ 9/2003 đến 5/2017 là Giảng viên cơ hữu Khoa Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Văn Lang; từ 6/2017 đến nay là Giảng viên cơ hữu Khoa Môi Trường và Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Văn Lang. Từ 2008 đến hiện tại là tác giả chính và đồng tác giả của nhiều bài báo đã được đăng trên các tạp chí chuyên ngành có uy tín. Hiện tại các công trình nghiên cứu của tôi liên quan đến nấm *Cordyceps* – bao gồm các nghiên cứu về tìm hiểu đặc điểm sinh học, về hoạt chất, hoạt tính sinh học ... để từ đó làm cơ sở cho việc khai thác và ứng dụng.

**Đinh Minh Hiệp** sinh năm 1975 tại Gia Định. Tốt nghiệp đại học chuyên ngành Vi sinh Sinh hóa tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 1997. Tốt nghiệp cao học chuyên ngành Hóa sinh tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2002. Tốt nghiệp Tiến sĩ chuyên ngành Hóa sinh tại Viện Sinh học Nhiệt đới năm 2013.

Năm 2001-2013 công tác tại Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM, năm 2014 đến nay công tác tại Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao TP.HCM. Từ năm 1997 đến nay tham gia hướng dẫn tốt nghiệp và thỉnh giảng tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM và một số trường ĐH khác. Tác giả và đồng tác giả trên 30 báo cáo trong các hội nghị khoa học quốc gia, trên 20 báo cáo trong các hội nghị khoa học quốc tế, hơn 60 bài báo khoa học trong nước và hơn 10 bài báo khoa học quốc tế. Hướng nghiên cứu hiện nay

đang tập trung vào nhóm nấm ký sinh côn trùng và enzyme thủy phân.

**Trương Bình Nguyên** sinh ngày 25/6/1966, tại Quảng Ninh. Tốt nghiệp Đại học ngành Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt, Tp. Đà Lạt năm 1991. Tốt nghiệp Thạc sỹ Tài nguyên Môi trường, Trường Đại học Đà Lạt năm 2002. Năm 2003-2008 Nghiên cứu sinh, chuyên ngành Nấm học, Trường Đại học Chiba, Nhật Bản. Đạt học vị tiến sĩ năm 2008 tại Nhật Bản.

Từ năm 1991-1997, là kỹ thuật viên công tác tại phòng sản xuất giống nấm, Xí nghiệp giống Lâm nghiệp Đà Lạt. 1997-1998, công tác tại phòng sản xuất giống nấm, Công ty Vanny Food, Đức Trọng, Lâm Đồng. 1998-2013, nghiên cứu viên, trưởng phòng, công tác tại phòng Công nghệ Vi sinh, Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên. 2013- nay, giảng viên khoa Sinh học, Viện trưởng Viện Nghiên cứu và Ứng dụng nông nghiệp công nghệ cao, trường Đại học Đà Lạt. Là tác giả và đồng tác giả của hơn 40 bài báo về nấm và công nghệ nấm trên các tạp chí khoa học có uy tín trong và ngoài nước

**Vũ Thị Ngân** sinh ngày 08/05/1990. Tốt nghiệp ngành Sinh học Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM tháng 10/2013.

Tháng 8/2013 – tháng 8/2015: nhân viên kỹ thuật, Công ty Cổ phần Nguyên Long – Lạc Dương – Lâm Đồng. Tháng 11/2015 – 12/2017: Học viên cao học, chuyên ngành Vi sinh vật, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM.

Là đồng tác giả của một số bài báo được đăng trên các Tạp chí chuyên ngành trong nước có uy tín.

**Đỗ Quang Dương** sinh ngày 01/06/1977, tại Biên Hòa, Đồng Nai. Tốt nghiệp Đại học ngành Công nghệ Thông tin, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 1999. Tốt nghiệp Thạc sỹ chuyên ngành Công nghệ Thông tin, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQG-HCM năm 2002. Năm 2004 đến 2007, Học nghiên cứu sinh, chuyên ngành Dược học (tối ưu hóa công thức thuốc bằng máy tính), Viện nghiên cứu IPI, Trường Đại học Bradford, Vương quốc Anh. Được phong Học hàm Phó Giáo sư năm 2013 chuyên ngành Dược học.

Từ 9/1999 đến nay là Giảng viên cơ hữu Khoa Dược - Đại học Y Dược TP.HCM. Từ 2003 đến hiện tại là tác giả chính và đồng tác giả của nhiều bài báo đã được đăng trên các tạp chí chuyên ngành có uy tín trong nước và quốc tế. Hiện tại các công trình nghiên cứu của tôi liên

quan đến việc ứng dụng kỹ thuật máy tính nghiên cứu thiết kế & tối ưu hóa công thức và quy trình— bao gồm các nghiên cứu công thức dược phẩm, môi trường nuôi cấy vi sinh... làm cơ sở cho việc nghiên cứu lý thuyết và triển khai ứng dụng.

**Ngô Kế Suong** sinh ngày 25/10/1938, tại Bắc Ninh. Từ 1956 đến 1962 học Đại học ngành Sinh học và nhận bằng tốt nghiệp Đại học tại Đại học Tổng hợp Moskva mang tên Lômônôxốp, LB Nga (trước là Liên Xô), chuyên ngành Sinh hóa; từ 1966 - 1971 học và tốt nghiệp Nghiên cứu sinh ngành Sinh học, chuyên ngành Sinh hóa, nhận bằng Dr. rer. Nat. tại ĐHQG Leipzig CHDC Đức; học Posdoct tại Viện Sinh học Phân tử và Di truyền, Viện HLKH Ucraina từ 1988 và nhận

bằng TSKH Sinh học tháng 12 năm 1989; được phong hàm PGS năm 1991.

Từ 1962 cho đến khi nghỉ hưu luôn làm công tác nghiên cứu khoa học, lúc đầu tại Ủy Ban Khoa học nhà nước; sau đó cứ tách dần thành Ủy Ban KH&KT nhà nước (1966), Viện KH Việt nam (1976), Trung tâm Khoa học Tự nhiên & Công nghệ Quốc gia (1993), Viện KH&CN Việt nam (2003) và nay là Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt nam. Trong quá trình công tác đã kinh qua các chức danh và chức vụ : Nghiên cứu viên, NCV chính, NCV cao cấp; cán bộ nghiên cứu, Phó rồi Trưởng Phòng, Phó rồi Giám đốc Trung tâm Sinh học Thực nghiệm Viện KH Việt nam, từ 1993 – 1998 Viện trưởng Viện Sinh học Nhiệt đới thuộc Trung tâm KHTN&CNQG và nay là Viện HLKH&CN Việt nam.

## Study on optimization of conditions for *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015 culture

Vo Thi Xuyen, Dinh Minh Hiep, Truong Binh Nguyen, Vu Thi Ngan,  
Do Quang Duong, Ngo Ke Suong

**Abstract**— *Cordyceps* biomass contains large number of biologically active substances in such as adenosine, cordycepin, polysaccharides, proteins... So many *Cordyceps* species have been cultured for biomedical or functional food. Studies on isolation, classification and optimum media for cultivating of *Cordyceps pseudomilitaris* DL0015 have been informed. In this followed study, optimization of culture conditions of this fungus for the production of high adenosine, polysaccharide, and protein biomass were checked using BCPharSoft. 19 treatments the BCPharSoft predicted had been tested. The results showed that the optimum input parameters were initial pH 6.7; light cycles day and night; temperature varies from at  $25 \pm 2^\circ\text{C}/16$  days followed by  $8 \pm 2^\circ\text{C}/7$  days and ended by  $25 \pm 2^\circ\text{C}/7$  days; output parameters for mycelial biomass, adenosine, polysaccharide, and protein were 19.98 g/l, 835.50 mg/Kg, 11.24%, and 0.27%, respectively.

**Index Terms**— *Cordyceps pseudomilitaris*, biomass, adenosine, polisaccarite, protein, BCPharSoft.