

Nghiên cứu khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của *Cordyceps militaris* trong lên men bề mặt dịch thể

Vũ Xuân Tạo^{1*}, Trần Thu Hiền², Đào Ngọc Ánh¹, Trần Bảo Trâm¹, Trương Thị Chiên¹, Đỗ Thị Kim Trang¹, Trần Văn Tuấn²

¹Viện Phát triển Công nghệ tiên tiến, Viện Đổi mới sáng tạo Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ, nhà C6, phường Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/3/2026; ngày chuyển phản biện 18/3/2026; ngày nhận phản biện 1/4/2026; ngày chấp nhận đăng 8/4/2026

Tóm tắt:

Cordyceps militaris được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền và làm thực phẩm. Loài nấm này có khả năng sinh cordycepin và pentostatin, đây là những hoạt chất có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh, tăng cường miễn dịch, gây độc đối với tế bào ung thư... Tuy nhiên, nấm *C. militaris* chủ yếu được sản xuất dạng quả thể làm nguyên liệu. Hiện nay, phương pháp lên men bề mặt dịch thể đã bước đầu cho thấy tiềm năng ứng dụng cao trong sản xuất các hoạt chất ngoại bào ở nấm. Nghiên cứu này đã tuyển chọn được 3 chủng nấm *C. militaris* (HL8, BN25.2 và TN25.1) có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao. Cả 3 chủng nấm đều có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào ổn định qua 5 thế hệ liên tiếp. Hơn nữa, nghiên cứu đã xác định được các điều kiện thích hợp trong lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* bao gồm sử dụng ánh sáng LED trắng, môi trường lên men với nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là tryptone, pH 6 và thời gian lên men là 45 ngày. Ở điều kiện lên men thích hợp, khả năng sinh cordycepin ngoại bào của 3 chủng nấm HL8, BN25.2 và TN25.1 tương ứng trung bình đạt là 1220, 1415 và 1225; trong khi pentostatin đạt 45,6, 35,6 và 37,6 mg/l dịch lên men. Đây là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho phát triển các loại thực phẩm và dược phẩm.

Từ khóa: cordycepin, *Cordyceps militaris*, lên men bề mặt dịch thể, ngoại bào, pentostatin.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

Study on extracellular production of cordycepin and pentostatin by *Cordyceps militaris* under liquid surface fermentation

Xuan Tao Vu^{1*}, Thu Hien Tran², Ngoc Anh Dao¹, Bao Tram Tran¹, Thi Chien Truong¹, Thi Kim Trang Do¹, Van Tuan Tran²

¹Institute for Advanced Technology Development, National Academy for Advanced Technology and Innovation, Ministry of Science and Technology, C6 Building, Thanh Xuan Ward, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi, 334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Ward, Hanoi, Vietnam

Received 17 March 2026; revised 1 April 2026; accepted 8 April 2026

Abstract:

Cordyceps militaris is widely used in traditional medicine and as a food source. This fungus is capable of producing cordycepin and pentostatin, two bioactive compounds with antimicrobial, immunomodulatory, and cytotoxic activities against cancer cells. However, *C. militaris* is predominantly produced in the form of fruiting bodies for use as raw material. Recently, liquid-state surface fermentation has shown considerable potential for enhancing extracellular metabolite production in fungi. This study selected three *C. militaris* strains (HL8, BN25.2, and TN25.1) with high extracellular production of cordycepin and pentostatin. All three strains demonstrated stable extracellular production of cordycepin and pentostatin over five consecutive generations. Furthermore, the study identified suitable conditions for surface liquid-state fermentation of *C. militaris*, including the use of white LED light, a fermentation medium containing glucose as the carbon source and tryptone as the nitrogen source, an initial pH of 6, and a fermentation duration of 45 days. Under the suitable fermentation conditions, the average extracellular production of cordycepin by strains HL8, BN25.2, and TN25.1 reached 1220, 1415, and 1225 mg/l, respectively, while pentostatin production reached 45.6, 35.6, and 37.6 mg/l fermentation broth. The fermentation broth represents a promising source of raw material for the development of food and pharmaceutical products.

Keywords: cordycepin, *Cordyceps militaris*, extracellular, liquid surface fermentation, pentostatin.

Classification numbers: 1.6, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: taovx.tsa@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Chi nấm *Cordyceps* được ghi nhận gồm nhiều loài nấm có giá trị dược liệu và được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền ở nhiều nước trên thế giới. Trong số các loài nấm thuộc chi *Cordyceps*, *C. militaris* là loài nấm dược liệu quý, được nghiên cứu và nuôi trồng phổ biến nhất. Loài này có tác dụng hỗ trợ điều trị nhiều bệnh lý bao gồm ung thư, suy giảm miễn dịch, rối loạn chức năng gan thận, viêm phế quản mạn tính, suy giảm sinh lý nam, tăng cholesterol và tình trạng mệt mỏi kéo dài [1, 2]. Hoạt chất được quan tâm nhiều nhất là cordycepin, với khả năng điều hòa miễn dịch, chống ung thư, chống oxy hóa, kháng viêm và tiềm năng hỗ trợ điều trị COVID-19 [2-4]. Ngoài ra, nấm *C. militaris* đã được phát hiện có khả năng sinh tổng hợp cùng một cụm gen duy nhất ở nấm *C. militaris*. Pentostatin tham gia bảo vệ cordycepin khỏi quá trình khử amin bằng cách ức chế hoạt động của adenosine deaminase (ADA) [5]. Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã phê duyệt pentostatin là thuốc, tên thương mại là Nipent, dùng trong điều trị các bệnh về bạch cầu [6]. Như vậy, việc khai thác các hoạt chất cordycepin và pentostatin từ nấm *C. militaris* là hoàn toàn khả thi và cần thiết.

Hiện nay, nấm *C. militaris* chủ yếu được nuôi trồng để thu quả thể với các quy mô khác nhau. Việc sản xuất quả thể nấm *C. militaris* đòi hỏi diện tích lớn, thời gian nuôi kéo dài. Công nghệ lên men đã được ứng dụng trong sản xuất các hoạt chất từ nấm *C. militaris*. Công nghệ lên men chìm có tiềm năng trong việc rút ngắn thời gian, nhưng hàm lượng cordycepin trong hệ sợi nấm *C. militaris* thu được thấp hơn so với quả thể, đồng thời quy trình phức tạp và đòi hỏi chi phí đầu tư ban đầu cao [7]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định tiềm năng và tính phù hợp của phương pháp lên men bề mặt dịch thể trong sản xuất các hoạt chất ngoại bào [8-10]. So với phương pháp lên men chìm, lên men bề mặt dịch thể đơn giản hơn, không yêu cầu các thiết bị phức tạp, hiện đại như hệ thống lên men, hệ thống cấp khí... Hơn nữa, phương pháp lên men bề mặt dịch thể phù hợp với điều kiện của các cơ sở nuôi trồng nấm tại Việt Nam. Hiện nay, tại Việt Nam, chưa ghi nhận đề tài nghiên cứu hay công bố khoa học nào đề cập tới việc ứng dụng công nghệ lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* để sản xuất hoạt chất cordycepin và pentostatin ngoại bào. Nghiên cứu này là cơ sở khoa học quan trọng cho việc sản xuất các hoạt chất ngoại bào từ nấm dược liệu *C. militaris* bằng phương pháp lên men bề mặt dịch thể tạo nguồn nguyên liệu mới cho phát triển các loại thực phẩm và dược phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

10 mẫu quả thể nấm thu thập tại các đơn vị nuôi trồng thương mại nấm Đông trùng hạ thảo tại Việt Nam (Bắc Ninh, Thái Nguyên, Lào Cai, Quảng Ngãi) ký hiệu là:

BN25.1, BN25.2, BN25.3, TN25.1, TN25.2, TN25.3, LC25.1, LC25.2, QN25.1 và QN25.2. Các mẫu được giữ nguyên trạng và đưa ngay về phòng thí nghiệm để phân lập.

20 chủng nấm *C. militaris* từ bộ sưu tập của Viện Phát triển Công nghệ tiên tiến, Viện Đổi mới sáng tạo Quốc gia (đã có mã số đăng ký trên GenBank) bao gồm các chủng: HN01 (OQ674539.1); HN02 (OQ674545.1); TN01 (OQ674547.1); TN02 (OQ674549.1); TN03 (OQ674702.1); TN04 (OQ674703.1); LC01 (OQ676501.1); SH01 (OQ674705.1); SH02 (OQ674708.1); SH03 (OQ674709.1); SH04 (OQ676497.1); SH05 (OQ676499.1); SH06 (OQ674711.1); QN6 (OQ676502.1); DL01 (OQ674717.1); HL6 (OQ676498.1); HL8 (OQ674722.1); HL11 (OQ676500.1); HL12 (OQ674732.1); HL13 (OQ674731.1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập và xác định đặc điểm hình thái các chủng nấm *C. militaris*: Quả thể nấm được tách ra khỏi hộp nuôi nấm, loại bỏ hai đầu, cắt thành lát nhỏ và đặt lên môi trường PDA (potato dextrose agar) có chứa chloramphenicol (nồng độ 100 µg/ml). Đĩa môi trường chứa lát cắt quả thể được ủ tối ở 22-25°C. Sau 3-5 ngày, hệ sợi nấm màu trắng xuất hiện và được thuần khiết bằng cách cấy chuyển sang đĩa môi trường PDA mới. Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA để thu bào tử [11]. Bào tử các chủng nấm được nuôi cấy trực tiếp trên tiêu bản hiển vi vô trùng có chứa môi trường PDA, sau 3 ngày tiến hành quan sát đặc điểm hình thái của hệ sợi và bào tử nấm dưới kính hiển vi quang học [12].

Phương pháp đánh giá khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của các chủng nấm: Quá trình nhân giống nấm *C. militaris* dạng dịch thể được thực hiện theo T.X. Vu và cs (2024) [2]. Các chủng nấm được tiến hành lên men bề mặt dịch thể ở cùng điều kiện trong 30 ngày ở 25°C, chiếu sáng 10 giờ/ngày bằng ánh sáng đèn LED trắng với cường độ chiếu sáng trung bình là 55±5 µmol/m²/s. Thành phần môi trường dùng trong lên men dịch thể bao gồm (1 l): dịch chiết 200 g khoai tây, 40 g glucose, 15 g tryptone, pH 7. Dịch môi trường (200 ml/hộp 650 ml), được khử trùng và làm nguội đến nhiệt độ phòng, sau đó cấy giống với tỷ lệ 5%. Hộp nuôi sau khi cấy giống được lên men trong điều kiện tối 7 ngày để hệ sợi nấm phát triển một lớp mỏng trên bề mặt môi trường dịch, sau đó bắt đầu chiếu sáng. Sau 30 ngày lên men, dịch lên men được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 20 phút để thu phần dịch, phục vụ phân tích hàm lượng cordycepin và pentostatin. Hàm lượng cordycepin được xác định trên hệ thống HPLC theo L. Huang và cs (2009) [7]. Hàm lượng pentostatin trong dịch lên men được xác định bằng phương pháp HPLC theo V.X. Tao và cs (2023) [13].

Đánh giá tính ổn định về khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của các chủng nấm *C. militaris* đã tuyển chọn: Để đánh giá tính ổn định về khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của các chủng nấm *C. militaris* đã tuyển chọn, bào tử các chủng nấm được cấy chuyển liên tiếp trên môi trường thạch PDA để thu bào tử liên tục 5 thế hệ [14]. Bào tử các chủng nấm ở các thế hệ được nuôi cấy trên môi trường PDA sử dụng cho nhân giống dịch thể dùng cho quá trình lên men. Hàm lượng cordycepin và pentostatin trong dịch lên men được xác định ở mỗi thế hệ.

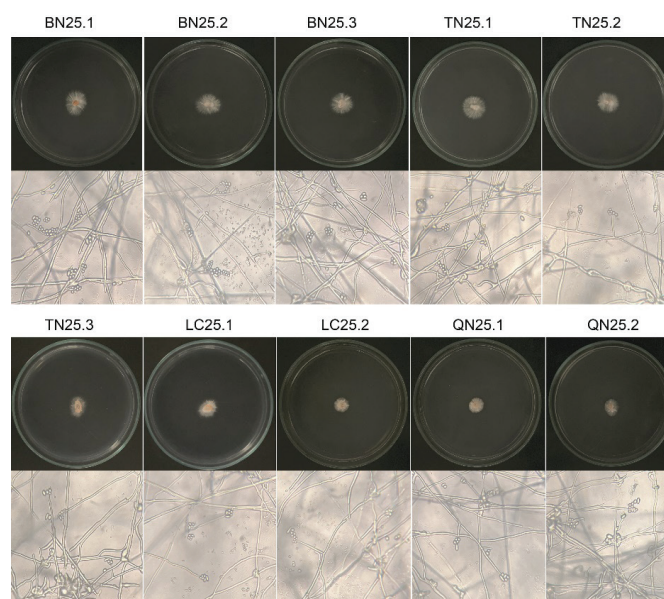
Định danh chủng nấm đã tuyển chọn dựa trên phân tích trình tự vùng ITS của rDNA: Các chủng nấm đã phân lập, tuyển chọn được nuôi trong môi trường PDB (lắc 150 vòng/phút ở 25°C trong tối), sau 4 ngày tiến hành thu hệ sợi nấm sử dụng cho việc tách chiết DNA. DNA tổng số được tách chiết từ hệ sợi nấm theo quy trình nhóm nghiên cứu đã công bố [15]. Mẫu DNA tổng số được sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại vùng ITS sử dụng cặp mồi ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3') [16]. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra, tinh sạch và được giải trình tự bởi công ty Apical Scientific Sdn. Bhd. (Malaysia). Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong GenBank sử dụng công cụ BLAST. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự ITS được xây dựng sử dụng phần mềm MEGA6.

Xác định một số điều kiện thích hợp cho lên men bề mặt dịch thể nấm được liệu *C. militaris* sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào: Điều kiện lên men thích hợp được xác định bằng cách so sánh hàm lượng cordycepin và pentostatin của dịch lên men nấm ở các điều kiện khác nhau. Hàm lượng cordycepin và pentostatin được xác định bằng phương pháp HPLC [7, 13]. Các điều kiện được xác định lần lượt bao gồm: ánh sáng, nguồn cacbon, nitơ, pH và thời gian lên men. Các điều kiện được nghiên cứu độc lập với nhau bằng cách thay đổi yếu tố khảo sát trong điều kiện lên men cơ bản đã được trình bày ở thí nghiệm trên. Kết quả lựa chọn phù hợp của thí nghiệm trước sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Ánh sáng gồm 7 công thức (CT) chiếu sáng khác nhau: CT1: LED trắng (vùng quang phổ rộng); CT2: LED đỏ (Red-630 nm); CT3: LED xanh (450 nm); CT4, 5, 6 LED đỏ - xanh (ở các tỷ lệ LED đỏ - xanh là 5:5, 7:3, 3:7); CT7: Đèn huỳnh quang. Nguồn cacbon gồm: sucrose, maltose, lactose và tinh bột với hàm lượng là 40 g/l. Các nguồn nitơ bao gồm: tryptone, peptone, cao nấm men, NaNO₃, NH₄Cl với hàm lượng 15 g/l. pH môi trường gồm các pH 5, 6, 7 và 8). Thời gian lên men gồm 15, 30, 45 và 60 ngày.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Phân lập, tuyển chọn chủng nấm có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao

Nhằm có được bộ sưu tập các chủng nấm *C. militaris* dùng cho nghiên cứu tuyển chọn các chủng có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao, ngoài 20 chủng nấm *C. militaris* (đã có mã số đăng ký trên GenBank) thuộc bộ sưu tập giống nấm được cung cấp bởi Viện Phát triển Công nghệ tiên tiến, nghiên cứu tiến hành phân lập thêm các chủng nấm khác từ nguồn nấm *C. militaris* đang nuôi trồng tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, từ 10 mẫu quả thể nấm *C. militaris* đã phân lập được 10 chủng nấm ký hiệu là BN25.1, BN25.2, BN25.3, TN25.1, TN25.2, TN25.3, LC25.1, LC25.2, QN25.1 và QN25.2. Các chủng nấm phân lập được sinh trưởng tạo hệ sợi màu trắng trên môi trường PDA. Các chủng nấm sau phân lập được tiến hành thu bào tử dùng cho nuôi cấy trên tiêu bản hiển vi. Quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần cho thấy, trên hệ sợi các chủng nấm hình thành cấu trúc cuống sinh bào tử, bào tử có dạng hình trứng (hình 1). Với các đặc điểm về mẫu quả thể thu thập, hệ sợi, bào tử và cấu trúc sinh bào tử cho thấy đây là những đặc điểm đặc trưng của loài *C. militaris* [17].



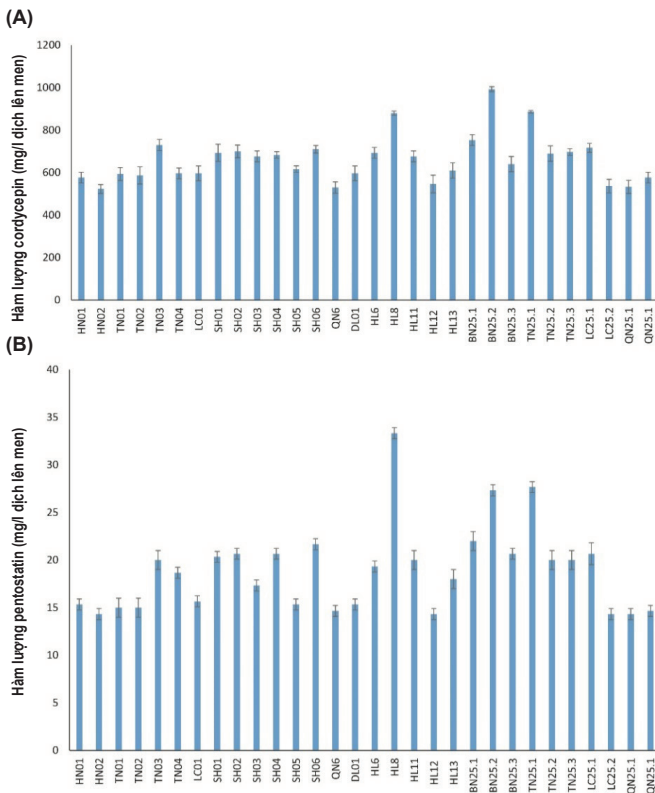
Hình 1. Hệ sợi các chủng nấm phân lập từ mẫu quả thể nấm *C. militaris* thu thập.

Để tuyển chọn được chủng nấm có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao, 30 chủng nấm được tiến hành lên men bề mặt dịch thể (hình 2). Sau 30 ngày, dịch lên men được thu để xác định hàm lượng cordycepin và pentostatin. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng cordycepin ngoại bào dao động trong khoảng 523-993 mg/l dịch lên men. Hàm lượng pentostatin



Hình 2. Lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris*.

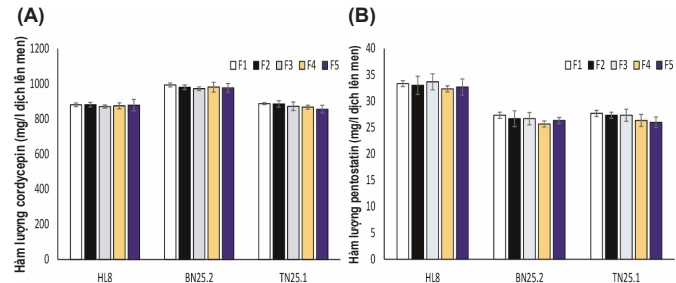
ngoại bào dao động trong khoảng 14-33 mg/l dịch lên men. Trong đó, chủng nấm *C. militaris* HL8 và 2 chủng nấm mới phân lập là BN25.2 và TN25.1 cho khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao nhất. Hàm lượng cordycepin ngoại bào tương ứng của 3 chủng nấm trung bình là 880, 993 và 886 mg/l dịch lên men. Hàm lượng pentostatin trong dịch lên men tương ứng trung bình là 33,3; 27,3 và 27,6 mg/l dịch lên men (hình 3). Hàm lượng hoạt chất cordycepin và pentostatin trong quả thể đã được xác định trong nhiều nghiên cứu về nấm *C. militaris* [2, 3, 18]. Y. Xia và cs (2017) [5] đã chứng minh pentostatin và cordycepin được sinh tổng hợp từ cùng một cụm gen ở *C. militaris*, đồng thời pentostatin giữ vai trò trong việc bảo vệ cordycepin thông qua ức chế adenosine deaminase (ADA), ngăn cản quá trình khử amin. Tuy nhiên, hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu đề cập tới hàm lượng cordycepin và pentostatin ngoại bào từ nấm *C. militaris*.



Hình 3. Hàm lượng cordycepin và pentostatin trong dịch lên men các chủng nấm sau 30 ngày. (A) Hàm lượng cordycepin; (B) Hàm lượng pentostatin.

3.2. Đánh giá tính ổn định về khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của các chủng nấm đã tuyển chọn

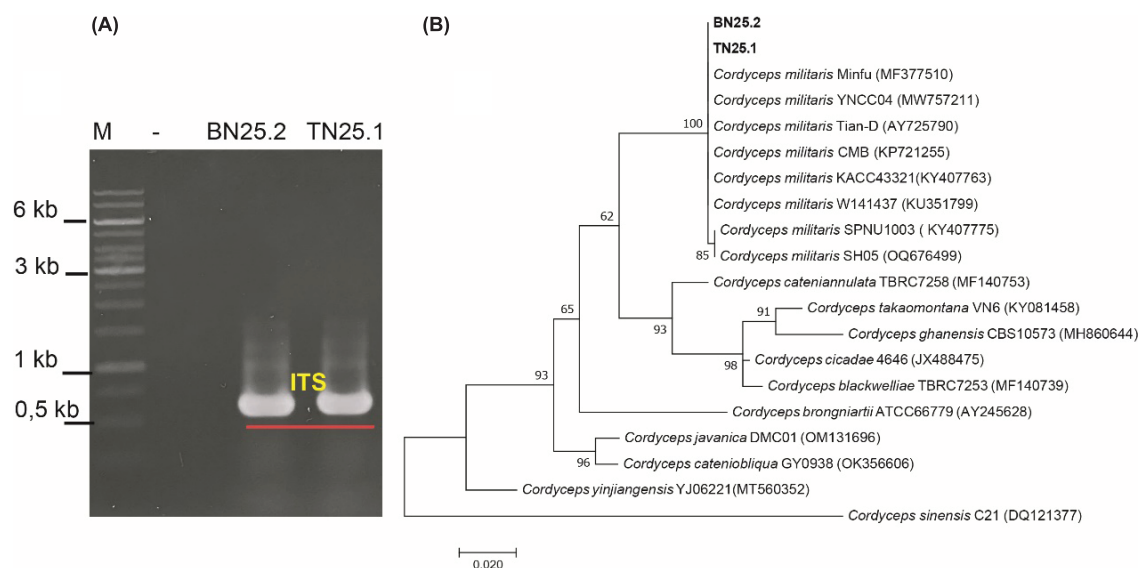
Tính ổn định về khả năng sinh hoạt chất của chủng nấm đóng vai trò quan trọng trong sản xuất. Do đó, trong nghiên cứu này, 3 chủng nấm đã tuyển chọn (BN25.2, TN25.1 và *C. militaris* HL8) được đánh giá khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào qua 5 thế hệ liên tiếp sau 30 ngày lên men. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của 3 chủng nấm không có sự khác biệt nhiều qua 5 thế hệ (hình 4). Ở thế hệ thứ nhất, hàm lượng cordycepin ngoại bào của 3 chủng nấm BN25.2, TN25.1 và HL8 tương ứng trung bình đạt là 993, 886 và 880 mg/l dịch lên men. Ở thế hệ thứ 5, hàm lượng cordycepin ngoại bào của 3 chủng nấm tương ứng trung bình đạt là 976, 855 và 878 mg/l dịch lên men. Tương tự, hàm lượng pentostatin ngoại bào của 3 chủng nấm BN25.2, TN25.1 và HL8 ở thế hệ thứ nhất tương ứng trung bình đạt là 27,3; 27,6 và 33,3 mg/l dịch lên men. Ở thế hệ thứ 5, hàm lượng pentostatin ngoại bào của 3 chủng nấm tương ứng trung bình đạt là 26,3; 26 và 32,7 mg/l dịch lên men. Việc nuôi trồng nấm *C. militaris* đã ghi nhận sự thoái hóa nhanh của các chủng giống, biểu hiện là sự giảm mạnh về năng suất quả thể và hàm lượng hoạt chất trong quả thể, thông thường giảm mạnh từ thế hệ thứ 3 và tới thế hệ thứ 5 có thể mất hoàn toàn khả năng hình thành quả thể [14, 19]. Như vậy, nghiên cứu này đã tuyển chọn được 3 chủng nấm BN25.2, TN25.1 và HL8 có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao và ổn định.



Hình 4. Hàm lượng cordycepin và pentostatin ngoại bào của các chủng nấm qua 5 thế hệ. (A) Hàm lượng cordycepin; (B) Hàm lượng pentostatin.

3.3. Định danh chủng nấm đã tuyển chọn dựa trên phân tích trình tự vùng ITS của rDNA

Ba chủng nấm BN25.2, TN25.1 và *C. militaris* HL8 được tuyển chọn do khả năng sinh tổng hợp cordycepin và pentostatin ngoại bào cao và ổn định. Trong đó, chủng HL8 đã được xác định là *C. militaris* [2] và có mã số trên GenBank là OQ674722.1. Hai chủng BN25.2 và TN25.1 có đặc điểm hình thái điển hình của loài *C. militaris* và được tiếp tục phân loại chính xác đến loài thông qua phân tích trình tự vùng ITS của rDNA.



Hình 5. Định danh chủng nấm BN25.2 và TN25.1 dựa trên phân tích trình tự ITS. (A) Hình ảnh điện di sản phẩm PCR vùng ITS; **(B)** Cây phát sinh loài dựa trên phân tích trình tự vùng ITS; (-): đối chứng âm; M: marker DNA 1 kb.

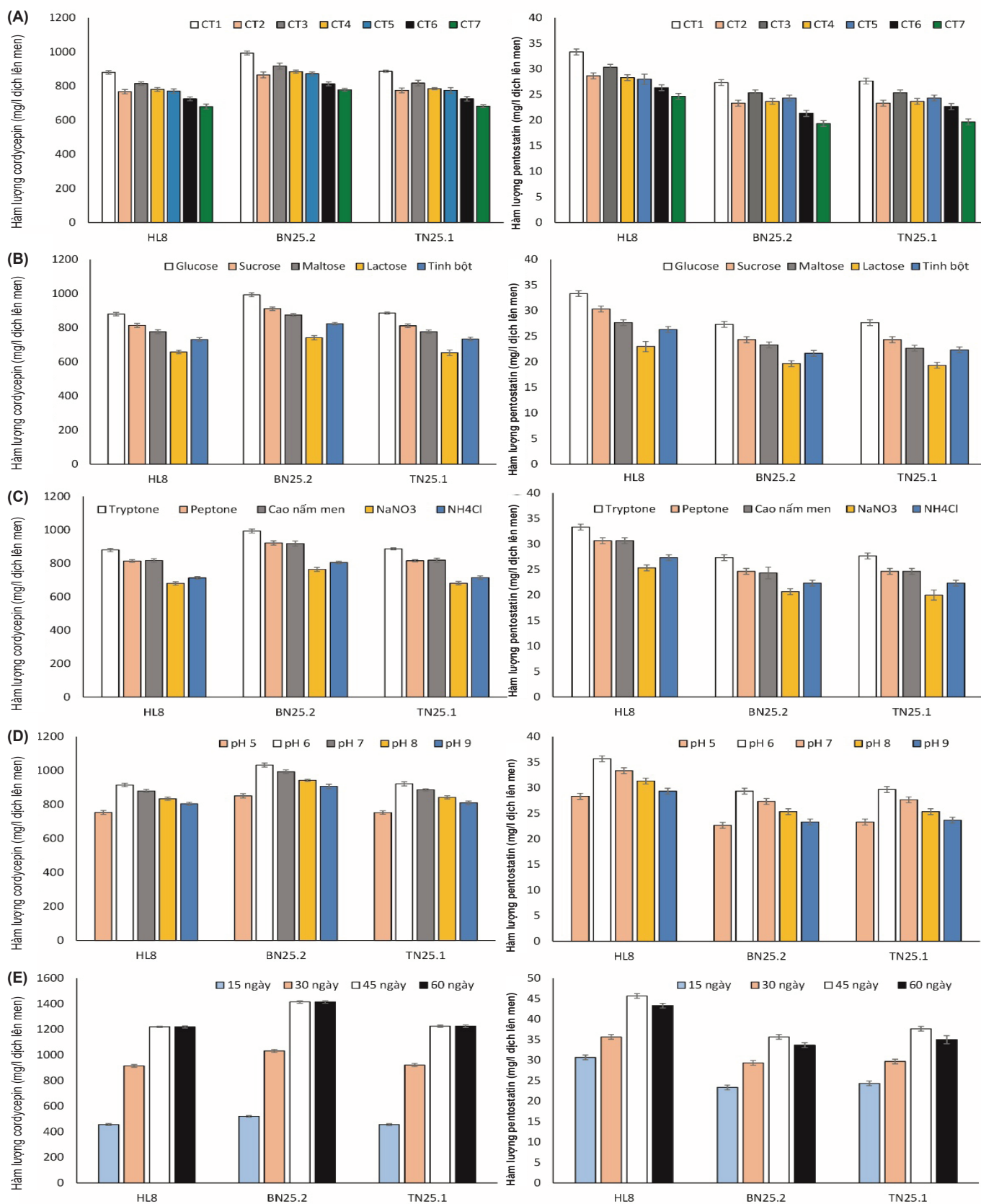
Trình tự vùng ITS của rDNA được sử dụng phổ biến trong phân loại nấm do vừa chứa các trình tự bảo thủ và trình tự có độ biến đổi cao giữa các loài [20]. Do đó, trong nghiên cứu này, chủng nấm BN25.2 và TN25.1 được nuôi cấy thu hệ sợi để tách chiết DNA dùng cho khuếch đại vùng ITS bằng cặp mồi ITS1/ITS4. Kết quả PCR cho thấy, xuất hiện một băng DNA duy nhất với kích thước khoảng trên 500 bp (hình 5A). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra, tinh sạch và được giải trình tự bởi công ty Apical Scientific Sdn. Bhd. (Malaysia). Kết quả giải trình tự cho thấy, trình tự vùng ITS của 2 chủng nấm BN25.2 và TN25.1 có chiều dài tương ứng là 535 và 539 bp. Trình tự ITS được so sánh với dữ liệu trong GenBank sử dụng công cụ BLAST chỉ ra rằng, 2 chủng nấm BN25.2, TN25.1 có độ tương đồng về trình tự ITS của nấm *C. militaris* là 99,81%. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự ITS thu được xác nhận 2 chủng nấm BN25.2 và TN25.1 thuộc loài *C. militaris* (hình 5B).

3.4. Xác định một số điều kiện thích hợp cho lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào

Dinh dưỡng môi trường, ánh sáng, thời gian được xác định là các yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của nấm *C. militaris* [21]. Trong nghiên cứu này, các điều kiện thích hợp cho lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* được xác định nhằm thu được hàm lượng cordycepin và pentostatin ngoại bào cao nhất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các chủng nấm *C. militaris* có khả năng sinh cordycepin và pentostatin cao nhất ở điều kiện lên men bề mặt dịch thể sử dụng ánh sáng LED trắng, môi trường lên men với nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là tryptone, pH 6 và thời gian lên men là 45 ngày (hình 6). Hiện nay, công nghệ chiếu sáng LED đã và đang được

ứng dụng nhiều trong nuôi trồng nấm với đặc tính tuổi thọ cao và phát nhiệt thấp. Ánh sáng LED khác nhau đã được chứng minh có ảnh hưởng đến màu sắc hệ sợi, khả năng sinh tổng hợp cordycepin, carotenoid, trong đó ánh sáng LED trắng cũng đã được xác định là loại ánh sáng thích hợp cho nấm *C. militaris* [22]. Trong nuôi trồng nấm *C. militaris*, nguồn cacbon là glucose và nguồn nitơ là pepton, nhộng tằm thường được sử dụng [14]. Tuy nhiên, nghiên cứu này cho thấy, tryptone là nguồn nitơ thích hợp hơn cho sự sản xuất cordycepin và pentostatin ngoại bào ở nấm *C. militaris*. Sự vượt trội của tryptone có thể được giải thích bởi đặc tính giàu peptide ngắn, cấu trúc dễ hấp thu và khả năng cung cấp đầy đủ acid amin [23]. pH là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất ở nấm. Nấm *C. militaris* thích hợp với pH môi trường hơi acid [24].

Như vậy, nghiên cứu này đã xác định được các điều kiện thích hợp trong lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* sinh tổng hợp cordycepin và pentostatin ngoại bào, bao gồm sử dụng ánh sáng LED trắng, môi trường lên men với nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là tryptone, pH 6 và thời gian lên men là 45 ngày. Với điều kiện lên men thích hợp, 3 chủng nấm *C. militaris* HL8, BN25.2 và TN25.1 có khả năng sinh cordycepin ngoại bào tương ứng trung bình đạt là 1220, 1415 và 1225 mg/l dịch lên men. Hàm lượng pentostatin ngoại bào tương ứng trung bình đạt là 45,6, 35,6 và 37,6 mg/l dịch lên men. So với phương pháp nuôi trồng quả thể nấm *C. militaris* thường kéo dài 60-65 ngày [2, 3], quá trình lên men bề mặt dịch thể sẽ rút ngắn được thời gian sản xuất hoạt chất cordycepin và pentostatin. Theo nghiên cứu của M. Masuda và cs (2007) [25], lên men bề mặt chủng nấm *C. militaris* NBRC 9787 sau 33 ngày thu được



Hình 6. Kết quả nghiên cứu điều kiện lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris*. (A) Ánh sáng; (B) Nguồn cacbon; (C) Nguồn nitơ; (D) pH môi trường nuôi cấy; (E) Thời gian lên men.

dịch lên men có hàm lượng cordycepin đạt 2500 mg/l. Tuy nhiên, nghiên cứu của nhóm tác giả thực hiện với thể tích lên men là 100 ml/bình lên men, trong khi nghiên cứu này thể tích lên men sử dụng với lượng gấp đôi (200 ml/hộp). Hơn nữa, môi trường lên men theo nghiên cứu của M. Masuda và cs (2007) có bổ sung adenine là tiền chất tổng hợp lên cordycepin và bổ sung glycine [25]. Việc môi trường lên men sử dụng các nguyên liệu có giá thành cao (như adenine, glycine) có thể làm tăng chi phí cho sản xuất, là khó khăn khi sản xuất quy mô lớn. Với kết quả nghiên cứu thu được cho thấy, dịch lên men nấm *C. militaris* là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho khai thác hoạt chất cordycepin và pentostatin ứng dụng trong thực phẩm và dược phẩm.

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã tuyển chọn được 3 chủng nấm *C. militaris* HL8, BN25.2 và TN25.1 có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào cao trong lên men bề mặt dịch thể. Cả 3 chủng nấm đều có khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào ổn định qua 5 thế hệ liên tiếp. Đặc biệt, nghiên cứu đã xác định được các điều kiện thích hợp trong lên men bề mặt dịch thể nấm *C. militaris* sinh tổng hợp cordycepin và pentostatin ngoại bào, bao gồm sử dụng ánh sáng LED trắng, môi trường lên men với nguồn cacbon là glucose, nguồn nitơ là tryptone, pH 6 và thời gian lên men là 45 ngày. Ở điều kiện lên men thích hợp, khả năng sinh cordycepin và pentostatin ngoại bào của 3 chủng nấm HL8, BN25.2 và TN25.1 tương ứng trung bình đạt là 1220, 1415, 1225 và 45,6, 35,6 và 37,6 mg/l dịch lên men. Dịch lên men nấm *C. militaris* là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho nghiên cứu tách chiết hoạt chất cordycepin và pentostatin dùng trong phát triển dược phẩm và thực phẩm.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN của Bộ Khoa học và Công nghệ: “Nghiên cứu công nghệ chiếu sáng đèn LED trong lên men bề mặt sản xuất hoạt chất cordycepin và pentostatin ngoại bào từ nấm dược liệu *Cordyceps militaris* tạo nguyên liệu sản xuất thực phẩm bảo vệ sức khỏe”. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S.K. Das, M. Masuda, A. Sakurai, et al. (2010), “Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects”, *Fitoterapia*, **81**(8), pp.961-968, DOI: 10.1016/j.fitote.2010.07.010.

[2] T.X. Vu, T.B. Tran, H.H. Vu, et al. (2024), “Ethanol extract from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* HL8 exhibits cytotoxic activities against cancer cells, skin pathogenic yeasts, and postharvest pathogen *Penicillium digitatum*”, *Archives of Microbiology*, **206**(3), pp.1-11, DOI: 10.1007/s00203-024-03833-8.

[3] T.X. Vu, M.T. Nguyen, A.N. Dao, et al. (2025), “Enhanced antioxidant and anti-inflammatory properties of albino *Cordyceps militaris*: A comparative study with wild-type strain”, *Chemistry & Biodiversity*, **22**(11), pp.1-14, DOI: 10.1002/cbdv.202501100.

[4] A.K. Verma, R. Aggarwal (2021), “Repurposing potential of FDA-approved and investigational drugs for COVID-19 targeting SARS-CoV-2 spike and main protease and validation by machine learning algorithm”, *Chemical Biology & Drug Design*, **97**(4), pp.836-853, DOI: 10.1111/cbdd.13812.

[5] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, et al. (2017), “Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin”, *Cell Chemical Biology*, **24**(12), pp.1479-1489, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.001.

[6] R.O. Dillman (2004), “Pentostatin (Nipent®) in the treatment of chronic lymphocyte leukemia and hairy cell leukemia”, *Expert Review of Anticancer Therapy*, **4**(1), pp.27-36, DOI: 10.1586/14737140.4.1.27.

[7] L. Huang, Q. Li, Y. Chen, et al. (2009), “Determination and analysis of cordycepin and adenosine in the products of *Cordyceps* spp.”, *African Journal of Microbiology Research*, **3**(12), pp.957-961, DOI: 10.5897/AJMR.9000227.

[8] A. Suparmin, T. Kato, H. Dohra, et al. (2017), “Insight into cordycepin biosynthesis of *Cordyceps militaris*: Comparison between a liquid surface culture and a submerged culture through transcriptomic analysis”, *PLOS ONE*, **12**(11), pp.1-16, DOI: 10.1371/journal.pone.0187052.

[9] N. Kazuhiro, I. Hiroyuki, T. Soukichi (2009), “Membrane-surface liquid culture, fungi”, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation*, pp.1-7, DOI: 10.1002/9780470054581.eib411.

[10] T. Tanaka, S. Eguchi, T. Aoki, et al. (2007), “Production of laccase by membrane-surface liquid culture of *Trametes versicolor* using a poly (L-lactic acid) membrane”, *Biochemical Engineering Journal*, **33**(2), pp.188-191, DOI: 10.1016/j.bej.2006.10.002.

[11] V.T. Tran, X.T. Vu (2020), “Establishment of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer approach for the medicinal fungus *Cordyceps militaris* G12”, *Vietnam Journal of Science and Technology-MOST*, **62**(5), pp.60-64 (in Vietnamese).

[12] T.X. Vu, T.T. Ngo, L.T.D. Mai, et al. (2018), “A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using *DsRed* and *GFP* to visualize citrus host colonization”, *Journal of Microbiological Methods*, **144**, pp.134-144, DOI: 10.1016/j.mimet.2017.11.019.

[13] X.T. Vu, T.H.L. Nguyen, B.T. Tran, et al. (2023a), “Development of HPLC-DAD method for the quantification of pentostatin in the fruiting body of *Cordyceps militaris*”, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **65**(7), pp.60-66, DOI: 10.31276/VJST.65(7).60-66 (in Vietnamese).

[14] T.X. Vu, H.D. Thai, B.H.T. Dinh, et al. (2023b), “Effects of MAT1-2 spore ratios on fruiting body formation and degeneration in the heterothallic fungus *Cordyceps militaris*”, *Journal of Fungi*, **9**(10), pp.1-11, DOI: 10.3390/jof9100971.

- [15] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), "A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59(4)**, pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.
- [16] T.J. White, T.D. Bruns, S.B. Lee, et al. (1990), "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics", *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, **18(1)**, pp.315-322, DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- [17] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2012), "Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine", *Genome Biology*, **12(11)**, pp.1-22, DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.
- [18] H.H. Lee, N. Kang, I. Park, et al. (2017), "Characterization of newly bred *Cordyceps militaris* strains for higher production of cordycepin through HPLC and URP-PCR analysis", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27(7)**, pp.1223-1232, DOI: 10.4014/jmb.1701.0104.
- [19] J. Yin, X. Xin, Y. Weng, et al. (2017), "Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration", *PLOS ONE*, **12(10)**, pp.1-14, DOI: 10.1371/journal.pone.0186279.
- [20] J. Curran, F. Driver, J.W.O. Ballard, et al. (1994), "Phylogeny of *Metarhizium*: Analysis of ribosomal DNA sequence data", *Mycological Research*, **98(5)**, pp.547-552, DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80478-4.
- [21] D.N. Anh, T.T. Chien, T.B. Tram, et al. (2024), "Research on isolation, identification, and determination of suitable conditions for the cultivation of albino *Cordyceps militaris* SHBTD fruiting bodies", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **22(2)**, pp.357-366, DOI: 10.15625/vjbt-21015.
- [22] G.T. Do, D.T. Ta, N.H. Nguyen, et al. (2026), "LED light spectra modulate growth, morphogenesis, and bioactive compound production in *Cordyceps militaris* (Ascomycota)", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **28(4)**, pp.41-56, DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2025062343.
- [23] X. Liu, C. Xiao, X. Yu, et al. (2025), "Peptone source effects on recombinant protease production and cellular responses in yeast", *Enzyme Microbial Technology*, **189**, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2025.110674.
- [24] M. Adnan, S.A. Ashraf, S. Khan, et al. (2017), "Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid - state fermentation on various substrates", *CyTA - Journal of Food*, **15(4)**, pp.617-621, DOI: 10.1080/19476337.2017.1325406.
- [25] M. Masuda, E. Urabe, H. Honda, et al. (2007), "Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, pp.1199-1205, DOI: 10.1016/j.enzmictec.2006.09.008.