

PHÂN LẬP NẤM KÝ SINH CÔN TRÙNG *CORDYCEPS* SPP. GIÀU HOẠT CHẤT BEAUVERICIN TỪ VƯỜN QUỐC GIA PÙ MÁT, NGHỆ AN

Nguyễn Thị Thanh Lan, Đinh Thị Ngọc Thúy, Nguyễn Thị Thanh Bình

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 05.11.2015

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps* sp. B6 được phân lập bào tử đơn từ mẫu nấm trên vật chủ là nhộng côn trùng thuộc bộ cánh vảy, thu thập tại Vườn quốc gia Pù Mát, tỉnh Nghệ An, Việt Nam. Chủng *Cordyceps* B6 được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử, theo đó DNA của chủng được tách chiết, làm sạch và được dùng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen ITS bằng cặp mồi ITS₁ và ITS₂. Đoạn gen ITS của chủng được xác định trình tự và so sánh trên Ngân hàng Gen bằng phần mềm BLAST. Với độ tương đồng 99% so với đoạn gen tương ứng của *Cordyceps takaomontana*, chủng *Cordyceps* B6 được xác định là *Cordyceps takaomontana*. Chủng *C. takaomontana* B6 được hoạt hóa tốt nhất trong môi trường lỏng CT1 với thành phần bao gồm glucose 20 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 10 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ 0,5 g/l, có mật độ bào tử đạt 5 x 10⁶ tế bào/ml sau 7 ngày nuôi cấy. Khi lên men bề mặt trong điều kiện phù hợp ở 25°C, pH môi trường lên men 7, cường độ chiếu sáng 200 lux, độ ẩm 80%, khối lượng thể quả thu được là 18,72 g tươi/lọ và hàm lượng beauvericin đạt 2,09 mg/g khô sau 45 ngày nuôi trồng. Với hàm lượng hoạt chất beauvericin cao, chủng *C. takaomontana* B6 được coi là tiềm năng để phát triển làm thực phẩm chức năng và nguyên liệu cho ngành dược.

Từ khóa: Beauvericin, *Cordyceps takaomontana*, dược liệu, nấm ký sinh côn trùng, thể quả

MỞ ĐẦU

Nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps* spp. là loại dược liệu quý được sử dụng trong y học cổ truyền, chứa nhiều hoạt chất sinh học có giá trị như adenosine, cordycepin, manitol, beauvericin, với những tác dụng như tăng cường miễn dịch, kháng khuẩn, hỗ trợ điều trị tim mạch, ung thư (Nam *et al.*, 2001).

Trên thị trường Việt Nam hiện đang lưu hành một số sản phẩm nấm ký sinh côn trùng có nguồn gốc từ các loài *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris*, *Cordyceps takaomontana* xuất xứ Hàn Quốc, Thái Lan, Nhật Bản, Trung Quốc. *C. sinensis* sinh trưởng và phát triển ở Tây Tạng, việc nghiên cứu nhân nuôi nhân tạo cho đến nay chưa thành công, vì vậy nguồn sản phẩm vẫn khai thác từ tự nhiên nên giá thành rất cao. *C. militaris* được nghiên cứu nuôi nhân tạo trên quy mô lớn ở một số nước như Trung Quốc, Nhật Bản, Thái Lan, Hàn Quốc. Ở Việt Nam đã nhân nuôi thành công ở quy mô vừa và nhỏ, nhưng nguồn giống phụ thuộc vào nước ngoài, nên bị động và khó kiểm soát được chất lượng giống cũng như sản phẩm tạo ra (Đái Duy Ban, Lưu Tham Muru, 2009).

Trong khi đó, tài liệu tham khảo cho thấy, *C. takaomontana* chứa đầy đủ các hợp chất sinh học quý như *C. militaris* và *C. sinensis* tuy hàm lượng thấp (Nam *et al.*, 2001). Ngoài ra, dẫn xuất nhóm acetoxyscirpenol chỉ thấy trong *C. takaomontana* có tác dụng diệt nhiều loại tế bào ung thư với giá trị IC₅₀ ở mức ng/ml (Yahagi, 1985; Kikuchi *et al.*, 2004), mạnh hơn so với thuốc chữa ung thư cisplatin từ 4 đến 6,6 lần (Nam *et al.*, 2001). Ngoài ra, beauvericin tách chiết được từ *C. takaomontana* có tác dụng gây độc nhiều dòng tế bào ung thư người, kháng 10 loại vi khuẩn gram dương và 9 loại vi khuẩn gram âm (Wang, Xu, 2012)

Ở Việt Nam, Phạm Quang Thu (2009), Phạm Quang Thu và Nguyễn Mạnh Hà (2010) đã tìm được *C. takaomontana* ở vườn quốc gia Tam Đảo. Trần Ngọc Lân và đồng tác giả (2008) đã xác định tại Vườn Quốc gia Pù Mát có hơn 200 mẫu *Cordyceps* gồm 15 loài, đặc biệt *C. takaomontana* có tới 11 loại dưới loài.

Kết quả đã công bố cho thấy, *C. takaomontana* ở Việt Nam rất phong phú (Trần Ngọc Lân và đồng tác giả (2008), vì vậy chủ động được nguồn giống, bên

chánh đó, thời gian nuôi trồng ngắn, nguyên liệu cho sản xuất loại nấm này như gạo, nhộng tằm ở Việt Nam dồi dào và giá thành thấp. Do đó, việc nghiên cứu khai thác, phát triển nguồn gen nấm *C. takaomontana* tạo quả thể giàu hoạt chất sinh học beauvericin để sử dụng làm nguyên liệu cho ngành dược có ý nghĩa khoa học và mang tính ứng dụng cao, góp phần nâng cao sức khỏe cộng đồng, đặt cơ sở cho sự phát triển một số ngành nghề mới đầy tiềm năng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu vật

Mẫu nấm ký sinh côn trùng trên vật chủ là nhộng thuộc bộ cánh vảy, được thu thập từ Vườn quốc gia Pù Mát, Nghệ An

Môi trường phân lập

Sử dụng môi trường PDA: khoai tây 200 g/l, đường glucose 20 g/l, agar 20 g/l.

Phân lập

Các chủng *Cordyceps* spp. được phân lập bào tử đơn theo phương pháp của Choi *et al.*, (1999) có cải tiến để phù hợp với điều kiện Việt Nam. Sau khi thu thập, các mẫu nấm được làm sạch và cắt thành miếng, đặt lên đĩa môi trường PDA, nuôi tối ở 25°C trong 5 ngày. Bằng mắt thường có thể thấy khuẩn lạc của *Cordyceps* spp. màu trắng đặc trưng. Khuẩn lạc được cấy chuyển trên môi trường PDA nhiều lần để thu được các khuẩn lạc thuần khiết.

Phân tích trình tự nucleotide của gen mã hóa ITS₁-5.8S-ITS₂

DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Gardes và Bruns (1993) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Đoạn gen được khuếch đại bằng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi ITS₁: 5'- GTT CCG TAG GTG AAC CTG C- 3' và ITS₂: 5'- ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT - 3' (Gardes, Bruns, 1993). Sản phẩm PCR có kích thước ước tính 560 bp. Phản ứng được thực hiện trong 20 µl với thành phần bao gồm đệm PCR 10x, MgCl₂ 2

mM, dNTP 2 mM, primer 2,5 mM (1 µl), Taq 0,5 u (5 u/1µl), DNA 20 ng, nước. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% sau đó được tinh sạch và đọc trình tự trên máy ABI PRISM 3100 - Avant Data Collection v1.0 tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học. Kết quả được phân tích bằng phần mềm CLUSTALX (1.81) và so sánh với các trình tự trên Ngân hàng Gen quốc tế bằng chương trình BLAST (Chen, 2004).

Lựa chọn môi trường hoạt hóa lỏng tối ưu

Khuẩn lạc trên môi trường thạch được cấy vào bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường lỏng CT1 (glucose 20 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 10 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ 0,5 g/l); CT2 (glucose 70 g/l, pepton 5 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, MgSO₄ 5,1 g/l; CT3 (glucose 20 g/l, pepton 2 g/l, KH₂PO₄ 2 g/l, MgSO₄ 1,5 g/l, CaCl₂ 1 g/l), nuôi lắc 150 vòng/phút ở 25°C trong 7 ngày. Kiểm tra mật độ bào tử vào các ngày nuôi thứ 3, 5, 7 và chọn môi trường sinh bào tử có mật độ cao. Môi trường lên men bề mặt bao gồm gạo lứt, môi trường dinh dưỡng có glucose, peptone, một số nguyên tố đa vi lượng.

Xác định tốc độ sinh trưởng

Tốc độ sinh trưởng của chủng *C. takaomontana* B6 được đánh giá theo mật độ bào tử bằng phương pháp buồng đếm Burkner – Turk. Xác định khối lượng tươi của thể quả tại các thời điểm thu hoạch khác nhau.

Định lượng Beauvericin

Định lượng hoạt chất trong thể quả nấm bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC (High-performance liquid chromatography). Dịch tách chiết thô từ thể quả B6 được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi được bơm vào hệ thống HPLC/MS. Pha động sử dụng hệ dung môi: MeOH/H₂O với gradient được thiết lập ở bảng 1. Chất chuẩn beauvericin được mua của hãng Sigma.

Bảng 1. Giá trị thiết lập Gradient MeOH/H₂O.

| Thời gian (min) | 0 | 5 | 12 | 15 | 17 | 29 | 30 | 40 |
|-------------------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| %MeOH | 8 | 8 | 50 | 50 | 90 | 90 | 100 | 100 |
| %H ₂ O | 92 | 92 | 50 | 50 | 10 | 10 | 0 | 0 |

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

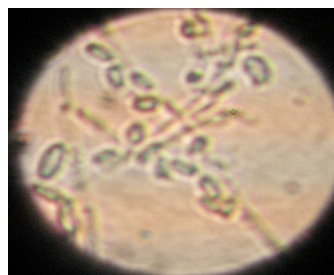
Phân lập nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps* sp. B6

Chủng B6 được phân lập từ mẫu nấm ký sinh côn trùng thu thập ở Vườn Quốc gia Pù Mát, Nghệ An. Trên môi trường PDA khuẩn lạc của chủng *Cordyceps* sp. B6 có màu trắng tinh, hệ sợi xốp mịn, mọc dày lan tỏa đồng tâm. Khi quan sát dưới kính hiển vi quang học, các tế bào có hình ovan, xếp sát nhau (Hình 1). Sau khi phân lập, chủng *Cordyceps* sp. B6 lưu giữ trong lạnh 4⁰C và cấy chuyển trên môi trường PDA 2 tháng một lần.

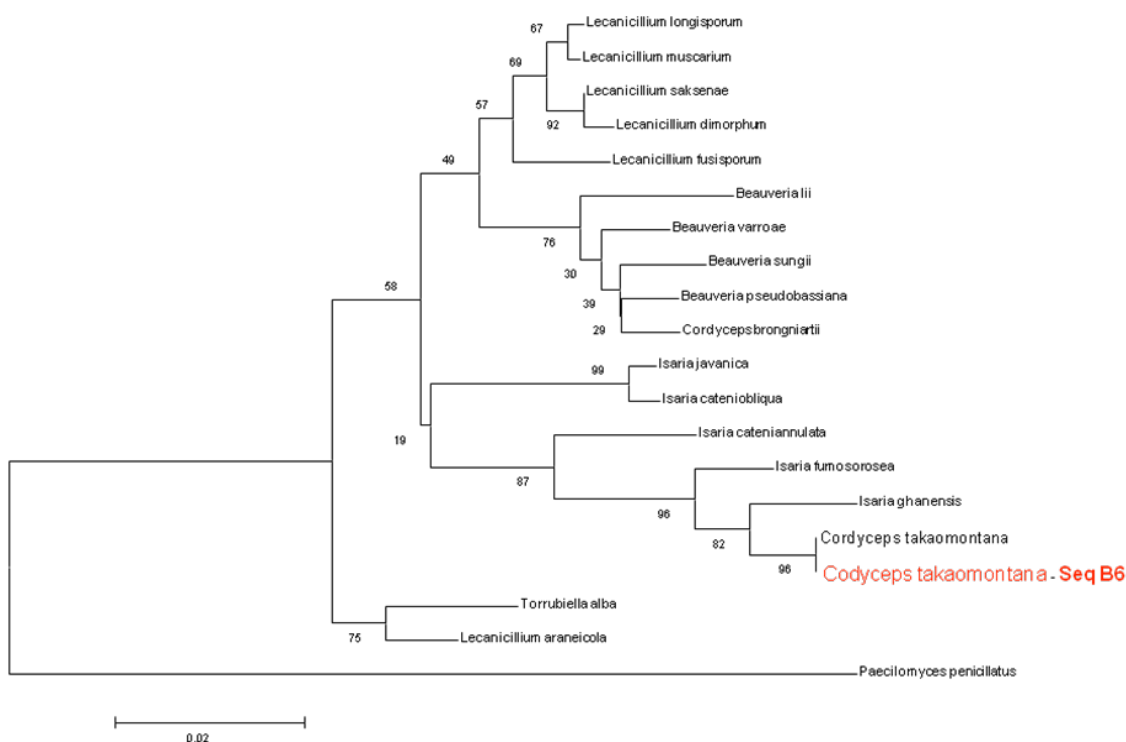
Phân tích trình tự nucleotide của gen mã hóa ITS₁-5.8S-ITS₂

DNA của mẫu nấm *Cordyceps* sp. B6 được dùng làm khuôn để nhân đoạn gen ITS bằng cặp mồi ITS₁

và ITS₂. Kết quả PCR cho thấy sản phẩm đặc hiệu, có kích thước khoảng 560 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết.



Hình 1. Hình ảnh bào tử chủng B6 dưới kính hiển vi quang học x 40.



Hình 2. Biểu đồ hình cây về phát sinh chủng loại của chủng B6 với các loài thuộc chi *C. takaomontana*

Sản phẩm PCR được tinh sạch và được xác định trình tự trên máy tự động ABI PRISM 3100 - Avant Data Collection v1.0. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng thể hiện ở Hình 2. Trình tự đoạn gen ITS của chủng *Cordyceps* sp. B6 có kích thước 562 bp, được phân tích bằng phần mềm CLUSTALX (1.81) và so sánh với các trình tự trên ngân hàng gen bằng chương trình BLAST, theo đó với độ tương đồng 99% có 23 trình tự *C. takaomontana*, 47 trình tự *Isaria tenuipes*, 17 trình tự *Paecilomyces tenuipes*, 5 trình tự *Isaria japonica*. Một số nghiên cứu và phân tích trình tự DNA đã khẳng định *I. tenuipes*, *P. tenuipes*, *I. japonica* đều là thể vô tính của *C. takaomontana* (Ard *et al.*, 2009), do đó có thể kết luận chủng *Cordyceps* sp. B6 là *C. takaomontana*.

Lựa chọn môi trường lỏng hoạt hóa giống

Môi trường hoạt hóa giống là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học của vi sinh vật nói chung và của nấm ký sinh cộng trùng nói riêng. Quá trình hoạt hóa giống được tiến hành trên 3 loại môi trường khác nhau là CT1, CT2, CT3. Khả năng sinh trưởng của chủng được đánh giá qua chỉ tiêu về mật độ dịch bào tử sau 3, 5, 7, 9, 11 ngày nuôi.

Kết quả thể hiện ở bảng 2 cho thấy, mật độ bào tử trong 3 môi trường CT1, CT2, CT3 khác nhau. Vào ngày nuôi thứ 3, môi trường CT2 chưa xuất

hiện bào tử, trong khi đó CT3 và CT1 mật độ bào tử lần lượt là 10^3 bt/ml và 2.10^4 bt/ml. Đến ngày nuôi thứ 5, môi trường CT2 mật độ bào tử 10^3 bt/ml là thấp nhất, tiếp theo sau là môi trường CT3 với mật độ bào tử đạt 2.10^4 bt/ml và cao nhất là môi trường CT1 với 6.10^4 bt/ml. Mức độ sinh bào tử trong 3 môi trường khác nhau rõ rệt, môi trường CT2 sinh bào tử chậm nhất, vào ngày thứ 7 mới đạt mức 5.10^4 bt/ml, ngày thứ 9 đạt 8.10^4 bt/ml và ngày thứ 11 chỉ đạt 10^5 bt/ml. Sau đó đến môi trường CT3, mật độ bào tử vào các ngày 7, 9, 11 lần lượt là 2.10^5 bt/ml, 4.10^6 bt/ml, 10^7 bt/ml. Tốc độ sinh bào tử ở môi trường CT1 là tốt nhất, ở ngày nuôi thứ 7, 9, 11, mật độ bào tử đạt tới 10^6 bt/ml, 10^8 bt/ml và 10^{10} bt/ml, cao hơn hẳn so với hai môi trường CT2 và CT3. Thành phần của môi trường CT2 có nồng độ đường và muối cao hơn, nên có thể ức chế khả năng sinh bào tử của chủng nấm, do đó mật độ bào tử trong môi trường CT2 thấp nhất so với hai môi trường còn lại. Hai môi trường CT1 và CT3 có thành phần gần giống nhau, nhưng môi trường CT1 giàu nguồn N hữu cơ gồm pepton và cao nấm men hơn so với môi trường CT3 chỉ có pepton, vì vậy mật độ bào tử ở môi trường CT1 cao hơn trong môi trường CT3.

Như vậy, môi trường CT1 là môi trường lỏng tốt nhất cho sự sinh bào tử của chủng *C. takaomontana* B6, nên được chọn để hoạt hóa giống cho chủng này.

Bảng 2. Khả năng sinh bào tử của chủng *C. takaomontana* B6 trên các môi trường nuôi khác nhau.

| Môi trường | Mật độ bào tử theo ngày nuôi (bt/ml) | | | | |
|------------|--------------------------------------|------------|------------|------------|-------------|
| | Ngày thứ 3 | Ngày thứ 5 | Ngày thứ 7 | Ngày thứ 9 | Ngày thứ 11 |
| CT1 | 2.10^4 | 6.10^4 | 5.10^6 | 5.10^8 | 10^{10} |
| CT2 | 0.0 | 10^3 | 5.10^4 | 8.10^4 | 10^5 |
| CT3 | 10^3 | 2.10^4 | 2.10^5 | 4.10^6 | 10^7 |

Lựa chọn thời gian thu hoạch thể quả để có hoạt chất cao nhất

Sản phẩm nhân nuôi bề mặt của chủng *C. takaomonta* B6 trong nghiên cứu là khối lượng thể quả giàu beauvericin. Lựa chọn thời điểm thu hoạch để thu được thể quả chứa nhiều beauvericin là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến sản phẩm của quy trình nuôi. Các điều kiện nuôi đã được tối ưu như khối lượng gạo lứt 40 g/lọ, có bổ sung bột nhộng tằm và môi trường dinh dưỡng lỏng, nhiệt độ nuôi cho phát triển thể quả 25°C trong môi trường

pH 7, với cường độ chiếu sáng 200 lux, độ ẩm 80%, chỉ thay đổi thời gian thu hoạch tại ngày nuôi thứ 40, 45, 50 và 55. Kết quả thể hiện trên Bảng 3 cho thấy, thời gian thu hoạch khác nhau có sự khác nhau về khối lượng thể quả và hàm lượng beauvericin trong thể quả. Ngày nuôi thứ 40, khối lượng thể quả đạt 15,50 g/lọ, hàm lượng beauvericin là 1,95 mg/g. Ngày nuôi thứ 45, khối lượng thể quả đạt 18,72 g/lọ và hàm lượng beauverin đạt cao nhất là 2,09 mg/g. Đến ngày nuôi thứ 50, hàm lượng beauvericin giảm nhẹ, còn 2,07 mg/g và khối lượng thể quả tươi giảm

còn 16,96 g/l. Khối lượng thể quả và hàm lượng beauvericin tiếp tục giảm nhẹ còn 15,72 g/l và 2,03 mg/g vào ngày thứ 55. Như vậy, ngày thứ 45 được lựa chọn để thu hoạch thể quả khi khối lượng thể quả và hàm lượng beauvericin cao hơn so với các thời điểm khác.

Từ thể quả, hàm lượng beauvericin của chủng *C. takaomontana* B6 dao động trong khoảng 1,95 mg/g - 2,09 mg/g, cao hơn so với chủng có nguồn gốc Thái

Lan, được báo cáo chỉ đạt 0,92 mg/g khi lên men trên môi trường rắn (Supothia *et al.*, 2011). Hàm lượng beauvericin từ chủng tự nhiên Thái Lan đạt khoảng 0,0056 mg/g đến 0,0380 mg/g (Supothina *et al.*, 2011), còn trong sinh khối lên men lỏng chỉ số này biến động từ 2,70 mg/l - 2,20 mg/l (Ard *et al.*, 2009). Như vậy, hàm lượng beauvericin từ *C. takaomontana* B6 Việt Nam cao hơn so với chủng *C. takaomontana* Thái Lan khi lên men trên môi trường rắn.

Bảng 3: Thời gian thu hoạch, khối lượng thể quả và hàm lượng Beauvericin của chủng *C. takaomontana* B6.

| Chỉ tiêu đánh giá | Thời gian nuôi trồng (ngày) | | | |
|---|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 40 | 45 | 50 | 55 |
| Khối lượng thể quả tươi (g/l) | 15,50 ± 0,12 | 18,72 ± 0,06 | 16,96 ± 0,05 | 15,72 ± 0,09 |
| Hàm lượng beauvericin (mg/g thể quả đông khô) | 1,95 ± 0,02 | 2,09 ± 0,01 | 2,07 ± 0,01 | 2,03 ± 0,02 |

Số liệu xử lý bằng Anova one way với $p < 0,05$

KẾT LUẬN

Đã phân lập thành công nấm ký sinh côn trùng *Cordyceps* sp B6 thuộc loài *Cordyceps* từ vườn Quốc Gia Pù Mát, Nghệ An. Dựa vào kết quả phân tích trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa ITS₁-5.8S. ITS₂, đã định được tên khoa học của chủng *Cordyceps* sp. B6 là *Cordyceps takaomontana*. Đã xác định được môi trường hoạt hóa lỏng tốt nhất là CT1 có glucose 20 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 10 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, và MgSO₄ 0,5 g/l. Đồng thời, xác định được thời gian thu hoạch thể quả của chủng *C. takaomontana* B6 khi lên men trên môi trường rắn ở điều kiện phù hợp là 45 ngày, khi khối lượng thể quả được 18,72 g tươi/l và hàm lượng beauvericin đạt 2,09 mg/g.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với kinh phí của đề tài “Khai thác và phát triển nguồn gen nấm *Cordyceps takaomontana* Yakush. & Kumaz làm dược liệu” thuộc NVQG 2014-2017.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ard J, Berkaew P, Ridkaew R, Nigel L, Jones H, Isaka M (2009) A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycological Research* 113: 1389-1395

Chen N (2004) Using RepeatMasker to identify repetitive elements in genomic sequences, *Curr Protoc Bioinformatics*. Chapter 4. Unit 4.10.

Choi YW, Hyde KD, Ho WH (1999) Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38.

Đái Duy Ban, Lưu Tham Mưu (2009) Đông trùng hạ thảo: Dược liệu quý hỗ trợ điều trị các bệnh virus, ung thư, HIV/AIDS, đái tháo đường, suy giảm tinh dịch và nghiên cứu phát hiện loài Đông trùng hạ thảo mới ở Việt Nam. Nxb Y học 2009

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS - primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2(2): 113-8.

Kikuchi H, Miyagawa Y, Nakamura K, Sahashi Y, Inatomi S, Oshima Y (2004) A novel carbon skeletal trichothecane, tenuipesine A, isolated from an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *Org Lett* 6: 4531-3

Nam KS, Jo YS, Kim YH, Hyun JW, Kim HW (2001) Cytotoxic activities of acetoxyscirpenediol and ergosterol peroxide from *Paecilomyces tenuipes*. *Life Sci* 69: 229-3

Phạm Quang Thu (2009) Phát hiện nấm Đông trùng Hạ thảo (*Cordyceps gunnii* (Berk.) Berk.) tại vườn quốc gia Tam Đảo tỉnh Vĩnh Phúc. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 6: 96-99.

Phạm Quang Thu, Nguyễn Mạnh Hà (2010) Phát hiện nấm Đông trùng Hạ thảo *Cordyceps takaomontana* Takushui và Kummazawa ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 6:126-130.

Supothina S, Srisanoh U, Nithithanasilp S, Tnasathai K, Luangsa-ard JJ, Li CR, Isaka (2011) Beauvericin production by the Lepidoptera pathogenic fungus *Isaria tenuipes*: Analysis of natural specimens, synema from

cultivation and mycelia from liquid-media fermentation
Nat Prod Bioprospect 1: 112-115

Trần Ngọc Lân, Nguyễn Tài Toàn, Nguyễn Thị Hiếu,
Nguyễn Thị Thủy, Trương Xuân Sinh, Nguyễn Thị Vui, Hà
Thị Thanh Hải, Đào Thị Hằng, Cao Thị Thu Dung, Somsak
Sivichai, Patcharaporn Wongsas, Suchada Mongkolsamrit,
Wiwantane Tongsriram (2008) Đa dạng sinh học nấm ký
sinh côn trùng và côn trùng bị nấm ký sinh ở Vườn Quốc gia

Pù Mát. *Hội nghị Côn trùng học toàn quốc lần thứ 6*. Nxb
Nông Nghiệp: 957-963.

Wang Q, Xu L (2012) Beauvericin, a bioactive compound
produced by fungi: a short review. *Molecules* 17(3): 2367-
2377.

Yahagi S (1985) An experimental study on cartilage and
the morphogenesis induced by implanted demineralized
dentin matrix. *Shikwa Gakuho* 85(2): 135-65.

ISOLATION OF INSECT PARASITIC FUNGI *CORDYCEPS* SPP. RICH IN BIOACTIVE BEAUVERICIN FROM PU MAT NATIONAL PARK, NGHE AN

Nguyen Thi Thanh Lan, Dinh Thi Ngoc Thuy, Nguyen Thi Thanh Binh[✉]

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Insect parasitic fungi *Cordyceps* sp. B6 was isolated as single spores from fungi on the host insect pupae of Lepidoptera, collected at Pu Mat National Park, Nghe An, Vietnam. *Cordyceps* B6 strain was identified by the method of molecular biology, in which the DNA of the strain was extracted, cleaned and used as a template to amplify the gene segment using primers for ITS₁ and ITS₂. ITS gene segment of the strain was sequenced and compared to sequences in the GeneBank database using BLAST (NCBI). With the similarity of 99% compared to the corresponding gene fragment of *Cordyceps takaomontana*, *Cordyceps* B6 strain was identified as *C. takaomontana*. *C. takaomontana* B6 was best activated with liquid medium CT1 containing glucose 20 g/l, yeast extract 5 g / l, peptone 10 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, 0.5 g MgSO₄/l. In this medium, the density could reach 5 x 10⁶ spores cells/ml after 7 days of culture. When surface fermentation performed in appropriate conditions (25 °C, pH= 7, light intensity 200 lux, humidity 80%), the fresh weight of 18.72 g/vial of spore cells and 2.09 mg of active beauvericin per gram of freeze-dry weight were obtained after 45 days of culture. With a high concentration of active beauvericin, *C. takaomontana* B6 could be considered as a potential source for development of functional food and raw materials for the pharmaceutical industry.

Keywords: *Beauvericin, Cordyceps takaomontana, pharmaceutical materials, insect parasitic fungus, fruity body.*

[✉] Author for correspondence: Tel: 84-4-38362430; E-mail: binhttn@ibt.ac.vn