

XÁC ĐỊNH MÔI TRƯỜNG NHÂN GIỐNG VÀ NUÔI TẠO QUẢ THỂ NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) THEO HƯỚNG HỮU CƠ

Đặng Thị Ngọc, Mai Hải Châu

Phân hiệu Trường đại học Lâm nghiệp tại Đồng Nai

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định môi trường nhân giống và nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) theo hướng hữu cơ được thực hiện. Thí nghiệm khảo sát điều kiện phân lập giống cho kết quả ở nồng độ ethanol 70% trong 30s mẫu sạch nhiễm hoàn toàn, tơ nấm phát triển dày, chuyển màu nhanh và đậm, chiều dài tơ trung bình đạt 1,475cm sau 9 ngày sau cấy. Đối với môi trường nhân giống nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*), thí nghiệm sử dụng môi trường nhân giống dịch thể (Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200g/L dịch chiết giá) cho kết quả tối ưu với kích thước cầu nấm lớn nhất đạt 1,1cm, trị số mật độ quang đạt 0,91 và quả thể đạt chiều cao 5cm chỉ sau 33 ngày cấy chuyển môi trường tạo quả thể. Trong thí nghiệm nuôi tạo quả thể nấm *C.militaris*, công thức (Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200g/L giá + 7g/L yến mạch + 5g/L bột tảo spirulina + 30g gạo lứt : gạo trắng (1:1)) cho kết quả tốt nhất, quả thể nấm xuất hiện rất sớm chỉ sau 3 ngày chuyển pha sáng, tổng số quả thể thu được đạt 168 qt/hộp, khối lượng tươi của hộp đạt 32,58g .

Từ khóa: môi trường nhân giống, công thức giá thể, nấm đông trùng hạ thảo, *Cordyceps militaris*, nhộng tằm

I. MỞ ĐẦU

Trong số các loài nấm ký sinh trên côn trùng thì *Cordyceps sinensis* và *Cordyceps militaris* từ rất lâu đã được sử dụng như là nguồn dược liệu quý để bồi bổ sức khỏe và hỗ trợ điều trị bệnh ở người (Huang et al, 2009). Có nhiều hoạt chất sinh học được tìm thấy trong các chủng nấm này như adenosin, cordycepin, polysaccharide, các sterol, protein, acid amin, vitamin và nhiều nguyên tố đa lượng, vi lượng thiết yếu khác (Holliday và Cleaver, 2018; Shashidhar et al, 2013; Zhou et al, 2009) với công dụng chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng viêm, kháng dòng tế bào ung thư, chống oxy hóa, tăng sản sinh testosterone và hạ đường huyết (Yang et al, 2014). Do đó nhu cầu sử dụng chúng để bồi bổ sức khỏe, tăng cường miễn dịch nhất là trong tình hình bùng phát của đại dịch Covid-19 là rất lớn, nhiều tiềm năng. Song việc sử dụng *Cordyceps* nói chung còn gặp nhiều hạn chế nếu chỉ dựa vào nguồn thu hái từ tự nhiên, giá của sản phẩm thường rất cao, giao động từ 1-2 tỷ/kg và rất khan hiếm. Chính vì vậy đã có những nỗ lực trong nghiên cứu nhân giống và sản xuất nấm đông trùng hạ thảo, tuy nhiên hiện chỉ có duy nhất chủng nấm *Cordyceps militaris* là được nuôi trồng thành công trên môi trường nhân tạo (Das et al, 2010) và phổ biến nhất tính đến nay (Zhang et al, 2012) song vẫn còn nhiều vấn đề chưa được giải quyết như việc sử dụng hóa chất, chất kích thích sinh trưởng trong nuôi trồng để lại dư lượng trong nấm, các phản ứng dị ứng có thể xảy ra do thành phần kitin của nhộng tằm dùng làm nguyên liệu nuôi trồng nấm, mặt khác nhiều khách hàng cảm thấy vị tanh của nhộng trong nấm và không thích hương vị này khi sử dụng sản phẩm, giá thành sản phẩm còn cao, quy trình nuôi cấy dài ngày, chưa tiếp cận được khách hàng ăn chay và thu nhập thấp. Nhằm giải quyết những

vấn đề trên, một số công thức môi trường hữu cơ đã được tuyển chọn để thay thế nhộng tằm trong quy trình nhân giống và nuôi tạo quả thể nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) theo hướng hữu cơ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

+ Mẫu nấm *Cordyceps militaris* do Cơ sở sản xuất thiết bị Cơ Y Hóa cung cấp; địa chỉ: 47/4^A Tân Phước Khánh 09, Tân Uyên, Bình Dương.

+ Đường glucose, Cao nấm men, Pepton, Vitamin (B1, B8), ethanol (40 %, 50 %, 60%, 70%), khoai tây, nhộng tằm, gạo lức huyết rồng, gạo trắng, yến mạch, hà thủ ô khô, hành tây, cà rốt, súp lơ, trứng, agar.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ ethanol và thời gian khử trùng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *Cordyceps militaris*

- Thí nghiệm 2 yếu tố, bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại 8 nghiệm thức, mỗi NT khảo sát 3 mẫu, tổng số mẫu khảo sát là 72 mẫu. Trong đó, yếu tố A là thời gian khử trùng (30s, 60s), yếu tố B là nồng độ ethanol (40%, 50%, 60%, 70%).

- Môi trường sử dụng môi trường YPDA để phân lập giống, sau khi chuẩn bị hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút, sau khi hấp xong để môi trường ở nhiệt độ phòng nguội đến 70°C tiến hành đưa vào tủ cấy vô trùng đồ đĩa (20 mL/đĩa).

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ mẫu không nhiễm trên tổng số mẫu đã đưa vào nuôi cấy (mẫu/đĩa).
- Tỷ lệ mẫu sống (mẫu/đĩa).
- Thời gian xuất hiện tơ nấm: được tính từ ngày đầu tiên khi tơ nấm bắt đầu phát triển (cm/ngày).
- Chiều dài tơ trung bình: theo dõi đến hết ngày thứ 9 (cm/ngày).
- Màu sắc: được theo dõi từ khi tơ nấm bắt đầu phát triển đến hết ngày thứ 9.
- Chiều dài tơ nấm: được đo bắt đầu từ gốc đến cuối phần nấm lan trên bề mặt môi trường đó theo các mốc thời gian 3 ngày, 6 ngày, 9 ngày (cm/ngày).

2.2. Khảo sát ảnh hưởng của loại môi trường đến hiệu suất nhân giống dịch thể của nấm *Cordyceps militaris*

- Thí nghiệm 1 yếu tố được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 5 nghiệm thức (NT), mỗi NT khảo sát 3 mẫu, tổng số mẫu là 45 mẫu.

NT1 đ/c: 100g/L khoai tây + 1g/L KH_2PO_4 + 1g/L $MgSO_4$ + 1g/L Triani citrat + 0,25g/L Inositol + 1g/L B1 + 30g/L glucose + 5g/L pepton + 5g/L cao nấm men.

NT2: Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200mL nước dừa.

NT3: Glucose 30g/L + 5g cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 400mL nước dừa.

NT4: Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200g/L dịch chiết giá.

NT5: Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 400g/L dịch chiết giá.

(Dịch chiết H: 5g/L cao hà thủ ô + 12g/L hành tây + 7g/L cà rốt + 7g/L súp lơ + 160g/L khoai tây)

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ mẫu không nhiễm (mẫu/chai);
- Tỷ lệ mẫu sống (mẫu/chai);
- Thời gian xuất hiện cầu nấm (ngày);
- Kích thước cầu nấm: lấy ngẫu nhiên 3 cầu nấm/chai môi trường tiến hành đo sau 10 ngày cấy giống (cm/câu);
- Giá trị OD sau 10 ngày nuôi cấy.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của một số loại môi trường tổng hợp đến sự hình thành và phát triển quả thể nấm *Cordyceps militaris*

- Thí nghiệm 1 yếu tố được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 6 NT, mỗi NT khảo sát 3 mẫu, tổng số mẫu khảo sát là 54 mẫu.

NT1(đ/c): Khoai tây 100g/L + nhộng tằm 350g/L + 30g/L đường glucose + 5g/L pepton + 5g/L cao nấm men + 1g/L KH₂PO₄ + 1g/L MgSO₄ + 1g/L triamoni citrat + 0,5g/L B1 + 0,25g/L inositol. Gạo lứt: gạo trắng (1:1); NT2: Môi trường lỏng tối ưu ở thí nghiệm 2 + nhộng tằm 350g/L, 30g/ hộp gạo lứt: gạo trắng (1:1); NT3: Môi trường lỏng tối ưu ở thí nghiệm 2 + 7g/L yến mạch + 5g/L bột tảo spirulina + 30g/ hộp gạo lứt: gạo trắng (1:1); NT4: Môi trường lỏng tối ưu ở thí nghiệm 2 + 7g/L trứng + 7g/L yến mạch + 14g/L bột đậu nành + 30g/ hộp gạo lứt: gạo trắng (1 : 1); NT5: Môi trường lỏng tối ưu ở thí nghiệm 2 + 14g/L yến mạch + 14g/L bột đậu nành + 5g/L bột tảo spirulina + 30g/ hộp gạo lứt: gạo trắng (1 : 1).

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ mẫu không nhiễm: tiến hành đo đếm sau khi cấy giống 4 ngày (%);
- Tỷ lệ mẫu sống (%);
- Thời gian lan tơ: khi tơ nấm bắt đầu ăn tơ đến khi phủ kín bề mặt môi trường (ngày);
- Thời gian xuất hiện quả thể: được tính khi có hộp đầu tiên ở mỗi nghiệm thức có mầm quả thể bằng ngòi bút nhú lên từ môi trường (ngày);
- Năng suất nấm:
 - + Tổng số quả thể sau thu hoạch chiều cao > 1cm (quả thể/hộp).
 - + Khối lượng quả thể tươi khi cắt bỏ phần giá thể sau 45 ngày (g/hộp).
- Màu sắc và hình thái của quả thể.

3. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Thu thập và sử lý số liệu bằng phần mềm Excel 2010 và phần mềm Minitab.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ ethanol và thời gian khử trùng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *Cordyceps militaris*

Giống là yếu tố quyết định trực tiếp năng suất và chất lượng sản phẩm nấm, nhưng hiện nay, hầu hết các cơ sở nuôi trồng nấm *C.militaris* đều nhập giống F1 đã được phân lập sẵn dẫn đến gặp khó khăn trong vấn đề bảo quản và thoái hóa giống gây ảnh hưởng lớn đến chất lượng nấm như: chậm lớn, quả thể không đồng đều... Vì vậy, chủ động trong việc phân lập tạo nguồn giống cung cấp cho quá trình sản xuất ngày càng được các nhà nuôi trồng nấm quan tâm. Trong đó, để phân lập được giống nấm thì loại dung dịch khử trùng và điều kiện vô mẫu là một trong những mối quan tâm hàng đầu. Có nhiều loại dung dịch được sử dụng trong quá trình vô mẫu như: Javen, ethanol, thủy ngân,.. tuy nhiên, javen và thủy ngân gây hại đến mẫu nấm vì cả hai chất này đều là dung dịch khử trùng mạnh có thể gây tổn thương thậm chí gây chết mẫu nấm *C.miliatris*. Do đó, đề tài tiến hành khảo sát các mức nồng độ ethanol khử trùng 40%, 50%, 60%, 70% ở hai mốc thời gian 30s và 60s, nhằm xác định được mức nồng độ và khoảng thời gian khử trùng tối ưu trong phân lập giống nấm *Cordyceps militaris*. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 3.1.



Hình 3.1. Giống nấm *Cordyceps militaris* sử dụng trong phân lập

Bảng 3.1. Chiều dài tơ trung bình của nấm *C.militaris* sau 3 ngày phân lập

		Nồng độ khử trùng (%)				
Thời gian khử trùng (s)		40 %	50 %	60 %	70 %	TB
	30s		0,250 ^{ns}	0,267 ^{ns}	0,208 ^{ns}	0,225 ^{ns}
60s		0,283 ^{ns}	0,250 ^{ns}	0,200 ^{ns}	0,225 ^{ns}	0,237 ^{ns}
	TB	0,267 ^{ns}	0,258 ^{ns}	0,225 ^{ns}	0,204 ^{ns}	
CV (%) = 4,732		F (A) = 0,01 ^{ns}		F (A*B) = 0,35 ^{ns}		F (B) = 2,50 ^{ns}

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (ns) $P > 0,05$.

Bảng 3.2. Chiều dài tơ trung bình của nấm *C.militaris* sau 6 ngày phân lập

		Nồng độ khử trùng (%)				
		40 %	50 %	60 %	70 %	TB
Thời gian khử trùng (s)	30s	1,067 ^{ns}	1,041 ^{ns}	0,854 ^{ns}	0,833 ^{ns}	0,989 ^{ns}
	60s	1,067 ^{ns}	1,108 ^{ns}	0,883 ^{ns}	0,900 ^{ns}	0,989 ^{ns}
	TB	1,067 ^a	1,075 ^a	0,869 ^b	0,867 ^b	
CV (%) = 1,645		F (A) = 2,38 ^{ns}		F (A*B) = 0,38 ^{ns}		F (B) = 19,97 [*]

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (ns) $P > 0,05$, có ý nghĩa thống kê (*) $P < 0,05$.

Bảng 3.3. Chiều dài tơ trung bình của nấm *C.militaris* sau 9 ngày phân lập

		Nồng độ khử trùng (%)				
		40 %	50 %	60 %	70 %	TB
Thời gian khử trùng (s)	30s	1,667 ^{ns}	1,650 ^{ns}	1,650 ^{ns}	1,475 ^{ns}	1,642 ^{ns}
	60s	1,833 ^{ns}	1,683 ^{ns}	1,558 ^{ns}	1,492 ^{ns}	1,483 ^{ns}
	TB	1,750 ^a	1,667 ^{ab}	1,567 ^{bc}	1,483 ^c	
CV (%) = 0,165		F (A) = 2,22 ^{ns}		F (A*B) = 1,44 ^{ns}		F (B) = 11,98 [*]

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (ns) $P > 0,05$, có ý nghĩa thống kê (*) $P < 0,05$.

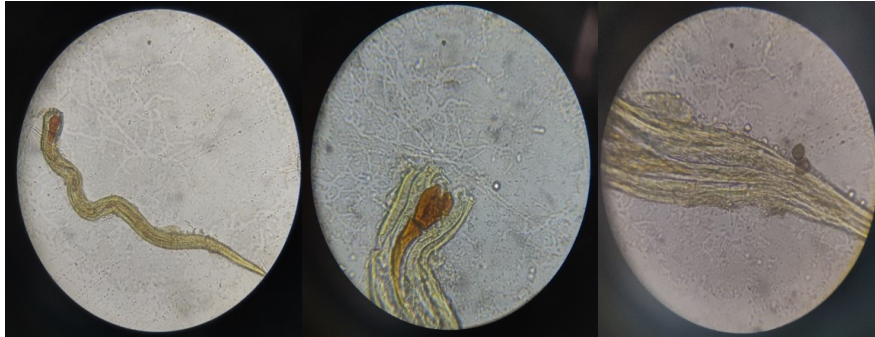
Khi khử trùng mẫu với hai mốc thời gian 30s và 60s thì 30s đạt 1,642 cm không có sự khác biệt về mặt thống kê với thời gian 60s (1,592cm) sau 9 ngày phân lập. Mẫu sạch nhiễm hoàn toàn. Có thể nhận thấy các mốc thời gian 30s và 60s ảnh hưởng không đáng kể đến quá trình hình thành và phát triển của tơ nấm *C.militaris*.

Khi xét về ethanol ở các mức nồng độ từ 40% - 70% cho kết quả nồng độ khử trùng tốt nhất ở NT 40% với chiều dài tơ trung bình đạt 1,750cm, sau 9 ngày phân lập, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. NT 70% cho kết quả khử trùng thấp nhất chỉ đạt 1,483cm (Bảng 3.3). Mẫu sạch nhiễm hoàn toàn, giai đoạn đầu tốc độ lan tơ không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, sau 6 ngày nuôi cấy, tơ nấm có sự phân hóa rõ rệt giữa các nghiệm thức (Bảng 3.2).

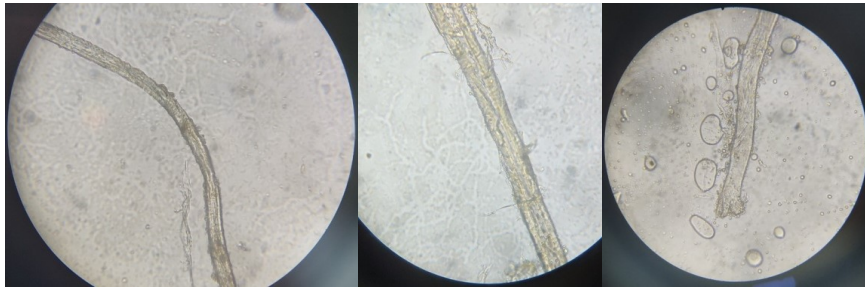
Khi xét cùng lúc hai yếu tố thời gian và nồng độ khử trùng nhận thấy sau 3, 6 và 9 ngày chiều dài trung bình tơ nấm không có ý nghĩa về mặt thống kê, nồng độ và thời gian khử trùng tốt nhất 40% trong 60s chiều dài tơ trung bình đạt 1,833cm, chiều dài tơ nấm thấp nhất chỉ 1,475cm khi khử trùng với ethanol 70° trong 30s. Trong quá trình nuôi trồng nấm ngoài yếu tố chiều dài tơ trung bình thì màu sắc tơ cũng là một trong những yếu tố được quan tâm vì màu sắc tơ nấm là yếu tố để đánh giá sơ bộ hàm lượng cordycepin trong nấm *Cordyceps militaris*. Nấm có màu càng đậm chứng minh hàm lượng dược chất cordycepin càng nhiều do đó, đề tài tiến hành tiến hành chiếu sáng mẫu tơ nấm trong 48 giờ sau quá trình ủ tối. Kết quả cho thấy sau 48 giờ chiếu sáng quan sát thấy ở khử trùng 70% trong 30s chuyển màu đều và đậm, bên cạnh đó NT khử trùng 40% trong 30s chuyển màu chậm, không đều và nhạt.

Sau 9 ngày phân lập hình thái tơ nấm dưới kính hiển vi của hai NT 70% trong 30s và NT 40% trong 60s có sự khác biệt rõ rệt được thể hiện qua hình 3.2 và 3.3.

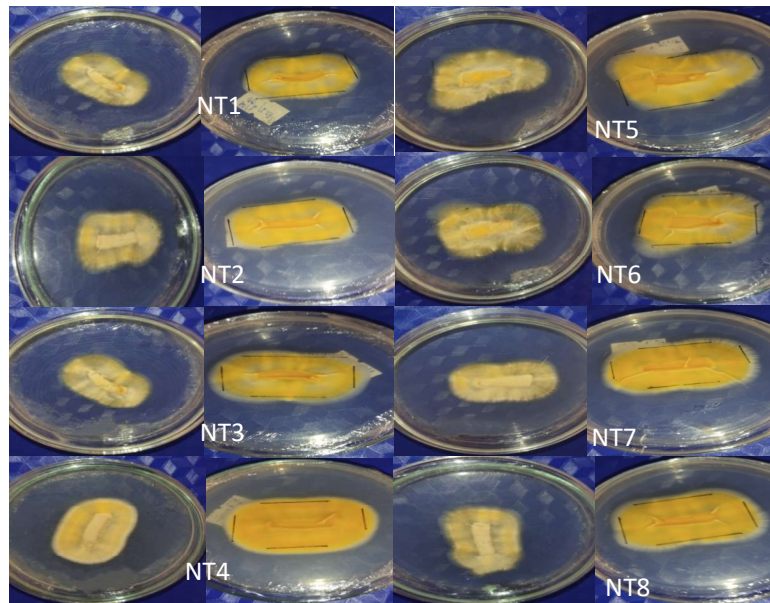
Từ hình 3.2 cho thấy NT 70% trong 30s tơ nấm chuyển màu đều, sợi nấm to và dày hơn so với NT 40% trong 30s (hình 3.3) sợi nấm nhỏ, chuyển màu không đều và nhạt. Mặt khác, khi xét về hình thái tơ nấm sau 9 ngày nuôi cấy cho thấy NT 1(40% trong 30s) hệ sợi mảnh, lan nhanh, chuyển màu chậm và không đều ở NT7 (70% trong 30s) hệ sợi dày, lan chậm, chuyển màu đều và đậm, hình thái tơ nấm được thể hiện ở hình 3.4.



Hình 3.2. Hình thái tơ nấm *C.militaris* ở NT 70% trong 30s dưới kính hiển vi



Hình 3.3. Hình thái tơ nấm *C.militaris* ở NT 40% trong 60s dưới kính hiển vi



Hình 3.4. Hình thái tơ nấm ở các mức nồng độ và mốc thời gian khử trùng

Như vậy, khử trùng ở nồng độ 70% trong 30s là điều kiện tối ưu để vào mẫu, tơ nấm phát triển khỏe chiều dài tơ trung bình đạt 1,475cm, chuyển màu nhanh và vàng đậm, mẫu sạch nhiễm hoàn toàn.

Khi so sánh kết quả thí nghiệm trên ở cùng nồng độ khử trùng 70% trong hai mốc thời gian 30s và 60s với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Hồng và cộng sự (2018) nghiên cứu về nồng độ khử trùng phân lập nấm ở nồng độ 70% trong 60s tỷ lệ mẫu sạch nhiễm 92,86%, kết quả của NT 7 (70% trong 30s) sạch nhiễm 100% tăng 7,14% tỷ lệ sạch bệnh. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể do không cùng điều kiện nuôi cấy, nguồn gốc mẫu phân lập mẫu nấm *in vitro* nên tối ưu hơn mẫu phân lập từ tự nhiên.

3.2. Ảnh hưởng của loại môi trường đến hiệu suất nhân giống dịch thể của nấm *Cordyceps militaris*.

Hiện nay, công nghệ nhân giống dịch thể đã và đang được đặc biệt quan tâm bởi những ưu điểm vượt trội như: Chu kỳ phát triển của giống nấm nhanh qua đó rút ngắn được thời gian nhân giống và nuôi trồng, tuổi nấm đồng đều, chất lượng giống nấm ổn định, dễ kiểm soát, giống khỏe, giá thành sản xuất thấp do tiết kiệm được nhiên liệu, điện năng. Bên cạnh những ưu điểm trên, quá trình nhân giống đòi hỏi về điều kiện nhân giống, loại môi trường dinh dưỡng nhân giống. Tuy nhiên, quá trình nhân giống hiện nay còn nhiều hạn chế như kích thước của cầu nấm không đồng đều, chủ yếu bổ sung hóa chất vào môi trường dinh dưỡng. Do đó, đề tài tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của loại môi trường đến năng suất nhân giống dịch thể nấm *C.militaris*. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở dưới đây:

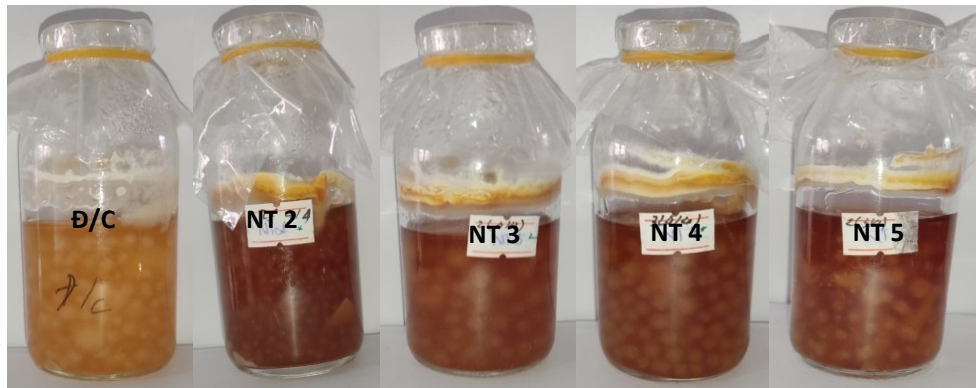
Bảng 3.4. Đặc điểm cầu nấm *C.militaris* sau 10 ngày nuôi cấy

Chỉ tiêu NT	OD _{600nm}	Kích thước cầu nấm(cm)	Thời gian xuất hiện cầu nấm	Đặc điểm cầu nấm
NT 1(đ/c)	1,057 ^a	0,867 ^{bc}	3 ngày	Cầu nấm to nhỏ không đều, có tua gai
NT 2	0,377 ^c	0,722 ^c	4 ngày	Cầu nấm nhỏ, không có tua gai
NT 3	0,830 ^c	0,900 ^b	3 ngày	Cầu nấm to kích thước đồng đều, có tua gai
NT 4	0,910 ^b	1,100 ^a	2 ngày	Cầu nấm to kích thước đồng đều, có tua gai
NT 5	0,757 ^d	0,933 ^b	3 ngày	Cầu nấm to nhỏ không đều, có tua gai
F	359,7^{**}	6,17^{**}		
CV (%)	0,591	3,626		

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (ns) $P > 0.01$, rất có ý nghĩa thống kê (**) $P < 0.01$.

Tiến hành đo OD sau khi kết thúc 10 ngày nuôi cấy giống *C.militaris* dưới bước sóng 600 nm. Kết quả nghiên cứu dựa vào trị số OD_{600nm} ở bảng 3.4 cho thấy, mật độ quang NT 2 khi bổ sung 200 mL nước dừa có giá trị OD là 0,377, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với NT 1 giá trị ở mức 1,057 cao nhất trong các NT. Nhưng khi xét về kích thước cầu nấm cho thấy khác biệt rất có ý nghĩa thống kê khi NT1 chỉ đạt 0,867cm, NT4 bổ sung 200g/L giá đạt kích thước lớn nhất

là 1,1cm và thấp nhất vẫn là NT2 đạt 0,722cm. Hình thái cầu nấm được thể hiện qua hình 3.5 dưới đây:



Hình 3.5. Cầu nấm *C.militaris* trong các môi trường dịch thể khác nhau sau 10 ngày

Từ hình 3.5 cho thấy cầu nấm ở NT4 tốt nhất cầu nấm phát triển nhiều cầu các cầu nấm đồng đều về hình thái và xuất hiện cầu nấm sau 2 ngày nuôi cấy, kém nhất là NT2 xuất hiện cầu nấm sau 4 ngày nuôi, kích thước cầu nấm rất nhỏ khó quan sát.

Sau khi lấy chỉ tiêu OD và kích thước cầu nấm tiến hành cấy giống ở các NT vào giá thể đối chứng. Sau 4 ngày ủ tối nhận thấy các NT lan tơ tốt ăn kín bề mặt môi trường, chuyển sang phòng chiếu sáng nhận thấy sau 4 ngày NT4 đã bắt đầu xuất hiện quả thể sớm nhất, NT1, NT2 và NT3 xuất hiện quả thể sau 5 ngày, chậm nhất là NT5 sau 6 ngày mới xuất hiện quả thể.

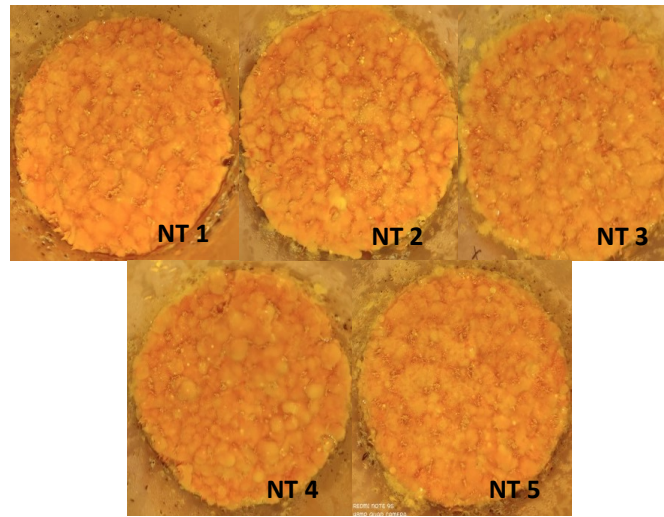
NT4 quả thể đạt 5cm sau 33 ngày nuôi trồng tiếp theo đến NT1 và NT3 giao động trong khoảng 34 – 35 ngày, kém nhất là NT5 và NT2 sau 45 ngày nuôi quả thể không đạt 5cm.

Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do môi trường bổ sung giá. Theo Nguyễn Công Khẩn và cộng sự (2010), trong 100g giá có 86,5g nước, 44 Kcal, 5,5g protein, 0,2g lipid, 5,1g glucid, 2g Celluloza, 4,13g sugar, 38g canxi, 1,40g sắt, 17g magie, 164g đồng, 23g natri, 0,2g B1, 0,13g B2, 0,088g B6, 0,8g PP, 10g vitamin C. Ngoài ra, còn có một số loại acid amin thiết yếu khác: Lysin 274mg, Valin 324mg, Cystin 43mg, Tyrosin 192mg. Từ đó, có thể thấy trong giá chứa nhiều dinh dưỡng cần thiết mà ta có thể bổ sung thêm vào môi trường nhân giống *C.militaris*. Hơn nữa giá là một thực phẩm được sử dụng khá phổ biến trong các món ăn nên an toàn cho sức khỏe, sẵn có, rẻ tiền.

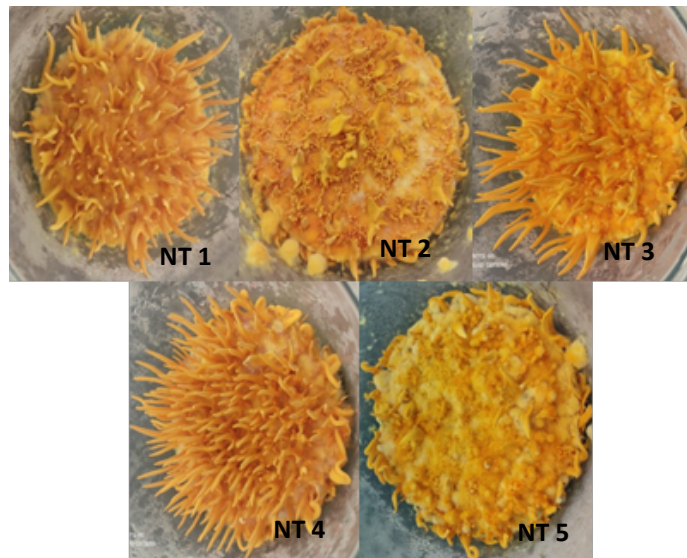
Môi trường NT4 bổ sung 200g/L là môi trường tối ưu nhân giống dịch thể nấm *C.militaris* xuất hiện cầu nấm sau 2 ngày nuôi, giá trị OD và kích thước cầu nấm lần lượt đạt 0,91 và 1,1cm sau 10 ngày nuôi cấy, quả thể xuất hiện sau 4 ngày chiếu sáng và đạt 5cm sau 33 ngày nuôi.

Khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Trần Thanh Thy và Lê Văn Vàng (2020) đã công bố tại tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ công thức môi trường nhân giống dịch thể ngày nuôi cấy gồm 35% SBG (sản phẩm phụ của ngành công nghiệp sản xuất bia), 10% glucose, 2% pepton, 2% cao nấm men, 0,5% vincozy (Vitamin nhóm B) số lượng cầu nấm đạt tối ưu sau 11 ngày. Trong NT4 cho thấy kết quả tối ưu sau 10 ngày nuôi, số ngày nuôi ngắn hơn 1 ngày.

Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể do khác nhau về thành phần dinh dưỡng bổ sung vào môi trường nhân giống, điều kiện nuôi cấy giống nấm.



Hình 3.6. Quả thể nấm của các nghiệm thức sau 2 ngày xuất hiện



Hình 3.7. Quả thể nấm *C.militaris* sau 35 ngày nuôi

3.3. Ảnh hưởng của một số loại môi trường tổng hợp đến sự hình thành và phát triển quả thể nấm *Cordyceps militaris*

Hiện nay, người ta chủ yếu sử dụng môi trường rắn chứa ấu trùng tằm *B.mori* làm cơ chất chính trong quá trình nuôi trồng nấm *C.militaris* bởi nhộng tằm rất giàu chất đạm, các vitamin A, B1, B2, PP, C và các chất khoáng như canxi, photpho... Trong 100 g nhộng tằm có 79,7g nước, 13g protid, 6,5g lipid và cung cấp tới 206 calo, hàm lượng protein trong nhộng tằm rất cao, chiếm tới 73,5%, gồm nhiều axit amin quan trọng như: leucin, isoleucin, lysin, theomn. Bên cạnh những lợi ích trên thì nhộng tằm còn nhiều hạn chế như: một số người tiêu dùng dị ứng với kitin có trong vỏ nhộng và chất natri sunfit dùng bảo quản nhộng một hạn chế quan trọng khác là người ăn chay không thể sử dụng được sản phẩm do môi trường bổ sung nhộng tằm, nhiều khách hàng không ưu thích hương vị của nấm vì cảm giác có vị tanh của nhộng... Do đó, đề tài tiến

hành khảo sát sự ảnh hưởng của các loại môi trường đến sự hình thành quả thể nấm *C.militaris*. Sau khi xác định được môi trường tối ưu trong nhân giống tiến hành nuôi cấy trên các NT thí nghiệm được thể hiện qua bảng 3.5 sau:

Bảng 3.5. Khối lượng tươi và số quả thể nấm *Cordyceps militaris* của các nghiệm thức sau 45 ngày

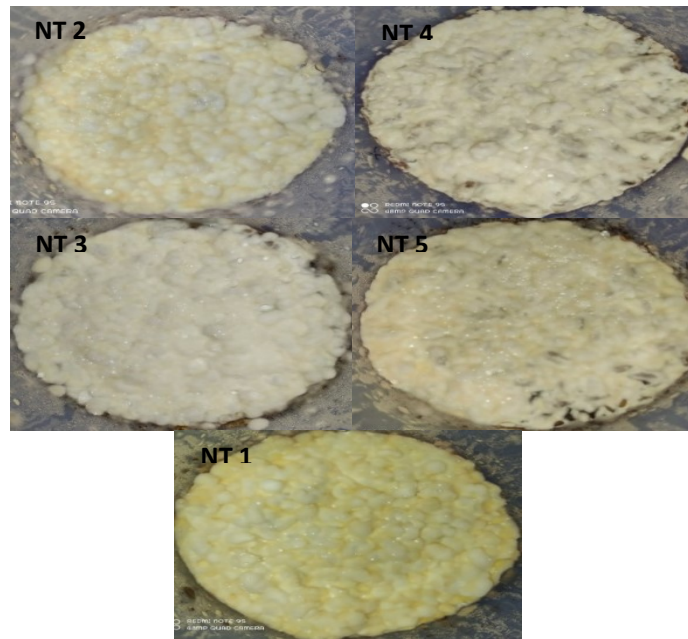
NT	Số quả thể	Khối lượng quả thể tươi (g/hộp)	Ngày xuất hiện quả thể (ngày)
NT1	62,78 ^d	26,589 ^b	4
NT2	107,6 ^b	27,078 ^b	4
NT3	168,00 ^a	32,58 ^a	3
NT4	84,00 ^c	24,011 ^{bc}	5
NT5	85,00 ^c	22,689 ^c	5
F	47,80^{**}	18,94^{**}	
CV (%)	3,457	2,467	

Ghi chú: Những số trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê (ns) $P > 0.01$, rất có ý nghĩa thống kê (******) $P < 0.01$.

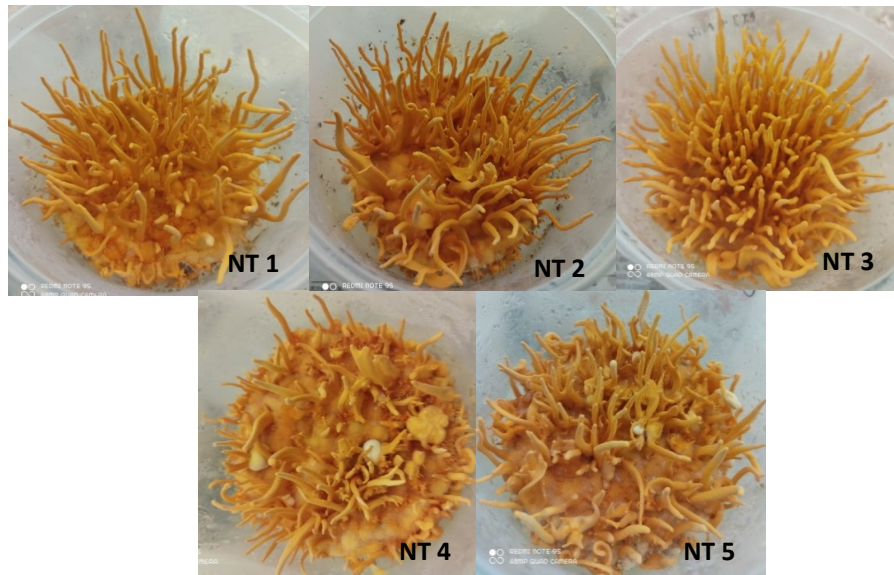
Sau 45 ngày nuôi trồng tạo quả thể nhận thấy NT1 (đ/c) bổ sung 350g nhộng có số quả thể (qt) thấp nhất chỉ đạt 62,78 qt khác biệt rất có ý nghĩa thống kê với NT3 bổ sung 7g/L yếm mạch và 5 g/L bột tảo spirulina thì số quả thể đạt cao nhất sau khi kết thúc quy trình nuôi trồng là 168 qt.

Khi xét về khối lượng tươi quả thể sau khi thu hoạch nhận thấy khác biệt rất có ý nghĩa thống kê khi NT3 khối lượng tươi cao nhất là 32,58 g, trong khi đó NT1 thấp nhất chỉ đạt 26,589g.

Kết thúc 4 ngày ủ tối tơ nấm ở các nghiệm thức lan kín bề mặt môi trường, tơ màu trắng bông, sau 6 giờ chiếu sáng đầu nhận thấy NT3 chưa đổi màu tơ, NT2,4,5 đã có hiện tượng đổi màu tơ từ trắng bông sang vàng nhạt, NT1 chuyển màu nhanh và có màu vàng. Tuy nhiên, sau 3 ngày chiếu sáng NT3 xuất hiện quả thể sớm nhất, chậm nhất là NT4 và NT5 sau 5 ngày mới xuất hiện quả thể nấm. Hình thái tơ được thể hiện qua hình 3.8.



Hình 3.8. Tơ nấm sau 6 giờ chiếu sáng 5 NT môi trường.



Hình 3.9. Quả thể nấm sau 45 ngày nuôi

Kết thúc quy trình nuôi *C.militaris* nhận thấy NT4 (bổ sung 7g/L trứng, 7g/L yến mạch, 14g/L bột đậu nành) và NT5 (14g/L yến mạch, 5g/L bột tảo spirulina, 14g/L bột đậu nành) không thích hợp tạo quả thể nấm, quan sát đặt điểm hình thái quả thể của 2 NT (hình 3.9), nhận thấy có hiện tượng quả thể dính lại với nhau, chậm phát triển, trong khi đó NT 3 quả thể có màu cam phát triển nhanh đồng đều.

Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể do môi trường bổ sung bột tảo spirulina và yến mạch giàu dinh dưỡng, vì trong 1kg tảo có chứa protein > 52 %, beta-carotene (tiền vitamin A) > 2250 mg/kg; sắc tố Zeaxanthin 3000 mg/kg; sắc tố C-phycoyanin 8.0 %, phycoyanin (thô) >17.3 %, vitamin B12 3000 mg/kg, vitamin K 20 mg/kg. Hàm lượng protein trong tảo

Spirulina thuộc vào loại cao nhất trong thực phẩm hiện nay, 60% – 70%. Hàm lượng carbohydrate khoảng 15% – 25%, axit amin trong tảo cũng rất cao. Vì thế có thể thay nhộng tằm bằng tảo xoắn spirulina và yến mạch để nuôi trồng nấm *C.militaris*, tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã nhân nuôi thành công loại tảo giàu dinh dưỡng này, do đó có thể giảm giá thành sản phẩm tảo.

Kết thúc 45 ngày nuôi trồng tiến hành thu mẫu thí nghiệm ở NT tối ưu nhất của thí nghiệm (Mẫu 2) đi phân tích hàm lượng dược chất tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm TP.HCM CASE và so sánh với mẫu nấm của Trung tâm sản xuất dịch vụ Phân Hiệu Đại học Lâm Nghiệp (Mẫu 1). Qua kết quả phân tích (Phụ lục) nhận thấy mẫu 1 hàm lượng adenosine chỉ đạt 48 mg/kg và cordycepin là 157 mg/kg trong khi đó ở mẫu 2 hàm lượng adenosine và cordycepin cao hơn ở mẫu 1 lần lượt đạt 54,4 mg/kg và 250 mg/kg và khi so sánh hàm lượng dược chất ở mẫu 2 với mẫu nấm của Nguyễn Ngọc Trai (2017) dược chất cordycepin và adenosine đạt lần lượt là 6,020 mg/kg và 80 mg/kg nhận thấy mẫu 2 của thí nghiệm hàm lượng dược chất thấp hơn. Nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt này có thể do khác nhau về thành phần môi trường, điều kiện nuôi trồng.

Môi trường giá thể tối ưu để tạo quả thể là NT3 (môi trường lỏng tối ưu ở thí nghiệm 2 + 7g/L yến mạch + 5g/L bột tảo spirulina), số quả thể và khối lượng quả thể tươi đạt lần lượt là 168 qt và 32,58 g, quả thể xuất hiện sau 3 ngày chiếu sáng, phát triển đồng đều có màu cam.

Kết quả nghiên cứu cho thấy NT3 cho kết quả tốt khi bổ sung bột tảo spirulina và yến mạch. Điều này mở ra hướng sản xuất nấm *C.militaris* không sử dụng chất hóa học, an toàn, hạn chế dị ứng, không còn vị tanh trong sản phẩm và phù hợp cho người ăn chay khi không sử dụng nhộng tằm trong sản xuất. Tuy nhiên, kết quả này vẫn chưa phải là tốt nhất, quả thể nấm sinh trưởng còn hạn chế, tỷ lệ bổ sung cũng là một trong những tác động gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của quả thể và hàm lượng dược chất của nấm *C.militaris*. Do vậy, cần mở rộng khảo sát thêm các tỷ lệ bổ sung tảo và yến mạch để xác định được công thức tối ưu nhất trong nuôi trồng nấm *C.militari*.

IV. KẾT LUẬN

Phân lập thành công giống nấm Đông trùng hạ thảo *C.militaris* từ quả thể tươi ở nồng độ ethanol 70% trong 30s tơ nấm phát triển dày, chuyển màu nhanh và đậm, chiều dài tơ trung bình đạt 1,475cm.

Sử môi trường nhân giống dịch thể đạt kết quả tốt nhất ở nghiệm thức: Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200g/L dịch chiết giá kích thước cầu nấm lớn nhất là 1,1cm, mật độ quang đạt giá trị 0,910 và quả thể đạt 5 cm sau 33 ngày nuôi trồng.

Môi trường giá thể để nuôi giống nấm *C.militaris* tối ưu với nghiệm thức tốt nhất là: Glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết H + 200g/L giá + 7g/L yến mạch + 5g/L bột tảo spirulina + 30g gạo lứt : gạo trắng (1:1), ở nghiệm thức này quả thể xuất hiện sau 3 ngày chiếu sáng , khối lượng tươi đạt 32,58g và số quả thể ở mức tốt nhất là 168 qt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

- [1] Nguyễn Ngọc Trai (2017), *Bước đầu nghiên cứu quy trình nuôi nấm Đông Trùng Hạ Thảo (Cordyceps militaris) có nguồn gốc Nhật Bản tại Trà Vinh*, NXB Trường đại học Trà Vinh.
- [2] Trần Thanh Thy (2019), *Nghiên cứu môi trường rắn làm tăng hàm lượng cordycepin và adenosine của nấm Cordyceps militaris*, Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.
- [3] Nguyễn Công Khẩn, Nguyễn Thị Thắm, Hà Thị Anh Đào, Lê Hồng Dũng, Lê Bạch Mai, Nguyễn Văn Sĩ (2007), *Bảng thành phần thực phẩm Việt Nam*, NXB Y Học. Tr 118.
- [4] Trần Thanh Thy and Lê Văn Vàng (2020), *Nghiên cứu môi trường thích hợp nhân nuôi nấm Cordyceps militaris trên vật chủ*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Tập 56 số 5B (2020). Tr 125 – 134.

Tài liệu nước ngoài

- [5] Das SK, Masuda M, Hatashita M, Sakurai A, Sakakibara M (2010). *Optimization of culture medium for cordycepin production using Cordyceps militaris mutant obtained by ion beam irradiation*. Process Biochem 45(1):129–132.
- [6] Huang L., Li Q., Chen Y., Wang X., and Zhou X., 2009. *Determination and analysis of cordycepin and adenosin in the products of Cordyceps spp*. African Journal of Microbiology research, 3(12), pp. 219-225.
- [7] Holliday J.C., and Cleaver M., 2008. *Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus Cordyceps (Fr.) Link (Ascomycetes) – A review*. International Journal of medicinal Mushrooms, 10(3), pp.219-234.
- [8] Shashidhar M.G., Giridhar P., Udaya Sankar K., and Manohar B., 2013. *Bioactive principles from Cordyceps sinensis: A potent food supplement – A review*. Journal of Functional Foods, 5(3), pp. 1013-1030.
- [9] Yang S., Jin L., Ren X., Lu J., and Meng Q., 2014. *Optimization of fermentation process of Cordyceps militaris and atitumor activities of polysaccharides in vitro*. Journal of food and drug analysis, 22 (4), pp. 468-476.
- [10] Zhang Z., Lei Z., Lu Y., et al., 2008. *Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with Cordyceps sinensis*. J Biosci Bioeng, 106, 188–93.
- [11] Zhang J.Y., Wu K.L., Duan J., 2010. *Influence of air permeability on growth of Cordyceps militaris*. Guangdong Agricultural Science.4:45–47.
- [12] Zhou L.H., Luo L.M., 2009. *Preparation and regeneration of protoplasts from Cordyceps militaris*. Hubei Agricultural Science. 48:1621–1624.

Optimization of culture medium for organic-oriented cordycepin (*Cordyceps militaris*) production

SUMMARY

In order to optimize the culture medium for organic-oriented cordycepin (*Cordyceps militaris*) production, a series of experiment was investigated. Experiments on isolation conditions showed that at 70% ethanol concentration in 30 seconds, the samples were completely clean, the mycelium grew thick, changed color quickly and darkly, and the average silk length reached 1,475cm after 9 days transplant. For the propagation medium of cordycepin (*C. militaris*), the experiment used liquid propagation medium (Glucose 30g/L + 5g/L yeast extract + 10g/L peptone + 0.2g/L B1 + 0.2g/L B8 + 200mL H extract + 200g/L sprout extract) gave optimal results with the largest fungal cocoon size reaching 1.1cm, optical density value of 0.91 and fruiting body reaching maximum height 5cm high after only 33 days of transplanting medium to create fruiting bodies. In the experiment to produce fruiting bodies of *C. militaris*, the formula (Glucose 30g/L + 5g/L yeast extract + 10g/L peptone + 0.2g/L B1 + 0.2g/L B8 + 200mL H extract + + 200g/L price + 7g/L oats + 5g/L spirulina powder + 30g brown rice: white rice (1:1)) gave the best results, mushroom fruit bodies appear very soon after only 3 days of phase transition, the total number of fruit bodies obtained was 168 qt/box, the fresh weight of the box was 32.58g.

Keywords: culture medium, propagation medium, cordycepin, *Cordyceps militaris*, silkworm pupae.