

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

Mai Hải Châu, Đặng Thị Ngọc

Trường Đại học Lâm nghiệp – Phân hiệu Đồng Nai

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.2022.2.003-013>

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. Kết quả cho thấy nguồn mẫu được khử trùng bằng ethanol 70% trong 30 giây cho kết quả tốt nhất, với hệ sợi tơ nấm phát triển dày, nhanh chuyển sang màu cam đậm, chiều dài tơ nấm trung bình đạt 1,475cm sau 9 ngày sau cấy. Đối với môi trường nhân giống nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) dịch thể gồm glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết (5g/L cao hà thủ ô + 12g/L hành tây + 7g/L cà rốt + 7g/L súp lơ + 160g/L khoai tây) + 200g/L dịch chiết giá đậu xanh cho kết quả phù hợp nhất, kích thước cầu nấm lớn nhất đạt 1,1cm, trị số mật độ quang đạt 0,91. Sử dụng giống dịch thể nuôi cấy tạo quả thể cho kết quả chiều cao đạt 5,0 (cm) sau 33 ngày. Trong thí nghiệm nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris*, công thức chứa glucose 30g/L + 5g/L cao nấm men + 10g/L pepton + 0,2g/L B1 + 0,2g/L B8 + 200mL dịch chiết như môi trường nhân giống + 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 quả thể/hộp, khối lượng tươi/hộp đạt 32,58g.

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

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

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 loài 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. 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, nấm *Cordyceps militaris* trên môi trường nhân tạo (Das et al., 2010; Zhang et al., 2012; Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng, 2017). 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.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

+ Nguồn giống 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 (Hình 1).



Hình 1. Giống nấm *Cordyceps militaris* sử dụng trong phân lập

+ 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.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. 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 (NT), mỗi nghiệm thức 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%).

- Sử dụng môi trường YPDA (yeast peptone dextrose adenine) 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).

2.2.2. 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 Đối chứng (Đ/C): 100g/L khoai tây + 1g/L KH_2PO_4 + 1g/L MgSO_4 + 1g/L Trianoni 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/cầu);
- Giá trị OD 600nm sau 10 ngày nuôi cấy.

2.2.3. 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 to 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.
- Hàm lượng adenosine và cordycepin trong quả thể ở NT [xyz] được phân tích tại Trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm TP. Hồ Chí Minh.

2.2.4. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

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

3. 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*

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. Nghiên cứu tiến hành khảo sát các mức nồng độ ethanol khử trùng 40%, 50%, 60%, 70% ở hai mốc thời gian 30s và 60s, kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Chiều dài tơ trung bình của nấm *C.militaris* sau 3 ngày phân lập

Thời gian khử trùng (s)	Nồng độ khử trùng (%)				TB
	40 %	50 %	60 %	70 %	
30s	0,250 ^{ns}	0,267 ^{ns}	0,208 ^{ns}	0,225 ^{ns}	0,239 ^{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 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. 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). 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 2).

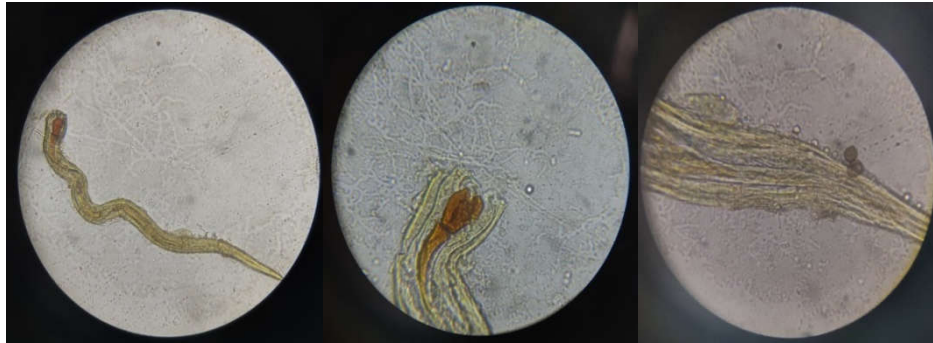
Khi xét cùng lúc hai yếu tố thời gian và nồng độ khử trùng nhận thấy sau 3, 6 và 9 ngày chiều dài trung bình tơ nấm không có ý nghĩa về mặt thống kê, nồng độ và thời gian khử trùng tốt nhất 40% trong 60s chiều dài tơ trung bình đạt 1,833cm, chiều dài tơ nấm thấp nhất chỉ 1,475cm khi khử trùng với ethanol 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.

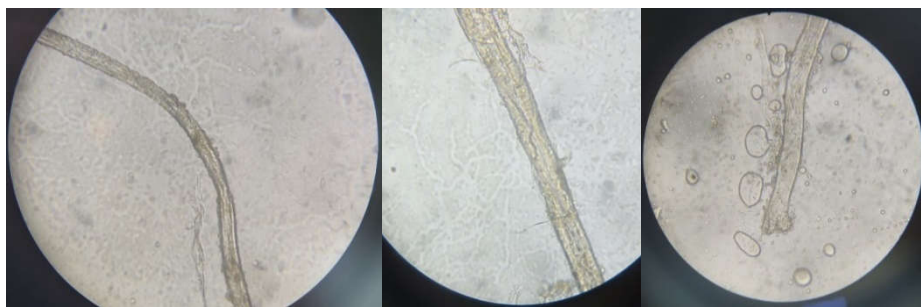
Sau 9 ngày phân lập hình thái tơ nấm dưới kính hiển vi của hai NT 70% trong 30s và NT 40% trong 60s có sự khác biệt rõ rệt được thể hiện qua hình 2 và 3.

Từ hình 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

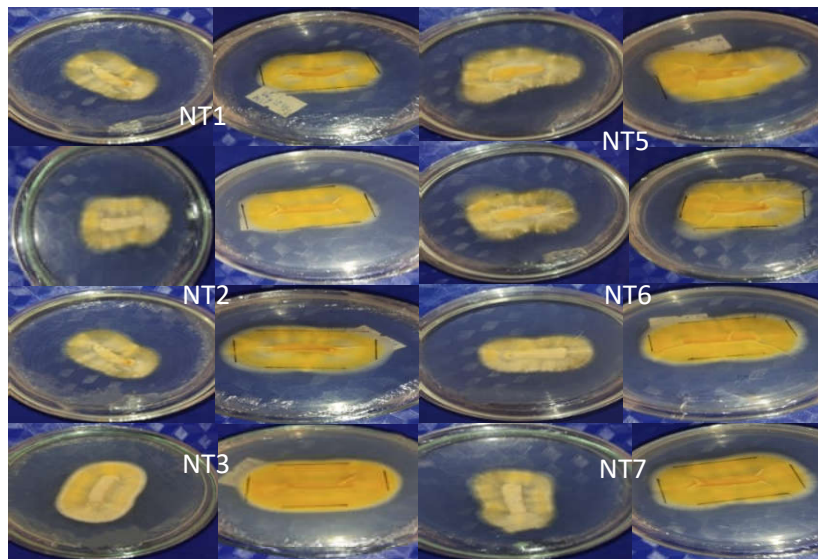
(70% trong 30s) hệ sợi dày, lan chậm, chuyển màu đều và đậm, hình thái tơ nấm được thể hiện ở hình 4.



Hình 2. Hình thái tơ nấm *C.militaris* ở NT 70% trong 30s dưới kính hiển vi



Hình 3. Hình thái tơ nấm *C.militaris* ở NT 40% trong 60s dưới kính hiển vi



Hình 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 (2019) 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*

Quá trình nhân giống nấm Đông trùng hạ thảo hiện nay còn một số hạn chế như kích thước của cầu nấm không đồng đều, chủ yếu bổ

sung hóa chất vào môi trường dinh dưỡng. Do đó, nhóm tác giả 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 bảng 4.

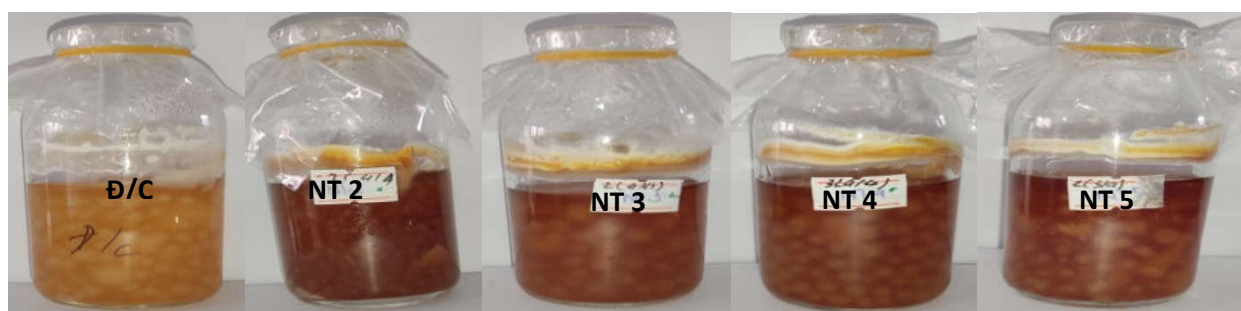
Bảng 4. Đặc điểm cầu nấm *C.militaris* sau 10 ngày nuôi cấy

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 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 5.



Hình 5. Cầu nấm *C.militaris* trong các môi trường dịch thể khác nhau sau 10 ngày

Từ hình 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.

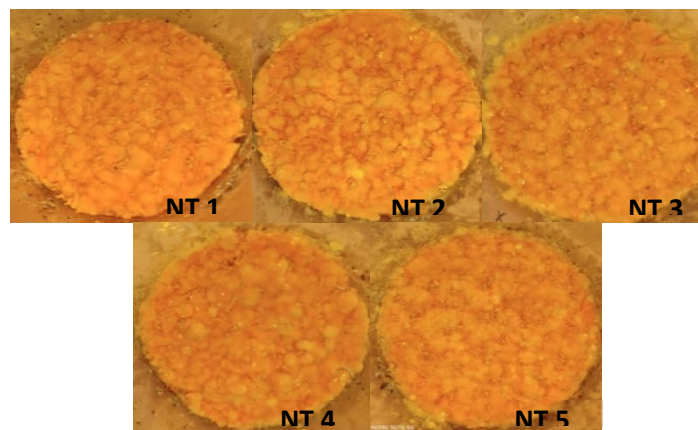
NT4 quả thể đạt 5cm sau 33 ngày nuôi trong tiếp theo đến NT1 và NT3 giao động trong khoảng 34 – 35 ngày, kém nhất là NT5 và NT2 sau 45 ngày nuôi quả thể không đạt 5cm.

Nguyên nhân của sự khác biệt này có thể do môi trường bổ sung giá. Theo Nguyễn Công Khanh và cộng sự (2010), trong giá có nhiều chất dinh dưỡng, acid amin thiết yếu và khoáng chất cần thiết cho sự phát triển của nấm như glucid, protein, vitamin B1, B2, B6, PP, Canxi, magie, natri, Lysin, Valin, Cystin, Tyrosin.

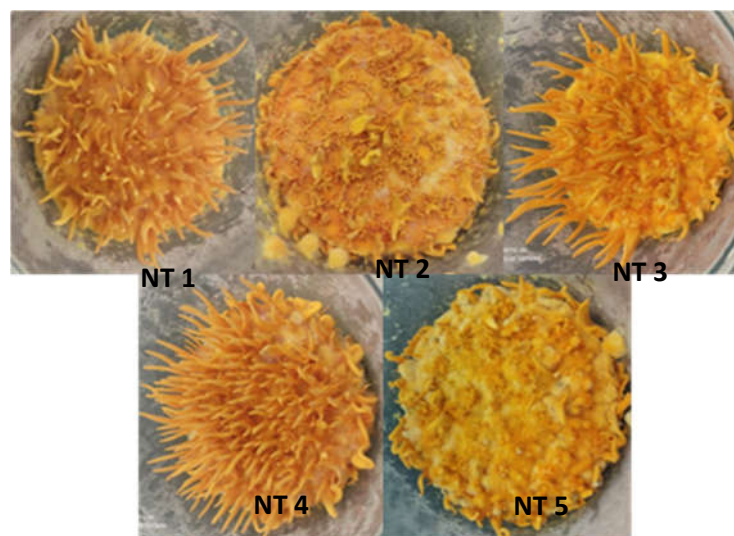
Môi trường NT4 bổ sung 200g/L là môi trường tối ưu nhân giống dịch thể nấm *C.militaris* xuất hiện cầu nấm sau 2 ngày nuôi, giá trị OD và kích thước cầu nấm lần lượt đạt

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



Hình 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 và các chất khoáng như canxi, photpho... Tuy nhiên, bên cạnh những lợi ích trên thì nhộng tằm còn nhiều hạn chế như: nhộng tằm nuôi bằng kháng sinh, một số người tiêu dùng dị ứng với kitin có trong vỏ 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, nghiên cứu 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 5.

Bảng 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 yến 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 32,58g, trong khi đó NT1 thấp nhất chỉ đạt 26,589g.

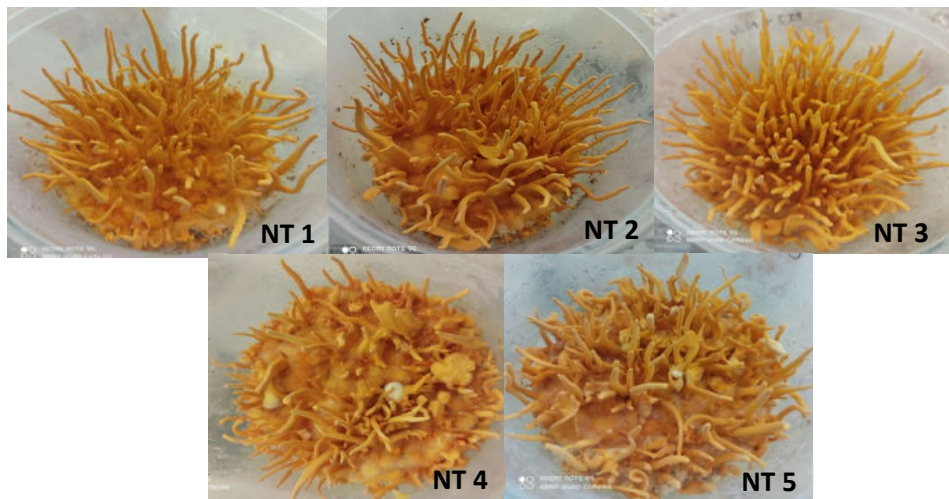
Kết thúc 4 ngày ủ tối tơ nấm ở các nghiệm thức lan kín bề mặt môi trường, tơ màu trắng bông, sau 6 giờ chiếu sáng đầu nhận thấy NT3 chưa đổi màu tơ, NT2,4,5 đã có hiện tượng đổi

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 8.

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 9), nhận thấy có hiện tượng quả thể dính lại với nhau, chậm phát triển, trong khi đó NT3 quả thể có màu cam phát triển nhanh đồng đều.



Hình 8. Tư nấm sau 6 giờ chiếu sáng 5 NT môi trường



Hình 9. Quả thể nấm sau 45 ngày nuôi

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. Kết thúc 45 ngày nuôi trồng tiến hành thu mẫu thí nghiệm và phân tích, so sánh với mẫu đối chứng. Qua kết quả phân tích 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

quả thể và 32,58g, 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..

4. KẾT LUẬN

Phân lập thành công giống nấm Đông trùng hạ thảo *C.militaris* từ quả thể tươi ở nồng độ ethanol 70% trong 30 giây 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 quả thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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.
2. Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng (2017). Nghiên cứu nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên môi trường tổng hợp và nhộng tằm. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp, 4, 10-16.
3. Holliday J.C., and Cleaver M. (2008). *Medicinal value of the caterpilla fungi species of the genus*

Cordyceps (Fr.) Link (Ascomycetes) – A review. International Journal of medicinal Mushrooms, 10(3), pp.219-234.

4. Nguyễn Thị Hồng, Lê Minh Sát, Nguyễn Thị Hồng Gấm (2019). Xác định môi trường và kỹ thuật phân lập giống gốc nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) thu thập tại Vườn quốc gia Hoàng Liên Sơn (Lào Cai). Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam. 9B. 2019.

5. 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.* Afrcan Journal of Microbiology research, 3(12), pp. 219-225.

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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. Tập 55, Số chuyên đề công nghệ sinh học. Tr 27-33.

10. Trần Thanh Thy và 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. Tr 125 – 134.

11. 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.

12. Zhang Z., Lei Z., Lu Y., Lu Z., Chen Y, (2008). Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. J Biosci Bioeng, 106, 188–93.

13. Zhang J.Y., Wu K.L., Duan J. (2010). *Influence of air permeability on growth of Cordyceps militaris*. Guangdong Agricultural Science.4:45–47.

14. Zhou L.H., Luo L.M. (2009). *Preparation and regeneration of protoplasts from Cordyceps militaris*. Hubei Agricultural Science. 48:1621–1624.

15. <https://vnua.edu.vn/tin-tuc-su-kien/nguyen-cuu-khoa-hoc/tao-spirulina,-thuc-pham-toi-uu-cho-cuoc-song-hien-dai-37746>

EVALUATION OF CULTURE MEDIUM FOR ORGANIC-ORIENTED CORDYCEPIN (*Cordyceps militaris*) PRODUCTION

Mai Hai Chau, Dang Thi Ngoc

Vietnam National University of Forestry - Dongnai Campus

SUMMARY

In order to evaluate 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 1.1 cm, 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: cordycepin, *Cordyceps militaris*, culture medium, propagation medium, silkworm pupae.

Ngày nhận bài : 13/02/2022

Ngày phản biện : 15/3/2022

Ngày quyết định đăng : 29/3/2022