



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003242

(51) **A01G 18/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00183

(22) 06/05/2021

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/11/2021 404

(73) **TRƯỜNG ĐẠI HỌC THỦY LỢI (VN)**

175 Tây Sơn, quận Đống Đa, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Kim Cúc (VN); Đặng Diễm Hồng (VN); Hoàng Thị Lan (VN); Đỗ Hải Lan (VN).

(54) **QUY TRÌNH NUÔI TRỒNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (CORDYCEPS MILITARIS NBRC 9787) HỮU CƠ BẰNG MÔI TRƯỜNG BỔ SUNG SINH KHỐI VI KHUẨN LAM (SPIRULINA PLATENSIS BM) VÀ CHUỐI TIÊU HỒNG (MUSA PARADISIACA L.)**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) hữu cơ từ nguồn dinh dưỡng có bổ sung sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis*) và chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.). Đông trùng hạ thảo hữu cơ được nuôi trồng bằng môi trường hữu cơ 100% có năng suất tương đương so với môi trường nuôi có nguyên liệu vô cơ nhưng có hàm lượng adenosin, cordycepin, carotin lần lượt cao hơn tới 1,16-2,56, 1,24-2,38 và 1,05 lần so với môi trường nuôi có nguyên liệu vô cơ. Sản phẩm quả thể và để nấm an toàn đối với sức khỏe con người khi sử dụng nấm đông trùng hạ thảo. Quy trình bao gồm các bước: nuôi trồng giống cấp 1 (môi trường thạch), nuôi trồng giống cấp 2 (môi trường lỏng), ương hệ sợi nấm, ương mầm quả thể, nuôi quả thể và thu hoạch, bảo quản sinh khối.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học, cụ thể là đề cập đến quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris* NBRC 9787) hữu cơ từ nguồn dinh dưỡng có bổ sung sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM) và chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.).

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp kỹ thuật

Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) hay còn gọi là trùng thảo chính là một loại nấm ký sinh trên sâu non, cơ thể côn trùng phát triển dạng hệ sợi, sử dụng nguồn dinh dưỡng từ cơ thể của côn trùng. Đến mùa hè khi có độ ẩm và nhiệt độ cao, nấm sinh ra cơ chất được gọi là stroma, bắt đầu hình thành quả thể giống như cây cỏ vươn lên khỏi mặt đất và phát triển thành dạng cây và phát tán bào tử. Trong điều kiện tự nhiên, đông trùng hạ thảo thường phân bố nhiều ở độ cao 0-2000 m so với mặt nước biển. Đông trùng hạ thảo có giá trị cao là do chúng có chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học cao như cordycepin, adenosin, manitol, axit amin, cordy-polisaccarit. Do nhu cầu sử dụng của con người với sản phẩm đông trùng hạ thảo ngày một tăng cao dẫn đến việc khai thác chúng ngoài tự nhiên quá mức làm cho nguồn dược liệu quý hiếm này ngày một trở nên rất cạn kiệt. Chính vì vậy, việc nuôi trồng nguồn dược liệu này bằng các môi trường nhân tạo trong điều kiện phòng thí nghiệm, pilot hay quy mô công nghiệp đang được đặt ra cấp thiết.

Đã có nhiều phương pháp trồng nấm đã được công bố tại Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan. Môi trường nuôi trồng đông trùng hạ thảo - nấm *Cordyceps militaris* phổ biến hiện nay gồm có các thành phần như sau: gạo lứt, nhộng tằm, khoai tây, nước dừa, đường glucoza, cao nấm men, chất làm đông aga, pepton, Myo-Inositol, Thiamin B1, KH_2PO_4 , và $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Khi nuôi trồng *C. militaris* trên môi trường chứa các hợp chất vô cơ, quả thể nấm và để nấm vẫn còn tồn dư một lượng hợp chất hóa học sẽ làm ảnh hưởng không tốt tới sức khỏe của người dùng sản phẩm này lâu dài. Do đó, cần có quy trình nhằm sản xuất sản phẩm nấm đông trùng hạ thảo hữu cơ 100%.

Các tác giả sáng chế đã nghiên cứu và phát hiện thấy việc bổ sung tảo xoắn (vi khuẩn lam) và dịch chiết giá đỗ, khoai tây, nước dừa, dịch chiết từ trái cây (từ chuối tiêu) vào môi trường nuôi cấy để bảo đảm đủ nguồn dinh dưỡng cacbon, ni tơ, muối khoáng đa và vi lượng, các loại vitamin cần thiết cho nấm đông trùng hạ thảo phát triển có năng suất và chất lượng cao. Bằng việc sử dụng nguồn nguyên liệu hữu cơ thay thế như vậy, chúng ta có thể tạo ra được sản phẩm đông trùng hạ thảo có nguồn gốc hữu cơ 100% có năng suất đủ lớn với hàm lượng adenosin và cordycepin cao để cân đối với chi phí nguyên liệu bổ sung cho quá trình sản xuất. Hơn nữa, hàm lượng adenosin và cordycepin trong đế nấm (trong phần môi trường nuôi) của sản phẩm tương đối cao có thể sử dụng như một nguồn các chất có hoạt tính sinh học mà lại hoàn toàn an toàn với sức khỏe người sử dụng. Như vậy, với môi trường nuôi hữu cơ 100% đã cho phép sử dụng an toàn tuyệt đối với sức khỏe con người khi sử dụng các sản phẩm quả thể nấm và đế nấm đang được thương mại hóa hiện nay góp phần đáp ứng được nhu cầu đông trùng hạ thảo hữu cơ có chất lượng cao, an toàn cho người sử dụng ở Việt Nam.

Việc nghiên cứu và nuôi thành công *C. militaris* bằng môi trường hữu cơ 100% là hoàn toàn mới ở Việt Nam. Phương pháp nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo bằng môi trường hữu cơ này đơn giản, dễ thực hiện, đảm bảo được hiệu quả và chất lượng nấm thu được.

Adenosin: Hoạt tính chủ yếu của adenosin đã được biết đến là một chất bảo vệ thần kinh trong thời kỳ thiếu máu cục bộ. Bổ sung adenosin vào cơ thể thiếu máu cục bộ có thể cải thiện căng thẳng thần kinh và làm giảm thể tích nhồi máu sau khi thiếu máu não khu trú thoáng qua. Nghiên cứu của tác giả Ren và cộng sự (2021) đã chỉ ra rằng nồng độ adenosin giảm và nồng độ xitokinin tăng ở bệnh nhân rối loạn mất ngủ kinh niên (CID) và nồng độ adenosin trong máu có liên quan chặt chẽ đến mức độ nghiêm trọng của chứng mất ngủ và/hoặc rối loạn chức năng nhận thức. Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng adenosin có hiệu quả điều trị ung thư và hỗ trợ chống ung thư.

Cordycepin (3'-deoxyadenosin), một dẫn xuất của adenosin, là một hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng được sản sinh bởi nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps* spp. Cordycepin đã được sử dụng rộng rãi như một hợp chất để phòng ngừa và điều trị khối u, chống ung thư, chống di căn, chống nôn, chống tiểu đường, chống trầm cảm,

chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, v.v.. Cordycepin ức chế sự phát triển của khối u thông qua quá trình điều hòa apoptosis, gây ra quá trình bắt giữ chu kỳ tế bào và nhắm mục tiêu vào các tế bào gốc ung thư (CSC). Cordycepin điều hòa vi môi trường thông qua việc ngăn chặn các con đường liên quan đến di căn của khối u. Vì vậy, cordycepin có thể là một trong những chất bổ sung hoặc thay thế thuốc quan trọng để điều trị ung thư. Với tác dụng chống lão hóa và sạm màu da v.v., cordycepin còn được sử dụng là một chất có hoạt tính sinh học trong các sản phẩm mỹ phẩm. Hơn nữa, các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên trên người của hợp chất này cho thấy chúng có hoạt tính chống viêm tiềm năng trong việc cải thiện đáng kể tình trạng viêm nhiễm đường thở trong bệnh nhân hen.

Đã có nghiên cứu và chỉ ra rằng cordycepin được sử dụng ở cả giai đoạn tiền lâm sàng và lâm sàng đều có tác dụng kháng vi rút. Trong bối cảnh đại dịch Covid -19 hay còn được gọi là Đại dịch virus corona, là một đại dịch bệnh truyền nhiễm với tác nhân là vi rút Sars CoV-2 hiện đang trở thành một đại dịch và đang là mối đe dọa toàn cầu, tác giả đã khuyến nghị cộng đồng thế giới cần kiểm tra tính hiệu quả và an toàn của việc sử dụng cordycepin trong điều trị cho bệnh nhân nhiễm Covid -19.

Như vậy, adenosin và cordycepin là hai chất có hoạt tính sinh học có vai trò quan trọng trong bảo vệ và tăng cường sức khỏe con người. Đây là những hợp chất có trong quả thể của Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) có nguồn gốc từ tự nhiên. Tuy nhiên, việc khai thác quá mức adenosin và cordycepin từ sinh khối đông trùng hạ thảo phát triển trong tự nhiên không đủ để đáp ứng nhu cầu thị trường hiện có về công dụng chữa bệnh và tăng cường sức khỏe. Do đó, nhiều chiến lược nhằm tăng cường sản xuất cordycepin ở *Cordyceps* spp. đang được triển khai ở các quy mô nuôi trồng khác nhau.

Vi khuẩn lam (*Spirulina platensis*)

Spirulina (Arthrospira) platensis - tên người dân hay gọi là tảo xoắn - là một loài vi khuẩn lam đa bào, dạng sợi, sinh vật nhân sơ có khả năng quang hợp thải oxygen, được sử dụng phổ biến rộng rãi nhất trên thế giới. Ở nhiều quốc gia châu Phi, nó được thu hoạch dễ dàng từ các hồ nước tự nhiên, sấy khô và sử dụng làm thực phẩm cho con người như một nguồn protein quan trọng. *S. platensis* khá phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm sức khỏe con người ở nhiều nước châu Á nói

chung và ở Việt Nam nói riêng. *S. platensis* là sản phẩm tự nhiên giàu dinh dưỡng vì có chứa hàm lượng protein cao, thành phần amino axit tốt, axit gama-linolenic (GLA), chất xơ, vitamin B, can xi, photpho, sắt, các sắc tố như beta-carotin, chất diệp lục, phycocyan và các hợp chất có hoạt tính sinh học khác. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng *S. platensis* có khả năng kháng vi rút, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, chống dị ứng, trị đái tháo đường, kháng khuẩn cũng như hạ lipid máu. Đặc biệt, sắc tố phụ của *S. platensis* là phycocyan được sử dụng làm màu thực phẩm an toàn (trong kẹo cao su, các sản phẩm bơ sữa v.v.), trong mỹ phẩm như son môi, kẻ mắt tại Nhật Bản, Trung Quốc, Thái Lan. Sắc tố này còn có khả năng chống oxy hóa cao, tăng cường miễn dịch và chống ung thư. Do đó, nhiều công ty dược phẩm có nhu cầu tách chiết hợp chất này để làm thành sản phẩm thuốc điều trị trực tiếp hoặc phối hợp với các phương pháp điều trị ung thư khác. Ngoài ra, *S. platensis* giúp làm giảm ô nhiễm môi trường do chúng có thể sử dụng một số nước thải, chất thải công-nông nghiệp làm nguồn dinh dưỡng và thải oxy.

Bảng 1: Thành phần dinh dưỡng của của dinh khối chủng vi khuẩn lam *S. platensis* BM nuôi trồng được sử dụng trong nuôi trồng đồng trùng hạ thảo *C. militaris* hữu cơ

Thành phần	Giá trị dinh dưỡng (mg/100 g sinh khối khô)	Thành phần	Giá trị dinh dưỡng (mg/100 g sinh khối khô)
Protein	55000-60000	Vitamin B6	6
Hyđrat-carbon	12430-15532	Vitamin B8	0,003
Lipit	11230-13430	Vitamin B9	0,06
Khoáng	8000	Vitamin B12	0,38
Chất xơ	6900	Ca	1002
Chlorophyll a	1160-1200	P	780
Phycocyan	12540-13420	Mg	390
Carotin tổng số	360-400	Fe	56
Vitamin A	210	Zn	5
Vitamin E	10	Cu	1,3
Vitamin B1	35	Mn	0,6
Vitamin B2	0,4	Cl	0,04
Vitamin B3	1,3	K	1,5
Vitamin B5	0,2	Axit gamma - linoleic	1,21

Trong thử nghiệm nuôi trồng đồng trùng hạ thảo hữu cơ, sử dụng sinh khối chủng *S. platensis* BM (phân lập ở hồ Ba Mẫu, Hà Nội, năm 2000 của Phòng Công nghệ Tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) được nuôi trồng dưới điều kiện thích hợp ở các hệ thống bể hở (raceway ponds) và hệ thống kín (closed photobioreactors) cho sinh trưởng và phát triển của chúng ở

nhệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; cường độ ánh sáng $100\text{-}150 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; chu kỳ chiếu sáng: tối là 12:12 h; mật độ quang (đo tại bước sóng 556 nm - $\text{OD}_{556\text{nm}}$) ban đầu là 0,3. Dưới điều kiện nuôi trồng nêu trên, tảo thu hoạch ở pha logarit trên đường cong sinh trưởng và sấy khô ở dưới 40°C . Thành phần dinh dưỡng của sinh khối vi khuẩn lam *S. platensis* BM được sử dụng trong nuôi trồng đồng trùng hạ thảo hữu cơ được chỉ ra trên Bảng 1.

Sinh khối tảo xoắn chủng BM được sử dụng cho thử nghiệm nuôi trồng đồng trùng hạ thảo đạt tiêu chuẩn cơ sở về hàm lượng protein, lipid, hydrat-carbon, chlorophyll a, phycocyan, carotin tổng số, đạt tiêu chuẩn cơ sở về các chỉ tiêu vi sinh vật, hàm lượng kim loại nặng (Pb, Hg, As, Cd) trong sinh khối tảo xoắn nuôi trồng được. Ngoài ra, sinh khối chủng tảo xoắn *S. platensis* BM còn rất giàu khoáng đa và vi lượng, giàu các loại vitamin và sắc tố, đặc biệt là sắc tố phụ phycocyan (có thể chiếm đến 13,4% sinh khối khô). Do vậy, việc bổ sung sinh khối tảo xoắn *S. platensis* BM vào môi trường nuôi đồng trùng hạ thảo hữu cơ sẽ cho phép thay thế một loạt các hóa chất vô cơ được sử dụng trong thành phần môi trường nuôi ở các cấp khác nhau.

Chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.)

Chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) là loại quả có giá trị dinh dưỡng cao. Ở nước ta, chuối tiêu hồng là một trong những loại quả chủ lực, dẫn đầu về diện tích, sản lượng. Năm 2016 diện tích trồng chuối là 138.600 ha với sản lượng 1.958.000 tấn. Đồng bằng sông Hồng là một vùng chủ lực về sản xuất chuối tiêu hồng của Việt Nam.

Nguyên liệu chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.) sử dụng trong nghiên cứu sản xuất nấm đồng trùng hạ thảo hữu cơ cung cấp bởi siêu thị Vinmart. Nguyên liệu hữu cơ có nguồn gốc và được đảm bảo sản xuất theo tiêu chuẩn VietGAP.

Trung bình trong 100 gam chuối chín chứa 18,25% hàm lượng đường tổng số, 1,93% hàm lượng tinh bột, 21,7% hàm lượng chất khô hòa tan tổng số (OBX) dưới dạng muối khoáng (canxi, photpho, sắt, đặc biệt: kali có gần 400mg/100g chuối), các vitamin: Carotin tổng số: 0,12mg, Vitamin B1: 0,005mg, Vitamin B2: 0,7mg, Vitamin B6, Vitamin C, v.v.. Như vậy, dịch chiết từ chuối tiêu hồng *M. paradisiaca* L. có thể được sử dụng như nguồn nguyên liệu hữu cơ thay thế một số hóa chất vô cơ sử dụng trong môi trường nuôi trồng đồng trùng hạ thảo ở các cấp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nuôi trồng đông trùng hạ thảo - *Cordyceps militaris* (chủng NBRC 9787 do Nhật Bản cung cấp) hữu cơ bổ sung sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM) và dịch chiết chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.). Quy trình nuôi trồng này đã hữu cơ hóa toàn bộ quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo từ bước nuôi trồng giống cấp 1 (môi trường thạch), giống cấp 2 (môi trường lỏng), nuôi ươm hệ sợi, ươm mầm và nuôi quả thể (môi trường hạt). Với quy trình này, sinh khối vi khuẩn lam (tảo xoắn - *S. platensis* BM) và dịch chiết chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.) được bổ sung vào cả 03 môi trường nuôi nêu trên. Sinh khối đông trùng hạ thảo hữu cơ thu được là nguồn nguyên liệu cung cấp chất có hoạt tính sinh học có hàm lượng cordycepin và adenosin cao. Ngoài ra, với môi trường nuôi được hữu cơ 100% nên đảm bảo an toàn tuyệt đối cho việc sử dụng quả thể nấm đông trùng hạ thảo cũng như phần đế nấm (giá thể của môi trường nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo) vào nhiều mục đích sử dụng khác nhau như ngâm rượu, tách chiết các chất có hoạt tính sinh học như codycepin và adenosin làm tăng giá trị sử dụng của đông trùng hạ thảo lên nhiều lần. Ví dụ, hàm lượng adenosin và codycepin ở quả thể nấm tương ứng là 33,92-317,00 và 226,00-1.194,05 mg/100 g sinh khối khô và ở phần đế môi trường nuôi (sau khi thu hoạch hết các quả thể) có hàm lượng adenosin và codycepin tương ứng là 10,58-11,70 và 161,56-194,60 mg/100 g sinh khối khô.

Do vậy, với môi trường nuôi hoàn toàn hữu cơ bằng cách bổ sung thêm sinh khối chủng *S. platenis* BM và dịch chiết của khoai tây, giá, đỗ, và chuối tiêu cùng nước dừa, củi dừa và gạo lứt đã làm cho năng suất sinh khối đông trùng hạ thảo đạt 0,98-1,02 lần nhưng hàm lượng adenosin và codycepin tăng lên tương ứng 2,10-2,56 và 1,46 -2,38 lần so với sản phẩm nấm nuôi trồng theo quy trình phổ biến đã và đang được thực hiện. Ngoài ra, sinh khối đông trùng hạ thảo được nuôi trong môi trường hữu cơ nêu trên có hàm lượng carotin tổng số, astaxanthin khá tương đồng đạt 0,98-1,05 lần so với kết quả nuôi trồng theo quy trình phổ biến (nuôi bằng môi trường có thành phần vô cơ trên môi trường thạch, lỏng và hạt).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nuôi trồng Đông trùng hạ thảo - *Cordyceps militaris* (chủng NBRC 9787) hữu cơ từ sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM) và chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.).

Hình 2 thể hiện sự sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 trên môi trường thạch sau 15 ngày.

Hình 3 thể hiện đặc điểm của hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 trong môi trường lỏng sau 07 ngày.

Hình 4 thể hiện nấm *C. militaris* NBRC 9787 phát triển ở các giai đoạn trên môi trường hạt.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo - nấm *Cordyceps militaris* (chủng NBRC 9787) hữu cơ bằng bổ sung sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM) và chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.) gồm các bước sau:

Chuẩn bị môi trường nuôi trồng

(i) Nuôi trồng giống cấp I

Giống nấm *Cordyceps militaris* NBRC 9787 - Nhật Bản được nuôi cấy tạo nguồn giống trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) - thạch đĩa/ống thạch nghiêng cải tiến có thành phần môi trường như sau: 20% dịch chiết khoai tây, 20% dịch chiết giá đỗ, 2% đường glucoza, 1,6% chất làm đông aga, 0,9% dịch chiết chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) và nước cất, độ pH môi trường nuôi 6,5 - 7,0. Môi trường sau khi chuẩn bị xong được khử trùng ở 121°C trong 19 phút. Môi trường nguội sau khi khử trùng được dùng để nuôi trồng giống cấp I. Giống cấp I được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 20-25°C.

(ii) Nuôi trồng giống cấp II

Giống nấm *Cordyceps militaris* NBRC 9787 cấp I được nuôi trồng tạo nguồn giống trên môi lỏng – Broth - với thành phần bao gồm: 2% đường glucoza, 1% sinh khối tảo xoắn *S. platensis* BM, 1,7% dịch chiết chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) và độ pH môi trường nuôi là 6,5 - 7,0. Lấy 100 mL môi trường được chuẩn bị nêu trên

vào các bình tam giác thể tích 250 mL, bịt kín bằng ni lông khử trùng ở 121°C trong 19 phút. Môi trường được để nguội sau khi khử trùng sẽ được sử dụng để cấy giống cấp II. Điều kiện cho nuôi giống cấp II: lắc mẫu trên máy lắc có tốc độ 130-150 vòng/phút, ở 20-25°C.

(iii) Nuôi trồng trong môi trường hạt

Giống *C. militaris* NBRC 9787 cấp II là nguồn giống cho nuôi trồng quả thể nấm đông trùng hạ thảo. Nguồn giống này được cấy vào môi trường hạt có thành phần như sau: nhộng tằm 20%, khoai tây 7%, nước dừa và cùi dừa 10%, bột đậu nành 2%, đường glucoza 3%, sinh khối tảo xoắn *S. platensis* BM 1,0-1,5% và 0,6% dịch chiết chuỗi tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.). Môi trường nuôi có độ pH 6,5 - 7,0. Gạo lứt được chia ra các lọ/hộp nhỏ và bổ sung môi trường vừa pha ở tỷ lệ ~47% gạo và 80 mL môi trường. Các hộp/lọ được bọc kín và khử trùng ở 121°C trong 25 phút. Môi trường sau khử trùng để nguội là môi trường hạt để nuôi cấy quả thể nấm đông trùng hạ thảo.

Quy trình thực hiện nuôi trồng ở các môi trường theo 6 bước như sau:

(i) Bước 1- Nuôi trồng giống cấp I

Nguồn giống cấp I được nuôi tạo theo các bước sau đây:

- Môi trường thạch nghiêng và thạch đĩa:

+ Môi trường thạch đã chuẩn bị được chiết vào ống nghiệm có đường kính $d = 1,5$ cm. Lượng môi trường đưa vào tương đương 1/3 thể tích của ống nghiệm. Bịt chặt ống nghiệm bằng ni lông và khử trùng. Sau khi hấp khử trùng, đặt nghiêng ống nghiệm để tạo môi trường thạch nghiêng.

+ Với môi trường thạch đĩa, môi trường thạch đã chuẩn bị được hấp khử trùng cùng các đĩa petri. Sau khi khử trùng, môi trường thạch được đổ vào các đĩa petri với lượng dung dịch tương đương 10-15 mL tùy thuộc vào kích thước đĩa petri; đậy nắp (các thao tác này được thực hiện trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng). Sau khi để nguội, gắn chặt cặp đĩa petri bằng màng parafilm.

- Cấy giống: Môi trường thạch cần được để nguội trước khi sử dụng để nuôi cấy nấm *C. militaris*. Tiến hành tách một phần hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 bằng que cấy vô trùng, cấy chấm điểm lên môi trường thạch đĩa - PDA (tất cả các thao tác trên đây tiến hành trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng), sau đó đặt các đĩa này trong điều

kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 20-25°C trong khoảng 15 ngày nuôi cấy để thu được kích thước khuẩn lạc nằm trong khoảng từ 55 đến 60 mm;

- Cấy chuyển: Khi giống nấm trong môi trường thạch đĩa phát triển, tiến hành kiểm tra giống nấm thuần, không bị nhiễm các vi sinh vật khác. Tiến hành cấy chuyển nấm bằng cách cấy chấm điểm từ môi trường thạch đĩa sang môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm. Các thao tác trên đây tiến hành trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng. Sau đó, đặt ống nghiệm có chứa giống nấm trong điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 25°C trong 5 ngày nuôi cấy để thu được hệ sợi lan kín bề mặt môi trường nuôi.

- Bảo quản ống nghiệm chứa chủng nấm đã thuần ở 4°C trong tủ lạnh, cấy chuyển định kỳ từ 2 đến 4 tháng một lần.

(ii) Bước 2- Nuôi trồng giống cấp II

- Môi trường lỏng đã được khử trùng, để nguội và bảo quản ở môi trường vô trùng. Tiến hành nhân giống *C. militaris* NBRC 9787 cấp II theo các bước như sau: tách một phần hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 thuần chủng được lưu giữ trong ống nghiệm bằng que cấy vô trùng đưa vào 100-150 mL môi trường lỏng chứa trong các bình tam giác 250 mL. Tất cả các thao tác trên đây tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng. Các bình tam giác có chứa môi trường nuôi được bịt kín nắp bằng ni lông. Sau đó, tiến hành nuôi lắc trong máy lắc ổn nhiệt ở 20-25°C, tốc độ lắc 130-150 vòng/phút trong khoảng 5-7 ngày để thu giống cấp II.

(iii) Bước 3- Ươm hệ sợi nấm trong môi trường hạt hữu cơ

- Giống cấp II thuần chủng đã nuôi cấy được được đồng nhất thành dung dịch huyền phù trong máy đồng nhất mẫu đến mật độ tế bào trên 2.10^5 CFU (bào tử/mL) để bảo đảm việc tạo hệ sợi trên giá thể nhân tạo (môi trường hạt) là tốt nhất.

- Có thể tiến hành cấy giống nấm *C. militaris* NBRC 9787 cấp II vào môi trường hạt đã được khử trùng và để nguội bằng cách sử dụng bơm tiêm vô trùng dung tích $V \geq 3$ mL để hút giống cấp II trong bình giống, phun đều 3 mL giống cấp II (dung dịch huyền phù hệ sợi nấm) lên bề mặt giá thể (môi trường hạt). Sau đó bọc kín miệng hộp/lọ bằng ni lông. Tất cả các thao tác trên đây tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng.

- Tất cả các hộp/lọ đã cấy giống nấm *C. militaris* NBRC 9787 nêu trên được đặt trong điều kiện tối hoàn toàn trong khoảng từ 5 đến 7 ngày, ở nhiệt độ 20°C - 25°C cho đến khi xuất hiện hệ sợi có màu trắng phủ kín bề mặt và ăn sâu bên trong giá thể.

(iv) Bước 4- Ươm mầm quả thể trong môi trường hạt hữu cơ

- Hộp/lọ giá thể môi trường hạt đã có hệ sợi *C. militaris* NBRC 9787 phủ kín được đặt vào phòng phun sương để tạo độ ẩm từ 70-80%, chiếu ánh sáng trắng bằng đèn led có công suất 25W/0,5m², cường độ chiếu sáng từ 1.000 đến 1.200 lux với thời gian chiếu sáng hàng ngày là 14 giờ sáng và 10 giờ tối, ở nhiệt độ 16-18°C.

- Giai đoạn ươm mầm quả thể trong môi trường hạt hữu cơ kết thúc khi các quả thể xuất hiện đều trên bề mặt môi trường với chiều cao khoảng 0,5-1,2 cm.

(v) Bước 5- Nuôi quả thể trong môi trường hạt hữu cơ

- Kết thúc giai đoạn ươm mầm quả thể, điều kiện môi trường phòng nuôi được điều chỉnh để phù hợp với giai đoạn nuôi quả thể. Điều kiện nuôi như sau: phòng phun sương để tạo độ ẩm từ 80-90%, chiếu ánh sáng trắng bằng đèn led có công suất 25W/0,5m², cường độ chiếu sáng từ 600 đến 700 lux với thời gian chiếu sáng hàng ngày là 10 giờ sáng và 14 giờ tối, ở nhiệt độ 18-20°C.

- Giai đoạn nuôi quả thể trong môi trường hạt hữu cơ kết thúc khi các quả thể có chiều cao 7,0-8,0 cm, đầu quả thể bắt đầu tù, màu vàng cam sậm.

(vi) Bước 6 - Thu hoạch và bảo quản sinh khối đông trùng hạ thảo hữu cơ

- Quả thể *Cordyceps militaris* NBRC 9787 được thu hoạch sau khoảng 55-70 ngày sau khi cấy giống với đặc điểm quả thể có thể thu hoạch có chiều cao đạt khoảng từ 7,0 cm đến 8,0 cm, đầu tù, màu vàng cam sậm. Nên tiến hành thu hoạch trước khi thể quả chuyển đầu tròn, màu nhạt dần.

- Thu hoạch bằng cách cắt sát chân thể quả, tách riêng quả thể và đế nấm (giá thể).

- Quả thể nấm *Cordyceps militaris* NBRC 9787 đến độ thu hoạch có thể được sử dụng trực tiếp dưới dạng tươi hoặc sau khi thu hoạch có được bảo quản bằng cách sử dụng phương pháp đông khô, rồi hút chân không, để mát ở nhiệt độ 20 đến 25°C và tránh ánh sáng.

- Để nấm (giá thể) nuôi đông trùng hạ thảo hữu cơ có hàm lượng đáng kể chất có hoạt tính sinh học cordycepin và adenosin, hoàn toàn an toàn với sức khỏe người tiêu dùng nên có thể sử dụng như một nguồn bổ sung cordycepin và adenosin.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Thực hiện nuôi trồng giống và quả thể nấm đông trùng hạ thảo

Nuôi trồng giống cấp I

- Chuẩn bị 01 lít môi trường thạch: cân 200g khoai tây, 200g giá đỗ, 9g chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.), 20g đường glucoza và 16g chất làm đông aga. Rửa sạch và thái nhỏ hỗn hợp khoai tây, giá đỗ và chuối tiêu rồi cho vào nồi đun sôi sau đó để nhỏ lửa đến khi hỗn hợp chín nhừ. Xay nhuyễn hỗn hợp đã nấu nhừ và cho vào nồi đun nhỏ lửa. Hòa tan hỗn hợp đường glucoza và chất làm đông aga với nước ở nhiệt độ phòng rồi tiếp từ từ vào nồi chứa hỗn hợp đang đun nhỏ lửa, vừa tiếp vừa khuấy đều, bổ sung nước cất để dung dịch có thể tích 1000 mL và độ pH trong khoảng 6,5-7,0. Khử trùng hỗn hợp môi trường ở 121°C trong 19 phút. Hỗn hợp sau khi khử trùng, để nguội sẽ đông dạng thạch được sử dụng làm giá thể để nuôi trồng giống cấp I.

- Cấy giống: Tiến hành tách một phần hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 bằng que cấy vô trùng, cấy chấm điểm lên môi trường thạch đĩa, sau đó, đặt các đĩa này trong điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 20-25°C trong khoảng 15 ngày nuôi cấy để thu được khuẩn lạc có kích thước nằm trong khoảng từ 55 đến 60 mm. Tất cả các thao tác nêu trên đều được tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng;

- Cấy chuyển: Khi giống nấm phát triển kín bề mặt đĩa thạch và thuần, không bị nhiễm các vi sinh vật khác sẽ được cấy chuyển nấm bằng cách cấy chấm điểm từ môi trường thạch đĩa sang môi trường thạch nghiêng trong ống nghiệm. Sau đó đặt ống nghiệm có chứa giống nấm trong điều kiện không có ánh sáng, nhiệt độ 25°C trong 15 ngày nuôi cấy để thu được hệ sợi lan kín bề mặt môi trường. Các thao tác trên đây tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng.

Nuôi trồng giống cấp II

- Chuẩn bị 01 lít môi trường lỏng: Cân 10g sinh khối khô tảo xoắn *S. platensis* BM., 17g chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.) xay nhuyễn (dịch chiết), 20g đường glucoza. Bổ sung nước cất để dung dịch có thể tích 1000 mL và độ pH trong khoảng

6,5-7,0. Chiết 100 -150 mL môi trường nêu trên vào các bình tam giác thể tích 250 mL, bịt kín bằng ni lông rồi khử trùng ở 121°C trong 19 phút. Môi trường để nguội sau khử trùng sẽ là môi trường để nuôi trồng giống cấp II.

- Nhân giống *C. militaris* NBRC 9787 cấp II vào môi trường nuôi lỏng bằng cách tách một phần hệ sợi nấm *C. militaris* thuần chủng được lưu giữ trong ống nghiệm bằng que cấy vô trùng đưa vào môi trường lỏng chứa trong các bình tam giác 250 mL, bịt kín bằng ni lông. Tất cả các thao tác trên đây tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học đã vô trùng.

- Thực hiện nuôi giống *C. militaris* NBRC 9787 trong các bình tam giác 250 mL nêu trên trên các máy lắc ổn nhiệt ở 20-25°C, tốc độ lắc 130-150 vòng/phút trong khoảng 5-7 ngày để thu giống cấp II.

Nuôi trồng quả thể trong môi trường hạt

- Chuẩn bị 01 lít môi trường hạt: Cân 200g nhộng tằm, xay nhuyễn lọc lấy nước, 70g khoai tây và 6g chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.) ninh nhừ và xay nhuyễn, 100g nước dừa và cùi dừa xay nhuyễn. Trộn các hỗn hợp cùng với 15g sinh khối khô tảo xoắn (*S. platensis* BM), 20g bột đậu nành, 30g đường glucoza và bổ sung nước cất đến thể tích 1 lít, môi trường có độ pH 6,5 - 7,0. Gạo lứt được chia ra các lọ/hộp nhỏ và bổ sung môi trường vừa pha ở tỷ lệ ~47% gạo và 80 mL dung dịch môi trường vừa pha được. Các hộp/lọ được bọc kín và khử trùng ở 121°C trong 25 phút. Hỗn hợp để nguội sau khi khử trùng là môi trường hạt để nuôi cấy quả thể đồng trùng hạ thảo

- Cấy giống: Sử dụng bơm tiêm vô trùng hút 3mL dung dịch huyền phù có chứa giống nấm *C. militaris* NBRC 9787 (giống cấp II) đã đồng nhất hóa trong bình tam giác, tưới đều lên bề mặt môi trường hạt và bọc kín bằng ni lông. Tất cả các thao tác trên đây tiến hành trong trong tủ cấy an toàn sinh học vô trùng.

- Ươm hệ sợi: hộp/lọ giá thể nhân tạo đã cấy huyền phù hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 được đặt trong điều kiện tối hoàn toàn trong khoảng từ 5 đến 7 ngày, ở nhiệt độ 20°C-25°C đến khi xuất hiện hệ sợi có màu trắng phủ kín bề mặt và ăn sâu bên trong giá thể.

- Ươm mầm quả thể: hộp/lọ giá thể môi trường hạt đã có hệ sợi *C. militaris* phủ kín được đặt vào phòng phun sương có độ ẩm 70-80%, chiếu ánh sáng trắng bằng đèn led có công suất 25W/0,5m², cường độ chiếu sáng từ 1.000 đến 1.200 lux với chu kỳ

sáng: tối là 14:10 giờ, ở nhiệt độ 16-18°C. Giai đoạn ươm mầm quả thể trong môi trường hạt hữu cơ kết thúc khi các quả thể xuất hiện đều trên bề mặt môi trường với chiều cao khoảng 0,5-1,2 cm.

- Nuôi quả thể trong môi trường hạt hữu cơ: Quả thể được nuôi trong điều kiện nuôi như sau: phòng nuôi được phun sương để tạo độ ẩm đạt từ 80-90%, tiến hành chiếu ánh sáng trắng bằng đèn led có công suất 25W/0,5m², cường độ chiếu sáng từ 600 đến 700 lux với chu kỳ sáng: tối là 10:14 giờ, ở nhiệt độ 18-20°C.

- Sau khoảng 55-70 ngày, khi các quả thể có chiều cao 7,0-8,0 cm, đầu quả thể bắt đầu tù, màu vàng cam sậm có thể thu hoạch quả thể nấm.

Ví dụ 2: Xác định năng suất và chất lượng của nấm đông trùng hạ thảo nuôi

Tiến hành phân tích, đánh giá hiệu suất trồng nấm đông trùng hạ thảo cùng các chỉ số lý, hóa. Kết quả thể hiện trong các Bảng 2 và 3 dưới đây.

Bảng 2: Kết quả trồng nấm đông trùng hạ thảo

Môi trường Năng suất/ hiệu suất	Môi trường đối chứng	Môi trường đối chứng không có vitamin và khoáng vô cơ, bổ sung 10 gam tảo xoắn	Môi trường đối chứng có bổ sung 5, 10, 15, và 20 gam tảo xoắn/1 lít môi trường					Môi trường hữu cơ 100%, có bổ sung 6 gam dịch chiết chuỗi tiêu và 5, 10, 15, và 20 gam tảo xoắn/1 lít môi trường				
	RC+	R10-	R5+	R10+	R15+	R20+	RB5	RB10	RB15	RB20		
Năng suất (Gam sinh khối khô/hộp giá thể)	8,34±0,40	8,22±0,22	8,31±0,57	8,51±0,29	8,60±0,15	8,04±0,20	8,14±0,37	8,40±0,38	8,50±0,09	8,18±0,19		
Hiệu suất sinh học (Gam nấm tươi/Khô)	6,33±0,22	6,18±0,21	6,35±0,24	6,36±0,11	6,25±0,23	6,26±0,13	6,06±0,35	6,18±0,25	6,22±0,17	6,2±0,16		

Bảng 3: Đánh giá chất lượng nấm đông trùng hạ thảo

Môi trường Chất lượng	Môi trường đối chứng	Môi trường đối chứng không có vitamin và khoáng vô cơ, bổ sung 10 gam tảo xoắn	Môi trường đối chứng có bổ sung 5, 10, 15, và 20 gam tảo xoắn/1 lít môi trường					Môi trường hữu cơ 100%, có bổ sung 6 gam dịch chiết chuỗi tiêu và 5, 10, 15, và 20 gam tảo xoắn/1 lít môi trường				
	RC+	R10-	R5+	R10+	R15+	R20+	RB5	RB10	RB15	RB20		
Ngày thử 60												
Adenosin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)	231,00	216,00	242,00	255,00	262,00	189,00	237,00	213,00	268,00	317,00		
Cordycepin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)	294,00	298,00	448,00	463,00	323,00	333,00	236,00	226,00	364,00	339,00		
Adenosin trong đế nấm (mg/100 g sinh khối khô)	19,54			8,04					11,70	10,58		
Cordycepin trong đế nấm (mg/ 100 g sinh khối khô)	171,27			143,85					161,56	194,60		
Astaxanthin (µg/g sinh khối khô)	156,74	125,70	157,52	170,89	148,84	166,79	158,79	165,04	154,59	164,35		
Carotinoid (mg/g sinh khối khô)	1,96	1,57	1,97	2,14	1,86	2,08	1,98	2,06	1,93	2,05		

Môi trường	Môi trường đối chứng	Môi trường đối chứng không có vitamin và khoáng vô cơ, bổ sung 10 gam táo xoăn	Môi trường đối chứng có bổ sung 5, 10, 15, và 20 gam táo xoăn/1 lít môi trường				Môi trường hữu cơ 100%, có bổ sung 6 gam dịch chiết chuỗi tiêu và 5, 10, 15, và 20 gam táo xoăn/1 lít môi trường			
			R5+	R10+	R15+	R20+	RB5	RB10	RB15	RB20
Chất lượng	RC+	R10-								
Ngày thứ 70										
Adenosin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)	16,13							41,35	33,92	
Cordycepin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)	502,60							735,94	1.194,05	
TỶ LỆ so với môi trường đối chứng										
Ngày thứ 60										
Adenosin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)		0,94	1,05	1,10	1,13	0,82	1,03	0,92	1,16	1,37
Cordycepin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)		1,01	1,52	1,57	1,10	1,13	0,80	0,77	1,24	1,15
Adenosin trong đế nấm (mg/100 g sinh khối khô)				0,41					0,60	0,54
Cordycepin trong đế nấm (mg/ 100 g sinh khối khô)				0,84					0,94	1,14
Astaxanthin (µg/ g sinh khối khô)		0,80	1,00	1,09	0,95	1,06	1,01	1,05	0,99	1,05
Carotinoid (mg/g sinh khối khô)		0,80	1,01	1,09	0,95	1,06	1,01	1,05	0,98	1,05
Ngày thứ 70										
Adenosin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)								2,56	2,10	
Cordycepin trong quả thể nấm (mg/100 g sinh khối khô)								1,46	2,38	

Ghi chú: Thành phần môi trường tương ứng với các môi trường nuôi trồng quả thể nấm đông trùng hạ thảo trong Bảng 2 và Bảng 3

		Đơn vị Gam/lít MT												
TT	Môi trường	Nhộng tằm	Khoai tây	Đậu trương	Gạo lứt	Dừa	Đường glucoza	Pepton	Myo- Inositol	Thiamin B1	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄ .7 H ₂ O	Tảo xoán	Chuối tiêu hồng
1	RC+ Môi trường đối chứng - công thức nuôi trồng phổ biến hiện nay	200	70	20	400	10	30	3	1	0,5	1	1,2	0	0
2	R10- Môi trường đối chứng không có vitamin và khoáng vô cơ, bổ sung 10 gam tảo xoắn	200	70	20	400	10	30	0	0	0,0	0	0,0	10	0
3	R5+ Môi trường đối chứng có bổ sung	200	70	20	400	10	30	0	1	0,5	1	1,2	5	0
4	R10+ 5, 10, 15, và 20	200	70	20	400	10	30	0	1	0,5	1	1,2	10	0
5	R15+ gam tảo xoắn/1 lít	200	70	20	400	10	30	0	1	0,5	1	1,2	15	0
6	R20+ môi trường	200	70	20	400	10	30	0	1	0,5	1	1,2	20	0
7	R5B Môi trường hữu cơ	200	70	20	400	10	30	0	0	0,0	0	0,0	5	6
8	R10B 100%, có bổ sung	200	70	20	400	10	30	0	0	0,0	0	0,0	10	6
9	R15B 6 gam dịch chiết	200	70	20	400	10	30	0	0	0,0	0	0,0	15	6
10	R20B chuối tiêu và 5, 10, 15, và 20 gam tảo xoắn/1 lít môi trường	200	70	20	400	10	30	0	0	0,0	0	0,0	20	6

So sánh kết quả phân tích hiệu suất, năng suất và chất lượng quả thể nấm đông trùng hạ thảo nuôi cấy với quy trình của công thức đối chứng (công thức nuôi trồng phổ biến hiện nay) với quy trình nuôi trồng với 100% nguyên liệu hữu cơ bằng công thức bổ sung vào mỗi lít môi trường 6 gam dịch chiết chuối tiêu và 15 gam tảo xoắn tại Bảng 2 và 3. Kết quả cho thấy hiệu suất và năng suất của quy trình trồng nấm theo quy trình hữu cơ 100% là tương đương với quy trình công thức nuôi trồng phổ biến hiện nay (Bảng 2). Tuy nhiên, sinh khối nấm đông trùng hạ thảo nuôi trồng được có hàm lượng các chất có hoạt tính sinh học ở quy trình trồng nấm 100% hữu cơ (theo giải pháp hữu ích này) với hàm lượng adenosin và cordycepin đạt tới 317,00 và 1.194,05 mg/100 g sinh khối khô tương đương, đã tăng cao hơn 1,16-2,10 và 1,24-2,38 lần so với với quy trình nuôi phổ biến hiện nay khi thu hoạch nấm ở ngày nuôi trồng thứ 60 và 70. Hàm lượng astaxanthin và carotin trong nấm trồng theo quy trình trồng nấm hữu cơ 100% (theo giải pháp hữu ích) đạt 99% và 98% so với quy trình phổ biến (Bảng 3).

Ở phần đế nấm (giá thể) của nấm đông trùng hạ thảo nuôi trồng theo quy trình giải pháp hữu ích này (100% hữu cơ) có hàm lượng adenosin đạt 10,58-11,70 mg/100 gam sinh khối khô, thấp hơn so với kết quả phân tích đế nấm nuôi theo phương pháp phổ biến 19,54 mg/100 gam sinh khối đế khô. Trong khi đó, hàm lượng cordycepin trong đế nấm nuôi theo quy trình của giải pháp hữu ích là 161,56 - 194,60 mg/100 gam đế khô. Như vậy, hàm lượng cordycepin trong đế nấm được nuôi theo quy trình hữu cơ 100% là tương đối cao. Kết quả này tương đương hoặc cao hơn nhưng không quá lớn so với kết quả phân tích hàm lượng cordycepin trong đế nấm nuôi trồng theo phương pháp phổ biến (0,94-1,14 lần) (Bảng 3). Tuy nhiên, điểm đáng chú ý là sản phẩm đế nấm nuôi trồng theo quy trình giải pháp hữu ích sử dụng 100% nguyên liệu hữu cơ, đảm bảo hoàn toàn an toàn với sức khỏe người tiêu dùng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* theo giải pháp hữu ích sử dụng 100% nguyên liệu hữu cơ từ tảo xoắn và dịch chiết hoa quả: chuối tiêu hồng, dứa, khoai tây, giá đỗ v.v.. Việc sử dụng nguồn nguyên liệu 100% hữu cơ vẫn cho phép sản xuất ra sản phẩm nấm đảm bảo về sản lượng sinh khối nấm mà lại có chất lượng tốt hơn so với quy trình nuôi bằng môi trường vô cơ. Hầu hết các chỉ tiêu

đánh giá chất lượng thể hiện qua hàm lượng adenosin, cordycepin, carotin tổng số, astaxanthin đều đạt tương đương hoặc cao hơn so với quy trình sử dụng nguyên liệu vô cơ.

Để, giá thể, nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo có chứa hàm lượng chất có hoạt tính sinh học tương đối cao. Đây là nguồn bổ sung adenosin và cordycepin quý giá nếu sử dụng nguyên liệu hữu cơ 100% làm môi trường nuôi trồng nấm. Việc áp dụng quy trình nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo theo giải pháp hữu ích có thể tận dụng được nguồn adenosin và cordycepin từ đế nấm đảm bảo 100% an toàn với sức khỏe người tiêu dùng.

Các nguyên liệu sử dụng cho nuôi trồng đông trùng hạ thảo theo quy trình giải pháp là các nguyên liệu hữu cơ 100%, phổ biến, dễ tìm kiếm trên thị trường Việt Nam. Quy trình nuôi trồng nấm này đơn giản, dễ thực hiện.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nuôi trồng đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris* NBRC 9787) sử dụng 100% nguyên liệu hữu cơ từ nguồn dinh dưỡng có bổ sung sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM) và chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) bao gồm các bước:

(i) nuôi trồng giống cấp I: chuẩn bị môi trường thạch cải tiến có thành phần môi trường như sau: 20% dịch chiết khoai tây, 20% dịch chiết giá đỗ, 2% đường glucoza, 1,6% chất làm đông aga, 0,9% dịch chiết chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) và nước cất, độ pH của môi trường nuôi là 6,5 - 7,0; khử trùng môi trường ở 121°C trong 19 phút; sử dụng que cấy vô trùng tách một phần hệ sợi giống nấm *Cordyceps militaris* NBRC 9787, cấy chấm điểm, giống cấp I được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ 20-25°C;

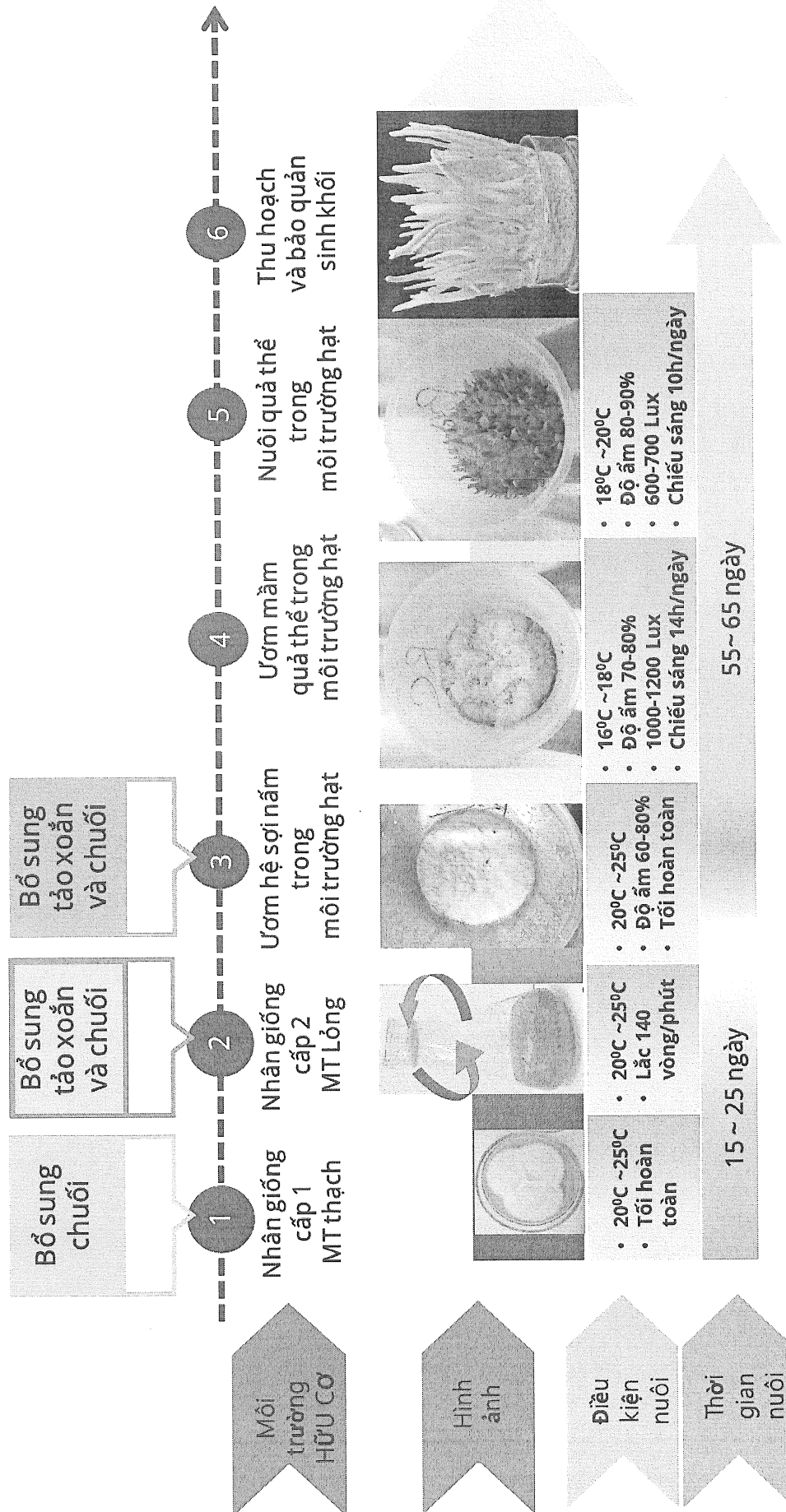
(ii) nuôi trồng giống cấp II: chuẩn bị môi trường lỏng với thành phần bao gồm: 2% đường glucoza, 1% sinh khối tảo xoắn (*S. platensis* BM), 1,7% dịch chiết chuối tiêu hồng (*Musa paradisiaca* L.) và độ pH môi trường là 6,5 - 7,0; chiết 100 -150 mL môi trường này vào các bình tam giác thể tích 250 mL, bịt kín bằng ni lông, khử trùng ở 121°C trong 19 phút; nuôi trồng giống nấm *Cordyceps militaris* NBRC 9787 cấp II trong môi trường đã được khử trùng trong điều kiện lắc mẫu trên máy lắc có tốc độ 130-150 vòng/phút, ở 20-25°C;

(iii) ươm hệ sợi nấm: chuẩn bị môi trường hạt hữu cơ với các thành phần như sau: nhộng tằm 20%, khoai tây 7%, nước dừa và cùi dừa 10%, bột đậu nành 2%, đường glucoza 3%, sinh khối tảo xoắn (*S. platensis* BM) 1,0-1,5% và 0,6% dịch chiết chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.), môi trường nuôi có độ pH 6,5 - 7,0; gạo lứt được chia ra hộp nhỏ và bổ sung môi trường vừa pha ở tỷ lệ khoảng 47% gạo và 80 mL môi trường, các hộp được bọc kín và khử trùng ở 121°C trong 25 phút; bơm đều 3ml dung dịch huyền phù giống *C. militaris* NBRC 9787 cấp II lên bề mặt giá thể của mỗi hộp môi trường đã chuẩn bị, bọc kín miệng hộp bằng ni lông; đặt giá thể đã cấy giống nấm trong điều kiện tối hoàn toàn trong 5 đến 7 ngày, ở nhiệt độ 20°C - 25°C cho đến khi xuất hiện hệ sợi có màu trắng phủ kín bề mặt và ăn sâu bên trong giá thể;

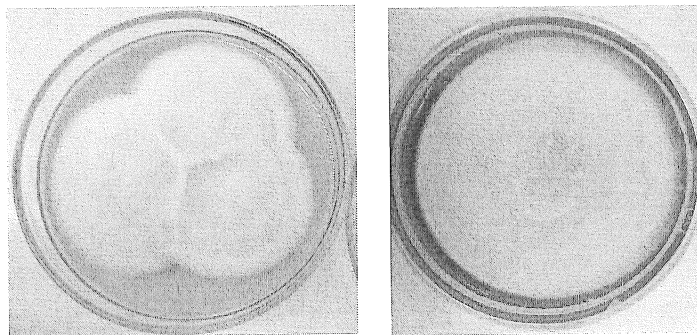
(iv) ươm mầm quả thể trong môi trường hạt hữu cơ: hộp giá thể môi trường hạt đã có hệ sợi *C. militaris* NBRC 9787 phủ kín được đặt vào phòng phun sương để tạo độ ẩm từ 70-80%, chiếu ánh sáng trắng bằng đèn led với cường độ chiếu sáng từ 1.000 đến 1.200 lux với chu kỳ chiếu sáng hàng ngày là 14 giờ sáng và 10 giờ tối, ở nhiệt độ 16-18°C, giai đoạn này kéo dài đến khi các quả thể xuất hiện đều trên bề mặt môi trường với chiều cao khoảng 0,5-1,2 cm;

(v) nuôi quả thể trong môi trường hạt hữu cơ: điều chỉnh điều kiện phòng nuôi có độ ẩm từ 80-90%, cường độ chiếu sáng từ 600 đến 700 lux với chu kỳ chiếu sáng hàng ngày là 10 giờ sáng: 14 giờ tối, ở nhiệt độ 18-20°C, giai đoạn nuôi quả thể trong môi trường hạt hữu cơ kết thúc khi các quả thể có chiều cao 7,0-8,0 cm, đầu quả thể bắt đầu tù, màu vàng cam sậm; và

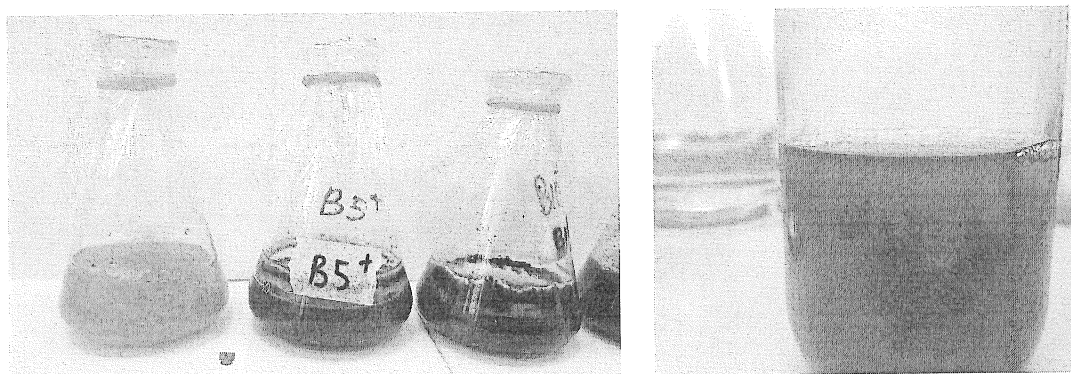
(vi) thu hoạch và bảo quản sinh khối đông trùng hạ thảo hữu cơ: quả thể *Cordyceps militaris* NBRC 9787 được thu hoạch sau khoảng 55-70 ngày sau khi cây giống với đặc điểm quả thể có thể thu hoạch có chiều cao đạt khoảng từ 7,0 cm đến 8,0 cm, đầu tù, màu vàng cam sậm.



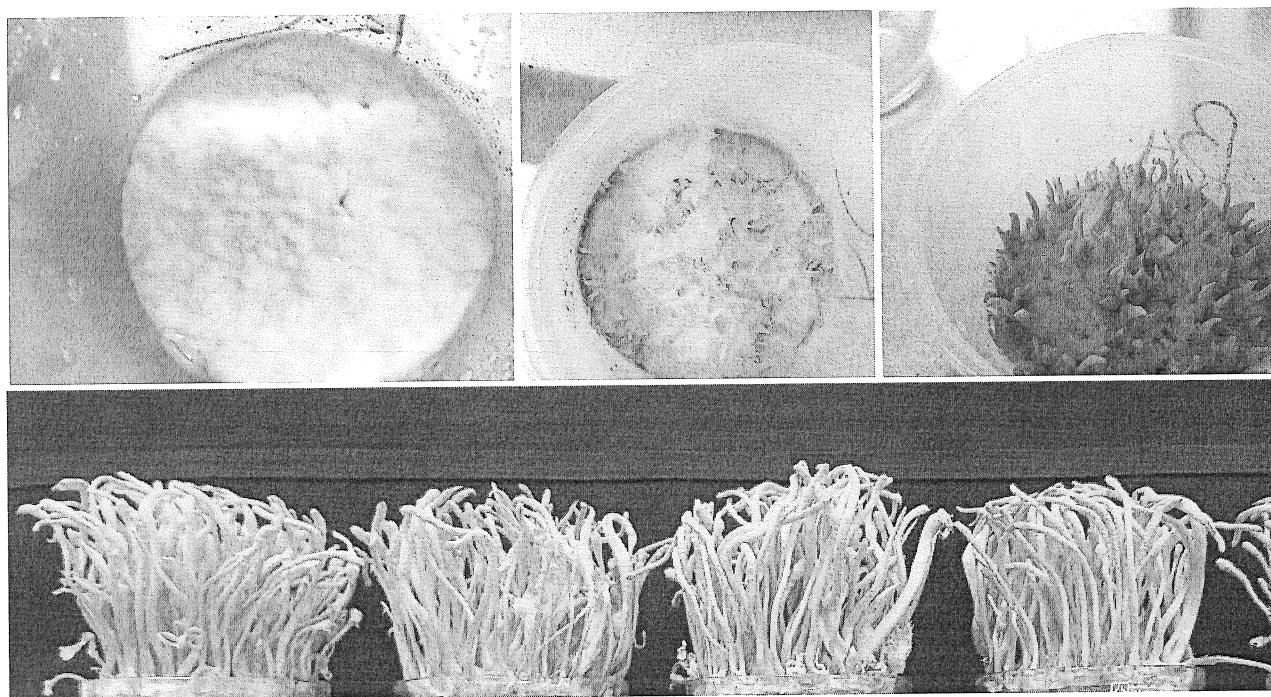
Hình 1. Sơ đồ quy trình nuôi trồng Đông trùng hạ thảo - *Cordyceps militaris* NBRC 9787- hữu cơ từ sinh khối vi khuẩn lam (*Spirulina platensis* BM.) và chuối tiêu hồng (*M. paradisiaca* L.).



Hình 2. Sinh trưởng của hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 trên môi trường thạch sau 15 ngày



Hình 3. Đặc điểm của hệ sợi nấm *C. militaris* NBRC 9787 trong môi trường lỏng sau 07 ngày



Hình 4. Nấm *C. militaris* NBRC 9787 phát triển ở các giai đoạn trên môi trường hạt