



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0038764

(51)^{2020.01} A01G 18/00; C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2021-05461

(22) 06/09/2021

(45) 26/02/2024 431

(43) 25/01/2022 406

(73) Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên (VN)

Tổ 10 Xã Quyết Thắng, Thành Phố Thái Nguyên, Tỉnh Thái Nguyên

(72) Nguyễn Mạnh Tuấn (VN); Đỗ Bích Duệ (VN).

(54) QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG NẤM THƯỢNG HOÀNG (TROPICOPORUS
LINTEUS NTH-PL4)

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 - 5,8S rRNA - ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, và quy trình này bao gồm các công đoạn: (i) chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến mà chứa dịch tách chiết cây dâu; và (ii) nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 trên các môi trường nêu trên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ nuôi trồng nấm dược liệu, cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chủng nấm Thượng Hoàng (*Tropicoporus linteus* NTH-PL4) được phân lập từ quả thể thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn và quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nấm Thượng Hoàng được mô tả và phân loại đầu tiên năm 1858 với danh pháp khoa học *Polyporus linteus* bởi Berk. & M.A. Curtis. Sau đó được phân loại lại với tên khoa học *Fomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1815, *Scindalma linteum* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1898, *Pyropolyporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1903, *Inonotus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1992, *Fulvifomes linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1915, *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) năm 1963. Từ năm 2015, các nhà khoa học thống nhất danh pháp nấm Thượng Hoàng với tên khoa học *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis). Như vậy, nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) = *Polyporus linteus* = *Fomes linteus* = *Scindalma linteum* = *Pyropolyporus linteus* = *Inonotus linteus* = *Phellinus linteus* (Dữ liệu MYCOBANK Database, <https://www.mycobank.org/>).

Tropicoporus linteus (Berkeley & M.A. Curtis) là một trong những loại nấm dược liệu tiêu biểu nhất của nhóm nấm Đấm (*Basidiomycetes*), bắt đầu được các nhà khoa học trên thế giới quan tâm từ năm 1968, khi Tetsuro Ikekawa và cộng sự công bố kết quả nghiên cứu về hoạt chất tách chiết từ các loại nấm dược liệu cho thấy rằng hoạt chất sinh học từ nấm Thượng Hoàng có khả năng ức chế 96,7% tế bào ung thư Sarcama-180, cao nhất so với các loại nấm dược liệu khác như nấm Linh chi *Ganoderma applanatum* (64,9%), nấm Vân chi *Coriolus versicolor* (65,0-77,5%),... (Xem tài liệu: Tetsuro Ikekawa, Miyako Nakanishi, Nobuaki Uehara, Goro Chihara, Fumiko Fukuoka. 1968. “Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*”. GANN Japanese Journal of Cancer Research, 59, pp 155-157). Cho đến nay, rất nhiều bằng chứng khoa học công bố cho thấy nấm Thượng Hoàng có chứa rất nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng, đặc biệt là khả năng phòng chống các bệnh ung thư như ung thư gan, ung thư phổi, biểu mô tuyến vú, tế bào ung thư ruột kết,... (Xem tài liệu: T Zhu, J Guo, L Collins, J Kelly, Z J Xiao, S-H Kim, C-Y Chen. 2007. “*Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells”. British Journal of

Cancer, 96, pp 583–590; Tianqi Yu, Suthakar Ganapathy, Ling Shen, Bo Peng, Sung-Hoon Kim, Alexandros Makriyannis, Changyan Chen. 2018. “A lethal synergy induced by *phellinus linteus* and camptothecin11 in colon cancer cells”. *Oncotarget*, 9, pp 6308-6319; Wenhua Chen, Huiying Tan, Qian Liu, Xiaohua Zheng, Hua Zhang, Yuhong Liu. 2019. “A Review: The bioactivities and pharmacological applications of *Phellinus linteus*”. *Molecules*, 24, 1888; Ayesha Sarfraz, Azhar Rasul, Iqra Sarfraz, Muhammad Ajmal Shah, Ghulam Hussain, Nusrat Shafiq, Muqaddas Masood, Sevki Adem, Satyajit D. Sarker, Xiaomeng Li. 2020. “Hispolon: A natural polyphenol and emerging cancer killer by multiple cellular signaling pathways”. *Environmental Research*, 190, 110017).

Trong tự nhiên, nấm Thượng Hoàng phân bố ở một số quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới, cần từ 3 đến 4 năm sinh trưởng có thể thu hái quả thể nấm, nhưng chất lượng nấm hoàn toàn phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Điều này dẫn tới, không chủ động được nguồn cung cấp và đảm bảo chất lượng nấm Thượng Hoàng. Chính vì vậy, nấm Thượng Hoàng được lưu giữ và nhân giống trong điều kiện nhân tạo, cụ thể như giống nấm đã lưu giữ (F₀) được cấy chuyển đến môi trường PDA (khoai tây: 200g; glucoza: 20g; aga: 20g; KH₂PO₄: 1g; vitamin B₁: 110mg; nước cất 1 lít), tiếp đến giống nấm được cấy chuyển đến cơ chất bao gồm lúa mỳ 98%, bột CaCO₃ 1% và vôi 1%, thu được giống sản xuất (xem tài liệu CN101485262B công bố ngày 15.6.2011). Theo một cách khác, giống nấm Thượng Hoàng (F₀) được hoạt hóa sử dụng môi trường PDA (glucoza: 0,1-5%; cao nấm men: 0,1-2%; pepton 0,1-2%; MgSO₄: 0,01-0,05%; KH₂PO₄: 0,1-0,05%; Ca₃(PO₄)₂: 0,001-0,01% và một số vi lượng: FeCl₃.6H₂O, MnCl₂.4H₂O, CuSO₄.5H₂O và ZnCl₂) nuôi ở 25-35°C, 7 ngày; sau đó được cấy chuyển đến cơ chất bao gồm mùn cưa cây sồi 80% và cám gạo 20%, thu được giống sản xuất (xem tài liệu KR20000037407A công bố ngày 22.11.2002).

Ở nước ta, thành tựu về nghiên cứu công nghệ nuôi trồng nấm Thượng Hoàng còn rất hạn chế, mới chỉ đề cập tới điều kiện nuôi cấy thích hợp mà không đưa ra giải pháp nhằm ngăn chặn sự thoái hóa giống, cũng như phương pháp nhân giống nấm Thượng Hoàng (xem tài liệu: Phạm Quang Thu. 2016. “Đặc điểm sinh học của nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*) trong nuôi cấy thuần khiết”. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 1, pp 4231-4237; Trần Thị Lựa, Vũ Văn Hạnh. 2017. “Nghiên cứu điều kiện nhân sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus baumi*)”. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 8, pp 106-108; Trần Thị Hiền, Trần Văn Tuấn, Nguyễn Thị Lý, Trần Thị Hoa, Nguyễn Thị Minh Huyền. 2020. “Ảnh hưởng của một số điều kiện môi trường đến sự

phát triển sinh khối nấm Thượng Hoàng (*Phellinus linteus*)”. Khoa học Công nghệ-Tạp chí Công Thương, 42, pp 20-23).

Trong quá trình bảo quản và nuôi cấy các chủng giống nấm trong phòng thí nghiệm (điều kiện nhân tạo), do sự thiết hụt của các thành phần dinh dưỡng, nhân tố cảm ứng,... từ vật chủ trong tự nhiên, dẫn đến một số gen chức năng của giống nấm hoạt động yếu hoặc không hoạt động. Kết quả là hoặc khả năng sinh trưởng hoặc hoạt tính sinh học hoặc cả hai đặc tính của giống nấm sẽ giảm hay còn gọi là thoái hóa giống (xem tài liệu: Qing Liu, Fen Wang, Kuanbo Liu, Caihong Dong. 2018. “Influence of strain preservation methods on fruiting body growth and metabolite production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes)”. Int J Med Mushrooms, 20(10), pp 1003-1011; Haiwei Lou, Junfang Lin, Liqiong Guo, Xinwei Wang, Shuangqi Tian, Chenxi Liu, Yu Zhao, Renyong Zhao. 2019. “Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration”, Appl Microbiol Biotechnol, 103(19), pp 7835-7841).

Để ngăn chặn sự thoái hóa giống nấm, 10% pepton được bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy (xem thêm tài liệu: Anhui Chen, Yulong Wang, Ying Shao, Bo Huang. 2017. “A novel technique for rejuvenation of degenerated caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), a valued traditional Chinese medicine”, Int J Med Mushrooms, 19(1), pp 87-91). Hoặc bổ sung dịch chiết tách từ cám gạo, nấm sò sử dụng nước vào môi trường nuôi cấy trước khi khử trùng ở 121°C, 60 phút (xem thêm tài liệu: Bích Thuy Thi Nguyen, Nghien Xuan Ngo, Ve Van Le, Luyen Thi Nguyen, Ry Kan, Huy Duc Nguyen. 2019. “Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* strain GA3”, Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering, 61 (1), pp 62-67). Tuy nhiên, giải pháp nhằm ngăn chặn sự thoái hóa giống bằng cách bổ sung các thành phần dinh dưỡng (pepton, dịch chiết cám gạo và nấm sò) vào môi trường nuôi cấy giống nấm như trên có thể là không phù hợp vì không đến từ vật chủ trong tự nhiên, thêm nữa một số thành phần dinh dưỡng (ví dụ như vitamin) có thể bị phá hủy ở nhiệt độ khử trùng ở 121°C.

Tỷ lệ ung thư và mắc mới hàng năm ở nước ta có xu hướng tăng nhanh trong những năm trở lại đây. Theo ước tính của Bộ Y tế, có 182.563 ca mắc mới và 122.690 ca tử vong do ung thư trong năm 2020, trong đó ung thư gan, phổi, vú, dạ dày và đại trực tràng là các loại thường gặp. Do đó, nhu cầu sử dụng nấm Thượng Hoàng trong phòng chống bệnh ung thư của người dân ngày càng tăng mạnh. Tuy nhiên, phần lớn các sản phẩm

nấm Thượng Hoàng trên thị trường trong nước hiện nay đều từ nguồn ngoại nhập với giá thành cao, khó kiểm soát về chất lượng, trong khi đó, nguồn giống để nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng lại chưa chủ động.

Với những lý do trên, có nhu cầu về nguồn giống nấm Thượng Hoàng để phục vụ việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng ở quy mô công nghiệp, nhằm cung cấp sản phẩm có chất lượng đáp ứng nhu cầu trong và ngoài nước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng đáp ứng nhu cầu nêu trên.

Để đạt được mục đích này, sáng chế đề xuất quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng, trong đó:

giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, và

quy trình này bao gồm các công đoạn:

(i) chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến, trong đó:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,

dịch tách chiết cây dâu: 10-15 ml,
 aga: 20g,
 ampicillin: 40-70mg (tùy ý),
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 20g,
 chất chiết mạch nha: 20g,
 pepton: 1g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10-15 ml,
 ampicillin: 40-70mg (tùy ý),
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza: 10g,
 chất chiết thô men: 3g,
 chất chiết mạch nha: 3g,
 pepton: 5g,
 aga: 20g,
 dịch tách chiết cây dâu: 10-15 ml,
 ampicillin: 40-70mg (tùy ý),
 nước cất vừa đủ: 1 lít,
 pH: 6-6,5;

trong đó, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C, tốt hơn là khoảng 60°C; và

(ii) nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm F₀) bảo quản lạnh sâu - 86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F₁,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C trong 7-10 ngày

cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F_2 ,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở 25-30°C, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F_3 , mà có thể dùng cho việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTN-PL4.

Theo một phương án thực hiện, trong đó các môi trường PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:	0,5g,
KH_2PO_4 :	0,46g,
K_2HPO_4 :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5.

Theo một phương án thực hiện, trong đó ở công đoạn (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

Theo một phương án thực hiện, trong đó dịch tách chiết cây dâu thu được bằng cách: tách chiết thành phần dinh dưỡng của phoi cây dâu qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 60-80% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 lít trên mỗi kg phoi cây dâu, lắc đều, tốt hơn là ở 100-120 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng;

tiến hành tách chiết thêm ít nhất một lần nữa, nhưng mỗi lần trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,3 lít trên mỗi kg phoi cây dâu;

lọc dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện, trộn lẫn lại với nhau và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 50°C bằng máy cô quay chân không; và

hòa cạn thu được trong hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ thể tích/thể tích nằm trong khoảng (5-7):(3-5), trong đó tỷ lệ hỗn dịch được sử dụng nằm trong khoảng từ

2 đến 3 ml trên mỗi g cặn, sau đó tốt hơn là lọc bỏ cặn bản qua màng lọc, thu được dịch tách chiết cây dâu.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 thu được bởi quy trình theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng theo sáng chế có các đặc trưng sau:

Quy trình theo sáng chế sử dụng chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Vườn Quốc gia Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam có trình tự đoạn gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA với độ dài 755 nucleotide có mức độ tương đồng 99,87% với nấm Thượng Hoàng *Phellinus linteus* KCTC 6190 (AF077678). Chủng thuần khiết về mặt sinh học được lưu giữ trong điều kiện lạnh sâu (-86°C) tại Viện Khoa học Sự sống – Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Mã số truy nhập gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 trên ngân hàng GenBank là MW757264.

Quy trình nhân giống theo sáng chế có bổ sung dịch chiết tách từ vật chủ (cây dâu) trong quá trình nhân giống nhằm ngăn chặn sự thoái hóa giống nấm Thượng Hoàng trong điều kiện nhân tạo.

Quy trình theo sáng chế đã đề xuất phương pháp chiết tách các thành phần dinh dưỡng từ cây dâu, tiến hành nhân giống nấm và kiểm soát điều kiện nhân giống gồm nhiệt độ, độ ẩm không khí được tối ưu.

Quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng theo sáng chế có thể áp dụng được ở quy mô công nghiệp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện quy trình phân lập và định danh nấm Thượng Hoàng.

Hình 2 thể hiện sơ đồ phả hệ phát sinh của chủng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 với các chủng nấm Thượng Hoàng đã công bố, chủng *Inonotus lonicericola* TAA105317 (JN642572) được sử dụng ngoài nhóm nấm Thượng Hoàng.

Hình 3 thể hiện quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4.

Hình 4 thể hiện sơ đồ quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 sử dụng giống nấm Thượng Hoàng thu được bởi quy trình theo sáng chế.

Hình 5 thể hiện việc rạch và loại bỏ hệ sợi bạch nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 trong quá trình nuôi trồng.

Hình 6 thể hiện việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 sau 4 tháng từ khi quả thể nấm bắt đầu hình thành.

Hình 7 thể hiện hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng, trong đó 1: hispidin chuẩn và 2: hoạt chất hispidin tách chiết từ quả thể nấm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các khía cạnh theo sáng chế và các phương án thực hiện ưu tiên của chúng sẽ được mô tả một cách chi tiết hơn. Tuy nhiên, lưu ý rằng phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các phương án cụ thể được mô tả dưới đây dưới dạng ví dụ minh họa cho sáng chế và cần hiểu rằng phạm vi của sáng chế sẽ bao gồm tất cả các cải biến, các thay đổi tương đương khác của chúng như được xác định bởi phần yêu cầu bảo hộ.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4” còn được đề cập tắt là “nấm Thượng Hoàng NTH-PL4” hoặc đơn giản là “nấm Thượng Hoàng”. Giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được sử dụng trong sáng chế là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, khuẩn ty của chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 trên môi trường PDA ở 25-30°C, 7-10 ngày có màu vàng.

Quá trình phân lập và định danh chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 được minh họa trên Hình 1.

Môi trường dinh dưỡng PDA (Potato Dextrose Agar) được chuẩn bị cho quá trình này gồm các thành phần (g/l): dextroza 20; chất chiết khoai tây 4; aga 15-20. Môi trường này được khử trùng ước ở 121°C trong 15 phút, sau đó được bổ sung kháng sinh ampicillin với lượng để có nồng độ cuối là 50 mg/L vào môi trường PDA có nhiệt độ 60°C trước khi phân phối môi trường vào đĩa petri.

Quả thể nấm Thượng Hoàng thu thập trong tự nhiên được lau sạch bề mặt trên và dưới bằng etanol 70%. Tiếp đến loại bỏ viền xung quanh (có thể chứa nhiều tạp nhiễm vi sinh vật từ môi trường sống trong tự nhiên) có độ dày 2 mm, cắt nhỏ phần bên trong quả thể nấm thành các mẫu có kích thước 0,5 × 0,5 cm (chiều dài × chiều rộng) rồi đặt lên bề mặt môi trường PDA thạch đĩa đã chuẩn bị có bổ sung kháng sinh ampicillin. Sau đó, các đĩa thạch đã cấy mẫu được nuôi ở 25°C trong 10 đến 14 ngày. Khuẩn ty tinh khiết của

chủng NTH-PL4 có màu vàng chanh trên môi trường PDA ở 25°C, 10 ngày (Hình 1) và được bảo quản trong glyxerol có nồng độ cuối cùng 10% ở -86°C (giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc hay còn gọi là giống nấm F₀) tại Viện Khoa học Sự sống – Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

Quá trình định danh phân tử chủng nấm NTH-PL4 được thực hiện như sau: Khuẩn ty tinh khiết của chủng NTH-PL4 được nuôi cấy trong môi trường lỏng đường khoai tây (Potato Dextrose) ở 25°C, 160 vòng/phút trong 48 giờ. Ly tâm ở 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút, tiếp đến rửa sinh khối ba lần với dung dịch đệm TE 1X (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid). Khoảng 30 mg hệ sợi sau khi được đồng nhất trong nitor lỏng được hòa vào trong 0,5 ml dung dịch đệm TE trong ống eppendorf, trộn đều bằng micro-pipet, tiếp đến bổ sung thêm 15 µL lysozym có nồng độ 10 mg/mL, ủ ở 37°C trong 45 phút. Sau đó, 20 µL natri dodecyl sulfat 10%, 10 µL proteinaza K nồng độ 20 mg/mL được bổ sung vào ống eppendorf chứa mẫu, ủ trong 30-45 phút ở 37°C. Tiếp theo 100 µL NaCl 5M và 80 µL hỗn dịch hexadexyltrimetylamonium bromua 10%/NaCl 5M (1:1, thể tích/thể tích) được bổ sung vào mẫu, trộn đều, ủ 65°C trong 10 phút. Sau 10 phút, bổ sung thêm hỗn dịch phenol/chloroform/rượu iso-amyl (25/24/1, thể tích/thể tích), lắc nhẹ bằng tay từ 3 đến 5 phút, ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút; hút phần dịch nổi chứa đựng DNA tổng số sang ống eppendorf mới, rồi bổ sung hai lần thể tích etanol lạnh có nồng độ từ 95% đến khan tuyệt đối, ly tâm 13.000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút. Thu cặn DNA tổng số và rửa từ 2 đến 3 lần bằng etanol 70%, làm khô, hòa trong dung dịch đệm TE, giữ ở -20°C.

Đoạn gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 được khuếch đại bằng phản ứng PCR (Polymerase chain reaction) sử dụng cặp mồi ITS1 xuôi (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') và mồi ITS4 ngược (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White và cộng sự, 1990) với các thành phần của phản ứng PCR được liệt kê ở Bảng 1 dưới đây. Chu trình của phản ứng PCR được tiến hành như sau: (i) Biến tính DNA tổng số ở 96°C trong 5 phút; (ii) 30 chu trình sau được cài đặt: biến tính DNA mẫu ở 95°C trong 1 phút, gắn mồi ở 55°C trong 1 phút và kéo dài trình tự DNA đích ở 72°C trong 1 phút; và (iii) chu trình kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 1. Thành phần của phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích sử dụng (μl)
Đệm PCR 1X chứa 2 mM MgCl ₂	2,5
dNTPs 2mM mỗi loại	2,5
Môi ITS1 xuôi (10μM)	1
Môi ITS4 ngược (10μM)	1
Taq polymerase (5U/μl)	1
DNA mẫu (10 ng)	2
Nước khử ion	15
<i>Tổng thể tích</i>	25

Sự tương đồng về trình tự gen 18S rRNA, Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) – 5,8S rRNA – ITS 2 và 28S rRNA của chủng NTH-PL4 với các chủng nấm đã công bố được so sánh dựa trên phần mềm NCBI Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Bảng 2) và được đăng ký trên ngân hàng GenBank với mã số truy nhập là MW757264. Sơ đồ phả hệ của chủng NTH-PL4 sử dụng trong sáng chế này được xây dựng dựa trên phần mềm chuyên biệt, ví dụ như MEGA 7 (Hình 2).

Bảng 2. So sánh sự tương đồng về trình tự gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA của chủng NTH-PL4 (MW757264) với các chủng nấm công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank

Chủng nấm gần nhất	Mức độ tương đồng (%)
<i>Phellinus linteus</i> KCTC 6190 (AF077678)	99,87
<i>Phellinus linteus</i> Namsan No.1 (AF080457)	99,73
<i>Inonotus linteus</i> FS656161 (HM584806)	99,60
<i>Inonotus linteus</i> PL0801 (FJ940906)	99,60
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25003 (AF082102)	99,60
<i>Sanghuangporus sanghuang</i> S3 (MN153568)	99,60
<i>Inonotus linteus</i> KFPA 016 (AY436626)	99,60
<i>Tropicoporus linteus</i> HN5530 (MW714847)	99,59
<i>Tropicoporus linteus</i> HN5222 (MT904657)	99,59
<i>Inonotus linteus</i> FS656160 (GU903004)	99,47
<i>Inonotus linteus</i> KAB-PL-01 (DQ462333)	99,47
<i>Phellinus linteus</i> DGUM 25004 (AF080458)	99,47

Tiếp theo, quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 theo sáng chế sẽ được mô tả.

Theo một phương án thực hiện, quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 theo sáng chế bao gồm các công đoạn:

(i) Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến, trong đó:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	4-8, tốt nhất là 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM (Mushroom Complete Medium - môi trường nấm hoàn chỉnh) cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	4-8, tốt nhất là 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA (Malt Extract Agar - môi trường mạch nha) cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,

aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	4-8, tốt nhất là 6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA (Yeast Malt Agar - môi trường mạch nha-nấm men)

cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	4-8, tốt nhất là 6-6,5;

trong đó, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C, tốt hơn là khoảng 60°C.

Theo một phương án thực của công đoạn (i), trong đó các môi trường dinh dưỡng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,

MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5.

Theo sáng chế, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng từ 55 đến 65°C, tốt hơn là khoảng 60°C, không nên bổ sung khi nhiệt độ của môi trường trên 60°C vì một số hoạt chất dễ biến tính bởi nhiệt độ (ví dụ như vitamin) sẽ bị phá hủy.

Giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F₀) sử dụng trong quy trình theo sáng chế được bảo ở điều kiện -86°C (để duy trì trạng thái tiềm sinh hay còn gọi là

ngừng sinh trưởng hoặc sinh trưởng rất chậm). Tuy nhiên, theo thời gian bảo quản, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc thường xảy ra hiện tượng bị thoái hóa giống, với biểu hiện như sinh trưởng chậm hoặc hoạt chất sinh học giảm so với thời điểm ban đầu. Để đảm bảo về chất lượng giống nấm, thành phần dinh dưỡng của vật chủ mà ở đó nấm Thượng Hoàng được phát hiện trong tự nhiên nên được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Trong tự nhiên, vật chủ của nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được sử dụng trong sáng chế là cây dâu (*Morus alba*), theo đó dịch tách chiết cây dâu sẽ được bổ sung vào các môi trường nuôi cấy nêu trên như một thành phần dinh dưỡng.

Để minh họa cho tác động của dịch tách chiết cây dâu đến sinh trưởng và hoạt chất sinh học của hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F₀) bảo quản ở -86°C trong 24 tháng được cấy chuyển đến môi trường, ví dụ, PDA và PDA cải tiến, nuôi lắ ở 25°C, 7 ngày; thu nhận sinh khối hệ sợi nấm Thượng Hoàng và sấy khô ở nhiệt độ 65-70°C trong 36 giờ; xác định khối lượng hệ sợi và hoạt chất sinh học có trong hệ sợi khô (hệ sợi khô có độ ẩm 7%). Các kết quả tương ứng được thể hiện ở Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Tác động của dịch tách chiết cây dâu đến sinh trưởng và hoạt chất sinh học của hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 bảo quản ở -86°C trong 24 tháng

Chỉ tiêu đánh giá	Môi trường	
	PDA	PDA cải tiến
Sinh khối hệ sợi (mg khô/100 ml môi trường)	0,71 [*]	0,88 [*]
β -glucan (%)	0,63 ^{**}	0,71 ^{**}
Hispidin (%)	0,05 ^{***}	0,08 ^{***}

* $P=0,039$; ** $P=0,037$; *** $P=0,015$.

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó dịch tách chiết cây dâu thu được bằng quy trình tách chiết như sau:

Thân và cành cây dâu tươi, tốt hơn là 3-5 năm tuổi, được cắt thành các phoi mỏng có độ dày 1-3 mm, dài từ 2-5 cm, làm khô ở nhiệt độ phòng 2-3 ngày đến độ ẩm khoảng 40-50% (không làm khô dưới ánh nắng trực xạ, điều này có thể dẫn tới một số chất bị ôxy hóa dưới tác động của tia UV).

Tiếp đến, thành phần dinh dưỡng của phoi cây dâu được tách chiết qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 60-80% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 lít trên mỗi kg phoi cây dâu, lắc đều, tốt hơn là ở 100-120 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng.

Quá trình tách chiết được thực hiện thêm ít nhất một lần nữa, nhưng mỗi lần trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,3 lít trên mỗi kg phoi cây dâu.

Dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện được lọc qua giấy lọc, ví dụ giấy lọc whatman có đường kính 90mm.

Trộn lẫn các dịch tách chiết thu được và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 50°C bằng máy cô quay chân không.

Hòa cạn thu được trong hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ thể tích/thể tích nằm trong khoảng (5-7):(3-5), trong đó tỷ lệ hỗn dịch được sử dụng nằm trong khoảng từ 2 đến 3 ml trên mỗi g cặn, sau đó tốt hơn là lọc bỏ cặn bản qua màng lọc, ví dụ có đường kính lỗ màng 0,22 μm , thu được dịch tách chiết cây dâu.

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó thành phần dinh dưỡng của phoi cây dâu được tách chiết qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 70% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước là 1,3 lít trên mỗi kg phoi cây dâu. Quá trình tách chiết được thực hiện một lần nữa, nhưng trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước là 1 lít trên mỗi kg phoi cây dâu. Dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện được lọc qua giấy lọc whatman có đường kính 90mm. Trộn lẫn hai dịch tách chiết thu được và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 40°C bằng máy cô quay chân không. Hòa cạn thu được trong 40 ml hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ 6:4 (thể tích/thể tích) và lọc bỏ cặn bản qua màng lọc có đường kính lỗ màng 0,22 μm , thu được dịch tách chiết cây dâu.

Do trong quá trình nuôi cấy, vi khuẩn từ môi trường ngoài không khí, từ dịch chiết tách cây dâu, từ thao tác trong quá trình thực hiện có thể lây nhiễm vào môi trường nuôi cấy, do đó để giải quyết vấn đề này, sáng chế đề xuất việc bổ sung ampicillin có nồng độ 40-70mg/lít môi trường.

(ii) Nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước, như được minh họa trên Hình 3:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm F_0) bảo quản lạnh sâu - 86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 15-40°C, tốt nhất là 25-30°C, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F_1 , giống nấm cấp 1 này có thể bảo quản được ở 4-6°C trong 3 tháng,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ cắt bằng dao thành các hình vuông có kích thước $1-1,5 \times 1-1,5$ cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở $25-30^{\circ}\text{C}$ trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F_2 ,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, ví dụ bằng dao thành các hình vuông có kích thước $1,5-2 \times 1,5-2$ cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh chẳng hạn, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở $25-30^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F_3 , mà có thể dùng cho việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTN-PL4.

Trên cơ chất thóc, giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 có màu vàng nhạt (Hình 3).

Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, trong đó cơ chất thóc, ví dụ thóc Khang dân, được sử dụng để nhân giống nấm cấp 3 được xử lý bằng cách:

ngâm thóc trong nước sạch 24-48 giờ ở nhiệt độ phòng, tốt hơn là sau đó loại bỏ thóc lép và rửa sạch nhiều lần, ví dụ 3 lần bằng nước,

luộc thóc sau khi ngâm cho tới khi hạt thóc nứt vỏ áo trấu, tiếp đến để thóc ráo nước và nguội tự nhiên, tốt hơn là để qua đêm, và

bổ sung vào thóc thành phần dinh dưỡng dextroza và bột CaCO_3 , trộn đều, tạo thành giá thể thóc cho nuôi giống nấm cấp 3 - giống nấm sản xuất.

Theo một phương án thực hiện, trong đó giá thể thóc còn được xử lý bằng cách:

cho giá thể thóc vào chai, ví dụ với lượng 300-350g thóc/chai,

khử trùng ở 121°C trong 2 giờ hoặc $95-100^{\circ}\text{C}$ trong 14-16 giờ, và

tốt hơn là, để nguội tự nhiên giá thể thóc qua đêm trước khi cấy giống nấm cấp 2.

Theo một phương án thực hiện, trong đó các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc	96-98,8%
Dextroza	1-3%
Bột CaCO_3	0,2-1%

Theo một phương án thực hiện, các thành phần của giá thể thóc bao gồm (tính theo % khối lượng):

Thóc đã luộc	98%
Dextroza	1,5%
Bột CaCO_3	0,5%.

Theo một phương án thực hiện, trong đó ở công đoạn (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

Theo một phương án thực hiện của quy trình nhân giống theo sáng chế, trong đó quy trình này còn bao gồm công đoạn phân lập chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, để thu được giống nấm gốc F_0 như nêu trên, trong đó công đoạn phân lập này được thực hiện theo quy trình phân lập đã mô tả ở trên.

Theo khía cạnh khác thứ hai, sáng chế đề xuất giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4, thu được bởi quy trình theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên.

Giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 (giống nấm cấp 3) thu được bởi quy trình theo sáng chế có thể được sử dụng trong nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4. Theo một phương án thực hiện để làm ví dụ, như được minh họa trên Hình 4, quy trình nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sử dụng giống nấm cấp 3 thu được bởi quy trình theo sáng chế được tiến hành như sau:

(a1) Cấy giống nấm và ươm hệ sợi nấm Thượng Hoàng NTH-PL4

Khoảng 0,5-1,5% khối lượng giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm cấp 3) so với khối lượng giá thể được cấy đều vào bề mặt của bịch giá thể bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa cây keo:	59-74%, tốt hơn là 65-70%, và tốt hơn là độ ẩm mùn cưa 55-65%
vôi tôi (Ca(OH)_2):	1-3%
cám gạo:	8-13%
bột ngô:	12-16%
bột đậu tương:	4-7%
bột CaCO_3 :	1-2%,

trong đó nguyên liệu mùn cưa cây keo nêu trên được chọn từ nhóm bao gồm mùn cưa cây keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd.), mùn cưa keo lá tràm (*Acacia*

auriculiformis A. Cunn. ex Benth) hoặc mùn cưa keo lai (keo tai tượng × keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Lượng giống nấm Thượng Hoàng để cấy vào nguyên liệu cho thích hợp; nếu lượng giống được cấy nhỏ hơn 0,5% (cấy ít giống nấm) sẽ làm tăng thời gian và tỷ lệ nhiễm bệnh của các bịch nguyên liệu sau khi cấy giống ở giai đoạn ươm sợi; nếu lượng giống nấm lớn hơn 1,5% (cấy nhiều giống nấm) có thể dẫn tới các hạt giống nấm bên trên (ở những vị trí không tiếp xúc trực tiếp với nguyên liệu) bị chết và là nguyên nhân cho các bệnh thứ phát hình thành, đặc biệt là nấm mốc.

Nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng tốt ở nguyên liệu có độ ẩm từ 55-65%; nếu độ ẩm nguyên liệu thấp hơn 55% sẽ dẫn tới giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng chậm hoặc không sinh trưởng; ngược lại nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sẽ xuất hiện hiện tượng co hệ sợi (hay còn gọi là ngừng sinh trưởng) và tăng tỷ lệ nhiễm bệnh trong trường hợp độ ẩm nguyên liệu lớn hơn 65%.

Vôi tôi (Ca(OH)_2) và bột CaCO_3 là hai thành phần có vai trò tạo pH của nguyên liệu trong khoảng 6-7 (khoảng pH thích hợp cho nấm Thượng Hoàng NTH-PL4); nếu bổ sung hai thành phần này không thích hợp sẽ làm cho pH của nguyên liệu nhỏ 6 (nguyên liệu có tính axit) hoặc lớn 7 (nguyên liệu có tính kiềm), nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 sinh trưởng yếu đối với cả hai trường hợp nguyên liệu trên.

Dinh dưỡng bổ sung (cám gạo, bột ngô và bột đậu tương) có vai trò tăng dinh dưỡng cho mùn cưa khi nuôi trồng nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 trong điều kiện nhân tạo. Hàm lượng dinh dưỡng bổ sung ít sẽ ảnh hưởng đến năng suất nấm Thượng Hoàng nuôi trồng; ngược lại khi hàm lượng dinh dưỡng bổ sung quá nhiều sẽ làm tăng tỷ lệ nhiễm bệnh (chủ yếu mốc xanh và mốc đen) ở quá trình ươm hệ sợi sau khi cấy giống nấm.

Theo một phương án thực hiện, giá thể cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng bao gồm các thành phần (tính theo % khối lượng):

mùn cưa keo:	68%
vôi tôi (Ca(OH)_2):	1%
cám gạo:	10%
bột ngô:	15%
bột đậu tương:	5%
bột CaCO_3 :	1%.

Sau đó, bịch đã cấy giống được ươm hệ sợi ở 25-30°C (không nên ươm sợi ở nhiệt độ trên 30°C), độ ẩm không khí 60-70% trong phòng tối. Đến ngày thứ 45-55, khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam, thì chuyển bịch hệ sợi nấm tới nhà nuôi trồng quả thể nấm để xử lý hệ sợi và chăm sóc ở công đoạn tiếp theo.

Ở giai đoạn ươm hệ sợi tốt nhất duy trì ở khoảng nhiệt độ từ 25-30°C; hệ sợi nấm ngừng sinh trưởng (không sinh trưởng) hoặc sinh trưởng chậm ở nhiệt độ thấp hơn 25°C; trong trường hợp nhiệt độ ươm sợi nằm khoảng lớn hơn 30 và nhỏ hơn 40°C thì hệ sợi nấm vẫn sinh trưởng nhưng thường tạo ra một lớp nước phủ ở bề mặt (do hiện tượng bay hơi nước từ giá thể) trên của bịch nấm, lớp nước này hoặc (i) gây chết sợi nấm, gây ra các bệnh thứ phát; (ii) hoặc làm ướt nút bông ở cổ nút tạo điều kiện cho các bệnh thứ phát thâm nhập từ ngoài vào bên trong nguyên liệu; hoặc (iii) làm giảm độ ẩm của nguyên liệu (phần bên dưới) dẫn đến hệ sợi nấm sinh trưởng chậm hơn.

Đối với độ ẩm không khí, nên duy trì độ ẩm bằng hoặc lớn hơn độ ẩm của nguyên liệu để tránh hiện tượng mất nước của giá thể khi độ ẩm không khí thấp; tuy nhiên nếu độ ẩm không khí phòng ươm sợi lớn hơn 70% sẽ làm tăng mật độ vi sinh vật gây bệnh (chủ yếu là nấm mốc), kết quả là làm tăng tỷ lệ nhiễm bệnh cho các bịch nấm trong giai đoạn ươm sợi.

(a2) Xử lý bịch hệ sợi nấm và chăm sóc quả thể nấm

Đặt các bịch hệ sợi nấm lên giá, khoảng cách giữa các bịch nấm tốt hơn là từ 3 đến 5 cm (không đặt các bịch nấm chồng lên nhau). Để thúc đẩy quá trình hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng, tiến hành xử lý hệ sợi ở vị trí vai các bịch hệ sợi nấm để hình thành quả thể nấm bằng dao sắc, ví dụ dao rọc giấy deli 2057, lau dao bằng cồn ví dụ 70° trước và trong quá trình rạch. Cụ thể, rạch và loại bỏ lớp màng dai ở phần vai bịch nấm, tốt hơn là rạch theo hình chữ U, với độ sâu 0,2-0,4 cm, chiều dài 4-5 cm, chiều rộng khoảng 2,5-3 cm (lưu ý: không cắt bỏ lớp túi nylon); tiếp đến dùng dao rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch nêu trên, mỗi đường rạch có độ sâu 0,2-0,4 cm, rồi đặt miếng lớp nylon lại (Hình 5).

Màng dai được hình thành do các hệ sợi sơ cấp sinh trưởng từ giống nấm ban đầu bện chặt lại với nhau, để chồi quả thể nấm hình thành cần phải có sự kết hợp của ít nhất hai loại hệ sợi thứ cấp với nhau. Việc rạch và loại bỏ màng dai (hay còn gọi là sợi sơ cấp) sẽ tạo điều kiện hình thành sợi thứ cấp, từ đó hình thành chồi quả thể nấm.

Tốt hơn là, quá trình rạch các bịch hệ sợi nấm trong khu vực nuôi trồng nhân tạo diễn ra trong 1-2 ngày.

Sau khi rạch xong tất cả các bịch hệ sợi nấm, duy trì điều kiện nhà nuôi trồng quả thể nấm với độ ẩm không khí 97-100% ví dụ bằng máy phun sương mù, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ trong nhà nuôi trồng 0,03-0,05% nhằm thúc đẩy quá trình hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng. Tốt hơn là, đến ngày thứ 4-7 sau khi rạch bịch nấm, tiến hành mở miệng lớp túi nylon ở vết rạch nhằm tạo điều kiện cho nụ nấm sinh trưởng tốt hơn để hình thành nấm non. Quả thể nấm non (hay còn gọi chồi nấm) của nấm Thượng Hoàng bắt đầu xuất hiện từ 25 đến 35 ngày tiếp theo sau rạch bịch. Sau khi quả thể nấm Thượng Hoàng non hình thành, tiếp tục duy trì điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 97-100%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh có đặc điểm hình móng ngựa hoặc elíp, mặt trên có màu vàng, viền xung quanh màu trắng sữa và không có cuống nấm. Khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh sau 2,5-3 tháng kể từ lúc rạch và loại bỏ lớp màng dai, duy trì điều kiện nuôi trồng với độ ẩm không khí 90-93%, ánh sáng 300-400 lux, nhiệt độ 25-35°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi nấm đến độ tuổi thu hái.

Quả thể nấm non khi mới hình thành chứa đựng khoảng hơn 95% là nước và được bao bọc bởi một lớp màng mỏng (hay còn gọi da nấm), các phân tử nước từ không khí được vận chuyển thụ động qua lớp màng mỏng vào bên trong quả thể nấm non giúp đảm bảo các phản ứng sinh lý, sinh hóa của các tế bào bên trong diễn ra bình thường; nếu độ ẩm không khí xuống thấp sẽ làm cho các phân tử nước có trong quả thể nấm non bị mất nước thụ động qua lớp màng mỏng, điều này dẫn đến quả thể nấm bị teo và chết, do vậy cần duy trì độ ẩm không khí dao động từ 97-100% từ khi rạch và loại bỏ lớp dai đến 2,5-3 tháng tiếp theo. Sau khi quả thể nấm Thượng Hoàng hình thành hoàn chỉnh, lượng nước có trong quả thể nấm chiếm khoảng 85-90% do vậy nên giảm độ ẩm không khí dao động từ 90-93% để đảm bảo hiệu quả sản xuất, cũng như giảm vi sinh vật có thể gây hại cho quả thể nấm.

Theo một phương án thực hiện, trong đó quy trình nuôi trồng nhân tạo nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 có thể còn bao gồm công đoạn:

(a3) Thu hái quả thể nấm Thượng Hoàng

Khoảng 175-215 ngày (tương đương khoảng 6-7 tháng) sau khi rạch bịch, quả thể nấm Thượng Hoàng có hình móng ngựa hoặc hình elíp, có màu vàng sẫm đồng nhất (không còn viền ngoài màu trắng), tiến hành thu quả thể nấm.

Tốt hơn là, quả thể nấm sau thu hoạch được sấy khô đến độ ẩm 6-8% và được bảo quản trong túi nylon kín ở nơi khô ráo và tránh ánh sáng trực xạ.

Theo một phương án thực hiện, quả thể nấm sau thu hoạch được sấy theo chu trình nhiệt bao gồm:

Giai đoạn 1: 38-42°C trong 2-4 giờ.

Giai đoạn 2: 53-57°C trong 14-16 giờ.

Giai đoạn 3: 63-67°C trong 1,5-2,5 giờ.

Theo một phương án thực hiện, trong đó quy trình nuôi trồng nhân tạo nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 có thể còn bao gồm công đoạn:

(a) Chuẩn bị giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Công đoạn này được tiến hành trước khi tiến hành công đoạn (a1). Mùn cưa tốt hơn là được loại bỏ các sinh khối thực vật lớn có thể sẽ làm thủng/rách túi nylon trong quá trình phân phối nguyên liệu vào túi, rồi được bổ sung vôi tôi, nước sạch, trộn đều, ủ trong vòng 18-24 ngày, tốt hơn là cứ 6-8 ngày tiến hành đảo trộn khối ủ một lần. Kiểm tra và duy trì độ ẩm của khối ủ ở 55-65%. Nếu thời ủ thấp hơn 18 ngày, không đủ thời gian để vôi thấm đều vào mùn cưa, cũng như tiêu diệt một phần mầm bệnh vốn có trong mùn cưa nhờ nhiệt độ khối ủ cao (khoảng 60-65°C); nếu thời gian ủ kéo dài hơn 24 ngày thì mùn cưa có thể bị mục và giảm dinh dưỡng.

Sau 18-24 ngày ủ, bổ sung các thành phần dinh dưỡng gồm cám gạo, bột ngô, bột đậu tương, bột CaCO_3 vào khối ủ nêu trên. Trộn đều các thành phần dinh dưỡng bổ sung với mùn cưa đã ủ, thu được giá thể mùn cưa cây keo cho nuôi trồng quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Theo một phương án thực hiện, công đoạn (a) còn bao gồm bước tạo ra bịch giá thể bằng cách phân phối giá thể mùn cưa thu được vào túi nylon, ví dụ túi nylon chịu nhiệt có kích thước 22×35 cm (chiều rộng $\times$ chiều dài), theo đó mỗi bịch giá thể có trọng lượng 1,5-1,8 kg. Tạo cổ nút nhồi bông không thấm nước và đóng nắp lại trước khi khử trùng ở 95-100°C trong 14-16 giờ. Sau đó, tốt hơn là chờ đến khi nhiệt độ trong buồng khử trùng khoảng 70°C, chuyển bịch giá thể đến phòng cấy giống, để bịch giá thể nguội tự nhiên trong một ngày trước khi cấy giống nấm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, các phương án thực hiện của sáng chế sẽ tiếp tục được minh họa thông qua các ví dụ thực hiện cụ thể.

Ví dụ 1 - Nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4

(i) Chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến với thành phần như trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4. Thành phần môi trường dinh dưỡng cải tiến sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4

Thành phần (Tính theo 1 lít môi trường)	Môi trường dinh dưỡng cải tiến			
	PDA	MCM	MEA	YMA
Dextroza (g)	20	20	20	10
Chất chiết khoai tây (g)	4			
Chất chiết thô men (g)		2		3
Chất chiết mạch nha (g)			20	3
Pepton (g)		1	1	5
MgSO ₄ .7H ₂ O (g)		0,5		
KH ₂ PO ₄ (g)		0,46		
K ₂ HPO ₄ (g)		1		
Aga (g)	20	20	20	20
Dịch tách chiết cây dâu (ml)	10	10	10	10
Ampicillin (mg)	50	50	50	50
Nước cất vừa đủ (lít)	1	1	1	1
pH	6,5	6,5	6,5	6,5

(ii) Nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 gốc (giống nấm F₀) bảo quản lạnh sâu -86°C ở nhiệt độ phòng trong 4 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25°C, từ 7 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F₁,

cắt giống nấm cấp 1 bằng dao thành các hình vuông có kích thước 1,5 × 1,5 cm (chiều dài × chiều rộng), rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25°C trong 7 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F₂,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm bằng dao thành các hình vuông có kích thước 2×2 cm (chiều dài $\times$ chiều rộng), cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai thủy tinh, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở 25°C , độ ẩm 60%, trong phòng tối 36 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được các giống nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F_3 tương ứng với mỗi môi trường nuôi cấy được sử dụng.

Ví dụ 2

Sử dụng giống nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 (giống nấm cấp 3) thu được ở ví dụ 1 trong nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTH-PL4.

Thực hiện với mùn cưa của keo tai tượng (*Acacia mangium* Willd).

Mùn cưa keo tai tượng (Độ ẩm 60%) 340kg, vôi 5kg, phủ bạt và ủ trong vòng 21 ngày. Sau 21 ngày bổ sung thêm cám gạo 50kg, bột ngô 75kg, bột đậu tương 25kg và bột CaCO_3 5kg được trộn vào nguyên liệu đã ủ. Phân phối nguyên liệu vào các túi nylon chịu nhiệt có kích thước 22×35 cm (chiều rộng $\times$ chiều dài), mỗi bịch giá thể có trọng lượng 1,5-1,8 kg. Tạo cổ nút nhồi bông không thấm nước và đóng nắp cho các bịch giá thể trước khi khử trùng ở 95°C trong 15 giờ. Sau đó, tốt hơn là chờ đến khi nhiệt độ trong buồng khử trùng khoảng 70°C , chuyển các bịch nguyên liệu đến phòng cấy giống, để các bịch nguyên liệu nguội tự nhiên trong một ngày trước khi cấy giống nấm.

Khoảng 10g giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 được cấy đều vào bề mặt của các bịch giá thể. Sau đó, các bịch đã cấy giống được ươm hệ sợi ở 25°C (không nên ươm sợi ở nhiệt độ trên 30°C), độ ẩm 60% trong phòng tối. Ở giai đoạn này, có khoảng 4,5% số bịch bị nhiễm bệnh (thường nhiễm mốc đen, mốc xanh và mốc vàng hoa cau) xuất hiện chủ yếu từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 15 sau khi cấy giống.

Đến ngày thứ 47 sau khi cấy giống nấm, khi hệ sợi đã phủ kín đáy bịch và hệ sợi có màu vàng sẫm hoặc vàng cam, thì chuyển bịch hệ sợi nấm sang nhà nuôi trồng quả thể. Đặt bịch hệ sợi nấm trên giá theo chiều thẳng đứng (không xếp chồng bịch nấm lên nhau), cổ nút quay lên trên, khoảng cách giữa các bịch nấm từ 3 đến 5 cm.

Dùng dao sắc rạch ở phần vai các bịch sợi nấm theo vết rạch hình chữ u với độ sâu khoảng 0,2 cm, chiều dài khoảng 4 cm, chiều rộng khoảng 2,5 cm (lưu ý: không cắt bỏ lớp túi nylon); tiếp đến dùng dao rạch thêm hai đường hình chữ X bên trong vết rạch hình chữ U, mỗi đường rạch có độ sâu khoảng 0,2 cm, rồi đặt lại miếng lớp nylon (Hình 5).

Duy trì điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 300 lux, độ ẩm không khí 97%, nhiệt độ 28°C, lượng khí CO₂ luôn ở mức 0,03-0,05% nhằm thúc đẩy quá trình hình thành hạch quả thể nấm Thượng Hoàng. Ở giai đoạn này, khoảng 3,1% số bịch bị nhiễm mốc đen, mốc xanh ở vết rạch. Loại bỏ các bịch nấm bị nhiễm nấm mốc ra khỏi nhà nuôi trồng. Có khoảng 95,1% số bịch nấm hình thành hạch nấm từ 25 đến 35 ngày tiếp theo sau khi rạch bịch. Khi đó, quả thể nấm Thượng Hoàng có kích thước 0,3-1 cm, màu trắng sữa hoặc vàng nhạt bắt đầu hình thành. Tiếp tục duy trì điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 300 lux, độ ẩm không khí 97%, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ trong nhà nuôi trồng 0,03-0,05% đến 2,5-3 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình thành. Quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh có đặc điểm hình móng ngựa hoặc elíp, mặt trên có màu vàng nhạt, viền xung quanh màu trắng sữa và không có cuống nấm.

Sau khi quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh, điều chỉnh độ ẩm không khí 90%, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ 0,03-0,05% cho đến khi nấm Thượng Hoàng đến độ tuổi thu hái.

Quan sát quả thể nấm Thượng Hoàng có hình móng ngựa hoặc elíp, màu nâu sẫm đồng nhất tiến hành thu hái nấm (khoảng 6-7 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình thành). Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng, kích thước trung bình 20,8 gram, chiều dài 7,5 cm, chiều rộng 5,1 cm, độ dày 2,3 cm.

Quả thể nấm Thượng Hoàng được sấy khô và nghiền thành bột để kiểm tra chất lượng nấm nuôi trồng.

Tách chiết và xác định hàm lượng polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm: Bột quả thể nấm Thượng Hoàng khô có độ ẩm 7% (0,1kg) được cắt thành các mảnh nhỏ có độ dày 2 mm và cho vào chai trung tính Duran dung tích 2 lít chứa đựng 1 lít etanol 90%, vặn chặt nắp, đặt trong bể ổn nhiệt ở 60°C qua đêm. Lọc dịch chiết qua giấy lọc giấy lọc whatman đường kính 150 mm. Hoạt chất sinh học trong nấm Thượng Hoàng được tiến hành tách chiết thêm hai lần nữa trong 1 lít etanol 90%, 60°C, 3 giờ. Loại bỏ etanol và nước trong dịch chiết (khoảng 2 lít) bằng máy cô quay chân không ở 50°C. Hòa cạn hoạt chất sinh học tổng số trong 30 ml nước và lọc qua màng lọc 0,45 µm và đông khô ở -54°C, thu được hoạt chất sinh học tổng số. Bảo quản hoạt chất trong lọ tối màu ở 4-6°C. Hàm lượng hoạt chất hispidin có trong mẫu được xác định thông qua hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC) (I-Chen Li và cộng sự, 2020) và hàm lượng polysacarit được xác định bằng máy quang phổ UV-VIS. Hàm lượng polysacarit và hispidin có trong mẫu lần lượt là 1,21 và 0,07%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng

theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (a), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng.

Mật độ các loại vi sinh vật có trong quả thể nấm Thượng Hoàng cũng được kiểm tra, các chỉ tiêu phân tích bao gồm *Coliform* được tiến hành theo phương pháp TCVN 4882:2007, *Escherichia coli* (TCVN 6846: 2007), *Clostridium perfringens* (TCVN 4991:2005), tổng số bào tử nấm men, nấm mốc (TCVN 8275:2010) và tổng số vi khuẩn hiếu khí (TCVN 4884-1:2015). Kết quả phân tích thể hiện ở Bảng 5 dưới đây.

Ví dụ 3

Thực hiện như ví dụ 2, chỉ khác thay mùn cưa keo tai tượng bằng mùn cưa keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth.)

Hệ sợi nấm Thượng Hoàng sẽ phủ kín đáy các bịch nguyên liệu trong khoảng 50 ngày sau khi cấy giống nấm. Giai đoạn ươm sợi, có 5% số bịch nấm bị nhiễm nấm mốc. Khi đó hệ sợi nấm có màu vàng sẫm hoặc vàng cam. Khoảng 92,9% số bịch nấm hình thành quả thể nấm non sau khi rạch bịch ở điều kiện nuôi trồng với ánh sáng 350 lux, độ ẩm không khí 98%, nhiệt độ 30°C, lượng khí CO₂ dao động 0,03-0,05%. Quả thể nấm Thượng Hoàng non sinh trưởng trong khoảng từ 6-7 tháng tiếp theo. Khi quan sát thấy quả thể nấm Thượng Hoàng có màu nâu vàng đồng nhất (không còn viền trắng ở quả thể nấm) tiến hành thu hái. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng, kích thước trung bình 19,2 gram, chiều dài 7,1 cm, chiều rộng 4,8 cm, độ dày 2,2 cm.

Hàm lượng hoạt chất polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng lần lượt là 1,19 và 0,08%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (b), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng. Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật thể hiện ở Bảng 5 dưới đây.

Ví dụ 4

Thực hiện như ví dụ 2, chỉ khác thay mùn cưa keo tai tượng bằng mùn cưa keo lai (Keo tai tượng × Keo lá tràm - *Acacia hybrid*).

Khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm Thượng Hoàng trên cơ chất mùn cưa keo lai khá tương đồng với ví dụ 2 và 3. Hệ sợi nấm phủ kín đáy bịch nấm trong khoảng 48 ngày sau khi cấy giống với tỷ lệ nhiễm bệnh ở giai đoạn ươm hệ sợi là 6,5%. Sau khi rạch nấm, tỷ lệ các bịch nấm hình thành quả thể nấm non đạt 93,4%. Quả thể nấm ở độ tuổi thu hái có màu vàng sẫm, hình móng ngựa hoặc elíp. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có

trọng lượng, kích thước trung bình 19,7 gram, chiều dài 7,3 cm, chiều rộng 5,2 cm, độ dày 2,3 cm.

Hàm lượng hoạt chất polysacarit và hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng lần lượt là 1,18 và 0,08%. Hoạt chất hispidin có trong quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng theo ví dụ này được thể hiện trên Hình 7 (c), trong đó đường 1 là của chất chuẩn hispidin và đường 2 là của quả thể nấm Thượng Hoàng nuôi trồng. Kết quả phân tích các chỉ tiêu vi sinh vật thể hiện ở Bảng 5 dưới đây.

Bảng 5. Kết quả phân tích vi sinh vật có trong quả thể khô nấm Thượng Hoàng nuôi trồng nhân tạo

Nấm Thượng Hoàng	Mật độ vi sinh vật (CFU/g)				
	<i>Coliform</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Tổng số bào tử nấm men, nấm mốc	Tổng số vi khuẩn hiếu khí
Ví dụ 2	0	0	0	$6,5 \times 10^1$	$6,4 \times 10^2$
Ví dụ 3	0	0	0	$5,8 \times 10^1$	$3,9 \times 10^2$
Ví dụ 4	0	0	0	$5,7 \times 10^1$	$7,1 \times 10^2$

Bảng 5 cho thấy rằng quả thể nấm khô thu được sau sấy không phát hiện một số vi khuẩn *Coliform*, *Escherichia coli* và *Clostridium perfringens*.

Ví dụ so sánh 1

Thực hiện như ví dụ 2, khác là chỉ cắt lớp nylon phủ ngoài ở phần vai bịch nấm sau khi hệ sợi nấm đã phủ kín đáy các bịch nấm, vết cắt hình chữ U có kích thước chiều dài khoảng 5 cm, chiều rộng khoảng 3 cm và không tiến hành rạch đứt hệ sợi nấm. Sau khi cắt lớp túi nylon phủ ngoài duy điều kiện nuôi trồng với độ ẩm 97%, ánh sáng 300 lux, nhiệt độ 25°C, lượng khí CO₂ dao động từ 0,03-0,05%. Quả thể nấm non bắt hình thành chậm hơn, sau 55-65 ngày tiếp theo thay vì ngày thứ 25 sau khi rạch bịch như ví dụ 2. Tuy nhiên tỷ lệ số bịch hình thành quả thể nấm chỉ có 21,8%, thấp hơn nhiều 4,36 lần so với ví dụ 2. Quả thể nấm ở độ tuổi thu hái cần từ 7-8 tháng sau khi cắt lớp nylon. Như vậy, nếu không tiến hành rạch và bóc lớp màng dai cho các bịch nấm Thượng Hoàng sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ các bịch hình thành quả thể và thời gian nuôi trồng, cũng như tăng chi phí sản xuất nấm Thượng Hoàng. Quả thể nấm Thượng Hoàng trưởng thành có hình móng ngựa hoặc elíp, trọng lượng khô 13,5 gram, chiều dài 6,2 cm, chiều rộng 4,1 cm, độ dày 1,8 cm.

Ví dụ so sánh 2

Tiến hành như ví dụ 2, chỉ khác là độ ẩm không khí nhà nuôi trồng duy trì từ 85 đến 90% sau khi rạch, loại bỏ màng dai cho các bịch nấm có hệ sợi phủ kín đáy bịch. Tỷ lệ số bịch nấm hình thành quả thể nấm thấp là 22,7%. Thời gian để quả thể nấm non hình thành hoàn chỉnh kéo dài hơn (từ 3,5-4 tháng sau khi quả thể nấm bắt đầu hình thành). Tiếp tục duy trì độ ẩm không khí dao động từ 85-90% sau khi quả thể nấm hình thành hoàn chỉnh, quả thể nấm Thượng Hoàng cần từ 7-8 tháng sinh trưởng sau khi rạch bịch nấm đến độ tuổi thu hái, có hình móng ngựa hoặc elíp. Tuy nhiên, quả thể nấm nhỏ hơn và mỏng hơn so với ví dụ 2. Quả thể nấm Thượng Hoàng khô có trọng lượng 6,5 gram, chiều dài 4,2 cm, chiều rộng 3,4 cm, độ dày 1,8 cm.

Ví dụ so sánh 3

Giống với ví dụ 2, chỉ khác nhiệt độ nhà nuôi trồng quả thể nấm sau khi rạch các bịch nấm có hệ sợi phủ kín đáy, được điều chỉnh ở 15-20°C. Mặc dù hệ sợi thứ cấp hình thành và phủ kín vết rạch sau 4-5 ngày, nhưng không hình thành quả thể nấm non. Phần lớn vết rạch của các bịch nấm chuyển từ màu nâu vàng sang màu đen sau khoảng 30-35 ngày sau khi rạch bịch nấm, không hình thành quả thể nấm Thượng Hoàng trong suốt quá trình nuôi trồng.

Ví dụ so sánh 4

Giống với ví dụ 2, chỉ khác nhiệt độ nhà nuôi trồng được điều chỉnh từ 37-40°C. Số bịch nấm hình thành quả thể nấm non chiếm 50,3%, cao hơn so với ví dụ so sánh 1, 2 nhưng thấp hơn 1,89 lần so với ví dụ 2. Quả thể nấm trưởng thành ở độ tuổi thu hái có hình móng ngựa hoặc elíp sau 6-7 tháng khi rạch bịch. Quả thể nấm có trọng lượng khô 11,8 gram, chiều dài 5,7 cm, chiều rộng 4,3 cm, độ dày 1,8 cm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống nấm Thượng Hoàng, trong đó giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, trong đó:

giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 là chủng nấm Thượng Hoàng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 có mã số truy nhập gen 18S rRNA, ITS 1 – 5,8S rRNA – ITS 2, 28S rRNA trên GenBank là MW757264, chủng *Tropicoporus linteus* NTH-PL4 này được phân lập từ quả thể nấm thu thập tại Ba Bể, Bắc Kạn, Việt Nam, và

quy trình này bao gồm các công đoạn:

(i) chuẩn bị môi trường dinh dưỡng sử dụng cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 được chọn từ nhóm bao gồm PDA, MCM, MEA, YMA cải tiến, trong đó:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
aga:	20g,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,

pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10-15 ml,
ampicillin:	40-70mg (tùy ý),
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6-6,5;

trong đó, dịch tách chiết cây dâu được bổ sung vào các môi trường trên khi môi trường có nhiệt độ nằm trong khoảng 55-65°C, tốt hơn là khoảng 60°C; và

(ii) nhân giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4, bao gồm các bước:

giã đông giống nấm Thượng Hoàng NTH-PL4 (giống nấm F₀) bảo quản lạnh sâu - 86°C ở nhiệt độ phòng trong 4-6 giờ, rồi cấy sang môi trường thạch nghiêng PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C, từ 7-10 ngày, thu được giống nấm cấp 1 hay còn gọi F₁,

cắt giống nấm cấp 1 theo hình dạng và kích thước nhất định, rồi cấy chuyển sang môi trường MCM, MEA hoặc YMA cải tiến nêu trên, nuôi ở 25-30°C trong 7-10 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA này, thu được giống nấm cấp 2 hay còn gọi là F₂,

sau khi hệ sợi (giống nấm cấp 2) của chủng NTH-PL4 sinh trưởng phủ kín bề mặt môi trường thạch đĩa MCM, MEA hoặc YMA, cắt hệ sợi nấm theo hình dạng và kích thước nhất định, cấy chuyển sang môi trường thóc đựng trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh, và

nuôi các chai thóc chứa giống nấm ở 25-30°C, độ ẩm 60-70%, trong phòng tối từ 35 đến 40 ngày cho đến khi hệ sợi sinh trưởng phủ kín phần thóc ở đáy chai, thu được giống

nấm cấp 3 hay còn gọi là giống sản xuất hoặc F₃, mà có thể dùng cho việc nuôi trồng nhân tạo quả thể nấm Thượng Hoàng NTN-PL4.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó các môi trường PDA, MCM, MEA hoặc YMA cải tiến cho nuôi cấy nấm Thượng Hoàng NTN-PL4 có thành phần như sau:

- môi trường dinh dưỡng PDA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết khoai tây:	4g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MCM cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết thô men:	2g,
pepton:	1g,
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5g,
KH ₂ PO ₄ :	0,46g,
K ₂ HPO ₄ :	1g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
aga:	20g,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng MEA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	20g,
chất chiết mạch nha:	20g,
pepton:	1g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5;

- môi trường dinh dưỡng YMA cải tiến bao gồm các thành phần:

dextroza:	10g,
chất chiết thô men:	3g,
chất chiết mạch nha:	3g,
pepton:	5g,
aga:	20g,
dịch tách chiết cây dâu:	10ml,
ampicillin:	50mg,
nước cất vừa đủ:	1 lít,
pH:	6,5.

3. Quy trình theo điểm 1 hoặc 2, trong đó ở công đoạn (ii), môi trường được sử dụng để nhân giống nấm cấp 2 khác với môi trường được sử dụng để nhân giống cấp 1.

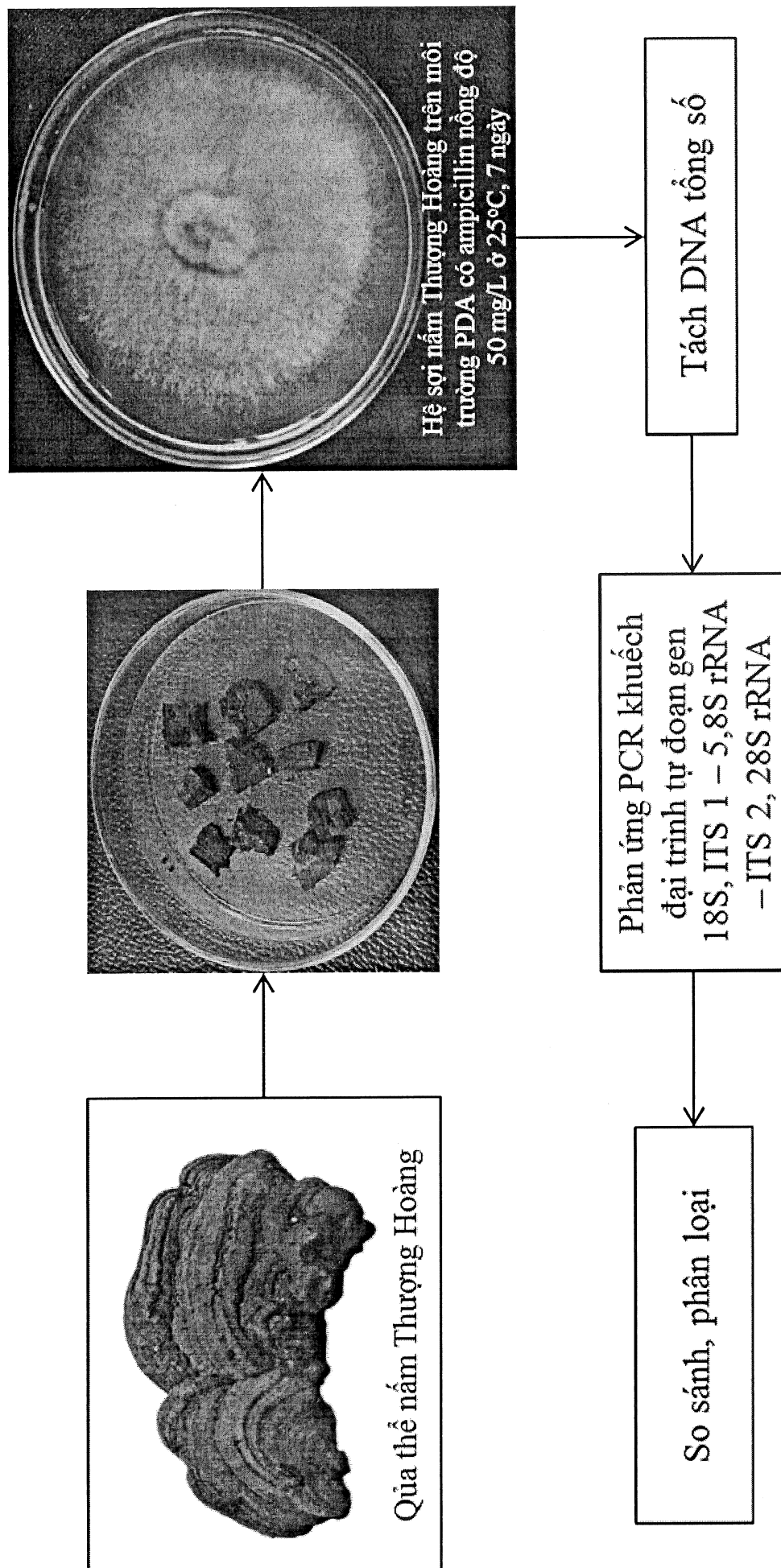
4. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó dịch tách chiết cây dâu thu được bằng cách:

tách chiết thành phần dinh dưỡng của phoi cây dâu qua đêm bằng dung dịch axetonitril trong nước có nồng độ 60-80% thể tích, tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,1 đến 1,5 lít trên mỗi kg phoi cây dâu, lắc đều, tốt hơn là ở 100-120 vòng/phút, ở nhiệt độ phòng;

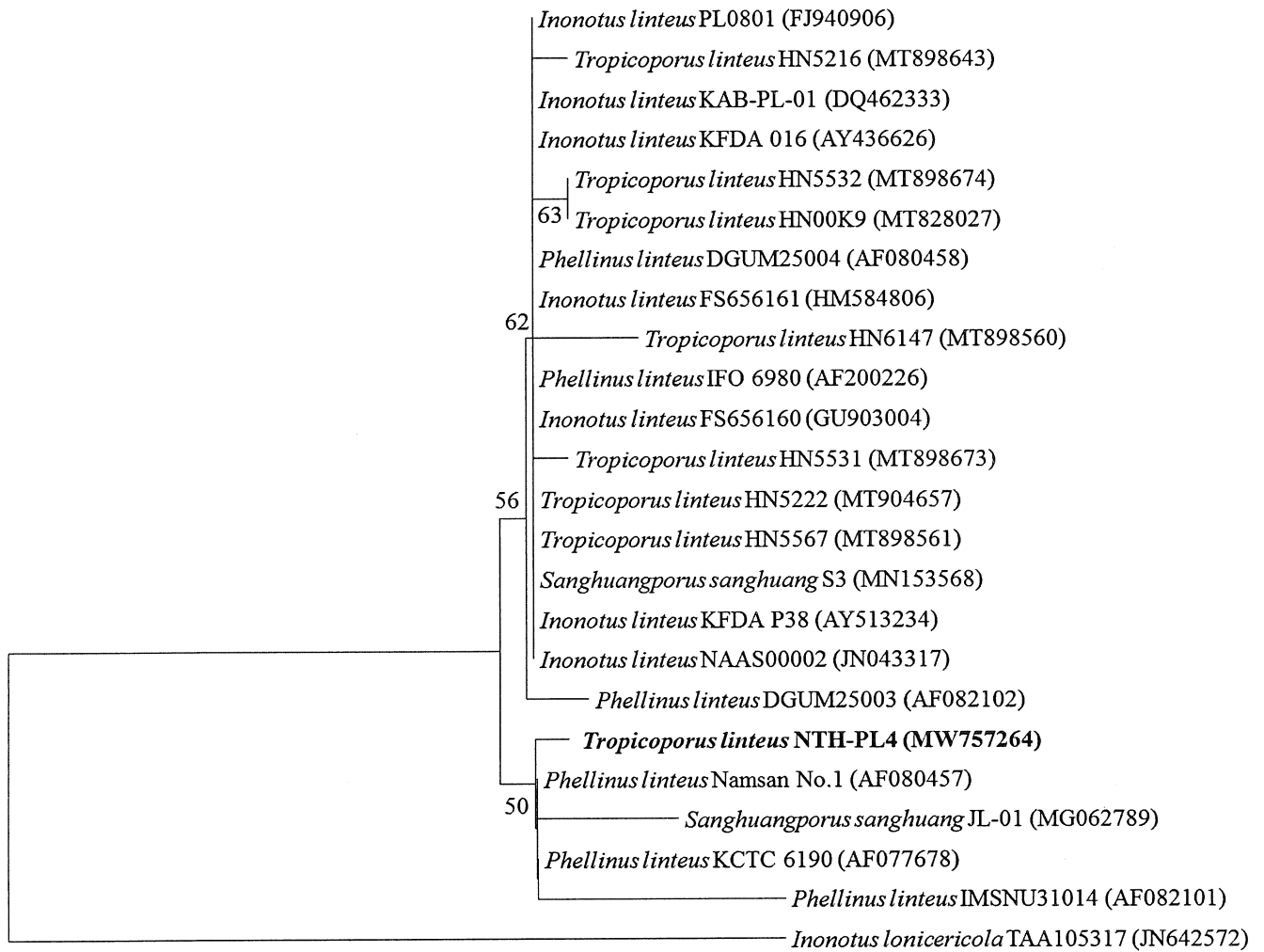
tiến hành tách chiết thêm ít nhất một lần nữa, nhưng mỗi lần trong thời gian lắc 1-1,5 giờ và tỷ lệ dung dịch axetonitril trong nước được sử dụng nằm trong khoảng từ 1,0 đến 1,3 lít trên mỗi kg phoi cây dâu;

lọc dịch tách chiết của mỗi lần thực hiện, trộn lẫn lại với nhau và tiến hành bay hơi ở nhiệt độ dưới 50°C bằng máy cô quay chân không;

hòa cạn thu được trong hỗn dịch nước:dimetyl sulfoxit theo tỷ lệ thể tích/thể tích nằm trong khoảng (5-7):(3-5), trong đó tỷ lệ hỗn dịch được sử dụng nằm trong khoảng từ 2 đến 3 ml trên mỗi g cạn, sau đó tốt hơn là lọc bỏ cạn rắn qua màng lọc, thu được dịch tách chiết cây dâu.

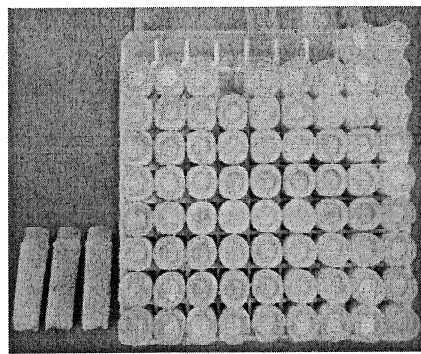


Hình 1

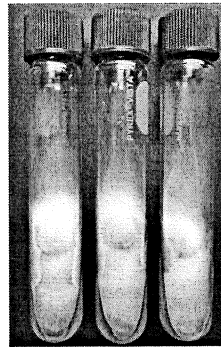


0.005

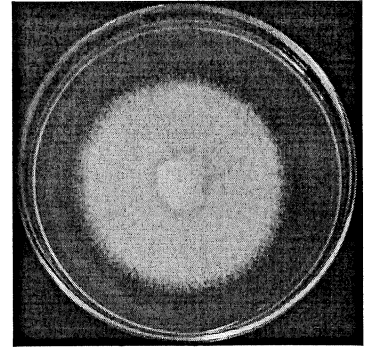
Hình 2



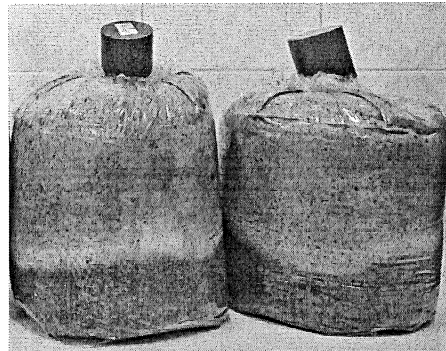
Giống nấm gốc Fo (-86°C)



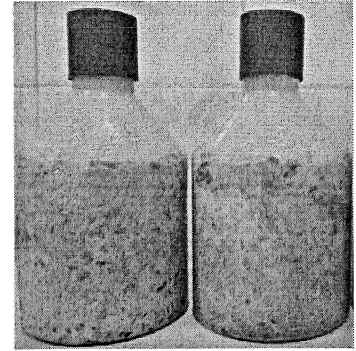
Giống nấm F₁ trên
môi trường PDA



Giống nấm F₂ trên
môi trường MCM

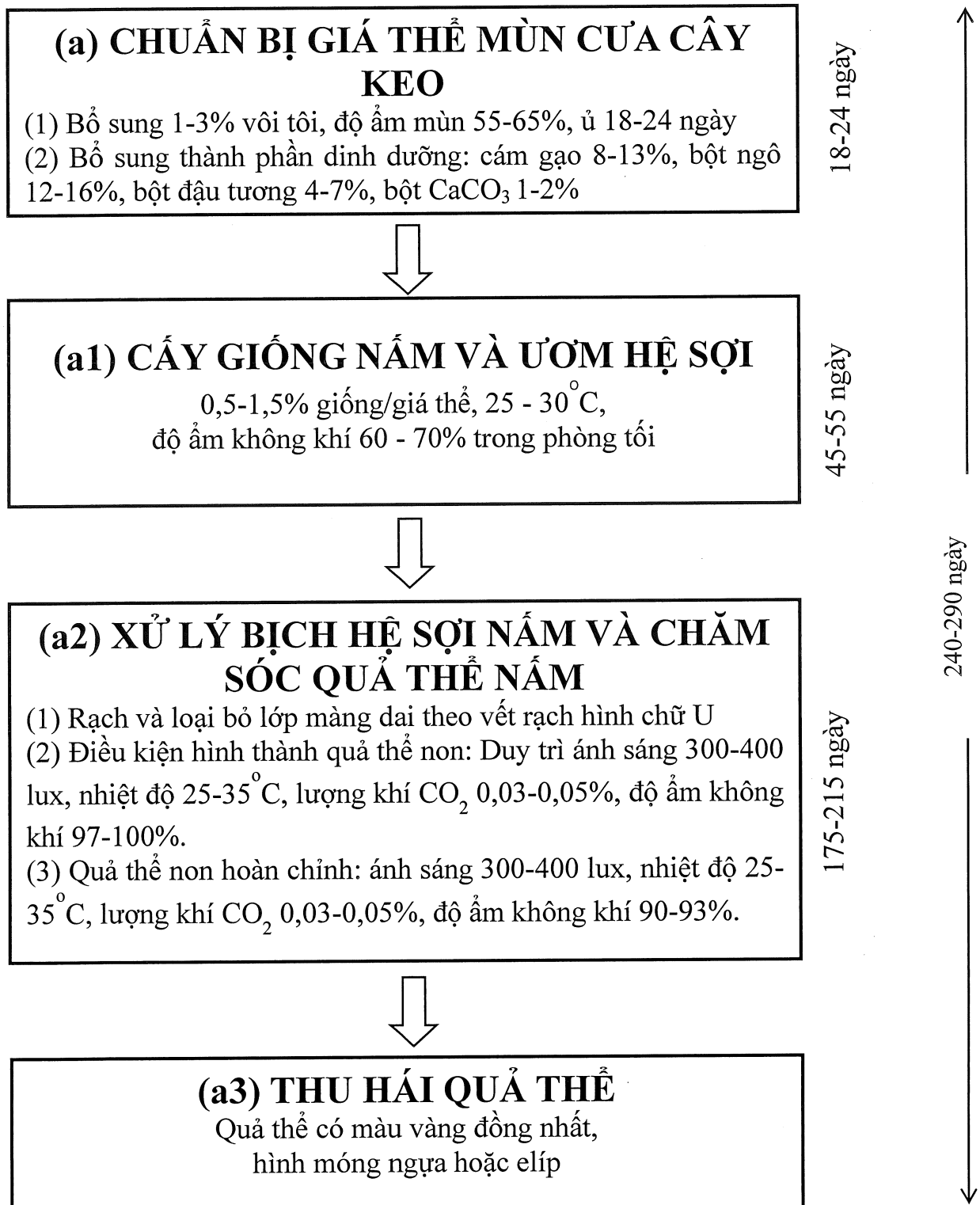


Nuôi trồng

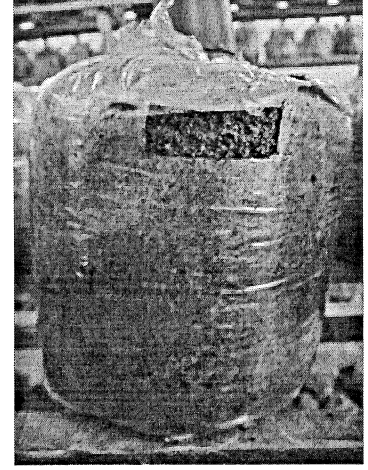
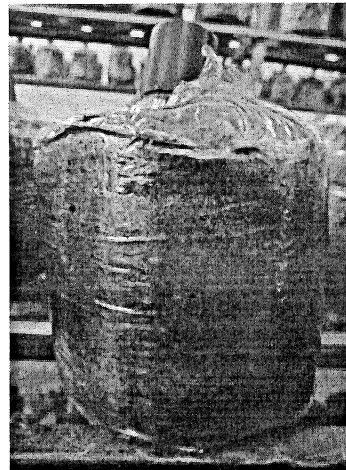
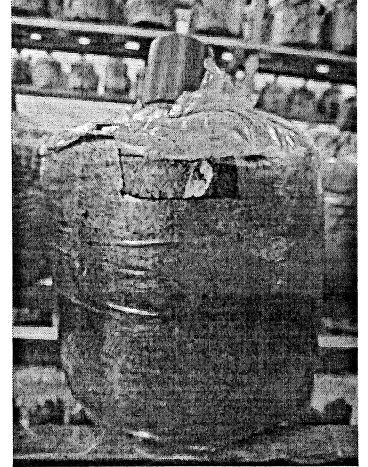


Giống nấm F₃
trên cơ chất thóc

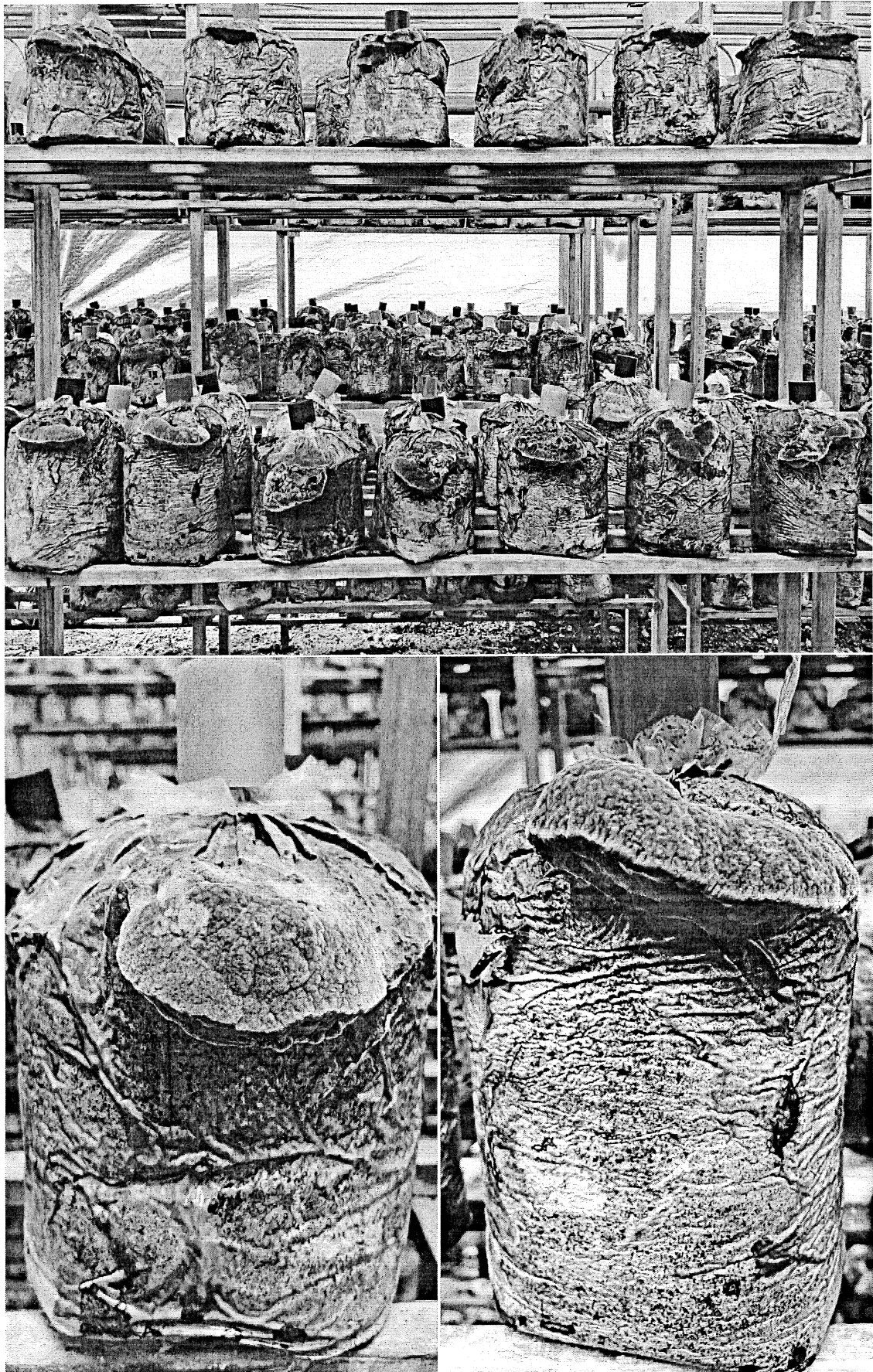
Hình 3



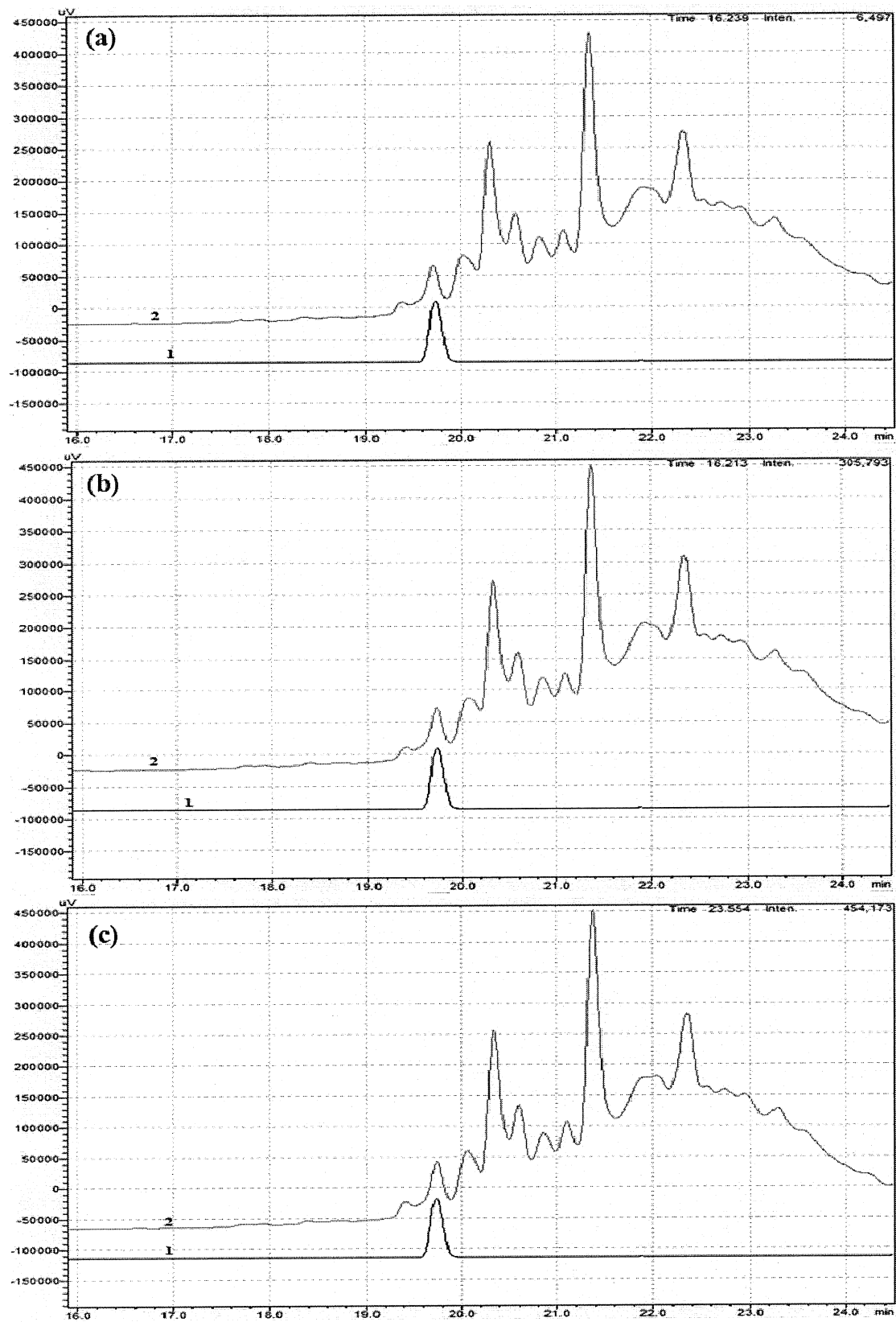
Hình 4



Hình 5



Hình 6



Hình 7