



(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)



**2-0003898**

(51) **A01G 1/04; C12N 1/14**  
2006.01

(13) **Y**

---

(21) 2-2020-00311

(22) 08/07/2020

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/01/2022 406

(73) Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao (VN)  
Áp 1, xã Phạm Văn Cội, huyện Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh

(72) Nguyễn Thị Ngọc Sương (VN); Phạm Đình Dũng (VN); Lê Văn Cửa (VN); Nguyễn  
Thị Huệ (VN); Nguyễn Thanh Hiền (VN); Vương Thị Hồng Loan (VN); Trần Minh  
Màn (VN); Nguyễn Thị Hồng Tú (VN); Trần Thị An (VN); Trần Hải My (VN); Võ  
Minh Long (VN); Nguyễn Thị Nguyên Trinh (VN); Lê Thành Hưng (VN); Lê Sĩ  
Ngọc (VN).

---

(54) **MÔI TRƯỜNG VÀ QUY TRÌNH NUÔI TRỒNG NHỘNG TRÙNG THẢO  
(CORDYCEPS MILITARIS)**

(21) 2-2020-00311

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến môi trường và quy trình nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*). Môi trường nuôi trồng bao gồm các thành phần (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 20 - 40 g/bình, cao nấm men 0,25 – 0,5 g/bình, lòng đỏ trứng gà 3 - 10 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 40 - 55 ml trong đó dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,01 - 0,2 g/l và axit folic 1 - 10  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 5 -15%, khoai tây 5 -15%. Ngoài ra, giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình nuôi trồng nhộng trùng thảo, trong đó quy trình này thu được sản phẩm nhộng trùng thảo có hàm lượng hoạt chất cao như hàm lượng cordycepin là 6,286 mg/g và hàm lượng adenosin là 4,280 mg/g.

### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực nông nghiệp, cụ thể là đề cập đến môi trường và quy trình nuôi trồng Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*).

### Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) là một loài nấm ký sinh trên sâu bướm, từ lâu được biết đến như một thuốc quý, giúp tăng cường sức khỏe, hỗ trợ hệ miễn dịch, chống suy nhược, mệt mỏi, phòng chống ung thư, bảo vệ tim, gan, thận... *Cordyceps militaris* có chứa nhiều hoạt chất sinh học như polysacarit, cordycepin, adenosin, axit amin, ergosterol, sterol, axit cordycepic và nhiều loại vitamin.

Trong số các hoạt chất sinh học có trong nấm *Cordyceps*, quan trọng nhất là nhóm chất axit cordycepic, cordycepin và polysacarit có tác dụng rất tốt trong điều trị bệnh ung thư và các bệnh do virus. Ngoài ba thành phần trên khi phân tích nấm người ta còn phát hiện rất nhiều hợp chất có giá trị N-acetylgalactosamin, adenosin, exopolysacarit, chitinaza, cicadaeptin, myriocin, sacarit (trehalosa và polysacarit), nucleosit (adenosin, inosin, uridin, guanosin và cordycepin) và ergosterol.

Nấm *Cordyceps* spp. được đánh giá cao về giá trị dinh dưỡng trong sản xuất thực phẩm chức năng và sản xuất thuốc trong phòng và trị bệnh. Chúng chứa rất nhiều loại đường, bao gồm mono-, di- và các oligosaccharide và nhiều polysaccharide phức tạp gồm có cyclofurans (đường 5C, mạch vòng, chưa rõ chức năng), beta-glucans, beta-mannans và phức hợp polysacarit có cả đường 5 và 6C cùng tham gia vào các chuỗi nhánh, dùng cả cầu nối alpha- và beta-.

Nấm *Cordyceps* được cho là có khả năng chống ung thư, chống di căn, điều hòa miễn dịch, chống oxy hóa, chống viêm, diệt khuẩn, hạ đường huyết, chống lão hóa, bảo vệ thần kinh và bảo vệ thận. *Cordyceps* là một loại dược liệu quý trong y học phương đông. Những nghiên cứu gần đây cho thấy những tác dụng dược lý của *Cordyceps*

*militaris* như tăng cường hệ thống miễn dịch và ức chế khối u, hiệu quả chống oxy hóa, kháng viêm và kháng tạo mạch có trong cả hệ sợi và trong quả thể *C. militaris*.

Hiện nay môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo thường sử dụng nhộng tằm (*Bombyx mori*) trong môi trường nuôi trồng. Tuy nhiên, thành phần nhộng tằm của môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo là loại nguyên liệu không phổ biến, khó bảo quản (bảo quản đông lạnh hoặc sấy khô, làm tăng chi phí sản xuất). Đây là một hạn chế gây khó khăn đến việc sản xuất ổn định và lâu dài. Do đó cần tìm một nguồn nguyên liệu phổ biến, dễ tìm, dễ bảo quản để dễ dàng và thuận tiện hơn cho quá trình sản xuất.

Việc sử dụng các nguồn nguyên liệu phổ biến trên thị trường để thay thế cho nguyên liệu nhộng tằm là cần thiết. Trứng và cao nấm men được lựa chọn làm nguyên liệu thay thế cho nhộng tằm. Đây là các nguyên liệu phổ biến trên thị trường. Bên cạnh đó, sử dụng các dịch chiết tự nhiên trong môi trường nuôi trồng góp phần làm tăng hoạt chất, cảm quan cho sản phẩm.

Quy trình nuôi trồng Nhộng trùng thảo đã biết có thể làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhộng trùng thảo so với tự nhiên nhờ vào việc bổ sung một số thành phần khoáng, vitamin, hormone vào môi trường nuôi trồng. Từ đó, có thể sản xuất stroma nhộng trùng thảo với sản lượng lớn có hàm lượng hoạt chất cao, đáp ứng được nhu cầu sản xuất thuốc hỗ trợ điều trị bệnh hiện nay. Với xu hướng sử dụng các sản phẩm có nguồn gốc hữu cơ, hạn chế các thành phần có nguồn gốc hóa học, việc sử dụng các nguồn khoáng, vitamin hay hormone có nguồn gốc từ thực vật vào sản xuất Nhộng trùng thảo đang là lựa chọn tối ưu.

Stroma của *C. militaris* được hình thành trong khoảng thời gian từ 35 – 70 ngày trên môi trường gạo là 35 – 45 ngày và trên môi trường khác như bắp, hạt kê, và gạo tissah là 40 – 70 ngày. Tuy nhiên thời gian nuôi trồng phụ thuộc vào hình dạng, thể tích bình nuôi và lượng môi trường.

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn đến sự tạo thành stroma của *C. militaris*. Nhiệt độ cao (khoảng  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) cho tốc độ lan tơ tối đa nhưng nhiệt độ thấp hơn trong khoảng 18 -  $22^{\circ}\text{C}$  kích thích và duy trì sự hình thành stroma, nhiệt độ tối ưu.

Ánh sáng là yếu tố môi trường quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự tạo thành stroma của *C. militaris* và không có stroma nào được tạo thành trong điều kiện tối. Stroma được hình thành dưới cường độ ánh sáng cao tương đương 500 - 4500lx. Thời gian chiếu sáng 18 giờ sáng ở 200lx là tối ưu cho hình thành sắc tố và tạo mầm, trong khi 10 giờ chiếu sáng thì thích hợp cho phát triển stroma và năng suất.

Sự trao đổi khí cao giúp cho sự phát triển hệ sợi, tạo mầm và năng suất sinh khối. Sự hình thành mầm cần độ ẩm cao 70 – 90%. Độ ẩm thấp làm cho môi trường nhanh khô. Do vậy khi nuôi trồng trong phòng với độ ẩm thấp cần có máy tạo độ ẩm để duy trì độ ẩm không khí phòng nuôi trồng.

Các nhà nghiên cứu thường sử dụng 30 – 40 % gạo, 5-10% nhộng tằm, khoáng 0,1 – 0,2%, cao nấm men 0,3 - 0,5%, 5 – 10% dịch chiết từ khoai tây, nước dừa,...

Do đó, cần cải tiến môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo nhằm tăng tính ổn định trong sản xuất và làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhộng trùng thảo. Từ đó ứng dụng vào quy mô sản xuất lớn.

### **Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích**

Mục đích của giải pháp là nhằm giải quyết các tồn tại nêu trên. Theo đó, giải pháp này đề xuất môi trường và quy trình nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo nhằm tìm nguồn nguyên liệu thay thế cho nguyên liệu nhộng tằm và tìm loại dịch chiết phù hợp cho việc nuôi trồng tạo stroma nhộng trùng thảo nhằm làm tăng tính ổn định trong sản xuất và làm tăng hàm lượng hoạt chất có trong stroma nhộng trùng thảo. Từ đó ứng dụng vào quy mô sản xuất lớn.

Theo khía cạnh đầu tiên, giải pháp đề cập đến môi trường nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*), trong đó môi trường bao gồm các thành phần sau đây (theo tỷ lệ g/bình): gạo lúc 20 - 40 g/bình, cao nấm men 0,25 – 0,5 g/bình, lòng đỏ trứng gà 3 - 10 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 40 - 55 ml. trong đó, dung dịch dinh dưỡng có thành phần (theo tỷ lệ g/l):  $\text{CaCl}_2$  0,01 - 0,2 g/l và axit folic 1 - 10  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 5 - 15%, khoai tây 5 -15%.

Trong một phương án ưu tiên, môi trường nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo theo giải pháp này bao gồm các thành phần như sau (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g, lòng đỏ trứng gà 5,59 g và dung dịch dinh dưỡng 45 ml. Dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo, trong đó quy trình gồm các bước:

a) Chuẩn bị môi trường:

Môi trường nhân giống thạch đĩa: môi trường PDA (khoai tây 20 g/L; dextroza 20 g/L, agar 15 g/L).

Môi trường nhân giống lỏng: môi trường SD1/2 (cao nấm men 5g/l, pepton 5 g/l, dextroza 10 g/l)

Cách pha môi trường PDA: Khoai tây rửa sạch, gọt vỏ, cắt lát mỏng. Nấu 200 g khoai tây đã cắt lát mỏng trong nước, giữ sôi trong khoảng 5 - 10 phút. Lọc thu dịch chiết loại bỏ cặn. Hòa tan 20 g dextroza vào dịch chiết, thêm nước cho đủ 1000 mL. Bỏ sung thêm 15 g agar, làm nóng môi trường để làm tan agar. Chia môi trường vào các chai thủy tinh trung tính hoặc các bình tam giác. Thể tích môi trường bằng 2/3 thể tích bình chứa. Hấp khử trùng môi trường ở 121°C, 1atm trong 15 phút.

Môi trường PDA sau khi lấy ra khỏi nồi hấp khử trùng được đưa vào tủ cấy, tiến hành đổ môi trường vào đĩa petri. Lưu ý toàn bộ quá trình này phải thực hiện trong tủ cấy vô trùng

Chuẩn bị môi trường cơ chất với mỗi bình nuôi trồng gồm các thành phần sau (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 20 - 40 g/bình, cao nấm men 0,25 – 0,5 g/bình, lòng đỏ trứng gà 3 - 10 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 40 - 55 ml. Dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,01 - 0,2 g/l và axit folic 1 - 10  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 5 -15%, khoai tây 5 -15%. Môi trường được phân phối vào các bình nuôi và hấp khử trùng ở 121°C trong 20 - 30 phút.

Theo phương án ưu tiên, môi trường nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo bao gồm các thành phần sau đây: gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g, lòng đỏ trứng gà 5,59 g và dung dịch dinh dưỡng 45 ml. Dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%.

b) Chuẩn bị giống: Ống giống gốc ban đầu được trữ trong tủ mát bảo quản ở nhiệt độ 4 - 6°C. Dùng que cấy móc lấy các mảnh sinh khối nấm từ ống giống gốc cấy chuyển qua các đĩa thạch PDA, ủ trong tối ở 22 - 25°C trong 10 - 15 ngày. Dùng ống đục thạch lấy các mảnh sinh khối nấm từ đĩa thạch PDA cấy chuyển sang các bình môi trường SD 1/2, nuôi tĩnh kết hợp với lắc, ủ trong tối ở 22 - 25°C trong 5 - 7 ngày.

c) Cấy giống: Cấy giống lỏng vào các bình cơ chất gạo đã được hấp khử trùng bằng cách sử dụng pipet hút mỗi 5 - 10 mL giống cấy qua mỗi bình cơ chất.

d) Nuôi ủ tơ và nuôi trồng nấm: Các bình nuôi sau khi cấy giống ủ tối ở 22 - 25°C trong 15 - 20 ngày. Khi tơ nấm đã lan kín bình và lan dày ở bề mặt, chuyển qua phòng nuôi với các điều kiện nhiệt độ 18 - 22 °C, độ ẩm 80 - 90%, cường độ ánh sáng 300 - 1000 lx, thời gian chiếu sáng 10- 14 giờ, nuôi trong 50 - 55 ngày.

e) Thu nấm: Sau 50 - 55 ngày nuôi trong điều kiện sáng, lúc này nấm đến giai đoạn thu hoạch, tiến hành thu nấm nhộng trùng thảo. Dùng dao đã được khử trùng tách riêng phần nấm và giá thể nuôi trồng. Nấm sau khi được tách ra được gửi mẫu để sấy thăng hoa. Sản phẩm sau sấy được phân loại và đóng gói trong các bình thủy tinh trong.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Hình 1 thể hiện sơ đồ quy trình nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo.

Hình 2 thể hiện ảnh chụp các bình nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo giai đoạn 50 ngày sau cấy giống.

Hình 3 thể hiện ảnh chụp nấm Nhộng trùng thảo giai đoạn thu hoạch.

#### **Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích**

Sau đây, sáng chế mô tả chi tiết các phương án cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết giải pháp chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các quy trình, kỹ thuật nhân giống, kỹ thuật pha chế môi trường và các điều kiện khử trùng môi trường thạch, môi trường lỏng, điều kiện nhân giống hệ sợi, điều kiện phát triển hệ sợi và quả thể trên môi trường là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ điều kiện nhân giống hệ sợi, điều kiện phát triển hệ sợi và quả thể trên môi trường cần môi

trường vô trùng để tránh nhiễm vi khuẩn hoặc vi sinh vật ngoại lai vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, điều kiện khử trùng môi trường thạch, lỏng là ở nhiệt độ 121°C trong 15 – 20 phút.

Người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực nuôi trồng nấm hoàn toàn có thể tiến hành các điều kiện khử trùng với đầy đủ trang thiết bị cần thiết.

Các thành phần, hóa chất hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo giải pháp này có thể tìm thấy hoặc mua được trên thị trường. Các chủng gốc được sử dụng để nuôi trồng là chủng giống nấm Nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*).

Các thành phần sử dụng làm môi trường nuôi trồng Nhộng trùng thảo bao gồm: gạo lức, trứng, cao nấm men

Gạo lức được sử dụng theo giải pháp hữu ích này là loại gạo lức đỏ, hạt dài, thường có tên là gạo huyết rồng. Gạo sau khi mua về được loại bỏ tạp chất, không mua loại gạo cũ, có sâu. Gạo có màu đều giữa các hạt. Mặc dù có nhiều loại gạo lức trên thị trường nhưng loại gạo lức đỏ được cho là tốt nhất cho việc nuôi trồng Nhộng trùng thảo. Vì hàm lượng khoáng, vitamin có trong gạo cao hơn các loại gạo khác. Gạo lức đỏ đảm bảo độ to xốp, không kết dính, làm tăng độ thoáng khí trong môi trường. Gạo được đông vào bình nuôi trồng trước khi hòa chung với dung dịch dinh dưỡng. Đối với bình nuôi trồng có thể 750 ml, lượng gạo có thể sử dụng 30 – 40 g/bình.

Trứng là loại trứng gà công nghiệp. Trứng được mua là loại trứng mới sản xuất, không bể vỡ, hư hỏng. Chỉ có lòng đỏ trứng được sử dụng trong nuôi trồng Nhộng trùng thảo. Do đó trứng mua về được tách lòng đỏ và lòng trắng ra riêng biệt. Lòng đỏ sau khi tách được cân với lượng 5 – 6 g/bình. Dựa trên tổng số bình cần thực hiện, cân lượng trứng đủ cho tổng số bình và hòa tan dung dịch dinh dưỡng, sau đó lọc qua rây để loại bỏ cặn lòng trắng và màng bao lòng đỏ còn sót lại.

Cao nấm men dạng bột mịn, màu vàng nâu nhạt đến đậm, có thể hòa tan hoàn toàn trong nước. Lượng cao nấm men sử dụng cho nuôi trồng nhộng trùng thảo 0,3 – 0,4 g/bình. Dựa trên tổng số bình cần thực hiện, cân lượng cao nấm men đủ cho tổng số bình và hòa tan dung dịch dinh dưỡng.



Khoai tây được sử dụng là loại khoai tây không mọc mầm. Nước dừa là nước dừa xiêm xanh còn non.

Dung dịch dinh dưỡng bao gồm các khoáng chất, vitamin và dịch chiết bao gồm .  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%.

Theo khía cạnh đầu tiên, giải pháp đề cập đến môi trường nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*), trong đó môi trường bao gồm các thành phần sau đây (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 20 - 40 g/bình, cao nấm men 0,25 – 0,5 g/bình, lòng đỏ trứng gà 3 - 10 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 40 - 55 ml. trong đó, dung dịch dinh dưỡng có thành phần (theo tỷ lệ g/l):  $\text{CaCl}_2$  0,01 - 0,2 g/l và axit folic 1 - 10  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 5 - 15%, khoai tây 5 -15%.

Theo một phương án ưu tiên, môi trường nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo theo giải pháp này bao gồm các thành phần như sau (theo tỷ lệ g/bình):: gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g, lòng đỏ trứng gà 5,59 g và dung dịch dinh dưỡng 45 ml. Dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp đề cập đến quy trình nuôi trồng nấm Nhộng trùng thảo bao gồm các bước: a) Chuẩn bị môi trường, b) Chuẩn bị giống, c) Cấy giống, d) Nuôi ủ tơ và nuôi trồng nấm, e) Thu nấm.

Trong bước chuẩn bị môi trường, môi trường bao gồm môi trường nhân giống thạch đĩa, môi trường nhân giống lỏng, môi trường nuôi trồng. Môi trường nhân giống thạch đĩa: môi trường PDA (khoai tây 20 g/L; dextroza 20 g/L, agar 15 g/L).

Môi trường nhân giống lỏng: môi trường SD1/2 (cao nấm men 5g/l, pepton 5 g/l, dextroza 10 g/l)

Cách pha môi trường PDA: Khoai tây rửa sạch, gọt vỏ, cắt lát mỏng. Nấu 200 g khoai tây đã cắt lát mỏng trong nước, giữ sôi trong khoảng 5 - 10 phút. Lọc thu dịch chiết loại bỏ cặn. Hòa tan 20 g dextroza vào dịch chiết, thêm nước cho đủ 1000 mL. Bỏ sung thêm 15 g agar, làm nóng môi trường để làm tan agar. Chia môi trường vào các chai thủy tinh trung tính hoặc các bình tam giác. Thử tích môi trường bằng 2/3 thể tích bình chứa. Hấp khử trùng môi trường ở 121°C, 1atm trong 15 phút.

Môi trường PDA sau khi lấy ra khỏi nồi hấp khử trùng được đưa vào tủ cấy, tiến hành đổ thạch vào đĩa petri. Lưu ý toàn bộ quá trình này phải thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Chuẩn bị môi trường nuôi trồng với mỗi bình nuôi trồng gồm các thành phần sau: gạo lức 30 g/bình, cao nấm men 0,378 g/bình, lòng đỏ trứng gà 5,59 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 45 ml. Dung dịch dinh dưỡng có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%. Môi trường được phân phối vào các bình nuôi và hấp khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong 20 - 30 phút.

Trong bước chuẩn bị giống thạch đĩa: Ống giống gốc ban đầu được trữ trong tủ mát bảo quản ở nhiệt độ  $4 - 6^\circ\text{C}$ . Dùng que cấy móc lấy các mảnh sinh khối nấm từ ống giống gốc cấy chuyển qua các đĩa thạch PDA, ủ trong tối ở  $22 - 25^\circ\text{C}$  trong 10 - 15 ngày. Dùng ống đục thạch lấy các mảnh sinh khối nấm từ đĩa thạch PDA cấy chuyển sang các bình môi trường SD 1/2, nuôi tĩnh, ủ trong tối ở  $22 - 25^\circ\text{C}$  trong 5 - 7 ngày.

Trong bước cấy giống lỏng vào môi trường nuôi trồng: Cấy giống lỏng vào các bình cơ chất gạo đã được hấp khử trùng bằng cách sử dụng pipet hút mỗi 5 - 10 mL giống cấy qua mỗi bình cơ chất. Tốt nhất là 5ml.

Trong bước nuôi ủ tơ và nuôi trồng nấm: Các bình nuôi sau khi cấy giống ủ tối ở  $22 - 25^\circ\text{C}$  trong 15 - 20 ngày. Khi tơ nấm đã lan kín bình và lan dày ở bề mặt, chuyển qua phòng nuôi với các điều kiện nhiệt độ  $18 - 22^\circ\text{C}$ , độ ẩm 80 - 90%, cường độ ánh sáng 300 - 1000 lx, thời gian chiếu sáng 10- 14 giờ, nuôi trong 50 - 55 ngày.

Trong bước thu nấm: Sau 50 - 55 ngày nuôi trong điều kiện sáng, lúc này nấm đến giai đoạn thu hoạch, tiến hành thu nấm nhộng trùng thảo. Dùng dao đã được khử trùng tách riêng phần nấm và giá thể nuôi trồng. Nấm sau khi được tách ra được gửi mẫu để sấy thăng hoa. Sản phẩm sau sấy được phân loại và đóng gói trong các bình thủy tinh trong.

### **Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích**

Ví dụ 1: Chuẩn bị môi trường gạo cho 1000 bình

Chuẩn bị các bình thủy tinh sạch. Đong 30g gạo vào bình.

Đối với axit folic và  $\text{CaCl}_2$ , cần pha stock trước khi pha môi trường. Stock khoáng có nồng độ 200X. Vitamin có nồng độ 1000X.

+ Cách pha stock khoáng: cân chính xác 20 g  $\text{CaCl}_2$ . Hòa tan hoàn toàn vào nước cất và thêm nước cất vừa đủ 1000 ml. Dung dịch được trữ trong tủ mát.

+ Cách pha stock vitamin: cân chính xác 0,005 g axit folic. Hòa tan hoàn toàn vào 1000 ml. Dung dịch được trữ trong tủ mát.

Chuẩn bị nguyên liệu: Khoai tây được gọt sạch vỏ, cắt nhỏ. Gạo được đông vào các bình thủy tinh trước khi cho dung dịch dinh dưỡng vào bình.

Các nấu dịch chiết khoai tây: đông 10 lít nước nấu với 3,375 kg khoai tây đã gọt vỏ. Sau khi nước sôi 5 – 10g. Lọc lấy nước, bỏ bã khoai tây.

Kỹ thuật pha môi trường: Chuẩn bị môi trường cho 1000 bình. Cân 5,59 kg lòng đỏ trứng. Cân 378 g cao nấm men. Đông 225 ml ml stock khoáng và 45 ml stock vitamin. Đông 3,375 lít nước dừa. Hòa tất cả nguyên liệu vào lượng nước dịch chiết khoai tây. Sau đó đông lượng nước vừa đủ 45 lít.

Kỹ thuật chuẩn bị bình môi trường: Gạo được đông vào các bình thủy tinh trước khi cho dung dịch dinh dưỡng vào bình với khối lượng 30 g/bình. Đông 45 ml dung dịch dinh dưỡng đã chuẩn bị sẵn cho vào bình thủy tinh. Đóng nắp và đậy giấy báo. Sau khi chuẩn bị xong các bình môi trường được cho vào nồi hấp khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$  trong thời gian 30 phút.

Ví dụ 2: Đánh giá ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu của môi trường đến việc nuôi trồng Nhộng trùng thảo

Để đánh giá được ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu của môi trường đến việc nuôi trồng Nhộng trùng thảo cần tiến hành thử nghiệm. Môi trường đối chứng: có thành phần là gạo lức 30 g, nhộng tằm 5 g và dung dịch bổ sung 45 mL có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/L và axit folic 5  $\mu\text{g/L}$ .

Môi trường thí nghiệm: gạo lức 30 g, nguyên liệu thí nghiệm và dung dịch bổ sung 45 mL có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/L và axit folic 5  $\mu\text{g/L}$ .

Nguyên liệu thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu của môi trường đến việc nuôi trồng Nhộng trùng thảo như nêu trong bảng bên dưới

**Bảng 1.** Nguyên liệu thí nghiệm sử dụng nuôi trồng Nhộng trùng thảo

| Nghiem thức | Nguyên liệu thí nghiệm                               |
|-------------|------------------------------------------------------|
| ĐC1         | Nhộng tằm 5 g/bình                                   |
| N1.1        | Cao nấm men 0,7541 g/bình                            |
| N1.2        | Pepton 0,6134 g/bình                                 |
| N1.3        | Lòng đỏ trứng 11,1633 g/bình                         |
| N1.4        | Cao nấm men 0,3771 g/bình + Pepton 0,3067 g/bình     |
| N1.5        | Cao nấm men 0,378 g/bình + Lòng đỏ trứng 5,59 g/bình |
| N1.6        | Pepton 0,3067 g/bình + Lòng đỏ trứng 5,5816 g/bình   |

Các môi trường được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C và 1 atm trong 30 phút. Điều kiện nhân giống, nuôi trồng, thu hoạch được thực hiện theo quy trình.

Các tiêu chí đánh giá sự ảnh hưởng của nguyên liệu đến việc nuôi trồng nhộng trùng thảo là năng suất, hàm lượng cordycepin và hàm lượng adenosin.

Mẫu nấm được đem phân tích hàm lượng hoạt chất cordycepin và adenosin bằng phương pháp HPLC-DAD. Kết quả đánh giá năng suất được thể hiện trong bảng sau:

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu nuôi trồng nhộng trùng thảo

| Nghiệm thức | Năng suất (g/bình) | Hàm lượng<br>cordycepin (mg/g) | Hàm lượng<br>adenosin (mg/g) |
|-------------|--------------------|--------------------------------|------------------------------|
| ĐC1         | 20,66              | 6,0448                         | 1,5031                       |
| N1.1        | 17,51              | 3,0237                         | 2,0877                       |
| N1.2        | 17,02              | 2,1931                         | 1,0273                       |
| N1.3        | 13,18              | 3,5160                         | 2,5136                       |
| N1.4        | 19,4               | 2,4337                         | Dạng vết                     |
| N1.5        | 14,91              | 6,7599                         | 4,4775                       |
| N1.6        | 15,06              | 3,9827                         | 2,7268                       |

Nguyên liệu cao nấm men kết hợp với pepton có hiệu quả tạo stroma tốt nhất nhưng hàm lượng hoạt chất thấp. Có thể nói nguyên liệu này giúp sự sinh trưởng của nấm được tốt hơn nhưng không kích thích tạo được nhiều hoạt chất. Các nghiệm thức sử dụng lòng đỏ trứng tuy hiệu quả tạo stroma thấp nhưng hàm lượng hoạt chất lại cao hơn hẳn so với các nghiệm thức từ nguyên liệu cao nấm men và pepton. Sự kết hợp cao nấm men và lòng đỏ trứng vừa tạo stroma tương đối tốt vừa tạo được nhiều hoạt chất trong stroma. Như vậy có thể nói nguyên liệu cao nấm men và pepton có hiệu quả trong việc tạo sinh khối, còn nguyên liệu lòng đỏ trứng có hiệu quả trong tạo hoạt chất trong stroma và sự kết hợp cao nấm men với lòng đỏ trứng là sự kết hợp phù hợp cho việc tạo stroma có chứa hàm lượng hoạt chất cao.

Ví dụ 3: Đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết của môi trường đến năng suất nuôi trồng Nhộng trùng thảo

Từ kết quả đánh giá nguồn nguyên liệu, ví dụ 2 được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết đến việc nuôi trồng nhộng trùng thảo. Dịch chiết được bổ sung vào công thức môi trường nuôi trồng thu được ở ví dụ 1. Đó là gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g/bình, lòng đỏ trứng 5,59 g/bình và dung dịch bổ sung 45 mL có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/L và axit folic 5  $\mu\text{g/L}$ . Lượng dịch chiết thí nghiệm như ở bảng dưới đây:

**Bảng 3.** Dịch chiết thí nghiệm sử dụng cho nuôi trồng nhộng trùng thảo

| Nghiem thức | Lượng dịch chiết trong dung dịch dinh dưỡng    |
|-------------|------------------------------------------------|
| ĐC3         | Không bổ sung dịch chiết                       |
| N3.1        | 200 g/L khoai tây                              |
| N3.2        | 200 g/L bắp                                    |
| N3.3        | 200 mL/L nước dừa                              |
| N3.4        | 100 g/L bắp, 100 g/L khoai tây                 |
| N3.5        | 100 mL/L nước dừa, 100 g/L khoai tây           |
| N3.6        | 100 mL/L nước dừa, 100 g/L bắp                 |
| N3.7        | 70 mL/L nước dừa, 70 g/L bắp, 70 g/L khoai tây |

Các môi trường được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C và 1 atm trong 30 phút. Điều kiện nhân giống, nuôi trồng, thu hoạch được thực hiện theo quy trình. Các tiêu chí đánh giá sự ảnh hưởng của nguyên liệu đến việc nuôi trồng Nhộng trùng thảo là năng suất. Kết quả đánh giá năng suất dưới sự ảnh hưởng dịch chiết được thể hiện trong bảng sau:

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của dịch chiết đến năng suất nuôi trồng nhộng trùng thảo

| Nghiem thức | Năng suất (g/bình) |
|-------------|--------------------|
| ĐC3         | 17,41              |
| N3.1        | 17,89              |
| N3.2        | 16,84              |
| N3.3        | 18,72              |
| N3.4        | 17,79              |
| N3.5        | 22,03              |
| N3.6        | 20,09              |
| N3.7        | 21,25              |

Theo kết quả thu được, nghiệm thức bổ sung nước dừa kết hợp với dịch chiết khoai tây có hiệu quả tạo stroma cao nhất (22,03 g/bình), hiệu suất sinh học đạt 11,31% cho

hiệu quả tạo stroma tốt. Nghiệm thức bổ sung dịch chiết bắp cho hiệu quả tạo stroma thấp nhất (16,84 g/bình), hiệu suất sinh học 8,41%. Kết quả được thu thập và trình bày ở bảng cho thấy nghiệm thức N3.5 (100 mL/L nước dừa + 100 g/L khoai tây) cho trọng lượng stroma khô cao nhất trong các nghiệm thức thí nghiệm (3,39 g/bình), đạt 126,51% so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức N3.2 (200 g/L bắp) cho trọng lượng stroma khô thấp nhất (2,91 g/bình), chỉ đạt 94,07% so với đối chứng. Như vậy, dịch chiết khoai tây kết hợp với nước dừa cho hiệu quả tạo stroma cao nhất trong các nghiệm thức.

Ví dụ 4: Đánh giá ảnh hưởng của lượng dịch chiết khoai tây và nước dừa của môi trường đến việc nuôi trồng nhộng trùng thảo

Sau khi xác định được loại dịch chiết phù hợp cho việc nuôi trồng nhộng trùng thảo, ví dụ 4 được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của lượng dịch chiết khoai tây và nước dừa đến việc nuôi trồng nhộng trùng thảo. Lượng dịch chiết sử dụng được tính theo phần trăm khối lượng sử dụng ở ví dụ 3 và được trình bày ở bảng sau:

**Bảng 5.** Tỷ lệ phần trăm lượng dịch chiết khoai tây và nước dừa sử dụng

| Nghiệm thức | Lượng dịch chiết         |
|-------------|--------------------------|
| ĐC4         | Không bổ sung dịch chiết |
| N4.1        | 50% X                    |
| N4.2        | 75% X                    |
| N4.3        | 100% X                   |
| N4.4        | 125% X                   |
| N4.5        | 150% X                   |

Các môi trường được chuẩn bị theo công thức thí nghiệm. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C và 1 atm trong 30 phút. Điều kiện nhân giống, nuôi trồng, thu hoạch được thực hiện theo quy trình. Các tiêu chí đánh giá sự ảnh hưởng của nguyên liệu đến việc nuôi trồng nhộng trùng thảo là số lượng stroma, chiều dài stroma, đường kính stroma, tỷ lệ stroma nhỏ/stroma lớn (%), năng suất, hàm lượng cordycepin và hàm lượng adenosin. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng dịch chiết được thể hiện ở bảng sau:

**Bảng 6. Ảnh hưởng của lượng dịch chiết khoai tây và nước dừa đến hình thái, số lượng stroma nhộng trùng thảo**

| Đặc điểm                                            | ĐC4<br>(Không bổ sung dịch chiết)                                                                              | N4.1 (50%)                                                                                                                      | N4.2 (75%)                                                                                                                | N4.3 (100%)                                                                                                                   | N4.4 (125%)                                                                                                                            | N4.5 (150%)                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Số lượng stroma trung bình (stroma/bình)            | 76,33 ± 11,37                                                                                                  | 70,67 ± 8,33                                                                                                                    | 65,33 ± 14,19                                                                                                             | 65,00 ± 11,79                                                                                                                 | 58,67 ± 11,15                                                                                                                          | 53,33 ± 14,05                                                                                                             |
| Chiều dài stroma trung bình (mm)                    | 65,4 ± 17,77                                                                                                   | 67,01 ± 17,25                                                                                                                   | 70,03 ± 22,86                                                                                                             | 68,59 ± 20,13                                                                                                                 | 63,66 ± 22,13                                                                                                                          | 60,58 ± 25,21                                                                                                             |
| Đường kính stroma trung bình (mm)                   | 1,56 ± 0,83                                                                                                    | 1,63 ± 0,94                                                                                                                     | 2,15 ± 0,72                                                                                                               | 2,42 ± 0,76                                                                                                                   | 2,72 ± 1,39                                                                                                                            | 3,15 ± 1,15                                                                                                               |
| Tổng số quả thể lớn trong 1 bình (chiều dài > 50mm) | 54,00 ± 6,08                                                                                                   | 40,33 ± 5,69                                                                                                                    | 52,67 ± 9,45                                                                                                              | 45,33 ± 7,37                                                                                                                  | 42,33 ± 7,23                                                                                                                           | 32,00 ± 7,00                                                                                                              |
| Tổng số quả thể nhỏ trong 1 bình (chiều dài < 50mm) | 22,33 ± 6,03                                                                                                   | 28,33 ± 4,51                                                                                                                    | 12,67 ± 5,03                                                                                                              | 19,67 ± 4,51                                                                                                                  | 16,33 ± 4,51                                                                                                                           | 21,33 ± 7,09                                                                                                              |
| Tỷ lệ stroma nhỏ/stroma lớn (%)                     | 41,35                                                                                                          | 70,25                                                                                                                           | 24,06                                                                                                                     | 43,39                                                                                                                         | 38,58                                                                                                                                  | 66,66                                                                                                                     |
| Đặc điểm stroma                                     | Stroma nhỏ, màu cam nhạt, hơi ngắn, đầu tương đối tròn, stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. | Stroma nhỏ, màu cam nhạt, đầu hơi tròn, tương đối dài, không phân nhánh. Stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. | Stroma to vừa phải, màu cam nhạt, đầu tròn, dài, không phân nhánh. Stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. | Stroma to vừa phải, màu cam nhạt, đầu hơi nhọn, dài, không phân nhánh. Stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. | Stroma to vừa phải, màu cam nhạt, đầu hơi tròn, dài vừa phải, không phân nhánh. Stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. | Stroma to, màu cam nhạt, đầu tròn, dài vừa phải, không phân nhánh. Stroma biến dạng nhiều, tập trung ở quanh bình và đáy. |



**Bảng 7. Ảnh hưởng của lượng dịch chiết khoai tây và nước dừa đến năng suất, hàm lượng hoạt chất của Nhộng trùng thảo**

| Nghiem thức | Năng suất stroma (g/bình) | Trọng lượng stroma khô (g/bình) | Hàm lượng cordycepin (mg/g) | Hàm lượng adenosin (mg/g) |
|-------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| ĐC4         | 17,42                     | 2,64                            | 6,256                       | 4,022                     |
| N4.1        | 20,82                     | 3,53                            | 5,909                       | 4,236                     |
| N4.2        | 22,71                     | 3,85                            | 6,286                       | 4,280                     |
| N4.3        | 22,17                     | 3,71                            | 6,152                       | 4,155                     |
| N4.4        | 21,19                     | 3,33                            | 6,049                       | 4,395                     |
| N4.5        | 21,05                     | 3,22                            | 6,079                       | 4,396                     |

Từ kết quả thu được nghiệm thức N4.2 là nghiệm thức cho năng suất, trọng lượng stroma khô cao nhất, tỷ lệ stroma nhỏ/stroma lớn thấp thể hiện độ đồng đều về kích thước của stroma trong mỗi bình cao. Như vậy công thức môi trường phù hợp cho nuôi trồng Nhộng trùng thảo không sử dụng nhộng tằm là gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g, lòng đỏ trứng gà 5,59 g và dung dịch dinh dưỡng 45 ml có thành phần  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, dịch chiết khoai tây 7,5% .

#### **Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích**

Việc sử dụng các nguyên liệu phổ biến cho nuôi trồng Nhộng trùng thảo là trứng gà, cao nấm men, dịch chiết mà không sử dụng nhộng tằm góp phần làm tăng tính ổn định trong sản xuất số lượng lớn, không phụ thuộc vào mùa vụ. Việc sử dụng giải pháp này cho năng suất stroma tươi 22,71 g/bình, trọng lượng stroma khô 3,85 g/bình, hàm lượng cordycepin, adenosin, polysacarit, ergosterol lần lượt là 6,286 mg/g; 4,280 mg/g; 34,25%; 2,184 mg/g; tỷ lệ stroma nhỏ/stroma lớn trong một bình thấp thể hiện độ đồng đều của stroma trong mỗi bình cao. Quy trình nuôi trồng Nhộng trùng thảo không sử dụng nhộng tằm sử dụng các nguyên liệu phổ biến, dễ tìm có thể ứng dụng ở mọi vị trí địa lý của Việt Nam mà không phụ thuộc vào mùa vụ, không ảnh hưởng tới tính ổn định và liên tục trong sản xuất quy mô lớn.

### Yêu cầu bảo hộ

1. Môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*), trong đó môi trường bao gồm các thành phần sau đây (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 20 - 40 g/bình, cao nấm men 0,25 - 0,5 g/bình, lòng đỏ trứng gà 3 - 10 g/bình, dung dịch dinh dưỡng 40 - 55 ml; trong đó, dung dịch dinh dưỡng có thành phần (theo tỷ lệ g/l):  $\text{CaCl}_2$  0,01 - 0,2 g/l và axit folic 1 - 10  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 5 -15%, khoai tây 5 -15%.

2. Môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo theo điểm 1, trong đó môi trường này bao gồm các thành phần như sau (theo tỷ lệ g/bình): gạo lức 30 g, cao nấm men 0,378 g, lòng đỏ trứng gà 5,59 g và dung dịch dinh dưỡng 45 ml, trong đó, dung dịch dinh dưỡng có thành phần (theo tỷ lệ g/l) :  $\text{CaCl}_2$  0,1 g/l và axit folic 5  $\mu\text{g/l}$ , nước dừa 7,5%, khoai tây 7,5%.

3. Quy trình nuôi trồng nhộng trùng thảo, trong đó quy trình gồm các bước sau:

a) chuẩn bị môi trường:

môi trường nhân giống thạch đĩa: môi trường PDA (khoai tây 20 g/L; dextroza 20 g/L, agar 15 g/L).

môi trường nhân giống lỏng: môi trường SD1/2 (cao nấm men 5g/l, pepton 5 g/l, dextroza 10 g/l)

chuẩn bị môi trường nuôi trồng nhộng trùng thảo với mỗi bình nuôi trồng gồm các thành phần như xác định trong điểm 1 hoặc 2;

b) Chuẩn bị giống:

ống giống gốc ban đầu được trữ trong tủ mát bảo quản ở nhiệt độ 4 - 6°C; dùng que cấy móc lấy các mảnh sinh khối nấm từ ống giống gốc cấy chuyển qua các đĩa thạch PDA, ủ trong tối ở 22 - 25°C trong 10 - 15 ngày;

dùng ống đục thạch lấy các mảnh sinh khối nấm từ đĩa thạch PDA cấy chuyển sang các bình môi trường SD 1/2, nuôi tĩnh kết hợp với lắc, ủ trong tối ở 22 - 25°C trong 5 - 7 ngày;

c) Cấy giống:

cấy giống lỏng vào các bình cơ chất gạo đã được hấp khử trùng bằng cách sử dụng pipet hút mỗi 5 - 10 mL giống cấy qua mỗi bình cơ chất;

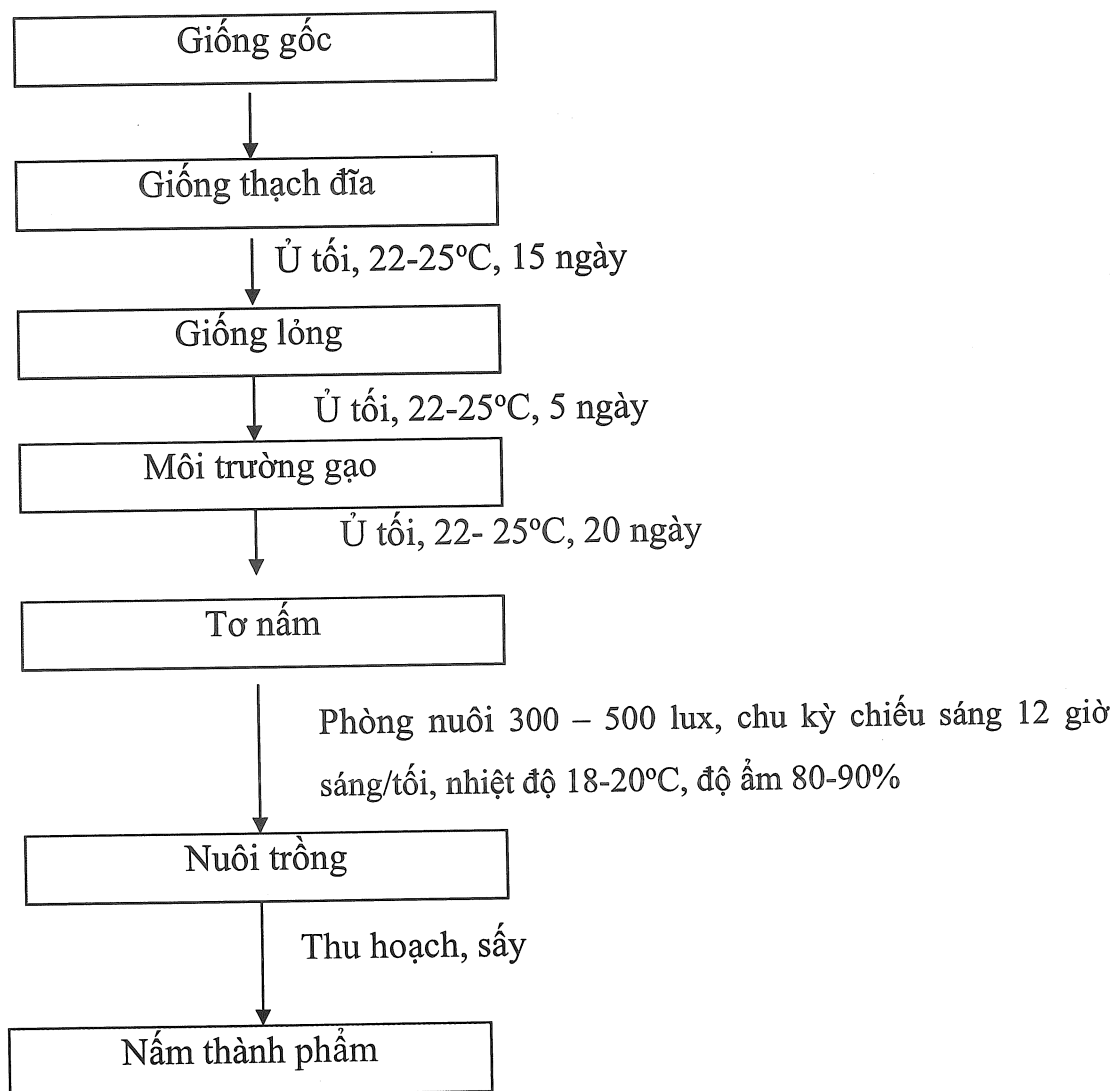
d) Nuôi ủ tơ và nuôi trồng nấm:

các bình nuôi sau khi cấy giống ủ tối ở 22 - 25°C trong 15 - 20 ngày; Khi tơ nấm đã lan kín bình và lan dày ở bề mặt, chuyển qua phòng nuôi với các điều kiện nhiệt độ 18 - 22 °C, độ ẩm 80 – 90%, cường độ ánh sáng 300 – 1000 lx, thời gian chiếu sáng 10- 14 giờ, nuôi trong 50 - 55 ngày;

e) Thu nấm:

sau 50 - 55 ngày nuôi trong điều kiện sáng, lúc này nấm đến giai đoạn thu hoạch, tiến hành thu nấm nhộng trùng thảo; Dùng dao đã được khử trùng tách riêng phần nấm và giá thể nuôi trồng; Nấm sau khi được tách ra được gửi mẫu để sấy thăng hoa; Sản phẩm sau sấy được phân loại và đóng gói trong các bình thủy tinh trong.

1/3



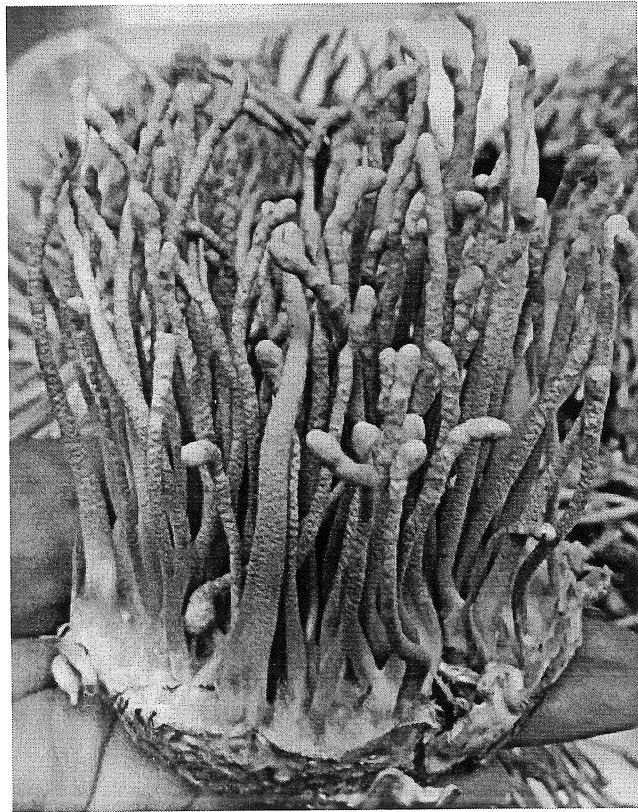
Hình 1

2/3



Hình 2

3/3

**Hình 3**