



(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)



2-0002337

(51)⁷ **C12N 1/14; C12N 3/00**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00147

(22) 07/05/2018

(45) 25/06/2020 387

(43) 25/07/2018 364A

(73) **VIỆN ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ (VN)**

Số 25, Lê Thánh Tông, quận Hoàn Kiếm, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Thanh Mai (VN); Trần Bảo Trâm (VN); Trương Thị Chiên (VN);
Nguyễn Thị Hiền (VN); Mai Thị Đàm Linh (VN).

(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Bình Minh (SUNRISE IP CO.,LTD.)

(54) **QUY TRÌNH SẢN XUẤT BỘT SINH KHỐI NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO
CORDYCEPS MILITARIS**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo Cordyceps militaris bao gồm các bước: a) phân lập nấm Cordyceps militaris, b) lên men chìm nấm Cordyceps militaris, và c) thu hồi và hoàn thiện sản phẩm lên men. Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện, dễ kiểm soát, và có thể áp dụng trong lên men công nghiệp giúp tăng năng suất và chất lượng sinh khối nấm Cordyceps militaris.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nấm *Cordyceps* (còn gọi là Đông trùng thảo, Trùng thảo hay Hạ thảo đông trùng) là các loài nấm kí sinh trên sâu non hoặc nhộng hoặc sâu trưởng thành của một số loại côn trùng. Phân tích thành phần hóa học của nấm đông trùng hạ thảo cho thấy có 17 axit amin khác nhau, D-mannitol, lipit và nhiều nguyên tố vi lượng (Al, Si, K, Na, v.v.). Ngoài ra, trong nấm đông trùng hạ thảo còn chứa nhiều loại vitamin (trong 100 g nấm đông trùng hạ thảo có 0,12 g vitamin B12; 29,19 mg vitamin A; 116,03 mg vitamin C, ngoài ra còn có vitamin B2 (riboflavin), vitamin E, vitamin K, v.v.. Quan trọng hơn là trong sinh khối của nấm *Cordyceps militaris* có nhiều chất hoạt động sinh học mà các nhà khoa học phát hiện ra nhờ các tiến bộ của ngành hoá học các hợp chất tự nhiên. Nhiều hoạt chất này có giá trị được liệu với con người như chất cordycepin, axit cordiceptic, adenosin và hydroxyethyl-adenosin.

Phương pháp lên men chìm cũng đã được sử dụng nhiều trong công nghệ nuôi cấy vi sinh vật. Nó có thể cho phép kiểm soát được toàn bộ quá trình lên men một cách thuận lợi, ít tốn kém mặt bằng. Do hệ thống khuấy trộn tốt nên toàn bộ môi trường nuôi cấy là một hệ thống nhất. Đối với nấm *C. militaris*, các nhà khoa học cũng đã sử dụng phương pháp này để tạo ra các chất chuyển hóa có giá trị từ hơn 20 năm qua. Phương pháp này có ưu điểm là tăng sản lượng hệ sợi thu được trên cùng một diện tích thí nghiệm sử dụng so với phương pháp lên men rắn, thời gian nuôi cấy ngắn và ít chịu ảnh hưởng của những thay đổi môi trường. Với phương pháp nuôi cấy chìm, *C.militaris* sinh trưởng trên môi trường lỏng và có sự thông khí, khuấy rất mạnh trong các thiết bị lên men.

Đã có nhiều nghiên cứu liên quan đến nấm *Cordyceps militaris*, ngoài phương pháp nuôi cấy bằng quả thể thì hiện nay phương pháp lên men chìm đang được nghiên cứu

nhằm nâng cao chất lượng nấm và khắc phục được nhược điểm của quy trình nuôi cấy quả thể. Ví dụ, tài liệu CN 103483040 A đã đề cập chi tiết đến thành phần môi trường nuôi cấy, quy trình lên men chìm chủng *Cordyceps sinensis* trên quy mô công nghiệp. Tuy nhiên, do đặc điểm nuôi cấy chủng *Cordyceps sinensis* khác với chủng *Cordyceps militaris* nên quy trình nuôi cấy lên men chìm có một số đặc điểm khác so với chủng công bố trước đó, ngoài ra trong công bố chưa đề cập chi tiết đến quá trình thu hồi và hoàn thiện sản phẩm sau lên men.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là giải quyết các vấn đề nêu trên. Theo đó, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bao gồm các bước:

- a) phân lập nấm *Cordyceps militaris*;
- b) lên men chìm nấm *Cordyceps militaris*; và
- c) thu hồi và hoàn thiện sản phẩm lên men.

Quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* nhằm mục đích để sản xuất sinh khối đông trùng hạ thảo ở dạng bột với lượng sinh khối tế bào cao, hàm lượng cordycepin đạt 1,6 mg/g và adenosin đạt 2,8 mg/g.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Hình ảnh ống giống nấm *C.militaris*

Hình 2: Bình lên men 250 ml

Hình 3: Bình phản ứng sinh học (Bioreactor)

Hình 4: Sinh khối nấm sau khi lọc

Hình 5: Sản phẩm bột sinh khối nấm sau khi đông khô

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

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

Các quy trình, kỹ thuật pha chế môi trường, quy trình nuôi cấy, các điều kiện pha chế, khử trùng môi trường là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, điều kiện ủ để phát triển khuẩn lạc, điều kiện thu nhận khuẩn lạc để có được chủng nấm thuần nhất, điều kiện cấy để tránh vi sinh vật ngoại lai lây nhiễm vào môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, các điều kiện khử trùng môi trường nuôi cấy là đã biết, ví dụ, điều kiện khử trùng có thể, nhưng không bị giới hạn ở, khử trùng bằng nhiệt, bằng hóa chất, chiếu xạ hoặc siêu lọc hoặc có thể kết hợp bởi các phương pháp này.

Các thành phần, hóa chất hoặc thiết bị sử dụng trong quy trình theo sáng chế có thể tìm thấy, hoặc mua được trên thị trường. Các thiết bị hoặc hóa chất có thể mua được, ví dụ, từ công ty Difco (Tây Ban Nha), Merck (Đức), Sigma (Hoa Kỳ), v.v..

Theo đó, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bao gồm các bước:

a) Phân lập nấm *Cordyceps militaris*

Chọn quả thể nấm đông trùng hạ thảo có kích thước to khỏe, không bệnh, màu vàng đậm, dùng dao cấy đã khử trùng cắt thành các đoạn nhỏ có kích thước 2-5 mm, ngâm các đoạn nhỏ này trong dung dịch cồn 70° trong thời gian 1 phút và tiếp tục ngâm rửa trong nước cất khử trùng 3 lần, mỗi lần trong thời gian 1 phút thu được các phân đoạn nấm;

Chuẩn bị môi trường PDA (trong 1 lít) bao gồm:

Glucosa: 40 g

Nước chiết khoai tây: 300 ml

Thạch (agar): 20 g

pH: 5,1±0,2

Dùng banh kẹp gấp các phân đoạn nấm đã làm sạch cho vào đĩa petri chứa môi trường PDA, sau đó ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong khoảng thời gian từ 5 đến 7 ngày để nấm phát triển, trong suốt quá trình này, thường xuyên kiểm tra và loại bỏ đĩa nhiễm tạp; sau đó lựa chọn chủng nấm phát triển tốt làm giống nấm gốc rồi cấy và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở nhiệt độ 4°C thu được chủng giống nấm cấp 1;

b) Lên men chìm nấm *Cordyceps militaris*

Môi trường lỏng MT1 có thành phần (trong 1 lít) như sau:

Glucose: 40 g

Pepton: 8 g

KH₂PO₄: 1 g

MgSO₄: 0,5 g

pH: 6,0

Cấy chủng giống nấm cấp 1 thu được ở bước a) vào các bình tam giác 250 ml chứa 90 ml môi trường MT1 trong thời gian 3 ngày, nhiệt độ 25°C, tốc độ lắc 120 vòng/ phút, ánh sáng ~500 lux thu được giống cấp 2;

Lên men giống cấp 2 trong các bình phản ứng sinh học (Bioreactor) dung tích 3 lít chứa môi trường MT1 nêu trên để thu được sinh khối nấm; trong đó, tỷ lệ cấp giống là 8%, nguồn nitơ là pepton, nguồn cacbon là đường glucose, nồng độ oxy được kiểm soát bằng cách điều chỉnh tốc độ khuấy với độ bão hòa không khí là 10%, nhiệt độ điều chỉnh trong quá trình lên men khoảng 25°C, pH 6, thời gian lên men 15 ngày, tốc độ khuấy 150 vòng/phút;

c) Thu hồi và hoàn thiện sản phẩm lên men

Sinh khối nấm sau khi nuôi cấy chứa các sợi nấm liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, được lọc bằng vải lọc để thu sinh khối sợi nấm. Sinh khối sợi nấm này được đông khô ở điều kiện nhiệt độ -49°C, áp suất chân không 13,3 Pa. Sản phẩm thu được ở dạng bột có màu sắc vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng và vị hơi ngọt. Bột sinh khối nấm thu được có hàm lượng cordycepin đạt 1,6 mg/g và adenosin đạt 2,8 mg/g. Các chỉ tiêu về aflatoxin, vi sinh vật như *E. coli*, *Coliform*, nấm men, nấm

men, nấm mốc, vi khuẩn hiếu khí đều nằm trong ngưỡng cho phép của Bộ Y tế về đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Phân lập và lên men chìm nấm *Cordyceps militaris* để sản xuất sinh khối nấm

Phân lập nấm *Cordyceps militaris*

Chọn quả thể nấm đông trùng hạ thảo có kích thước to khỏe, không bệnh, màu vàng đậm, dùng dao cắt đã khử trùng cắt thành các đoạn nhỏ có kích thước 2-5 mm, ngâm các đoạn nhỏ này trong dung dịch cồn 70° trong thời gian 1 phút và tiếp tục ngâm rửa trong nước cất khử trùng 3 lần, mỗi lần trong 1 phút thu được các phân đoạn nấm;

Chuẩn bị 1 lít môi trường PDA bao gồm:

Glucosa: 40 g

Nước chiết khoai tây: 300 ml

Thạch (agar): 20.

Môi trường PDA được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút, đổ vào đĩa petri đã khử trùng, để nguội. Dùng banh kẹp gắp các phân đoạn nấm đã làm sạch cho vào đĩa petri chứa môi trường PDA, sau đó ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong khoảng 5-7 ngày để sợi nấm phát triển. Trong suốt quá trình này, thường xuyên kiểm tra và loại bỏ các ống giống nhiễm tạp.

Từ các chủng phân lập, lựa chọn chủng phát triển tốt, không nhiễm tạp, cấy vào ống thạch nghiêng, ủ ở 25°C trong 10 ngày phát triển đầy bề mặt thạch, quan sát hàng ngày để phát triển nhiễm tạp và loại bỏ kịp thời để tránh ảnh hưởng đến những ống thạch nghiêng đang phát triển tốt thu được chủng giống nấm cấp 1.

Lên men chìm nấm *Cordyceps militaris*

Chuẩn bị 1 lít môi trường lỏng MT1 có thành phần như sau:

Glucosa: 40 g

Pepton: 8 g

KH_2PO_4 : 1 g

MgSO_4 : 0,5 g

pH: $6,0 \pm 0,2$

1 lít môi trường này được khuấy đều và cho vào 10 bình tam giác thủy tinh 250 ml mỗi bình chứa 90 ml môi trường, và được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, sau đó để nguội;

Từ chủng giống nấm cấp 1, dùng que cấy vô trùng gạt phần nấm trắng cho vào 10 bình tam giác 250 ml chứa 90 ml môi trường MT1, thời gian nuôi cấy 3 ngày, nhiệt độ 25°C , tốc độ lắc 150 vòng/phút, ánh sáng ~ 500 lux, thu được giống cấp 2. Giống cấp 2 là các sợi nấm nhỏ li ti màu trắng, lơ lửng trong môi trường.

Giống cấp 2 được lên men trong bình phản ứng sinh học với dung tích 3 lít, thành phần 1 lít môi trường MT1 bao gồm:

Glucose: 40 g

Pepton: 8 g

KH_2PO_4 : 1 g

MgSO_4 : 0,5 g

pH: $6,0 \pm 0,2$

Với tỷ lệ cấp giống là 8%, nguồn nitơ là pepton, nguồn cacbon là đường glucose, nồng độ oxy được kiểm soát bằng cách điều chỉnh tốc độ khuấy với độ bão hòa không khí là 10%, nhiệt độ điều chỉnh trong quá trình lên men nằm trong khoảng 25°C , pH 6, thời gian lên men 15 ngày, tốc độ khuấy 150 vòng/phút.

Ví dụ 2: Thu hồi và hoàn thiện sản phẩm lên men từ nấm *Cordyceps militaris*

Trong quá trình lên men, ban đầu hình thành các mảnh sợi nấm nhỏ li ti, sau đó sợi nấm lớn lên, liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, do đó chúng tôi tiến hành lọc sản phẩm lên men bằng vải lọc, thu sinh khối.

Sinh khối thu được đem đi đông khô với điều kiện nhiệt độ -49°C , áp suất chân không 13,3 Pa thu được bột sinh khối nấm *C. militaris* có màu sắc vàng nhạt, mùi thơm đặc trưng và vị hơi ngọt. Chất lượng sản phẩm bột sinh khối sau lên men: độ ẩm đạt 5-

5-6%, hàm lượng cordycepin đạt 1,6 mg/g, adenosin đạt 2,8 mg/g. Các chỉ tiêu về aflatoxin, vi sinh vật như *E. coli*, *Coliform*, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn hiếu khí nằm trong ngưỡng cho phép của Bộ y tế về đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, có khả năng áp dụng để lên men chìm sản phẩm nấm *Cordyceps militaris* bằng cách lựa chọn môi trường, điều kiện nuôi cấy thích hợp. Việc lên men chìm nấm *Cordyceps militaris* giúp tăng sản lượng hệ sợi thu được trên cùng một diện tích thí nghiệm sử dụng so với phương pháp lên men rắn, đồng thời rút ngắn thời gian nuôi cấy và dễ kiểm soát.

Quy trình theo giải pháp hữu ích có khả năng áp dụng trên quy mô công nghiệp, góp phần làm đa dạng hóa các sản phẩm chức năng từ một loài nấm quý trên thị trường Việt Nam và thế giới.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* bao gồm các bước:

a) phân lập nấm *Cordyceps militaris*:

chọn quả thể nấm đông trùng hạ thảo có kích thước to khỏe, không bệnh, màu vàng đậm, dùng dao cắt đã khử trùng cắt thành các đoạn nhỏ có kích thước 2-5 mm, ngâm các đoạn nhỏ này trong dung dịch cồn 1 phút và tiếp tục ngâm rửa trong nước cất khử trùng 3 lần, mỗi lần trong 1 phút thu được các phân đoạn nấm;

dùng banh kẹp gấp các phân đoạn nấm đã làm sạch cho vào đĩa petri chứa môi trường PDA, có thành phần (trong 1 lít) bao gồm:

Glucose: 40 g

Nước chiết khoai tây: 300 ml

Thạch (agar): 20 g

pH: $5,1 \pm 0,2$;

sau đó ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong khoảng 5-7 ngày để sợi nấm phát triển, sau đó lựa chọn chủng nấm phát triển tốt làm giống nấm gốc rồi cấy và bảo quản trong ống thạch nghiêng ở nhiệt độ 4°C thu được chủng giống nấm cấp 1;

b) lên men chìm nấm *Cordyceps militaris*

chuẩn bị môi trường lỏng MT1 có thành phần (trong 1 lít) như sau:

Glucose: 40 g

Pepton: 8 g

KH_2PO_4 : 1 g

MgSO_4 : 0,5 g

pH: $6,0 \pm 0,2$,

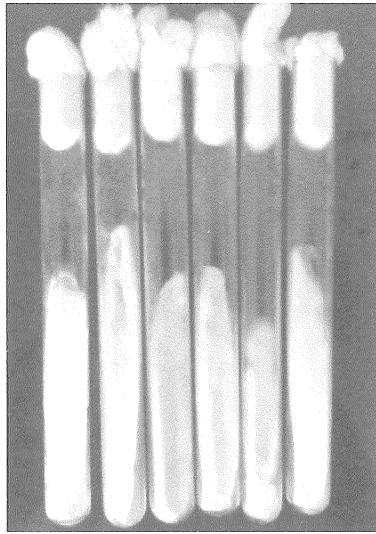
cấy chủng giống nấm cấp 1 thu được ở bước a) vào các bình tam giác 250 ml chứa 90 ml môi trường MT1 trong thời gian 3 ngày, nhiệt độ 25°C , tốc độ lắc 120 vòng/ phút, ánh sáng ~ 500 lux, thu được giống cấp 2;

lên men giống cấp 2 trong các bình phản ứng sinh học dung tích 3 lít chứa môi trường MT1 nêu trên để thu được sinh khối nấm; trong đó, tỷ lệ cấp giống là 8%, nguồn nitơ là pepton, nguồn cacbon là đường glucoza, nồng độ oxy được kiểm soát bằng cách điều chỉnh tốc độ khuấy với độ bão hòa không khí là 10%, nhiệt độ điều chỉnh trong quá trình lên men nằm trong khoảng 25°C, pH 6, thời gian lên men 15 ngày, tốc độ khuấy 150 vòng/phút;

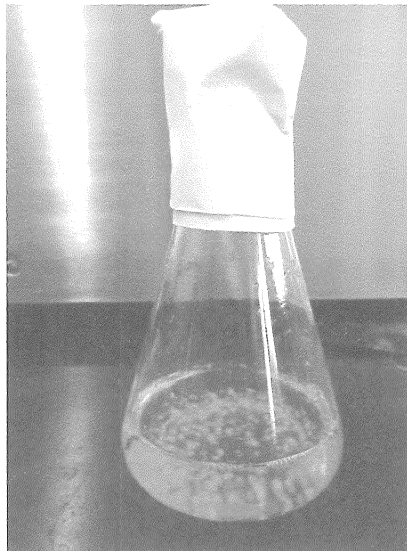
c) thu hồi và hoàn thiện sản phẩm lên men:

sinh khối nấm sau khi nuôi cấy chứa các sợi nấm liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, được lọc bằng vải lọc để thu sinh khối nấm, sau đó sinh khối nấm được đông khô ở điều kiện nhiệt độ -49°C, áp suất chân không 13,3 Pa thu được bột sinh khối nấm đông trùng hạ thảo.

Hình 1



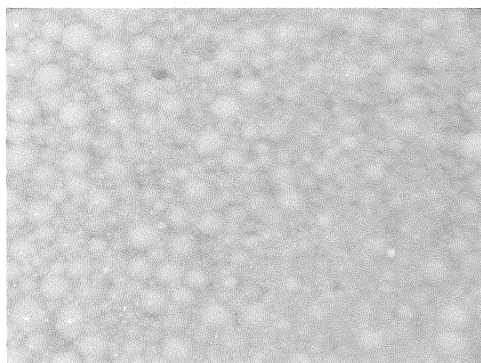
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5

