

NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM NUÔI TRỒNG NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris*) TRÊN CÁC NGUỒN ĐẠM THỰC VẬT

Nguyễn Trần Đức Duy*, Lương Thị Ngọc Hân, Đỗ Thị Như Thảo, Nguyễn Anh Thư, Nguyễn Phạm Trúc Phương, Nguyễn Thị Loan, Hoàng Đắc Hiệt

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, Ban quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao

TÓM TẮT

Ngày nay, ngành nuôi trồng nhân tạo nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) đang phát triển rất mạnh mẽ ở nước ta và các quốc gia trên thế giới để phục vụ cho các nhu cầu sản xuất dược liệu cũng như là thực phẩm. Nếu sử dụng các nguồn đạm từ bột ngũ cốc hoặc phế phẩm từ ngành công nghiệp sản xuất hạt ngũ cốc để sản xuất nấm nhộng trùng thảo thì sẽ có được nguồn nguyên liệu dồi dào, giá thành rẻ, phù hợp sản xuất quy mô công nghiệp. Do đó, nhiệm vụ nghiên cứu khoa học “Nghiên cứu thử nghiệm nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên các nguồn đạm thực vật” được thực hiện với mục đích tìm ra nguồn nguyên liệu thực vật thay thế nhộng tằm tươi vào môi trường nuôi cấy nhằm chủ động được nguồn nguyên liệu giúp giảm chi phí sản xuất nhưng nấm vẫn có giá trị dinh dưỡng và dược liệu. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng bột đậu nành là nguồn đạm phù hợp để thay thế nhộng tằm để bổ sung vào thành phần môi trường nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo. Công thức sử dụng: gạo lứt 30 g/hộp, bột đậu nành 2,55 g/hộp, 60 mL dung dịch dinh dưỡng (dịch chiết rong phổ tai 9,02 g/L, CaCl_2 0,1 g/L, axit folic 5 $\mu\text{g/L}$). Năng suất và chất lượng nấm nhộng trùng thảo nuôi trồng bằng bột đậu nành: khối lượng khô quả thể đạt: 5,86 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 2933 mg/kg, hàm lượng adenosine đạt: 146 mg/kg sau 50 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Bã đậu, bột đậu nành, *Cordyceps militaris*, khô đậu nành, nuôi trồng bán rắn.

MỞ ĐẦU

Nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* trong vài năm gần đây được nuôi trồng rất phổ biến, loài nấm này vừa có giá trị dược liệu cao vừa dễ dàng nuôi trồng trong môi trường nhân tạo. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu quan trọng về gen, nhu cầu dinh dưỡng, môi trường nuôi cấy, các đặc tính sinh hóa và dược lý của nấm *C. militaris*. Gần đây, bộ gen hoàn chỉnh của *C. militaris* cũng được giải trình tự làm cơ sở cho nhiều nghiên cứu sâu hơn về loài nấm này. Ngày nay, với sự phát triển của y học hiện đại, các thành phần hợp chất trong *Cordyceps* đã được xác định có hoạt chất sinh học quý giá như: Cordycepin có tác dụng ức chế sự phân hạch và trì hoãn sự lây lan của các tế bào ung thư, Adenosine có tác dụng điều hòa miễn dịch, bảo vệ tim mạch, manitol làm tăng độ thấm thấu của huyết tương và dịch trong ống thận, gây lợi niệu thẩm thấu và làm tăng lưu lượng máu thận, ... (Đỗ Tuấn Bách et al., 2017).

Nhộng trùng thảo là loài nấm ký sinh côn trùng không bắt buộc, trong tự nhiên, nấm *C. militaris* ký sinh trên cơ thể ấu trùng hoặc nhộng của một số loại sâu bướm. Để sản xuất quy mô lớn về số lượng quả thể nấm nhộng trùng thảo hiện nay người ta sử dụng môi trường bán rắn bao gồm gạo lứt, bột nhộng tằm và một số khoáng chất tổng hợp bổ sung (Nguyễn Thị Minh Hằng, Bùi Văn Thắng, 2017). Tuy nhiên, giá thành của nguồn nguyên liệu nhộng tằm khá cao, yêu cầu bảo quản nhộng tằm tươi trong tủ đông, do đó gây khó khăn cho việc sản xuất quy mô lớn đặc biệt là ở các vùng xa nguồn nguyên liệu này. Ngoài ra, sử dụng nguyên liệu nhộng tằm trong môi trường nuôi cấy có khả năng gây dị ứng cho một số người dùng có hệ miễn dịch quá mẫn với protein của nhộng hoặc một số ít người ăn thuần chay e ngại việc sử dụng nấm được nuôi trên cơ chất có chứa động vật. Mặt khác, các nguồn nguyên liệu giàu đạm như bột đậu nành, bã đậu nành ép dầu, bã đậu nành làm sữa đậu nành rất phổ biến với số lượng lớn. Nếu tận dụng nguồn ngũ cốc dồi dào hay phụ phẩm công nghiệp để sản xuất nấm nhộng trùng thảo thì sẽ có được nguồn nguyên liệu dễ tìm, dễ bảo quản, giá thành rẻ phù hợp sản xuất quy mô công nghiệp. Xuất phát từ mục tiêu đó, “Nghiên cứu thử nghiệm nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên các nguồn đạm thực vật” được tiến hành, nhằm xây dựng công thức môi trường có nguồn gốc thực vật để nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo có giá trị dinh dưỡng và dược liệu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng giống nấm *Cordyceps militaris* (Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao).

Nguyên liệu: gạo lứt đỏ huyết rồng (được cung cấp bởi công ty Gạo Mộng Tuyết, Long An), nhộng tằm tươi (được cung cấp bởi công ty Minh Linh, Lâm Đồng), bột đậu nành (được cung cấp bởi công ty thực phẩm Hòa

Phát, TP. Hồ Chí Minh), bã đậu nành ép dầu (được cung cấp bởi công ty Quang Dũng, TP. Hồ Chí Minh), bã đậu nành làm đậu hủ (được cung cấp bởi lò đậu hủ tươi tại chợ ấp 1, xã Phạm Văn Cội, TP. Hồ Chí Minh).

Phương pháp nghiên cứu

Xác định nguồn đạm thực vật phù hợp cho nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo

Thí nghiệm được bố trí dựa trên môi trường cơ bản: Gạo lứt 30 g, nhộng tằm 5 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL (CaCl₂ 0,1 g/L, axit folic 5 µg/L). Các nguồn đạm sử dụng trong nghiên cứu: bột đậu nành, bã đậu nành sau khi ép dầu, bã đậu nành làm đậu hủ. Các nguyên liệu này sẽ được phân tích hàm lượng N tổng số và các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm như hàm lượng kim loại nặng Pb, Hg, As, Cd, hàm lượng độc tố aflatoxin tổng, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2.

Kết quả phân tích sẽ làm cơ sở để chọn ra nguồn nguyên liệu và hàm lượng sử dụng sao cho nguồn nguyên liệu đạt an toàn vệ sinh thực phẩm và hàm lượng N tổng số có trong nguyên liệu bằng với hàm lượng N của nhộng tằm sử dụng trong nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 50 hộp, lặp lại thí nghiệm 3 lần.

- Đối chứng dương là môi trường cơ bản: Gạo lứt 30 g, nhộng tằm 5 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL (CaCl₂ 0,1 g/L, axit folic 5 µg/L).

- Đối chứng âm là môi trường cơ bản nhưng không bổ sung nhộng tằm: Gạo lứt 30 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL (CaCl₂ 0,1 g/L, axit folic 5 µg/L).

- Nghiệm thức thí nghiệm là nguồn đạm thay thế nhộng + môi trường cơ bản (không bổ sung nhộng tằm).

Chỉ tiêu theo dõi:

- Khối lượng khô quả thể (g/hộp).

- Hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô (mg/kg).

Khảo sát hàm lượng các nguồn đạm

Hàm lượng nitơ được xác định bằng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 10034:2013. Từ kết quả phân tích hàm lượng N, các nguyên liệu thay thế cho nhộng tằm được xác định với khối lượng là X1, X2, X3 (g). Tiến hành thí nghiệm với khối lượng nguyên liệu thay thế là 50, 75, 100, 125, 150% khối lượng sử dụng ở nội dung trên. Mỗi nghiệm thức 50 hộp, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Các nghiệm thức với nguồn đạm và hàm lượng sử dụng như ở Bảng 1.

Bảng 1. Các hàm lượng khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Nguồn đạm	Khối lượng nguồn đạm (g/hộp)
NT2.1		0,5 X1
NT2.2		0,75 X1
NT2.3	Bột đậu nành	1 X1
NT2.4		1,25 X1
NT2.5		1,5 X1
NT2.6		0,5 X2
NT2.7		0,75 X2
NT2.8	Bã đậu nành ép dầu	1 X2
NT2.9		1,25 X2
NT2.10		1,5 X2
NT2.11		0,5 X3
NT2.12		0,75 X3
NT2.13	Bã đậu nành làm đậu hủ	1 X3
NT2.14		1,25 X3
NT2.15		1,5 X3

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng khô quả thể (g/hộp). Hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô (mg/kg).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định nguồn đạm thực vật phù hợp cho nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo

Đánh giá an toàn vệ sinh thực phẩm của các nguồn đạm thực vật và xác định hàm lượng nitơ có trong các loại nguồn đạm

Trước khi được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm thì các nguồn đạm sẽ được phân tích các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm nhằm đánh giá mức độ an toàn của các nguồn nguyên liệu trên cơ sở đó để chọn lựa nguồn nguyên liệu phù hợp. Phân tích được thực hiện tại phòng Phân tích kiểm nghiệm Nông sản thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao. Kết quả phân tích (Bảng 2) cho thấy: không phát hiện kim loại nặng Pb, Hg, As, Cd; hàm lượng độc tố aflatoxin tổng, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin trong 3 nguồn nguyên liệu: bột đậu nành (BĐN), bã đậu nành sau khi ép dầu (khô nành/KN), bã đậu nành làm đậu hũ (bã đậu/BĐ). Như vậy, các nguồn đạm từ thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là an toàn và có thể sử dụng để làm nguyên liệu nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo.

Bảng 2. Kết quả phân tích các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm của các nguồn đạm từ thực vật

Chỉ tiêu	Phương pháp	Đơn vị	LOD (mg/kg)	Nguồn đạm		
				KN	BĐN	BĐ
Pb	Ref AOAC 999.10	mg/kg	0,0075	ND	ND	ND
Hg	Ref AOAC 971.21	mg/kg	0,012	ND	ND	ND
As	Ref AOAC 986.15	mg/kg	0,016	ND	ND	ND
Cd	Ref AOAC 999.10	mg/kg	0,003	ND	ND	ND
Aflatoxin tổng	TCVN 7596:2007	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin B1	TCVN 7596:2008	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin B2	TCVN 7596:2009	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin G1	TCVN 7596:2010	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin G2	TCVN 7596:2011	µg/kg	0,5	ND	ND	ND

Ghi chú: KN: Khô nành, BĐN: Bột đậu nành, BĐ: Bã đậu, ND: Not Detected.

Các nguyên liệu bã đậu nành sau khi ép dầu (khô nành/KN), bột đậu nành (BĐN), bã đậu nành làm đậu hũ (bã đậu/BĐ) và nhộng tằm tươi được phân tích bằng phương pháp Kjeldahl TCVN 10034:2013 để xác định chính xác hàm lượng nitơ có trong mỗi loại làm cơ sở để xác định hàm lượng sử dụng phù hợp cho thí nghiệm. Kết quả phân tích ở Bảng 3 cho thấy hàm lượng nitơ có trong nguyên liệu khô nành là cao nhất (7,15%) và thấp nhất là trong nguyên liệu nhộng tằm tươi (1,94%). Dựa vào kết quả này, tính ra được hàm lượng nguồn đạm được sử dụng cho thí nghiệm khảo sát các nguồn đạm sao cho hàm lượng N tổng số có trong nguyên liệu thực vật bằng với hàm lượng N của nhộng tằm (Bảng 3).

Bảng 3. Hàm lượng nitơ có trong các nguyên liệu khảo sát nguồn đạm phù hợp

Nguyên liệu	Hàm lượng Nitơ (%)	Hàm lượng quy đổi để sử dụng cho thí nghiệm (gram/hộp)
Nhộng tằm tươi	1,94	5
Bột đậu nành (X1)	5,71	1,70
Khô nành (X2)	7,15	1,36
Bã đậu (X3)	2,23	4,35

Ảnh hưởng của các nguồn đạm lên quá trình sinh trưởng của nấm nhộng trùng thảo

Khi tơ nấm nhộng trùng thảo đã lan kín hộp và lan dày ở bề mặt, chuyển qua phòng nuôi với các điều kiện chiếu sáng 500 – 700 lux, chu kỳ chiếu sáng 12 giờ sáng/tối, nhiệt độ 18-20°C, độ ẩm được duy trì bằng máy tạo ẩm khoảng 80-85%. Để đánh giá tiềm năng thay thế nhộng tằm của các nguồn đạm từ thực vật, thí nghiệm được bố trí trên môi trường cơ bản với đối chứng dương là môi trường có sử dụng nhộng tằm tươi và đối chứng âm không bổ sung nhộng tằm.

Sau 24 giờ được cấy vào môi trường bán rắn, hệ sợi của nấm nhộng trùng thảo (NTT) bắt đầu lan ra bề mặt môi trường dinh dưỡng và tốc độ tăng trưởng diễn ra nhanh trong vài ngày kế tiếp. Hệ tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường sau khoảng 5 - 8 ngày nuôi cấy. Mật độ hệ sợi, màu sắc hệ sợi không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khảo sát. Ở ba loại nguồn đạm khảo sát, thời gian lan tơ của hệ sợi chậm hơn so với nghiệm thức đối chứng dương (5,33 ngày) và nhanh hơn so với nghiệm thức đối chứng âm (7,67 ngày), bên cạnh đó nếu so sánh thời gian lan tơ của hệ sợi giữa 3 loại nguồn đạm khác nhau (khô nành, bột đậu nành, bã đậu thì hầu như không có sự khác biệt (6,33 – 6,67 ngày). Yếu tố giúp hệ sợi phát triển nhanh trong môi trường bán rắn là sự thông thoáng của khối cơ chất và tỷ lệ

các thành phần dinh dưỡng có trong môi trường. Cả ba nguyên liệu khô nành, bột đậu nành, bã đậu đều có thành phần dinh dưỡng cao và tạo được độ xốp cho môi trường nên phù hợp cho hệ sợi nấm phát triển. Tốc độ phát triển, mật độ hệ sợi và màu sắc của hệ sợi của nấm *C. militaris* khi được nuôi trên 5 công thức môi trường được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Đặc điểm sinh trưởng hệ sợi nấm trên các công thức dinh dưỡng

Nghiệm thức	Thời gian đầy tơ (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi
ĐC âm	7,67 ^a ± 0,58	Hệ sợi phát triển chậm, thời gian lan xuống đáy hộp lâu, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
ĐC dương	5,33 ^b ± 0,58	Hệ sợi phát triển mạnh, ăn lan ra bề mặt môi trường nhanh, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Khô nành	6,67 ^{ab} ± 0,58	Hệ sợi phát triển tốt, ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Bột đậu nành	6,33 ^{ab} ± 0,58	Hệ sợi phát triển tốt, ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Bã đậu	6,67 ^{ab} ± 0,58	Hệ sợi phát triển tốt ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam khi chiếu sáng.

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Tốc độ phát triển quả thể nhanh nhất ở tất cả các lô thí nghiệm từ ngày 20 đến 35 sau khi cấy vào môi trường bán rắn. Từ lúc hình thành mầm quả thể cho đến ngày thứ 35, đầu quả thể luôn nhọn và hướng thẳng lên phía trên. Vì giai đoạn này, quả thể nấm đang thời gian sinh trưởng và tăng trưởng về chiều cao cũng như đường kính. Từ sau ngày 35 đến ngày 50 tốc độ tăng trưởng chiều cao chậm lại, đầu quả thể bắt đầu chuyển từ nhọn sang dạng tròn. Sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu quả thể nấm và ghi nhận các đặc điểm chiều cao quả thể, hình dạng quả thể. Sau đó tiến hành sấy nấm bằng phương pháp sấy thăng hoa để xác định khối lượng khô (KLK) quả thể/ hộp và phân tích hàm lượng hoạt chất trong quả thể khô.

Bảng 5. Khối lượng khô quả thể nấm trên các môi trường khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Chiều cao quả thể (cm)	KLK quả thể (gram/hộp)	Đặc điểm quả thể
ĐC âm	4,40 ^b ± 0,23	2,64 ^b ± 0,32	Quả thể ngắn, nhỏ, chẻ ngọn, màu cam đậm, quả thể mọc nghiêng nhiều hơn mọc thẳng
ĐC dương	6,45 ^a ± 0,21	5,82 ^a ± 0,28	Quả thể to, dài, mọc thẳng, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
Khô nành	5,93 ^a ± 0,28	5,59 ^a ± 0,18	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, một ít quả thể mọc nghiêng, màu cam đậm
Bột đậu nành	6,30 ^a ± 0,18	5,74 ^a ± 0,14	Quả thể to, mọc thẳng, đầu tròn, màu cam đậm
Bã đậu	6,06 ^a ± 0,22	5,68 ^a ± 0,22	Quả thể to, đầu tròn, mọc thẳng, chênh lệch chiều dài quả thể nhiều, màu cam đậm

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Kết quả ghi nhận ở Bảng 5 cho thấy, ở ba nghiệm thức khảo sát nguồn đạm, chiều cao quả thể không có sự khác biệt về mặt thống kê so với đối chứng dương và cao hơn đối chứng âm (có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê). Khối lượng khô quả thể nấm NTT cao nhất ở nghiệm thức đối chứng dương (5,82 ± 0,28 g/hộp) và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm (2,64 ± 0,32 g/hộp), sự khác biệt này là có ý nghĩa về mặt thống kê. Ở ba nghiệm thức nguồn đạm thay thế nhộng tằm, khối lượng khô quả thể cao nhất ở nghiệm thức bột đậu nành (5,74 g/hộp), kế tiếp là nghiệm thức bã đậu (5,68 g/hộp) và nghiệm thức khô nành thấp nhất (5,59 g/hộp), tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

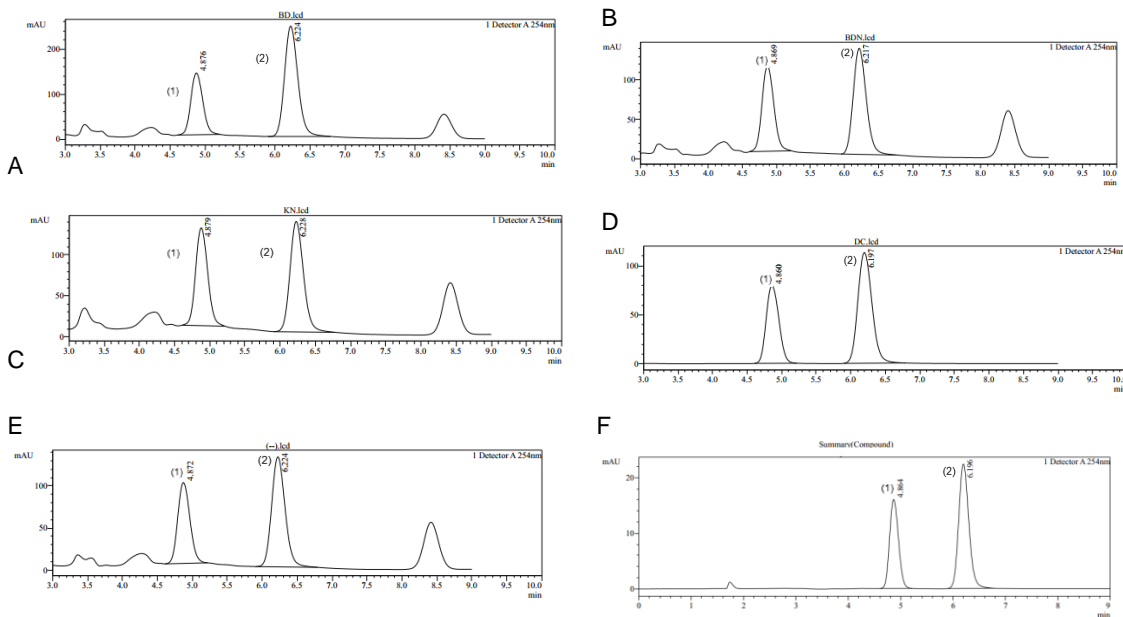
Kết quả ghi nhận trong Bảng 6 cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Nghiệm thức đối chứng âm có hàm lượng cordycepin thấp nhất (933 mg/kg), tiếp theo là nghiệm thức bã đậu (1998 mg/kg), nghiệm thức khô nành (2093 mg/kg), đối chứng dương (2701 mg/kg) và cao nhất là ở nghiệm thức bột đậu nành (2869 mg/kg). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của tác giả Sripilai và đồng tác giả (2023), việc bổ sung bột đậu nành vào môi trường nuôi cấy giúp tăng hàm lượng cordycepin của nấm so với nghiệm thức đối chứng (Sripilai *et al.*, 2023). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Lim và đồng tác giả (2012) cho thấy đậu nành và lúa mì được bổ sung dinh dưỡng là cơ chất tốt nhất cho sự tạo thành adenosine, cordycepin và D-mannitol của *C. militaris* khi được nuôi trên môi trường bán rắn (Lim *et al.*, 2012). Nguyễn Thị Bích Hằng và đồng tác giả (2023), xác định bã đậu nành là nguồn nguyên liệu phù hợp để bổ sung vào môi trường bán rắn nuôi trồng tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo, năng suất nấm tăng 2,6% so với môi

trường đối chứng không bổ sung bã đậu nành (Nguyễn Thị Bích Hằng et al., 2023). Hàm lượng adenosine cũng có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Nghiệm thức đối chứng âm có hàm lượng adenosine thấp nhất (126 mg/kg), tiếp theo là nghiệm thức bã đậu (173 mg/kg), nghiệm thức bột đậu nành (174 mg/kg), nghiệm thức khô nành (183 mg/kg) và cao nhất là ở nghiệm thức đối chứng dương (216 mg/kg). Trong ba nguồn đạm khảo sát, hàm lượng adenosine ở nghiệm thức khô nành là cao nhất, tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Bảng 6. Hàm lượng cordycepin, adenosine ghi nhận được trong thí nghiệm khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Hàm lượng cordycepin (mg/kg)	Hàm lượng adenosine(mg/kg)
ĐC âm	933 ^c ± 65	126 ^b ± 11
ĐC dương	2701 ^a ± 107	216 ^a ± 29
Khô nành	2093 ^b ± 110	183^{ab} ± 11
Bột đậu nành	2869^a ± 122	174 ^{ab} ± 22
Bã đậu	1998 ^b ± 103	173 ^{ab} ± 21

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với $P > 0,05$.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu phân tích hàm lượng cordycepin, adenosine

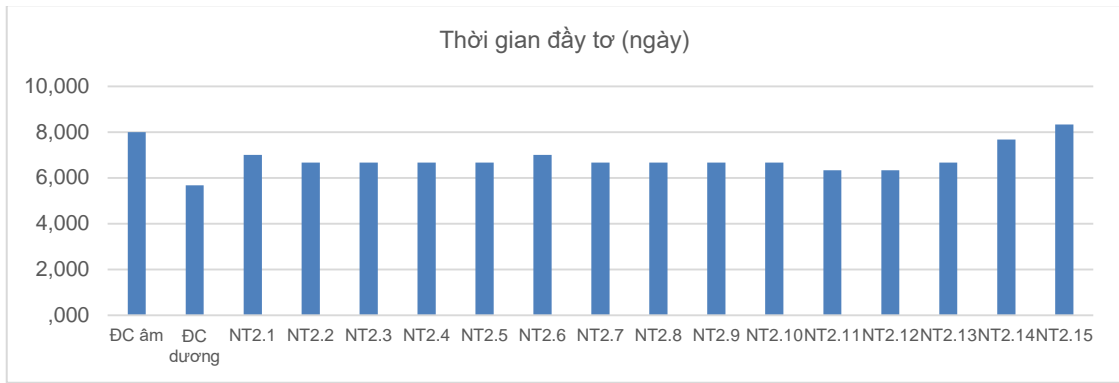
A: Bã đậu. B: Bột đậu nành. C: Khô nành. D: Đối chứng dương. E: Đối chứng âm.
F: Chất chuẩn adenosine và cordycepin. (1) adenosine. (2) cordycepin

Như vậy, dựa vào kết quả ghi nhận được của các chỉ tiêu thời gian lan tở của hệ sợi, số lượng mầm quả thể, đặc điểm sinh trưởng của quả thể, chiều cao quả thể, khối lượng khô quả thể và hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô thì cả ba loại nguồn đạm khảo sát đều có tiềm năng sử dụng để thay thế nhộng tằm tươi trong nuôi trồng tạo quả thể nấm NTT.

Khảo sát nồng độ các nguồn đạm

Từ kết quả khảo sát các nguồn đạm thực vật phù hợp ở nội dung trên, hàm lượng các nguồn đạm sẽ được khảo sát ở 5 mức: 0,5; 0,75; 1; 1,25 và 1,5 lần (bảng 1). Kết quả của thí nghiệm sẽ giúp chọn được nguồn đạm và nồng độ phù hợp nhất để sử dụng cho môi trường nuôi trồng nấm NTT. Bên cạnh đó, vẫn tiếp tục bố trí nghiệm thức đối chứng âm và nghiệm thức đối chứng dương như nội dung trên để làm căn cứ đánh giá và so sánh kết quả.

Sau 24 giờ được cấy vào môi trường bán rắn, hệ sợi của nấm NTT bắt đầu lan ra bề mặt môi trường dinh dưỡng và tốc độ tăng trưởng diễn ra nhanh trong những ngày kế tiếp. Hệ tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường và ăn sâu xuống khối cơ chất sau khoảng 5 - 9 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức. Tỷ lệ nhiễm trong thí nghiệm này vẫn trong khoảng 0 - 4% và không khác biệt giữa các nghiệm thức khác nhau. Trong thí nghiệm này, mật độ hệ sợi, màu sắc hệ sợi có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, đặc biệt là đối với nguồn đạm bã đậu. Thời gian hệ sợi nấm phủ kín khối cơ chất của hệ sợi của nấm *C. militaris* được nuôi trên 17 công thức môi trường được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Thời gian lan tơ hệ sợi nấm trên các công thức dinh dưỡng

Thời gian lan tơ của hệ sợi chậm nhất ở nghiệm thức NT2.15 (bã đậu nồng độ 1,5 – 6,52 g/ hộp) với thời gian 8,33 ngày, lâu hơn cả nghiệm thức đối chứng âm (8 ngày). Thời gian lan tơ nhanh nhất ở nghiệm thức đối chứng dương. Ở các nghiệm thức sử dụng bã đậu, sự chênh lệch về thời gian lan tơ là rất rõ rệt. Nghiệm thức có nồng độ bã đậu thấp (NT2.11 và NT2.12) thì hệ sợi phát triển rất nhanh, hệ sợi phủ kín bề mặt cơ chất chỉ sau 6,33 ngày. Tuy nhiên khi tăng nồng độ bã đậu từ 1 đến 1,5 lần (NT2.13, NT2.14, NT2.15) thì thời gian lan tơ chậm dần, hệ sợi có nhiều sợi nấm khí sinh và màu sắc của hệ sợi sau khi được kích sáng cũng nhạt hơn so với các nghiệm thức ở nồng độ thấp. Việc bổ sung quá nhiều bã đậu vào môi trường nuôi cấy (NT2.14 là 5,44 g/ hộp, NT2.15 là 6,52 g/ hộp) có thể đã ảnh hưởng đến ẩm độ và độ thông thoáng của khối cơ chất, do đó tác động mạnh lên sự tăng trưởng của hệ sợi. Đối với 2 nguồn nguyên liệu khô nành và bột đậu nành, thời gian lan tơ của hệ sợi không bị ảnh hưởng nhiều bởi hàm lượng của nguồn đạm bổ sung và thời gian lan tơ trong khoảng 6 - 7 ngày.

Sau 5-7 ngày được chiếu sáng, mầm quả thể sẽ được hình thành. Mật độ mầm quả thể không khác biệt nhiều giữa các nghiệm thức, dao động trong khoảng 30 - 85 mầm/ hộp đối với các nghiệm thức đối chứng âm, đối chứng dương, khô nành ở 5 nồng độ khảo sát, bột đậu nành ở 5 nồng độ khảo sát. Riêng với nguyên liệu bã đậu, mầm quả thể dao động trong khoảng 30 - 85 mầm/ hộp đối ở các nồng độ bã đậu thấp (NT2.11, NT2.12, NT2.13), ở nồng độ bã đậu cao NT2.14, NT2.15 số lượng mầm quả thể ghi nhận được trong khoảng 15 – 40 mầm/ hộp. Sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu quả thể nấm và ghi nhận các chỉ tiêu chiều cao quả thể, hình dạng quả thể.

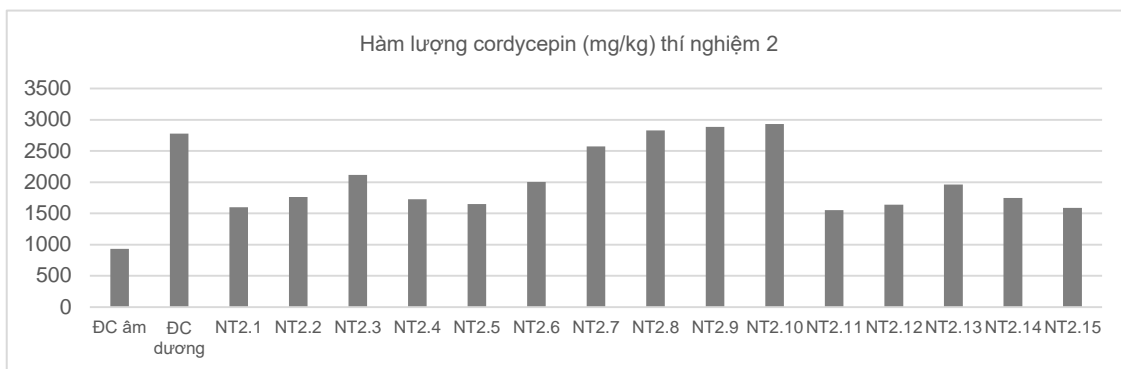
Bảng 7. Chiều cao quả thể, khối lượng khô quả thể, đặc điểm quả thể trên các môi trường khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Chiều cao quả thể (cm)	KLK quả thể (gram/hộp)	Đặc điểm quả thể
ĐC âm	3 – 6	2,62 ^c ± 0,22	Quả thể nhỏ, đầu tròn, màu cam
ĐC dương	5 – 8	5,85 ^a ± 0,26	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.1	4 – 7	5,27 ^{ab} ± 0,24	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.2	4 – 7	5,48 ^a ± 0,25	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.3	4 – 7	5,61 ^a ± 0,21	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.4	5 – 8	5,68 ^a ± 0,19	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.5	5 – 8	5,70 ^a ± 0,25	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.6	4 – 7	5,49 ^a ± 0,19	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.7	4 – 7	5,68 ^a ± 0,17	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.8	4 – 7	5,73 ^a ± 0,20	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.9	5 – 8	5,84^a ± 0,19	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.10	4 – 7	5,86^a ± 0,15	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.11	4 – 7	5,31 ^{ab} ± 0,25	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.12	4 – 7	5,43 ^{ab} ± 0,30	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.13	4 – 7	5,69 ^a ± 0,23	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.14	5 – 7	5,62 ^a ± 0,23	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm, số lượng quả thể ít
NT2.15	5 – 7	4,77 ^b ± 0,16	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm, số lượng quả thể ít

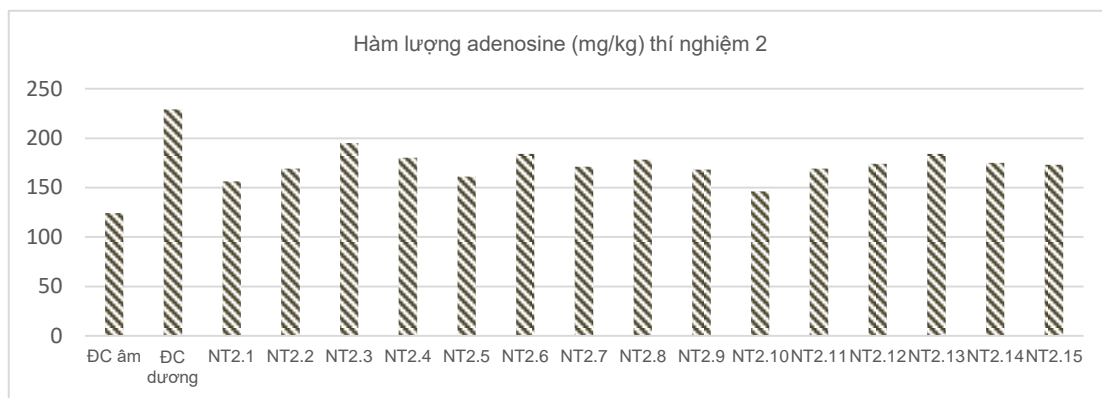
Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Kết quả ghi nhận ở Bảng 7 cho thấy, khối lượng khô quả thể nấm NTT ở các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê ($P \leq 0,05$). Ở 15 nghiệm thức khảo sát nồng độ nguồn đạm, khối lượng khô quả thể nấm đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm. Điều này chứng tỏ khô nành, bột đậu nành, bã đậu là nguồn đạm phù hợp để nuôi trồng nấm NTT. Ở nghiệm thức bổ sung bột đậu nành nồng độ cao 1,25 lần – NT2.9 (5,84 g/hộp) và 1,5 lần – NT2.10 (5,86 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm ghi nhận được tương đương với đối chứng dương (5,86 g/hộp). Nghiệm thức bã đậu nồng độ 1,5 lần (NT2.15) có khối lượng khô quả thể thấp nhất (4,77 g/hộp) trong 15 nghiệm thức khảo sát.

Nếu xét về từng loại nguồn đạm, đối với nguồn nguyên liệu khô nành, kết quả cho thấy, khối lượng khô quả thể tăng dần (5,27 – 5,70 g/hộp) khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1,5 lần. Tương tự, đối với nguồn nguyên liệu bột đậu nành khối lượng khô quả thể cũng tăng dần (5,49 – 5,86 g/hộp) khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1,5 lần. Như vậy, khi tăng nồng độ dinh dưỡng thì giúp sợi nấm phát triển mạnh hơn, năng suất nấm cao hơn, mức dinh dưỡng phù hợp là trong khoảng 1- 1,5 lần. Đối với nguyên liệu bã đậu, khối lượng khô quả thể tăng khi tăng nồng độ từ 0,5 – 1 (5,31 – 5,69 g/hộp), tiếp tục tăng nồng độ từ 1 – 1,5 thì khối lượng khô quả thể lại giảm dần (5,69 – 4,77 g/hộp). Điều này có thể giải thích là vì khi cho quá nhiều bã đậu vào môi trường nuôi cấy sẽ ảnh hưởng đến độ ẩm của môi trường vì bã đậu ở dạng khô hút nhiều nước. Bên cạnh đó cấu trúc của bã đậu khi gặp dung dịch dinh dưỡng sẽ nở ra và lấp đầy các khoảng trống của môi trường bán rắn làm cho môi trường mất đi độ rỗng, xốp, làm ảnh hưởng đến sự lan tỏa của hệ sợi dẫn đến giảm năng suất nấm.



Hình 3. Biểu đồ hàm lượng cordycepin có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm



Hình 4. Biểu đồ hàm lượng adenosine có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm

Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể nấm cho thấy, ở 15 nghiệm thức khảo sát nồng độ nguồn đạm, hàm lượng hoạt chất đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm. Hàm lượng hoạt chất có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm được thể hiện trong Hình 3 và Hình 4.

Trong ba nguồn đạm khảo sát, hàm lượng cordycepin ghi nhận ở các nghiệm thức sử dụng bột đậu nành là cao nhất, khi tăng nồng độ bột đậu nành (từ 0,5 – 1,5 lần) thì hoạt chất cordycepin cũng tăng dần (2006 – 2933 mg/kg). Ở các nghiệm thức khô nành và bã đậu, hàm lượng cordycepin thấp hơn và khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1 lần thì hoạt chất tăng (KN: 1596 – 2118 mg/kg; BĐ: 1552 – 1965 mg/kg), tiếp tục tăng nồng độ nguồn đạm 1- 1,5 thì hoạt chất giảm dần (KN: 2118 – 1651 mg/kg; BĐ: 1965 – 1589 mg/kg). Mặt khác, hàm lượng adenosine thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm và cao nhất đối chứng dương, lần lượt là 124 – 229 mg/kg. Các nghiệm thức khảo sát có hàm lượng adenosine trong khoảng 146 – 195 mg/kg. Các nghiệm thức khô nành, bã đậu khi tăng nồng độ từ 0,5 – 1 lần thì hàm lượng adenosine tăng, tiếp tục tăng nồng độ 1 – 1,5 lần thì hàm lượng adenosine sẽ giảm. Các nghiệm thức bột đậu nành, khi tăng nồng độ nguồn đạm thì hàm lượng adenosine giảm dần.

KẾT LUẬN

Dựa vào các kết quả ghi nhận được của các chỉ tiêu khối lượng khô quả thể, hàm lượng cordycepin và adenosine, cả ba loại nguồn đạm khảo sát đều có tiềm năng sử dụng để thay thế nhộng tằm tươi trong nuôi trồng tạo quả thể nấm NTT. Nếu xét về giá trị kinh tế thì khô nành và bã đậu là 2 nguồn nguyên liệu phù hợp vì có giá thành rẻ. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu khô nành là ở mức 1,25 X2 (1,70 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,68 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 1765 mg/kg. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu bã đậu là ở mức 1 X1 (4,35 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,69 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 1965 mg/kg. Nếu xét về hàm lượng hoạt chất thì bột đậu nành là nguồn nguyên liệu phù hợp vì giúp làm tăng hàm lượng cordycepin so với đối chứng dương. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu bột đậu nành là ở mức 1,5 X3 (2,55 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,86 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 2933 mg/kg.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn bột đậu nành là nguồn đạm thay thế nhộng tằm tươi vì nguyên liệu này dễ tìm, giá thành rẻ hơn nhộng tằm tươi, cho năng suất tương đương nhộng tằm và nấm có được chất cordycepin cao. Nồng độ bột đậu nành sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo là 2,55 g/hộp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tuấn Bách, Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang, Hà Văn Hương, Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Duy Thuấn, Dương Văn Cường. (2017). Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*. *TNU Journal of Science Technology*, 161(01): 113-118.
- Lim L, Lee C, Chang E (2012). Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link (Ascomycetes). *International journal of medicinal mushrooms*, 14(2).
- Nguyễn Thị Bích Hằng, Triệu Thy Hòa, Đoàn Chí Cường (2023). Đặc điểm của nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) nuôi trồng trên cơ chất bã đậu nành. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 38-42.
- Nguyễn Thị Minh Hằng, Bùi Văn Thắng (2017). Nghiên cứu nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên giá thể tổng hợp và nhộng tằm.
- Sripilai K, Chaicharoenadomrung N, Phonchai R, Chueaphromsri P, Kunhorm P, Noisa P (2023). Development of an animal-free nitrogen source for the liquid surface culture of *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*, 76(5): oवाद053.

EXPERIMENTAL RESEARCH ON CULTIVATING *Cordyceps militaris* ON DIFFERENT PLANT-BASED NITROGEN SOURCES

Nguyen Tran Duc Duy^{*}, Luong Thi Ngoc Han, Do Thi Nhu Thao, Nguyen Anh Thu, Nguyen Pham Truc Phuong, Nguyen Thi Loan, Hoang Dac Hiet

Research and Development Center for Hi-tech Agriculture

SUMMARY

Nowadays, the artificial cultivation industry of *Cordyceps militaris* mushrooms is developing vigorously in our country and other countries around the world to serve the needs of both pharmaceutical production and food. If using sustainable sources such as cereal powder or by-products from the cereal grain industry to cultivate *Cordyceps militaris* mushrooms, abundant raw materials can be obtained, with low costs, suitable for industrial-scale production. Therefore, the scientific research task "Experimental research on cultivating (*Cordyceps militaris*) different plant-based nitrogen sources" is carried out with the aim of finding a vegetable raw material substitute for fresh silkworm pupae in the cultivation environment to actively manage the raw material source, helping to reduce production costs while maintaining the nutritional and medicinal value of the mushrooms. The research results show that soybean flour is a suitable protein source to replace silkworm pupae to supplement the cultivation environment, creating *Cordyceps militaris* mushroom fruit bodies. The concentration used: 30 g of brown rice/box, 2.55 g of soybean flour/box, 60 ml of nutrient solution (extracted seaweed extract 9.02 g/L, CaCl₂ 0.1 g/L, folic acid 5 µg/L). The yield and quality of *Cordyceps militaris* mushrooms cultivated on soybean flour: dry fruit body weight reached 5.86 g/box, cordycepin content reached 2933 mg/kg, adenosine content reached 146 mg/kg after 50 days of cultivation..

Keywords: Soybean meal, soybean meal powder, *Cordyceps militaris*, soybean residue, semi-sollic fermentation.

^{*} Author for correspondence: Tel: 0901.479.775; Email: duy.reus97@gmail.com