

**SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP.HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

**ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO – CÔNG DỤNG, XU HƯỚNG
SẢN XUẤT VÀ THƯƠNG MẠI**



Biên soạn: Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM

Với sự cộng tác của:

❖ **BS. Trần Văn Năm**

Phó Viện trưởng, Viện Y dược học Dân tộc TP.HCM

❖ **TS. Lê Thị Diệu Trang**

Phó Viện trưởng Viện NC Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM

TP.Hồ Chí Minh, 11/2014

MỤC LỤC

I. ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO TRONG Y HỌC	4
1. Tổng quan về đông trùng hạ thảo	4
1.1. Tên gọi	4
1.2. Nguồn gốc hình thành	4
1.3. Mô tả	5
1.4. Thành phần	5
2. Tác dụng dược lý của đông trùng hạ thảo theo y học hiện đại	8
2.1. Chống oxy hoá	8
2.2. Tác dụng kháng tế bào ung thư	8
2.3. Tác dụng chống mệt mỏi và stress	8
2.4. Tác dụng trên hệ hô hấp	8
2.5. Tác dụng chống sợi hoá gan	8
2.6. Tác dụng chống sợi hoá phổi	9
2.7. Tác dụng kích thích hệ miễn dịch	9
3. Ứng dụng đông trùng hạ thảo trong lâm sàng	9
II. NẤM DƯỢC LIỆU ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO – NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN	10
1. <i>Cordyceps sinensis</i>	10
2. <i>Cordyceps militaris</i>	13
2.1. Đặc điểm	13
2.2. Các nghiên cứu về nuôi cấy <i>Cordyceps militaris</i>	15
3. Các nghiên cứu về đông trùng hạ thảo tại Việt Nam	17
III. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ	17
1. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo thời gian	17
2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo quốc gia	18
3. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC	20
4. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo ở 4 quốc gia: Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Mỹ	21
5. Giới thiệu một số sáng chế về đông trùng hạ thảo	22
5.1. Sáng chế về nuôi cấy đông trùng hạ thảo	22
5.2. Sáng chế về ứng dụng đông trùng hạ thảo	22
IV. SẢN XUẤT ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (<i>Cordyceps militaris</i>) Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM	23

1. Mục đích thực hiện đề tài nghiên cứu “Sản xuất Đông trùng hạ thảo (<i>Cordyceps militaris</i>) ở quy mô phòng thí nghiệm”	23
2. Xây dựng quy trình nuôi cấy quả thể.....	24
2.1. Thời gian bắt đầu hình thành quả thể.....	24
2.2. Đặc điểm hình thái của quả thể nấm <i>C. militaris</i>	25
2.3. Năng suất quả thể sau nuôi cấy.....	27
3. Đánh giá chất lượng sản phẩm đông trùng hạ thảo	28
3.1. Hàm lượng các nucleoside chỉ thị trong quả thể và sợi nấm phát triển trên giá thể ...	28
3.2. Hàm lượng đạm tổng số, lipid tổng số và tro tổng số	31
3.3. Hoạt tính kháng oxi hóa	31
4. Kết luận.....	32
TÀI LIỆU THAM KHẢO	34

ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO – CÔNG DỤNG, XU HƯỚNG SẢN XUẤT VÀ THƯƠNG MẠI

I. ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO TRONG Y HỌC

1. Tổng quan về đông trùng hạ thảo:

1.1. Tên gọi:

Đông trùng hạ thảo (*Chinese caterpillar fungus*), còn gọi là trùng thảo, hạ thảo đông trùng hay đông trùng thảo, là một loại đông dược quý có bản chất là dạng ký sinh của loài nấm *Cordyceps sinensis* (thuộc nhóm *Ascomycetes*) trên cơ thể sâu *Hepialus fabricius*. Phần dược tính của đông trùng hạ thảo đã được chứng minh là do các chất chiết xuất từ nấm *Cordyceps sinensis*.

Tên gọi "đông trùng hạ thảo" là xuất phát từ quan sát thực tế khi thấy vào mùa hè nấm *Cordyceps sinensis* mọc chồi từ đầu con sâu nhô lên khỏi mặt đất. Vào mùa đông thì nhìn cặp cá thể này giống con sâu (côn trùng), còn đến mùa hè thì chúng trông giống một loài thực vật (thảo mộc) hơn.

Riêng tên "Đông trùng hạ thảo" được ghi chép là vị thuốc xuất hiện lần đầu tiên trong cuốn "Bản thảo cương mục" vào đời nhà Minh của danh y Lý thời Trân (năm 1575), Đông Trùng Hạ Thảo được xếp ngang với nhân sâm về công năng chữa bệnh – thuộc vào loại toàn diện nhất.

1.2. Nguồn gốc hình thành:

Đông trùng hạ thảo là hiện tượng loài sâu thuộc chi *Hepialus* trong tổng Họ *Lepidoptera* (Cánh bướm) bị ký sinh bởi một loài nấm túi có tên khoa học là *Cordyceps sinensis* (Berk.) thuộc tổng Họ *Ascomycetes* (Nang Khuẩn). Thường gặp nhất là sâu non của loài *Hepialus Fabricius* hoặc *Hepialus Armoricanus*. Ngoài ra còn 40 loài khác thuộc chi *Hepialus* cũng có thể bị *Cordyceps sinensis* ký sinh. Các loài nấm này phân bố rộng ở châu Á và châu Úc với trung tâm đa dạng là vùng Đông Á, đó là các vùng cao nguyên cao hơn mặt biển từ 4000 đến 5000m như: Tây Tạng, Tứ Xuyên, Thanh Hi, Cam Túc, Vân Nam...

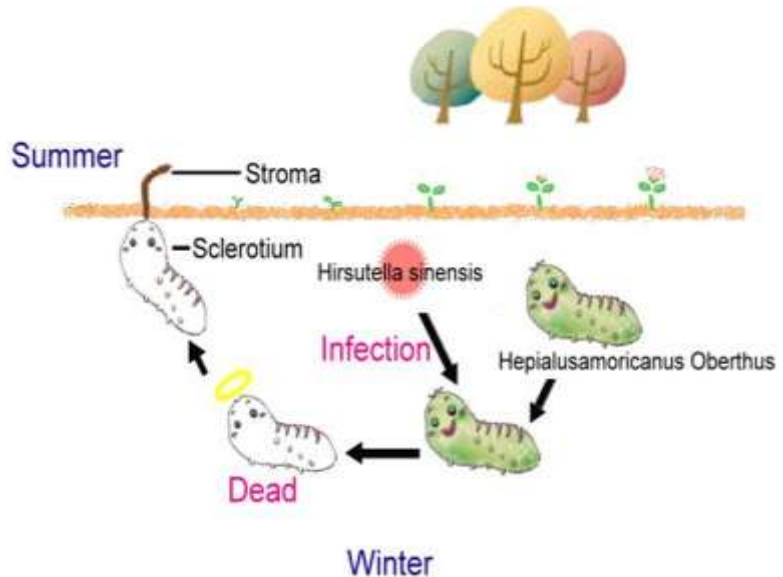
Chu trình sống của *Cordyceps*:

✓ *Cordyceps* thuộc họ nấm, nó ký sinh trên thân của côn trùng. Mùa Đông, nấm ký sinh vào côn trùng, phát triển thành hệ sợi nấm (đây là giai đoạn vô tính), sử dụng nguồn dinh dưỡng từ cơ thể côn trùng và giết chết côn trùng.

- ✓ Mùa hạ, sợi nấm vô tính chuyển sang giai đoạn hữu tính, hình thành cây nấm là cơ quan chứa bào tử vô tính và nhú lên khỏi mặt đất nhưng gốc vẫn dính liền vào thân sâu



Cordyceps sinensis
(winter worm, summer grass)



1.3. Mô tả

Chi nấm Cordyceps có tới hơn 600 loài khác nhau. Tuy nhiên cho đến nay người ta mới chỉ nghiên cứu nhiều nhất được về 2 loài Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. và Cordyceps militaris (L. ex Fr.) Link. Từ năm 1964, chỉ có loại Cordyceps sinensis được coi là dược liệu có trong dược điển C. sinensis.

Đồng trùng hạ thảo khi còn sống, người ta có thể trông rõ hình con sâu, với đuôi là một cành nhỏ, mọc lá. Khi sấy khô, nó có mùi tanh như cá, đốt lên có mùi thơm. Phần "lá" hình dạng giống ngón tay, dài khoảng 4 - 11cm do sợi nấm mọc dính liền vào đầu sâu non mà thành. Đầu sâu non giống như con tằm, dài chừng 3-5 cm, đường kính khoảng 0,3 - 0,8 cm. Bên ngoài có màu vàng sẫm hoặc nâu vàng với khoảng 20-30 vằn khía, vằn khía ở gần đầu nhỏ hơn. Phần đầu có màu nâu đỏ, đuôi giống như đuôi con tằm, có tất cả 8 cặp chân, nhưng 4 đôi ở giữa là rõ nhất. Chất đệm nấm hình que cong mọc ra từ mình sâu non, dài hơn sâu non một chút. Sâu non dễ bẻ gãy, ruột bên trong căng đầy, màu trắng hơi vàng; chất đệm nấm khá dai và bên trong ruột hơi rỗng, có màu trắng ngà.

1.4. Thành phần

Các phân tích hoá học cho thấy trong sinh khối (biomass) của đồng trùng hạ thảo có 17 đến 19 loại acid amin khác nhau, có D-mannitol, có lipid, có nhiều nguyên tố vi lượng (Na, K, Ca, Mg, Al, Mn, Cu, Zn, Bo, Fe... trong đó cao nhất là phospho). Quan trọng hơn là trong sinh khối đồng trùng hạ thảo có nhiều chất

hoạt động sinh học mà các nhà khoa học đang khám phá dần, nhờ tiến bộ của ngành hoá học các hợp chất tự nhiên.

Nhiều hoạt chất trong đông trùng hạ thảo có giá trị dược liệu thần kỳ. Trong đó phải kể đến là cordiceptic acid, cordycepin, adenosine, hydroxyethyl-adenosine. Đáng chú ý hơn cả là nhóm hoạt chất HEAA (Hydroxy-Ethyl-Adenosine- Analogs).

Đông trùng hạ thảo còn chứa nhiều loại vitamin (trong 100g đông trùng hạ thảo có 0,12 g vitamin B12; 19 mg vitamin A; 116,03 mg vitamin C, ngoài ra còn có vitamin B2 (riboflavin), vitamin E, vitamin K...), ngoài ra còn có khoảng 25 - 30 % protein, 8% chất béo và đường mannitol.

Theo Holiday và Cleaver (2004), đông trùng hạ thảo đã được sử dụng như một loại “thần dược” từ những năm 620 sau CN, vào thời nhà Đường ở Trung Quốc (618-907).

Những thông tin về loại dược liệu này được công bố đến các nhà khoa học châu Âu vào 1726, trong một hội nghị khoa học được tổ chức tại Pháp.

Mẫu vật đông trùng hạ thảo đầu tiên được đưa vào Pháp bởi một giáo sĩ , người có trải nghiệm sử dụng nấm này trong thời kỳ ông lưu trú tại hoàng cung Trung Quốc.

Năm 1994, Trung Quốc đã chính thức xếp loại đông trùng hạ thảo như một dược phẩm. Sau đó, đông trùng hạ thảo được sử dụng rất nhiều khi dịch SARS xuất hiện ở Trung Quốc vào năm 2003.

Gần đây, đông trùng hạ thảo được chứng minh có tác dụng trong điều trị các bệnh về tim mạch, hô hấp, gan, thận, ức chế sự hình thành khối u, ... (Chen et al., 2006; Kuo, Sua, Yang, Huang, & Chen, 2006; Wang & Shiao, 2000).

Giá sản phẩm:

- ✓ Năm 2004: 10.000 USD/kg tại Trung Quốc
- ✓ Năm 2008: 75.000 USD/kg tại Mỹ price (Holiday và Cleaver, 2008)

Bảng: Các hợp chất hoạt tính sinh học được phân lập từ Cordyceps sp

S. no	Bioactive compounds	References
1	Cordycepin	Cunningham et al. (1950)
2	Cordycepic acid	Chatterjee et al. (1957)

3	<i>N</i> -acetylgalactosamine	Kawaguchi et al. (1986)
4	Adenosine	Guo et al. (1998)
5	Ergosterol and ergosteryl esters	Yuan et al. (2007)
6	Bioxanthracenes	Isaka et al. (2001)
7	Hypoxanthine	Huang et al. (2003)
8	Acid deoxyribonuclease	Ye et al. (2004)
9	Polysaccharide and exopolysaccharide	Yu et al. (2007, 2009), Xiao et al. (2010), Yan et al. (2010)
10	Chitinase	Lee and Min (2003)
11	Macrolides (C ₁₀ H ₁₄ O ₄)	Rukachaisirikul et al. (2004)
12	Cicadapeptins and myriocin	Krasnoff et al. (2005)
13	Superoxide dismutase	Wanga et al. (2005)
14	Protease	Hattori et al. (2005)
15	Naphthaquinone	Unagul et al. (2005)
16	Cordyheptapeptide	Rukachaisirikul et al. (2006)
17	Dipicolinic acid	Watanabe et al. (2006)
18	Fibrynolytical enzyme	Kim et al. (2006)
19	Lectin	Jung et al. (2007)
20	Cordymin	Wonga et al. (2011)

2. Tác dụng dược lý của đông trùng hạ thảo theo y học hiện đại:

2.1. Chống oxy hoá:

Trên thực nghiệm: dịch chiết bằng nước và rượu, cả cordyceps tự nhiên và nuôi cấy cho thấy tác dụng chống oxy hoá:

- ✓Ức chế khả năng oxy hoá acid linoleic
- ✓Khử hoạt tính của chất 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DDPH), hydrogen peroxide, gốc tự do hydroxyl, anion superoxide, hoạt tính bắt giữ kim loại
- ✓Poly phenolic và flavonoid có trong Cordyceps là chất anti oxidants

2.2. Tác dụng kháng tế bào ung thư:

Nghiên cứu trên các loại tế bào ung thư khác nhau như: hạch, gan, đại tràng, tuyến tiền liệt, và vú, cho thấy dịch chiết rượu từ cordyceps có tác dụng chống tăng sinh của các loại tế bào ung thư này.

Một nghiên cứu khác cho thấy cordyceps ức chế tăng sinh tế bào ung thư đại tràng qua con đường ức chế sự thoái giáng của chất I-kappa B-alpha trong tế bào và ức chế hoạt tính của NF-Kappa B.

2.3. Tác dụng chống mệt mỏi và stress:

Dịch chiết bằng nước nóng của Cordyceps sinensis có tác dụng chống mệt mỏi và stress trên chuột ICR và chuột Sprague-Dawly.

2.4. Tác dụng trên hệ hô hấp:

Dịch chiết bằng cồn cho kết quả:

- ✓Ức chế sự tăng sinh những tế bào BALF (Bronchoalveolar lavage fluids) được hoạt hóa bởi lipopolysaccharide (LPS),
- ✓Ức chế sự sản xuất IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-10 và INF – alpha trên BALF.

2.5. Tác dụng chống sợi hoá gan:

Trên mô hình chuột Sprague –Dawly, gây sợi hóa gan bằng Dimethyl nitrosamine, cho uống Cordyceps sinensis, kết quả cho thấy giảm đáng kể sợi hóa ở gan, bởi nó thúc đẩy sự thoái giáng chất collagen như Hydroxyproline, ức chế metalloproteinase – 2 ở mô, collagen loại IV và loại I.

2.6. Tác dụng chống sợi hoá phổi:

Nghiên cứu được thực hiện trên người bệnh SARS đã phục hồi, chia 2 nhóm:

- Nhóm thử: 16 người (4 nam và 12 nữ); tuổi trung bình 34,3 tuổi; cho uống 3 gr Cordyceps mỗi ngày.
- Nhóm chứng: 15 người, được chăm sóc bằng y học hiện đại.
- Kết quả đánh giá bằng chụp CT scanner phổi, xét nghiệm Serum soluble Interleukin – 2 Receptor (SIL – 2R): nhóm thử thuốc cải thiện tốt trên CT-scanner và giảm nồng độ SIL – 2R, trong khi nhóm chứng không có được kết quả này.

2.7. Tác dụng kích thích hệ miễn dịch:

Tính chất điều hòa hệ miễn dịch của polysaccharides từ cordyceps sinensis đã được khảo qua xét nghiệm máu ngoại vi.

Kết quả: dịch chiết có khả năng gây sản xuất yếu tố hoại tử bướu alpha (TNF-alpha), Interleukin (IL) -6, và IL-10.

3. Ứng dụng đông trùng hạ thảo trong lâm sàng:

Đông trùng hạ thảo được dùng để điều trị ho, viêm phế quản mạn tính, bệnh ở thận, tiểu đêm, suy nhược sinh dục nam, thiếu máu, tăng cholesterol, rối loạn chức năng gan, mệt mỏi, ù tai, sụt cân...

Tăng chức năng hệ miễn dịch, tăng lực cho vận động viên, chống lão hoá sớm, cải thiện chức năng gan với người viêm gan siêu vi B.

Một số người dùng đông trùng hạ thảo như một “adaptogen” để tăng thể lực và chống mệt mỏi.

Trên hệ tim mạch: đông trùng hạ thảo tốt cho hoạt động của tim và mạch máu, điều hoà nhịp tim, hạ cholesterol máu, ức chế kết tụ tiểu cầu, có tác dụng chống viêm, cải thiện tuần hoàn bàng hệ.

Myriocin và thermozymocidin (1 acid amin không điển hình) ức chế hữu hiệu serine palmitoyltransferase, chất hình thành trong giai đoạn đầu của sự sinh tổng hợp sphingosin (Zhao. et al., 2013)

Myriocin có tác dụng ức chế miễn dịch (immunosuppressant) gấp 10-100 lần cyclosporine.

II. NẤM DƯỢC LIỆU ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO – NGHIÊN CỨU VÀ PHÁT TRIỂN

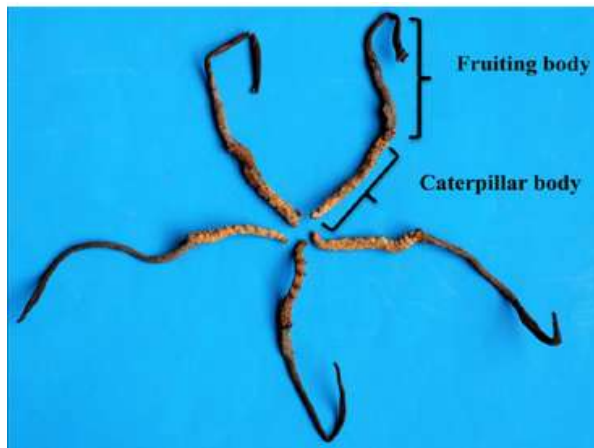
Hiện nay, có khoảng 680 loài nấm thuộc chi *Cordyceps* (Holliday, Cleaver, & Wasser, 2005).

Hai loài nấm đông trùng hạ thảo được sử dụng lâu đời trong y học cổ truyền Trung Quốc là *Cordyceps sinensis* (tên khác: *Ophiocordyceps sinensis*) và *Cordyceps militaris*.

Hàng ngàn công trình nghiên cứu từ các trường đại học và các viện nghiên cứu đã được thực hiện từ rất lâu và chủ yếu tập trung vào hai loài đông trùng hạ thảo có giá trị dược liệu cao nói trên.

1. *Cordyceps sinensis*:

Cordyceps sinensis (tên khác: *Ophiocordyceps sinensis*) là loài ký sinh trên ấu trùng côn trùng và phân bố chủ yếu ở Tibet, các vùng đồng cỏ ở Nepal, Bhutan và Bắc Ấn độ nơi có độ cao 3500-5000m so với mực nước biển..



Hình: Cordyceps sinensis
(Shashidhar và ctv, 2013)



Hình: Cordyceps sinensis
(Holliday và Cleaver, 2004)

Cordyceps sinensis đã được thị trường hóa dưới dạng chất bổ sung dinh dưỡng dưới sự kiểm soát của FDA, do vậy nhu cầu của thị trường đối với đông trùng hạ thảo ngày càng tăng cao ở nhiều quốc gia (Dong & Yao, 2007).

Tuy nhiên, sự gia tăng của nhu cầu đã dẫn đến tình trạng khai thác quá mức đông trùng hạ thảo ngoài tự nhiên, làm cạn kiệt nguồn tài nguyên của loài dược liệu quý này (Holliday, Cleaver, Megan, & Patel, 2004; Hsu, Shiao, Hsieh, & Chang, 2002).

Trước tình trạng trên, cơ quan quản lý CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) của Trung Quốc đã chính thức xếp loại loài nấm này danh mục các loài có nguy cơ tuyệt chủng (CITES Management Authority of China, 2012).

Nhằm đáp ứng nhu cầu của thị trường ngày càng tăng, các nhà nghiên cứu đã tìm cách nuôi cấy loài nấm này trong điều kiện nhân tạo và đến giữa thập kỷ 1990's, *Cordyceps sinensis* nuôi cấy nhân tạo đã được thị trường hóa rộng rãi trên thế giới (Holliday et al., 2004)

Đặc điểm phân loại của *C. sinensis*:

- ✓ Kingdom - Fungi
- ✓ Phylum - Ascomycota
- ✓ Class - Ascomycetes
- ✓ Order - Hypocreales
- ✓ Family - Clavicipitaceae
- ✓ Genus - *Cordyceps*
- ✓ Species - *Cordyceps sinensis*

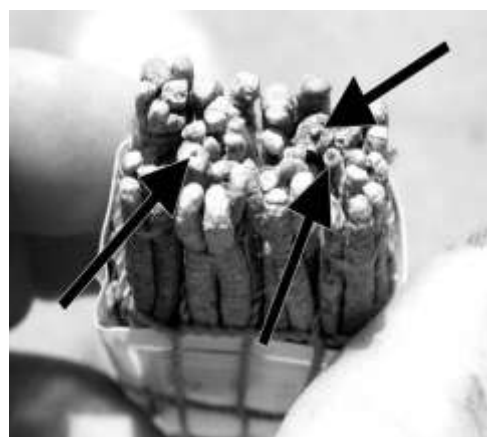
Đặc điểm hình thái của *Cordyceps sinensis*:

- ✓ Quả thể *C. sinensis* có màu nâu đậm đến đen, thường mọc ra từ phần đầu của ấu trùng loài sâu *Hepialis armoricanus*.
- ✓ Phần thân ấu trùng có vàng hay vàng nâu.
- ✓ Khi quả thể phát triển thành thực thể hình thành bào tử, các bào tử này dễ dàng rời khỏi túi bào tử và phát tán theo gió hoặc rơi xuống đất.



Cordyceps sinensis tìm thấy trên đồng cỏ ở độ cao 4200m trên mực nước biển tại Tibet (Daniel Winkler, 2010)

Vì mục đích lợi nhuận, rất nhiều sản phẩm giả hoặc kém chất lượng xuất hiện trên thị trường



Các đoạn kẽm hay dây điện được chêm vào giữa thân nấm Cordyceps để tăng trọng lượng (Holiday và Cleaver, 2005)

Nhiều công nghệ tiên tiến trong việc nuôi cấy nhân tạo loài nấm này được nghiên cứu và phát triển đồng thời giúp kiểm soát chất lượng các sản phẩm trên thị trường.

Tuy nhiên, cho đến nay, việc nuôi cấy và sản xuất *Cordyceps sinensis* chỉ dừng lại ở mức độ sản xuất hệ sợi nấm.

Các nhà nghiên cứu trên thế giới chưa thành công trong việc tạo ra quả thể của *Cordyceps sinensis* trong điều kiện nuôi cấy nhân tạo.

2. *Cordyceps militaris*

2.1. Đặc điểm:

Cordyceps militaris dễ dàng hình thành quả thể trong môi trường nuôi cấy nhân tạo.

Giá trị dược liệu cao, hoạt chất Cordycepin trong *Cordyceps militaris* cao hơn so với *Cordyceps sinensis*. Cordycepin được chứng minh là có khả năng kháng ung thư, kháng oxy hóa, kháng viêm, tăng cường hoạt động hệ miễn dịch, gan, thận... (Tuli và ctv. 2014).

Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện nhằm tìm ra các đặc điểm về di truyền học, nhu cầu về dinh dưỡng và môi trường phát triển, các đặc tính dược liệu và sinh hóa của *Cordyceps militaris*.

Gần đây bộ gen của *C. militaris* đã được giải trình tự (Zheng và ctv, 2011). Bộ gen *C. militaris* có kích thước 32,2Mb với 9684 gen mã hóa protein được dự đoán, trong đó có 13,7% là các gen đặc hiệu loài.

Cordyceps militaris phân bố rộng rãi ở độ cao 0->2000m so với mực nước biển (Kobayasi 1941; Mains 1958; Panigrahi 1995; Shrestha và Sung 2005; Ma và ctv. 2007).

Cordyceps militaris có hình thái đa dạng và có khả năng thích nghi với nhiều loài ký chủ côn trùng. Các ký chủ thường gặp là ấu trùng và nhộng của các loài côn trùng thuộc bộ cánh vảy Lepidoptera.

Ngoài ra, có thể tìm thấy *Cordyceps militaris* ký sinh trên các loài côn trùng khác thuộc bộ cánh cứng Coleoptera, bộ cánh màng Hymenoptera, bộ hai cánh Diptera...

Kích thước quả thể *Cordyceps militaris* trong tự nhiên thường nhỏ, không đủ để thỏa mãn nhu cầu thị trường.

Đã có những nghiên cứu về việc nuôi cấy loài nấm này ở qui mô lớn ở cả dạng sợi nấm lẫn quả thể (Dai và ctv. 2007; Gu và ctv. 2007).

- ✓ Nghiên cứu sản xuất quả thể *C. militaris* trên cơ thể côn trùng (de Bary 1867, 1887; Shanor 1936; Müller-Kögler 1965; Leatherdale 1970)
- ✓ Nghiên cứu sản xuất quả thể *C. militaris* trên các cơ chất hữu cơ (Pettit 1895; Sopp 1911; Kobayasi 1941; Basith và Madelin 1968; Yue và ctv. 1982).

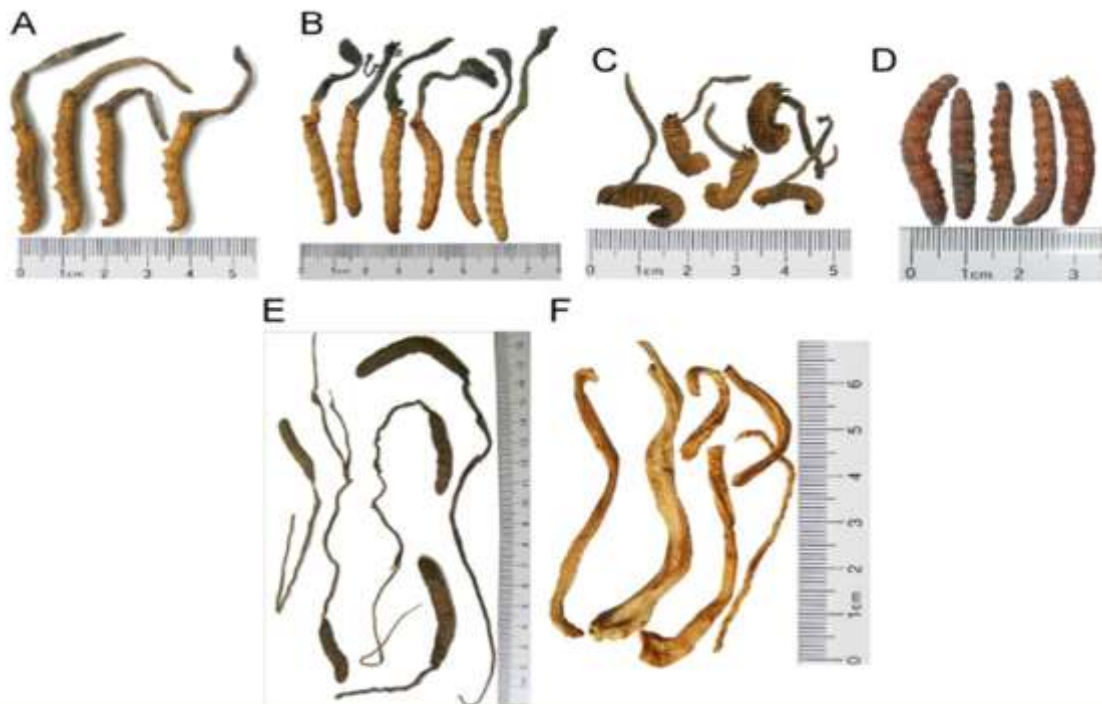
Đặc điểm phân loại của *Cordyceps militaris* :

- ✓ Kingdom: Fungi
- ✓ Phylum: Ascomycota

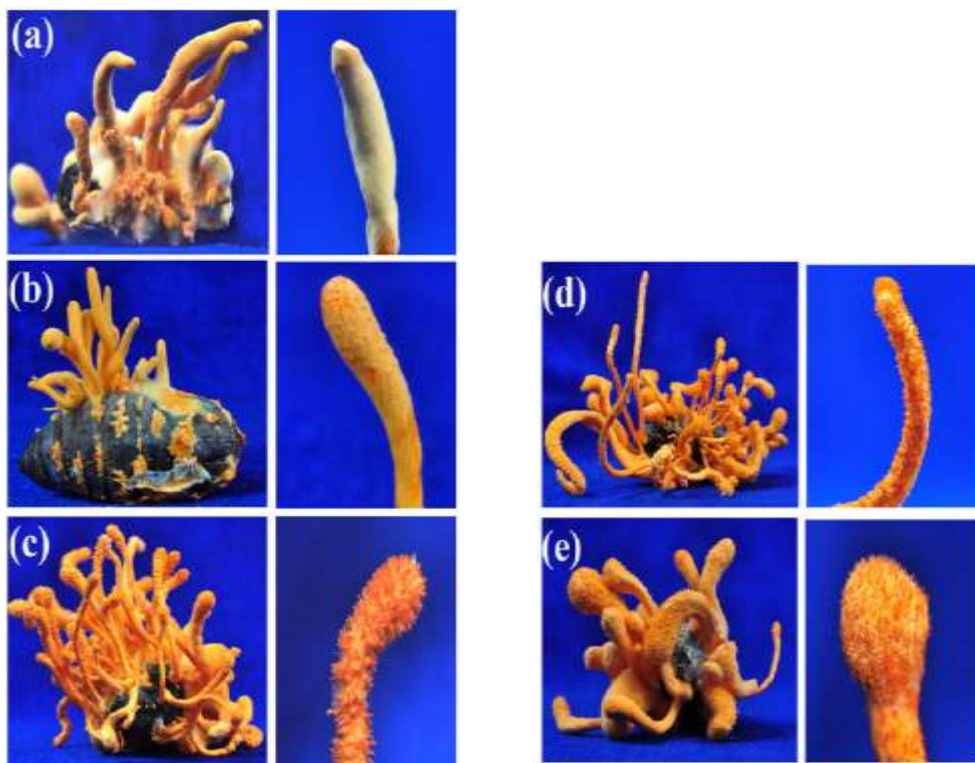
- ✓ Sub-phylum: Ascomycotina
- ✓ Class: Ascomycetes/Pyrenomycetes
- ✓ Order: Hypocreales
- ✓ Family: Clavicipitaceae
- ✓ Genus: *Cordyceps*
- ✓ Species: *Cordyceps militaris*



Cordyceps militaris (www.jscr.jp)



(A) *C. sinensis* , (B) *C. gunnii* ; (C) *C. barnesii*; (D) *C. gracilis*
 (E) *C. liangshanensis* ; (F) *C. militaris*



Sự đa dạng về hình thái của Cordyceps militaris

2.2. Các nghiên cứu về nuôi cấy *Cordyceps militaris*:

2.2.1. Nguồn dinh dưỡng:

Nguồn dinh dưỡng cần thiết để nuôi cấy *Cordyceps militaris* là các loại côn trùng, như:

- ✓ Ấu trùng và nhộng tằm *Bombyx mori*
- ✓ Nhộng tằm sồi *Antherea pernyi*
- ✓ Sâu hại bắp cải *Mamestra brassicae*
- ✓ Sâu gạo *Tenebrio molitor*
- ✓ Sâu đục thân bắp *Ostrinia nubilalis*
- ✓ Các loài sâu khác như *Heliothis virescens*, *H. zea* và *Spodoptera*.

Ngũ cốc có thể là nguyên liệu thay thế cho côn trùng. Koyayashi (1941) đã sản xuất quả thể *Cordyceps militaris* trên nền cơ chất gạo. Tiếp theo đó, hàng loạt các nghiên cứu khác cũng sử dụng gạo như thành phần chính trong nuôi cấy tạo quả thể nấm này.

Khi sử dụng gạo để nuôi cấy *Cordyceps militaris* thì tỷ lệ gạo: nước 1:1-1:1,35 được cho là thích hợp để quả thể phát triển nhưng tỷ lệ này tùy thuộc vào độ dẻo của gạo được sử dụng (Sung và ctv. 1999, 2002; Lin và ctv. 2006b; Zheng và ctv. 2008c; Yue 2010).

Các cơ chất hữu cơ khác có thể được sử dụng để nuôi cấy *Cordyceps militaris*: bột đậu, cám bắp, hạt kê, cao lương, hạt hướng dương và lúa mì (Chen và Wu 1990; Zhang và Liu 1997; Li 2002; Li và ctv. 2004a; Zhao và ctv. 2006a; Gao và Wang 2008; Wei và Huang 2009).

Sử dụng hỗn hợp gạo và côn trùng cũng cho kết quả tốt (Ren 1998; Chen và ctv. 2002; Shrestha và ctv. 2004, 2005; Sung và ctv. 2002, 2006; Zhao và ctv. 2006; Jin và ctv. 2009).

Ở một số nghiên cứu cho thấy:

- ✓ *Cordyceps militaris* cho năng suất không cao trên môi trường là côn trùng nhưng lại tốt hơn trên môi trường ngũ cốc.
- ✓ Tuy nhiên, chất lượng nấm *Cordyceps militaris* nuôi cấy trên côn trùng cho hàm lượng các hoạt chất sinh học quý hiếm như adenosine, cordycepin... cao hơn nhiều so với nuôi cấy trên ngũ cốc.

2.2.2. Thời gian hình thành quả thể và năng suất quả thể:

Quả thể thường được tạo ra trong khoảng 35-70 ngày nuôi cấy (Zhang và Liu 1997; Sung và ctv. 1999; Yue 2010; Du và ctv. 2010) tùy theo các cơ chất khác nhau.

Năng suất: Wu và ctv. (1996) thu được 25g quả thể tươi từ 50g môi trường gạo, trong khi đó Zhang và Liu (1997) thu được lượng quả thể có thể đến 61% trên môi trường gạo, 58-59% trên môi trường có chứa hạt kê, Lin và ctv. (2006) lại có thể thu được đến 18g quả thể tươi từ 20g môi trường...

2.2.3. Yếu tố môi trường tác động đến việc nuôi cấy:

❖ Nhiệt độ:

Nhiệt độ thích hợp để hệ sợi nấm phát triển mạnh là 25°C, nhưng nhiệt độ để hình thành quả thể 18-22°C (Sung và ctv. 1999, 2002; Gao và ctv. 2000a; Zhao và ctv. 2006; Du và ctv. 2010; Sato và Shimazu 2002).

Trong khi đó, một nghiên cứu khác (Li và ctv. 2004a; Yue 2010) lại cho rằng 25°C là nhiệt độ tối ưu cho cả hệ sợi lẫn quả thể.

❖ Ánh sáng:

Sato và Shimazu (2002) cho rằng quả thể *C. militaris* không thể hình thành trong bóng tối. Cường độ ánh sáng giới hạn sự phát triển quả thể ở 1400lux. Trong khi đó, Gao và ctv. thu được quả thể ở 4500lux.

Các báo cáo gần đây cho thấy cường độ ánh sáng phù hợp cho quả thể phát triển nằm trong khoảng 500-1000 lux tùy thuộc vào thời gian chiếu sáng dài hay

ngắn (Sung và ctv. 1999; Gao và ctv. 2000; Sato và Shimazu 2002; Li và ctv. 2004; Zhao và ctv. 2006; Du và ctv. 2010).

3. Các nghiên cứu về đông trùng hạ thảo tại Việt Nam:

Các báo cáo khoa học về *Cordyceps* tại Việt Nam còn rất ít và còn khá sơ khai so với khối lượng nghiên cứu đồ sộ trên thế giới.

Nghiên cứu về các đặc điểm sinh học của hệ sợi nấm *C. militaris* trong các môi trường nuôi cấy cơ bản được thực hiện bởi Phạm Quang Thu và ctv. (2012)

Nhóm tác giả Trương Bình Nguyên, Đinh Minh Hiệp, Lê Huyền Ái Thúy và ctv, (2010) tập trung vào các nghiên cứu phát hiện các chủng nấm *Cordyceps* bản địa tại vùng cao nguyên Langbian, Lâm Đồng và khảo sát một số hoạt tính sinh học của các loài nấm này.

Năm 2012-2014, Viện nghiên cứu Công nghệ sinh học – môi trường, trường ĐH Nông Lâm thực hiện đề tài NCKH cấp Bộ về xây dựng quy trình nuôi cấy đông trùng hạ thảo quy mô phòng thí nghiệm.

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Viện Nghiên cứu công nghệ sinh học và môi trường, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM (Lê Thị Diệu Trang, Lê Phước Thọ, Trần Công Sơn và Nguyễn Thị Ngọc Anh) báo cáo công trình nghiên cứu “Sản xuất đông trùng hạ thảo *Cordyceps* sp. quy mô phòng thí nghiệm” trong cuộc thi Eureka 2013 của Thành Đoàn TP.HCM.

Nhóm tác giả Lê Thị Diệu Trang, Trần Công Sơn, Lê Phước Thọ, Nguyễn Thị Ngọc Anh (2013) đã công bố các kết quả xây dựng quy trình nuôi cấy *C. sinensis*, đánh giá tính kháng oxy hóa và hàm lượng adenosin trên tạp chí khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp của Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM

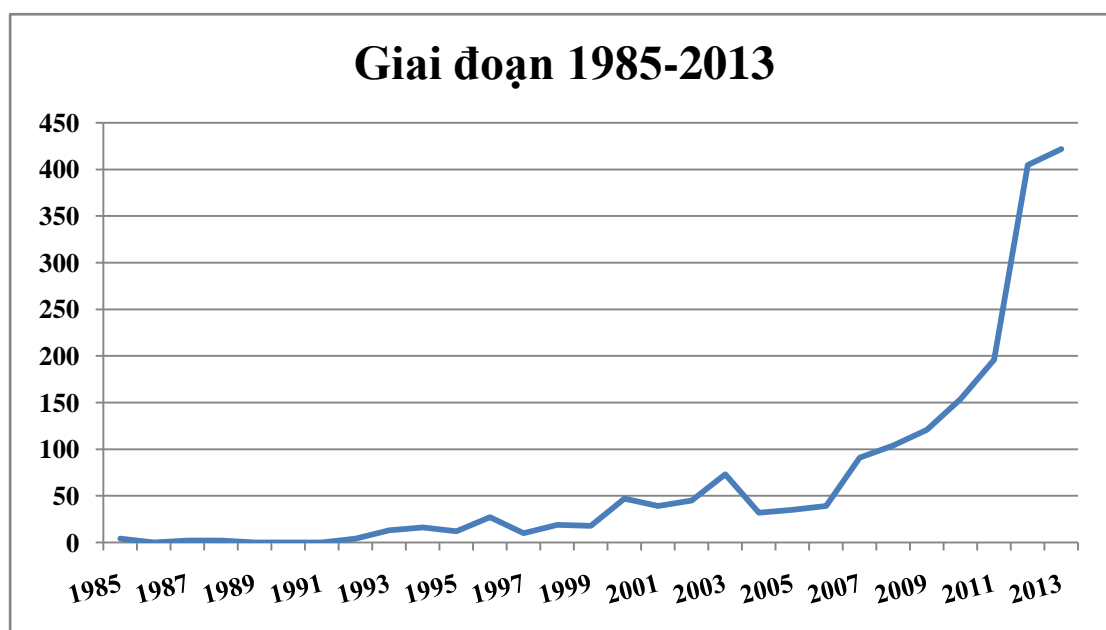
Gần đây, trong Hội nghị nấm học tổ chức tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP.HCM (11/2014), một số công trình của các nhóm tác giả Vũ Xuân Tạo và ctv, Phạm Nguyễn Duy Bình và Phan Kim Ngọc đã công bố kết quả nghiên cứu về các yếu tố môi trường tác động đến sự sinh trưởng của *C. militaris*; Võ Thị Xuyên và ctv nghiên cứu tối ưu hóa môi trường nuôi cấy *C. pseudomilitaris*.

III. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

1. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo thời gian:

Đông trùng hạ thảo được biết đến là một loại thảo dược quý hiếm có nhiều hoạt chất sinh học giúp tăng cường sức khỏe cho con người.

Theo nguồn thông tin tiếp cận được từ CSDL Wipsglobal, từ 1985 đã có sáng chế đăng ký liên quan đến đông trùng hạ thảo. Từ đó đến nay có khoảng 1930 sáng chế đăng ký về vấn đề này



Hình: Tình hình đăng ký sáng chế về đông trùng hạ thảo từ 1985 – 2013
(1930 sáng chế, theo Wipsglobal)

Theo thời gian, tình hình đăng ký sáng chế có xu hướng tăng dần qua các năm, cụ thể như sau:

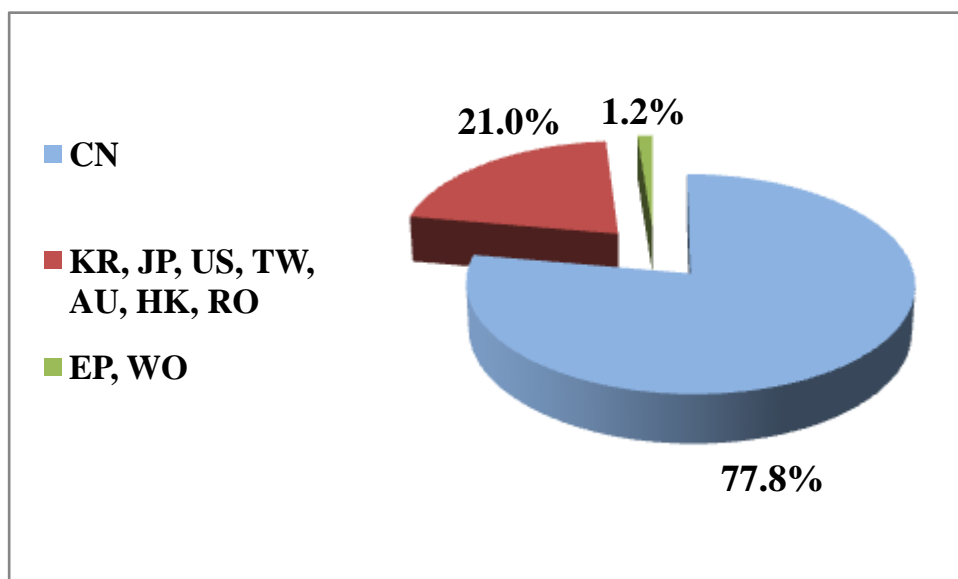
- ✓ Thập niên 80: trung bình mỗi năm có khoảng 1 sáng chế được đăng ký bảo hộ
- ✓ Thập niên 90: trung bình mỗi năm có khoảng 11 sáng chế được đăng ký bảo hộ
- ✓ Từ 2000-2013: trung bình mỗi năm có khoảng 128 sáng chế được đăng ký bảo hộ

2. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo quốc gia:

Hiện nay, sáng chế về đông trùng hạ thảo đang được đăng ký bảo hộ ở:

- ✓ 8 quốc gia: Trung Quốc (CN): 1501 SC, Hàn Quốc (KR): 304 CS, Nhật Bản (JP): 56 SC, Mỹ (US): 21 SC, Đài Loan (TW): 18 SC, Úc (AU): 3 SC, Hồng Kông (HK): 2 SC, Rumania (RO): 1 SC.

- ✓ 2 tổ chức: chức chức thế giới (WO): 20 SC và tổ chức châu Âu (EP): 4 SC



Hình: Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đồng trùng hạ thảo ở các quốc gia (theo Wipsglobal)

Nhìn trên đồ thị, có thể thấy lượng sáng chế về đồng trùng hạ thảo đang được đăng ký bảo hộ chủ yếu ở Trung Quốc – chiếm 77.8%, lượng sáng chế đăng ký bảo hộ ở 7 quốc gia còn lại (Hàn Quốc, Nhật Bản, Mỹ, Đài Loan, Úc, Hồng Kông, Rumania) chỉ chiếm 21%.

Bảng thống kê năm đầu tiên có sáng chế đăng ký bảo hộ ở các quốc gia

Quốc Gia	Năm
Trung Quốc	1985
Nhật	1987
Đài Loan	1993
Mỹ	1995
Hàn Quốc	1996
Hồng Kông	1998
Úc	2000
Rumania	2004

Theo bảng thống kê có thể thấy:

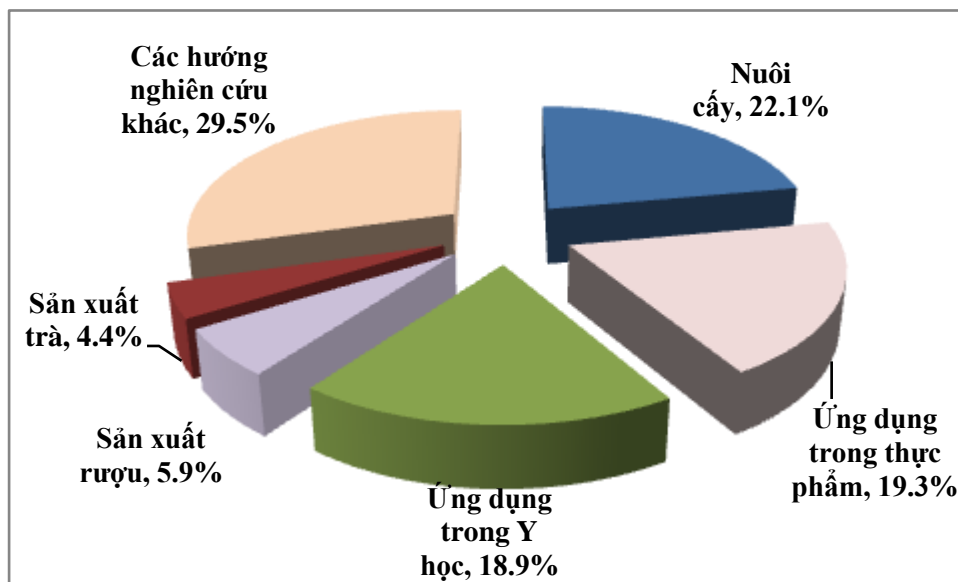
- ✓ Những năm thập niên 80: lượng sáng chế về đồng trùng hạ thảo được đăng ký bảo hộ đầu tiên ở Trung Quốc và Nhật Bản
- ✓ Những năm thập niên 90: lượng sáng chế bắt đầu đăng ký bảo hộ thêm ở các quốc gia: Đài Loan, Mỹ, Hàn Quốc, Hồng Kông

- ✓ Từ năm 2000 đến nay: sáng chế về đông trùng hạ thảo bắt đầu được đăng ký bảo hộ ở khu vực châu Âu và châu Úc

3. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC:

Với hơn 1900 sáng chế đăng ký bảo hộ về Đông trùng hạ thảo mà Trung tâm tiếp cận được từ cơ sở dữ liệu Wipsglobal, khi đưa vào bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC, nhận thấy lượng sáng chế tập trung nhiều vào một số nhóm như sau:

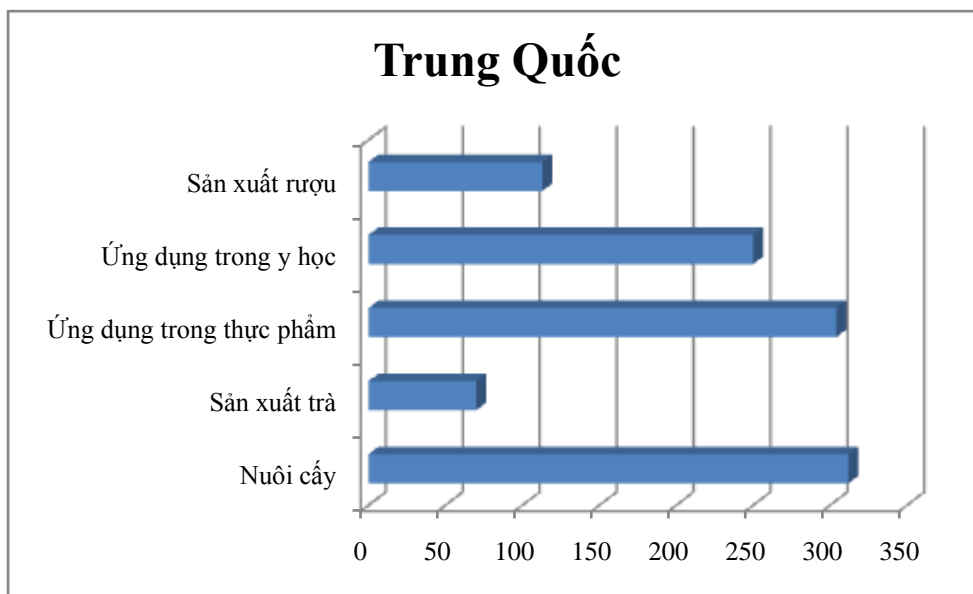
- ✓ Nhóm sáng chế đề cập tới việc nuôi cấy đông trùng hạ thảo chiếm 22.1% tổng lượng sáng chế.
- ✓ Nhóm sáng chế đề cập tới việc ứng dụng đông trùng hạ thảo trong thực phẩm chiếm 19.3% tổng lượng sáng chế.
- ✓ Nhóm sáng chế đề cập tới việc ứng dụng đông trùng hạ thảo trong y học chiếm 18.9% tổng lượng sáng chế.
- ✓ Nhóm sáng chế đề cập tới việc sản xuất rượu có chứa các thành phần hoạt chất từ đông trùng hạ thảo chiếm 5.9% tổng lượng sáng chế.
- ✓ Nhóm sáng chế đề cập tới việc sản xuất trà có chứa các thành phần hoạt chất từ đông trùng hạ thảo chiếm 4.4% tổng lượng sáng chế.



Hình: Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC

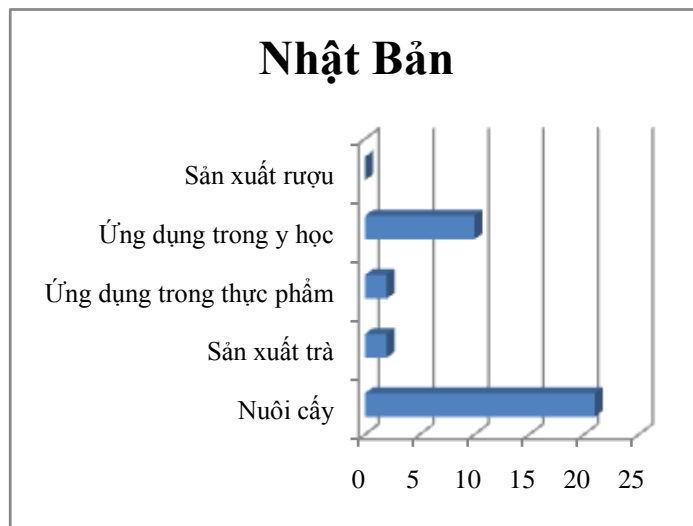
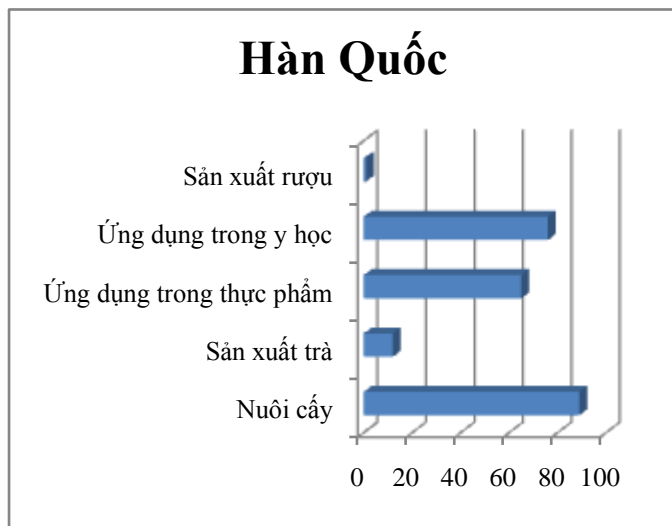
4. Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo ở 4 quốc gia: Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Mỹ:

Ở Trung Quốc: các sáng chế đăng ký bảo hộ nhiều về việc nuôi cấy đông trùng hạ thảo và ứng dụng đông trùng hạ thảo trong thực phẩm



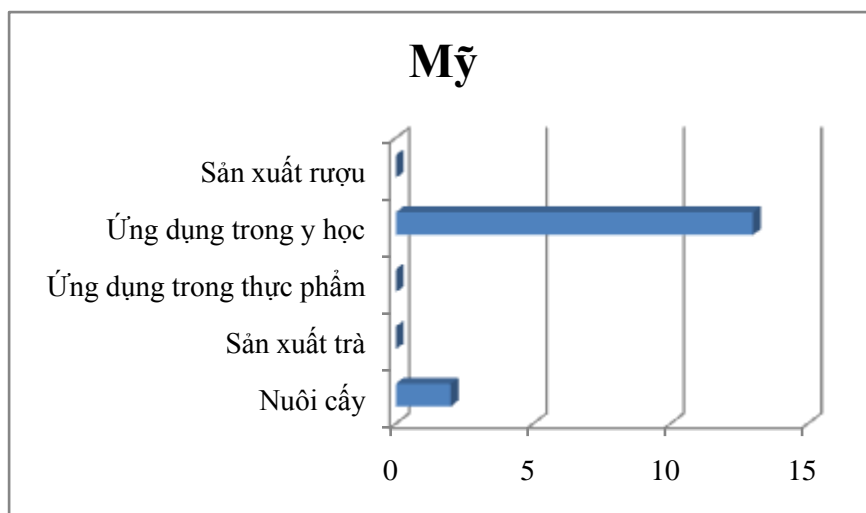
Hình: Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo ở Trung Quốc

Ở Hàn Quốc và Nhật Bản: các sáng chế đăng ký bảo hộ nhiều về việc nuôi cấy đông trùng hạ thảo



Hình: Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo ở Hàn Quốc và Nhật Bản

Ở Mỹ: các sáng chế đăng ký bảo hộ nhiều về việc ứng dụng đông trùng hạ thảo trong y học



Hình: Tình hình đăng ký bảo hộ sáng chế về đông trùng hạ thảo ở Mỹ

5. Giới thiệu một số sáng chế về đông trùng hạ thảo

5.1. Sáng chế về nuôi cấy đông trùng hạ thảo:

- a. Method for producing flaky smooth cordyceps militaris sporocarp
 - Số sáng chế: CN 101663956
 - Ngày nộp đơn: 29/09/2009
- b. Fermentation method for high cordyceps militaris biomass and high cordycepin content
 - Số sáng chế: CN 101554121
 - Ngày nộp đơn: 15/05/2009
- c. Method for culturing cordyceps militaris by distilled grain
 - Số sáng chế: CN 101946638
 - Ngày nộp đơn: 20/09/2010

5.2. Sáng chế về ứng dụng đông trùng hạ thảo:

- a. Cordyceps sinensis and matrimony vine wine
 - Số sáng chế: CN 001712509
 - Ngày nộp đơn: 21/06/2004
- b. Functional health food containing Cordyceps militaris
 - Số sáng chế: CN 103564445

- Ngày nộp đơn: 16/10/2013
- c. *Cordyceps sinensis* bag tea and method of preparing the same
 - Số sáng chế: CN101366422
 - Ngày nộp đơn: 15/08/2008
- d. *Cordyceps militaris* and American ginseng tea
 - Số sáng chế: CN 102356792
 - Ngày nộp đơn: 29/08/2011

IV. SẢN XUẤT ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

1. Mục đích thực hiện đề tài nghiên cứu “Sản xuất Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) ở quy mô phòng thí nghiệm”

Ngày nay, xã hội ngày càng phát triển, chất lượng cuộc sống con người ngày càng được nâng cao nên nhu cầu về sức khỏe là vấn đề rất được quan tâm. “Sống khỏe, không bệnh tật” đó là niềm ao ước của con người ở bất cứ thời đại nào. Tuy nhiên, sức khỏe của con người lại tùy thuộc vào nhiều yếu tố như di truyền, môi trường sống, dinh dưỡng và phòng trị bệnh; trong đó dinh dưỡng để phòng ngừa các bệnh tật đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ sức khỏe. Việc sử dụng các dược liệu quý có nguồn gốc tự nhiên trong chế độ dinh dưỡng đã có những tác động rất hiệu quả trong việc hỗ trợ điều trị và phòng chống một số bệnh. Đông trùng hạ thảo là một trong số các dược liệu quý đó, đã được sử dụng lâu đời trong lịch sử Đông y.

Đông trùng hạ thảo là một dạng kí sinh giữa loài nấm túi *Cordyceps* với ấu trùng của một số loài côn trùng. Trong tự nhiên, đông trùng hạ thảo chỉ sinh sống và phát triển ở những vùng núi cao từ 3500 – 5000 m so với mực nước biển và khí hậu lạnh (Đái Duy Ban và Lưu Tham Mưu, 2009; Nguyễn Lâm Dũng, 2010). Do vậy, sản phẩm tự nhiên thường rất khan hiếm và năng suất ngày càng giảm do khai thác quá mức, nhu cầu tiêu dùng lại ngày càng tăng dẫn đến giá thành rất đắt đỏ. Vì vậy, việc thay thế các sản phẩm *Cordyceps* tự nhiên bằng các sản phẩm *Cordyceps* nuôi cấy là hướng đi mới và mang tính đột phá.

Trong các loài *Cordyceps* thì *C. militaris* là một trong các dược liệu quý và có giá trị cao. Trên thế giới, việc sản xuất *Cordyceps* chủ yếu tập trung vào hệ sợi nấm bằng kỹ thuật lên men chìm. Tuy nhiên, trong thực tế, người tiêu dùng vẫn có xu hướng ưa chuộng các sản phẩm nguyên thủy (có mang quả thể). Hiện nay, có nhiều sản phẩm đông trùng hạ thảo trên thị trường với chất lượng và giá cả khác nhau hầu như không kiểm soát được. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất *C. militaris* có mang

quả thể trong điều kiện nhân tạo là phù hợp với nhu cầu thực tế tại Việt Nam.. Trong khi đó, ở Việt Nam chưa có nhiều công bố khoa học về việc nuôi cấy sản xuất *C. militaris*. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác đã chứng minh, các hoạt chất quý trong sợi nấm và quả thể *Cordyceps* nuôi cấy có hàm lượng cao và hiệu quả dược lý không thua kém so với các sản phẩm *Cordyceps* tự nhiên (Fan và ctv, 2007). Có thể thấy rằng, sản xuất thành công *C. militaris* trong điều kiện nhân tạo là một cơ hội mang ý nghĩa quan trọng và có giá trị thương mại hóa cao. Chính vì vậy, việc nghiên cứu sản xuất đông trùng Hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trong điều kiện nhân tạo ở quy mô phòng thí nghiệm đã được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM.

Xây dựng quy trình nuôi cấy sản xuất quả thể *C. militaris* ở quy mô phòng thí nghiệm, nhằm mục đích:

- ✓ Năng suất và chất lượng tốt, ổn định
- ✓ Chủ động thời gian sản xuất
- ✓ Đảm bảo nguồn dược liệu tốt, an toàn
- ✓ Giá thành phù hợp

Nội dung thực hiện nghiên cứu:

- ✓ Xây dựng quy trình nuôi cấy quả thể nấm
- ✓ Tối ưu hoá quy trình ly trích adenosine, cordycepin và guanosine
- ✓ Đánh giá chất lượng sản phẩm sau nuôi cấy

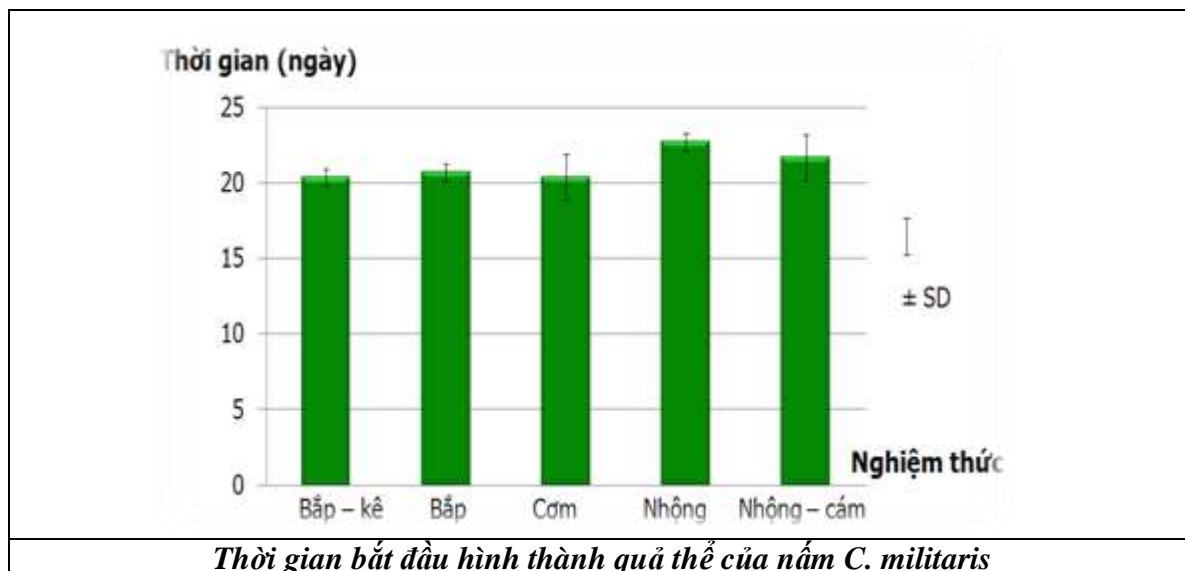
2. Xây dựng quy trình nuôi cấy quả thể:

Sợi nấm *C. militaris* được nhân giống trên môi trường PGA trước khi cấy vào môi trường bán rắn với các nguồn cơ chất khác nhau: bắp-kê, bắp, cơm, nhộng và nhộng cám.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tốc độ phát triển của hệ sợi nấm trên bề mặt các cơ chất trong khoảng 11-15 ngày sau cấy. Hệ sợi phát triển nhanh nhất trên cơ chất nhộng và chậm nhất trên cơ chất nhộng cám.

2.1. Thời gian bắt đầu hình thành quả thể

Thời gian nấm *C. militaris* bắt đầu mọc quả thể dao động từ 20 – 23 ngày. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, không có sự khác biệt ý nghĩa về thời gian bắt đầu hình thành quả thể giữa các nghiệm thức. Nhìn chung, các nghiệm thức sử dụng cơ chất có nguồn gốc thực vật (bắp, kê, cơm) có số ngày bắt đầu hình thành quả thể nhanh hơn các nghiệm thức sử dụng cơ chất có nguồn gốc động vật (nhộng) từ 1 – 2 ngày.



2.2. Đặc điểm hình thái của quả thể nấm *C. militaris*

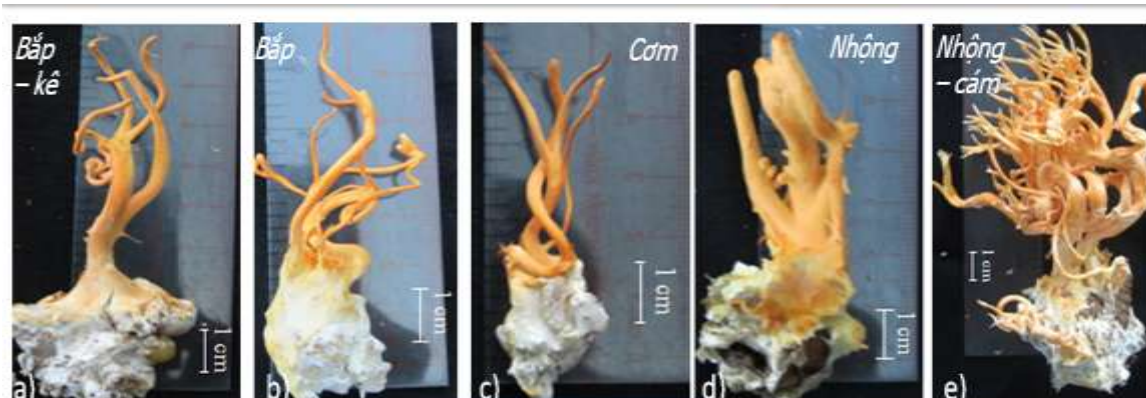
Quả thể trong điều kiện không chiếu sáng và chiếu sáng có sự khác nhau rõ rệt về đặc điểm hình thái:

- ✓ Quả thể trong điều kiện không chiếu sáng: có màu trắng ngà, đường kính trung bình từ 0,2 – 0,4 cm
- ✓ Quả thể trong điều kiện chiếu sáng (> 12h chiếu sáng): có màu vàng cam, đường kính trung bình từ 0,2 – 0,3 cm.

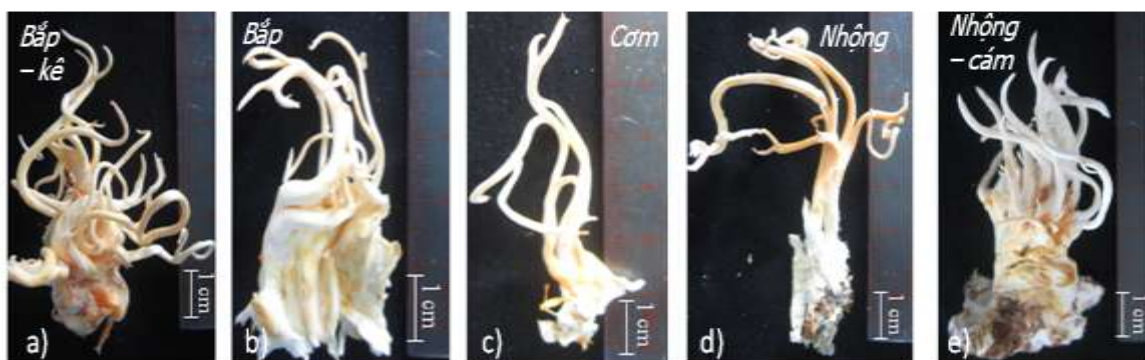
Quả thể mọc trên cơ chất A1 (bắp – kê) và A2 (bắp) khá giống nhau: dài, tương đối thẳng và ít phân nhánh.

Quả thể trên cơ chất cơm: thân ốm (đường kính chủ yếu khoảng 0,15 cm), xoắn.

Quả thể trên cơ chất nhộng: thân to mập (đường kính chủ yếu khoảng 3 – 4 cm), phân nhánh.



Hình thái quả thể ở điều kiện chiếu sáng >12 giờ



Hình thái quả thể ở điều kiện chiếu sáng <12 giờ

Bảng: Đặc điểm hình thái của quả thể nấm *C. militaris* trên các cơ chất ở điều kiện không chiếu sáng

Giá thể	Đặc điểm hình thái quả thể nấm <i>C. militaris</i>
A1 (bấp - kê)	Màu trắng ngà, thân hình trụ dẹt, đường kính 0,2 – 0,5 cm, hơi xoắn, phân nhánh ít, đỉnh nấm nhọn.
A2 (bấp)	Màu trắng cam, thân hình trụ, khá thẳng, đường kính 0,2 – 0,4 cm, phân nhánh từ giữa thân hoặc ngọn, đỉnh nấm nhọn.
A3 (cơm)	Màu trắng ngà, thân hình trụ, đường kính 0,1 – 0,3 cm, hơi xoắn, ít phân nhánh, phân nhánh trên ngọn, đỉnh nấm nhọn.
A4 (nhộng)	Màu trắng cam, thân hình trụ dẹt, đường kính 0,2 – 0,5 cm, khá thẳng, phân nhánh ở giữa thân hoặc ngọn, đỉnh nấm nhọn hoặc tròn phình to.
A5 (nhộng - cám)	Màu trắng ngà, thân hình trụ, đường kính 0,2 – 0,4 cm, thẳng, phân nhánh từ gốc hoặc giữa thân.

Bảng: Đặc điểm hình thái của quả thể nấm *C. militaris* trên các cơ chất ở điều kiện có chiếu sáng

Giá thể	Đặc điểm hình thái quả thể nấm <i>C. militaris</i>
A1 (bấp - kê)	Màu vàng cam, thân hình trụ, đường kính 0,2 – 0,3 cm hơi xoắn, ít phân nhánh, nhánh mọc từ giữa thân, đỉnh nấm nhọn.
A2 (bấp)	Màu vàng cam, thân hình trụ, đường kính 0,2 – 0,3 cm, hơi xoắn, ít phân nhánh, nhánh mọc từ giữa thân hoặc ngọn, đỉnh nấm nhọn.
A3 (cơm)	Màu vàng cam, thân hình trụ dẹt, đường kính 0,1 – 0,3 cm, xoắn, phân nhiều nhánh ở phần ngọn, đỉnh nấm nhọn.

A4 (nhộng)	Màu đỏ cam, thân hình trụ dẹt, đường kính 0,2 – 0,5 cm, thẳng, ít phân nhánh, nhánh mọc ở phần ngọn hoặc giữa thân, đỉnh nấm nhọn hoặc tròn phình to.
A5 (nhộng – cám)	Màu vàng cam, thân hình trụ, đường kính 0,2 – 0,4 cm, thẳng, phân nhiều nhánh, nhánh mọc từ giữa thân, đỉnh nấm nhọn hoặc trụ dẹt.

2.3. Năng suất quả thể sau nuôi cấy:

Sinh khối của quả thể nấm *C. militaris* khác biệt trên các cơ chất và điều kiện chiếu sáng khác nhau.

Năng suất quả thể sau nuôi cấy

Nghiệm thức	Khối lượng quả thể ($x \pm SD$) (g)	Tổng khối lượng sản phẩm ($x \pm SD$) (g)	Tỷ lệ phân trăm quả thể sau khi sấy khô ($x \pm SD$) (%)
A1B1	2,86 ± 0,63	20,91 ± 0,96	13,78 ^{ef} ± 3,58
A2B1	2,73 ± 1,05	19,34 ± 1,17	14,38 ^{ef} ± 1,67
A3B1	2,40 ± 0,62	23,38 ± 0,98	10,21 ^f ± 2,43
A4B1	3,28 ± 0,16	14,09 ± 0,11	23,27 ^{bc} ± 1,14
A5B1	2,23 ± 0,93	21,61 ± 0,63	10,42 ^f ± 4,67
A1B2	4,55 ± 0,51	21,24 ± 0,81	21,40 ^{cd} ± 1,87
A2B2	5,12 ± 0,15	17,97 ± 0,51	28,49 ^{ab} ± 1,47
A3B2	3,83 ± 0,21	22,97 ± 0,70	16,67 ^{de} ± 0,45
A4B2	4,37 ± 0,60	13,76 ± 0,72	31,91 ^a ± 5,30
A5B2	6,01 ± 0,20	20,48 ± 0,42	29,33 ^a ± 0,84

$P < 0,05$

A1: Bắp kê; A2: Bắp; A3: Cơm; A4: Nhộng; A5: Nhộng cám
B1: chiếu sáng 12 giờ B2: chiếu sáng > 12 giờ

9

Có thể thấy rằng, cơ chất nhộng luôn cho tỷ lệ sinh khối quả thể cao nhất là rất phù hợp với thực tế bởi ngoài tự nhiên, nấm *C. militaris* kí sinh trên một số loài côn trùng bộ cánh vảy (Nguyễn Lâm Dũng, 2010). Vì nhộng tằm cũng thuộc bộ côn trùng cánh vảy và được xem là giá thể thay thế gần nhất so với kí chủ mà nấm kí sinh. Bên cạnh đó, giá trị dinh dưỡng của nhộng rất cao (trong 100 g nhộng có 79,7 g nước; 13 g protid; 6,5 g lipid; nhiều vitamine và chất khoáng) không thua kém các loại thịt, cá thông thường (Hoàng Liên, 2009) nên nấm *C. militaris* sinh trưởng và phát triển rất tốt trên giá thể nhộng.

Qua đó, nhận thấy xét về mặt năng suất nấm *C. militaris* cho khả năng hình thành quả thể cao nhất trên giá thể nhộng và nhộng – cám ở điều kiện chiếu sáng trên 12 giờ.

3. Đánh giá chất lượng sản phẩm đông trùng hạ thảo:

3.1. Hàm lượng các nucleoside chỉ thị trong quả thể và sợi nấm phát triển trên giá thể:

Adenosine, cordycepin và guanosine là các nucleoside được coi là các thành phần chính trong *C. militaris* và được sử dụng làm chỉ thị để đánh giá chất lượng đông trùng hạ thảo, bên cạnh các hoạt chất khác như polysaccharide, manitol... (Guo và ctv, 1998; Hsu và ctv, 2002). Quy trình phân tích adenosine, cordycepin và guanosine bằng kỹ thuật HPLC được tối ưu hóa tại Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

3.1.1. Hàm lượng adenosine trong sản phẩm:

Trên mẫu quả thể hàm lượng adenosine đều cao hơn rất nhiều so với hệ sợi hệ nấm phát triển trên giá thể tương ứng.

Kết quả hàm lượng adenosine có trong quả thể nấm *C. militaris* dao động trong khoảng 1,13 – 1,91 mg/g là tương đương với chất lượng nấm *C. militaris* của các nước Mỹ, Nhật Bản sản xuất và hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu của Huang và ctv (2009) (hàm lượng adenosine của *C. sinensis* tự nhiên là 1,63 mg/g).

Ở giá thể A3 cả quả thể và sợi nấm đều có hàm lượng adenosine thấp nhất là điều tất yếu bởi đây là giá thể nghèo chất dinh dưỡng và độ ẩm khá thấp, tuy nấm *C. militaris* nuôi trên giá thể A3 vẫn có thể hình thành quả thể song chất lượng quả thể sẽ không cao mặc dù nguồn nguyên liệu rẻ tiền và luôn có sẵn..

Cả quả thể và hệ sợi nấm trên giá thể nhộng cho hàm lượng adenosine cao nhất và khác biệt khá lớn so với quả thể và hệ sợi nấm trên các giá thể khác (trừ quả thể trên giá thể A5 (nhộng – cám)).

Bảng: Hàm lượng adenosine có trong quả thể và hệ sợi nấm

Môi trường	Hàm lượng adenosine ($x \pm SD$) (mg/g)	
	Quả thể	Hệ sợi nấm phát triển trên môi trường
Bắp – kê	$1,53 \pm 0,09$	$0,17 \pm 0,03$
Bắp	$1,21 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$
Cơm	$1,13 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,04$

Nhộng	1,91 ± 0,15	1,02 ± 0,07
Nhộng – cám	1,76 ± 0,09	0,51 ± 0,01
<i>Cordyceps</i> tự nhiên	1,63 mg/g (Huang và ctv, 2009)	

3.1.2. Hàm lượng cordycepin trong sản phẩm:

Quả thể và hệ sợi nấm phát triển trên cơ chất nhộng cho hàm lượng cordycepin cao nhất với 2,102mg/g và 3,419mg/g tương ứng, khác biệt rất có ý nghĩa với các nghiệm thức khác về mặt thống kê ở mức P = 0,01.

Như vậy, có thể thấy môi trường bán rắn thích hợp để nuôi cấy đồng trùng hạ thảo là cơ chất nhộng, hàm lượng cordycepin thu được sẽ rất cao, sản phẩm nuôi cấy sẽ có giá trị dược liệu hơn so với các môi trường nuôi cấy khác.

Trong khi đó, nghiên cứu của Kumar (2013) trên *C. militaris* tự nhiên cho hàm lượng cordycepin là 0,288 mg/g, còn Huang (2009) cũng nuôi cấy trên giá thể nhộng tằm cho hàm lượng cordycepin trung bình là 1,848 mg/g.

Bảng: Hàm lượng cordycepin có trong quả thể và hệ sợi nấm

Nghiệm thức	Hàm lượng cordycepin trung bình (mg/g)
Môi trường - bắp kê	1,712 ^{bcd}
Quả thể - bắp kê	1,655 ^{bcd}
Môi trường - bắp	2,147 ^{bc}
Quả thể - bắp	1,422 ^{cd}
Môi trường – com	0,959 ^d
Quả thể - com	2,489 ^b
Môi trường - nhộng cám	2,079 ^{bc}
Quả thể - nhộng cám	0,935 ^d

Môi trường - nhộng	3,419 ^a
Quả thể - nhộng	2,103 ^{bc}

3.1.3. Hàm lượng Guanosine trong mẫu sản phẩm:

Từ kết quả nghiên cứu, nhận thấy:

- Hàm lượng guanosine trong các sản phẩm sử dụng cơ chất nhộng (quả thể) và nhộng cám (quả thể) cao:

✓ Trên cơ chất nhộng (quả thể): hàm lượng guanosine là 1,483 mg/g

✓ Trên cơ chất nhộng cám (quả thể): hàm lượng guanosine là 1,042 mg/g

- Hàm lượng guanosine thấp hơn trong các sản phẩm sử dụng cơ chất thực vật, thấp nhất là cơ chất com (0,709 mg/g) và bắp (0,800 mg/g).

Theo Fan (2006), sản phẩm *C. militaris* nuôi cấy trong một số nghiên cứu có hàm lượng guanosine trong khoảng (0,128 – 0,663 mg/g). Có thể thấy rằng hàm lượng guanosine trong các sản phẩm của Viện CNSH-MT cao hơn hẳn so với số liệu tham khảo trên.

Bảng: Hàm lượng guanosine có trong quả thể và hệ sợi nấm

Môi trường	Hàm lượng guanosine ($\mu\text{g/g}$)
Bắp kê (quả thể)	0,967 ^{ab}
Bắp kê (giá thể)	0,334 ^{cd}
Bắp (quả thể)	0,801 ^{bc}
Bắp (giá thể)	0,342 ^{cd}
Com (quả thể)	0,709 ^{bcd}
Com (giá thể)	0,192 ^d
Nhộng cám (quả thể)	1,042 ^{ab}
Nhộng cám (giá thể)	0,841 ^{bc}
Nhộng (quả thể)	1,483 ^a
Nhộng (giá thể)	0,760 ^{bc}

3.2. Hàm lượng đạm tổng số, lipid tổng số và tro tổng số:

Kết quả phân tích các chỉ tiêu của nấm *C. militaris* (quả thể và sợi nấm phát triển trên giá thể): tro tổng số, đạm tổng số, lipid tổng số của Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh như sau:

- **Đạm tổng số:** quả thể và hệ sợi nấm trên giá thể nhộng có hàm lượng cao nhất lần lượt là 7,62 và 5,14 %, . Các loại giá thể cơm, bắp, kê có hàm lượng đạm trong sợi nấm và quả thể khá thấp lần lượt là 2,16; 2,61 và 1,72%. So sánh với kết quả nghiên cứu về đồng trùng hạ thảo trên tầm dâu của Nguyễn Mậu Tuấn (2010) trích dẫn bởi Bình Nguyên (2012), với 7,75% đạm tính trên khối lượng khô thì hàm lượng đạm của nấm *C. sinenes* trên giá thể nhộng là tương đương.

- **Lipid tổng số:** hàm lượng lipid của quả thể và sợi nấm trên các giá thể nằm trong khoảng từ 6,59 – 8,18%. Kết quả phân tích này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Mậu Tuấn (2010) với 7,77% lipid tính trên khối lượng khô của đồng trùng hạ thảo tầm dâu.

- **Tro tổng số:** giá thể nhộng có hàm lượng tro cao nhất (5,50 - 7,30 %) gấp 2 – 3 lần so với giá thể thực vật. Giá thể cơm cho lượng tro tổng số thấp nhất với 2,02%.

Môi trường	Các chỉ tiêu		
	Đạm tổng số (%)	Lipid tổng số (%)	Tro tổng số (%)
Bắp – kê	2,16	6,85	3,87
Bắp	2,61	7,04	3,81
Cơm	1,72	8,19	2,02
Nhộng	7,62	7,87	5,50
Nhộng – cám	5,14	6,59	7,30
Phương pháp thử nghiệm	TCVN 8314:2009	TCVN 8137:2009	TCVN 7142:2009

*Kết quả tính trên khối lượng mẫu sấy khô
Kết quả phân tích của Viện CNSH - MT*

3.3. Hoạt tính kháng oxi hóa:

Để đánh giá khả năng kháng oxi hóa của các mẫu dịch chiết, thử nghiệm đồng trùng hạ thảo được sử dụng để đánh giá khả năng bắt gốc tự do của các hợp chất có

trong các mẫu dịch chiết, qua đó cũng đánh giá được khả năng kháng oxy hóa của các hợp chất sinh học hiện diện trong Cordyceps.

Để so sánh một cách đầy đủ hoạt tính chống oxy hóa giữa các mẫu với nhau cần căn cứ vào giá trị IC₅₀ (nồng độ mẫu thử có khả năng làm giảm 50% gốc tự do DPPH). Mẫu nào có giá trị IC₅₀ thấp hơn, tức nồng độ mẫu thử có khả năng bắt 50% gốc DPPH thấp

Hoạt tính kháng oxy hóa của các mẫu thử qua giá trị IC₅₀



Qua các giá trị IC₅₀ cho thấy tất cả các thành phần sản phẩm nấm *C. militaris* đều cho khả năng kháng oxy hóa.

4. Kết luận

Quy trình sản xuất đồng trùng hạ thảo *C. militaris* quy mô phòng thí nghiệm tại Viện NC Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường ĐH Nông Lâm TP.HCM cho sản phẩm với chất lượng cao, ổn định.

Sản phẩm có đặc điểm:

- ✓ Hàm lượng adenosine, cordycepin, guanosine cao, ổn định.
- ✓ Có tính kháng oxy hóa
- ✓ Chi phí sản xuất hợp lý

Quy trình này có thể được áp dụng ở quy mô sản xuất nhỏ. Đồng thời, dựa trên cơ sở này, có thể tối ưu hóa các thông số quy trình để mở rộng sản xuất trên quy mô lớn.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn:

- ✓ Sản phẩm nuôi cấy nhân tạo có chất lượng cao và ổn định, đáp ứng các tiêu chí của nấm dược liệu *C. militaris* nên được sử dụng để thay thế sản phẩm đông trùng hạ thảo ngoài tự nhiên.
- ✓ Quy trình này là cơ sở cho việc phát triển nuôi cấy *C. militaris* ở quy mô lớn, cung cấp nguồn dược liệu chất lượng ổn định cho thị trường, góp phần nâng cao cuộc sống cho con người và xã hội.
- ✓ Cung cấp nguồn vật liệu cho các nghiên cứu về dược tính của *C. militaris*.
- ✓ Quy trình phân tích adenosine bằng hệ thống HPLC góp phần kiểm soát chất lượng của *Cordyceps militaris* nuôi cấy và sản phẩm đông trùng hạ thảo tự nhiên trên thị trường dược liệu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Shonkor Kumar Das, Mina Matsuda, Akihiko Sakurai, Mikio Sakakibara. 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. *Fitoterapia*. 81: 961-968.
2. Peng Zheng, Yongliang Xia, Guohua Xiao, Chenghui Xiong, Xiao Hu, Siwei Zhang, Huajun Zheng, Yin Huang, Yan Zhou, Shengyue Wang, Guo-Ping Zhao, Xingzhong Liu, Raymond J St Leger and Chengshu Wang. 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a value traditional Chinese medicine. *BioMed Central*, <http://genomebiology.com/2011/12/11/R116>. 21pp.
3. Bushan Shrestha, Weimin Zhang, Yongjie Zhang, Xingzhong Liu. 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. German mycology society and Springer. *Myco. Progress*.
4. Dong, C.H., Yao, Y.J. (2005) Nutritional requirements of mycelia growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *J. Applied Microbiology*, 99: 483-492.
5. Dong, C.H., Yao, Y.J. (2007). In vitro evaluation of antioxidant activities of aqueous extracts from natural and cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Food Science and Technology*. Vol. 41: 669-677
6. Holliday JC, Cleaver P, Loomis-Powers M, and Patel D (2004). Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Ascomycetes). *International journal of medicinal mushroom*. Vol. 6: 151-164.
7. Li SP, Yang FQ, và Tsim KWK (2006). Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 41: 1571-1584.
8. Russell R., Paterson M. 2008. *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? *Phytochemistry* 69 (2008) 1469–1495
9. BS. Trần Văn Năm, *Đông trùng hạ thảo trong y học*, 2014.