

PHÂN LẬP VÀ SẢN XUẤT THỬ NGHIỆM GIỐNG NẤM DA BÁO TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÁI NGUYÊN

Vi Đại Lâm*, Nguyễn Xuân Vũ, Đinh Văn Thiện,
Nguyễn Thị Trang, Vũ Đình Hối, Bùi Thanh Ngọc
Trường Đại học Nông Lâm - ĐHTN Thái Nguyên

TÓM TẮT

Nấm da báo là loại nấm ăn hoang dại ngày càng hiếm gặp, được người dân ưa thích, có tiềm năng phát triển thương mại. Trong nghiên cứu này, giống nấm da báo hoang dại được phân lập và nhân giống tại phòng thí nghiệm trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Mẫu nấm da báo được phân lập bằng phương pháp nuôi cấy mô thể quả trên môi trường PDA. Giống nấm được cấy trên tấm bông sau đó cấy lên thóc để tăng tỷ lệ thành công so với phương pháp sản xuất giống nấm truyền thống. Giống nấm được cấy thử nghiệm trên cơ chất tạo thể quả là mùn cưa gỗ tạp. Thể quả nấm da báo hình thành sau 3 tháng nuôi cấy. Từ những kết quả thu được, nấm da báo sẽ được tiếp tục thử nghiệm và tối ưu hóa quy trình nuôi cấy trên những quy mô lớn hơn để trở thành một mặt hàng có giá trị thực tiễn về kinh tế, góp phần tạo thêm công ăn việc làm cho người dân.

Từ khóa: Nấm da báo; phân lập; sản xuất giống nấm; hình thành thể quả; cải tiến quy trình

MỞ ĐẦU

Nấm da báo tên khoa học là *Lentinus tigrinus* (Bull.) còn gọi là nấm phễu da báo, nấm xoài hay nấm dai, là loại nấm ăn mọc hoang dại. Nấm có vị ngọt ngon, được người dân tại nhiều tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam như Tuyên Quang, Lạng Sơn sử dụng làm thực phẩm ưa thích. Nấm có tiềm năng trong thực tiễn sản xuất và thương mại hóa. Ngoài thực phẩm, nấm da báo còn được biết tới với nhiều phát hiện rất được chú ý như: Chứa hoạt chất có tác dụng ngăn phiên mã ngược ở virus [4], khả năng xử lý các chất thải giàu cellulose gây ô nhiễm, phân giải thành phần lindane (γ -HCH) trong thuốc trừ sâu [3]. Các đặc điểm sinh học, khả năng mọc và sinh sản của nấm da báo đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu, tuy nhiên trên thị trường nấm ăn trong nước vẫn chưa thấy sự xuất hiện của các sản phẩm của loại nấm này [1]. Hiện nay người dân còn thiếu nguồn cung cấp giống nấm cũng như các kỹ thuật để có thể chủ động nuôi trồng loại nấm ăn này tại địa phương, số lượng nấm da báo thu nhận được hàng năm rất ít và ngày càng hiếm gặp. Để giải quyết vấn đề trên, giống nấm da báo được phân lập và sản xuất thử nghiệm tại trường Đại học

Nông Lâm Thái Nguyên. Cơ chất thích hợp và thuận lợi cho sản xuất giống nấm là thóc. Tuy nhiên trong quá trình nấm phát triển, các giọt nước đọng trên thành chai/túi làm nát hạt thóc gây chua, dính, làm sợi nấm không phát triển được dẫn tới hỏng hàng loạt, thậm chí hỏng 100% gây thiệt hại lớn về kinh tế. Vấn đề này đòi hỏi cần cải tiến kỹ thuật sản xuất hiện hành.

Mục tiêu của bài báo tập trung vào các bước: Phân lập nấm da báo hoang dại để thu nhận giống nấm gốc, sản xuất giống nấm (meo nấm) trên nguyên liệu là tấm bông và cấy chuyển lên thóc để giảm tỷ lệ nát, hỏng. Những kết quả thu được sẽ là cơ sở để xây dựng các mô hình sản xuất, mô hình khởi nghiệp và mô hình nuôi trồng nấm tại các hộ gia đình, góp phần đưa các loại nấm ăn tới gần với người dân lao động.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Quá trình nghiên cứu và thử nghiệm được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Lên men, khoa Công nghệ sinh học-Công nghệ thực phẩm, Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Các nguyên vật liệu và phương pháp thí nghiệm như sau:

Thu mẫu

Mẫu nấm da báo được thu nhận ngoài tự nhiên trên địa bàn huyện Sơn Dương, tỉnh

*Tel: 0968 010313, Email: vilamcns@gmail.com

Tuyên Quang. Những thể quả lớn, chưa bị héo, nứt nẻ được thu nhận để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình phân lập bằng mảnh mô lõi. Mẫu được vận chuyển về phòng thí nghiệm, bảo quản trong điều kiện 5°C. Quá trình phân lập được tiến hành khi mẫu nấm còn tươi, các mẫu nấm đã bảo quản lạnh khoảng 1 tuần khi phân lập thường có tốc độ phát triển chậm hơn, rủi ro thất bại cao.

Chuẩn bị môi trường phân lập

Môi trường Potato Dextrose Agar (PDA), được sử dụng để phân lập mẫu mô nấm. Môi trường được chuẩn bị như sau: Khoai tây gọt vỏ, thái nhỏ thành những mảnh khoảng 2-3 cm, khối lượng 200 g, đun sôi 10 - 15 phút, thu lấy 1000 ml dịch chiết, bổ sung agar (18 g/l), glucose (20 g/l), peptone (4 g/l), khử trùng ở điều kiện 121°C, 1 at, 20 phút.

Phân lập mẫu

Sử dụng phương pháp phân lập truyền thống bằng mảnh mô lõi thể quả, có điều chỉnh nhỏ về hàm lượng một số thành phần, áp dụng cho các loại nấm lớn như nấm sò, linh chi, nấm hương [5]. Lựa chọn thể quả nấm có kích thước lớn, không dính đất bẩn trên bề mặt, xít cùn -70°C lên bề mặt thể quả và chuyển vào tủ cấy vô trùng. Xé đôi thể quả nấm từ phần mũ dọc theo thân nấm. Sử dụng kéo hoặc dao vô trùng cắt lấy mảnh mô khoảng 1 - 1,5 cm², chuyển vào đĩa petry/chai chứa môi trường phân lập. Điều kiện nuôi không có ánh sáng hoặc ánh sáng yếu, nhiệt độ phòng khoảng 30 - 33°C [2], [6]. Quan sát và theo dõi sự phát triển của sợi nấm trong 10 ngày nuôi cấy.

Chuẩn bị và cấy giống trên giá thể tấm bông

Tấm bông thân gỗ, đường kính khoảng 2 mm, dài 5 - 6 cm. Hai đầu tấm quần bông được ủ với môi trường PDA cho ướt đều, chuyển vào túi bóng chịu nhiệt hoặc chai thủy tinh, hấp khử trùng ở điều kiện 121°C, 1 at, 1h. Thí nghiệm lặp lại ba lần, mỗi lần một túi chứa 50 que. Sau khử trùng, tấm bông được để nguội trong tủ cấy vô trùng. Từ môi trường phân

lập, tách 1 mảnh thạch có sợi nấm mọc dày cấy chuyển sang tấm bông. Điều kiện nuôi sợi không có ánh sáng hoặc ánh sáng yếu, nhiệt độ phòng khoảng 30 - 33°C. Khi sợi nấm lan kín hai đầu, sử dụng tấm bông làm giống cấy lên thóc để sản xuất giống nấm đưa vào sản xuất.

Sản xuất thử nghiệm giống nấm

Thóc là nguyên liệu sản xuất giống nấm phổ biến. Khối lượng thóc sử dụng sản xuất giống nấm thử nghiệm là 5 kg. Thóc được rửa sạch, ngâm qua đêm, đun sôi cho tới khi nứt vỏ hạt, vớt để ráo nước, bổ sung 1% bột CaCO₃, trộn đều và đóng vào các túi nilon chịu nhiệt. Khối lượng mỗi túi khoảng 300 g. Do thóc có thể chứa nhiều yếu tố gây nhiễm, túi thóc được hấp khử trùng 2 lần theo phương pháp Tyndallization ở điều kiện 121°C, 1 at, 30 phút. Mỗi lần cách nhau 24h. Cách khử trùng này có thể diệt các vi sinh vật và cả bào tử vừa nảy mầm sau lần khử trùng đầu tiên đồng thời tiết kiệm năng lượng vận hành thiết bị. Giống nấm trên tấm bông được cấy lên thóc. Mỗi túi thóc cấy 2 tấm bông ở hai phía đối diện trong tủ cấy vô trùng, dùng kim tạo những lỗ nhỏ dọc theo tấm bông, buộc chặt miệng túi. Những túi đã cấy tấm bông được chuyển vào 1 túi nilon lớn vô trùng, làm duy nhất 1 nút bông cho túi này, nuôi trong điều kiện 30 - 33°C, ít hoặc không có ánh sáng, theo dõi sự phát triển của hệ sợi. Giống nấm mọc đều, không xuất hiện các dấu hiệu nhiễm vi sinh vật được cấy thử nghiệm lên 10 bịch cơ chất. Thành phần gồm mùn cưa gỗ tạp, là nguồn nguyên liệu sẵn có, bổ sung 10% cám gạo, 1% bột CaCO₃, khử trùng 2 lần ở 121°C, 1 at, 30 phút.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Phân lập mẫu

Thể quả nấm da báo được thu nhận từ môi trường tự nhiên được tách lấy mảnh mô lõi và cấy lên môi trường PDA (Hình 1). Sau 2 - 3 ngày nuôi cấy có thể quan sát thấy sợi nấm bằng mắt thường. Sau khoảng 9 - 10 ngày, sợi nấm mọc kín bề mặt đĩa petri đường kính 10 cm. Bảo quản sợi nấm trong điều kiện 5°C, sau 30 ngày cấy truyền sang đĩa môi trường mới.



Hình 1. Nuôi cấy mảnh mô nấm da báo

Giống nấm da báo trên giá thể tằm bông

Để tìm kiếm giải pháp cho các vấn đề nát, hỏng của thóc khi sản xuất giống nấm, giống nấm da báo được cấy thử nghiệm trên giá thể tằm bông. Kết quả cho thấy 100% túi tằm bông có sợi nấm phát triển trắng đều, không quan sát thấy hiện tượng nhiễm mốc, không xuất hiện các chất nhầy có màu khác thường. Sợi nấm lan phủ kín giá thể sau 20 - 25 ngày nuôi cấy (Hình 2).



Hình 2. Hệ sợi nấm trên giá thể tằm bông

Ngoài các tấm bông thân gỗ đóng gói sẵn đang được bán trên thị trường có thể tự chuẩn bị bằng tấm tre có kích thước tương tự, quần bông vào hai đầu tấm tre. Thân tấm gỗ và tấm tre không chứa nhiều chất dinh dưỡng nhưng

khí được ngâm với môi trường PDA, hai khối bông ở hai đầu tấm sẽ trở thành nguồn dinh dưỡng cung cấp cho sợi nấm. Với nguyên liệu cứng như tấm bông, vấn đề giọt nước đọng trên thành túi gây nát nguyên liệu hoàn toàn được giải quyết. Sợi nấm theo thời gian cũng có thể sử dụng thân tấm như nguồn cellulose trong tự nhiên. Tuy nhiên, ở điều kiện sản xuất thông thường, giống nấm cấy lên cơ chất tạo thể quả cần số lượng lớn để bao phủ bề mặt nguyên liệu nhằm tăng khả năng cạnh tranh vị trí lan phủ của nấm ăn với các vi sinh vật lây nhiễm. Vì vậy, trong nghiên cứu này giống nấm tằm bông chỉ được sử dụng để tăng hiệu quả cho quá trình sản xuất giống nấm trên thóc.

Với cách cấy truyền thống sử dụng mảnh agar chứa sợi nấm, vùng thóc ở đáy túi sẽ tiếp xúc với sợi nấm sau khoảng 20 ngày, khoảng thời gian này quá dài dễ dẫn tới rủi ro hỏng, nát thóc. Giống nấm trên tằm bông có thể cải thiện vấn đề này. Với 2 tấm bông cấy ở 2 phía đối diện của túi thóc, sợi nấm từ 2 đầu tấm bông sẽ đồng thời phát triển cả phía trên, phía dưới, phía trước và phía sau, nhanh chóng lan kín túi thóc, giảm rủi ro thóc bị hỏng, nát, giảm thời gian ươm sợi.

Sản xuất thử nghiệm giống nấm

Nguyên liệu sản xuất thử nghiệm giống nấm da báo là thóc, được cấy bằng tấm bông có sợi nấm tinh sạch lan phủ kín, mọc đều. Túi thóc được khử trùng bằng phương pháp Tyndallization. Các túi thóc được cung cấp khí qua những lỗ kim nhỏ. Sử dụng một túi nilon chịu nhiệt lớn vô trùng có nút bông để ngăn cách các túi thóc với các yếu tố lây nhiễm. Kết quả cho thấy 100% túi thóc cho kết quả tốt, sợi nấm mọc trắng, có mùi thơm nhẹ, lan phủ kín túi nguyên liệu sau 15 - 20 ngày nuôi cấy. Không quan sát thấy túi thóc bị nhiễm mốc hay côn trùng gây hại (Hình 3A). Với phương pháp tạo lỗ thùng nhỏ, hơi nước trong các túi thóc thoát ra ngoài làm giảm độ ẩm của túi thóc tránh hiện tượng nát thóc. Trên thành túi nilon chịu nhiệt lớn bọc ngoài các túi thóc thường quan sát thấy các giọt nước ngưng tụ.



A)



B)

Hình 3. Sản xuất thử nghiệm giống nấm da báo: A) Giống nấm cấy trên thóc; B) Thể quả nấm da báo trên giá thể mùn cưa

Lượng nước này không tiếp xúc trực tiếp với hạt thóc và không gây ảnh hưởng, bên cạnh đó còn có thể duy trì độ ẩm bên trong túi. Cách sản xuất này giảm thiểu tối đa lượng bông và cỏ nút sử dụng trong phương pháp truyền thống, ngăn ngừa hiệu quả sự gây hại của côn trùng như ruồi giấm, kiến, góp phần cắt giảm chi phí trong sản xuất, giảm thời gian làm nút bông, hạ giá thành sản phẩm. Trong quá trình sản xuất, một số túi thóc có tốc độ mọc không đồng đều, có thể chậm hơn so với những túi được cấy cùng thời điểm từ 3 - 5 ngày. Vì vậy trong tương lai cần có những thử nghiệm đánh giá về số lượng các lỗ thông khí cho túi thóc, đồng thời nên để một khoảng không gian trống ở vị trí lỗ kim tránh trường hợp sợi nấm mọc bịt kín lỗ kim, gây cản trở quá trình thông khí của túi thóc. Giống nấm sau khi mọc kín được cấy thử nghiệm trên mùn cưa gỗ tạp có sẵn tại địa phương. Thể

quả nấm hình thành sau 3 tháng nuôi cấy (Hình 3B).

KẾT LUẬN

Từ mẫu nấm thu nhận trong môi trường hoang dại, chúng tôi đã phân lập thành công giống gốc của nấm da báo. Giống nấm phục vụ sản xuất được cấy thành công trên nguyên liệu tấm bông và thóc. Với phương pháp nhân giống bằng tấm bông và cách đóng gói mới đã giải quyết được vấn đề hỏng nát thóc trong phương pháp nhân giống truyền thống. Với tỷ lệ sản xuất giống nấm da báo thành công 100% trên quy mô phòng thí nghiệm, phương pháp này sẽ được thử nghiệm trong những quy mô lớn hơn, đồng thời tối ưu hóa các điều kiện hình thành thể quả, tiến tới thương mại hóa sản phẩm giống nấm, đưa giống nấm da báo hoang dại vào hoạt động sản xuất của người dân, đáp ứng nhu cầu thực tiễn của xã hội.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Thanh Tú, Trịnh Tam Kiệt (2009), “Nghiên cứu đặc điểm sinh học của nấm phễu da báo *Lentinus tigrinus* (Bull) Fr”, *Di truyền học và Ứng dụng - Chuyên san Công nghệ sinh học*, số 5, tr. 26.
2. Bernardo E. Lechner, Edgardo Albertó (2004), “Optimal conditions for the fruit body production of natural occurring strains of *Lentinus tigrinus*”, *Bioresource Technology*, 98(9), pp. 1866-1869.
3. Juan C. Quintero, María T. Moreira, Gumersindo Feijoo, Juan M. Lema (2008), “Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH)”, *Cien. Inv. Agr.*, 35(2), pp. 159-167.
4. LiJing Xu, HeXiangWang, TziBun Ng (2012), “A Laccase with HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitory Activity from the Broth of Mycelial Culture of the Mushroom *Lentinus tigrinus*”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2012, Article ID 536725, pp. 1.
5. Nootjaree Tudsas (2016), “Isolation and Mycelial Growth of Mushrooms on Different Yam-based Culture Media”, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, Vol. 4 (05), pp. 033-036.
6. Rich Milton R. Dulay, Sofronio P. Kalaw, Renato G. Reyes, Esperanza C. Cabrera, Noel F. Alfonso (2012), “Optimization of Culture Conditions for Mycelial Growth and Basidiocarp Production of *Lentinus tigrinus* (Bull.) Fr., A New Record of Domesticated Wild Edible Mushroom in the Philippines”, *The Philippine Agricultural Scientist*, Vol. 95, pp. 278-285.

SUMMARY

ISOLATION AND PILOT PRODUCTION OF SPAWN OF *LENTINUS TIGRINUS* MUSHROOM IN THAI NGUYEN UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

**Vi Dai Lam^{*}, Nguyen Xuan Vu, Dinh Van Thien,
Nguyen Thi Trang, Vu Dinh Hoi, Bui Thanh Ngoc**
TNU - University of Agriculture and Forestry

Lentinus tigrinus is a wild edible mushroom with delicious taste. In this study, this edible mushroom is domesticated for commercial purpose in the future. The sample is collected from natural environment, isolated by tissue culture on PDA media in laboratory of Faculty of Biotechnology and Food Technology, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry. Mother spawn is produced in cotton swab and subcultured into rice to reduce decay ratio in traditional method. The result shows that *Lentinus tigrinus* is domesticated successfully. The fruiting body is observed after three months. One hundred percent of mother spawn grow well without decay rice. Conditions for fruiting body formation will be optimized in the future to develop this edible mushroom as a commercial product.

Từ khóa: *Lentinus tigrinus*; Isolation; Mushroom spawn production; Fruiting body; Process improvement

Ngày nhận bài: 15/3/2018; **Ngày phản biện:** 25/3/2018; **Ngày duyệt đăng:** 27/4/2018

^{*} Tel: 0968 010313, Email: vilamcns@gmail.com