

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.121

## NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG THÍCH HỢP NHÂN NUÔI NẤM *Cordyceps militaris* TRÊN VẬT CHỦ

Trần Thanh Thy<sup>1\*</sup> và Lê Văn Vàng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Kiến trúc – Xây dựng và Môi trường, Trường Đại học Nam Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Thy (email: tthy@nctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/06/2020

Ngày nhận bài sửa: 11/07/2020

Ngày duyệt đăng: 28/10/2020

### Title:

Study of suitable media for the fruiting body of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* on host

### Từ khóa:

*Cordyceps militaris*, đông trùng hạ thảo, môi trường, nhân nuôi nấm, vật chủ

### Keywords:

*Cordyceps militaris*, host, media, medicinal mushroom.

### ABSTRACT

Medicinal mushroom, *Cordyceps militaris*, an entomopathogenic fungus with medicinal and commercial values, is over-exploited, leading to scarcity in nature. The cultivation procedure of *C. militaris* on host under in vitro condition has been carried out successfully. The results showed that SDAY2 media was suitable for fast growing mycelium after 5 days of culture and large fruiting body size, very fine mycelium, cotton and reptile surface. Liquid medium CTI showed that optimal fungal spore density after 11 days of culture, by injecting 2 mL of fungal liquid into the top of the pupal stage of *Brihaspa astrostigmella*, *Rhynchophorus ferrugineus* and *Bombyx mori* were highly effective, mycelium develops quickly and forms fruiting bodies, infection rate of *C. militaris* and *Bombyx mori* productivity the highest (> 95%; length 7.05 cm, diameter 2.31 mm and weight 0.32 g/fruit), cordycepin and adenosine content in the fruiting body dried to 5.25 mg/g and 0.71 mg/g, 6.1 mg/g and 0.52 mg/g, 5.34 mg/g and 0.58 mg/g respectively for *Brihaspa astrostigmella*, *Rhynchophorus ferrugineus* and *Bombyx mori*. These techniques can be applied to produce *C. militaris* mushroom on hosts to meet the market demand for current *Cordyceps* products.

### TÓM TẮT

Nấm đông trùng hạ thảo, *Cordyceps militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng có giá trị dược liệu quý và thương mại rất cao nên bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm ngoài tự nhiên. Nhân nuôi nấm *C. militaris* trên vật chủ trong điều kiện bán nhân tạo đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy nuôi cấy hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường SDAY2 sau 5 ngày cho hệ sợi nấm ăn kín bề mặt môi trường, hệ sợi nấm rất mịn, bông và bò sát bề mặt môi trường. Môi trường lỏng CTI cho mật độ bào tử nấm đạt tối ưu sau 11 ngày nhân nuôi; bằng kỹ thuật tiêm 2 mL dịch lỏng nấm vào đỉnh đầu giai đoạn nhộng của *Brihaspa astrostigmella*, *Rhynchophorus ferrugineus* và *Bombyx mori* đều đạt hiệu quả cao, hệ sợi nấm phát triển nhanh và hình thành quả thể, tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* và năng suất trên *Bombyx mori* đạt cao nhất (> 95%; chiều dài quả thể 7,05 cm, đường kính 2,31 mm và khối lượng 0,32 g/quả thể), hàm lượng được liệu cordycepin và adenosine trong quả thể sấy khô đạt 5,25 mg/g và 0,71 mg/g, 6,1 mg/g và 0,52 mg/g, 5,34 mg/g và 0,58 mg/g tương ứng cho *Brihaspa astrostigmella*, *Rhynchophorus ferrugineus* và *Bombyx mori*. Kỹ thuật này có thể ứng dụng để sản xuất nấm *C. militaris* trên vật chủ để đáp ứng nhu cầu thị trường về sản phẩm đông trùng hạ thảo hiện nay.

Trích dẫn: Trần Thanh Thy và Lê Văn Vàng, 2020. Nghiên cứu môi trường thích hợp nhân nuôi nấm *Cordyceps militaris* trên vật chủ. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(5B): 125-134.

## 1 MỞ ĐẦU

*Cordyceps militaris* được gọi là nấm đông trùng hạ thảo (ĐTHT), là một loài nấm ký sinh trên côn trùng có giá trị dược liệu quý tương tự như *Cordyceps sinensis* và được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền trong nhiều năm qua (Bhushan *et al.*, 2012). Đến năm 2006, hơn 400 loài nấm ĐTHT thuộc chi *Cordyceps* được phát hiện nhưng chỉ có 2 loài được nghiên cứu nhiều nhất là *C. sinensis* và *C. militaris* do có giá trị dược liệu cao. Ngoài tự nhiên, nấm ĐTHT thường được tìm thấy vào mùa hè, loài nấm *C. sinensis* phân bố chủ yếu ở các vùng núi cao thuộc dãy núi Himalaya có độ cao trên 4.000 m so với mực nước biển như vùng Tây Tạng (Trung Quốc) (Wang, 1995; Sung, 1996; Li *et al.*, 2006). Loài nấm *C. sinensis* đến nay vẫn chưa nhân nuôi qua thể thành công trong môi trường nhân tạo (Đỗ Tuấn Bách và *ctv.*, 2017). Loài nấm *C. militaris* có hàm lượng các hoạt chất có hoạt tính và sinh học tương đương, thậm chí còn cao hơn của loài nấm *C. sinensis* và dễ dàng nuôi trồng trên môi trường nhân tạo (Li *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 2012; Trần Thanh Thy, 2019). Gần đây, bộ gen hoàn chỉnh của nấm *C. militaris* cũng được giải trình tự làm cơ sở cho nhiều nghiên cứu sâu hơn về loài nấm này và nghiên cứu thành công cơ chất rắn được bổ sung SBG (spent brewery grain) đã làm tăng hàm lượng dược liệu trong quả thể của nấm này (Zheng *et al.*, 2011; Trần Thanh Thy, 2019). Ngũ cốc đã qua sử dụng (SBG) là sản phẩm phụ của ngành công nghiệp sản xuất bia, SBG vẫn còn lớp vỏ bên ngoài của hạt lúa mạch ban đầu sau khi chiết xuất lúa mạch bằng nước nóng ở nhiệt độ 65-70°C (Mussatto *et al.*, 2006).

Trong nấm *C. militaris* chứa một số dược liệu quan trọng như cordycepin, ergosterol, cordycepic acid, adenosine, polysaccharide, superoxide dismutase (SOD) và một số thành phần dinh dưỡng khác. Các polysaccharide của *C. militaris* cho thấy các hoạt tính chống tế bào ung thư cổ tử cung và ung thư gan (Yang *et al.*, 2014), các chất chiết xuất từ quả thể có hoạt tính như chất chống oxy hóa, chất kháng khuẩn, kháng nấm, kháng thể dòng tế bào ung thư (Raoa *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2014), kháng viêm (Won and Park, 2005; Raoa *et al.*, 2010), chống xơ hóa (Nan *et al.*, 2001), chống quá trình tạo mạch máu ở tế bào ung thư (Yoo *et al.*, 2004) và tiết insulin (Choi *et al.*, 2004). Loài nấm này được nuôi trồng để sản xuất cordycepin (3'-deoxyadenosine), một chất tương tự như nucleoside chống ung thư, ức chế tăng sinh, chống di căn, diệt sâu và kháng khuẩn (Song *et al.*, 1998).

Nhiều tác giả trong và ngoài nước đã nghiên cứu thành công quy trình nuôi nấm *C. militaris* trên cơ chất, rất ít nghiên cứu nuôi nấm này trên vật chủ trong điều kiện bán nhân tạo. Gần đây sâu chít, đuông dừa và nhộng tằm đã trở thành đặc sản và có mặt ở nhiều thành phố lớn ở Việt Nam. Song song với việc sử dụng các loại côn trùng như trên làm thực phẩm thì nhiều hộ kinh doanh trong khu vực còn có nghề nuôi côn trùng (Phạm Quỳnh Mai và *ctv.*, 2015). Với khả năng sinh trưởng và phát triển mạnh của nấm *C. militaris* thì nhộng sâu chít, nhộng đuông dừa và nhộng tằm sẽ là nguồn giá thể phù hợp cho sự sinh trưởng phát triển của nấm *C. militaris*.

Do giá trị dược liệu, giá trị kinh tế cao và tính khả thi của việc nuôi nấm *C. militaris* ở quy mô công nghiệp, việc phát triển các nghiên cứu về nuôi trồng nấm *C. militaris* trên vật chủ nhằm tăng quy mô sản xuất, đáp ứng nhu cầu của thị trường trong nước và chuyển giao công nghệ cho các đơn vị sản xuất để đem lại lợi ích kinh tế cho địa phương là hết sức cần thiết. Nghiên cứu này trình bày kết quả nghiên cứu môi trường thích hợp được bổ sung SBG nhằm làm tăng hàm lượng dược liệu trong quả thể của chủng nấm *C. militaris* nhân nuôi trên vật chủ trong điều kiện bán nhân tạo.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

- Giống nấm ĐTHT: Chủng nấm *C. militaris* (ký hiệu CM- China1) được mua chủng gốc từ Công ty Công nghệ Baoli Laoning (Trung Quốc).
- Các loại nguyên liệu: khoai tây, agar, pepton, yeast extract.
- Các chất khoáng và vitamin: SBG, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, vincozyn, kitin.
- Các loại môi trường nhân nuôi chủng nấm CM- China1
- Môi trường thạch nhân nuôi hệ sợi nấm
- Môi trường PDA (potato dextrose agar): agar, 45% khoai tây, 10% dextrose.
- Môi trường SDAY1 (spent brewery grain dextrose agar yeast extract): agar, 45% SBG, 10% dextrose, 5% yeast.
- Môi trường DAY1 (dextrose agar yeast extract): agar, 10% dextrose, 5% yeast.
- Môi trường SDAY2 (spent brewery grain dextrose agar yeast extract và khoáng chất, vitamin): agar, 45% SBG, 10% dextrose, 5% Yeast + một số chất khoáng và vitamin (0,2% MgSO<sub>4</sub>, 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% kitin, 5% pepton).

- Môi trường DAY2 (dextrose agar yeast extract và khoáng chất, vitamin): agar, 10% dextrose, 5% yeast + một số chất khoáng và vitamin (0,2% MgSO<sub>4</sub>, 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,05% kitin, 5% pepton).

- Môi trường dịch lỏng nhân nuôi hệ sợi nấm

- Môi trường CT1: 35% SBG, 10% glucose, 2% pepton, 2% yeast, 0,5% vincozyn.

- Môi trường CT2: 35% SBG, 10% glucose, 2% pepton, 2% yeast, 0,5% vincozyn, 0,2% MgSO<sub>4</sub>, 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

- Môi trường CT3: 10% glucose, 2% pepton, 2% yeast, 0,5% vincozyn, 0,2% MgSO<sub>4</sub>, 0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Các vật chủ nhân nuôi nấm *C. militaris*: nhộng sâu chít (*Brihaspa astrostigmella*), nhộng đòng dừa (*Rhynchophorus ferrugineus*) và nhộng tằm (*Bombyx mori*).

Tất cả các môi trường nuôi cấy đều được hấp thanh trùng ở 121°C trong 20 phút.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và đặc điểm của hệ sợi nấm *CM- China1*

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp của Kamp and Bidochka (2002) trên 5 loại môi trường PDA, SDAY1, DAY1, SDAY2 và DAY2 với 6 lần lặp lại. Cho 10 mL môi trường đã được thanh trùng/ đĩa petri đã thanh trùng. Sau đó cấy 1 khoanh nấm có đường kính 5 mm vào giữa đĩa môi trường và đặt ở điều kiện nhiệt độ 22°C trong tối hoàn toàn. Sau khi hệ sợi nấm mọc phủ kín môi trường thạch thì chiếu sáng 8 giờ/16 với cường độ 700 Lux.

*Chi tiêu ghi nhận:* Theo dõi sự phát triển của hệ sợi và đường kính khuẩn lạc của nấm *C. militaris* vào các 2, 5, 10 và 30 ngày sau khi cấy (NSKC) giống nấm.

### 2.2.2 Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dịch lỏng đến sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm *CM- China1*

- Thí nghiệm cũng được thực hiện theo phương pháp của Kamp and Bidochka (2002) trên 3 loại môi trường lỏng CT1, CT2 và CT3 với 10 lần lặp lại. Dùng que cấy lấy giống cấp 1 (được chọn từ nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và đặc điểm của hệ sợi nấm) khoanh nấm 0,5 mm cho vào bình tam giác được chứa 400 ml môi trường dịch lỏng đã được thanh trùng và

được lên men bề mặt với hệ thống lắc tròn (250 v/phút) trong điều kiện nhiệt độ 22 °C tối hoàn toàn.

- *Chi tiêu ghi nhận:* Đếm mật độ bào tử nấm vào 5, 7, 9 và 11 NSKC giống nấm.

### 2.2.3 Nhân nuôi nấm *CM- China1* trên vật chủ

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 loài vật chủ (nghiệm thức) là nhộng sâu chít, nhộng đòng dừa, nhộng tằm và 50 lần lặp lại. Tiêm 2 mL dịch lỏng chủng nấm *CM- China1* (được chọn từ nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dịch lỏng đến sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm) vào đỉnh đầu của nhộng. Sau đó, 150 nhộng của 3 loài vật chủ được đặt vào hộp nhựa có lót một lớp giấy thấm khử trùng bên dưới và được nuôi trong điều kiện bán nhân tạo ở nhiệt độ, ẩm độ và ánh sáng huỳnh quang tối ưu qua 3 giai đoạn: (1) giai đoạn ươm tơ nấm đặt ở điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ 18°C, không tạo ẩm độ; (2) giai đoạn kích mầm đặt ở nhiệt độ 20°C, tạo ẩm độ 80-85%, chiếu sáng 14/10 với cường độ 1.800 Lux và (3) giai đoạn chăm sóc quả thể đặt ở nhiệt độ 20-22°C, tạo ẩm độ 85-90%, chiếu sáng 12/12 với cường độ 1.800 Lux. Quả thể chủng nấm *CM- China1* trên thân nhộng khi thành thực được thu hoạch và được gửi mẫu phân tích được liệu tại Viện Thực phẩm Chức năng.

- *Chi tiêu ghi nhận:* thời gian sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm; tỷ lệ nhiễm nấm *CM- China1*; đường kính quả thể; chiều dài quả thể; trọng lượng quả thể.

- *Đánh giá về được liệu:* Mỗi nghiệm thức được lấy ngẫu nhiên 10 nhộng (10 lần lặp lại) để chuyển mẫu phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể (mg/g) sấy khô bằng phương pháp LC-MS/MS và HD.PP.50/TT.HPLC của Viện Thực phẩm Chức năng. Quả thể chủng nấm *CM- China1* được nghiền nát và được cho bay hơi qua hệ thống cô quay chân không với dung môi *n*-hexan. Dịch trong suốt thu được sau khi chiết xuất được ly tâm ở 14000 g trong 10 phút và lọc qua màng lọc 0.22 μm (Macherey Nagel). Quá trình phân tích được thực hiện trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ LC/MS/MS bao gồm: HPLC được trang bị đầu dò PDA 996, module tách 2690 và Nucleosil C18, thông số cột 250 x 4.6 mm, 5 μm. Ergosterol đã được rửa giải bằng dòng với 50% methanol và 50% acetonitrile, tốc độ dòng 1,5 mL/phút và xác định với thời gian lưu chuẩn và ba đỉnh hấp thu đặc hiệu của ergosterol tại các bước sóng ở giữa 260 nm và 300 nm. Đối với định lượng, sử dụng ergosterol chuẩn tinh khiết để dựng đường chuẩn và đọc kết quả (Nylund *et al.*, 1992).

Xử lý số liệu: Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 21.0 qua phân tích ANOVA và ý nghĩa được chấp nhận ở  $p < 0,05$ .

**3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1 Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng và đặc điểm của hệ sợi nấm CM- China1 trong môi trường nhân giống**

Chủng nấm CM- China1 được nuôi cấy để phát triển hệ sợi trên 5 loại môi trường gồm PDA, SDAY1, DAY1, SDAY2 và DAY2. Kết quả cho thấy trên các loại môi trường dinh dưỡng khác nhau thì hệ sợi sinh trưởng, phát triển là rất khác nhau. Sự khác nhau được thể hiện rõ ở các chỉ tiêu như thời gian để hệ sợi nấm mọc kín môi trường dinh dưỡng, đặc điểm hệ sợi nấm mọc qua từng khoảng thời gian xác định (Bảng 1)

**Bảng 1: Sự sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm *C. militaris* trên môi trường thuần khiết**

Môi trường	Thời gian hệ sợi nấm mọc kín (ngày)	Đặc điểm hệ sợi nấm vào các NSKC			
		2	5	10	30
PDA	12 a	Từ mô hệ sợi cấy ban đầu, hệ sợi bắt đầu mọc lan ra xung quanh, tạo khuẩn lạc, hệ sợi mỏng, màu trắng bông.	Hệ sợi bắt đầu phát triển mọc lan ra bề mặt môi trường, mỏng, dai, màu trắng bông và bề mặt hệ sợi mịn.	Hệ sợi phát triển mạnh mọc lan gần kín bề mặt môi trường, dày, dai, màu trắng bông và bề mặt hệ sợi mịn.	Hệ sợi ngừng phát triển, lớp hệ sợi dày, dai màu vàng cam.
SDAY1	7 b	Từ mô hệ sợi cấy ban đầu, hệ sợi phát triển mọc lan ra xung quanh, tạo khuẩn lạc, hệ sợi mỏng, màu trắng bông.	Hệ sợi phát triển mạnh mọc lan gần kín bề mặt môi trường, dày, dai, màu trắng bông, bề mặt hệ sợi mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi mọc kín bề mặt môi trường, hệ sợi bắt đầu chuyển sang màu vàng cam, mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi ngừng phát triển. Bề mặt hệ sợi bông xốp, bò sát môi trường và màu vàng cam.
DAY1	7 b	Từ mô hệ sợi cấy ban đầu, hệ sợi phát triển mọc lan ra xung quanh, tạo khuẩn lạc, hệ sợi mỏng, màu trắng bông.	Hệ sợi phát triển mạnh mọc lan gần kín bề mặt môi trường, dày, dai, màu trắng bông, bề mặt hệ sợi mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi mọc kín bề mặt môi trường, hệ sợi bắt đầu chuyển sang màu vàng cam, mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi ngừng phát triển. Bề mặt hệ sợi bông xốp, bò sát môi trường và màu vàng cam.
SDAY2	5 c	Từ mô hệ sợi cấy ban đầu, hệ sợi phát triển mọc lan ra xung quanh, tạo khuẩn lạc, hệ sợi dày, màu trắng bông.	Hệ sợi phát triển mạnh mọc kín bề mặt môi trường, dày, dai, màu trắng bông, bề mặt hệ sợi rất mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi bắt đầu chuyển sang màu vàng cam, hệ sợi rất mịn.	Hệ sợi ngừng phát triển. Bề mặt hệ sợi bông xốp, rất mịn, bò sát môi trường và màu vàng cam.
DAY2	5 c	Từ mô hệ sợi cấy ban đầu, hệ sợi phát triển mọc lan ra xung quanh, tạo khuẩn lạc, hệ sợi dày, màu trắng bông.	Hệ sợi phát triển mạnh mọc kín bề mặt môi trường, dày, dai, màu trắng bông, bề mặt hệ sợi mịn và bò sát môi trường.	Hệ sợi bắt đầu chuyển sang màu vàng cam.	Hệ sợi ngừng phát triển. Bề mặt hệ sợi bông xốp, bò sát môi trường và màu vàng cam.
CV (%)	18,32				
Mức ý nghĩa	**				

Ghi chú: \*\*: chỉ khác biệt mức ý nghĩa 1%. Trong cùng một cột các trung bình theo sau có cùng chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan.

Hệ sợi nấm trên cả 5 môi trường đều phát triển tốt, có sự khác biệt về thời gian mọc tơ nấm cũng như hình thái của hệ sợi. Yếu tố dẫn đến sự khác biệt của hệ sợi nấm trong 5 môi trường trên chính là do thành phần dinh dưỡng. Ở môi trường PDA nghèo dinh dưỡng nên hệ sợi chậm phát triển nhất, 4 môi trường còn lại được bổ sung thêm SBG, khoáng chất và vitamin cho hệ sợi nấm phát triển nhanh hơn (5-7 NSKC), trong đó môi trường SDAY2 vừa bổ sung SBG và chất khoáng, vitamin hệ sợi ăn kín môi trường chỉ 5 NSKC, hệ sợi dày, dai, bóng, mịn, màu vàng cam và bò sát bề mặt môi trường thể hiện đặc tính thuần của chủng nấm *C. militaris*, phù hợp cho việc chọn chủng giống cấp 1 để nhân giống trong môi trường lỏng.

Bảng 2 cho thấy, đường kính phát triển của khuẩn lạc chủng CM- China1 ở thời điểm 2 NSKC dao động từ 10,02 - 40,01 mm. Trong đó, đường kính khuẩn lạc phát triển mạnh nhất ở môi trường SDAY2, đạt 40,01 mm và không khác biệt thống kê với các môi trường DAY2, SDAY1 và DAY1. Đến 5 NSKC, tốc độ phát triển khuẩn lạc của nấm tăng mạnh, trong đó môi trường SDAY2 và DAY2 cho đường kính khuẩn lạc đạt tối ưu (100,3-100,4 mm), giống nhau về mặt thống kê và khác biệt giữa nhau với 3 môi trường còn lại. Khi xét ở thời điểm 10 NSKC, hai môi trường SDAY1 và DAY1 cho đường kính khuẩn lạc đạt tối ưu, không khác biệt giữa nhau với 3 môi trường còn lại và tốc độ phát triển khuẩn lạc ngừng phát triển cho đến 30 NSKC.

**Bảng 2: Đường kính khuẩn lạc của nấm *C. militaris* trên môi trường thuần khiết**

Môi trường	Đường kính khuẩn lạc (mm) vào các NSKC			
	2	5	10	30
PDA	10,02 c	30,12 c	98,02	98,02
SDAY1	30,86 ab	97,23 b	100,04	100,04
DAY1	36,52 ab	97,12 b	100,03	100,03
SDAY2	40,01 a	100,03 a	100,04	100,04
DAY2	38,05 ab	100,04 a	100,04	100,04
CV (%)	10,32	25,25	3,20	3,20
Mức ý nghĩa	**	**	ns	ns

*Ghi chú:* \*\*: chỉ khác biệt mức ý nghĩa 1%; ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê. Trong cùng một cột các trung bình theo sau có cùng chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan.

– Việc chọn nguồn dinh dưỡng thích hợp để cho nấm phát triển và hình thành hệ sợi nấm hoặc bào tử đóng vai trò rất quan trọng trong nghiên cứu sinh học, nhất là những loài nấm ký sinh côn trùng. Theo Phạm Quang Thu và *ctv.* (2012), môi trường dinh dưỡng PDA có bổ sung thêm 10% nhộng Tằm thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của nấm *C. militaris*. Theo Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh (2016), môi trường SDAY<sub>1</sub> (Sabouraud Dextrose Agar Yeast) và SDAY<sub>3</sub> (sabouraud dextrose agar yeast có thêm khoáng chất) là môi trường nuôi cấy nấm *C. militaris* cho đường kính khuẩn lạc đạt tốt nhất. Nghiên cứu này cho thấy môi trường SDAY2 (spent brewery grain dextrose agar yeast extract và

khoáng chất, vitamin) nuôi cấy hệ sợi nấm chủng CM- China1 đạt tối ưu và đặc tính hình thái của nấm đạt độ thuần của chủng nấm *C. militaris*.

**3.2 Ảnh hưởng của môi trường dịch lỏng đến sinh trưởng và phát triển của hệ sợi nấm CM- China1**

– Môi trường hoạt hóa giống là yếu tố quan trọng, ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học của vi sinh vật nói chung và của nấm ký sinh côn trùng nói riêng. Môi trường hoạt hóa giống được tiến hành trên 3 loại môi trường khác nhau là CT1, CT2, CT3. Khả năng sinh trưởng của chủng nấm được đánh giá qua chỉ tiêu về mật độ bào tử sau 5, 7, 9, 11 ngày nuôi.

**Bảng 3: Mật độ bào tử sau khi chủng chủng nấm *C. militaris* trên môi trường lỏng**

Môi trường	Mật độ bào tử (bào tử) vào các NSKC			
	5	7	9	11
CT1	8.10 <sup>4</sup> a	8.10 <sup>6</sup> a	6.10 <sup>8</sup> a	10 <sup>10</sup> a
CT2	10 <sup>2</sup> c	10 <sup>3</sup> b	8.10 <sup>3</sup> c	10 <sup>4</sup> c
CT3	6. 10 <sup>4</sup> ab	8.10 <sup>5</sup> a	6.10 <sup>6</sup> b	10 <sup>7</sup> b
CV (%)	32,14	29,68	38,21	31,97
Mức ý nghĩa	**	**	**	**

*Ghi chú:* \*\*: chỉ khác biệt mức ý nghĩa 1%. Trong cùng một cột các trung bình theo sau có cùng chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan.

– Kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy mật độ bào tử trong 3 môi trường CT1, CT2, CT3 là rất khác nhau. Vào ngày nuôi thứ 5, 7, 9 và 11, môi trường CT1 cho tốc độ sinh bào tử là đạt tối ưu nhất và khác biệt thống kê giữa nhau với hai môi trường còn lại vào ngày thứ 9, 11;  $8.10^4$  bt/ml,  $8.10^6$  bt/ml,  $6.10^8$  bt/ml và  $10^{10}$  bt/ml, tương ứng. Kế đến, môi trường CT3 lần lượt đạt  $6.10^4$  bt/ml,  $8.10^5$  bt/ml,  $6.10^6$  bt/ml và  $10^7$  tương ứng vào thời điểm 5, 7, 9 và 11 ngày nuôi. Và thấp nhất trên môi trường CT1,  $10^2$  bt/ml,  $10^3$  bt/ml,  $8.10^3$  bt/ml và  $10^4$  bt/ml, tương ứng.

Thành phần môi trường CT1 giàu nguồn N hữu cơ từ SBG, môi trường CT3 được bổ sung thêm muối khoáng từ  $Mg^{2+}$  và  $K^+$ , môi trường CT2 vừa được bổ sung SBG và muối khoáng  $Mg^{2+}$  và  $K^+$ . Gregori (2014) công bố môi trường nhân nuôi nấm *C. militaris* được bổ sung SBG đã làm tăng mật độ bào tử. Nghiên cứu của Li *et al.* (2004) và Dong *et al.* (2012) cho thấy việc bổ sung các muối khoáng như  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  làm tăng mật độ bào tử, nâng suất quả thể và hàm lượng các hoạt chất sinh học trong nấm *C. militaris*. Nghiên cứu này cho thấy môi trường CT1 (35% SBG, 10% glucose, 2% pepton, 2% Yeast, 0,5% vincosyn) đáp ứng đủ nguồn N hữu cơ để nấm đạt mật độ tối ưu nhất, trong khi đó môi trường CT2 có thể thừa dinh dưỡng, nên đã hạn chế sự phát triển mật độ bào tử, môi trường CT3 được bổ sung chất khoáng mật độ bào tử phát triển tốt, nhưng chưa đạt tối ưu. Như vậy, môi trường CT1 là

môi trường lỏng tối ưu nhất cho sự sinh bào tử của chủng CM- China1, nên được chọn để hoạt hóa giống cho chủng này.

### 3.3 Nhân nuôi chủng nấm CM- China1 trên vật chủ

#### 3.3.1 Ảnh hưởng của vật chủ đến tốc độ phát triển và tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris*

Vật chủ nuôi cấy nấm ký sinh rất quan trọng và tùy thuộc vào mỗi loại nấm, đặc biệt là nhu cầu về nguồn C, N để giúp hình thành sợi nấm. Đối với nghiên cứu này, cả ba loài vật chủ sau 12 – 13,5 ngày nuôi trồng nấm đều phát triển hệ sợi nấm và bao kín vật chủ, kế tiếp tối đa 16 ngày tiếp theo quả thể bắt đầu mọc mầm trên thân vật chủ và sau 31 ngày quả thể trên thân vật chủ thành thực, không có sự khác biệt giữa nhau về các chỉ tiêu này đối với cây chủng CM- China1 trên nhộng sâu chít, đuông dừa và tằm (Bảng 4). Theo Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng (2017), với phương pháp cấy giống *C. militaris* vào thân nhộng và phun dịch nấm vào nhộng Tằm nuôi cấy trong điều kiện 22 °C và duy trì độ ẩm 85% sau 30-40 ngày nuôi hệ sợi nấm mọc kín thân và sau 40-44 ngày quả thể bắt đầu mọc mầm trên thân nhộng Tằm. Theo kết quả nghiên cứu này, với phương pháp cấy giống vào đỉnh đầu của nhộng cho thời gian nấm *C. militaris* tấn công vào vật chủ nhanh hơn so với việc cấy nấm vào thân nhộng hay phun nấm toàn thân nhộng.

**Bảng 4: Thời gian sinh trưởng, phát triển và tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* trên vật chủ**

Vật chủ	Thời gian hệ sợi nấm mọc kín thân (ngày)	Thời gian quả thể bắt đầu mọc mầm (ngày)	Thời gian quả thể thành thực (ngày)	Tỷ lệ nhiễm nấm <i>C. militaris</i> (%)
Sâu chít	12	28	59,5	75,12 c
Đuông dừa	13,5	29	60,8	85,71 b
Nhộng tằm	13,1	28,8	61,5	95,2 a
CV (%)	12,03	9,14	10,11	25,27
Mức ý nghĩa	ns	ns	ns	*

Chi chú: \*: chỉ khác biệt mức ý nghĩa 5%; (ns): không khác biệt ý nghĩa thống kê. Trong cùng một cột các trung bình theo sau có cùng chữ cái thì khác biệt không ý nghĩa thống kê qua kiểm định Duncan.

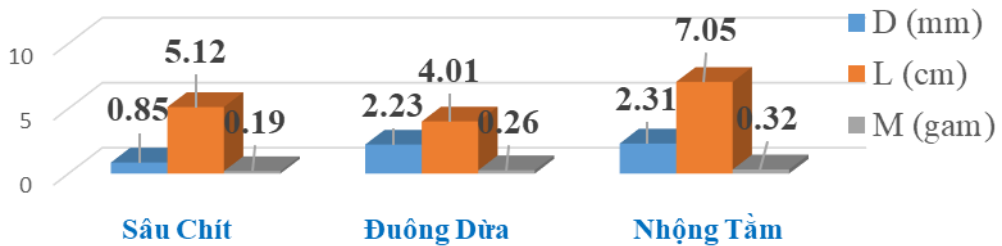
Chủng nấm CM- China1 khi được nuôi trên nhộng sâu Chít, đuông Dừa và Tằm cho tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* có khác biệt giữa nhau. Theo đó, tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* trên nhộng Tằm cao nhất (95,2 %), kế tiếp nhộng đuông Dừa (85,71 %) và thấp nhất nhộng sâu Chít (75,12%) (Bảng 4). Cũng theo Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng (2017), tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* trên nhộng Tằm chỉ đạt 25-78% đối với phương pháp tiếp giống nấm *C. militaris* vào thân nhộng và phun dịch giống vào nhộng Tằm. Kết quả nghiên cứu này cho thấy phương pháp tiếp giống nấm *C. militaris* vào đỉnh đầu nhộng đạt hiệu quả cao.

#### 3.3.2 Ảnh hưởng của vật chủ đến sự phát triển quả thể của chủng nấm *C. militaris*

Sự phân bố của quả thể *C. militaris* trong môi trường nuôi cấy chủ yếu phụ thuộc vào mức độ đồng đều của các chất dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy, mức độ đồng đều của giống khi cấy giống và mức độ cạnh tranh của các cá thể *C. militaris* trong quá trình hình thành quả thể. Kết quả nghiên cứu này đã chỉ ra *C. militaris* hoàn toàn sinh trưởng và hình thành quả thể trên cả ba loài sâu Chít, đuông Dừa và nhộng Tằm. Trong đó, quả thể trên nhộng Tằm đạt cao nhất (chiều dài quả thể trung bình đạt

7,05 cm; đường kính 2,31 mm và khối lượng 0,32 g/quả thể), kể đến đuông dừa (chiều dài quả thể 4,01 cm; đường kính 2,23 mm và khối lượng 0,26 g/quả thể) và sâu Chít (chiều dài quả thể 5,12 cm; đường kính 0,85 mm và khối lượng 0,19 g/quả thể) (Hình 1). Quan sát quả thể *C. militaris* thường hình thành tại vị trí được tiêm giống hoặc vị trí xây xát trên cơ thể, vị trí vách ngăn các đốt thân, vị trí lỗ khí, những vị trí có hệ sợi nấm bông mịn và bò sát bề mặt vật chủ (Hình 2). Bằng kỹ thuật che tối phần thân nặng, quả thể chỉ mọc tại vị trí đỉnh đầu (Hình 3).

Theo Li *et al.* (2006), kích thước quả thể nấm cũng phụ thuộc rất nhiều vào lượng dinh dưỡng có trong môi trường nuôi cấy, môi trường càng nhiều dinh dưỡng thì kích thước quả thể càng lớn, nếu trong môi trường có quá nhiều dinh dưỡng thì chiều cao của quả thể nấm sẽ kém phát triển và chỉ phát triển đường kính quả thể nấm. Theo Trần Thanh Thy (2019), môi trường cơ chất rắn khi được bổ sung 45% SBG cho thấy không làm tăng năng suất quả thể nấm *C. militaris* một cách rõ rệt. Kết quả nghiên cứu này cho thấy nhộng tằm là vật chủ nuôi nấm *C. militaris* đạt năng suất hơn 2 loài vật chủ đuông dừa và sâu chít.



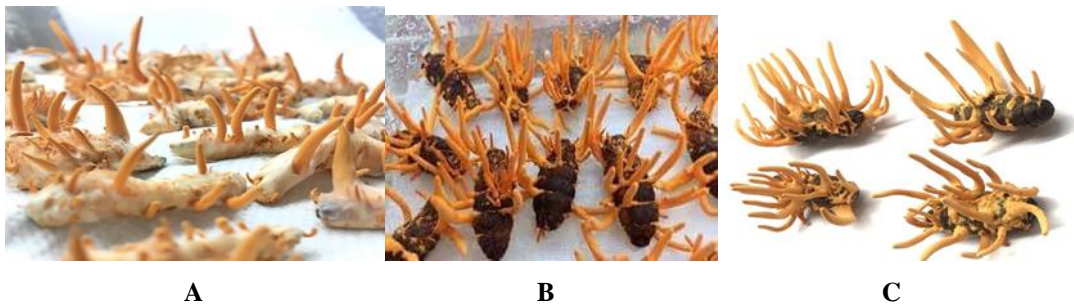
**Hình 1: Kích thước và khối lượng quả thể vào thời điểm thu hoạch**

Ghi chú: D (mm): đường kính quả thể tại thời điểm thu hoạch; L (cm): chiều dài quả thể tại thời điểm thu hoạch; M (gam): khối lượng quả thể tại thời điểm thu hoạch.

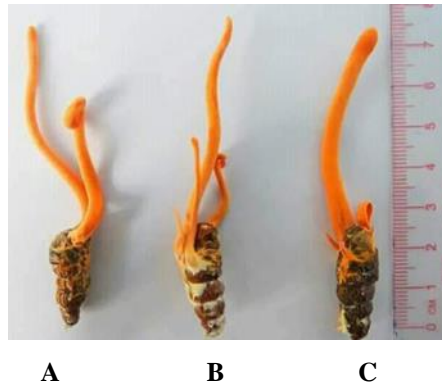
**3.3.3 Ảnh hưởng của vật chủ đến hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể**

Hàm lượng adenosin và cordycepin được sử dụng như chỉ thị cho chất lượng của *Cordyceps spp* (Phạm Văn Nhã, 2017). Kết quả trình bày ở Hình 4 chỉ ra hàm lượng của adenosin và cordycepin trên các vật chủ là không chênh lệch nhau lớn.

Hàm lượng adenosine trong cả 3 vật chủ đạt 0,71 mg/g, 0,58 mg/g và 0,52 mg/g quả thể sấy khô, tương ứng sâu chít, nhộng tằm và đuông dừa. Trong khi đó hàm lượng cordycepin đạt 6,1 mg/g, 5,34 mg/g và 5,25 mg/g, tương ứng đuông dừa, nhộng tằm và sâu chít (Hình 4).



**Hình 2: Sự phát triển của nấm *C. militaris* trên thân nhộng của sâu chít (A), bươm tằm (B) và đuông dừa (C)**

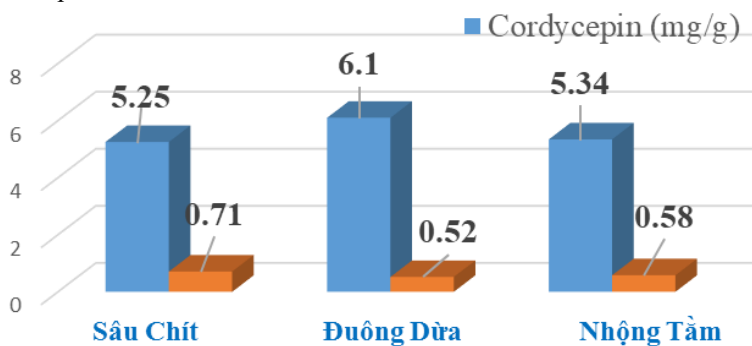


**Hình 3: Sự phát triển của nấm *C. militaris* trên phần đầu nhộng sâu chít (A), tằm (B) và đung dừa (C)**

Holliday *et al.* (2004) cho rằng lượng cordycepin đạt được là 2,25 mg/g trong các sản phẩm thương mại *C. sinensis* thu được qua quá trình nuôi trồng trên môi trường rắn và 0,65 mg/g cordycepin thu được từ stromata của *C. sinensis* tự nhiên. Ni *et al.* (2009) báo cáo hàm lượng cordycepin từ 0,1 đến 1 mg/g thu được từ nuôi trồng *C. militaris*. Lie *et al.* (2014) công bố hàm lượng cordycepin đạt được trong các sản phẩm thương mại nấm *C. militaris* trên vật chủ là 1,72 mg/g và adenosine là 0,97 mg/g. Phạm Văn Nhã (2017) báo cáo hàm lượng cordycepin đạt 16,05 mg/g và adenosine là 0,57 mg/g thu được từ việc nuôi quả thể trên vật chủ. Kết quả nghiên cứu của Trần Thanh Thy (2019) cho thấy bổ sung SBG vào môi trường rắn để nuôi trồng *C. militaris* rất có hiệu quả làm tăng cordycepin và đồng thời tăng adenosine, khi phân tích quả thể nấm tươi trên môi trường có bổ sung SBG cordycepin và adenosine đạt 10,58 mg/g và 0,85 mg/g, trong khi môi trường không bổ sung SGB chỉ đạt 7,21 mg/g và 0,56 mg/g, tương ứng. Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh (2016) nuôi *C. militaris* trên cơ chất là gạo lứt có bổ sung dinh dưỡng khoáng tối ưu môi trường nhân nuôi khi phân tích được liệu chỉ đạt

cordycepin cao nhất là 5,56 mg/g quả thể tươi. Nghiên cứu này cho thấy, hệ sợi nấm được nuôi trong môi trường thạch và dịch lỏng đều được bổ sung hàm lượng SBG, hàm lượng cordycepin trong quả thể không tăng cao như trên cơ chất rắn trong công bố của Trần Thanh Thy (2019), nghiên cứu này do quả thể được hình thành trên vật chủ. Nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra hàm lượng này cũng giảm dần khi chuyển từ giai đoạn hệ sợi sang giai đoạn phát sinh quả thể và giảm mạnh khi quả thể đạt kích thước tối đa và chuyển sang già hóa (Ahn *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2012; Tuli *et al.*, 2014).

Hàm lượng cordycepin và adenosine thu được của nghiên cứu này là đạt (cao) so với các nồng độ báo cáo nêu trên. Trong tự nhiên hàm lượng của cordycepin còn gây nhiều tranh cãi, hàm lượng của nó biến động khá lớn trong các nghiên cứu khác nhau. Điểm chung của các nghiên cứu đều cho rằng hàm lượng của cordycepin ở giai đoạn quả thể cao hơn so với giai đoạn hệ sợi và có liên quan nhiều đến nồng độ oxy trong điều kiện nuôi cấy (Phạm Văn Nhã, 2017).



**Hình 4: Hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể vào thời điểm thu hoạch**



Các kết quả thí nghiệm của nghiên cứu này đã khẳng định quả thể nấm *C. militaris* được cấy từ chủng CM- China1 hoàn toàn sinh trưởng và phát triển tốt trên nhộng sâu Chít, đuông Dừa và Tằm tạo ra hai hợp chất quan trọng cordycepin và adenosine đạt hàm lượng.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1 Kết luận

Môi trường SDAY2 là tốt nhất cho sự hình thành và phát triển hệ sợi nấm của chủng CM- China1.

Môi trường lỏng CT1 là tối ưu cho sự nhân mật độ bào tử nấm của chủng CM- China1.

Cả ba loài vật chủ, nhộng sâu Chít, nhộng đuông Dừa và nhộng Tằm đều cho hình thành quả thể nấm *C. militaris* tốt. Trong đó, nhộng Tằm đạt tỷ lệ nhiễm nấm *C. militaris* và năng suất cao nhất. Hàm lượng dược liệu codycepin và adenosine trong quả thể sấy khô đạt 5,25 mg/g và 0,71 mg/g, 6,1 mg/g và 0,52 mg/g, 5,34 mg/g và 0,58 mg/g tương ứng cho sâu Chít, đuông Dừa và nhộng Tằm.

### 4.2 Đề nghị

Cần có thêm các nghiên cứu trên nhóm vật chủ khác như ong mật, ve sầu,... để kiểm chứng hệ sợi nấm *C. militaris* được nuôi trong môi trường thuần khiết và dịch lỏng có bổ sung hàm lượng SBG. Bên cạnh đó, cần nghiên cứu việc tối ưu hóa các thông số nuôi trồng như nhiệt độ, thời gian ủ, ánh sáng và quá trình sục khí khi nuôi hệ sợi nấm *C. militaris* trong môi trường lỏng có làm tăng lượng cordycepin và adenosine trong quả thể.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahn, Y.J., Park, S.J., Lee, S.G., Shin, S.C. and Choi, D.H., 2000. "Cordycepin: selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp". *J Agric Food Chem*, 48 (7): 2744-2748

Bhushan, S., Zhang, W., Zhang Y., and Liu, X., 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. *Mycological Progress* 11(3): 599-614.

Choi, S.B., Park, C.H., Choi, M.K., Jun, D.W., Park, S., 2004. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(11): 2257-2264.

Dong, J.Z., Lei, C., Ai, X.R., 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166: 1215-1224.

Đỗ Tuấn Bách, Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang và ctv., 2017. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 161(01): 113 – 118.

Gregori A., 2014. Cordycepin production by *Cordyceps militaris* cultivation on spent brewery grains. *Acta biologica slovenica*, 57 (2): 45-52.

Holliday, J.C., Cleaver. P., Loomis-Powers, M., Patel, D., 2004. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6: 151-164.

Kamp, A. M. and Bidochka, M. J., 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 4-77.

Li N., Song J.G., Liu J.Y., Zhang H., 1995. Compared chemical composition between *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis*. *Journal of Jilin Agriculture University* 17, 80-3. (in Chinese).

Li, C.B., Tong, X.D., Bai, J., Fan, S.D., 2004. Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*. *Journal of Dalian National University*, 6(5): 29-31.

Li, C.R., Nam, S.H., Geng, D.G., 2006. Artificial culture of seventeen *Cordyceps Mycosystema*, 25:639-645.

Li, S.P., Yang, F.Q., Tsim, K.W.K., 2006. Quality control of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1571-1584.

Lie, A.C, Chiang, R.V., Mai, J., and Sci, M., 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. *Journal of Jilin Agriculture University*, 41(4): 858-872.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2006. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, 43: 1-14.

Nan, J.X., Park, E.J., Yang, B.K., Song, C.H., Ko, G., Sohn, D.H., 2001. Antibiotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 24(4): 327-332.

Nguyễn Thị Minh Hằng và Bùi Văn Thắng, 2017. Nghiên cứu nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) trên giá thể tổng hợp và nhộng tằm. *Tạp chí khoa học và công nghệ Lâm Nghiệp*, 4: 10-16.

- Ni, H., Zhou, X.H., Li, H.H., Huang, W.F., 2009. Column chromatographic extraction and preparation of cordycepin from *Cordyceps militaris* waster medium. *Journal of Chromatography B*, 877: 2135-2141.
- Nylund, J.E., Wallander, H., 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *Methods in Microbiology*, 24: 77-88.
- Phạm Quang Thu, Lê Thị Xuân và Nguyễn Mạnh Hà, 2012. Nghiên cứu đặc điểm sinh học hệ sợi trong nuôi cấy thuần khiết các chủng nấm Đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* (L.:Fr Link). *Tạp chí Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam*, 5: 28-39.
- Phạm Quỳnh Mai, Nguyễn Tiến Đạt, Khuất Đăng Long, 2015. Giá trị dinh dưỡng và kinh nghiệm chế biến từ côn trùng thành các món ăn ở Việt Nam, Hội nghị khoa học toàn quốc về Sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 6: 1178-1183.
- Phạm Văn Nhã, 2017. Nghiên cứu nuôi trồng thử nghiệm Đông trùng hạ thảo tại 3 tỉnh Sơn La, Điện Biên, Lai Châu. *Khoa học và công nghệ phục vụ phát triển bền vững vùng Tây Bắc*, ĐHQGHN: 1-179.
- Rao, Y.K., Fang, S.H., Wu, W.S., Tzeng, Y.M., 2010. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. *Journal of Ethnopharmacology*, 131(2): 363-367.
- Reis, F.S., Barros, L., Calheta, R.C., Ćirić, A., van Griensven, L., Soković, M. and Ferreira, I., 2013. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food and Chemical Toxicology*, 62: 91-98.
- Song, C.H., Jeon, Y.J., Yang, B.K., Ra, K.S., Sung, J.M., 1998. Anti-complementary activity of exopolymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8: 536-539.
- Sung, J.M., 1996. The insect-borne fungus of Korea in color. *Kyohak Publishing Co. Ltd.*, Seoul, 247-258.
- Trần Thanh Thy, 2019. Nghiên cứu môi trường rắn làm tăng hàm lượng cordycepin và adenosine của nấm *Cordyceps militaris*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 55(2): 27-33.
- Trịnh Thị Xuân và Lê Tuấn Anh, 2016. Nghiên cứu môi trường thích hợp cho sản xuất quả thể nấm dược liệu *Cordyceps militaris*. *Tạp chí khoa học trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 3)*: 88-92.
- Tuli, H.S., Sharma, A.K. and Sandhu, S.S. 2014. Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris*, 3936: 35-36.
- Wang G.D., 1995. Ecology, cultivation and application of *Cordyceps* and *Cordyceps sinensis*. *Scientific and Technical Documents*, Beijing.
- Won, S.Y., Park, E.H., 2005. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 555-561.
- Yang, S., Jin, L., Ren, X., Lu, J., Meng, Q., 2014. Optimization of fermentation process of *Cordyceps militaris* and antitumor activities of polysaccharides in vitro. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22: 468-476.
- Yoo, H.S., Shin, J.W., Cho, J.H., Son, C.G., Lee, Y.W., Park, S.Y., Cho, C.K., 2004. Effects of *Cordyceps militaris* extract on angiogenesis and tumor growth. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(5): 657-65.
- Zheng, P., Xia, Y., Xiao, G. *et al.*, 2012. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*, 12(11): R116