



## NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO *Cordyceps militaris*: ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, GIÁ TRỊ DƯỢC LIỆU VÀ CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI TRỒNG NẤM

Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh và Nguyễn Văn Hiệp

Trường Đại học Thủ Dầu Một

### ABSTRACT

*Cordyceps militaris* is an entomopathogenic fungus with many medicinal values similar to *Cordyceps sinensis* and has been used for a long time in traditional medicines. Different from *Cordyceps sinensis*, which has very low mass production and only grows in natural environment, the fungus *Cordyceps militaris* can be farmed in artificial conditions. Therefore, collecting of technical information and researches will help promoting the production of *Cordyceps militaris* in Vietnam to satisfy the demand of national and abroad markets. This study evaluated the role of *Cordyceps militaris* in modern medicine based on summing up the scientific research results, as well as assessing the biological characteristics and the effects of the cultivating conditions for *Cordyceps militaris* to develop farming processes in our country, which will bring essential economic benefits for local producers. Results from scientific publications showed that there had been many researches confirming the potential applications of *C.militaris* in illness treatment, also it was widely used in the modern pharmaceutical industry, such as cancer treatment, immunomodulatory, impaired liver and kidney function, etc. (Shonkor, 2010; Seulmee et al., 2009). For the production of *C.militaris* in artificial conditions, the strict control of environmental conditions such as fungal seeds, temperature, humidity, light, and nutrients was found as essential to maintain the yield and quality *C.militaris* mushrooms.

### Thông tin chung:

Ngày nhận: 19/12/2015

Ngày chấp nhận: 25/07/2016

### Title:

*Cordyceps militaris*: biological characteristics, pharmaceutical values and elements affecting the cultivating process

### Từ khóa:

*Cordyceps militaris*, điều kiện nuôi cấy, giá trị dược liệu

### Keywords:

*Cordyceps militaris*, culture condition, medicinal value

### TÓM TẮT

Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng có giá trị dược liệu quý tương tự như nấm *Cordyceps sinensis* và được sử dụng nhiều trong y học cổ truyền trong nhiều năm qua. Khác với nấm *Cordyceps sinensis* với sản lượng rất ít và chỉ mọc trong tự nhiên, loài nấm *Cordyceps militaris* có thể được nuôi trồng trong điều kiện nhân tạo. Do đó, việc tìm hiểu thông tin kỹ thuật và nghiên cứu về quy trình nuôi trồng sẽ giúp cho việc sản xuất nấm *C.militaris* thương phẩm tại Việt Nam, đáp ứng nhu cầu thị trường trong và ngoài nước. Nghiên cứu này đánh giá vai trò của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* trong y học hiện đại trên cơ sở tổng hợp nhiều kết quả nghiên cứu khoa học, đồng thời đánh giá các đặc điểm sinh học và ảnh hưởng của các điều kiện nuôi trồng lên loại nấm *Cordyceps militaris* nhằm phục vụ cho phát triển các quy trình nuôi trồng ở nước ta, đem lại những lợi ích kinh tế thiết thực cho các nhà sản xuất ở các địa phương. Kết quả nghiên cứu từ các công bố khoa học cho thấy nấm *C.militaris* được nhiều nghiên cứu khẳng định tiềm năng ứng dụng trong điều trị bệnh, đồng thời cũng được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp dược phẩm hiện nay, ví dụ như trong điều trị ung thư, điều hòa miễn dịch, suy giảm chức năng gan, thận... (Seulmee et al., 2009; Shonkor, 2010). Đối với việc sản xuất nấm *C.militaris* ở trong điều kiện nhân tạo, việc kiểm soát chặt chẽ các yếu tố điều kiện môi trường nuôi trồng nấm như giống, nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng và dinh dưỡng là hết sức cần thiết để duy trì sản lượng và chất lượng nấm *C.militaris*.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Liên Thương, Trịnh Diệp Phương Danh và Nguyễn Văn Hiệp, 2016. Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*: Đặc điểm sinh học, giá trị dược liệu và các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 44b: 9-22.

## 1 GIỚI THIỆU

Nấm dược liệu từ lâu đã là một phần quan trọng của văn hóa và nền văn minh nhân loại, đặc biệt các loài trong giống *Cordyceps* được đánh giá cao do chứa nhiều hợp chất dược liệu (McKenna *et al.*, 2002). Giống *Cordyceps* có hai loài hiện nay đang được nghiên cứu rất nhiều về chiết xuất và sản xuất do có giá trị dược liệu và giá trị kinh tế cao (Liu *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006). Nấm đông trùng hạ thảo *Ophiocordyceps sinensis* (hay còn gọi là *Cordyceps sinensis*) là một loại nấm dược liệu có phân bố rất hạn chế trong tự nhiên và được nuôi trồng trong điều kiện hoang dã, loài nấm này hiện tại vẫn chưa được nuôi trồng thành công trong môi trường nhân tạo, do đó sản lượng nấm thu được không đáp ứng đủ nhu cầu của thị trường (Li *et al.* 2006; Stone 2008; Zhang *et al.* 2012). Loài đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* (thường được gọi nấm cam sâu bướm), chứa các hợp chất hóa học tương tự như của *O.sinensis*, nhưng có thể dễ dàng nuôi trồng trong môi trường nhân tạo (Li *et al.* 1995; Dong *et al.*, 2012). Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về quy trình nuôi trồng nấm *C. militaris* nhằm thay thế cho loài *O. Sinensis* và có nhiều nghiên cứu quan trọng về gen, nhu cầu dinh dưỡng, môi trường nuôi cấy, các đặc tính sinh hóa và dược lý của nấm *C. militaris*. Gần đây, bộ gen hoàn chỉnh của *C. militaris* cũng được giải trình tự làm cơ sở cho nhiều nghiên cứu sâu hơn về loại nấm này (Zheng *et al.*, 2011).

Có hơn 400 phân loài *Cordyceps* đã tìm thấy và mô tả, tuy nhiên chỉ có khoảng 36 loài được nuôi trồng trong điều kiện nhân tạo để sản xuất quả thể (Wang, 1995; Sung, 1996; Li *et al.*, 2006). Trong số những loài này, chỉ có loài *C. militaris* đã được trồng ở quy mô lớn do nó có dược tính rất tốt và có thời gian sản xuất ngắn (Li *et al.*, 2006).

Quả thể của nấm *Cordyceps militaris* dùng làm thực phẩm, dùng trong các món hầm, súp, trà... ở các nước Đông Nam Á như Hongkong, Đài Loan, Trung Quốc. Lượng an toàn ít hơn 2.5 g/kg thể trọng (Che *et al.*, 2003). Quả thể và sinh khối nấm cũng được sử dụng làm thuốc và bồi bổ sức khỏe như nước uống, viên nhộng, rượu, dấm, trà, yogurt, và nước chấm (Wang *et al.*, 2006). Các loại thuốc từ nấm này dùng duy trì chức năng thận, phổi, chống lão hóa, điều hòa giấc ngủ, viêm phế quản mãn tính (Das *et al.*, 2010). Hiện có hơn 30 loại sản phẩm chăm sóc sức khỏe từ *C. militaris* trên thị trường (Huang *et al.*, 2010).

Theo kết quả điều tra của công ty Công nghệ Baoli Laoning (Trung Quốc) cho thấy thực phẩm chức năng từ nấm có tiềm năng rất lớn tại Trung Quốc đạt doanh thu 70 tỷ nhân dân tệ, Nhật Bản đạt 3,6 tỷ USD năm 1990, Mỹ đạt 3,5 tỷ USD năm 1990 (Wang và Yang, 2006). Các sản phẩm thuốc và thực phẩm chức năng từ nấm *Cordyceps militaris* chiếm thị trường rất lớn trên thế giới. Giá thị trường của các sản phẩm như Công ty Zeolite bán 41,95USD/ lọ 90 viên (650mg/viên), Cordygen 19,95 USD/lọ 90 viên.

Do giá trị dược liệu, giá trị kinh tế cao và tính khả thi của việc nuôi nấm *Cordyceps militaris* ở quy mô lớn, việc phát triển các nghiên cứu về nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris* nhằm tăng quy mô sản xuất, đáp ứng nhu cầu của thị trường trong nước và chuyên giao công nghệ cho các đơn vị sản xuất để đem lại lợi ích kinh tế cho địa phương là hết sức cần thiết.

## 2 NỘI DUNG

### 2.1 Các đặc điểm sinh học của nấm *Cordyceps militaris*

#### 2.1.1 Phân loại và mô tả nấm *Cordyceps militaris*

*Cordyceps militaris* là loài nấm thuộc họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps*. Loài này được Carl Linnaeus mô tả vào năm 1753 với tên gọi *Clavaria militaris* (Bảng 1) (Kobayasi, 1982). *Cordyceps* Fr. là chi đa dạng nhất trong họ Clavicipitaceae về số lượng loài và phổ ký chủ. Ước tính có hơn 400 loài trong giống này (Mains, 1958; Kobayasi *et al.*, 1982; Stensrud *et al.*, 2005). Nấm *Cordyceps militaris* thuộc giới Nấm, chi Ascomycota, lớp Sordariomycetes, bộ Hypocreales, họ Cordycipitaceae, giống *Cordyceps* và loài *C. Militaris*. Tên khoa học *Cordyceps militaris*(L.) Fr. (1818) (Kobayasi *et al.*, 1982).

Nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* là loài nấm ký sinh trên bướm và sâu bướm, có màu cam, chiều dài 8-10 cm. Đầu quả thể nấm có các đốm màu cam sáng. Quả thể nấm nhô lên từ xác ấu trùng hoặc nhộng, mặt cắt ngang quả thể có màu nhạt, rỗng ở giữa (Hình 1). Các nang bào tử dài từ 300-510 micro mét, bề rộng 4 micro mét. Các bào tử nang hình sợi, không màu và phân đoạn, kích thước 3.5-6 × 1- 1.5 micro mét. Các bào tử nang này trong điều kiện nghèo dinh dưỡng sẽ đứt ra và nảy chồi tạo các bào tử thứ cấp. Nấm này có phân bố rộng, ở Bắc Mỹ, châu Âu và châu Á (Paul *et al.*, 2008).



**Hình 1: Nấm *Cordyceps militaris* và mặt cắt dọc quả thể chứa các bào tử (Christian *et al.*, 1837)**

Mật độ sợi nấm thay đổi trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau. Mật độ tơ *C. militaris* rất thấp trên môi trường WA, nghèo ở môi trường MA và CMA, trong khi rất nhiều trong các môi trường SDAY và SMAY (Shretha *et al.*, 2006). Màu sắc khuẩn lạc dao động từ trắng, vàng, cam nhạt đến cam tùy theo thành phần dinh dưỡng. Các quan sát cho thấy môi trường có bổ sung pepton và cao nấm men cho khuẩn lạc có màu sắc đậm hơn (Shretha *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Chu trình sống của nấm *Cordyceps militaris*

Giống như hầu hết các loài *Cordyceps* khác, *C. militaris* là một loài nấm ký sinh trên côn trùng và ấu trùng của côn trùng. Loài này chủ yếu lây nhiễm ở giai đoạn nhộng của các loài bướm khác nhau, rồi nhân lên trong cơ thể ký chủ vào mùa đông. Bào tử nấm theo gió dính vào bên ngoài ký chủ, sau đó từ bào tử hình thành các ống nảy mầm có các thể bám. Các ống này tiết ra các enzyme như lipase, chitinase, protease làm tan vỏ ngoài của ký chủ và xâm nhập vào bên trong cơ thể. Sau đó hệ sợi nấm hút dinh dưỡng và sinh trưởng mạnh mẽ

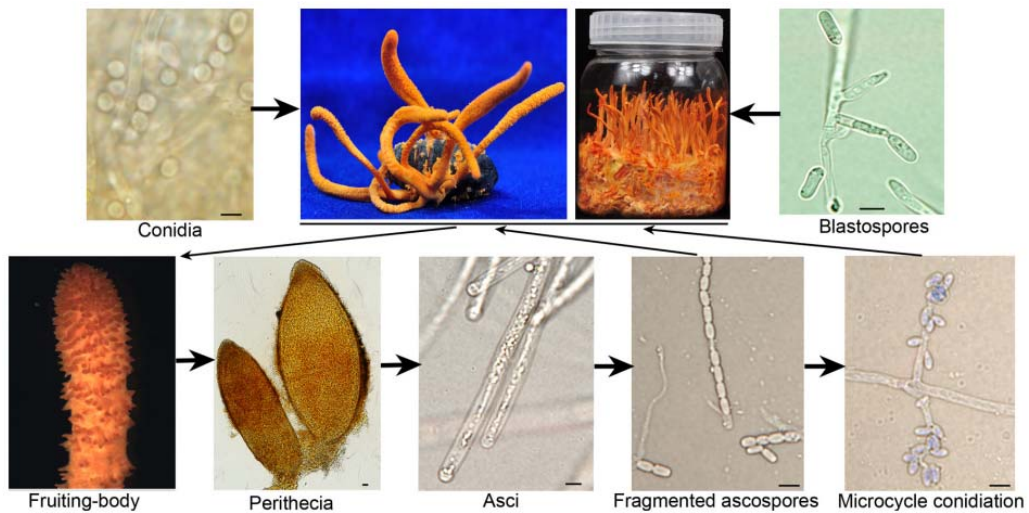
chiếm toàn bộ cơ thể và gây chết ký chủ. Đến cuối hè hoặc thu quả thể nhô ra ngoài để phát tán bào tử vào không khí (Kobayasi *et al.*, 1982; Kamble *et al.*, 2012). Các quả thể nấm *C. militaris* thường có màu vàng nhạt hoặc màu da cam (Zheng *et al.*, 2011).

Nấm *Cordyceps militaris* có các dạng bào tử khác nhau trong chu trình sống của nấm (Hình 2). Ở các điều kiện môi trường khác nhau, sự hình thành các dạng bào tử cũng cho thấy sự khác biệt, như việc tạo bào tử tròn tạo ra trên môi trường nuôi cấy rắn hoặc các chồi bào tử tạo ra trên môi trường nuôi cấy lỏng.

### 2.1.3 Ký chủ

Nấm *Cordyceps militaris* là loài được nghiên cứu kỹ nhất trong tất cả các loài của giống *Cordyceps* (Kobayasi *et al.*, 1941). Sự đa dạng về hình thái và khả năng thích nghi của loài này ở nhiều sinh cảnh khác nhau có thể là nguyên do khiến chúng có mặt ở nhiều vùng địa lý và sinh thái trên trái đất (Kobayasi *et al.*, 1941; Mains, 1958; Sung và Spatafora, 2004). Ký chủ phổ biến của loài *C. militaris* trong tự nhiên bao gồm ấu trùng và nhộng của các loài bướm. Ngoài ra, còn có các ký chủ khác như các loài côn trùng thuộc bộ cánh cứng (Coleoptera), bộ cánh màng (Hymenoptera), và bộ hai cánh (Diptera). Ví dụ như *Ips sexdentatus*, *Lachnosterna quercina*, *Tenebrio molitor* (thuộc bộ cánh cứng), *Cimbex similis* (thuộc bộ cánh màng), và *Tipula paludosa* (thuộc bộ hai cánh) (Bảng 1).

Trong tự nhiên có nhiều loài *Cordyceps* có hình thái tương tự hoặc gần giống loài *C. militaris*, bao gồm *C. cardinalis* G.H. Sung & Spatafora, *C. Kyusyuensis* A. Kawam., *C. pseudomilitaris* Hywel-Jones & Sivichai, *C. rosea* Kobayasi & Shimizu, *C. roseostromata* Kobayasi & Shimizu, *C. washingtonensis* Mains, và một số loài khác (Sung và Spatafora, 2004; Sung *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008).



**Hình 2: Các dạng bào tử của nấm *Cordyceps militaris* (Zheng *et al.*, 2011). Conidia: bào tử tròn tạo ra trên môi trường nuôi cấy rắn. Blastospores: chồi bào tử tạo ra trên môi trường nuôi cấy lỏng. Fruiting-body: quả thể. Perithecia: thể quả hình chai. Asci: nang. Fragmented ascospores: các mảnh nang bào tử. Microcycle conidiation: vi chu kỳ tạo bào tử**

**Bảng 1: Một số ký chủ thuộc các phân lớp khác của nấm *Cordyceps militaris***

Bộ	Họ	Loài	Tác giả
Coleoptera	Scarabaeidae	<i>Lachnosterna quercina</i>	Farlow và <i>ctv.</i> (1888)
Diptera	Tipulidae	<i>Tipula paludosa</i>	Müller-Kögler (1965)
Hymenoptera	Cimbicidae	<i>Cimbex similis</i>	Kobayasi (1941)
Lepidoptera	Bombycidae	<i>Andraca bipunctata</i>	Panigrahi (1995)

2.1.4 Tế bào học và di truyền học của

*Cordyceps militaris*

Cho đến nay chỉ có một số ít nghiên cứu về tế bào học và di truyền của loài *C. militaris*. Tác giả Moore (1964) cho thấy rằng nhân tế bào soma phân chia tương tự như các tế bào sinh dưỡng khác. Phân tích điện di karyotype cho thấy loài này có 7 nhiễm sắc thể, kích thước nhiễm sắc thể dao động trong khoảng 2,0 và 5,7 Mb (Wang *et al.*, 2010). Tuy nhiên, nghiên cứu gần đây cho thấy toàn bộ gen gần đây của *C. militaris* có chiều dài khoảng 32,2 Mb (Zheng *et al.*, 2011).

Các kết quả phân tích gen cho thấy có sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các chủng hoang dại và chủng thoái hóa (Li *et al.*, 2003,2007). Tuy nhiên, không giống như sự đa dạng đáng kể trong di truyền của loài *O. sinensis* (Zhang *et al.*, 2009), các khoảng cách di truyền của các loài *C. militaris* phân lập từ các khu vực khác nhau là cực kỳ thấp khi phân tích dựa trên trình tự nrDNA ITS (khoảng cách K2P ≤0.01) (Wang *et al.*, 2008).

Các điều kiện ảnh hưởng đến sự hình thành và

tái sinh của bào tử trần của loài *C. militaris* đã được nghiên cứu rộng rãi (Ma *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009; Zhou và Luo, 2009; Li *et al.*, 2011). Một số các nghiên cứu cho thấy khi gây đột biến bằng bức xạ trên *C. militaris* có thể tạo ra các loài đột biến có đặc điểm vượt trội hơn so với đối chứng, như tạo ra hàm lượng cao hơn các chất cordycepin, polysaccharide, hoặc cho năng suất quả thể cao hơn (Che *et al.*, 2004; Zhou và Bian, 2007; Zhou và Luo, 2009; Li *et al.*, 2011).

Dựa trên trình tự biểu hiện Tag (EST) cho thấy các mô hình phiên mã gen khác nhau ở loài *C. militaris* khi nuôi hệ sợi nấm trong môi trường lỏng, môi trường rắn chứa gạo, và khi tạo quả thể trên môi trường gạo hoặc nhộng tằm (Xiong *et al.*, 2010). Các phân tích cho thấy gen tham gia vào quá trình chuyển hóa tế bào, chuyển hóa năng lượng, và đáp ứng stress. Các gen cũng quy định cấu trúc vách tế bào trong quá trình hình thành bào tử hữu tính (Xiong *et al.*, 2010). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh có sự ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến việc hình thành quả thể và tạo các hợp chất chuyển hóa (ví dụ, cordycepin, polysaccharide), tuy nhiên các cơ sở di truyền giải thích cho các quá

trình này vẫn chưa rõ ràng (Cui và Zhang 2011; He *et al.*, 2011).

## 2.2 Giá trị dược liệu của nấm *Cordyceps militaris*

### 2.2.1 Các hợp chất dược liệu

Các hợp chất dược liệu của loại nấm *Cordyceps militaris* ứng dụng trong điều trị bệnh và nâng cao sức khỏe con người, do đó loài nấm này có giá trị kinh tế cao. Nấm *Cordyceps militaris* rất khan hiếm trong tự nhiên. Vì vậy, việc sản xuất ở quy mô lớn các chiết xuất từ nấm phục vụ nghiên cứu và điều trị bệnh từ *Cordyceps militaris* hiện đang là một vấn đề cấp thiết.

– *Các hợp chất chống ung thư*: Hợp chất cordycepin (3'-deoxyadenosine) từ nấm cho thấy có hoạt tính kháng vi sinh vật, kháng ung thư, ngừa di căn, điều hòa miễn dịch (Shonkor *et al.*, 2010).

– *Hoạt tính kháng oxy hóa*: Các nghiên cứu cho thấy hợp chất CM-hs-CPS2 chứa trong dịch chiết nấm *C. militaris* có tính kháng DPPH, hoạt tính khử và tạo phức ở nồng độ (8 mg/ml) là 89%, 1,188 và 85% (Fengyao *et al.*, 2011).

– *Tăng số lượng tinh trùng*: Nghiên cứu trên lợn cho thấy khi dùng chế phẩm từ *Cordyceps militaris*, số lượng tinh trùng tăng, số phần trăm tinh trùng di động và hình dạng bình thường tăng. Hiệu quả này được duy trì thậm chí sau 2 tuần ngưng sử dụng chế phẩm. Lượng cordycepin trong tế bào tăng trong thời gian sử dụng chế phẩm nên có khả năng chất này làm tăng lượng tinh dịch và chất lượng tinh trùng ở lợn (Lin *et al.*, 2007).

– *Hạn chế vius cúm*: Acidic polysaccharide (APS) tách chiết từ nấm *Cordyceps militaris* trồng trên đậu nành này mầm có khả năng ứng dụng trong điều trị cúm A. Chất này góp phần điều hòa hoạt động miễn dịch của các đại thực bào (Yuko *et al.*, 2007).

– *Kháng khuẩn kháng nấm và kháng ung thư*: *C. militaris*: protein (CMP) tách chiết từ nấm có kích thước 12kDa, pI 5,1 và có hoạt tính trong khoảng pH 7–9. Protein này ức chế nấm *Fusarium oxysporum* và gây độc đối với tế bào ung thư bàng quan (Byung-Tae *et al.*, 2009). Hợp chất cordycepin còn cho thấy khả năng kháng vi khuẩn *Clostridium*. Các hợp chất dẫn xuất từ nấm được mong đợi ứng dụng trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường ruột (Young-Joon *et al.*, 2000). Cordycepin ngăn sự biểu hiện của gen T2D chịu trách nhiệm điều hòa bệnh tiểu đường thông qua việc ức chế các đáp ứng phản ứng viêm phụ

thuộc NF-κB, do đó được hy vọng sẽ ứng dụng được như một chất điều hòa miễn dịch dùng trong điều trị các bệnh về miễn dịch (Seulmee *et al.*, 2009).

– *Tan huyết khối*: Enzyme tiêu sợi huyết tách chiết từ nấm *Cordyceps militaris* có hoạt tính gắn fibrin, và do đó xúc tiến việc phân hủy fibrin. Enzyme này có khả năng sử dụng trong điều trị tan huyết khối tương tự như các enzym fibrinolytic mạnh khác như nattokinase và enzyme chiết từ giun đất. Khi enzyme này có thể sản xuất ở quy mô lớn sẽ là một giải pháp thay thế hữu hiệu cho các enzym fibrinolytic giá thành cao hiện đang được sử dụng cho bệnh tim lão hóa ở người (Jae-Sung *et al.*, 2006).

– *Tính kháng viêm*: Để xác định tác dụng kháng viêm của nấm, dịch chiết từ quả thể nấm *Cordyceps militaris* (CMWE) được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) (chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide), việc phóng thích yếu tố hoại tử khối u α (TNF-α) và interleukin-6 (IL-6) của tế bào RAW 264,7. Các đại thực bào được xử lý với nồng độ khác nhau của CMWE làm giảm đáng kể LPS, TNF-α và IL-6 và mức độ giảm theo nồng độ của dịch chiết. Những kết quả này cho thấy rằng CMWE có tác dụng ức chế mạnh đến việc sản xuất các chất trung gian gây viêm của tế bào (Wol *et al.*, 2010).

– *Các ứng dụng trên lâm sàng của nấm Cordyceps militaris*: Mặc dù nấm *Cordyceps sinensis* được sử dụng rộng rãi hơn *Cordyceps militaris*, tuy nhiên các ứng dụng lâm sàng của chúng cũng khá tương tự nhau. Các chiết xuất từ nấm *Cordyceps militaris* có thể được sử dụng trong các trường hợp suy giảm chức năng phổi, ho có đờm, chóng mặt (Mizuno, 1999; Das *et al.*, 2010).

### 2.2.2 Các thành phần hóa học của nấm *Cordyceps militaris*

Theo số liệu nghiên cứu về thành phần hóa học của thể quả nấm *C. militaris* cho thấy loài nấm này chứa các thành phần như protein chiếm 40,69%; các loại vitamin: vitamin A (34,7 mg/gam), vitamin B1 (13,0 mg/gam), vitamin B6 (62,2 mg/gam), vitamin B12 (70,3 mg/gam), vitamin B3 (42,9 mg/gam); các nguyên tố khoáng: Se (0,44 ppm), Zn (130,0 ppm), Cu (29,15 ppm); hợp chất hóa học và nhóm hợp chất quan trọng: cordycepin (1,52%), cordycepic acid (11,8%), polychaccaride (30%) (Shih *et al.*, 2007).

#### *Acid amin*

Kết quả nghiên cứu của Hyun (2008) cho thấy trong quả thể nấm *Cordyceps militaris* có chứa lượng acid amin tổng số cao hơn trong sinh khối nấm (69,32 mg/g trong quả thể và 14,03 mg/g trong sinh khối nấm). Khối lượng acid amin mỗi loại trong quả thể và sinh khối nấm cũng có sự chênh lệch, dao động từ 1,15–15,06 mg/g và 0,36–2,99 mg/g. Thành phần acid amin của mỗi loại trong quả thể bao gồm: lysine (15,06 mg/g), glutamic acid (8,79 mg/g), prolin (6,68 mg/g), threonine (5,99 mg/g), arginine (5,29 mg/g), và alanine (5,18 mg/g) in the fruiting body. Số liệu phân tích của Chang và ctv. (2001) cho thấy phần lớn trong sinh khối nấm chứa acid aspartic (2,66 mg/g), valine (2,21 mg/g) và tyrosine (1,57 mg/g) (Chang, 2001).

*Acid béo*

Quả thể nấm *Cordyceps militaris* chứa nhiều acid béo không no, chiếm 70% tổng số acid béo, trong đó lượng acid linoleic chiếm đến 61,3% trong quả thể và 21,5% trong sinh khối. Lượng acid béo no chủ yếu là acid palmitic, chiếm 24,5% trong quả thể và 33,0% trong sinh khối (Bảng 2) (Hur, 2008).

**Bảng 2: Thành phần acid béo của *Cordyceps militaris* (Hur, 2008)**

Acid béo	Phần trăm acid béo tổng (%)	
	Quả thể	Sinh khối
Palmitic acid (C16:0)	24.5	21.5
Palmitoic acid (C16:1)	2.3	2.1
Stearic acid (C18:0)	5.8	5.0
Oleic acid (C18:1)	6.0	17.7
Linoleic acid (C18:2)	61.3	33.0
Linolenic acid (C18:3)	–	20.6

*Adenosine và cordycepin*

Adenosine và cordycepin là hai hợp chất có dược tính cao của nấm *Cordyceps militaris*. Adenosine chiếm 0,18% trong quả thể và 0,06% trong sinh khối nấm. Đối với hợp chất cordycepin, trong quả thể có hàm lượng cao gấp 3 lần so với sinh khối (0,97% so với 0,36%) (Hyun et al, 2008).

*Polysaccharide*

Các polysaccharide CPS-1 và CPS-2 được tách chiết từ nấm *Cordyceps militaris* cho thấy chúng có thành phần từ các đơn phân là các đường monosaccharide, mannose và galactose. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai loại polysaccharide này có

khả năng phục hồi các tổn thương gan do ethanol, và tác dụng này tăng lên khi tăng liều dùng chiết xuất. Yan et al., 2008 cho rằng tác dụng này có thể do chức năng kháng oxy hóa của các polysaccharide từ nấm.

**2.3 Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nuôi trồng nấm *Cordyceps militaris***

Nấm dược liệu từ lâu đã là một phần quan trọng của văn hóa và nền văn minh nhân loại, đặc biệt các loài trong giống *Cordyceps* được đánh giá cao về dược tính (McKenna et al., 2002). Hầu hết các loài *Cordyceps* ký sinh trên ấu trùng côn trùng hoặc các loài chân đốt (Kobayasi et al., 1941; 1982). Loài nấm Đông trùng hạ thảo có giá trị kinh tế cao nhất trong giống này là *Cordyceps sinensis* (Berk.), là loài ký sinh trên sâu bướm (Wang Yao et al., 2011), phân bố ở cao nguyên Tây Tạng của Trung Quốc và đồng cỏ trên cao của Nepal, Bhutan và Ấn Độ (Shrestha et al., 2010; Zhang et al., 2012]. *O. sinensis* là một loại nấm dược liệu có giá trị cao, được thu hái và giao dịch từ lâu đời (Jones et al., 1997; Halpern, 1999). Do bị khai thác triệt để, số lượng của *O. sinensis* trong tự nhiên giảm mạnh (Li et al., 2006; Stone, 2008; Zhang, 2012). Sự khan hiếm và giá bán trên thị trường cao đã dẫn đến việc xuất hiện nhiều nấm giả bán trên thị trường dưới nhiều dạng như dùng những loài nấm có hình thái quả thể giống với loài *O. sinensis*, hoặc ép khuôn tạo hình dáng tương tự *O. sinensis* từ các loại bột và dược liệu.

Một loài trùng thảo phổ biến khác là loài *Cordyceps militaris* (. L: Fr.) Link, có phân bố trên toàn thế giới ở độ cao từ 0–2.000 m trên mực nước biển (Kobayasi et al., 1941; Mains, 1958; Panigrahi et al., 1995; Shrestha và Sung, 2005; Ma et al., 2007). Loài này thường được gọi là nấm cam sâu bướm, có thể dễ dàng nuôi nhân tạo bằng cả hai phương pháp rắn và lỏng trong môi trường có nhiều nguồn carbon và nitơ. *C. militaris* được xem như một nguồn thay thế cho *O. sinensis* do nó chứa các hợp chất hóa học và dược tính tương tự như nấm *O. sinensis* như hoạt tính chống oxy hóa, ức chế tế bào ung thư... (Gong et al., 2006a,b ; Huang et al., 2006; Yu et al., 2006; Ni et al., 2007; Gao et al., 2008; Yue et al., 2008; Zhou et al., 2009; Das et al., 2010; Khan et al., 2010; Li et al., 2010; Zheng et al., 2011; Dong et al., 2012). Tuy nhiên, cần có thêm các nghiên cứu dược lý sâu hơn nhằm xác định các hợp chất tinh khiết khác ngoài cordycepin để xác định và so sánh chính xác giá trị dinh dưỡng của hai loài này (Paterson et al., 2008).

Khác với loài *O. sinensis* không nuôi trồng được hoàn chỉnh để tạo quả thể trong môi trường nhân tạo, nấm *C. militaris* có vòng đời hoàn chỉnh khi nuôi cấy trong môi trường nhân tạo, do đó loài này được sử dụng làm mô hình để nghiên cứu các loại nấm thuộc giống *Cordyceps* khác (Shrestha *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2010). Không phân bố ở các điều kiện địa lý nghiêm ngặt như *O. sinensis*, loài nấm *C. militaris* có phân bố rộng trên toàn thế giới. Tuy nhiên, mật độ trong tự nhiên của nấm lại không đáng kể, và sản lượng quả thể nấm này trong tự nhiên rất thấp, do đó trong những năm gần đây đã có nhiều nghiên cứu trên việc nuôi cấy quy mô lớn quả thể và tơ nấm này cho ứng dụng trong dược liệu (Dai *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2007).

Từ cuối thế kỷ 19, các nhà khoa học đã công bố các nghiên cứu tạo quả thể nấm trên côn trùng (de Bary *et al.*, 1887; Shanor *et al.*, 1936; Müller-Kögler *et al.*, 1965; Leatherdale, 1970) và sau đó là các nghiên cứu nuôi trồng thành công nấm trên các hợp chất hữu cơ trong quy mô phòng thí nghiệm (Kobayasi *et al.*, 1941; Basith và Madelin, 1968; Yue *et al.*, 1982). Nguyên do lý giải cho khả năng nuôi trồng nấm *C. militaris* trên môi trường không chứa dịch chiết côn trùng vẫn chưa được lý giải thỏa đáng nhưng thành quả của các nghiên cứu này đã đóng góp to lớn cho việc phát triển quy mô nuôi cấy cỡ lớn hơn.

Để đáp ứng nhu cầu về các dược chất từ nấm *C. militaris*, cùng với việc nuôi cấy thu quả thể, việc sản xuất hệ sợi *C. militaris* trong môi trường lỏng cũng là một hướng đi hứa hẹn để sản xuất ra các hợp chất có hoạt tính sinh học cao từ nấm này (Huang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009a, b; Das *et al.*, 2010). Các nghiên cứu sâu về các hợp chất

sinh hóa và dược chất của nấm tiếp theo đó cũng đã được công bố trong những năm gần đây (Paterson *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010).

Nấm *Cordyceps militaris* khi nuôi trên các môi trường khác nhau sẽ có các hình thái khác nhau (Hình 3). Các số liệu nghiên cứu tại Đại học Thủ Dầu Một cho thấy trên môi trường rắn bổ sung đạm hữu cơ từ bột nhộng, nấm tạo quả thể dạng sợi, chiều dài 5-6 cm sau 9 tuần. Trên môi trường lỏng tinh sử dụng môi trường SDAY và thạch agar không thấy hiện tượng sinh quả thể.

### 2.3.1 Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến quá trình nuôi trồng nấm

*Cordyceps militaris* được trồng trong môi trường lỏng để thu hoạch sợi nấm đồng thời trên môi trường rắn để thu quả thể. Các tác giả Kim và Liu đã tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy chìm nấm *C. militaris* (Kim *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Để sản xuất quy mô lớn về số lượng quả thể nấm *C. militaris* hiện nay người ta chỉ sử dụng môi trường rắn chứa các cơ chất nhân tạo hoặc môi trường rắn chứa côn trùng (ví dụ, ấu trùng tằm *B. mori*). Tuy nhiên, việc nuôi nấm lấy quả thể trên côn trùng rất tốn kém, do đó hiện nay nấm chủ yếu được nuôi trên môi trường có thành phần chính là gạo. Các môi trường dùng cho nuôi cấy bao gồm môi trường nhân giống, môi trường tiên nuôi cấy hệ sợi và môi trường sản xuất. Thành phần các môi trường này khác nhau phù hợp với sự phát triển của nấm ở các giai đoạn. Có 4 giai đoạn chính trong sự phát triển của nấm, bao gồm: giai đoạn tạo hệ sợi, giai đoạn tạo sắc tố, giai đoạn nảy chồi, và giai đoạn tạo quả thể (Lu *et al.*, 2005). Các quá trình này đòi hỏi việc kiểm soát chặt chẽ về nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng (Ren *et al.*, 2009).



**Hình 3: *Cordyceps militaris* nuôi trồng trên các điều kiện khác nhau (Dữ liệu nghiên cứu của Phòng thí nghiệm Nấm dược liệu, Đại học Thủ Dầu Một); (a) Nấm *Cordyceps militaris* nuôi trồng trên môi trường rắn có bổ sung gạo và bột nhộng (1-9 tuần); (b) Nấm *Cordyceps militaris* nuôi trên môi trường lỏng SDAY; (c) Nấm *Cordyceps militaris* mọc trên môi trường thạch agar bổ sung đạm hữu cơ**

Việc nuôi cấy các loại nấm trên môi trường rắn đã được nghiên cứu trong nhiều năm qua. So sánh với các loại môi trường khác, môi trường rắn hiệu quả hơn về các mặt như diện tích nuôi trồng nhỏ, giảm lượng nước tiêu thụ so với nuôi cấy lỏng, đồng thời giảm chi phí xử lý nước thải và tiêu thụ năng lượng trong quy trình nuôi nấm. Trong tự nhiên nấm *C. militaris* sinh trưởng rất hạn chế ký sinh trên côn trùng. Khi nuôi trồng trong điều kiện nhân tạo nấm có thể phát triển trong điều kiện tối ưu như độ thoáng khí giúp cho việc phát triển tơ nấm và quả thể, nhất là chủ yếu quả thể chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học hơn (Sung *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008). Quả thể đã được trồng thành công trên môi trường gạo lứt (Choi *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2002) hoặc ấu trùng côn trùng (Harada *et al.*, 1995; Sato và Shimazu, 2002). Các nghiên cứu khác cũng cho thấy việc sử dụng hạt kê có thể tạo ra nấm có hàm lượng adenosine cao. Các nghiên cứu cũng cho thấy khi hạt đậu nành được dùng làm môi trường rắn hàm lượng cordycepin tăng so với giá thể gạo (Lim *et al.*, 2012).

### 2.3.2 Ảnh hưởng của dinh dưỡng trong môi trường nuôi nấm

#### Nguồn dinh dưỡng từ côn trùng

Môi trường nuôi cấy nấm có thể dùng các loại nhộng và sâu khác nhau, nhưng hầu hết sử dụng nhộng tằm *Bombyx mori* (Hong *et al.*, 2010). Các

nghiên cứu cũng cho thấy có khả năng sử dụng các loại côn trùng khác để nuôi nấm như ấu trùng bướm đêm *Antherea pernyi* (Wang *et al.*, 2002), *Mamestra brassicae* (Harada *et al.*, 1995)...

#### Nguồn dinh dưỡng từ các hợp chất hữu cơ tự nhiên

Việc sử dụng côn trùng trong nuôi cấy nấm ở quy mô lớn cho thấy nhiều hạn chế về mặt nguyên liệu sẵn có, sự tạp nhiễm trong quá trình nuôi cao hơn, do đó các hợp chất hữu cơ đã được sử dụng để thay thế côn trùng. Xie và *ctv* cho thấy việc bổ sung gạo lứt, lúa mạch và đậu nành vào môi trường nuôi cấy thích hợp để thay thế côn trùng (Xie *et al.*, 2009b). Tuy nhiên, Yahagi cũng chỉ ra rằng môi trường dinh dưỡng trên thạch không phù hợp cho việc sản xuất nấm (Yahagi *et al.*, 2004).

Các hormone thực vật như 2, 4-D, citric acid triamine, colchi-cines cũng cho thấy có ảnh hưởng đến năng suất quả thể (Wang *et al.*, 2010). Nghiên cứu của Li năm 2004 và Dong năm 2012 cho thấy việc bổ sung các muối khoáng như  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ở nồng độ khoảng 0.1 g/L cũng có thể tăng năng suất quả thể và hàm lượng các hoạt chất sinh học trong nấm (Li *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2012). Thời gian tạo quả thể nấm dao động theo loại môi trường sản xuất quả thể, thường trong khoảng 35-70 ngày (Du *et al.*, 2010). Zhang và Liu (1997) kết luận trên môi trường gạo cần 35-45 ngày cho thời



gian thu hoạch quả thể, tuy nhiên khi sử dụng các môi trường khác thì thời gian tạo quả thể sẽ dài hơn như khi dùng hạt kê, ngô làm môi trường trồng nấm.

### 2.3.3 Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy

#### Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ môi trường có ảnh hưởng lớn đến việc tạo quả thể trong nuôi trồng nấm. Các nghiên cứu cho thấy khoảng nhiệt độ 18–22 °C là tối ưu cho sự sinh trưởng sinh khối nấm và năng suất quả thể. Tuy nhiên, quá trình này sẽ giảm mạnh khi tăng nhiệt độ trên 25°C (Sung *et al.*, 1999, 2002; Gao *et al.*, 2000). Do đó, cần lưu ý về yếu tố nhiệt độ môi trường khi trồng nấm và phải đảm bảo điều kiện này khi tiến hành nuôi trồng nấm ở khu vực có nhiệt độ môi trường không thích hợp, như sử dụng máy điều hòa.

#### Ảnh hưởng của yếu tố ánh sáng

Cường độ ánh sáng cũng ảnh hưởng lớn đến quá trình nuôi cấy tạo quả thể nấm. Trong điều kiện che tối, việc tạo quả thể bị ức chế (Gao *et al.*, 2000; Sato và Shimazu, 2002). Các nghiên cứu cho thấy cường độ ánh sáng tối ưu cho sinh trưởng của nấm có thể dao động tùy chủng nấm, tuy nhiên từ 500-1000 lux được xem là điều kiện thích hợp nhất (Sung *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2000; Sato và Shimazu, 2002). Cần thiết kế các chế độ chiếu sáng phù hợp trong phòng nuôi khi nuôi trong điều kiện nhân tạo đối với nấm *C. militaris*.

#### Ảnh hưởng của độ thoáng khí và ẩm độ

Độ thoáng khí tốt kích thích sự sinh trưởng của tơ nấm và tổng sinh khối nấm. Các nghiên cứu cho thấy việc sử dụng màng bao HFM (hydrophobic fluoropore Membrane) cho kết quả tốt nhất về hiệu suất quả thể nấm *C. militaris* (Zhang *et al.*, 2010). Khoảng ẩm độ thích hợp cho nấm dao động từ 70–90 %, tương đương với độ ẩm không khí trong tự nhiên sẽ phù hợp cho việc tạo quả thể. Khi độ ẩm thấp sẽ làm môi trường khô nhanh hạn chế sự phát triển của tơ nấm cũng như quả thể. Do đó, trong phòng nấm cần bổ sung ẩm bằng máy phun ẩm với nguồn nước sạch khuẩn.

Ngoài độ thoáng khí và ẩm độ, dịch nuôi cấy *C. militaris* cần được chú ý duy trì pH trong khoảng 6.0–6.5, nhiệt độ 20–25°C và bổ sung các nguồn dinh dưỡng như carbohydrate, nitrogen và muối khoáng (Sung *et al.*, 2006).

## Vấn đề thoái hóa giống trong nuôi cấy nấm *C. militaris*

Thoái hóa giống là vấn đề quan trọng trong việc nuôi trồng nấm *C. militaris* trong điều kiện nhân tạo. Sự thoái hóa giống thể hiện ở việc giảm tốc độ sinh trưởng, giảm mật độ tơ nấm, màu sắc tơ và năng suất quả thể, cũng như các thay đổi về hình dạng và kích thước quả thể. Ngoài ra, sự thoái hóa giống còn thể hiện ở việc giảm hàm lượng các hợp chất có lợi tạo ra trong môi trường nuôi cấy và trong quả thể nấm.

Thoái hóa trong tạo quả thể thường có liên quan đến vật liệu dùng phân lập. Nếu giống được phân lập từ đa bào tử hoặc mô, việc thoái hóa giống sẽ xảy ra ở lần nuôi cấy thứ hai hoặc ba (Shrestha *et al.*, 2004). Tuy nhiên, giống nấm *C. militaris* ít thoái hóa hơn khi được phân lập từ các đơn bào tử (Shrestha *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2006). Việc giảm sắc tố cũng được ghi nhận khi nuôi trồng nấm sau vài lần nhân giống (Sung *et al.*, 2006). Hoạt tính của enzyme dehydrogenase và sắc tố giảm như trong nghiên cứu của Lin *et al.* 2010.

Một số nghiên cứu cho thấy việc trữ giống ở 4–10°C có thể duy trì khả năng tạo quả thể đến 6 tháng (Sung *et al.*, 2006; Geng *et al.*, 2009). Các nghiên cứu trên gen cũng chỉ ra rằng có sự liên hệ giữa các biến đổi ở mức độ gen và sự thoái hóa giống của nấm *C. militaris* (Li *et al.*, 2003), tuy nhiên các gen chính xác liên quan đến quá trình này vẫn chưa được xác định.

Khi phát triển quy trình nuôi cấy hiệu quả nấm *C. militaris* các nhà sản xuất cần đáp ứng các yêu cầu về giống nấm, duy trì năng suất quả thể và hàm lượng cordycepin trong quả thể cao. Du và *ctv.* (2010) phát triển phương pháp nuôi cấy đạt hàm lượng cordycepin cao (24.98 mg/g quả thể) trong khi Che và *ctv.* (2004) tạo ra chủng nấm có năng suất cao và ổn định hơn nhờ đột biến bằng tia UV (Che *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2010). Nấm thường được nuôi trong các chai nhỏ 0.5- 1 lít do nấm đòi hỏi độ ẩm cao. Sử dụng các chai nhựa trong hoặc chai thủy tinh thích hợp cho việc phát triển tơ và quả thể nấm, đồng thời có thể tái sử dụng làm giảm chi phí trong sản xuất.

## 3 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 3.1 Kết luận

Thông qua kết quả của các nghiên cứu về nấm *Cordyceps militaris* cho thấy loài nấm này có thành phần dinh dưỡng bổ dưỡng, có chứa các hợp chất có dược tính và có tiềm năng ứng dụng lớn trong

việc điều trị bệnh trong y học hiện đại và cổ truyền. Các nghiên cứu sâu về ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến việc nuôi trồng nấm *C. militaris* cũng như các quy trình nuôi cấy cho thấy tính khả thi của việc sản xuất nấm này ở quy mô lớn trong điều kiện nhân tạo có kiểm soát về các yếu tố như giống, nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng, và dinh dưỡng nhằm có thể ổn định chất lượng sản phẩm nấm.

### 3.2 Đề xuất

Giá trị kinh tế cao và nhu cầu sử dụng nấm *Cordyceps militaris* cho việc nghiên cứu và ứng dụng lâm sản trong điều trị bệnh trong và ngoài nước chỉ rõ rằng việc sản xuất nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris* cần được đẩy mạnh ở nước ta. Việc chuyển giao công nghệ sản xuất nấm đến người nông dân cần có sự phối hợp giữa các viện nghiên cứu, trường đại học ở Việt Nam và các sở ban ngành quản lý về nông nghiệp sẽ giúp tạo ra các khu sản xuất nấm *Cordyceps militaris* có chất lượng cao và ổn định về sản lượng, từ đó làm cơ sở cho việc phát triển kinh tế địa phương tại Việt Nam.

### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được Quỹ nghiên cứu khoa học thuộc trường Đại học Thủ Dầu Một tài trợ.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Basith M., Madelin M.F., 1968. Studies on the production of perithecial stromata by *Cordyceps militaris* in artificial culture. Canadian Journal Botany 46:473–480.

Byung-Tae P., Kwang-Heum N., Eui-Cha J., Jae-Wan P., Ha-Hyung K., 2009. Antifungal and Anticancer Activities of a Protein from the Mushroom *Cordyceps militaris*. Korean Journal of Physiol Pharmacology 13: 49 - 54.

Chang, H. L., Chao, G. R., Chen, C. C., Mau, J. L., 2001. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris*. Food Chemistry. 74:203-207.

Che Z.M., 2003. Assessment on edible safety of artificially cultivated *Cordyceps militaris* fruiting bodies. Edible Fungi. 25(3): 45–46.

Che Z.M., Wang Y., Zhou L.L., 2004. Study on the breeding of a new variety of *Cordyceps militaris* by mutated with ultraviolet radiation. Food Ferment Industry. 30(8):35–38.

Choi Y.S., Lee H.K., Kim S.H., 1999. Production of fruiting body using cultures

of entomopathogenic fungal species. Korean Journal of Mycology. 27: 15–19

Christian G.D.N. E. and Henry A. C. F., 1837. Das System der Pilze: part one.

Das S.K., Masuda M., Mikio S., 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects. Fitoterapia. 81:961–968.

de Bary A., 1887. Comparative morphology and biology of the fungi, mycetozoa and bacteria. Clarendon, Oxford.

Dong JZ, Lei C, Ai XR et al., 2012. Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* Link and analysis on its main active components. Applied Biochemistry and Biotechnology. 166:1215–1224.

Du A.L., Zhang X. and Zhang H.Z., 2010. A new high cordycepin *Cordyceps militaris* cultivar 'Haizhou 1'. Acta Horticulture Sinica. 37:1373–1374.

Farlow W.G., Seymour A.B., 1888. A provisional host-index of the fungi of the United States: part 1. Polypetalae, Cambridge.

Fengyao W., Hui Y., Xiaoning M., Junqing J., Guozheng Zh., Xijie G. and Zhongzheng G., 2011. Structural characterization and antioxidant activity of purified polysaccharide from cultured *Cordyceps militaris*. African Journal of Microbiology Research. 5(18): 2743-2751.

Gao S.Y., Wang F.Z., 2008. Research of commercialized cultivation technology on *Cordyceps militaris*. North Hortic 9:212–215.

Gao X.H., Wu W., Qian G.C., 2000. Study on influences of abiotic factors on fruitbody differentiation of *Cordyceps militaris*. Acta Agriculture Shanghai. 16: 93–98.

Geng L.J., He L.L., Yu-Yang E., 2009. Effect of different preservation conditions on mycelial growth and fruitbody yield of *Cordyceps militaris*. Journal of Shenyang Agriculture University. 40:165–168.

Gong C.L., Pan Z.H., Zheng X.J., 2006a. Anti-oxidation of cultured *Cordyceps militaris* growing on silkworm pupa. In: Proceedings of International Workshop on Silk handicrafts cottage industries and silk enterprises development in Africa, Europe, Central Asia and the Near East, & Second Executive Meeting of Black, Cas-pian seas

- and Central Asia Silk Association (BACSA), Bursa, Turkey, pp 615–620.
- Gong C.L., Pan Z.H., Zheng X.J., 2006b. Immunoregulation function of artificially *Cordyceps militaris* growing on pupae of silkworm *Bombyx mori* for mice. In: Proceedings of International Workshop on Silk handicrafts cottage industries and silk enterprises development in Africa, Europe, Central Asia and the Near East, & Second Executive Meeting of Black, Caspian seas and Central Asia Silk Association (BACSA), Bursa, Turkey, pp 633–638.
- Gu Y.X., Wang Z.S., Li S.X., 2007. Effect of multiple factors on accumulation of nucleosides and bases in *Cordyceps militaris*. *Food Chemistry* 102:1304–1309.
- Halpern G.M., 1999. *Cordyceps*: China's healing mushroom. Avery, New York
- Harada Y., Akiyama N., Yamamoto K., Shiota Y., 1995. Production of *Cordyceps militaris* fruit body on artificially inoculated pupae of *Mamestra brassicae* in the laboratory. *Transactions of the Mycological Society of Japan*. 36: 67–72.
- Hong I.P., Kang P.D., Kim K.Y., 2010. Fruit body formation on silkworm by *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 38:128–132.
- Huang N.L., Lin Z.B., Chen G.L., 2010. Medicinal and edible fungi. Shanghai Scientific and Technological Literature, Shanghai.
- Huang S.J., Tsai S.Y., Lee Y.L., 2006. Nonvolatile taste components of fruiting bodies and mycelia of *Cordyceps militaris*. *Food Science Technology* 39:577–583.
- Hur H., 2008. Chemical Ingredients of *Cordyceps militaris*. *Mycobiology*. 36(4):233-235.
- Jae-Sung K., Kumar S., Se-Eun P., Bong-Suk C.i, Seung K., Nguyen T. H., Chun-Sung K., Han-Seok C., Myung-Kon K., Hong-Sung C., Yeal P., Sung-Jun K., 2006. A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris*. *Journal of Microbiology* 44(6):622-31.
- Jones K., 1997. *Cordyceps*: tonic food of ancient China. Sylvan, Washington.
- Kamble V.R. and Agre D.G., 2012. Reinvestigation of insect parasite fungus *Cordyceps militaris* from Maharashtra. *Bionano Frontier* 5(2):224-225.
- Kim S.W., Hwang H.J., Xu C.P., 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Apply Microbiology*. 94:120–126.
- Kobayasi Y., 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Science Reports of the Tokyo Bunrika Daigaku section B*. 84(5):53–260.
- Kobayasi Y., 1981. Revision of the genus *Cordyceps* and its allies 1. *Bulletin of the National Science Museum Tokyo*. 7:1–13.
- Kobayasi Y., 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 23:329–364 Herbal, New York.
- Kwon J.S., Lee J.S., Shin W.C., 2009. Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14:756–762.
- Khan M.A., Tania M., Zhang D.Z., 2010. *Cordyceps* mushroom: a potent anticancer nutraceutical. *Open Nutraceuticals Journal*. 3:179–183
- Leatherdale D., 1970. The arthropod hosts of entomogenous fungi in Britain. *Entomophaga*. 15:419–435.
- Li C.B., Tong X.D., Bai J., 2004. Artificial stromata production of *Cordyceps militaris*. *Journal of Dalian National University*. 6(5):29–31.
- Li C.L., Liu X.L., Zheng X.Q., 2011. Mutagenesis of *Cordyceps militaris* protoplast for high production of exopolysaccharide. *Indian Microbiology*. 41(2):51–56.
- Li C.R., Nam .S.H., Geng D.G., 2006. Artificial culture of seventeen *Cordyceps spp*. *Mycosystema*. 25:639–645.
- Li J., Chen G.S., Fang Q.M., 2010. Comparative study on cultivated *Cordyceps militaris* and wild *Cordyceps sinensis*. *Journal of Chengdu University*. 33(3):82–84.
- Li M.N., Wu X.J., Li C.Y., 2003. Molecular analysis of degeneration of artificial planted

- Cordyceps militaris*. Mycosystema 22:277–282.
- 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 S.P., Yang F.Q., Tsim K.W.K., 2006. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41, 1571–84.
- Lim L., Lee C., Chang E., 2012. Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) Link (Ascomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms. 14:181–188.
- Lin Q.Q., Qiu X.H., Zheng Z.L., 2010. Characteristics of the degenerate strains of *Cordyceps militaris*. Mycosystema 29:670–677.
- Lin W.H., Tsai M.T., Chen Y.S., Hou R.C., Hung H.F., Li C.H., Wang H.K., Lai M.N., Jeng K.C., 2007. Improvement in sperm production in subfertile boars by *Cordyceps militaris*. The American Journal of Chinese Medicine.35(4):631-41.
- Liu D., He L.L., Wang Z.Q., 2006. The influences of subculture of *Cordyceps militaris* to colonial morphology and fruitbody yield. Journal of Shenyang Agriculture University. 37:538–541.
- Liu M.M., Ning S.Y., Cui X.Y., 2008. Optimization of submerged culture condition for *Cordyceps militaris* using response surface methodology. China Agricultural Science. 24(5):127–131.
- Liu X.L., Zhou J.Z., Huang K.H., 2009. Study on preparation and regeneration of protoplast of *Cordyceps militaris*. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis. 21(9):119–120.
- Liu Z.Y., Yao Y.J., Liang Z.Q., 2001. Molecular evidence for the anamorph-teleomorph connection in *Cordyceps sinensis*. Mycological Research. 105: 827–32.
- Lu J.M., Zeng Z.J., He H.Q., 2005. Culture technique of *Cordyceps militaris* on artificial media. Guangdong Agricultural Science. 2:88–89.
- Ma L.P., Zhao J.F., Liu K.Y., 2008. Research on the isolation condition of *Cordyceps militaris* protoplast. Journal of Anhui Agricultural Science 36:14612–14613.
- Ma T., Feng Y., Wu X.P., 2007. Primary investigation of a host insect of *Cordyceps militaris* and analysis of its main ingredients. Forest Resources 20:63–67.
- Mains E.B., 1958. North American entomogenous species of *Cordyceps*. Mycologia. 50:169–222.
- McKenna D.J., Jones K., Hughes K., 2002. Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements, 2nd edn. Haworth.
- Mizuno T., 1999. Medicinal Effects and Utilization of *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes) and *Isaria* Fr. (Mitosporic Fungi) Chinese Caterpillar Fungi, “Tochukaso” (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms. 1:251-261.
- Moore R.T., 1964. Fine structure of mycota: 12 Karyochorisis – somatic nuclear division – in *Cordyceps militaris*. Z Zellforsch. 63:921–937.
- Müller-Kögler E., 1965. *Cordyceps militaris* (Fr.) Link: Beobachtung- und Versuche anlässlich eines Fundes auf *Tipula paludosa* Meig. (Dipt., Tipul.). Z Angew Entomol. 55:409–418.
- Ni H., Li H.H., Huang W.F., 2007. Research and product development of *Cordyceps militaris* and its bioactive substances. Review Science and Technology 25(15):75–79.
- Panigrahi A., 1995. Fungus *C. militaris* infestation in the pupa of the tea pest *Andraca bipunctata* Walker. Environmental Ecology. 13:942–946.
- Paterson R.R.M., 2008. *Cordyceps*—a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? Phytochemistry. 69:1469–1495.
- Paul M. K., Paul F. C., David W. M. and Stalpers J. A., 2008. Dictionary of the Fungi; CABI.
- Peng Zh., Yongliang X., Guohua X., Chenghui X., Xiao H., Siwei Zh., Huajun Zh., Yin Huang, Yan Zh., Shengyue W., Guo-Ping Zh., Xingzhong L., Raymond J. St L. and Chengshu W., 2011. Genome sequence of

- the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. *Genome Biology*, 12: 116.
- Ren W.Y., Zhao H., Wu Z.K., 2009. Techniques for fast and high yielding cultivation of the valuable edible and medicinal mushroom, *Cordyceps militaris*. *China Agricultural Technology Extension*. 25(5):28–29.
- Sato H. and Shimazu M., 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Applied Entomology and Zoology*. 37:85–92.
- Seulmee S., Sungwon L., Jeonghak K., Sunhee M., Seungjeong L., Chong-Kil L., Kyunghae C., Nam-Joo H., Kyungjae K., 2009. Cordycepin Suppresses Expression of Diabetes Regulating Genes by Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Macrophages. *Immune Network*. 9(3):98-105.
- Shanor L., 1936. The production of mature perithecia of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link in laboratory culture. *Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society*. 52:99–105.
- Shih I.L., Tsai K.L., Hsieh C.Y., 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal*. 33, 193–201.
- Shonkor K. D., Shinya F., Mina M. and Akihiko S., 2010. Efficient Production of Anticancer Agent Cordycepin by Repeated Batch Culture of *Cordyceps militaris* Mutant. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*. 20-22.
- Shrestha B., Park Y.J., Han S.K., 2004. Instability in vitro fruiting of *Cordyceps militaris*. *Journal of Mushroom Science and Production*. 2:140–144.
- Shrestha B., Sung J.M., 2005. Notes on *Cordyceps* species collected from central region of Nepal. *Mycobiology* 33:235–239.
- Shrestha B., Zhang W.M., Zhang Y.J., 2010. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology*. 1:228–236.
- Shrestha B., Lee W.H., Han S.K., Sung J.M., 2006. Observations on Some of the Mycelial Growth and Pigmentation Characteristics of *Cordyceps militaris* Isolates. *Mycobiology*. 34(2):83-91.
- Stensrud Ø., Hywel-Jones N.L., Schumacher T., 2005. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycological Research*. 109: 41–56.
- Stone R., 2008. Last stand for the body snatcher of the Himalayas? *Science*. 322:1182.
- Sung G.H., Spatafora J.W., 2004. *Cordyceps cardinali* ssp. nov., a new species of *Cordyceps* with an east Asian-eastern North American distribution. *Mycologia* 96:658–666.
- Sung J.M., 1996. The insects-born fungus of Korea in color. *Kyohak Publishing Co. Ltd.*, Seoul.
- Sung J.M., Choi Y.S., Lee H.K., 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Korean Journal of Mycology* 27:15–19.
- Sung J.M., Choi Y.S., Shrestha B., Park Y.J., 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Korean Journal of Mycology*. 30: 6–10.
- Sung J.M., Park Y.J., Han S.K., 2006. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. *Mycobiology*. 34: 131–137.
- Sung J.M., Park Y.J., Lee J.O., 2007. Effect of preservation periods and subcultures on fruiting body formation of *Cordyceps militaris* in vitro. *Mycobiology* 34:196–199 Supplements. *American Journal of Chinese Medicine*. 35(4):631-41.
- Wang G.D., 1995. Ecology, cultivation and application of *Cordyceps* and *Cordyceps sinensis*. *Scientific and Technical Documents*, Beijing.
- Wang H.J., Chu Z., Feng L., 2010. A comparative study on effect of two plant growth promoters on the growth of *Cordyceps militaris*. *Lishizhen Medicine And Material Medical Research*. 21:541–542.
- Wang J.F., Yang C.Q., 2006. Research survey on artificial cultivation and product development of *Cordyceps militaris*. *Lishizhen Medicine And Material Medical Research*. 17:268–269.
- Wang L., Zhang W.M., Hu B., 2008. Genetic variation of *Cordyceps militaris* and its allies based on phylogenetic analysis of

- rDNA ITS sequence data. *Fungal Divers* 31:147–155.
- Wang X.L., Yao Y.J., 2011. Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review. *ZooKeys*. 127:43–59.
- Wang X.Q., Chen C.Q., Zhang R., 2002. Methodological studies on cultivation of *Cordyceps militaris* on pupae of *Antheraea pernyi*. *Journal of Anhui Agricultural Science*. 30:965–968.
- Wol-Soon J., Yoo-Jin C., Hyoun-Ji K., Jae-Yun L., Byung-Hyouk N., Jae-Dong L., Sang-Wha L., Su-Yeong S. and Min-Ho J., 2010. The Anti-inflammatory Effects of Water Extract from *Cordyceps militaris* in Murine Macrophage. *Mycobiology*. 38(1): 46-51.
- Xie C.Y., Gu Z.X., Fan G.J., 2009a. Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 158:483–492.
- Xie C.Y., Liu G.X., Gu Z.X., 2009b. Effects of culture conditions on mycelium biomass and intracellular cordycepin production of *Cordyceps militaris* in natural medium. *Annua Microbiology*. 59:293–299.
- Xiong C.H., Xia Y.L., Zheng P., 2010. Developmental stage-specific gene expression profiling for a medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Mycology* 1:25–66.
- Yahagi N., Yahagi R., Takano F., 2004. Growth of ascocarps from cultured *Cordyceps militaris*(L.:Fr.) Fr. and *Cordyceps formicarium* Kobayasi in an agar medium. *Nippon Kingakukai Kaiho*. 45:15–19.
- Yan H., Zhu D., Xu D., Wu J. and Bian X., 2008. A study on *Cordyceps militaris* polysaccharide purification, composition and activity analysis. *African Journal of Biotechnology*. 7 (22): 4004-4009.
- Young-Joon A., Suck-Joon P., Sang-Gil L., Sang-Cheol S. and Don-Ha C., 2000. Cordycepin: Selective Growth Inhibitor Derived from Liquid Culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 2744–2748.
- Yu H.M., Wang B.S., Huang S.C., 2006. Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:3132–3138.
- Yue D.C., Yang Y.P., Wang S.F., 1982. Preliminary study on stroma formation of *Cordyceps militaris* strain (Briefing). *Journal of China Medicinal Material*. 05:7
- Yue G.G.L., Lau C.B.S., Fung K.P., 2008. Effects of *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps militaris* and their isolated compounds on ion transport in Calu-3 human airway epithelial cells. *Journal of Ethno-pharmacology*. 117:92–101.
- Yuko O., Jung-Bum L., Kyoko H., Akio F., Dong-Ki P. and Toshimitsu H., 2007. In Vivo Anti-influenza Virus Activity of an Immunomodulatory Acidic Polysaccharide Isolated from *Cordyceps militaris* Grown on Germinated Soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10194–10199.
- Zhang J.Y., Wu K.L., Duan J., 2010. Influence of air permeability on growth of *Cordyceps militaris*. *Guangdong Agricultural Science*. 4:45–47.
- Zhang X.K. and Liu W.X., 1997. Experimental studies on planting *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link with different culture materials. *Edible Fungi China*. 16(2):21–22.
- Zhang Y.J., Li E., Wang C.S., 2012. *Ophiocordyceps sinensis*, the flagship fungus of China: terminology, life strategy and ecology. *Mycology*. 3:2–10.
- Zhang Z., Lei Z., Lu Y., 2008. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106: 188–93.
- Zheng P., Xia Y.L., Xiao Ch.H., 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. *Genome Biology*. 23; 12.
- Zhong S., Pan H.J., Fan L.F., 2009. Advances in research of polysaccharides in *Cordyceps* species. *Food Technology & Biotechnology*. 47:304–312.
- Zhou H.Y., Bian Y.B., 2007. Identification and selection of high cordycepin-yielding protoplast fusion products of *Cordyceps militaris*. *Acta Edulis Fungi*. 14(2):65–70.
- Zhou L.H., Luo L.M., 2009. Preparation and regeneration of protoplasts from *Cordyceps militaris*. *Hubei Agricultural Science*. 48:1621–1624.