



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.040

NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG RẮN LÀM TĂNG HÀM LƯỢNG CORDYCEPIN VÀ ADENOSINE CỦA NẤM *Cordyceps militaris*

Trần Thanh Thy*

Trường Đại học Cửu Long

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thanh Thy (email: tranthanhthy@mku.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 25/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Study of artificial media for increasing cordycepin and adenosine of mushroom *Cordyceps militaris* with high value of trade

Từ khóa:

Cordyceps militaris, môi trường rắn, ngũ cốc đã qua sử dụng

Keywords:

Artificial media, *Cordyceps militaris*, spent brewery grain

ABSTRACT

Mushroom *Cordyceps militaris* is known as a high functional food that supports (restores, maintains or enhances) the function of body parts, with or without nutritional effects, makes body comfortable, increases resistance and reduce the risk of disease. Study of artificial media for increasing pharmaceutical values of the fungus was carried out on four artificial media including M-1 (purple rice, SBG (spent brewery grain), mineral nutrient), M-2 (Secale cereal, SBG, mineral nutrient), M-3 (purple rice, mineral nutrient) and M-4 (Secale cereal, mineral nutrient). These four types of artificial media cultured with the CM- China1 fungus at artificial conditions. The results showed that stromata (fruiting body or buffer) were formed on medium containing SBG. Two media added SBG showed pharmaceutical values of fruiting body higher than those without SBG. The M-2 medium containing SBG increased the highest levels of cordycepin and adenosine in fruiting bodies at 10.58 mg/g and 0.85 mg/g fresh stromata.

TÓM TẮT

Nấm *Cordyceps militaris* là loại thực phẩm chức năng cao cấp có tác dụng hỗ trợ (phục hồi, duy trì hoặc tăng cường) chức năng của các bộ phận trong cơ thể, có hoặc không tác dụng dinh dưỡng, tạo cho cơ thể tình trạng thoải mái, tăng sức đề kháng và giảm bớt nguy cơ bệnh tật. Nghiên cứu môi trường rắn làm tăng hàm lượng dược liệu của loài nấm này được thực hiện trên 04 loại môi trường rắn gồm: M-1 (gạo tím than, ngũ cốc đã qua sử dụng (spent brewery grain-SBG), dinh dưỡng khoáng); M-2 (lúa mạch đen, SBG, dinh dưỡng khoáng); M-3 (gạo tím than, dinh dưỡng khoáng) và M-4 (lúa mạch đen, dinh dưỡng khoáng). Cả 04 loại môi trường được nuôi cấy chủng nấm CM- China1 và được nhân nuôi trong điều kiện bán nhân tạo. Kết quả cho thấy chủng nấm CM- China1 có khả năng hình thành stromata (quả thể hay thể đệm) trên môi trường có chứa SBG. Hai môi trường có chứa SBG đều cho kết quả phân tích dược liệu quả thể nấm là cao hơn môi trường không bổ sung SBG. Môi trường M-2 có chứa SBG đã làm tăng dược liệu cordycepin và adenosine cao nhất trong quả thể của nấm đạt 10,58 mg/g và 0,85 mg/g quả thể tươi.

Trích dẫn: 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(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 27-33.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Cordyceps sinensis* (*C. sinensis*) được gọi là đông trùng hạ thảo (ĐTHT), loài nấm này đến nay vẫn chưa nhân nuôi quả thể thành công trong môi trường nhân tạo, chỉ khai thác tự nhiên tại các nước như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản. Khai thác nấm *C. sinensis* dần trở nên khan hiếm đã thúc đẩy nhiều nghiên cứu hướng đến việc nuôi trồng ĐTHT trên các môi trường nhân tạo khác nhau. Từ xưa đến nay nấm ĐTHT vẫn được xem là một loại dược liệu quý hiếm được coi là một vị thuốc cải lão hoàn đồng và cùng với nhân sâm, linh chi, tam thất tạo thành bộ tứ thần dược mang lại sức khỏe cường thịnh cho con người (Đỗ Tuấn Bách và *ctv.*, 2017).

Hiện nay, trước nhu cầu tiêu thụ ĐTHT ngày một lớn, giá trị thương mại mang lại từ nuôi trồng nấm này ngày càng cao, do vậy nhiều công ty, các viện nghiên cứu, trường đại học... đang tiến hành đẩy mạnh nghiên cứu sản xuất loại nấm dược liệu này. Tại Việt Nam, việc sử dụng nấm ĐTHT đã được người dân biết đến nhiều năm qua, nhưng do giá thành để mua sản phẩm hoàn toàn thiên nhiên rất cao và đặc biệt là sản phẩm giả, sản phẩm rỗng được bán trên thị trường mà các cơ quan chức năng và người tiêu dùng khó kiểm soát được. Mặt khác, sản xuất sinh khối trên cơ thể côn trùng rất tốn kém và không phải lúc nào cũng có sẵn, ngoài ra côn trùng cũng bị nhiễm một số bệnh do vi sinh vật gây ra, nên việc chọn lựa môi trường cơ chất làm tăng hàm lượng dược liệu trong quả thể để thay thế vật chủ là rất cần thiết (Kobayashi, 1941; Ting *et al.*, 2014).

Loài nấm ĐTHT *Cordyceps militaris* (được gọi là nấm cam sâu bướm) thuộc nhóm Ascomycota, là loài nấm ký sinh trên cơ thể ấu trùng, nhộng, thành trùng của loài côn trùng, hình thành các quả thể phát triển bên ngoài (Buenz *et al.*, 2005). *C. militaris* được sử dụng như một loại thuốc bổ dân gian truyền thống, đặc biệt là ở Đông Á (Ying *et al.*, 1987; Holliday and Cleaver, 2008; Bhandari *et al.*, 2010). *C. militaris* cũng phát triển ngoài tự nhiên ở Slovenia (Ogris, 2013) và ở một số nước Châu Âu khác. 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).

Những năm gần đây, *C. militaris* được nuôi trồng rộng rãi trên môi trường thuần khiết, môi trường lỏng cũng như môi trường rắn (Das *et al.*, 2010), và là chi *Cordyceps* được nuôi trồng phổ biến nhất (Kobayashi, 1941; Sung, 1996; Zhang *et al.*, 2012). Các loại ngũ cốc và hạt giống khác nhau được sử dụng để bổ sung vào các môi trường rắn để làm tăng dược liệu của nấm như hạt kê, lúa mạch đen, gạo tím than, bột đậu, ngũ cốc, vỏ hạt bông, lúa miến (cao lương), lõi ngô, hạt kê, lúa mì, hạt hoa hướng dương (Chen and Wu, 1990; Zhang and Liu, 1997; Li, 2002; Holliday *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Gao and Wang, 2008; Shrestha *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2014). Ngũ cốc đã qua sử dụng (spent brewery grain-SBG) là sản phẩm phụ của ngành công nghiệp sản xuất bia, SBG vẫn còn lớp vỏ quả-hạt 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). Ngũ cốc đã qua sử dụng cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu đưa vào thành phần môi trường rắn để nuôi quả thể loài *C. militaris*. Wu *et al.*, 2013 đã báo cáo về sự thành công của việc nuôi trồng *C. militaris* và sản xuất cordycepin dựa trên sự lên men chìm. Ngũ cốc đã qua sử dụng là sản phẩm phụ sẵn có, số lượng lớn, chi phí thấp và vẫn là nguồn tài nguyên quý giá cho việc khai thác công nghiệp. Hiện tại, ngành sản xuất bia đã có nhiều tỉnh, thành phố nên rất thuận tiện cho việc khai thác bã bia. Nghiên cứu này trình bày kết quả nghiên cứu môi trường cơ chất rắn được bổ sung SBG nhằm làm tăng hàm lượng dược liệu cordycepin và adenosine trong quả thể của chủng nấm *C. militaris* nhân nuôi trong điều kiện bán nhân tạo.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chuẩn bị chủng nấm *C. militaris* nhân nuôi

Chủng nấm *C. militaris* (ký hiệu CM- China1) được mua chủng gốc từ Công ty Công nghệ Baoli Laoning (Trung Quốc). Sau đó, chủng nấm được hoạt hóa trên môi trường cơ bản PDA (potato dextrose agar) và ủ ở 22°C trong tối hoàn toàn. Sau khi hệ sợi nấm mọc phủ kín môi trường thuần khiết, hệ sợi nấm được đồng nhất lên men với 100 ml dung dịch dinh dưỡng vô trùng. Chủng giống lỏng được sử dụng để cấy truyền vào môi trường rắn nuôi trồng.

2.2 Chuẩn bị môi trường rắn và nuôi cấy

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Vi sinh của Trường Đại học Cửu Long từ tháng 02 đến 9/2017. Môi trường rắn được thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức (Bảng 1) với 20 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một hộp nhựa polypropylene (kích thước 8,5 cm x 11,5 cm). Trộn đều các nguyên liệu theo mỗi công thức và đổ vào hộp nhựa polypropylene theo tỷ lệ cơ chất rắn và dung dịch là 1: 2,5. Tám mươi hộp polypropylene được hấp thanh trùng trong 30 phút ở 121°C và được làm nguội dưới dòng không khí vô trùng. Trong quá trình cấy truyền, chủng giống lỏng đã được trộn đều trên một máy khuấy từ sau đó chuyển 5 mL chủng giống lỏng vào lọ chứa môi trường. Các hộp nuôi được đóng kín nắp và được nuôi trong điều kiện bán nhân tạo ở nhiệt độ, ẩm độ và ánh sáng huỳnh quang tối ưu nhất 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 *C. militaris* khi thành thực được thu hoạch và được gửi mẫu phân tích được liệu tại Viện Thực phẩm Chức năng.

Bảng 1: Thành phần môi trường rắn được bổ sung SBG trong nghiên cứu

Môi trường rắn	Thành phần
M-1	Gạo tím than, 45% SBG, 2% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, 0,2% KH ₂ PO ₄ , 0,2% MgSO ₄ , 0,05% vincozyn, 3,5% nhộng tằm, 0,05% kitin.
M-2	Lúa mạch đen, 45% SBG, 2% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, 0,2% KH ₂ PO ₄ , 0,2% MgSO ₄ , 0,05% vincozyn, 3,5% nhộng tằm, 0,05% kitin.
M-3	Gạo tím than, 2% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, 0,2% KH ₂ PO ₄ , 0,2% MgSO ₄ , 0,05% vincozyn, 3,5% nhộng tằm, 0,05% kitin.
M-4	Lúa mạch đen, 2% glucose, 1% peptone, 1% yeast extract, 0,2% KH ₂ PO ₄ , 0,2% MgSO ₄ , 0,05% vincozyn, 3,5% nhộng tằm, 0,05% kitin.

Chỉ tiêu ghi nhận

– Đánh giá về năng suất: Tổng số mầm, chiều dài quả thể (LS), khối lượng quả thể (FW) và năng suất sinh học (BE).

$BE = FW / MW \times 100$, trong đó MW là trọng lượng cơ chất môi trường.

Đánh giá về dược liệu: Mỗi nghiệm thức được lấy ngẫu nhiên 5 hộp (5 lần lặp lại) để gửi mẫu phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể (mg/g) tươi bằng phương pháp LC-MS/MS và HD.PP.50/TT.HPLC của Viện Thực phẩm Chức năng.

Quả thể *C. militaris* 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 đẳng 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

Năng suất: Nấm *C. militaris* mọc kín trên tất cả 04 hỗn hợp môi trường rắn thử nghiệm. Hai loại môi trường rắn có bổ sung SBG cho thấy tổng số mầm, LS, FW và BE hầu như không khác biệt thống kê với môi trường không bổ sung SBG. Chỉ tiêu trọng lượng quả thể (FW-g), khi bổ sung SBG vào cơ chất rắn không làm tăng rõ rệt so với cơ chất không bổ sung SBG, M-1 đạt 21,9 g so với M-3 23,4 g khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê; M-2 đạt 19,8 g so với M-4 20,1 g khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả cho thấy cơ chất lúa mạch đen không làm tăng năng suất so với gạo tím than, M-3 đạt năng suất cao nhất (23,4 g) khác biệt thống kê với M-2 (19,8 g) và M-4 (20,1 g) (Bảng 2).

Bảng 2: Các chỉ số sinh học của nấm *C. militaris* nhân nuôi trên môi trường rắn khác nhau

Môi trường rắn	Tổng số mầm (mầm)	LS (cm)	FW (g)	BE (%)
M-1	214,3 a	8,12 b	21,9 ab	27,4 ab
M-2	198,1 ab	7,05 b	19,8 b	24,7 b
M-3	200,2 ab	9,86 a	23,4 a	29,25 a
M-4	182,7 b	7,47 b	20,1 b	25,1 b
CV (%)	21,6	31,0	12,5	9,5
Mức ý nghĩa	*	**	**	**

M-1: Gạo tím than + SBG + dinh dưỡng khoáng; M-2: Lúa mạch đen + SBG + dinh dưỡng khoáng; M-3: Gạo tím than + dinh dưỡng khoáng; M-4: Lúa mạch đen + dinh dưỡng khoáng; LS: chiều dài quả thể; FW: khối lượng quả thể; BE: năng suất sinh học

(*): Khác biệt mức ý nghĩa 5%; (**): 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

Được liệu: Khi cơ chất rắn có chứa SBG, chủng nấm CM- China1 hình thành và sản xuất cordycepin và adenosine cao trong điều kiện nuôi cấy bán nhân tạo so với cơ chất không chứa SBG. Lúa mạch đen tỏ ra là cơ chất sản sinh ra cordycepin và adenosine cao khi được phối hợp với SBG so với gạo tím than. Khi phân tích quả thể nấm tươi trên M-2 đạt cordycepin và adenosine cao nhất trong 4 môi trường cơ chất, tương ứng 10,58 mg/g và 0,85 mg/g; thấp nhất là M3, tương ứng 6,26 mg/g và 0,27 mg/g (Bảng 3). Theo 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.

Bảng 3: Các chỉ số cordycepin và adenosine trong quả thể nấm tươi được nuôi trên cơ chất rắn khác nhau

Môi trường	Cordycepin (mg/g)*	Adenosine (mg/g)*
M-1	8,45	0,48
M-2	10,58	0,85
M-3	6,26	0,27
M-4	7,21	0,56

(*): Kết quả phân tích của Viện Thực phẩm Chức năng trực thuộc Bộ Y tế.

Kết quả của nghiên cứu 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. Sự tăng sản lượng cordycepin và adenosine khi môi trường có chứa SBG có thể là do nồng độ của các hợp chất phân tử thấp (đường đơn và các sản phẩm lên men khác được sản xuất qua quá trình sản xuất bia) trong SBG cao hơn so với các hạt gạo tím than, lúa mạch đen chưa lên men. Nhiều thành phần hóa học bổ sung khác nhau được sử dụng

trong nuôi trồng thương mại *C. militaris*. Nghiên cứu của Xie *et al.* (2009) báo cáo rằng các thành phần tự nhiên như gạo nâu, mạch nha và đậu nành là nguồn dinh dưỡng tốt hơn cho *C. militaris* so với các môi trường hóa học. Điều này cho thấy nồng độ cordycepin cao trong môi trường bổ sung SBG có thể đạt được bởi vì SBG là một nguyên vật liệu hỗn hợp chỉ gồm các thành phần tự nhiên. Bên cạnh đó, những đặc điểm hình thái của loài *C. militaris* (màu cam, có khả năng hình thành stromata) cũng được ghi nhận ở chủng CM-China1. Điều này có nghĩa là CM-China1 là một chủng thuộc loài *C. militaris* có khả năng sản xuất cordycepin và adenosine cao chỉ trên môi trường là lúa mạch đen khi được bổ sung SBG và CM-China1 là chủng mà cordycepin bị ảnh hưởng mạnh bởi việc bổ sung SBG vào môi trường. Mặt khác, công bố của Sreshtha *et al.* (2012) về chủng CM11 (*C. militaris*, ký hiệu thứ 11) bị thoái hóa, quả thể có màu trắng và khả năng hình thành stromata kém, khi chủng này được nuôi trên lúa mạch đen thì cordycepin không bị ảnh hưởng bởi việc bổ sung SBG vào môi trường.

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*, Wen *et al.* (2014) đã tối ưu hóa thành phần môi trường rắn để nuôi trồng *C. militaris* và đạt được cordycepin là 9,17 mg/g. Tất cả các nồng độ được báo cáo đều thấp hơn so với kết quả của nghiên cứu này (10,58 mg/g), cho thấy SBG là môi trường chất lượng, sẵn có và rẻ tiền cho việc làm tăng cordycepin từ nuôi trồng quả thể loài nấm *C. militaris*.



Hình 1: Sự phát triển của nấm *C. militaris* trên môi trường rắn M-2, nhân nuôi trong điều kiện bán nhân tạo.

Hệ sợi nấm wam tor (A); Mầm quả thể 20 ngày tuổi sau khi cấy giống nấm (B); và quả thể thành thực (C).

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Môi trường rắn có chứa SBG nồng độ 45% làm tăng rõ rệt hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể của loài nấm *C. militaris* khi được nuôi trong điều kiện bán nhân tạo.

Cần có thêm các nghiên cứu để xác định chính xác các thành phần và/hoặc các tính chất vật lý dẫn tới tăng lượng cordycepin khi nuôi trồng trên môi

trường có chứa SBG và 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhandari, A.K., Negi, J.S., Bisht, V.K., Rana, C.S., Bharti, M.K., Singh, N., 2010. Chemical Constituent, Inorganic Elements and Properties of *Cordyceps sinensis* - a Review (Cordyceps

- sinensis - a Review). *Nature and Science*. 8 (9): 253-256.
- Buenz, E.J., Bauer, B.A., Osmundson, T.W., Motley, T.J., 2005. The traditional Chinese medicine *Cordyceps sinensis* and its effects on apoptotic homeostasis. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 19–29.
- Chen, S.Z., Wu, P.J., 1990. A brief introduction to bottle culture technique of *Cordyceps militaris*. *Edible fungi*. 4: 31-37.
- Chen, Y.S., Liu, B.L., Chang, Y.N., 2011. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 28 (3): 875-879.
- 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.
- Das, S.K., Masuda, M., Sakurai, A., Sakakibara, M., 2010. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: Current state and prospects. *Fitoterapia*. 81 (8): 961–968.
- Đỗ Tuấn Bách, Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang, Hà Văn Hương, Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Huy Thuần và Dương Văn Cường, 2017. Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*. *Tạp chí Khoa học và công nghệ*. 161 (01): 113 – 118.
- Gao, S.Y., Wang, F.Z., 2008. Research of commercialized cultivation technology on *Cordyceps militaris*. *Northern Horticulture*. 9: 212-215.
- Holliday, J.C., Cleaver, M., 2008. Medicinal Value of the Caterpillar Fungi Species of the Genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10 (3): 219–234.
- 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.
- Kobayashi, Y., 1941. The genus *Cordyceps* and its allies. *Science reports of the Tokyo Bunrika Daigaku*. 84: 53-260.
- 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, X., 2002. Manmade cultivates of *Cordyceps militaris* (L) Link. *Journal of microbiology*. 22 (6): 56-57.
- 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.
- 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.
- Ogris, N., 2013. Podatkovna zbirka gliv Slovenije *Boletus informaticus*. 57 (2): 45-52.
- Raoa, Y.K., Fangb, S.H., Wuc, W.S., Tzenga, Y.M., 2010. Constituents isolated from *Cordyceps militaris* suppress enhanced inflammatory mediator's production and human cancer cell proliferation. *Journal of Ethnopharmacology*. 131: 363–367.
- Reis, F.S., Barros, L., Calhelha, 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.
- Shrestha, B., Han, S. K., Sung, J. M., Sung, G. H., 2012. Fruiting Body Formation of *Cordyceps militaris* from Multi-Ascospore Isolates and Their Single Ascospore Progeny Strains. *Mycobiology*. 40 (2): 100-106.
- 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.
- Ting-chi Wen, Guang-rong Li, Ji-chuan Kang, Chao Kang, Kevin D. Hyde, 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. *Chiang Mai J. Sci*. 41(4): 858-872.
- 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.
- Wen, T.C., Li, G.R., Kang, J.C., Kang, C., Hyde, K.D., 2014. Optimization of Solid-state Fermentation for Fruiting Body Growth and

- Cordycepin Production by *Cordyceps militaris*. Chiang Mai Journal of Science. 41 (4): 858-872.
- 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.
- Wu, F.C., Chen, Y.L., Chang, S.M., Shih, I.L., 2013. Cultivation of medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), and production of cordycepin using the spent medium from levan fermentation. International Journal Of Medicinal Mushrooms. 15 (4): 393-405.
- Xie, C.Y., Gu, Z.X., Fan, G.J., 2009. Production of cordycepin and mycelia by submerged fermentation of *Cordyceps militaris* in mixture natural culture. Applied Biochemistry and Biotechnology. 158: 483-492.
- 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, In Press. 22: 468-476.
- Ying, J., Mao, X., Mao, Q., Zong, Y., Wen, H., 1987. Icons of Medicinal Mushroom from China, Science Press, Beijing. 151–155.
- 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.
- Zhang, X.K., Liu, W.X., 1997. Experimental studies on planting *Cordyceps militaris* (L. ex Fr.) Link with different culture materials. Edible fungi of China. 16 (2): 21-22.
- Zhang H., Wang J. W., Dong S. Z., Xu F. X., Wang S. H. (2012), “The optimization of extraction of cordycepin from fruiting body of *Cordyceps militaris* (L.) link”, In Advanced Materials Research 393, pp. 1024-1028. Trans Tech Publications.
- Zhao, C.Y., Li, H., Zhang, M., 2006. Optimization on conditions of artificial cultivation of *Cordyceps militaris*. Journal of Shenyang Agricultural University. 37: 209-212.