

## ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC, GIÁ TRỊ DƯỢC LIỆU VÀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI TRỒNG NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO *CORDYCEPS MILITARIS*

Nguyễn Thị Thanh Mai<sup>1</sup>, Trần Bảo Trâm<sup>1</sup>, Trương Thị Chiên<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hiền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phương Trang<sup>2,4</sup>, Mai Thị Đàm Linh<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viện Ứng dụng công nghệ

<sup>2</sup>Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên

<sup>4</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Nấm dược liệu từ lâu đã được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền phương Đông, trong đó nấm đông trùng hạ thảo (*Cordyceps*) được đánh giá cao do chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học (McKenna D. J., et al., 2002). Nấm dược liệu *Cordyceps* thuộc chi *Cordyceps* ký sinh trên ấu trùng thuộc chi *Thitarodes*, có tên khoa học là *Ophiocordyceps sinensis* hay *Cordyceps militaris*.

Trên thế giới đã có khoảng 200 loài *Cordyceps* được phát hiện và nghiên cứu, trong đó xác định được 36 loài có khả năng nuôi nhân tạo để thu sinh khối (Wang, 1995; Sung, 1996; Li et al., 2006). Loài được nhân nuôi phổ biến trên quy mô công nghiệp nhất hiện nay là *C. militaris* do có dược tính cao và thời gian sản xuất ngắn (Li. et al., 2006).

Trong môi trường tự nhiên *C. militaris* đòi hỏi các điều kiện sinh trưởng và vật chủ hết sức đặc biệt, do đó để duy trì việc tạo thành các hoạt chất nội, ngoại bào khi nuôi *C. militaris* trên môi trường nhân tạo cần tìm được môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Một số nghiên cứu cho thấy thành phần hóa học của nấm *C. militaris* trong tự nhiên và nuôi trên môi trường nhân tạo là tương tự nhau (Li. et al., 2006). Tuy nhiên, các nghiên cứu cũng cho thấy có sự khác biệt lớn giữa thành phần hoạt chất của các chủng *Cordyceps* khác nhau và giữa các sản phẩm *Cordyceps* tạo thành trong quá trình nuôi nhân tạo. Hiện nay, các phương pháp nhân nuôi *C. militaris* được sử dụng phổ biến là nuôi cấy trên môi trường rắn và môi trường lỏng (lên men chìm hoặc lên men bề mặt).

Đã có rất nhiều các đánh giá đã được công bố tập trung nhiều vào các đặc điểm của quá trình nuôi cấy *C. militaris* (Wu et al. 2000a, Lin et al. 2006a; Zheng và Kang 2006; Zhong et al. 2006; Đại et al., 2007; Ông et al. 2011b). Trong báo cáo này, chúng tôi cố gắng thu thập cập nhật các thông tin về đặc điểm sinh học, các thành phần hoạt chất cũng như các phương pháp nuôi cấy *C. militaris* hiện đang được sử dụng nhằm cung cấp nguồn thông tin tổng hợp hơn.

### I. NỘI DUNG

#### 1. Đặc điểm sinh học

Nấm Đông trùng hạ thảo (còn gọi là Đông trùng thảo, Trùng thảo hay Hạ thảo đông trùng) là các loài nấm ký sinh trên sâu non, nhộng hoặc sâu trưởng thành của một số loài côn trùng. Loài nấm đầu tiên các nhà khoa học Trung Quốc xác định trên vùng núi trên cao nguyên Tây Tạng thuộc chi *Cordyceps* là *C. sinensis* ký sinh vào ấu trùng của loài bướm thuộc chi *Thitarodes*. Năm 1878, các nhà khoa học phát hiện ra loài *C. militaris* cũng ký sinh trên ấu trùng của các loài côn trùng thuộc chi *Thitarodes* (Shin et al., 2007; John & Matt, 2008).

Bảng 1

Bảng phân loại của *Cordyceps militaris*

Giới	Nấm
Ngành	Ascomycoea
Ngành phụ	Ascomycotina
Lớp	Ascomycetes/Pyrenomycetes
Bộ	Hypocreales
Họ	Clavicipataceae
Giới	<i>Cordyceps</i>
Loài	<i>Cordyceps militaris</i>



Hình 1: Hình ảnh nấm *C. militaris*, *C. ophioglossoides* và *C. sinensis* (từ trái sang phải) được thu nhận ngoài tự nhiên (Nguồn: internet)

Bảng 2

Các tên gọi thông dụng của *Cordyceps*

Tên chung	Caterpillar fungus, <i>Cordyceps</i> , Caterpillar mush
Tên latin/ tên tiếng Anh	<i>Cordyceps militaris</i> , <i>Cordyceps</i> , Deer, Caterpillar
Tên Trung Quốc	Dong Chong Xia Cao, Summer grass-winter worm, Hia tsao tong tchong
Tên Nhật Bản	Tochukaso/Tochukasu, Totsu kasu
Tên Hàn Quốc	Tong ch'ug ha ch'o
Tên Nepal	Yarsagumba, Jeebanbuti, Sanjivani, Kiraghans
Các tên khác	Chong cao, Dong chong cao, Aweto

#### a. Sự phân bố của nấm Đông trùng hạ thảo trong tự nhiên

Sự phân bố của nấm Đông trùng hạ thảo hay các loài thuộc chi *Cordyceps* phụ thuộc vào nhiệt độ, độ ẩm và ánh sáng của môi trường. Chúng thường phân bố ở vùng núi có độ cao từ 2000-3000m so với mực nước biển. Dựa trên đặc điểm hình thái cũng như đặc điểm về thông tin di truyền, các loài nấm thuộc họ này bao gồm các chi chủ yếu là: *Cordyceps*, *Elaphocordyceps*, *Metacordyceps* và *Ophiocordyceps* (Sung *et al.*, 2007). Nấm Đông trùng hạ thảo dùng để sản xuất dược liệu được xác định gồm hơn 680 loài khác nhau, chỉ riêng Trung Quốc đã tìm thấy hơn 60 loài (Park *et al.*, 2001).

Trong công bố của các nhà khoa học Hàn Quốc, 25 loài nấm thuộc chi *Cordyceps* phân bố ở Hàn Quốc được mô tả đặc điểm hình thái và hình ảnh bao gồm: *C. adaesanensis*, *C. agriota*

*Kawamura, C. bifisispora, C. crassispora, C. discoideocapiata, C. formicarum, C. gemiculata, C. gracilis, C. heteropoda, C. ishikariensis, C. kyushuensis, C. martialis, C. militaris, C. nutans, C. ochraceostromata, C. ophioglossoides, C. oxycephala, C. pentatoni, C. pruinosa, C. rosea, C. scarabaeicola, C. sinensis, C. sphecocephala, C. tricentri, C. yongmoonensis* (Sung et al., 2000). Và theo một số nghiên cứu cho thấy, các loài của chi nấm *Cordyceps* còn được tìm thấy ở Thái Lan, Nhật Bản và Việt Nam (John et al., 2005; Trịnh Tam Kiệt, 2011). Như vậy, có thể thấy thành phần loài nấm Đông trùng hạ thảo khá phong phú ở trên các vùng sinh thái khác nhau và nhiều loài có phạm vi phân bố rộng, các loài có đặc điểm phân bố đặc hữu cho từng vùng.

**b. Cấu tạo hình thái của một số loài nấm thuộc chi *Cordyceps***

Trong tự nhiên, nấm *Cordyceps* để hoàn thành chu kỳ sinh trưởng của mình chúng phải trải qua nhiều giai đoạn phát triển phức tạp, từ giai đoạn sống trong đất tới sau khi lây nhiễm vào cơ thể ấu trùng, chúng chịu sự cạnh tranh với các vi khuẩn khác, thậm chí cạnh tranh với các loài trong chi *Cordyceps*.

Bảng 3

Mô tả hình thái một số loài nấm thuộc chi *Cordyceps* (Hui-juan et al., 2011)

Loài	Ấu trùng	Quả thể
<i>C. sinensis</i>	Phần cơ thể ấu trùng giống như nhộng tằm, có chiều dài từ 3-5 cm, đường kính từ 3-8 mm, màu vàng đậm tới vàng nâu	Quả thể hình trụ mảnh, 4-7 cm chiều dài và khoảng 3 mm, với đỉnh nhọn
<i>C. gunnii</i>	Phần cơ thể ấu trùng giống như nhộng tằm, dài từ 3 – 6 cm, đường kính 3 – 10 mm, vàng nâu đến nâu	Quả thể hình trụ, mập và thô, chiều dài 4-12 cm, đường kính 4 mm, với phần đầu phình ra hoặc phân nhánh ở đỉnh
<i>C. gracilis</i>	Cơ thể ấu trùng giống như một con tằm, mảnh, chiều dài 2 – 4 cm và đường kính 2 – 5 mm; màu vàng nâu, tím, nâu hoặc nâu đỏ.	Quả thể như sợi chỉ, 2-3 cm chiều dài và khoảng 2 mm đường kính, với phần phình ra ở đỉnh, có hình cầu. Quả thể bám không chắc
<i>C. barnesii</i>	Cơ thể ấu trùng cong hình thận, ngắn, 1,5-2 cm chiều dài, đầu nhỏ, với một cặp răng.	Chỉ có 1 quả thể, mảnh và cong, 2-6 cm chiều dài và khoảng 2 mm đường kính
<i>C. liangshanensis</i>	Cơ thể ấu trùng giống con tằm, dày, chiều dài 3-6 cm, đường kính 6-10 mm; Bề mặt bên ngoài với màu nâu để màng màu nâu sẫm.	Quả thể dạng sợi, phân nhánh hoặc không phân nhánh, 10-30 cm chiều dài và đường kính 1-2 mm.
<i>C. militaris</i>	Môi chất dinh dưỡng không có cơ thể ấu trùng	Quả thể có kích thước to đều từ trên xuống dưới, hơi cong, chiều dài khoảng 5 cm, màu vàng cam đến màu đỏ da cam.

**c. Vật chủ của các loài thuộc chi *Cordyceps***

Loài *C. militaris* được nghiên cứu nhiều nhất trong chi *Cordyceps* và cũng là loài có số lượng ký chủ đa dạng nhất. Khả năng thích nghi của loài này cao nên chúng được tìm thấy ở

nhiều khu hệ sinh thái trên trái đất. Ký chủ phổ biến của loài *C. Militararis* trong tự nhiên bao gồm ấu trùng và nhộng của các loài bướm, côn trùng cánh cứng (*Coleoptera*), cánh màng (*Hymenoptera*) và hai cánh (*Diptera*) như: *Ips sexdentatus*, *Lachnosterna quercina*, *Tenebrio molitor* (thuộc cánh cứng), *Cimbex similis* (thuộc cánh màng) và *Tipula paludosa* (thuộc họ hai cánh) (Bảng 4).

Trong tự nhiên có nhiều loài *Cordyceps* có hình thái tương tự hoặc gần giống loài *C. militararis*, bao gồm *C. cardinalis*, *C. Kyusyuensis* A. Kawam., *C. pseudomilitaris* Hywel-Jones & Sivichai, *C. rosea* Kobayasi & Shimizu, *C. roseostromata* Kobayasi & Shimizu, *C. washingtonensis* và một số loài khác

Bảng 4

Một số loài ký chủ của nấm *Cordyceps militararis*

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

## 2. Các phương pháp nuôi trồng nấm Đông trùng hạ thảo

### a. Nuôi cấy trên môi trường rắn

Nuôi trồng thể quả nấm Nhộng trùng thảo *Cordyceps militararis* đã được tiến hành ở nhiều nước trên thế giới như Trung Quốc, Hàn Quốc, Nhật Bản và Mỹ... Tại Trung Quốc có các trang trại lớn chuyên nuôi trồng loài nấm này ở các tỉnh: Thượng Hải, Quảng Châu, Chiết Giang, An Huy, Giang Tô.... Chỉ tính một trang trại nuôi trồng loài nấm này tại Kaiping, Quảng Châu, sản lượng một năm thu được 100.000 kg sản phẩm. Sản phẩm nấm Nhộng trùng thảo từ nuôi trồng nhân tạo đã có mặt ở nhiều nước trên thế giới kể cả các nước phương Tây và mang lại lợi nhuận cao cho các doanh nghiệp và người nuôi trồng nấm.



Hình 2: Hình ảnh nấm *C. Militararis* nuôi cấy trên môi trường rắn  
(Nguồn: Nguyễn Thị Thanh Mai)

Nuôi cấy nấm trên môi trường rắn được biết đến từ nhiều năm qua. So sánh với các phương pháp nuôi cấy khác thì phương pháp này có một số ưu điểm như: mô hình nhỏ hơn, mức độ tiêu thụ nước ít, lượng nước thải ra ít và tiêu thụ năng lượng thấp. Trong một vài năm gần đây, phương pháp nuôi cấy trên môi trường rắn đã được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất enzyme [Fenice et al., 2003; Marques de Souza et al, 2002], sản xuất nhiên liệu và sản xuất thực phẩm chức năng [Aguilar et al., 2008; Vintila et al., 2009]. Trong tự nhiên, *C. militararis* sinh trưởng trên xác côn trùng bằng cách phân hủy cơ thể côn trùng dưới các điều kiện ngoài tự

nhiên. Do đó, phương pháp nuôi cấy trên môi trường rắn đã có thể được tối ưu hóa quá trình phát triển của *C. militaris* dưới các điều kiện như: cho phép hệ sợi phát triển trên bề mặt môi trường rắn, tối ưu hóa dòng khí và các điều kiện hình thành quả thể... Hơn nữa, từ những nghiên cứu trước đã chứng minh rằng quả thể có chứa rất nhiều các hoạt chất sinh học hơn trong hệ sợi [Sung et al., 2006; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2008]. Do đó, nuôi cấy trên môi trường rắn đã nổi lên như một công nghệ nuôi cấy đầy triển vọng trong sản xuất quả thể từ *C. militaris*. Trong 20 năm trước, các nhà nghiên cứu đã có thể nuôi cấy nấm trên môi trường rắn. Việc sản xuất quả thể trong phòng thí nghiệm của nấm *C. militaris* cũng đã được nghiên cứu thành công trên môi trường gạo lứt [Choi et al., 1999; Sung et al., 2002]. Một vài nhà nghiên cứu khác cũng đã thành công trong việc nuôi trồng quả thể *C. militaris* trên nhộng tằm [Harada et al., 1995; Sato & Shimazu, 2002]. Tuy nhiên, khi nuôi cấy quả thể trên môi trường rắn cũng gặp một số vấn đề khi mở rộng ở quy mô lớn cũng như việc tách chiết các hợp chất sinh học từ quả thể của *C. militaris*.

Thêm vào đó, các điều kiện trong nuôi cấy trên môi trường rắn cũng đóng một vai trò hết sức quan trọng trong nuôi cấy hệ sợi của *C. militaris* và các sản phẩm trao đổi chất trong quá trình nuôi trồng *C. militaris*. Vì vậy, các điều kiện tối ưu hóa cho quá trình nuôi trồng *C. militaris* trên môi trường rắn nhằm tạo các hoạt chất sinh học như adenosine, cordycepin, D-manitol trong quả thể đã được nghiên cứu. Kết quả chỉ ra rằng các điều kiện nuôi cấy tối ưu để tạo ra hàm lượng adenosine cao sử dụng hạt kê là nguồn cơ chất chính. Tuy nhiên, đối với cordycepin thì các điều kiện tối ưu để tạo được nồng độ cao nhất là sử dụng nguồn C từ đậu tương [Lim et al., 2012]. Những nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy rằng ánh sáng cũng là một nhân tố qua trọng trong việc xác định mật độ, hình dáng và sắc tố của hệ sợi nấm. Tuy nhiên, dưới các điều kiện ánh sáng thì mức độ sắc tố và mật độ tế bào có ảnh hưởng qua lại lẫn nhau theo chu kỳ nuôi cấy và loại môi trường. Bán kính sinh trưởng của nấm trong điều kiện tối phát triển nhanh hơn khi được chiếu sáng.

Thành phần môi trường, các điều kiện nuôi cấy quả thể của *C. militaris* trên môi trường rắn cũng đã được nghiên cứu và tối ưu hóa [Wei et al., 2008]. Dưới các điều kiện tối ưu hóa, hàm lượng cordycepin trong môi trường đã tăng gấp đôi so với các điều kiện ban đầu. Chen et al (2011) đã điều tra tác động của ánh sáng và kim loại nặng lên sinh trưởng và phát triển của *C. militaris* trên môi trường gạo. Kết quả đã cho thấy rằng các loại gạo khác nhau cũng cho những kết quả về sinh trưởng của quả thể nấm khác nhau. Các hoạt chất sinh học và quả thể nấm đạt tốt nhất thu được khi nuôi cấy trên môi trường gạo I (bao gồm rất ít kim loại nặng) với chu kỳ chiếu sáng 12h sáng/ tối. Các kim loại nặng (Pb, Hg và Cd) đã được ghi nhận có ý nghĩa ức chế sự phát triển của quả thể. Hiện nay, mặc dù quả thể của *C. militaris* có thể được sản xuất nhiều từ phương pháp nuôi cấy trên môi trường rắn nhưng phương pháp này lại tốn nhiều thời gian. Thông thường, nó mất khoảng vài tháng để nuôi cấy tạo quả thể và rất khó để kiểm soát chất lượng của sản phẩm cuối cùng. So với phương pháp nuôi cấy trên môi trường lỏng thì sản lượng từ phương pháp nuôi cấy trên môi trường rắn là không đủ. Và như là một kết quả, phương pháp này không phù hợp để sản xuất công nghiệp ở quy mô lớn của *C. militaris*.

#### **b. Nuôi cấy trên môi trường lỏng**

Việc sản xuất các chất chuyển hóa có giá trị trong nuôi cấy *C. militaris* trên môi trường lỏng đã được nghiên cứu rộng rãi trong 20 năm trước (Hsieh et al, 2007, Kim et al, 2002b, Park et al, 2004). Nuôi cấy trên môi trường lỏng có thể tạo ra nguồn sản phẩm sinh khối cao hơn trong cùng một diện tích sử dụng và với thời gian ngắn hơn và ít nguy cơ nhiễm bẩn. Vì vậy, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để có thể duy trì được các lợi ích và tiềm năng của các cơ chất nội, ngoại bào được tạo ra từ quá trình lên men trên môi trường lỏng này (Mao & Zhong, 2006, Cui and

Zhang, 2011, Masuda et al, 2013). Nhìn chung, nuôi cấy trên môi trường lỏng được chia thành lên men chìm và lên men bề mặt. Đối với lên men chìm thì *C. militaris* được nuôi cấy trong môi trường lỏng và được thông khí, khuấy trong nồi lên men. Đối với lên men bề mặt thì *C. Militaris* được nuôi cấy trên các bình tam giác 500ml (chứa 100ml môi trường trong bình có thể tích 500ml) ở 25°C.

Nhìn chung, môi trường là yếu tố rất quan trọng quyết định sản lượng của sản phẩm thu được. Nguồn Cacbon, Nito, các ion kim loại và các chu kì lên men cũng có mối liên quan trực tiếp tới sự phát triển của tế bào và các quá trình sinh tổng hợp trao đổi chất. Ảnh hưởng của các nguồn nitơ lên sinh trưởng của tế bào và sản xuất cordycepin từ *C. militaris* bằng phương pháp lên men chìm đã được nghiên cứu (Mao & Zhong, 2006). Kết quả chỉ ra rằng peptone là nguồn nitơ tốt nhất cho sinh tổng hợp cordycepin trong phức hợp môi trường. Ngược lại,  $\text{NH}_4^+$  đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp cordycepin. Hàm lượng Cordycepin tăng lên đáng kể khi môi trường nuôi cấy được bổ sung  $\text{NH}_4^+$ . Ngoài ra, Mao et al (2005) đã phát hiện ra rằng nguồn cacbon, tỷ lệ cacbon / nitơ cũng có ảnh hưởng đến việc tạo ra cordycepin trong suốt quá trình nuôi cấy *C. militaris* bằng phương pháp lên men chìm. Gần đây, nhóm nghiên cứu này cũng đã cho thấy ảnh hưởng của việc bổ sung ferrous sulfat vào sản xuất cordycepin trong quá trình nuôi cấy *C. militaris* bằng phương pháp lên men chìm. Kết quả của họ cho thấy sản phẩm tạo ra khi sản xuất cordycepin bằng phương pháp lên men chìm có bổ sung sắt sulfat cao hơn khi không bổ sung sắt sulfat (Fan et al, 2012).



Hình 3: Hình ảnh nấm *C. militaris* nuôi cấy trên môi trường lỏng  
(Nguồn: Nguyễn Thị Thanh Mai)

Nhìn chung, các điều kiện trong nuôi cấy đóng một vai trò hết sức quan trọng trong việc hình thành các sản phẩm có chứa các hoạt chất. Mặc dù đã có rất nhiều các nghiên cứu đã cố gắng đưa ra các điều kiện tối ưu trong lên men chìm để tạo ra các sản phẩm trao đổi chất từ *C. militaris* như môi trường dinh dưỡng, các điều kiện môi trường... tuy nhiên vẫn cần có các nghiên cứu sâu hơn (Hsieh Et al, 2007; Kim et al, 2003; Park et al, 2001). Park và cs (2002a) đã điều tra ảnh hưởng của tốc độ / tỷ lệ dòng khí lên hình dáng và các sản phẩm sinh học ngoại sinh trong các bình lên men 5 l. Họ nhận thấy rằng có một điều đáng chú ý về các thông số hình thái học giữa các hạt tạo thành với các điều kiện thông khí khác nhau. Kết quả là sản lượng các polyme ngoại bào đã được thay đổi tương ứng.

Shih et al. (2010) nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình nhân nuôi *C. militaris* bằng phương pháp lên men chìm và phương pháp nuôi cấy trên môi trường rắn. Kết quả cho thấy rằng hàm lượng adenosine trong hệ sợi nấm và trong quả thể khi nuôi cấy trên môi trường rắn giảm đi khi thời gian nuôi cấy tăng lên.

Trong một vài năm gần đây, công nghệ nuôi cấy bề mặt trên môi trường lỏng được sử dụng để tăng hàm lượng Cordycepin đang được coi như một công nghệ nuôi trồng *C. militaris*. Masuda et al (2006) đã nghiên cứu các điều kiện sản xuất cordycepin trong nuôi cấy bề mặt khi dùng *C. militaris* NBRC 9787. Kết quả của họ cho thấy thể tích của môi trường ảnh hưởng đến năng suất nuôi trồng *C. militaris*. Hàm lượng cordycepin đạt cao nhất khi nuôi cấy trong môi trường nuôi đạt 640 mg/l trong điều kiện tối ưu. Tuy nhiên, họ cũng cho thấy rằng việc sản xuất cordycepin đã được tăng cường đáng kể khi bổ sung hợp chất adenine và glycine (Masuda Et al, 2007). So với phương pháp nuôi cấy bề mặt truyền thống thì nuôi cấy theo mẻ sẽ có thể làm tăng đáng kể hàm lượng cordycepin (Masuda et al, 2011). Hơn nữa, cordycepin được tạo thành khi sử dụng phương pháp nuôi cấy bề mặt trên môi trường lỏng của *C. militaris* mutant G81-3 đã tăng lên đáng kể khi bổ sung adenosine. Gần đây, cùng nhóm này cũng đã phát hiện ra rằng bổ sung nước vào bình nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy bề mặt lỏng giúp ngăn ngừa sự kết tinh cordycepin (Masuda et al, 2013). Thêm vào đó, ảnh hưởng của adenosine và Glycine được sử dụng như chất phụ gia trong nuôi cấy bề mặt lỏng dưới các điều kiện tối ưu cũng đã được nghiên cứu cho hàm lượng cordycepin cao hơn (Das et al, 2009; Das et al, 2010b). Các kết quả cho thấy rằng adenosine có ảnh hưởng tốt hơn glycine trong quá trình sản xuất cordycepin. Tuy nhiên, nồng độ cao hơn của cả adenosin và Glycine đều có ảnh hưởng tiêu cực đến sản xuất cordycepin.

### 3. Các hoạt chất sinh học và ứng dụng trong phòng và điều trị bệnh

Các hoạt chất sinh học 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 chất 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 chất CM-hs-CPS2 chứa trong dịch chiết nấm *Cordyceps militaris* có tính kháng DPPH, hoạt tính khử và tạo phức ở nồng độ (8mg/m) 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 virus cúm:** Acidic polysaccharide (APS) tách chiết từ nấm *Cordyceps militaris* nuôi 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:** protein (CMP) tách chiết từ *Cordyceps militaris* 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 quang (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 viêm phụ thuộc NF- $\kappa$ B, do đó được hi 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 enzyme 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 enzyme 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) đã được thử nghiệm về tác dụng kiểm soát lipopolysaccharide (LPS) (chịu trách nhiệm kích thích việc sản xuất nitric oxide), việc giải phóng các yếu tố hoại tử khối u  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 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-  $\alpha$  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).

## II. 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 phương pháp thường được sử dụng để nuôi trồng *Cordyceps militaris* phổ biến hiện nay là: Nuôi cấy trên môi trường rắn, nuôi cấy trên môi trường lỏng cùng với các nghiên cứu sâu về ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến việc nuôi trồng nấm *Cordyceps 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, độ ẩm, ánh sáng và dinh dưỡng nhằm có thể ổn định chất lượng sản phẩm nấm tạo thành.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Aguilar CN., Aguilera-Carbo A., Robledo A., et al.**, 2008. Production of antioxidant nutraceuticals by Solid-State cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) leaves. *Food Technol Biotech*, 46, 218–22.
2. **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
3. **Chen Ysh., Liu BL., Chang YN.**, 2011. Effects of light and heavy metals on *Cordyceps militaris* fruit body growth in rice grain-based cultivation. *Korean J Chem Eng*, 28, 875–9.
4. **Choi YS., Lee HK., Kim SH., et al.**, 1999. Production of fruiting body using cultures of entomopathogenic fungal species. *Korean J Mycol*, 27, 15–19.
5. **Cui JD., Yuan LQ.**, 2011. Optimization of culture conditions on mycelia grown in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Int J Food Eng*, 7, 1–11
6. **Das ShK., Masuda M., Hatashita M., et al.**, 2010b. Optimization of culture medium for cordycepin production using *Cordyceps militaris* mutant obtained by ion beam irradiation. *Process Biochem*, 45, 129–32.
7. **Das ShK., Masuda M., Sakurai A., Sakakibara M.**, 2009. Effects of additives on cordycepin production using a *Cordyceps militaris* mutant induced by ion beam. *African J Biotechnol*, 8, 3041–7
8. **Fan DD., Wang W., Zhong JJ.**, 2012. Enhancement of cordycepin production in submerged cultures of *Cordyceps militaris* by addition of ferrous sulfate. *Biochem Eng J*, 60, 30–5.



9. **Fenice M., Giovannozzi SG., Federici F., D'Annibale A.,** 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *J Biotechnol*, 100, 77–85.
10. **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 *Cordycepsmilitaris*. *African Journal of MicrobiologyResearch*. 5(18): 2743-2751
11. **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
12. **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. *Trans Mycol Soc Jpn*, 36, 67–72
13. **Hui-juan L., Hao-bin H., Chu C., Qin L., Ping L.,** 2011. Morphological and Microscopic identification studies of *Cordyceps* and its counterfeits. *Acta Pharmaceutica Sinica B*
14. **Hsieh Ch., Tsai KL., Shih IL.,** 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochem Eng J*, 33, 193–201
15. **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
16. **John H, Malt C.,** 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). *International Journal Medicinal Mushroom* 10(3): 219-234
17. **John H., Matt C., Aloha M Inc, SantaCruz, California, U.S.A.,** 2005. *Cordyceps*. Wasser SP Institute of Evolution, University of Haifa, Mt.Carmel, Haifa, Israel
18. **Kim SW., Hwang HJ, Xu CP, et al.,** 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *J Appl Microbiol*, 94, 120–6.
19. **Kim SW., Hwang HJ., Park JP., et al.,** 2002b. Mycelial growth and exopolymer production by submerged culture of various edible mushroom under different media. *Lett Appl Microbiol*, 34, 56–61.
20. **Li C. R., Nam S. H., Geng D. G.,** 2006. Artificial culture of seventeen *Cordyceps* spp. *Mycosystema*. 25:639–645
21. **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). *Int J Med Mushrooms*, 14, 181–7.
22. **Mao XB., Zhong JJ.,** 2006. Significant effect of NH<sub>4</sub> on cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 38, 343–50.
23. **Mao XB., Eksriwong T., Chauvatcharin S., Zhong JJ.,** 2005. Optimization of carbon source/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *cordyceps militaris*. *Process Biochem*, 40, 1667–72

24. **Marques de Souza CG., Zilly A., Peralta RM.,** 2002. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *J Basic Microb*, 42, 83–90.
25. **Mc Kenna D. J., Jones K., Hughes K.,** 2002. *Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements*, 2nd edn. Haworth
26. **Masuda M., Das SK., Hatashita M., et al.,** 2013. Efficient production of cordycepin the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use. *Process Biochem*, 49, 181–187
27. **Masuda M., Das SK., Fujihara S., et al.,** 2011. Production of cordycepin by a repeated batch culture of a *Cordyceps militaris* mutant obtained by proton beam irradiation. *J Biosci Bioeng*, 111, 55–60
28. **Masuda M., Urabe E., Honda H., et al.,** 2007. Enhanced production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 40, 1199–205
29. **Masuda M., Urabe E., Sakurai A., Sakakibara M.,** 2006. Production of cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*. *Enzyme Microbial Technol*, 39, 641–6
30. **Park JP., Kim SW., Hwang HJ., Yun JW.,** 2004. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exobiopolymer. *Process Biochem*, 39, 2241–7.
31. **Park JP., Kim SW., Hwang HJ., Yun JW.,** 2001. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exobiopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Lett Appl Microbiol*, 32, 1–6.
32. **Park JP., Kim YM., Kim SW., et al.,** 2002a. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochem*, 37, 1257–62.
33. **Sato H., Shimazu M.,** 2002. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Appl Entomol Zoo*, 37, 85–92
34. **Seulmee S., Sungwon L., Jeonghak K., Sunhee M., Seungjeong L., Chong-Kil L., Kyunghae C., Nam-Joo H., Kyungjae K.,** 2009. Cordycepin uppresses Expression of Diabetes Regulating Genes by Inhibition of Lipopolysaccharide-induced Inflammation in Macrophages. *Immune Network*. 9(3):98-105.
35. **Shih I, Chang S, Chen Y.,** 2010. Cultivation of *Cordyceps militaris* in solid and liquid culture. *J Am Diet Assoc*, 110 (supplement), A51.
36. **Shih IL., Tsai KL., Hsieh C.,** 2007. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactivemetabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal* 33: 193–201
37. **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
38. **Sung GH., Nigel L., Jones H., Sung JM., Luangsa-ard JJ., Shrestha B. and Spatafora JW.,** 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59
39. **Sung J. M., Park YJ., Han SK., et al.,** 2006. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. *Mycobiology*, 34, 131–7.
40. **Sung J. M.,** 1996. *The insects-born fungus of Korea in color*. Kyohak Publishing Co. Ltd., Seoul

41. **Sung J. M., Choi YS., Shrestha B., Park YJ.,** 2002. Investigation on artificial fruiting of *Cordyceps militaris*. *Korean J Mycol*, 30, 6–10.
42. **Sung J. M.,** 2000. Insect-born fungus of Korea, Kangwon National Univ., Korea
43. **Vintila T., Dragomirescu M., Jurcoane S., et al.,** 2009. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. *Roman Biotechnol Lett*, 14, 4275–81
44. **Wang G. D.,** 1995. Ecology, cultivation and application of *Cordyceps* and *Cordyceps sinensis*. Scientific and Technical Documents, Beijing
45. **Wang X. L., Yao Y. J.,** 2011. Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review. *ZooKeys*. 127:43–59
46. **Wei HP., Ye XL., Zhang HY., et al.,** 2008. Investigations on cordycepin production by solid culture of *Cordyceps militaris*, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 33, 2159–69.
47. **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.
48. **WuW., Gao XH., Cui XM., et al.,** 2000. Review on studies and applications of *Cordyceps militaris*. *Acta Agric Shanghai*, 16 (Suppl), 99–104.
49. **Yang FC., Hsieh C., Chen HM.,** 2003. Use of stillage grain from a ricespirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem*, 39: 21–6.
50. **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
51. **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
52. **Zhang Z., Lei Z., Lu Y., et al.,** 2008. Chemical composition and bioactivity changes in stale rice after fermentation with *Cordyceps sinensis*. *J Biosci Bioeng*, 106, 188–93.

## BIOLOGICAL CHARACTERISTICS, MEDICINAL VALUES AND METHODS OF CULTIVATION OF *CORDYCEPS MILITARIS*

**Nguyen Thi Thanh Mai, Tran Bao Tram, Truong Thi Chien,  
Nguyen Thi Hien, Nguyen Thi Phuong Trang, Mai Thị Đàm Linh**

### SUMMARY

*Cordyceps militaris* is an entomopathogenic fungus and is known a potential harbour of biometabolites for herbal drugs and is receiving a great deal of interest from scientists. Today, *Cordyceps militaris* is used in traditional medicine and used as functional foods. Amongst all the species, *C. militaris* is considered as the oldest source of some useful chemical constituent. Much knowledge has been gathered with regard to the *C. militaris*'s importance in the genetic resources, nutritional and environmental requirements, mating behavior and biochemical pharmacological properties. This fungus has many reviews, but few have focused on its biotechnological production of bioactive constituents. This review focuses on the recent advances in the biological characteristics and medicinal values and methods of cultivation of *C. militaris*.