

Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến sự sinh trưởng của nấm Đông trùng hạ thảo trong môi trường nhân giống dịch thể

Trần Thu Hà*, Lê Văn Vẽ, Nguyễn Nam Giang
Phạm Thị Thu, Nguyễn Duy Trình

Viện Di truyền nông nghiệp

Ngày nhận bài 9/3/2016, ngày chuyên phản biện 11/3/2016, ngày nhận phản biện 22/3/2016, ngày chấp nhận đăng 20/6/2016

Nấm Đông trùng hạ thảo - ĐTHT (*Cordyceps militaris*) là một trong những loại nấm dược liệu quan trọng nhất do có chứa nhiều hoạt chất quý như cordycepine, adenosine, ergoterol và mannito. Trong bài viết này, các tác giả tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của pH, nguồn carbon, nitrogen và chế độ lắc tới sinh khối hệ sợi, mật độ và đường kính thể lạc cầu (TLC) của nấm ĐTHT. Kết quả cho thấy, trong môi trường dịch thể, pH tốt nhất cho sinh trưởng của giống nấm ĐTHT là 6. Đường sucrose và glucose là nguồn carbon tối ưu cho sự phát triển của nấm ĐTHT. Nguồn dinh dưỡng nitrogen từ nhộng tằm được đánh giá là tốt nhất, tốc độ lắc 160 vòng/phút phù hợp cho sự phát triển của giống ĐTHT.

Từ khóa: dịch thể, đông trùng hạ thảo.

Chỉ số phân loại 4.1

The effects of culture conditions on growth of *Cordyceps militaris* L. ex Fr. in submerged liquid medium

Summary

Cordyceps Militaris, one of the most important medicinal mushrooms, contains many kinds of active components, such as cordycepine, adenosine, ergoterol and mannito. This study considers the influences of pH, carbon and nitrogen sources on the yield of mycelia, density and diameter of Cordyceps Militaris. The results demonstrate that in the liquid medium, the optimal pH value for growth of mycelia is 6. Glucose and sucrose are optimum carbon sources for Coryceps Militaris; the best nitrogen source comes from Silkworm; and the most suitable shaking speed for the growth of Cordyceps Militaris is 160 rpm.

Keywords: *Cordyceps militaris*, liquid culture.

Classification number 4.1

Đặt vấn đề

Trên thế giới, có khoảng 200 loài *Cordyceps* đã được phát hiện và nghiên cứu, trong đó xác định được 36 loài có khả năng nhân nuôi trong môi trường nhân tạo để thu sinh khối. Hai loài nhân nuôi phổ biến nhất hiện nay là *C. militaris* và *C. sinensis*, trong đó chỉ có loài *C. militaris* có thể nuôi trồng nhân tạo với quy mô công nghiệp.

Nuôi trồng nấm ĐTHT sử dụng công nghệ nhân giống dạng dịch thể mang lại hiệu quả cao, rút ngắn được thời gian, giảm tỷ lệ nhiễm và thích hợp cho nuôi trồng với quy mô lớn. Nhiều nghiên cứu trên thế giới về thành phần dinh dưỡng, các yếu tố ngoại cảnh thích hợp cho nhân giống nấm ĐTHT dạng dịch thể đã được công bố. Các kết quả cho thấy, quá trình sinh tổng hợp các hợp chất polysaccharide ngoại bào của nấm ĐTHT diễn ra tốt nhất trên môi trường bổ sung đường sucrose 0,95 g/l. Nitrogen hữu cơ được xác định là nguồn dinh dưỡng phù hợp hơn so với nitrogen vô cơ, trong đó cao nấm men là dinh dưỡng tối ưu nhất [1-3]. Tỷ lệ C/N tối ưu cho phát triển hệ sợi và tổng hợp polysaccharide ngoại bào của nấm ĐTHT là 2/1 khi sử dụng glucose làm nguồn cung cấp carbon [2] hoặc 42 g glucose/l với 15,8 g peptone/l [4]. Các vitamin có vai trò tăng tốc độ của các phản ứng sinh hóa khi được bổ sung vào môi trường dịch thể nuôi nấm ĐTHT [5]. Nhiệt độ 25°C, pH = 6 và lắc giống với tốc độ 200 vòng/phút là thích hợp để nuôi cấy thu sinh khối sợi nấm ĐTHT [6-8].

Ở nước ta, nấm ĐTHT vẫn là một đối tượng nghiên cứu

*Tác giả liên hệ: Email: tranthuhapt@gmail.com

mới. Các nghiên cứu của Phạm Quang Thu (2009), Hoàng Tiến Công (2010) và Trần Văn Tú (2011) [9-11] bước đầu đã xác định được thành phần môi trường nhân giống (PDA + 10% nhộng tằm), nhiệt độ không khí (25°C), pH = 5-6 là thích hợp đối với chủng giống nấm ĐTHT. Tuy nhiên, các nghiên cứu này mới chỉ dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm, chưa có nhiều công trình được đầu tư một cách bài bản và chủ yếu sử dụng công nghệ nhân giống truyền thống trên môi trường aga (dạng rắn). Với mục tiêu phục vụ công tác nghiên cứu, phát triển công nghệ nuôi trồng nấm ĐTHT, đồng thời khai thác được những ưu điểm của giống dạng dịch thể, chúng tôi đã nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến quá trình nhân giống nấm ĐTHT dịch thể nhằm xác định được điều kiện nhân giống tối ưu nhất cho chủng giống nấm ĐTHT mới nhập nội ở Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Giống nấm ĐTHT được nhập từ Trung Quốc đang được lưu giữ và bảo quản ở 4°C trên môi trường PGA cải tiến (200 g/l khoai tây, 20 g/l glucose, 20 g/l agar + 0,1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + 0,1 g/l KH_2PO_4) tại Trung tâm Nghiên cứu và phát triển nấm - Viện Di truyền nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể: môi trường YMK - Yeast Magnesium Potassium (20 g/l glucose, 5 g/l cao nấm men, 1 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g/l KH_2PO_4) [7] được sử dụng để làm môi trường nhân giống (thí nghiệm 1). Đánh giá sự sinh trưởng hệ sợi giống nấm ĐTHT tại các ngưỡng pH môi trường là 4, 5, 6, 7 và 8. Các hóa chất NaOH 1M và HCl 1M được sử dụng để điều chỉnh pH môi trường.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng carbon đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể: môi trường nhân giống dịch thể nấm ĐTHT gồm nguồn carbon 20 g/l, cao nấm men 5 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,0 g/l và KH_2PO_4 2 g/l (thí nghiệm 2). Các nguồn dinh dưỡng carbon được sử dụng là fructose, sucrose, lactose, maltose và glucose trong môi trường pH tối ưu của thí nghiệm 1.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng

nitrogen đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể: các nguồn nitrogen được khảo sát gồm cao nấm men, peptone, tryptone, nhộng tằm, $NaNO_3$, NH_4NO_3 với nồng độ 5 g/l (thí nghiệm 3). Nguồn carbon, pH môi trường dựa trên kết quả của thí nghiệm 1 và 2.

Trong 3 thí nghiệm trên, nhiệt độ nhân giống được thực hiện ở 25°C, tốc độ lắc 150 vòng/phút, thời gian nhân giống 168 h.

Nghiên cứu ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể: giống nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể được lắc với các tốc độ khác nhau (100, 130, 160, 190, 220 và 250 vòng/phút) để khảo sát sự ảnh hưởng của tốc độ lắc tới sự sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT. Các yếu tố phi thí nghiệm được kế thừa từ kết quả của các thí nghiệm trước.

Chỉ tiêu theo dõi: TLC, trong quá trình nuôi giống nấm trong môi trường dịch thể, ban đầu hình thành các mảnh sợi nấm nhỏ li ti, sau đó sợi nấm lớn lên, liên kết lại với nhau tạo thành viên hình cầu có kích thước khác nhau, các thể hình cầu này được gọi là TLC (hay pellets).

Mật độ TLC: là số lượng TLC có trong 10 ml dịch giống. Sử dụng kính hiển vi Optika có kết nối với máy tính để đếm số lượng TLC (đơn vị tính là TLC/10 ml dịch giống).

Kích thước TLC: sử dụng kính hiển vi Optika để đo đường kính thể lác cầu (đơn vị tính là mm).

Sinh khối sợi: đánh giá sinh khối được thực hiện theo phương pháp của Park và cs (2001) [1]. Mẫu được ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 15 phút, lọc bằng màng milipore 0,45 μm . Mẫu được rửa 4 lần với ethanol bão hòa, bảo quản qua đêm ở 4°C. Khối lượng sợi khô được xác định sau khi lọc sợi, rửa với nước cất và sấy ở 70°C qua đêm đến khối lượng không đổi.

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu được thu thập, phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và phần mềm thống kê IRRISTAT 5.0.

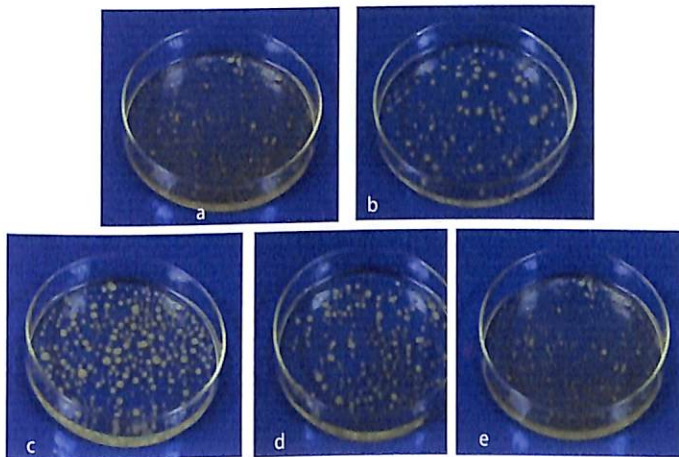
Kết quả nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Nghiên cứu sự sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể ở 5 giá trị pH khác nhau. Kết quả cho thấy, tại giá trị pH = 6, hệ sợi nấm ĐTHT sinh trưởng khỏe nhất, cho sinh khối sợi nấm và mật độ TLC cao nhất, lần lượt là 10,56 g/l và 54,70 TLC/10 ml dịch giống. Trong môi trường có tính acid hay bazơ, khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm ĐTHT giảm, sinh khối sợi đều thấp hơn. Cụ thể, tại giá trị pH = 4, 5, 7 và 8 sinh khối sợi tương ứng lần lượt là 4,13; 4,86; 7,93 và 4,93 g/l (bảng 1).

Bảng 1: ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

pH môi trường ban đầu	Mật độ TLC (TLC/10 ml)	Đường kính TLC (mm)	Sinh khối sợi (g/l)
4	20,40	1,0	4,13
5	37,70	1,8	4,86
6	54,70	2,0	10,56
7	40,03	1,9	7,93
8	25,10	1,0	4,93
LSD _{0,05}	1,54	0,1	0,57
CV%	2,3	3,7	4,6



Hình 1: ảnh hưởng của pH môi trường đến hình thái và mật độ TLC nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể
a) pH = 4 b) pH = 5 c) pH = 6 d) pH = 7 e) pH = 8

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng carbon tới sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Sử dụng 5 loại đường làm nguồn cung cấp dinh dưỡng carbon chính cho nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể (fructose, sucrose, maltose, lactose và glucose). Kết quả nghiên cứu cho thấy, đường sucrose cho kết quả lên men cao nhất, đạt 10,82 g/l sinh khối sợi (mật độ là 62,4 TLC/10 ml), tiếp đến là đường glucose,

đạt 10,81 g/l sinh khối sợi (mật độ là 65,8 TLC/10 ml) và thấp nhất là đường lactose, có sinh khối sợi đạt 8,54 g/l (mật độ là 31,0 TLC/10 ml) (bảng 2).

Bảng 2: ảnh hưởng của nguồn carbon tới sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

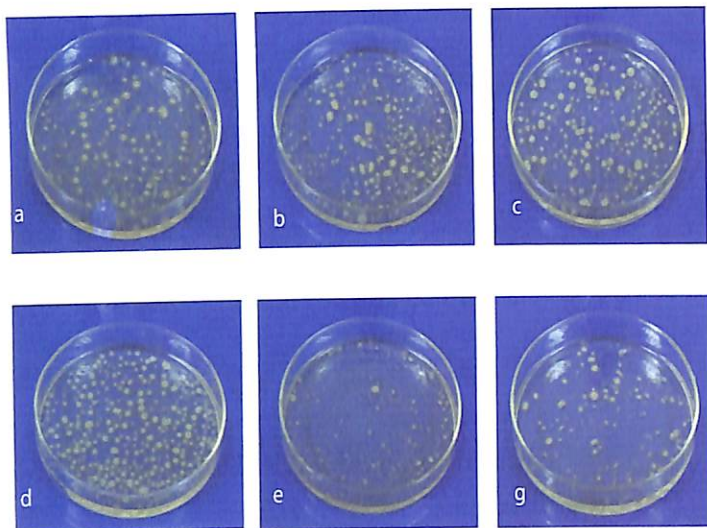
Nguồn carbon (20 g/l)	Mật độ TLC (TLC/10 ml)	Đường kính TLC (mm)	Sinh khối sợi (g/l)
Fructose	58,4	1,9	10,19
Sucrose	62,4	2,0	10,82
Maltose	50,0	2,0	9,98
Lactose	31,0	2,2	8,54
Glucose	65,8	1,9	10,81
LSD _{0,05}	2,78	0,84	0,6
CV%	2,8	2,2	3,2

Ảnh hưởng của dinh dưỡng nitrogen tới sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Với 6 nguồn dinh dưỡng carbon khảo sát, kết quả nghiên cứu cho thấy, dinh dưỡng dịch chiết nhộng tằm cho hiệu quả sinh trưởng hệ sợi nấm cao nhất với sinh khối sợi nấm đạt 12,36 g/l, số lượng TLC/10 ml dịch giống là 69,1. Ở các nguồn dinh dưỡng khác: cao nấm men, peptone, tryptone, NaNO₃, NH₄NO₃, sinh khối sợi nấm thu được lần lượt là: 10,85; 10,81; 10,69; 5,14 và 5,20 g/l. Tương ứng với mật độ TLC/10 ml dung dịch giống lần lượt là 65,7; 63,7; 62,9; 39,4 và 39,9 (bảng 3, hình 2).

Bảng 3: ảnh hưởng dinh dưỡng nitrogen tới sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Nguồn nitrogen (5 g/l)	Mật độ TLC (TLC/10 ml)	Đường kính TLC (mm)	Sinh khối sợi (g/l)
Cao nấm men	65,7	2,1	10,85
Peptone	63,7	2,0	10,81
Tryptone	62,9	2,2	10,69
Nhộng tằm	69,1	2,0	12,36
NaNO ₃	39,4	1,0	5,14
NH ₄ NO ₃	39,9	1,8	5,20
LSD _{0,05}	2,15	0,12	0,66
CV%	2,1	3,8	4,1



Hình 2: ảnh hưởng của nguồn dinh dưỡng nitrogen đến hình thái, mật độ TLC nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

- a) Cao nấm men b) Peptone c) Tryptone
 d) Dịch chiết nhộng tằm e) NaNO₃ g) NH₄NO₃

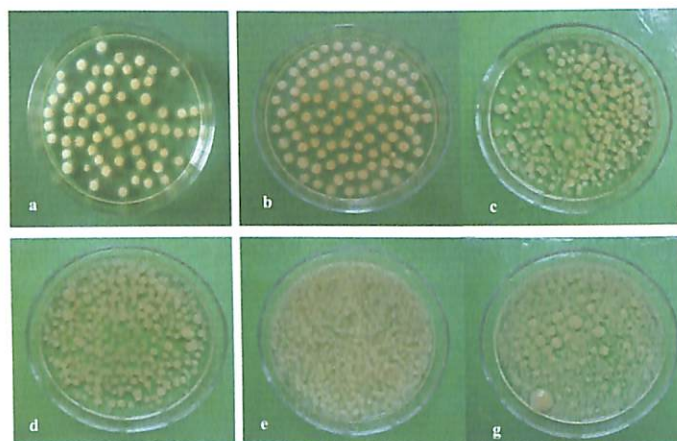
Ảnh hưởng của tốc độ lắc tới sự sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Tiến hành lắc giống với 6 chế độ lắc khác nhau, dựa trên kết quả mô tả hình thái của hệ sợi nấm về số lượng, đường kính, hình dạng TLC cũng như sinh khối sợi nấm để xác định tốc độ lắc phù hợp cho việc sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường nhân giống dịch thể.

Kết quả bảng 4 cho thấy, tốc độ lắc có ảnh hưởng rõ rệt đến mật độ TLC và sinh khối sợi nấm. Mật độ TLC tăng dần khi tốc độ lắc tăng dần (hình 3). Ở tốc độ lắc 100 vòng/phút thì mật độ TLC là 43,4 TLC/10 ml, khi tăng tốc độ lắc lên 220 vòng/phút thì mật độ TLC tăng lên 80,6 TLC/10 ml dịch giống. Và nếu tiếp tục tăng tốc độ lắc lên 250 vòng/phút thì mật độ TLC thay đổi không có sự sai khác. Đường kính TLC cũng có sự biến động lớn, ở tốc độ lắc 100 vòng/phút đường kính TLC là lớn nhất (3,06 mm), giá trị này giảm dần và đạt thấp nhất tại tốc độ lắc 250 vòng/phút (0,67 mm). Về sinh khối sợi, hệ sợi nấm lên men và đạt sinh khối cao nhất tại tốc độ lắc 160 vòng/phút. Ở các tốc độ khác, sinh khối sợi đều có giá trị thấp hơn.

Bảng 4: ảnh hưởng của cường độ lắc tới sinh trưởng, phát triển hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

Vòng/phút	Mật độ TLC (TLC/10 ml)	Đường kính TLC (mm)	Sinh khối sợi (g/l)
100	43,4	3,06	8,61
130	53,0	2,38	10,80
160	65,8	1,94	12,42
190	75,1	1,12	10,25
220	80,6	0,83	9,12
250	80,1	0,67	8,99
LSD _{0,05}	2,52	0,15	0,70
CV%	2,1	4,8	3,8



Hình 3: ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể

- a) 100 vòng/phút b) 130 vòng/phút c) 160 vòng/phút
 d) 190 vòng/phút e) 220 vòng/phút g) 250 vòng/phút

Thảo luận

Sự sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể được mô tả bằng khả năng hình thành các TLC, kích thước của các TLC và sinh khối sợi nấm thu được. Trong đó, sinh khối sợi là tiêu chí quan trọng nhất để đánh giá khả năng sinh trưởng của hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể. Sinh khối sợi là tiêu chuẩn để lựa chọn giống nấm dịch thể có chất lượng tốt, đảm bảo sức sinh trưởng và phát triển của nấm ĐTHT trên cơ chất nuôi trồng.

Sự sinh trưởng và phát triển của nấm ĐTHT trong môi trường nhân giống dịch thể chịu ảnh hưởng của tất cả các yếu tố như thành phần dinh dưỡng, pH của môi trường và tốc độ lắc trong quá trình nuôi giống.

Độ pH môi trường nhân giống có ảnh hưởng đến

chức năng của màng tế bào, hình thái và cấu trúc tế bào, độ hòa tan của các muối, các ion, sự hấp thụ các chất dinh dưỡng và quá trình sinh tổng hợp các chất khác nhau. Các tế bào chỉ có thể phát triển trong một phạm vi pH nhất định và sự hình thành chuyển hóa các chất cũng chịu ảnh hưởng của giá trị pH [12]. Kim và cs (2003) [13] đã báo cáo rằng, nồng độ các hợp chất polysaccharide ngoại bào và sinh khối sợi nấm đạt giá trị cao nhất tại pH = 6 và sẽ giảm dần khi giảm pH xuống 3,0 hay tăng dần pH lên 9,0.

Nhu cầu dinh dưỡng cho sinh tổng hợp các chất tạo sinh khối sợi phụ thuộc vào mỗi loại nấm và điều kiện nuôi cấy. Nguồn dinh dưỡng carbon khác nhau có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng phân giải và hấp thụ dinh dưỡng của tế bào. Glucose và sucrose là 2 nguồn carbon mang lại hiệu quả sinh tổng hợp các hợp chất polysaccharide và tạo sinh khối sợi cao nhất đối với nấm ĐTHT. Nguồn carbon hữu cơ (cám ngô) cũng được các tác giả nghiên cứu và so sánh. Kết quả cho thấy, chỉ cần sử dụng 10 g/l cám ngô sinh khối sợi nấm và quá trình tổng hợp các chất đạt giá trị lớn nhất và cao hơn so với nguồn dinh dưỡng sucrose [1].

Nguồn dinh dưỡng nitrogen được sử dụng cho sự tăng trưởng hệ sợi nấm là amoniac, muối amoni, axit amin và nitrogen hữu cơ phức tạp [14]. Nitrogen hữu cơ được sử dụng rộng rãi nhất cho hầu hết các loại nấm và cho hiệu quả sinh trưởng của hệ sợi nấm trong môi trường dịch thể cao hơn nguồn vô cơ. Shil và cs (2007), Vladimir (2012) [3, 15] khẳng định nitrogen hữu cơ phù hợp cho sinh trưởng hệ sợi, tổng hợp và chuyển hóa các chất đối với giống nấm ĐTHT CCRC 32219. Masuda (2006) [2] cũng chứng minh peptone và cao nấm men là 2 nguồn dinh dưỡng thích hợp cho nấm ĐTHT tổng hợp cordycepine.

Ngoài dinh dưỡng, điều kiện nuôi cấy cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể. Nhiều nghiên cứu cho thấy, tốc độ lắc là cơ sở duy nhất để cung cấp oxy hòa tan cho quá trình sống của sợi nấm trong môi trường dịch lỏng, ảnh hưởng đến khả năng cuộn xoắn của hệ sợi nấm và ảnh hưởng trực tiếp đến hình thái kích thước TLC cũng như sinh khối sợi nấm thu được [7].

Trong nghiên cứu này, giá trị pH tối ưu cho nhân giống nấm ĐTHT là 6. Ở các giá trị pH = 3, 4, 5, 7 và 8, hệ sợi nấm vẫn có khả năng sinh trưởng và tạo sinh khối, tuy nhiên sự tăng trưởng này không đảm bảo mật

độ sợi trên 1 đơn vị thể tích giống.

Nguồn dinh dưỡng carbon phù hợp cho sự sinh trưởng hệ sợi nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể là glucose và sucrose. Hai loại đường này cho hiệu quả nhân giống không khác nhau ở mức ý nghĩa 0,05. Tuy nhiên, xem xét về mặt hiệu quả kinh tế trong nghiên cứu, chúng tôi lựa chọn nguồn đường sucrose là nguồn dinh dưỡng chính cho nhân giống nấm ĐTHT dạng dịch thể. Kết quả này phù hợp với công bố của Kim và cs (2003) [13].

Dinh dưỡng nitrogen hữu cơ từ dịch chiết nhộng tằm được xác định là phương án tối ưu nhất mang lại sinh khối sợi nấm lớn nhất và cho thấy sự khác biệt rõ rệt với các nguồn dinh dưỡng khác. Tốc độ lắc giống 160 vòng/phút cho kết quả về mật độ TLC và sinh khối sợi tối ưu. Ở 100 vòng/phút, tốc độ lắc thấp tạo nên sự suy giảm oxy trong lõi của các TLC, gây ra sự tự phân (autolytic) nhanh hơn hình thành nên các sợi nấm và đám sợi do hệ sợi nấm tụ lại. Hơn nữa, ở tốc độ lắc này sự phân cắt hệ sợi nấm do lực cơ học và độ liên kết giữa các sợi nấm cũng giảm nên đường kính của các TLC được hình thành do sự cuộn xoắn của hệ sợi nấm trong môi trường dịch giảm đi. Khi tốc độ lắc cao (220 vòng/phút, 250 vòng/phút), tác động lực cơ học lớn gây đứt, gãy, tổn thương sợi nấm, sinh trưởng sợi nấm giảm, sinh khối sợi giảm [1].

Kết luận

- pH thích hợp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của giống nấm ĐTHT dạng dịch thể là 6,0.
- Sucrose là nguồn cung cấp dinh dưỡng carbon tốt nhất và thích hợp nhất cho nhân giống nấm ĐTHT dịch thể.
- Nguồn cung cấp nitrogen thích hợp cho sự phát triển của hệ sợi nấm ĐTHT là nhộng tằm.
- Tốc độ lắc phù hợp để nuôi cấy nấm ĐTHT trong môi trường dịch thể là 160 vòng/phút.

Tài liệu tham khảo

- [1] J.P. Park, S. Kim, H.J. Hwang, J.W. Yun (2001), "Optimization of submerged culture conditions for the mycelia growth and exopolymers production by *Cordyceps militaris*", *The Society for Applied Microbiology. Letters in Applied Microbiology*, **33**, pp.76-81.
- [2] M. Masuda (2006), "Production of Cordycepin by surface culture using the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, pp.641-646.

- [3] I.L. Shih, K.L. Tsai, C. Hsieh (2007), "Effects of culture conditions on the mycelia growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*", *Biochemical engineering journal*, **33**(3), pp.193-201.
- [4] X.B. Mao, T. Eksriwong, S. Chauvatcharin, J.J. Zhong (2005), "Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Process Biochemistry*, **40**, pp.1667-1672.
- [5] C.H. Dong, Y.J. Yao (2005), "Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture", *Journal of Applied Microbiology*, **99**(3), pp.483-492.
- [6] L.T. Hung, S. Keawsompong, V.T. Hanh, S. Sivichai, N.L. Hywel (2009), "Effect of temperature on Cordycepin production in *Cordyceps militaris*", *Thai Journal of Agricultural Science*, **42**(4), pp.219-225.
- [7] J.S. Kwon, J.S. Lee, W.C. Shin, K.E. Lee, E.K. Hong (2009), "Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with *Cordyceps militaris* in liquid culture", *Biotechno, Bioprocess Eng*, **14**, pp.756-762.
- [8] B. Shrestha, W. Zhang, Y. Zhang, X.H. Liu (2012), "The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development", *Mycology Progress*, **11**(3), pp.599-614.
- [9] Phạm Quang Thu, Lê Thị Xuân, Nguyễn Mạnh Hà (2009), "Nghiên cứu đặc điểm sinh học hệ sợi trong môi trường nuôi cấy thuần khiết các chủng nấm ĐHTT *Cordyceps militaris* (L.:Fr)", <http://vafs.gov.vn>.
- [10] Hoàng Tiến Công (2010), *Nghiên cứu thành phần loài nấm ĐHTT tại khu bảo tồn thiên nhiên Tây Yên Tử, huyện Sơn Động, tỉnh Bắc Giang*, luận văn thạc sỹ, Đại học Thái Nguyên.
- [11] Trần Văn Tú (2011), *Nghiên cứu thành phần loài nấm ĐHTT tại Vườn Quốc gia Hoàng Liên - Lào Cai*, luận văn thạc sỹ, Đại học Thái Nguyên.
- [12] Q.H. Fang, J.J. Zhong (2002), "Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*", *Process Biochemistry*, **37**, pp.769-774.
- [13] S.W. Kim, H.J. Hwang, C.P. Xu, J.M. Sung, J.W. Choi, J.W. Yun, (2003), "Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738", *Journal of Applied Microbiology*, **94**(1), pp.120-126.
- [14] A. Suzuki (2002), "Fungal succession at different scales", *Fungal Succession* (eds. K.D. Hyde and E.B.G. Jones), *Fungal Diversity*, **10**, pp.11-20.
- [15] E. Vladimir (2012), "Submerged Cultivation of Medicinal Mushrooms: Bioprocesses and Products", *International Journal of Medicinal Mushrooms*, **14**(3), pp.211-239.