

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH CHỐNG OXY HÓA CỦA NẤM ĐÔNG TRÙNG HẠ THẢO (*Cordyceps militaris*) TRÊN CÁC MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY BỔ SUNG NGUỒN NITƠ VÀ CARBON

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE FUNGUS *Cordyceps militaris* GROWN ON MEDIUMS ADDITIONAL NITROGEN AND CARBON SOURCES

NGUYỄN TRÍ YẾN CHI^a, NGUYỄN VIỆT KHOA, ĐỖ CHÁNH DƯƠNG
Khoa Khoa học Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long
^aTác giả liên hệ: chinty@vlute.edu.vn

Nhận bài (Received): 13/4/2024; Phản biện (Reviewed): 06/5/2024; Chấp nhận (Accepted): 15/7/2024

TÓM TẮT

Nấm Đông trùng hạ thảo (*Cordyceps militaris*) là 1 loại nấm dược liệu có các đặc tính chống oxy hóa, có tác dụng chống ung thư, bảo vệ gan và chống viêm, bảo vệ thận và chống nhiễm trùng. Nghiên cứu môi trường rắn làm tăng hàm lượng dược liệu của loài nấm này được thực hiện trên 9 môi trường nuôi trồng. Mỗi môi trường chứa nguồn carbon (glucose, fructose) và nitơ (nhộng tằm khô, cao nấm men, peptone) khác nhau. Hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết được xác định bằng hàm lượng polysaccharide và tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Nghiên cứu cho thấy hàm lượng polysaccharide và tỷ lệ bắt gốc tự do của nấm *C. militaris* lần lượt là 73,24 g/mL và 82,74%. Môi trường thích hợp để nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo cho hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất trong thí nghiệm là 0,1g/L KH_2PO_4 ; 0,1g/L MgSO_4 ; 0,3g/L Vitamin B1, 20g/L glucose và 20g/L cao nấm men.

Từ khóa: *Cordyceps militaris*, DPPH, polysaccharide, nguồn carbon, nguồn nitrogen

ABSTRACT

Cordyceps militaris, a species of the genus *Ascomycetes*, is a medicinal mushroom with antioxidant properties, antitumour effects, hepatoprotective and anti-inflammatory effects, nephroprotective and antiapoptotic properties. Study of artificial media for increasing pharmaceutical values of the fungus was carried out on nine mediums. Each medium contained different types of carbon sources (sucrose, glucose, fructose) and nitrogen sources (dried silkworm pupae, yeast extract and peptone). The antioxidant activity of the extracts was determined by the polysaccharide content and free radical scavenging ratio DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay. The results show that, the maximal *C. militaris* polysaccharide content and free radical scavenging ratio were 73,24 g/mL and 82,74%, respectively. This study provides a new strategy for the production of healthy food from traditional food. The optimal medium for the maximal polysaccharide production and antioxidant activities in this study consisted of (g/L): rice 50; KH_2PO_4 0,1; MgSO_4 0,1 ; Vitamin B1 0,3; glucose 20 and yeast extract 20.

Keywords: *Cordyceps militaris*, DPPH, polysaccharide, carbon sources, nitrogen sources

1. GIỚI THIỆU

Nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* được biết đến là một trong những loại nấm được liệu truyền thống của Trung Quốc và đã được sử dụng rộng rãi qua nhiều thế kỷ. Trong điều kiện tự nhiên, *C. militaris* thường ký sinh trên nhộng hoặc ấu trùng của côn trùng và hình thành quả thể. Nó được sử dụng rộng rãi làm dược liệu truyền thống và nấm ăn ở Trung Quốc, Hàn Quốc và một số khu vực châu Á khác [1]. Polysaccharide trong nấm dược liệu là một loại polyme sinh học có giá trị cao và ứng dụng rộng rãi [2]. Các polysaccharide đã được nghiên cứu và ứng dụng trong lĩnh vực y sinh học như giảm lượng đường trong máu [3], chống ung thư [4] và điều hòa miễn dịch [5]. Polysaccharide của nấm có thể được sử dụng làm thuốc điều trị bệnh tiểu đường, ung thư... Nhiều báo cáo trước đây đã kết luận rằng hoạt chất sinh học của nấm tập trung có tác dụng chống ung thư, chống khối u, chống tiểu đường, chống viêm, điều hòa miễn dịch và cải thiện tình trạng [6, 7, 8]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra nấm đông trùng hạ thảo có tiềm năng hiệu quả kinh tế và có thể sản xuất theo quy mô công nghiệp. Mặt khác, quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* trong tự nhiên rất khó tìm thấy và có thể trở nên vô hiệu do đặc tính của vật chủ và yêu cầu của môi trường phát triển nghiêm ngặt. Do có hoạt tính dược lý cao nên nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* gần đây đã thu hút được sự chú ý lớn trong nuôi cấy nhân tạo. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy là cần thiết để sản xuất quả thể và gia tăng hoạt chất sinh học từ nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* ở quy mô lớn. Việc nuôi cấy nhân tạo đòi hỏi phải nghiên cứu kỹ thành phần môi trường bao gồm nguồn carbon và nguồn nitơ để nấm đông trùng phát triển và tăng cường thành phần hoạt tính sinh học trong quá

trình nuôi cấy trong môi trường nhân tạo. Nhìn chung, thành phần dinh dưỡng chính của môi trường là nguồn carbon và nitơ. Nó cần thiết cho sự tăng sinh tế bào và sinh tổng hợp các chất chuyển hóa. Các báo cáo trước đây đã chứng minh sự tối ưu hóa các nguồn carbon và nitơ để hình thành quả thể và sản xuất thành phần hoạt tính sinh học [9, 10, 11, 12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu chủ yếu tập trung khảo sát trên môi trường cấy lỏng [13], chưa có nhiều nghiên cứu trên môi trường rắn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của chiết xuất nấm *C. militaris* nuôi cấy trong môi trường cơ chất rắn được bổ sung nitơ và carbon.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật Liệu

Nguyên liệu

Chủng nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris* trong thí nghiệm được cung cấp từ Viện nghiên cứu sinh học ứng dụng Hà Nội (VBio).

Dung môi, hóa chất

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma, Đức), acid ascorbic (Sigma, Đức), D-glucose (Xilong Scientific, Trung Quốc), Phenol (Xilong Scientific, Trung Quốc), H_2SO_4 (Xilong Scientific, Trung Quốc), PDA (Himedia, Ấn Độ), KH_2PO_4 (Xilong Scientific, Trung Quốc), $MgSO_4$ (Xilong Scientific, Trung Quốc), Vitamin B1 (Ấn Độ)...

Thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

Cân phân tích 4 số SHINKO DENSHI-Japan, thiết bị UV-vis BioSpectrometer Basic (Eppendorf – Đức), máy đo pH inoLab pH 7110 để bàn hãng WTW/Đức, máy lắc orbital (Đài Loan), bể Ôn Nhiệt Memmert (Đức).

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Hoạt hóa chủng giống và nuôi tạo quả thể nấm *C. militaris*

Bào tử vô tính từ ống giống được chuyển sang bình tam giác chứa 100 mL môi trường PDA lỏng và nuôi ở nhiệt độ 24°C, lắc 120 vòng/phút trong 7 ngày trước khi được cấy lên môi trường nhân tạo (gạo lứt).

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sản sinh hàm lượng polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

Môi trường nuôi cấy nhân tạo gồm có 50 g gạo lứt, 70 mL dịch chiết đậu xanh kết hợp với 0,1g/L KH_2PO_4 ; 0,1g/L MgSO_4 ; 0,3g/L Vitamin B1 và thành phần dinh dưỡng khác nhau thay đổi theo công thức thí nghiệm (Bảng 1) được đưa vào bình thể tích 700 mL. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C trong 40 phút, để nguội xuống nhiệt độ phòng trước khi cấy 3 mL dung dịch chủng nấm giống. Bình cấy giống sau đó được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn trong 1 tuần trước khi chuyển sang giai đoạn chiếu sáng (12h sáng/12 tối) ở 22°C và ẩm độ 70-85%.

Bảng 1: Thành phần nitơ và carbon bổ sung vào môi trường rắn

Môi trường rắn	Thành phần
M-1 (Đối chứng)	20g/L D-Glucose, 10g/L cao nấm men
M-2 (G + Y)	20g/L D-Glucose, 20g/L cao nấm men
M-3 (G + P)	20g/L D-Glucose, 20g/L peptone
M-4 (G + N)	20g/L D-Glucose, 20g/L nhộng tằm khô

Môi trường rắn	Thành phần
M-5 (F + Y)	20g/L Fructose, 20g/L cao nấm men
M-6 (F + P)	20g/L Fructose, 20g/L peptone
M-7 (F + N)	20g/L Fructose, 20g/L nhộng tằm khô
M-8 (G+N+P+Y)	20g/L D-Glucose, 10g/L nhộng tằm khô, 5g/L peptone, 5g/L cao nấm men
M-9 (F+N+P+Y)	20g/L Fructose, 10g/L nhộng tằm khô, 5g/L peptone, 5g/L cao nấm men

Ghi chú: G: glucose, F: fructose, P: peptone, N: nhộng tằm khô

Polysaccharide được định lượng bằng phương pháp phenol-sulfuric acid [14]. Các bước được mô tả tóm tắt như sau: 400 μL dịch mẫu chứa polysaccharide cho tác dụng với 200 μL dung dịch phenol 5%, cho thêm 1mL H_2SO_4 đậm đặc và để 30 phút ở nhiệt độ phòng. Màu của phản ứng được phát hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 490 nm. Hàm lượng polysaccharide được định lượng dựa trên số đo OD thu được của mẫu thí nghiệm đối chiếu với đồ thị chuẩn glucose. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần đánh giá trên 5 hộp cho mỗi công thức môi trường.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chống oxy hoá DPPH của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

Hoạt tính chống oxy hoá DPPH của nấm đông trùng hạ thảo được đánh giá theo phương pháp của Brand-Williams et al. (1995). Hút 0,6 mL mẫu đã pha loãng thích hợp vào ống nghiệm, thêm 0,8 mL DPPH 0,004%. Giữ ống nghiệm trong tối

30 phút. Sau đó đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng $\lambda = 517 \text{ nm}$. Khả năng khử gốc tự do DPPH được tính dựa vào đường chuẩn acid ascorbic. Xây dựng đường chuẩn acid ascorbic: pha nồng độ acid ascorbic từ 4, 8, 12, 16, 20 $\mu\text{g/mL}$. Thực hiện quy trình tương tự như trên cho acid ascorbic chuẩn. Dựng đường biểu diễn độ hấp thụ của dung dịch theo nồng độ acid ascorbic ($\mu\text{g/mL}$) [15]. Phần trăm bắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức như sau:

$$IC (\%) = \frac{OC_c - OC_t}{OC_c} \times 100$$

Trong đó, IC(%): Hoạt tính dọn gốc tự do DPPH, OD_c: Mật độ quang của mẫu chứng âm OD_t: Mật độ quang của mẫu thử.

2.2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Các giá trị trung bình được xử lý trên phần mềm Excel, phân tích phương sai một nhân tố ANOVA và so sánh các giá trị trung bình bằng kiểm định Duncan với mức ý nghĩa 95% bằng phần mềm thống kê SPSS 20.

2.3. Kết quả và thảo luận

2.3.1. Ảnh hưởng carbon và nitơ đến sự sản sinh polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

Ảnh hưởng của chính môi trường nuôi cấy đến sự sản sinh polysaccharide đã được phân tích sau 60 ngày nuôi cấy. Kết quả ở Bảng 2 cho thấy hàm lượng polysaccharide tổng số thu được dao động từ 47,54 g/mL (M- 9) đến 73,24 g/mL (M-2). Điều này cho thấy sự phù hợp của môi trường ở M-2 đối với sự tổng hợp polysaccharide, do sự sản sinh polysaccharide của nấm đông trùng được nuôi cấy trong môi trường M-2 là cao nhất.

Khi khảo sát ảnh hưởng của carbon (glucose và fructose) đến sự tổng hợp polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo cho thấy có sự khác biệt rõ rệt và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức 5% (Bảng 2). Hàm lượng polysaccharide tổng số ở môi trường M-8 lớn hơn môi trường M-9 (60,43g/L so với 47,54g/L). Khi khảo sát ảnh hưởng của nitơ (cao nấm men, peptone và nhộng tằm khô) đến sự tổng hợp polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo cũng cho thấy có sự khác biệt (Bảng 2). Hàm lượng polysaccharide tổng số thu được ở môi trường M-2 (bổ sung cao nấm men) cao hơn so với các môi trường M-3 (bổ sung peptone) và M-4 (bổ sung nhộng tằm khô) (73,24g/L so với 65,48g/L và 59,48g/L), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Kết quả đã chứng minh rằng nguồn carbon phù hợp nhất là đường glucose và nguồn nitơ tốt nhất là cao nấm men. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Zhongyang et al. [16], nhóm nghiên cứu đã kết luận rằng khi bổ sung đường glucose (40g/l) vào môi trường nuôi cấy chìm nấm địa sâm *Coprinus comatus* sẽ thu được hàm lượng polysaccharide cao nhất so với môi trường có bổ sung được sucrose, fructose và maltose. Theo nghiên cứu của Chien-Chang Wang et al. (2019) cũng đã xác định glucose và cao nấm men là nguồn carbon và nitơ thích hợp nhất cho tổng hợp polysaccharide ngoại bào khi nuôi cấy chìm nấm đông trùng hạ thảo (40g glucose/l và 10g cao nấm men/l) [17]. Ngoài ra, Ling Xu et al. (2019) cũng đã kết luận peptone là yếu tố chính ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp polysaccharide. Nồng độ peptone thấp có lợi cho sự tăng trưởng sinh khối nhưng lại có hại cho quá trình tổng hợp polysaccharide [18].

Bảng 2: Ảnh hưởng carbon và nito đến sự sản sinh polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

STT	Môi trường rắn	Hàm lượng polysaccharide tổng số (g/mL)
1	M-1 (Đối chứng)	52,38 ^{cdef} ± 1,64
2	M-2 (G + Y)	73,24 ^a ± 3,82
3	M-3 (G + P)	65,48 ^b ± 3,57
4	M-4 (G + N)	59,48 ^{bcd} ± 5,20
5	M-5 (F + Y)	56,70 ^{cde} ± 5,31
6	M-6 (F + P)	49,45 ^{ef} ± 8,31
7	M-7 (F + N)	51,94 ^{def} ± 2,85
8	M-8 (G+N+P+Y)	60,43 ^{bc} ± 2,53
9	M-9 (F+N+P+Y)	47,54 ^f ± 1,77

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ở mức thống kê $P \leq 0,05$. G: glucose, F: fructose, P: peptone, N: nhộng tằm khô

2.3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hoạt tính chống oxy hoá DPPH của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

Hoạt tính bắt gốc tự do DPPH là một trong các khảo sát hoạt tính kháng oxy hoá hiệu quả và đơn giản. Abheri Das Sarma et al. (2010) đã cho rằng gốc tự do được sinh ra do các tác nhân phổ biến như: stress, chế độ dinh dưỡng, thiếu oxy mô, bỏng, nhiễm xạ, hoá chất độc hại, nhiễm trùng, bệnh mãn tính, lao động quá sức,... [19]. Tiềm năng kháng oxy hóa của mẫu được đánh giá bằng phần trăm hoạt tính chống oxy hóa. Giá trị này càng cao, hiệu quả bắt gốc tự do càng cao. Kết quả phân tích ở bảng 3 cho thấy phần trăm tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH của các môi trường rắn dao động từ 67,72% (đối chứng) đến 82,74% (M-2). Điều này

cho thấy các môi trường nuôi cấy đều ảnh hưởng tốt đến hoạt tính chống oxy hóa DPPH của nấm đông trùng hạ thảo và được cải thiện hơn so với đối chứng. Thứ tự ảnh hưởng của các môi trường lên tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH là glucose + yeast > glucose + peptone > glucose + nhộng tằm > fructose + nhộng > fructose + peptone > fructose + nhộng. Điều này có thể giải thích là do hàm lượng polysaccharide của nấm đông trùng hạ thảo khi nuôi cấy ở môi trường M-2 (glucose + yeast) và M-3 (glucose + peptone) cao hơn các môi trường còn lại nên khả năng kháng oxy hóa mạnh hơn các môi trường còn lại. Kết quả nghiên cứu này góp phần cung cấp những dẫn liệu khoa học cho các ứng dụng trong y học sau này. Bởi vì, sự gia tăng hàm lượng các gốc tự do trong tế bào sẽ dẫn đến quá trình lão hóa, bệnh tật: xơ vữa động mạch, suy yếu hệ thống miễn dịch, giảm trí tuệ, tiểu đường, ung thư... [20]. Vì vậy, việc nghiên cứu và tìm tòi ra các môi trường nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo giúp gia tăng hàm lượng dược chất có trong nấm, cung cấp thêm nguồn dược liệu trong phòng và trị bệnh.

Bảng 3: Ảnh hưởng carbon và nito đến hoạt tính chống oxy hoá DPPH của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*

STT	Môi trường rắn	Tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH (%)
1	M-1 (Đối chứng)	67,72 ^e ± 2,92
2	M-2 (G + Y)	82,74 ^a ± 2,63
3	M-3 (G + P)	82,30 ^a ± 2,80
4	M-4 (G + N)	78,11 ^b ± 0,85
5	M-5 (F + Y)	75,04 ^{bcd} ± 1,44
6	M-6 (F + P)	76,82 ^{cd} ± 1,79
7	M-7 (F + N)	71,80 ^d ± 1,36
8	M-8 (G+N+P+Y)	77,21 ^{cd} ± 2,36
9	M-9 (F+N+P+Y)	73,70 ^{cd} ± 3,38

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt ý nghĩa ở mức thống kê $P \leq 0,05$. G: glucose, F: fructose, P: peptone, N: nhộng tằm khô

3. KẾT LUẬN

Môi trường rắn có bổ sung glucose (20g/L) và cao nấm men (20g/L) làm tăng

rõ rệt hàm lượng polysaccharide ngoại bào và gia tăng tỷ lệ bắt gốc tự do DPPH của nấm đông trùng hạ thảo *C. militaris*. Công thức thích hợp để nuôi cấy nấm đông trùng hạ thảo là 0,1 g/L KH_2PO_4 ; 0,1 g/L MgSO_4 ; 0,3g/L Vitamin B1, 20g/L glucose và 20g/L cao nấm men.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Shrestha, B., Zhang, W., Zhang, Y., Liu, X., (2012). “*The medicinal fungus Cordyceps militaris: research and development*”. Mycol. Prog. 11, 599-614.
- [2]. Anupreet Kaur (2020). “*Isolation and characterisation of polysaccharides from traditionally known Chinese medicinal mushrooms*”, Thesis of Master, School of Science Western Sydney University, Australia.
- [3]. Kim, Y.O.; Han, S.B.; Lee, H.W.; Ahn, H.J.; Yoon, Y.D.; Jung, J.K (2005). “*Immunostimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of Inonotus obliquus*”. Life Sci., 77, 2438–2456. [CrossRef] [PubMed].
- [4]. Park, S.E.; Kim, J.G.; Lee, Y.W.; Yoo, H.S.; Cho, C.K (2009). “*Antitumor activity of water extracts from Cordyceps militaris in NCI-H460 cell xenografted nude mice*”. J. Acupunct. Meridian Stud., 2, 294–300. [CrossRef].
- [5]. Rao, Y.K.; Fang, S.H.; Wu, W.S.; Tzeng, Y.M. (2010) . “*Constituents isolated from Cordyceps militaris suppress enhanced inflammatory mediator’s production and human cancer cell proliferation*”. J. Ethnopharmacol, 131, 363–367. [CrossRef] [PubMed].
- [6]. Cui, J. (2014). “*Biotechnological production and applications of Cordyceps militaris, a valued traditional Chinese medicine*”. Critical Reviews in Biotechnology. 1-10.
- [7]. Luo, X., Y. Duan, W. Zhang, C. Li, and J. Zhang. (2017). “*Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from Cordyceps militaris*”. Carbohydrate Polymers. 157: 794-802
- [8]. Wang, B., C. Lee, Z. Chen, H. Yu, and P. Duh. (2012). “*Comparison of the hepatoprotective activity between cultured Cordyceps militaris and natural Cordyceps sinensis*”. Journal of Functional Foods. 4: 489- 495.
- [9]. Dang, H., C. Wang, and H. Lay. (2018). “*Effect of nutrition, vitamin, grains, and temperature on the mycelium growth and antioxidant capacity of Cordyceps militaris (strains AG-1 and PSJ-1)*”. Journal of Radiation Research. 11: 130-138
- [10]. Kang, N., H. Lee, I. Park, and Y. Seo. (2017). “*Development of high cordycepin-producing Cordyceps militaris strains*”. Mycobiology. 45: 31-38
- [11]. Yang, S., L. Jin, X. Ren, J. Lu, and Q. Meng. (2014). “*Optimization of fermentation process of Cordyceps militaris and antitumor activities of polysaccharides in vitro*”. Journal of Food and Drug Analysis. 22: 468-476.

- [12]. Qin, Q., G. Zhou, H. Zhang, Q. Meng, J. Zhang, H. Wang, L. Miao, and X. Li. (2018). “*Obstacles and approaches in artificial cultivation of Chinese Cordyceps*”. Mycology. 9: 7-9.
- [13]. Jeong Seok Kwon, Jong Seok Lee, Won Cheol Shin, Keun Eok Lee & Eock Kee Hong (2010). “*Optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides with Cordyceps militaris in liquid culture*”. Biotechnology and Bioprocess Engineering. Volume 14, pages 756–762
- [14]. Tang, Q.L.; Huang, G.L. (2018). “*Preparation and antioxidant activities of cuaurbit polysaccharide*”. Int. J. Biol. Macromol. 117, 362–365
- [15]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. and Berset, C.L.W.T. (1995) “*Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*”. LWT-Food Science and Technology, 28, 25-30. [http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- [16]. Zhongyang Ding, Wangfei Wang, Feng Wang, Qiong Wang and Kechang Zhang, (2012). “*Polysaccharides production by submerged fermentation of Coprinus comatus and their inhibitory effects on non-enzymatic glycosylation*”. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(7), pp. 1375-1381.
- [17]. Chien-Chang Wang, Jiun-Yan Wu, Chih-Yuan Chang, Shih-Tsung Yu and Yung-Chuan Liu (2019). “*Enhanced exopolysaccharide production by Cordyceps militaris using repeated batch cultivation*”. Journal of Bioscience and Bioengineering, Volume 127, Issue 4, Pages 499-505.
- [18]. Ling Xu, Feng Wang, Zhicai Zhang and Norman Terry. (2019). “*Optimization of Polysaccharide Production from Cordyceps militaris by Solid-State Fermentation on Rice and Its Antioxidant Activities*”. Foods 8(11), 590; <https://doi.org/10.3390/foods8110590>
- [19]. Albalasmed, A.A., A.A. Berhe and T.A. Ghezzehei. (2013). “*A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry*”. Carbohydrate Polymers, 97:253-261.
- [20]. Lazo-de-la-Vega-Monroy, M-L. & Fernández-Mejía, C. (2013), “*Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*”, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), 2013; ISBN: 978-953-51-1123-8, InTech, DOI:10.5772/51788. pp. 209 – 232.