

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГРИБАМИ РОДА *CORDYCEPS* И ИХ АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ

Т.А. Пучкова, А.Н. Капич, О.В. Осадчая, О.О. Целеш, П.С. Шабуня*,
С.А. Фатыхова*, А.Н. Михалюк**

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: micomp@mbio.bas-net.by

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь,
e-mail: peter_kurman@tut.by

**Гродненский государственный аграрный университет, Гродно, Республика Беларусь,
e-mail: alex-vet@mail.ru

Введение

Перспективными источниками для получения новых лечебно-профилактических препаратов являются энтомопатогенные грибы рода *Cordyceps*. В течение многих столетий они используются в народной медицине стран Юго-Восточной Азии, а в настоящее время приобретают все большую популярность в США и Европе благодаря уникальным целебным свойствам. Наиболее известными представителями этого рода являются *C. militaris* и *C. sinensis*. Входящие в состав этих грибов соединения проявляют высокую иммуностимулирующую, противоопухолевую, гепатопротекторную, антиоксидантную, антимикробную, противовирусную и сорбционную активности [1, 2].

Мицелий кордицепса содержит комплекс биологически активных соединений: углеводы (моно-, ди-, олиго- и полисахариды), белки, незаменимые аминокислоты, липиды, ненасыщенные жирные кислоты, эргостерол, витамины, стеролы, нуклеозиды, макро- и микроэлементы. Биологическое действие кордицепса определяют, в первую очередь, полисахариды, производные нуклеозидов, циклоспорины. Иммуномодулирующие полисахариды (β -D-глюканы) активируют иммунные клетки, увеличивают продукцию цитокинов и интерферона. Производные нуклеозидов: кордицепин (3'-дезоксаденозин) и 2,3'-дидезоксаденозин, являются структурными аналогами аденозина, обладают противовирусным действием за счет ингибирования синтеза нуклеиновых кислот [3–5].

В природе грибы рода *Cordyceps* встречаются в труднодоступных районах, поэтому в настоящее время для получения препаратов на их основе используется мицелий, полученный биотехнологическим путем. Наиболее распространено твердофазное культивирование этих грибов. Перспективным способом получения биомассы и метаболитов грибов рода *Cordyceps* является глубинное культивирование, позволяющее за короткое время получать стандартные продукты с заданными свойствами. Для глубинного культивирования грибов рода *Cordyceps* в основном используются полусинтетические питательные среды, при этом биологически активные соединения могут образовываться не только в мицелии, но и в культуральной жидкости [6–8]. Однако физиологические потребности грибов рода *Cordyceps*, а также их способность продуцировать биологически активные вещества при глубинном культивировании на жидких питательных средах изучены недостаточно.

Хотя грибы рода *Cordyceps* проявляют широкий спектр фармакологического действия, данные об использовании их в ветеринарии немногочисленны. Применение экстракта кордицепса оказывало положительное влияние на ростовые показатели цыплят-бройлеров, выживаемость птиц, титр антител к вирусу болезни Ньюкасла. Добавление кордицепса в корм кур-несушек повышало яйценоскость и позволяло получить яйца с более низким содержанием холестерина [9, 10]. Большой интерес представляют публикации о повышении фертильности животных при включении кордицепса в их кормовой рацион. Применение кордицепса способствовало нормализации уровня гормонов, активизации сперматогенеза, улучшению морфологии и повышению подвижности сперматозоидов у экспериментальных животных [10–13]. В то же время, влияние биологически активных веществ грибов рода *Cordyceps* на организм животных, его неспецифическую резистентность, антиоксидантный

статус, обмен веществ, заболеваемость, сохранность и продуктивные качества до сих пор остается малоизученным.

Большой интерес представляет разработка комплексной лечебно-профилактической кормовой добавки на основе грибов рода *Cordyceps*, включающей мицелий и культуральную жидкость этих грибов. Разработка жидкой формы препарата выдвигает определенные требования к составу питательных сред для культивирования грибов. В частности нежелательным является включение минеральных солей, которые при их неполной утилизации грибом, могут оказывать отрицательное воздействие на организм животных. В связи с этим при оптимизации питательных сред для культивирования грибов следует использовать компоненты, которые поддерживают активный рост мицелия и продуцирование биологически активных веществ, и которые при этом не представляют потенциальной опасности для животных.

Цель исследования – сравнительное изучение влияния условий культивирования и состава питательных сред на рост и образование биологически активных соединений грибами рода *Cordyceps* и исследование антиоксидантного действия культуральных жидкостей с мицелием грибов на экспериментальных животных.

Методы исследования

Объектами исследования служили два штамма грибов *Cordyceps militaris* 403 и *C. sinensis* 405, хранящиеся в коллекции культур лаборатории экспериментальной микологии и биоповреждений Института микробиологии НАН Беларуси.

Глубинное культивирование мицелия грибов проводили на пивном сусле (7° по Баллингу), полусинтетической питательной среде (г/л: глюкоза – 20,0; дрожжевой экстракт – 3,0; K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4$ – 0,25), различных вариантах комплексных сред в колбах Эрленмейера на качалке, а также лабораторных ферментерах: АК-10 (объемом 10 л). Температура культивирования – 23–25°C, время – 3–5 суток. Количество инокулюма – 10%.

Грибной мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через плотную ткань, высушивали при температуре 60°C и далее использовали для последующих анализов. Кроме того, производили анализ состава культуральной жидкости.

Белок в мицелии определяли по Кьельдалю [14], а в культуральной жидкости по Брэдфорд [15], эндополисахариды – по [16], экзополисахариды – по [17], общие углеводы – по [18], общие фенольные соединения – по [19].

Углеводный состав полисахаридов после предварительного гидролиза их 7%-ной серной кислотой на кипящей водяной бане в течение 5 ч определяли методом ГЖХ в виде триметилсилильных (ТМС) производных сахаров. ТМС-производные углеводов и метчиков, которыми служили ксилоза, манноза, галактоза, глюкоза («Sigma», США), получали по методу [20]. Хроматографию проводили на хроматографе «Chrom 5» (Чехия) с пламенно-ионизационным детектором, используя колонку из нержавеющей стали длиной 2,8 м, заполненную хроматоном N-AW-HMDS с 5%-ной жидкой фазой SE-30, при программировании температуры в пределах от 140 до 280°C со скоростью 5° в мин. Содержание каждого моносахарида рассчитывали как процент площади его пика от общей суммы площадей пиков на хроматограмме.

Количественный анализ нуклеозидов в образцах культуральной жидкости и мицелия проводили с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 в комплекте с масс-спектрометром Agilent 6410 Triple Quad. Подготовку проб проводили по [21].

Для изучения иммунокорригирующего действия мицелия и культуральной жидкости грибов рода *Cordyceps* проведен опыт на 24 беспородных белых крысах массой 178–185 г в возрасте 2,5 месяцев. Исследование антиоксидантного действия проводилось на 30 беспородных белых крысах (самках) массой 140–146 г в возрасте 1,5 месяцев.

В каждом из проводимых исследований животных разделяли на 3 группы: две опытных и контрольную. Животных содержали на виварном рационе, первая опытная группа в свободном доступе из поилок получала культуральную жидкость с мицелием гриба *C. sinensis* 405 в разведении от исходной концентрации 1:10, вторая опытная группа – культуральную жидкость с мицелием гриба *C. militaris* 403 в том же разведении, а контрольная группа – физиологический раствор. Наблюдение проводили в течение 14 дней.

Ежедневно учитывали количество потребленных препаратов в расчете на 1 крысу. За животными вели ежедневное наблюдение, обращая внимание на внешний вид, поведение, потребление корма, динамику массы тела.

Через 14 дней после начала эксперимента животных забивали методом декапитации и отбирали кровь для проведения гематобиохимических исследований.

Для определения показателей крови крыс использовали гематологический анализатор MEDONIC CA – 620 (Швеция) и биохимический анализатор DIALAB Autolyzer 20010D.

Фагоцитарную активность лейкоцитов определяли по методике [22], бактерицидную активность сыворотки крови – по [23].

В сыворотке крови определяли: из группы гидрофильных скэвенджеров радикалов – количество восстановленного глутатиона по способности кислоторастворимых тиоловых группировок при взаимодействии с реактивом Эллмана образовывать окрашенное соединение тιο-2-нитробензойную кислоту; из группы ферментов, осуществляющих восстановление окисленных низкомолекулярных биоантиоксидантов – активность глутатионредуктазы – по скорости окисления НАДФН в присутствии окисленного глутатиона; из группы энзиматических перехватчиков – активность глутатионпероксидазы – по изменению поглощения восстановленного глутатиона после инкубации в присутствии перекиси водорода. Активность антиоксидантных ферментов определяли спектрофотометрически [24, 25].

Статистическая обработка материала включала методы расчета обобщающих коэффициентов, характеризующих различные стороны каждого из признаков, методы сравнения различных статистических совокупностей.

Результаты и обсуждение

Исследован рост мицелия грибов *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 на агаризованных питательных средах, применяемых в микологии: сусло-агаре, картофельно-декстрозном агаре, глюкозо-пептон-дрожжевом агаре. Наиболее активный рост грибов отмечался на сусло-агаре, где *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 образовывали высокие ватообразные колонии белого цвета с ровным или слегка волнистым краем. При освещении мицелия *C. militaris* видимым светом отмечено образование желтовато-оранжевого пигмента.

При выращивании при температурах 20–25°C линейная скорость роста *C. militaris* 403 составила 1,7–2,1 мм/сут, ростовой коэффициент – 6,6–32,4. У *C. sinensis* 405 эти показатели составляли, соответственно, 1,4–2,0 мм/сут и 7,2–35,2.

При микроскопировании вегетативного мицелия *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 наблюдались септированные гифы с гладкими стенками, пряжки отсутствовали. На мицелии исследуемых грибов встречались конидиальные спороношения и хламидоспоры. После 20 суток культивирования мицелиальная культура формировала много округлых спор (5–10 мкм).

При выращивании на стандартных жидких питательных средах (пивное сусло, глюкозо-пептонная среда) мицелий *C. militaris* 403 рос в виде мелких пеллет, а *C. sinensis* 405 образовывал густую дисперсную массу. В культуральной жидкости обоих грибов присутствовали округлые споры, причем у *C. sinensis* 405 большое их количество наблюдалось уже на вторые сутки культивирования.

Для оценки влияния компонентов питательных сред на рост и биосинтетическую активность грибов *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 соответствующие источники углерода или азота в составе исходной полусинтетической питательной среды заменяли другими в эквивалентных количествах. Исследования показали, что в качестве источников углерода более предпочтительными оказались глюкоза, крахмал, лактоза и мальтоза, среди источников азота – пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты.

По данным литературы, в составе питательных сред для выращивания грибов рода *Cordyceps* органические источники азота (пептон, дрожжевой или кукурузный экстракты) использовали в достаточно высоких концентрациях (8–25 г/л) [5–7]. При этом достигался высокий уровень биомассы, полисахаридов и кордицепина. Потребность грибов рода *Cordyceps* в относительно большом количестве источника азота, вероятно, можно объяснить тем, что в природе они являются энтомопатогенными.

Для грибов *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 показано, что при повышении содержания дрожжевого экстракта в полусинтетической питательной среде с 3 г/л до 5–10 г/л, количество биомассы увеличивалось на 25–40%. Использование более высоких концентраций дрожжевого экстракта хотя и способствовало дальнейшему повышению уровня биомассы, но приводило к значительному удорожанию питательной среды.

Исследование динамики роста грибов показало, что при начальных концентрациях в составе питательной среды глюкозы от 20 до 40 г/л, прирост биомассы наблюдался до 3–4 суток культивирования (8,2–11,5 г/л у *C. militaris* 403 и 8,7–9,8 г/л у *C. sinensis* 405), а затем на 5–6 сутки её количество начинало постепенно снижаться. При более высоком содержании глюкозы в питательной среде (50–60 г/л) рост грибной биомассы продолжался и на 4–5 сутки культивирования, а её количество достигало 12,0–13,5 г/л.

При увеличении начальной концентрации глюкозы до 40–60 г/л повышалось образование экзополисахаридов до 3,0–4,5 г/л у *C. militaris* 403 и до 2,0–3,0 г/л у *C. sinensis* 405. Наибольшее их накопление происходило на 4–5 сутки культивирования (в стационарной фазе роста грибов).

Поскольку на себестоимость процесса выращивания мицелия грибов большое влияние оказывают оба фактора: состав питательной среды и длительность культивирования, для выращивания грибов рода *Cordyceps* мы остановились на полусинтетической питательной среде следующего состава, г/л: глюкоза – 40 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, K_2HPO_4 – 1, KH_2PO_4 – 1, $MgSO_4$ – 0,25 и времени культивирования 3–4 суток, что позволило получать 9,5–11,0 г/л биомассы. В мицелии *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403 содержалось, соответственно, 21,2–22,5% и 14,3–15,4% общего и истинного белка, 20,5–22,0% полисахаридов, 2,8–3,5% липидов, 850–1100 мг% общих фенольных соединений. В культуральной жидкости присутствовало 17,4–17,7 г/л общих углеводов, 1,5–3,0 г/л экзополисахаридов, а также следовые количества липидов.

Полученные данные о росте исследуемых грибных культур на полусинтетических питательных средах с различными источниками углерода и азота явились основой разработки состава комплексных питательных сред. В качестве их компонентов использовали продукты переработки сельскохозяйственной продукции: молочную сыворотку, свекловичную мелассу, крахмал, продукты мукомольной промышленности, которые являлись источниками не только углеводов, но и белка. При выборе промышленных питательных сред особое внимание уделялось не только накоплению биомассы, но и скорости роста культур.

Наиболее высокий выход биомассы исследуемых грибов (23,0–26,0 г/л) получен при использовании комплексной питательной среды на основе соевой муки и мелассы. Время культивирования грибов рода *Cordyceps* на данной среде составило 3–4 суток. В мицелии *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 содержалось, соответственно, общих углеводов – 44,8–48,6%, полисахаридов – 17,5–22,5%, белка – 26,0–32,0%, липидов – 6,2–7,4% %, общих фенольных соединений – 720–1100 мг%. В культуральной жидкости присутствовало 1,8–3,0 г/л экзополисахаридов, 0,15–0,17 г/л белка, 20,5–22,4 г/л общих углеводов.

Исследовано влияние условий культивирования на рост грибов и образование полисахаридов. Показано, что для хорошего роста мицелия *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 подходят слабокислые значения исходного pH (5,5–6,5).

Оптимальной для накопления биомассы *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 с высоким содержанием эндополисахаридов оказалась температура культивирования 23–25°C. При 18–20°C концентрация биомассы у *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 оказалась ниже, соответственно, на 32 и 29%, а при 28–30°C – на 39 и 31%. При температуре 28–30°C снижалось также образование внеклеточных полисахаридов. Особенно чувствительным к повышению температуры оказался *C. militaris* 403, у которого значительно замедлялся рост при 30°C и выше. В то же время, мицелий данного гриба продолжал расти при низкой температуре (3–5°C), образуя на поверхности питательной среды толстую пленку.

Благоприятный уровень аэрации при культивировании грибов в колбах составил 0,325–0,210 гO₂/л/ч.

Проведено изучение влияния интенсивности аэрации на накопление биомассы и образование полисахаридов грибов рода *Cordyceps* при их культивировании на среде с соевой мукой и мелассой в лабораторных ферментерах АК-10. При низкой интенсивности аэрации (0,5 л/л/мин) наибольшая концентрация биомассы – 22–24 г/л у *C. militaris* 403 и 24–26 г/л у *C. sinensis* 405 наблюдалась через 48–60 ч культивирования. При аэрации 1,0 л/л/мин это количество биомассы образовывалось через 36–48 ч, а при 2 л/л/мин – через 24–36 ч. При повышении аэрации до 2 л/л/мин происходило сильное вспенивание культуральной жидкости, что могло привести к уменьшению объема препарата, поэтому дальнейшее повышение аэрации оказалось нецелесообразно. Максимальная удельная скорость роста грибов достигала 0,022–0,033 ч⁻¹. Накопление полисахаридов наблюдалось параллельно росту биомассы.

Таким образом, оптимизация состава комплексной питательной среды и условий культивирования способствовала увеличению количества грибной биомассы более чем в 2 раза, а внеклеточных полисахаридов – в 1,5–2 раза, по сравнению с полусинтетической средой (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание внутриклеточных (% от АСБ) и внеклеточных полисахаридов (г/л) в образцах культуральной жидкости и сухого мицелия грибов рода *Cordyceps*

Питательная среда	<i>C. militaris</i> 403		<i>C. sinensis</i> 405	
	Эндополисахариды, % от АСБ	Экзопполисахариды, г/л	Эндополисахариды, % от АСБ	Экзопполисахариды, г/л
Полусинтетическая	8,3–9,5	1,6–2,0	8,6–10,0	0,8–1,0
Комплексная	17,5–20,5	2,4–3,0	20,4–22,5	1,5–2,0

Установлено, что полисахариды грибов *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 являлись протеогликанами, содержащими 10–15% белка. Исследование углеводного состава показало, что они представляют собой гетерогликаны, включающие в качестве основных мономеров глюкозу, маннозу и галактозу (таблица 2).

Таблица 2 – Углеводный состав полисахаридов мицелия и культуральной жидкости грибов рода *Cordyceps*

Полисахариды	Моносахариды, %			
	Манноза	Галактоза	Глюкоза	Соотношение сахаров
<i>C. sinensis</i> 405				
Эндополисахариды	86,81	8,69	4,5	19:2:1
Экзопполисахариды	75,3	13,45	11,25	7:1:1
<i>C. militaris</i> 403				
Эндополисахариды	40,32	21,14	38,54	1,9:1:1,8
Экзопполисахариды	64,07	14,70	21,23	4,4:1:1,4

Методом масс-спектрометрии исследовано содержание нуклеозидов в мицелии и культуральной жидкости данных грибов. Показано, что данные соединения в более высоком количестве определялись при культивировании исследуемых грибов на полусинтетической питательной среде (таблица 3).

Среди обнаруженных в мицелии грибов нуклеозидов преобладали компоненты нуклеиновых кислот – аденозин (289–646 мкг/г) и гуанозин (305–765 мкг/г). Инозин присутствовал в количестве 23,7–137,9 мкг/г. Данный нуклеозид, являющийся компонентом тРНК, используется в фармакологии как метаболическое средство, предшественник АТФ, оказывает положительное действие на процессы обмена в миокарде.

У исследуемых грибов обнаружены производные нуклеозидов – кордицепин (1,7–37,0 мкг/г) и 2'-дезоксаденозин (23,8–50,8 мкг/г). Кордицепин у *C. militaris* 403 присутствовал в более высоком количестве, чем у *C. sinensis* 405, 13,7–37,0 и 1,7–5,8 мкг/г, соответственно.

В культуральной жидкости содержание нуклеозидов оказалось относительно невелико (мкг/мл): аденозин – 0,04–3,2, гуанозин – 0,7–3,6, инозин – 0,07–0,27. У *C. militaris* 403

обнаружен 2'-дезоксиаденозин (1,3 мкг/мл) и в более высоком количестве (0,8–3,2 мкг/мл), чем у *C. sinensis* 405, кордицепин.

Таблица 3 – Содержание нуклеозидов в образцах культуральной жидкости (КЖ, мкг/мл) и сухого мицелия (М, мкг/г) грибов рода *Cordyceps*

Питательная среда	Инозин		Гуанозин		Аденозин		Кордицепин		2'-дезоксиаденозин	
	КЖ	М	КЖ	М	КЖ	М	КЖ	М	КЖ	М
<i>C. militaris</i>										
Полусинтетическая	0,27	29,0	3,60	708,0	3,20	524,0	0,80	37,0	-	42,0
Комплексная	0,12	137,9	3,35	765,0	0,50	646,4	3,20	13,7	1,32	39,0
<i>C. sinensis</i>										
Полусинтетическая	0,07	44,1	0,65	557,0	0,07	470,0	0,02	5,8	-	50,8
Комплексная	0,08	23,7	0,70	305,3	0,04	289,3	0,004	1,7	-	23,8

При добавлении в кормовой рацион лабораторных животных культуральных жидкостей с мицелием грибов *C. sinensis* 405 и *C. militaris* 403, по данным гематологических показателей, наблюдалось иммунокорригирующее действие, проявлявшееся в увеличении общего белка в сыворотке крови на 5,4–5,9%, повышении бактерицидной активности крови на 2,7–4,1% и фагоцитарной активности на 3,2–3,9%.

Результаты исследований по изучению антиоксидантного действия мицелия и культуральных жидкостей грибов рода *Cordyceps* на лабораторных животных показали (таблица 4), что содержание глутатиона и антиоксидантных ферментов в крови животных опытных групп были несколько выше, чем в контрольной группе. Так, содержание глутатиона у животных первой опытной группы было выше на 5,3%, второй опытной группы – на 9,7% в сравнении с контролем. Также к концу исследований возрастала активность фермента глутатионредуктазы у животных 2 опытной группы на 7,9%. У животных первой опытной группы данный показатель был в пределах физиологической нормы, однако несколько ниже, чем в контрольной группе и составил $302,95 \pm 63,35$ мкмоль.

Как показали наши исследования, наблюдалась положительная динамика и в показателях глутатионпероксидазы у животных опытных групп. Так, активность глутатионпероксидазы возросла у животных первой опытной группы на 3,3%, а во второй – на 5,8% по сравнению с контролем.

Уникальным свойством глутатионпероксидазы является ее способность разрушать разнообразные гидроперекисные субстраты, в том числе гидроперекиси кортикостероидных гормонов, холестерина, тиамина, ДНК. Разрушая высокотоксичные гидроперекиси липидов, образующиеся в качестве нормальных промежуточных продуктов обмена веществ тканей животных, глутатионпероксидаза предотвращает образование свободного гидроксил-радикала и синглетного кислорода, дезинтегрирующих клеточные и субклеточные мембраны и приводящие к гибели клетки [26].

Таблица 4 – Влияние культуральных жидкостей с мицелием грибов рода *Cordyceps* на содержание глутатиона и антиоксидантных ферментов в крови здоровых крыс

Показатели	Контрольная	1 опытная	2 опытная
Содержание глутатиона, нмоль/г гемоглобина	$17,23 \pm 0,43$	$18,14 \pm 0,56$	$18,90 \pm 0,72$
Активность глутатионпероксидазы, мкмоль глутатиона/час/г гемоглобина	$36,52 \pm 3,80$	$37,72 \pm 4,10$	$38,65 \pm 3,58$
Активность глутатионредуктазы, мкмоль НАДФН/мин/мг гемоглобина	$306,15 \pm 56,22$	$302,95 \pm 63,35$	$330,34 \pm 48,93$

Выводы

Таким образом, исследовано влияние компонентов питательных сред и условий культивирования на рост грибов *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405. Показано, что при глубинном культивировании, их мицелий и культуральная жидкость содержат комплекс биологически активных веществ. Проведено количественное и качественное изучение полисахаридов и нуклеозидов мицелия и культуральной жидкости исследуемых грибов. В

опытах на лабораторных животных установлено, что культуральные жидкости с мицелием *C. militaris* 403 и *C. sinensis* 405 оказывают иммунокорригирующее и антиоксидантное действие.

Список литературы

1. Russell, R. *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? / R. Russell, M. Paterson // *Phytochemistry*. – 2008. – Vol. 69. – P. 1469–1495.
2. Bioactive substances from insect pathogenic fungi / M. Isaca [et al.] // *Acc. Chem. Res.* – 2005. – Vol. 38. – P. 813–823.
3. Holiday, J. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review / J. Holiday, M. Cleaver // *Int. J. of Medicinal Mushrooms*. – 2008. – Vol. 10. – P. 219–234.
4. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects / S.K. Das [et al.] // *Fitoterapia*. – 2010. – Vol. 81. – P. 961–968.
5. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products / X. Zhou [et al.] // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2009. – Vol. 61. – P. 279–291.
6. Kim, H.O. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures / H.O. Kim, J.W. Yun. // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 728–738.
7. Dong, C.H. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture / C.H. Dong, Y.J. Yao // *J. Appl. Microbiol.* – 2005. – Vol. 99. – P. 483–492.
8. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* / I.L. Shih, K.L. Tsai, C. Hsieh // *Biochem. Engineering J.* – 2007. – Vol. 33. – P. 193–201.
9. Koh, J. H. Hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis* as a substitute for antibiotic growth promoters / J.H. Koh, H.J. Suh, T.S. Ahn // *Biotechnol. Lett.* – 2003. – Vol. 25. – P. 585–590.
10. Activation of macrophages and the intestinal immune system by orally administered decoction from cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* / J.H. Koh [et al.] // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2002. – Vol. 66. – P. 407–411.
11. Improvement of sperm production in subfertile boars by *Cordyceps militaris* supplement / W.H. Lin [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2007. – Vol. 35. – P. 631–641.
12. Effect of *Cordyceps militaris* supplementation on sperm production, sperm motility and hormones in sprague-dawley rats / Y. Chang [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2008. – Vol. 36. – P. 849–859.
13. Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract / D.-B. Ji [et al.] // *Phyther. Res.* – 2009. – Vol. 23. – P. 116–122.
14. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 256 с.
15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. Tang, Y.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid / Y.J. Tang, J.J. Zhong // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – Vol. 31. – P. 20–28.
17. Exopolysaccharides of some medicinal mushrooms: production and composition / V.G. Babitskaya [et al.] // *Int. J. of Medicinal Mushrooms*. – 2000. – Vol. 2. – P. 51–54.
18. Гончарова, И.А. Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus* / И.А. Гончарова, В.В. Щерба, В.Г. Бабицкая // *Прикл. биохим. и микробиол.* – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 434–437.
19. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения растений: биосинтез, превращение, функции / М.Н. Запрометов // *Новые направления в физиологии растений*. – М.: Наука, 1985. – С. 143–162.
20. Методы исследования углеводов / Под ред. А.Я. Хорлина. – М.: Мир, 1975. – С. 9–13.
21. Li, S.P. Quality control of *Cordyceps sinensis*, a valued traditional Chinese medicine / S.P. Li, F.Q. Yang, K.W.K. Tsim // *J. of Pharm. and Biomed. Anal.* – 2006. – Vol. 41. – P. 1571–1584.
22. Иванов, А.И. К методике определения поглотительной способности нейтрофилов / А.И. Иванов, Б.А. Чухловин // *Лабораторное дело*. – 1967. – №10. – С. 108–110.
23. Смирнова, О.В. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии / О.В. Смирнова, Т.А. Кузьмина // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 1966. – №4. – С. 8–11.
24. Мильман, Л.С. Методы биологии развития / Л.С. Мильман, Ю.Г. Юровицкий, Л.П. Ермолаева. – М., Наука 1974. – 676 с.
25. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: Справочник / И.П. Кондрахин [и др.]; под ред. И.П. Кондрахина. – М.: КолосС, 2004. – 520 с.
26. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова [и др.]. – М.: Слово, 2006. – 556 с.