

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Учреждение образования

**«Международный государственный экологический институт
имени А.Д. Сахарова»**

Белорусского государственного университета

ФАКУЛЬТЕТ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

КАФЕДРА ИММУНОЛОГИИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИИ

**ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ РОСТА И БИОСИНТЕТИЧЕСКОЙ
АКТИВНОСТИ ГРИБОВ РОДА *CORDYCEPS* В ИСКУССТВЕННОЙ
КУЛЬТУРЕ**

Дипломная работа

Специальность 1-33 01 05 Медицинская экология

Исполнитель:

Студент 4 курса 52073 группы

дневной формы обучения _____ Лобатюк Анна Николаевна

Научный руководитель:

канд. биол. наук _____ Иконникова Наталья Валерьевна

К защите допущена:

Заведующий кафедрой иммунологии

и экологической эпидемиологии

д-р мед. наук, доцент _____ Зафранская Марина Михайловна

РЕФЕРАТ

Дипломная работа: Исследование условий роста и биосинтетической активности грибов рода *Cordyceps* в искусственной культуре: 45 страниц; 6 рисунков, 4 таблицы, 4 формулы, 52 источника.

Грибы рода *Cordyceps*, биологические активные компоненты, полисахариды, условия культивирования, источники углеродного и азотного питания, биомасса.

Цель работы: изучить и проанализировать биосинтетическую активность грибов *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* под влиянием компонентов искусственных питательных сред.

Методы исследования. Культуральные, морфологические. Изучены и отработаны методики глубинного и поверхностного культивирования мицелиальных грибов.

Полученные результаты и их новизна. В работе использовали грибы *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*, полученные из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины и хранящиеся в коллекции лаборатории экспериментальной микологии Института микробиологии НАН Белоруссии. Лучшими источниками углерода для роста и образования полисахаридов у исследуемых грибов оказались глюкоза, сахароза и мальтоза; источниками азота – пептон и кукурузный экстракт. Для полусинтетической питательной среды подобрана оптимальная концентрация глюкозы в среде 30-40 г/л и время культивирования 3 суток.

Степень использования. Дальнейшее изучение грибов рода *Cordyceps* поможет выявить их новые качества и свойства и расширит не только сферу их применения, но и определит альтернативные способы культивирования с увеличением продуктивности выработки биологически активных веществ.

Область применения. Биотехнология, медицина, фармакология.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа: Даследаванне ўмоў росту і біясінтэтычнай актыўнасці грыбоў роду *Cordyceps* у штучнай культуры: 45 старонак: 6 малюнкаў, 4 табліцы, 4 формулы, 52 крыніцы.

Грыбы роду *Cordyceps*, біялагічна актыўныя кампаненты, полісахарыды, умовы культывавання, крыніцы вугляроднага і азотнага сілкавання, біямаса.

Мэта работы: Вывучыць і прааналізаваць біясінтэтычную актыўнасць грыбоў *Cordyceps sinensis* і *Cordyceps militaris* пад уплывам кампанентаў штучных пажыўных асяроддзяў.

Метады даследавання. Культуральныя, марфалагічныя. Вывучаны і адпрацаваны метадыкі глыбіннага і паверхневага культывавання мицэліяльных грыбоў.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. У працы выкарыстоўвалі грыбы *Cordyceps sinensis* і *Cordyceps militaris*, атрыманыя з калекцыі культур шапачкавых грыбоў Інстытута батанікі НАН Украіны і якія захоўваюцца ў калекцыі лабараторыі эксперыментальнай мікалогіі Інстытута мікрабіялогіі НАН Беларусі. Лепшымі крыніцамі вугляроду для росту і адукацыі полісахарыдаў у доследных грыбоў апынуліся глюкоза, сахароза і мальтоза; крыніцамі азоту - пептон і кукурузны экстракт. Для паўсінтэтычнай пажыўнай асяроддзя падабрана аптымальная канцэнтрацыя глюкозы ў асяроддзі 30-40 г / л і час культывавання 3 сутак.

Ступень выкарыстання. Далейшае вывучэнне грыбоў роду *Cordyceps* дапаможа выявіць іх новыя якасці і ўласцівасці і пашырыць не толькі сферу іх прымянення, але і вызначыць альтэрнатыўныя спосабы культывавання з павелічэннем прадуктыўнасці выпрацоўкі біялагічна актыўных рэчываў.

Вобласць прымянення. Біятэхналогія, медыцына, фармакалогія.

ABSTRACT

Graduate work: Study of the growth conditions and biosynthetic properties by the fungi of the genus *Cordyceps* in artificial culture: 45 pages: 6 figures, 4 tables, 4 formulas, 52 sources.

Fungi of the genus *Cordyceps*, biologically active components, polysaccharides, cultivation conditions, sources of carbon and nitrogen nutrition, biomass.

Objective: To study and analyse biosynthetic activity of the fungi *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* under influence of components artificial nutritive media.

Methods of research. Cultured, morphological. The methods of deep and surface cultivation of mycelial fungi have been studied and developed.

The results obtained and their novelty. The fungi *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*, obtained from the hatchery culture collection of the Botanical Institute of National Academy Sciences of Ukraine and stored in the collection of the experimental mycology laboratory of the Microbiology Institute of the National Academy Sciences of Belarus, were used in the work. The best sources of carbon for the growth and formation of polysaccharides in the fungi studied were glucose, sucrose and maltose; sources of nitrogen - peptone and corn extract. For a semi-synthetic nutrient medium, the optimum glucose concentration in the medium is 30-40 g / l and the cultivation time is 3 days.

Degree of use. Further study of the fungi of the genus *Cordyceps* will help to reveal their new qualities and properties and will expand not only the scope of their application, but will also determine alternative methods of cultivation with an increase in the productivity of the biologically active substances.

Application area. Biotechnology, medicine, pharmacology.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1 Структура и место обитания гриба рода <i>Cordyceps</i>	9
1.2 Биологически активные вещества гриба рода <i>Cordyceps</i>	11
1.3 Полисахариды и их синтез грибами рода <i>Cordyceps</i>	13
1.4 Культивирование грибов рода <i>Cordyceps</i>	18
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	26
2.1 Объект исследования.....	26
2.2 Методы исследования	27
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	30
3.1 Влияние различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов у <i>C. sinensis</i> и <i>C. militaris</i>	30
3.2 Влияние исходных концентраций глюкозы на динамику роста грибов <i>C. sinensis</i> и <i>C. militaris</i>	32
3.3 Влияние различных источников азота на рост и содержание полисахаридов у <i>C. sinensis</i> и <i>C. militaris</i>	35
3.4 Влияние исходных концентраций дрожжевого экстракта на выход биомассы и полисахаридов у грибов <i>C. sinensis</i> и <i>C. militaris</i>	38
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	42

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Водорастворимый полисахарид	- CPS-1
Интерферон	- IFN
Один из полисахаридов кордицепса, которые построен в основном из α -(1→4)-D-глюкозы и α -(1→3)-D-маннозы, с ответвлениями α -(1→4,6)-D-глюкозы на каждые двенадцать остатков в среднем.	- CPS-2
Полисахарид, участвующий в активации тромбоцитов.	- CME-1
Полисахаридные кислоты	- APSF
Полисахариды кордицепса	- CP
Супероксиддисмутаза	- SOD
Фракция экзополисахарида	- EPSF

ВВЕДЕНИЕ

Создание эффективных функционально-корректирующих препаратов, выступающих как лечебно-профилактические средства для вспомогательной терапии, весьма актуально на сегодняшний день. Особую актуальность приобретает применение препаратов естественного происхождения. Повысить адаптационные резервы организма призваны функциональные продукты, основой которых во многих странах мира становятся лекарственные грибы, синтезирующие уникальный комплекс биологически активных веществ. Среди грибов особый интерес представляют грибы рода *Cordyceps*.

Cordyceps является традиционным лекарством и средством профилактики Восточной медицины многие столетия. Соединения, входящие в состав этого лекарственного гриба, улучшают состояние иммунной системы, усиливают резистентность к различным патогенным микроорганизмам, оказывают противоопухолевое действие, повышают адаптационные возможности организма, обладают антиоксидантной активностью, препятствуют процессам старения [44, 36].

Применение биомассы грибов в качестве кормовых добавок является достаточно новым направлением [52]. Грибной мицелий богат белковыми веществами, которые имеют достаточно высокую биологическую ценность и хорошо усваиваются организмом. [40].

Искусственное выращивание грибов отчасти решило бы проблему отходов сельского хозяйства и лесной промышленности, так как в качестве субстрата используются солома, лузга подсолнечника, опилки, стебли кукурузы и т. д. После сбора урожая грибов использованный субстрат, пронизанный грибницей, оказывается обогащенным съедобным грибным белком и становится хорошей кормовой добавкой для сельскохозяйственных животных, а также для обогащения органическими веществами почвы под садовыми и огородными культурами [38].

Технология выращивания большинства грибов разработана достаточно хорошо. Однако и на сегодня актуальными являются задачи по разработке мер стимулирования роста, развития и урожайности грибов, вопросы подбора оптимальных питательных сред для выращивания грибов и повышения выхода биомассы и биологически активных соединений при минимальных производственных затратах [50].

Цель работы – изучить влияние компонентов питательных сред на рост и биосинтетическую активность грибов *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*.

Задачи:

- изучить особенности роста грибов рода *Cordyceps* в глубинных условиях;
- изучить влияние различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов у *C. sinensis* и *C. militaris*
- изучить влияние различных концентраций глюкозы на динамику роста грибов *C. sinensis* и *C. militaris*
- изучить влияние различных источников азота на рост и содержание полисахаридов у *C. sinensis* и *C. militaris*
- изучить влияние различных концентраций дрожжевого экстракта на выход биомассы и полисахаридов у грибов *C. sinensis* и *C. militaris*
- подобрать условия культивирования для накопления максимального количества биомассы мицелия грибов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Структура и место обитания гриба рода *Cordyceps*

Кордицепс – это гриб, который паразитирует на гусеницах определенного вида бабочек. Микроскопические грибки рода *Cordyceps* относятся к классу аскомицеты, или сумчатые грибы *Ascomycetes*, который является наиболее многочисленным и включает до 30000 видов. Представители этого класса характеризуются наличием хорошо разветвленного мицелия с перегородками [24]. В результате полового процесса у типичных представителей из зиготы образуется аскогенные гифы, на которых возникают сумки. Сумка - это репродуктивный орган; в ней образуется споры, с помощью которых происходит дальнейшее размножение особи. Споры распространяются токами воздуха, каплями дождя, при помощи насекомых [7]. *Cordyceps* паразитируют на плодовых телах базидиальных, реже сумчатых грибов, а в зимнем периоде в коконе некоторых насекомых. Кордицепс китайский обитает условиях высокогорья на высоте 3500м в Тибете в провинциях Сычуань, Юньнань, Цинхай. Тело этого гриба богато питательными веществами и специфическими биологически активными компонентами.

Кордицепс очень высоко ценится на востоке за свои тонизирующие и лечебные свойства. В китайской медицине этот гриб используется в течение нескольких столетий для быстрого восстановления сил. Лечебные свойства кордицепса были подтверждены многочисленными экспериментальными и несколькими клиническими исследованиями. Препараты кордицепса улучшали параметры иммунитета, снижали уровень холестерина, повышали устойчивость тканей печени и почек к повреждениям. Не было обнаружено каких-либо побочных эффектов [48].

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 [6,11,22]. Однако физиологические потребности грибов рода *Cordyceps*, а также их способность продуцировать биологически активные

вещества при глубинном культивировании на жидких питательных средах изучены недостаточно.

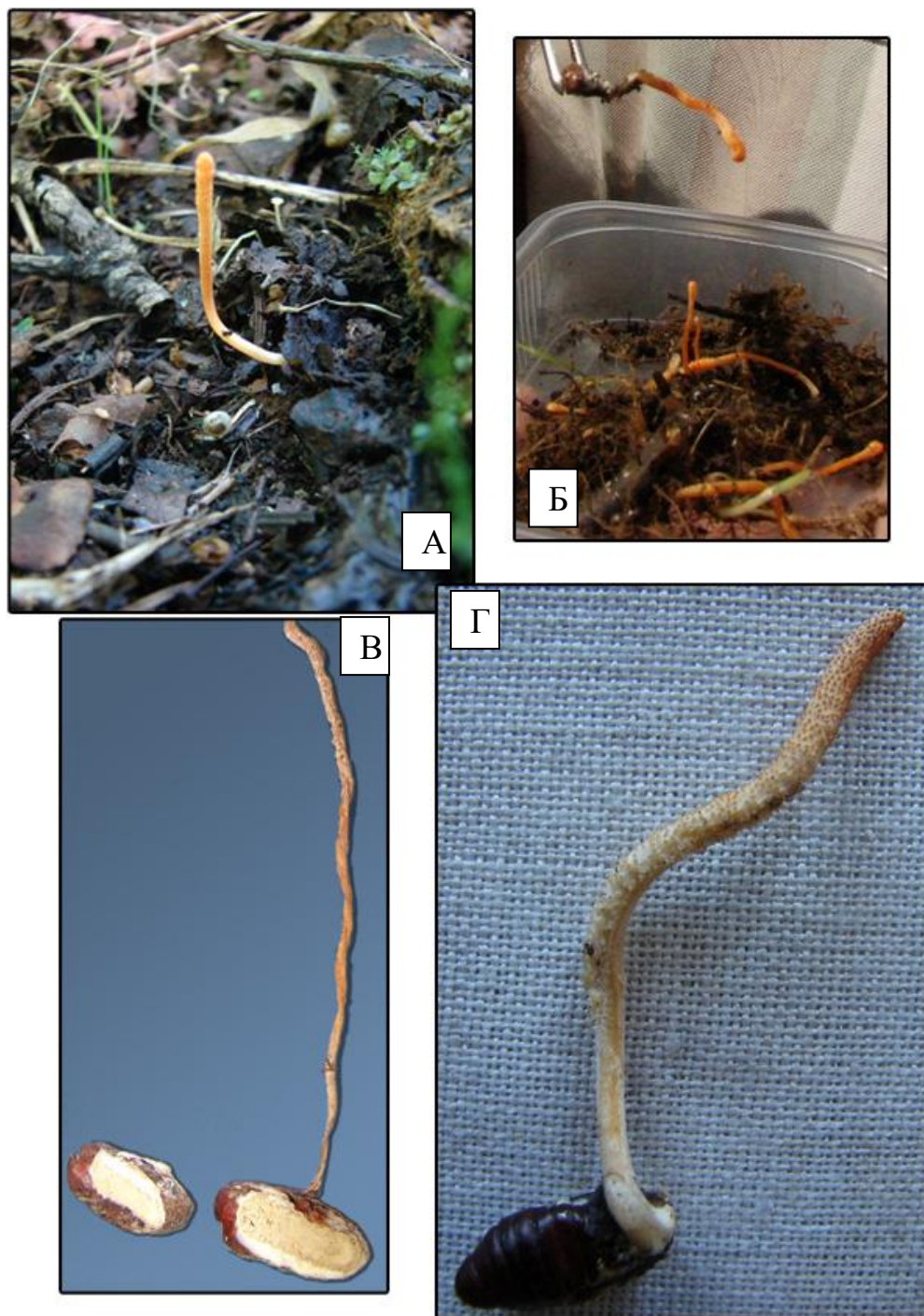


Рисунок 1 – Строение гриба рода *Cordyceps*

А - строма гриба *C. militaris* в лесной подстилке; Б - собранные из природных местообитаний насекомые, зараженные *C. militaris*; В - продольный разрез кокона насекомого, заполненного склеротием со стромой *C. militaris*; Г – куколка чешуекрылых со стромой *C. militaris*

В основе технологии получения активных метаболитов грибов рода *Cordyceps* находится способность этих грибов вызывать инфекционное заболевание у насекомых. Энтомофильные и энтомопатогенные грибы, вирулентные по отношению к насекомым, принадлежащим к разным отрядам, встречаются в нескольких родах, таких как *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Cordyceps*, причем виды последнего рода можно отнести к грибам с умеренной вирулентностью. При заражении насекомых грибами этих родов возникает заболевание, которое часто заканчивается гибелью насекомых с признаками мускардиноза (мумифицирования). Таким образом, природное лекарственное сырье, например *C. sinensis* представляет собой комплекс “гриб-насекомое” [49].

1.2 Биологически активные вещества гриба рода *Cordyceps*

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 [39].

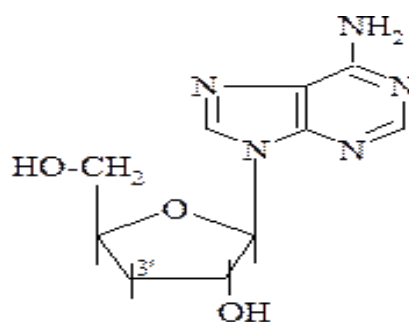
Кордицепс содержит 18 аминокислот, в т. ч. такие, которые являются материальной основой для укрепления и повышения иммунитета: аспарагиновая кислота, треонин, серин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин, цистин. В гусенице коконопряда кордицепса содержится 19 аминокислот, в т. ч. разлагаемый во время гидролиза триптофан. При сопоставлении отдельных частей кордицепса показано, что содержание аминокислот снижается в ряду: строма > комплекс кордицепса > гусеница [46].

Ценными составляющими кордицепса являются нуклеозиды (аденозин и кордицепин - аналог дезоксиаденозинтрифосфорной кислоты) и не только потому, что усиливают регенерацию клеток (входят в состав ДНК и РНК), высокая концентрация аденозина делает кордицепс сильным сосудистым релаксантом. Поэтому его издавна применяли при недостаточном питании кровью сердца, мозга, нижних конечностей. Относительно недавно ученые выяснили влияние аденозина на образование тромбов. Это открытие делает

кордицепс безопасной альтернативой аспирина для снижения риска инфарктов и инсультов у больных сердечно-сосудистой патологией [47].

Выделены и идентифицированы содержащиеся в кордицепсе нуклеотиды: из естественного кордицепса получены кордицепин, аденин, гуанин, оксипурин, карнин, урацил, адениловая кислота, дезоксиаденозин, тимидин и др. Из ферментатов естественного и искусственно культивируемого кордицепсов получены аденин, адениловая кислота, дезоксиаденозин, урацил, гуаниловая кислота. Из искусственно культивируемого кордицепса выделены тимидиловая кислота и урацил [46].

Кордицепин (*3' Deoxyadenosine*) – нуклеозид, оказывающий выраженное иммуномодулирующее и антиоксидантное действие. Аденозин признан одним из важнейших иммуномодуляторов тонуса кровеносных сосудов на уровне тканей [27]. Препараты кордицепина, полученные различными разработчиками (преимущественно китайскими, японскими, корейскими), обладают высокой эффективностью в борьбе с опухолями, вирусными и бактериальными инфекциями [39].



Кордицепин

Рисунок 2 - Структура кордицепина

Стерины, выделенных из кордицепса и искусственного фермента, насчитывают 9, пептидов — 6.

В кордицепсе на куколке содержатся D-маннитол, эргостерин и его перекись, ситостерин и пятиатомные спирты — рибиты. D-маннитол — может удалять свободные радикалы кислорода и повышать антиоксидантные свойства, замедляя старение клеток и восстанавливая клетки эпителия. Эргостерин является важным сырьём для фармацевтической промышленности. В клинике он употребляется для лечения тромбоза сосудов головного мозга, церебральной эмболии, вазоспазма, почечной недостаточности, обладает диуретическим, антиоксическим действием, способствует нормализации обмена веществ. Кроме того, эргостерин является характерным компонентом клеточной стенки грибов, его содержание в кордицепсе на куколке относительно определенное [2].

Фермент супероксиддисмутаза (SOD) является биоактивным белком, уничтожает свободные радикалы кислорода, образующиеся в организме в процессе обмена веществ, является ключевым ферментом в предупреждении разных болезней и наступления преждевременной старости. В последние годы фермент SOD очень широко применяется в области производства продуктов, косметических средств, медикаментов и предметов санитарии.

В кордицепсе на куколке содержится большое количество минеральных веществ, среди которых уже установлено 36 микроэлементов, включая Fe, Cu, Zn, Mn, Cr, Se, Co, объявленные ВОЗ необходимыми для здоровья человеческого организма. Кордицепс на куколке эффективен для укрепления лёгких и улучшения работы почек, возможно, одной из причин тому является высокое содержание Fe и Mn. Поскольку кордицепс на куколке богат фосфором, этим может объясняться его эффективность в клинике нервных болезней [45]. Среди всех микроэлементов «королем» против рака является селен. Содержание селена в кордицепсе достигает 0,54 ppm, что в 5,8 раза выше, чем в трагаканте (растение рода астрагал семейства бобовых) который, как считается, очень богат селеном. По литературным данным, когда соотношение Zn и Cu в человеческом организме достигает 1:14, начинает повышаться уровень холестерина, что увеличивает риск заболевания ишемической болезнью сердца. В кордицепсе соотношение Zn и Cu находится в пределах 4,5-5,5 поэтому он считается полезным для предупреждения и лечения ишемической болезни сердца.

Кордицепс на куколке содержит многие витамины, включая A, B12, B2, B1, B6, C, D, E, PP (никотиновая кислота) и каротин b. Из плодового тела кордицепса выделены пальмитиновая, олеиновая и линолевая кислоты, стерин и его перекись, цереброзид B и кордицепин. В клеточном метаболизме они играют ключевую роль. Цереброзид B, входящий в состав миелиновой оболочки нервных волокон, оказывает противораковое, противовирусное (в отношении вирусов гепатита) и иммуностимулирующее действие [4, 46].

1.3 Полисахариды и их синтез грибами рода *Cordyceps*

Основными действующими компонентами кордицепса являются: полисахариды, кордицепин (3-деоксиаденозин, *3-deoxyadenosine*), аденозин, аденин, кордицепсовая кислота, убихинон (коэнзим Q10), офиокоордин, аминокислоты, витамины и микроэлементы [48].

Углеводы составляют 43% сухого веса гриба и представлены d-маннитолом и полисахаридами, которые мощно влияют на иммунитет, обмен веществ, являются естественными протекторами от стрессов и антиканцерогенами [47].

В грибном царстве, и особенно в грибах рода *Cordyceps*, полисахариды, пожалуй, являются наиболее известными и изученными из медикаментозных активных соединений. [6,22] Были выявлены и важные производные сахаров, как например кордицепиновая кислота (D-маннит). Исследования показали, что эти полисахариды эффективны при регулировании уровня сахара в крови и обладают антиметастатическим и противоопухолевым эффектами [10, 28].

По сравнению с бактериальными и синтетическими полисахаридами лекарственных грибов не имеют побочных эффектов и характеризуются низкой токсичностью, что даёт им значительное преимущество при разработке иммуномодулирующих, противоопухолевых и ранозаживляющих средств [31].

Полисахариды — компоненты, улучшающие работу неспецифической иммунной системы, могут регулировать работу сердца и печени, улучшать метаболизм, микроциркуляцию крови; помогают восстанавливать клетки эпителия и воздействуют на функцию кроветворения, стимулируя генерацию стволовых клеток (вырабатываемых костным мозгом), грануломононуклеарных тканевых клеток и фибробластов. В последнее время установлено, что полиозы кордицепса активируют иммунокомпетентные клетки, особенно лимфоциты и лимфатические факторы, систему моноядерных макрофагов и клетки НК, способные обеспечивать надлежащий надзор за своевременным уничтожением злокачественных и мутировавших клеток [46].

Cordyceps sinensis содержит большое количество полисахаридов, которые могут составлять 3% - 8% от общей массы. Полисахариды *Cordyceps* подразделяются на внеклеточные и внутриклеточные полисахариды. Большое количество экспериментальных данных показало, что полисахариды грибов имеют широкий диапазон биоактивности, включая противоопухолевую, против вируса гриппа, гипогликемическую, гипохолестеринемический и антиоксидантные эффекты. Другие исследования показали, что фармакологическая активность полисахаридов коррелирует с их характеристиками. Например, высокая молекулярная масса полисахаридов определяет противоопухолевую активность. Доказано, что противоопухолевая активность полисахаридов грибов связана с молекулярным весом, если его молекулярная масса более 16000 кДа. Кроме того, десять моносахаридов, а именно: рамноза, рибоза, арабиноза, ксилоза, манноза, глюкоза, галактоза, маннит, фруктоза и сорбоза в 13 образцах природного и культивированного *C. sinensis*, были качественно и количественно проанализированы. Чаще всего полисахариды Кордицепса состоят именно из этих моносахаридов, и они играют заметную роль в организме. Полисахариды являются основным

источником фармакологических свойств *C. sinensis*. Тем не менее, для доказательной базы дополнительной и альтернативной медицины его применение было ограничено до сих пор из-за недостатка знаний о нем.

Фракция экзополисахарида (EPSF), гетерополисахарид, был извлечен из искусственно выращенного *C. sinensis*. Культурный супернатант собрали, а затем обработали три раза 95% этилового спирта для осаждения. В результате, осадок содержал большое количество EPSF. EPSF имеет большое количество фармакологических эффектов; два из наиболее важных являются иммуномодулирующими и противоопухолевыми свойствами. EPSF может собирать свободные радикалы, которые индуцируют дифференцировку раковых клеток, и повышать противоопухолевой способностью через активацию различных иммунных реакций хозяина. Таким образом, видно, что повышение иммунитета является очень полезным в терапии опухолей [12, 16]. Исследования показали, что зрелые РС (дендритные клетки) являются важными модуляторами иммунного ответа и их способность инициировать цитотоксический Т-лимфоцитов является очень ценной в иммунотерапии рака, и созревание РС является критическим фактором для инициации иммунного ответа. EPSF-1, представляет собой экзополисахарид, произведенный из лекарственного гриба Кордицепс. Недавние исследования показали, что сульфатированные EPSF-1 производные обладают сильными антиоксидантными свойствами. Так, сульфатация была эффективной и выгодной стратегией для улучшения физико-химических свойств и биологической активности грибных полисахаридов.

Полисахаридные кислоты (APSF) были выделены из окультуренных *C. sinensis* мицелия путем ионного обмена и хроматографии. APS состоит из маннозы, глюкозы и галактозы в приблизительном молярном соотношении 3.3 : 2.3 : 1. APS обладает защитным действием на клетки pc12 от H₂O₂-индуцированного повреждения. Однако антиоксидантный механизм APSF остается неясным и требует дальнейшего изучения. В виду того, что кислоты в полисахаридной фракции (APSF), извлеченные из *C. sinensis*, оказывают стимулирующее воздействие на макрофаги. APSF может конвертировать M2 фенотип макрофагов для активации NK. Следовательно, APSF обладают иммуномодулирующим действием, как и многие другие полисахариды.

Водорастворимый полисахарид, названный CPS-1 был выделен из *C. sinensis* мицелия экстракцией горячей водой, осаждением этанолом, анион-обменной и гельпроникающей хроматографией. CPS-1 это глюкоманнан, - галактан с соотношением моносахаридов: глюкоза: манноза: галактоза = 2.8 : 2.9 : 1. (1→4) и (1→3,6) навеска глюкозы составила основу CPS-1. Исследования показали, что CPS-1 обладает сильным антиокислительным

действием, которое может быть использовано для снижения уровня глюкозы в крови и лечения почечной недостаточности. С одной стороны, CPS-1 может “собирать” гидроксильные радикалы, снижая при этом Fe^{2+} -энтеросорбенты. Это указывает на связь между антиокислительной активностью и репарации почечной недостаточности. С другой стороны, CPS-1 стимулирует работу поджелудочной железы выделением инсулина и/или уменьшает метаболизм инсулина, так полисахарид может лечить диабет [34, 16].

CPS-2 - один из полисахаридов кордицепса, которые построен в основном из α -(1→4)-D-глюкозы и α -(1→3)-D-маннозы, с ответвлениями α -(1→4,6)-D-глюкозы на каждые двенадцать остатков в среднем. CPS-2, который появился как белый порошок, продемонстрировал значительную терапевтическую активность против хронической почечной недостаточности. Недавно, основа молекулярного механизма была изучена учеными, которые установили, что CPS-2 может снизить ВВ-индуцированный фактор роста полученный из тромбоцитов [25, 16].

Нейтральный манноглюкан с молекулярной массой $7,7 \times 10^3$ Да, полученный из 0.05 М буфера ацетата экстракта мицелия *C. sinensis*. Это разветвленный полисахарид в основе которого находятся (1→4)- и (1→3)-связанные остатки D-глюкозы. Кроме того, Манноглюкан показал слабую цитотоксическую активность в отношении линии раковых клеток SPCI и отсутствие явной цитотоксической активности против VCAP37 и SW480 линий клеток рака. Аналогичным образом в водорастворимой полисахаридной фракции, СМЕ-1, с молекулярной массой 27,6 кДа, был подготовлен из мицелия Кордицепса и идентифицирован методами ЯМР и GC-MS. Ученые определили, что СМЕ-1 может защитить RAW264.7 клетки от окислительного стресса путем ингибирования активности SMase и снижением C16 - и C18-керамидного уровней. Кроме того, был выделен новый компонент под названием кордиглюкан (1-3- β -D-глюкан). Было обнаружено, что он оказывает мощное противоопухолевое действие, которое может быть связано с его (1→3)- β -D-глюкан связью. Кроме того, два других полисахарида, названные CS-F10 и кордицинокан, были извлечены из культивированного мицелия Кордицепса, соответственно. Они обладают гипогликемической активностью, которая может привести к снижению уровня глюкозы [16].

Значительный интерес как биологически активные вещества, обладающие иммуномодулирующими, противоопухолевыми, радиопротекторными и противовоспалительными свойствами, представляют 1-3-, 1-6-D-глюканы. D-глюканы являются полифункциональными веществами, которые заключены в клеточной стенке грибов [26].

В основе биологической активности D-глюканов лежат прежде всего их иммуностимулирующие свойства, хотя радиопротекторное действие может быть обусловлено способностью D-глюканов связывать свободные радикалы, противоопухолевое — появлением регрессирующего опухоли фактора в ответ на введение глюкана, противовоспалительное действие — появлением в сыворотке крови фактора, стимулирующего продукцию транспортных белков острой фазы [42].

Бета-D-глюкан является одним из классов полимеров, который как было показано увеличивает врожденный и клеточный иммунитет. Эти полисахариды увеличивают производство таких цитокинов, как TNF-а, интерлейкинов, интерферонов, NO, и антител, активированных иммунными клетками. Эта активация иммунной реакции может быть вызвана взаимодействием полисахаридов со специфическими рецепторами на поверхности клеток иммунной системы, называемыми CR3 рецепторы. Исследователи также полагают, что полисахариды участвует в механизмах клеточной связи, возможно, действуя в качестве посыльного молекул [43].

Лентинан представляет собой полисахарид с молекулярной формулой $(C_6H_{10}O_5)_n$, и средним молекулярным весом 5×10^5 Da. Как показал электрофорез, ультрацентрифугирование и другие химические методы это 1-3/1-D-глюкан. В настоящее время считают, что D-глюкан связывается с поверхностным слоем лимфоцита или со специфическим сывороточным белком, который активирует макрофаги, Т-клетки, НК-клетки и другие эффекторные клетки. Это приводит к увеличению продукции антител, интерлейкинов (IL-1 и IL-2) и интерферона (IFN). Таким образом, канцеростатический эффект есть результат активации иммунной системы хозяина [41].

Существует вариация в содержании полисахаридов в разных родах *Cordyceps*. Было обнаружено, что содержание полисахаридов в мицелии *C. sinensis* составляет 157,3 мг / г. Хотя для сравнения содержание сахаров между корпусом (частью насекомого) и плодом тела (аской) было несколько иным (24,2 и 24,9% соответственно), содержание в мицелии было выше (39,4%), Колориметрическим анализом с использованием антрона и серной кислоты ученые обнаружили, что содержание полисахаридов в *C. sinensis* и *C. hawkesii* составляло 3,5 и 0,7% соответственно, что было намного ниже, чем у *C. sinensis*.

C. militaris рассматривается как идеальный вид кордицепса и может хорошо культивироваться в твердой или жидкой культуре. Были изучены нелетучие компоненты в плодовых телах и мицелии *C. militaris* и обнаружили, что общий уровень сахаров составил 260,64 и 389,47 мг / г соответственно, но

снижение содержания сахара в плодоносящем теле было выше, чем у мицелия. Исследование содержания полисахаридов в организме плодоносного тела Кордицепса, строме, склеротиуме и мицелие показало, что самое высокое содержание сахаров (86,49 мг / г) в плодоносящем теле, за которым следуют строма и склероций. В искусственной среде содержание СР (полисахариды кордицепса) в сухом веществе составляло 0,14%.

C. sobolifera, также известный как *chanhua*, *chanyongcao*, *chanrong* и т. Д. В Китае, обладает освежающим и охлаждающим эффектом и используется как относительно редкий препарат для улучшения остроты зрения, снижения лихорадки, детоксикации, снятия судорог и других целей. Однако об этом мало что известно. Чтобы узнать основные активные компоненты и облегчить дальнейшую разработку и использование. Было изучено содержание СР в *C. sobolifera* и выяснено, что он составлял 94,88 мг / г, что было значительно выше, чем у *C. militaris* (32,30 мг / г), но несколько ниже, чем у *C. sinensis* (125,68 мг / г).

C. gunnii, другой вид рода, представляет собой крупный кордицепс, расположенный у личинок *Hepialidae*, и впервые был зарегистрирован в 1983 году Ляном. *C. gunnii* и его анаморфы имеют богатые биологически активные вещества. Полисахарид обладает уникальными фармакологическими эффектами и имеет хорошие перспективы развития и ценность использования. Выращивание *C. gunnii* для разных периодов роста показало, что накопление полисахарида в мицелии было медленным, но увеличилось в фазе логарифмического роста и было максимальным при 28,2 мг / г. Оценка содержания СР в строме, паразитированном червях, целломорфе и мицелии показала, что она максимальна в мицелии, за ней следует строма [34].

1.4 Культивирование грибов рода *Cordyceps*

Широкому распространению кордицепса до недавнего время препятствовало то, что его ресурсы в природе ограничены. Сбор личинок насекомых, зараженных этим грибом-паразитом, происходит в ограниченное время в труднодоступных районах, поэтому рыночная цена за 1 кг природного кордицепса достигает примерно 1200-1300 долларов США. В настоящее время для получения препаратов на его основе используется мицелий, полученный биотехнологическим путем. При этом стоимость получаемого продукта значительно снизилась, а объем продаж расширился [8, 40].

Промышленное производство биологически активных добавок на основе *Cordyceps* диктует необходимость разработки современных интенсивных технологий культивирования этих грибов в искусственных условиях. С 1950 г. началось искусственное выращивание *Cordyceps* в лабораториях. Важной задачей современной грибной индустрии является

создание новых технологий, позволяющих при незначительном повышении материальных затрат получить высокий урожай. Выявлению различных факторов, влияющих на продуктивность, посвящен ряд работ [5, 51].

Существует три способа культивирования грибов: поверхностное, твердофазное и глубинное.

Поверхностное культивирование – это способ культивирования мицелия на поверхности жидкой среды без перемешивания в виде пленки.

Второй способ характеризуется развитием мицелия не только на поверхности, но и в толще субстрата. Этот способ культивирования используют для получения плодовых тел гриба. В качестве субстратов используют пшеничные отруби, картофельную мезгу, свекловичный жом, солодовые ростки и др. Твердофазное культивирование микроскопических грибов было одним из первых способов промышленного получения ферментных препаратов [32]. На процесс накопления биологически активных компонентов грибами при их твердофазном культивировании оказывают следующие влияния: технологические условия – состав и структура питательной среды, ее влажность, температура в слое, относительная влажность и температура воздушной среды в растительной камере, длительность развития культуры, вид посевного материала.

Глубинную культуру выращивают на жидкой питательной среде при постоянном перемешивании и энергичной аэрации в герметически закрытых аппаратах и в стерильных условиях. Показано ускорение роста мицелия в условия глубинного культивирования по сравнению с другими способами [30].

Наиболее распространено твердофазное культивирование *Cordyceps* с использованием субстратов на основе шелковичных червей или зерна. Установлено сходство биохимического состава плодовых тел и мицелия *Cordyceps*, поэтому выращивание плодовых тел не является необходимым для получения качественных фармацевтических продуктов [21].

Из-за невозможности стандартизации продаваемого на китайских рынках сырья натурального кордицепса, возможности контаминации его свинцом, более безопасно использовать искусственно выращенный мицелий [20].

Перспективным способом получения биомассы и метаболитов грибов рода *Cordyceps* является глубинное культивирование, позволяющее за короткое время получать стандартные продукты с заданными свойствами. Однако, сведения об образовании полисахаридов и других БАВ при погруженном культивировании ограничены. По данным литературы, для

выращивания *Cordyceps* используются полусинтетические питательные среды или на основе мелассы [6].

Глубинное культивирование способствует более быстрому и продуктивному росту аэробных микроорганизмов, в том числе аскомикотов, по сравнению с поверхностным культивированием на жидких средах [37].

В методе, в основном используемом в Китае, известном как метод культуральной жидкости или ферментации, организм вводят в бак со стерильной жидкой средой, которая содержит необходимые питательные компоненты для быстрого роста мицелия. Мицелий затем собирают из жидкого бульона и высушивают. Внеклеточные соединения, синтезируемые грибом во время роста, отбрасываются с потраченным бульоном, что представляет собой основные потери биологически активных соединений [29]. Второй метод выращивания твердой подложки использует большинство производителей в Японии и Америке. Мицелий выращивают в пластиковых пакетах или стеклянных банках, полных стерилизованной среды, которая почти всегда содержит зерновые (как правило, рис, пшеницу, рожь или сорго). После некоторого прироста мицелия, он собирается вместе с остатками зерна. Хотя этот метод наиболее легок в применении и лучше всего освоен, он имеет один недостаток: содержание зерновых в конечном продукте может превышать содержание мицелия гриба. Вторичные метаболиты в данном случае собирают вместе с подложкой и мицелием. Подложками для большинства китайских производителей является жидкая среда, основанная на остатках шелкопряда, с добавлением углеводов и минералов. Новейшие подложки для культивирования *Cordyceps* богаты антиоксидантами кукурузы, что, как показали аналитические тесты, ведет к увеличению доли активных соединений и скорости роста [23].

Важнейшими факторами, регулирующими рост и метаболизм грибов в культуре, являются температура, рН питательной среды и аэрация. Они обуславливают физиологическую активность культур, в том числе влияют на свойства клеточных стенок, транспорт питательных веществ, скорость роста и характер метаболизма, а также способность усваивать те или иные источники питания [18].

Выращивание грабов рода *Cordyceps* в искусственных условиях требует изучения их отношения к факторам внешней среды, которые регулируют накопление биомассы или желаемых продуктов метаболизма. Изучение питательных потребностей позволило установить физиологические особенности штаммов, а также использовать полученные результаты в дальнейшей работе по оптимизации питательных сред, выбору субстратов для крупномасштабного культивирования [3]. На жидких синтетических

питательных средах исследовали рост при различном значении показателя концентрации водородных ионов (рН) в питательной среде, различных значения температуры и аэрации, на питательных средах с разными источниками углерода, азота, стимуляторами и т.д.

Проведенные исследования показали, что грибы рода *Cordyceps* при глубинном культивировании на оптимизированных питательных средах синтезируют полноценный комплекс биологически активных соединений. Установлено, что путем изменения температуры, рН среды и интенсивности аэрации можно регулировать их соотношение в биомассе [1].

Существенное влияние на синтез биологически активных соединений оказывает температура культивирования. Так, исследования в этой области показывают, что оптимальные температуры для активного роста, синтеза полисахаридов и липидов у *Cordyceps* не совпадают: максимальное количество биомассы отмечается при температуре 20-22 °С, полисахаридов и липидов – при 25-28 °С. Также отмечено, что с понижением температуры культивирования увеличивается общая насыщенность липидов за счет повышения удельного веса пальмитиновой и стеариновой кислот. Повышение температуры культивирования до 26 и 30-32 °С приводит к увеличению ненасыщенности за счет усиленного синтеза линолевой кислоты [9, 36].

Важным фактором, определяющим рост и физиологическую активность грибов, является активная кислотность среды культивирования (рН). Большинство видов способно расти при значительных изменениях показателей кислотности, хотя для многих оптимальные значения находятся в пределах рН 5,0-6,0. Грибы, принадлежащие одной и той же экологической или систематической категории, могут значительно отличаться по отношению к исходному рН среды, изменяя его в благоприятную или неблагоприятную для роста сторону.

В связи с этим представляется необходимым предварительно установить те пределы рН, в которых происходит активный рост исследуемых штаммов. Учитывая при этом, что оптимальный рН среды будет различным на разных стадиях и будет зависеть от других условий культивирования.

Установлено, что изменение рН среды для культивирования грибов *Cordyceps* с 4,0 до 9,0 не влияет на выход биомассы, оказывая, вместе с тем существенное влияние на синтез полисахаридов и липидов. Наиболее активное образование липидов и полисахаридов происходит при рН 5,0-6,0. Изменение рН среды в кислую или щелочную зону снижает общий выход липидов в 1,5-1,7 раза, эндополисахаридов с 12,0 до 9,0 % и экзополисахаридов - с 4,0 до 2,5 г/л. Изменение рН среды с 4,0 до 9,0 не оказывает существенного влияния на жирнокислотный состав липидов.

Режим механического перемешивания оказывает значительное влияние на рост *Cordyceps*. Культура выращивается в колбах на круговых качалках, что способствует интенсивной аэрации. При культивировании без механического перемешивания и при низких скоростях перемешивания *Cordyceps* развивается медленно и биомасса маленькая [36].

Таким образом, на пути к созданию препаратов на основе грибов рода *Cordyceps*, важным этапом является оптимизация питательных сред для наиболее продуктивного культивирования с максимальным выходом биологически активных соединений. Данная оптимизация подразумевает, в первую очередь, определение источников углеродного и азотного питания, дающих наибольший выход биомассы гриба и БАВ.

Углеводсодержащие субстраты играют главную роль в питании грибов, обеспечивая грибной организм углеродом, необходимым для синтеза веществ живой клетки и участия в процессах окисления, где он является единственным источником энергии. В естественных условиях грибы сталкиваются с большим разнообразием углеводов, чаще всего с полимерными формами простых сахаров. При искусственном культивировании они предпочитают сахара другим источникам углерода [17]. В биотехнологии обычно в качестве источника углеводов в питательные среды вносят отходы других производств (меласса, гидролат, патока, жом свекловичный и другие) и индивидуальные сахара: моносахариды (ксилоза, глюкоза), дисахариды (сахароза, лактоза), трисахарид (рафиноза), полисахариды (крахмал). Интенсивность роста грибов, культивируемых на питательных средах с разными источниками углерода, различается.

Любое органическое вещество вначале расщепляется до более простых соединений, а последние вовлекаются в тот или иной биосинтетический процесс. Возникающая при расщеплении энергия накапливается в АТФ или в других соединениях, имеющих макроэргические связи. Таким образом, органические субстраты обеспечивают как энергетическую, так и конструктивную стороны обмена грибов [33]. Следовательно, вопрос об углеродном питании и о влиянии источников углерода на развитие микроорганизмов является очень существенным при проведении любых микробиологических экспериментов.

Выбор источника азота также очень важен для хорошего роста мицелия в культуре и содержания в нём белка. Потребность грибов в азоте в значительной мере зависит от снабжения их углеродом, а также от других факторов [13]. Органический азот обычно обеспечивает лучший рост мицелия, чем минеральные соли азота. В качестве источников азота могут быть использованы аспарагин, мочевины, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, пептон и др.

Минеральные элементы выполняют важные структурные и метаболические функции в грибных клетках. Содержание минеральных элементов в растительном сырье обычно достаточно высокое и плотность обеспечивает потребности в минеральных элементах культивируемого гриба. Минеральный состав растительного сырья достаточно сильно зависит от состава почвы и может влиять на химический состав плодовых тел, правда, эти изменения большей частью касаются содержания микроэлементов.

Как большинству организмов грибам для развития необходимы витамины. Многие грибы способны сами синтезировать все необходимые витамины из простых питательных веществ. Важнейшими для метаболизма грибов являются витамины группы В. Хорошим источником витаминов группы В являются цельные семена зерновых культур, а также отруби семян этих культур.

Смеси аминокислот и нуклеотидов (дрожжевой гидролизат) также стимулируют рост грибов при добавлении небольшого количества этих препаратов (0,05 - 0,2%) в субстрат.

Эндогенные стимуляторы роста грибов, по типу гормонов роста растений, пока еще не выделены, но есть вероятность их обнаружения, так как скорость роста различных видов грибов может отличаться в десятки и сотни раз. Положительное влияние на рост мицелия оказывает гетероауксин и эпин, стимуляторы растений [35].

В качестве стимуляторов на синтетической среде с сахарозой испытаны отвары зеленой массы различных сельскохозяйственных культур: кукурузы, овса, фасоли (створки), свеклы столовой, гороха, вики, люпина, люцерны и т.д. Показана целесообразность их использования в качестве компонентов сред для улучшения роста и увеличения продукции биомассы мицелия при культивировании грибов рода *Cordyceps*.

Установлено, что наибольшее количество биомассы накапливается к 72-96 ч. К этому же времени грибы накапливают и наибольшее количество внутриклеточных полисахаридов, липидов и фенольных соединений [19]. Максимальное количество белка в биомассе отмечается к 48-72 ч. Также, проведены исследования по изучению изменения количества жирных кислот липидах данного вида гриба. Установлено, что к 72-96 ч. у *Cordyceps* незначительно снижается сумма ненасыщенных жирных кислот. Эти изменения связаны с уменьшением количества линолевой кислоты ($C_{18:2}$), увеличением олеиновой ($C_{18:1}$) и пальмитиновой ($C_{16:0}$) кислот.

Одним из требований, которые предъявляются к промышленному продуценту пищевой биомассы, является наличие у него способности утилизировать дешевые, недефицитные источники питания и субстраты,

содержащие углеводы, органический азот, витамины и другие стимулирующие добавки. Это продукты переработки овощей, фруктов, зерновых, кормовых и технических культур, молочная сыворотка. Многие из субстратов – отходы пищевого хозяйства и промышленности – представляют интерес как экономически выгодные компоненты комплексных питательных сред.

Определена возможность замены в стандартной питательной среде дефицитных и дорогостоящих компонентов на вторичные продукты по переработке сельскохозяйственного сырья – молочную сыворотку, свекловичную мелассу, пивное сусло, крахмал (непищевые крахмалистые отходы переработки картофеля), а также продукты мукомольной и маслоперерабатывающей промышленности, которые составили основу промышленных сред [15].

Дешевым субстратом являются отходы переработки картофеля, которые могут служить источником углеродного питания при глубинном культивировании мицелия. Вместе с тем сырые крахмалистые отходы (очистки, нестандартный картофель, клеточный соки т.п.) – скоропортящиеся продукты. Этих недостатков лишены консервированные и сухие продукты безотходной технологии переработки картофеля, в частности картофельная мука и концентрат картофельного сока. Картофельная мука служит хорошим источником углерода [14]. Как субстрат для получения поверхностного и глубинного мицелия на жидких питательных средах испытан также консервированный концентрат клеточного сока картофеля, в состав которого входят углеводы, аминокислоты, источники минерального питания.

Одним из перспективных субстратов в экономическом отношении является меласса, которая может использоваться как основной источник углеродного питания для глубинного культивирования мицелия. По внешнему виду свекловичная меласса представляет собой густую вязкую жидкость темно-коричневого цвета со специфическим запахом, обусловленным в основном присутствием триметиламина и диметилсульфида. Ценность его заключается в том, что наряду с высоким содержанием сахара в мелассе содержатся все вещества, необходимые для нормальной жизнедеятельности гриба. Меласса имеет сложный и непостоянный химический состав, зависящий от почвенно-климатических условий вегетации свеклы, вносимых удобрений, способов уборки, условий и продолжительности хранения, технологии сахароварения и др. Например, механизированная уборка свеклы, транспортировка, доочистка и складирование травмируют корни, способствуя их загниванию при хранении. Все это ухудшает качество свеклы и мелассы.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали грибы *Cordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris*, полученные из коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники НАН Украины и хранящиеся в коллекции лаборатории экспериментальной микологии Института микробиологии НАН Белоруссии.

Для определения влияния источников углеродного и азотного питания на накопление биомассы штаммы выращивали на глюкозо-пептонной среде в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл с 150 мл среды на круговой качалке при 180 об/мин, заменяя глюкозу на сахарозу, мелассу, лактозу или крахмал, а пептон – на дрожжевой экстракт или $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$. Культивирование штаммов на оптимизированных промышленных средах проводили в ферментационных аппаратах АК-10 (Россия) при аэрации 0,5-2,0 л/л·мин и частоте вращения мешалки 100 об/мин (посевная доза мицелия составляет 5%). После выращивания гриба мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через плотную ткань, промывали дистиллированной водой и использовали для определения физиологически активных веществ.

2.1 Объект исследования

Объектом исследования служили грибы рода *Cordyceps* (*C. sinensis* и *C. militaris*).

Культуры гриба поддерживали на сусло-агаре (4° Б), пересевали один раз в месяц, хранили при 4 ° С.

Для выращивания мицелия гриба использовали полусинтетические и комплексные питательные среды, которые стерилизовали автоклавированием при 0,75 атм. в течение 30 мин.

Для хранения культур гриба использовали питательную среду следующего состава:

- Пивное сусло 4° по Баллингу – 1 л; агар-агар – 20 г/л; рН – 5,8.

Глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера на качалке (180-200 об/мин) или в ферментерах объёмом 10 л (АК-10) и 300 л (Biotron 300). Условия культивирования: температура 25-28° С, аэрация – 0,5-1,0 л/л среды/мин; перемешивание – 50-100 об/мин.

Для глубинного культивирования гриба использовали следующие питательные среды:

- Глюкозо – пептонная среда, г/л:

Глюкоза – 20 (30) *; пептон – 3 **; KH_2PO_4 - 1,0; K_2HPO_4 - 1,0; MgSO_4 – 0,25.

* - в ходе опытов по выявлению наиболее доступного источника углерода заменялась на эквивалентные количества крахмала, мальтозы, сахарозы (по углероду).

** - в ходе опытов по выявлению наиболее доступного источника азота заменялся на эквивалентные количества $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NaNO_3 , дрожжевого экстракта (по азоту).

2.2 Методы исследования

Глубинное культивирование грибов проводили на пивном сусле (7^0 по Баллингу) и полусинтетической питательной среде (г/л: глюкоза – 20,0; пептон – 3,0; кукурузный экстракт – 2,0) в колбах Эрленмейера на качалке. Температура культивирования – 20-30⁰ С, время – 3-7 сут. При подборе компонентов питательной среды различные источники углерода вносили в среду в количестве 20 г/л, а азота из расчета 0,45-0,5 г/л по азоту. Количество инокулюма – 10%.

После выращивания гриба мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через плотную ткань, промывали дистиллированной водой и использовали для проведения соответствующих анализов.

1) Измерение содержания сухих веществ

Навеску сырой биомассы гриба высушивали в сушильном шкафу при $(105\pm 2)^\circ\text{C}$ до постоянной массы, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Первое взвешивание проводили через 2 ч, последующие через 1 ч. Перед каждым взвешиванием навеску охлаждали в эксикаторе до комнатной температуры в течение 40 мин. Если разница между двумя последними взвешиваниями не превышала 0,01 г, постоянная масса считалась достигнутой.

2) Определение содержания полисахаридов:

• эндополисахаридов

Осуществляли фенол-сернокислотным методом. Для этого, измельчённую навеску сухого мицелия в количестве 100 мг помещали в пробирку объёмом 20 мл, приливали 5 мл 1 М NaOH, закрывали пробкой и экстрагировали в термостате при 60⁰ С в течение 1 ч, периодически перемешивая. Полученный экстракт центрифугировали 20 мин при 8000 об/мин. Осадок отделяли и в супернатанте определяли содержание полисахарида фенол-сернокислотным методом. 1,0 мл супернатанта переносили в пробирку объёмом 20 мл, добавляли 1,0 мл 5% водного раствора фенола и тщательно перемешивали. К полученному раствору быстро добавляли 5 мл концентрированной серной кислоты при непрерывном встряхивании. Давали раствору отстояться в течение 10 мин, перемешивали и помещали в водяную баню при 25-30⁰ С на 10-20 мин. Измерения вели на

фотоэлектроколориметре при 490 нм, в кювете 5 мм. Контролем служил раствор, содержащий вместо супернатанта 1 мл дистиллированной воды, 1 мл 5% водного раствора фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты. Для определения коэффициента калибровочной кривой используют свежеприготовленный основной раствор глюкозы: 100 мг глюкозы растворяют в 100 см³ дистиллированной воды. Из основного раствора готовят рабочий и сразу используют для построения калибровочной кривой: 10 см³ основного раствора разводят в 100 см³ дистиллированной воды. Для построения калибровочной кривой берут следующие объемы рабочего раствора: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 см³, переносят в мерные пробирки на 20 см³ в которые добавляют соответственно 9; 8; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1 см³ дистиллированной воды. Полученные разведения содержат соответственно: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09 мг/мл глюкозы. Из полученных разведений берут по 1 см³ раствора, переносят в мерные пробирки на 20 см³, приливают 1 см³ 5 % водного раствора фенола, перемешивают и быстро добавляют 5 см³ концентрированной серной кислоты при непрерывном встряхивании. По истечении 10 мин оптическую плотность испытуемого раствора измеряют против контроля на спектрофотометре при длине волны 490 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см в отношении контрольного опыта. Контрольный опыт проводят аналогично, где вместо рабочего раствора глюкозы берут дистиллированную воду.

Для каждой концентрации рабочего раствора рассчитывают коэффициент (K_i) по формуле (1):

$$K_i = \frac{C_i}{D_i} , \quad (1)$$

где:

C_i – содержание глюкозы в i -растворе глюкозы, мг/мл;

D_i – оптическая плотность i -раствора при длине волны 490 нм.

Коэффициент калибровочной кривой (K) рассчитывают по формуле (2):

$$K = \frac{K_1 + K_2 + \dots + K_n}{n} , \quad (2)$$

где:

$K_1; K_2; K_n$ – коэффициенты рабочих растворов;

n – количество рабочих растворов (ед.)

Проводят два параллельных испытания и за результат принимают среднее арифметическое. Допустимое расхождение при параллельных испытаниях не должно превышать $\pm 0,2$ %.

- **экзополисахаридов**

После фильтрации биомассы к культуральной жидкости добавляли этиловый спирт (1:1), оставляли при температуре 4⁰ С до полного осаждения, затем осаждённые полисахариды отделяли центрифугированием и сушили при температуре 4⁰ С.

3) Измерение конечного значения рН среды

Для определения степени кислотности использовался специальный прибор - рН-метр РН-150 МИ Гомельского производства.

Обработка данных была проведена с применением программы Microsoft Excel и статистического пакета Statistica 6.0. Сравнение данных различных групп было проведено по t-критерию в случае нормального распределения. Данные в таблицах представлены: для нормально распределенных данных как среднее и соответствующее стандартное отклонение ($M \pm \sigma$).

Средние значения и стандартные отклонения рассчитывали в соответствии с формулами (3 и 4):

$$M_{cs} = \frac{m_1 + m_2 + m_3}{3}, \quad (3)$$

где M_{cs} – рассчитанное среднее,
 m_1, m_2, m_3 – значения, полученные в каждой из повторностей;

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(m_i - m_{cs})^2}{n-1}}, \quad (4)$$

где σ – стандартное отклонение,
 m_i – значение, полученное в отдельной повторности,
 m_{cs} – среднее значение, n – число повторностей.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для оценки влияния компонентов питательных сред на рост и биосинтетическую активность грибов *C. sinensis* и *C. militaris*, их выращивали на полусинтетической глюкозо-пептонной среде. Соответствующие источники углерода или азота в составе исходной полусинтетической глюкозо-пептонной питательной среды заменяли другими в эквивалентных количествах.

Далее проводилась оценка влияния различных источников углерода и азота на *C. sinensis* и *C. militaris* по средствам изучения следующих параметров: биомассы, пересчитанной в соотношении грамм на литр среды, конечного значения рН среды, процентного содержания эндополисахаридов и содержания экзополисахаридов, пересчитанного в соотношении грамм на литр среды.

3.1 Влияние различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов у *C. sinensis* и *C. militaris*

Известно, что углеводсодержащие субстраты играют главную роль в питании грибов, обеспечивая грибной организм углеродом, необходимым для метаболических процессов. Источник углерода оказывает большое влияние на рост грибов и синтез полисахаридов. Усваиваемость различных источников углерода грибом определяется в основном структурой молекул этих соединений. Использование сложных природных соединений возможно лишь в том случае, если гриб способен синтезировать и выделять в среду необходимые гидролитические ферменты.

В качестве источников углерода использовали глюкозу, лактозу, сахарозу, крахмал, мальтозу. Контролем служила среда без добавления дополнительного источника углерода. Результаты исследования влияния различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов представлены в таблицах 3.1-2.

В отношении *C. sinensis* лучший рост гриба был отмечен в средах с использованием глюкозы, сахарозы и мальтоза в качестве источников углерода, и накопленная биомасса гриба оказалась наибольшей. В то же время наименьший выход биомассы оказался в средах с добавлением лактозы и крахмала по сравнению с контролем без источника углерода, что говорит о плохой усваиваемости данных сахаров грибом *C. sinensis*. По выходу эндополисахаридов лучшими вновь оказались среды с использованием глюкозы и сахарозы, среда с мальтозой не показала такого же высокого процента выхода эндополисахаридов, но имела лучшие результаты по сравнению с остальными средами. По выходу экзополисахаридов лучшим

источником углерода оказался крахмал. Изменение конечного рН среды по сравнению с первоначальным значением (рН среды для культивирования 5,8) оказалось незначительным, поэтому не могло иметь влияния на процесс культивирования.

Таблица 3.1 - Влияние различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов у *Cordyceps sinensis*

№ п/п	Среда	Биомасса, г/л	Конечный рН	Эндополисахариды, %	Экзопполисахариды, г/л
1	Глюкоза	9,6	6,2	24,7	1,4
2	Лактоза	6,3	6,8	17,5	1,4
3	Сахароза	9,2	6,5	24,0	1,4
4	Крахмал	7,1	6,9	16,7	2,8
5	Мальтоза	9,3	6,5	19,2	1,6
6	Контроль без источника углерода	3,7	7,7	14,1	0,6

В отношении *C. militaris* лучший рост гриба был отмечен, как и у *C. sinensis*, в средах с использованием глюкозы, сахарозы и мальтоза в качестве источников углерода, а наименьший выход биомассы также был отмечен в среде с крахмалом по сравнению с контролем без источника углерода. Однако среда с использованием крахмала показала наилучший результат по выходу эндополисахаридов, также неплохие результаты были получены с использованием глюкозы и мальтозы. По выходу экзополисахаридов вновь лучшим источником углерода оказался крахмал. Изменение конечного рН среды по сравнению с первоначальным значением оказалось незначительным.

Таблица 3.2 - Влияние различных источников углерода на рост и содержание полисахаридов у *Cordyceps militaris*

№ п/п	Среда	Биомасса, г/л	Конечный рН	Эндополисахариды, %	Экзополисахариды, г/л
1	Глюкоза	11,0	6,3	20,8	2,4
2	Лактоза	9,3	6,5	19,2	0,9
3	Сахароза	10,5	6,6	18,5	2,6
4	Крахмал	7,8	6,7	25,5	4,5
5	Мальтоза	10,6	6,4	20,3	2,5
6	Контроль без источника углерода	4,0	7,0	18,7	0,45

Таким образом, анализируя полученные данные по влиянию различных источников углерода на рост и полисахариды у грибов *C. sinensis* и *C. militaris* стало известно, что лучшими источниками углерода для роста обоих видов грибов служат глюкоза, сахароза и мальтоза. В то же время у исследуемых видов выявлены различия в выходе эндополисахаридов: для *C. sinensis* предпочтительнее использование глюкозы и сахарозы, для *C. militaris* – крахмала. Для обоих видов использование крахмала в качестве источника углерода повышает выход экзополисахаридов.

Из всего изложенного выше можно заключить, что глюкоза является универсальным источником углерода для обоих видов *Cordyceps* и является лучшим выбором для культуральной среды для грибов данных видов.

3.2 Влияние исходных концентраций глюкозы на динамику роста грибов *C. sinensis* и *C. militaris*

Было изучено влияние различных концентраций глюкозы в качестве источника углерода в среде для культивирования на рост *C. sinensis* и *C. militaris*.

Исследование динамики роста гриба показало, что при начальных концентрациях источника углерода от 20 до 40 г/л (рисунок 3.1, 3.2),

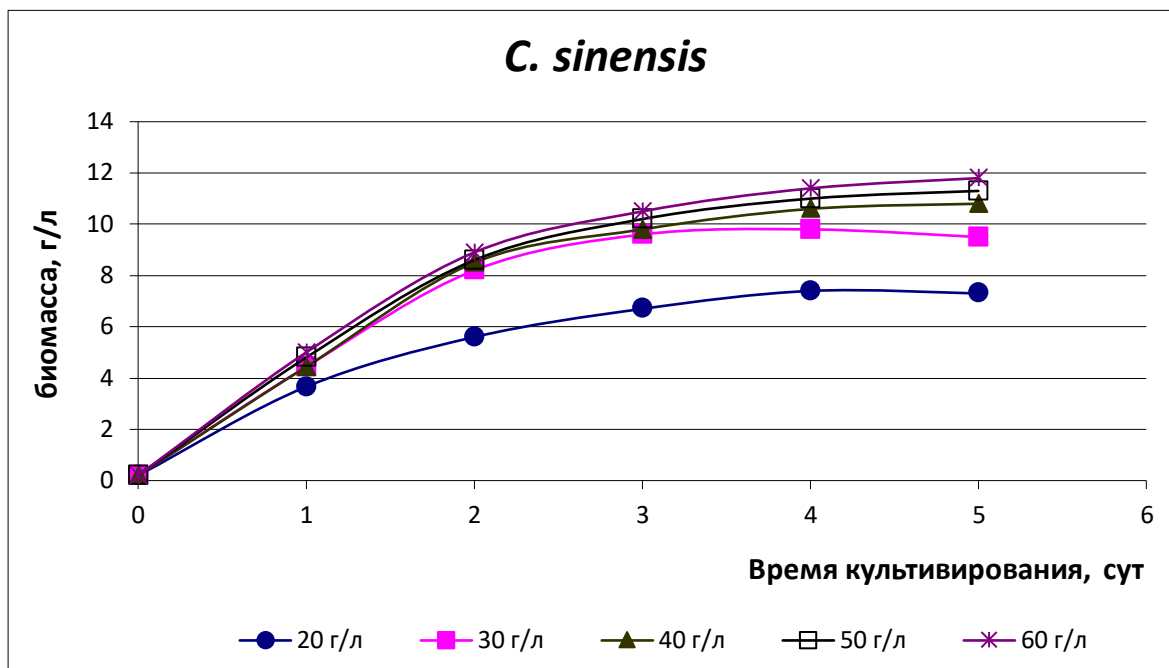
накопление максимально высокой биомассы наблюдалось на 2-3 сутки культивирования (8,2-11,5 г/л у *C. militaris* и 8,7-9,8 г/л у *C. sinensis*), затем её количество постепенно снижалось. Среды с начальными концентрациями глюкозы 20 и 30 г/л дали наименьшие результаты по выходу биомассы у *C. militaris*, у *C. sinensis* худшей оказалась среда с минимальной начальной концентрацией глюкозы – 20 г/л.

При начальной концентрации глюкозы 50-60 г/л, рост гриба продолжался и на 4-5 сутки культивирования, однако прирост биомассы оказался незначительным (10-17 %).

Таким образом, повышение начальной концентрации источника углерода способствует более длительному культивированию с постепенным приростом биомассы гриба как у *C. militaris*, так и у *C. sinensis*. Однако отмечено, что последующее повышение концентрации глюкозы более 40 г/л в среде не приводит к значительному повышению выхода биомассы гриба.

Поскольку на себестоимость процесса выращивания грибов большое влияние оказывает длительность культивирования и состав питательной среды, мы остановились на концентрации источника углерода в среде 30-40 г/л и времени культивирования 3 сут как для *C. militaris*, так и для *C. sinensis*, что позволило получать 9,5-11,0 г/л биомассы.

А:



Б:

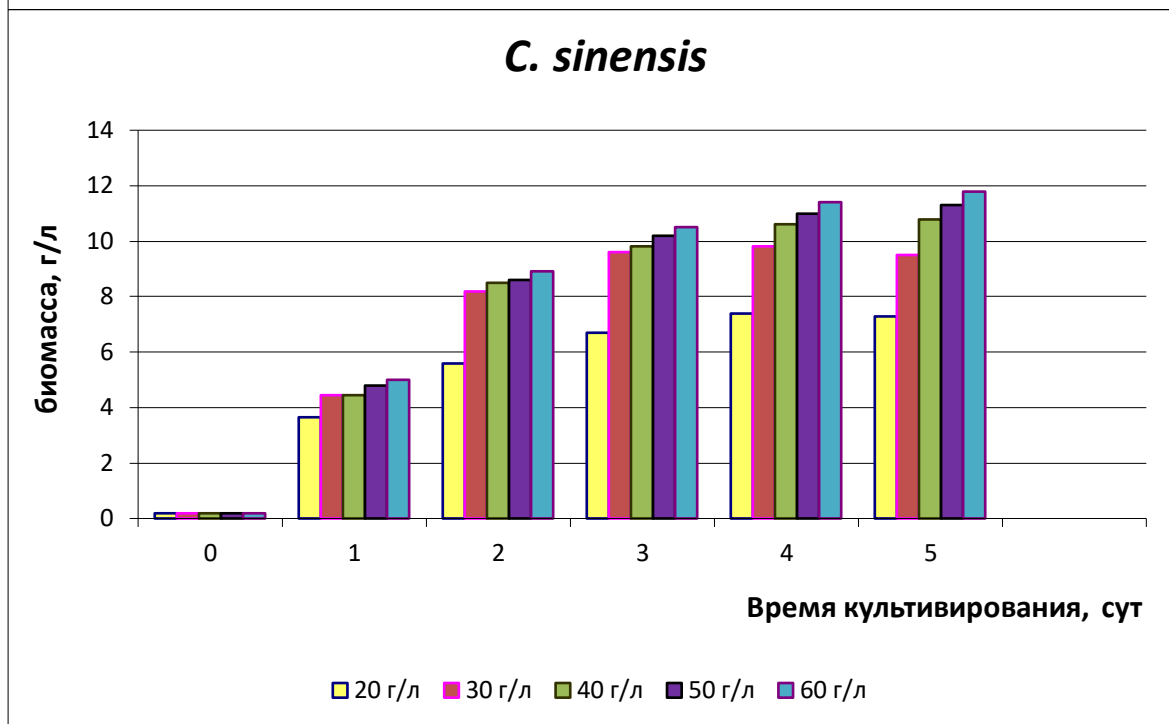


Рисунок 3.1 – Влияние исходных концентраций глюкозы на динамику роста грибов рода *Cordyceps sinensis*

А – график, Б – проекция графика

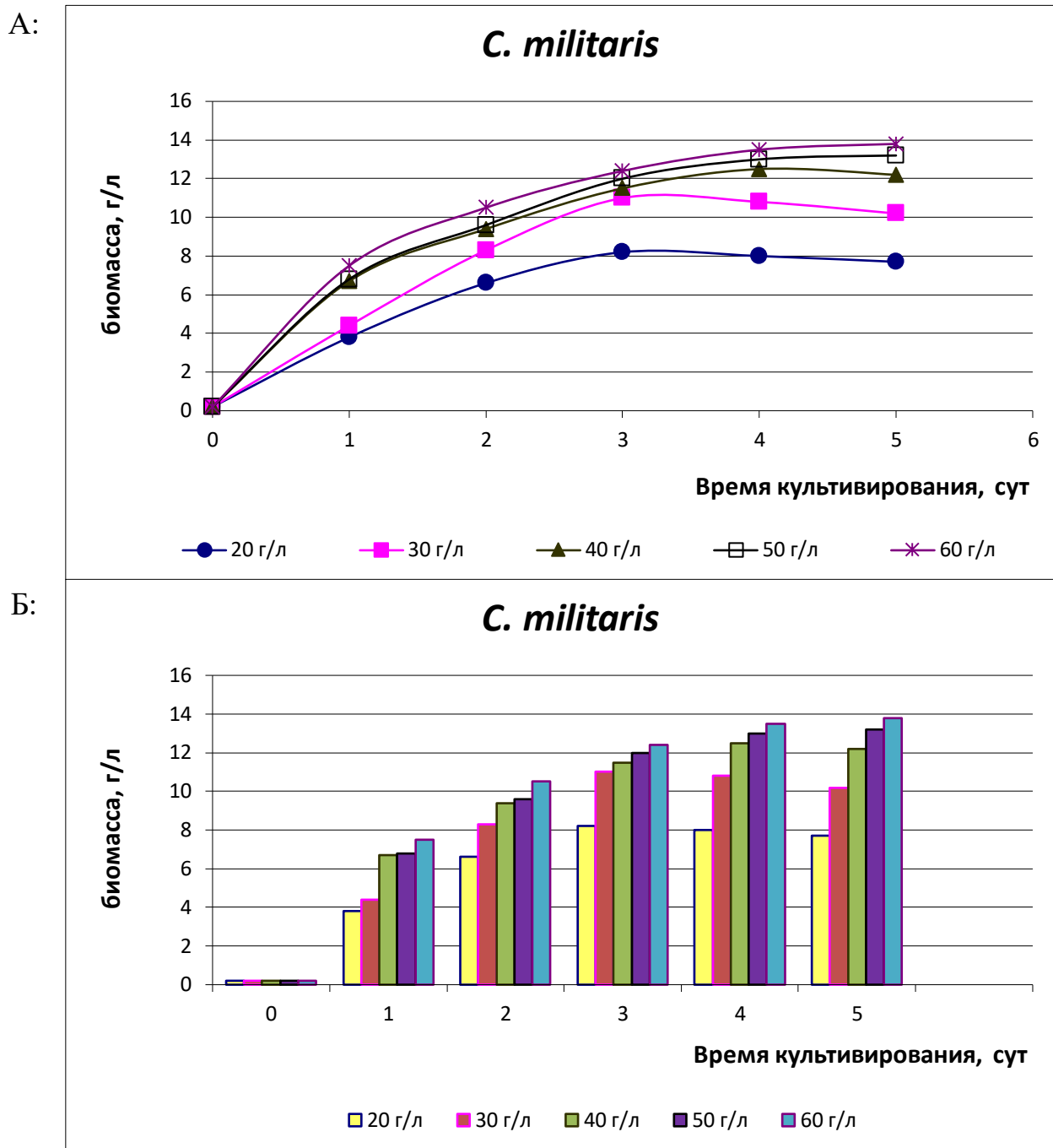


Рисунок 3.2 – Влияние исходных концентраций глюкозы на динамику роста грибов рода *Cordyceps militaris*

А – график, Б – проекция графика

3.3 Влияние различных источников азота на рост и содержание полисахаридов у *C. sinensis* и *C. militaris*

Выбор источника азота также очень важен для хорошего роста мицелия в культуре и содержания в нем белка. Азотистые соединения являются основой белков - важнейшей составной частью протоплазмы, они играют большую роль в обмене веществ у грибов.

В качестве источников азота использовали неорганический $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ и органические (пептон, дрожжевой и кукурузный экстракты) источники. Контролем служила среда с 0,2% кукурузного экстракта без внесения дополнительного источника азота.

Пептон — препарат, полученный из молока и мяса животных под действием протеолитических ферментов. На начальных стадиях процесса переваривания белков под действием ферментов, например, пепсина образуются крупные белковые фрагменты, которые и называются пептонами. Кроме коротких пептидов, обычно пептоны содержат жиры, металлы, соли, витамины и много других органических и минеральных веществ (Wikimedia Foundation, 2010).

Дрожжевой экстракт – продукт, получаемый из дрожжевого автолизата разведением его в 4 раза водой и последующим фильтрованием или центрифугированием с целью удаления нерастворимых (твердых) компонентов. После мягкого высушивания может длительное время храниться в порошке. Автолизат дрожжевой – продукт, получаемый в результате автолиза прессованных пекарских дрожжей (при 60 °С в течение двух суток). Входит в состав многих питательных сред для выращивания микроорганизмов как источник азотистых веществ, витаминов группы В, аминокислот и микроэлементов («Микробиология: словарь терминов», Фирсов Н.Н., М: Дрофа, 2006 г).

Кукурузный экстракт – густая непрозрачная жидкая масса, получаемая вакуум–выпариванием замочных вод, являющихся отходом кукурузно–крахмального производства. Химический состав экстракта зависит как от сорта кукурузы, так и от условий ее выращивания, а также от технологии получения и условий хранения экстракта («Микробиология: словарь терминов», Фирсов Н.Н., М: Дрофа, 2006 г.).

Результаты исследования влияния различных источников азота на рост и содержание полисахаридов у *Cordyceps sinensis* и *militaris* представлены в таблицах 3.3-4.

В отношении *C. sinensis* лучший рост гриба был отмечен в средах с использованием пептона и дрожжевого экстракта в качестве источников азота, и накопленная биомасса гриба оказалась наибольшей. В то же время наименьший выход биомассы оказался в среде с добавлением сульфата аммония по сравнению с контролем без добавления какого-либо источника азота, что говорит о плохой усваиваемости неорганических источников азота грибом *C. sinensis*. По выходу эндополисахаридов лучшим источником азота оказался кукурузный экстракт. Наибольший выход экзополисахаридов наблюдался при использовании среды с добавлением дрожжевого экстракта,

наихудший результат оказался при использовании кукурузного экстракта. Изменение конечного рН среды по сравнению с первоначальным значением оказалось незначительным при использовании органических источников азота, что оказывало благоприятное влияние на рост гриба в культивируемых условиях, что нельзя сказать про неорганический источник азота, который способствовал значительному окислению среды и как следствие нарушал благоприятные условия для культивирования.

Таблица 3.3 - Влияние различных источников азота на рост, содержание полисахаридов у *Cordyceps sinensis*

№ п/п	Среда	Биомасса, г/л	Конечный рН	Эндополисахариды, %	Экзопполисахариды, г/л
1	Пептон	9,6	6,2	24,7	1,4
2	Дрожж. экстракт	9,4	5,6	24,8	2,6
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	8,4	2,8	24,3	1,0
4	Кукурузный экстракт	8,9	5,1	28,1	0,8
5	Контроль без источника азота	1,76	6,3	18,4	0,4

В отношении *C. militaris* лучший рост гриба был отмечен как и у *C. sinensis* в средах с использованием пептона, а также в средах с кукурузным экстрактом в качестве источников азота. Как и у *C. sinensis* наименьший выход биомассы наблюдался при использовании неорганического источника азота. Среда с использованием пептона показала наилучший результат по выходу эндополисахаридов, также неплохие результаты были получены с использованием дрожжевого и кукурузного экстрактов. По выходу экзополисахаридов вновь лучшие результаты были получены при использовании пептона. Изменение конечного рН среды по сравнению с первоначальным значением оказалось незначительным даже в среде с добавлением сульфата аммония в качестве источника азота.

Таблица 3.4 - Влияние различных источников азота на рост, содержание полисахаридов у *Cordyceps militaris*

№ п/п	Среда	Биомасса, г/л	Конечный рН	Эндополисахариды, %	Экзопполисахариды, г/л
1	Пептон	11,0	6,2	20,8	2,4
2	Дрожж. экстракт	9,8	6,4	19,4	1,8
3	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,6	5,5	16,5	0,6
4	Кукур. экстракт	10,8	5,8	19,3	2,0
5	Контр. без N	2,0	6,8	15,8	0,8

Таким образом, анализируя полученные данные по влиянию различных источников азота на рост и выход полисахаридов у грибов *C. sinensis* и *C. militaris* стало известно, что лучшими источниками азота для роста обоих видов грибов служит пептон, в то же время пептон повышает выход эндополисахаридов у обоих видов. Также высокие показатели выхода биомассы и полисахаридов у *C. sinensis* отмечены при использовании дрожжевого экстракта.

Из всего изложенного выше можно заключить, что пептон и дрожжевой экстракт являются универсальными источниками азота для обоих видов *Cordyceps* и являются лучшим выбором для культуральной среды для грибов данных видов.

3.4 Влияние исходных концентраций дрожжевого экстракта на выход биомассы и полисахаридов у грибов *C. sinensis* и *C. militaris*

Для определения оптимального содержания дрожжевого экстракта в среде для культивирования *C. sinensis* и *C. militaris* провели исследование влияния его различного содержания в среде на выход биомассы и полисахаридов.

Результаты исследования показывают (рисунок 3.3, 3.4), что с увеличением содержания в среде дрожжевого экстракта возрастает выход биомассы, накопление максимально высокой биомассы наблюдалось при начальной концентрации экстракта 20 г/л (15,7 г/л у *C. militaris* и 14,2 г/л у *C. sinensis*). Среды с начальными концентрациями дрожжевого экстракта 3 и 5 г/л дали наилучшие результаты по выходу эндополисахаридов у *C. militaris* (24,2-

25,85 %) и у *C. sinensis* (23,78-23,99 %), дальнейшее повышение начальной концентрации экстракта в среде снижало выход эндополисахаридов.

Выход экзополисахаридов оказался наивысшим при минимальном количестве вносимого экстракта 3 г/л (2,1 г/л у *C. militaris* и 1,5 г/л у *C. sinensis*) и снижается по мере увеличения начальной концентрации дрожжевого экстракта в среде.

В результате проведенного исследования было выбрано оптимальное количество дрожжевого экстракта необходимого для культивирования обоих видов *Cordyceps* в концентрации 5 г/л.

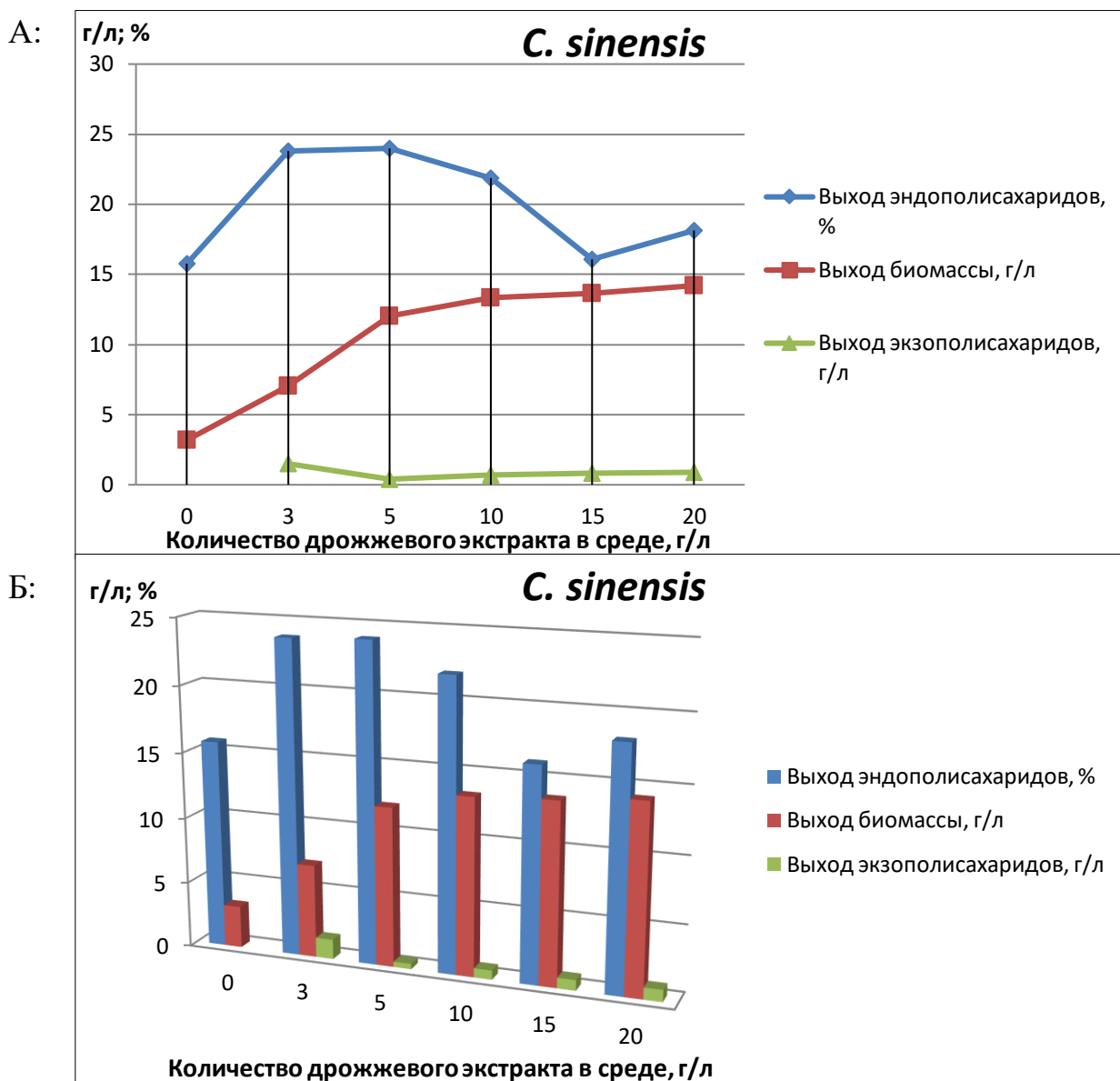


Рисунок 3.3 – Культивирование *Cordyceps sinensis* на средах с различным количеством дрожжевого экстракта

А – график, Б – проекция графика

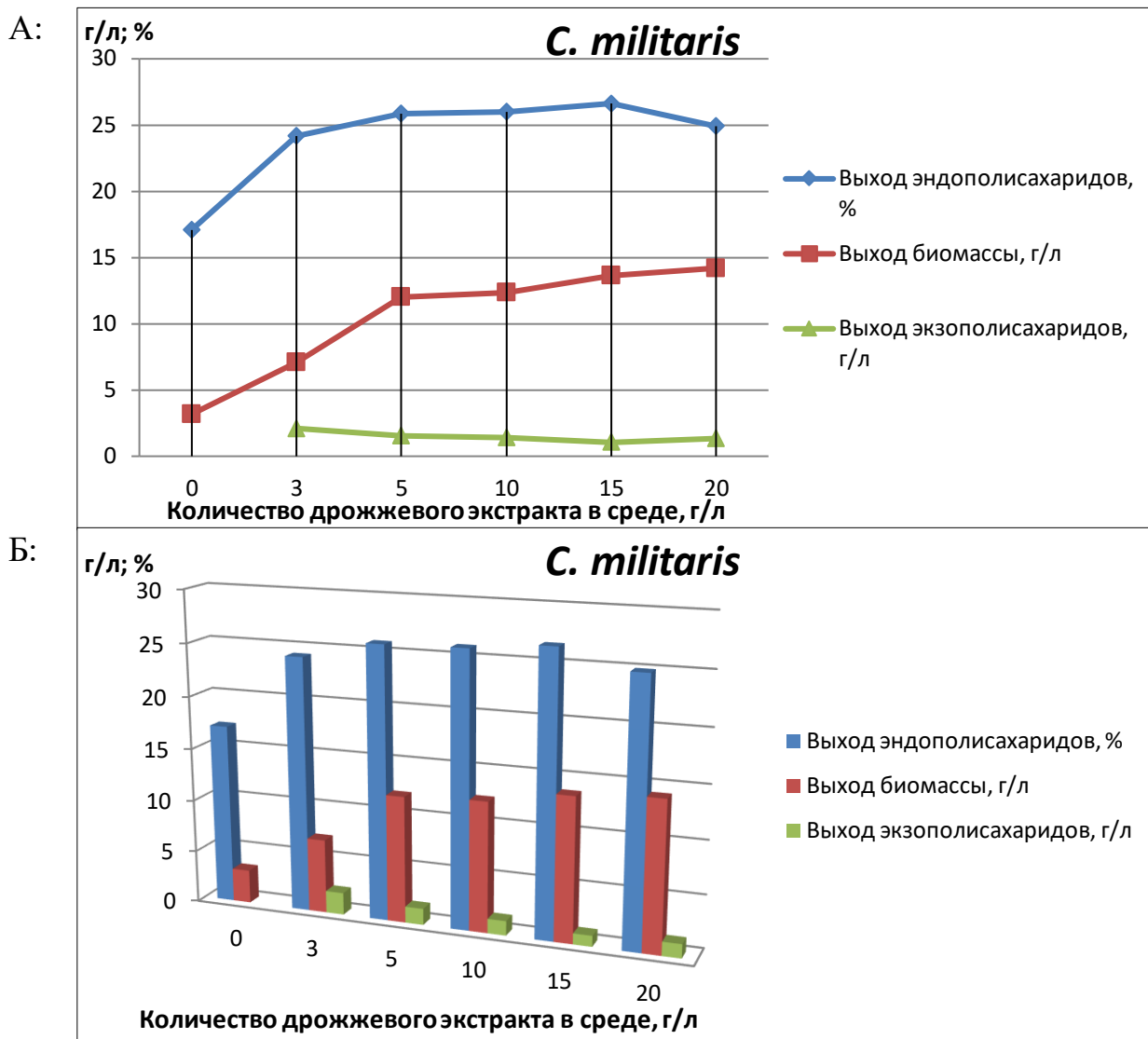


Рисунок 3.4 – Культивирование *Cordyceps militaris* на средах с различным количеством дрожжевого экстракта

А – график, Б – проекция графика

Таким образом, в результате проведенных исследований подобрана питательная среда, содержащая: глюкозу – 30-40 г/л и рожжевой экстракт – 5 г/л и определено время культивирования – 3 суток, что обеспечивает при культивировании *Cordyceps sinensis* и *militaris* получение 9,5-11,00 г/л биомассы и 1,4-3,0 г/л полисахаридов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лучшими источниками углерода для роста и образования полисахаридов у исследуемых грибов оказались глюкоза, сахароза и мальтоза; источниками азота – пептон и кукурузный экстракт. Для полусинтетической питательной среды подобраны оптимальная концентрация глюкозы в среде 30-40 г/л и время культивирования 3 суток.

Лучшими источниками азота для роста обоих видов грибов служит пептон, в то же время пептон повышает выход эндополисахаридов у обоих видов. Также высокие показатели выхода биомассы и полисахаридов у *C. sinensis* отмечены при использовании дрожжевого экстракта.

Пептон и дрожжевой экстракт являются универсальными источниками азота для обоих видов *Cordyceps* и являются лучшим выбором для культуральной среды для грибов данных видов.

В результате выбрано оптимальное количество дрожжевого экстракта необходимого для культивирования обоих видов *Cordyceps* в концентрации 5 г/л.

Дальнейшее изучение грибов рода *Cordyceps* возможно выявит их новые качества и свойства и расширит не только сферу их применения, но и определит альтернативные способы культивирования с увеличением продуктивности выработки биологически активных веществ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Cao, L. Method for artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* fruiting bodies / L. Cao / Worldwide applications. – 2014. – P. 12-15.
2. Choda, U. Medicinal Value of *Cordyceps sinensis* / U. Choda // Translational Biomedicine. – 2017. – P. 25-27.
3. Cui, J.D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine / J.D. Cui // Critical Reviews in Biotechnology. – 2013. – P. 475-484.
4. Das, S.K. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects / S.K. Das [et al.]. // Fitoterapia journal. – 2010. – P. 75-76.
5. Dong, C.H. *Chinese cordyceps*: from scientific research to industry/ C.H. Dong // Mycosystema. – 2016. – P. 369-374.
6. Dong, C.H. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture / C.H. Dong // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – Vol.99, N 3. – P. 483-492.
7. Guo, L.X. Fungus-larva relation in the formation of *Cordyceps sinensis* as revealed by stable carbon isotope analysis / L.X. Guo [et al.]. // Scientific reports journal. – 2017. – P. 51-52.
8. Hobbs, C. Medicinal Mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture / C. Hobbs // Santa Cruz, CA: Botanica Press, 2002. – P. 251.
9. Hung, L.T. Effect of Temperature on Cordycepin Production in *Cordyceps militaris* / L.T. Hung [et al.]. // Thai Journal of Agricultural Science. – 2009. – P. 219-225.
10. Ji, D.B. Antiaging effect of *Cordyceps sinensis* extract / D.B. Ji [et al.]. // Phytotherapy Research. – 2009. – P. 116-122.
11. 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 // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – Vol. 99. – P. 728–738.
12. Kuo, M.C. Immunomodulatory effect of exopolysaccharides from submerged cultured *Cordyceps sinensis*: enhancement of cytokine synthesis, CD11b expression, and phagocytosis / M.C. Kuo [et al.]. // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – P. 197.
13. Leung, P.H. Effects of ammonium feeding on the production of bioactive metabolites (cordycepin and exopolysaccharides) in mycelial culture of a *Cordyceps sinensis* fungus / P.H. Leung // Journal of Applied Microbiology. – 2007. – P. 1942-1949.

14. Lin, Q. Evaluation of different agricultural wastes for the production of fruiting bodies and bioactive compounds by medicinal mushroom *Cordyceps militaris* / Q. Lin [et al.]. // Journal Science of Food and Agriculture. – 2016. – P. 71-73.
15. Liu, X. On the sustainable development of the *C. sinensis* resource / X. Liu // Science Press. – 2016. – P. 231.
16. Liu, Y. Review Article the Chemical Constituents and Pharmacological Actions of *Cordyceps sinensis* / Y. Liu [et al.]. // Hindawi Publishing Corporation. – 2014. – P. 12.
17. Mao, X.B. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* / X.B. Mao [et al.]. // Process Biochemistry. – 2005. – P. 1667–1672.
18. Mohd, A. Effect of pH, temperature and incubation time on cordycepin production from *Cordyceps militaris* using solid-state fermentation on various substrates / A. Mohd [et al.]. // Journal of food. – 2017. – P. 617-621.
19. Park, J.P. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris* / J.P. Park [et al.]. // Applied Microbiology. – 2001. – P. 321.
20. Qi, L. Obstacles and approaches in artificial cultivation of *Chinese cordyceps* / L. Qi [et al.]. // An International Journal on Fungal Biology. – 2018. – P.7-9.
21. Russell, R. *Cordyceps* – A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory / R. Russell // Phytochemistry. – 2008. – Vol. 69. – P. 1469–1495.
22. Shih, I.L. Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* / I.L. Shih // Biochemical Engineering Journal. – 2007. – Vol. 33. – P. 193–201.
23. Shonkor, K.D. Efficient Production of Anticancer Agent. Cordycepin by Repeated Batch Culture of *Cordyceps militaris* Mutant / S. K. Das [et al.]. // Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science. – San Francisco, 2010. – Vol. II. – P. 457.
24. Sung, G.H. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi / G.H. Sung [et al.]. // Studies Mycology. – 2007. – P. 5-7.
25. Tsai, C.H. Finding of polysaccharide-peptide complexes in *Cordyceps militaris* and evaluation of its acetylcholinesterase inhibition activity / C.H. Tsai // Journal of Food and Drug Analysis. – 2015. – Vol. 23 – P. 63-70.
26. Tuli, H.S. Cordycepin: A bioactive metabolite with therapeutic potential / H.S. Tuli [et al.]. // Life Science. – 2013. – P. 863-869.

27. Tuli, H.S. Pharmacological and therapeutic potential of *Cordyceps* with special reference to cordycepin / H.S. Tuli // *Biotechnology Journal*. – №4. – 2014. – P. 1-12.
28. Wang, Z.S. Chemical components of *Cordyceps sinensis* mycelial fermentation preparations in solid media / Z. S. Wang [et al.]. // *Natural Product Research and Development*. – 2005. – Vol. 17. – P. 331-336.
29. Wen, T.C. Enhanced production of cordycepin by submerged culture using additives in *Cordyceps militaris* / T.C. Wen [et al.]. // *Food Science*. – 2010. – P. 175-179.
30. Wu, F.C. Cultivation of medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps militaris* (*Ascomycetes*), and production of cordycepin using the spent medium from levan fermentation // F.C. Wu [et al.]. // *International Journal Med Mushrooms*. – 2013. – P. 393-405.
31. Xuanwei, Z. *Cordyceps* fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products / Z. Xuanwei // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2009. – Vol. 61. – P. 279 – 291.
32. Yue, K. The artificial cultivation of medicinal *Caterpillar Fungus*, *Ophiocordyceps sinensis* (*Ascomycetes*) / K. Yue [et al.]. // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. – 2013. – P. 13-15.
33. Zhao, J. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps* / J. Zhao [et al.]. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2014. – P. 271–289.
34. Zhong, S. Advances in Research of Polysaccharides in *Cordyceps Species* / S. Zhong [et al.]. // *Food Technology and Biotechnology*. – 2008. – P. 304–312.
35. Zhou, X.W. Advances in research of the artificial cultivation of *Ophiocordyceps sinensis* in China / X.W. Zhou // *Critical Reviews in Biotechnology Journal*. – 2014. – №34. – P. 233–243.
36. Бабицкая, В.Г. Грибы рода *Cordyceps* : физиологически активные соединения, биологическое действие / В.Г. Бабицкая [и др.]. // *Биотехнология*. – 2009. – № 2. – С. 42-48.
37. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. – Киев: Наук. думка, 1988. – С. 20, 43-47, 77-80.
38. Вассер, С.П. Промышленное культивирование съедобных грибов / С.П. Вассер, Л.В. Гарибова, И.А. Дудка. – Киев, Наукова думка, 1978. – 285 с.
39. Влияние условий культивирований на образование биологически активных веществ грибами рода *Cordyceps* и их антиоксидантную активность / под общ. ред. Т.А. Пучкова [и др.]. *Институт микробиологии НАН РБ*. – 2013. – Т.8, №1. – С.75-77.

40. Горшина, Е.С. Биотехнологические препараты лекарственных грибов рода *Trametes* / Е.С. Горшина // Успехи медицинской микологии: материалы II Всероссийского конгресса по медицинской микологии. Москва, 24-25 марта 2004 г. / Национальная академия микологии; под ред.: Ю.В. Сергеев [и др.]. – Москва, 2004. – Т.3. – С.246–249.
41. Злокачественные опухоли [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: <http://www.nazdorovye.ru/cancerous-growth.html>. – Дата доступа: 05.04.2019.
42. Иммуностропные свойства глюканов [Электронный ресурс]. / НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН. – Владивосток, 2000. – Режим доступа: <http://xn--c1atere.xn--p1ai/o-kompanii/immunotropnye-svojjstva-beta-d-gljukanov/>. – Дата доступа: 03.04.2019.
43. *Cordyceps Sinensis* сильнейший в мире [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://dolgoletiepeptid.blogspot.com.by/2012/10/sinensis-s_10.html. – Дата доступа: 05.04.2019.
44. Кордицепс и иммунная система / Н. В. Коренева. – Москва, 2009. – 60 с.
45. Кордицепс: фармакологические и медицинский свойства [Электронный ресурс]. – 2012-2018. – Режим доступа: <https://www.zagribami.info/%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%8B/cordyceps/>. – Дата доступа: 10.04.2019.
46. Ли, Ю. Лекарственные грибы в традиционной китайской медицине и современных биотехнологиях / Ю. Ли, под общ. ред. В. А. Сысуева // НИИ сельского хозяйства Северо-Востока. – 2009. – С. 221-240.
47. Национальный интернет портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://daktari-mk.com/at/good_for_you/cordycepsis.html. – Дата доступа: 02.04.2019.
48. Общие вопросы механизмов действия лекарственных грибов и их компонентов [Электронный ресурс] / В. А. Алексеев – Санкт-Петербург, 2003. – Режим доступа: http://league-ukr.com/biblioteka_zdorovja/alekseev-v-vzglyad-tradici/chast-i/. – Дата доступа: 07.04.2019.
49. Огаркова, Б.Н. Грибы рода *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains из экосистем Южного Байкала как продуценты высоких концентраций иммуномодулятора кордицепина / Б.Н. Огарков [и др.]. // Известия Иркутского государственного университета. – 2012. – Т.5, №2. – С.75-80.
49. Підбір живильних середовищ для вирощування у глибинних умовах грибу *Pleurotus pulmonarius*:/ хімія та сучасні технології: тези доповідей V міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих

вчених, Дніпропетровськ, 20-22 квітня 2011р. / Дніпропетровськ, гос ун-т; Х.В Федорова [и др.]. – 2011. – 510 с.

51. Поединок, Н.Л. Перспективы культивирования ценных лекарственных грибов *C. militaris* и *C. Sinensis* / Н.Л. Поединок // Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины. Институт микробиологии имени Купревича НАН Белоруссии – Киев – Минск, 2006. – 459 с.

52. Ревин, В.В. Способ получения кормового продукта / В.В. Ревин, Н.А. Атыкян. – Мордовия, 2003. – С.12.