

ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГРИБА *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr. (Ascomycota) ЯК ПРОДУЦЕНТА ЛІКАРСЬКИХ РЕЧОВИН

О. Б. Михайлова
Н. Л. Поєдинок

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

E-mail: mikhajlov_e@ukr.net

Отримано 26.02.2013

Наведено результати дослідження росту і морфологічних особливостей культур лікарського гриба *Cordyceps militaris* із колекції Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України. Методом сканувальної електронної мікроскопії досліджено характерні для *C. militaris* мікроморфологічні структури вегетативного міцелію. Морфолого-культуральні дослідження проводили на чотирьох агаризованих живильних середовищах. Для всіх досліджених штамів оптимальними для вегетативного росту були глюкозо-пептон-дріжджовий агар і мальц-екстракт агар, температура інкубації — 16 °С, критична температура — 36 °С. Оптимальними джерелами вуглецю для вегетативного росту міцелію були глюкоза, лактоза і сахароза, серед органічних джерел азоту — пептон і дріжджовий екстракт, рН 6,0–6,5. Опромінення світлом різної природи стимулювало швидкість радіального росту гриба на агаризованих та накопичення біомаси — на рідких живильних середовищах.

Ключові слова: *Cordyceps militaris*, сканувальна електронна мікроскопія, ріст, морфологія, температура інкубації, джерела вуглецю та азоту, рН, міцеліальна маса.

Пошук нових природних джерел фізіологічно активних сполук з метою одержання ефективних та безпечних біопрепаратів є однією з важливих задач сучасної біотехнології. В останні три десятиріччя у фармацевтичній промисловості відбулися зміни, пов'язані з розвитком біотехнології. Серед лікарських препаратів значну увагу почали привертати засоби, отримані біотехнологічним способом на основі грибною біомаси. Особливістю цих біотехнологій було те, що як продуценти частіше стали використовувати макроміцети, особливо *Basidiomycota* та *Ascomycota*, і основне місце серед препаратів із грибів посідали вже не антибіотики, а серцево-судинні, протиракові, імуностимулювальні, гепатопротекторні лікарські засоби і харчові добавки на основі біологічно активних речовин (БАР) грибною міцелію. Відомі тривалий час лише вузькому колу мікологів-систематиків ентомопатогенні гриби роду *Cordyceps* Fr. тепер у багатьох країнах опинились у центрі уваги біотехнологів. Найвідомішим видом цього роду, що має практичне значення, є *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr. Цей гриб може уражувати комах у різних фазах розвитку, але, як правило, він паразитує на лялечках та гусеницях лускокрилих (Lepidoptera) [1, 2].

Лікувальні властивості речовин, одержаних із видів роду *Cordyceps*, відомі вже понад 2 000 років і їх широко застосовують у традиційній китайській та тибетській медицині [3, 4]. Сучасними дослідженнями доведено, що окремі види роду *Cordyceps* здатні синтезувати цілу низку БАР [5–7]. Особливу роль серед них відіграють полісахариди — D-глюкани, галактозоаміноглюкани та інші сполуки, наприклад кордицепін [8]. Ці сполуки активізують імунні клітини організму людини, які збільшують продукцію цитокінів та інтерферону, підсилюють резистентність до різних патогенних мікроорганізмів, підвищують адаптаційні можливості організму, мають антиоксидантну активність і перешкоджають процесам старіння [5, 9]. Встановлено, що препарати з кордицепсу, як й інші полісахариди грибів, що входять до їхнього складу, зменшують негативну дію хемо- та та радіотерапії.

Вузька специфічність субстратів, сезонність, особливість традиційних регіонів зростання і збору цих грибів визначають надзвичайно високу ціну їх на світовому ринку (понад 1 тис. дол. США за 1 кг плодівих тіл). Саме тому актуальним є розроблення високоефективних біотехнологій культивування на штучних субстратах, що дасть

змогу зменшити вартість відповідних сполук і зробити їх доступними для широких верств населення.

Одним із методів промислового культивування *Cordyceps militaris* є одержання плодових тіл твердофазовим культивуванням з подальшим виділенням та очищенням певних цільових речовин. Але більш технологічним та ефективним є спосіб одержання грибною біомаси і метаболітів *C. militaris* на рідких живильних середовищах в умовах глибинної культури, що уможливило одержання за короткий час необхідних речовин із заданими властивостями [3, 10–12].

Біотехнологічне використання *C. militaris* як потенційного продуцента БАР із різними біологічними властивостями стало можливим лише з уведенням його в чисту культуру. Проте дані щодо особливостей росту і розвитку в чистій культурі обмежені, а іноді й суперечливі. Під час культивування грибів у вегетативній формі одним із важливих етапів є їх коректна ідентифікація та контроль чистоти культури-продуцента за характерними мікроморфологічними і культуральними ознаками. Саме тому є потреба в подальшому детальному вивченні анаморф і структур вегетативного міцелію, основних морфологічних і культуральних ознак за вирощування в різних умовах культивування, що дає змогу за певними морфологічними ознаками охарактеризувати та ідентифікувати цей вид у культурі.

Метою роботи було дослідження біологічних властивостей *C. militaris* у культурі, зокрема мікроморфології вегетативного міцелію, особливостей росту і розвитку на живильних середовищах різного складу, а також інших факторів росту та біосинтетичної активності штамів *C. militaris*.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були чисті культури *C. militaris* (2 штами), які зберігаються в Колекції культур шапинкових грибів (ІВК) Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України [13].

Дослідження морфології та росту культур проводили на стандартних і модифікованих агаризованих живильних середовищах різного складу: мальц-екстракт агар (МЕА), сусло-агар (4° за Балінгом) (СА), картопляно-декстрозний агар DIFCO (КДА), глюкозо-пептон-дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза — 25,0; пептон — 5,0; дріжджовий екстракт — 3,0; агар-агар — 20, рН 6,5, у чашках Петрі. Поверхневе культивування

здійснювали за температур: 4,0±0,1; 16±0,1; 26,0±0,1 °С. Для перевірки життєздатності культур їх інкубували на ГПДА за температур 30–38 °С з інтервалом 1 °С. Після третьої доби інкубації враховували наявність чи відсутність росту міцелію. Збереження або втрати життєздатності міцелію культур перевіряли у процесі подальшого інкубування за температури 26 °С.

Радіальну швидкість росту розраховували за методикою [14].

Мікроструктури вегетативного міцелію *C. militaris* досліджували в світловому мікроскопі МБІ-15, а також у сканувальному електронному мікроскопі SEM JSM-35С (Японія), використовуючи модифікований метод Квательбаума та Карнера [15].

Наявність у вегетативному міцелії досліджених штамів грибів оксидаз (лакази, тирозинази, пероксидази) встановлювали за допомогою якісних ензиматичних реакцій на наявність восьми ензимів, які характеризують метаболізм азотних сполук (протеїнази, уреазі, нітрат-редуктази), вуглеводів (амілази, целюлази, ксиланази, β-глюкозидази), ліпідів (ліпази) за методом [16].

Для визначення впливу кислотності середовища на ріст міцелію використовували рідке синтетичне середовище А такого складу (г/л): глюкоза — 20,0; (NH₄)₂HPO₄ — 4,0; KH₂PO₄ — 1,0; K₂HPO₄ · 3H₂O — 1,0; MgSO₄ · 7H₂O — 0,5; MnSO₄ · 7H₂O — 0,005; FeCl₃ · 6H₂O — 0,005; CuSO₄ · 5H₂O — 0,003; ZnCl₂ — 0,005. Значення рН у середовищі змінювали в інтервалі від 2 до 8 з кроком 1 за допомогою розчинів 1Н КОН і 1Н НСІ. Початкове значення рН середовища (контроль) визначали після стерилізації.

Потреби культур у джерелах вуглецевого та азотного живлення визначали на синтетичному середовищі А, склад якого наведено вище. Джерелами вуглецю були моно- (глюкоза, ксилоза, маноза), ди- (сахароза, лактоза, мальтоза) і полісахариди (крохмаль), які додавали в кількості, еквівалентній 20 г глюкози за вуглицем, рН 6,5.

Джерелами азоту слугували NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, пептон, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт (КЕ), які вносили у середовища в кількості, еквівалентній 4 г (NH₄)₂HPO₄ за азотом. Дослідження проводили у колбах Ерленмеєра місткістю 150 мл з 50 мл живильного середовища. Інокулюмом були 7-добові культури гриба, попередньо вирощені на ГПДА за температури 16 ± 1 °С. У кожному колбу з рідким середовищем вносили три міцеліальні диски (d = 5 мм). Культури інкубували у стаціонарних умовах

за 16 ± 1 °C. Біомасу відокремлювали від культуральної рідини (КР) шляхом фільтрації, коли в одному з варіантів міцелій повністю покривав поверхню середовища. Кількість біомаси визначали ваговим методом після висушування до сталої маси за температури 105 ± 1 °C [17]. Також вираховували кінцеве значення рН культуральної рідини.

Для визначення кількості екзополісахаридів їх осаджували 10 мл 96%-го етанолу з 5 мл КР. Розчин відстоювали протягом 24 год у холодильнику за температури 4 ± 1 °C. Наступної доби осад відділяли центрифугуванням упродовж 25 хв у режимі 5 000 g. Надосадову рідину зливали, осад розчиняли в 5 мл гарячої дистильованої води. З отриманого розчину відбирали 2 мл рідини, в якій визначали кількість екзополісахаридів фенол-сірчанним методом [18].

Експериментальні дослідження впливу світла на культурально-морфологічні особливості продуцентів проводили з використанням експериментальних установок, які забезпечували генерацію лазерного випромінювання із заданими параметрами на довжинах хвиль 450,0 та 632,8 нм з можливостями опромінення культур у розчинах, на агарі тощо. Середня доза випромінювання на мішені становила близько 250 мДж/см².

Статистичну обробку результатів виконували стандартними методами з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 5 повторах. Дані вважали достовірними за $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення

Встановлено, що вегетативний міцелій *C. militaris* складається з тонких (2–4 мкм), помірно розгалужених, рівномірно септованих гіф, які зливаються між собою, утворюючи численні міцеліальні тяжі. Досліджені культури на всіх живильних середовищах проходили анаморну стадію (конідіальні спороношення) (рис. 1).

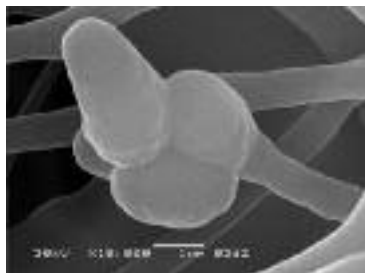


Рис. 1. *Cordyceps militaris*: конідіальне спороношення *Cephalosporium militare*: SEM JSM-35C. $\times 18\ 000$

Фіаліди конічні, пляшкоподібні, $10\text{--}30 \times 1,5\text{--}2,3$ мкм, утворюються поодинокі з клітин гіф через різні інтервали або в пучках і групами (часто на різних рівнях) по дві — чотири. Конідії формуються на верхівках фіалід. Перша конідія звичайно більша, еліптична або короткоциліндрична, розміром $3,2\text{--}6,0 \times 3,0$ мкм у діаметрі, наступні — шароподібні діаметром $2,3\text{--}3,0$ мкм.

Щодо належності анаморфи *Cordyceps militaris* до того чи іншого роду єдиної думки немає. Доволі тривалий час вважали, що анаморфою *C. militaris* є *Isaria farinose* (Holm.) Fr., проте після виділення цього гриба в чисту культуру Petch [цит. за 2] уперше зробив припущення, що його анаморфа належить до роду *Cephalosporium*. Саме такого висновку дійшов Kobayasi [19], який вивчав цей вид у культурі. Коваль [2] відносить цю конідіальну стадію до *Cephalosporium militare*. У більш пізніх джерелах вона фігурує як *Lecanicillium* sp. [20, 21] або як представник роду *Paecilomyces* [22].

Крюков та ін. [23] відзначають, що ізоляти, отримані з аскоспор *C. militaris*, мали анаморфи, які за своїми морфологічними ознаками повністю збігались із зазначеними в літературі як *Lecanicillium* sp. [20, 21]. Окрім того, у посівах зі стром цього гриба поряд із типовою анаморфою спостерігалася й інша, ознаки якої чітко вкладаються у діагноз виду *Isaria farinose* [23]. Проте асоціація *I. farinose* з *C. militaris* залишається незрозумілою, і цей факт констатують різні дослідники. В умовах нашого експерименту спостерігали лише один вид конідіального спороношення.

Слід також зазначити, що нами встановлено наявність на вегетативному міцелії *C. militaris* численних хламідоспор (рис. 2) і скупчення екзометаболітів (рис. 3).

Таким чином, дослідження мікроморфології вегетативного міцелію культур *C. militaris* з використанням світлової та електронної мікроскопії дало змогу встановити

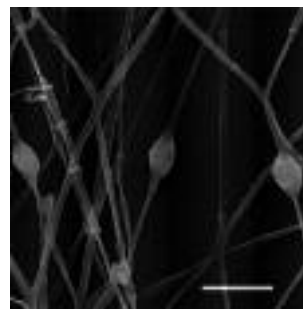


Рис. 2. *Cordyceps militaris*: вегетативний міцелій: хламідоспори, SEM JSM-35C. $\times 200$

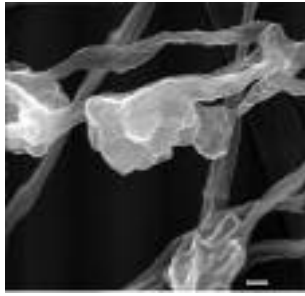


Рис. 3. *Cordyceps militaris*: вегетативний міцелій: екзометаболіти, SEM JSM-35C. $\times 6\ 000$

наявність у всіх штамів характерних для даного виду мікроструктур (конідіального спороношення, анастомозів, міцеліальних тяжів), які дозволяють ідентифікувати та контролювати чистоту культури продуцентів у процесі їх культивування.

Важливе практичне значення мають дані щодо збереження життєздатності ентомопатогенних грибів в умовах чистої культури. При цьому слід враховувати її трофічні особливості. Було встановлено, що компонентний склад живильних середовищ для цієї групи грибів зумовлений їхніми трофічними особливостями, які відрізняються за специфічними потребами в різних компонентах, спричинюючи перехід від паразитного існування до сапротрофного [1]. За даними літератури, культури *C. militaris* культивуються і зберігаються на стандартних живильних середовищах: мальц-естракт агар (МЕА) і картопляно-декстрозний агар (КДА) [11, 12, 24]. Підбираючи склад живильного середовища, брали до уваги природну приуроченість цього виду до протеїнових субстратів і виходили з того, що середовище має містити протеїни, які легко руйнуються протеолітичними ензимами ентомопатогенних грибів, тимчасом як вуглеводи і жири можуть бути присутні в мінімальній кількості. Тому під час проведення морфолого-культуральних досліджень крім стандартних живильних середовищ (МЕА, КДА) використовували також СА і ГПДА. Оптимальне живильне середовище для росту культур підбирали, враховуючи інтенсивність розвитку вегетативного міцелію, його пігментацію, морфологію колоній, радіальну швидкість росту штамів, а також фізіологічну активність культур. Особливу увагу приділяли дослідженню чинника, що впливає на збереження життєздатності культур, — температурі інкубації.

Культури *C. militaris* на використаних живильних середовищах під час культивування за всіх досліджених температур мали

стабільні характерні морфологічні ознаки, тобто формували дуже щільні, повстисті колонії з великою кількістю сплутаних повітряних гіф, рівним або хвилястим краєм. У темряві формувались колонії білого кольору, за освітлення спостерігали появу яскраво-жовтої пігментації міцелію (рис. 4). Реверзум із чіткими радіальними складками, його колір збігався із кольором середовища.

За результатами дослідження впливу низьких і високих температур на ріст та життєздатність міцелію було встановлено, що за умов низьких температур ($4\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$), незалежно від складу середовища, спостерігався слабкий вегетативний ріст (менш ніж $0,75\ \text{мм/добу}$), і міцеліальні колонії зберігали свої основні морфологічні ознаки. Слід зазначити, що досліджені штами незадовільно переносили підвищення температури. За температури $34\ ^\circ\text{C}$ ріст міцелію був відсутній, однак культури не втрачали життєздатності і відновлювали ріст при $26\ ^\circ\text{C}$ протягом тижня. Температура $36\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ виявилася критичною, і штами *C. militaris* повністю втрачали життєздатність. Відомо [24], що загибель клітин міцелію за високих температур є наслідком порушення координації процесу денатурації протеїнів.

Проведене дослідження дало змогу встановити, що найсприятливішими середовищами для росту та розвитку вегетативного міцелію *C. militaris* були ГПДА та МЕА, а оптимальною для росту міцелію досліджених штамів *C. militaris* температурою — $16\pm 0,1\ ^\circ\text{C}$ (табл. 1).

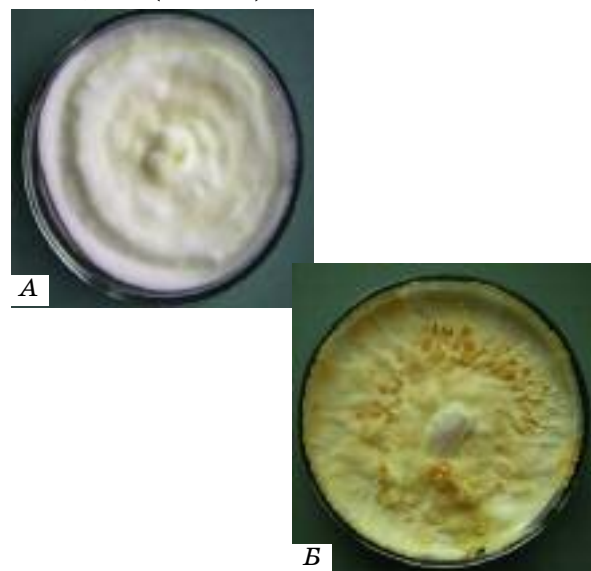


Рис. 4. Міцеліальна колонія *C. militaris* на середовищі ГПДА:

25-та доба культивування за відсутності освітлення (А); при освітленні (Б)

Таблиця 1. Швидкість радіального росту (V_r , мм/добу) вегетативного міцелію *Cordyceps militaris* на агаризованих середовищах за різних температур інкубації

Вид, штамп	Температура інкубації, °C	V_r , мм/добу на різних живильних середовищах			
		СА	МЕА	ГПДА	КДА
<i>Cordyceps militaris</i> , 1862	16±0,1	1,32±0,6	1,5±0,4	1,83±0,4	1,12±0,2
	26±0,1	1,23±0,2	1,53±0,3	1,61±0,4	1,42±0,6
<i>C. militaris</i> , 2029	16±0,1	1,43±0,2	1,41±0,2	1,45±0,5	0,96±0,2
	26±0,1	1,13±0,4	1,12±0,2	1,21±0,4	1,16±0,3

Примітка: у цій та в наступних таблицях для всіх показників значення достовірні за $P < 0,05$.

Згідно з одержаними значеннями радіальної швидкості росту досліджені штами *C. militaris* можна віднести до групи грибів, що ростуть повільно.

Підбір оптимальних субстратів у процесі культивування грибів з метою цілеспрямованого синтезу кінцевих продуктів неможливо проводити без знання їхніх фізіолого-біохімічних властивостей, зокрема активності ензимів. У природі ентомопатогенні гриби здатні синтезувати значну кількість ензимів, з яких найбільше значення мають хітиназа, протеїназа, ліпаза та амілаза [1, 2].

Нами досліджено активність таких гідролітичних ензимів: амілази, целюлази, β -глюкозидази, ксиланази, протеїнази, нітрат-редуктази, уреаз, ліпази у культурах *C. militaris*. У всіх штамів спостерігали позитивні реакції на більшість ензимів, активність яких визначали. Не виявлено наявності ксиланази (табл. 2).

На цьому етапі експериментів у ході проведення первинного скринінгу здійснено дослідження наявності певних ензимів за допомогою якісних тестів (у табл. 2 відображено «+» або «-»), але в подальшому ми плануємо провести кількісні дослідження окремих ензимів у штамів, які

вважаємо біотехнологічно перспективними продуцентами. Проведення кількісних визначень ензиматичної активності всього спектра ензимів — трудомісткий процес і на даному етапі досліджень був недоцільним.

Визначення наявності окисно-відновних ензимів (лакази, тирозинази і пероксидази) показало, що всі досліджені культури виявили позитивну реакцію лише на тирозиназу, реакції на лаказу і пероксидазу не спостерігали.

Таким чином, у біотехнології культивування цієї групи грибів з урахуванням їхніх екологічних та фізіологічних особливостей живлення слід використовувати середовища, які містять джерела протеїнів.

Одним із найважливіших фізико-хімічних параметрів середовища є рН, значення якого впливає на фізіологічну активність культур та продуктивність біотехнологічного процесу. Дослідження впливу середовища на ріст культур показало необхідність визначення оптимальних значень рН для кожного штаму, оскільки це впливає на підвищення продуктивності біотехнологічного процесу. Вираховуючи оптимальне для росту культур значення рН середовища в діапазоні від 2 до 8, встановили, що культури починали рости за рН 3,0 (рис. 5).

 Таблиця 2. Ензиматичні реакції на наявність гідролітичних ензимів у досліджених штамів *Cordyceps militaris*

Вид, штамп	Ензим							
	Протеїназа	Амілаза	Целюлаза	β -Глюкозидаза	Ксиланаза	Уреаз	Нітрат-редуктаза	Ліпаза
<i>C. militaris</i> , 1862	+++	++	+	+	-	+	+	++
<i>C. militaris</i> , 2029	+++	++	++	+	-	+	+	++

Примітка: «-» — реакція відсутня; «+» — слабка реакція; «++» — помірна реакція; «+++» — сильна реакція.

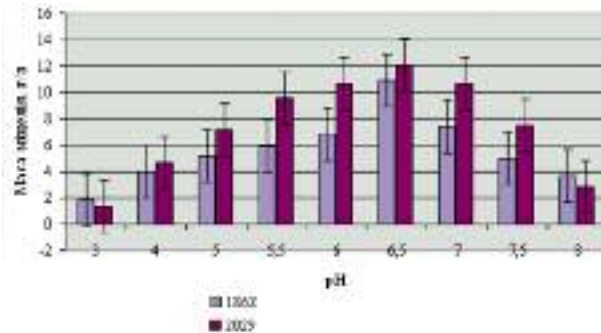


Рис. 5. Накопичення міцеліальної маси штамми *C. militaris* на середовищах з різними початковими значеннями рН (14-та доба): штам 1862; штам 2029.

Оптимальним для росту досліджених штамів є рН 6,0–6,5. За цих значень вихід біомаси становив понад 11,5 г/л на 14-ту добу культивування у стаціонарних умовах. За даними літератури, під час вирощування культури *C. militaris* діапазон оптимальних значень рН для росту міцелію і накопичення екзополісахаридів становив 5,0–6,0 [24–26]. За іншими даними, у разі дослідження фізіології *C. militaris* на рідких живильних середовищах максимальну концентрацію біомаси (8,1 г/л) було одержано за початкового значення рН 9,0 [3].

Виходячи з отриманих нами даних і аналізу літератури можна зробити висновок, що залежність росту культур *C. militaris* від рН середовища є штамоспецифічною ознакою і для кожного штаму на певному середовищі слід знаходити його оптимальне значення.

Для росту вегетативного міцелію *C. militaris* кращими джерелами вуглецю були глюкоза, лактоза і сахароза (табл. 3).

Максимальну кількість міцеліальної маси спостерігали для штаму *C. militaris* 1862 (понад 11,2 г/л), *C. militaris* 2029 (12,9 г/л) і екзополісахаридів (2,6 і 2,4 г/л) відповідно.

За даними літератури [24], штами *C. militaris* добре використовують глюкозу, крохмаль і сахарозу, на середовищах з такими

вуглеводами культури накопичують понад 8,5 г/л біомаси на 4-ту добу культивування.

Нами встановлено, що під час росту культур на середовищах із різними джерелами вуглецевого живлення рН змінювалось у кислий бік. Зниження рН середовища залежало в основному від природи джерела вуглецю і швидкості його використання. На живильних середовищах із повільним використанням джерела вуглецю, зокрема крохмалю, значення рН знижувалось у процесі росту меншою мірою (до 4,8–5,2), ніж на середовищах з глюкозою (4,0–4,2).

Як джерела азоту застосовували неорганічні (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) і органічні (пептон, дріжджовий і кукурудзяний екстракти). Серед органічних оптимальними джерелами азоту для росту *C. militaris* були пептон і дріжджовий екстракт (накопичення міцеліальної маси — понад 12 г/л) (табл. 4).

Оптимальним серед неорганічних джерел азоту виявився фосфат амонію (кількість біомаси — понад 10,0 г/л). Це можна пояснити тим, що фосфат амонію є джерелом не лише азоту, але й фосфору, який є необхідним для нормального росту грибів.

Слід зазначити, що оптимальні для накопичення біомаси *C. militaris* глюкоза, сахароза, пептон, дріжджовий екстракт є поширеними компонентами рідких і твердих живильних середовищ і їх найчастіше застосовують для культивування різних видів грибів, у тому числі й роду *Cordyceps* [11, 12, 24–26].

Визначення накопичення екзополісахаридів на рідких середовищах (табл. 4) показало, що їх максимальна кількість фіксується на середовищах із пептоном та дріжджовим екстрактом (2,9 і 2,1 г/л відповідно). Найменший вплив на цей показник мали середовища з мінеральними джерелами азоту.

За даними літератури, накопиченню екзополісахаридів сприяли фосфат амонію

Таблиця 3. Вплив джерел вуглецю на ріст *C. militaris* і синтез екзополісахаридів

Джерело вуглецю	<i>C. militaris</i> , 1862		<i>C. militaris</i> , 2029	
	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л
Глюкоза	11,3±0,4	2,4±0,2	12,7±0,3	2,2±0,1
Крохмаль	10,8±0,3	1,8±0,1	11,5±0,2	1,3±0,3
Ксиліоза	9,2±0,3	2,2±0,3	9,8±0,3	1,9±0,2
Лактоза	11,2±0,5	2,4±0,3	12,1±0,3	2,2±0,2
Мальтоза	11,0±0,3	1,1±0,2	11,6±0,4	0,9±0,1
Маноза	8,5±0,4	1,7±0,2	9,3±0,2	1,3±0,2
Сахароза	11,5±0,3	2,6±0,1	12,9±0,4	2,1±0,2

Таблиця 4. Вплив джерел азоту на ріст *C. militaris* і синтез екзополісахаридів

Джерело азоту	<i>C. militaris</i> , 1862		<i>C. militaris</i> , 2029	
	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л	Біомаса, г/л	Екзополісахариди, г/л
NaNO ₃	6,7±0,4	1,2±0,1	7,7±0,3	1,2±0,2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	10,0±0,2	1,0±0,1	9,4±0,3	1,0±0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,0±0,2	0,3±0,2	5,3±0,2	0,3±0,1
Пептон	12,0±0,4	2,9±0,3	12,8±0,4	2,6±0,1
Дріжджовий екстракт	12,0±0,3	2,1±0,2	12,5±0,3	2,0±0,3
Кукурудзяний екстракт (КЕ)	8,0±0,2	1,4±0,1	7,7±0,2	1,4±0,2

і пептон, на цих середовищах кількість їх становила 1,05 і 1,19 г/л відповідно [12]. У роботі [24] наведено дані щодо впливу джерел вуглецю й азоту на накопичення міцеліальної маси та екзополісахаридів. Найсприятливішими джерелами вуглецю виявились кукурудзяний екстракт і соєвий пептон (1,97 та 1,06 г/л відповідно).

Отже, особливості накопичення біомаси та екзополісахаридів *C. militaris* залежать передусім від складу середовища і пов'язані з наявністю речовин-індукторів та хімічною природою сполук, що є джерелами вуглецю й азоту для гриба.

Оскільки комплексні середовища, з одного боку, є сприятливішими для росту й одержання БАР з грибів, ніж синтетичні, а з другого — відносно дешевими, за культивування *C. militaris* доцільно використовувати середовища з пептоном і дріжджовим екстрактом.

Дані літератури, а також результати нашої роботи свідчать, що фізіологічні властивості різних видів грибів суттєво різняться і тому не може існувати універсального живильного середовища, склад якого був би оптимальним і придатним для будь-якої культури. Одержані дані щодо росту і біосинтетичної активності досліджених штамів *C. militaris* дають змогу в подальшому прогнозувати оптимізацію рідких живильних середовищ для глибокого культивування з метою одержання міцеліальної маси та екзополісахаридів.

У літературі ми не знайшли даних стосовно впливу світла на розвиток вегетативного міцелію. Проте відомо, що світло також впливає на морфологію культур і позначається на характері подальшого плодоношення.

Дослідження впливу світла на швидкість радіального росту і морфологію колоній штамів *C. militaris* під час культивування на агаризованому середовищі показало, що опромінення синім світлом (довжина хвилі 450,0 нм) збільшувало швидкість радіального росту *C. militaris* на 10,0%, а опромінення червоним світлом (632,8 нм) — на 13,8%. На 4-ту добу після опромінювання *C. militaris* у морфології його колоній на СА з'являються відмінності: у дослідному варіанті на відміну від контрольного край колонії стає білим пухнастим, ближчий до центру злегка втиснений міцелій жовтіє (рис. 6).

Опромінення посівного міцелію в імпульсному режимі (450,0 нм) індукувало формування стром гриба *C. militaris* на рідкому живильному середовищі з пептоном (рис. 7, А, Б).

Опромінення блакитним світлом (450 нм) стимулювало синтез біомаси *C. militaris* (5–10%). Як блакитне, так і червоне (632,8 нм) світло не впливало на акумуляцію ендополісахаридів і дещо зменшувало продукцію екзополісахаридів (табл. 5).

Таблиця 5. Ріст *C. militaris* і синтез полісахаридів після опромінення

Довжина хвилі	Біомаса, а.с.в.	Ендополісахариди, %	Екзополісахариди, г/л
Без опромінення	5,33±0,09	13,2±0,33	5,5±0,11
450,0 нм	6,18±0,17	13,3±0,47	3,3±0,08
632,8 нм	5,67±0,26	13,5±0,51	3,8±0,10

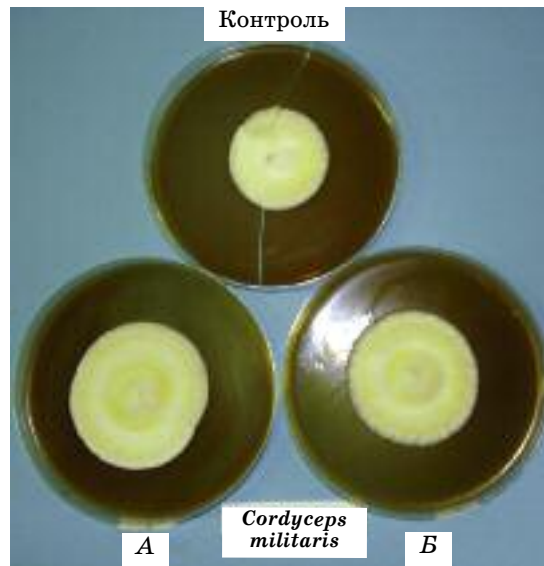


Рис. 6. Міцеліальні колонії *Cordyceps militaris* на СА після опромінення:
 А — He-Ne лазером, довжина хвилі 632,8 нм; Б — аргонним лазером, довжина хвилі 450 нм

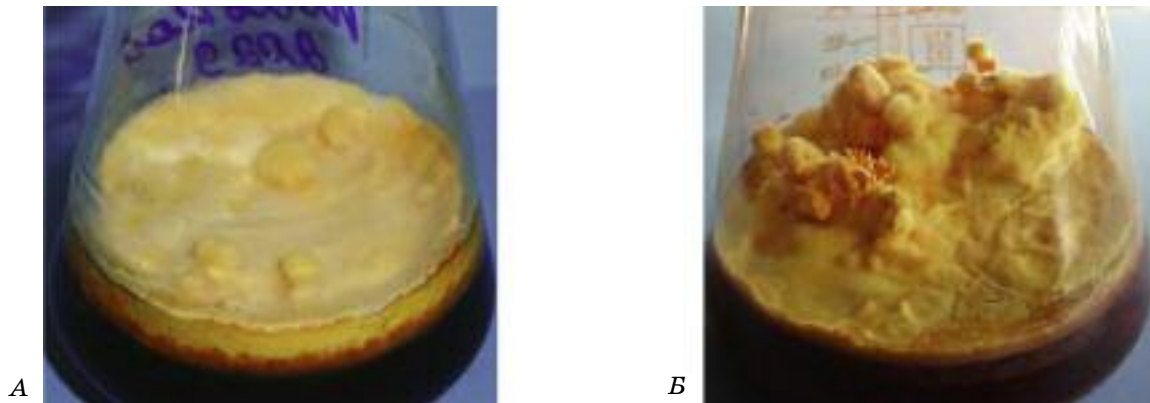


Рис. 7. Утворення стром *Cordyceps militaris* на рідкому середовищі з пептоном:
 А — контроль; Б — після опромінення в імпульсному режимі (450,0 нм)

Таким чином, за допомогою сканувально-го електронного мікроскопа досліджено основні мікроморфологічні особливості вегетативного міцелію *C. militaris*. Виявлені мікроморфологічні ознаки можна використовувати для ідентифікації культур цього виду та контролю чистоти у вегетативній стадії росту за умов штучного культивування.

Отримано дані про ріст і морфологію культур *C. militaris* на агаризованих живильних середовищах різного складу за різних температур інкубації. За величиною швидкості росту досліджені штами можуть бути віднесені до групи грибів, що ростуть повільно. Проведені якісні ензиматичні

тести показали, що досліджені культури мають значний набір гідролітичних ензимів і за умов збереження в умовах колекції не втрачають своєї фізіологічної активності. Встановлено оптимальні для росту джерела вуглецю (глюкоза, лактоза і сахароза), органічні джерела азоту (пептон, дріжджовий екстракт) та фосфат амонію (рН 6,0–6,5).

Доведено, що опромінення світлом різної природи стимулює біологічну активність вегетативного міцелію, що сприяє збільшенню швидкості радіального росту та накопиченню біомаси на рідких середовищах.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Евлахова А. А.* Энтомопатогенные грибы. — Л.: Наука, 1974. — 260 с.
2. *Коваль Э. З.* Клавиципитальные грибы СССР. — К.: Наук. думка, 1984. — 287 с.
3. *Kim S. W., Xu C. P., Hwang H. J. et al.* Production and characterization of exopolysaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3 // *Biotechnol. Progr.* — 2003. — V. 19. — P. 428–435.
4. *Yu K. W., Suh H. J., Bac S. H. et al.* Chemical properties and physiological activities of stromata of *Cordyceps militaris* // *J. Microbiol. Biotechnol.* — 2001. — V. 11. — P. 266–274.
5. *Ng T. B., Wang H. X.* Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2005. — V. 57, N 12. — P. 1509–1519.
6. *Isaka M., Kittakoy P., Kirtikara K., Hywel-Jones N.* Bioactive substances from insect pathogenic fungi // *Acc. Chem. Res.* — 2005. — V. 38, N 10. — P. 813–823.
7. *Dai Yu-Ch., Yang Zh-L., Cui B-K., Yu Ch-J.* Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review) // *Int. J. Med. Mushrooms.* — 2009. — V. 11, N 3. — P. 287–302.
8. *Kim G. Y., Yun J. W.* Water extract of *Cordyceps militaris* enhances maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells *in vitro* // *Biol. Pharm. Bull.* — 2006. — V. 29, N 2. — P. 354–360.
9. *Leung P. H., Zhang Q. X., Wu J. Y.* Mycelium cultivation, chemical composition and anti-tumour activity of a *Tolyposcladium* sp. Fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis* // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — V. 101. — P. 275–283.
10. *Xu C. P.* Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by *Cordyceps militaris* NG3 // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2002. — V. 36, Pt. 2. — P. 127–131.
11. *Dong C. H., Yao Y. I.* Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture / *J. Appl. Microbiol.* — 2005. — V. 99, N 3. — P. 483–492.
12. *Kim S. W., Hwang H. J., Xu C. P.* Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738 // *Ibid.* — 2003. — V. 94. — P. 120–126.
13. *Бухало А. С., Митропольська Н. Ю., Михайлова О. Б.* Каталог культур Колекції культур шапинкових грибів (ІБК). — К.: Альтерпрес, 2011. — 100 с.
14. *Соломко Е. Ф., Ломберг М. Л., Митропольська Н. Ю.* Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу // *Укр. ботан. журн.* — 2000. — Т. 57, № 2. — С. 119–126.
15. *Бухало А. С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. — К.: Наук. думка, 1988. — 144 с.
16. *Molitoris H. P.* Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // *Czech Mycol.* — 2000. — V. 52, N 2. — P. 97–24.
17. *Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В. И. Билай.* — К.: Наук. думка, 1982. — 550 с.
18. *Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А.* Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наук. думка, 2006. — 238 с.
19. *Kobayasi Y., Shimizu D.* The genus *Cordyceps* and its allies from New Guinea // *Bull. Nat. Sci. Mus., Ser. B (Bot.).* — 1976. — V. 2, N 4. — P. 133–151.
20. *Zare R., Gams W.* A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. IV. The genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. // *Nova Hedwigia.* — 2001. — V. 73, N 1–2. — P. 1–50.
21. *Zare R., Gams W.* A revision of the *Verticillium* fungicola species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium* // *Mycol. Res.* — 2008. — V. 112, N 7. — P. 811–824.
22. *Bridge P. D., Clark M. S., Pearce D. A.* A new species of *Paecilomyces* isolated from the Antarctic springtail *Cryptopygus antarcticus* // *Mycotaxon.* — 2005. V. 92. — P. 213–222.
23. *Крюков В. Ю., Ярославцева О. Н., Седнев Г. Р., Борисов Б. А.* Локальные эпизоотии, вызванные кордиципитоидными грибами (*Ascomycota, Hypocreales*), в популяциях лесных чешуекрылых и пилильщикова летне-осеннего комплекса в Сибири // *Микол. фитопатол.* — 2010. — Т. 44, Вып. 4. — С. 315–328.
24. *Park J. P., Kim S. W., Hwang H. J., Yum J. W.* Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* // *Lett. Appl. Microbiol.* — 2001. — V. 33. — P. 76–81.
25. *Билай В. И.* Основы общей микологии. — К.: Вища школа, 1989. — 392 с.
26. *Kim H. O., Yun J. W.* A comparative study on the production of exo-polysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *C. sinensis* in submerged mycelial cultures // *Ibid.* — 2005. — V. 99, N 4. — P. 728–738.

**НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ГРИБА
Cordyceps militaris (L.: Fr.) Fr. (*Ascomycota*)
КАК ПРОДУЦЕНТА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ**

О. В. Михайлова
Н. Л. Поединок

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины,
Киев

E-mail: mikhajlov_e@ukr.net

Представлены результаты исследования роста и морфологических особенностей культур лекарственного гриба *Cordyceps militaris* из коллекции Института ботаники им. Н. Г. Холодного НАН Украины. Методом сканирующей электронной микроскопии изучены характерные для данного вида микроморфологические структуры. Морфолого-культуральные исследования проводили на четырех агаризованных питательных средах. Для всех исследованных штаммов оптимальными для вегетативного роста были глюкозо-пептон-дрожжевой агар и мальц-экстракт агар, температура инкубации — 16 °С, критическая температура — 36 °С. Оптимальными источниками углерода для вегетативного роста мицелия были глюкоза, лактоза и сахароза, среди органических источников азота — пептон и дрожжевой экстракт, рН 6,0–6,5. Облучение светом различной природы стимулировало скорость радиального роста гриба на агаризованных и накопление биомассы — на жидких питательных средах.

Ключевые слова: *Cordyceps militaris*, сканирующая электронная микроскопия, рост, морфология, температура инкубации, источники углерода и азота, рН, мицелиальная масса.

**SOME BIOLOGICAL PROPERTIES
OF *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Fr.
(*Ascomycota*) MUSHROOM
AS PRODUCER OF MEDICINAL
SUBSTANCES**

O. V. Mykchaylova
N. L. Poyedinok

Kholodny Institute of Botany of National
Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: mikhajlov_e@ukr.net

Results of the study on growth and morphological peculiarities of valuable medicinal mushroom *Cordyceps militaris* from the culture collection of mushrooms of Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine are given. Using the method of scanning electron microscopy, the micro-morphological structures specific to this species were studied. This allows identifying this species in pure culture. Culture-morphological studies were performed on four agar nutrient media. Glucose-peptone-yeast agar medium, malt agar extract and incubation temperature of 16 °C were the most favorable for the vegetative growth of all the tested strains. Temperature of 36 °C is critical. Maximal growth of *C. militaris* was observed at pH 6.0–6.5. The optimal sources of carbon for vegetative mycelium growth were glucose, lactose and sucrose, whereas peptone and yeast extract were the best sources of nitrogen. Light irradiation of different nature stimulated the radial growth in agar media and accumulation of their biomass in liquid ones.

Key words: *Cordyceps militaris*, scanning electron microscopy, the growth, morphology, incubation temperature, carbon and nitrogen sources, pH, mycelia mass.