

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Біологічний факультет

**Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом
цивільного захисту та медицини**

Кваліфікаційна робота

магістра

**на тему: ВПЛИВ АКТИВНИХ СПОЛУК *CORDISEPS MILITARIS* НА ДЕЯКІ
ФІЗІОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛЮДИНИ**

Виконала: студентка 2 курсу, групи 8.0912-б-з
спеціальності 091 Біологія

освітньої програми Біологія

Д.О. Пристінська

Керівник д.б.н, проф. О. Г. Куц

Рецензент к.б.н., доц. Є.Ю. Гороховський

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Факультет біологічний

Кафедра фізіології, імунології і біохімії з курсом цивільного захисту та
медицини

Рівень вищої освіти магістр

Спеціальність 091 Біологія

Освітня програма Біологія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Зав. кафедрою О. Г. Куш

« 05 » вересня 2022 р.

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ СТУДЕНТЦІ**

Пристінській Дарині Олександрівні

1. Тема роботи Вплив активних сполук Cordiceps militaris на деякі фізіологічні показники людини

керівник роботи Оксана Георгіївна Куш, д.б.н., професор

затверджена наказом вищого навчального закладу від «01» 05 2023 р. №645-с

2. Строк подання студентом роботи 13.12.2023

3. Вихідні дані до роботи встановлення можливих корисних ефектів гриба на організм людини та їх детальний аналіз.

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) Вивчити експериментальні та клінічні дослідження впливу Cordiceps militaris на фізіологічні показники людини; з'ясувати як змінюються фізіологічні показники під впливом активних сполук Cordyceps militaris

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) таблиці: математико-статистичні показники функціонального стану печінки за біохімічним аналізом крові та ліпідним спектром.

6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
1-3	д.б.н., професор Кущ О.Г		
4	к.б.н., доцент Гороховський Є.Ю.		

7. Дата видачі

завдання _____

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ п/п	Назва етапів дипломної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітки
1	Вплив <i>Cordyceps militaris</i> на організм людини.	03.10.2022	
2	Методи культивування <i>Cordyceps militaris</i> .	14.11.2022	
3	Вирощування <i>Cordyceps militaris</i> .	05.12.2022	
4	Дослідження впливу <i>Cordyceps militaris</i> при неалкогольній жировій хворобі печінки.	09.01.2023	
5	Статистична обробка даних.	12.06.2023	

Студент _____

Д. О. Пристінська

Керівник роботи _____

О. Г. Кущ

Нормоконтроль пройдено

Нормоконтролер _____

Є. Ю. Гороховський

РЕФЕРАТ

Роботу викладено на 79 сторінках друкованого тексту, проілюстровано 9 таблицями та 5 рисунками. Список використаної літератури містить 69 джерел, з них 55 – іншомовних.

Об'єктом дослідження є вплив активних сполук, наявних у *Cordyceps militaris*, на деякі фізіологічні показники людини. Предметом дослідження є конкретні фізіологічні процеси та показники елементів, які можуть бути модульною взаємодією з цими сполуками.

Метою даної роботи є науково обґрунтоване вивчення впливу активних сполук *Cordyceps militaris* на визначені фізіологічних показників людини. Основним завданням є встановлення можливих корисних ефектів гриба на організм людини та їх детальний аналіз.

Науковою новизною є глибоке вивчення та систематичний аналіз впливу конкретних активних сполук, присутніх у *Cordyceps militaris*, на деякі фізіологічні параметри людини. Дослідження спрямоване на виявлення та розкриття нових можливостей використання цього гриба для підтримки та покращення фізичного стану печінки.

CORDYCEPS MILITARIS, ГЛИБИННИЙ МІЦЕЛІЙ, БІОХІМІЧНИЙ СКЛАД, ПОЛІСАХАРИДИ, БІОЛОГІЧНА ДІЯ, СКРИНІНГ, БАД

ABSTRACT

The work is presented on 79 pages of printed text, illustrated with 9 tables and 5 figures. The list of used literature contains 69 sources, of which 55 are in foreign languages.

The object of the study is the effect of active compounds present in *Cordyceps militaris* on some physiological parameters of a person. The subject of research is specific physiological processes and indicators of elements that can be a modular interaction with these compounds.

The method of this master's thesis is a scientifically based study of the effect of active compounds of *Cordyceps militaris* on certain physiological parameters of a person. The main task is to establish the possible beneficial effects of the mushroom on the human body and their detailed analysis.

The scientific novelty of the work is an in-depth study and systematic analysis of the effect of specific active compounds present in *Cordyceps militaris* on some physiological parameters of a person. The research is aimed at identifying and revealing new possibilities of using this mushroom to maintain and improve the physical condition of the elements.

CORDYCEPS MILITARIS, DEEP MYCELIUM, BIOCHEMICAL COMPOSITION, POLYSACCHARIDES, BIOLOGICAL EFFECT, SCREENING, BAD

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	8
ВСТУП.....	9
1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1 Загальні відомості про лікарські гриби роду <i>Cordyceps</i>	11
1.2 Морфо-фізіологічні характеристики роду <i>Cordyceps</i>	12
1.3 Сучасні біотехнологічні тенденції інтенсивного культивування лікарських грибів	21
1.4 Методи культивування.....	21
1.4.1 Твердофазна ферментація.....	23
1.4.2 Глибинне культивування.....	25
1.5 Використання глибинного культивування для отримання <i>Cordyceps militaris</i>	29
1.6 Фактори регуляції росту та біосинтетичної активності аскоміцетів та методи їх інтенсифікації.....	30
1.6.1 Оптимізація живильних середовищ.....	31
1.6.2 Стимулятори росту та біосинтетичної активності.....	32
1.7 Фотоморфогенез грибів.....	33
1.8 Отримання спорового матеріалу аскоміцетів та пророщування спор.....	37
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	38
2.1 Об'єкт та методи дослідження.....	38
2.2 Культурально-морфологічні особливості при вирощуванні <i>Cordyceps militaris</i>	41
2.3 Особливості накопичення біомаси та екзополісахаридів <i>C. Militaris</i>	49
2.4 Дослідження впливу світла на швидкість радіального росту і морфологію колоній штамів <i>C. Militaris</i>	52
3 ЕСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	56

3.1 Патологія неалкогольної жирової хвороби печінки.....	56
3.2 Оцінка показників функціонального стану печінки за біохімічним аналізом крові.....	59
3.3 Характеристика порушень ліпідного спектра крові.....	62
4 ОХОРОНА ПРАЦІ.....	65
ВИСНОВКИ.....	69
РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	71
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	72

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

АсАт - Аспартатамінотрансфераза

АлАТ - Аланінамінотрансфераза

ВА - вівсяний агар

ГГТП - гамма-глутамілтранспептидази

КГА - картопляно-глюкозний агар

КДА - картопляно-декстрозний агар

ЛФ - лужної фосфатази

МЕА - мальц екстракт агар

МРА - мальц екстракт пептонний агар

МУРА - мальц дріжджовий пептонний агар

СА - сусло-агар

t - температура

БАД - біологічно активні харчові добавки

БАР - біологічно активні речовини

НАЖХП - неалкогольна жирова хвороба печінки

ВСТУП

Активні сполуки природного походження, зокрема *Cordyceps militaris*, здавна цікавлять науковців та вчених своїми всіма корисними властивостями для людини. Ці гриби, що відносяться до класу *Ascomycetes*, відомі своєю унікальною біологічною активністю та великим спектром біологічно активних речовин. Серед них виділяються активні сполуки, які можуть впливати на фізіологічні показники організму людини.

Об'єктом даного дослідження є активні сполуки *Cordyceps militaris*, які відомі своїм помітним впливом на фізіологічні функції організму людини.

Предметом дослідження є вивчення впливу цих активних ефектів на деякі фізіологічні показники людини та їх можливий терапевтичний ефект.

Метою даної магістерської роботи є систематичний аналіз впливу активних сполук *Cordyceps militaris* на конкретні фізіологічні показники людини.

Для досягнення цієї мети поставлені наступні завдання:

- Проведення аналізу біологічно активних сполук *Cordyceps militaris*.
- Вивчення літературних джерел з експериментальних та клінічних досліджень, що стосуються впливу цих сполук на фізіологічні показники людини.
- Проведення експериментальних досліджень з використанням моделей для оцінки впливу *Cordyceps militaris* на вибрані фізіологічні показники.
- Вивчення рівня печінкових ферментів, АсАт, АсАт, білірубину та інших маркерів під впливом активних сполук *Cordyceps militaris*.

Нове дослідження відбувається в систематизації та аналізі наукових даних щодо впливу активних сполук *Cordyceps militaris* на фізіологічні

показники людини, що може відкрити нові перспективи у сфері сучасної біології, медицини та фармакології.

Не зважаючи на значний інтерес до *Cordyceps militaris* у науковому світі, демонструючи повноцінне обґрунтування їхнього впливу на конкретні фізіологічні показники людини залишається актуальною проблемою, яку необхідно знову дослідити та проаналізувати. *Cordyceps militaris* містить біологічно активні речовини, які вже мають антиоксидантні, протизапальні та імуномодулюючі властивості. Це відкриває перспективи для його використання в підтримці та захисті печінки.

Магістерська робота спрямована на розкриття можливого впливу активних сполук *Cordyceps militaris* на фізіологічні показники людини, що має велике значення для подальшого розвитку сучасної біології, медицини та фармакології.

1 ОГЛЯД НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Загальні відомості про лікарські гриби роду *Cordyceps*

Вже більше двох тисяч років тому китайці помітили, що гриби - це не тільки смачна їжа, а й цінні ліки. Історія вивчення грибів у Китаї налічує більше двох тисяч років. За давньою китайською легендою, Шень Хун, цілитель і голова великого клану, випробував на собі сотні різних інгредієнтів, у тому числі гриби, щоб виявити їх корисні властивості та лікувальне призначення. Шень Хун не був самотнім у своїх зусиллях, і протягом наступних тисячоліть багато цікавих китайців діяли як піддослідні кролики та продовжували перевіряти властивості різних грибів, багато з яких виявилися отруйними для людини.

Ентомопатогенні гриби роду *Cordyceps* опинилися в центрі уваги біотехнологів не тільки тому, що, будучи летальними збудниками комах, кліщів і нематод, вони можуть виступати продуцентами біопрепаратів для контролю чисельності фітофагів, але й завдяки відкриттю багатьох біологічно активних речовин (БАР), цінних для фармакології. Певні види *Cordyceps* використовувалися в народній медицині в країнах Південно-Східної Азії протягом століть і зараз набувають популярності в Сполучених Штатах і Європі завдяки своїм унікальним лікувальним властивостям.

На сьогоднішній день у світі описано близько 400 видів *Cordyceps*. Найбільше видове різноманіття і велика кількість цих грибів зафіксовано в тропічних лісах. В оптимальних екологічних умовах низьких широт і гірських районів багато видів кордицепса формують статеву стадію (телеоморфи), в рівнинних районах помірного поясу їх можна зустріти у великій кількості лише на нестатевій (анаморфній) стадії розвитку, які класифікуються як *Deuteromycota*. Є багато видів, які, очевидно, повністю втратили телеоморфів. На жаль, у тропіках і субтропіках багато місць, що характеризуються високою

видовою різноманітністю цих грибів, зникають у результаті інтенсивного розвитку (Шрі-Ланка, Китай, Японія, тропічні ліси Амазонки та ін.) [7].

Найвідомішими представниками цього роду є *C. militaris* і *C. sinensis*. *C. sinensis* зустрічається у важкодоступних районах Гімалаїв на висоті понад 3600 м, де заражає личинок метеликів роду *Hepialus armoricanus* (*Lepidoptera*), хоча іноді може вражати личинок інших видів. Уражена грибок гусениця зимує в ґрунті, а влітку утворює плодове тіло. Кордицепс має високі адаптаційні характеристики, може рости як у звичайних кліматичних умовах, так і у високогірних районах - на висоті до 6000 метрів. *C. militaris* мешкає в лісах Азії, Європи та Північної Америки. Паразитує на личинках і лялечках метеликів, рідше на інших комах (жуках, перетинчатокрылих, напівжорсткокрылих, прямокрылих, рівнокрылих і двокрылих) [7–9].

Систематичне положення:

царство *Fungi*

Відділ *Ascomycota*

клас *Sordariomycetes*

підклас *Hypocreomycetidae*

порядок *Hypocreales*

сімейство *Clavicipitaceae*

Рід: *Cordyceps*

Вид: *C. militaris*

1.2 Морфо-фізіологічні характеристики роду *Cordyceps*

Мицелій на поверхні комахи здебільшого малопомітний або розповсюджується в місцях виходу строми на поверхню, волокнистий, повстятий або туманний у висихаючому стані. Усередині порожнини тіла комахи гіфи - товщиною 1,5-5 мкм, тонкостінні, сильно розгалужені, білого

або кремового кольору , поступово заповнюють всю порожнину, утворюючи склероцій . Строми поодинокі або численні, виникають на різних ділянках шкіри між сегментами комах, прямі або зігнуті, прості або розгалужені біля основи, циліндричні або булавоподібні, 0,8-8 см заввишки, до 2-6 мм завширшки, різних відтінків помаранчевого кольору. Плодова частина верхівкова, циліндрична, булавоподібна , веретеноподібна або еліптична, 0,25-3 см завдовжки, пряма або злегка зігнута, на вершині зазвичай тупа, майже такої ж товщини, як ніжка, або трохи товщі, різних відтінків оранжевого. Кісточка (нижня частина строми) гладенька, світліша: від білуватої до оранжево-червоної [10].

Окрім типового розмноження аскоспорами, кордицепс також розмножується конідіями. Перитеції з мішечками, що містять аскоспори, занурені в строму - булавоподібну структуру, що складається з щільно переплених гіф і виростає з тіла комахи, убитої грибок. У мішках міститься 8 ниткоподібних багатоклітинних спор, які легко розпадаються на окремі клітинні сегменти. Конідієносці - з розгалуженнями, на кінцях яких загострені дрібні округлі конідії. Зазвичай окремі конідієносці розростаються у великі пучки, які виходять з поверхні тіла загиблої комахи. В середині комахи міцелій утворює більше циліндричних конідій, які потім проростають як дріжджі.

Коли аскоспори дозрівають , у верхній частині потовщеної частини мішка утворюється спора, через яку вони виходять назовні. Спори розміщені в мішку паралельним пучком і вивільняються по черзі. Аскоспори викидаються з верхньої частини зрілого мішка з великою швидкістю на відстань 0,3 мм - з інтервалом 1-2 секунди. Після вигнання всіх восьми аскоспор мішечок розпадається і через 0,5-10 хв на розкритті перитеціїв виростає новий мішечок .

Аскоспори, які потрапляють на шкіру сприйнятливих лялечок, проростають і їх зародкові трубки впроваджуються в тіло господаря через дихальця або безпосередньо через шкіру, гідролізуючи хітин . Потрапляючи всередину комахи-господаря, грибок розвивається як дріжджоподібна форма і

виробляє метаболіти, які змінюють поведінку комахи, пригнічують імунну систему та перешкоджають росту чужорідної мікрофлори. Гриб повертається до міцеліальної форми, продукує позаклітинні ліпази, хітинази, протеази, гідролізує внутрішні органи комахи, залишає сухий хітиновий панцир, а в його оболонках утворюється тверда дефінова маса псевдосклероція [11].

У народній медицині східних країн використовується як плодове тіло личинки, так і тіло, заповнене міцелієм. Застосовується при захворюваннях легенів і нирок, хронічному бронхіті, недостатності життєвої енергії, гіперліпідемії, цирозі печінки, ослабленні лібідо, імпотенції. Регулярне вживання кордицепсу сприяє підвищенню стійкості до інфекційних захворювань, його вживають після виснаження та тривалої хвороби [4].

Лікувальні властивості кордицепса підтверджені сучасними науковими дослідженнями. Сполуки, що входять до складу цього лікарського гриба, покращують стан імунної системи, посилюють опірність до різноманітних патогенних мікроорганізмів, мають протипухлинну дію, підвищують адаптаційні можливості організму, мають антиоксидантну дію та перешкоджають процесам старіння, гармонізують обмінні процеси. Також кордицепс благотворно впливає на нервову, ендокринну, дихальну та репродуктивну системи, має антиаритмічну та гіпотензивну дію, знижує рівень холестерину, покращує мікроциркуляцію крові в тканинах та перешкоджає утворенню тромбів [12].

Кордицепс містить унікальний комплекс фізіологічно активних речовин: білки, незамінні амінокислоти, ліпіди, ненасичені жирні кислоти, ергостерин, вітаміни B1, B2, B12, E і K, вуглеводи (моно-, ди-, оліго- і полісахариди), стерини, нуклеозиди, макро- та мікроелементи (K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Se, Al, Ni та ін.).

Біологічний ефект кордицепса в основному зумовлений імуномодулюючими полісахаридами, які активують імунні клітини, збільшують вироблення цитокінів та інтерферону, а також іншими похідними цукру, такими як кордицепсова кислота (D-маніт). Протипухлинна дія

полісахаридів кордицепса, як і інших лікарських грибів, пов'язана з підвищенням захисних сил організму, хоча механізм їх дії до кінця не вивчений. Водні екстракти *C. militaris* мають протипухлинні та імуномодулюючі властивості *in vivo* та *in vitro* [13-18].

Дослідження біохімічних властивостей різних полісахаридних фракцій кордицепсу. Так, за даними Wu Y., полісахариди (кордіглюкани) міцелію *C. sinensis*, екстраговані гарячою водою та 0,05 М NaOH, містять β -(1 → 3)-D-глікозидний зв'язок, а екзополісахариди мають β -(1 → 3)-D-глікозидний зв'язок в головному ланцюзі та β -(1 → 4)-зв'язок у розгалуженнях [19-20]. Полісахариди в міцелії та плодових тілах *C. militaris* містять α -(1 → 4)-D-глікозидні зв'язки в основному ланцюзі та α -(1 → 6) у розгалуженнях, середня молекулярна маса полісахаридів становить $5,0 \times 10^3$ - $1,3 \times 10^4$ [16-17]. Усі фракції полісахаридів складаються в основному з глюкози, оскільки незначні компоненти можуть включати галактозу, манозу, рамнозу, а також невелику кількість білка.

Препарати на основі кордицепса стимулюють активність і розмноження Т-лімфоцитів, природних кілерів і клітин моноклеарної макрофагальної системи, секрецію факторів лімфоцитів. При цьому активність природних кілерів зросла в 1,5 рази, фагоцитоз моноклеарних макрофагів – на 70%, кількість фагоцитів – на 130%. Застосування кордицепсу дозволяло організму при пошкодженні 40% лейкоцитів відновити їх нормальну кількість протягом 7 днів. Таким чином, спостерігалось не тільки підвищення імунітету, але і стимуляція кровотворення. Екстракт кордицепсу має виражену бронхорозширювальну дію, розслаблює гладку мускулатуру бронхів, заспокоює задишку та сприяє припиненню загострень астми [21].

Полісахариди мають антиоксидантну, протизапальну, гіпоглікемічний ефект, знижують рівень холестерину в крові [29].

Препарати кордицепсу, як і інші грибні полісахариди (PSP, PSK, АНСС, лентинан, арабіноксилани), зменшують вираженість і тривалість побічних

ефектів, пов'язаних з хіміотерапією та променевою терапією, що може бути пов'язано з високою антиоксидантною активністю [30,31].

Протипухлинну дію мають також модифіковані нуклеозиди: кордицепін (3-дезоксиаденозин), дидезоксиаденозин. Під час синтезу нових ниток ДНК ці сполуки вбудовуються замість аденозину, перешкоджаючи реплікації ДНК. Кордицепін пригнічує синтез ДНК у ракових клітинах, оскільки в них порушений механізм відновлення ДНК. Цим пояснюється протівірусна дія кордицепсу [32–34].

Гриби *Cordyceps* мають протимікробні та протигрибкові властивості діяльності, виробляють антибіотики: кордицепін, цефалоспорин і циклоспорин [13,35,36].

Китайські дослідники виявили, що додавання міцелію *C. militaris* до раціону тварин покращує їх репродуктивну функцію за рахунок підвищення статевої активності та якості сперми [41]. Регулярне вживання спортсменами харчових добавок, що містять китайські гриби, дозволяють їм успішно витримувати тривалі фізичні навантаження, призводить до помітного збільшення м'язової сили, більш ефективного засвоєнню кисню клітинами організму [39,40]. Екстракт *C. militaris* впливає на ендокринні функції, стимулює вироблення кортикостероїдів у лабораторних тварин [42].

Найбільш активно *Cordyceps* вивчають китайські та корейські вчені. Їм також належить більшість патентів на використання кордицепса в медичній, харчовій та косметичній промисловості [43-48]. Запатентована харчова добавка (0,1-1% кормового раціону) розроблена на основі міцелію *C. militaris*, вирощеного на субстраті, що складається з бобових і рисових висівок, для прискорення росту тварин і підвищення імунітету [49].

Ентомопатогенні гриби роду *Cordyceps* є смертельними збудниками комах, кліщів і нематод і можуть діяти як виробники біопрепаратів для контролю популяцій комах, шкідливих для людини. Захворювання, викликане кордицепсом, є заразним і зазвичай протікає у формі справжньої епідемії з досить значним рівнем смертності [50]. Китайські вчені запатентували спосіб

отримання біологічного інсектициду, отриманого шляхом ферментаційного культивування кордицепса. Продукт стабільний і безпечний для навколишнього середовища протягом тривалого часу [51].

В останні десятиліття ринок БАДів динамічно розвивається. Ці препарати швидко увірвалися в життя розвинених країн, і сьогодні важко уявити життя американців, європейців і японців без цього класу продуктів. У сучасному світі БАДи поступово стають частиною здорового способу життя. Таким чином, близько 90% населення використовує добавки в Японії, 80% в США і 50% в Європі. БАДи з кожним роком стають все більш популярними серед російських споживачів. Медична практика БАД розвивається. В даний час харчові продукти, збагачені мікроелементами природного походження, отримали поширення і в Україні. Відносна простота реєстрації та виробництва, широкий асортимент і натуральне походження препаратів сприяють поширенню БАД.

Перспективним джерелом для створення БАД є лікарські гриби – продуценти БАР широкого спектру дії. Їх регулярне вживання підвищує імунітет, запобігає захворюванням і прискорює одужання. Переваги грибних препаратів порівняно з рослинними полягають у тому, що гриби легко розмножуються вегетативним шляхом, підгриб зберігається тривалий час, завдяки чому можна контролювати його біохімічний і генетичний склад. Плодові тіла вирощують за інтенсивною технологією в спеціальних грибних фермах, що безпечніше, ніж збір грибів у природі. Для використання в якості сировини для фармацевтичної промисловості міцеліальну біомасу гриба вирощують у глибинній культурі, що дає можливість отримувати стандартизовані продукти із заданими властивостями.

На фармацевтичному ринку представлені такі види грибної продукції:

- на основі штучно культивованих або зібраних природним шляхом плодових тіл;
- суміші злакових субстратів, оброслих міцелієм грибів разом із зачатками;

- міцелій, отриманий методом глибокого культивування в ферментерах.

Поживні речовини для грибів — це висушена біомаса, очищені або частково очищені водно-спиртові екстракти, їх концентрати та суміші, виготовлені у формі таблеток або капсул. З широким використанням БАР-грибів у медицині пов'язана поява нового напрямку – фармацевтичної мікології [3,52].

Ресурси кордицепса обмежені. Збір личинок комах, заражених цим паразитичним грибом, відбувається обмежений час у важкодоступних місцях, тому в стародавньому Китаї кордицепс вживали тільки члени імператорської сім'ї або дуже заможні люди. В даний час його лікувальна і ринкова цінність значно перевищує женьшень і ріг: ринкова ціна 1 кг натурального кордицепса сягає приблизно 1200-1300 доларів США. Штучне вирощування кордицепса почалося в 1970-х роках. При цьому суттєво знизилася собівартість отриманої продукції та збільшився обсяг реалізації. В даний час отриманий біотехнологічним шляхом міцелій використовується для отримання лікарських засобів на його основі.

Найпоширенішим твердофазним культивуванням цього гриба є використання субстратів на основі шовкопряда або зерна. Показано подібність біохімічного складу плодових тіл і міцелію кордицепса, тому для отримання якісних препаратів культивування плодових тіл не є обов'язковим. Через неможливість стандартизації сировини для натурального кордицепса, що продається на китайських ринках, можливість забруднення свинцем, безпечніше використовувати міцелій, вирощений штучно.

Останніми роками з'явилися публікації щодо глибинного культивування *C. militaris*, як найбільш перспективного методу отримання грибної біомаси та метаболітів, що дозволяє за короткий час отримувати стандартні продукти із заданими характеристиками. Однак дані щодо полісахаридів та інших БАР у зануреній культурі часто суперечливі. Використовують напівсинтетичні

поживні середовища або поживні середовища на основі патоки. Процес вирощування грибів досить тривалий [53-60].

Для підвищення продуктивності мікроорганізмів і грибів використовуються різні методи: підбір і оптимізація складу поживних середовищ, додавання прекурсорів і активаторів біосинтезу БАВ, різні способи аерації, контроль в'язкості середовища; природний відбір штамів; індукований мутагенез; генетична модифікація виробничого штаму. Найкращий ефект дає комплексне вирішення цих проблем. Оптимальне поєднання зазначених методів і підходів при розробці технічних параметрів процесу культивування дає змогу в десятки разів збільшити біологічну продуктивність мікроорганізмів [61-63].

В даний час біотехнологія виробництва БАВ вимагає максимальної інтенсифікації всіх технологічних етапів вирощування продуцентів. У цьому контексті гостро постає проблема пошуку екологічно чистих стимуляторів їх біологічної активності. Наявна на даний момент інформація в літературі дозволяє говорити про перспективність використання біотехнології на основі використання лазерного випромінювання. Відомо, що світло є одним із факторів, що впливають на ріст, морфогенез і пігментацію багатьох видів культивованих грибів. Однак механізми фоторецепції в них на даний момент вивчені недостатньо. В даний час до розробки методів впливу світла на гриби переважає емпіричний підхід. Це пов'язано з відсутністю теоретичного та експериментального обґрунтування механізму дії низькоінтенсивного випромінювання на організм гриба. Необхідно вивчити спектр дії, визначити найбільш ефективні довжини хвиль, методи опромінення (інтенсивність, доза, геометрія, поляризація, когерентність і т.д.) . Одним із спірних питань є специфіка дії низькоінтенсивного лазерного випромінювання на біологічні об'єкти. На думку одних дослідників, вирішальним фактором дії світла на живий організм є когерентність лазерного випромінювання, на думку інших — просторова неоднорідність лазерного поля.

Як показали дослідження вчених Ботанічного інституту імені Н. Г. Холодного НАН України, вплив світла на гриби нерівномірний. Вони мають регуляторну систему, яка називається мікохромною, аналогічною фітохромній системі вищих рослин. Мікохромні системи виявлені у представників різних таксономічних груп: аскоміцетів, базидіоміцетів і дейтеромицетів. Переважна більшість грибів, які, як було показано, мають мікохромні системи, мають пігменти каротиноїди та меланін [61,62].

Показано, що опромінення в певних режимах лікарського базидіального гриба (*Ganoderma lucidum*, *Inonotus koscii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Laetiporus sulfureus* і *Hericiium erinaceus*) стимулює ріст міцелію, скорочує фази розвитку, підтримує утворення більш потужного та активного міцелію та підвищує врожайність плодових тіл. Активація посівного міцелію опроміненням червоним або синім світлом дає змогу зменшити дозу його внесення в субстрат у 2 рази. Наступним кроком досліджень у цьому напрямку буде вивчення механізмів дії світла, вибір ефективних довжин хвиль та оптимізація режимів опромінення, визначення його впливу на синтез і властивості синтезованих сполук. Значний інтерес представляє вивчення впливу лазерного випромінювання на ріст і формування БАР грибом *S. militaris*.

Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей цього гриба в умовах глибинного культивування дасть можливість подальшого розвитку біотехнології для створення нових біологічно активних харчових і кормових добавок з лікувально-профілактичними властивостями [64].

1.3 Сучасні біотехнологічні тенденції інтенсивного культивування лікарських грибів

Інтенсивні методи вирощування (на спеціальних ділянках з регульованими умовами живлення та мікрокліматом) мають ряд переваг порівняно з екстенсивними:

- процес вирощування відбувається цілий рік;
- врожайність вище і стабільніше, завдяки створенню оптимальних умов;
- більш короткий виробничий цикл і можливість використання автоматизації виробничих процесів.

1.4 Методи культивування

Чи можуть екстракти грибів справді покращити настрій, загальний стан здоров'я та навіть спортивні результати? Ті, хто продає кордицепс, складний гриб, який використовується в традиційній китайській медицині, роками заявляли про ці позитивні ефекти (і багато іншого).

Але в реальних наукових дослідженнях позитивний ефект є, або його немає. В одному дослідженні результати чудові, в іншому ніякого ефекту. Щурам це сподобалося б, але люди нічого не відчули б.

Кордицепс є однією з найбільших аномалій в індустрії харчових добавок. Деякі дослідники вважають, що нарешті зрозуміли чому. За допомогою кількох нових досліджень можна зрозуміти, що потрібно використовувати правильний екстракт кордицепса. Так як *C. militaris* росте на личинках комах там, де умови не є абсолютно стерильними і в природі

відбуваються часті мутації грибів, тому для медичних цілей рекомендується використовувати лише вирощені за допомогою спеціальної біотехнології.

В даний час існують різні способи вирощування лікарських грибів. Вибір методу визначається цілями і можливостями. Деякі методи надзвичайно прості. З іншого боку, стерильні методи набагато складніші. Вирощування вимагає спеціальних знань з біології грибів.

Найдавніша з них, екстенсивна, заснована на здатності аскоміцетів розвиватися сапротрофно на мертвих личинках комах. Цей метод (*log culture*) був розроблений в Японії та Китаї понад 1000 років тому і досі широко використовується дрібними виробниками в Азії для отримання плодкових тіл для продажу на місцевих ринках.

Перевага такого вирощування в тому, що воно є простим і природним, але такий процес трудомісткий, повільний і сезонний (цей вид грибів плодоносить з червня по листопад), порівняно з інтенсивним способом вирощування грибів на стерильних сумішах і останків тварин, і не вимагає високої продуктивності.

Культивування аскоміцетів включає наступні етапи:

- Відбір спор грибів для посіву на живильне середовище для отримання чистої культури грибів;
- Отримання чистої культури міцелію шляхом посіву тканини з плодового тіла на живильне середовище;
- Підтримка міцеліальних культур;
- Отримання посівного матеріалу;
- Приготування поживних середовищ;
- Щеплення та колонізація та створення оптимальних умов вирощування.

Першим кроком у процесі культивування грибів є отримання чистої культури міцелію певного штаму грибів. Вперше такі досліді були проведені в Інституті Пастера в Парижі в 1893 р., а пізніше методи отримання чистої культури були вдосконалені для скорочення термінів і оптимізації умов

вирощування міцелію [55]. Культури міцелію виділяли з тканин плодів і спор. Найбільш універсальним є спосіб вилучення чистих культур з плодових тіл. Це дозволяє отримати культуру дикаріотичного міцелію без подальшого схрещування гаплоїдного міцелію. Успіх в отриманні чистих культур аскоміцетів був досягнутий у зв'язку з використанням антибіотиків, які додають в живильне середовище для пригнічення росту сторонньої мікрофлори. Для кожного виду існують специфічні умови його вирощування, обумовлені його біологічними особливостями, дотримання яких дозволяє зберегти бажані характеристики і активність культури поза природним середовищем. Масштабне виробництво грибів вимагає великої кількості специфічного насінневого матеріалу (1-5% від об'єму виробничого середовища). Посівний міцелій повинен відповідати основним вимогам: мати високу життєздатність, що забезпечує швидкий ріст гіф в субстраті, належати до селекційного штаму з високою активністю. При підготовці необхідно суворо дотримуватись технічного регламенту стерилізації субстрату та асептичних умов посіву.

1.4.1. Твердофазна ферментація

Твердофазна ферментація визначається як процес, який відбувається за відсутності вільної води з синтетичними або природними матеріалами як субстратами. Цей метод культивування призначений для біоконверсії рослинного матеріалу в більш цінні продукти, такі як плодові тіла, кормові добавки, вторинні метаболіти та ферменти. Послідовність технічних операцій отримання плодових тіл аскоміцетів визначається біологією культивованого виду. Загалом їх можна розділити на 6 основних фаз [68]:

1. Підготовка субстрату;
2. Інокуляція – внесення міцелію в субстрат;

3. Інкубація – заселення та розвиток субстрату міцелієм;
4. Початок плодоношення;
5. Утворення плодів;
6. Плодоношення.

Різні варіанти сучасної технології отримання плодових тіл грибів відрізняються в першу чергу способом виготовлення субстрату. Існує два основних методи підготовки субстрату: аеробна ферментація та стерилізація субстрату. Інші відомі технології виробництва грибів займають проміжне положення між стерильною технологією та технологією аеробної мікробіологічної ферментації за селективністю субстрату [32]. Основою успішного застосування нестерильної технології є здатність культивованого гриба пригнічувати ріст конкуруючої мікрофлори. Зазвичай для цього потрібні високі дози посівного матеріалу (від 3,0% від ваги готового субстрату) Вперше стерилізацію субстрату застосували при інтенсивному вирощуванні грибів . Протягом 1960-х і 1970-х років багато інших видів грибів культивувалися за допомогою стерильної техніки. Стерильна технологія дозволяє вирощувати види грибів, які неможливо виростити на нестерильному субстраті. Крім того , стерилізація значно підвищує доступність субстрату за рахунок його часткового гідролізу компонентів при термічній обробці, що призводить до знач збільшення врожаю грибів . Норму витрати посівного матеріалу міцелію зменшують у 3-5 разів.

Твердофазна ферментація має свої переваги порівняно з глибоким культивуванням, які пов'язані з низьким споживанням енергії, зосередженої в живильному середовищі, завдяки чому можна досягти високої об'ємної продуктивності в менших біореакторах . Крім того, концентрований продукт можна отримати з дешевої сировини, наприклад відходів агропромислового виробництва. Використання природних лігноцелюлозних матеріалів , особливо залишків харчової промисловості, безсумнівно, є найбільш перспективним методом для вирощування грибів, оскільки ці залишки багаті цукри і інші корисні сполуки, які легко засвоюються грибами. Однак

використання лігноцелюлозних субстратів ускладнює процес очищення кінцевого продукту. З цієї причини цей метод підходить для ферментації субстрату, який можна використовувати, наприклад, як корм або харчову добавку. Однак основні перешкоди для промислового застосування методів культивування ТФ грибів ще не повністю подолано. Вони займаються будівництвом та експлуатацією великих біореакторів через проблеми, пов'язані з контролем таких параметрів, як рН, температура, аерація та оксигенація, вологість та змішування.

1.4.2 Глибинне культивування

В даний час найбільш перспективним вважається глибинне культивування аскоміцетів. На відміну від твердофазного культивування, глибинне культивування вимагає великих енергетичних витрат на перемішування живильного середовища та подачу кисню. Однак заглиблені культури працюють як однорідна система, і процес культивування легко контролювати за допомогою різних онлайн-датчиків. Занурене культивування аскоміцетів, як спосіб отримання їх міцелію для подальшого виділення фізіологічно активних сполук, має ряд переваг:

- дає можливість скоротити тривалість процесу в 8-10 разів,
- синхронізувати культуру,
- регулюють склад комплексу БАР,
- здійснюють прямий синтез цільових метаболітів,
- використовувати типові обладнання для вирощування грибів різних еколого-трофічних груп,
- стандартизувати отриману продукцію [44].

Поживна цінність міцелію, вирощених у глибинних умовах за вмістом у ньому білка, незамінних амінокислот та вітамінів порівнянна з плодовими

тілами. Основним напрямком розвитку світової науки в галузі культивування аскоміцетів є вивчення БАР, особливо вуглеводної природи, глибинного міцелію та культурального фільтрату та їх використання для створення функціональних препаратів. Глибинне культивування грибів з метою отримання харчового білка було ще з 40-х років ХХ століття [67]. Але цей метод не отримав широкого поширення через труднощі, пов'язані в основному з повільним ростом деяких видів грибів і необхідність використання багатих поживних середовищ, що призводить до забруднення бродильного середовища сторонньою мікрофлорою. В даний час 80-85% всіх продуктів, синтезованих лікарськими грибами, отримують з штучно культивованих або зібраних в дикому вигляді плодових тіл [59]. Лише 15% всієї продукції отримують на основі екстракту міцелію і невелику частку - з фільтрату. Крім того, що на формування плодових тіл йде кілька місяців, важко проконтролювати якість кінцевого продукту. З цієї причини глибинне культивування лікарських грибів привертає увагу як перспективний і відтворюваний альтернативний метод виробництва грибкового міцелію та метаболітів. Цей метод має значний промисловий потенціал і його успіх у промислових масштабах базується на збільшенні врожайності та розробці нових систем виробництва, які вирішують проблеми технології вирощування грибів.

Незважаючи на зусилля багатьох дослідників, спрямовані на отримання біологічно активних метаболітів грибів, фізіологічні та технічні аспекти глибинного культивування потребують подальших досліджень. Особливо помітним є брак інформації про глибинне культивування грибів у біореакторах. Для інтенсивного культивування лікарських грибів використовуються різні методи та стратегії залежно від їхніх фізіологічних та морфологічних характеристик та поведінки в різних умовах середовища. Найбільш використовуваними методами є періодичні культури в колбах на качалках та в лабораторних ферментерах [60]. Перевага використання ферментера полягає в тому, що в цьому випадку легше контролювати умови

середовища, такі як температура, перемішування, розчинений кисень і рН середовища. Однак зростання біомаси грибів має значний вплив на масообмін, швидкість метаболізму та виділення продуктів. Міцелій може обертатися навколо мішалки, спричиняючи засмічення та підвищення в'язкості, обмежуючи перенесення біомаси та кисню. Ці недоліки обмежують час роботи в біореакторах .

При вирощуванні аскоміцетів періодичне бродіння з підживленням (*fed-batch fermentation*) для отримання біологічно активних метаболітів [69]. Ця стратегія базується на додаванні однієї або кількох поживних речовин під час процесу культивування. Метод культивування з живленням дає змогу подовжити другу фазу росту та збільшити виділення позаклітинних метаболітів. Обмеження швидкості поглинання субстрату швидкістю його доставки є способом подолання «катаболітної репресії» утворення продукту. Відомі способи глибинного культивування з використанням міцелію аскоміцетів, іммобілізованого на різних матеріалах [62]. Цей спосіб має ряд переваг. Перший, іммобілізована клітинна система полегшує відділення клітин від рідке середовище, яке дозволяє періодичне культивування повторювати. За рахунок іммобілізації міцелію знижується в'язкість середовища, що значно покращує постачання киснем і масовий вихід [27]. Крім того, іммобілізовані культури мають вищий рівень активності та більш стійкі до зовнішнього стресу. Проте інформації про біосинтетичну активність іммобілізованих аскоміцетів практично немає. Спираючись на роботу В. Янга та його співавторів [65], можна поглянути на їхній спосіб роботи з глибоким культивуванням. Вони помістили пінополіуретанові пластини на глибинне культуральне середовище в колби Елленмейера . Міцелій гриба був міцно прикріплений до пінистої поверхні, а культуральна рідина містила кілька вільно плаваючих клітин. Вихід біомаси та полісахаридів при такому методі культивування був значно вищим, ніж при вільному вирощуванні. На додаток до вищезгаданих стратегій глибокого вирощування і зараз з'явилися інші, які одночасно включають різні методи інтенсифікації біологічних процесів. Так

званий «*multi-pulse feeding integrated strategy*» нещодавно була розроблена Чангом і Тангом, але для *G. lucidum* [68]. Вона передбачає три етапи опромінення грибної культури в процесі бродіння. Перші два дні культивування проводять у темряві, наступні 6 днів при освітленні білим світлом 0,94 В/м², а потім 4,70 В/м² до кінця бродіння.

Стратегія «*multiply-addition*» для додавання іонів міді в різних концентраціях на етапах розвитку міцелію, що дозволило їм підвищити перетворення лактози на вторинні метаболіти [67]. Розроблено економічно ефективні стратегії регулювання біосинтезу біологічно активних метаболітів (антиоксидантів). У монокультурі накопичення біомаси досягло експоненціальної фази на 3-й день і досягло 7,6 г/л на 11-й день. Подібні тенденції накопичення біомаси спостерігалися в спільному вирощуванні, але максимальний рівень біомаси знизився до 5,2 г/л. Навпаки, накопичення метаболітів у спільній культурі було значно вищим, ніж у монокультурі. Максимальний рівень продукції меланіну в монокультурі досягав лише 1,23 г/л, а в спільному вирощуванні цей показник збільшився до 3,61 г/л. Максимальний рівень фенольних сполук, синтезованих грибами, у монокультурі досягав 29,89 мг/г, у спільному вирощуванні зростав до 43,91 мг/г. Загальна кількість міцелію тритерпеноїдів у спільній культурі також була значно вищою, ніж у монокультурі. Не всі види грибів можуть рости в умовах глибокої культури. При виборі грибів з метою отримання харчової біомаси та біологічно активних речовин керуються наступними принципами:

- Нетоксичний і можливо їстівний;
- Наявність у культури характерних ознак, які роблять це можливим ідентифікувати;
- Продуктивність при першому відборі на рулон не менше 1г сухої речовини біомаси на 1 л середовища на добу;
- Продуктивність при вирощуванні в ферментері не нижче 4/г/добу сухої речовини біомаси, вміст сирого протеїну в міцелії 40-50%, максимальна швидкість росту в експоненціальній фазі не менше 0,4⁻¹ год.

1.5 Використання глибинного культивування для отримання *Cordyceps militaris*

Один з найпоширеніших способів промислового вирощування *Cordyceps militaris* - це екстракція плодових тіл за допомогою твердофазного культивування з подальшим виділенням і очищенням заданих цільових речовин. Однак останній, технічний і ефективний спосіб отримання біомаси і метаболітів гриба *C. militaris* на рідкому живильному середовищі в умовах глибинного культивування, що забезпечує набуття необхідних речовин із необхідними вихідними властивостями за короткий час[66].

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.

1.6 Фактори регуляції росту та біосинтетичної активності аскоміцетів та методи їх інтенсифікації

Ряд досліджень показує залежність росту міцелію аскоміцетів та їх біологічної активності від ряду фізичних факторів і складу живильного субстрату. Варіюючи ці фактори, можна цілеспрямовано регулювати процес синтезу кінцевого продукту [66]. Як описано вище, при глибокому вирощуванні необхідно вводити поживні речовини, багаті цукром. Це можуть бути спеціально оброблені середовища або відходи, отримані від переробки сільськогосподарської продукції, а також переробки деревини, яка містить лігнін і целюлоза [49]. Також використовуються несахаридні джерела вуглецю, такі як аліфатичні спирти, н-алкалоїди, органічні кислоти. Глюкоза і фруктоза є універсальними джерелами вуглецю в глибинній культурі аскоміцетів. Спирти - маніт, гліцерин і етанол - добре засвоюються багатьма грибами; дисахариди - мальтоза, целюлоза, сахароза; полісахариди - крохмаль, декстрини, пектинові речовини. Основними джерелами неорганічного азоту є нітрати і солі амонію, а органічного азоту - сечовина, пептони, гідролізат казеїну. Оптимальне співвідношення C:N, залежно від виду гриба та умов рослини, становить від 8:1 до 20:1. Незамінними факторами росту є вітаміни, особливо групи B, тому в живильне середовище часто додають рослинні екстракти та відвари [65]. Початковий рН середовища для більшості культивованих аскоміцетів становить близько 5,0. Оптимальний склад середовища та інші параметри зазвичай визначаються методами глибинної культури.

Інтенсивність перемішування та аерації є важливими факторами успішного вирощування аскоміцетів і мають свої особливості. Успішна аеробна ферментація вимагає підтримки достатньої кількості розчиненого кисню в середовищі, щоб не обмежувати та не перешкоджати нормальній дихальній діяльності. Аерація призводить до кращого перемішування

виробничого середовища. Однак під час вирощування міцеліальних організмів перемішування може пошкодити гіфи, що негативно вплине на ріст і продуктивність. Плюс змішування може призвести до утворення липких частинок агломерату, які ускладнюють надходження кисню. Оптимальна швидкість змішування – це баланс між надходженням кисню в середовище та ступенем пошкодження гіф, який зростає зі збільшенням швидкості змішування. Тому необхідно знайти баланс між позитивними та негативними ефектами змішування. Міцелій чутливий до механічних пошкоджень при перемішуванні та аерації. Крім того, дослідження, спрямовані на розробку методів глибокого культивування, показали можливість цілеспрямованої регуляції процесів біосинтезу аскоміцетів шляхом зміни швидкості перемішування та подачі кисню [15].

1.6.1 Оптимізація живильних середовищ

Для досягнення більшої продуктивності в процесах культивування основні зусилля дослідників спрямовані на розробку оптимального живильного середовища та оптимальних умов процесу. Традиційні методи оптимізації поживного середовища передбачають зміну одного незалежного параметра при збереженні інших незмінними. Однак такі одновимірні методи дуже трудомісткі, забирають багато часу і не дають інформації про взаємодію та кореляції між параметрами. Існує велика кількість даних щодо оптимізації поживних середовищ для інтенсифікації росту міцелію та синтезу метаболітів за допомогою статистичних методів, які дозволяють одночасно оптимізувати багато факторів, отримуючи таким чином дуже кількісну інформацію шляхом виконання невеликої кількості дослідів і тестів. Ці методи були успішно застосовані для покращення культуральних середовищ у виробництві первинних і вторинних метаболітів. Оптимізація умов глибокого

культивування та потреб у поживних речовинах біомаси міцелію та утворення полісахаридів під час культивування *Cordyceps militaris* досліджували за допомогою методу ортогональної матриці. За оптимальних умов культивування максимальна концентрація полісахаридів досягала 3,64 г/л, що більш ніж у чотири рази більше, ніж у вихідному середовищі [31]. Для інтенсифікації росту та синтезу біологічно активних метаболітів під час глибинного культивування використовували різні методи статистичної оптимізації поживних середовищ та визначення найважливіших факторів .

1.6.2 Стимулятори росту та біосинтетичної активності

Багато дослідників використовують різноманітні речовини для стимуляції росту та біосинтетичної активності, включаючи жирні кислоти, поверхнево-активні речовини, рослинні олії та органічні розчинники. Вони порушують проникність мембран і впливають на синтез ферментів, які беруть участь у синтезі цільових продуктів. Як регулятори росту використовували гіберелову кислоту, бета-індолоцтову кислоту, індолмасляну кислоту, кінетин і альфа-нафтилоцтову кислоту [60]. Додавання вітамінів у живильне середовище часто використовується дослідниками для розробки методів інтенсифікації росту лікарських грибів, а також їстівних. Багато з них відзначають, що кращим з досліджених вітамінів для грибів є тіамін, а також біотин і токоферол. Нікотинова кислота і тіаміну гідрохлорид істотно стимулювали вегетативний ріст гриба. Додавання 0,3% Твін 80 збільшило накопичення біомаси на 51,3% і полісахаридів на 41,8% [65]. Стимулюючу дію на ріст і активність надають також різні рослинні олії, що використовуються як піногасники аскоміцетів [38].

Одним із нових напрямків у вирощуванні грибів є електростимуляція. Є кілька повідомлень про використання імпульсів високої напруги для стимулювання росту та збільшення врожаю плодових тіл лікарських грибів.

Урожайність після такої обробки зростає в 1,5-2 рази. Механізми цієї стимуляції ще не повністю вивчені, але допускають дві можливі можливості. Перший пояснює таку дію імпульсів високої напруги утворенням тріщин у порослі та утворенням з них плодових тіл. Інше пояснення полягає в тому, що певні ферменти були активовані шляхом застосування імпульсів електричного поля, що призвело до активації плодових тіл [41].

Проте, незважаючи на велику кількість досліджень у цьому напрямку, пошук нових екологічно чистих регуляторів росту та біологічної активності грибів залишається актуальним. У нашому експерименті ми не використовували метод електростимуляції, але одним із природних регуляторів життєдіяльності цих організмів є світло. Тому з кожним роком все більше уваги дослідників приділяється механізмам фотоморфогенезу грибів [43].

1.7. Фотоморфогенез грибів

Для більшості аскоміцетів, навіть якщо вони не належать до фототрофних організмів, світло виступає як важливий морфогенетичний фактор. На відміну від рослин, гриби використовують світло як джерело енергії. Десятиліттями вивчені реакції на світло не менше 100 видів грибів різних систематичних груп. Досліджено механізми сприйняття грибами синього, ближнього УФ, зеленого та червоного світла. Зібраний до теперішнього часу значний фактичний матеріал свідчить про те, що перш за все фотофізіологічні явища у грибів пов'язані з регуляцією процесів росту та індивідуального розвитку. Таким чином, світло може регулювати швидкість

росту морфологічних структур, характерних для вегетативної стадії розвитку грибів [50]. Проте особливо різна регулююча дія світла в онтогенезі грибів проявляється при переході організму до наступної фази індивідуального розвитку, при проростанні та при формуванні спороносних структур [45]. При цьому в залежності від організму, а також від довжини, інтенсивності та спектральних властивостей світлового сигналу характер реакції може бути як позитивним, так і негативним. У деяких грибів виявляється, що для утворення нормальних спороносних структур необхідна лише певна послідовність темних і світлих періодів розвитку. З'ясування впливу світла на морфогенез грибів ускладнюється широким діапазоном ставлення окремих видів до цього екологічного чинника. Зокрема, представники різних систематичних груп відрізняються кількістю світла, необхідного для нормального морфогенезу. Він має сприятливу дію лише в певних дозах, а високі інтенсивності гальмують розвиток [32].

Ще в 1950 р. Х. Хавке поділила гриби на 4 групи за світлом [69]. Питання фоторецепції світлової енергії в міцелії та механізми перетворень, що відбуваються після поглинання світла, досить складні й до кінця не вирішені. Поглиблене вивчення впливу світла на представників різних таксономічних груп грибів (аскоміцетів, базидіоміцетів, дискоміцетів) призвело до виявлення в них мікохромних систем, оптичні властивості яких відображають наявність найбільшого стрибка в діапазоні діапазону. Сонце в районі 400 нм. Характерною особливістю мікохромної системи є залежність ряду фаз морфогенезу і плодоношення у грибів від тривалості та інтенсивності синього та ультрафіолетового світла [53]. Більшість грибів, які були виявлені мікохромних систем мають пігменти каротиноїди та меланін [52]. Молекулярна основа енергетичного метаболізму грибів складається з ланцюги електронного транспорту (ЛЕТ), які включають флавіни, цитохроми та хінони. Світло, яке безпосередньо впливає на компоненти ЛЕТ, може поглинатися цими компонентами та змінювати їхню активність. Світло може безпосередньо активувати компоненти ЛЕТ, які знаходяться у вузьких місцях

енергетичного метаболізму, придатних для регуляторних процесів. Отже, освітлення грибів світлом в діапазоні 400 нм призводить до активації різних спектральних форм електронесних молекул, що порушує баланс між періодами життя цих форм і може призводити до тимчасової неузгодженості біохімічних реакцій у кількох кроки [46]. Відомі на даний момент фотобіологічні явища в грибах не обмежуються короткохвильовими областями спектра. Прикладів фоторегуляції багато різні процеси в грибах із зеленим, жовтим і червоним світлом [10]. У деяких випадках процесами індивідуального розвитку грибів можна керувати ділянками з найбільшою довжиною хвилі видимого спектра – червоним і дальнім червоним світлом [35]. У зв'язку з цим надзвичайно важливими є дані про зворотність морфогенетичного ефекту світла 650-700 нм довгохвильовим опроміненням (690-750 нм) , що вказує на те, що система фоторегуляції грибів схожа з системою фітохромів вищих організмів. Цей хромопротеїн існує у двох формах, одна з яких поглинає світло приблизно при 660 нм, а інша – при 730 нм. У результаті взаємного перетворення цих форм при освітленні змінюється їх кількісне співвідношення, запускаючи ланцюг процесів, які в кінцевому підсумку призводять до проростання насіння, утворення бутонів, цвітіння рослин та інших формоутворюючих ефектів. Відповідно до існуючих на сьогоднішній день гіпотетичних моделей механізму дії фітохрому на молекулярному рівні, первинні реакції у відповіді, викликані сигналами фітохрому , пов'язані зі зміною проникності мембрани, а вторинні – з активацією хромосомного апарату та ферментативної активності [57].

Багато даних показали, що фітохроми, які за своєю природою є протеїнкіназами , передають свої сигнали через регульоване світлом фосфорилування білка. На сьогоднішній день ідентифіковано велику кількість білків-субстратів для активності фітохромкінази. За допомогою молекулярно-біологічного аналізу з дигібридним схрещуванням у грибах було ідентифіковано кілька фітохром-взаємодіючих компонентів: субстрат фітохромкінази і нуклеозиддифосфаткіназу, які взаємодіють з карбокси-

кінцевою послідовністю. Види фотофізіологічних ефектів - фотоіндукція та фотостимуляція утворення певних пігментів у клітинах грибів, головним чином каротиноїдів, певною мірою можна вважати частиною або аналогом фоторегуляції певних фізіологічних процесів, головним чином фоторегуляції швидкості та напрямку росту, фотоіндукції синтезу пігменту. та фотоіндукція явищ морфогенезу[41].

У літературі переважає думка, що такі спектри дії вказують на наявність акцепторів квантів світла, таких як флавіни, ймовірно, компонент флавопротеїнів. Однак флавіни - не єдині можливі кандидати на роль фоторецепторів. Оскільки наведені вище спектри дії подібні до спектрів поглинання не тільки флавононів, а й каротиноїдів, припускають, що ці сполуки беруть участь у поглинанні світла. Однак це припущення не підтверджується в експериментах з інгібіторами синтезу каротиноїдів, а також в експериментах з безкаротиноїдними штамми грибів [13].

В даний час відомо, що датчиками світла є хромопротеїни - низькомолекулярні сполуки, які поглинають світло в певних ділянках спектра і ініціюють білкові реакції. В даний час у грибів на молекулярному рівні виділяють три світлочутливі системи. Чутливість до синього світла забезпечується фоторецептором на основі флавіну, який сам діє як джерело передачі. Чутливість до червоного світла реалізується фітохромом, молекулою, яка донедавна вважалася унікальною рослин [52]. Нещодавно були виявлені опсинові системи на основі сітківки, біологічні функції яких ще належить дослідити. Питання про природу світлофокусуєчих молекул не можна вважати остаточно вирішеним. Відомо, що світло може бути потужним пусковим механізмом завдяки наявності в клітинах великих грибів ряд фотосенсибілізаторів, таких як флавіни, птерини, порфірини. Розрив цих молекул квантом світла призводить до утворення АФК (активних форм кисню) у клітинах або такого сильного окислювача як синглетний кисень або супероксид [61]. Здатність АФК до взаємоперетворення посилює цей ефект. Ініціаторами деструктивної фотодинаміки виступають триплетні молекули

фотосенсибілізаторів, синглетний кисень, вільні радикали та пероксиди органічних сполук. Таким чином, вплив світла призводить до окислювального стресу та викликає активацію біосинтезу в клітинах таких сполук, як каротиноїди [64]. Однак різноманітність фотореакцій у різних грибів свідчить про наявність у них цілої групи фоторецепторних молекул, що, ймовірно, пояснює відмінності у фоточутливості грибів і різний вплив мутацій на процес фототрансдукції [69]. Реалізація реакції на світловий сигнал знаходиться під контролем генетичного апарату клітини. Про це свідчить наявність у деяких грибів мутантів, які не здатні до нормального морфогенезу.

1.8 Отримання спорового матеріалу аскоміцетів та пророщування спор

Мицелій у насінні гриба *S. militaris* отримували відомим способом: стерильне проварене зерно пшениці засівали матковою культурою з агаризованого середовища, яке інкубували в темряві при температурі 26 °C до повного переростання субстрату. Дозрілі плодові тіла збирали і висушували 70% спиртом для отримання спор. При отриманні відбитків спор *S. militaris* плодові тіла збирали із закритою приватною оболонкою, яку стерильно видаляли пінцетом. Ніжку розрізали до рівня шапинки. Підготовлені таким чином плодові тіла поміщали в стерильні чашки Петрі і витримували добу при температурі +20-22 °C .

Щоб запобігти бактеріальному зараженню, їх додавали в середину антибіотики: 200 од пеніциліну і 100 од стрептоміцину на 1 мл середовища. Інкубували в темряві при 26°C. Проростання спор контролювали щодня під мікроскопом. Пророщені відокремлені спори виділяли та поміщали в нові чашки Петрі з бородавковими дахами для вимірювання швидкості росту. Сформовані мицеліальні структури аналізували на наявність затискачів і каріотичності. Ядра фарбували за методом Гімзи [45].

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Об'єкт та методи дослідження

Об'єктом нашого досліджу є швидкорослі штами грибів роду *Cordyceps*: чисті культури *C. military* (2 штами) *Cordyceps militaris*, 1862 і *Cordyceps militaris*, 2029, який отримано з колекції культур ІБК Ботанічного інституту імені М. Г. Холодного НАН України. Подано їх культурно -морфологічну характеристику. Швидкість росту кордицепса лінійна при температурі 20–25°C *C.militaris*, 1862 становила 1,7–2,1 мм/добу, фактор росту – 6,6–32,4. В *C. militaris*, 2029 ці показники становили 1,4–2,0 мм/добу та 7,2–35,2. При проведенні світлової мікроскопії основними морфологічними ознаками грибів *Cordyceps* були відсутність міцеліальних затискачів, конідій. спороношення та утворення хламідоспор .

Міцелій *Cordyceps militaris*, 1862 і *Cordyceps militaris* 2029 містить 17,8–22,5% білків, 8,3–16,2% полісахаридів, 6,2–7,4% ліпідів, 680–1100 мг% фенольних сполук. Культуральна рідина містила 17,4–17,7 г/л вуглеводів і 0,5–2,3 г/л екзополісахаридів. Антиоксидантна активність спиртових екстрактів міцелію відносно іонольного антиоксиданту становила 72–80%.

Для визначення культурально-морфологічних ознак грибів та росту культур проводили культивування на стандартному та модифікованому агаризованому живильному середовищі складу: солодовий екстракт-агар (СЕА), сусло-агар (СА), картопляно-декстрозний агар (КДА), глюкозо-пептонний дріжджовий агар (ГПДА), г/л: глюкоза — 25,0; пептон - 5,0; дріжджовий екстракт - 3,0; агар-агар — 20, рН 6,5, у чашках Петрі, при температурах $+4 \pm 1$, 16 ± 1 , 20 ± 1 , 25 ± 1 , 30 ± 1 , 37 ± 1 °C.

Глибинне культивування грибів проводили на пивному суслі (7°C) і напівсинтетичному живильному середовищі в колбах Ерленмейєра на циркулярному шейкері (180 об/хв). Температура культивування - 20–30°C, час

- 4-5 днів. Різні джерела вуглецю при виборі компонентів живильного середовища вносять у середу в кількості 20 г/л, азот - в дозі 0,45–0,5 г/л.

Кількість посівного матеріалу 10%. Для перевірки життєздатності культур культури інкубували при 30–38°C з інтервалом 1°C. Після третьої доби інкубації враховували наявність або відсутність росту міцелію. Консервація або втрата життєва сила в процесі контролювали міцелій культур далі інкубація при 26°C. Радіальну швидкість росту розраховували за методикою. Мікроструктуру вегетативного міцелію *S. Militar* вивчали на світловому мікроскопі МБІ-15, а також на скануючому електронному СЕМ-мікроскоп JSM-35С, використовуючи модифікований метод Квательбаума і Карнера [21].

Як від культуральної рідини відділяли міцелій гриба. Фільтрують через щільну тканину, висушують при температурі 60°C і потім використовують для подальших аналізів. Білок у міцелії визначали за Кельдалем, ендополісахариди, екзополісахариди, загальні вуглеводи, загальні фенольні сполуки - за спеціалізованою методикою з використанням якісних ферментативних реакцій на наявність восьми ферментів, що характеризують метаболізм азотистих сполук.

Антиоксидантні властивості грибів оцінювали за здатністю екстракту пригнічувати утворення продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-активні продукти). За 100% прийнято значення іонулу АОА, відомого антиоксиданту.

Для визначення впливу кислотності середовища проростання росту міцелія використовували синтетичне середовище наступного складу (г/л): глюкоза— 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ — 4,0; KH_2PO_4 — 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ — 1,0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,003; ZnCl_2 — 0,005. Значення рН у середовищі змінено в інтервалі від 2 до 8 із кроком 1 за допомогою розчину КОН і НСІ.

Початкове значення рН для середовища (контроль) були отримані після стерилізації.

Потреби сільськогосподарських культур у ресурсах вуглецево та азотне живлення визначали на синтетичному середовищі, склад якого наведено вище.

Джерелом вуглецю виступає:

- моносахариди (глюкоза, ксилоза , маноза),
- дисахариди (сахароза, лактоза, мальтоза),
- полісахарид (крохмаль).

Їх додавали в кількості, що відповідає 20 г глюкози, використовуючи вуглець, зі значенням рН 6,5. Джерелом азоту були: пептон, дріжджовий екстракт, кукурудзяний екстракт (КЕ), NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Їх вносили в середовище в кількості, що відповідає 4 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ за азотом.

Експерименти проводять у колбах Ерленмейера об'ємом 150 мл, де 50 мл поживне середовище. Інокулянт виконали 7-денні посіви гриба , який передчасно виріс на ГПДА при температурі $16 \pm 1^\circ\text{C}$. У кожній колбі з рідким середовищем внесли три міцеліальні диски ($d=5$ мм). Культури піддають інкубації в стаціонарних умовах при $16 \pm 1^\circ\text{C}$. Біомаса відокремили від культурної рідини (КР) методом фільтрації (з урахуванням того, що одна з альтернатив мала умову, за якої міцелій повністю покриває поверхню середовища).

Кількість біомаси визначають ваговим методом тільки після висушування до постійної маси при температурі $105 \pm 1^\circ\text{C}$. Важливою передумовою також є розрахунок кінцевого значення рН культуральної рідини.

Для визначення кількості екзополісахаридів використовували метод їх преципітації (10 мл 96% етанолу з 5 мл КР). Після цього розчин піддається відстоюванню до 24 годин у холодильнику (температура в діапазоні $4 \pm 1^\circ\text{C}$) . Потім, наступного дня, осад відділявся за допомогою центрифуги протягом 25 хвилин в режимі 5000 г. Надосадову рідину вилити, осад розчинили в 5 мл дистильованої води (гарячої). З нового отриманого розчину відібрали 2 мл рідини, в якій і було визначення кількості екзополісахаридів за допомогою фенол-сірчаного методу [63].

Експеримент стосовно дослідження впливу світла на культурно - морфологічні особливості грибів було виконано з використанням експериментальних установок, які забезпечили генерацію лазерного опромінення із заданими параметрами на довжинах хвиль 450,0 та 632,8 нм. Прийнято було вважати середню дозу випромінювання на мішені - близько 250 мДж/см².

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою статистичних функцій Microsoft Excel, рівень значущості 95%.

2.2 Культурально-морфологічні особливості при вирощуванні *Cordyceps militaris*

На основі скринінгу виділено 2 штами швидкорослих грибів. Це представник роду *Cordyceps*: *Cordyceps militaris*, 1862 та *Cordyceps militaris*, 2029. Їх культурально-морфологічні характеристики вивчали при вирощуванні на агаризованому середовищі : МЕА, КДА, СА та ГПДА. Встановлено також, що вегетативний міцелій *C.militaris* складається з тонких (2–4 мкм), помірно розгалужених, рівномірно розділених перегородками гіф, які зливаються, утворюючи численні нитки міцелію . Досліджувані культури перебували в анаморфній стадії (конідіальні спороношення) на всіх поживних середовищах (рис. 2.1).

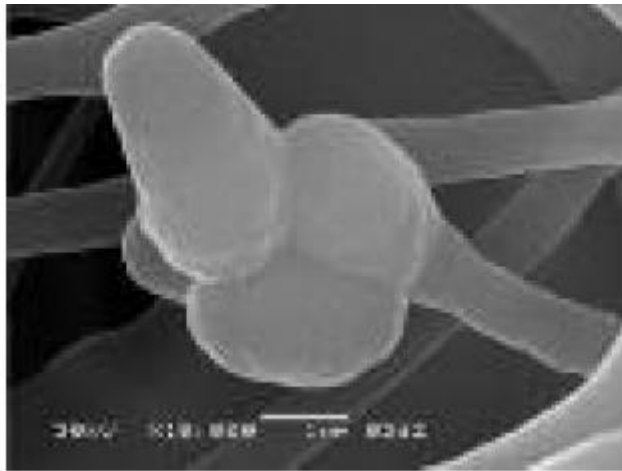


Рисунок 2.1 *Cordyceps militaris*: конідиальне спороношення [63]

При температурі $+4\pm 1^\circ\text{C}$ вегетативний міцелій практично не розвивався, спостерігалось незначне опушення посіву. Після перенесення культуральних чашок в умови, сприятливі для росту міцелію, він почав рости. Оптимальна температура росту досліджуваних грибів була в межах $20\text{--}25^\circ\text{C}$ (табл. 1). При 20°C лінійна швидкість росту *C. militaris* 1862 становила $1,9\text{--}2,1$ мм/добу, коефіцієнт росту – $6,6\text{--}15,6$. У *C. militaris* 2029 ці показники становили $1,5\text{--}2,0$ мм/добу та $7,2\text{--}14,4$. При 25°C на всіх середовищах спостерігалися вищі та щільніші колонії міцелію. Хоча лінійна швидкість росту грибів була дещо нижчою ($1,7\text{--}2,0$ мм/добу для *C. militaris* 1862 та $1,4\text{--}1,9$ мм/добу для *C. militaris* 2029), ніж при 20°C , значення коефіцієнта росту вищі. Повне заростання чашок Петрі спостерігалось на 23-25 день інкубації. Низька температура культивування (17°C) виявилася кращою для досліджуваних штамів грибів, ніж висока (30°C), при якій ріст міцелію спостерігався лише протягом перших п'яти днів інкубації, після чого він припинявся. Увімкнено.

При $37\pm 1^\circ\text{C}$ ріст не спостерігався, що дуже важливо з огляду на безпечність міцелію досліджуваних грибів для людини і тварин. При вирощуванні на щільному живильному середовищі за показниками лінійної швидкості росту та фактора росту досліджувані *C. militaris*, 1862 і *C. militaris*, 2029 можна віднести до групи повільно зростаючих грибів.

C. militaris, 2029 утворювали високі ватні, опушені білі колонії з гладким або злегка хвилястим краєм на всіх досліджуваних середовищах. Колір без освітлення білий. Найбільш активне зростання спостерігалось в СА. Радіальні колонії відзначені в ГПДА.

C. militaris, 1862 на агаризованому пивнику також створив високі, щільні, опушені колонії та менші колонії на ГПДА та КДА щільні радіальні колонії з опуклим центром. При вирощуванні в темряві колонії білі. При освітленні міцелію видимим світлом відзначається утворення жовто-жовтого гарячого пігменту. (Рис. 2.2).

За результатами дослідження впливу низьких і високих температур на ріст і життєздатність міцелію ми знайшли закономірність, згідно з якою в умовах низьких температур ($4\pm 0,1^{\circ}\text{C}$), незалежно від складу середовища, був слабким, спостерігається вегетативний ріст (менше 0,75 мм/добу), але колонії міцелію зберігають основні морфологічні характеристики. Також необхідно звернути увагу на те, що досліджувані штами незадовільно переносять підвищення температури. При температурі 34°C ріст міцелію зник, культури не втрачали життєздатність і негайно відновилися при 26°C протягом тижня. Температура $36\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ виявляється критичною і виснажливою, повністю втратили життєздатність і загинули. Наразі є така інформація, як загибель клітинного міцелію до високих температурних показників і є наслідком порушення координації процесу денатурації білків. Це дослідження є можливістю для нас вирішити, що найбільше підходить середовище для вегетативного росту і розвитку міцелій *C. Militaris* є ГПДА та МЕА, і оптимальна температура для росту міцелію племен *C. Militaris* — $20 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ (табл. 1) досліджувані штами *C. militaris* можна віднести до групи повільно зростаючих грибів.

Таблиця 2.1 - Зростання колоній грибів роду *Cordyceps* на агаризованих поживних середовищах різного складу

Поживне середовище	Температура	Діаметр колонії в мм					Кр, мм/доб	РК
		6 доба	9 доба	14 доба	16 доба	21 доба		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>C. militaris</i> 1862								
СА	20	24,6 ± 0,2	41,0 ± 0,6	57,6 ± 0,4	67,3 ± 0,6	90,0 ± 0,1	2,1	13,7
ГПДА		19,3 ± 0,3	31,0 ± 0,3	50,6 ± 0,5	58,0 ± 0,5	79,0 ± 1,2	1,9	15,6
КДА		23,6 ± 0,2	37,0 ± 0,3	54,3 ± 0,3	66,3 ± 0,4	75,0 ± 0,5	2,0	6,6
МЕА		19,5 ± 0,2	35,3 ± 0,3	50,2 ± 0,4	59,3 ± 0,3	68,4 ± 0,4	1,5	14,2
СА	25	22,7 ± 0,6	32,3 ± 0,7	50,3 ± 0,9	57,0 ± 0,8	61,0 ± 0,9	1,7	32,4
ГПДА		22,7 ± 0,3	33,3 ± 0,1	52,0 ± 0,4	61,3 ± 0,6	71,0 ± 0,5	1,8	23,5
КДА		24,0 ± 0,8	35,0 ± 0,6	56,0 ± 0,9	66,6 ± 0,7	73,0 ± 0,6	2,0	15,6
МЕА		22,5 ± 0,2	34,8 ± 0,4	49,5 ± 0,8	61,3 ± 0,6	69,5 ± 0,2	1,5	16,2
<i>C. militaris</i> 2029								
СА	20	25,0 ± 0,2	37,7 ± 0,3	55,3 ± 0,4	62,0 ± 0,3	78,0 ± 0,9	2,0	14,4
ГПДА		28,3 ± 0,3	37,6 ± 0,3	51,0 ± 0,4	61,7 ± 0,4	71,6 ± 0,6	1,5	14,4

Продовження таблиці 2.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
КДА		20,6 ± 0,3	28,3 ± 0,3	42,7 ± 0,1	48,3 ± 0,3	54,3 ± 0,4	1,5	7,2
МЕА		19,5 ± 0,2	29,5 ± 0,3	38,5 ± 0,5	45,5 ± 0,2	51,0± 0,2	1,4	11,2
СА	25	32,6 ± 0,7	46,3 ± 0,7	63,3 ± 0,6	69,3 ± 0,5	75,0 ± 0,5	1,9	35,2
ГПДА		32,3 ± 0,3	42,3 ± 0,3	53,0 ± 0,3	59,0 ± 0,4	61,6 ± 0,6	1,4	14,4
КДА		24,6 ± 0,2	34,3 ± 0,3	53,6 ± 0,3	57,3 ± 0,3	65,0 ± 0,1	1,4	15,6
МЕА		21,0 ± 0,2	39,5 ± 0,3	45,9 ± 0,8	56,3 ± 0,2	69,5 ± 0,6	1,12	13,5

Найважливішими морфологічними характеристиками грибів роду *Cordyceps* були відсутність пружок на міцелії, конідіальний спороношення та освіта хламідоспор. При мікроскопії вегетативного міцелію гіфи і конідієносці міцелію - гіалінові з гладкими стінками, конідії циліндричні, стінки гладкі. На поверхневому міцелії утворювалися округлі спори діаметром 5-10 мкм. Фіаліди мають конічну пляшкоподібну форму, розміром 10-30'1,5-2,3 мкм , утворені окремо з гіфальних клітин на різних інтервалах або в пучках і групах (часто на різних рівнях) по два-чотири. На верхівках фіалід утворюються конідії. Перші конідії зазвичай більші, еліптичні або короткоциліндричні, 3,2-6,0-3,0 мкм в діаметрі, наступні конідії сферичні, 2,3-3,0 мкм в діаметрі. У глибинній культурі вже на 2-й день культури спостерігалася велика кількість спор у культуральній рідині. Щодо придатності анаморфів *Cordyceps militaris* немає згоди щодо того чи іншого типу. Досить довго вважалося, що він анаморфний *C. militaris* є *Isaria farinose* (Holm.) Fr, але після виділення цього гриба в чистій культурі його анаморфу вперше припустили до роду

Cephalosporium. У нашому експерименті був присутній тип конідіального спороношення, і ми виявили наявність великої кількості хламідоспор (рис.2.2) і накопичення екзометаболітів (рис. 2.3) на вегетативному міцелії. Як показано на (рис.2.2), гіфи міцелію є перегородками та утворюють анастомози. Спороутворення відбувається у аскоміцетів роду *Cordyceps* у фазі росту міцелію. При старінні культури або несприятливих умовах спостерігається інтеркалярне утворення хламідоспор — великих овальних клітин з потовщеними оболонками, що містять додаткові поживні речовини; на деяких гіфах спостерігається накопичення екзометаболітів, мабуть, екзополісахаридів. Тому для виявлення та контролю чистоти культури-продуцента в процесі вирощування *C. Militaris* нам потрібно було визначити наявність мікроструктур (конідій спороношення, анастомоз, міцеліальних тяжів) для цього дослідження ми використовували електронний і світловий мікроскоп.

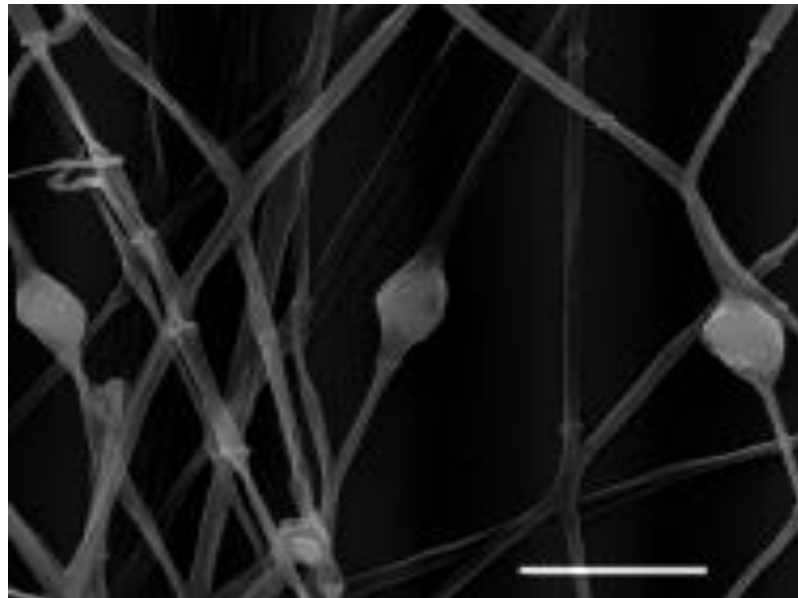


Рисунок 2.2 *Cordyceps militaris*: вегетативний міцелій, екзометаболіти

[63]

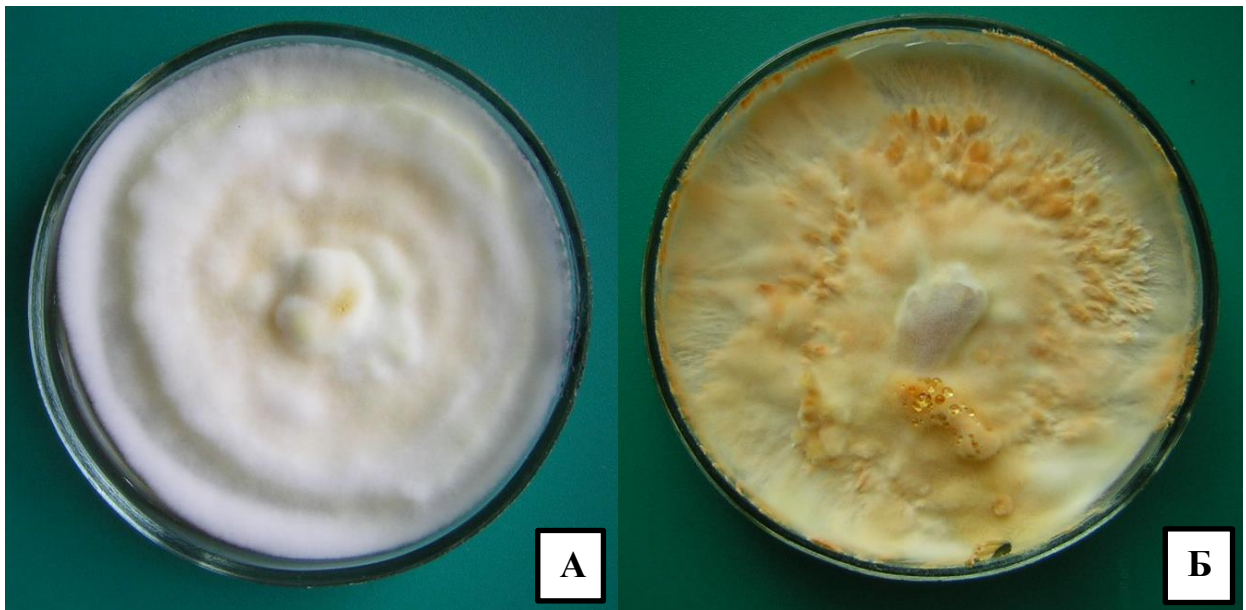


Рисунок 2.3 Міцеліальна колонія *C. militaris* на середовищі ГПДА: 25-та доба культивування за відсутності освітлення (А); при освітленні (Б) [64]

Вибір оптимальних субстратів у процесі культивування грибів для цілеспрямованого синтезу кінцевих продуктів неможливий без знання їх фізіолого-біохімічних властивостей, особливо щодо активності ферментів. У природі ентомопатогенні гриби мають здатність синтезувати велику кількість ферментів, причому найважливішу роль відіграють хітинази, протеїнази, ліпази та амілази. Вивчали активність таких гідролітичних ферментів: амілази, целюлази, β -глюкозидази, ксиланази, протеїнази, нітратредуктази, уреаз, ліпази в культурах *C. militaris*. Обидва штами показали позитивну реакцію на більшість ферментів, активність яких ми визначали. Присутності ксиланази не виявлено (табл. 2.2). У нашому випадку на цьому етапі експерименту під час первинного скринінгу було проведено дослідження на наявність ферментів за допомогою якісних тестів (табл. 2) із відображенням «+» або «-»). Виконання кількісних визначень ферментативної активності всього спектру ферментів займає багато часу. процес і далі дано фаза де непрактичний.

Таблиця 2.2 - Энзиматичні реакції на наявність гідролітичних ензимів у досліджених штамів *Cordyceps militaris*

Вид, штам	Ензим							
	Протеїназа	Амілаза	Целолаза	β- Глюкозида	Ксиланаза	Уреаза	Нітраг- редуктаза	Ліпаза
<i>C. militaris</i> , 1862	+++	++	+	+	-	+	+	++
<i>C. militaris</i> , 2029	+++	++	++	+	-	+	+	++

Примітка: «-» - немає реакції; «+» – слабка реакція; «++» — легка реакція; "+++ " - сильна реакція.

Визначення наявності окисно-відновних ферментів (лакази, тирозинази та пероксидази) показало, що всі досліджувані культури показали позитивну реакцію лише на тирозиназу, реакцій на лактазу та пероксидазу не спостерігалось.

Тому в біотехнології культивування цієї групи грибів слід використовувати середовища, що містять джерела білка, з урахуванням їх еколого-фізіологічних поживних властивостей.

2.3 Особливості накопичення біомаси та екзополісахаридів *C. Militaris*

Одним із найважливіших фізико-хімічних параметрів навколишнього середовища є рН, значення якого впливає на фізіологічну активність культур і продуктивність біотехнологічного процесу. Дослідження впливу середовища на зростання показало необхідність визначення оптимального значення рН для кожного штаму, оскільки це впливає на підвищення продуктивності біотехнологічного процесу. Оптимальний для значення рН середовища для вирощування культур в межах досяжності від 2 до 7 за умови, що почали зростати культури при рН 3,0 (рис. 2.4).

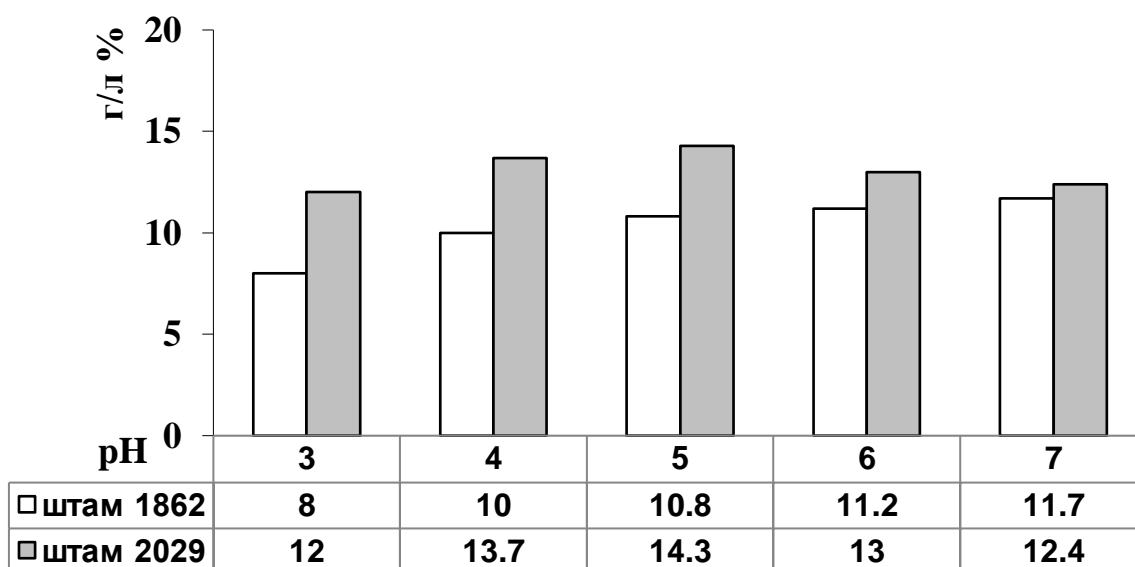


Рисунок 2.4 - Накопичення міцеліальної маси штамами *C. militaris*

РН росту досліджуваних штамів становить 6,0-6,5. За цих значень вихід біомаси на 14 добу культивування в стаціонарних умовах становив понад 11,5 г/л. Згідно з літературними даними, діапазон оптимальних значень рН для росту міцелію та накопичення екзополісахариду в культурі *C. militaris* становив 5,0-6,0. За іншими даними, при дослідженні фізіології *C. militaris* на рідких поживних середовищах максимальна концентрація біомаси (8,1 г/л)

була отримана при початковому рН 9,0 [3]. На основі отриманих нами даних та аналізу літератури можна стверджувати, що залежність росту культур *C. militaris* від рН середовище є властивістю, специфічною для штаму, і її оптимальне значення слід знайти для кожного штаму в конкретному середовищі. Для росту вегетативного міцелію *C. militaris* найкращими джерелами вуглецю були глюкоза, лактоза та сахароза (табл. 2.3).

Таблиця 2.3 - 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
Ксилоза	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

Максимальна кількість міцеліальної маси спостерігалась у штамів *C. militaris* 1862 (понад 11,2 г/л), *C. militaris* 2029 (12,9 г/л) та екзополісахаридів (2,6 та 2,4 г/л). За даними літератури [24], штами *C. Militaris* добре використовують глюкозу, крохмаль і сахарозу, на середовищах з такими вуглеводами культури на 4-ту добу культивування накопичують понад 8,5 г/л біомаси. Ми виявили, що під час вирощування культур на середовищах з різними джерелами вуглецевого живлення рН змінювався в кислу сторону. Зниження рН середовища в основному залежало від типу джерела вуглецю та швидкості його використання. У середовищах з повільною утилізацією джерела вуглецю, особливо крохмалю, рН під час росту знижувався меншою

мірою (до 4,8-5,2), ніж у середовищах з глюкозою (4,0-4,2). Як джерела азоту використовували неорганічні (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) та органічні (пептон, дріжджовий та кукурудзяний екстракти). З органічних речовин оптимальними джерелами азоту для росту *C. militaris* були пептон та дріжджовий екстракт (накопичення маси міцелію — понад 12 г/л) (табл. 2.4).

Таблиця 2.4 - 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
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	10,0±0,2	1,0±0,1	9,4±0,3	1,0±0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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

З неорганічних джерел азоту оптимальним виявився фосфат амонію (кількість біомаси більше 10,0 г/л). Це можна пояснити тим, що фосфат амонію є джерелом не тільки азоту, але і фосфору, необхідного для нормального росту гриба. Слід зазначити, що глюкоза, сахароза, пептон та дріжджовий екстракт, оптимальні для накопичення біомаси *C. militaris*, є звичайними компонентами рідких і твердих поживних середовищ і найчастіше використовуються для культивування різних видів грибів, зокрема кордицепсу. Визначення накопичення екзополісахаридів на рідких середовищах (табл. 4) показало, що максимальна їх кількість фіксується на середовищах з пептоном та дріжджовим екстрактом (2,9 та 2,1 г/л відповідно). Найменше на цей показник

впливало середовище з джерелами мінерального азоту. За даними накопичення літератури екзополісахариди підтримували фосфатом амонію та пептоном, їх кількість на цих середовищах становила 1,05 та 1,19 г/л [71]. Внесок містить дані про вплив ресурсів вуглець і азот для накопичення міцелій м'якоть і екзополісахариди. Екстракт кукурудзи та соєвий пептон виявилися найбільш корисним джерелом вуглецю (1,97 та 1,06 г/л).

Тобто характеристики біомаси та накопичення екзополісахариду *C.militaris* це в основному залежить від складу середовища і пов'язане з наявністю індукторів і хімічною природою сполук, які є джерелами вуглецю і азот для грибів. Оскільки складні середовища, з одного боку, є більш сприятливими, ніж синтетичні, для росту та виробництва БАР з грибів, а з іншого боку, є відносно дешевими, для культивування *C. militaris* доцільно використовувати середовища з пептоном і дріжджовим екстрактом. Дані літератури, а також результати нашої роботи свідчать про те, що фізіологічні особливості різних видів грибів суттєво відрізняються, а тому не може бути універсального живильного середовища, склад якого був би оптимальним і придатним для всіх культур. Отримано дані про ростову та біосинтетичну активність досліджуваних штамів *C.militaris* крім того, це дозволяє прогнозувати оптимізацію рідких поживних середовищ для глибинного культивування для отримання міцеліальної маси та екзополісахаридів.

2.4 Дослідження впливу світла на швидкість радіального росту і морфологію колоній штамів *C. Militaris*

Дослідження впливу світла на швидкість радіального росту і морфологію колоній штаму *C. Militaris* в культивації на агаризованому середовищі показало середовище 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. 2.5).

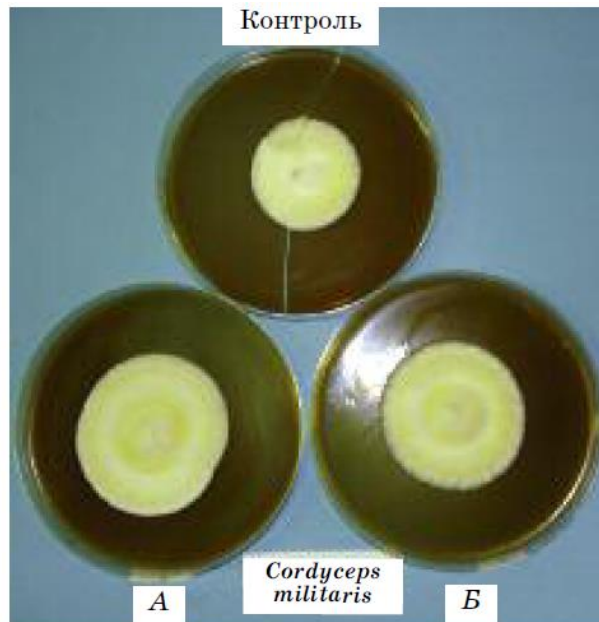


Рисунок 2.5 - Міцеліальні колонії *Cordyceps militaris* на СА після опромінення: А— гелій-неоновим лазером, довжина хвилі 632,8 нм; Б— аргонним лазером, довжина хвилі 450 нм [64]

Опромінення посівного міцелію в імпульсному режимі (450,0 нм) індукувало формування стром гриба *C. militaris* на рідкому живильному середовищі з пептоном (рис. 2.6, А, Б).

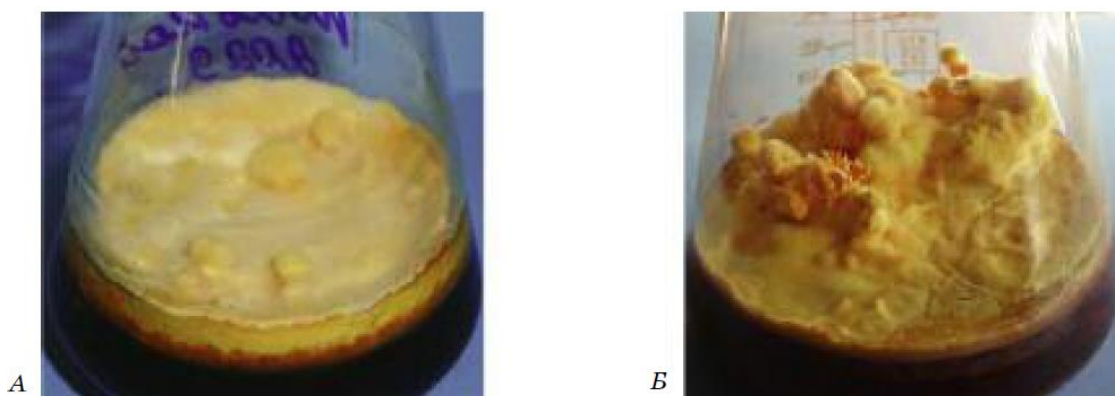


Рисунок 2.6 - Утворення стром *Cordyceps militaris* на рідкому середовищі з пептоном: А— контроль; Б— після опромінення в імпульсному режимі (450,0 нм) [64]

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. 2.5).

Таблиця 2.5 - 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

Проводили порівняльне вивчення зростання як у поверхневому, так і в глибинному культивуванні. Досліджені гриби характеризуються високою швидкістю росту при глибокому культивуванні. Міцелій і культуральна рідина містять комплекс біологічно активних вуглеводів, білків і ліпідів, і фенольну природу. За допомогою скануючого електронного мікроскопа встановлено основні мікроморфологічні ознаки вегетативного міцелію *C.militaris* Нами

були виявлено мікроморфологічні ознаки, які використовуються для ідентифікації культур цього виду, а також для перевірки чистоти фази вегетативного росту при штучному вирощуванні.

Отримано дані про ріст і морфологію культура *C.militaris*, які вирощували на агаризованому живильному середовищі різного складу при різних температурах інкубації. За швидкістю росту досліджувані штами можна віднести до групи грибів, що повільно ростуть. Були проведені якісні ензиматичні тести, які показали, що дані культури мають великий набір гідролітичних ензимів і при умовах збереження в колекції не втрачатимуть свої фізіологічні активності. Нами також були встановлені оптимальні для росту джерела вуглецю (глюкоза, лактоза і сахароза), органічні джерела азоту (пептон, дріжджовий екстракт) та фосфат амонію (рН 6,0–6,5).

3 ЕСПЕРЕМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Патологія неалкогольної жирової хвороби печінки

Ожиріння є однією з найактуальніших медико-соціальних проблем сучасності. За результатами останнього дослідження, метою якого було з'ясувати динаміку розвитку ожиріння серед населення України віком від 2 до 70 років, виявлено різке зростання поширеності ожиріння практично в усіх вікових групах за період з 1953 по 2023 рік. Крім того, найбільша частота ожиріння була зафіксована саме з 30 років. У зв'язку з великою різноманітністю супутньої патології ожиріння вже давно вважається не тільки ендокринологічним захворюванням, але й суттєвим фактором ризику розвитку патологій інших органів і систем організму. Відомо, що однією з найпоширеніших патологій, пов'язаних з ожирінням, є неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП), якою страждає 30-35% дорослого населення. НАЖХП не пов'язана з надмірним споживанням алкоголю чи іншими причинами захворювання печінки та діагностується за допомогою аномальних печінкових проб (хоча результати можуть бути нормальними) та візуалізаційних досліджень. НАЖХП пов'язана з низкою кардіометаболічних розладів: ожирінням, резистентністю до інсуліну, діабетом 2 типу, гіпертонією та атерогенною дисліпідемією - ці фактори збільшують ризик інфаркту або інсульту, що є найчастішою причиною смерті.

Основним принципом лікування НАЖХП є:

- зниження ваги за допомогою низькокалорійної дієти;
- обмежити споживання насичених жирів, крохмалю та цукру;
- поліпшити дієту;
- фізична активність.

У разі втрати ваги >5% можна спостерігати кардіометаболічний ефект і зменшення жиру в печінці. Більша втрата ваги має більше переваг і може сприяти регресії стеатогепатиту або фіброзу печінки (при втраті ваги на 10%).

Дослідження проводилось на базі гастроентерологічного відділення Криворізької міської лікарні №3 м. Кривий Ріг. До основної групи увійшли 44 пацієнти віком від 31 до 65 років (середній вік $47,32 \pm 0,79$ року). Критеріями включення до основної групи були:

- наявність екзогенного конституційного ожиріння (індекс маси тіла (ІМТ) > 35);
- та/або незначне підвищення рівня печінкових трансаміназ за даними біохімічного аналізу крові;
- та/або ознаки стеатозу печінки за даними ультразвукового дослідження органів черевної порожнини.

Контрольну групу склали 22 хворих того ж віку. Окрім звичайних загальноклінічних досліджень, у всіх пацієнтів визначали основні біохімічні показники функції печінки – гепатограму (рівнів аланінамінотрансферази (АлАт), аспартатамінотрансферази (АсАт), лужної фосфатази (ЛФ), гамма-глутамілтранспептидази (ГГТП), альфа-амілази, загального білірубіну та його фракцій, загального білка). Для виявлення порушень ліпідного обміну всім пацієнтам призначали ліпідограму з визначенням рівня загального холестерину (ЗХЛ), тригліцеридів, ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїдів дуже низької щільності, ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ) з розрахунком коефіцієнту атерогенності (КА) за формулою Фрідевальда.

Діагноз НАЖХП підтверджено ультразвуковим дослідженням печінки та змінами біохімічного складу крові (підвищення сироваткових трансаміназ). Враховуючи мету дослідження, всі пацієнти, у яких після повного клініко-лабораторного та інструментального обстеження було встановлено діагноз ожиріння, приймали Кордицепс по 750 мг по 1 капсулі 3 рази на день під час їжі. Курс лікування становив 6 місяців. Крім медикаментозної корекції, для всіх пацієнтів основної групи була розроблена дієта з режимом фізичної активності. Для контрольної групи також була розроблена дієта з розкладом фізичних вправ. Для оцінки ефективності розробленої схеми профілактичного

лікування всім хворим основної групи через 3 місяці та 6 місяців проводили контрольне клініко-лабораторне обстеження, яке включало повторне визначення біохімічних показників крові та ліпідного спектру. Крім того, всім пацієнтам після завершення лікування проводили моніторинг (УЗД) органів черевної порожнини.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Microsoft Excel та пакету прикладних програм Statistica 5.0 for Windows. Для обробки результатів, що підпадають під нормальний розподіл, використовувався статистичний метод із використанням середнього арифметичного (M), стандартного відхилення (SD) і похибки середнього арифметичного (m). Критерій t Стьюдента використовувався для порівняння середніх значень. Різницю показників вважали ймовірною при значенні $p < 0,05$.

Найбільш поширеними скаргами пацієнтів були скарги на:

- головний біль;
- запор;
- метеоризм;
- підвищена стомлюваність;
- слабкість;
- періодичні болі в області серця;
- артеріальна гіпертензія;
- піт;
- запаморочення;
- час від часу симпатoadреналовий криз.

3.2 Оцінка показників функціонального стану печінки за біохімічним аналізом крові

Наступним етапом наших досліджень був аналіз біохімічних показників крові хворих на ожиріння до початку лікування та їх порівняння з нормальними показниками. Результати дослідження показали вірогідні відмінності між показниками цитолітичних ферментів (АлАт та АсАт) у хворих на ожиріння порівняно з контрольною групою та нормою (табл. 3.6, 3.7), тоді як середній рівень АлАт у крові хворих на ожиріння становив майже в 2 рази вище цього показника повинно бути в нормі.

Таблиця 3.6 - Оцінка показників функціонального стану печінки за біохімічним аналізом крові в обстежених основної групи

Показник	Норма	Основна група до лікування	Основна група після 3 місяців лікування	Основна група після 6 місяців лікування
1	2	3	4	5
Загальний білок, г/л	64-83	80,30 ± 0,78	77,50 ± 0,45	70,50 ± 0,50
Загальний білірубін, ммоль/л	1,7 - 20,5	16,30 ± 0,91	14,60 ± 0,61	12,2 ± 0,41
АлАт, Од/л	Чоловіки до 50.0 Жінки до 35.0	68,30 ± 4,61	52,30 ± 1,83	34,51 ± 1,41
АсАт, Од/л	Жінки – до 31 чоловіки – до 41	67,7 ± 5,2	55,3 ± 1,7	33,5 ± 1,4

Продовження таблиці 6

1	2	3	4	5
ГГТП, Од/л	чоловіки — 8-61 Жінки — 5-36	42,60± 1,70	35.30± 0,92	35,60± 0,72
ЛФ, Од/л	98-279	265,3 ± 11,2	244,3 ± 11,7	228,3 ± 10,3
Альфа-амілаза, Од/л	13-53	45,70 ± 1,69	38,40 ± 1,28	35,40 ± 1,11
Тимолова проба, Од.	0-5	4,1 ± 0,14	2,80 ± 0,24	2,40 ± 0,12

Таблиця 3.7 - Оцінка показників функціонального стану печінки за біохімічним аналізом крові в обстежених контрольної групи

Показник	Норма	Контрольна група	Контрольна група після 3 місяців	Контрольна група після 6 місяців
1	2	3	4	5
Загальний білок, г/л	64-83	81,30 ± 0,73	80,50 ± 0,50	79,50 ± 0,69
Загальний білірубін, ммоль/л	1,7 - 20,5	16,30 ± 0,95	15,60 ± 0,61	15,2 ± 0,41
АлАт, Од/л	Чоловіки до 50.0 Жінки до 35.0	67,30 ± 4,55	62,80 ± 1,83	56,71 ± 1,41
АсАт, Од/л	Жінки – до 31 чоловіки – до 41	66,7 ± 5,4	65,3 ± 1,7	60,6 ± 1,4

Продовження таблиці 7

1	2	3	4	5
ГГТП, Од/л	чоловіки — 8-61 Жінки — 5-36	40,60± 1,81	40.30± 0,92	39.60± 0,82
ЛФ, Од/л	98-279	266,3 ± 11,7	260,3 ± 11,7	252,3 ± 10,7
Альфа-амілаза, Од/л	13-53	44,70 ± 1,71	42,80 ± 1,44	40,40 ± 1,26
Тимолова проба, Од.	0-5	4,3 ± 0,20	3,60 ± 0,24	3,40 ± 0,19

Варто зазначити, що підвищення рівня цитолітичних ферментів відзначено майже у половини хворих на ожиріння: АЛАТ – у 53,8% (24 хворих), АсАТ – у 51,2% (23 хворих). Найвищий рівень ферменту реєструвався досить рідко, лише у чоловіків (7,6% пацієнтів) з ІМТ > 30, що відповідало наявності важкого ступеня ожиріння, переважно черевної порожнини. Такі біохімічні показники, як рівень загального білка, гамма-глутамілтранспептидази, альфа-амілази, лужної фосфатази у хворих на ожиріння не мали вірогідної різниці з показниками осіб з нормальною масою тіла ($p > 0,05$). Показники тимолової проби були у верхній межі норми у більшості пацієнтів основної групи, підвищення відмічено лише у 3 обстежених.

3.3 Характеристика порушень ліпідного спектра крові

Отримані результати свідчать про достовірне порушення майже всіх показників ліпідного спектру хворих основної групи (табл. 3.8, 3.9).

Таблиця 3.8 - Характеристика порушень ліпідного спектра крові в обстежених пацієнтів основної групи

Показник	Норма	Основна група до лікування	Основна група після 3 місяців лікування	Основна група після 6 місяців лікування
ЗХ, ммоль/л	3,5–5,7	$4,92 \pm 0,08$	$4,28 \pm 0,05$	$4,34 \pm 0,05$
ТГ, ммоль/л	0,2–1,7	$1,38 \pm 0,07$	$1,02 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$
ЛПНЩ, ммоль/л	до 3	$2,80 \pm 0,04$	$2,30 \pm 0,05$	$1,60 \pm 0,03$
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,1-0,57	$0,49 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$
ЛПВЩ, ммоль/л	Вище 1-1,2	$1,12 \pm 0,03$	$1,20 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,02$
КА	≤ 3	$3,30 \pm 0,17$	$2,77 \pm 0,17$	$2,66 \pm 0,15$

Таблиця 3.9 - Характеристика порушень ліпідного спектра крові в контрольній групі

Показник	Норма	Контрольна група до лікування	Контрольна група після 3 місяців	Контрольна група після 6 місяців
ЗХ, ммоль/л	3,5–5,7	4,96 ± 0,08	4,88 ± 0,05	4,74 ± 0,05
ТГ, ммоль/л	0,2–1,7	1,41 ± 0,09	1,30 ± 0,02	1,25 ± 0,03
ЛПНЩ, ммоль/л	до 3	2,80 ± 0,04	2,70 ± 0,05	2,30 ± 0,03
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,1-0,57	0,48 ± 0,03	0,42 ± 0,04	0,35 ± 0,03
ЛПВЩ, ммоль/л	Вище 1-1,2	1,12 ± 0,03	1,15 ± 0,02	1,20 ± 0,02
КА	≤ 3	3,30 ± 0,17	3,15 ± 0,19	2,99 ± 0,16

За результатами розширеної ліпідограми також встановлено, що у пацієнтів із ожирінням середній рівень проатерогенної фракції ЛПНЩ у сироватці крові досягав надзвичайно високої межі допустимої норми, а рівень ЛПВЩ знижувався. Також ми відзначили достовірне підвищення рівня ЛПНЩ у 21,5% (10 хворих) основної групи пацієнтів з вираженим ожирінням. Виявлені під час дослідження порушення ліпідного спектру крові обстежених свідчать про активацію процесів перекисного окислення ліпідів клітинної мембрани, що індукує розвиток ліпотоксичного стресу та є основою патогенезу НАЖХП у хворих на ожиріння.

Тому оцінку ефективності застосування в поєднанні з дієтичними заходами та ЛФК для профілактики та лікування НАЖХП проводили на основі аналізу динаміки клініко-лабораторних та інструментальних даних хворих основної групи до та після терапії. Споживання *S. militaris* підвищило рівень глутатіону в печінці та знизило рівень перекису ліпідів. Ці результати свідчать

про те, що *S. militaris* може мати захисну дію проти розвитку НАЖХП, частково шляхом зменшення запальних цитокінів і покращення антиоксидантного статусу печінки.

Одним із основних клінічних показників ефективності лікування було покращення загального самопочуття та зменшення частоти проявів астеноневротичного синдрому. При обстеженні пацієнтів виявлено, що вони значно рідше скаржилися на підвищену стомлюваність, слабкість і метеочутливість. Скарги на головний біль і періодичні болі в ділянці серця, які на етапі обстеження турбували майже половину хворих на ожиріння, наприкінці лікування періодично з'являлися лише у кожного п'ятого. Важливо відзначити, що зміна способу життя в поєднанні з БАДами позитивно вплинула на нормалізацію показників артеріального тиску. Серед пацієнтів, які суворо дотримувалися терапевтичних рекомендацій, за період дослідження не було зафіксовано жодного епізоду артеріальної гіпертензії. Поліпшення самопочуття хворих після закінчення лікування відбулося також за рахунок зменшення частоти майже всіх диспепсичних проявів. Особливо значний клінічний регрес спостерігався при таких симптомах, як метеоризм і запор, на фоні застосування пробіотичних культур і препаратів поліненасичених жирних кислот з вітаміном Е. Скарги на запор, який на початку лікування турбував майже 82% пацієнтів і супроводжувалися відчуттям метеоризму у більшості хворих із гострим спастичним болем у животі, після лікування залишилося лише 5 пацієнтів. Позитивна динаміка відзначена і в проявах абдомінального больового синдрому: жоден пацієнт не скаржився на відчуття тяжкості і дискомфорту в епігастрії, хоча періодичні болі в правому підребер'ї, особливо при фізичному навантаженні, все ще турбували близько 26% пацієнтів. пацієнтів основної групи.

ОХОРОНА ПРАЦІ

Фахівці з молекулярної та клітинної біології, імунологи, генетики, фахівці з хімії білків і пептидів, а також біохіміки найбільше піддаються безпосередній реальній і потенційній небезпеці впливу рекомбінантної ДНК. Обслуговуючий персонал вентиляційних установок, холодильників тощо також піддається біологічній небезпеці прямого контакту з рекомбінантною ДНК, хоча й у меншій мірі [49,50]. Дослідження безпеки та гігієни праці, проведені експертами з біотехнологічних академічних і медичних інститутів, показали, що приблизно 30-40% працівників типових біотехнологічних установ зазнають непрямого впливу.

Співробітники біотехнологічних лабораторій піддаються впливу великої кількості біологічних небезпек, токсичного впливу хімічних речовин, рекомбінантів і нерекомбінантів, впливу патогенних організмів і збудників зоонозних захворювань.

Оператори, зайняті на біотехнологічному виробництві, також піддаються впливу хімічних речовин, але не в тій мірі, як працівники лабораторій. Залежно від профілю виробництва вони можуть піддаватися впливу радіонуклідів. Біотехнічні виробничі процеси є закритими процесами, і можливість прямого контакту з рекомбінантними культурами виникає лише в разі аварії. У біомедичному виробництві використовуються сучасні технології виробництва продукції, засновані на стандартах безпеки та захисту працівників. Найбільшою небезпекою на великих підприємствах є не ризик контакту з рекомбінантами, а пошкодження від опіків на лініях парової обробки або опіків від контакту з хімічними речовинами, такими як кислоти, луги тощо, які використовуються у виробничому процесі.

У біотехнологічних процесах у біомедичному секторі клітини або організми особливим чином модифікуються для отримання необхідних продуктів, їх вирощують у біореакторах. Для отримання культури клітин

савців білок, отриманий з клітин, поміщають у живильне середовище; Для отримання і очищення продукту застосовуються різні методи хімічного розділення (хроматографія, електрофорез). Необхідний продукт отримують в клітинній мембрані, і для отримання продукту клітина піддається фізичному розриву. У цьому процесі існує ризик впливу ендотоксинів. Найчастіше для прискорення процесу для отримання кінцевого продукту додають антибіотики під середній або створюється високий тиск. Ці елементи можуть викликати у людини алергічні реакції. Крім того, існує ризик впливу аерозолів.

Ризик витоку продуктів реакції або виділення аерозолів регулюється кількома способами. Доступ до біореактора необхідний для моніторингу та керування системою, а також для подачі поживних речовин, кисню та видалення вуглекислого газу. Щоб запобігти зараженню культури, отвори для доступу повинні бути закупорені або оснащені фільтрами. Витяжна фільтрація виконується для захисту працівників від аерозолів, що утворюються під час культивування або ферментації. Загальною практикою є інактивація рідких стічних вод (зазвичай термічним, паровим або хімічним методами) залежно від ступеня біологічної небезпеки в системі.

Іншими потенційними небезпеками є шум, опіки парою, контакт з корозійними речовинами тощо.

Продуктивність традиційного землеробства багато в чому залежить від отримання нових сортів, для цього використовують традиційне схрещування рослин. Генна інженерія рослин принесла велику користь у цій галузі, і використання традиційних методів селекції відразу ж значно скоротилося. Використання пестицидів і добрив стає непопулярним (оскільки вони забруднюють навколишнє середовище), і перевага віддається технологіям, які потенційно виключають використання цих хімікатів. Для біотехнологічних перетворень рослин відбирають рослини, які легко піддаються генетичній модифікації, або економічно важливі рослини.

Оскільки клітинні стінки рослин відносно товсті, методи, які використовуються для перенесення ДНК у рослинні клітини, відрізняються від

тих, які використовуються для клітин бактерій і ссавців. Після трансформації будь-яким методом клітини рослин розбавляють живильним середовищем, поміщають у чашку і вирощують відібрану тканину на живильному середовищі в камерах або рослинних інкубаторах відносно тривалий час (порівняно з культурою бактерій). Рослини-регенеранти пересаджують у ґрунт у камерах для подальшого росту. Після досягнення певного терміну його пересаджують в теплицю. Для досягнення генетичної стабільності необхідно проводити досліди в теплиці на кількох поколіннях рослин; зібране насіння піддають дослідженню. Під час роботи вони також збирають інформацію про вплив цих експериментів на навколишнє середовище, а потім надсилають отримані дані до відповідних органів для отримання дозволу на проведення експериментів у відкритому космосі .

Існує п'ять основних ризиків, пов'язаних із контактом із мікроорганізмами або їх продуктами біотехнології в промислових масштабах у вищевказаних процесах:

- 1) інфекція;
- 2) відповідь на ендотоксин;
- 3) алергія на мікроорганізми;
- 4) алергічна реакція на продукт;
- 5) токсична реакція на продукт.

Інфекція малоймовірна, оскільки в більшості промислових процесів використовуються непатогенні організми. Однак може виявитися, що мікроорганізми вважаються нешкідливими, наприклад штами *Pseudomonas* і *Aspergillus* , але може спричинити інфекцію в деяких людей з ослабленою імунною системою. Вплив ендотоксину, компонента ліпополісахаридного шару клітинної стінки всіх гамма-негативних бактерій у концентраціях понад 300, викликає тимчасові симптоми, схожі на лихоманку. Працівники біотехнологічних процесів піддаються впливу ендотоксинів. Алергічні реакції на мікроорганізми або їх продукти також зустрічаються в багатьох інших галузях промисловості.

Професійна астма може виникнути у біотехніків від різних мікроорганізмів і продуктів, включаючи *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* і протеази. Токсичні реакції у працівників можуть відрізнятися залежно від організмів і продуктів. В результаті впливу антибіотиків може спостерігатися зміна мікрофлори кишечника. Відомо, що гриби також можуть виробляти токсини за певних умов.

Оскільки люди, які працюють з рекомбінантною ДНК, першими піддаються шкідливому впливу нових технологій, Національний інститут здоров'я із самого початку наказав обов'язкове медичне обстеження таких працівників. Конституційний комітет з біологічного захисту разом з експертами в галузі охорони здоров'я та медичної допомоги зобов'язаний вирішити, яке медичне обстеження необхідно провести в кожному окремому випадку. Залежно від ідентичності конкретного препарату та природи біологічної небезпеки визначаються потенційні шляхи впливу та необхідні щеплення та компоненти програми медичного обстеження.

Інша небезпека пов'язана з використанням клітин тварин з невідомими або невиявленими онкогенами або вірусами, потенційно небезпечними для людини.

Слід зазначити, що попередні побоювання щодо створення генетично небезпечних мутантних штамів або супертоксинів не виправдалися. Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначила, що небезпека біотехнології не більша, ніж небезпека, пов'язана з іншими галузями промисловості. Небезпека, пов'язана з проведенням досліджень у цій галузі, — це не що інше, як небезпека, пов'язана з вивченням організмів, переносників хвороб, ДНК, розчинників тощо. І все ж, звичайно, є певна небезпека в процесі створення нових організмів, але можна звести до мінімуму можливий контакт працівників з ними.

ВИСНОВКИ

В останні роки спостерігається збільшення використання натуральних рослинних препаратів замість синтетичних. Завдяки його невикористаному потенціалу, отриманому за допомогою різних методів культивування, і тому, що *C. militaris* є чудовим джерелом біоактивних метаболітів і має понад 21 клінічно підтверджену користь для здоров'я людини, включаючи протипухлинну, протидіабетичну, антиоксидантну, імуномодулюючу, статеву потенціатор, протимікробну, інсектицидну та імуносупресивний ефект, кордицепс, традиційний лікарський гриб, який використовувався як ліки для здоров'я людини в стародавніх цивілізаціях. Оскільки кордицепін широко вивчався на його протипухлинні та антиоксидантні властивості, він має фармакологічний і терапевтичний потенціал для лікування широкого спектру виснажливих захворювань. Захоплюючий потенціал цього терапевтичного гриба для здоров'я людини потребує подальшого вивчення та заохочувати методи культивування етно -фармакологічне та комерційне використання цієї дивовижної рослини.

Найважливіші результати роботи представлені у наступних висновках:

1. Дослідження росту 2 штамів *Cordyceps militaris* на підщепному середовищі за температур 5⁰С, 10⁰С, 15⁰С, 20⁰С, 25⁰С, 28⁰С дозволило встановити, що оптимальною температурою для росту всіх штамів є 25⁰С.
2. Максимальна продуктивність ендopolісахаридів для досліджуваних видів грибів була отримана при рН 4-6
3. Найбільший вміст біомаси та ендopolісахаридів зафіксовано за температури 20-25 ⁰С .
4. Доведено, що він найкраще підходить для росту та накопичення полісахаридів *C.militaris* була глюкоза, лактоза та сахароза - біомаса -12 г/л, ендopolісахариди - 7,7%, екзopolісахариди - 2,6 г/л.

5. Джерелами азоту, що сприяють накопиченню полісахаридів, є фосфат амонію, пептон і дріжджовий екстракт.

6. Оптимізація складу живильного середовища дозволила збільшити вихід біомаси в 1,5 рази, ендopolісахаридів в 1,7 рази і екзopolісахаридів в 2 рази.

7. Встановлено, що шляхом додавання до живильного середовища рослинних олій стимулюються процеси росту досліджуваних грибів і синтез полісахаридів. Водночас додавання рослинних олій різної природи не завжди викликало однозначні зміни, що свідчить про наявність складного взаємозв'язку між цими процесами в метаболізмі досліджуваних грибів.

8. Одним із найважливіших показників ефективності профілактики та лікування НАЖХП у хворих на ожиріння є позитивні зміни ліпідного спектру крові, які зафіксовані майже у всіх хворих через 6 місяців лікування .

9. Аналіз динаміки біохімічних показників крові після закінчення лікування показав вірогідне зниження рівня печінкових трансаміназ (АлАт та АсАт) у пацієнтів з ожирінням. Найбільш суттєві зміни відзначені в концентрації АлАт у сироватці крові , середні значення якої знизилися майже вдвічі.

10. У результаті проведеної терапії відмічалось також вірогідне зниження середнього показника ЛПНЩ — до $1,60 \pm 0,03$ ($t = 2,53$; $p < 0,05$).

11. Позитивна динаміка ліпідного спектру крові безсумнівно відбилася на показниках коефіцієнта атерогенності , середні значення якого у пацієнтів з ожирінням починали відповідати нормальним значенням після закінчення терапії.

РЕКОМЕНДАЦІЇ

Усім людям з вираженим ожирінням рекомендовано проходити обстеження на НЖХП так, як ця хвороба протікає майже безсимптомно. Для своєчасного виявлення проблеми потрібно звернути увагу на: рівень ферментів цитолізу (АлАт і АсАт) у біохімічному аналізі крові та розгорнуту ліпідограму.

Cordyceps militaris можна використовувати як доповнення до стандартного лікування НЖХП, але не як його заміна. Цей гриб має потужні антиоксидантні та протизапальні властивості, які корисні для печінки.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Бісько Н.А., Поєдинок Н.Л., Негрійко А.М., Потьомкина Ж.В. Фактори регуляції біосинтетичної активності лікарських грибів: Пріоритети наукової співпраці ДФФД і БФФД. Матеріали спільних конкурсних проектів Державного фонду фундаментальних досліджень. Київ: ДІА. 2007. С. 312–325.
2. Велигодська А.К., Федотов О.В. Вміст меланінів у базидіальних грибів порядків Polyporales та Agaricales. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2013. С. 72-83.
3. Коваль Е.З. Клавіцепітальні гриби. Київ: «Наукова думка». 1984. С.191
4. Підгорський В.С., Іутинська Г.О., Пирог Т.П. Інтенсифікація технологій мікробного синтезу: монографія. Київ: Наукова думка. 2010. С. 328.
5. Поєдинок Н.Л., Негрійко А.М., Бісько Н.А., Михайлова О.Б., Ходаковський В.М., Потьомкина Ж.В. Енергоефективні системи штучного освітлення у технологіях вирощування їстівних та лікарських грибів. *Наука та інновації*, 2013. Т.9. С. 46-59.
6. Вон С.Й., Парк Е.Х. Протизапальна та відповідна фармакологічна активність культивованого міцелію та плодових тіл *Cordyceps militaris*. *Журнал Етнофармакологія*. 2005. С. 1-15.
7. Клечак І., Антоненко Л. Біотехнологія на основі базидіальних грибів Гігнера роду *Coriolus* Quel. *Наукові вісті НТУУ КПІ*. 2012. С. 41–49.
8. Holliday, J., Cleaver, M.P. Medicinal value of species of caterpillar fungi of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). 2008. P. 219-234.
9. Грін М., Арора К., Пракаш С. Мікробна медицина: пребіотичні та пробіотичні функціональні продукти для лікування ожиріння та метаболічного синдрому. Львів: Магнолія. 2020. С. 21.

10. Зерова, М.Я., Сосін, П.Є., Роженко, Г.Л. Базидіоміцети. Книга 2. Болетальні, стробіломіцетальні, трихоломатальні, ентоломатальні, русулальні, агарикальні, гастероміцети. *Визначник грибів України*. 1979. Т. 5. С. 330-331.
11. Соломко Е. Ф., Ломберг М. Л., Митропольська Н. Ю. Ріст окремих видів лікарських макроміцетів на живильних середовищах різного складу. *Український ботанічний журнал*, №57. 2000. С. 119–126.
12. Вассер Е.Д. Біологічні особливості лікарських макроміцетів у культурі Київ, Україна: Альтерпрес. 2011. С. 56
13. Cui J.D. Biotechnological production and application of *Cordyceps militaris*, a valuable traditional Chinese medicine. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015. P. 484.
14. Dong C.H., Yao Y.I. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. P. 483-492.
15. Gu Y., Wang Z., Yuan Q. The varieties of antioxidant activity of *Cordyceps militaris* during the submerged fermentation. *Electronic Journal of Biology*. 2006. Vol. 2. P. 30–33.
16. Holliday J., Cleaver M. (n.d.). On the trial of the yak. Ancient *Cordyceps* in the modern world. Retrieved from http://www.alohamedicinals.com/Cordy_Article.pdf
17. Kim H.O., Yun J.W. A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. *Journal of Applied Microbiology*. 2005. Vol. 99. P. 728-738.
18. Leung P.H., Zhang Q.X., Wu J.Y. Mycelium cultivation, chemical composition and antitumour activity of a *Tolyposcladium* sp. Fungus isolated from wild *Cordyceps sinensis*. *Journal of Applied Microbiology*. 2006. P. 101, 275-283.
19. Sato H., Shimazu M. Stromata production for *Cordyceps militaris* (Clavicipitales: Clavicipitaceae) by injection of hyphal bodies to alternative host insects. *Applied Entomology and Zoology*. 2002. Vol. 37. P. 85–92.

20. Sung J.M. Cordyceps diversity and its preservation in Korea. *Inoculum*. 2004. Retrieved from <http://msafungi.org>
21. Tang Y.J. et al. Submerged culture of mushrooms in bioreactors – challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*. 2007. Vol. 45. P. 221-229.
22. Tang Y.J., Zhong J.J. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002. Vol. 31. P. 20–28.
23. Wang S.Y., Shiao M.S. Pharmacological functions of Chinese medicinal fungus *Cordyceps sinensis* and related species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2000. Vol. 8. P. 248-257.
24. Wasser S.P., Didukh M.Y., Nevo, E. Dietary supplements from culinary-medicinal mushrooms: a variety of regulations and safety concerns for the 21st century. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2004. Vol. 6. P.231–248.
25. Wasser S.P. The Importance of Culinary–Medicinal Mushrooms from Ancient Times to the Present. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2005. Vol.7. P. 263–264.
26. Won S.Y., Park E.H. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004. Vol. 96. P. 555–561.
27. 29. Wu Y., Sun C., Pan Y. Structural analysis of a neutral, beta-D-glucan from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Journal of Natural Products*. 2005. Vol. 68. P. 812-814.
28. Zhan J.Y., Dong C.H., Yao Y.J. Antioxidant activities of aqueous extract from cultivated fruit-bodies of *Cordyceps militaris* (L.) Link in vitro. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2006. Vol. 48. P. 1365–1370.
29. Folch I., Lees M., Sloan-Staulet G.H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957. Vol. 226. P. 491-509.

32. Bi S., Jing Y., Zhou Q., Hu X., Zhu J., Guo Z., Song L., Yu R. Structural elucidation and immunostimulatory activity of a new polysaccharide from *Cordyceps militaris*. *Food function*, 2018. P. 279–293.
30. Cui L., Dong M.S., Chen X.H., Jiang M., Lv X., Yan G. A novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*, a Chinese traditional medicinal mushroom. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2008. Vol. 24. P. 483–489.
31. Leu S.F., Poon S.L., Pao H.Y., Huang B.M. In vivo and in vitro stimulatory effects of cordycepin on steroidogenesis of mouse Leydig cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2011. P. 75.
32. Kim H.S., Kim J.Y., Kang J.S., Kim H.M., Kim Y.O., Hong I.P., Khan S.B. Cordlan polysaccharide isolated from *Cordyceps militaris* induces dendritic cell maturation through toll-like receptor 4 signaling. *Food Chemistry and Toxicology*, 2010. P. 48.
33. Holliday J., et al. Analysis of quality and techniques for hybridization of medicinal fungus *Cordyceps sinensis*. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2004. Vol. 6. P. 147–160.
34. Nishizawa K., et al. Antidepressant-Like Effect of *Cordyceps sinensis* in the Mouse Tail Suspension Test. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007. Vol.30. P. 1758–1762.
35. Koh J.H., et al. Antifatigue and antistress effect of the hot-water fraction from mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2003. Vol. 26. P. 691–694.
36. Choi H.R., et al. Anti-inflammatory composition containing *Cordyceps militaris* extract as effective composition. 2004. *WELSKIN CO LTD. Stalemate. 20040041912 KR MKII 6 A61K35/78*.
37. Yamaguchi Y., et al. Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *Phytotherapy Research*. 2000. Vol. 14. P. 647–649.

38. Li S.P., et al. Antioxidation activity of different types of natural Cordyceps sinensis and cultured Cordyceps mycelia. *Phytomedicine. International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 2001. Vol. 8. P. 207–212.
39. Yoshikawa N., et al. Antitumour Activity Of Cordycepin In Mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2004. Vol.31. P. 51-53.
40. Xu C. Application of statistically based experimental designs for the optimization of exo-polysaccharide production by Cordyceps militaris NG3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2002. Vol.36. P. 127-131.
41. Isaca M. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Accounts of Chemical Research*. 2005. Vol. 38. P. 813–823.
42. Song W. Biological insecticide. 2004. Stalemate. 1473474 CN MKY 6 A01N63/04; A01N63/04. Application 05.08.02; Publ. 11.02.04.
43. Gu W. Chinese medicine for treating impotence and prostermia and its processing method. 2007. Stalemate. 1977927 CN MKY 6 A61K36/882; A61K36/88. Application 29.11.05; Publ. 13.06.07.
44. Yu H.M., et al. Comparison Of Protective Effects Between Cultured Cordyceps militaris and Natural Cordyceps sinensis against oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006. Vol.54. P. 3132-3138.
45. Park T.S., Lee H.M. Composition comprising the extract of Cordyceps militaris for anticancer. 2005. Stalemate. 20050051180 KR MKY 6 A61K35/78. Application 27.11.03; Publ. 01.06.05.
46. Yoon Y.P., et al. Containing a cosmetic compounds extracted from Cordyceps militaris using a supercritical fluid extract. 2005. Stalemate. 20050053461 KR MKY 6 A61K7/48. Application 02.12.03; Publ. 08.06.05.
47. Yoshikawa N., et al. Cordycepin And Cordyceps sinensis Reduce The Growth Of Human Promyelocytic Leukaemia Cells Through The Wnt Signaling Pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007. Vol. 34. P. 61-63.

48. Kuo C.F., et al. Cordyceps sinensis Mycelium Protects Mice From Group A Streptococcal Infection. *Journal Of Medicinal Microbiology*. 2005. Vol. 54. P. 795–802.
49. Wang S.M., et al. Effects of a water-soluble extract of Cordyceps sinensis on steroidogenesis and capsular morphology of lipid droplets in cultured rat adrenocortical cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998. Vol. 69. P. 483–489.
50. Kim S.G., Lee Y.H. Food-Supplement For Sports Players. 2003. Stalemate. 20030013836 KR MKY 6 A2311/29; A2311/29. Application 09.08.01. Publ. 2003-02-15.
51. Wang B.J., et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of Cordyceps sinensis fractionated by supercritical carbon dioxide. *Food and Chemical Toxicology*, 2005. Vol. 43. P. 543–552
52. Park C., et al. Growth inhibition of U937 leukemia cells by aqueous extract of Cordyceps militaris through induction of apoptosis. *Oncology Reports*. 2005. Vol. 13. P. 1211–1216.
53. Koh J.H., et al. Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of Cordyceps sinensis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003. Vol.26. P. 84–87.
54. Li S.P., et al. Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured Cordyceps mycelia. *Phytomedicine*. 2006. Vol. 13. P. 428–433.
55. Zhang W., et al. Immunomodulatory and antitumour effects of exopolysaccharide fraction from cultivated Cordyceps sinensis (Chinese caterpillar fungus) on tumour-bearing mice. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2005. Vol. 42. P. 9–15.
56. Lin W.H., et al. Improvement of sperm production in subfertile boars by Cordyceps militaris supplement. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2007. Vol. 35. P. 631.
57. Y R., et al. Isolation and biological properties of polysaccharide CPS-1 from cultured Cordyceps militaris. *Fitoterapia*. 2004. Vol. 75. P. 465–472.

58. Cha S.H., et al. Morphological characteristics of *Cordyceps sinensis* 16 and production of mycelia and exo-biopolymer from molasses in submerged culture. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2006. Vol. 12. P. 115-120.
59. Song J.F., et al. Optimization Of Cordycepin Extraction From Cultured *Cordyceps militaris* By Hplc-Dad Coupled With Uniform Design. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007. Vol. 82. P. 1122–1126.
60. Park J.P., et al. Optimization of submerged culture conditions for the mycelial growth and exo-biopolymer production by *Cordyceps militaris*. *Letters in Applied Microbiology*. 2001. Vol. 33. P. 76-81.
61. Kim S.W., et al. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. *Journal of Applied Microbiology*. 2003. Vol. 94. P. 120.
62. Park T.S., Lee H.M. Pharmaceutical composition comprising the extract of *Cordyceps militaris* for enhancing the immune system. 2005. Stalemate. 20050051179 KR MKY 6 A61K35/78 Appl. 27.11.03; Publ. 01.06.05.
63. Ng T.B., Wang H.X. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005. Vol. 57. P. 1509–1519.
64. Cho J.U., et al. Preservative-free cosmetic composition. 2004. Stalemate. 20040060632 KR MKY 6 A61K7/48. Application 30.12.02; Publ. 06.07.04.
65. Kim S.W., et al. Production and characterization of exopolysaccharides from an entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris* NG3. *Biotechnology Progress*. 2003. Vol. 19. P. 428-435.
66. Jeong J.H., Jung M.S., Park C.G. Production of functional feed additive using mycelium of *Cordyceps militaris* cultured with bean dregs and rice bran as substrate and feed containing the same feed additive. 2004. STALEMATE. 20040092083 KR A23K1/00; A23K1/00. APPLICATION 24.04.03; published 03.11.04.

67. Cha S.H., et al. Production of mycelia and exo-biopolymer from molasses by *Cordyceps sinensis* 16 in submerged culture. *Bioresource Technology*. 2007. Vol. 98. P. 165-168.

68. Liu W., et al. Protection against radiation-induced bone marrow and intestinal injuries by *Cordyceps sinensis*, a Chinese herbal medicine. *Radiation Research*. 2006. Vol. 166. P. 900–907.

69. Yu R., et al. Structural characterization and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps militaris*. *Carbohydrate Polymers*. 2007. Vol.70. P. 430-436.