

А. О. САГИТОВ¹, ЯН ХУАЙН ДЖУНЬ², ГО СУ ПИНЬ²,

ЛИ СИНЬ ДОНЬ², ЛУ ВЕЙ³, С.Б. АМАНОВ¹

¹Казахский научно-исследовательский институт защиты и карантина растений,
Алматы, Республика Казахстан,

²Научно-исследовательский институт медицины и науки о жизни, Провинция Шаньси,
КНР

³Шаньсиский университет, КНР)

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОТБОРУ ВЫСОКОПРОДУКТИВНОГО ШТАММА *Cordyceps militaris* И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЕГО ВЫРАЩИВАНИЯ

Аннотация. Изложены материалы по культивированию гриба *Cordyceps militaris* на искусственных питательных средах. Уточнены технологические параметры культивирования и после сравнительного эксперимента по выбору методов посева гриба, выращенного на твердом и жидком субстратах, рекомендован метод, который называется «Новая технология выращивания *Cordyceps militaris* в плоских поддонах». Получен стабильно высокоурожайный новый штамм кордицепса. Подобрана оптимальная среда и разработаны технические условия культивирования нового штамма *Cordyceps militaris*. Установлено, что метод посева суспензией мицелия *Cordyceps militaris*, приводит к увеличению производственных показателей.

Ключевые слова: новый штамм кордицепса, глубинное выращивание, суспензия, твердофазное выращивание, мицелий.

Тірек сөздер: кордицепстің жаңа штамы, терендетіп өсіру, суспензия, қатты фазалы өсіру, мицелий.

Keywords: new strain of Cordyceps, deep cultivation, suspension, solid state cultivation, mycelium.

Cordyceps militaris в Китае называют северным зимним кордицепсом, так как он произрастает в высоких горах на севере Китая не ниже 3,5 тыс. метров. *Cordyceps militaris* содержит вещества с представляющими интерес биологическими и фармакологическими свойствами, например, кордицепин (cordycepin) [1, 2]. В составе мицелия кордицепса присутствует также коэнзим Q10, незаменимые аминокислоты, минеральные соли, витамины, а также полисахариды, имеющие антиоксидантный и иммуномодулирующий эффект.

Цикл развития грибов рода *Cordyceps* неразрывно связан с насекомыми. Размножение происходит путем паразитирования на бабочках (точнее гусеницах), мухах и муравьях. Споры, попадающие на волосистую поверхность насекомого, прорастают и внедряются в тело насекомого. Насекомое или личинка бабочки гибнет, и в теле развивается полноценные гифы мицелия кордицепса. Тела насекомых, в которых находятся споры

кордицепса, не разлагаются и не заражаются никакими другими микроорганизмами по причине присутствия кордицепина, обладающего свойством, подобным антибиотику. *Cordyceps militaris* еще является и съедобным грибом, который богат белками и аминокислотами [3].

В последние годы Министерство здравоохранения Китая поддерживает разработки биотехно-логов по культивированию кордицепса, который завоевывает рынок пищевых продуктов, как основа нового оздоровительного питания, поэтому развитие технологии по выращиванию *Cordyceps militaris* и продукции из него являются весьма перспективными. Искусственное выращивание одомашненного *Cordyceps militaris* и разработка технологий его использования процветает в КНР, что дает новый импульс развития сельского хозяйства и увеличивает доходы фермеров.

Материалы и методика исследований

В культивировании кордицепса существует два подхода. Первый – это получение плодовых тел, используя в качестве субстрата куколки насекомых, однако использование такого метода весьма затруднительно и затратное ввиду очень низкой производительности. Второй подход является самым обычным методом, используемым при интенсивном культивировании шляпочных грибов на искусственных питательных средах. Однако, исходя из физиологических особенностей данного гриба, нами был применен гибридный метод в подборе среды культивирования.

В качестве основных субстратов использовали рис, пшеницу, кукурузную и соевую муку. Также в качестве дополнительных источников сахаров использовали глюкозу и сахарозу в различных концентрациях.

Для приготовления жидких и агаризованных сред для содержания коллекции и получения маточных культур использовали сахарозу или глюкозу в качестве источника углеводов; пептон, дрожжевой экстракт и аспарагин в качестве источников азота и минеральные добавки – дигидро-фосфат калия и сульфат магния. В качестве активатора роста использовали индолилуксусную кислоту (гетероауксин) и тиамин (витамин В1). В качестве загустителя твердых сред использовали агар. В качестве особых добавок использовали размол куколок цикад и шелкопряда, последние предпочтительнее, так как имеются в достатке как отходы шелкопрядильных производств.

Все растворимые ингредиенты поочередно растворяли в дистиллированной воде, в случае необходимости добавляли агар или нерастворимые субстраты. После чего проводили стерилизацию при 1,2 атм. в течение 1–3 часов.

Работы с культурой проводили в стерильных условиях, в ламинарных боксах 2 класса чистоты.

Строму гриба очищали от грязи, промывали чистой водой, а затем замачивали в 1% растворе сулемы HgCl_2 . Переносили в стерильный бокс, после чего полоскали 4–5 раз в

стерильной воде, вырезали из нижней части небольшой фрагмент до 5 мм и высаживали на агаризованной среде в чашки Петри. Культивирование проводили при 10–15 °С.

Культивирование и хранение коллекционных штаммов проводили на скошенной агаризованной среде в 30 мл пробирках следующего состава:

Глюкоза – 10 г	Сульфат магния – 0,6 г
Пептон – 10 г	Ауксин – 0,5 мг
Дрожжевой экстракт – 2 г	Агар – 15-20 г
Аспарагин – 1 г	Вода – 1000 мл
Калия дигидрофосфат – 1,5 г	РН – 6,0

Культивирование проводили при температуре 23–25 °С, 10 дней, после чего готовые маточные культуры первого уровня хранили в холодильнике при 4–5 °С.

Маточные культуры второго уровня готовили двумя способами:

– Классическим методом получения мицелия на твердом субстрате (зерна риса, пшеницы и проса), зерно предварительно промывается и закладывается в стеклянные бутылки на 0,5 л. до половины объема, заливается водой до полного погружения зерен. Бутылки закрываются ватным тампоном и стерилизуются в течение 1 часа при 1,2 атм.

В остуженный субстрат засеваются маточник 1 уровня:

– Глубинным методом культивирования мицелия в жидкой искусственной среде различных составов. На микробиологической термостатируемой качалке по 80 мл в 250 мл колбах, при скорости 180 об./мин.

Для выращивания *Cordyceps militaris* использовали стандартный для культурных грибов двухступенчатый метод:

– Изначально на предварительно стерилизованный сложный субстрат высевается посадочный материал из маточников 2 уровня и культивируется в условиях темноты, при высокой влажности и повышенной температуре в специальных термокамерах. На этой стадии происходит захват суб-страта мицелием и полное его прорастание.

– На второй стадии путем индукции светом и понижением температуры до физиологически оптимальных для конкретного вида гриба происходит формирование плодовых тел.

В суспензии спор и клеток оценивали соотношение осадка к надосадочной жидкости в процентах после центрифугирования при 8000 об/мин., в течение 15 мин.

Для этого 10 мл суспензии заливали в пробирки. После центрифугирования измеряли объем надосадочной жидкости (V_L) и сырого осадка (V_S). Вычисления проводили по формуле (1):

$$K = \frac{V_S - V_L}{V_S} \cdot 100\%. \quad (1)$$

Оценку производительности плодовых тел проводили взвешиванием грибов на единицу суб-страта.

Результаты исследований

В качестве исходного материала в 2009 году были собраны свежие стромы *Cordyceps militaris*. После ряда пересевов были отобраны 5 штаммов: Y201001bcc; Y201002bcc; Y201003bcc; Y201004 и Y201005bcc бсс, которые явились объектами данного исследования. Следует отметить, что после очистки и выделения, данные штаммы необходимо регулярно пересевать на свежие питательные среды, чтобы обеспечить чистоту и стабильность по урожаю.

Первоначальный отбор штамма проводили по продуктивности мицелия на двух вариантах субстратов:

- Среда номер 1 (без добавок): рис, соевая мука и вода;
- Среда номер 2 (с добавками): сахароза, пшеница, и размол куколок цикад.

Проросший мицелий на субстрате весом 500 г в полипропиленовых контейнерах, культиви-ровали при температуре 20–22 °С и влажности 85% на свету. Через 45 суток взвешивали общую массу полученных грибов в каждом контейнере и высчитывали среднюю урожайность в выборке 100 повторностей на каждый вариант. Закладку опыта проводили на промышленной базе научно-исследовательского института медицины и науке о жизни провинции Шаньси.

Как видно из результатов эксперимента, представленного на рисунке 1, наиболее продуктив-ными на обоих вариантах сред стали штаммы Y201003bcc и Y201005bcc, и поэтому следующие эксперименты по оптимизации условий роста культур проводили с этими штаммами.

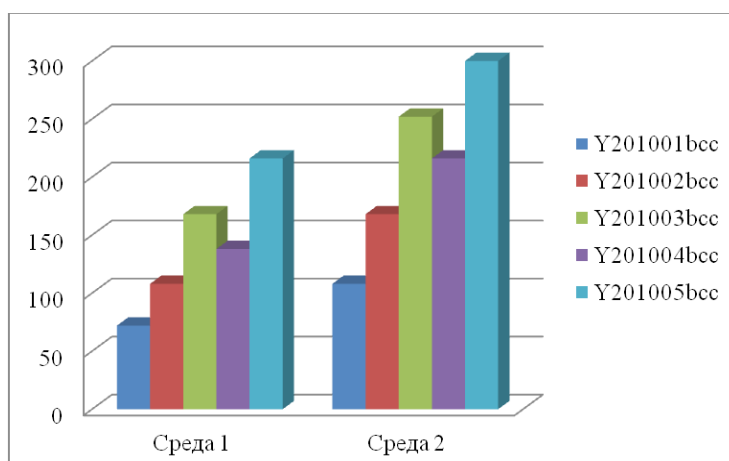


Рисунок 1 – Отбор продуктивного штамма *Cordyceps militaris*

Главным источником питания грибов и в том числе *Cordyceps militaris* являются источники углерода, в том числе глюкоза, сахароза, мальтоза, крахмал, пектин и т.д. Установлено, что самым лучшим вариантом оказалось использование малых молекул – моносахаридов и дисахаридов, хотя это не всегда оправдано с точки зрения

промышленного производства из-за дороговизны данных компонентов. Кроме того, азот является необходимым элементом для синтеза белков и нуклеиновых кислот, и грибы хорошо используют азотистые вещества, особенно органический азот, например, пептон, соевый порошок, дрожжевой экстракт, размол куколок шелкопряда.

Для оптимизации питательных компонентов были поставлены многофакторные эксперименты по подбору состава среды.

В эксперименте по подбору сред для глубинного культивирования штамма Y201005bсс, основными источниками углерода явились глюкоза и кукурузная мука, в качестве источников азота: пептон, дрожжевой экстракт и соевая мука, а также использовали размол куколок шелкопряда, ко-торый помимо дополнительного источника азота, является стимулятором роста мицелия (таблица 1).

Таблица 1 – Варианты состава сред, %

№	Глюкоза	Кукурузная мука	Дрожжевой экстракт	Соевая мука	Пептон	Размол шелкопряда
1	2,0	1,0				0,5
2	1,5	1,0				0,5
3	1,0	1,0				0,5
4	1,0	1,0				1,5
5	1,0	1,0				1,0
6	1,0	1,0				0,5
7	1,0	2,5				1,0
8	1,0	2,0				1,0
9	1,0	1,5				1,0
10	1,0	1,5			1,5	
11	1,0	1,5			1,0	
12	1,0	1,5			0,5	
13	1,0	1,5		2,5		
14	1,0	1,5		2,0		
15	1,0	1,5		1,5		
16	1,0	1,5	0,5			

17	1,0	1,5	0,3		
18	1,0	1,5	0,2		

В состав среды добавляли гидрофосфат калия K_2HPO_4 в концентрации 0,15%, сульфат магния MgSO_4 – 0,06% и тиамин хлорид – витамин В1 в концентрации 0,02% при рН – 6,0. Культиви-вировали на качалочных колбах 8 суток. Использовали концентрацию мицелия по формуле (1) как контрастный параметр.

После анализа полученных данных, отраженных на рисунке 2, нами была выбрана среда номер 8, как наиболее продуктивная (концентрация мицелия – 47%) для выращивания мицелия глубинным методом. Кроме того, данный состав оптимален и с точки зрения себестоимости среды.

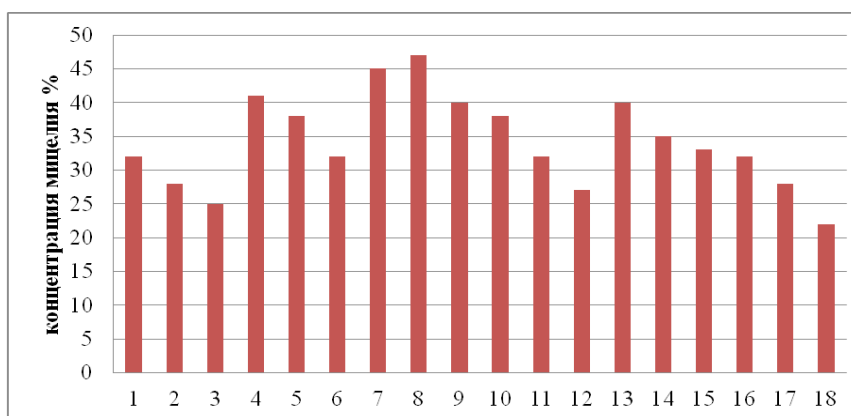


Рисунок 2 – Продуктивность штамма Y201005bсс в зависимости от состава среды

В экспериментах по подбору субстрата для выращивания плодовых тел использовали 3 вариан-та сред:

Вариант 1. Рисовый субстрат: рис – 340 г, соевая мука – 60 г, соотношение субстрат/пи-тательный раствор 1:1.5.

Состав питательного раствора: сахараза 10 г, размол куколок шелкопряда 5 г, K_2HPO_4 – 1 г, MgSO_4 – 1 г, витамин В1 – 1 г растворить в 600 мл воды (на каждую коробку).

Вариант 2. Пшеничный субстрат: пшеница – 400 г, соотношение субстрат/питательный раствор 1:1.5.

Состав питательного раствора: сахараза 10 г, размол куколок шелкопряда 10 г, K_2HPO_4 – 1 г, MgSO_4 – 1 г, витамин В1 – 1 г растворить в 600 мл воды (на каждую коробку).

Вариант 3. Пшенично-кукурузный субстрат: пшеница – 400 г, кукурузная мука – 20 г, соот-ношение субстрат/питательный раствор 1:1.5.

Состав питательного раствора: сахараза 5 г, размол куколок шелкопряда 10 г, $\text{KН}_2\text{PО}_4$ – 0,6 г, MgSO_4 – 0,6 г, витамин В1 – 1 г растворить в 600 мл воды (на каждую коробку).

Температура – 18 °С, влажность – 65%, цикл выращивания – 45 дней.

По данным эксперимента, показанным на рисунке 3, наиболее оптимальной является пшенич-ный субстрат (Вариант 2).

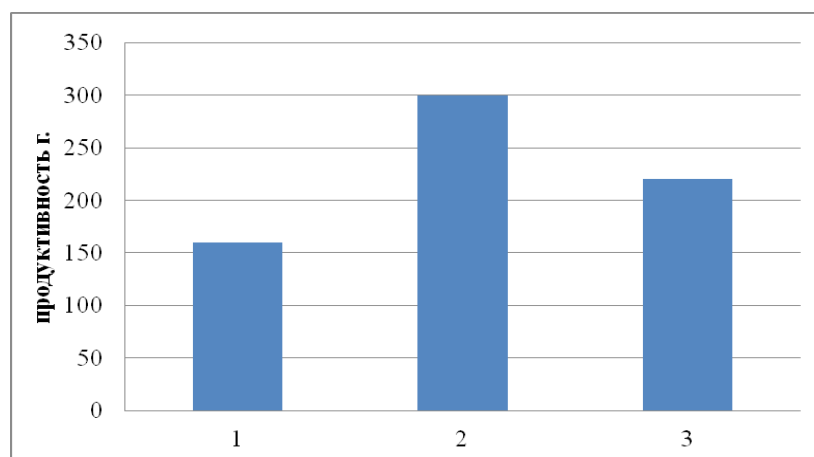


Рисунок 3 – Влияние состава субстратов на продуктивность штамма Y202005bсс

Таким образом, в ходе экспериментов было выявлено влияние источников азота на фоне комбинаций источников углерода для успешного управления процессом производства грибов. Кроме того, у разных веществ есть свои достоинства и недостатки. Соевая мука очень дешевая, но сильно удлиняет цикл выращивания, что дает низкий коэффициент полезного действия и снижается производительность. Напротив размол куколок шелкопряда дорогостоящий и специфический продукт дает высокие производительные показатели, пептон имеет сложный состав, который может меняться в зависимости от поставщика и соответственно дает не стабильный урожай.

Основными факторами, влияющими на рост и физиологическое развитие шляпочных грибов, кроме состава среды культивирования, оказывают температура, влажность и степень аэрации. При этом если влажность и аэрация на всех этапах развития практически не меняются, то изменение температурного режима оказывает ключевое влияние на развитие мицелия и формирование плодово-вых тел. Поэтому на первом этапе оценивали температурные режимы для мицелиарного роста отоб-ранных штаммов. Для этого на жидкой среде глубинным методом выращивали мицелий штаммов Y201005bсс и Y201003bсс при различных температурах. Через 7 суток оценивали процент при-роста колоний (таблица 2).

Результаты исследований показали, что оптимальной температурой для роста мицелия штам-мов *Cordyceps militaris* является 18–20 °С. При этом стоит отметить, что данную

температуру целесообразно использовать как при выращивании грибов, так и коллекционных штаммов и маточников.

Таблица 2 – Влияние температуры на рост мицелия штаммов Y201005bcc и Y201003bcc *Cordyceps militaris*

Штамм	Температура выращивания, °С		
	14–16	18–20	26–28
Y201005bcc, %	24±0,2	45±0,3	32±0,2
Y201003bcc, %	22±0,1	38±0,3	32±0,2

Промышленные испытания показали, что в данных условиях культивирования на 3–4 сутки в темноте на субстрате появляются белые нити мицелия по всему субстрату, и при переносе на свет на 5 сутки меняется цвет мицелия на светло-желтый, при этом интенсивность зарастания субстрата не снижается.

Вторым этапом явилось изучение влияния температуры на формирование плодовых тел *Cor-dyceps militaris*. Для этого выращенные на субстрате промышленным способом в плоских поддонах мицелии культивировали при различных температурах в 100 повторностях для каждого варианта. Масса субстрата составила 400 г на каждый поддон и через 40 суток оценивали продуктивность грибов в каждом поддоне.

Таблица 3 – Влияние температуры на рост плодовых тел грибов штаммов Y201005bcc и Y201003bcc *Cordyceps militaris*

Штамм	Температура выращивания, °С		
	14–16	20–22	26–28
Y201005bcc, г	106±2,1	252±1,9	112±1,1
Y201003bcc, г	92± 2,8	216±1,5	98±1,0

Результаты эксперимента, представленные в таблице 3, показали, что оптимальной температурой для выращивания плодовых тел является 20–22 °С и в качестве рабочего штамма с высокой урожайностью мы выбрали Y201005bcc, который показывал устойчиво высокие показатели.

Следует отметить, что обычно при культивировании пищевых и лекарственных грибов в искусственных условиях, стимулирующим фактором для формирования плодовых тел и дальнейшего спороношения является свет и понижение температуры при высокой влажности, характерные для осенних грибов. В случае с культивированием *Cordyceps militaris* мы отметили, что для более активного роста стром гриба необходимо увеличить температуру при прочих одинаковых условиях для других культурных видов грибов.

Данная реакция, скорее всего, связана с физиологической особенностью и является результатом способа существования этого паразитического гриба. Если практически все остальные культивируемые грибы являются сапрофитами и в природных условиях для них основным источником питания являются отходы жизнедеятельности растений животных и их период генеративного состояния обусловлен максимально благоприятными условиями внешней среды (солнечная прохладная погода после дождей), то представители рода *Cordyceps* являются паразитическими организмами. И для успешного заселения хозяев насекомых им необходимо созреть в теплую погоду, когда появляются насекомые.

ЛИТЕРАТУРА

1 Shin K.H., Lim S.S., Lee S., Lee Y.S., Jung S.H., Cho S.Y. Anti-tumor and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* spp // *Phytother Res.* 2003;17:830–3.

2 Holliday, John; Cleaver, Phillip; Lomis-Powers, Megan; Patel, Dinesh;. Analysis of Quality and Techniques for Hybridization of Medicinal Fungus *Cordyceps sinensis* (Berk.)Sacc. (Ascomycetes) // *Int. J. Med Mushr.*, 2004., Vol. 6, pp. 151-164.

3 Mizuno T. medicinal effect and utilization of *Cordyceps (Fr)* Link (Ascomycetes) and *Isaria Fr.*(Mitosporic fungi) Chinese Caterpillar fungi, “*Tochukaso*”// *Int J Med Mushr.*, 1999, Vol. 1, pp. 251-262.

Резюме

А. О. Сагитов¹, Ян Хуайн Джунь², Го Су Пинь², Ли Синь Донь², Лу Вей³, С. Б. Аманов¹

¹Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан Республикасы,

²Медицина және өмір жайлы ғылымдар ғылыми-зерттеу институты, Шаньси провинциясы, ҚХР,

³Шаньси университеті, ҚХР)

CORDYCEPS MILITARIS САҢЫРАУҚҰЛАҒЫНЫҢ ТҮСІМДІЛІГІ ЖОҒАРЫ ШТАМЫН ІРІКТЕУ

ЖӘНЕ ОНЫ ӨСІРУ ТЕХНОЛОГИЯСЫН ЖАСАУ ЖӨНІНДЕГІ ЗЕРТТЕУЛЕР

Мақалада *Cordyceps militaris* саңырауқұлағын жасанды коректік орталарда өсіру жөніндегі мәліметтер баяндалды. Саңырауқұлақты өсірудің технологиялық параметрлері анықталды, қатты және сұйық субстрат-тарда өсірілген саңырауқұлақты себу тәсілдерін таңдау жөніндегі салыстырмалы тәжірибеден кейін «*Cordyceps militaris* саңырауқұлағын жайпақ тұғырықтарда өсірудің жаңа технологиясы» деп аталатын тәсіл ұсынылды. Кордицепстің тұрақты жоғарыөнімді штамы алынды. *Cordyceps militaris* жаңа штамын өсіру үшін қалыпты орта таңдалды және техникалық жағдайлар жасалды. *Cordyceps militaris* мицелиін суспензиямен себу тәсілі өндірістік көрсеткіштерді жоғарылататыны анықталды.

Тірек сөздер: кордицепстің жаңа штамы, тереңдетіп өсіру, суспензия, қатты фазалы өсіру, мицелий.

Summary

A. O. Sagitov¹, J. Yang Huaijun², G. Guo Suping², Li Xue Don², Lu Vey³, S. B. Amanov¹

¹Kazakh Scientific Research Institute of Plant Protection and Quarantine, Almaty, Republic of Kazakhstan.

²Research Institute for Medicine and Life Sciences, Shanxi Province, China,

³Shanxi University, China)

STUDY ON THE SELECTION OF HIGHLY PRODUCTIVE *CORDYCEPS MILITARIS* STRAINS

AND ITS GROWING TECHNOLOGY DEVELOPMENT

The article describes the material for the cultivation of the fungus *Cordyceps militaris* on artificial media. Refined technological parameters of cultivation and after a comparative experiment on the choice of in vitro methods of the fungus grown on solid and liquid substrates, recommended method, which is called the «New Technology of growing *Cordyceps militaris* in flat trays». Obtained stable high-yielding a new strain of *Cordyceps*. Selected optimum

condition and developed specifications for the cultivation of a new strain of *Cordyceps militaris*. Established that the method of isolation a suspension of mycelium *Cordyceps militaris*, leads to increase production.

Keywords: New strain of *Cordyceps*, deep cultivation, suspension, solid state cultivation, mycelium.

Поступила 04.06.2013 г.