

УДК 579.222.3

ОБРАЗОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СИБИРСКИМИ ШТАММАМИ *CORDYCEPS MILITARIS*

© 2024 г. Т. В. Антипова^{a, b, *}, В. П. Желифонова^a, Б. П. Баскунов^a,
Ю. А. Литовка^{c, d}, М. М. Патрушева^{c, d}, В. Б. Кешелава^e, Е. С. Михайлов^{f, g},
И. Н. Чистяков^h, И. Н. Павлов^{c, d}

^aИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦ БИ РАН,
Пушино, 142290, Россия

^bВсероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, 196608, Россия

^cИнститут леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, 660036, Россия

^dСибирский государственный университет науки и технологий им. М.Ф. Решетнева, Красноярск, 660037, Россия

^eИнститут биологического приборостроения РАН, ФИЦ ПНЦ БИ РАН, Пушино, 142290, Россия

^fФилиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Пушино, 142290, Россия

^gПушинский филиал ФГБОУ ВО “Российский биотехнологический университет”, Пушино, 142290, Россия

^hООО “Пушинские биотехнологии”, Пушино, 142290, Россия

*e-mail: tatantip@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.03.2024 г.

После доработки 23.05.2024 г.

Принята к публикации 23.05.2024 г.

Штаммы грибов, выделенные в Красноярском крае из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, обнаруженных в подстилке и кроне *Abies sibirica* Ledeb., на основании морфологических и генетических методов были отнесены к виду *Cordyceps militaris*. Штаммы являются высокоактивными продуцентами биологически активных соединений, таких как полисахариды (ПС), аденозин и кордизинин В. Кордизинин В был впервые обнаружен у вида *C. militaris*. Установлено, что на продукцию ПС большее влияние оказал способ выращивания грибов, чем углеродный субстрат. Наибольшая продукция ПС (6.0–6.7 г/л) и нуклеозидов (390 мг/л) у *C. militaris* 11-5 наблюдалось при глубинном культивировании на сахарозе при использовании абиопептида. При изучении биосинтеза ПС в процессе роста гриба установлено, что синтезированные ПС потребляются культурой при снижении концентрации углеродного субстрата в среде и, по-видимому, служат запасными источниками углерода.

Ключевые слова: кордицепс, нуклеозиды, аденозин, кордизинин В, полисахариды, ферментация

DOI: 10.31857/S0026365624060099

Cordyceps militaris – энтомопатогенный гриб, который известен как один из древних лекарственных средств Тибета и Китая (Kontogiannatos et al., 2021; Cui, 2015). *C. militaris* паразитирует внутри личинок или куколок чешуекрылых насекомых и образует плодовые тела на насекомых-хозяевах (Olatunji et al., 2018). Грибы этого вида являются популярными нутрицевтиками, которые используются в кулинарии в виде экстрактов, ферментированного порошка и настоек (Jędrejko et al. 2022). В последнее время появились данные об использовании этого гриба в качестве кормовой добавки в животноводстве и птицеводстве (Chen et al., 2020). Поиск и изучение новых

штаммов *C. militaris* представляет интерес из-за их биологически активных соединений, которые нашли применение в фармакологии (Jędrejko et al., 2021). Среди лечебных свойств *C. militaris* известна гипогликемическая, гипополипидемическая, противовоспалительная, противоопухолевая, антибактериальная, противогрибковая, противовирусная, противомаларийная, нейропротекторная, антиоксидантная и иммуномодулирующая активности (Zhang et al., 2019; Das et al., 2021). Из плодовых тел, мицелия и культуральной жидкости этих грибов были выделены различные биологические активные соединения: полисахариды, нуклеозиды (аденозин,

кордицепин (3'-дезоксиаденозин), гуанозин), эргостерин, пептиды, статины и пр. (Das et al., 2021; Miao et al., 2022; Qu et al., 2022).

Полисахариды (ПС), накапливающиеся в культуральной жидкости, являются одними из основных водорастворимых биоактивных компонентов *C. militaris* (Miao et al., 2022). По сравнению с другими соединениями ПС *C. militaris* изучены недостаточно. Из-за различных условий выращивания и особенностей штаммов *C. militaris* моносахаридный состав и их молярные соотношения в ПС непостоянны, что усложняет установление их структуры (Yang et al., 2020). Экспериментальные данные показывают, что ПС *Cordyceps* spp. обладают широким спектром действия, включая противоопухолевую, противовирусную, иммуностимулирующую, гипохолестеринемическую, гипогликемическую и антиоксидантную активности (Liu et al., 2015).

Вид *C. militaris* широко распространен в Северной и Южной Америке, Европе и Азии. На территории РФ встречается часто в Приморском крае, реже в центральных и южных регионах Европейской части страны. В западной Сибири штаммы *C. militaris* были изолированы в Иркутской, Новосибирской областях, на юге Байкала (Огарков и соавт., 2012; Kryukov et al., 2018). Этот гриб обычно растет на куколках, реже на личинках или взрослых насекомых из отрядов *Arachnida*, *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Diptera* и *Isoptera*. Аскоматы *C. militaris* изменчивы по форме и размерам, что связано с типом доступного для роста грибов источника пищи, а также размером хозяина и количеством образовавшихся стром.

В природе грибы *C. militaris* растут медленно, их рост ограничен определенной территорией, а плодовые тела трудно обнаружить из-за небольших размеров (0.8–7 см высотой и 2–6 мм шириной в верхней части) (Евлахова, 1974). В Китае из-за чрезмерной эксплуатации под угрозой находятся ресурсы дикого *C. militaris*, поэтому широкое использование его в качестве лекарственного средства запрещено. Для преодоления этого ограничения были разработаны технологии крупномасштабного искусственного выращивания культур *C. militaris* в виде плодовых тел и мицелия (Shih et al., 2007; Jiapeng et al., 2014; Kang et al., 2014). Существующие возможности улучшения коммерческого выращивания *C. militaris* связаны с выбором подходящего штамма и оптимизацией питательной среды.

На территории Нижне-енисейского лесничества Красноярского края в 2017 г. из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, обнаруженных в подстилке и кроне *Abies sibirica* Ledeb., нами были выделены три новых изолята энтомопатогенных грибов.

Целью работы было определение таксономического положения изолятов; изучение и идентификация биологически активных соединений, продуцируемых штаммами, и установление оптимальных условий их образования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования. Объектами исследования были три штамма *C. militaris* (L.) Fr. (1818) (*Cordycipitaceae*, *Hypocreales*, *Hypocreomycetidae*, *Sordariomycetes*, *Ascomycota*, *Fungi*) 11-3, 11-4, 11-5 из коллекции чистых культур лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН (Красноярск, Россия). Штаммы были выделены в 2017 г. из гусениц *D. sibiricus*. После поверхностной стерилизации 75%-м этанолом с последующим промыванием стерильной водой и подсушиванием между двумя слоями стерильной фильтровальной бумаги гусениц раскладывали во влажные камеры, а также на поверхность 2% мальт-экстракт агара (МЭА) с 0.5% танина и среды Чапека. Посевы инкубировали 7 сут при 25°C. Из мицелия, выросшего непосредственно из тела насекомого, изолировали чистые культуры грибов. Морфологические особенности колоний изучали на МЭА, картофельно-сахарозном агаре (КСА) и среде SNA (глюкоза – 0.2 г, сахароза – 0.2 г, KNO₃ – 1.0 г, KH₂PO₄ – 1.0 г, MgSO₄ × 7H₂O г, KCl – 0.5 г, дистиллированная вода 1 л; Nirenberg, 1990) на 7 и 14 сут роста. Микроструктуры оценивали методами светлой микроскопии с использованием микроскопа Nikon Eslipse Ci (“Nicon”, Япония). Видовую идентификацию штаммов подтверждали молекулярно-генетическими методами – секвенированием участков генетических маркеров ITS и TEF 1-alpha с использованием оборудования ЦКП “Инновационные технологии защиты растений” Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (Санкт-Петербург–Пушкин, РФ). Последовательность по ITS штамма 11-3 Siberia внесена в GenBank под номером SUB14449092 SH PP794588.

Штаммы выращивали в пробирках на скошенном глюкозо-картофельном агаре (ГКА) при 25°C и хранили при 4°C. Влияние температуры культивирования на скорость роста штаммов определяли в чашках Петри с ГКА при температурах 15, 25, 28 и 37°C. Оптимальную температуру выращивания оценивали по радиальной скорости роста колоний.

Влияние двух источников углерода на рост культур и биосинтез биологически активных соединений (БАС) изучали при глубинном или

поверхностном культивировании штаммов *C. militaris* в двух средах, содержащих по 50 г/л глюкозы или сахарозы и 10 г/л триптона. Изучение влияния пяти разных источников азота на процесс роста и биосинтеза БАС было проведено при глубинном культивировании штамма *C. militaris* 11-5 в присутствии 50 г/л глюкозы. Среда содержала 10 г/л триптона (“Difco”, США), 10 г/л гидролизата казеина (“Difco”, США), 5 г/л глутамата, 6 г/л NaNO_3 или 40 мл абиопептида (ООО “А-Био”, РФ). Концентрации других компонентов в средах составили (г/л дистиллированной воды): дрожжевой экстракт (“Difco”, США) – 9.0; KH_2PO_4 – 1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.9; KCl – 0.01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01. Грибы выращивали в колбах (750 мл): глубинно в 200 мл среды на шейкере (220 об./мин) в течение 12 сут или в стационарных условиях с 400 мл среды в течение 35 сут. Температура культивирования составляла $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Среда засеивалась 5–7-суточным мицелием, выращенным глубинно в 2%-ом мальт-экстракте (“Difco”, США).

Изучение накопления ПС и потребления углеводов в процессе роста *C. militaris* 11-5. Гриб выращивали в 5 л ферментере Minifors (“Infors HT”, Швейцария) с 3.5 л среды, содержащей 50.0 г/л сахарозы и 40 мл/л абиопептида. Концентрация других компонентов указана выше. Ферментер засеивали 5–7 сут культурой, выращенной глубинно в колбах (750 мл) с 200 мл вышеописанной среды на шейкере (200 об./мин) при 24°C . Посевная доза инокулята составила 10 об. % (сухая масса мицелия 1.4 г/л). Силиконовый пеногаситель Silicone anti-foam M-30 (“Serva”, США) вносили в концентрации 0.1%. При культивировании гриба температуру в ферментере поддерживали на уровне $24 \pm 1^\circ\text{C}$, а pH среды – 5.0 ± 0.2 периодическим внесением 5%-го раствора NaOH. Отбор проб проводили два раза в сутки. В пробах определяли концентрацию биомассы, углеводов и внеклеточных ПС, также проводили микроскопирование культуры и контроль на присутствие посторонней микрофлоры.

Определение биомассы. Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием через бумажный фильтр (Белая лента, РФ) и навеску биомассы высушивали до постоянного веса при температуре 105°C .

Определение углеводов. Углеводы в среде определяли спектрофотометрически антроновым методом при λ 625 нм (Рое, 1955). Расчет содержания углеводов проводили по калибровочной кривой, построенной по глюкозе.

Идентификация нуклеозидов. Внутриклеточные нуклеозиды выделяли из мицелия, высушенного до постоянного веса при температуре 60°C , трехкратной экстракцией метанолом. Внеклеточные нуклеозиды выделяли из фильтрата культуральной

жидкости трехкратной экстракцией хлороформом. Растворители удаляли в вакууме. Экстракты анализировали методом ТСХ на пластинках силикагеля 10×10 см (Silica gel 60 F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системе этилацетат–метанол–вода (100 : 15 : 10) (Thuy et al., 2023). Соединения обнаруживали по поглощению в УФ-свете при 254 нм. Нуклеозиды выделяли препаративной ТСХ на пластинках силикагеля (Silica gel F₂₅₄, “Merck”, Германия) в системе растворителей. Идентификацию выделенных соединений осуществляли на основе сравнения данных УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии с литературными источниками. Подробную информацию о структуре соединений получали при анализе МС/МС спектров при энергии коллизии 20–40 %. УФ-спектры соединений в метаноле получали на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Масс-спектры соединений регистрировали на квадрупольном масс-спектрометре LCQ Advantage MAX (“Thermo Finnigan”, Германия), используя одноканальный шприцевой насос для прямого ввода образца в камеру для химической ионизации при атмосферном давлении.

Количественное определение нуклеозидов. К навеске биомассы (200 мг) добавляли 4 мл 50% этанола и выдерживали при температуре 60°C в течение 1 ч. Экстракты в пяти повторностях наносили на пластину силикагеля в объеме 5 мкл и хроматографировали в системе растворителей. В качестве стандарта использовали кордицепин (“Sigma”, США), который наносили на пластины в аналогичном объеме в нескольких концентрациях. Анализ хроматограмм осуществляли с последующим их сканированием в денситометре (“SORBFIL”, РФ). Концентрацию нуклеозидов в полученных экстрактах определяли с помощью программы Sorbfil TLC View.

Количественное определение внеклеточных и внутриклеточных полисахаридов. К 5 мл фильтрата культуральной жидкости добавляли 30 мл 96% этанола и выдерживали 12–15 ч при 4°C . Полученный осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 6000 об./мин. Осадок суспендировали в 0.3 N NaOH и выдерживали на водяной бане в течение 30 мин при температуре 60°C (Li et al., 2021). Общее количество сахаров в препарате ПС определяли по методу с фенолсерной кислотой (Dubois et al., 1956). Для этого к 1 мл раствора добавляли 0.5 мл 5% фенола и 2.5 мл H_2SO_4 (конц.) и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 20 мин. Полученный раствор анализировали на спектрофотометре при 490 нм. Расчет вели, используя калибровочную кривую, построенную по раствору глюкозы в различных концентрациях.

Для определения внутриклеточных ПС к навеске биомассы (200 мг) добавляли 5 мл H_2O (дист.)

и выдерживали в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Раствор фильтровали через бумажный фильтр, осадок промывали. Фильтрат анализировали по методу, указанному выше.

Расчет основных характеристик роста и биосинтеза ПС (Перт, 1978):

Удельную скорость роста гриба (μ , ч⁻¹) рассчитывали по формуле: $\mu = ((\lg x - \lg x_0) / t) \times 2.3$;

Скорость потребления субстрата культурой (q_s , г/г·ч): $q_s = (s - s_0) / x \times t$;

Удельную скорость образования продукта культурой (q_p , г/г·ч): $q_p = (p - p_0) / x \times t$;

Экономический коэффициент (Y_s): $Y_s = x - x_0 / s - s_0$, где x_0 — концентрация биомассы в начальный момент времени; x — концентрация биомассы в конечный момент времени; s_0 — концентрация субстрата в начальный момент времени; s — концентрация субстрата в конечный момент времени; p_0 — концентрация продукта в начальный момент времени; p — концентрация продукта в конечный момент времени; t — время.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием стандартных методов, обеспеченных программой Microsoft Office Excel 2013. Анализы биомассы, ПС проводили не менее трех раз, нуклеозидов — не менее пяти раз. Их содержание представлено в виде

среднего арифметического значения $\pm$ стандартная ошибка. Доверительные интервалы не превышали $\pm 5\%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфология штаммов *C. militaris*. Исследуемые штаммы, выделенные из гусениц *Dendrolimus sibiricus* (рис. 1а), характеризовались схожими морфологическими признаками. На МЭА культуры грибов формировали округлые выпуклые колонии светло-сливочного цвета порошистой структуры за счет обильного спороношения; при старении культур иногда появлялся экссудат светло-желтого цвета; реверс бледно-желтый или светло-коричневый (рис. 1б).

На КСА колонии более приземистые, пушистые, слегка припорошенные, мицелий белого цвета (рис. 1в), но при старении культуры появляется слабый сливочный оттенок. Реверс окрашен в различные оттенки желтого (рис. 1г). У штамма 11-3 реверс бледно-желтый, у 11-4 светло-коричневый, у 11-5 — ярко-желтый. Оптимальная температура роста штаммов *C. militaris* составила 25°C; при 28°C рост отсутствовал. Наибольшую скорость роста отмечена у штамма 11-5 *C. militaris* (2.5 мм/сут);

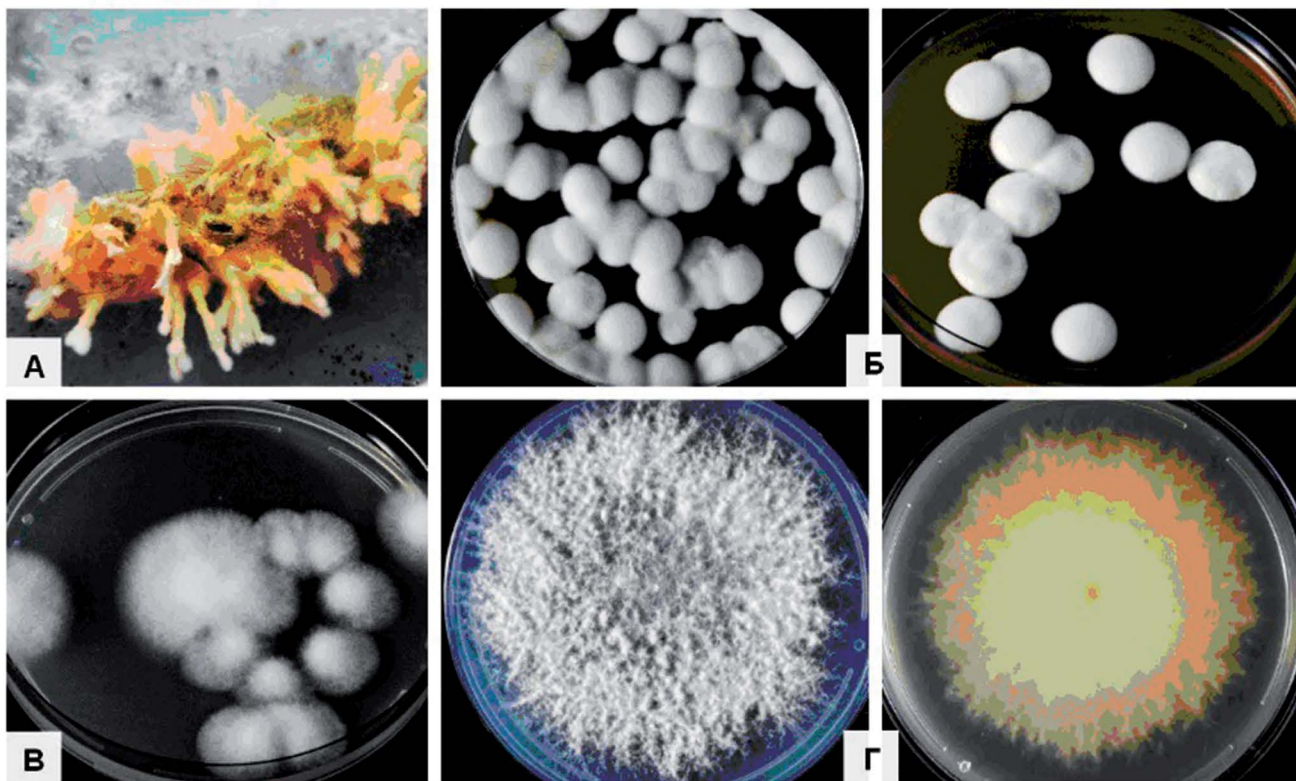


Рис. 1. Морфология колоний *C. militaris* 11-3: а — мицелий гриба на гусенице *Dendrolimus sibiricus*; б — колонии на МЭА; в — колонии на КСА (7 сут); г — колонии (слева) и реверс колонии (справа) при старении культуры на КСА (14 сут).

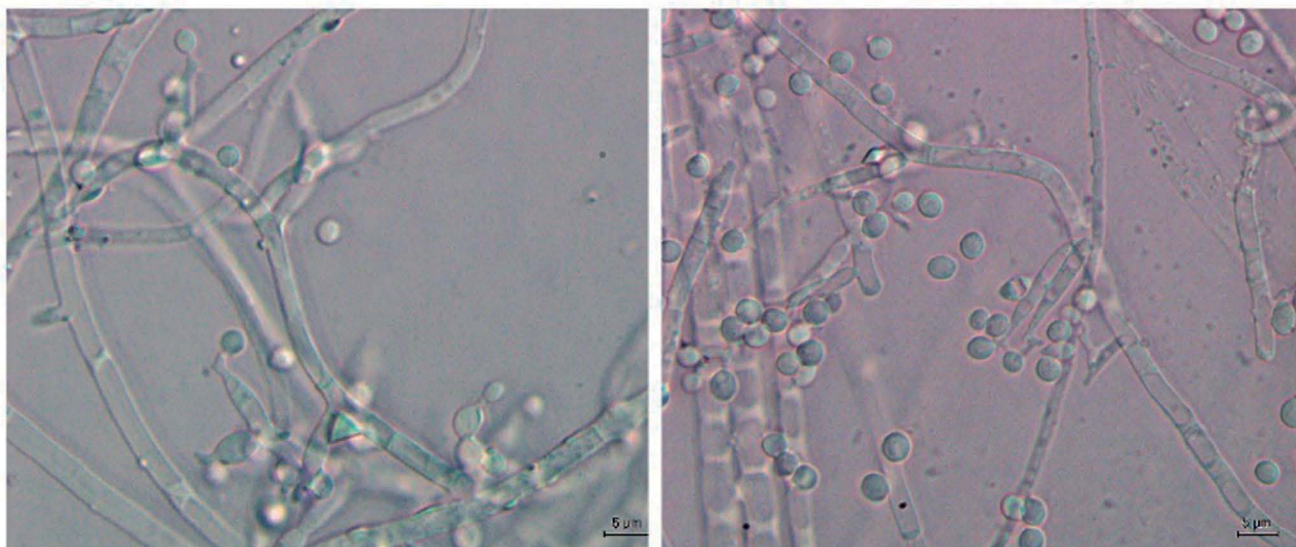


Рис. 2. Бесполое размножение штамма *C. militaris* 11-3 на среде SNA (7 сут).

скорость роста штаммов 11-3 и 11-4 была ниже на 30 и 12% соответственно.

Вегетативный мицелий анаморфной формы *C. militaris* представлен разветвленными, равномерно септированными гифами 1.5–3 мкм в диаметре, которые в отдельных случаях формировали мицелиальные тяжи. Фиалиды расположены одиночно или пучками на разном уровне, бутылковидной формы с утолщением у основания, размером 10–30 × 1.5–2.3 мкм. Верхняя конидия эллиптическая или коротко цилиндрическая размером 3.2–6.0 × 3.0 мкм, другие шаровидные диаметром 2.3–3.0 мкм (рис. 2).

По результатам молекулярно-генетических исследований с использованием праймеров ITS и TEF-1α штамм 11-3 был отнесен к виду *C. militaris* (рис. 3).

На филогенетическом дереве, построенном на основе метода максимального правдоподобия (ML) для штамма 11-3 и последовательностей *C. militaris* из NCBI GenBank с использованием праймеров TEF-1α, штамм попадает в обособленную кладу (рис. 3б). На основании сравнения макро- и микроморфологических признаков все исследуемые штаммы были отнесены к виду *C. militaris*.

Идентификация нуклеозидов. Анализ экстрактов из биомассы трех штаммов показал наличие метаболита 1 с R_f 0.55 и метаболита 2 с R_f 0.63, при этом стандарт кордицепина имел R_f 0.60 (рис. 4).

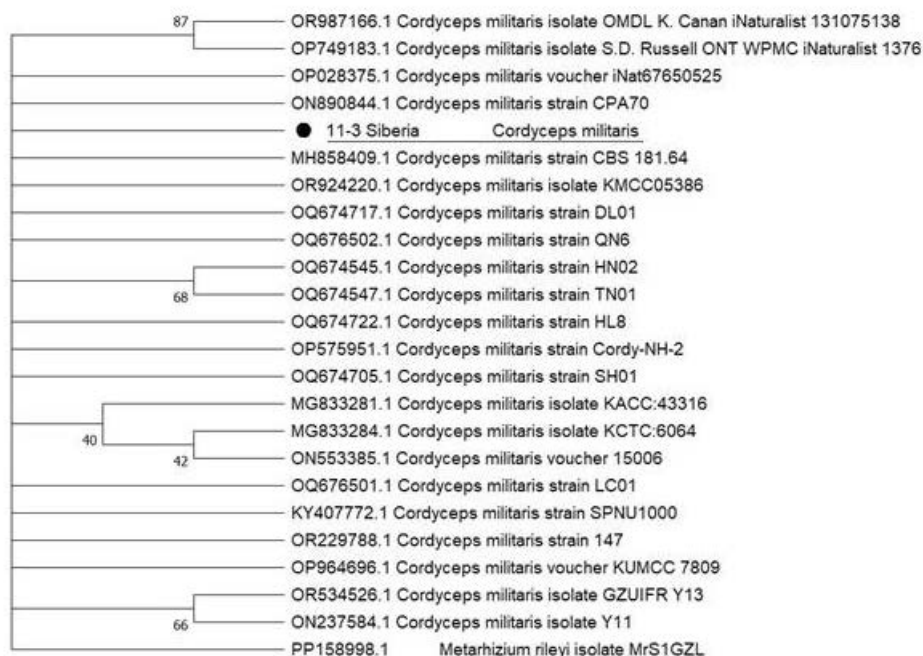
УФ-спектр метаболитов имел близкие значения максимальных полос поглощения: метаболит 1 при $\lambda_{\max}$ 211, 260 нм, метаболит 2 при $\lambda_{\max}$ 209, 261 нм, а стандарт кордицепина $\lambda_{\max}$ 211, 259 нм. Молекулярный ион метаболита 1 в положительных ионах имел массу 268 (M + H)⁺, при этом в МС/

МС спектре преобладал фрагментный ион с m/z 136, соответствующий катиону аденина. Молекулярный ион стандарта кордицепина показал массу 252 (M + H)⁺, а МС/МС содержал аналогичный фрагментный ион с m/z 136. На основании этих полученных данных метаболит 1 был идентифицирован как аденозин. Метаболит 2 имел положительный молекулярный ион 282 (M + H)⁺, который также содержал ион с m/z 136, что соответствовало по литературным данным кордизинину В (2-метиладенозин) (Yang et al., 2011).

Аденозин является основным нуклеозидом, накапливаемым *Cordyceps* spp. Он выполняет важную роль в биохимических процессах в организме, таких как передача энергии (АТФ и АДФ) и сигналов в клетках. В ответ на стресс или ранение аденозин проявляет в основном цитопротекторное действие, защищая ткани от повреждения в случаях гипоксии, ишемии или судорог (Kitakaze, Hori, 2000; Nakav et al., 2008). Аденозин опосредует свои эффекты через активацию рецепторов, связанных с G-белком, а именно A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃ (Gessi et al., 2014). В частности, в клетках кожи этот эндогенный нуклеозид, действуя на один или несколько рецепторов, может участвовать в защите и восстановлении поврежденной ткани. Кроме того, сообщается, что аденозин подавляет рост опухолевых клеток посредством активации различных внешних и внутренних сигнальных путей. В обоих путях аденозин активирует каспазы митохондриально-зависимым и/или независимым образом (Yang et al., 2007).

Кордизинин В впервые был выделен из мицелия *C. sinensis* (Yang et al., 2011). Как аденозин, так и кордизинин В показали индуцирующую CRE-опосредованную транскрипцию в клетках PC 12,

(a)



(б)

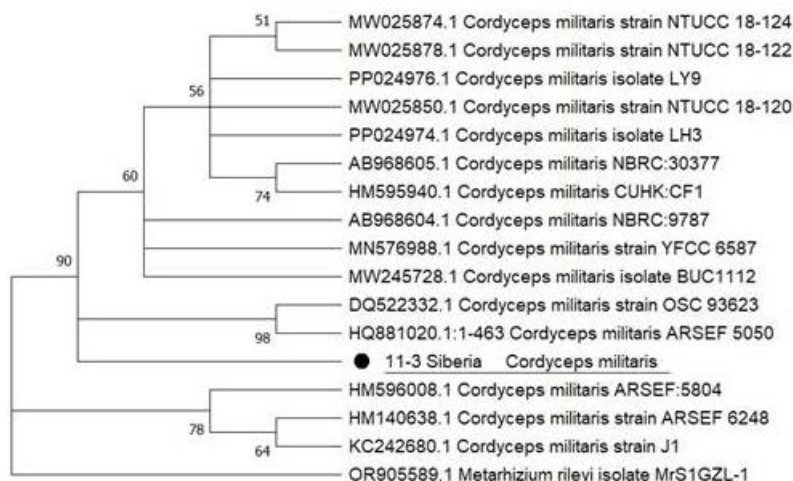


Рис. 3. Филогенетическое дерево на основе метода максимального правдоподобия (ML) для штамма 11-3 (Siberia) и последовательностей *C. militaris* из NCBI GenBank: а – с использованием праймеров ITS (бутстреп-значения более 40% указаны рядом с кластерами); б – с использованием праймеров TEF-1α (бутстреп-значения более 50% указаны рядом с кластерами). В качестве внешней группы использовали *Metarhizium rileyi*.

что важно в лечении нарушения памяти при болезни Альцгеймера (Ohizumi et al., 2021). Это действие, по крайней мере частично, является результатом активации аденозиновых рецепторов A_1 , A_{2A} и A_{2B} .

Известный для *C. militaris* кордицепин (3'-дезоксиаденозин) у изученных штаммов не был обнаружен. Кордицепин представляет собой соединение широкого спектра действия, обладающее

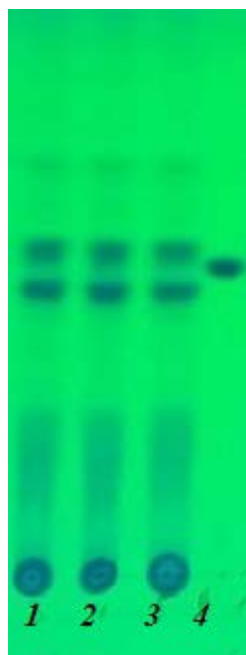


Рис. 4. Хроматограмма экстрактов под УФ-светом ($\lambda = 254$ нм) из биомассы штаммов *C. militaris*: 1 – 11-3; 2 – 11-4; 3 – 11-5; 4 – стандарт кордицепина.

противовоспалительной, болеутоляющей, противоопухолевой, антибактериальной, антивирусной и инсектицидной активностью (Liu et al., 2015). Известно, что биосинтез кордицепина начинается с аденозина и протекает последовательно путем фосфорилирования, дефосфорилирования и восстановления. В геноме продуцирующего кордицепин *C. militaris* было идентифицировано четыре гена кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*. По данным разных авторов содержание кордицепина в мицелии у штаммов *C. militaris* может колебаться от следовых количеств до 8570 мг/л, а в плодовых телах от 0.6 до 77.4 мг/г (Kontogiannatos et al., 2021). Такую изменчивость в продукции кордицепина объясняют штаммовыми различиями. Геном штаммов *C. militaris* оказывает влияние как на способность образовывать плодовые тела, так и на способность к биосинтезу кордицепина (Kontogiannatos et al., 2021). Отсутствие биосинтеза кордицепина у исследованных штаммов может быть связано с неактивным состоянием генов кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*.

Таким образом, изученные сибирские штаммы *C. militaris* являются продуцентами двух нуклеозидов – аденозина и кордизинина В. Следует отметить, что наличие у *C. militaris* кордизинина В, как одного из основных метаболитов, обнаружено впервые.

Влияние способа культивирования и различных источников углерода и азота на образование БАС штаммами *C. militaris*. В табл. 1 приведены

показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов при глубинном и поверхностном культивировании сибирских штаммов *C. militaris* в средах с глюкозой или сахарозой.

Можно видеть, что урожай биомассы на сахарозе был выше по сравнению с глюкозой, независимо от способа выращивания штаммов. Нуклеозиды (аденозин и кордизинин В) были идентифицированы только в мицелии. Их содержание было выше при росте на сахарозе по сравнению с глюкозой и в зависимости от штамма и способа выращивания колебалось от 60 до 399 мг/л. Во всех пробах соотношение аденозина к кордизинину В было примерно одинаково.

ПС образовывались как в среде культивирования штаммов, так и в мицелии. На продукцию ПС большее влияние оказывал способ выращивания грибов, чем углеродный субстрат. При глубинном культивировании штаммов 11-3, 11-4 и 11-5 накопление суммарных ПС было в 1.4, 1.7 и 2.5 раза выше по сравнению с поверхностным. При этом доля внеклеточных ПС при глубинном культивировании, независимо от природы углевода, составляла 85–90%, а при поверхностном была ниже – 46–67% от суммы ПС.

Источник углерода является одним из наиболее важных питательных веществ для биосинтеза ПС. Отходы сельского хозяйства, такие как рисовые отруби, барда, картофельная декстроза и другие побочные продукты могут применяться в качестве источника углерода для ферментации *Cordyceps* (Chen et al., 2016). Ферменты гриба модифицируют сложные углеводы до моносахаридных остатков, которые используются в биосинтезе полисахаридов. Глюкоза и сахароза являются самыми распространенными и благоприятными источниками углерода для роста биомассы и производства ПС в большинстве микробных ферментаций (Mao et al., 2005; Radchenkova et al., 2011; Wu et al., 2014). Максимальное значение концентрации ПС 5.7 г/л было получено при культивировании штамма *C. militaris* в среде, содержащей 40 г/л глюкозы и 10 г/л дрожжевого экстракта (Wang et al., 2019). Сравнение полученных нами данных с литературными показало, что изученные штаммы являются высокоактивными продуцентами ПС. Их суммарное содержание у штамма 11-5 при глубинном культивировании на сахарозе достигало 6.0–6.7 г/л по сравнению с известными у *C. militaris* – от 0.4 до 5.7 г/л (Yang et al., 2020).

Большое количество исследований для увеличения продукции ПС грибами *C. militaris* посвящено источникам азота и соотношению С : N в среде культивирования (Yang et al., 2020). При выращивании *C. militaris* обычно используют как органические (пептоны, гидролизаты казеина, дрожжевой экстракт и др.), так и неорганические

Таблица 1. Показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов при глубинном и поверхностном выращивании штаммов *C. militaris* с разными углеводами

Показатели	Углевод	Культивирование штаммов					
		11-3		11-4		11-5	
		Глубинное	Поверх- ностное	Глубинное	Поверх- ностное	Глубинное	Поверх- ностное
Биомасса, г/л	Глюкоза	27.2 ± 1.5	13.9 ± 1.2	20.1 ± 1.3	29.5 ± 1.8	20.3 ± 1.4	20.7 ± 1.5
	Сахароза	28.1 ± 1.2	13.3 ± 0.9	23.1 ± 1.4	31.2 ± 1.5	27.5 ± 1.3	24.6 ± 1.4
Внеклеточные ПС, г/л	Глюкоза	4.8 ± 0.4	2.8 ± 0.3	3.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	4.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1
	Сахароза	4.2 ± 0.8	2.8 ± 0.3	4.8 ± 0.7	1.8 ± 0.3	5.1 ± 1.2	1.1 ± 0.3
Внутриклеточные ПС, г/л	Глюкоза	0.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3
	Сахароза	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.2
Сумма полисахаридов, г/л	Глюкоза	5.7	4.2	4.2	2.5	5.4	2.3
	Сахароза	5.0	3.8	5.2	3.0	6.0	2.4
Аденозин, мг/л	Глюкоза	122 ± 12	35 ± 4	141 ± 11	162 ± 15	100 ± 16	101 ± 14
	Сахароза	171 ± 13	33 ± 6	141 ± 17	209 ± 23	118 ± 15	165 ± 34
Кордизинин В, мг/л	Глюкоза	101 ± 9	29 ± 2	90 ± 10	180 ± 21	63 ± 12	122 ± 19
	Сахароза	138 ± 21	27 ± 2	60 ± 12	190 ± 15	83 ± 12	145 ± 23
Сумма нуклеозидов, мг/л	Глюкоза	223	64	231	342	163	223
	Сахароза	309	60	201	399	201	310

источники азота (аммоний и нитрат). Влияние пяти источников азота на рост и биосинтез БАС изучали при глубинном культивировании штамма *C. militaris* 11-5 в среде с глюкозой. В исходных средах отношение C: N ~ 20: 1.

Из результатов табл. 2 можно видеть, что при использовании нитрата, гидролизата казеина, триптона и абиопептида урожай биомассы был в 1.3, 1.3, 1.3, 1.6 и 2 раза ниже, соответственно, по сравнению с глутаматом. Но глутамат, нитрат, гидролизат казеина не способствовали биосинтезу ПС культурой. Суммарное количество ПС на триптоне и абиопептиде было в 2–3 раза выше по сравнению с другими источниками азота. Содержание нуклеозидов было примерно в 2 раза выше в среде

с абиопептидом по сравнению с другими источниками азота. При использовании абиопептида культурой аденозин преобладал и составил 73% от суммы нуклеозидов. Таким образом, в нашем исследовании наибольшая продукция ПС и нуклеозидов штаммом *C. militaris* 11-5 наблюдалось при использовании абиопептида.

Динамика роста и накопления полисахаридов *C. militaris* 11-5. С целью выяснения особенностей роста и биосинтеза ПС было проведено культивирование штамма *C. militaris* 11-5 ферментере. Гриб выращивали в среде, содержащей сахарозу и абиопептид, в условиях лимита по кислороду: значения рО₂ находились около 1% от насыщения воздухом. Это было достигнуто небольшой

Таблица 2. Влияние источников азота на показатели роста, биосинтеза ПС и нуклеозидов *C. militaris* 11-5

Показатели	Источник азота				
	Глутамат	Нитрат натрия	Гидролизат казеина	Триптон	Абиопептид
Биомасса, г/л	33.2 ± 1.9	25.4 ± 1.4	24.8 ± 1.7	20.3 ± 1.7	17.0 ± 0.8
Внеклеточные ПС, г/л	2.5 ± 0.4	1.7 ± 0.3	2.5 ± 0.2	5.1 ± 0.5	6.0 ± 0.6
Внутриклеточные ПС, г/л	1.1 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1
Сумма ПС, г/л	3.6	2.0	2.9	6.0	6.7
Аденозин, мг/л	136 ± 21	144 ± 28	94 ± 17	100 ± 22	264 ± 23
Кордизинин В, мг/л	96 ± 13	118 ± 17	74 ± 12	122 ± 17	126 ± 19
Сумма нуклеозидов, мг/л	232	262	168	222	390

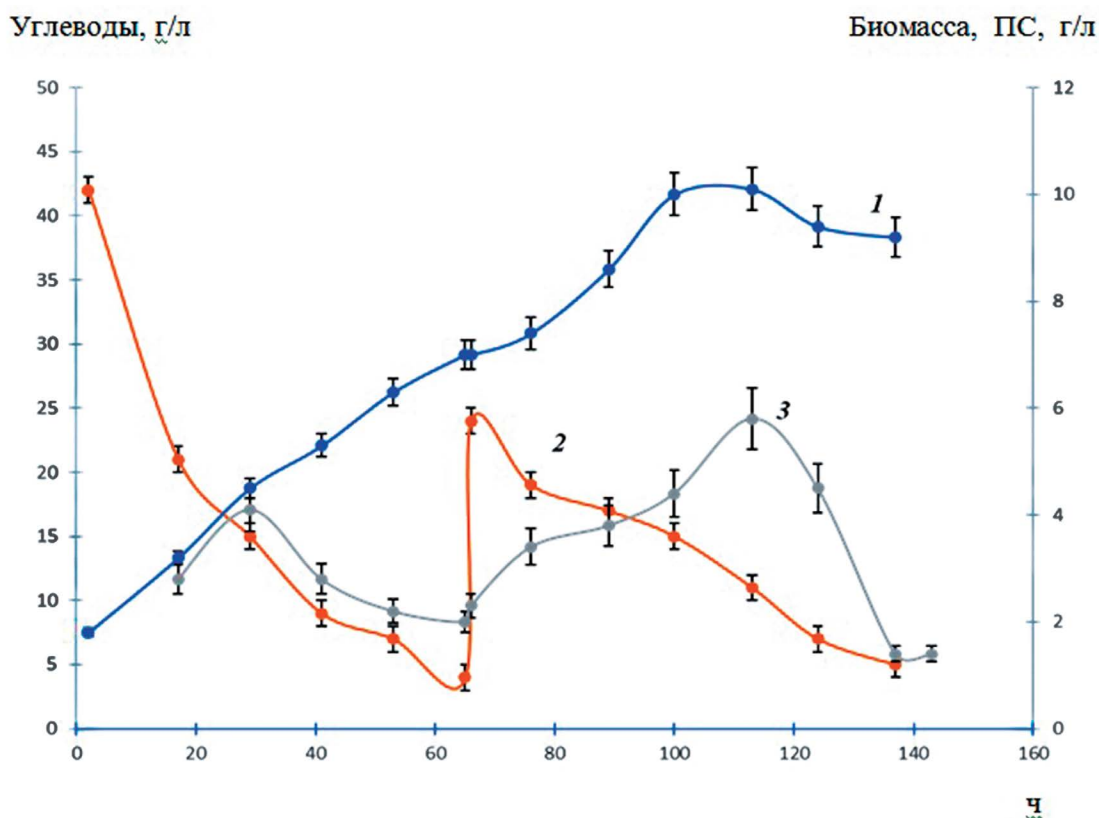


Рис. 5. Динамика роста, синтеза ПС и потребления углеводов *C. militaris* 11-5: 1 — биомасса, г/л; 2 — углеводы, г/л; 3 — ПС, г/л.

скоростью подачи воздуха (до 2 л/мин) и скоростью вращения мешалки до 400 об./мин. В процессе культивирования гриба, помимо глубинного роста, также наблюдался пристеночный (поверхностный) рост мицелия выше уровня среды. Культуральная суспензия была гомогенной и имела бледно желто-коричневый цвет. Вегетативный мицелий был представлен разветвленными равномерно септированными гифами до 3 мкм в диаметре, которые в отдельных случаях формировали мицелиальные тяжи. С 5 сут роста наблюдалось формирование фиалид и образование конидий. Далее происходило массовое прорастание этих конидий и дальнейший рост гиф.

На рис. 5 представлена динамика роста гриба, изменения концентрации углеводов и ПС в среде культивирования.

Можно видеть, что активный рост мицелия и потребление углеводов наблюдались до 41 ч. Затем происходило снижение этих показателей, что связано с уменьшением концентрации углеводов в среде до 4 г/л. При внесении сахарозы до 24 г/л на 65 ч культивирования активный рост и потребление субстрата грибом восстановилось. Таким образом, показано, что биосинтез внеклеточных ПС культурой зависел

от концентрации углеродного субстрата в среде. Биосинтез ПС наблюдался при концентрации углевода не ниже 10 г/л, а при дальнейшем снижении концентрации субстрата происходило потребление ПС культурой. Выход полисахаридов от потребленного субстрата ($Y_{\text{ПС/с}}$) составил 0.12. Максимальные удельные скорости роста (μ), потребления сахарозы ($q_{\text{сах}}$) и биосинтеза ПС ($q_{\text{ПС}}$) наблюдались в первые сутки роста и составили 0.038 ч^{-1} , $0.44 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$, $0.28 \text{ г/г}\cdot\text{ч}$ соответственно. Таким образом, в процессе культивирования гриба наблюдался двухфазный характер образования ПС, связанный с повторным внесением углевода в среду. Снижение концентрации ПС связано с низким уровнем углеводов в среде. По-видимому, ПС можно рассматривать как запасные источники углерода, которые начинают потребляться культурой при низких значениях концентрации углеродного субстрата в среде.

Таким образом, наше исследование показало, что сибирские штаммы *C. militaris*, выделенные в Красноярском крае из погибших гусениц сибирского шелкопряда *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, отличаются от известных штаммов этого вида отсутствием биосинтеза кордицепина. Это может быть связано с неактивным

состоянием генов кордицепинсинтетазы *cns1-cns4*. Сибирские штаммы являются высокоактивными продуцентами биологически активных соединений, таких как полисахариды, аденозин и кордизинин В. Кордизинин В у вида *C. militaris* обнаружен впервые. Суммарное содержание полисахаридов при глубинном культивировании *C. militaris* 11-5 на сахарозе достигало 6.0–6.7 г/л, что сопоставимо с литературными данными. Следовательно, исследованные штаммы представляют интерес для биотехнологии. Полисахариды можно рассматривать как запасные источники углерода, которые начинают потребляться культурой, при недостаточной концентрации углеродного субстрата в среде. Исследование моносакхаридного состава полисахаридов еще предстоит изучить.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, где в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование проводилось в рамках Государственного задания и частично поддержано грантом РНФ № 23-26-00052 (<https://rscf.ru/project/23-26-00052>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евлахова А.А. Энтомопатогенные грибы. Л.: Наука, 1974. 260 с.
- Огарков Б.Н., Огарков О.Б., Огаркова Г.Р., Самусенок Л.В. Грибы рода *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains из экосистем Южного Байкала как продуценты высоких концентраций иммунномодулятора кордицепина // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2012. Т. 5. № 2. С. 75–80.
- Перт С.Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. 331 с.
- Ashraf S.A., Elkhailifa A.E.O., Siddiqui A.J., Patel M., Awadelkareem A.M., Snoussi, M., Ashraf M.S., Adnan M., Hadi S. Cordycepin for health and wellbeing: a potent bioactive metabolite of an entomopathogenic medicinal fungus *Cordyceps* with its nutraceutical and therapeutic potential // *Molecules*. 2020. V. 25. Art. 2735.
- Chen X., Wu J.Y., Gui X.T. Production and characterization of exopolysaccharides in mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1 with different carbon sources // *Chin. J. Chem. Eng.* 2016. V. 24. P. 158–162.
- Chen X., Zhang Y., Ma W., Zhu Y., Wu X., Wang Zh. Effects of *Cordyceps militaris* polysaccharide on egg production, egg quality and caecal microbiota of layer hens // *J. World Poult. Res.* 2020. V. 10. P. 41–51.
- Cui J.D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015. V. 35. P. 475–484.
- Das G., Shin H.S., Leyva-Gómez G., Prado-Audelo M.L.D., Cortes H., Singh Y.D., Panda M.K., Mishra A.P., Nigam M., Saklani S., Chaturi P.K., Martorell M., Cruz-Martins N., Sharma V., Garg N., Sharma R., Patra J.K. *Cordyceps* spp.: a review on its immune-stimulatory and other biological potentials // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 8. Art. 602364.
- Gessi S., Merighi S., Borea P.A. Targeting adenosine receptors to prevent inflammatory skin diseases // *Experim. Dermatol.* 2014. V. 23. P. 553–554.
- Jędrejko K.J., Lazur J., Muszyńska B. *Cordyceps militaris*: an overview of its chemical constituents in relation to biological activity // *Foods*. 2021. V. 10. Art. 2634.
- Jędrejko K., Kała K., Sułkowska-Ziaja K., Krakowska A., Zięba P., Marzec K., Szewczyk A., Sękara A., Pytko-Polończyk J., Muszyńska B. *Cordyceps militaris* – fruiting bodies, mycelium, and supplements: valuable component of daily diet // *Antioxidants (Basel)*. 2022. V. 11. Art. 1861.
- Jiapeng T., Yiting L., Li Z. Optimization of fermentation conditions and purification of cordycepin from *Cordyceps militaris* // *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014. V. 44. P. 90–106.
- Kang C., Wen T.C., Kang J.C., Meng Z.B., Li G.R., Hyde K.D. Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture // *Sci. World J.* 2014. V. 2014. Art. 510627.
- Kim S.W., Hwang H.J., Xu C.P., Na Y.S., Song S.K., Yun J.W. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii* // *Lett. Appl. Microbiol.* 2002. V. 34. P. 389–393.
- Kitakaze M., Hori M. Adenosine therapy: a new approach to chronic heart failure // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2000. V. 9. P. 2519–2535.
- Kontogiannatos D., Koutrotsios G., Xekalaki S., Zervakis G.I. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* – a review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus // *J. Fungi (Basel)*. 2021. V. 7. Art. 986.

- Kryukov V.Yu., Tomilova O.G., Yaroslavl'tseva O.N., Wen T.C., Kryukova N.A., Polenogova O.V., Tokarev Y.S., Glupov V.V. Temperature adaptations of *Cordyceps militaris*, impact of host thermal biology and immunity on mycosis development // Fungal Ecol. 2018. V. 35. P. 98–107.
- Liu Y., Wang J., Wang W., Zhang H., Zhang X., Han C. The chemical constituents and pharmacological actions of *Cordyceps sinensis* // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015. V. 2015. Art. 575063.
- Mao X.B., Eksriwong T., Chauvatcharin S., Zhong J.J. Optimization of carbon source and carbon/nitrogen ratio for cordycepin production by submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* // Process Biochem. 2005. V. 40. P. 1667–1672.
- Miao M., Yu W.Q., Li Y., Sun Y.L., Guo S.D. Structural elucidation and activities of *Cordyceps militaris* – derived polysaccharides: a review // Front. Nutrit. 2022. V. 9. Art. 898674.
- Nakav S., Chaimovitz C., Sufaro Y., Lewis E.C., Shaked G., Czeiger D., Zlotnik M., Douvdevani A. Anti-inflammatory preconditioning by agonists of adenosine A1 receptor // PLoS One. 2008. V. 3. Art. e2107.
- Nirenberg H.I. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium* // Stud. Mycol. 1990. V. 32. P. 91–101.
- Ohizumi Y., Kawada M., Kamada M., Nakajima A., Kajima K., Uozumi N., Hara Y., Guo Y., Ishibashi M. Isolation of adenosine and cordysinin B from *Anredera cordifolia* that stimulates CRE-mediated transcription in PC12 cells // Planta Med. Int. Open. 2021. V. 8. P. e19–e24.
- Olatunji O.J., Tang J., Tola A., Auberon F., Oluwaniyi O., Ouyang Z. The genus *Cordyceps*: an extensive review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology // Fitoterapia. 2018. V. 129. P. 293–316.
- Qu S.L., Li S.S., Li D., Zhao P.J. Metabolites and their bioactivities from the genus *Cordyceps* // Microorganisms. 2022. V. 10. Art. 1489.
- Radchenkova N., Tomova A., Kambourova M.. Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438 // Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2011. V. 25. P. 77–79.
- Roe J.H. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent // J. Biolog. Chem. 1955. V. 212. P. 335–343.
- Shih I.L., Tsai K-L., Hsieh Ch., Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris* // Biochem. Engineer. J. 2007. V. 33. P. 193–201.
- Thuy D.T.P., Anh T.T.N., Thuy N.T.T., Intaparn P., Tapingkae T., Mai N.T. Simple and efficient method for the detection and quantification of cordycepin content in *Cordyceps* // Chiang Mai J. Sci. 2021. V. 48. P. 420–428.
- Wang C.C., Wu J.Y., Chang C.Y., Yu S.T., Liu Y.C. Enhanced exopolysaccharide production by *Cordyceps militaris* using repeated batch cultivation // J. Biosci. Bioeng. 2019. V. 127. P. 499–505.
- Wu J.Y., Leung P.H., Wang W.Q., Xu C.P. Mycelial fermentation characteristics and anti-fatigue activities of a Chinese caterpillar fungus, *Ophiocordyceps sinensis* strain Cs-HK1 (Ascomycetes) // Int. J. Med. Mushrooms. 2014. V. 16. P. 105–114.
- Yang D., Yaguchi T., Yamamoto H., Nishizaki T. Intracellularly transported adenosine induces apoptosis in HuH-7 human hepatoma cells by downregulating c-FLIP expression causing caspase-3/-8 activation // Biochem. Pharmacol. 2007. V. 73. P. 1665–1675.
- Yang Sh., Yang X., Zhang H. Extracellular polysaccharide biosynthesis in *Cordyceps* // Crit. Rev. Microbiol. 2020. V. 46. P. 359–380.
- Yang M.L., Kuo P.C., Hwang T.L., Wu T.S. Anti-inflammatory principles from *Cordyceps sinensis* // J. Nat. Prod. 2011. V. 74. P. 1996–2000.
- Zhang J., Wen Ch., Duan Y., Zhang H., Ma H. Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) Link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review // Int.J. Biol. Macromol. 2019. V. 132. P. 906–914.

EXPERIMENTAL ARTICLES

Formation of Biologically Active Compounds by Siberian *Cordyceps militaris* (L.) Fr. Strains

T. V. Antipova^{1, 2, *}, V. P. Zhelifonova¹, B. P. Baskunov¹,
Y. A. Litovka^{3, 4}, M. M. Patrusheva^{3, 4}, V. B. Keshelava⁵, E. S. Mikhaylov^{6, 7},
I. N. Chistiakov⁸, I. N. Pavlov^{3, 4}

¹G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms,
FRC Pushchino Centre for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

²All-Russian Institute of Plant Protection, Pushkin, 196608, Saint-Petersburg, Russia

³V.N. Sukachev Institute of Forest, FRC KSC, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
Krasnoyarsk, 660036, Russia

⁴Reshetnev Siberian State University of Science and Technology, Krasnoyarsk, 660037, Russia

⁵Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290, Russia

⁶Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, 142290, Russia

⁷Fundamental Biotechnology Department, RosBioTech University at Pushchino, Pushchino, 142290, Russia

⁸OOO "Pushchino Biotechnologies", Pushchino, 142290, Russia

*e-mail: tatantip@rambler.ru

Fungal strains isolated in the Krasnoyarsk Territory from dead caterpillars of the Siberian silkworm *Dendrolimus sibiricus* Tschetverikov, found in the litter and crown of *Abies sibirica* Ledeb., based on morphological and genetic methods, were assigned to the species *Cordyceps militaris* (L.) Fr. The strains are highly active producers of bioactive compounds such as polysaccharides (PS), adenosine and cordysin B. Cordysin B was first discovered in the species *C. militaris*. It was found that the production of PS was more influenced by the method of growing mushrooms than by the carbon substrate. The highest production of PS (6.0–6.7 g/l) and nucleosides (390 mg/l) of *C. militaris* 11-5 was observed during submerged cultivation on sucrose using aminopeptide. When studying the biosynthesis of PS during the growth of the fungus, it was found that the synthesized PS are consumed by the culture when the concentration of the carbon substrate in the environment decreases and, apparently, serve as reserve sources of carbon.

Keywords: cordyceps, nucleosides, adenosine, cordysin B, polysaccharides, fermentation