

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИЦЕЛИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *GANODERMA LUCIDUM*

Бабицкая В.Г.¹, Щерба В.В.¹, Смирнов Д.А.¹,

Бисько Н.А.², Филимонова Т.В.¹, Поединок Н.Л.²

¹ Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь, Минск

² Институт ботаники НАН Украины, Украина, Киев

Для исследований было взято два штамма. Штаммы выделены из плодовых тел гриба, собранных в различных областях Беларуси. Отличаются от контрольного (КНДР) сильной пигментацией мицелия. При глубинном культивировании на глюкозо-пептонной среде и пивным сусле выход биомассы у этих штаммов достигал 10-12 г/л. Эндополисахариды составляли 7,5-9,0%, экзополисахариды – 6,5-7,0 г/л. Сравнительный анализ показал, что местные штаммы близки зарубежным аналогам по содержанию белка, липидов, эндополисахаридов, превосходят их по ферментативной (лигнолитической) активности и синтезу экзополисахаридов.

Белорусские штаммы *G. lucidum* также как и контрольный вариант (штамм №362) секретируют полисахариды, которые слабо растворяются в воде без нагревания. Это особенно касается экзополисахаридов. Так, экзополисахариды обоих штаммов лишь частично растворялись в воде при нагревании, значительно лучше – в щелочах, особенно в 10 % NaOH.

Эндополисахариды, в отличие от экзополисахаридов, при нагревании полностью растворялись в воде и в щелочах, слабых растворах неорганических и органических кислот.

Важной характеристической особенностью полисахаридов является вязкость. Кинематическая вязкость 0,1% растворов эндополисахаридов обоих штаммов незначительно превосходила вязкость воды (0,89 мм²/с) и составляла 0,92 и 0,94 мм²/с. В то же время показатель вязкости водо- и щелочерастворимых экзополисахаридов превосходил таковой воды: 1,90 и 1,95 мм²/с – водорастворимая и 2,10 и 2,25 мм²/с – щелочерастворимые фракции.

Водные растворы углеводов, как правило, оптически активны и способны вращать плоскость поляризации света. Удельное вращение плоскости поляризации 0,1% водным раствором эндополисахаридов составило $[\alpha]_{D^{20}} + 15,5^{\circ}$ (штамм 8) и $+ 20,0^{\circ}$ (штамм 10). Для водо- и щелочерастворимых фракций экзополисахаридов этот показатель равнялся $[\alpha]_{D^{20}} - 30^{\circ}$ и $- 35^{\circ}$ (штаммы 8 и 10) и $[\alpha]_{D^{20}} + 20,2^{\circ}$ и $25,0^{\circ}$.

По данным литературы многие иммуностимулирующие и противоопухолевые полисахариды, получаемые из плодовых тел и мицелия грибов, содержат в своем составе белок (до 10 – 50% по сухому весу). Методом Бредфорда установлено присутствие белка (пептидных остатков) во

фракциях эндополисахаридов в количестве 2,5 и 3,0% (штаммы 8 и 10), водорастворимых экзополисахаридов – 3,9 и 4,2% и щелочерастворимых полисахаридов – 2,0 и 2,5%. В аналогичных фракциях контрольного штамма (№362) содержание белка составляло 1,5% (внутриклеточные полисахариды) и 3,9 и 1,2% (внеклеточные полисахариды). Анализ аминокислотного состава гидролизатов экзо- и эндополисахаридов гриба двух штаммов показал наличие в них 17 аминокислот.

В результате деления растворов экзо- и эндополисахаридов на колонке с ДЭАЕ целлюлозой были получены следующие фракции:

- Водная фракция эндополисахаридов – эндополисахариды, элюируемые с носителя дистиллированной водой.
- Солевая фракция эндополисахаридов – эндополисахариды, элюируемые с носителя 1М NaCl.
- Водная фракция экзополисахаридов – экзополисахариды, элюируемые с носителя дистиллированной водой.
- Солевая фракция экзополисахаридов – экзополисахариды, элюируемые с носителя 1М NaCl.

Во всех случаях преобладала количественно водная фракция.

Гель-хроматография эндополисахарида *G. lucidum* штамм 8 на Toyopearl HW-75 позволила установить, что его молекулярный вес находится в области 2 000 кДа. При нанесении фракции водорастворимых экзополисахаридов был получен один пик вне области деления колонки. Вероятно, молекулярный вес гликана был менее 70 кДа. В результате гель-фильтрации фракции щелочерастворимых экзополисахаридов *G. lucidum* было получено два пика: минорная фракция с молекулярным весом менее 70 кДа и преобладающая фракция с молекулярным весом порядка 2 000 кДа. Близкие молекулярные массы имели полисахариды другого штамма – *G. lucidum* 10: молекулярная масса эндополисахаридов находилась в пределах 1800 кДа, экзополисахаридов – 50 и 1500 кДа. Сравнительный анализ молекулярных масс полисахаридов местных штаммов с таковыми контрольного (№ 362) не показал значительных различий. Изучение мономерного состава эндо- и экзополисахаридов местных штаммов *G. lucidum* показало, что они являются гетерогликанами. Определение конфигурации мономеров, входящих в состав полисахаридов гриба, выявило, что все сахара (как у местных штаммов, так и у контрольного) относятся к D-ряду.

В гидролизатах обеих фракций эндополисахаридов преобладала D-глюкоза (более 90%). Преобладающим мономером в экзополисахаридах также оказалась глюкоза. Значимых различий в мономерном составе водной и щелочной фракций не обнаружено. Местные штаммы по мономерному составу полисахаридов близки к контрольному варианту.

ИК-спектры фракций экзо- и эндополисахаридов *G. lucidum* обнаружили большое сходство между собой и характеризовались интенсивными полосами поглощения в области 1100-1000 см⁻¹, характерными для класса углеводов в целом. В спектрах поглощения полисахаридов явно наблюда-

ется асимметрия пика в области 3050-3200 см^{-1} (NH-водородносвязанный) и наличие пиков в областях 1650 (амид I) и 1550 (амид II), что является подтверждением того, что полисахариды исследуемых грибов содержат белковую часть.

В спектрах водо- и щелочерастворимых фракций экзополисахаридов отмечены полосы 890 и 1370 см^{-1} , указывающие на наличие α -гликозидных связей. Одновременно есть полосы поглощения при 920, 840 и 760 см^{-1} , характерные для α -аномера. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, которые также зафиксировали наличие в водорастворимой фракции экзополисахаридов *G. lucidum* как β - так и α -гликозидных связей. Как и в случае экзополисахаридов, в обеих фракциях эндополисахаридов присутствуют пики, соответствующие как β -, так и α -типам гликозидной связи. Для всех фракций экзо- и эндополисахаридов *G. lucidum* β -связь выражена ярче.

Для определения положения гидроксильных, соединяющих моносахаридные звенья в молекуле полисахарида, широко применяется деградация по Смитсу. При периодатном окислении и боргидридном восстановлении всех фракций полисахаридов происходило потребление периодата натрия и образовывалась муравьиная кислота. Продуктами мягкого гидролиза восстановленных полисахаридов являлись глицерин и эритрит. Образование глицерина наряду с муравьиной кислотой говорит о присутствии (C1→C6) связей, эритрит указывает на присутствие (C1→C4) связей. Наличие негидролизованного остатка указывает на присутствие (C1→C3) связанных моноз, поскольку последние не имеют углеродных атомов, несущих α -диольные группы и не окисляются периодатом. Жесткий гидролиз остатка обнаружил неокисленные метапериодатом натрия молекулы гексоз, что подтверждает наличие (C1→C3) связей в углеводной цепи полимера. Таким образом, все фракции полисахаридов гриба *G. lucidum* шт. №8 и 10 являются разветвленными структурами. Поскольку не окисляемый периодатом остаток полисахарида преобладает во всех фракциях, можно предположить, что основные цепи гликанов как эндо-, так и экзополисахаридов образованы C1→C3 связанными остатками гексоз. В боковых цепях полисахаридов присутствуют C1→C4 и C1→C6 гликозидные связи между мономерами. Внутриклеточные полисахариды содержат преимущественно C1→C4 связи в боковых цепях молекул гликанов в отличие от внеклеточных, где соотношение C1→C4 и C1→C6 связей приблизительно равно.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ-ГФФИУ (проект №Б05К-016).