

УДК 547.458.7:582.284

РАЗДЕЛЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И МЕЛАНИНА ИЗ ЭКСТРАКТА ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ ТРУТОВИКОВ

© 2025 г. С. Б. Хайтметова^{1,*}, Г. А. Халилова¹, А. С. Тураев¹, С. Р. Маккамбоева¹

¹Институт биоорганической химии им. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, 100125 Узбекистан

*e-mail: xsb75@mail.ru

Поступила в редакцию 05.07.2024 г.

После доработки 03.03.2025 г.

Принята к публикации 03.03.2025 г.

Из базидиального гриба *Ganoderma lucidum* (класс *Basidiomycetes*) выделены водорастворимые и щелочнорастворимые полисахариды. Установлено, что полученные водные и щелочные фракции в основном состоят из глюкановых полисахаридов и меланинов и представлены меланин-глюкановым комплексом. Разработаны методы разделения и очистки меланин-глюканового комплекса до отдельных фракций меланинов и бета-глюканов. Изучены физико-химические свойства полученных образцов методом УФ-спектроскопии, установлена степень чистоты полученных фракций меланина и полисахаридов. На основе полученных результатов показано, что меланин в составе полисахаридной фракции составлял $\leq 10\%$. Методами газовой хроматографии, ИК-спектроскопии установлены состав и молекулярная структура полученных образцов меланина и полисахаридов. В состав полисахаридных фракций входили в основном остатки глюкозы (88–90.6%), в качестве минорных моносахаридов до 20.5% остатки фруктозы, ксилозы и маннозы. Результаты исследования показали, что средняя молекулярная масса полученных полисахаридов и меланина от 10300 до 17700 Да, молекулярное массовое распределение полисахаридов полученных из водной и щелочной фракции 1.2, а меланина водной фракции 1.1, щелочной фракции 1.8.

Ключевые слова: экстракт, водорастворимые полисахариды, меланин, базидиальные грибы, *Ganoderma lucidum*

DOI: 10.7868/S3037577X25040072

Высшие базидиальные грибы могут служить богатым источником противоопухолевых и иммуномодулирующих полисахаридов [1–3]. Клеточная стенка грибов содержит биологически активные полисахариды – β -глюканы [4], гетерогенные полисахариды, состоящей из единиц D-глюкозы, связанных β -1,3 или β -1,4 гликозидными связями [5–7]. Авторы З. Лин и С. Хуе [8, 9], которые описали трутовик *Ganoderma lucidum*, популярный в восточной медицине. С древних времен в Китае, Корее и Японии, а этот трутовик наделяют чудодейственными свойствами и применяют для лечения множества разнообразных заболеваний.

Противоопухолевое действие экстрактов из *G. lucidum* связывают с двумя группами соединений – тритерпеноидами и полисахаридами [8–10].

В литературе, посвященной *G. Lucidum*, описаны полисахариды: линейные α -глюканы [11, 12], разветвленные β -глюканы [13–15] и многочисленные более сложные полисахариды, такие как арабиноксилотриглюкан [16], глюкуроноглюкан [17], разветвленные гетерополисахариды с главной цепью из связанных (1→4) связью остатков D-маннозы [18], или D-галактозы [19], а также гликопротеины, характерным компонентом разветвленных углеводных цепей которых являются концевые не восстанавливающие остатки α -L-фукозы [20, 21]. Все эти биополимеры в той или иной степени оказывали противоопухолевое или иммуномодулирующее действие, однако разнообразие их структур не позволяет установить надежную корреляцию между строением и биологической активностью. Обилие разных полисахаридов, выделенных формально из одного источника, объясняется несколькими при-

чинами. Таксономия рода *Ganoderma* разработана недостаточно [22], а разные виды и даже разные штаммы одного вида могут сильно различаться полисахаридным составом, на который может существенно влиять природа субстрата, на котором растет гриб в естественных условиях или в процессе искусственного культивирования. Кроме того, в разных работах для выделения полисахаридов авторы использовали плодовые тела гриба, споры, мицелий, культуральную жидкость и это обстоятельство послужило дополнительным фактором, увеличившим разброс результатов.

Дереворазрушающие базидиомицеты (ксилотрофы) все чаще становятся объектом пристального внимания специалистов. Это определяется их уникальными экосистемными функциями и физиолого-биохимическими особенностями. Высшие базидиальные грибы осуществляют в природе деструкцию таких сложных биополимеров, как целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин, пектиновые вещества. В пределах группы ксилотрофов особое место занимают грибы белой гнили, обладающие спектром лигнолитических ферментов. В процессе ферментативного разложения субстратов, содержащих лигнин, образуются разнообразные соединения как фенольной, так и не фенольной природы [23]. В результате во всем мире растет спрос на получение пигментов из природных источников, в основном из микроорганизмов. Среди микроорганизмов грибы составляют группу, важную для производства пигментов, поскольку при выращивании в больших масштабах они дают высокий выход метаболитов [24]. Среди широкого спектра пигментов, производимых грибами, есть важный класс пигментов, называемых меланинами [25–28]. Меланины – это вторичные метаболиты, вырабатываемые грибами, которые способствуют выживанию грибов в неблагоприятных условиях [29]. Это биополимеры, широко распространенные во многих частях живых организмов, это пигменты темно-коричневого или черного цвета с высокой молекулярной массой, отрицательно заряженные, гидрофобные по своей природе и образуются в результате окислительной полимеризации фенольных или индольных соединений [30]. Уникальные свойства грибов и их специфические особенности, значительная питательная ценность, лечебные свойства многих видов, возможности получения ценных веществ и материалов на их основе интересовали человечество с момента возникновения цивилизации [31].

Для анализа химического состава и биологической активности взяты трутовые грибы *G. lucidum* из-за их доступности и возможности культивирования.

Цель работы – изучение состава меланина и водорастворимых полисахаридов трутовика *G. lucidum*.

МЕТОДИКА

В качестве исходного сырья использовали трутовик лекарственный (класса базидиомицетов – *Basidiomycetes*) из дереворазрушающих грибов *G. lucidum*, произрастающих в Узбекистане. Базидиальные грибы *G. lucidum* (Curtis) P. Karst. были собраны в местах их естественного произрастания в Ташкентской области и Ферганской долине. Для выделения полисахаридов были использованы высушенные до постоянной массы в сушильном шкафу “BINDER FD 56” (“Binder”, Германия) при температуре 40–50°C плодовые тела базидиального гриба. Способ разделения меланина и водорастворимых полисахаридов из экстрактов плодовых тел трутовиков предусматривает измельчение плодового тела трутовиков в лабораторном измельчителе до размера частиц от 2 до 6 мм, обессмоливание измельченного сырья смесью хлороформ–этанол 96% в соотношении 1 : 2 в аппарате Сокслета. Далее высушенное обезжиренное сырье трижды экстрагировали горячей водой при соотношениях сырье : экстрагент 1 : 20, 1 : 15, 1 : 10 и продолжительности экстрагирования 6 ч при температуре 100°C. Полученные водные экстракты объединили, фильтровали и упаривали на роторно-пленочном испарителе при температуре 50°C до 1/5 от первоначального объема. К полученному фильтрату добавляли 1%-ный NaOH, перемешивали при комнатной температуре, подкисляли 10%-ным HCl до pH 1.5, в результате образовывался хлопьевидный осадок, который отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g. Полученный супернатант собирали, доводили pH раствора до 7.0. Отделенный осадок растворяли в 1%-ном NaOH, потом подкисляли 10%-ным HCl до pH 1.5, полученный осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 10000 g, а супернатант собирали, доводили до pH 7.0. Осадок еще раз растворяли щелочью, процесс подкисления проводили трижды. После чего выпавший осадок растворяли в 0.1%-ном NaOH и диализовали через мембрану до достижения нейтрального pH среды. Все полученные супернатанты объединяли, упаривали на роторном пленочном испарителе при температуре 50°C до 2/5 первоначального объема и проводили диализ против проточной воды. После диализа полученные образцы лиофильно высушили на установке “BK-FD10P” (“Biobase”, Китай).

Остаток плодового тела трутовика после водной экстракции экстрагировали 5%-ным раствором NaOH, в течение 18 ч с перемешиванием при температуре 30–40°C, (соотношении сырья и экстрагента 1 : 10). Экстракт отделяли через капроновую мембрану с размером пор 50–100 мкм, а остаток плодового тела еще дважды обрабатывали щелочью в тех же условиях. Щелочные экстракты подкисляли 10%-ной HCl до pH 1.5, полученный хлопьевидный осадок отделили центрифугирова-

нием в течение 15 мин при 10000 g и затем супернатант собирали и доводили pH до 7.0. Осадок еще раз растворяли в 1%-ном NaOH, этот процесс повторяли дважды. Выпавший осадок растворяли в 0.1%-ном NaOH и диализовали до установления нейтрального pH. Супернатанты объединяли и упаривали на роторно-пленочном испарителе при температуре 50°C до 2/5 первоначального объема, а затем диализовали через диализную мембрану и после диализа лиофильно высушили.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры исследуемых образцов снимали на ИК-Фурье спектрометре "IRTracer-100" ("Shimadzu", Япония) в комплекте с приставкой нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) MIRacle-10 с призмой diamond/ZnSe (спектральный диапазон по шкале волновых чисел – 4000 ÷ 450 см⁻¹; разрешение – 4 см⁻¹, чувствительность соотношения сигнал/шум – 60.000 : 1; скорость сканирования – 20 спектров/с).

УФ-спектроскопия. УФ-спектры снимали на спектрофотометре "UV-1280" ("Shimadzu", Япония). Полосы, характерные для белков появлялись при 260 и 280 нм.

Эксклюзионная жидкостная хроматография. Молекулярно-массовые характеристики разных типов полисахаридов определяли на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity (США) с использованием хроматографической колонки PL Aquagel-ОН Mixed ("Agilent Technologies", США) длиной 300 мм и внутренним диаметром 8 мм. Концентрации вводимых проб составляли 1–4 мг/мл, а объем – 100 мкл. В качестве элюента использовали водный 0.1 н. раствор нитрата натрия. Объемная скорость потока элюента составляла 0.8 мл/мин. Температуру систем колонок и детекторов поддерживали равной 30°C. В качестве детекторов использовали дифференциальный рефрактометр (RID10A, "Shimadzu", Япония). Для калибровки колонок в качестве стандартов полимеров были использованы узко дисперсные пуллуланы фирмы "ShowaDenko" (Япония). Обработка результатов ВЭЖХ-анализа проведена ручным способом с использованием линейных калибровочных кривых полученных с использованием стандартов – пуллуланов.

Ионообменная хроматография. Образец полисахарида (100 мг) растворяли в 5 мл дистиллированной воды и наносили на колонку (14 × 3 см) с DEAE-целлюлозой 52 ("Sigma-Aldrich", Германия). Элюировали градиентом концентрации раствора NaCl от 0 до 1 М. Скорость элюирования составляла 60 мл/ч. Отбирали фракции объемом по 10 мл. Выход полисахаридов из колонки контролировали фенол-сернокислотным методом. Фракции, соответствующие отдельным пикам, объединяли, концентрировали, диализовали и лиофильно высушивали.

Определение моносахаридного состава β-глюканов. Моносахаридный состав отдельных полисахаридов определяли альдитол-ацетатным методом. 5 мг полисахарида и 3 мл 2 М раствора трифторуксусной кислоты помещали в ампулу и запаивали, гидролиз проводили при 110°C в течение 6 ч. Трифторуксусную кислоту удаляли многократным упариванием досуха с добавлением метанола. В сухой гидролизат добавляли гидроксилламин гидрохлорид (10 мг), миоинозит (2 мг) в качестве внутреннего стандарта и смесь растворяли в 5 мл пиридина. Раствор нагревали при 90°C в течение 30 мин, быстро охлаждали до комнатной температуры, добавляли уксусный ангидрид (0.5 мл) и ацетилировали в течение 30 мин при 90°C. Реакционную смесь высушивали в потоке азота, растворяли в 0.5 мл хлороформа и фильтровали через шприцевой фильтр (0.45 мкм). Альдитолацетатные производные моносахаридных стандартов (D-Glc, D-Gal, D-Rib, D-Ara, L-Rha, D-Man, D-Xyl и D-Fru) были получены, как описано выше. Синтезированные альдитолацетатные производные моносахаридов анализировали на хроматографе TRACE2000 ("ThermoFinnigan", Италия) скапилярной колонкой DB-5MS (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм), газ-носитель гелий (скорость потока 1 мл/мин). Температурный режим изменялся со скоростью 20°C/мин со 180 до 270°C, с удержанием при 270°C в течение 25 мин. Количество вводимой пробы – 1 мкл. Идентификацию альдитолацетатов проводили, сравнивая с масс-спектрами стандартных соединений, а также по временам удерживания. Содержание моносахаридов в продуктах гидролиза полисахаридов определяли с использованием метода нормализации по глюкозе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

β-D-глюканы являются одной из наиболее распространенных форм полисахаридов, состоящих из β-глюкозы, соединенной 1 → 3 линейной β-гликозидной связью и отличаются друг от друга по длине или разветвленной структурой [32, 33]. Разветвления β-D-глюканов специфичны по видам. Например, β-D-глюканы гриба имеют 1 → 6 боковые ветви, в то время как β-D-глюканы бактерий имеют 1 → 4 боковые ветви. В водном растворе β-D-глюканы подвергаются конформационным изменениям с образованием тройной, одиночной или случайных спиралей.

С целью получения природных полисахаридов были разработаны методы выделения полисахаридов из грибов-базидиомицетов, разделение и очистка меланин-глюканового комплекса до фракции меланинов и β-глюканов.

Для выделения полисахаридов из базидиальных грибов проводили экстракцию из плодовых тел. На рис. 1 представлена схема выделения полисахаридов из плодовых тел базидиального гриба.



Рис. 1. Схема выделения полисахаридов из *Ganoderma lucidum*.

Для извлечения липофильных веществ и низкомолекулярных примесей из плодовых тел проводили экстракцию смесью спирт : хлороформ в соотношении 2 : 1 в аппарате Сокслета. После обессмоливания сырья методами водной, кислотной и щелочной экстракций выделено 3 фракции водорастворимых, кислоторастворимых и щелочерастворимых полисахаридов.

В табл. 1 представлены результаты выхода низкомолекулярных веществ (НМВ): водорастворимой (ВРФ), кислоторастворимой (КРФ) и щелочерастворимой (ЩРФ) фракций выделенных из базидиомицетного сырья.

Выделенные водорастворимые и щелочерастворимые фракции представляли собой порошки коричневого цвета, которые хорошо растворялись в воде при низкой концентрации и образовывали опалесцирующие растворы, а при высокой концентрации образовывали вязкие растворы с высокими показателями относительной вязкости.

При кислотной экстракции получали небольшой выход полисахаридов — 1.23%, поэтому дальнейшие исследования проводили только с водорастворимой и щелочерастворимой фракциями.

Физико-химическими методами (УФ-, ИК-спектроскопии, гельпроникающей, ионообменной хроматографии и др.) установлено, что в составе выделенных водных и щелочных фракций находятся комплексы. Проведенный УФ-спектральный анализ экстрактов (GW, GSH) на содержание меланина в области 200–360 нм показал, что полученные пики соответствовали присутствию в образцах меланина (рис. 2), то есть полисахариды в плодовых телах находились в виде комплекса полисахаридов с меланином, что соответствовало данным литературы [34].

Проведены разделение и очистка полученных образцов. Молекулярно-массовые характеристики полученных фракций определены с помощью гельпроникающей хроматографии. В табл. 2 представлены молекулярно-массовые характеристики меланин-глюкановых комплексов водной (GW) и щелочной (GSH) фракций, экстрагированных из грибного сырья, а также выделенных из них полисахаридов и меланинов. Из табл. 2 видно, что средняя молекулярная масса (ММ) и молекулярно-массовое распределение (ММР) меланин-глюкановых комплексов растворимых в воде и щелочи близки.

Таблица 1. Выход НМВ, КРФ, ЩРФ, ВРФ фракций после экстракции

Название гриба	НМВ, %	ВРФ, %	КРФ, %	ЩРФ, %	Сумма полисахаридов, %	Нерастворимая часть, %	Технические потери
<i>Ganoderma lucidum</i>	3.60	15.16	1.23	2.13	18.52	29.75	48.13

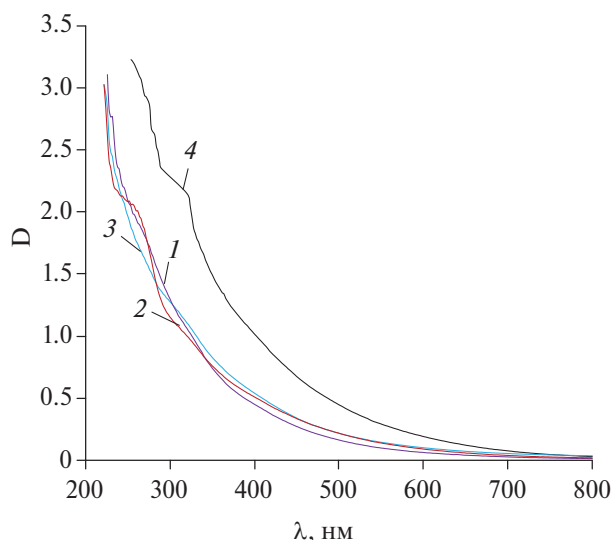


Рис. 2. УФ-спектры образцов меланин-глюканового комплекса водной фракции (1), меланин водной фракции (2), полисахарид водной фракции (3), щелочной фракции (4).

Также установлено, что средняя ММ полисахаридов, полученных из водной фракции (GW-P) составляла 10300 Да, а из щелочной фракции (GSH-P) 10500 Да, ММР – 1.2.

Количественное определение моносахаридных остатков в составе полученных фракций полисахаридов (GW-P, GSH-P) проводили с помощью GC-MS соответствующих ацетатов альдита (рис. 3). В табл. 3 приведен моносахаридный состав образцов полученных полисахаридов. Как видно из рис. 3 и табл. 3, все образцы полисахаридов состояли в основном из остатков глюкозы. Также

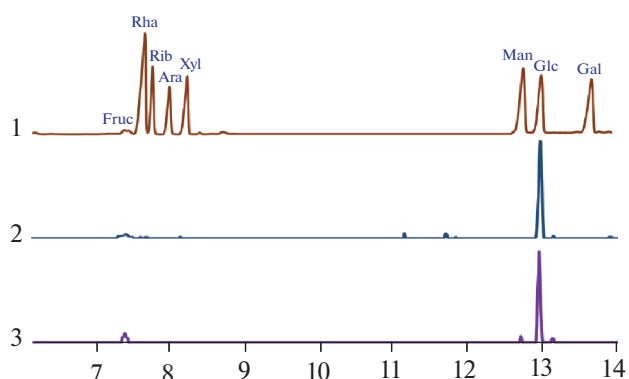


Рис. 3. Хроматограммы образцов полученных полисахаридов из меланин-глюканового комплекса.

в состав моносахаридов входили: остатки фруктозы, ксилозы и маннозы в качестве минорных компонентов.

При разделении полученного комплекса было выявлено, что соотношение β-глюканов и меланинов зависело от способа их экстракции.

При анализе образцов депротеинизированных полисахаридов методом, описанным в работах [35, 36] с использованием метода УФ-спектроскопии не наблюдали пики, соответствующие белкам при 280 нм и 260 нм. Это означает, что данные образцы полисахаридов не содержали белки и пептиды.

При разделении меланин-глюканового комплекса на полисахарид и меланин состав фракций изучался с помощью фенол-сернокислотного метода, который показал, что часть меланина оставалась в составе полисахарида, поэтому выделенные

Таблица 2. Молекулярно-массовые параметры меланин-глюкановых комплексов и выделенных из них полисахаридов и меланинов

№	Образцы	ММ*, Да	ММ/Мн
1	Водная фракция <i>Ganoderma lucidum</i> (GW)	12300	1.5
2	Меланин водной фракции (GW-M)	17000	1.1
3	Полисахарид водной фракции (GW-P)	10300	1.2
4	Щелочная фракция <i>Ganoderma lucidum</i> (GSH)	12600	1.5
5	Меланин щелочной фракции (GSH-M)	17700	1.8
6	Полисахарид щелочной фракции (GSH-P)	10500	1.2

* ММ – средняя молекулярная масса.

Таблица 3. Моносахаридный состав образцов полученных полисахаридов из меланин-глюканового комплекса

Образец	Моносахаридный состав, %							
	Фру	Рам	Риб	Ара	Кси	Ман	Глю	Гал
GW-P	7.41	–	–	–	3.70	–	88.89	–
GSH-P	6.24	–	–	–	–	3.13	90.63	–

полисахариды были дополнительно очищены с использованием хроматографического метода. При нанесении образцов на колонку с DEAE-целлюлозой, колонку промывали дистиллированной водой, а затем добавляли NaCl. Нейтральные и анионные полисахариды были разделены при промывании колонки дистиллированной водой и затем градиентом NaCl. На рис. 4 представлены полученные после разделения фракции GW фракции нейтральных полисахаридов GW-1 и анионных полисахаридов GW-2. При этом выход нейтральных полисахаридов фракции GW, полученной при водной экстракции GW-1 составил – 25.71%, анионных полисахаридов GW-2 – 5.26%.

На рис. 5. представлены хроматограммы разделения фракции GSH на две фракции полисахаридов: нейтральные полисахариды GSH-1 и анионные полисахариды GSH-2. При этом выход нейтральных полисахаридов GSH-1 составил 11.91%, анионных GSH-2 – 6.27%. Методом ионообменной хроматографии водной (GW) и щелочной (GSH) фракции получили две фракции полисахаридов: нейтральных (GW-1 25.71%, GSH-1 11.91%) и столько же анионных (GW-2 5.26%, GSH-2 6.27%). При сравнении выхода нейтральных и анионных полисахаридов из водной и щелочной фракции, оказалось, что выход нейтральных полисахаридов был почти в 2 раза выше. Таким образом, основной состав экстрагированных водо- и щело-

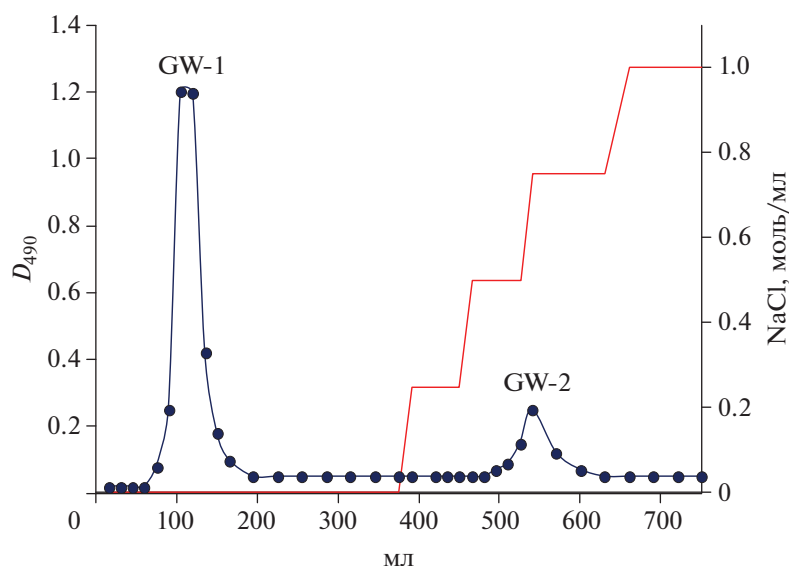


Рис. 4. Ионообменная хроматография полисахаридов GW-1, GW-2 в колонке DEAE-целлюлозной 52.

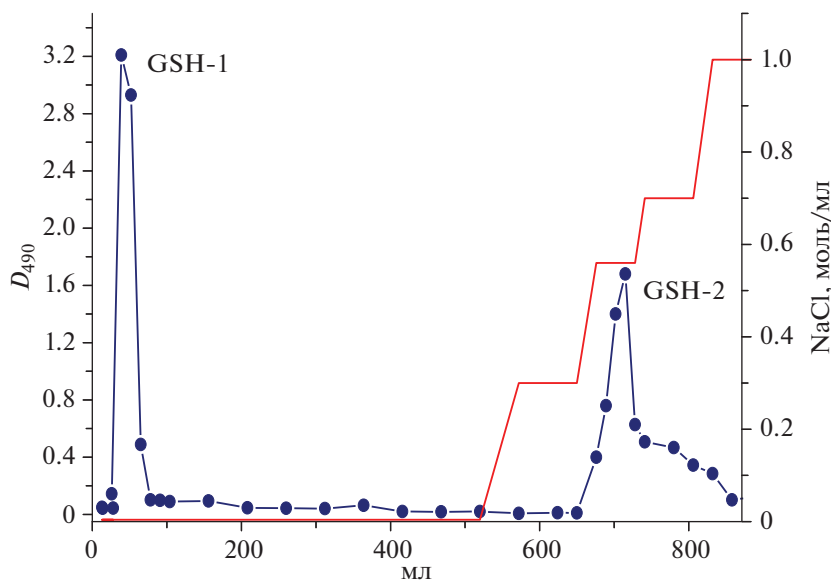


Рис. 5. Ионообменная хроматограмма полисахаридов GSH-1, GSH-2 в колонке с DEAE-целлюлозой 52.

черастворимых фракций составляли нейтральные полисахариды.

В ИК-спектрах исследуемых образцов (GW, GW-1, GW-2, GSH, GSH-1, GSH-2) обнаружены все полосы поглощения (рис. 6 и 7), характерные для β -глюканов и меланинов. В ИК-спектрах меланин-глюканового комплекса отмечены полосы поглощения валентных колебаний, характерных для O–H связей полисахаридов и N–H связей меланинов в области 2900–3600 см^{-1} [37]. Полоса поглощения в интервале 2850–2900 см^{-1} соответствовала валентным колебаниям C–H атома углерода C6 полисахаридов. За счет карбоксильных групп меланина в спектрах присутствовала полоса поглощения при 2325 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям O–H связи карбоксильных групп. В интервале 1460–1750 см^{-1} находятся полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям C=C связи ароматического кольца меланина и C=O связи карбоксильных групп [38]. В области 1170–1450 см^{-1} наблюдались полосы поглощения, соответствующие полисахаридам и C–O связи карбоксильных групп. В спектрах отмечены полосы поглощения в интервале 1050–1150 см^{-1} , соответствующие валентным колебаниям C–O–C связей глюкопиранозного кольца полисахаридов. В области 500–750 см^{-1} присутствовали полосы поглощения, характерные для различных типов колебаний C–H связи.

В ИК-спектрах (рис. 6 и 7) полученных образцов наблюдались соответствующие полисахаридам полосы поглощения 3300, 2950, 1600, 1420–1380, 1200–750 см^{-1} а для меланинов при 2900–3600, 2325, 1460–1750 см^{-1} . В области 1200–950 см^{-1} наблюдались полосы поглощения валентных колебаний, соответствующие C–O и C–C связям. Наибольшую информацию о структуре полисахарида несет ближняя ИК-область спектра (аномерный регион), наличие полос в которой характеризует направление и тип связей в макромолекуле, а также конформационные и конфигурационные особенности полимера. В этой области очень хорошо видны структурные различия полисахаридов. В спектре полисахарида присутствует полоса 898–900 см^{-1} , свидетельствующая о наличии β -типа связи: β - (1–3), β - (1–6) [39]. Полисахаридные фракции, полученные экстракцией, очищали методами ионообменной хроматографии. Результаты выделения и очистки фракций из базидиальных грибов показали снижение интенсивности полосы поглощения в районе 1660 см^{-1} , что свидетельствовало об очистке образцов от меланина.

Из базидиального гриба *Ganoderma lucidum* выделены водные и щелочные фракции. Физико-химическими методами установлено, что полученные водные и щелочные фракции в основном содержат

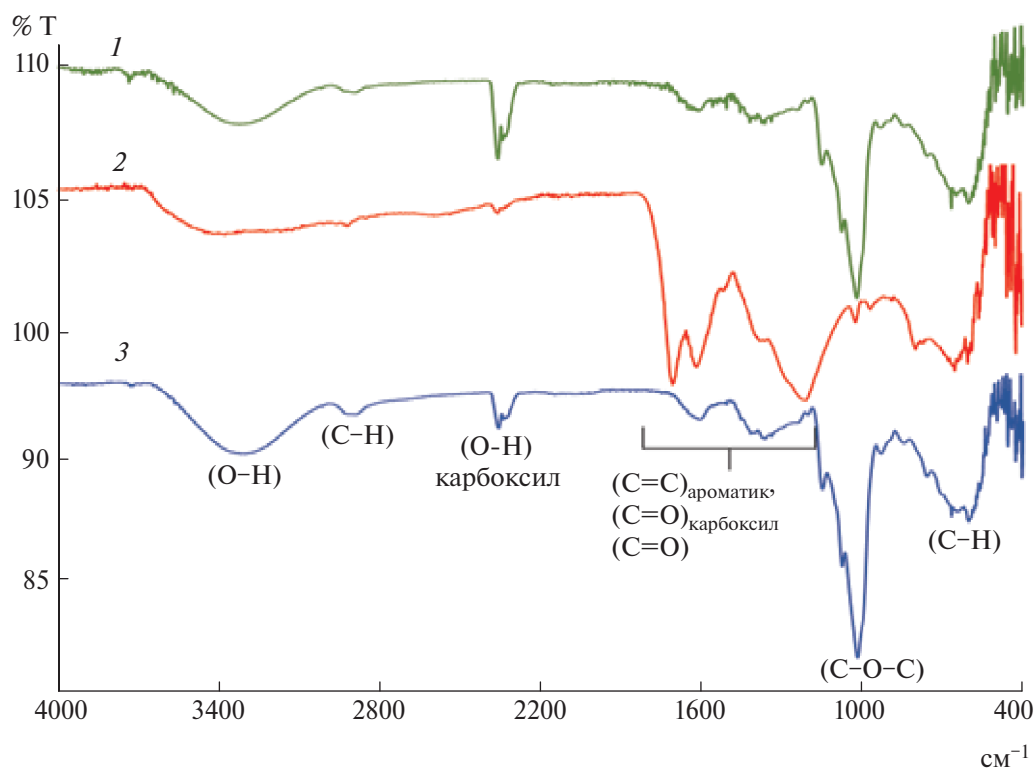


Рис. 6. ИК-спектры образцов меланин-глюканового комплекса водной фракции (1), меланина (2) и полисахарида (3).

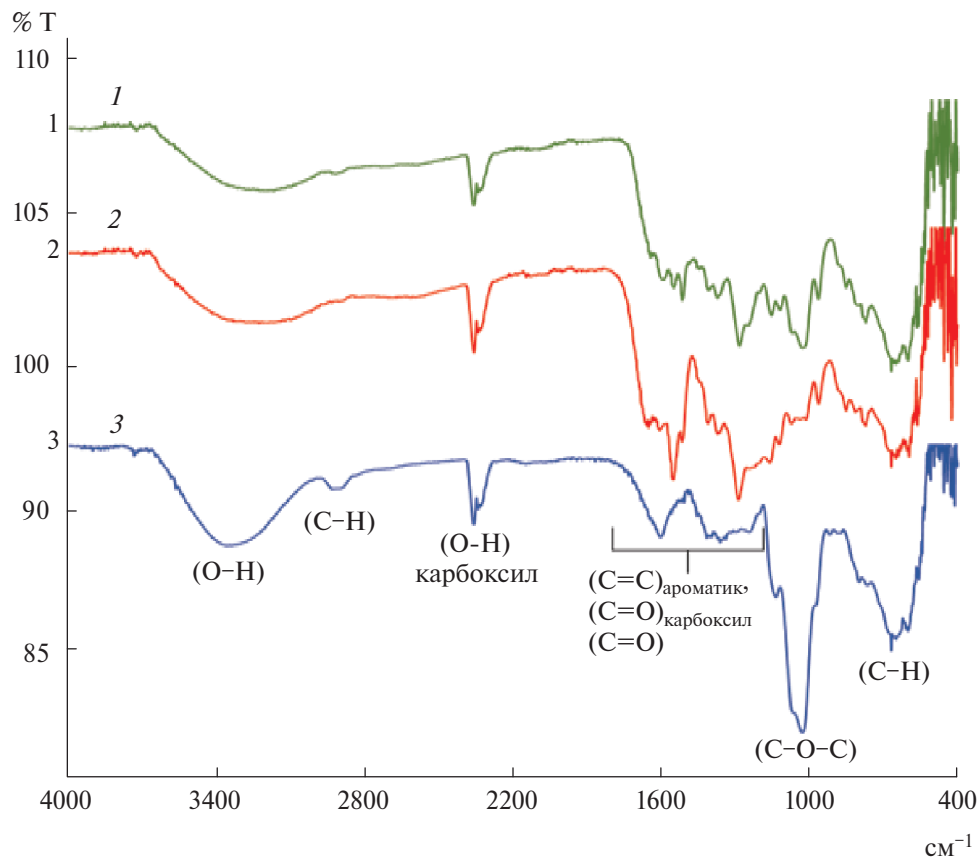


Рис. 7. ИК-спектры образцов щелочной фракции меланин-глюканового комплекса (1), меланина (2) и полисахарида (3).

меланин-глюкановые комплексы. Комплексы были разделены на меланины и глюканы. Методами УФ-, ИК-спектроскопии, ионообменного, газового и эксклюзионной жидкостной хроматографии изучены физико-химические свойства полученных образцов. Методом УФ-спектроскопии установлена степень чистоты полученных фракций меланина и полисахаридов. На основе полученных результатов выявлено, что содержание меланина в составе полисахаридной фракции $\leq 10\%$. Методами газовой хроматографии, установлено, что в состав полисахаридных фракций входят в основном остатки глюкозы (88–90,6%), качестве минорных моносахаридов до 20,5% составляли остатки фруктозы, ксилозы и маннозы. Результаты исследования молекулярной массы показали, что ММ β -глюканов базидиомицетов находятся в пределах 9800–17700 Да, ММР – 1,2–1,8.

Для дальнейшего исследования структуры и биологической активности необходимо использовать чистые фракции. Поэтому выделенные водные и щелочные фракции были дополнительно очищены и разделены на меланины и полисахариды. Результаты исследования показали, что состав экстрагированных водо- и щелочерастворимых

фракций составляют в основном из нейтральных полисахаридов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках текущего финансирования деятельности института.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов исследований с использованием животных и человека в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wasser S.P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 60. P. 258–274. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
2. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E. // Exp. Biol. Med. 2004. V. 229. P. 393–406. <https://doi.org/10.1177/153537020422900507>

3. Zhang M., Cui S.W., Cheung C.K., Wang Q. // Trends Food Sci. Technol. 2007. V. 18. P. 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.07.013>
4. Avramia I., Amariei S. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 2. P. 825. <https://doi.org/10.3390/ijms22020825>
5. Han B., Baruah K., Cox E., Vanrompay D., Bossier P. // Front. Immunol. 2020. V. 11. P. 658. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00658>
6. Chioru A., Chirsanova A. // Food and Nutrition Sciences. 2023. V. 14. P. 963–983. <https://doi.org/10.4236/fns.2023.1410061>
7. Ruiz-Herrera J., Ortiz-Castellanos L. // The Cell Surface. 2019. V. 5. P. 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>
8. Lin Z., Zhang H. // Acta Pharmacol. Sin. 2004. V. 25. P. 1387–1395.
9. Huie C.W., Di X. J. // Chromatogr. 2004. V. 812. P. 241–257. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(04\)00678-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(04)00678-6)
10. Paterson R.M. // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 1985–2001. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.004>
11. Chen J., Zhou J., Zhang L., Nakamura Y., Norisuye T. // Polymer J. 1998. V. 30. № 10. P. 838–843. <https://doi.org/10.1295/polymj.30.838>
12. Bao X., Duan J., Fang X., Fang J. // Carbohydr. Res. 2001. V. 336. № 2. P. 127–140. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00238-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00238-5)
13. Bao X., Liu C., Fang J., Li X. // Carbohydr. Res. 2001. V. 332. № 1. P. 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00075-1)
14. Bao X.F., Wang X.S., Dong Q., Fang J.N., Li X.Y. // Phytochemistry. 2002. V. 59. № 2. P. 175–181. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00450-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00450-2)
15. Bao X.F., Zhen Y., Ruan L., Fang J.N. // Chem. Pharm. Bull. 2002. V. 50. № 5. P. 623–629. <https://doi.org/10.1248/cpb.50.623>
16. Miyazaki T., Nishijima M. // Chem. Pharm. Bull. 1981. V. 29. № 12. P. 3611–3616. <https://doi.org/10.1248/cpb.29.3611>
17. Saito K., Nishijima M., Miyazaki T. // Chem. Pharm. Bull. 1989 V. 37. № 11. P. 3134–3136. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3134>
18. Miyazaki T., Nishijima M. // Carbohydr. Res. 1982. V. 109. P. 290–294. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(82\)84047-0](https://doi.org/10.1016/0008-6215(82)84047-0)
19. Li Y.Q., Fang L., Zhang K.C. // Carbohydr. Polym. 2007. V. 68. № 2. P. 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.12.001>
20. Wang Y.Y., Khoo K.H., Chen S.T., Lin C.C., Wong C.H., Lin C.H. // Bioorg. Med. Chem. 2002. V. 10. № 4. P. 1057–1062. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00377-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00377-7)
21. Ye L.B., Zhang J.S., Ye X.J., Tang Q.J., Liu Y.F., Gong C.Y., Du X.J., Pan Y.J. // Carbohydr. Res. 2008. V. 343. № 4. P. 746–752. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.004>
22. Szedlay G. // Acta Microbiol. Immunol. 2002. V. 49. P. 235–243. <https://doi.org/10.1556/AMicr.49.2002.2-3.9>
23. Ильина Г.В., Лыков Ю.С. // Поволжский экологический журнал. 2010. Т. 3. С. 263–273.
24. Duran N. Teixeira M.F., De Conti R.; Esposito E. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2002. V. 42. P. 53–66. <https://doi.org/10.1080/10408690290825457>
25. Kalra R., Conlan X.A., Goel M. // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 369. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00369>
26. Lagashetti A.C., Dufosse L., Singh S.K., Singh P.N. // Microorganisms. 2019. V. 7. P. 604. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120604>
27. Suthar M., Lagashetti A.C., Räisänen R., Singh P.N., Dufosse L., Robinson S.C., Singh S.K. // In Advances in Macrofungi: CRC Press, 2021. P. 223–251.
28. Dufosse L., Fouillaud M., Caro Y., Mapari S.A., Suthiwong N. // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 26. P. 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>
29. Chambergo F.S., Valencia E.Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 100. P. 2567–2577. <https://doi.org/10.1007/S00253-016-7305-2>
30. Eisenman H.C., Casadevall A. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 93. P. 931–940. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3777-2>
31. Ильина Г.В., Ильин Д.Ю. Ксилотрофные базидиомицеты в чистой культуре. Пенза: РИО ПГСХА, 2013. 222 с.
32. Bohn J., BeMiller J. // Carbohydr. Polym. 1995. V. 28. № 1. P. 3–14.
33. Азимова Л.Б., Нормакхатов Н.С., Хайтметова С.Б., Мухитдинов Б.И., Амонова Д.М., Филатова А.В. и др. // Химия растительного сырья. 2019. № 2. С. 35–41. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2019024491>
34. Arun G., Eyini M., Gunasekharan P. // Indian J. Exp. Biol. 2015. V. 53. № 6. P. 380–387.
35. Staub A.M. // Methods in Carbohydrate Chemistry. 1965. V. 5. P. 5–6.
36. Халилова Г.А., Тураев А.С., Мухитдинов Б.И., Филатова А.В., Хайтметова С.Б., Нормакхатов Н.С. // Химия растительного сырья. 2021. № 3. С. 99–106. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2021039028>
37. Pacelli C., Cassaro A., Maturilli A., Timperio A.M., Gevi F., Cavalazzi B. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2020. V. 14. P. 6385–6395. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10666-0>
38. Mboniyirivuze A., Mwakikunga B., Mokhotjwa Dhlamini S., Maaza M. // Physics and Materials Chemistry. 2015. V. 3. № 2. P. 25–29. <https://doi.org/10.12691/pmc-3-2-2>
39. Khalilova G.A., Turaev A.S., Mухитдинов B.I., Filatova A.V., Haytmetova S.B., Normakhmatov N.S. // Am. J. App. Sci. 2021. V. 3. № 1. P. 9–17. <https://doi.org/10.37547/tajas/Issue01-03>

Separation of Water-Soluble Polysaccharides and Melanin from an Extract of Wood-Destroying Fungi

S. B. Khaytmetova^{a, *}, G. A. Khalilova^a, A. S. Turaev^a, and S. R. Makkambaeva^a

^a*Institute of Bioorganic Chemistry. A.S. Sadykov Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, st. Mirzo Ulugbek, 83, Tashkent, 100125 Uzbekistan*

**e-mail: xsb75@mail.ru*

Water-soluble and alkali-soluble polysaccharides have been isolated from the basidiomycete fungus *Ganoderma lucidum* (class *Basidiomycetes*). It has been established that the obtained aqueous and alkaline fractions mainly consist of glucan polysaccharides and melanins and are represented by a melanin-glucan complex. Methods have been developed for separating and purifying the melanin-glucan complex to a separate fraction of melanins and beta-glucans. The physicochemical properties of the obtained samples have been studied, and the purity of the obtained melanin and polysaccharide fractions has been established using UV spectroscopy. Based on the obtained results, it has been shown that melanin in the polysaccharide fraction was $\leq 10\%$. The composition and molecular structure of the obtained melanin and polysaccharide samples have been established using gas chromatography and IR spectroscopy. The polysaccharide fractions mainly consisted of glucose residues (88–90.6%), and also up to 20.5% of fructose, xylose and mannose residues as minor monosaccharides. The results of the study showed that the average molecular weight of the obtained polysaccharides and melanin was from 10300 to 17700 Da, the molecular weight distribution of polysaccharides obtained from the aqueous and alkaline fractions was 1.2, and that of melanin from the aqueous fraction was 1.1, and that of the alkaline fraction was 1.8, respectively.

Keywords: extract, water-soluble polysaccharides, melanin, basidiomycetes, *Ganoderma lucidum*