

КРИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДСОДЕРЖАЩЕЙ ФРАКЦИИ *Hericium erinaceus* БП 16

© 2020 г. И. Г. Широких^{*,@}, Т. В. Полежаева^{**}, А. А. Широких^{*},
А. Н. Худяков^{**}, М. И. Сергушкина^{**}, Я. И. Назарова^{*}, И. Г. Патурова^{***}

^{*}Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого,
ул. Ленина, 166а, г. Киров, 610007 Россия

^{**}Институт физиологии КомиНЦ УрО РАН, ул. Первомайская, 5, г. Сыктывкар, 167982 Россия

^{***}Кировский государственный медицинский университет, ул. Карла Маркса, 112, г. Киров, 610027 Россия

@E-mail: irgenal@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2018 г.

После доработки 13.12.2018 г.

Принята к публикации 20.02.2019 г.

Выделена полисахаридсодержащая фракция (ПФ) из плодовых тел искусственно культивированного ксилотрофного базидиального гриба *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. экстракцией горячей водой (70°C) с последующим осаждением 96%-ным этиловым спиртом. В составе углеводных цепей ПФ идентифицированы остатки рамнозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, маннозы, глюкозы и галактозы в соотношении 7 : 8 : 1 : 19 : 14 : 26 : 27 соответственно. Показано влияние добавления ПФ в водные растворы криопротекторов на процессы замерзания воды в венозной крови человека при ее криоконсервировании. Установлено, что присутствие ПФ (0.25%) в составе консерванта, содержащего глицерин (3.5%), обеспечивает сохранность ядросодержащих клеток крови человека при –20 и –80°C, что свидетельствует о его криозащитной активности. Отмечено, что данная способность ПФ может использоваться при разработке новых составов для замораживания биообъектов.

DOI: 10.31857/S0002332920010129

Собранные в дикой природе или выращенные в искусственных условиях плодовые тела, культивируемый погруженный мицелий и культуральные жидкости высших базидиальных грибов содержат биологически активные полисахариды (Wasser, 2015). Основное внимание традиционно уделялось изучению их противоопухолевых и иммуномодулирующих свойств. Однако исследования, проведенные в два последних десятилетия, показывают, что спектр функционального действия грибных полисахаридов этим далеко не исчерпывается.

Гериций гребенчатый – *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. – широко известный в восточных странах съедобный и лекарственный гриб, один из лидеров по производству и использованию плодовых тел и мицелия в Китае, Японии и США. Препараты, получаемые на основе полисахаридного комплекса гериция, обладают антимикробным (Kim *et al.*, 2000), противоопухолевым (Wang *et al.*, 2001), иммуностимулирующим (Liu *et al.*, 2002), антиоксидантным (Mau *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2013), гипохолестеринемическим (Byung *et al.*, 2003), гепатопротективным (Zhang *et al.*, 2012) действиями. Из этого гриба выделены дитерпено-

иды эринацины, стимулирующие синтез фактора роста нервных клеток (Shimbo *et al.*, 2005; Krzyczkowski *et al.*, 2010). Таблетированные экстракты *H. erinaceus* используются для лечения язвы желудка и гастритов (Lu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2015).

Молекулы полисахаридов имеют в своем составе функциональные группы, способные стабилизировать воду при охлаждении (Шраго и др., 1981; Белоус, Грищенко, 1994), что обеспечивает образование мелкоячеистой структуры льда и снижает риск повреждения клеток при замораживании. В низкотемпературной адаптации базидиальных грибов участвуют природные антифризы белковой, гликопротеиновой и полисахаридной природы (Бильданова и др., 2012). Обладают криостатическими эффектами, например, ксилосманнан из мицелия и плодовых тел базидиального гриба *Flammulina velutipes* (Kawahara *et al.*, 2006, 2016), эндополисахаридная фракция мицелия гриба *Trametes ochracea* (Полежаева и др., 2017). О выявлении криостатических эффектов у полисахаридов *H. erinaceus* до настоящего времени в литературе не сообщалось.

Цель работы – экспериментальная проверка предположения о способности полисахаридов

H. erinaceus обеспечивать сохранность живых клеток при замораживании.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и получение плодовых тел гриба. В исследовании использовали природный изолят *H. erinaceus* БП 16 из плодового тела гриба, отобранного в грабово-кисличной дубраве на территории национального парка “Беловежская пуша” (52°37' с.ш., 23°82' в.д., Беларусь). Чистая мицелиальная культура гриба получена с использованием культуры ткани на агаризированном (2%) сусле (4° по Баллингу). Выделенный штамм при лабораторном культивировании отличался повышенной способностью к плодообразованию: уже через 18–20 сут роста на сусле-агаре по периферии колоний начинали появляться примордии. Посевной мицелий гриба получали на стерильном зерне овса. Для получения плодовых тел применяли субстрат из соломы, зерна и дубовых опилок в объемном соотношении 6 : 3 : 1. После автоклавирования и охлаждения субстрат в стерильных условиях инокулировали посевным зерновым мицелием гриба (5% массы субстрата). Емкости с инокулированным субстратом инкубировали при комнатной температуре (20 ± 1°С). На 48-е, 68-е и 83-и сутки культивирования собирали плодовые тела *H. erinaceus*, которые высушивали в термостате при 40°С.

Для извлечения грибных полисахаридов сухие плодовые тела *H. erinaceus* (45.36 г) заливали горячей (70°С) дистиллированной водой и оставляли на 8 ч для экстракции. Полисахаридсодержащие фракции (ПФ) осаждали из водного экстракта плодовых тел добавлением 96%-ного этанола (1 : 4, V/V). Полученный осадок отделяли центрифугированием (1300 об./мин, в течение 40 мин), растворяли в дистиллированной воде (1 : 1, V/V), раствор лиофилизировали. В результате получили ПФ (0.936 г).

Количественное определение нейтральных моносахаридов в виде соответствующих ацетатов полиолов после полного (в течение 3 ч) кислотного гидролиза ПФ 2М трифторуксусной кислотой проводили газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ). Для этого использовали хроматограф “Varian 450-GC” (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярную колонку VF-5 ms (Varian, США; 0.25 мм, 30 м), гелий в качестве газа-носителя. ГЖХ ацетатов полиолов проводили в программе: от 175°С (1 мин) до 250°С (2 мин) со скоростью 3°С/мин. Процентное содержание моносахаридов (% суммарного препарата) вычисляли из площадей пиков, используя коэффициенты отклика детектора (York *et al.*, 1985). В качестве внутреннего стандарта использовали миоинозит (Sigma, США).

Анализ криоосмотических свойств ПФ. Для характеристики криоосмотических свойств на дистиллированной воде готовили растворы ПФ в концентрациях 1–0.1%. Кроме ПФ гриба использовали водные растворы известных криопротекторов эндоцеллюлярного (проникающего) действия: 7%-ного глицерина (ЗАО; ЭКОлаб, Электрогорск), 10%-ного диметилсульфоксида (ДМСО) (Sigma), 10%-ного диметилацетамида (ДМАЦ) (Sigma), 10%-ного пропандиола (1.2-ПД) (Lancaster, Англия). Выбор указанных концентраций был обусловлен их практическим применением при криоконсервировании тромбоцитов и лейкоцитов крови человека, а также стволовых кроветворных клеток (Сведенцов, 2010).

Осмолярные концентрации (мОсм/л) и температуры замерзания водных растворов веществ определяли с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1 (НПП “Буревестник”, Санкт-Петербург). Исследуемый раствор (0.3 мл) помещали в пластиковую кювету, погружали в нее измерительный элемент и устанавливали в термостатируемую камеру прибора. С каждым раствором, указанным в данной работе, было выполнено по 10 тестирований. При этом было установлено, что абсолютные погрешности измерений осмолярной концентрации вещества (0–500 мОсм/л) и температуры замерзания (–0.93...–3.72°С) составляли ±2 мОсм/л и ±0.01°С соответственно.

Для выявления криозащитных свойств ПФ проводили замораживание лейкоцитов венозной крови человека в среде, содержащей глицерин (3.5%) и глицерин (3.5%) с ПФ *H. erinaceus* (0.25%). Для этого использовали гепаринизированную венозную кровь здоровых женщин-добровольцев (23–40 лет). Кровь одного донора смешивали с каждым из исследованных консервантов в соотношении 1 : 1 и охлаждали по ранее разработанной медленной нелинейной программе с использованием электрических морозильников (–20 и –80°С). Для этого биообъект в полимерных контейнерах “Компопласт 300” (Синтез, Россия) помещали на 15 мин в спиртовую ванну (96%-ный этиловый спирт), охлаждаемую до –20°С в электроморозильнике Derby (Дания). После этого часть контейнеров переносили в воздушную среду данного электроморозильника для хранения при –20°С, другую часть – в воздушную среду электроморозильника “Vestfrost” (Дания) для дальнейшего замораживания и хранения при –80°С. Средняя скорость охлаждения от +20 до –20°С составила 2.6°С/мин, а от –20 до –80°С – по 3.5°С/мин. Через 1 сут хранения образцы отогревали в емкости с водой (38°С) при интенсивном покачивании контейнера в течение 20 с.

После отогрева в образцах методом световой микроскопии (Nikon H550S, Япония) оценивали общее число лейкоцитов в камере Горяева; сте-

Таблица 1. Кривоосмотические характеристики используемых в работе веществ

Вещество	Концентрация, %	Осмолярность, мОсм/л	Кривоосмотическая точка, °С
Дистиллированная вода	—	0	–0.002
Полисахариды <i>H. erinaceus</i>	0.5	21	–0.023
Глицерин	7.0	760	–1.420
с полисахаридами <i>H. erinaceus</i>	0.5	998	–1.860
Диметилсульфоксид	10	1725	–3.230
с полисахаридами <i>H. erinaceus</i>	0.5	1580	–2.955
Диметилацетамид	10	1098	–2.050
с полисахаридами <i>H. erinaceus</i>	0.5	1113	–2.080
1.2-Пропандиол	10	1560	–2.915
с полисахаридами <i>H. erinaceus</i>	0.5	1700	–3.180

пень криоустойчивости различных популяций клеток в мазках, окрашенных по Май-Грюнвальду и Романовскому; целостность клеточной мембраны лейкоцитов в пробах с 1%-ным раствором суправитального красителя эозина; долю в процентах фагоцитирующих нейтрофилов с использованием инертных частиц латекса (Sigma-Aldrich, Германия) диаметром 0.08 мкм (Khudyakov *et al.*, 2015).

При статистической обработке данных для каждого показателя вычисляли среднее арифметическое значение (M) и среднее квадратичное отклонение ($M \pm \delta$). Для выявления статистически значимых различий между группами применяли непараметрический критерий Уилкоксона (Гланц, 1998) с использованием компьютерной программы BIOSTAT.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика моносахаридного состава ПФ. В результате экстракции горячей водой с последующим осаждением этанолом из сухих плодовых тел гриба *H. erinaceus*, выращенного на обогащенном зерном древесно-соломистом субстрате, была получена ПФ с выходом 2.06% массы сухого материала. По данным ГЖХ в состав углеводных цепей грибного полисахарида входят остатки следующих нейтральных моносахаридов: рамнозы (2.35%), фукозы (2.68%), ксилозы (0.3%), арабинозы (6.79%), маннозы (5.01%), глюкозы (9.14%) и галактозы (9.62%). Сопоставление результатов с имеющимися в литературе данными показало, что основными моносахаридами в плодовых телах *H. erinaceus*, как и в погруженном мицелии (Автаномова и др., 2012), были галактоза и глюкоза. Вместе с тем плодовые тела при искусственном культивировании гриба отличались от погруженной мицелиальной культуры наличием в своем составе остатков арабинозы и маннозы. О выявлении остатков арабинозы и маннозы в составе раз-

личных полисахаридов плодовых тел и мицелия *H. erinaceus* уже сообщалось ранее (Bai *et al.*, 2001). В другой работе китайских ученых в составе углеводных цепей полисахаридов, выделенных из плодовых тел *H. erinaceus*, были обнаружены лишь остатки глюкозы, галактозы и фукозы (Wang *et al.*, 2004). По-видимому, структура полисахаридов, синтезируемых грибом *H. erinaceus*, может значительно изменяться в зависимости от штамма и условий его роста.

Влияние ПФ на процессы замерзания воды в растворах криопротекторов. При определении криоосмотических характеристик используемых в работе веществ – осмолярности, характеризующей создаваемое растворами осмотическое давление, и температуры замерзания раствора – установлено, что осмолярность 0.1–1.0% растворов ПФ *H. erinaceus* во всем исследованном концентрационном ряду была очень низкой. В комбинациях с растворами криопротекторов 0.5%-ный водный раствор ПФ *H. erinaceus* изменял их осмолярность, как в сторону повышения (7%-ный глицерин, 10%-ный 1.2-ПД), так и в сторону понижения (10%-ный ДМСО) (табл. 1).

Необходимо отметить, что повышение осмолярности раствора приводит к снижению температуры его замерзания и наоборот. Следовательно, ПФ *H. erinaceus* можно рассматривать как вещество, которое в зависимости от химической природы охлаждаемой жидкости либо ускоряет в ней процесс кристаллизации льда, проявляя нуклеирующую активность, либо замедляет его, усиливая переохлажденное состояние.

*Влияние водорастворимых ПФ *H. erinaceus* на процессы замерзания воды в венозной крови человека.* Осмолярность венозной крови человека при добавлении 0.5%-ного водного раствора ПФ *H. erinaceus* снижалась от 281 до 149 мОсм/л, при этом температура замерзания изменялась от –0.505 до –0.260°С. В концентрационном ряду

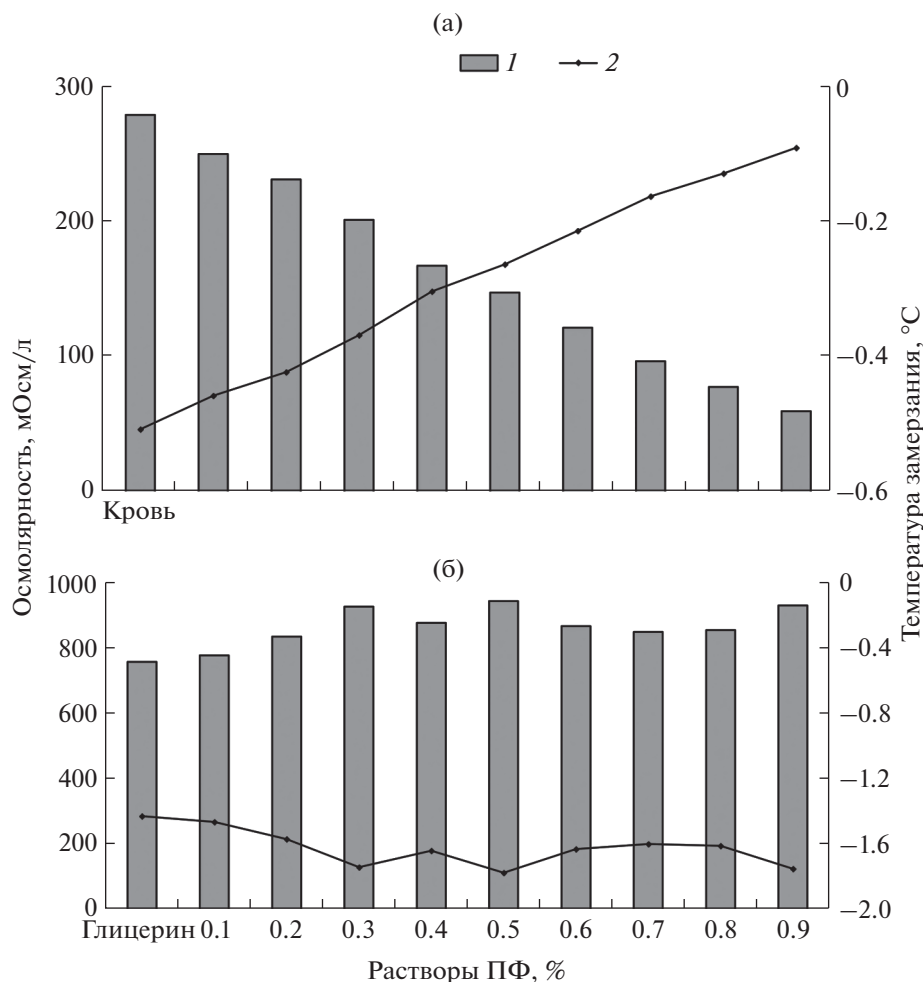


Рис. 1. Влияние полисахаридсодержащей фракции (ПФ) *Hericium erinaceus* БП 16 (0.1–0.9%) на температуру заморзания воды в венозной крови человека (а), в 7%-ном растворе глицерина (б). Абсолютные погрешности ± 2 мОсм/л, $\pm 0.010^\circ\text{C}$. 1 – осмолярность, 2 – температура заморзания.

(0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9%) ПФ *H. erinaceus* осмолярность венозной крови продолжала снижаться, а температура заморзания – стремиться к 0°C (рис. 1а). Возможно, это обусловлено тем, что функциональные группы полисахаридов взаимодействуют с осмотически активными веществами плазмы крови, что приводит к снижению осмолярности среды и, как следствие, к ускорению кристаллизации воды. Данная особенность ПФ *H. erinaceus* может найти применение при разработке новых способов быстрого замораживания биообъектов. В частности, в настоящее время протоколы ускоренного охлаждения используются при криоконсервировании репродуктивных клеток человека и животных (Линник, Мартынюк, 2010).

В практике криоконсервации клеток крови получают все более широкое распространение комбинированные среды, включающие в себя проникающие и непроникающие криопротекторы. Про-

никающие криопротекторы, например глицерин, тормозят рост кристаллов и способствуют более эффективному связыванию воды как внутри, так и за пределами клеток. Принцип действия непроникающих криопротекторов до конца не ясен. Предполагают, что оно двояко: препятствует росту кристаллов во внеклеточной среде и защищает клетки от осмотических перепадов. Из числа наиболее часто используемых при криоконсервировании к непроникающим протекторам относят олигосахариды.

При добавлении в раствор глицерина ПФ *H. erinaceus* осмолярность смеси в разной степени увеличивалась, при этом температура кристаллизации воды понижалась (рис. 1б). Вероятно, имеющиеся в составе молекул грибного полисахарида функциональные группы образуют с гидроксильными группами глицерина дополнительные связи, формируя тем самым сеть, удерживающую большее число молекул воды, чем каждый компо-

Таблица 2. Влияние полисахаридсодержащей фракции (ПФ) *Hericium erinaceus* (0.25%) на криозащитный эффект глицерина (3.5%) по показателям сохранности лейкоцитов венозной крови доноров-добровольцев в условиях отрицательных температур (–20 и –80°C)

Лейкоциты	n	Показатели сохранности (число), $M \pm \sigma$		
		лейкоциты с мембраной, непроницаемой для эозина	гранулоциты	фагоцитирующие нейтрофилы
–20°C				
С глицерином	6	67 ± 2.5	64 ± 10.4	58 ± 3.8
С глицерином и ПФ	23	84 ± 3.4*	85 ± 8.3*	74 ± 4.4*
–80°C				
С глицерином	5	73 ± 7.1	68 ± 9.8	45 ± 4.3
С глицерином и ПФ	17	87 ± 3.7*	80 ± 8.7*	63 ± 4.4*

Примечание. Данные представлены в процентах по отношению к уровню до замораживания, принятому за 100%. * – отличие от значений показателя “лейкоциты с глицерином” значимо ($p < 0.05$).

нент смеси по отдельности. Поскольку, как отмечено выше, в составе водорастворимого полисахарида плодовых тел гриба *H. erinaceus* преобладают моносахаридные остатки галактозы и глюкозы, можно полагать, что их функция, особенно функция глюкозы, не ограничивается только криопротективным действием. Глюкоза – главный энергетический субстрат для роста клеток и при холодовом стрессе. Вероятно, она поддерживает их жизнеспособность в этом качестве легкодоступного источника энергии. Кроме того, способность ПФ *H. erinaceus* снижать температуру замерзания глицерина, даже на десятки доли градуса, по нашему мнению, может содействовать снижению риска повреждений клеток при замораживании. Известно, что смещение температуры кристаллизации воды в клетках в диапазон более низких температур на начальных этапах охлаждения, способствует постепенному “вымораживанию” воды с образованием мелкоячеистой и потому менее травматичной структуры льда (Белоус, Грищенко, 1994).

Важно отметить, что “вымораживание” клеточной воды в лед при охлаждении происходит постепенно. Это отражается на степени замедления метаболизма. Ранее было показано, что при –15...–20°C в присутствии широко используемых криопротекторов проникающего или непроникающего действия (5–20%-ной конечной концентрации) процессы метаболизма в клетках замедляются в малой степени, так как происходит кристаллизация только внеклеточной воды и свободной внутриклеточной воды, в то время как связанная и фиксированная воды остаются в незамерзшем состоянии (Сведенцов, Туманова, 2007). При малом замедлении метаболизма в условиях действия факторов холодового стресса клетки подвержены высокому риску повреждений, тогда при –80°C ста-

бильна кристаллизация большинства фракций воды (исключение составляет фиксированная вода). При этом метаболизм в клетках выражено замедляется. Поэтому на практике при заготовке клеточных субстанций осуществляется при данной температуре.

Для проверки гипотезы о снижении риска криоповреждения биообъектов путем комбинирования в замораживаемой среде 0.25% ПФ *H. erinaceus* с 3.5%-ным глицерином ядросодержащие клетки крови человека были подвергнуты охлаждению до –20 или до –80°C в течение 1 сут (табл. 2). Установлено, что способность ПФ *H. erinaceus* повышать криозащитный эффект глицерина сохраняется в широком температурном диапазоне (–20...–80°C).

Полученные результаты о сохранности лейкоцитов при замораживании в среде глицерина с ПФ *H. erinaceus* подтвердили наше предположение о том, что снижение температуры замерзания раствора глицерина в присутствии грибного полисахарида может способствовать снижению риска повреждений клеток при криоконсервации. Возможно, комплекс ПФ *H. erinaceus*–глицерин в условиях биологической среды способствует образованию новых связей с компонентами мембран клеток, что стабилизирует в них процессы кристаллизации воды и снижает риск криоповреждений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из плодовых тел искусственно культивированного ксилотрофного базидиального гриба *H. erinaceus* экстракцией горячей водой (70°C) с последующим осаждением 96%-ным этиловым спиртом была выделена ПФ. В составе углеводных цепей ПФ были идентифицированы остатки рамнозы, фукозы, ксилозы, арабинозы, маннозы,

глюкозы и галактозы в соотношении 7 : 8 : 1 : 19 : : 14 : 26 : 27 соответственно.

Добавление ПФ в водные растворы криопротекторов оказало влияние на процессы замерзания воды в венозной крови человека при ее криоконсервировании. Получены результаты о сохранности ядродержащих клеток крови человека в условиях отрицательных температур -20 , -80°C , которые свидетельствуют о способности ПФ гриба *H. erinaceus* взаимодействовать со льдом – нейтрализовать нуклеаторы льда, способствуя переохлаждению; снижать температуру замерзания жидкости, выполнять криопротекторную роль в отношении мембран клеток, модифицировать форму кристаллов льда и останавливать их рост. В свете современных исследований, посвященных поиску новых эффективных криозащитных сред, грибные полисахариды могут найти применение при разработке новых технологий сохранности биологических объектов в условиях температур электрических морозильников.

Работа выполнена в рамках НИР № 0767-2018-0012 “Изучить потенциал полифункционального действия мицелиальных микроорганизмов в региональных типах почв в целях создания новых препаратов для повышения адаптивности и экологической безопасности растениеводства и защиты окружающей среды от загрязнений” и № 0415-2016-003 “Влияние пектинов на функциональную сохранность клеток при замораживании”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Автономова А.В., Баканов А.В., Шуктуева М.И., Винокуров В.А., Попова О.В., Усов А.И., Краснопольская Л.М. Погруженное культивирование и химический состав мицелия *Hericium erinaceus* // Антибиотики и химиотерапия. 2012. № 57. С. 7–11.
- Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. Киев: Наукдумка, 1994. 432 с.
- Бильданова Л.Л., Салина Е.А., Шумный В.К. Основные свойства и особенности эволюции антифризных белков // Вавиловский журн. генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 250–270.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
- Линник Т.П., Мартынюк И.Н. Подходы к созданию криозащитных сред при криоконсервировании спермы птиц // Проблемы криобиологии. 2010. Т. 20. № 2. С. 109–122.
- Полежаева Т.В., Худяков А.Н., Сергушкина М.И., Широких И.Г., Широких А.А., Безмельцева О.М., Соломина О.Н., Зайцева О.О. Траметоидные трутовики Русской равнины как источник полисахаридов с криопротекторными свойствами // Теорет. и прикл. экология. 2017. № 3. С. 103–109.
- Сведенцов Е.П. Криоконсерванты для живых клеток. Сыктывкар: КомиНЦ УрО РАН, 2010. 80 с.
- Сведенцов Е.П., Туманова Т.В. Функциональное состояние лейкоцитов после выхода из криоанабиоза. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. 81 с.
- Шраго М.И., Гучок М.М., Калугин Ю.В., Ханина Л.А. О некоторых путях создания криопротекторов // Проблемы гематологии и переливания крови. 1981. Т. 16. № 6. С. 3–8.
- Bai Y.Z.C.Y., Jin-song Y.Q.Z. Isolation, purification and characteristics of polysaccharides from fruit body and mycelia of *Hericium erinaceus* // Mycosystema. 2001. V. 3. P. 020.
- Byung K.Y., Jun B.P., Chi H.S. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus* // Biosci. Biotech. Biochem. 2003. V. 67. № 6. P. 1292–1298.
- Han Z.H., Ye J.M., Wang G.F. Evaluation of in vivo antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides // Intern. J. Biol. Macromol. 2013. V. 52. P. 66–71.
- Kawahara H., Kawakami K., Obata H. Purification and characterization of antifreeze protein from a mushroom, *Flammulina velutipes* // Cryobiology. 2006. V. 53. № 3. P. 428.
- Kawahara H., Matsuda Y., Sakaguchi T., Arai N., Koide Y. Antifreeze activity of xylomannan from the mycelium and fruit body of *Flammulina velutipes* // Biocontrol Sci. 2016. V. 21. № 3. P. 153–159.
- Khudyakov A.N., Polezhaeva T.V., Zaitseva O.O., Günter E.A., Solomina O.N., Popeyko O.V., Shubakov A.A., Vetoshkin K.A. The cryoprotectant effect of polysaccharides from plants and microalgae on human white blood cells // Biopreserv. Biobanking. 2015. V. 13. № 4. P. 240–246.
- Kim D.M., Pyun C.W., Ko H.G., Park W.M. Isolation of antimicrobial substances from *Hericium erinaceum* // Mycobiol. 2000. V. 28. P. 33–38.
- Krzyszczkowski W., Malinowska E., Herold F. Erinacine A biosynthesis in submerged cultivation of *Hericium erinaceum*: quantification and improved cultivation // Eng. Life Sci. 2010. V. 10. № 5. P. 446–457.
- Liu C.P., Fang J.N., Xiao X.Q. Structural characterization and biological activities of SC4, an acidic polysaccharide from *Salvia chinensis* // Acta Pharmacol. Sinica. 2002. V. 23. № 2. P. 16–166.
- Lu L., Li J.L., Cang Y.H. PCR-based sensitive detection of medicinal fungi *Hericium* species from ribosomal internal transcribed spacer (ITS) sequences // Biol. Pharmaceut. Bull. 2002. V. 25. № 8. P. 975–980.
- Mau J.L., Lin H.C., Song S.F. Antioxidant properties of several specialty mushrooms // Food Res. Intern. 2002. V. 35. P. 519–526.
- Shimbo M., Kawagishi H., Yokogoshi H. Erinacine A increases catecholamine and nerve growth factor content in the central nervous system of rats // Nutrition Res. 2005. V. 25. № 6. P. 617–623.
- Wang J.C., Hu S.H., Lee T.M. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericium* spp. Kaoshing // J. Med. Sci. 2001. V. 17. № 9. P. 461–467.
- Wang M., Gao Y., Xu D.D., Gao Q.P. Physicochemical properties and antigastric ulcer activity of *Hericium erinace-*

- um* polysaccharide // Food Sci. Technol. 2015. V. 40. № 6. P. 224–227.
- Wang Z., Luo D., Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. // Carbohydrate Polymers. 2004. V. 57. № 3. P. 241–247.
- Wasser S.P. Medicinal mushroom science: current prospects, advances, evidences, and challenges // Biosphere. 2015. V. 7. № 2. P. 238–248.
- York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components // Meth. Enzymol. 1985. V. 118. № 3. P. 4019.
- Zhang Z., Lva G., Pana H., Pandeyb A., Hec W. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-polysaccharides from *Hericium erinaceus* grown on tofu whey // J. Biol. Macromol. 2012. V. 51: I. № 5. P. 1140–1146.

Cryoprotective Properties of the Polysaccharide Fraction of the Mushroom *Hericium erinaceus* BP 16

I. G. Shirokikh^{1, #}, T. V. Polezhaeva², A. A. Shirokikh¹, A. N. Khudyakov², M. I. Sergushkina²,
Ja. I. Nazarova¹, and I. G. Paturova³

¹Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnickiy, ul. Lenina 166a, Kirov, 610007 Russia

²Institute of Physiology of Komi Scientific Center of Ural branch of RAS, ul. Pervomayskaya 50, Syktyvkar, 167982 Russia

³Kirov State Medical University, ul. Karla Marxa 112, Kirov, 610027 Russia

[#]e-mail: irgenal@mail.ru

The natural isolate of xylotrophic basidiomycetes *Hericium erinaceus* BP 16 was artificially cultivated to produce fruiting bodies from which the polysaccharide-containing fraction (PF) was isolated by extraction with hot water (70°C), followed by precipitation with 96% ethanol. Residues of rhamnose, fructose, xylose, arabinose, mannose, glucose and galactose in the ratio of 7 : 8 : 1 : 19 : 14 : 26 : 27, respectively, were identified in the composition of the PF carbohydrate chains. The effect of adding PF to aqueous solutions of cryoprotectants on the freezing of water in human venous blood during its cryopreservation is shown. It was found that the presence of PF (0.25%) in a preservative containing glycerin (3.5%) ensures the safety of human nuclear blood cells at –20°C and –80°C, which indicates the cryoprotective activity of PF *H. erinaceus* BP 16.