

ПРИРОДНЫЕ
ПОЛИМЕРЫ

УДК 541.64:547.458

ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИСАХАРИДА ИЗ МЕСТНОРАСТУЩЕГО
И КУЛЬТИВИРУЕМОГО БАЗИДИАЛЬНОГО СЫРЬЯ
GANODERMA LUCIDUM

© 2023 г. С. Б. Хайтметова^{а,*}, А. С. Тураев^а, Г. А. Халилова^а,
Б. И. Мухитдинов^а, С. Р. Маккамбоева^а

^аИнститут биоорганической химии им. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан
100125 Узбекистан, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83

*e-mail: xsb75@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принята к публикации 20.10.2023 г.

В результате исследования из базидиомицетного сырья местнорастущей и культивируемой *Ganoderma lucidum*, выделены разветвленные полисахариды. Установлено, что выделенные фракции содержат разветвленные полисахариды в виде комплексов с меланином. После очистки полисахаридов методом ионообменной хроматографии из местнорастущего и культивируемого базидиального сырья получили две фракции: нейтральные полисахариды местнорастущего *Ganoderma lucidum* (GW-1), культивируемого *Ganoderma lucidum* (GWL-1) с выходом 25.71 и 29.85% соответственно, и анионные полисахариды местнорастущего *Ganoderma lucidum* (GW-2), культивируемого *Ganoderma lucidum* (GWL-2), с выходом 5.26 и 4.19%. Изучены физико-химические свойства полученных образцов методами ИК- и УФ-спектроскопии. Установлена степень чистоты фракций разветвленных полисахаридов. Методами газовой хроматографии, одномерной (ЯМР ^{13}C , ЯМР ^1H) и двумерной (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) ЯМР-спектроскопии установлены состав и молекулярная структура полученных образцов полисахаридов. Результаты показали, что выделенные и очищенные полисахариды представляют собой разветвленные полисахариды β -глюканового типа, которые имеют точки разветвления (1,4,6)- и (1,3,6)-связанных глюкопиранозных остатков.

DOI: 10.31857/S2308112023600084, EDN: DDDUQO

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день в мире ведутся научные исследования по поиску природных источников, богатых биологически активными соединениями, по выделению из них биологически активных веществ, а также по определению их структуры и биологической активности. В связи с этим особое внимание уделяется разработке методов выделения биологически активных веществ из базидиальных грибов (*Ganoderma lucidum* (Curt Fr.), являющихся одним из перспективных объектов, определению структуры и биологической активности полученных биологически активных соединений, а также созданию лекарственных средств на их основе, обладающих иммуномодулирующей и противоопухолевой активностями.

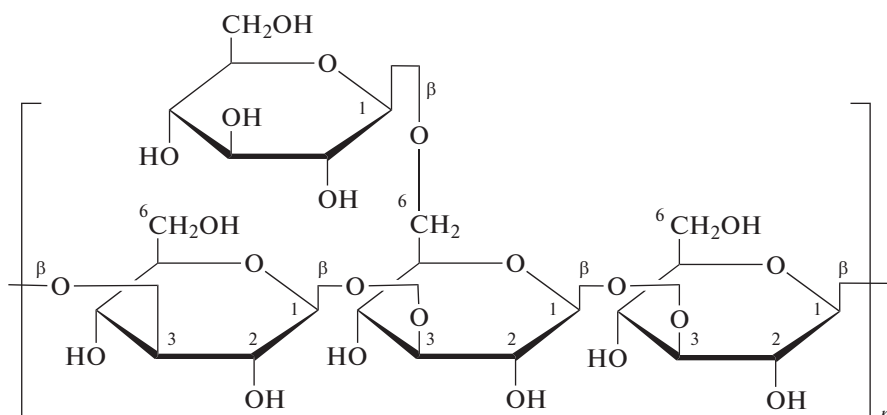
Базидиальные грибы в последние годы становятся предметом для глубокого исследования с точки зрения поиска новых противоопухолевых и различных биологически активных лекарственных веществ.

После получения данных о составе клеточных стенок базидиальных грибов у исследователей появился большой интерес к имеющимся в их составе полисахаридам. Полисахариды являются одним из важнейших компонентов органических соединений, которые участвуют во многих биологических процессах. Многочисленные исследования показали, что противораковые свойства биологически активных соединений, выделенных из грибов, в основном имеют разветвленную структуру [1–4].

При исследовании структуры установлено, что большинство полисахаридов, выделенных из грибов, обладающих противораковыми свойствами, представляют собой глюканы с (1,3), (1,6) гликозидными связями [5]. β -D-глюканы состоят из линейной или разветвленной цепи, состоящей из молекул глюкозы, и боковой цепи, содержащей комбинацию других простых сахаров. Полисахариды, содержащиеся в базидиальных грибах, накапливаются в плодовых телах, спорах, и особен-

но высока их концентрация в мицелии. Эти полисахариды, как сказано выше, различаются по своей химической структуре, но все имеют β -(1,3)-глюкановые группы в основной цепи и β -(1,6)-

глюкановые группы в разветвленных участках, которые отвечают за биологическую активность. Структура β -глюканов базидиальных грибов приведена ниже.



Исследование структурных характеристик полисахаридов представляет собой сложную задачу с точки зрения физико-химических и структурных показателей [6]. Гель-проникающая хроматография сочетается с детектором многоуглового лазерного рассеяния. В гелевой колонке макромолекулы полисахаридов начинают разделяться по относительной молекулярной массе [7].

В настоящее время часто применяют хромато-масс-спектрометрию для структурного анализа полисахаридов. Использование этого метода позволяет за один анализ смеси получить сведения о временах удерживания ее компонентов, об их относительном содержании в смеси, а также масс-спектры каждого компонента смеси [8].

Анализ состава моносахаридов имеет решающее значение для изучения структуры полисахаридов. Моносахариды, высвобождающиеся в результате гидролиза, могут быть идентифицированы и количественно охарактеризованы с помощью различных методов, таких как анионообменная, газовая хроматография, обращенно-фазовая ВЭЖХ [9].

Характеристика разветвления полисахаридов является одним из важных молекулярных параметров, которая определяет различные физико-химические свойства полисахаридов. Разветвленные полисахариды могут иметь различную структуру, положение разветвления может быть случайным или равномерно распределено по основной цепи или цепи разветвления [10].

Для установления структуры полисахаридов применяют ИК- и ЯМР-спектроскопию. Последняя подтверждает наличие гликозидных связей в структуре полисахарида и количества моносахаридов в повторяющейся структуре, включая идентификацию моносахарида, альфа- или бета-

связи, тип гликозидной связи и повторяющиеся единичные последовательности полисахаридной цепи [11].

Молекулы полисахаридов могут образовывать трехмерные сетчатые структуры через водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса, ковалентные связи и т.д. Более того, полисахаридная цепь имеет большую степень свободы и гибкости. Эти особенности делают пространственную конформацию полисахаридов очень сложной. Исследования все чаще показывают, что биологическая активность полисахаридов не только связана с первичными структурами, но также зависит от структуры и разветвления [12, 13]. В связи с этим большое значение имеет анализ структуры полисахаридов. Дополнительными методами изучения структуры полисахаридов являются атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, хроматография с круговым дихроизмом, рентгеновская дифракция и т.д.

Цель настоящей работы — выделение разветвленных полисахаридов из местнорастущего и культивируемого базидиального гриба *Ganoderma lucidum*, определение их физико-химических свойств, макромолекулярной структуры и биологической активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение водорастворимых полисахаридов

В качестве природного сырья для извлечения водорастворимых полисахаридов нами были выбраны базидиальные трутовые грибы трутовик лакированный (также возможны названия Линчжи или Рейши) (лат. *Ganoderma lucidum*) — гриб рода *Ganoderma*, в настоящее время включаемого в семейство Polyporaceae, собранный в местах

естественного произрастания на территории Узбекистана в Бустанлыкском районе, а также *Ganoderma lucidum*, полученный методом культивирования.

*Культивирование гриба *Ganoderma lucidum**

Из чистых культур плодовых тел данного гриба впервые методом культивирования получен местный штамм — *Ganoderma lucidum*.

Для выделения мицелиальных культур из плодовых тел последние тщательно очищают, промывают, обжигают над пламенем горелки и в асептических условиях берут кусочек из внутренней части (размером 3 мм), помещают на поверхность плотной питательной среды в чашке Петри. Молодой мицелий базидиального гриба появлялся на седьмые–восьмые сутки с момента посева на среды.

При культивировании на искусственных субстратах данного местного штамма получено 10% от сухой массы субстрата. Грибы выращивали методом культивирования шелуха (хлопковая) + 5% отруби пшеницы, урожай 10% от сухой массы.

В качестве носителя для мицелия использовали зерно злаковых культур (пшеницы). Из данного мицелия были выращены базидиальные грибы рода *Ganoderma lucidum*.

Для выделения водорастворимых полисахаридов из природного сырья использовали высушенные, измельченные, обезжиренные трутые тела, взвешивали и экстрагировали трижды горячей водой на кипящей водяной бане с обратным холодильником (при суммарном соотношении сырья и экстрагента 1 : 20, 1 : 15, 1 : 10). Суммарная продолжительность трех экстрагирований 6 ч. Полученные водные экстракты объединяли, фильтровали и упаривали на ротаторном испарителе при температуре 50°C до 1/5 первоначального объема и лиофилизировали.

Ионообменная хроматография

Образец водорастворимого полисахарида (100 мг) растворяли в 5 мл дистиллированной воды и наносили на колонку (14 × 3 см) с DEAE-целлюлозой 52 (“Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Германия). Элюирование полисахаридов проводили последовательно 0–1 М градиентным раствором NaCl со скоростью 60 мл/ч. Отбирали фракции объемом по 10 мл. Выход полисахаридов из колонки контролировали фенол-сернокислотным методом. Фракцию, соответствующую отдельным пикам, объединяли, концентрировали, диализовали и лиофильно высушивали.

Эксклюзионно-жидкостная хроматография

Молекулярно-массовые характеристики водорастворимых полисахаридов определяли на жид-

костном хроматографе “Agilent 1260 Infinity” с использованием хроматографической колонки “PLAqualgelOHMixed” (Англия) длиной 300 мм и внутренним диаметром 8 мм.

ИК-спектроскопия

ИК-спектры исследуемых образцов снимали на ИК-фурье-спектрометре “IRTracer-100” (“Shimadzu Corp”, Япония, 2017) в диапазоне частот 400–4000 см⁻¹ [14].

Исследование структуры методом метилирования

Навеску полисахарида 5 мг растворяли в диметилсульфоксиде 1 мл, прибавляли тонкоизмельченный гидроксид натрия 30–40 мг и далее при перемешивании приливали CH₃I — 0.5 мл. Реакционную смесь выдерживали 1 ч, приливали хлороформ 5 мл, промывали несколько раз водой, после чего хлороформный раствор упаривали и остаток гидролизовали нагреванием с 1 мл 2М раствора трифторуксусной кислоты при 100°C в течение 8 ч. Кислоту отгоняли упариванием с этанолом, полученные метилированные производные моносахаридов переводили в ацетаты полиолов и идентифицировали с помощью хромато-масс-спектрометрии известным методом [15].

ЯМР-спектроскопия

Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре “JNM-ECZ600R” (“JEOL”, Япония) при рабочей частоте 600 МГц, для ¹H в растворах D₂O. В качестве внутреннего стандарта в спектрах ЯМР ¹H использовали сигнал воды (4.8 м.д.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для предварительной очистки исходного сырья измельченное плодовое тело базидиального гриба *Ganoderma lucidum* экстрагировали обезжиривающим реагентом, который приводит к удалению липидов, частично протеинов, моно- и олигосахаридов, красящих веществ и неорганических примесей, при этом выход примесей у местнорастущего базидиального гриба составил 3.6%, а культивируемого — 4.39%. После обессмоливания сырья для выделения из него водорастворимых полисахаридов провели последовательную экстракцию сырья водой и лиофилизировали. Выход полисахаридов из местнорастущего базидиального гриба составил 15.16%, из культивируемого — 16.47%. Выделенные полисахариды представляют собой порошок кремового цвета, который хорошо растворяется в воде, при низкой концентрации образует опалесцирующий раствор, а при высокой концентрации образует вязкий раствор.

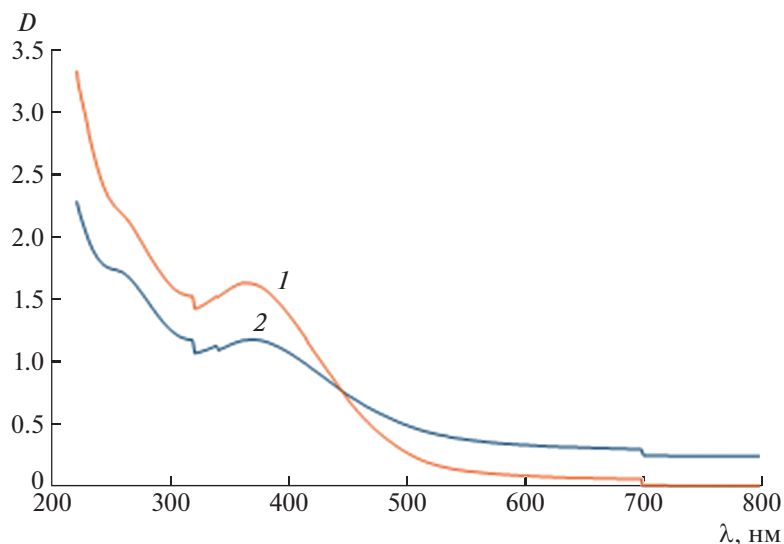


Рис. 1. УФ-спектр водорастворимых фракций полисахаридов, выделенных из местнорастущего GW (1) и культивируемого GWL (2) базидиомицетного сырья. Цветные рисунки можно посмотреть в электронной версии.

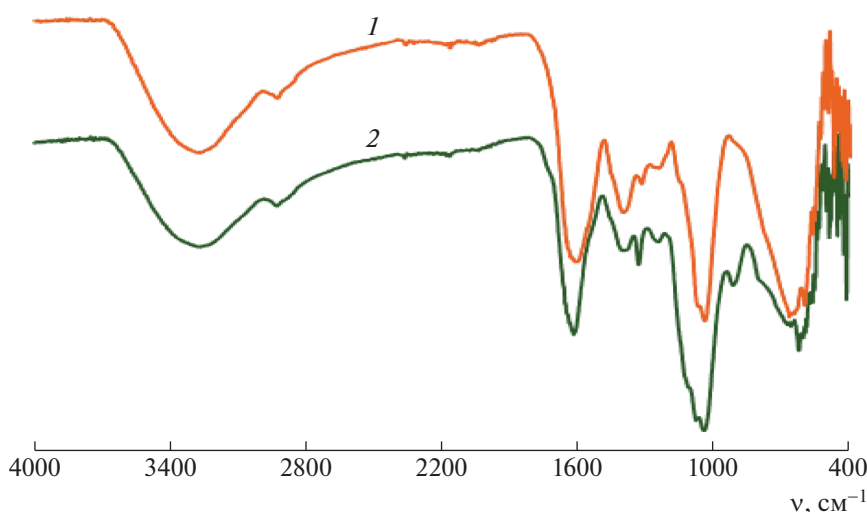


Рис. 2. ИК-спектры выделенных водных фракций GW (1) и GWL (2) полисахаридов.

Был проведен УФ-спектральный анализ на содержание меланина во фракциях местнорастущего и культивируемого базидиомицетного сырья (рис. 1). Как видно на рис. 1, в области 320–360 нм наблюдаются пики, которые соответствуют присутствию в образцах меланина, т.е. образцы полисахаридов находятся в виде комплекса полисахаридов и меланина, что согласуется с литературными данными [16]. В водорастворимой фракции 1 (местнорастущего сырья) пик более интенсивный, и количество меланина в данной фракции больше, чем во фракции 2, выделенной из культивируемого сырья, в которой меланина меньше.

Для дальнейшего изучения выделенных фракций полисахаридов провели исследования мето-

дом ИК-спектроскопии, которая является чувствительным методом к различным функциональным группам в молекулах полимеров и широко применяется для определения карбоксильных групп в полисахаридах.

ИК-спектры выделенных фракций полисахаридов представлены на рис. 2. В спектрах полученных образцов наблюдались соответствующие полисахаридам полосы поглощения 3300, 2950, 1600, 1420–1380, 1200–750 см^{-1} . В областях 1620 и 1420–1380 см^{-1} присутствуют полосы поглощения, соответствующие полисахаридам. В области 1200–950 см^{-1} наблюдались полосы поглощения валентных колебаний, относящиеся к связям С–О

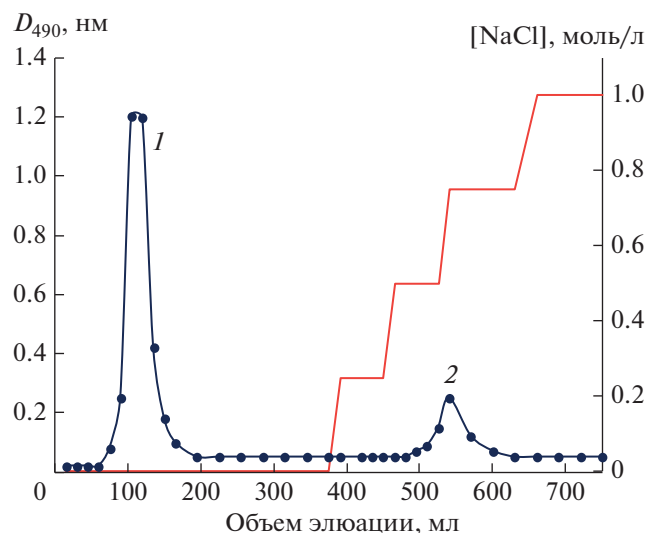


Рис. 3. Ионообменная хроматограмма полисахаридов GW-1 и GW-2 в целлюлозной колонке DEAE-52. Здесь и на рис. 4 элюент: градиентный раствор NaCl 0–1.0 моль/л, скорость элюирования: 1 мл/мин.

и С–С [17]. 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 данной области очень хорошо видны структурные различия полисахаридов. В спектре полисахарида присутствует полоса $898\text{--}900\text{ см}^{-1}$, свидетельствующая о наличии β -типа связи: β - (1–3), β - (1–6) [18, 19].

Для исследования структуры необходимо использовать чистые фракции полисахаридов. В связи с этим полученные водорастворимые полисахариды были дополнительно очищены методами ионного обмена и гель-хроматографии.

Для дальнейшей очистки полисахариды были пропущены через колонку с DEAE-целлюлозой. Их сначала промывали в дистиллированной воде, затем добавляли 0.1 М раствор NaCl. Со временем концентрация раствора NaCl возрастала до 1.0 М. Нейтральные и анионные полисахариды были разделены при промывке дистиллированной водой и градиентом NaCl соответственно. При этом выход нейтральных полисахаридов фракции полисахаридов из местнорастущего гриба GW-1 составил 25.71%, анионных полисахаридов GW-2 – 5.26%.

На рис. 3 представлены полученные после разделения фракции GW из местнорастущего базидиомицетного сырья нейтральные полисахариды GW-1 и анионные полисахариды GW-2.

После очистки полисахаридов методом ионообменной хроматографии получили две фракции полисахаридов GWL-1 и GWL-2 (рис. 4). При этом выход нейтральных полисахаридов GWL-1 составил 29.85%, анионных GWL-2 – 4.19%. При сравнении выхода нейтральных и анионных полисахаридов из дикорастущего и культивируемого вида сырья оказалось, что разница в выходе незначительная и составляет всего 1.5%.

Для определения гомогенности фракций исходных полисахаридов, а также очистки их от сопутствующих примесей с целью дальнейшего изучения их состава и строения углеводных цепей

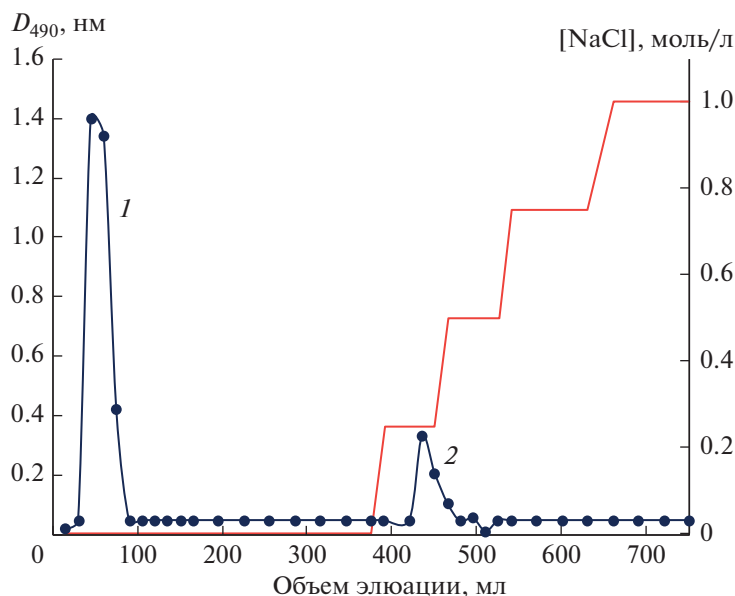


Рис. 4. Ионообменная хроматограмма полисахаридов GWL-1, GWL-2 в целлюлозной колонке DEAE-52.

Таблица 1. Количество углеводов после фракционирования

Базидиальный гриб <i>Ganoderma lucidum</i>	Растворитель	Полисахарид	Количество полисахарида, %	Примеси, %
Местнорастущий	Вода	GW-1	99.41	0.60
	0.1 М NaCl	GW-2	65.01	69.99
Культивированный	Вода	GWL-1	99.32	0.70
	0.1 М NaCl	GWL-2	79.54	67.50

Таблица 2. Молекулярно-массовые параметры полисахаридов

Базидиальный гриб <i>Ganoderma lucidum</i>	Фракция	$M \times 10^{-3}$	M_w/M_n
Местнорастущий	Водная фракция (GW)	12.3	1.5
	Нейтральный полисахарид (GW-1)	17.7	1.4
	Анионный полисахарид (GW-2)	10.5	1.5
Культивированный	Водная фракция (GWL)	10.9	1.5
	Нейтральный полисахарид (GWL-1)	10.3	1.5
	Анионный полисахарид (GWL-2)	9.8	1.2

проведена гель-хроматография на сефадексе G-75. В процессе разделения было установлено, что каждый образец полисахарида состоял из однородных полисахаридов.

После очистки полисахаридов фенол-серно-кислотным методом определили количество углеводов в образцах, результаты которых представлены в табл. 1. Как видно, количество углеводов в нейтральных фракциях больше, чем в анионных фракциях. Количество полисахаридов в нейтральных фракциях в культивируемом и местнорастущем сырье одинаково.

Далее были определены молекулярно-массовые характеристики полученных фракций с помощью метода гель-фильтрации. В табл. 2 приведены молекулярно-массовые параметры полисахаридов водной фракции.

Результаты показывают, что молекулярная масса образцов водной фракции (GW, GW-1, GW-2, GWL, GWL-1, GWL-2) находится в пределах 9800–17700, ММР – в интервале 1.2–1.5.

Из табл. 2 следует, что образцы характеризуются относительно небольшим значением полидисперсности, что указывает на гомогенность полисахаридов. Образцы из местнорастущего и культивированного сырья по молекулярной массе сильно не отличаются друг от друга.

Для анализа структуры связей полисахаридов широко применяется метод метилирования с использованием метилиодида для преобразования всех свободных гидроксильных групп молекул полисахарида в метоксигруппы. Метилированный полисахарид гидролизуют до моносахаридов и восстанавливают с помощью бородегтеридата натрия. Восстановленные моносахариды ацети-

руют уксусным ангидридом с образованием летучих продуктов – частично метилированных ацетатов альдитов. Для идентификации и количественного определения частично метилированных ацетатов альдитов их анализируют методами газовой хроматографии и масс-спектрометрии (ГХ-МС) [9, 20, 21].

Типы связывания моносахаридных единиц в полисахаридах были идентифицированы посредством метилирования. Индивидуальность и характер фрагментации перметилованных альдитолацетатов детектировали с помощью масс-спектров и относительного времени удерживания в газовой хроматографии. Процент метилированных сахаров оценивался как отношение площадей пиков. Анализ ГХ-МС перметилованных альдитолацетатов представлен в табл. 3. Анализ ГХ-МС показал, что перметилованные альдитолацетаты, полученные из GW-1 и GWL-1, содержат 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюцитол, 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метил-глюцитол, 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метил-глюцитол, 1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилглюцитол, 1,4,5,6-тетра-О-ацетил-2,3-ди-О-метилглюцитол и 1,3,5,6-тетра-О-ацетил-2,4-ди-О-метил-глюцитол. Полученные результаты доказывают, что полисахариды GW-1 и GWL-1 состоят из концевых (1,3)-связанных, (1,4)-связанных, (1,6)-связанных, (1,4,6)-связанных и (1,3,6)-связанных глюкопиранозильных остатков.

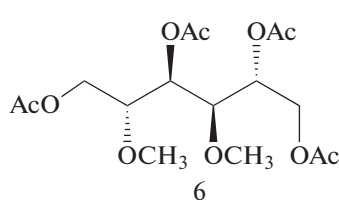
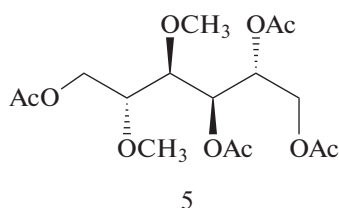
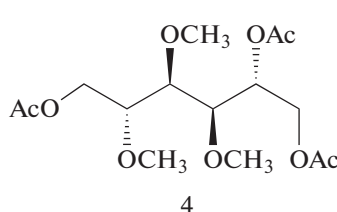
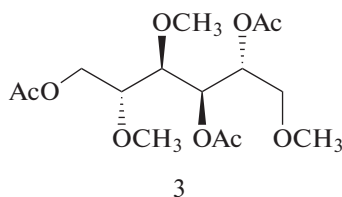
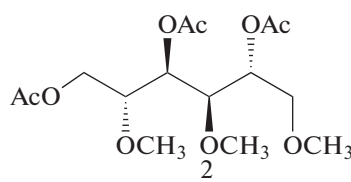
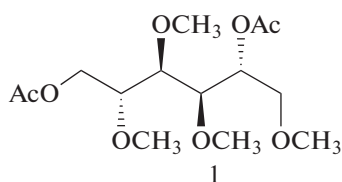
Ниже показаны перметилованные альдитолацетаты из GW-1 и GWL-1 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюцитол (1), 1,3,5-три-О-ацетил-2,4,6-три-О-метил-глюцитол (2), 1,4,5-три-О-ацетил-2,3,6-три-О-метил-глюцитол (3),

Таблица 3. Результаты ГХ-МС метилированных полисахаридов GW-1 и GWL-1, выделенных из природного и культивируемого *Ganoderma lucidum*

Метилированный сахар	Гликозидные связи	Молярное соотношение		Основные массовые фрагменты (m/z)
		GW-1	GWL-1	
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	1-связанный Glc	3.0	2.0	43,45,71,87,102,118,129,145,161,162,205
2,4,6-Me ₃ -Glc	1,3-связанный Glc	1.0	3.0	43,45,71,87,101,118,129,161,174,217,234,277
2,3,6-Me ₃ -Glc	1,4-связанный Glc	1.0	1.0	43,45,71,87,102,113,118,129,162,173,233,277
2,3,4-Me ₃ -Glc	1,6-связанный Glc	1.0	3.0	43,59,71,87,99,102,118,129,162,189,233
2,3-Me ₂ -Glc	1,4,6-связанный Glc	1.0	1.0	43,85,102,118,127,162,201,261,305
2,4-Me ₂ -Glc	1,3,6-связанный Glc	2.0	1.0	43,87,102,118,129,189,234,305

1,5,6-три-О-ацетил-2,3,4-три-О-метилглюцитол (4),
1,4,5,6-тетра-О-ацетил-2,3-ди-О-метилглюцитол (5)

и 1,3,5,6-тетра-О-ацетил-2,4-ди-О-метил-глюцитол (6).



Было определено, что остатки в полисахаридах GW-1 и GWL-1 находятся в молярном соотношении 3.0 : 1.0 : 1.0 : 1.0 : 1.0 : 2.0 и 2.0 : 3.0 : 1.0 : 3.0 : 1.0 : 1.0 соответственно. Результаты показали, что выделенные и очищенные полисахариды представляют собой разветвленные полисахариды β -глюканового типа, которые имеют точки разветвления (1,4,6) – и (1,3,6)-связанных глюкопиранозных остатков.

Спектры ЯМР ¹³C содержат ценную информацию о функциональном составе полисахаридов, положениях межмономерных связей, размерах циклов моносахаридных остатков, конфигурациях гликозидных центров и последовательности

моносахаридов в цепи. Из этих спектров можно определить абсолютные конфигурации отдельных моносахаридных остатков (если известны конфигурации соседних звеньев), а также получить данные о регулярном строении полисахаридов. Если известен моносахаридный состав линейного регулярного полисахарида, построенного из повторяющихся олигосахаридных звеньев, то задача установления его полного строения по спектру ЯМР успешно решается с помощью соответствующих компьютерных программ [22]. В связи с этим дальнейшее изучение моносахаридных последовательностей и структуры полисахаридов GW-1 и GWL-1, очищенных из природного и культивируемого сырья базидиомицетов, были

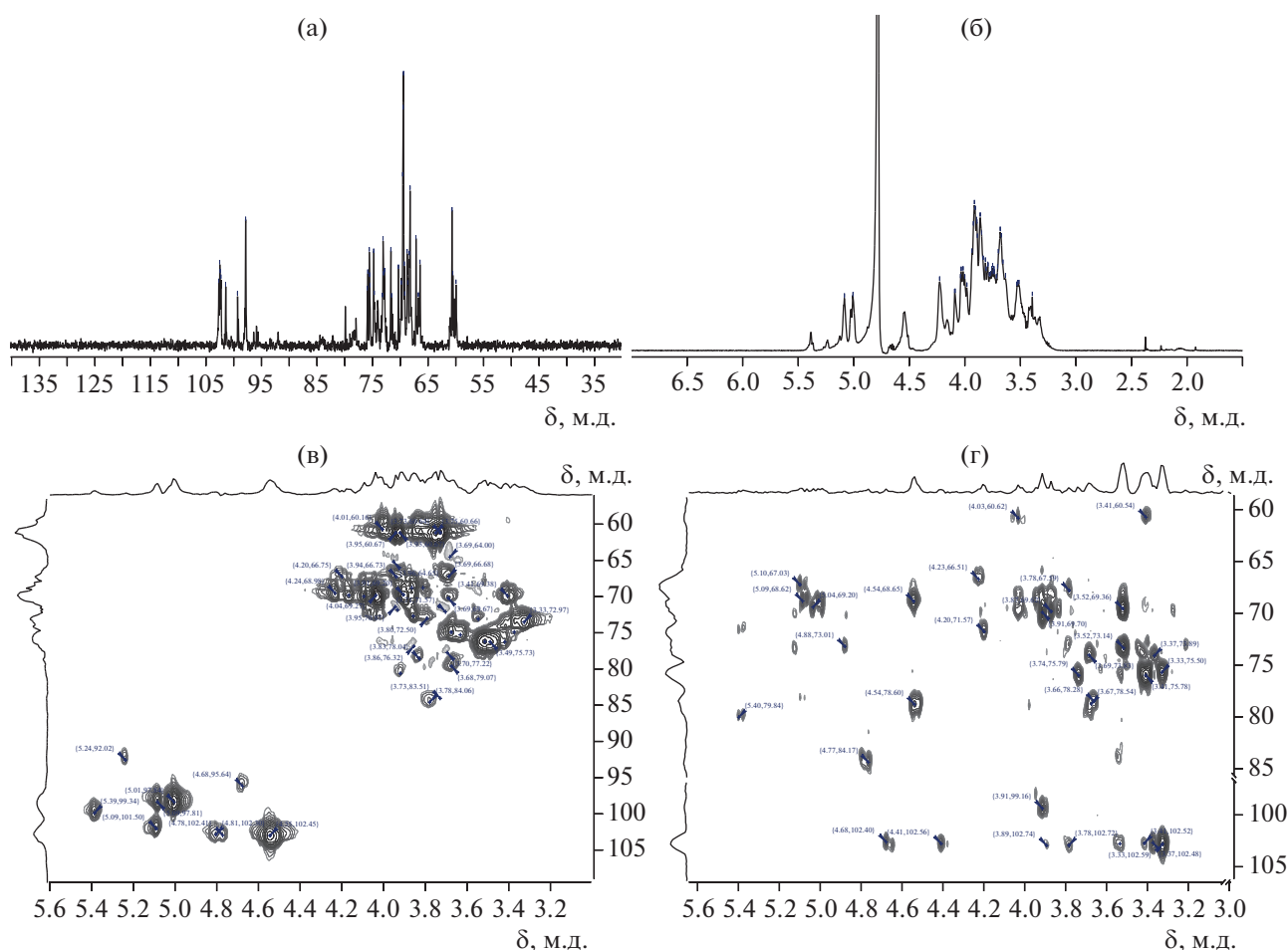


Рис. 5. Спектры ЯМР ^{13}C (а), ЯМР ^1H (б), HSQC (в) и HMBC (г) полисахарида GW-1.

изучены с использованием одномерной (ЯМР ^{13}C , ЯМР ^1H) и двумерной (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY) ЯМР-спектроскопии (рис. 5 и 6). Химические сдвиги ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C для GW-1 и GWL-1 представлены в табл. 4 и 5 соответственно.

Спектры ЯМР ^1H GW-1 и GWL-1 показали, что оба полисахарида имеют шесть аномерных сигналов, наблюдаемых при 4.42–5.09 м.д. Это указывает на то, что глюкопиранозильные звенья полисахаридов обладают β -конфигурацией. Приведенные результаты согласуются с данными ИК-спектроскопии. Кроме того, β -конфигурация моносахаридных остатков полисахаридов подтверждается спектрами ЯМР ^{13}C , в которых характерные сигналы для аномерных атомов углерода C-1 появляются при 97.84–102.75 м.д.

Химические сдвиги аномерных протонов остатков 1,3-Glcp (остаток А) GW-1 и GWL-1 были обнаружены при 4.81 и 4.42 м.д.; это указывает на то, что остаток является β -связанным. В спектрах GW-1 характерные резонансы для 1,3-Glcp H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 обнаруже-

ны при 3.92/80.07, 3.73/83.51, 3.69/66.68, 3.70/77.22, 3.75/60.66 м.д. соответственно. В спектрах GWL-1 характерные резонансы для H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 3.46/73.18, 3.67/85.78, 3.49/68.00, 3.30/75.54, 3.92/69.44 м.д. Исследования HMBC и NOESY показали, что остаток 1,3-Glcp GW-1 связан с 1,3,6-Glcp посредством β -(1,3)-гликозидной связи. Кроме того, спектр HMBC GWL-1 свидетельствует о том, что остатки 1,3-Glcp связаны друг с другом и с 1,3,6-Glcp посредством β -(1,3)-гликозидных связей.

В спектрах остатков 1,3,6-Glcp (остаток В) GW-1 и GWL-1 специфические сигналы аномерного протона проявлялись при 4.78 и 4.64 м.д., указывая на то, что остатки имеют β -конфигурацию. В спектрах GW-1 характерные резонансы для 1,3,6-Glcp H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 определены при 3.68/79.07, 3.78/84.06, 3.94/66.73, 3.67/74.32, 3.91/69.30 м.д. соответственно. В спектрах GWL-1 специфические сигналы для 1,3,6-Glcp H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 3.46/73.18,

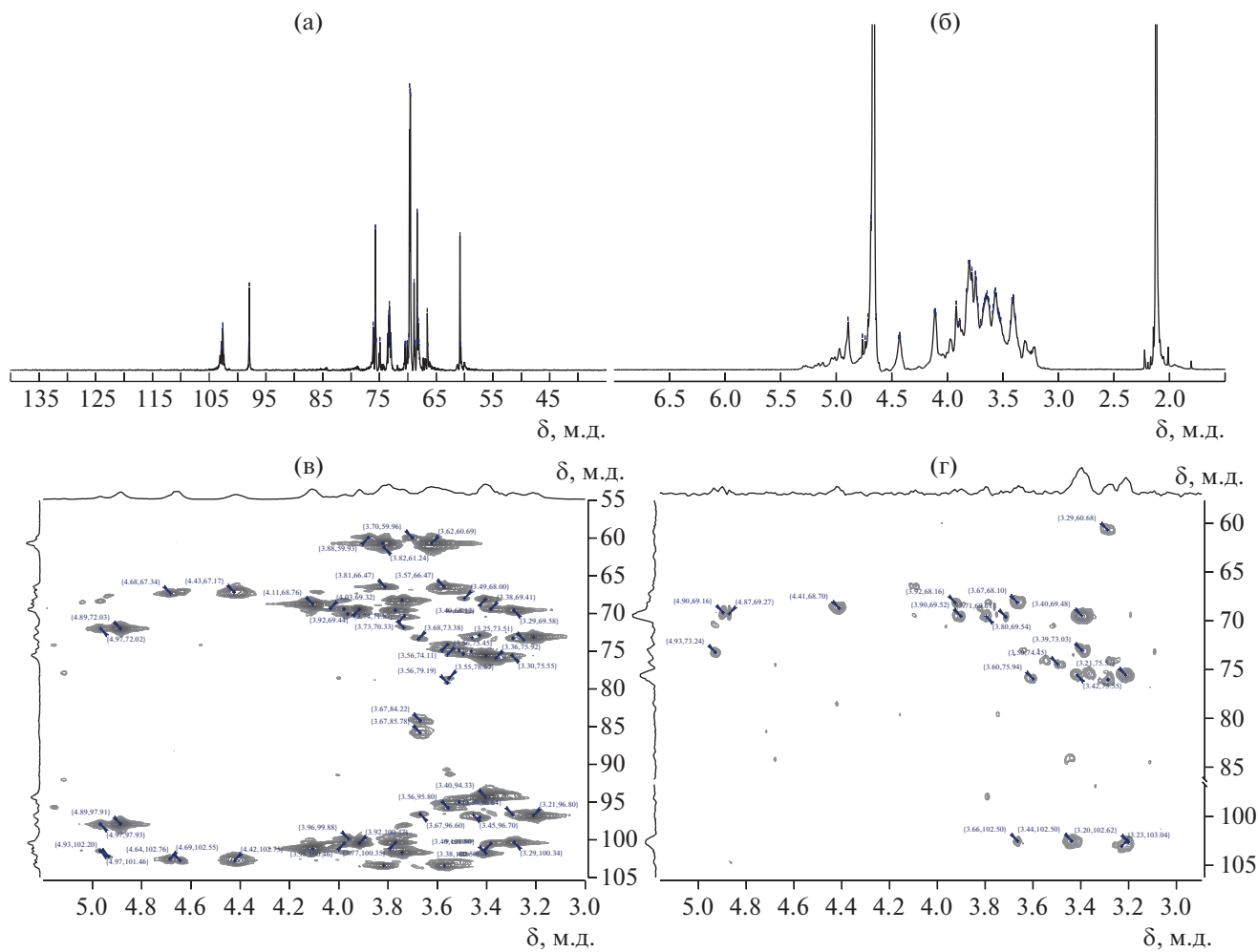


Рис. 6. Спектры ЯМР ¹³C (а), ЯМР ¹H (б), HSQC (в) и HMBC (г) полисахарида GWL-1.

3.67/85.78, 3.49/68.00, 3.30/75.54, 3.92/69.44 м.д. Эксперименты HMBC и NOESY показали, что остатки 1,3,6-Glcp в GW-1 связаны друг с другом и остатком 1,3-Glcp посредством β(1,3)-гликозидной связи и с 1-Glcp-, 1,6-Glcp- и 1,4,6-Glcp-

остатки по β-(1,6)-, β-(1,6)- и β-(1,4)-гликозидным связям. Кроме того, остаток в GWL-1 связан с 1,3,6-Glcp, 1,6-Glcp- и 1,4,6-Glcp-остатками посредством β-(1,3)-, β-(1,6)- и β-(1,4)-гликозидной связи.

Таблица 4. Химические сдвиги ЯМР ¹H и ЯМР ¹³C для GW-1, выделенного из природного Ganoderma lucidum

Остаток гликозидной связи	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
1,3-Glcp (A)	4.81/102.30	3.92/80.07	3.73/83.51	3.69/66.68	3.70/77.22	3.75/60.66
1,3,6-Glcp (B)	4.78/102.41	3.68/79.07	3.78/84.06	3.94/66.73	3.67/74.32	3.91/69.30
1,4-Glcp (C)	5.01/97.84	3.33/72.97	3.52/75.68	3.68/79.07	3.49/75.73	3.73/60.64
1,4,6-Glcp (D)	5.09/101.50	3.55/72.56	3.42/75.71	3.83/78.04	3.38/74.35	4.04/69.27
Терминал-Glcp (E)	4.55/102.45	3.86/72.15	3.64/74.75	3.71/71.57	3.86/76.32	4.01/60.16
1,6-Glcp (F)	4.88/100.27	3.80/72.50	3.52/74.68	3.69/69.67	3.51/75.31	3.87/68.26

Таблица 5. Химические сдвиги ЯМР ^1H и ЯМР ^{13}C для GWL-1, выделенного из культивированной *Ganoderma lucidum*

Остатки гликозидной связи	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
1,3-Glcp (A)	4.42/102.75	3.21/73.12	3.67/84.22	3.40/68.12	3.46/75.01	3.70/59.96
1,3,6-Glcp (B)	4.64/102.76	3.46/73.18	3.67/85.78	3.49/68.00	3.30/75.54	3.92/69.44
1,4-Glcp (C)	4.89/97.91	3.43/72.90	3.40/75.59	3.56/79.19	3.56/75.45	3.82/60.69
1,4,6-Glcp (D)	4.93/102.20	3.56/74.11	3.42/75.71	3.55/78.57	3.54/76.31	3.77/69.57
Терминал-Glcp (E)	4.97/101.46	3.68/73.38	3.50/75.37	3.74/71.87	3.66/75.14	3.88/59.93
1,6-Glcp (E)	4.69/102.55	3.68/73.38	3.51/74.89	3.96/70.05	3.51/75.31	4.11/68.76

Спектроскопическими исследованиями остатков 1,4-Glcp (остаток C) в GW-1 и GWL-1 установлено, что остатки присутствуют в β -конфигурации. В спектрах GW-1 специфические сигналы для 1,3,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 проявляются при 5.01/97.84, 3.33/72.97, 3.52/75.68, 3.68/79.07, 3.49/75.73, 3.73/60.64 м.д. В спектрах GWL-1 сигналы для 1,3,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, H4/C4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 4.89/97.91, 3.43/72.90, 3.40/75.59, 3.56/79.19, 3.56/75.45, 3.82/60.69 м.д. соответственно. Исследования НМБС и NOESY показали, что остаток 1,4-Glcp в образцах GW-1 и GWL-1 связан с 1-Glcp- и 1,4,6-Glcp-остатками посредством β -(1,4)- и β -(1,6)-гликозидных связей.

Дальнейшими исследованиями установлено, что остатки 1,4,6-Glcp (остаток D) GW-1 и GWL-1 также имеют β -конфигурацию. В спектрах GW-1 резонансы 1,4,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 5.09/101.50, 3.55/72.56, 3.42/75.71, 3.83/78.04, 3.38/74.35, 4.04/69.27 м.д. Из спектров GWL-1 сигналы 1,4,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 расположены при 4.93/102.20, 3.56/74.11, 3.42/75.71, 3.55/78.57, 3.54/76.31, 3.77/69.57 м.д. соответственно. Анализ НМБС и NOESY показал, что остатки 1,4,6-Glcp как в GW-1, так и в GWL-1, связаны с остатками 1,3,6-Glcp-, 1,4-Glcp- и 1,3-Glcp по β -(1,4)-, β -(1,6)- и β -(1,3)-гликозидным связям.

В спектрах GW-1 и GWL-1 были обнаружены концевые остатки 1-Glcp (остаток E), имеющие β -конфигурацию. В спектрах GW-1 характерные сигналы для 1-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 4.55/102.45, 3.86/72.15, 3.64/74.75, 3.71/71.57, 3.86/76.32, 4.01/60.16 м.д.

В спектрах GWL-1 сигналы для 1-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 4.97/101.46, 3.68/73.38, 3.50/75.37, 3.74/71.87, 3.66/75.14, 3.88/59.93 м.д. Эксперименты НМБС и NOESY ясно показали, что концевые остатки в GW-1 связаны с остатками 1,3,6-Glcp-, 1,6-Glcp- и 1,4-Glcp посредством β -(1,6)-, β -(1,6)- и β -(1,4)-гликозидных связей. Из спектра НМБС следует, что концевые остатки в GWL-1 связаны с 1,6-Glcp- и 1,4-Glcp-остатками посредством β -(1,6)- и β -(1,4)-гликозидных связей.

Спектроскопические исследования привели к выводу, что полисахариды содержат остатки 1,6-Glcp (остаток F), имеющие β -конфигурацию. В спектрах GW-1 специфические сигналы для 1,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 обнаружены при 4.88/100.27, 3.80/72.50, 3.52/74.68, 3.69/69.67, 3.51/75.31, 3.87/68.26 м.д. В спектрах GWL-1 специфические сигналы для 1,6-Glcp H1/C1, H2/C2, C3/H3, C4/H4, H5/C5, H6/C6 наблюдаются при 4.69/102.55, 3.68/73.38, 3.51/74.89, 3.96/70.05, 3.51/75.31, 4.11/68.76 м.д. В исследованиях НМБС и NOESY кросс-пики свидетельствуют о том, что остатки 1,6-Glcp в образцах как GW-1, так и GWL-1, связаны с 1,3,6-Glcp- и концевыми 1-Glcp-остатками посредством β -(1,6)-гликозидных связей.

На основании результатов анализа метилирования, 1D и 2D ЯМР-спектроскопических исследований были выяснены порядок и последовательность связывания, а также возможные структуры моносахаридных остатков в полисахаридах GW-1 и GWL-1. Ниже приведены порядок связывания, последовательность и возможные структуры полисахаридов GW-1 (а) и GWL-1 (б).

8. *Pan D., Wang L., Chen C., Teng B., Wang Ch., Xu Z., Hu B., Zhou P.* // Food Chem. 2012. V. 135. № 3. P. 1097.
9. *Magdeldin S.* Affinity Chromatography: Principles and Applications. China: InTech, 2012.
10. *Wang Q., Zhao X., Pu J., Luan X.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 143. P. 296.
11. *Kim Y., Kim B., Cheong Ch., David L., Williams, Kim Ch., Lim S.* // Carbohydr. Res. 2000. V. 328. P. 331.
12. *Patel B.K., Campanella O.H., Janaswamy S.* // Carbohydr. Polym. 2013. V. 92. P. 1873.
13. *Tao Y., Zhang R., Wei Y., Liu H., Yang H., Zhao Q.* // Carbohydr. Polym. 2015. V. 128. P. 179.
14. *Khaytmetova S.B., Turaeva A.S., Khalilova G.A.* // Polymer Science B. 2022. V. 64. № 4. P. 500.
15. *Bjomdal H., Hellerqvist C., Lindberg B., Svensson S.* // Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 1970. V. 9. P. 610.
16. *Arun G., Eyini M., Gunasekaran P.* // J. Experim. Biol. 2015. V. 53. P. 380.
17. *Tian Y., Elbing K., Stefan H.* // Microbiology. 2008. V. 154. P. 2814.
18. *Jianguo W., Yahong Y., Tianli Y.* // Carbohydr. Polym. 2014. V. 10. P. 247.
19. *Khalilova G.A., Turaev A.S., Muhiiddinov B.I., Filatova A.V., Haytmetova S.B., Normakhamatov N.S.* // Am. J. Appl. Sci. 2021. V. 3. № 1. P. 9.
20. *Ding H.H., Cui S.W., Goff H.D., Chen J., Guo Q., Wang Q.* // Carbohydr. Polym. 2016. V. 151. P. 538.
21. *Ren Y., Bai Y., Zhang Z., Cai W., Del R., Flores A.* // Molecules. 2019. V. 24. № 17. P. 3122.
22. *Халилова Г.А., Тураев А.С., Мухитдинов Б.И., Хайтметова С.Б., Азимова Л.Б., Нормакхматов Н.С.* // Докл. АН Республики Узбекистан. 2020. № 5. С. 55.