

## АНАЛИЗ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ В ПРОЦЕССЕ ЭКСТРАКЦИИ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ ГРИБОВ *PLEUROTUS OSTREATUS*

© 2018 г. В. Н. Васильева<sup>2</sup>, Н. В. Леонова<sup>1\*</sup>, Е. В. Антонцева<sup>2\*\*</sup>,  
В. Г. Конусова<sup>1</sup>

\*E-mail: leonova@hpb-spb.com, \*\*E-mail: \_p\_m\_@mail.ru

<sup>1</sup>ФГУП ГосНИИ «Особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный технологический институт,  
Санкт-Петербург, Россия

Проведено исследование антирадикальной активности (АРА) биомассы грибов *Pleurotus ostreatus* и продуктов спиртово-водной экстракции полисахаридов. Оценка препаратов проводилась с использованием колориметрического метода основанного на ингибировании свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). Показано, что АРА в грибных препаратах определяется как низкомолекулярными компонентами, так и полисахаридами. Метод с ДФПГ адекватно отражает антирадикальную активность в грибных экстрактах на всех стадиях технологического процесса и пригоден для определения АРА конечного продукта.

**Ключевые слова:** полисахариды, грибы *Pleurotus ostreatus*, антирадикальная активность (АРА)

DOI: 10.31857/S102872210002617-3

### Авторы:

**Васильева В. Н.**, бакалавр, факультет химии и биотехнологии, кафедра технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института, Санкт-Петербург, Россия;

**Леонова Н. В.**, к.б.н., руководитель группы внутрипроизводственного контроля участка РЭЧ в ФГУП ГосНИИ «Особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

**Антонцева Е. В.**, старший преподаватель кафедры технологии микробиологического синтеза Санкт-Петербургского государственного технологического института, Санкт-Петербург, Россия;

**Конусова В. Г.**, к.б.н., в.н.с. лаборатории иммунофармакологии ФГУП ГосНИИ «Особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Изучение фармакологических свойств базидиальных грибов и создание новых лекарственных средств на их основе является одним из активно развивающихся направлений современной фармакологии. В состав действующих активных соединений грибов входят фенолы, флавоноиды, терпены и тритерпены, витамины, антибиотики, незаменимые аминокислоты, эссенциальные жирные кислоты, фосфолипиды, микроэлементы. Однако большинство лечебных свойств грибов связывают с полисахаридами и их комплексами с протеинами и пептидами [1]. Наиболее функционально активными из них являются 1,3/1,6 бета-Д-глюканы, состоящие из молекул глюкозы, соеди-

ненных β-связями в позиции 1→3 в основную цепочку, от которой в положении 1→6 отходят боковые ответвления. Исследования структурно-функциональных особенностей [2] этих биополимеров показывает, что бета-Д-глюканы являются уникальными макромолекулами, обладающими, в сравнении с белками и нуклеиновыми кислотами, значительно большей вариабельностью, как на уровне первичной структуры (тип связи, степень разветвления, м. вес), так и третичной (конформация в виде одиночной или тройной спирали, катушки). Возможно, эта структурная особенность обуславливает широкий спектр биологических активностей проявляемых ими. Многочисленными исследованиями установлено что, например, экстракты грибов *Pleurotus ostreatus* проявляют противоопухолевую и иммуностимулирующую активности, стимулируют гемопоэз, оказывают антиоксидантное и антибактериальное действие, проявляют гиполипидемический, гепатопротекторный, радиопротекторный и антиоксидантный эффекты. В последние годы активно исследуются радиопротективный потенциал экстрактов пищевых грибов обусловленный, уникальным сочетанием в них иммуномодулирующей, гемопоэтической и антиоксидантной активностей [3, 4].

Основным источником получения бета-Д-глюканов являются плодовые тела грибов или

мицелий, получаемый методом глубинного культивирования. Однако ограничением для широкого применения грибных полисахаридов в медицине является как отсутствие стандартного исходного сырья, так и способов определения активности конечного продукта. Возможно, что оценка антирадикальной активности в исходном сырье и в полисахаридах, полученных в результате экстракции, может являться эффективным маркером их биологической активности. Задачей данного исследования являлся анализ антирадикальной активности полисахаридов грибов *Pleurotus ostreatus* в процессе выделения из биомассы плодовых тел методом спиртово-водной экстракции.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 9 препаратов из грибов Вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*). Три препарата, полученные в заводских условиях путем замораживания-оттаивания плодовых тел грибов (фирма «Гамми», Нижний Новгород), являлись исходными продуктами для последующего выделения полисахаридов в лабораторных условиях. Один из препаратов в заводских условиях был подвергнут однократной спиртовой обработке. Экстракцию полисахаридов производили в 2 этапа. На первом этапе для удаления липидов и низкомолекулярных примесей проводили 2-кратное кипячение исходных образцов в 80% этиловом спирте в течение 3-х часов. Затем из спиртового экстракта путем 3-кратного кипячения в воде получали полисахаридную фракцию, состоящую из водорастворимых и водонерастворимых компонентов. В исследовании использовали фракцию водорастворимых полисахаридов. Также анализировали АРА в спиртовой фракции, являющейся побочным продуктом при проведении спиртовой экстракции. Оценка антирадикальной активности исследуемых препаратов проводилась с использованием колориметрического метода основанного на ингибировании свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила. В качестве положительного контроля в исследовании использовали аскорбиновую кислоту. Регистрировали изменение оптической плотности раствора ДФПГ при добавлении водного или спиртового экстрактов исследуемых препаратов в течение 20 минут при  $\lambda$  517 с помощью спектрофотометра (UV mini-1240, SHIMADZU, Япония). Измерения выполняли в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2010.

**Результаты и обсуждение.** Исходные образцы биомассы грибов обладали АРА. Это связано с присутствием продуктов деградации клеточных стенок и фрагментированного внутриклеточного содержимого, при использовании метода замораживания-оттаивания в заводских условиях. Разные промышленные партии исходных образцов биомассы грибов обладали близкой по значению антирадикальной активностью. Выявленные различия в АРА исходных препаратов могут быть обусловлены качеством исходного сырья разных партий.

Полученные на первом этапе (после спиртового кипячения исходных препаратов) «грубые экстракты» имели минимальную АРА. Повидимому, обработка исходной биомассы 80% спиртом при высокой температуре приводит либо к конформационным изменениям, либо к экранированию сайтов, способных взаимодействовать с органическими радикалами, в частности, с радикалом ДФПГ. В одном из исходных образцов предобработанным однократно спиртом антирадикальная активность частично сохранялась. Возможно однократная обработка спиртом недостаточна для удаления низкомолекулярных примесей (фенолов, флавоноидов, терпенов и тритерпенов, микроэлементов и витаминов и др.), которые обладают высокой АРА. Действительно в спиртовом образце, являющемся побочным продуктом при экстракции полисахаридов, определялась максимальная АРА. Последний этап фракционирования (трехкратное кипячение в воде препаратов после проведения спиртовой экстракции) и последующее концентрирование водорастворимого компонента приводило к восстановлению биологических свойств полисахаридов, в том числе и АРА.

Таким образом, метод ДФПГ позволяет контролировать уровень АРА на всех стадиях технологического процесса выделения полисахаридов из плодовых тел грибов. Метод ДФПГ дает возможность проводить анализ в различных средах, как водных, так и спиртовых. Нами показано, что АРА в грибных препаратах определяется как низкомолекулярными компонентами, так и полисахаридами. Однако, в большей степени эта активность связана с низкомолекулярными примесями. Ранее Mattila e.a. (2001) методом ДФПГ показал высокую степень корреляции между общим содержанием фенолов в препаратах и их антирадикальной активностью. Повидимому, антирадикальные свойства грибных экстрактов зависят от вида и качества исходного сырья. По литературным данным наиболь-

шей АРА, обладали полисахариды, выделяемые из мицелиальных культур грибов. На АРА влияет также способ выделения полисахаридов. Показано, что использование при выделении микроволновых волн или ультразвука позволяет получить более активные препараты [5].

Работа выполнена в рамках договора № 02–2 от 28.12.2017 г. между ФГУП ГосНИИ «Особо чистых биопрепаратов» ФМБА России в г. Санкт-Петербург и Санкт-Петербургским государственным технологическим институтом на проведение практики студентов, аспирантов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Friedman M.* Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods*, 2016; 5: 80–114.
2. *Bashir K. M., Choi J. S.* Clinical and Physiological Perspectives of  $\beta$ -Glucans: The Past, Present, and Future. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18 (9), 84–102.
3. *Kozarski M., Klaus A., Jakovljevic D., Todorovic N., Vunduk J., Petrovic P., Niksic M., Vrvic M. M., Griensven L.* Antioxidants of Edible Mushrooms *Molecules* 2015, 20(10), 19489–19525.
4. *Vamanu E.* Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012; 2(1), 67–75.
5. *Mattila P., Konko K., Euro M., Pihlava J. M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V.* Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric Food Chem.* 2001;49:2343–8.

### ANALYSIS OF ANTIRADICAL ACTIVITY IN THE PROCESS OF POLYSACCHARIDES EXTRACTION FROM *PLEUROTUS OSTREATUS* MUSHROOMS

©2018 V. N. Vasileva<sup>2</sup>, N. V. Leonova<sup>1\*</sup>, E. V. Antontceva<sup>2\*\*</sup>, V. G. Konusova<sup>1</sup>

\*E-mail: leonova@hpb-spb.com, \*\*E-mail: \_p\_m\_@mail.ru

<sup>1</sup>State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia

A study of the antiradical activity (ARA) of the biomass of *Pleurotus ostreatus* mushrooms and products of hydroalcoholic extraction of polysaccharides was conducted. Evaluation of the samples was carried out using the colorimetric method based on the inhibition of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). We have shown that ARA in mushroom samples is determined by both low-molecular components and polysaccharides. The DPPH method adequately reflects antiradical activity at all stages of the process and is suitable for determining the ARA of the final product.

*Key words:* Polysaccharides, *Pleurotus ostreatus* mushrooms, the antiradical activity (ARA)

#### Authors:

**Vasileva V. N.**, bachelor, Faculty: Chemical and Biotechnology, Graduate, Departments Technology of Microbiological Synthesis, Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia;

**Leonova N. V.**, ☒ PhD, head of the group of production control, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia; **E-mail:** leonova@hpb-spb.com;

**Antontceva E. V.**, ☒ Assist. Professor, Faculty: Chemical and Biotechnology, Graduate: Departments of Technology of Microbiological Synthesis, Saint-Petersburg State Institute of Technology, St. Petersburg, Russia; **E-mail:** \_p\_m\_@mail.ru;

**Konusova V. G.**, PhD, Leading Researcher, Immunopharmacology Department, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia.