

***Hericium erinaceus* BP16 как источник полисахаридов,  
стабилизирующих функции сперматозоидов быков  
при гипотермическом хранении**

© 2021. О. Н. Соломина<sup>1</sup>, к. б. н., н. с., М. И. Сергушкина<sup>1</sup>, м. н. с.,  
А. А. Широких<sup>2</sup>, д. б. н., в. н. с., Т. В. Полежаева<sup>1</sup>, д. б. н., зав. лабораторией,  
И. Г. Широких<sup>2</sup>, д. б. н., зав. лабораторией, О. О. Зайцева<sup>1</sup>, к. б. н., с. н. с.,  
А. Н. Худяков<sup>1</sup>, к. б. н., с. н. с.,

<sup>1</sup>Институт физиологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии наук,  
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 50,  
<sup>2</sup>Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока  
имени Н. В. Рудницкого,  
610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166а,  
e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

Актуальность сохранения генетических ресурсов животного и растительного мира обуславливает необходимость поиска биологически активных веществ для консервации репродуктивных клеток. В условиях гипотермического хранения осмотичность внеклеточной среды, стабилизацию мембран и структуру цитоскелета клеток могут обеспечивать различные сахара. Ксилотрофный базидиальный гриб *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. представляет собой источник полисахаридов с высокой биологической активностью. В составе углеводных цепей полисахаридной фракции (ПФ) *H. erinaceus* BP16 идентифицированы остатки галактозы, глюкозы, арабинозы, маннозы, фукозы, рамнозы, ксилозы (в порядке снижения % содержания). Изучено влияние ПФ разных концентраций на процессы замерзания воды в водном растворе глицерина, а также на показатели жизнеспособности сперматозоидов быков голштинской породы в условиях гипотермического (+4 °С) хранения: на интенсивность процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность, на способность гамет к прогрессивному движению, на устойчивость сперматозоидов к гипоосмотическому стрессу. В связи с поиском новых эффективных компонентов для консервирующих растворов полученные в работе данные свидетельствуют о перспективе применения ПФ *H. erinaceus* в качестве компонента для замедления скорости кристаллизации льда в клеточных суспензиях при их замораживании и антиоксидантного регулятора функциональной полноценности гамет при охлаждении.

**Ключевые слова:** *Hericium erinaceus*, полисахариды, сперматозоиды, охлаждение, гипотермическое хранение.

***Hericium erinaceus* BP16 as a source of polysaccharides stabilizing  
the functions of bulls spermatozoa during hypothermic storage**

© 2021. O. N. Solomina<sup>1</sup> ORCID: 0000-0001-5187-8698<sup>\*</sup>  
M. I. Sergushkina<sup>1</sup> ORCID: 0000-0002-3113-527X<sup>\*</sup>, A. A. Shirokikh<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-7808-0376<sup>\*</sup>  
T. V. Polezhaeva<sup>1</sup> ORCID: 0000-0003-4999-3077<sup>\*</sup>, I. G. Shirokikh<sup>2</sup> ORCID: 0000-0002-3319-2729<sup>\*</sup>  
O. O. Zaitseva<sup>1</sup> ORCID: 0000-0001-9427-0420<sup>\*</sup>, A. N. Khudyakov<sup>1</sup> ORCID: 0000-0003-3757-8263<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physiology of Komi Science Centre  
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,  
50, Pervomayskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,  
<sup>2</sup>Federal Agricultural Research Center of North-East named N. V. Rudnitsky,  
166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,  
e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

various sugars. Xylotrophic basidiomycete *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. is a source of polysaccharides with high biological activity. Residues of galactose, glucose, arabinose, mannose, fucose, rhamnose, xylose (in order of decreasing % content) were identified in the carbohydrate chains of the polysaccharide fraction (PF) of *H. erinaceus* BP16. The effect of PF of different concentrations on the freezing of water in an aqueous solution of glycerin, as well as on the viability of spermatozoa of Holstein bulls under hypothermic (+ 4 °C) storage conditions, on the intensity of lipid peroxidation processes and antioxidant activity, on the ability of gametes for progressive movement, on sperm resistance to hypoosmotic stress. In connection with the search for new effective components for preserving solutions, the data obtained in this work indicate the prospect of using the PF of *H. erinaceus* as a component to slow down the rate of ice crystallization in cell suspensions during freezing and as an antioxidant regulator of the functional usefulness of gametes during cooling.

**Keywords:** *Hericium erinaceus*, polysaccharides, spermatozoa, refrigeration, hypo-thermal storage.

В связи с поиском новых природных источников биологически активных веществ актуально изучение химического состава и физиологических функций полисахаридов и гликопротеинов базидиальных грибов. Ежовик гребенчатый (*Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers.) – представитель агарикоидных ксилотрофных грибов (порядок Russulaceae) – издавна известен как ценный съедобный и лекарственный вид в странах Европы и Южной Америки, искусственно культивируется и используется в традиционной медицине стран Восточной Азии. Исследования последних 10–15 лет привели к изоляции из плодовых тел и мицелия этого гриба, в общей сложности, более 35 полисахаридов, которые являются своего рода биоактивными компонентами и отвечают за противораковую, иммуномодулирующую, гипополидевическую, антиоксидантную и нейрорепараторную активность этого гриба [1, 2]. Известно большое количество медицинских продуктов и лекарств, запатентованных в Китае [3], США, Японии и Корее [4], которые содержат в качестве действующего вещества, только *H. erinaceus*. В настоящее время активно продолжаются исследования, направленные на расширение границ практического использования полисахаридов *H. erinaceus*.

Анализ литературных [5, 6] и собственных [7, 8] данных позволяет предположить, что полисахаридные фракции *H. erinaceus* могут оказать положительный эффект при гипотермическом или низкотемпературном хранении репродуктивных клеток. Сахара в анаэробных и аэробных условиях являются для клетки не только энергетическим субстратом, но и обеспечивают необходимую осмотическую во внеклеточной среде, стабилизируют белковолипидные комплексы мембран клеток и структуру цитоскелета при охлаждении, что обуславливает их криозащитный эффект [9, 10].

Целью настоящего исследования являлась оценка способности полисахаридов гриба *H. erinaceus* BP16 оказывать влияние на со-

хранность функций сперматозоидов быка в условиях гипотермического хранения.

### Объекты и методы исследования

Для выделения полисахаридов использовали плодовые тела гриба *H. erinaceus* (природный изолят BP16, нуклеотидная последовательность фрагмента ITS1\_5.8S ITS2 депонирована в NCBI под номером MK809367), выращенного в стеклянных ёмкостях (500 мл) на лигноцеллюлозном композитном субстрате, состоящем из дубовых опилок, зерна овса и соломы (1 : 3 : 6 об. %). В субстрат после автоклавирования (1 атм в течение 25 мин) и охлаждения заполненных на три четверти объёма ёмкостей асептически вносили агаровые блоки с мицелием, вырезанные из 15-ти суточной газонной культуры гриба на сусло-агаре (4° по Баллингу). Ёмкости с инокулированным субстратом инкубировали при комнатной температуре (20±1 °C). По мере формирования грибом плодовых тел, начиная с четвёртой недели культивирования, каждые 10–15 дней их срезали и высушивали при 60 °C.

Сухие плодовые тела *H. erinaceus* (50 г) заливали горячей (70 °C) дистиллированной водой и оставляли на 8 ч для экстракции. Водный экстракт плодовых тел смешивали с 3 объёмами 96%-ного этанола и оставляли на ночь при 4 °C для осаждения полисахаридсодержащей фракции (ПФ). Полученный таким образом осадок отделяли декантацией, упаривали при 60 °C и измельчали до получения крупного порошка экстрагированных горячей водой полисахаридов (1,38 г).

Сахара, входящие в состав полисахаридов, определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) в виде соответствующих ацетатов полиолов на хроматографе «Varian 450-GC» (США) с пламенно-ионизационным детектором, как описано ранее [8]. Процентное содержание моносахаридов от суммарного препарата вычисляли из площадей пиков, используя коэффициенты отклика детектора [11].

Для характеристики криоосмотических свойств полисахаридов на дистиллированной воде готовили растворы ПФ в концентрациях 1,0; 0,7–0,1% (вес/объём). Кроме ПФ гриба в работе использовали водный раствор (вес/объём) криопротектора эндоцеллюлярного (проникающего) действия – глицерина 3,5% (ЗАО; ЭКОлаб, г. Электрогорск). Осмолярные концентрации и температуры замерзания водных растворов веществ определяли с помощью осмометракриоскопа ОСКР-1 (НПП «Буревестник», Санкт-Петербург). Абсолютная погрешность при определении осмолярной концентрации вещества в диапазоне измерений от 0 до 500 мОсм/л составляла  $\pm 2,0$ ; температура замерзания в диапазоне от  $-0,930$  до  $-3,720$  °С –  $\pm 0,010$ . Исследуемый раствор, объёмом 0,3 мл, помещали в пластиковую кювету, погружали в неё измерительный элемент и устанавливали в термостатируемую камеру прибора.

Сперматозоиды быков-производителей голштинской породы получали в производственных условиях ОАО «КировПлем». Свежеполученную сперму от 15 быков с подвижностью 7–9 баллов разбавляли 1 : 1 лактозо-цитратно-желточной средой для спермы быков. Через 5 мин в полученную смесь медленно, по каплям добавляли в соотношении 2 : 3 лактозо-цитратно-желточную среду с глицерином (контрольная группа) или лактозо-цитратно-желточную среду с глицерином и ПФ *H. erinaceus* в исследуемых концентрациях (опытные группы). Конечная концентрация глицерина в среде сперматозоидов составляла 4,4%, ПФ – 0,12; 0,36 и 0,60%. Смесь разливали по полимерным коническим микропробиркам по 0,5 мл, которые выдерживали при +6 °С от 1 до 9 сут. До и после гипотермической экспозиции определяли показатели жизнеспособности сперматозоидов.

Количество гамет определяли путём микроскопирования в камере Горяева (с добавлением 3% хлорида натрия для обездвиживания сперматозоидов) по общепринятой методике и выражали в млрд/мл. Уровень биологической полноценности сперматозоидов определяли по показателю их подвижности в 3% цитрате натрия в камере Горяева (10 баллов – все сперматозоиды в поле зрения двигаются поступательно вперёд).

Жизнеспособность сперматозоидов оценивали с помощью теста на гипоосмотическое набухание (HOS-тест). В 400 мл 1% раствора цитрата натрия, подкрашенного эозином, добавляли 0,02 мл разжиженного эякулята.

Выдерживали смесь при +20 °С не менее 30 мин и исследовали сперматозоиды в фазово-контрастном микроскопе. Набухание сперматозоидов идентифицировали по скручиванию и вздутию их хвостов. Подсчитывали число набухших клеток на 100 исследуемых сперматозоидов, выражали в процентах. Высокий процент набухших спермиев указывает на наличие клеток, имеющих функциональную и неповреждённую плазматическую мембрану.

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали хемилюминесцентным методом на биохемилюминометре БХЛ-07 (ООО «Медозонс», Россия). В измерительную кювету прибора вносили 0,1 мл спермы в растворе глицерина и одной из концентраций ПФ и 0,4 мл фосфатного буфера (рН 7,5 ед.), добавляли 0,4 мл 0,01 мМ раствора сульфата железа (ОАО «Спектр-Хим» г. Москва) и помещали в измерительную кювету. После чего в неё быстро вносили 0,2 мл 2% раствора перекиси водорода (ЗАО «СП Химпром» г. Самара) и регистрировали сигнал в течение 30 с. Оценивали следующие параметры:  $I_{\max}$  (мВ) – максимальную интенсивность быстрой вспышки, отражающей потенциальную способность биологического объекта к свободно радикальному окислению;  $S$  (мВ · с) – светосумму за 30 с, отражающую содержание радикалов  $\cdot\text{RO}_2$ ;  $\text{tg}(-2\alpha)$  – тангенс угла наклона кривой оси времени (характеризует максимальную крутизну спада кривой, со знаком «-»), чем выше значение показателя  $\text{tg}(-2\alpha)$ , тем выше активность ферментативных систем клеток, регулирующих содержание гидрперекисей.

Результаты исследования подвергали статистическому анализу с использованием программы «BioStat 2009 Professional 5.8.4» (AnalystSoft, США). Для оценки различий использовали непараметрические критерии Манна-Уитни и Уилкоксона, считая различия значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты исследования на рисунках представлены в виде  $M \pm \sigma$ , в таблице – в виде медианы, 25-го и 75-го центилей ( $Me, Q1-Q3$ ).

### Результаты и обсуждение

Грибные полисахариды по своей природе являются водорастворимыми глюканами с сильно разветвлённой структурой, в состав которых, наряду с глюкозой, могут входить другие моно-, полисахаридные и протеиновые комплексы (протеоглюканы) [12]. Вариативность молекулярной массы и моносахаридного

состава сопровождаются различиями в биологической активности полисахаридов [13]. Структура полисахаридов, синтезируемых грибом *H. erinaceus*, может значительно изменяться в зависимости от штамма и условий его роста [14].

Из плодовых тел искусственно культивируемого гриба *H. erinaceus* ВР16, в результате экстракции горячей водой и последующего осаждения этанолом, была получена ПФ с выходом 2,8% массы сухого материала. По данным ГЖХ углеводные цепи ПФ штамма ВР16 состоят преимущественно из остатков галактозы (9,62%), глюкозы (9,14%) и арабинозы (6,79%). В меньших количествах идентифицированы в составе углеводных цепей остатки маннозы (5,01%), рамнозы (2,35%) и фукозы (2,68%). В качестве минорного компонента отмечена ксилоза (0,30%). Из литературы известно, что биологическая активность полисахаридов часто бывает обусловлена наличием в их составе остатков таких моносахаридов, как манноза, арабиноза и галактоза [15, 16]. Выявление этих структурных компонентов в составе углеводных цепей гериция послужило предпосылкой к проведению оценки эффективности ПФ *H. erinaceus* в качестве природного криопротектирующего средства.

С помощью криоскопического метода изучена способность ПФ *H. erinaceus* изменять температуру замерзания 3,5% водного раствора глицерина. Установлено, что полисахариды в концентрациях 0,3; 0,7 и 1,0% повышают осмолярность раствора глицерина соответственно на 97, 82 и 100 мОсм/л, что способствует понижению температуры его замерзания на 0,19; 0,16 и 0,19 °С (рис. 1).

С помощью хемилюминесцентного метода установлено, что наличие в среде сперматозоидов полисахаридной фракции *H. erinaceus* в концентрации 0,36% способствует стабилизации процессов ПОЛ в их мембранах (по значению показателей  $I_{\max}$ ,  $S$ ). Статистически значимо данный эффект проявляется на сроке хранения 9 сут. Вероятно, это обусловлено тем, что данная концентрация полисахаридов способствует повышению активности ферментативных систем клеток, регулирующих содержание гидроперекисей. На это указывает значимое повышение показателя  $tg(-2\alpha)$  (рис. 2).

Следовательно, ПФ *H. erinaceus* можно использовать в составе консервирующих сред в качестве компонента для замедления скорости кристаллизации льда в клеточных суспензиях при их замораживании в случае необходимости.

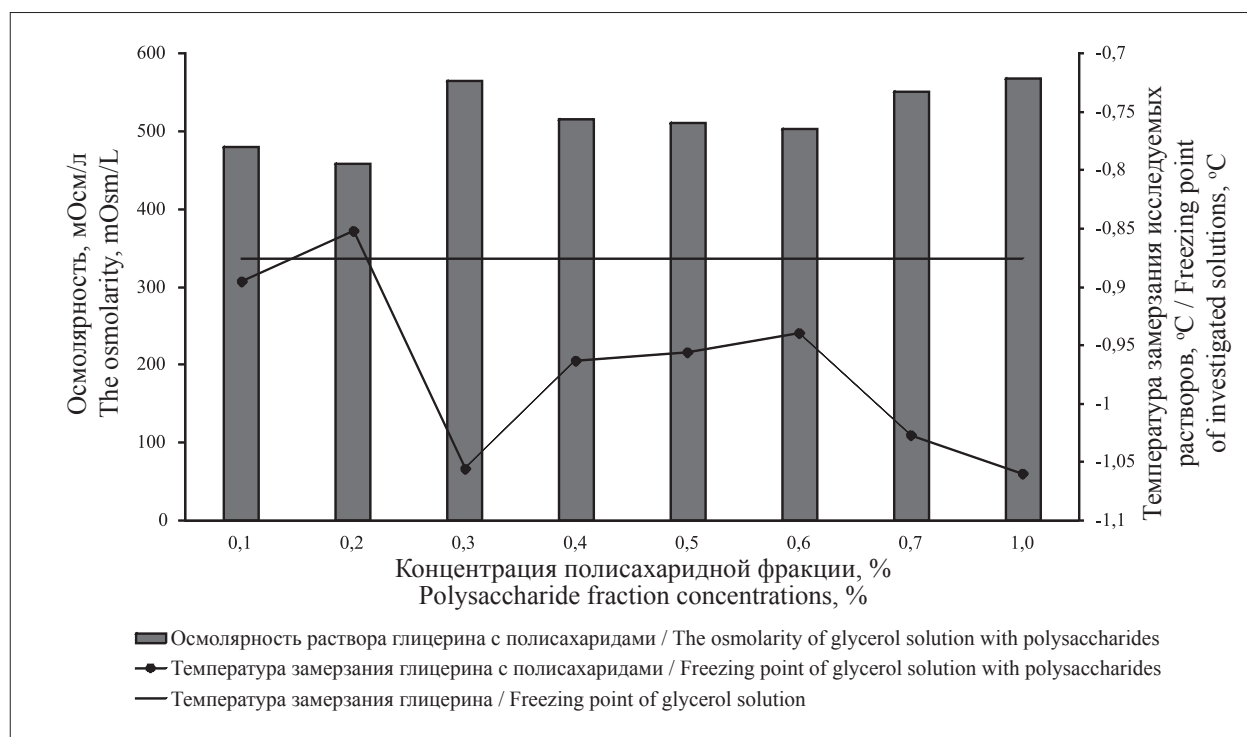
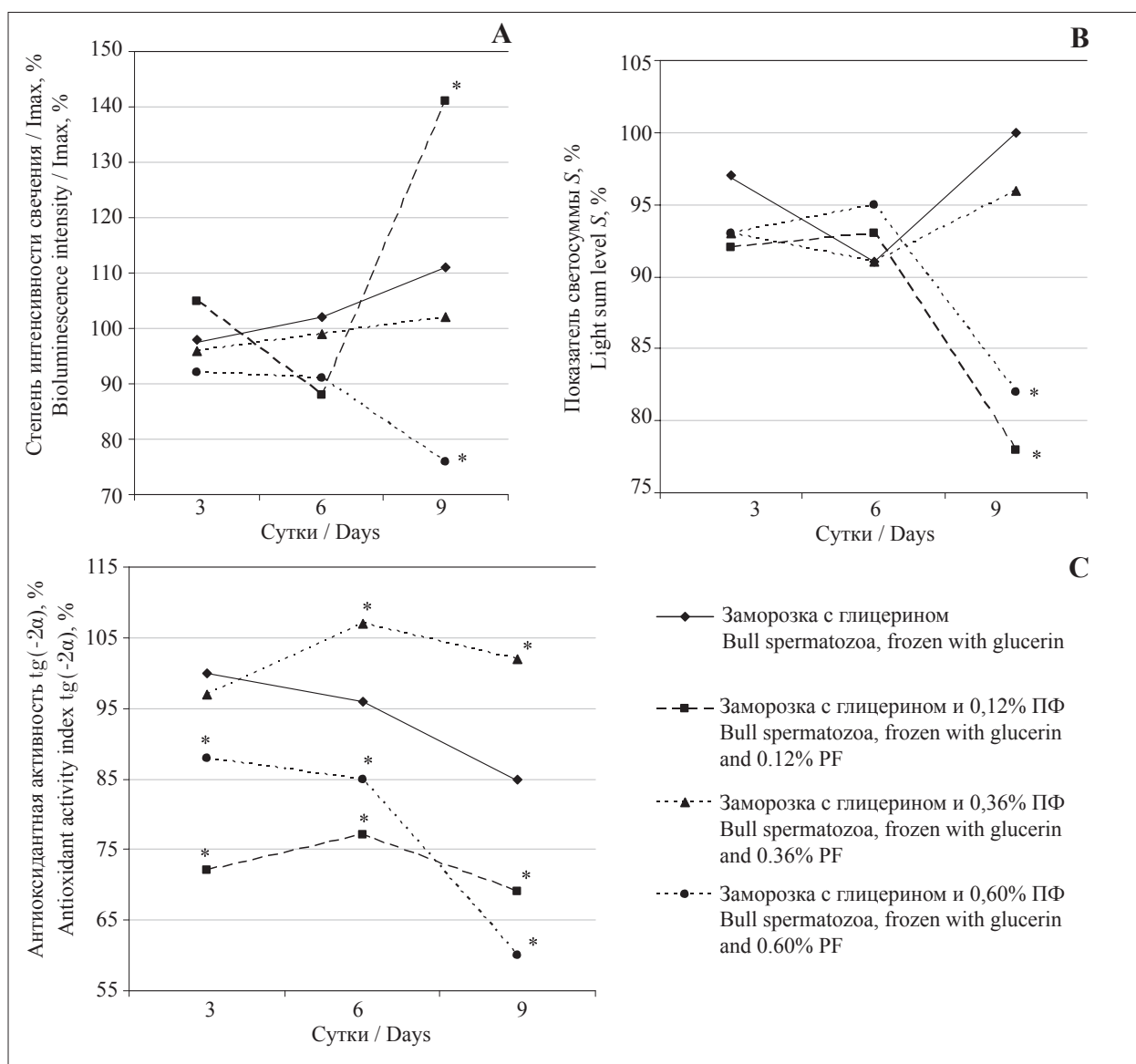


Рис. 1. Изменение температуры замерзания 3,5% раствора глицерина при наличии в среде полисахаридной фракции *H. erinaceus*  
 Fig. 1. The change of the freezing point of 3.5% glycerol solution in the presence of a polysaccharide fraction from *H. erinaceus*



**Рис. 2.** Показатели ( $I_{max}$ ,  $S$ ) интенсивности перекисного окисления липидов (диаграммы А, В) и антиоксидантной активности ( $tg(-2\alpha)$ ) сперматозоидов быка (диаграмма С), подвергнутых гипотермическому (+6 °С) хранению в течение 3, 6 и 9 сут в среде глицерина (4,4%) и полисахаридной фракции (ПФ) *H. erinaceus* в разных концентрациях. Данные представлены в виде среднего арифметического значения  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm \delta$ ,  $n = 37$ )

**Fig. 2.** Indicators ( $I_{max}$ ,  $S$ ) of the intensity of lipid peroxidation (graphics A, B) and antioxidant activity ( $tg(-2\alpha)$ ) of bovine spermatozoa (graphic C) after cooling to +6 °С and storage (in this temperature) for 3, 6 and 9 days in glycerol medium (4,4%) and polysaccharide fraction (PF) from *H. erinaceus* in different concentrations. Data are presented an arithmetic mean value  $\pm$  standard deviation ( $M \pm \delta$ ,  $n = 37$ )

У гамет, хранившихся в среде одного глицерина при +6 °С способность спермиев к прогрессивному движению на уровне 40% (допустимой для оплодотворения) сохранялась в течении 6 сут, при введении в глицериновую среду ПФ 0,36% – 7 сут (табл. 1). Вероятно, данный эффект обусловлен выявленным и описанным выше антиоксидантным действием ПФ в указанной концентрации.

Жизнеспособность сперматозоидов, согласно НОС-тесту, во все сроки хране-

ния соответствовала уровню спермиев в глицерине, т. е. наличие в среде ПФ не повлияло на эффект глицерина по данному показателю (табл. 2, рис. 3). Мы полагаем, что в условиях гипотермического хранения спермиев при +6 °С в течении 9 сут мембрана не получала существенных повреждений, поэтому при гипоосмотическом стрессе приток жидкости в клетку не вызывал её неконтролируемого разбухания до степени разрыва мембраны.

Таблица 1 / Table 1

Показатель подвижности сперматозоидов (*Me, Q1-Q3*), подвергнутых гипотермическому (+6 °C) хранению в течение 3–9 сут в среде глицерина (4,4%) и ПФ *H. erinaceus* в различных концентрациях  
Sperm motility index (*Me, Q1-Q3*) after hypothermic storage (+6 °C) for 3–9 days in the presence of glycerol (4,4%) and different concentrations PF from *H. erinaceus*

Серия Series	Сроки хранения (сут) / Storage periods (days)				
	3	6	7	8	9
Глицерин Glycerol	78 (62,5–83,5)	44 (25–67)	22 (15,25–53)	11 (0–29,75)	12 (0–44)
+ 0,12 % ПФ + 0,12% PF	87 (75–89)	33 (13–56,5)	33 (11,5–69,5)	11 (0–41,25)	12 (0–33)
+ 0,36% ПФ + 0,36% PF	78 (64–89)	50 (36,75–67)#	44 (24,75–74,25) * #	22 (8,25–51,5)*	18 (8,25–54,25)
+ 0,6% ПФ + 0,6% PF	85 (76,5–89)	47 (29–78)#	44 (15,25–64,25)	33 (13,75–54,5)* #	33 (22–56)#

Примечания: данные представлены в процентах по отношению к уровню до хранения, принятому за 100%; \* – различие со значением показателя «сперма с глицерином» при соответствующем сроке хранения статистически значимо при  $p < 0,05$ ; # – различие со значением показателя «+0,12%» при соответствующем сроке хранения статистически значимо при  $p < 0,05$ .

Notes: Data are presented as a percentage relative to the level before freezing, taken as 100%; \* – the difference with the value of the indicator “sperm with glycerol” with the corresponding shelf life is statistically significant at  $p < 0.05$ ; # – the difference with the value of the indicator “+ 0.12%” with the corresponding shelf life is statistically significant at  $p < 0.05$ .

Таблица 2 / Table 2

Устойчивость к гипоосмотическому набуханию (HOS-тест)  
Resistance to hypoosmotic swelling (HOS-test)

Раствор для хранения Storage solution	Сроки хранения (сут) / Storage periods (days)				
	3	6	7	8	9
Глицерин Glycerol	83 (76–91)	69 (60,5–80)	40 (28–56)	35 (31–51,5)	45 (42–64)
+ 0,12 % ПФ + 0,12% PF	86 (71,5–97,25)	65 (41–78)	35 (25,5)	35 (28,5–50)	39 (37,75–57)
+ 0,36% ПФ + 0,36% PF	83 (78,75–98,5)	78 (45,5–84)	29 (27–69,5)	41 (39,75–48,75)	38 (35–55)
+ 0,6% ПФ + 0,6% PF	81 (75–91)	69 (46,25–88,25)	35 (23–47,5)	41 (37,25–48,25)	45 (33–51)

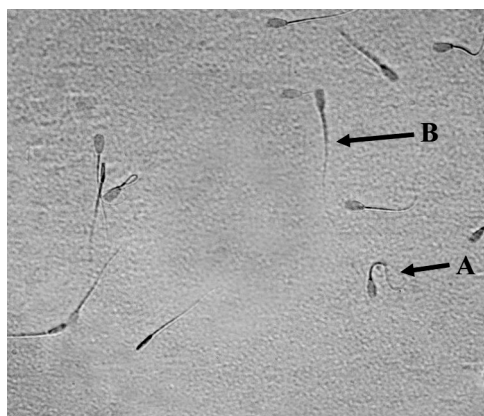


Рис. 3. Сперматозоиды быка с различной реакцией на гипоосмотическое воздействие:

А – устойчивый тип гамет (жизнеспособный),

В – неустойчивый тип гамет (нежизнеспособный)

Fig. 3. Bovine spermatozoa with different responses to hypoosmotic effects:

A – resistant type of gametes (viable), B – unstable gamete type (unviable)

## Заклучение

Проблема сохранения генетических ресурсов животного и растительного мира продолжает оставаться актуальной на протяжении многих лет. Предложенные ещё советскими учёными методы криоконсервирования спермы для искусственного осеменения сельскохозяйственных животных широко используются в мире. Состав и физико-химические свойства консервирующих сред являются определяющими при подготовке спермы к гипотермическому хранению или замораживанию. В свете современных представлений, поиск новых эффективных компонентов для консервирующих растворов должен быть ориентирован в первую очередь на природные соединения. Полученные в работе данные свидетельствуют о возможности применения ПФ гриба *H. erinaceus* ВР16, в качестве перспективного компонента для замедления скорости кристаллизации льда в клеточных суспензиях при их замораживании, а также как антиоксидантного регулятора функциональной полноценности гамет сперматозоидов быка в условиях гипотермического (+6 °С) хранения.

*Работа выполнена в рамках НИР № АААА-А17-117012310156-0 «Влияние пектинов на функциональную сохранность клеток при замораживании» и № 0767-2019-0090 «Изучить потенциал полифункционального действия мицелиальных микроорганизмов в региональных типах почв с целью создания новых препаратов для повышения адаптивности и экологической безопасности растениеводства и защиты окружающей среды от загрязнений».*

## References

1. He X., Wang X., Fang J., Chang Y., Ning N., Guo H., Zhao Z. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. V. 97. P. 228–237. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.040
2. Zan X., Cui F., Li Y., Yang Y., Wu D., Sun W., Ping L. *Hericium erinaceus* polysaccharide-protein HEG-5 inhibits SGC-7901 cell growth via cell cycle arrest and apoptosis // International Journal of Biological Macromolecules. 2015. V. 76. P. 242–253. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.060
3. Friedman M. Chemistry, nutrition, and health-promoting properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom fruiting bodies and mycelia and their bioactive compounds // J. Agric Food Chem. 2015. V. 63. No. 32. P. 7108–7123. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02914
4. Thongbai B., Rapior S., Hyde K.D., Wittstein K., Stadler M. *Hericium erinaceus*, an amazing medicinal mushroom // Mycological Progress. 2015. V. 14. No. 10. P. 1–23. doi: 10.1007/s11557-015-1105-4
5. Holt W.V. Basic aspects of frozen storage of semen // Animal Reproduction Science. 2000. V. 62. P. 3–22. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4
6. Linnik T.P., Martynyuk I.N. Approaches to creation of cryoprotective media for cryopreservation of avian sperm // Problems of Cryobiology. 2010. V. 20. No. 2. P. 109–122.
7. 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 Biobank. 2015. V. 13. No. 4. P. 240–246. doi: 10.1089/bio.2014.0077
8. Shirokikh I.G., Polezhaeva T.V., Shirokikh A.A., Khudyakov A.N., Sergushkina M.I., Nazarova Ya.I., Paturova I.G. Cryoprotective properties of the polysaccharide fraction of the mushroom *Hericium erinaceus* BP 16 // Biology Bulletin. 2020. V. 47. No. 1. P. 1–6 (in Russian). doi: 10.1134/S1062359020010124
9. Schrago M.I., Guchok M.M., Kalugin Yu.V., Khanina L.A. Some ways to create cryoprotectants // Problems Hematol Blood Transfusion. 1981. No. 26. P. 3–6 (in Russian).
10. Svedentsov E.P. Cryoprotectants for living cell. Syktyvkar: Physiology Institute at the Komi Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2010. 80 p. (in Russian).
11. York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components // Methods in Enzymology. 1986. V. 118. P. 3–40.
12. Nie S., Cui S. W., Xie M. Bioactive polysaccharides. Academic Press, 2017. P. 8–17. doi: 10.1016/C2015-0-04574-9
13. Ferreira S.S., Passos C.P., Madureira P., Vilanova M., Coimbra M.A. Structure function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review // Carbohydr. Polym. 2015. V. 132. P. 378–396. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.011
14. Wang Z., Luo D., Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. // Carbohydrate polymers. 2004. V. 57. No. 3. P. 241–247. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.04.018
15. Chen Y.Y., Xue Y.T. Purification, chemical characterization and antioxidant activities of a novel polysaccharide from *Auricularia polytricha* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 120. P. 1087–1092. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.160
16. Rong Y., Yang R.L., Yang Y.Z., Wen Y.Z., Liu S.X., Li C.F., Hu Z.Y., Chen X.R., Li W. Structural characterization of an active polysaccharide of longan and evaluation of immunological activity // Carbohydr. Polym. 2019. V. 213. P. 247–256. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.03.007