

на правах рукописи



ШАХМАТОВ ЕВГЕНИЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

**СТРОЕНИЕ ПЕКТИНА И УГЛЕВОДНОЙ ЧАСТИ
АРАБИНОГАЛАКТАНОВЫХ БЕЛКОВ
БОРЩЕВИКА СОСНОВСКОГО (*HERACLEUM SOSNOWSKYI* M.)**

02.00.10 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте химии Коми научного центра УрО РАН

Научный руководитель: **к.х.н. Макарова Елена Николаевна**

Официальные оппоненты: **Абрамова Татьяна Вениаминовна, д.х.н.**
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН, с.н.с.

Рогачев Артем Дмитриевич, к.х.н.
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Новосибирский институт
органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН,
н.с.

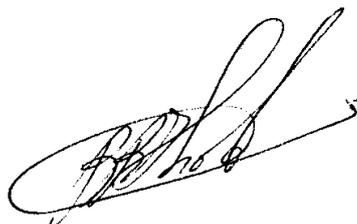
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Иркутский Институт химии
им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН

Защита состоится « 26 » мая 2017 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного
совета Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « » _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. К наиболее сложноорганизованным и вариабельным по структуре компонентам клеточной стенки относятся пектиновые полисахариды и арабиногалактановые белки (AGP) – растительные полимеры, широко представленные в различных растительных источниках.

Пектины входят в большую группу гликаногалактуронанов, основным компонентом которых являются главным образом остатки 1,4- α -D-GalpA. Установлено, что моносахаридный состав и структурные элементы пектинов могут различаться не только у различных видов растений, но и отдельных тканей одного растения.

AGP – обширный класс высокогликозилированных белков, имеющих сложную структуру. Основную массу AGP (до 98%) составляет углеводная часть молекулы, состоящая из арабиногалактана типа II, и 2-10% полипептидный кор, содержащий главным образом такие аминокислоты как Нур, Ala, Ser, Thr. Из всех полимеров клеточной стенки именно пектиновые полисахариды и AGP наиболее часто упоминаются как взаимосвязанные полимеры клеточной стенки. Отдельные элементы структуры пектиновых полисахаридов и AGP довольно хорошо охарактеризованы в литературе, однако до сих пор ведутся дискуссии о взаимодействии данных структурных элементов между собой и с другими компонентами клеточной стенки.

Многочисленные исследования, проведенные различными исследователями, использующими разнообразные виды растений, поддерживают существование комплексов пектин-AGP в клеточных стенках растительных тканей. Однако в целом информация о взаимодействии AGP с другими полимерами клеточной стенки, в частности с пектинами, ограничена, в первую очередь в связи со сложностью и разнообразием строения этих полимеров. Идентификация связей между данными структурными элементами приведет к более глубокому всестороннему выяснению структуры растительной клеточной стенки.

Комплексное изучение перспективных хозяйственно-ценных видов растений – часть оценки природных ресурсов потенциального богатства растительного покрова России. Поэтому исследования местных растительных ресурсов для более полного их использования является научной и практической задачей. Расширение ассортимента растений, являющихся сырьевой базой для получения полисахаридов, актуально в настоящее время.

Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) семейства Сельдерейные (Зонтичные) *Apiacea* Burnett (*Umbelliferae*) – гигантский травянистый многолетник высотой 2 и более метров с мощным железисто опушенным полым стеблем и крупными перисто-рассеченными листьями. Дикорастущий вид борщевика Сосновского представляет несомненный интерес для исследования структуры полисахаридных комплексов, которые он содержит, поскольку обладает огромной биомассой, быстро размножается и отличается богатым биохимическим составом. Огромные территории, занятые борщевиком, подталкивают к поиску новых возможностей применения его биомассы. К настоящему времени исследования структуры пектиновых полисахаридов из борщевика проведены только для борщевика Меллендорфа, но и они ограничиваются только изучением моносахаридного состава. Между тем, целенаправленное изучение структурных особенностей компонентов *H. sosnowskyi* и их химических характеристик могут помочь разработать научные основы его переработки, что имеет решающее значение для определения перспектив его применения.

Цель работы: Установление химической структуры пектиновых полисахаридов и углеводной части арабиногалактановых белков *Heracleum sosnowskyi*.

Задачи исследования: 1. Выделить и охарактеризовать AGP, пектиновые полисахариды и связующие гликаны из надземной части *Heracleum sosnowskyi*.

2. Установить характер изменения выхода и моносахаридного состава AGP, пектинов и связующих гликанов в зависимости от природы экстрагента и этапа экстракции при выделении их из надземной части *Heracleum sosnowskyi*. 3. Изучить строение углеводных цепей AGP и пектиновых полисахаридов *Heracleum sosnowskyi* методами структурной химии углеводов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изучен характер изменения выхода и моносахаридного состава AGP, пектиновых полисахаридов и связующих гликанов в зависимости от природы экстрагента и этапа экстракции при выделении их из надземной части *Heracleum sosnowskyi*. Установлено, что при последовательной экстракции водой, раствором HCl и раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ наблюдается уменьшение содержания арабиногалактановых белков и увеличение содержания пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

2. Кор макромолекулы пектина *Heracleum sosnowskyi* представлен участками частично метилэтерифицированного и частично ацетилированного 1,4- α -галактопиранозилуронана и участками частично 2-*O*- и главным образом 3-*O*- ацетилированного RG-I, боковые цепи которого образованы преимущественно остатками T- α -L-Araf, 1,4-связанными и 3,4-ди-*O*-замещенными остатками β -D-Galp, указывающими на наличие AG-I; а также остатками T- α -L-Araf, 1,5-связанными, 2,5-ди-*O*- и 3,5-ди-*O*-замещенными остатками α -L-Araf, свидетельствующими о наличии участков разветвленного 1,5- α -L-арабинана.

3. Углеводная часть макромолекулы AGP *Heracleum sosnowskyi* состоит из AG-II, главная цепь которого представлена остатками 1,3-связанной β -D-Galp, а боковые цепи разветвленной области образованы остатками 1,6-связанной β -D-Galp, 1,5-связанной α -L-Araf, 3,5-ди-*O*-замещенной α -L-Araf, 4-*O*-Me- β -D-GlcpA и 1,4-связанной β -D-GlcpA. Точки ветвления главной и боковых цепей представлены 3,6-ди-*O*-замещенными остатками β -D-Galp. Значительная часть β -1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me- β -D-GlcpA с помощью β -(1 \rightarrow 6)-связи: 4-*O*-Me- β -GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -Galp-(1 \rightarrow Незначительная часть GlcpA, входит в состав фрагментов: α -Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -GlcpA-(\rightarrow Некоторая часть боковых углеводных цепей AGP, представлена фрагментами:

... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 3,5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow ..., α -Araf-(1 \rightarrow 5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow ... и/или ... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow Остатки T- β -D-Galp, T- α -L-Araf, T- α -L-Rhap и T- α -L-Fucp находятся на невосстанавливающих концах боковых цепей.

Научная новизна:

1. Впервые выделены и охарактеризованы AGP, пектиновые полисахариды и связующие гликаны из надземной части *Heracleum sosnowskyi*.

2. Впервые изучен характер изменения выхода и моносахаридного состава AGP, пектинов и связующих гликанов в зависимости от природы экстрагента и этапа экстракции при выделении их из надземной части *Heracleum sosnowskyi*.

3. Впервые установлены структурные элементы пектина *Heracleum sosnowskyi* и обнаружено, что кор макромолекулы представлен участками частично метилэтерифицированного и частично ацетилированного 1,4- α -D-галактуронана, а также участками частично 2-*O*- и/или 3-*O*-ацетилированного RG-I, боковые цепи которого образованы фрагментами AG-I и разветвленного 1,5- α -L-арабинана (минорный фрагмент).

4. Впервые установлены структурные элементы углеводной части макромолекулы AGP *Heracleum sosnowskyi* и показано, что она состоит из AG-II, главная цепь которого представлена остатками 1,3- β -D-Galp и 1,3,6- β -D-Galp, а боковые цепи образованы остатками 1,6- и 1,3,6- β -D-Galp, 1,5- и 1,3,5- α -L-Araf, 4-*O*-Me- β -D-GlcpA и 1,4- β -D-GlcpA.

Практическая и теоретическая значимость.

Установлено, что надземная часть борщевика является потенциальным источником отечественного пектина (содержание до 17% от массы сухого сырья), который может быть использован в составе функциональных продуктов. Установленные изменения выхода и состава полисахаридных фракций в процессе экстракции позволяют целенаправленно получать полисахариды с желаемым составом для последующего изучения, либо практического применения. Изученные структурные особенности компонентов *H. sosnowskyi* будут способствовать разработке научных основ его переработки и определению областей применения продуктов на его основе. Данные о химическом строении полисахаридов борщевика позволяют расширить знания о структурном разнообразии полисахаридов растительного происхождения, а также могут быть использованы для выявления особенностей строения полисахаридов других травянистых растений. Результаты изучения структуры полисахаридов *H. sosnowskyi* расширяют потенциальные возможности для направленного исследования зависимости физиологической активности от структурных особенностей макромолекулы. Полученные результаты по биологической активности подтверждают перспективность использования борщевика как источника веществ, которые оказывают влияние на биологические процессы, например, обладают ростстимулирующим действием.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на Всероссийской конференции по органической химии «ОргХим – 2013» (Санкт-Петербург, 2013), III Всероссийской конференции "Современные проблемы химической науки и фармации" (Чебоксары, 2014), IV Всероссийской научной конференции «Химия и технология новых веществ и материалов» (Сыктывкар, 2014), IX Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Москва, 2015), III Всероссийской научной конференции «Теоретические и экспериментальные исследования процессов синтеза, модификации и переработки полимеров» (Уфа, 2015), XI Международной конференции «daRostim» (Сыктывкар, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ: четыре статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и 7 тезисов.

Личный вклад автора. Выполнен анализ литературы по теме исследования, проведено планирование экспериментов, получена основная часть результатов, проведены интерпретация и систематизация полученных результатов, написаны статьи и подготовлены доклады на конференциях. На защиту вынесены только те результаты исследований, в получении которых роль автора была определяющей.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 178 страницах, содержит 24 рисунка и 28 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и обсуждения, выводов, а также списка цитируемой литературы, содержащего 238 источников, в том числе 197 на английском языке.

Работа выполнена в ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН в соответствии с планом НИР, при поддержке проекта УрО РАН № 15-21-3-11 и с использованием оборудования Центров коллективного пользования «Химия» (Институт химии) и "Геонаука" (Институт геологии).

Принятые сокращения. AG – арабиногалактан, AGP – арабиногалактановые белки, HG – гомогалактуронан, RG-I – рамногалактуронан I, Mw – средневесовая молекулярная масса, Mw/Mn – степень полидисперсности, SA – степень ацетилирования, SM – степень метилэтерифицирования, ЧКГ – частичный кислотный гидролиз, ГХ – гельхроматография, ИОХ – ионообменная хроматография, ФГ – ферментативный гидролиз, Т – терминальный остаток.

Результаты исследований и обсуждение

1. Выделение и общая химическая характеристика полисахаридов

H. sosnowskyi. Свежесобранную надземную часть борщевика Сосновского (целые растения, включающие в себя листья, стебли и цветки), заготовленную в июле в период цветения растения (г. Сыктывкар, Республика Коми), предварительно измельчали и экстрагировали этиловым спиртом для удаления экстрактивных веществ. Полученный материал последовательно экстрагировали водой, раствором соляной кислоты, раствором оксалата аммония, растворами гидроксидов калия и натрия. Для каждой ступени обработки применяли пятикратную экстракцию. Фракции с каждой экстракции собирали отдельно. В результате получили набор фракций полисахаридов: HS_W-I – HS_W-V (H₂O, 70°C), HS_A-I – HS_A-V (р-р HCl, pH~3.5-4, 70°C), HS_O-I – HS_O-V (0.7%-ный р-р (NH₄)₂C₂O₄, 70°C), HS_K-I – HS_K-V (7.0%-ный р-р KOH, 25°C) и HS_N-I – HS_N-V (14.0%-ный р-р NaOH, 25°C). Показано, что главными полисахаридами, выделенными из борщевика Сосновского, являются пектиновые полисахариды, экстрагируемые оксалатом аммония, при этом максимальный выход наблюдается для первой экстракции и составляет ~12.5%.

Моносахаридный анализ фракций HS_W-I – HS_W-V выявил высокое содержание остатков GliA и Gal (табл. 1). Показано, что при последовательной экстракции содержание остатков GliA и Rha в полученных фракциях увеличивается от 23 до 59% и от 2.1 до 3.8% соответственно, в то время как содержание остатков Gal снижается с 37 до 17% (табл. 1). Содержание остатков Ara практически не зависит от ступени экстракции и составляет ~5%. Вероятно, фракции HS_W-I – HS_W-V характеризуются значительным содержанием AG-II, часто являющегося углеводной частью макромолекулы AGP, а также содержат пектиновые полисахариды. Для исследования структуры использовали фракции с первой и с пятой ступени экстракции.

Таблица 1. Выход и состав фракций *H. sosnowskyi* (вес. %)

| Фракции | Выход *, % | GliA | Нейтральные моносахариды | | | | | | Белок |
|----------------------|------------|------|--------------------------|-----|-----|-----|------|-----|-------|
| | | | Gal | Ara | Rha | Xyl | Glc | Man | |
| HS _W -I | 0.6 | 23.0 | 36.6 | 5.6 | 2.1 | 0.2 | 2.3 | 1.3 | 8.5 |
| HS _W -II | 0.2 | 35.0 | 16.3 | 3.2 | 3.7 | 1.5 | 4.0 | 1.4 | 9.1 |
| HS _W -III | 0.2 | 40.0 | 17.0 | 4.6 | 3.8 | 0.7 | 5.1 | 1.4 | 8.5 |
| HS _W -IV | 0.1 | 58.7 | 16.6 | 5.1 | 3.7 | 1.7 | 5.2 | 0.9 | 8.1 |
| HS _W -V | 0.1 | 57.0 | 17.4 | 4.9 | 3.6 | 1.7 | 8.2 | 0.6 | 6.6 |
| HS _A -I | 0.2 | 49.7 | 14.2 | 8.2 | 2.3 | 3.1 | 3.0 | 0.6 | 5.7 |
| HS _A -II | 0.2 | 51.8 | 17.6 | 6.6 | 2.0 | 0.8 | 2.0 | 0.4 | 5.5 |
| HS _A -III | 0.3 | 52.5 | 16.9 | 9.2 | 2.6 | 0.8 | 2.5 | 0.3 | 5.4 |
| HS _A -IV | 0.6 | 60.0 | 15.5 | 6.8 | 3.0 | 3.1 | 4.3 | 0.2 | 5.6 |
| HS _O -I | 12.5 | 83.0 | 4.7 | 2.6 | 3.7 | 0.6 | 2.6 | 0.5 | 2.0 |
| HS _O -II | 2.7 | 80.0 | 5.1 | 4.2 | 3.7 | 0.7 | 2.6 | 0.2 | 3.2 |
| HS _O -III | 1.0 | 77.3 | 4.5 | 4.8 | 3.4 | 0.7 | 2.0 | 0.1 | 3.7 |
| HS _O -IV | 0.5 | 51.3 | 11.7 | 5.3 | 5.4 | 2.1 | 10.0 | 0.3 | 3.5 |
| HS _O -V | 0.5 | 57.4 | 4.9 | 1.8 | 2.2 | 0.6 | 3.2 | 0.1 | 3.0 |

*- от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

При анализе моносахаридного состава фракций HS_A-I - HS_A-IV (фракция HS_A-V была испорчена) установлено, что они имеют близкое содержание нейтральных моносахаридов и гликуроновых кислот, как между собой, так и в сравнении с фракциями HS_W-IV и HS_W-V. Фракции HS_A-I – HS_A-IV были объединены в одну фракцию HS_A, поскольку имели схожий моносахаридный состав (табл. 1).

Моносахаридный анализ фракций HS_O-I – HS_O-V выявил высокое содержание

остатков GliA. Установлено, что при последовательной экстракции содержание остатков GliA и Rha в полученных фракциях уменьшается от 83 до 51% и от 3.7 до 2.2% соответственно. Вероятно, фракции HS_O-I – HS_O-V характеризуются значительным содержанием пектиновых полисахаридов. Для исследования структуры использовали главную по выходу фракцию HS_O-I.

Показано, что при последовательной экстракции водой, водным р-ром HCl и р-ром оксалата аммония содержание белка уменьшается от ~9 до ~2% (табл. 1).

Таким образом, при изучении количественного и качественного моносахаридного состава выделенных фракций борщевика выявлено, что в состав их углеводных цепей входят преимущественно остатки GliA, Gal, Ara и Rha – характерные компоненты пектиновых полисахаридов и AG-II, часто присутствующего в виде AGP.

2. Исследование структуры полисахаридов *H. sosnowskyi*

Фракционированием методом *ионообменной хроматографии* (ИОХ) на ДЭАЭ-целлюлозе (табл. 2) установлено, что фракция HS_W-I состоит главным образом из двух полимеров HS_W-I₁ (Mw 8.5 кДа) и HS_W-I₂ (Mw 9.5 кДа), элюируемых 0.01 М и 0.1 М NaCl соответственно, характеризующихся высоким содержанием остатков Gal, Ara и GliA.

Таблица 2. Выход и состав фракций HS_W и HS_A (вес. %)

| Фракции | Выход*, % | GliA | Нейтральные моносахариды | | | | | | Белок |
|---------------------------------|-----------|------|--------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-------|
| | | | Gal | Ara | Rha | Xyl | Glc | Man | |
| HS _W -I ₁ | 19.1 | 17.2 | 65.0 | 8.0 | 2.0 | 0.5 | 2.0 | 0.7 | 2.1 |
| HS _W -I ₂ | 35.9 | 20.0 | 43.6 | 8.0 | 2.0 | 0.5 | 1.9 | 1.3 | 2.0 |
| HS _A -S | 0.3** | 19.6 | 2.1 | 35.2 | 2.6 | 1.6 | 6.6 | 4.0 | 8.7 |
| HS _A -1 | 5.3 | 7.5 | 41.7 | 8.0 | 0.8 | 0.5 | 1.8 | 0.4 | 3.3 |
| HS _A -2 | 55.4 | 42.4 | 20.0 | 6.8 | 3.9 | 0.7 | 1.1 | 0.2 | 3.7 |
| HS _A -3 | 21.9 | 67.0 | 7.8 | 3.8 | 4.7 | 0.6 | 1.0 | 0.9 | 3.5 |

* – выходы фракций, от нанесенного на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой;

** - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Фракции HS_W-I₁, HS_W-I₂, HS_W-V были изучены методом ЯМР спектроскопии.

В спектре ¹H/¹³C HSQC фракции HS_W-I₁ обнаружены интенсивные сигналы, которые принадлежат остаткам 1,3-, 1,6-, 1,3,6-β-D-Galp – характерным компонентам AG-II (рис. 1). В спектре ROESY фракции HS_W-I₁ присутствуют корреляционные кросс-пики: H1/H3 4.68/3.83 м.д. и H1/H5 4.68/3.76 м.д. остатков 1,3-β-D-Galp, подтверждающих присутствие фрагментов: ...→[3]-β-D-Galp-(1)_n→... Детальный анализ спектра НМВС данной фракции позволил выявить корреляционные пики: C6/H1 72.4/4.47, C1/H6;H6' 106.3/4.04;3.92, C4/H3 71.7/3.68, C4/H5 71.7/3.91, C5/H6 76.7/3.92, C3/H2 75.6/3.57, C1/H2 106.3/3.57, C2/H5 73.9/3.91 м.д. остатков 1,6-β-D-Galp, указывающих на присутствие фрагментов: ...→[6]-β-D-Galp-(1)_n→... Спектр ROESY подтверждает присутствие вышеуказанных фрагментов (...→[6]-β-D-Galp-(1)_n→...) наличием *транс*- и *интра*-гликозильных корреляционных кросс-пигов: H1 с H3, H5, H6 при 4.47/3.68, 4.47/3.91 и 4.47/4.04 м.д.

В гомоядерном спектре COSY присутствуют интенсивные корреляционные кросс-пики H1/H2 при 4.49/3.68 м.д. и 4.55/3.70 м.д., принадлежащие 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Galp. Вероятно, сигналы при 4.49/3.68 м.д. принадлежит остаткам 1,3,6-β-D-Galp главной углеводной цепи AG-II, замещенных по атому *O*-3 остатками 1,3- или 1,3,6-β-D-Galp, в то время как сигнал при 4.55/3.70 м.д., принадлежит остаткам 1,3,6-β-D-Galp боковой углеводной цепи AG-II, замещенных по атому *O*-3 остатками *T*- и/или 1,5-α-L-Araf.

В аномерной области спектра ¹H/¹³C HSQC (рис. 1) имеются сигналы высокой

интенсивности остатков T- α -L-Araf 111.4/5.45; 5.41 и 112.6/5.25 м.д., а также сигналы слабой интенсивности при 110.7/5.09 м.д. остатков 1,5- α -L-Araf. Все вышесказанное позволяет предположить присутствие во фракции HS_w-I₁ фрагментов: ... \rightarrow 6)[α -L-Araf(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf(1 \rightarrow 3)] β -D-Galp(1 \rightarrow ..., α -L-Araf(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 6)[α -L-Araf(1 \rightarrow 3)] β -D-Galp(1 \rightarrow ..., в соответствии с другими исследованиями AGP (Redgwell et al. 2011, Tan et al. 2004, Tryfona et al. 2012).

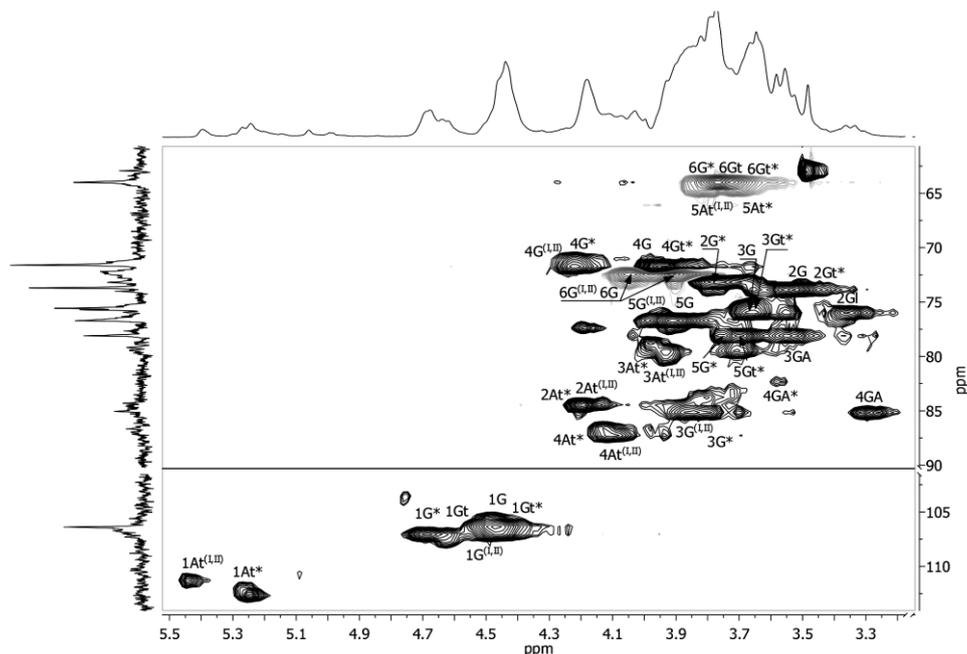


Рисунок 1. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида HS_w-I₁

Интенсивные сигналы C/H-атомов CH₃O-групп в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (рис. 1) при 62.8/3.48 и C4/H4 при 85.2/3.28 м.д. указывают на наличие 4-*O*-Me- β -D-GlcpA. В спектре НМВС наблюдаются кросс-пики при 85.2/3.48 м.д. и 62.8/3.28 м.д., подтверждающие, что остатки β -D-GlcpA имеют CH₃O-группу по 4-му положению. По литературным данным остатки 4-*O*-Me- β -D-GlcpA могут находиться на невозстанавливающих концах боковых цепей β -(1 \rightarrow 6)-галактана: 4-*O*-Me- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galp-(1 \rightarrow

AGP обнаруженные в корнях *Echinacea pallida*, в корнеплодах *Raphanus sativus*, *Zea mays*, *Lucium barbarum*, аравийской камеди, *Arabidopsis thaliana* также содержали остатки GlcA и 4-*O*-Me- β -D-GlcA (Ellis et al., 2010; Göllner et al., 2011; Konishi et al., 2008; Redgwell et al., 2011; Thude & Classen, 2005; Tryfona et al., 2012).

Кроме того, в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (рис. 1) присутствует корреляционный пик C4/H4 при 82.4/3.58 м.д., подтверждающий наличие остатков: ... \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow Остатки 1,4- β -D-GlcpA были ранее обнаружены в AGP, выделенных из *L. barbarum* (Redgwell et al., 2011). В аномерной области спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC фракции HS_w-I₁ наблюдаются сигналы остатков T- α -L-Rhap при 103.7/4.76 м.д., которые, вероятно, связаны с остатками GlcpA посредством 1,4-связи: α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpA-(1 \rightarrow

Также в спектрах ЯМР фракции HS_w-I₁ наблюдаются сигналы низкой интенсивности остатков 1,4- α -D-GalpA. Остатки GlcpA и GalpA согласно соотношению интегральных интенсивностей присутствуют в соотношении ~14:1. Таким образом, уроновые кислоты во фракции HS_w-I₁ представлены преимущественно остатками 4-*O*-Me- β -D- и 1,4- β -D-GlcpA.

В спектре COSY в сильной области идентифицируются корреляционные кросс-пики H6/H3 1.32/4.08, H6/H2 1.32/4.12 и H6/H2 1.24/4.04 м.д., свидетельствующие о присутствии 1,2-связанных и 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α -L-Rhap. Наличие вышеприведенных остатков α -L-Rhap и 1,4- α -D-GalpA указывает на присутствие пектиновых полисахаридов.

При подробном анализе ЯМР спектров фракции HS_W-I₂ можно сделать заключение, что данная фракция характеризуется аналогичными по строению элементами структуры, в сравнении с фракцией HS_W-I₁.

В спектре ¹H/¹³C HSQC фракции HS_W-V наблюдается интенсивный сигнал C/H-атомов CH₃O-групп при 55.8/3.81 м.д., указывающий на наличие остатков 1,4-α-D-GalpA(OMe). Интенсивность H1 сигналов в спектре ¹H-ЯМР остатков 1,4-α-D-GalpA, по сравнению с остатками 4-O-Me-β-D-GlcpA, значительно выше, что указывает на преобладание пектиновых полисахаридов в данной фракции.

Из представленных результатов можно сделать вывод, что фракции HS_W-I – HS_W-V представляют собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов и различаются между собой большим или меньшим содержанием остатков 4-O-Me-β-D-GlcpA, 1,4-β-D-GlcpA и 1,4-α-D-GalpA. Установлено, что при последовательной экстракции борщевика водой содержание урсонных кислот увеличивается от 23 до 59%, а содержание AG-II уменьшается, что свидетельствует об увеличении содержания пектиновых полисахаридов и уменьшении содержания AGP в выделенных фракциях.

Фракционированием методом ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе показано, что фракция HS_A состоит преимущественно из полисахаридов HS_A-2 и HS_A-3, элюируемых 0.1 и 0.2 М NaCl соответственно, характеризующихся высоким содержанием остатков GliA, Gal и Ara (табл. 2). Можно предположить, что фракция HS_A имеет аналогичные по строению элементы структуры, в сравнении с фракциями HS_W-IV и HS_W-V, и представляет собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов с преобладанием последних.

Выделение полисахаридов HS_A-S, HS_O-S₁ и HS_O-S₂. Из объединённых водно-спиртовых супернатантов, полученных при осаждении фракций HS_A-I – HS_A-V и HS_O-I – HS_O-V этанолом, выделены полисахаридные фракции, при фракционировании которых методом гельхроматографии (ГХ) получены полисахариды HS_A-S (Mw 13.9 кДа, Mw/Mn 1.8), HS_O-S₁ (Mw 14.4 кДа, Mw/Mn 1.9) и HS_O-S₂ (Mw 11.7 кДа, Mw/Mn 1.7) соответственно (табл. 2, 3). Вероятно, данные полисахариды присутствуют в зелёной массе борщевика как свободные полисахариды, образовавшиеся в процессе постсинтетической модификации или биосинтеза макромолекулы пектина. Исследование их структурных особенностей может существенно дополнить сведения о строении пектинов борщевика.

ЯМР исследования полисахаридов HS_A-S и HS_O-S₂. Анализ спектров ЯМР полисахарида HS_O-S₂ свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи участков, представленных остатками 1,4-α-D-GalpA, 1,4-α-D-GalpA(OMe) (CM 21%), а также 1,4-α-D-GalpA(OAc) (CA 34%). Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2-α-L-Rhap и 1,2,4-α-L-Rhap ¹H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 1:1, из этого следует, что в полисахариде HS_O-S₂ около половины из всех остатков рамнозы являются точками разветвления главной углеводной цепи RG-I.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-S₂ наблюдаются корреляционные кросс-пики: H1 атомов остатков α-Rhap/1,4-α-GalpA 5.26/5.00 м.д.; H1/H4 остатков α-Rhap/1,4-α-GalpA 5.26/4.42 м.д.; H1/H3 остатков α-Rhap/1,4-α-GalpA 5.26/4.12 м.д., свидетельствующих о присутствии участков: ...→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→...; H2/H1 остатков α-Rhap/1,4-α-GalpA 5.01/4.12 м.д., свидетельствующих о присутствии участков: ...→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→....

При анализе двумерных спектров ЯМР полисахарида HS_O-S₂ обнаружены сигналы, относящиеся к остаткам T-, 1,5-, 1,2,5-, 1,3,5- и 1,2,3,5-α-L-Araf, которые свидетельствуют о наличии высоковетвленного 1,5-α-L-арабинана. В спектре ROESY установлено присутствие *транс*- и *интра*-гликозильных корреляционных кросс-пигов: H1/H3, H5,5' 5.09/4.01, 3.87, 3.81 м.д., которые свидетельствуют о присутствии фрагмента

...→5)- α -L-Araf-(1→...; H1/H2 T- α -L-Araf/1,2,3,5- α -L-Araf 5.15/4.30 м.д., указывающих на присоединение остатков T- α -L-Araf по 2-му положению к остаткам 2,3,5-три-*O*-замещенной α -L-Araf; H1/H3 T- α -L-Araf/1,3,5- α -L-Araf 5.17/4.09 м.д., вероятно, указывающих на присоединение остатков T- α -L-Araf по 3-му положению к остаткам 1,3,5- α -L-Araf.

Соотношение остатков α -L-Ara/2,4-ди-*O*-замещенной Rha ~ 11, а также значительное количество 1,2,5- и 1,3,5- α -L-Araf в полисахариде HS_O-S₂, вероятно, свидетельствуют о присутствии длинных высоковетвленных боковых цепей, а также о небольшой длине участков кора RG-I.

Детальный анализ спектров также позволил обнаружить сигналы, принадлежащие остаткам 1,4- β -D-Xylp, 1,4- β -D-Manp и 1,4- β -D-Glcp.

Спектроскопией ЯМР установлено, что фракция HS_A-S характеризуется аналогичными по строению элементами структуры, в сравнении с фракцией HS_O-S₂. Таким образом, полученные фракции содержали несколько классов полисахаридов, главным образом пектиновые полисахариды, содержащие в боковой углеводной цепи значительные участки высоковетвленного 1,5- α -L-арабинана, а также связующие гликаны класса глюкоманнанов и класса арабиноксиланов.

Ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе показано, что фракция HS_O-I состоит в основном из двух полисахаридов HS_O-I₁ и HS_O-I₂, элюируемых 0.1 М и 0.2 М NaCl. Главными компонентами их углеводных цепей являются остатки GliA, Rha, Gal и Ara – характерные компоненты главной и боковых углеводных цепей HG и RG-I (табл. 3).

Таблица 3. Выход и состав фракций HS_O *H. sosnowskyi* (вес. %)

| Фракции | Выход, % от HS _O -I | GliA | Нейтральные моносахариды | | | | | | Белок |
|-----------------------------------|-----------------------------------|------|--------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | | | Gal | Ara | Rha | Xyl | Glc | Man | |
| HS _O -S ₁ | 0.18* | 23.4 | 5.7 | 4.6 | 3.5 | 1.0 | 10.1 | 3.4 | 17.1 |
| HS _O -S ₂ | 0.24* | 16.0 | 4.6 | 25.2 | 4.4 | 3.5 | 14.8 | 10.0 | 13.0 |
| HS _O -I ₁ | 27.0 | 67.0 | 9.1 | 4.1 | 6.8 | н.о. | 0.4 | 0.1 | 1.1 |
| HS _O -I ₂ | 51.9 | 93.0 | 1.8 | 1.0 | 2.4 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 1.0 |
| HS _O -I ₃ | 4.1 | 85.0 | 2.9 | 1.3 | 2.4 | 0.3 | 1.1 | 0.5 | 4.1 |
| HS _O -I-H | 56.8 | 92.0 | 1.5 | н.о. | 2.0 | н.о. | н.о. | н.о. | 3.8 |
| HS _O -H ₁ | 16.9 | 96.0 | 0.4 | н.о. | 1.9 | н.о. | н.о. | н.о. | - |
| HS _O -H ₂ | 20.9 | 87.0 | 2.1 | н.о. | 2.8 | н.о. | сл. | 0.2 | - |
| HS _O -I-H ₁ | 20.5 | 70.0 | 11.3 | н.о. | 8.0 | н.о. | сл. | н.о. | - |
| HS _O -I-H ₂ | 1.3 | 44.2 | 14.4 | 0.2 | 11.0 | н.о. | н.о. | 2.5 | 3.5 |

* - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья; н.о. – не обнаружено; сл. – следы.

В результате **частичного кислотного гидролиза** (ЧКГ) полисахарида HS_O-I 0.05 М ТФУ получены полисахаридные фрагменты: HS_O-I-H (СМ 5.1%), HS_O-I-H₁ (СМ 10%) и HS_O-I-H₂ (СМ 9%) (табл. 3). Фрагмент HS_O-I-H (кислотонерастворимый) является главным по выходу и составляет ~ 57% от массы полисахарида HS_O-I. Показано, что он содержит в основном участки HG и представляет собой пектовую кислоту. При дальнейшем фракционировании этого фрагмента методом ГХ на сефакриле S-300 получены два полисахарида HS_O-H₁ и HS_O-H₂, характеризующиеся высоким содержанием остатков GalpA (87-96%). Наличие среди нейтральных моносахаридов только остатков Rha и Gal указывает на замещение остатков Rha исключительно остатками Gal. Главными компонентами углеводной цепи фрагмента HS_O-I-H₁ (кислоторастворимый) являются остатки GliA, Gal и Rha присутствующие в соотношении GliA:Gal:Rha 8.7:1.4:1 (табл. 3).

Из водно-спиртового супернатанта выделен фрагмент, при дальнейшем

фракционировании которого методом ГХ, получен полисахарид HS₀-I-H₂ с небольшой Mw ~ 12 кДа и Mw/Mn 1.7. При анализе его моносахаридного состава установлено высокое содержание остатков GliA, Gal и Rha – характерных компонентов боковой и главной углеводных цепей RG-I.

При анализе полученных результатов установлено, что обработка ТФУ приводит к удалению почти всех остатков Ara, это указывает на фуранозную форму данных остатков, на наличие боковых цепей, которые представлены главным образом остатками Araf, и/или о том, что на невосстанавливающих концах боковых цепей находятся остатки T-Araf.

Таким образом, в результате ЧКГ полисахарида HS₀-I получены фрагменты, содержащие главным образом линейную область (HS₀-I-H, HS₀-H₁, HS₀-H₂), и фрагменты, содержащие значительные участки разветвленной области (HS₀-I-H₁ и HS₀-I-H₂), строение которых было изучено с помощью спектроскопии ЯМР.

Данные ЯМР спектроскопии подтверждают, что кислотонерастворимый фрагмент HS₀-I-H представляет собой преимущественно 1,4- α -D-галактуронан, а боковые цепи его разветвленной области представлены исключительно 1,4- β -D-галактаном.

Положение сигналов в одномерных и двумерных спектрах фрагмента HS₀-I-H₂ свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи участков, представленных остатками 1,4- α -D-GalpA, 1,4- α -D-GalpA(OMe), α -D-GalpA-(1 \rightarrow , \rightarrow 4)- β -D-GalpA и \rightarrow 4)- α -D-GalpA.

В спектре ¹H/¹³C HSQC фрагмента HS₀-I-H₂ (рис. 2) присутствуют сигналы C1/H1 101.7/5.25, C2/H2 79.2/4.11 и C6/H6 19.6/1.24;1.31 м.д., свидетельствующие о присутствии остатков 1,2- α -L-Rhap и 1,2,4- α -L-Rhap. Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2- α -L-Rhap (1.24 м.д.) и 1,2,4- α -L-Rhap (1.31 м.д.) ¹H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 77:23, из этого следует, что большинство остатков α -L-Rhap не являются точками разветвления главной углеводной цепи.

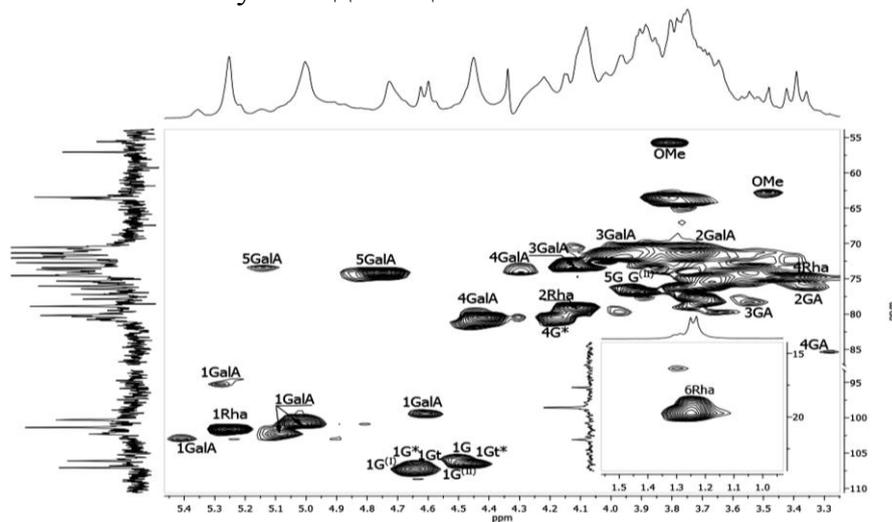


Рисунок 2. Фрагмент спектра ¹H/¹³C HSQC полисахарида HS₀-I-H₂

В спектрах ROESY и HMBC фрагмента HS₀-I-H₂ наблюдаются интенсивные сигналы схожие по химическим сдвигам с полисахаридом HS₀-S₂, подтверждающие присутствие фрагментов: ... \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow ...; ... \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow ...

В ¹H/¹³C HSQC спектре фрагмента HS₀-I-H₂ обнаружены интенсивные сигналы, свидетельствующие о наличии в углеводной цепи участков 1,4- β -D-галактана.

В спектре ROESY присутствуют *транс*- и *интра*- гликозильные корреляционные кросс-пики H1 с H3, H4, H5, H6 при 4.65/3.76, 4.65/4.17, 4.65/3.72, 4.65/3.79 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: ... \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow Спектр HMBC также подтверждает присутствие 1,4-связанных остатков β -D-Galp наличием кросс-пиков: C4/H1 (80.5/4.65 м.д.) и C1/H2 (107.3/3.68 м.д.).

Анализ ЯМР спектров фрагмента $\text{HS}_0\text{-I-H}_2$ позволил также обнаружить корреляционные кросс-пики остатков 1,4- β -D-Galp (H1/H2 4.62/3.51 м.д.), гликозилирующих 2,4-ди-*O*-замещенные остатки α -L-рамнопиранозы по атому *O*-4, что свидетельствует о присутствии участков: ... \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow

Из соотношения интегральных интенсивностей H1 атомов остатков β -D-Galp спектра ^1H -ЯМР следует, что доминирующими являются остатки 1,4- β -D-Galp (4.65/3.68 м.д.) \sim 40% и 1,4- β -D-Galp (4.62/3.51 м.д.) (\sim 20%).

Согласно анализу моносахаридного состава и данным ЯМР спектроскопии средняя длина 1,4- β -D-галактана составляет порядка четырех мономеров, что свидетельствует о присутствии коротких боковых цепей и их низкой разветвленности, состоящих главным образом из фрагментов: β -D-Galp \rightarrow [4]- β -D-Galp-(1) $_3\rightarrow$ 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow

Кислотная обработка привела к удалению всех остатков Aga и, соответственно, к увеличению доли остатков T- β -D-Galp и 1,6- β -D-Galp и к уменьшению доли остатков 3,6-ди-*O*-замещенной β -D-Galp. В спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида $\text{HS}_0\text{-I-H}_2$ (рис. 2) наблюдаются сигналы низкой интенсивности, принадлежащие остаткам 1,3- β -D-Galp и 1,3,6- β -D-Galp, а также остаткам 4-*O*-Me- β -D-GlcpA – характерным компонентам AG-II, вероятно, указывающим на присутствие AGP.

Таким образом, с помощью ЧКГ установлено, что кор полисахарида $\text{HS}_0\text{-I}$ состоит главным образом из участков 1,4- α -D-галактопиранозилуронана и участков RG-I, боковые цепи которого представлены преимущественно участками 1,4- β -D-галактана или AG-I.

В результате ферментативного гидролиза (ФГ) α -1,4-D-полигалактуроназой полисахарида $\text{HS}_0\text{-I-H}_1$ с последующим фракционированием ферментолизата методом ГХ получили полисахарид $\text{HS}_0\text{-I-H}_1\text{-F}$ с выходом 4.2% ($M_w \sim 10.5$ кДа, CM 10%). Главными компонентами его углеводной цепи являются остатки GliA (24%), Gal (13.4%) и Rha (20.4%). Содержание белка составило 1.6%. Молярное соотношение GliA:Rha составляет \sim 1.1:1. Это почти эквимольное соотношение характерно для RG-I, что подтверждает, что кор данного полисахарида построен главным образом из чередующихся остатков [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow)] $_n$ и составляет \sim 26 повторяющихся звеньев. Фракция $\text{HS}_0\text{-I-H}_1\text{-F}$ была исследована методом ЯМР спектроскопии (рис. 3, табл. 4). В спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида $\text{HS}_0\text{-I-H}_1\text{-F}$ (рис. 3) наблюдаются интенсивные сигналы остатков 1,4- α -D-GalpA, α -D-GalpA-(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 4)- β -D-GalpA и ... \rightarrow 4)- α -D-GalpA.

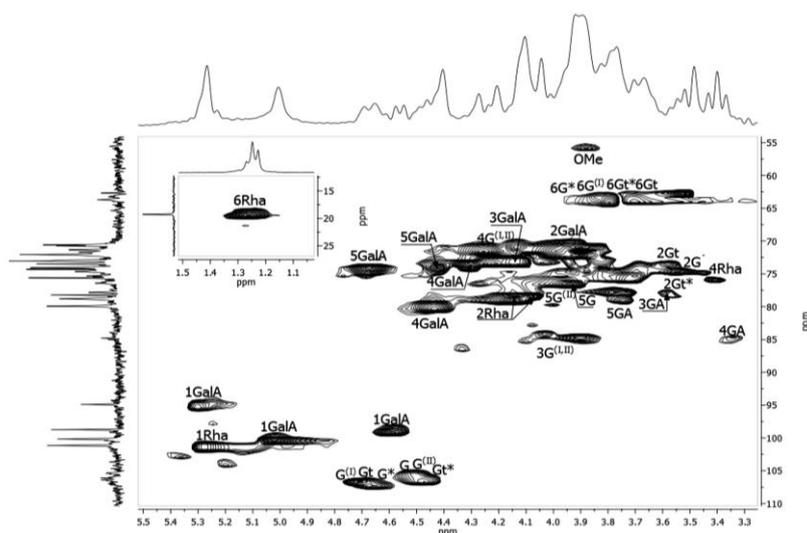


Рисунок 3. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида $\text{HS}_0\text{-I-H}_1\text{-F}$

В спектрах HMBC и ROESY полисахарида $\text{HS}_0\text{-I-H}_1\text{-F}$ наблюдаются интенсивные сигналы схожие по химическим сдвигам с полисахаридами $\text{HS}_0\text{-S}_2$ и $\text{HS}_0\text{-I-H}_2$,

подтверждающие присутствие фрагментов:

...→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→...; ...→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→...

Таблица 4. ¹³C и ¹H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-H₁-F

| Остатки | | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
|--------------------|-------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5;5' | H-6;6' |
| α-GalpA-(1→ | | 100.4 5.01 | 70.9 3.81 | 71.4 3.90 | 73.5 4.28 | 74.1 4.41 | 177.9 |
| α-GalpA-(1→ | | 100.4 5.01 | 70.9 3.81 | 71.6 3.97 | 73,5 4.29 | 74.1 4.66 | 177.9 |
| →4)-α-GalpA-(1→2 | | 100.4 5.00 | 71.7 3.90 | 73.2 4.11 | 80.2 4.42 | 74.1 4.65 | 177.9 |
| →4)-α-GalpA-(1→2 | | 100.4 5.05 | 71.7 3.91 | 73.2 4.07 | н.о. 4.27 | 74.1 4.65 | 177.9 |
| →4)-α-GalpA | | 95.2 5.29 | 70.9 3.81 | 71.6 3.99 | 80.2 4.41 | 74.1 4.65 | 177.9 |
| →4)-β-GalpA | | 99.5 4.60 | 74.4 3.48 | 74.8 3.76 | 80.7 4.38 | 76.7 4.27 | 177.9 |
| →4)-β-GalpA | | 99.1 4.56 | 74.4 3.49 | 73.7 3.68 | н.о. 4.21 | 78.6 4.04 | 177.9 |
| →2)-α-Rhap-(1→ | | 101.4 5.28 | 79.0 4.12 | 71.9 3.89 | 75.8 3.41 | 72.2 3.79 | 19.3 1.24 |
| →2)-α-Rhap-(1→ | | 101.4 5.22 | 78.4 4.08 | 71.9 3.88 | н.о. 3.50 | н.о. 3.97 | 19.3 1.24 |
| β-Galp-(1→ | Gt | 107.4 4.61 | 73.6 3.59 | 75.5 3.69 | 71.7 3.92 | 77.8 3.72 | 63.9 3.78 |
| β-Galp-(1→ | Gt* | 106.5 4.43 | 74.6 3.52 | 75.5 3.66 | 71.7 3.92 | 77.8 3.75 | 63.9 3.78 |
| →4)-β-Galp-(1→ | G* | 107.2 4.62 | 75.0 3.67 | 75.8 3.76 | 80.2 4.18 | 77.8 3.75 | 63.9 3.78 |
| →4)-β-Galp-(1→ | G* | 107.2 4.64 | 73.6 3.61 | 75.5 3.79 | 80.2 4.17 | 77.8 3.75 | 63.9 3.78 |
| →3)-β-Galp-(1→ | G ^(I) | 106.7 4.69 | 72.9 3.77 | 84.8 3.87 | 71.4 4.26 | н.о. 3.67 | 63.9 3.78 |
| →6)-β-Galp-(1→ | G | 106.5 4.47 | 74.6 3.54 | 75.5 3.67 | 71.3 3.97 | 76.5 3.91 | 72.2 4.03;3.92 |
| →3,6)-β-Galp-(1→ | G ^(II) | 106.5 4.45 | 73.2 3.69 | 84.2 4.03 | 70.9 4.13 | 76.5 3.91 | н.о. 4.04;3.92 |
| 4-O-Me-β-GlcpA-(1→ | GA | 105.2 4.48 | н.о. 3.36 | 78.1 3.57 | 84.8 3.28 | 79.0 3.74 | 178.9 |

н.о. – не определены.

Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2-α-L-Rhap (1.24 м.д.) и 1,2,4-α-L-Rhap (1.31 м.д.) ¹H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 90:10, из этого следует, что большинство остатков α-L-Rhap не являются точками разветвления главной углеводной цепи.

В гомоядерном спектре COSY наблюдаются сигналы высокой интенсивности H1/H2 4.64/3.61, H2/H3 3.61/3.79, H3/H4 3.79/4.17 м.д. остатков 1,4-β-D-Galp.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-H₁-F присутствуют корреляционные кросс-пики низкой интенсивности H1 с H3, H4 при 4.62/3.76, 4.62/4.18 м.д., указывающие на невысокое содержание фрагментов: ...→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Galp-(1→..., в отличие от полисахарида HS_O-I-H₂, где данные остатки были преобладающими.

Соотношение интегральных интенсивностей сигналов H1/H2 единичного остатка 1,4-β-D-Galp (4.64/3.61 м.д.) к цепи из остатков 1,4-связанной β-D-Galp (4.62/3.67 м.д.) составляет ~ 6:1, что свидетельствует о преобладании в полисахариде HS_O-I-H₁-F коротких

боковых углеводных цепей: β -D-Galp \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow

Кроме того, совместный анализ одномерных и двумерных спектров позволил установить сигналы (табл. 4) характерные для остатков T-, 1,3-, 1,6- и 1,3,6- β -D-Galp, а также 4-O-Me- β -GlcA, вероятно, принадлежащих углеводной части макромолекулы AGP.

Из соотношения интегральных интенсивностей H1 остатков β -D-Galp спектра 1 H-ЯМР полисахарида HS_O-I-H₁-F следует, что преобладающими являются остатки 1,4- β -D-Galp (~ 24%), 1,6- β -D-Galp (~ 22%) и 1,3- β -D-Galp (~ 18%). Наименьшую интенсивность сигналов имеют 3,6-ди-O-замещенные остатки β -D-Galp, что, вероятно, объясняется удалением остатков арабинозы при кислотной обработке.

Согласно литературным данным остатки, участвующие в ковалентной связи между AGP и пектиновыми полисахаридами, не определены, за исключением работы Tan 2013, где показано, что RG-I ковалентно присоединен к AGP, что предполагает присутствие структурного звена: ... \rightarrow 4- α -D-GalA-1 \rightarrow 2- α -L-Rha-1 \rightarrow 4- β -D-GlcA-1 \rightarrow 6- β -D-Gal \rightarrow При этом авторами показано, что остатки GalpA, находящиеся на восстанавливающих концах углеводных цепей, отсутствуют. Тем не менее, в нашем случае остатки, представляющие собой α и β аномеры ... \rightarrow 4)- β -GalpA и ... \rightarrow 4)- α -GalpA, присутствуют в ряде полученных фрагментов, что, вероятно, свидетельствует о том, что AGP могут быть связаны с пектиновой макромолекулой иным способом.

Следует отметить, что главная углеводная цепь полисахарида HS_O-I-H₁-F представлена RG-I, при этом среди нейтральных моносахаридов преобладающими являются остатки характерные для углеводной части макромолекулы AGP, что указывает на то, что AGP непосредственно связаны с участками RG-I.

При ферментативной обработке 1,4- α -D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I получен фрагмент HS_O-I-F₁ (схема 1, табл. 5). ФГ полисахарида HS_O-I сопровождается заметным расщеплением углеводной цепи, что подтверждает присутствие значительных участков линейного неэтерифицированного галактуронана.

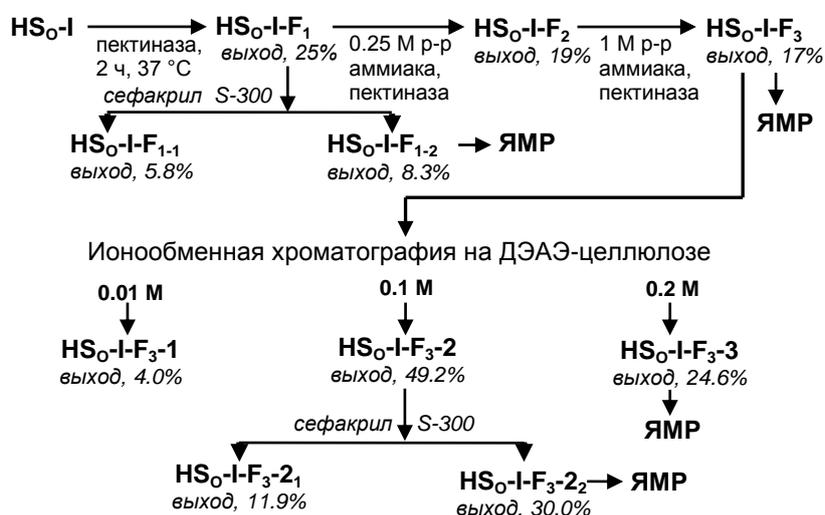


Схема 1. Ферментативный гидролиз с последующей ИОХ полисахарида HS_O-I.

Таблица 5. Выход и состав фракций, полученных методом ФГ (вес. %)

| Фракции | Выход*, % | GliA | Нейтральные моносахариды | | | | | | | Белок |
|-------------------------------------|-----------|------|--------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-------|
| | | | Gal | Ara | Rha | Xyl | Fuc | Glc | Man | |
| HS _O -I-F ₁ | 25.0 | 55.0 | 11.7 | 3.6 | 11.7 | 0.5 | 0.6 | 2.1 | 0.3 | - |
| HS _O -I-F ₁₋₁ | 5.8 | 29.0 | 21.8 | 7.2 | 12.6 | 1.4 | 0.7 | 6.6 | 1.1 | 6.5 |
| HS _O -I-F ₁₋₂ | 8.3 | 48.0 | 7.3 | 2.3 | 6.8 | 0.6 | 0.6 | 4.6 | 0.8 | 5.5 |
| HS _O -I-F ₃ | 17.0 | 42.0 | 14.5 | 4.9 | 15.1 | 0.6 | 0.8 | 2.8 | 0.5 | 0.6 |

* - от исходного полисахарида HS_O-I

В результате последующего фракционирования фрагмента HS_O-I-F₁ методом ГХ получены фракции HS_O-I-F₁₋₁ (СМ 19%, СА 65%) и HS_O-I-F₁₋₂ (СМ 42%, СА 52%, Mw ~11.2 кДа). Фракция HS_O-I-F₁₋₂ была исследована методом ЯМР спектроскопии.

Известно, что активность фермента эндополигалактуроназы повышается после удаления ацетильных и метоксильных групп. Фрагмент HS_O-I-F₁ далее был обработан 0.25 М раствором аммиака и подвергнут ФГ 1,4- α -D-полигалактуроназой, в результате чего получили фрагмент HS_O-I-F₂ (выход 19.0% от HS_O-I). Методом ЯМР установлено, что в состав углеводной цепи фрагмента HS_O-I-F₂ входят участки из остатков 1,4- α -D-GalpA(OMe) (СМ 45%) и/или 1,4- α -D-GalpA(OAc) (СА 64%).

В связи с чем, фрагмент HS_O-I-F₂ был обработан 1 М р-ром аммиака и вновь подвергнут ФГ. В результате исчерпывающей трехкратной обработки полисахарида HS_O-I получен устойчивый к дальнейшему действию пектиназы фрагмент HS_O-I-F₃, характеризующийся низкой СМ остатков 1,4- α -GalpA (СМ 6%). Моносахаридный анализ полученного фрагмента указывает на то, что молярное соотношение GliA:Rha составляет 2.4:1, что свидетельствует о том, что кор данного фрагмента содержит значительные участки RG-I. Фрагмент HS_O-I-F₃ был исследован методом ЯМР спектроскопии.

Полученные при ферментативной обработке фрагменты имеют значительно более низкое содержание уоновых кислот и более высокое содержание нейтральных моносахаридов в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I. Приведенные результаты свидетельствуют о присутствии в полисахариде HS_O-I, как участков линейного α -1,4-D-галактуронана, так и участков разветвленного RG-I.

Подробный анализ спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-F₁₋₂ свидетельствует о присутствии участков, состоящих преимущественно из остатков 1,4- α -D-GalpA(OMe) и/или 1,4- α -D-GalpA(OAc), что подтверждено сигналами высокой интенсивности C/H-атомов CH₃O-групп 55.7/3.78;3.82 м.д. и CH₃CO-групп 23.1/2.13;2.18 м.д. в спектре ¹H/¹³C HSQC. Спектр HMBC подтверждает присутствие вышеуказанных остатков наличием сигналов C6/OMe при 174.7/3.82 и 174.2/3.78 м.д. и CH₃CO-групп при 176.3/2.13;2.18 м.д.

В спектрах ЯМР фракции HS_O-I-F₁₋₂ также установлены интенсивные сигналы характерные для остатков T-, 1,3-, 1,6- и 1,3,6- β -D-Galp, а также 4-O-Me- β -D-GlcpA, свидетельствующих о том, что она имеет схожие элементы структуры, в сравнении с полисахаридом HS_O-I-H₁-F.

Кроме того, в двумерных ЯМР спектрах полисахарида HS_O-I-F₁₋₂ наблюдаются сигналы невысокой интенсивности 1,4-связанных остатков β -D-Galp, указывающие на невысокое содержание фрагментов: ... \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow 4)- β -D-Galp-(1 \rightarrow ..., в отличие от полисахарида HS_O-I-H₂, где данные остатки были доминирующими.

В аномерной области спектра ¹H/¹³C HSQC фракции HS_O-I-F₁₋₂ имеются сигналы высокой интенсивности остатков T- α -L-Araf при 111.3/5.44, 112.2/5.24 м.д. и 1,5- α -L-Araf при 110.4/5.09 м.д., что, по всей вероятности, свидетельствует о присутствии фрагментов: ... \rightarrow 6)[α -L-Araf(1 \rightarrow 3)] β -D-Galp(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 6)[α -L-Araf(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf(1 \rightarrow 3)] β -D-Galp(1 \rightarrow ... и/или α -L-Araf(1 \rightarrow 5)- α -L-Araf(1 \rightarrow 3)- β -D-Galp(1 \rightarrow ..., в соответствии с предыдущими исследованиями AGP (Redgwell et al. 2011, Tan et al. 2004, Tryfona et al. 2012).

В спектре COSY также отмечают сигналы невысокой интенсивности атомов H1/H2 остатков T- α -L-Araf 5.15/4.13 м.д. и 1,3,5- α -L-Araf 5.11/4.28 м.д.

В спектре COSY фракции HS_O-I-F₁₋₂ также присутствуют корреляционные кросс-пики H1/H2 4.48/3.68 м.д. и 4.55/3.71 м.д. 3,6-ди-O-замещенных остатков β -D-Galp. Следует отметить, что сигнал при 4.55/3.71 м.д., принадлежащий остаткам 1,3,6- β -D-Galp боковой углеводной цепи, вероятно, замещенных по атому O-3 остатками T- α -L-Araf и/или 1,5- α -L-Araf, отсутствовал в спектрах полисахаридов HS_O-I-H₂ и HS_O-I-H₁-F.

Анализ спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-F₃ (рис. 4) свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи участков: ...→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→... и ...→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→....

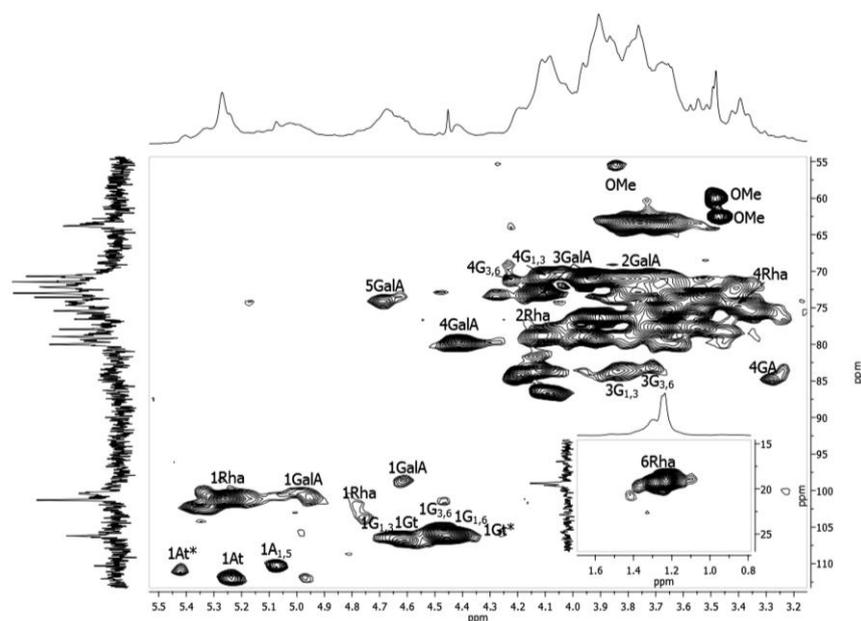


Рисунок 4. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида HS_O-I-F₃

Следует отметить полное отсутствие в спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-F₃ остатков 1,4-α-D-GalpA(OAc) и низкое содержание остатков 1,4-α-D-GalpA(OMe) (СМ 6%). Совместный анализ спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-F₃ позволил установить интенсивные сигналы характерные для остатков углеводной части макромолекулы AGP.

Таким образом, можно заключить, что в полисахариде HS_O-I-F₃, по сравнению с полисахаридом HS_O-I-F_{1,2}, значительно увеличивается доля RG-I, при этом среди нейтральных моносахаридов превалируют главным образом остатки характерные для AGP, что еще раз подтверждает, что AGP непосредственно связаны с участками RG-I.

Структурное исследование полисахарида HS_O-I с помощью ФГ свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи участков частично метилэтерифицированного и/или частично ацелированного 1,4-α-D-галактопиранозилуронана и участков частично 2-O- и в основном 3-O- ацелированного RG-I, боковые цепи которого представлены главным образом остатками 1,4-связанной β-D-Galp, указывающими на наличие 1,4-β-D-галактана или AG-I. Остатки 3-O-, 6-O- и 3,6-ди-O-замещенной β-D-Galp, 4-O-Me-β-D-GlcpA, T-α-L-Araf и 1,5-связанной α-L-Araf, которые являются характерными компонентами AG-II, вероятно, принадлежат углеводной части макромолекул AGP.

Можно сделать заключение, что результаты, полученные с помощью метода ФГ, подтвердили и существенно дополнили результаты полученные методом ЧКГ.

Для того чтобы доказать, что в результате ферментативного гидролиза пектин и AGP не отделяются друг от друга и, вероятно, связаны ковалентной связью, было проведено фракционирование полисахарида HS_O-I-F₃ методом ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе. Установлено, что полисахарид HS_O-I-F₃ состоит главным образом из двух фракций HS_O-I-F₃-2 (выход 49.2%) и HS_O-I-F₃-3 (выход 24.6%), элюируемых 0.1 М и 0.2 М NaCl соответственно (табл. 6). В результате последующего фракционирования фракции HS_O-I-F₃-2 методом ГХ были получены две фракции HS_O-I-F₃-2₁ и HS_O-I-F₃-2₂, основными компонентами углеводных цепей которых являются остатки GliA, Gal, Ara и Rha (табл. 6).

Подробный анализ ЯМР спектров полисахаридов HS_O-I-F₃-2₁ (рис. 5) и HS_O-I-F₃-3, указывает на то, что их главная углеводная цепь состоит главным образом из участков

RG-I: ...→2)- α -L-Rhap-(1→4)- α -D-GalpA-(1→..., ...→4)- α -D-GalpA-(1→2)- α -L-Rhap-(1→.... Боковые цепи RG-I состоят преимущественно из остатков T- α -L-Araf и 1,4- β -D-Galp, указывающих на присутствие AG-I.

Таблица 6. Выход и состав фракций, полученных методом ИОХ полисахарида HS_O-I-F₃ (вес. %)

| Фракции | Выход*, % | GliA | Нейтральные моносахариды | | | | | | |
|---|-----------|------|--------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|
| | | | Gal | Ara | Rha | Xyl | Fuc | Glc | Man |
| HS _O -I-F ₃ -2 ₁ | 11.9 | 28.0 | 17.5 | 6.7 | 12.7 | 0.5 | 0.4 | 1.1 | 0.4 |
| HS _O -I-F ₃ -2 ₂ | 30.0 | 35.0 | 15.3 | 5.4 | 13.8 | 0.5 | 1.3 | 1.4 | 0.4 |
| HS _O -I-F ₃ -3 | 24.6 | 50.0 | 11.2 | 3.2 | 24.6 | 0.6 | 0.5 | 1.6 | 0.6 |

* – выходы фракций, от нанесенного на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой.

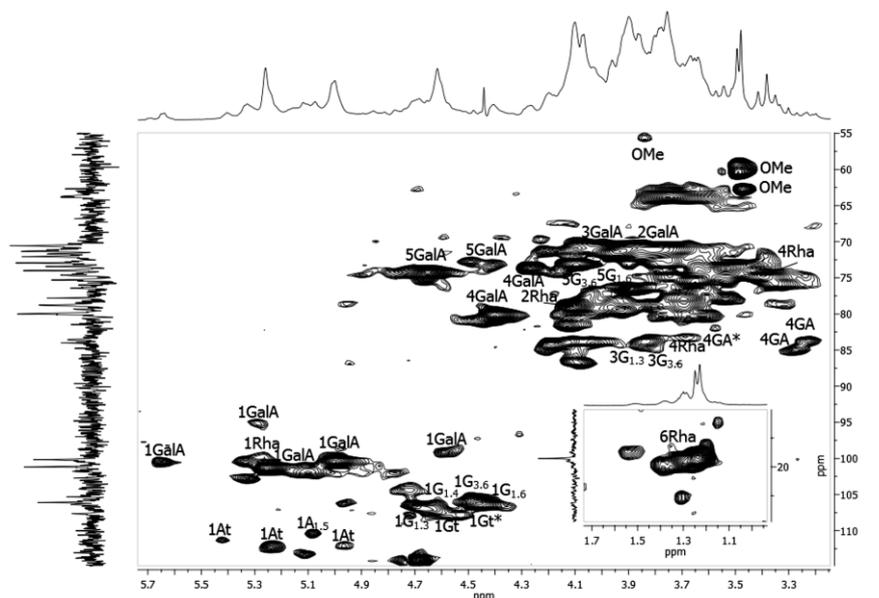


Рисунок 5. Фрагмент спектра ¹H/¹³C HSQC полисахарида HS_O-I-F₃-2₂

Сигналы высокой интенсивности, принадлежащие остаткам 3-*O*-, 6-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенной β -D-Galp, 4-*O*-Me- β -D-GlcpA, 1,4- β -D-GlcpA, T- α -L-Araf и 1,5- α -L-Araf (рис. 5), которые являются характерными компонентами AG-II, указывают на присутствие AGP, как было показано ранее для фракций HS_O-I-F₁₋₂ и HS_O-I-F₃. Остатки GlcpA и GalpA в полисахариде HS_O-I-F₃-2₂ присутствуют в соотношении ~1:2.2, что говорит о значительном содержании остатков GlcpA (~11%).

Следует отметить, что полисахарид HS_O-I-F₃-2₂ имеет более высокое содержание остатков, принадлежащих AG-II, и более низкое содержание остатков, принадлежащих AG-I, в сравнении с полисахаридом HS_O-I-F₃-3, что свидетельствует о присутствии в нем большей доли AGP.

Из представленных результатов можно заключить, что большая часть AG-II, не отделяется от фракции пектина. Таким образом, значительная доля AG-II, совместно элюирующаяся с пектиновым полисахаридом при фракционировании методом ИОХ полисахарида HS_O-I-F₃, подтверждает, что в полисахариде HS_O-I значительная часть AGP связаны, вероятно, ковалентной связью с участками RG-I.

В результате *деградации по Смитту* фракции HS_O-I был получен полисахарид HS_O-I-SD устойчивый к периодатному окислению. В результате фракционирования полисахарида HS_O-I-SD на колонке с сефакрилом S-300 была получена фракция HS_O-I-SD₁ (выход 12%, Mw ~17 кДа), которая имеет более высокое содержание остатков Gal 25%, Rha 8.7% и Ara 6% и более низкое содержание остатков GliA 50%, по сравнению с исходным полисахаридом. Содержание белка составило 3.8%.

Полисахарид HS_O-I-SD₁ был изучен методом ЯМР спектроскопии (табл. 7). Остатки, химические сдвиги которых схожи с химическими сдвигами, приведенными ранее для полисахарида HS_O-I-H₁-F (табл. 4), в таблице 7 не приведены.

Таблица 7. ¹³C и ¹H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-SD₁

| Остатки | | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 |
|------------------|------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | H-1 | H-2 | H-3 | H-4 | H-5;5' |
| →5)-α-Araf-(1→ | A _{1,5} | 110.5 5.08 | 84.3 4.12 | 79.6 4.02 | 85.3 4.21 | 69.4 3.87;3.78 |
| →3,5)-α-Araf-(1→ | A _{3,5} | 110.5 5.11 | 82.2 4.28 | 85.3 4.09 | 84.5 4.29 | 69.2 3.93;3.83 |
| →2,5)-α-Araf-(1→ | A _{2,5} | 110.1 5.18 | 89.9 4.16 | 78.2 4.15 | 84.5 4.28 | 69.2 3.93;3.83 |
| α-Araf-(1→ | At | 110.1 5.14 | 84.3 4.13 | 79.6 3.95 | 86.9 4.03 | 64.1 3.81;3.71 |
| α-Araf-(1→ | At* | 110.1 5.17 | 84.3 4.13 | 79.6 3.95 | 86.9 4.07 | 64.1 3.81;3.71 |
| α-Araf-(1→ | At** | 112.4 5.24 | 84.5 4.20 | 79.6 3.95 | 86.8 4.13 | 64.1 3.81;3.71 |

Моносахаридный анализ и данные ЯМР спектроскопии исходного (HS_O-I) и полученного (HS_O-I-SD₁) полисахаридов указывают на то, что в результате распада по Смитту существенная часть остатков α-D-GalA разрушается, что свидетельствует о присутствии неацетилированных остатков 1,4-α-D-GalpA, а также остатков 1,4-α-D-GalpA(OAc) и/или остатков 1,4-α-D-GalpA, имеющих точки замещения по 2-му и/или 3-му положению, не подвергающиеся окислению IO₄⁻.

В спектре ¹H/¹³C HSQC фракции HS_O-I-SD₁ (рис. 6) наблюдаются сигналы высокой интенсивности, свидетельствующие о присутствии остатков 1,4-α-D-GalpA, α-D-GalpA-(1→..., 1,2-связанной и 2,4-ди-О-замещенной α-L-Rhap.

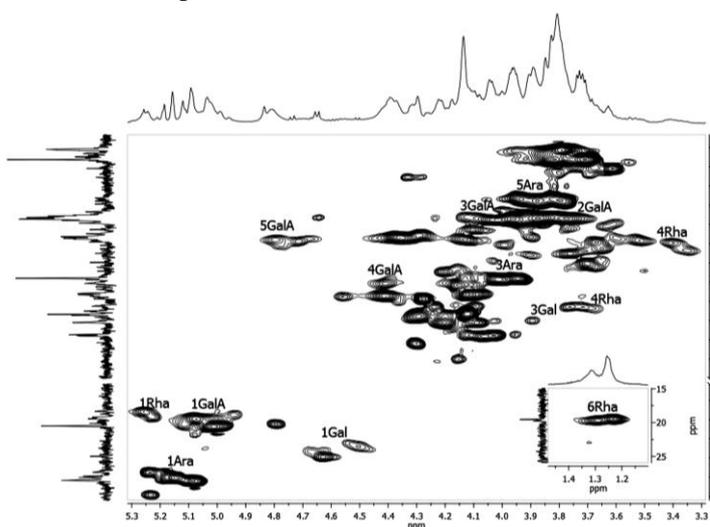


Рисунок 6. Фрагмент спектра {¹H, ¹³C} HSQC полисахарида HS_O-I-SD₁

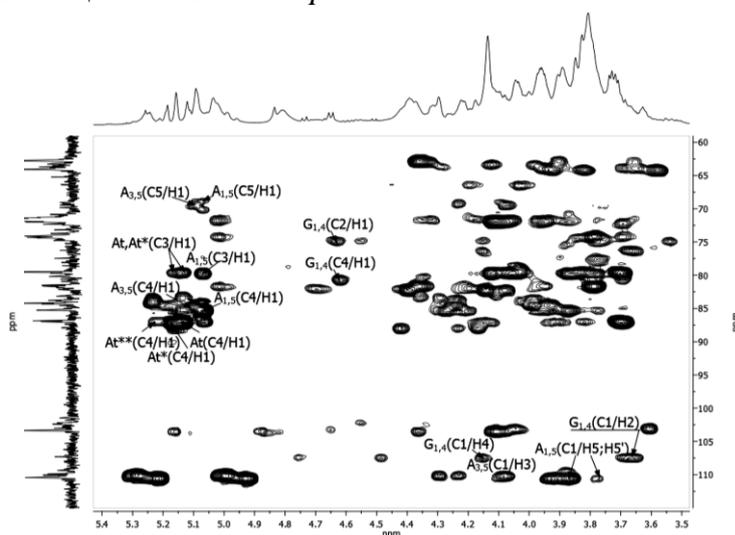


Рисунок 7. Фрагмент спектра {¹H, ¹³C} HMBC полисахарида HS_O-I-SD₁

В спектре ROESY фракции HS_O-I-SD₁ наблюдаются аналогичные с полисахаридами HS_O-S₂, HS_O-I-H₂, HS_O-I-H₁-F, HS_O-I-F₃, HS_O-I-F₃-2₂ и HS_O-I-F₃-3 интенсивные сигналы, свидетельствующие о присутствии участков RG-I: ...→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→...; ...→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→....

Также, в спектре ROESY присутствуют *транс*- и *интра*-гликозильные корреляционные кросс-пики атомов H1/H3, H4, H5 1,4-связанных остатков β-D-Galp,

указывающих на присутствие фрагментов: ...→4)-β-D-Galp-(1→4)-β-D-Galp-(1→.... Спектры НМВС (рис. 7) и HSQC-NOESY подтверждают присутствие остатков 1,4-β-D-Galp (сигналы: C4/H1 80.5/4.63, C1/H4 107.4/4.16, C1/H5 107.4/3.71, C1/H3 107.4/3.76 и C1/H2 107.4/3.68 м.д.).

Значительное количество остатков 1,4-β-D-Galp, наблюдаемых после обработки IO₄⁻ полисахарида HS_O-I, указывает на то, что его боковые углеводные цепи, вероятно, содержат остатки 3,4-ди-*O*-замещенной β-D-Galp, свидетельствующие о присутствии AG-I.

Подробный анализ ЯМР спектров фракции HS_O-I-SD₁ позволил также обнаружить остатки T-, 1,3-, 1,6-, 1,3,6-β-D-Galp и 4-*O*-Me-β-GlcpA – характерных компонентов AG-II.

Из соотношения интегральных интенсивностей H1-атомов остатков β-D-Galp спектра ¹H-ЯМР полисахарида HS_O-I-SD₁ следует, что преобладают остатки 1,4-β-D-Galp. Следующими по интенсивности являются сигналы, принадлежащие остаткам 1,6-β-D-Galp и 1,3-β-D-Galp. Значительную интенсивность остатков 1,6-β-D-Galp можно объяснить окислением IO₄⁻ остатков T-α-L-Araf, которые ранее гликозилировали остатки 1,6-β-D-Galp по 3-му положению. По этой же причине интенсивность сигнала, принадлежащего 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Galp, была наименьшая.

При интерпретации спектров ЯМР отмечено присутствие остатков GlcA после окисления IO₄⁻, что может указывать на то, что по крайней мере некоторая часть остатков GlcA в AGP замещены, возможно, по 2-му или 3-му положению. Остатки 1,2-β-D-GlcpA были ранее обнаружены в AGP из листьев *Raphanus sativus* L. (Inaba et al., 2015).

Интересно отметить, что после окисления IO₄⁻ наблюдается высокое содержание арабинозы (рис. 6, 7). Анализ ЯМР спектров фракции HS_O-I-SD₁ указывает на присутствие в углеводной цепи остатков T-, 1,5-, 1,2,5- и 1,3,5-α-L-Araf, свидетельствующих о том, что часть боковых цепей RG-I представлена участками разветвленного 1,5-α-L-арабинана, как было показано ранее для полисахарида HS_O-S₂.

В спектре НМВС (рис. 7) установлено присутствие корреляционных кросс-пиков: C4/H1 (At) 86.9/5.14, C4/H1 (At*) 86.9/5.17, C4/H1 (A_{3,5}) 84.5/5.11, C3/H1 (At) 79.6/5.14, C3/H1 (At*) 79.6/5.17 и C3/H1 (A_{1,5}) 79.6/5.08 м.д. (табл. 7), подтверждающих присутствие вышеприведенных остатков α-L-Araf.

Более того, в спектре НМВС наблюдаются сигналы высокой интенсивности атомов C1(A_{1,5})/H5;5'(A_{1,5}) 110.5/3.87;3.78 и C5(A_{1,5})/H1(A_{1,5}) 69.4/5.08 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: ...→5)-α-Araf-(1→5)-α-Araf-(1→...; C1(A_{1,5})/H5;5'(A_{3,5}) и C3(A_{3,5})/H1(A_{1,5}) при 110.5/3.93;3.83 и 85.3/5.08 м.д. соответственно, свидетельствующие о присутствии фрагментов: ...→5)-α-Araf-(1→3,5)-α-Araf-(1→.... Спектры ROESY и HSQC-NOESY подтверждают присутствие вышеуказанных остатков α-L-Araf.

Интерпретация результатов, полученных с помощью распада по Смиуту, подтверждает наличие в главной цепи полисахарида HS_O-I участков частично ацетилированных 1,4-α-D-галактопиранозилуронана и RG-I, боковые цепи которого образованы преимущественно фрагментами AG-I и 1,5-α-L-арабинана.

В результате **ферментативного расщепления** α-1,4-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I-SD с последующим фракционированием ферментолизата методом ГХ получили фракцию HS_O-I-SD-F с выходом 10.8% от исходного полисахарида HS_O-I. Главными компонентами ее углеводной цепи являются остатки GliA (32%), Gal (22.6%), Rha (9.5%) и Ara (3.1%).

В спектре ¹H/¹³C HSQC полисахарида HS_O-I-SD-F присутствуют сигналы значительно более высокой интенсивности, в сравнении с полисахаридом HS_O-I-SD₁, подтверждающие присутствие фрагментов: ...→2)-α-L-Rhap-(1→4)-α-D-GalpA-(1→..., ...→4)-α-D-GalpA-(1→2)-α-L-Rhap-(1→....

Интересно отметить полное отсутствие в спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-SD-F сигналов остатков 1,4-β-D-Galp (4.63/3.68 м.д.), T-α-L-Araf (5.14/4.13, 5.17/4.13 м.д.), 2,5-ди-O- (5.18/4.16 м.д.) и 3,5-ди-O-замещенной α-L-Araf (5.11/4.28 м.д.), характерных для AG-I и 1,5-α-L-арабинана, в отличие от полисахарида HS_O-I-SD₁, где данные остатки составляли значительную часть боковых углеводных цепей RG-I.

Вероятно, участки RG-I, содержащие в боковых углеводных цепях AG-I и 1,5-α-L-арабинан, были удалены при обработке ферментом полисахарида HS_O-I-SD. Это можно объяснить тем, что значительная часть метоксильных и ацетильных групп была удалена при распаде по Смитту, что сделало доступным для воздействия фермента участки, представленные остатками 1,4-α-D-GalpA, в результате чего короткие участки кора RG-I, содержащие в боковых цепях вышеуказанные фрагменты и, вероятно, перемежающиеся с данными участками галактуронана, были удалены из основной цепи полисахарида.

Кроме того, анализ спектров полисахарида HS_O-I-SD-F позволил установить интенсивные сигналы характерные для остатков углеводной части макромолекулы AGP, свидетельствующие о том, что данный полисахарид имеет схожие структурные элементы, в сравнении с полисахаридом HS_O-I-SD₁.

В аномерной области спектра HSQC полисахарида HS_O-I-SD-F присутствуют интенсивные сигналы остатков T-α-L-Araf при 112.5/5.24 м.д. и 1,5-α-L-Araf при 110.7/5.08 м.д.

Наличие вышеуказанных остатков Ara, наблюдаемых после распада по Смитту, свидетельствует о том, что некоторая часть боковых цепей углеводной части AGP, вероятно, представлена остатками 1,3,5-α-L-Araf, что позволяет предположить присутствие фрагментов: ...→6)[α-L-Araf(1→3,5)-α-L-Araf(1→3)]β-D-Galp(1→..., наличие которых и объясняет сохранность остатков 3,6-ди-O-замещенной β-D-Galp в боковой цепи полисахарида HS_O-I-SD-F.

Ранее остатки 1,3,5-α-L-Araf были обнаружены в AGP из каллусных клеток *Picea abies* (Karácsonyi et al., 1998), ксилемы *Pinus radiata* (Putoczki et al., 2007), плодов *Lycium barbarum* (Redgwell et al., 2011) и зеленого кофе (Nunes et al., 2008).

Таким образом, можно заключить, что в полисахариде HS_O-I-SD-F, по сравнению с полисахаридом HS_O-I-SD₁, значительно увеличивается доля RG-I, при этом среди нейтральных моносахаридов остаются главным образом остатки характерные для AGP, что еще раз подтверждает, что AGP непосредственно связаны с участками RG-I.

ЯМР исследования белковой части молекулы. В одномерных и двумерных спектрах исследуемых фрагментов наблюдаются сигналы в области сильного поля при 17-33/0.8-3.0 м.д. и слабого поля 6.7-8.5 м.д., а также группа сигналов в области 54-69/3.45-4.70 м.д., вероятно, принадлежащих белковой части макромолекулы AGP.

Аминокислотный состав фракции HS_W-I₂. Аминокислотным анализом было установлено, что белковая часть фракции HS_W-I₂ содержала главным образом такие аминокислоты, как гидроксипролин, серин, аланин, треонин, глицин, L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислота, характерные для AGP (табл. 8) (Oosterveld et al., 2002; Putoczki et al., 2007; Redgwell et al., 2002; 2011).

Таблица 8. Аминокислотный состав (% моль) фракции HS_W-I₂

| Ала | Сер | Про-ОН | Гли | Тре | Глу | Асп | Про | Вал | Лиз | Лей | Иле | Тир | Фен |
|------|------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 14.1 | 12.3 | 11.0 | 9.2 | 8.0 | 8.0 | 8.0 | 7.4 | 5.3 | 5.0 | 4.7 | 2.3 | 1.9 | 1.8 |

Заключение

В результате проведенного исследования можно заключить, что из надземной части борщевика Сосновского было получено и охарактеризовано более 55 полисахаридов и их фрагментов, в т.ч. АGR, пектиновые полисахариды и связующие гликаны.

Показано, что главными полисахаридами, выделенными из надземной части борщевика Сосновского, являются пектиновые полисахариды, экстрагируемые раствором оксалата аммония, при этом максимальный выход наблюдается для первой экстракции и составляет ~ 12.5%.

Установлено, что главные по выходу фракции, экстрагируемые водой, состояли главным образом из свободных АGR и минорных количеств пектиновых полисахаридов. Фракции, экстрагируемые раствором HCl, представляли собой смесь АGR и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних. Фракции, экстрагируемые раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, характеризовались значительным преобладанием пектиновых полисахаридов и минорным количеством связанных АGR.

Показано, что при последовательной экстракции борщевика водой, раствором HCl и раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ наблюдается уменьшение содержания АGR и увеличение содержания пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

Впервые установлены структурные элементы пектина надземной части борщевика Сосновского. ЯМР спектроскопией полисахаридных фрагментов, полученных при ЧКГ, показано, что они характеризуются наличием более коротких участков кора RG-I, более высоким содержанием 1,4-связанных остатков $\beta\text{-D-Galp}$ и имеют более длинные боковые углеводные цепи, состоящие главным образом из фрагментов: $\beta\text{-D-Galp} \rightarrow [4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}\text{-}(1)_3 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow \dots$, по сравнению с полисахаридами, полученными методом ФГ, напротив, характеризующимися присутствием более протяженных участков кора RG-I, невысоким содержанием 1,4-связанных остатков $\beta\text{-D-Galp}$ и, таким образом, имеющими более короткие боковые углеводные цепи, состоящие главным образом из фрагментов: $\beta\text{-Galp}\text{-}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow \dots$, $\beta\text{-Galp} \rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Galp}\text{-}(1 \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-Rhap}\text{-}(1 \rightarrow \dots$

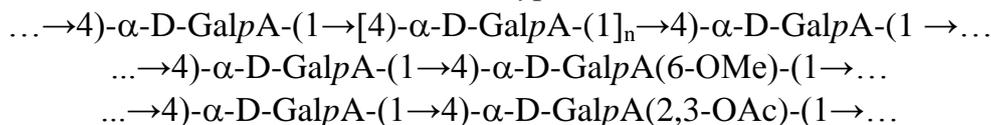
Впервые установлены структурные элементы углеводной части макромолекулы АGR надземной части борщевика Сосновского. Можно заключить, что по крайней мере часть пектина прочно ассоциируется с АGR, поскольку белок и пектин продолжительно ассоциируются вместе и их не удалось разделить ни методом ЧКГ, при котором наблюдалось расщепление нейтральных боковых цепей, ни после значительного расщепления главной углеводной цепи методом ФГ, ни в результате периодатного окисления, при котором существенная часть остатков $\alpha\text{-D-GalA}$ также подверглась разрушению. Интересно отметить, что при увеличении содержания протяженных участков RG-I параллельно увеличивается содержание участков AG-II, в частности во фрагментах $\text{HS}_0\text{-I-N}_1\text{-F}$, $\text{HS}_0\text{-I-F}_3$, $\text{HS}_0\text{-I-SD-F}$ и $\text{HS}_0\text{-I-F}_3\text{-2}_2$, что указывает на то, что АGR непосредственно связаны с протяженными участками RG-I, а не HG.

Согласно полученным результатам, а также литературным данным, можно предположить, что некоторые АGR могут служить сшивающими агентами в клеточных стенках, связывая по крайней мере некоторые из пектиновых полисахаридов, тем самым обеспечивая возможность формирования непрерывной сети между полисахаридами и структурными белками. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы определить природу связей белка и пектиновой макромолекулы.

Суммируя полученные результаты, можно схематически представить структурные элементы пектиновой макромолекулы *H. sosnowskyi*:

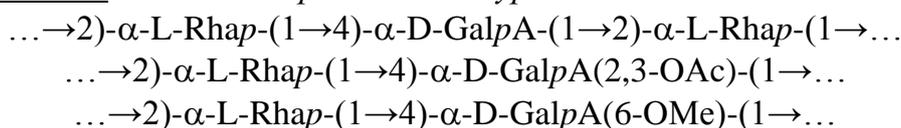
Линейная область:

галактуронан:

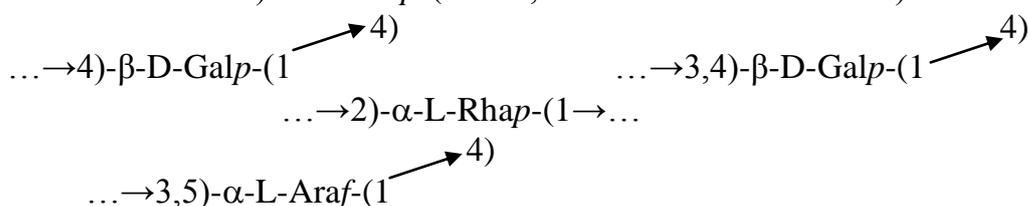


Разветвленная область:

рамногалактуронан I:

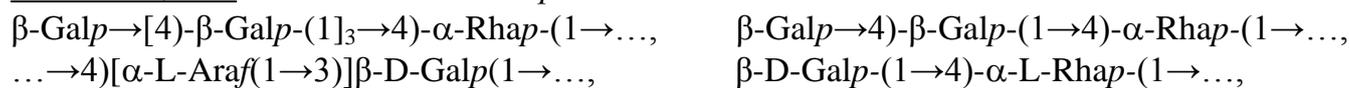


точки разветвления: $\dots \rightarrow 2) - \alpha\text{-L-Rhap} - (1 \rightarrow \dots,$ $\dots \rightarrow 2) - \alpha\text{-L-Rhap} - (1 \rightarrow \dots$



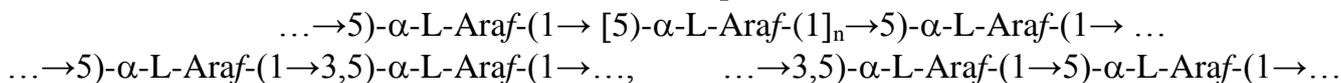
Боковые цепи:

арабиногалактан типа I:

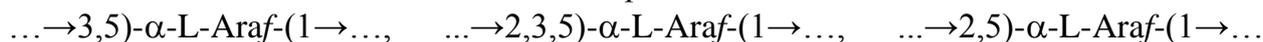


точки разветвления: $\dots \rightarrow 3,4) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow \dots$

1,5- α -L-арабинан:



точки разветвления:



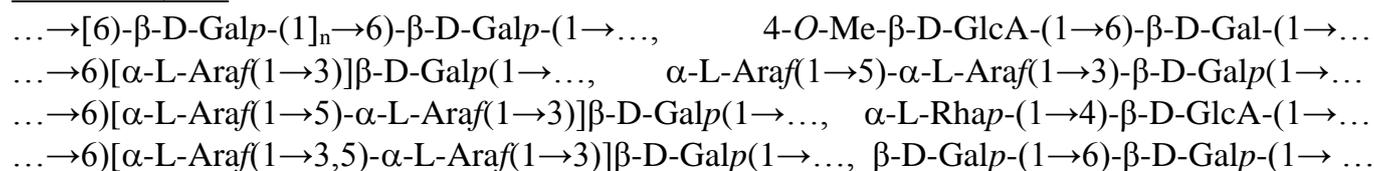
Суммируя полученные результаты, можно схематически представить строение углеводной части макромолекулы AGP *H. sosnowskyi*:

Линейная область: $\dots \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow [3) - \beta\text{-D-Galp} - (1]_n \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow \dots$

точки разветвления: $\dots \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow \dots,$ $\dots \rightarrow 3) - \beta\text{-D-Galp} - (1 \rightarrow \dots$



Боковые цепи:



Выводы:

1. Из надземной части *Heracleum sosnowskyi* при последовательной экстракции водой, растворами HCl, (NH₄)₂C₂O₄, KOH и NaOH впервые выделены арабиногалактановые белки, пектиновые полисахариды и связующие гликаны. Изучен

характер изменения выхода и моносахаридного состава вышеуказанных полимеров в зависимости от природы экстрагента и этапа экстракции при выделении их из *Heracleum sosnowskyi*. Установлено, что при последовательной экстракции водой, раствором HCl и раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ наблюдается уменьшение содержания арабиногалактановых белков и увеличение содержания пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

2. Установлено, что макромолекула пектина *Heracleum sosnowskyi* состоит из линейной области, представленной главным образом участками частично метилэтерифицированного и частично ацелированного 1,4- α -D-галактопиранозилуронана, и разветвленной области, представленной участками частично 2-*O*- и главным образом 3-*O*-ацелированного RG-I, кор которого представлен 1,2- α -L-рамно-1,4- α -D-галактуронаном. Боковые цепи разветвленной области рамногалактуронана I представлены главным образом остатками T- α -L-Araf, 1,4-связанной β -D-Galp, 3,4-ди-*O*-замещенной β -D-Galp, указывающими на наличие AG-I; а также остатками T- α -L-Araf, 1,5-связанной α -L-Araf, 3,5-ди-*O*-, 2,5-ди-*O*- и 2,3,5-три-*O*-замещенной α -L-Araf, свидетельствующими о наличии разветвленного 1,5- α -L-арабинана (минорный фрагмент). Точками ветвления углеводных цепей AG-I являются 3,4-ди-*O*-замещенные остатки β -D-Galp. Точками ветвления углеводных цепей 1,5- α -L-арабинана являются 3,5-ди-*O*-, 2,5-ди-*O*- и 2,3,5-три-*O*-замещенные остатки α -L-Araf. Остатки T- α -L-Araf присутствуют на невосстанавливающих концах боковых цепей AG-I и 1,5- α -L-арабинана.

3. Углеводная часть макромолекулы AGP *Heracleum sosnowskyi* состоит из AG-II, главная цепь которого представлена 1,3-связанными остатками β -D-Galp, боковые цепи разветвленной области образованы остатками 1,6- β -D-Galp, 1,5- α -L-Araf, 1,3,5- α -L-Araf, 4-*O*-Me- β -D-GlcpA и 1,4- β -D-GlcpA. Точками ветвления боковых и главной углеводных цепей являются 3,6-ди-*O*-замещенные остатки β -D-Galp. Значительная часть β -1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me- β -D-GlcpA с помощью β -(1 \rightarrow 6)-связи, что указывает на присутствие фрагментов: 4-*O*-Me- β -GlcpA-(1 \rightarrow 6)- β -Galp-(1 \rightarrow Незначительная часть GlcpA входит в состав фрагментов: α -Rhap-(1 \rightarrow 4)- β -GlcpA-(\rightarrow Часть боковых углеводных цепей AGP борщевика представлена фрагментами:

... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 3,5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow ..., ... \rightarrow 6)[α -Araf-(1 \rightarrow 5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)] β -Galp-(1 \rightarrow ... и/или α -Araf-(1 \rightarrow 5)- α -Araf-(1 \rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow

Остатки терминальных β -D-Galp, α -L-Araf, α -L-Rhap и α -L-Fucp находятся на невосстанавливающих концах боковых цепей.

4. Показано, что часть пектина прочно ассоциируется с AGP, при этом AGP непосредственно связаны с участками RG-I, а не галактуронана.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах

1. Shakhmatov E. G., Toukach P. V., Kuznetsov S. P., Makarova E. N. Structural characteristics of water-soluble polysaccharides from *Heracleum sosnowskyi* Manden // Carbohydrate polymers. –2014. –Т. 102. –С. 521-528.
2. Шахматов Е. Г., Михайлова Е. А., Макарова Е. Н. Структурно-химическая характеристика и биологическая активность полисахаридов *Heracleum sosnowskyi* Manden // Химия растительного сырья. –2015. –№ 4. –С. 15-22.
3. Shakhmatov E. G., Atukmaev K. V., Makarova E. N. Structural characteristics of pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Heracleum sosnowskyi* Manden // Carbohydrate polymers. –2016. –Т. 136. –С. 1358-1369.
4. Makarova E. N., Shakhmatov E. G., Belyy V. A. Structural characteristics of oxalate-soluble polysaccharides of Sosnowsky's hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden) // Carbohydrate Polymers. –2016. –Т. 153. –С. 66-77.