Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук

На правах рукописи

ШАХМАТОВ ЕВГЕНИЙ ГЕННАДЬЕВИЧ

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

02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Макарова Елена Николаевна

Сыктывкар – 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	7
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1	Характерные особенности рода борщевик семейства Сельдерейные (Зонтичные) *Apiacea* Burnett (*Umbelliferae*)	13
1.2	Структурно-химическая характеристика полисахаридов растений семейства зонтичные (*Apiaceae*)	16
1.3	Структурно-химическая характеристика пектиновых полисахаридов	21
1.3.1	*Линейная область пектиновых полисахаридов*	23
1.3.2	*Разветвленная область пектиновых полисахаридов*	24
1.3.2.1	*Боковые цепи рамногалактуронанов I*	26
1.4	Структурные модели пектиновых макромолекул	27
1.5	Структурно-химическая характеристика арабиногалактановых белков	30
1.6	Методы установления строения полисахаридов	33
1.7	Заключение	37
2	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	39
2.1	Реактивы и материалы	39
2.2	Экспериментальные условия	39
2.2.1	*Общие экспериментальные условия*	39
2.2.2	*Аналитические методы*	41
2.3	Экстракция полисахаридов	42
2.4	Методы исследования	45
2.4.1	*Ионообменная хроматография полисахарида HS_W-I*	45
2.4.2	*Ионообменная хроматография полисахарида HS_A*	46
2.4.3	*Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I*	46
2.4.4	*Частичный кислотный гидролиз полисахарида HS_O-I*	47
2.4.5	*Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-H_1*	48

2.4.6 *Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I* 48
2.4.7 *Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I-F_3* 50
2.4.8 *Распад по Смиту полисахарида HS_O-I* 51
2.4.9 *Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-SD* 51
2.4.10 *Определение биологической активности полисахаридов* 52
2.4.11 *Анализ аминокислотного состава пептидной части полисахарида HS_W-I_2* 53
2.4.12 *Статистическая обработка данных* 54
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ 55
3.1 Выделение и общая химическая характеристика полисахаридов *H. sosnowskyi* 55
3.2 Исследование структуры полисахаридов *H. sosnowskyi* 62
3.2.1 *Общие принципы изучения строения пектина и углеводной части арабиногалактановых белков H. sosnowskyi* 62
3.2.2 *Ионообменная хроматография полисахарида HS_W-I на ДЭАЭ-целлюлозе* 63
3.2.3 *ЯМР спектроскопия полисахаридов HS_W-I_1 и HS_W-I_2* 64
3.2.4 *ЯМР спектроскопия фракции HS_W-V* 71
3.2.5 *Выделение полисахарида HS_W-S* 72
3.2.6 *ЯМР спектроскопия полисахарида HS_W-S* 73
3.2.7 *Выделение полисахарида HS_A-S* 76
3.2.8 *Ионообменная хроматография полисахарида HS_A на ДЭАЭ-целлюлозе* 77
3.2.9 *Выделение полисахаридов HS_O-S_1 и HS_O-S_2* 78
3.2.10 *ЯМР исследования полисахаридов HS_A-S и HS_O-S_2* 78
3.2.11 *Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I на ДЭАЭ-целлюлозе* 82
3.2.12 *Частичный кислотный гидролиз полисахарида HS_O-I* 83
3.2.13 *ЯМР исследования полисахарида HS_O-H_2* 85
3.2.14 *ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-H_2* 87

3.2.15	*Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-H_1*	92
3.2.16	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-H_1-F*	93
3.2.17	*Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I*	99
3.2.18	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_{1-2}*	101
3.2.19	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3*	105
3.2.20	*Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I-F_3 на ДЭАЭ-целлюлозе*	109
3.2.21	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3-2_2*	110
3.2.22	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3-3*	115
3.2.23	*Распад по Смиту полисахарида HSo-I*	118
3.2.24	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-SD_1*	118
3.2.25	*Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-SD*	126
3.2.26	*ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-SD-F*	127
3.2.27	*ЯМР исследования белковой части молекулы*	132
3.2.28	*Определение аминокислотного состава пептидной части полисахарида HS_W-I_2*	133
3.2.29.	*Определение биологической активности полисахаридов H. sosnowskyi*	134
3.3	О строении пектина *H. sosnowskyi*	138
3.3.1	*О строении углеводной части макромолекул арабиногалактановых белков H. sosnowskyi*	139
3.4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	140
	ВЫВОДЫ	146
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	148

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

БХ – бумажная хроматография

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Glc*p*A – глюкопиранозилуроновая кислота

Gal*p*A – галактопиранозилуроновая кислота

Ara*f* – арабинофураноза

Gal*p* – галактопираноза

Rha*p* – рамнопираноза

Man*p* – маннопираноза

Glc*p* – глюкопираноза

Xyl*p* – ксилопираноза

T- – терминальный остаток

Mw – средневесовая молекулярная масса

Mn – среднечисловая молекулярная масса

Mw/Mn – степень полидисперсности

HG – галактопиранозилуронан

RG-I – рамногалактуронан I

RG-II – рамногалактуронан II

AGP – арабиногалактановые белки

AG – арабиногалактан

СМ – степень метиэтерифицирования

СА – степень ацетилирования

ИОХ – ионообменная хроматография

ЧКГ – частичный кислотный гидролиз

ФГ – ферментативный гидролиз

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

ТФУ – трифторуксусная кислота

COSY – гомоядерная корреляционная спектроскопия

HSQC – Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

TOCSY – полная корреляционная спектроскопия

HMBC – гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия

ROESY – двумерная корреляционная гомоядерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат

м.д. – миллионные доли

ppm – parts per million (м.д. - миллионные доли)

ВВЕДЕНИЕ

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 [1].

Пектины входят в большую группу гликаногалактуронанов, основным компонентом которых являются главным образом остатки 1,4-α-D-Gal*p*A. Установлено, что моносахаридный состав и структурные элементы пектинов могут различаться не только у различных видов растений, но и отдельных тканей одного растения [1, 2].

AGP – обширный класс высокогликозилированных белков, имеющих сложную структуру. Основную массу AGP (до 95%) составляет углеводная часть молекулы, состоящая из арабиногалактана типа II, и 2-10% полипептидный кор, содержащий главным образом такие аминокислоты как Hyp, Ala, Ser, Thr [1, 3].

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 растительные ткани и виды растений, поддерживают существование комплексов пектин-AGP в клеточных стенках растительных тканей [1, 3-5]. Однако в целом информация о взаимодействии AGP с другими полимерами клеточной стенки, в частности с пектинами, ограничена, что объясняется в первую очередь сложностью и разнообразием строения этих полимеров. Идентификация связей между данными структурными элементами позволит более объективно, глубоко и

всесторонне выяснить строение растительной клеточной стенки [1, 3-5].

Комплексное изучение перспективных хозяйственно-ценных видов растений является частью оценки природных ресурсов потенциального богатства растительного покрова России. Поэтому исследования местных растительных ресурсов для более полного их использования являются научной и практической задачей. Расширение ассортимента растений для целей создания сырьевой базы 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 [6]. 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 $(NH_4)_2C_2O_4$ 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-D-галактопиранозилуронана и участками частично 2-*O*- и главным образом 3-*O*- ацетилированного RG-I, боковые цепи которого образованы преимущественно остатками T-α-L-Ara*f*, 1,4-связанными и 3,4-ди-*O*-замещенными остатками β-D-Gal*p*, указывающими на наличие AG-I; а также остатками T-α-L-Ara*f*, 1,5-связанными, 2,5-ди-*O*- и 3,5-ди-*O*-замещенными остатками α-L-Ara*f*, свидетельствующими о наличии участков разветвленного 1,5-α-L-арабинана (минорный фрагмент).

3. Углеводная часть макромолекулы AGP *Heracleum sosnowskyi* состоит из AG-II, главная цепь которого представлена остатками 1,3-связанной β-D-Gal*p*, а боковые цепи разветвленной области образованы остатками 1,6-связанной β-D-Gal*p*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-связанной

β-D-Glc*p*A, 1,5-связанной α-L-Ara*f* и 3,5-ди-*O*-замещенной α-L-Ara*f*. Точки ветвления главной и боковых цепей представлены 3,6-ди-*O*-замещенными остатками β-D-Gal*p*. Значительная часть β-1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A с помощью β-(1→6)-связи: 4-*O*-Me-β-Glc*p*A-(1→6)-β-Gal*p*-(1→…. Незначительная часть Glc*p*A входит в состав фрагментов: α-Rha*p*-(1→4)-β-Glc*p*A-(→…. Некоторая часть боковых углеводных цепей AGP, представлена фрагментами:

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,

α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→… и/или

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→….

Остатки T-β-D-Gal*p*, T-α-L-Ara*f*, T-α-L-Rha*p* и T-α-L-Fuc*p* 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.

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-Gal*p* и 1,3,6-β-D-Gal*p*, а боковые цепи образованы остатками 1,6- и 1,3,6-β-D-Gal*p*, 1,5- и 1,3,5-α-L-Ara*f*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-β-D-Glc*p*A.

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 10 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).

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характерные особенности рода борщевик семейства Сельдерейные (Зонтичные) *Apiacea* Burnett (*Umbelliferae*)

Семейство Зонтичные (лат. *Umbelliferae*) или Сельдереевые (лат. *Apiaceae*) принадлежит к числу наиболее крупных и наиболее важных в хозяйственном отношении семейств цветковых растений. Это многолетние травы, редко кустарники или небольшие деревья. Семейство включает около 300 родов и 3000 видов, распространенных почти по всей суше земного шара, преимущественно в умеренном климате Европы, Азии и Северной Америки [7].

Род *Heracleum* в мировой флоре насчитывает почти 70 видов, из них в России и странах СНГ произрастают 40 видов. Растения рода *Heracleum* встречаются почти везде, но большинство видов (26 видов) сосредоточено на Северном Кавказе [8].

В России наибольшее распространение получил один из самых жгучих видов этого рода – борщевик Сосновского (*Heracleum sosnówskyi*). Листья и плоды *Heracleum* богаты эфирными маслами, содержащими фуранокумарины – фотосенсибилизирующие вещества, которые при попадании на кожу могут повысить чувствительность к ультрафиолету, что может привести к (солнечному) ожогу [6].

Борщевик Сосновского впервые был описан в 1944 году Идой Манденовой (Ida P. Mandenova, 1907-1995). Принятое сокращение Manden. Свое ботаническое название *Heracleum sosnówskyi* получил в честь Д.И. Сосновского (1885–1952) – известного исследователя флоры Кавказа. Естественные места произрастания – Юго-Восточное и Восточное Закавказье,

восточная часть Большого Кавказа, северо-восток Турции, где этот вид растет на субальпийских лугах и в горных лесах [9, 10].

Heracleum sosnówskyi, *Heracleum persicum* и *Heracleum mantegazzianum* – группа так называемых «гигантских борщевиков», которую назвали так за большой размер листа и высоту стебля [10, 11].

Гигантские борщевики обладают мощным конкурентным потенциалом: неприхотливы к почве, устойчивы к холоду, быстро растут и формируют большую надземную растительную массу, содержат большое количество углеводов, протеина, витаминов, микроэлементов [10, 11].

Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) семейства Зонтичные – крупное травянистое растение, достигающее в высоту 2.2-3.1 метра с крупными листьями (длиной 85-125 см и шириной 110-150 см) и цветами (диаметром до 75 см), обладает огромной биомассой и быстро размножается [6, 12-16].

За время культивирования борщевик Сосновского широко распространился в Восточной Европе – России, Белоруссии, Германии, Латвии, Эстонии, Польше, Литве и Украине [14, 17, 18]. На сегодняшний день одичавший борщевик Сосновского распространился на территории Поволжья [19], Южного Урала [20], республик Карелия [21], Коми [22], Мордовия [23], а также Псковской [24], Ленинградской [25, 26], Кировской [27], Московской [28], Рязанской [29], Тульской, Вологодской, Сахалинской [30], Орловской [31] и многих других областей.

Растения борщевика Сосновского неприхотливые и холодостойкие (переносят температуру до -35 – -40°С при достаточном снежном покрове). Весной листья начинают отрастать (на второй и последующие годы) сразу, как только сойдёт снег. После скашивания быстро формируется новый урожай отавы, готовый к уборке через 3-4 месяца. Растения рода *Heracleum* дают урожайность зеленой массы от 500 и до 2000 ц/га, а в наиболее благоприятных условиях произрастания и до 2500 ц/га. Зеленая масса

растений рода *Heracleum* характеризуется высокими кормовыми достоинствами [8].

Борщевик Сосновского используют как декоративное растение в ботанических садах. Также этот сорт борщевика используют в переработанном виде на корм скоту, молодые его побеги применяют для кормления в свежем виде. Борщевик является отличным медоносом – с гектара посевов можно получить до трехсот килограмм меда. Молодые побеги и листья этого растения добавляют в виде приправы в супы, борщ, картофель и мясные блюда. Также борщевик используют для маринования, соления, кладут в свежие салаты, а также добавляют во всевозможные начинки. Корень борщевика Сосновского в сушеном и свежем виде используют как пряность. Сушеную зелень и эфирные масла этого растения широко применяют в консервной промышленности [32].

При химическом исследовании растений рода *Heracleum* из листьев были выделены дубильные вещества пирокатехиновой группы и тритерпеновые сапонины, в корнях найдено небольшое количество кумаринов и алкалоидов, в соцветиях идентифицированы алкалоиды (качественные реакции), сапонины, кумарины, дубильные вещества пирокатехиновой группы и флавоноиды, в плодах обнаружены сапонины и кумарины [33].

Огромные территории распространения борщевика Сосновского подталкивают исследователей к поискам вариантов использования его биомассы. Например, из него был получен новый волокнистый полуфабрикат близкий по составу к тростнику. Полученную из борщевика Сосновского целлюлозу авторы предложили использовать для частичной замены древесного сырья при производстве внутренних слоев упаковочных видов картона [34].

Имеются предложения об использовании зелённой массы борщевиков в качестве сырья для производства биоэтанола. Этому способствуют высокое содержание углеводов в зеленой массе и высокая урожайность растений

этого рода. Это может способствовать получению недорого биотоплива в количествах достаточных, чтобы обеспечить не только внутреннюю потребность, но и стать экспортером биоэтанола на мировой рынок [7].

Показано, что экстракты, полученные из надземной части различных видов борщевика, обладают широким спектром физиологической активности, например, иммуностимулирующим, сосудорасширяющим, жаропонижающим, обезболивающим, антибактериальным. Применяются в качестве средства для лечения экзематозов и псориаза [35-45].

В эксперименте на белых мышах изучена биологическая активность водного извлечения из борщевика Сосновского на токсичность и гонадотропное действие. Результаты определения острой токсичности при интрагастральном введении животным позволяют отнести настойки водного извлечения из борщевика Сосновского к малотоксичным препаратам [33].

Также имеются сведения об изучении влияния пектина борщевика в качестве регулятора роста для повышения продуктивности травянистых растений в условиях Севера. Показано, что обработка травостоев пектином из борщевика существенно повышает урожайность второго укоса [46].

1.2. Структурно-химическая характеристика полисахаридов растений семейства зонтичные (*Apiaceae*)

Несмотря на то, что растения семейства Зонтичные (*Apiaceae*) широко распространены почти по всему земному шару, информация о структуре полисахаридов, которые они содержат, ограничена.

Володушка серповидная (*Bupleurum falcatum*) – вид многолетних травянистых растений семейства Зонтичные широко распространенных в Японии, Китае и в Приморье. Современная медицина успешно использует володушку при лечении гепатита, нефротического синдрома и различных аутоиммунных заболеваний. Физиологически активный пектиновый полисахарид, названный буплейран 2IIc, был изучен группой японских

исследователей во главе с профессором Ямада. Буплейран 2IIc был охарактеризован как пектиновый полисахарид, состоящий из линейной области, главная углеводная цепь которой представлена участками частично метилэтерифицированного 1,4-α-D-галактуронана и разветвленной области, состоящей из участков RG-I. Главными компонентами боковой углеводной цепи разветвленной области являются остатки 1,3-β-D-галактопиранозы, 1,6-β-D-галактопиранозы, 1,3,6-β-D-галактопиранозы, терминальной и 1,5-α-L-арабинофуранозы, глюкуроновой и 4-*O*-Me-D-глюкуроновой кислоты. В состав полисахарида входит также минорная область RG-II, содержащая редкие моносахаридные остатки, такие как апиоза, 2-*O*-Me-фукоза, 2-*O*-Me-ксилоза, кетодезоксиманнооктоновая кислота (KDO), ацеровая кислота, а также дезоксиликсогептулозаровая кислота (DHA) [2, 47-50].

Володушка китайская (*Bupleurum Chinense*) – травянистое многолетнее растение встречается в центре Европы, Китае, Монголии, Японии, Корее, в Сибири и на Дальнем Востоке. Из володушки китайской был выделен и охарактеризован разветвленный полисахарид со средним молекулярным весом около 2000 кДа, состоящий из остатков Glc, Ara, Gal и Man в соотношении 3.5:2.4:2.0:1.0 соответственно, а также из минорных остатков Rha и Xyl. Главными компонентами углеводной цепи выделенного полисахарида являются остатки терминальной, 1,6-, 1,3 и 1,3,6-связанной Glc*p*, терминальной и 1,5-связанной Ara*f*, терминальной, 1,4-, 1,6- и 1,4,6-связанной Gal*p*, терминальной, 1,4- и 1,4,6-связанной Man*p* [51].

Angélica – род травянистых растений семейства Зонтичные. Родиной растения считают север Евразии. *Angelica sinensis* – ангелика китайская, дудник лекарственный, дягиль лекарственный – представляет собой многолетнее травянистое растение высотой 1.5-2 м. Растение обладает исключительными целебными свойствами и известно как "женский женьшень". Структурно-химическая характеристика полисахаридов, выделенных из различных частей *A. sinensis* различными экстрагентами,

подробно представлена в обзоре Jin с соавторами (2012 г) и в ряде других работ [52-54].

В частности, структура пектинового полисахарида, выделенного из корней *A. sinensis*, была исследована с помощью частичного кислотного и ферментативного гидролизов в сочетании с методом метилирования и дополнительно подтверждена методом ЯМР спектроскопии. Углеводная цепь данного полисахарида представлена остатками D-галактуроновой кислоты, D-галактозы, L-арабинозы, L-рамнозы, D-глюкозы, D-маннозы в соотношении 58.3:24.9:10.5:1.9:0.9:0.4 [55]. Установлено, что полисахарид из *A. sinensis* состоит из линейной области, состоящей из участков α-1,4-D-галактопиранозилуронана, и разветвленной области, состоящей из участков рамногалактуронана I. Боковые цепи RG-I представлены преимущественно остатками T, 1,5- и 1,3,5-α-L-арабинофуранозы, а также остатками T-, 1,6-, 1,4-, 1,3,6- и 1,4,6-β-D-галактопиранозы [56, 57].

Пектиновые полисахариды и арабиногалактаны были также выделены из корней и стеблей Дудника даурского *Angelica dahurica*. Установлено, что в состав углеводной цепи полисахарида, выделенного из стеблей *A. dahurica*, входят остатки уроновых кислот (26%), а остатки галактозы, арабинозы, маннозы, рамнозы и глюкозы присутствуют в соотношении 23:23:23:21:10. В состав углеводной цепи полисахарида, выделенного из корней *A. dahurica*, входят остатки гликуроновых кислот (52%), а остатки рамнозы, галактозы, арабинозы, маннозы и глюкозы присутствуют в соотношении 27:23:23:21:17 [58].

Вышеуказанные полисахариды также были выделены из Дудника остролопастного *Angelica acutiloba*. В состав углеводной цепи полисахарида, отнесенного к арабиногалактану типа II, входят остатки L-арабинозы, D-галактозы и L-рамнозы в соотношении 52.1:43.5:4.35, а в состав пектинового полисахарида – остатки D-галактозы, L-арабинозы, D-галактуроновой кислоты и D-глюкуроновой кислоты в соотношении 34.5:34.5:27.6:3.4 [59-61].

Гления прибрежная (*Glehnia littoralis*) – род травянистых растений семейства *Apiaceae*, распространена на Дальнем Востоке [62]. Из стеблей *G. littoralis* был выделен и охарактеризован полисахарид, характеризующийся значительным содержанием остатков рамнозы, а также галактозы, маннозы, арабинозы и глюкозы в соотношении 40:19:19:12:10 соответственно. Интересно отметить, что из корней *G. littoralis* был выделен и охарактеризован полисахарид, относящийся к классу глюканов и состоящий, большей частью, из остатков глюкозы, а также галактозы и маннозы в соотношении 83:9:8 соответственно. Содержание остатков уроновых кислот в полисахаридах, выделенных из стеблей и корней, составляет 24 и 37% соответственно, что, вероятно, указывает и на присутствие пектинов [58].

Борщевик Меллендорфа *Heracleum moellendorffii* – многолетнее травянистое растение семейства *Apiaceae*. Встречается по всей территории Приморья и Приамурья [33]. Имеются исследования моносахаридного состава и содержания пектиновых полисахаридов, кислых арабиногалактанов и связующих гликанов класса глюканов в стеблях и корнях *H. moellendorffii*. Показано, что в состав углеводной цепи полисахарида, выделенного из стеблей *H. moellendorffii*, входят остатки глюкозы, галактозы, арабинозы и рамнозы, в соотношении 43:32:17:8, а в состав полисахарида, выделенного из корней *H. moellendorffii*, входят остатки галактозы, глюкозы, арабинозы, рамнозы и ксилозы в соотношении 30:29:22:14:5 соответственно. Содержание остатков уроновых кислот в обоих выделенных полисахаридах составляет ~57% [58].

Сапожниковия растопыренная *Saposhnikovia divaricata* – многолетнее травянистое кустистое растение высотой 30-80 см семейства *Apiaceae*. Распространена в Восточной Сибири (Даурский район), на Дальнем Востоке (Приамурье, Приморье). С лечебной целью используется трава (стебли, листья, цветки), корни и плоды [63]. Из стеблей и корней *S. divaricata* были выделены и охарактеризованы полисахариды, в состав которых входят

фрагменты арабинана, галактана, арабиногалактана, гомогалактуронана и рамногалактуронана. Установлено, что в состав углеводной цепи полисахарида, выделенного из стеблей, входят остатки арабинозы, галактозы, маннозы, глюкозы и рамнозы, в соотношении 33:21:21:13:12, а содержание остатков уроновых кислот составляет 53%. Из корней *S. divaricata* был выделен и охарактеризован полисахарид, характеризующийся значительным содержанием остатков арабинозы, а также галактозы, рамнозы и глюкозы в соотношении 60:17:14:9 соответственно, а содержание остатков гликуроновых кислот составляет 71% [58].

Морковь обыкновенная (*Daucus carota*) – двулетнее, реже однолетнее травянистое растение семейства Зонтичные. Установлено, что морковь активизирует внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы, регулирует углеводный обмен, обладает антисептическими, противовоспалительными, обезболивающими и ранозаживляющими свойствами. Арабиногалактановые белки (AGP) были выделены осаждением реагентом Ярива из среды, на которой выращивали клеточные культуры моркови, и из семян моркови. AGP, выделенные из среды, содержали главным образом остатки глюкуроновой кислоты и рамнозы, а также минорное количество остатков арабинозы. В отличие от них, AGP, выделенные из семян, содержали главным образом остатки арабинозы и галактозы и имели низкое содержание остатков глюкуроновой кислоты. Методом метилирования было установлено, что главными компонентами углеводной цепи являлись остатки 1,3-β-D-галактопиранозы, 1,6-β-D-галактопиранозы, 1,3,6-β-D-галактопиранозы и терминальной α-L-арабинофуранозы – характерные компоненты арабиногалактана типа II, часто являющегося углеводной частью макромолекулы AGP [64, 65].

Таким образом, можно заключить, что большинство выделенных полисахаридов семейства *Apiaceae* содержали главным образом остатки арабинозы, галактозы, глюкозы, уроновых кислот и, реже, рамнозы, маннозы и ксилозы, показана их принадлежность к классу пектиновых полисахаридов,

арабинанов и арабиногалактанов типа II. В то же время многие из изученных растений, вероятно, содержали резервные глюканы, учитывая значительное содержание остатков глюкозы.

1.3. Структурно-химическая характеристика пектиновых полисахаридов

Клеточная стенка состоит из трех относительно структурно независивых, но взаимодействующих между собой сетей полимеров, каждая из которых выполняет свои специфические функции. Линейные микрофибриллы целлюлозы и соединяющие их связующие гликаны составляют основную сеть, которая образует каркас клеточной стенки. Вторую сеть представляют пектиновые полисахариды. Третья сеть построена из структурных белков [1, 66, 67].

К наиболее сложноорганизованным и вариабельным по структуре компонентам клеточной стенки относятся пектиновые полисахариды – группа растительных полисахаридов, широко представленных в различных растительных источниках [68-80].

В последнее десятилетие пектин был получен из жома сахарной свеклы [81-83], яблочных выжимок [84], кожуры маракуйи [85, 86], лимона [87], шелухи какао-бобов [88, 89], зеленого чая [90], древесной зелени пихты сибирской [91, 92], японской сливы [93], кожуры грейпфрукта [94], апельсиновых корок [95].

Пектиновые вещества встречаются почти во всех высших растениях, они присутствуют главным образом в межклеточном пространстве и первичных клеточных стенках молодых растительных клеток, выполняя множество важных биологических функций: играют крайне важную роль в делении и росте клеток, определяют растяжимость и прочность клеточных стенок, поддерживают водный и солевой баланс, предохраняют растения от увядания и высыхания, повышают устойчивость растений к засухе и холоду,

оказывают влияние на прорастание семян и выполняют защитную функцию во взаимоотношениях растений с фитопатогенами [2, 96-98].

В качестве структурного элемента, входящего в состав клеточной ткани, и в качестве важного компонента межклеточного пространства пектин выполняет роль связывающего и упрочняющего элемента в тканях растений для сцепления соседних клеток [99-106] .

Пектин сочетает в себе эластичность и пористость с высокой прочностью – именно за счет него обеспечивается целостность растительного организма, по крайней мере, у молодых проростков или формирующихся органов. Считается, что эти свойства определяются содержанием рамногалактуронанов I, а точнее длиной и количеством арабинановых, галактановых и арабиногалактановых боковых цепей рамногалактуронанов I [106].

Химический состав и содержание пектиновых веществ неодинаковы у разных видов растений, их органов, тканей и зависят от метеорологических условий произрастания, географической зоны, сортовой принадлежности, периода развития и возраста растений. Содержание пектиновых веществ в растительных материалах колеблется в широких пределах: от 0.1 до 50%. Наибольшее содержание пектина в лимонных выжимках (30-35%), в апельсиновых и мандариновых отжимах (25-30%), околоплодниках подсолнечника (около 25%), свекловичном жоме (20-25%), яблочных выжимках (5-15%) [107].

Над изучением свойств пектина работают ученые всего мира, открывая все новые и новые его целебные свойства. Многолетние исследования пектиновых полисахаридов и галактансодержащих полисахаридов, в т.ч. арабиногалактанов высших растений, показали, что они обладают широким спектром биологической и физиологической активностей, что открывает широкие перспективы использования данных полисахаридов в медицине, ветеринарии, пищевой и косметической промышленности. Для фармацевтической промышленности пектины ценны как физиологически

активные вещества с мощными энтеросорбирующими свойствами. Пектин имеет способность образовывать комплексы и выводить из организма человека тяжелые металлы (ртуть, свинец, кобальт, цинк, молибден и пр.), а также обладает способностью сорбировать и выводить из организма анаболики, биогенные токсины, продукты метаболизма, ксенобиотики и др. биологически вредные вещества. Пектины обладают иммуномодулирующим и противовоспалительным действием, их используют для лечения атеросклероза, диабета, при заживлении ран и ожогов, гемофилии, для лечения бактериальных инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта и др. [108-111].

Установлено, что биологическая и физиологическая активность вышеуказанных полисахаридов во многом определяется особенностями тонкой структуры их макромолекул, т.е. степенью полимеризации, составом, длиной и степенью разветвленности боковых углеводных цепей, наличием модифицирующих групп и характером их расположения [1]. В связи с этим актуальным является исследование тонкого строения полисахаридов с целью обнаружения структурных элементов, влияющих на проявление ценных физико-химических свойств, а также биологической и физиологической активностей.

Основными компонентами пектиновых веществ являются галактуронан (HG), рамногалактуронан-I (RG-I), рамногалактуронан-II (RG-II), арабинан, галактан, арабиногалактан (AG), апиогалактуронан и ксилогалактуронан, что указывает на то, что пектиновые вещества весьма сложные по структуре полисахариды клеточной стенки [101, 112-119].

1.3.1. Линейная область пектиновых полисахаридов

HG считается наиболее широко распространенным полисахаридом, составляющим 50-90% от общего содержания пектина, тогда как RG-I

составляет 5-48%, ксилогалактуронан и RG-II, как правило, минорные компоненты, составляющие менее 10% [68, 81, 120-122].

Как правило, участки HG преобладают над участками RG-I, тем не менее, RG-I является преобладающим компонентом (50% и больше) в пектинах, выделенных из листьев зелёного чая (*Camellia sinensis*), семядолей сои (*Glycine max*), а также практически единственным структурным компонентом пектинов из семян *Linum usitatissimum* (лён обыкновенный), *Arabidópsis thaliana* (резуховидка Таля), *Abelmoschus esculentus* (бамия) [77, 90-92, 117, 123-130].

Предполагаемая длина гомогалактуронанов, выделенных из пектинов цитрусовых, сахарной свеклы, яблок, варьирует от 70 до 120 последовательно соединенных остатков 1,4-α-D-Cal*p*A [77, 129, 131-133].

Карбоксильные группы остатков D-галактуроновой кислоты могут быть в различной степени метилэтерифицированы по атому C-6 [114, 118].

Остатки метилэтерифицированной GalA могут иметь как неупорядоченное распределение, так и блочное, например, когда длинные участки из неметилэтерифицированных остатков GalA перемежаются длинными участками из метилэтерифицированных остатков GalA [1, 134].

У растущих клеток, как правило, сохраняется высокая степень этерификации пектинов, однако в дальнейшем наблюдается постепенное вытеснение высокометилэтерифицированных пектинов кислыми. Показано, что деметилэтерифицированные, связанные с кальцием галактуронаны локализованы в срединных пластинках, вокруг межклетников, углах клеток, в то время как метилэтерифицированные галактуронаны равномерно распределены по всей толще первичных клеточных стенок [112].

1.3.2. Разветвленная область пектиновых полисахаридов

Рамногалактуронан I (RG-I) — гетерополимер, кор которого представляет собой чередующиеся остатки …→4)-α-D-Gal*p*A-(1→… и

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→…, последние могут быть частично замещены по *O*-4 (главным образом) и/или *O*-3 положению. Соотношение Gal*p*A:Rha*p*, как правило, составляет 1:1 и более [1, 135].

Протяженность кора RG-I варьирует от 15 до 300 димеров, при этом расхождения могут наблюдаться даже в пределах одного растительного объекта [1]. Так, например, показано, что RG-I, выделенный из платана, содержал более 300 повторяющихся дисахаридных звеньев [136, 137]; RG-I, полученный из сахарной свеклы методом ферментативного гидролиза, ~ 80 димеров; и только 3-10 димеров для RG-I из сахарной свеклы, полученного методом кислотного гидролиза [130, 138]; из пектина сои – 15-100 димеров [139]; из коммерческих цитрусовых пектинов – 15-40 димеров [81, 130, 140]; из пектинов плодов огурцов, корней фенхеля, листьев лука-порея по 114, 125 и 148 димеров соответственно.

Чередование остатков D-Gal*p*A и L-Rha*p* 1:1 в коре RG-I может соблюдаться не всегда, в результате чего формируются участки, содержащие несколько последовательно соединенных остатков рамнозы [1, 141]. Например, в пектинах из листьев женьшеня было установлено присутствие димеров L-Rha*p* [142].

Эти данные свидетельствуют о том, что кор RG-I может варьироваться в широких пределах: от относительно коротких до очень длинных участков, состоящих из димеров […→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→...], в зависимости от растительного источника и метода выделения.

Остатки GalA в RG-I, как и в HG могут быть ацетилированны по атомам *O*-2 и/или *O*-3. Степень ацетилирования GalA значительно варьирует в зависимости от растительного источника [130, 143-146].

Считается, что в RG-I остатки Gal*p*A не метилэтерифицированы, тем не менее, в некоторых работах обнаружены метилэтерифицированные остатки галактуроновой кислоты (от 47 до 100%) [147-150].

1.3.2.1. Боковые цепи рамногалактуронанов I

К остаткам рамнозы могут быть присоединены различной длины боковые цепи, состоящие из разнообразных полисахаридов: 1,4-β-D-галактан, 1,5-α-L-арабинан, AG типа I, AG типа II, и, вероятно, галактоарабинан [1, 2, 77, 101, 116, 132, 147].

Степень замещения остатков L-Rha*p* может быть различной (от 20 до 96%) в зависимости от источника, из которого выделен полисахарид [106, 151, 152]. Наличие, длина и детали структуры боковых цепей RG-I различаются в зависимости от растительного источника и локализации полисахарида в тканях [106].

Арабинаны – разветвленные полимеры, кор которых представлен 1,5-связанными остатками α-L-арабинофуранозы, которые могут быть замещены по атомам *O*-2 и/или *O*-3 терминальными остатками α-L-арабинофуранозы или цепями, образованными 1,2- и/или 1,3-связанными остатками α-L-Ara*f* [147, 148, 153-159].

Галактаны, как правило, имеют линейные цепи из остатков 1,4-связанной β-D-Gal*p*, которые могут быть замещены по атомам *O*-2, *O*-3 или *O*-6, при этом боковые цепи представлены одиночными остатками β-D-Gal*p*, и по атомам *O*-3 и *O*-6 одиночными остатками α-L-Ara*f* [1, 112, 160, 161].

Арабиногалактаны типа I – (1→4)-β-D-галактаны замещенные главным образом по атому *O*-3 остатками T-α-L-Ara*f* и/или короткими цепями из 1,2/1,3-связанных остатков α-L-арабинофуранозы [108, 130, 161, 162].

Главная цепь AG-II представлена, как правило, 1,3-β-D-галактаном, боковые цепи присоединены по атому *O*-6 к остаткам 1,3-β-D-Gal*p* кора и представлены преимущественно остатками 1,3- и/или 1,6-связанной β-D-Gal*p*, остатками терминальной α-L-Ara*f* и 1,3-, 1,5-связанными остатками α-L-Ara*f*. На невосстанавливающих концах боковых цепей также иногда могут быть обнаружены остатки 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и α-L-фукозы [1, 76, 112,

114, 116, 118, 130, 161].

Известно, что AG-II может присутствовать в клеточной стенке как свободный полисахарид, являться структурным компонентом пектиновых полисахаридов и входить в состав боковых цепей разветвленной области RG-I, либо являться углеводной частью молекулы арабиногалактановых белков (AGP). Принадлежность AG-II к RG-I как ковалентно связанной боковой цепи давно обсуждается, однако до сих пор экспериментально не доказана, хотя RG-I и AG-II часто совместно экстрагируются и впоследствии с трудом отделяются друг от друга [77, 106, 112, 114].

Возможно, существует и четвертый тип боковых цепей RG-I – галактоарабинан, главная цепь которого представлена остатками 1,5-α-L-арабинофуранозы, замещенных по атому *O*-3 остатками Т-β-D-галактопиранозы и/или 1,4-β-D-галактопиранозы [130].

1.4. Структурные модели пектиновых макромолекул

Несмотря на то, что пектиновые вещества были открыты более 200 лет назад, их структура достоверно не установлена. В настоящее время существует три основных гипотетических модели для описания структуры пектина [75-78, 101, 116].

В первой структурной модели пектина, созданной De Vries с соавторами и впоследствии обновленной Schols и Voragen, участки разветвленной области RG-I чередуются с линейными участками HG. Модель, в которой RG-I ковалентно соединен с HG, связанным в свою очередь с RG-II и ксилогалактуронаном, долгое время использовалась как структурная модель пектинов [76, 140, 163].

В альтернативной второй модели пектина, предложенной Vincken с соавторами, напротив, участки HG присутствуют в качестве боковой цепи RG-I [101, 116].

Согласно этой модели пектиновый комплекс представлен исключительно, так называемым «волосатым» типом макромолекулы пектина; в которой боковые цепи состоят из нейтральных компонентов (галактана, арабинана, арабиногалактана), а также из галактуронана и ксилогалактуронана [106].

Кроме того, была предложена третья гипотетическая модель пектинового комплекса, в которой учитываются как первая, так и вторая модель. В этой модели главная цепь представлена двумя линейными элементами HG и одного элемента RG-I, встроенного между ними. Последний может содержать боковые цепи, представленные галактаном, арабинаном, арабиногалактаном, ксилогалактуронаном и гомогалактуронаном, но не рамногалактуронаном II. Участки гомогалактуронана в главной цепи, возможно, могут находиться как в горизонтальном, так и в вертикальном положении (вверх и вниз), что обусловлено гибкостью связей остатков 1,2-α-L-рамнозы, посредством которых они соединены с RG-I. К боковым цепям, представленным HG, могут быть присоединены молекулы RG-II [77].

В настоящее время ни одна из вышепредставленных моделей не может быть, как отклонена, так и принята, поскольку до сих пор ведутся дискуссии о наличии и характере связей между компонентами пектиновых веществ.

Суммируя вышеизложенное, можно сформировать потенциально возможные структурные комбинации пектиновой макромолекулы (см. Рисунок 1) [106].

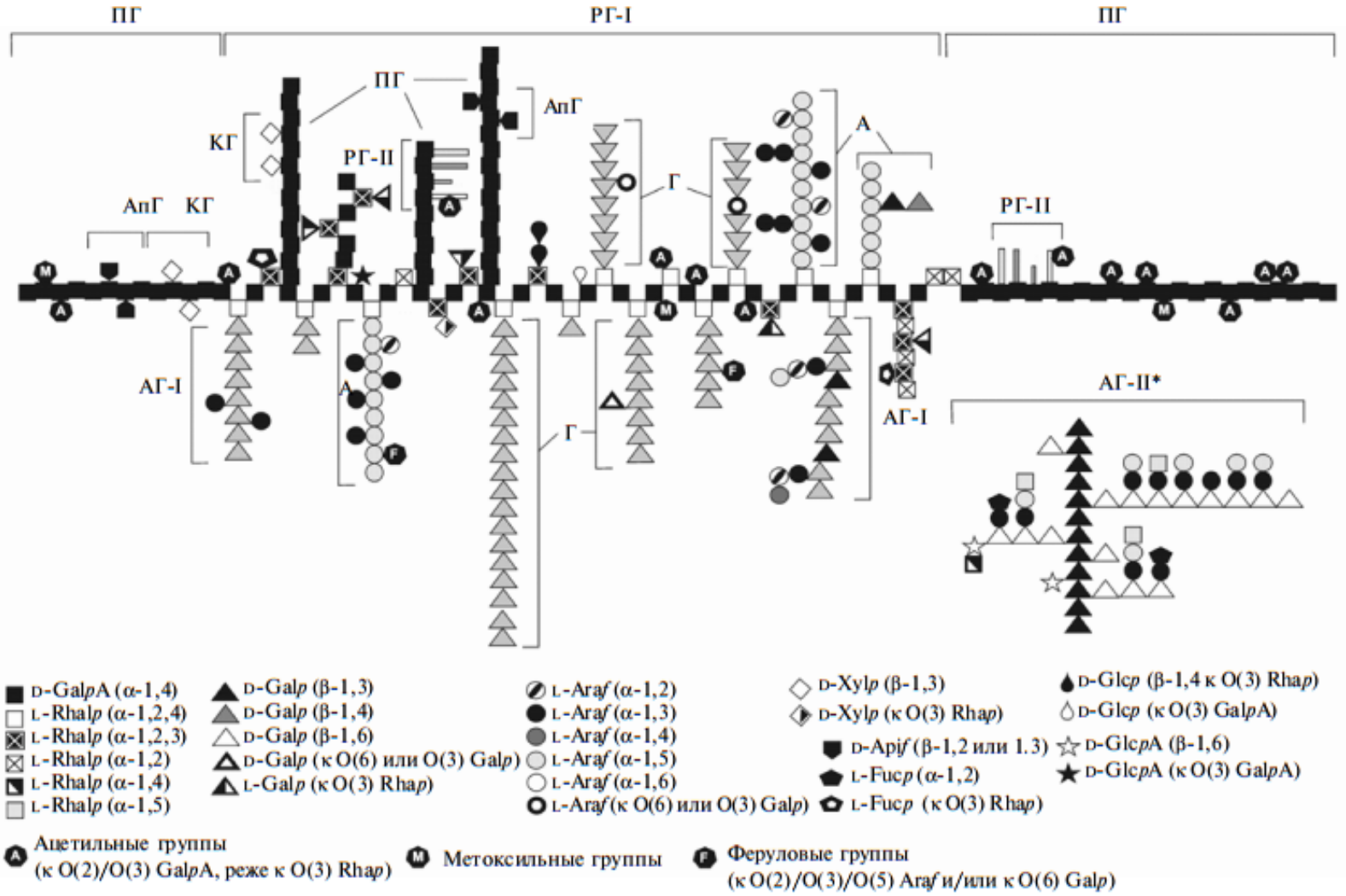

Рисунок 1. Схематическое представление охарактеризованных элементов пектинов. ПГ – гомогалактуронан, РГ-I – рамногалактуронан I, РГ-II – рамногалактуронан II, А- арабинаны, Г – галактаны, АГ-I – арабиногалактаны I типа, АГ-II – арабиногалактаны II типа, АпГ – апиогалактуронан, КГ - ксилогалактуронан [106]

1.5. Структурно-химическая характеристика арабиногалактановых белков

AGP – обширный класс высокогликозилированных белков, имеющих сложную структуру. AGP присутствуют на всех стадиях развития и во всех тканях растения, однако ни у одного индивидуального AGP конкретная роль не выявлена. Основную массу AGP (до 98%) составляет углеводная часть молекулы, состоящая из арабиногалактана типа II (AG-II) и 2-10% полипептидный кор, содержащий главным образом такие аминокислоты как гидроксипролин, серин, аланин, треонин и глицин. AGP водорастворимы и имеют молекулярную массу порядка 60-300 кДа, которая сильно зависит от степени гликозилирования [1, 3, 5, 164, 165].

AGP относятся к O-гликозилированным белкам: полисахаридные и олигосахаридные единицы в них присоединяются к белковому кору через кислород гидроксипролина (Hyp). К гидроксипролину белкового кора присоединяются β-1,3-галактановые цепи, которые замещены по положению C-6 боковыми цепями из остатков 1,6-связанной β-D-Gal*p*. Боковые цепи часто содержат остатки α-L-Ara*f*, α-L-Fuc*p*, α-L-Rha*p*, β-D-Glc*p*A, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A (рис. 2) [1, 3, 5, 166-174].

Боковые углеводные цепи AGP могут состоять более чем из 95-120 остатков моносахаридов [175], а в AGP из бобов кофе предполагаемая длина боковых цепей составляет 1000 моносахаридных остатков [4, 176].

Для арабиногалактановых белков не установлена какая-либо точная функциональная роль, хотя показано, что они играют важную роль в различных аспектах вегетативного роста и репродуктивного развития растений, накапливаются в ответ на поранение тканей. Полагают, что эти белки участвуют в адгезии клеток, в процессах растяжения клеток, а также могут служить маркерами направления клеточной дифференцировки [4, 177, 178].

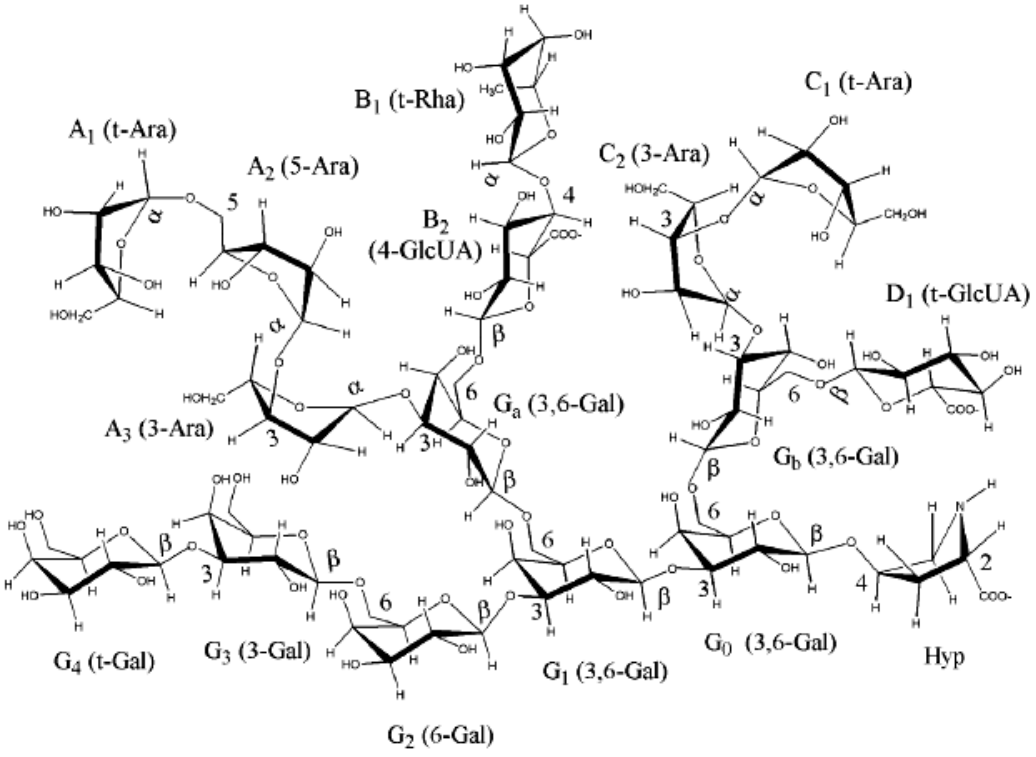

Рисунок 2. Предлагаемая первичная структура AGP [166]

Показано, что AG типа II и AGP, выделенные из различных источников, обладают иммуностимулирующей активностью, проявляют иммуномодулирующие свойства, активируют ретикулоэндотелиальную систему, увеличивают фагоцитарный индекс и др. [165, 179-182].

Взаимодействия белков между собой и с другими компонентами клеточной стенки до сих пор не выяснены, так же как неизвестно, каким образом компоненты клеточной стенки собраны в единый структурно-функциональный ансамбль. Тем не менее, из всех полимеров клеточной стенки именно пектиновые полисахариды и AGP наиболее часто упоминаются как взаимосвязанные полимеры клеточной стенки [65, 96, 172, 176, 183-185].

Полагают, что пектины могут взаимодействовать со структурными белками с помощью сложных ковалентных связей с образованием переплетенной сети, которая необходима клеточной стенке для поддержания целостности и стабильности [186].

Однако проблемы, связанные с окончательной идентификацией ковалентных связей между пектиновыми полисахаридами и белками, окончательно не решены и остаются на стадии обсуждения, что объясняется, в первую очередь, сложностью и разнообразием строения этих полимеров.

В ряде многочисленных исследований показано, что фракции арабиногалактановых белков, например, выделенные из семян кукурузы (*Zea mays*) [187], винограда (*Vitis vinifera)* [188], корней дягиля (*Angelica acutiloba*) [59], хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus)* [183], корней *Vernonia kotschyana* [189], свеклы обыкновенной [190], моркови обыкновенной (*Daucus carota*) [65], зерен кофе аравийского (*Coffea arabica*) [176], из среды культивирования клеток резуховидки Таля (*Arabidópsis thaliána*) [185] содержали также и пектиновые полисахариды. Более того, в работе Tan с соавторами [185] показано, что арабиногалактановые белки ковалентно присоединены к связующим гликанам и пектиновым полисахаридам, где пектин (RG-I) связан через остаток рамнозы с арабиногалактаном типа II, являющегося углеводной частью макромолекулы AGP, а арабиноксилан связан либо через остаток рамнозы или непосредственно с арабиногалактаном типа II.

При изучении с помощью атомно-силовой микроскопии физической структуры пектина, выделенного из сахарной свеклы, было показано, что этот экстракт содержит смесь линейного и разветвленного пектинов и комплекса пектина с белком, присоединенного к одному концу пектиновой цепи [2, 190].

В работе [190] предполагается, что белок ковалентно присоединён к пектиновой макромолекуле, выделенной из сахарной свеклы. Также было показано, что белковый компонент может быть отделён от пектиновой макромолекулы щелочной обработкой. Т.о. связь между пектином и белком является щелочелабильной, что характерно для сложноэфирной связи, предположительно эта связь «образована» посредством «сшивания» через остатки феруловой кислоты.

Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии данные подтверждают предположение о наличии ковалентной связи между пектином и белком, однако не являются прямым доказательством наличия этой связи, поскольку не исключается возможность физической ассоциации пектина и протеина. Таким образом, необходимы дополнительные исследования, чтобы идентифицировать тип протеин-пектиновой связи в комплексе и в растительной клеточной стенке [2].

1.6. Методы установления строения полисахаридов

В структурном анализе полисахаридов широко используются *полный и частичный кислотный гидролизы*. Метод частичного кислотного гидролиза (ЧКГ) основан на различной устойчивости гликозидных связей разного типа к действию кислот. Удаление определенных моносахаридных остатков при частичном кислотном гидролизе позволяет предположить конфигурацию гликозидной связи, размер окисного цикла, последовательность расположения моносахаридных остатков в углеводной цепи. Высокая чувствительность к кислотам свойственна гликозидным связям фуранозидов, 2-дезоксигексоз и 3-дезоксиальдулозоновых кислот. Напротив, гликозидные связи некоторых моносахаридов обладают повышенной устойчивостью к кислотному гидролизу. В первую очередь это касается связей уроновых, амино- и диаминоуроновых кислот [191, 192].

Недостатком частичного кислотного гидролиза является небольшой выход получаемых олигосахаридов, так как гликозидные связи в середине цепей гораздо более устойчивы к гидролизу, чем концевые и, соответственно, образующиеся низкомолекулярные фрагменты гидролизуются значительно быстрее, что не содействует их накоплению [192].

В результате ЧКГ можно получить набор полисахаридов, представляющих собой фрагменты исходного полисахарида (как главной, так

и боковых цепей) с более простой структурой. Установить структуру таких фрагментов намного проще, чем для исходного полисахарида [192].

Структурный анализ полисахаридов методом *ферментативного гидролиза* широко используется в современных исследованиях. Основная особенность ферментов - высокая, а иногда абсолютная специфичность их действия. Ферменты, как правило, абсолютно специфичны к конфигурации расщепляемой гликозидной связи, к размеру цикла моносахаридного остатка, к структуре и конфигурации моносахаридного звена. Ферменты, расщепляющие полисахариды, бывают двух типов – экзоферменты и эндоферменты. Первые способны осуществлять гидролитическое отщепление только концевых моносахаридных остатков. Вторые катализируют гидролиз гликозидных связей внутри полисахаридной цепи, т.е. расположенных достаточно далеко от обоих ее концов [191].

Избирательное расщепление связей при помощи ферментов позволяет сделать заключение не только о природе гликозильного остатка, но и о конфигурации разрушенной гликозидной связи, а иногда и о его ближнем окружении в цепи [191-193].

Для изучения структуры пектиновых полисахаридов обычно применяют несколько групп ферментов. В настоящее время наиболее изученными ферментами являются – протопектиназа, полигалактуроназа, пектинметилэстераза, рамногалактуроназа, арабиназа и галактаназа. Полигалактуроназа катализирует гидролитическое расщепление α-1,4-связи, образованной неэтерифицированными остатками галактуроновой кислоты. Пектинэстераза гидролизует сложноэфирные связи пектина с образованием метилового спирта и полигалактуроновой кислоты. Пектинтрансэлиминаза расщепляет уронидные связи пектина без его предварительной деметилэтерификации. Рамногалактуроназа применяется для разрушения кора рамногалактуронана I, для получения фрагментов, содержащих остатки галактуроновой кислоты и рамнозы [193].

Распад по Смиту – широко распространенный метод структурного анализа полисахаридов. Он основан на избирательном расщеплении С-С-связи моносахаридов при окислении α-гликольной группировки периодатом. Процесс избирательного распада по Смиту включает три стадии: окисление полисахарида периодатом натрия, восстановление $NaBH_4$ образующегося полиальдегида до многоатомного спирта и последующий мягкий кислотный гидролиз, расщепляющий только гликозидные связи окисленных моносахаридов [191, 192]. Остатки моносахаридов, не содержащие соседних гидроксогрупп, например, 1,3-связанные остатки, не затрагиваются при окислении периодатом.

Метилирование – основной химический метод установления положений замещения моносахаридов в полисахаридной цепи. Метод состоит в метилировании всех свободных гидроксилов в углеводной цепи с последующим полным гидролизом гликозидных связей и идентификацией образующихся метилированных сахаров. Широко распространен метод метилирования по Хакомори, который заключается в обработке углевода йодистым метилом в диметилсульфоксиде с метилсульфинилкарбанионом. Определение положения групп CH_3 позволяет установить размер окисного цикла, места замещения и природу остатков. Однако поскольку при гидролизе разрываются все гликозидные связи, невозможно установить последовательность расположения моносахаридных остатков в цепи и конфигурацию гликозидной связи [191, 192].

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – один из главных методов физико-химического анализа, применяемый для определения структуры полисахаридов.

ЯМР-спектроскопия широко используется для определения природы моносахаридного остатка, положения межмономерных связей, конфигурации гликозидных остатков, размеров окисных циклов и последовательности расположения в цепи моносахаридных остатков [194].

Двухмерная ЯМР-спектроскопия представляет больше сведений о структуре молекулы, чем одномерная ЯМР-спектроскопия и особенно удобна в установлении структуры особенно сложных молекул, структуру которых тяжело установить с помощью одномерной ЯМР-спектроскопии.

В гомоядерной корреляционной спектроскопии COSY коррелируются химические сдвиги магнитных ядер со связанными спинами.

Другим двумерным экспериментом, широко применяемым для расшифровки спектров, является полная корреляционная спектроскопия TOCSY. Ее главное отличие от COSY – выявление корелляционных пиков между всеми протонами изолированной спиновой системы.

Двумерная гетероядерная спектроскопия HSQC и HMQC коррелирует химические сдвиги гетероядер (например, ^{13}C) и присоединенных к ним протонов.

Многосвязная гетероядерная корреляционная спектроскопия (HMBC) определяет гетероядерные корреляции на расстоянии до 2-4 связей [194].

Двумерная спектроскопия ROESY, использующая ядерный эффект Оверхаузера, коррелирует химические сдвиги пространственно близко расположенных протонов, вне зависимости от расположения связей в молекуле между ними, а также аномерный протон гликозилирующего моносахарида с протонами гликозилируемого моносахарида [194].

При значительном перекрывании корреляционных пиков H/C, используется эксперимент ^{1}H-, ^{13}C-HSQC-TOCSY, позволяющий наблюдать корреляцию каждого сигнала углерода не только с сигналом присоединенного к нему протона, но и с сигналами всех протонов данной спиновой системы [194].

1.7. Заключение

К основным полимерам клеточных стенок растений относятся преимущественно целлюлоза, лигнин, связующие гликаны, пектины и структурные белки. К наиболее сложноорганизованным и вариабельным по структуре компонентам клеточной стенки относятся пектиновые полисахариды и арабиногалактаны типа II (в т.ч. AGP) – группа растительных полисахаридов, широко представленных в различных растительных источниках. Продолжающиеся интенсивные исследования вышеуказанных полисахаридов открывают все новые структурные особенности этих сложнейших классов природных соединений. Однако, хотя в исследованиях структуры этих полисахаридов достигнуты существенные успехи, ряд особенностей их структуры и сегодня является предметом прений. Это, прежде всего, обусловлено их высоким молекулярным весом и нерегулярностью строения углеводных цепей.

Несмотря на то, что различные элементы структуры пектинов и AGP довольно подробно описаны в литературе (в том числе и их структура), до сих пор нет достоверных знаний о взаимодействии данных структурных блоков между собой и с другими полисахаридами, поскольку неизвестно каким образом компоненты клеточной стенки собраны в единый структурно-функциональный ансамбль. В связи с чем необходимо дальнейшее изучение структурного разнообразия данных полимеров, разработка новых эффективных методов фрагментации и анализа, более глубокое всестороннее выяснение их структуры.

Из проведённого анализа литературы можно сделать вывод, что полисахариды растений рода *Heracleum* являются малоизученными. В то же время следует отметить, что растения рода *Heracleum* представляют несомненный интерес для исследования. Достаточная обеспеченность сырьевой базой делает надземную часть растений рода *Heracleum* перспективным и ценным источником биологически активных веществ.

Целенаправленное изучение полисахаридов растений рода *Heracleum* имеет решающее значение для определения перспектив его применения. Прикладными аспектами рационального использования полисахаридов борщевика, например, являются оценки перспектив применения их в медицинской практике для профилактики и лечения ряда заболеваний различной этиологии.

Между тем, перспективное использование *Heracleum* в качестве лекарственного сырья требует оценки структурно-химических характеристик и биологической активности отдельных компонентов, входящих в его состав.

Целенаправленное использование биологических ресурсов борщевика Сосновского затрудняется недостатком сведений о динамике накопления, составе и строении полисахаридов его клеточных стенок. Исследования, направленные на изучение динамики содержания различных групп соединений, а также отдельных компонентов биомассы борщевика, как и информацию о структуре и свойствах веществ, которые входят в экстракты борщевика Сосновского, можно использовать в качестве основы при создании и усовершенствовании технологий комплексного использования вегетативной массы борщевика Сосновского.

Кроме того, научный интерес и актуальность исследований борщевика продиктованы возможностью расширения знаний о структурном разнообразии полисахаридов растительного происхождения, выявления зависимости физико-химических свойств от их структурной организации. Изучение структурных особенностей компонентов *H. sosnowskyi* и их химических характеристик могут помочь разработать научные основы его переработки, что в свою очередь может способствовать решению проблемы по ограничению распространения и вредоносности борщевика как агрессивного инвазионного вида.

ГЛАВА 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Реактивы и материалы

Для выполнения диссертации применяли: коммерческие заведомые образцы бычьего сывороточного альбумина и моносахаридов: галактозы, арабинозы, рамнозы, маннозы, глюкозы, ксилозы, фукозы, глюкуроновой и галактуроновой кислот; химические реактивы: толуол и пиридин марки «ч.д.а.», серная кислота и аммиак водный марки «о.с.ч.», соляная кислота, ледяная уксусная кислота марки «х.ч.», хлороформ марки «х.ч.», метиловый спирт, этиловый спирт (96%), трифторуксусная кислота (Merck, Германия, 99%), 3,5-диметилфенол (Aldrich, США, 99%), натрия метаарсенит (Fluka, Германия, 99%) и натрия боргидрид (Sigma-Aldrich, США, 98.5%).

2.2. Экспериментальные условия

2.2.1. Общие экспериментальные условия

Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Shimadzu UV-1700 (PharmaSpec).

Гель-фильтрационную хроматографию выполняли на хроматографической системе (Pharmacia, Швеция), применяли колонки (1.3×37 см) с молекулярными ситами Sephacryl (сефакрил) S-300 (Sigma), элюент – дистиллированная вода, свободный объём V_0 = 12 мл, скорость элюции 0.25 мл/мин, сбор фракций по 3 мл. Элюцию углеводов контролировали по положительной реакции аликвоты элюата на углеводы с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, фотоколориметрирование проводили при 480 нм (метод Смита) [195]. Фракции, соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали и лиофилизовали.

Водные растворы концентрировали на ротационном испарителе (Heidolph, Германия) в вакууме при 40-45°С, центрифугировали на приборе «Sigma» (Германия) при 5000–10000g в течение 10–20 мин. Растворы полисахаридов диализовали против дистиллированной воды на мембранах 3.5 и 12-14 кДа (12-14 кДа во всех случаях, если не указано иное) в течение 3 суток, периодически меняя воду (не менее 2-х раз в сутки). Водные растворы образцов лиофилизовали на приборе «ALPHA 2-4 LD plus» (MARTIN CHRIST).

Газожидкостную хроматографию выполняли на хроматографе Shimadzu GC-2010AF с пламенно-ионизационным детектором и интегратором на капиллярной колонке HP-1 Agilent (30 м×0.25 мм×0.25 μм), газ-носитель – He, в программе: от 175°С (1 мин) до 250°С (2 мин) со скоростью 3°/мин. Процентное содержание моносахаридов от суммарного содержания препарата вычисляли из площадей пиков, используя коэффициенты отклика детектора [196].

Молекулярную массу полисахаридных фракций определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Образец (3 мг) растворяли в 0.15 М NaCl и фильтровали. Для анализа использовали хроматографическую систему (Shimadzu, Япония), включающую насос LC-20AD, дегазатор DGU-20A3, термостат CTO-10AS, рефрактометр RID-10A, колонки Shodex OH-pak SB-804 HQ (7.6 мм×30 см) с предколонкой Shodex GS-2G 7B (7.6 мм×5 см) (Shimadzu, Япония). Элюирование проводили 0.15 М раствором NaCl, содержащим 0.02% NaN_3. Хроматографирование проводили при 40°С, скорость подачи элюента 0.3 мл/мин. В качестве стандартов использовали пуллуланы (Fluka, Германия, Mw 1.3, 6, 12, 22, 50, 110, 200, 400, 800 кДа). Средневесовая молекулярная масса (Mw), среднечисловая молекулярная масса (Mn) и фактор полидисперсности (Mw/Mn) были рассчитаны программой LCsolutionGPC (LCsolution, версия 1.24 SP1). Образцы и стандарты были исследованы в двух повторностях.

Идентификацию моносахаридов проводили, используя распределительную нисходящую *бумажную хроматографию* на бумаге Filtrak FN-12 и FN-13 (Германия) в системе растворителей бутан-1-ол:пиридин:H_2O (6:4:3, по объему). Для индикации пятен моносахаридов на бумажных хроматограммах применяли раствор кислого анилинфталата при 105°С.

Спектры ЯМР были зарегистрированы при температуре исследования 300-328 K на приборе Bruker AVANCE-II-300 (Германия), для 3-5%-ных растворов полисахаридов, после 1-2-кратной лиофилизации образцов из D_2O и последующего растворения их в 99.9% D_2O. Химические сдвиги приведены по отношению к внутреннему стандарту DSS (sodium 4,4-dimethyl-4-silapentan-sulfonate) (Sigma–Aldrich) ($\delta_н/\delta_с$ 0.00 м.д.). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР производили на основании данных двумерных экспериментов. Для регистрации двумерных спектров использовали стандартные методики фирмы «Bruker».

2.2.2. Аналитические методы

Общее содержание углеводов определяли реакцией с фенолом в присутствии конц. серной кислоты [195].

Общее содержание гликуроновых кислот определяли по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты (калибровочный график построен для D-GalA, фотоколориметрирование проводили при двух длинах волн: 400 и 450 нм) [197].

Содержание белка – по методу Бредфорд (калибровочный график построен для бычьего альбумина, фотоколориметрирование проводили при 595 нм) [198].

Содержание метоксильных групп определяли по реакции с пентан-2,4-дионом (калибровочный график построен для метанола, фотоколориметрирование проводили при 412 нм) [199].

Все измерения проводили в трех аналитических повторностях и использовали средние значения для расчетов.

Качественное и количественное определение нейтральных моносахаридов проводили с помощью метода ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [196].

К навеске (2-5 мг) исследуемого образца добавляли 1 мл 2М ТФУ, содержащий *мио*-инозит (1.0 мг/мл). Смесь термостатировали в течение 5 ч при 100°С. Избыток кислоты удаляли многократным упариванием гидролизата досуха с CH_3OH. Полученную в результате кислотного гидролиза смесь моносахаридов растворяли в 1 М растворе NH_4OH (1 мл), добавляли $NaBH_4$ (5 мг) и оставляли на ночь при комнатной температуре. Избыток $NaBH_4$ разрушали добавлением лед. уксусной кислоты до pH 5. Раствор упаривали, добавляя CH_3OH до полного удаления влаги. Смесь полиолов растворяли в 0.2 мл сухого пиридина, добавляли 0.2 мл уксусного ангидрида и оставляли на ночь при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, добавляя по 0.2 мл толуола до полного удаления избытка пиридина и уксусного ангидрида, а далее упаривали досуха, добавляя CH_3OH до полного удаления влаги. Смесь ацетатов полиолов растворяли в 1 мл сухого $CHCl_3$, количественно переносили в виалы (2 мл) и анализировали методом ГЖХ.

2.3. Экстракция полисахаридов

Надземную часть борщевика Сосновского (целые растения, включающие в себя листья, стебли и цветы) заготавливали в июле месяце в период цветения растения. Образцы борщевика для исследования отбирали не менее чем с 20 растений. Для исследования срезали надземную часть борщевика в четырех разных направлениях поля. Сырьё измельчали с помощью ножевой мельницы RM-120 (Россия) до размера частиц 10-15 мм и экстрагировали этиловым спиртом (t ~ 55°С) дважды по 2 ч для удаления

низкомолекулярных веществ. Остаток сырья сушили на воздухе, выход составил ~ 9% от исходного свежего сырья. Схема экстракции приведена на рисунке 3 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.1)

На первой ступени полученное обезжиренное воздушно-сухое сырьё (25 г) экстрагировали дист. водой при перемешивании и t ~ 70-71°C в течение 2-х часов. Применяли пятикратную экстракцию (здесь и далее по 0.5 л экстрагента). Фракции с каждой экстракции собирали отдельно, центрифугировали и концентрировали (50-100 мл). Полисахариды осаждали четырехкратным объемом 96%-ного этанола (1:4 по объёму). Полученный осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде (50 мл), диализовали против дист. воды и лиофильно высушивали. Получили набор пяти фракций полисахаридов: HS_W-I, HS_W-II, HS_W-III, HS_W-IV, HS_W-V, с выходом 138.5, 52.6, 54.7, 22.3, 35.8 мг соответственно.

На второй ступени остаток сырья экстрагировали водой, подкисленной HCl до pH ~ 3.5-4, при перемешивании и t ~ 70-71°C в течение 2-х часов. Применяли пятикратную экстракцию. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше. Получили набор четырех фракций полисахаридов HS_A-I, HS_A-II, HS_A-III, HS_A-IV, с выходом 56.1, 56.4, 79.7, 151.8 мг соответственно. Фракция HS_A-V (выход ~ 150 мг) была испорчена.

На третьей ступени остаток сырья экстрагировали 0.7%-ным водным раствором $(NH_4)_2C_2O_4$, применяли пятикратную экстракцию при перемешивании и t ~ 70-71°C в течение 2-х часов. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше. Получили набор полисахаридных фракций HS_O-I, HS_O-II, HS_O-III, HS_O-IV, HS_O-V, с выходом 3110, 663.2, 252.3, 114.8, 122.8 мг соответственно.

На четвёртой ступени остаток сырья экстрагировали водным раствором 7.0%-ного KOH (содержащим 10 мМ/л $NaBH_4$), применяли пятикратную экстракцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 2-х часов. Полученные экстракты охлаждали, подкисляли уксусной кислотой до pH ~ 5 и центрифугировали, далее растворы концентрировали, диализовали и

лиофильно высушивали. Получили набор полисахаридных фракций HS_K-I, HS_K-II, HS_K-III, HS_K-IV, HS_K-V с выходом 704, 305, 393, 144, 103 мг соответственно.

На пятой ступени остаток сырья экстрагировали 14%-ным водным раствором NaOH и 4% H_3BO_3, содержащим 10 мМ/л $NaBH_4$, применяли пятикратную экстракцию при перемешивании при комнатной температуре в течение 2-х часов. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше. Получили набор полисахаридных фракций HS_N-I, HS_N-II, HS_N-III, HS_N-IV, HS_N-V с выходом 952, 69, 95, 26, 40 мг соответственно.

Водно-спиртовые супернатанты, полученные при осаждении фракций HS_W-I – HS_W-V 4-х кратным объемом 96%-ного этанола, объединяли, концентрировали (20-50 мл) и диализовали против дистиллированной воды (мембраны 3.5 кДа). Полученный раствор центрифугировали, концентрировали и лиофилизовали. Полученную углеводную фракцию (46 мг), растворяли в дист. воде (1 мл) и фракционировали с помощью гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали по положительной реакции аликвоты элюата на углеводы с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты по методу Смита, фотоколориметрирование проводили при 480 нм [195].

Фракции (по 3 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридную фракцию HS_W-S, соответствующую главному пику на выходной кривой, выход 26 мг.

Водно-спиртовые супернатанты, полученные при осаждении фракций HS_A-I – HS_A-V 4-х кратным объемом 96%-ного этанола, объединяли, концентрировали (20-50 мл) и диализовали против дистиллированной воды (мембраны 3.5 кДа). Полученный раствор центрифугировали, концентрировали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридную фракцию с выходом 87 мг. Полученную углеводную фракцию (42 мг), растворяли в дист. воде (1 мл) и фракционировали с помощью

гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали, как описано выше. В результате получили полисахаридную фракцию HS_A-S, соответствующую главному пику на выходной кривой, выход 31 мг.

Водно-спиртовые супернатанты, полученные при осаждении фракций HS_O-I – HS_O-V 4-х кратным объемом 96%-ного этанола, объединяли, концентрировали (20-50 мл) и диализовали против дистиллированной воды (мембраны 3.5 кДа). Полученный раствор центрифугировали, концентрировали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридную фракцию с выходом 143 мг. Полученную углеводную фракцию (42 мг), растворяли в дист. воде (1 мл) и фракционировали с помощью гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали, как описано выше. В результате получили две полисахаридные фракции HS_O-S_1 (13 мг) и HS_O-S_2 (17.4 мг).

Схема выделения полисахаридных фракций из водно-спиртовых супернатантов приведена на рисунке 6 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.5).

2.4. Методы исследования

2.4.1. Ионообменная хроматография полисахарида HS_W-I

Полисахарид HS_W-I (100 мг) растворяли в 0.01 M NaCl (3 мл) и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (OH^--форма, 34.5×2.2 см). Фракции элюировали последовательно 0.01; 0.1; 0.2; 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl со скоростью 60 мл/ч. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

Фракции (по 5 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали (30 мл), диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции HS_W-I_1 (0.01 M NaCl, выход 19.1 мг), HS_W-I_2 (0.1 M NaCl, выход 35.9 мг), HS_W-I_3

(0.2 M NaCl, выход 5.8 мг), HS_W-I_4 (0.3 M NaCl, выход 4.7 мг).

Состав фракций приведен в таблице 6 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.2).

2.4.2. Ионообменная хроматография полисахарида HS_A

Фракции HS_A-I – HS_A-IV были объединены в одну фракцию HS_A, поскольку имели схожий моносахаридный состав (табл. 2, см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.1).

Полисахарид HS_A (100 мг) растворяли в 0.01 M NaCl (3 мл) и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (OH^--форма, 34.5×2.2 см). Фракции элюировали последовательно 0.01; 0.1; 0.2; 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl со скоростью 60 мл/ч. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

Фракции (по 5 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали (30 мл), диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции HS_A-1 (0.01 M NaCl, выход 5.3 мг), HS_A-2 (0.1 M NaCl, выход 55.4 мг), HS_A-3 (0.2 M NaCl, выход 21.9 мг).

Состав фракций приведен в таблице 9 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.7).

2.4.3. Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I

Полисахарид HS_O-I (150 мг) растворяли в 0.01 M NaCl (3 мл) и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (OH^--форма, 34.5×2.2 см). Фракции элюировали последовательно 0.01; 0.1; 0.2; 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl со скоростью 60 мл/ч. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

Фракции (по 5 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали (30 мл), диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции HS_O-I_1 (0.1 M NaCl, выход 40.6 мг), HS_O-I_2 (0.2 M NaCl, выход 77.9 мг), HS_O-I_3 (0.3 M NaCl, выход 6.2 мг).

Состав фракций приведен в таблице 12 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.11).

2.4.4. Частичный кислотный гидролиз полисахарида HS_O-I

К полисахариду HS_O-I (1000 мг) добавляли 0.05 М ТФУ (185 мл) и термостатировали в течение 4 ч при 70°С. Кислотонерастворимую фракцию отделяли центрифугированием после охлаждения реакционной смеси. Нерастворимый осадок промывали 96%-ным этанолом до отсутствия моносахаридов в супернатанте, диспергировали в воде и постепенно приливали 1 М водный раствор NH_3 до полного растворения осадка, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридный фрагмент с выходом 568 мг, который (41 мг) растворяли в дист. воде и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. В результате получили два полисахаридных фрагмента HS_O-H_1 (12.2 мг) и HS_O-H_2 (15.1 мг).

Кислоторастворимую фракцию (супернатант после отделения осадка) концентрировали (50 мл) и осаждали 4-кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридный фрагмент HS_O-I-H_1, выход 205 мг.

Водно-спиртовой супернатант концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили углеводную фракцию, которую растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и фракционировали методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом

S-300. В результате получили фрагмент HS_O-I-H_2, соответствующий главному пику на выходной кривой, выход 12.7 мг.

Состав фрагментов приведен в таблице 12 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.11).

2.4.5. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-H_1

Полисахарид HS_O-I-H_1 (183 мг) растворяли в 33 мл воды, добавляли водный раствор (0.2 мл) пектиназы (7 мг, «Fluka», Германия, активность 1000 ед/мг), смесь инкубировали при 37ºС в течение 2 ч, контролируя количество восстанавливающих сахаров в растворах по методу Нельсона-Сомоджи до прекращения роста количества восстанавливающих сахаров [200]. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100ºС в течение 10 мин., выпавший осадок удаляли центрифугированием.

Полученный раствор концентрировали (10-15 мл) и осаждали 4-х кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отсутствовал. Спиртовой супернатант концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили углеводную фракцию, которую растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300.

В результате получили полисахаридную фракцию HS_O-I-H_1-F, соответствующую главному пику на выходной кривой, выход 28.9 мг, и минорную фракцию, выход 7.2 мг.

Состав фрагментов приведен в таблице 15 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.15).

2.4.6. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I

Полисахарид HS_O-I (770 мг) растворяли в 130 мл воды, добавляли водный раствор (0.2 мл) пектиназы (30 мг, «Fluka», Германия, активность 1000 ед/мг), смесь инкубировали при 37ºС в течение 2 ч, контролируя

количество восстанавливающих сахаров в растворах по методу Нельсона-Сомоджи до прекращения роста количества восстанавливающих сахаров [200]. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100ºС в течение 10 мин., выпавший осадок удаляли центрифугированием.

Полученный раствор концентрировали (10-15 мл) и осаждали 4-х кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отсутствовал. Спиртовой супернатант концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили полисахаридный фрагмент HS_O-I-F_1, выход 192 мг, который (40 мг) растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

В результате получили два полисахаридных фрагмента HS_O-I-$F_{1\text{-}1}$ (9.4 мг) и HS_O-I-$F_{1\text{-}2}$ (13.5 мг).

Навеску фрагмента HS_O-I-F_1 (150 мг) растворяли в 0.25 М водном растворе аммиака и выдерживали в течение ночи при температуре 5ºС. Раствор нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали.

Полученный полисахаридный фрагмент растворяли в 30 мл воды, добавляли водный раствор пектиназы (5 мг), смесь инкубировали при 37ºС в течение 2 ч. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100ºС в течение 10 мин., выпавший осадок удаляли центрифугированием. Полученный раствор концентрировали (~10 мл), диализовали против дистиллированной воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили фрагмент HS_O-I-F_2, выход 114 мг.

Навеску фрагмента HS_O-I-F_2 (114 мг) растворяли в 1 М водном растворе аммиака и выдерживали в течение ночи при температуре 5ºС. Раствор нейтрализовали уксусной кислотой, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали.

Полученный полисахаридный фрагмент (108 мг) растворяли в 20 мл воды, добавляли водный раствор пектиназы (3 мг), смесь инкубировали при 37ºС в течение 2 ч. Пектиназу дезактивировали кипячением при 100ºС в течение 10 мин., выпавший осадок удаляли центрифугированием.

Полученный раствор концентрировали (10-15 мл), диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили фрагмент HS_O-I-F_3, выход 102 мг.

Состав фрагментов приведен в таблице 17 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.17).

2.4.7. Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I-F_3

Полисахарид HS_O-I-F_3 (65 мг) растворяли в 0.01 M NaCl (3 мл) и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (OH^--форма, 34.5×2.2 см). Фракции элюировали последовательно 0.01; 0.1; 0.2; 0.3, 0.4, 0.5 M NaCl со скоростью 60 мл/ч. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

Фракции (по 5 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали (10 мл), диализовали (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции HS_O-I-F_3-1 (0.01 M NaCl, выход 2.6 мг), HS_O-I-F_3-2 (0.1 M NaCl, выход 32 мг), HS_O-I-F_3-3 (0.2 M NaCl, выход 16 мг). Фракцию HS_O-I-F_3-2 растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и фракционировали методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. В результате получили две фракции HS_O-I-F_3-2_1 (выход 7.7 мг) и HS_O-I-F_3-2_2 (выход 19.5 мг).

Состав фракций приведен в таблице 20 (см. главу "Обсуждение результатов", раздел 3.2.20**).**

2.4.8. Распад по Смиту полисахарида HS_O-I

505 мг полисахарида HS_O-I растворяли в 38 мл воды и приливали 12.5 мл 0.03 М раствора $NaIO_4$. Полученный раствор выдерживали в темноте при +5ºС до прекращения расхода окислителя. Расход окислителя контролировали по убыванию значения оптической плотности раствора при 223 нм. Избыток метапериодата натрия разрушали раствором этиленгликоля (0.3 мл), смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 2 часов, затем небольшими порциями добавляли 1.3 г $NaBH_4$ и оставляли на ночь. Избыток боргидрида разрушали добавлением лед. уксусной кислоты до pH ~ 5, полученную смесь диализовали против дистиллированной воды и лиофилизовали. Получили полиспирт с выходом 432 мг.

Полиспирт растворяли в 0.5 М ТФУ (160 мл) и выдерживали в течение 24 ч при комнатной температуре. Полученный раствор концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили полисахаридный фрагмент HS_O-I-SD, выход 252.7 мг.

Полученный фрагмент (41.3 мг) растворяли в дист. воде и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее. Фракции, соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридный фрагмент HS_O-I-SD_1, соответствующий главному пику на выходной кривой, выход 9.9 мг.

Состав фрагментов приведен в таблице 23 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.23).

2.4.9. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-SD

Полисахарид HS_O-I-SD (78.8 мг) растворяли в 16 мл воды, добавляли водный раствор (0.2 мл) пектиназы (3 мг, «Fluka», Германия, активность

1000 ед/мг), смесь инкубировали при 37ºС в течение 1 ч, контролируя количество восстанавливающих сахаров в растворах по методу Нельсона-Сомоджи до прекращения роста количества восстанавливающих сахаров [200].

Пектиназу дезактивировали кипячением при 100ºС в течение 10 мин., выпавший осадок удаляли центрифугированием.

Полученный раствор концентрировали (5-10 мл) и осаждали 4-х кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок не обнаружен. Спиртовой супернатант концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили полисахаридную фракцию, выход 24.3 мг, которую растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. Элюцию углеводов контролировали по методу Смита [195], как описано ранее.

В результате получили полисахаридную фракцию HS_O-I-SD-F (17 мг), соответствующую главному пику на выходной кривой, и минорную фракцию, выход 2.1 мг.

Состав фрагментов приведен в таблице 25 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.25).

2.4.10. Определение биологической активности полисахаридов

Работы по определению биологической активности полисахаридов из борщевика Сосновского проводились на базе Института физиологии Коми НЦ УрО РАН н.с. Михайловой Е.А.

Для определения действия полисахаридов из борщевика Сосновского на ранние стадии онтогенеза злаков использовали семена пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. сорта «Иргина». Семена перед посевом обрабатывали 0.002%-ными водными растворами полисахаридов. Контролем служили семена, которые предварительно обрабатывали водопроводной водой. Обработанные семена инкубировали в чашках Петри в течение 8 суток при

23ºС. Всхожесть семян определяли в процентах. В процессе прорастания семян и роста проростков на 2, 4, 6 и 8-е сутки измеряли длину корней и проростков пшеницы. Опыты проводили в 4-х кратной повторности по 50 семян в каждом варианте опыта.

Среднестатистические значения параметров и их стандартные ошибки представлены в таблице 28 (см. главу "Результаты исследований и обсуждение", раздел 3.2.29).

2.4.11. Анализ аминокислотного состава пептидной части полисахарида HS_W-I_2

Работы по анализу аминокислотного состава проводились на базе Института геологии Коми НЦ УрО РАН с использованием оборудования Центра коллективного пользования "Геонаука" с.н.с. Шаниной С. Н.

Для извлечения аминокислот образцы подвергались гидролизу в 6М HCl (12 ч, 105°С) [201]. К гидролизату добавлялся внутренний стандарт (L-норвалин). Полученные гидролизаты отфильтровывались на стеклянных фильтрах и отгонялись под вакуумом на роторном испарителе при температуре 45°С. Содержимое перерастворяли в 0.05М HCl. Полученный раствор очищался от солей и органических соединений. Очистка проводилась на колонке, заполненной сорбентом Dowex 50W X8 (катионообменник). Для удаления металлов и органических соединений смолу промывали 25 мл 0.01М HCl. Элюирование аминокислот осуществлялось 25 мл 2.5М NH_4OH. Полученный раствор вновь отгонялся на роторном испарителе при температуре 45°С. Высушенные образцы перерастворялись в 4 мл 0.1М HCl, замораживались и высушивались. Затем они этерифицировались пентафторпропионовым (PFP) ангидридом. Реакции этерификации проводили при температуре 110°С. Полученные N-PFP изопропиловые эфиры аминокислот растворяли в дихлорметане и переносили в виалы для хроматографии.

Все используемые реагенты имели высокую степень чистоты (фирмы Aldrich и Fluka). Для анализов использовалась только бидистиллированная вода. Предварительно стеклянная посуда прогревалась в течение 2 часов при температуре 500°С для того, чтобы удалить возможное органическое загрязнение.

Анализы выполнялись на газовом хроматографе GC-17A (Shimadzu) с пламенно-ионизационным детектором. Для разделения D- и L-энантиомеров полученных эфиров аминокислот использовалась капиллярная колонка Chirasil-Val (длина 50 м, внутренний диаметр 0.25 мм). В качестве газа-носителя применялся гелий. Выбор условий анализа осуществляли экспериментально. Температура испарителя – 250°С, температура пламенно-ионизационного детектора – 275°С. Анализ проводился при следующих условиях программирования температуры термостата колонок: 4 мин в изотермическом режиме при температуре 90°С, затем подъем температуры до 210°С со скоростью 2°С/мин. Время анализа – 70 минут. Обработка и запись хроматограмм осуществлялись программой GC Solution.

Параллельно с образцами проводился холостой опыт, для которого использовался гидролизат, извлеченный из крупки горного хрусталя, предварительно прогретого при 1000°С.

2.4.12. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента) средствами программ Microsoft Excel-2010. Критерий вероятности $P < 0.05$ принимали достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выделение и общая химическая характеристика полисахаридов *H. sosnowskyi*

Свежесобранную надземную часть борщевика Сосновского (целые растения, включающие в себя листья, стебли и цветы), заготовленную в июле месяце в период цветения растения (г. Сыктывкар, Республика Коми), измельчали, а затем экстрагировали этиловым спиртом для удаления экстрактивных веществ.

Для извлечения водорастворимых полисахаридов обезжиренное сырьё экстрагировали дистиллированной водой при 70°С. Для разрушения протопектина полученный растительный материал подвергали обработке раствором соляной кислоты при 70ºС, с постоянным перемешиванием смеси, при этом начальная pH раствора составляла ~3.5-4. Для последующего извлечения пектиновых полисахаридов из борщевика использовали обработку раствором оксалата аммония (t - 70ºС, перемешивание), связывающего двухвалентные катионы кальция и магния в нерастворимые соли.

При оценке возможности выделения полисахаридов с целью практического их использования важным является определение оптимального числа экстракций тем или иным экстрагентом, обычно за основу берут выход продукта с каждой экстракции. Кроме того, могут представлять интерес и данные об изменении качественного и количественного состава получаемых фракций.

В связи с этим на каждой ступени обработки применяли пятикратную экстракцию. Фракции с каждой экстракции собирали отдельно. Для осаждения полисахаридов применяли ~96%-ный этанол в объемном соотношении к концентрату 4:1.

Для выделения связующих гликанов применяли последовательную обработку растворами KOH и NaOH. Растворяющая способность растворов KOH и NaOH при различных концентрациях отличается, что позволяет фракционировать полиозы на группы, например на маннаны и ксиланы [202]. Для выделения ксиланов применяли 7% водный раствор гидроксида калия, маннанов – 14% водный раствор гидроксида натрия с 4% борной кислотой. Для выделения водорастворимых связующих гликанов из щелочных растворов использовали подкисление уксусной кислотой до pH ~ 5. Полученный раствор далее концентрировали и диализовали.

В результате для получения полисахаридов из борщевика была использована схема, приведенная на Рисунке 3.

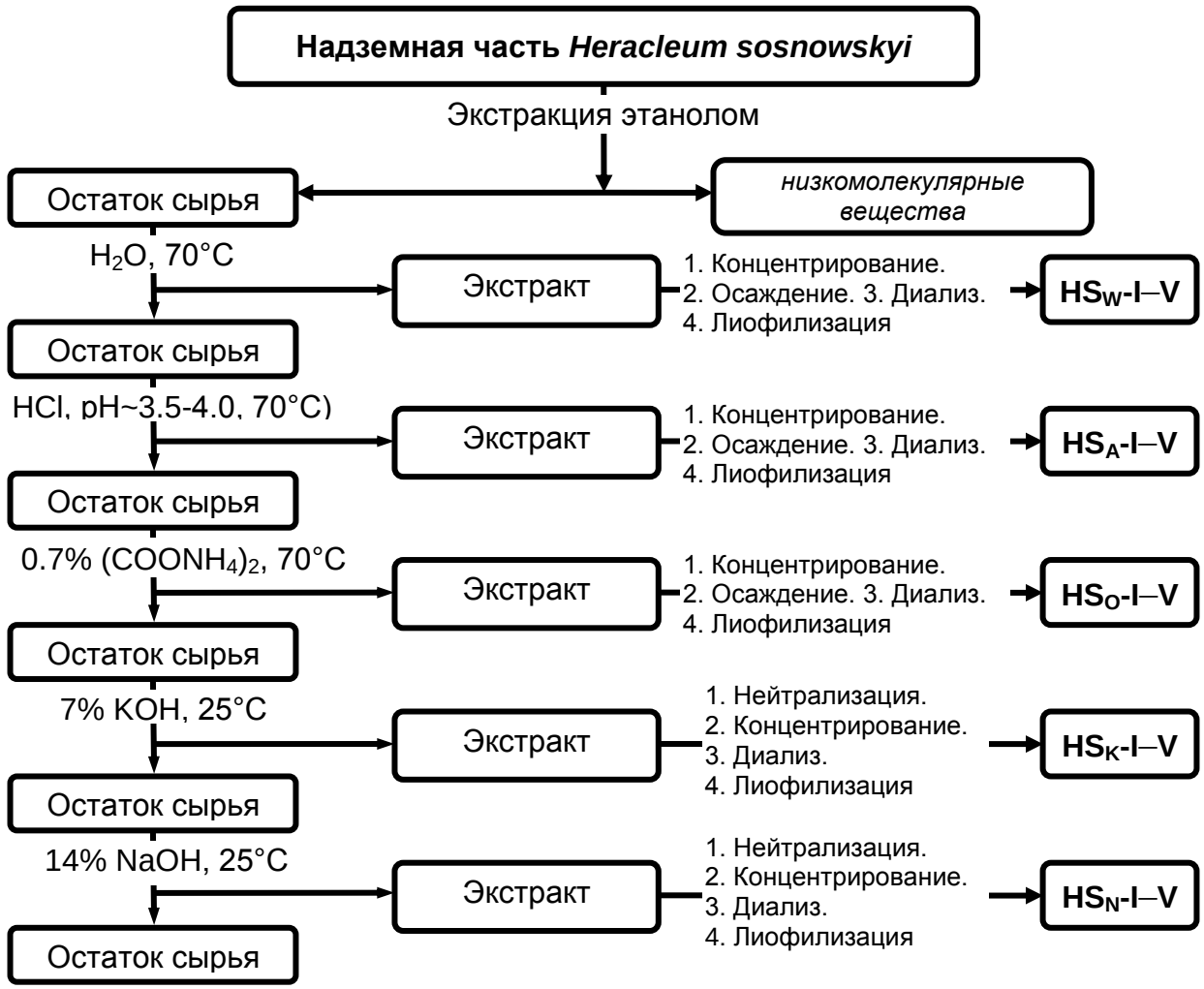

Рисунок 3. Выделение полисахаридов из надземной части борщевика Сосновского

Таким образом, при последовательной экстракции надземной части борщевика Сосновского водой, водой, подкисленной соляной кислотой до pH ~ 3.5-4, раствором оксалата аммония, растворами гидроксида калия и гидроксида натрия получили набор фракций полисахаридов: HS_W-I – HS_W-V (H_2O, 70°C), HS_A-I – HS_A-V (раствор HCl, 70°C), HS_O-I – HS_O-V (раствор $(NH_4)_2C_2O_4$, 70 °C), HS_K-I – HS_K-V (раствор KOH, 25 °C), и HS_N-I – HS_N-V (раствор NaOH, 25 °C) соответственно (рис. 3).

Моносахаридный анализ фракций HS_W-I – HS_W-V выявил высокое содержание остатков гликуроновых кислот, галактозы (до 37%) и арабинозы (до 5.6%) (табл. 1). Из представленных результатов видно, что при последовательной экстракции содержание остатков уроновых кислот и рамнозы в полученных фракциях увеличивается от 23 до 59% и от 2.1 до 3.8% соответственно, в то время как содержание остатков галактозы снижается от 37 до 17% (табл. 1). Содержание остатков Ara почти не зависит от ступени экстракции и составляет в среднем ~ 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 HS_W *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

* - 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 (табл. 1, 2). Фракции HS_A-I – HS_A-IV были объединены в одну фракцию HS_A, поскольку имели схожий моносахаридный состав.

Таблица 2. Выход и состав фракций HS_A *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
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

* - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Показано, что главными полисахаридами, выделенными из надземной части борщевика Сосновского, являются пектиновые полисахариды, экстрагируемые оксалатом аммония, при этом максимальный выход наблюдается для первой экстракции и составляет ~ 12.5% (табл. 3).

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

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
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 полисахаридных фракций HS_O-I – HS_O-V установлено, что при последовательной экстракции содержание остатков уроновых кислот и рамнозы в полученных фракциях уменьшается от 83 до 51% и от 3.7 до 2.2% соответственно (табл. 3). Вероятно, фракции HS_O-I – HS_O-V характеризуются значительным содержанием пектиновых полисахаридов. Для исследования структуры использовали главную по выходу фракцию HS_O-I.

Выделение полисахаридов HS_W, HS_A и HS_O из борщевика сопровождается также экстракцией белка (табл. 1-3). Показано, что при последовательной экстракции водой, раствором HCl, раствором оксалата аммония содержание белка в полученных фракциях уменьшается от ~ 9 до ~ 2%.

Таким образом, при изучении количественного и качественного моносахаридного состава полисахаридов борщевика Сосновского, экстрагируемых водой, раствором соляной кислоты и раствором оксалата аммония выявлено, что в состав их углеводных цепей входят преимущественно остатки уроновых кислот, галактозы, арабинозы и рамнозы – характерные компоненты пектиновых полисахаридов и арабиногалактана типа II, часто присутствующего в виде AGP (табл. 1-3).

При изучении моносахаридного состава полисахаридных фракций HS_K-I – HS_K-V установлено, что основными компонентами их углеводных цепей являются остатки ксилозы, глюкозы и гликуроновых кислот, что, вероятно, указывает на принадлежность данных фракций к связующим гликанам класса глюкуроноарабиноксиланов (табл. 4).

Таблица 4. Выход и состав фракций HS_K *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_K- I	2.8	17.1	4.5	2.4	0.8	32.2	9.5	1.3	8.4
HS_K-II	1.2	14.1	4.6	2.2	0.8	23.0	12.4	2.1	15.3
HS_K-III	1.6	12.6	4.7	2.1	0.7	21.4	15.0	1.9	14.7
HS_K-IV	0.6	10.9	4.4	2.5	0.9	13.9	16.1	3.7	18.4
HS_K-V	0.4	10.8	5.8	3.1	1.1	13.8	13.9	4.9	19.2

* - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Показано, что при последовательной экстракции содержание остатков ксилозы и гликуроновых кислот в полученных фракциях снижается от 32.2 до 13.8% и от 17.1 до 10.8% соответственно, а содержание остатков глюкозы, напротив, увеличивается от 9.5 до 16.1%. Учитывая высокое содержание остатков Glc и Xyl можно также предположить, что некоторая часть

связующих гликанов представлена ксилоглюканами. Известно, что остов молекулы ксилоглюкана представляет собой β-D-(1→4)-глюкан, к которому присоединены по С-6 атомам остатки ксилозы, в то время как остов молекулы арабиноглюкуроноксилана представляет собой β-D-(1→4)-ксилан, который может быть замещен по С-2 или С-3 атомам остатками арабинозы и глюкуроновой кислоты [203, 204].

Главными компонентами углеводной цепи полисахаридных фракций HS_N-I – HS_N-V являются остатки маннозы и глюкозы, что, вероятно, указывает на принадлежность данных фракций к связующим гликанам класса глюкоманнанов (табл. 5). Показано, что при последовательной экстракции содержание остатков маннозы в полученных фракциях снижается от 21.4 до 3.1% (табл. 5).

Таблица 5. Выход и состав фракций HS_N *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_N-I	3.8	15.4	4.7	1.9	0.2	5.5	10.7	14.4	12.6
HS_N-II	0.3	14.0	6.2	3.2	1.4	11.1	23.4	21.4	18.0
HS_N-III	0.4	12.6	4.3	3.3	1.5	7.1	13.4	7.7	14.7
HS_N-IV	0.1	15.3	6.2	4.3	2.5	8.4	13.2	3.7	15.6
HS_N-V	0.2	16.8	7.2	5.5	3.3	10.0	17.3	3.1	19.7

* - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Моносахаридный анализ фракций HS_K-I – HS_K-V и HS_N-I – HS_N-V указывает на наличие в них нескольких классов полисахаридов, поскольку кроме вышеуказанных остатков они содержат также остатки арабинозы, галактозы и рамнозы типичные для пектиновых полисахаридов, которые (пектины), вероятно, запутались в целлюлозной матрице. Это согласуется с предыдущими исследованиями, показывающими, что фракции, экстрагируемые щелочами, часто содержат значительное количество пектиновых полисахаридов [205].

Таким образом, экстракция зелёной массы борщевика Сосновского различными экстрагентами привела к получению сложной смеси полисахаридов. При этом молекулы одних и тех же полисахаридов были обнаружены нами в различных фракциях, отличающихся между собой по моносахаридному составу и преобладающим типам полисахаридов.

Следует отметить, что при последовательной экстракции водой, раствором оксалата аммония, растворами гидроксида калия и гидроксида натрия наблюдается снижение выхода фракций от I к V (табл. 1, 3-5), тогда как для фракций, экстрагируемых водным раствором HCl, наблюдается обратное явление. Наблюдаемое увеличение выхода полимеров (табл. 2) при экстракции водным раствором HCl, вероятно, можно объяснить постепенным разрушением надмолекулярной комплексной структуры, что позволяет извлечь Ca^{2+}- связанные пектиновые полисахариды.

Таким образом, изучен характер изменения выхода и моносахаридного состава углеводной части макромолекул арабиногалактановых белков, пектиновых полисахаридов и связующих гликанов, выделенных из надземной части борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi* последовательной экстракцией водой, раствором HCl, раствором $(NH_4)_2C_2O_4$, растворами KOH и NaOH. Установленные изменения выхода и состава полисахаридных фракций в процессе экстракции позволяют целенаправленно получать полисахариды с желаемым составом для последующего изучения, либо практического применения.

3.2. Исследование структуры полисахаридов *H. sosnowskyi*

3.2.1. Общие принципы изучения строения пектина и углеводной части арабиногалактановых белков H. sosnowskyi

Строение углеводной цепи пектиновых полисахаридов и арабиногалактановых белков борщевика определяли как классическими, так и современными методами структурной химии углеводов. Спектры ЯМР нативных полисахаридов отличаются высоким уровнем сложности, в связи с чем для установления строения полисахаридов борщевика использовали фрагменты с невысокой молекулярной массой, более простые по строению, полученные с помощью методов ионообменной хроматографии, частичного кислотного и ферментативного гидролизов, распада по Смиту, а также при сочетании различных методов друг с другом.

Для разделения кислых и нейтральных полисахаридов использовали ионообменную хроматографию на диэтиламиноэтилцеллюлозе (ДЭАЭ-целлюлоза). Для фракционирования полисахаридов по молекулярной массе использовали гель-фильтрационную хроматографию. Для определения содержания уроновых кислот, белка и метоксильных групп применяли спектрофотометрические методы. Моносахаридный состав определяли методом газожидкостной хроматографии. Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение определяли методом ВЭЖХ.

Современные методы спектроскопии ЯМР открывают возможность установления первичной структуры полисахаридов, ограничивая применение деструктивных химических методов, что является очень важным при работе с полисахаридами, имеющими сложную структуру и содержащими кислото- и щелочно-лабильные компоненты. Для определения положения межмономерных связей, конфигурации гликозидных остатков, размеров окисных циклов применяли разнообразные одномерные и двумерные методики спектроскопии ЯМР – ^{13}C- и ^{1}H-ЯМР, COSY, HSQC, TOCSY, ROESY, HMBC, HSQC-NOESY, HSQC-TOCSY.

3.2.2. Ионообменная хроматография полисахарида HS_W-I на ДЭАЭ-целлюлозе

Фракционированием методом ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе (OH^--форма) установлено, что фракция HS_W-I состоит главным образом из двух полимеров, элюируемых 0.01 M NaCl (HS_W-I_1) и 0.1 M NaCl (HS_W-I_2). Данные полисахариды характеризуются близкой средневесовой молекулярной массой Mw 8.5 кДа (HS_W-I_1) и Mw 9.5 кДа (HS_W-I_2), высоким содержанием остатков галактозы (44-65%), арабинозы (8.0%) и гликуроновых кислот (17-20%), являющихся характерными компонентами арабиногалактана типа II, присутствующего часто в виде арабиногалактановых белков (табл. 6).

Таблица 6. Выход и состав фракций HS_W, полученных методом ионообменной хроматографии (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_W-I_3	5.8	19.9	15.9	6.4	12.4	0.7	8.0	2.4	12.3
HS_W-I_4	4.7	18.9	8.8	3.3	5.7	0.5	6.5	2.3	14.1

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

Минорные фракции, элюируемые 0.3 M (HS_W-I_3) и 0.4 M NaCl (HS_W-I_4), характеризуются значительно меньшим содержанием остатков галактозы и арабинозы, более высоким содержанием остатков рамнозы, глюкозы и белка в сравнении с фракциями HS_W-I_1 и HS_W-I_2 (табл. 6).

Среднее соотношение Gal:Ara для фракций HS_W-I_1 и HS_W-I_2 составляет 8:1 и 5:1 соответственно. Близкие соотношения Gal:Ara были получены для AGP из меда кунцеи вересковидной (5.3:1) [165], кофе арабика (9:1) [206], а также ядровой древесины ели 4.3:1, сосны 4.5:1 и лиственницы 6.7:1 [207].

Фракции HS_W-I_1, HS_W-I_2, HS_W-V были изучены методом ЯМР спектроскопии.

3.2.3. ЯМР спектроскопия полисахаридов HS_W-I_1 и HS_W-I_2

В спектре $^1H/^{13}C$ HSQC фракции HS_W-I_1 (рис. 4) обнаружены интенсивные сигналы, которые принадлежат остаткам 1,3-, 1,6- и 1,3,6-β-D-Gal*p* (табл. 7).

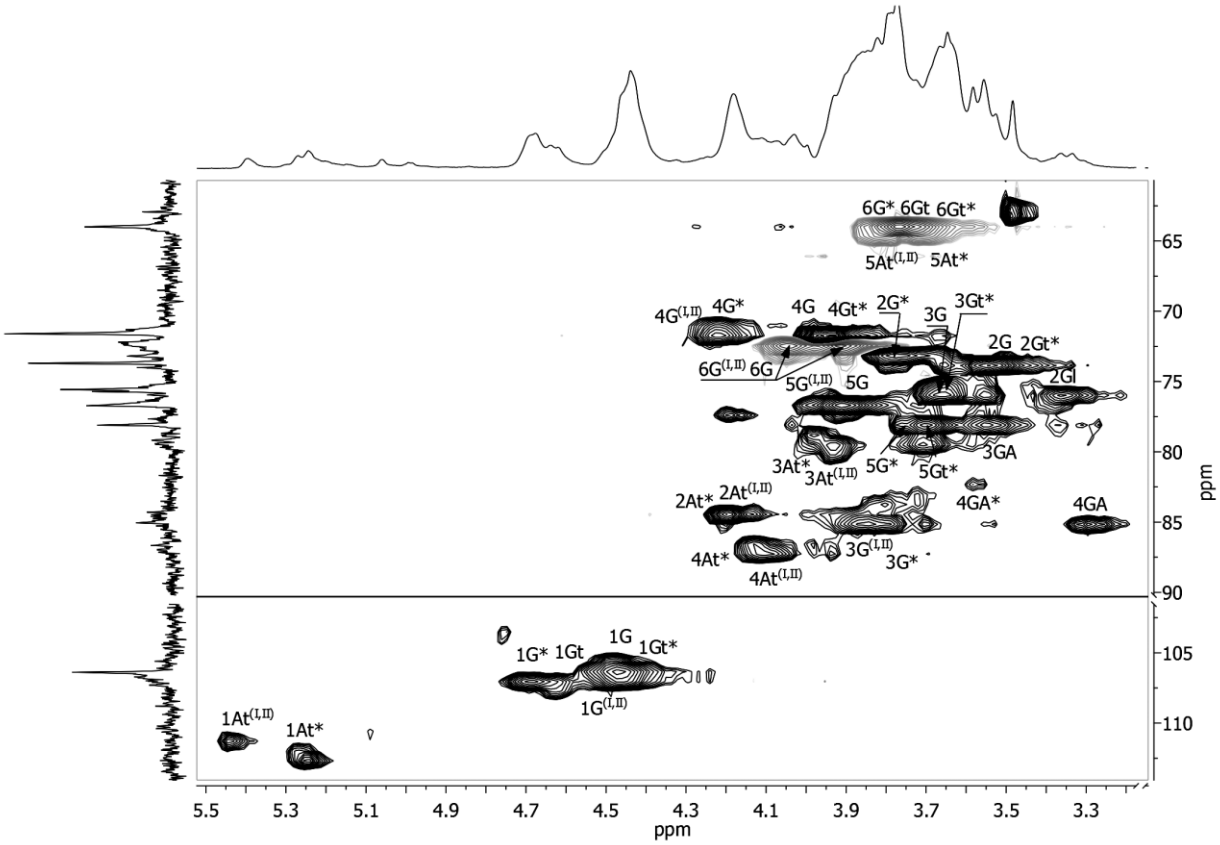

Рисунок 4. Фрагмент спектра $^1H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_W-I_1

В спектре ROESY фракции HS_W-I_1 присутствуют корреляционные кросс-пики: H1/H3 4.68/3.83 м.д. и H1/H5 4.68/3.76 м.д., остатков 1,3-связанной β-D-Gal*p*, подтверждающих присутствие фрагментов: ...→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→... [124, 184, 206].

Детальный анализ спектра HMBC (рис. 5) данной фракции позволил выявить корреляционные кросс-пики: C6/H1 72.4/4.47 м.д., C1/H6;H6' 106.3/4.04;3.92 м.д., C4/H3 71.7/3.68 м.д., C4/H5 71.7/3.91 м.д., C5/H6 76.7/3.92 м.д., C3/H2 75.6/3.57 м.д., C1/H2 106.3/3.57 м.д., C2/H5 73.9/3.91 м.д. остатков 1,6-β-D-Gal*p*, подтверждающих присутствие фрагментов: ...→6)-β-Gal*p*-(1→6)-β-Gal*p*-(1→... [154, 172, 206, 208, 209].

Таблица 7. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_W-I_1

Остатки	N	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'*
→4)-α-Gal*p*A-(1→		н.о. *5.00*	н.о. *3.82*	н.о. *3.97*	н.о.	н.о.	н.о.
α-Rha*p*-(1→		103.7 4.76	н.о. *3.93*	н.о. *3.76*	74.7 *3.39*	71.7 *4.01*	19.3 *1.30*
β-Gal*p*-(1→3	Gt	107.2 *4.61*	73.7 *3.61*	75.4 *3.67*	71.7 *3.93*	78.1 *3.69*	64.0 *3.75*
β-Gal*p*-(1→6	Gt*	106.5 *4.45*	73.7 *3.52*	75.7 *3.66*	71.5 *3.92*	78.1 *3.70*	64.0 *3.76*
→3)-β-Gal*p*-(1→	G*	107.2 *4.68*	73.2 *3.77*	85.0 *3.83*	71.3 *4.18*	78.0 *3.76*	64.0 *3.77*
→6)-β-Gal*p*-(1→	G	106.3 *4.47*	73.9 *3.57*	75.6 *3.68*	71.7 *3.95*	76.7 *3.91*	72.4 *4.04;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(I)}$	106.5 *4.49*	73.2 *3.68*	85.0 *3.85*	71.3 *4.20*	76.7 *3.91*	72.4 *4.04;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(II)}$	106.5 *4.55*	73.2 *3.70*	83.8 *3.78*	71.3 *4.22*	76.7 *3.91*	72.4 *4.04;3.92*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A-(1→	GA	105.9 *4.48*	76.0 *3.35*	78.1 *3.54*	85.2 *3.28*	78.2 *3.74*	н.о.
→4)-β-Glc*p*A-(1→	GA*	105.9 *4.48*	76.0 *3.35*	78.1 *3.56*	82.4 *3.58*	78.2 *3.76*	н.о.
→6)-β-Glc*p*-(1→	Gl	105.9 *4.48*	76.0 *3.35*	73.7 *3.55*	73.9 *3.65*	75.5 *3.54*	66.1 *3.98;3.71*
→5)-α-Ara*f*-(1→		110.7 *5.09*	84.2 *4.13*	н.о.	н.о. *4.20*	69.4 *3.87;3.81*	
α-Ara*f*-(1→	$At^{(I)}$	111.4 *5.41*	84.5 *4.19*	79.6 *3.93*	86.8 *4.13*	64.0 *3.81;3.73*	
α-Ara*f*-(1→	$At^{(II)}$	111.4 *5.45*	84.5 *4.20*	79.6 *3.94*	86.8 *4.13*	64.0 *3.81;3.72*	
α-Ara*f*-(1→3	At*	112.6 *5.25*	84.5 *4.20*	78.9 *3.98*	86.7 *4.11*	64.0 *3.81;3.71*	

н.о.– не определены.
N – обозначения моносахаридных остатков.

Корреляционный пик C6/H1 в спектре HMBC (рис. 5) при 72.4/4.47 м.д. также может свидетельствовать о замещении 3,6-ди-*O*-замещенных остатков β-D-Gal*p* по атому *O*-6 остатками 1,6-связанной β-D-Gal*p*.

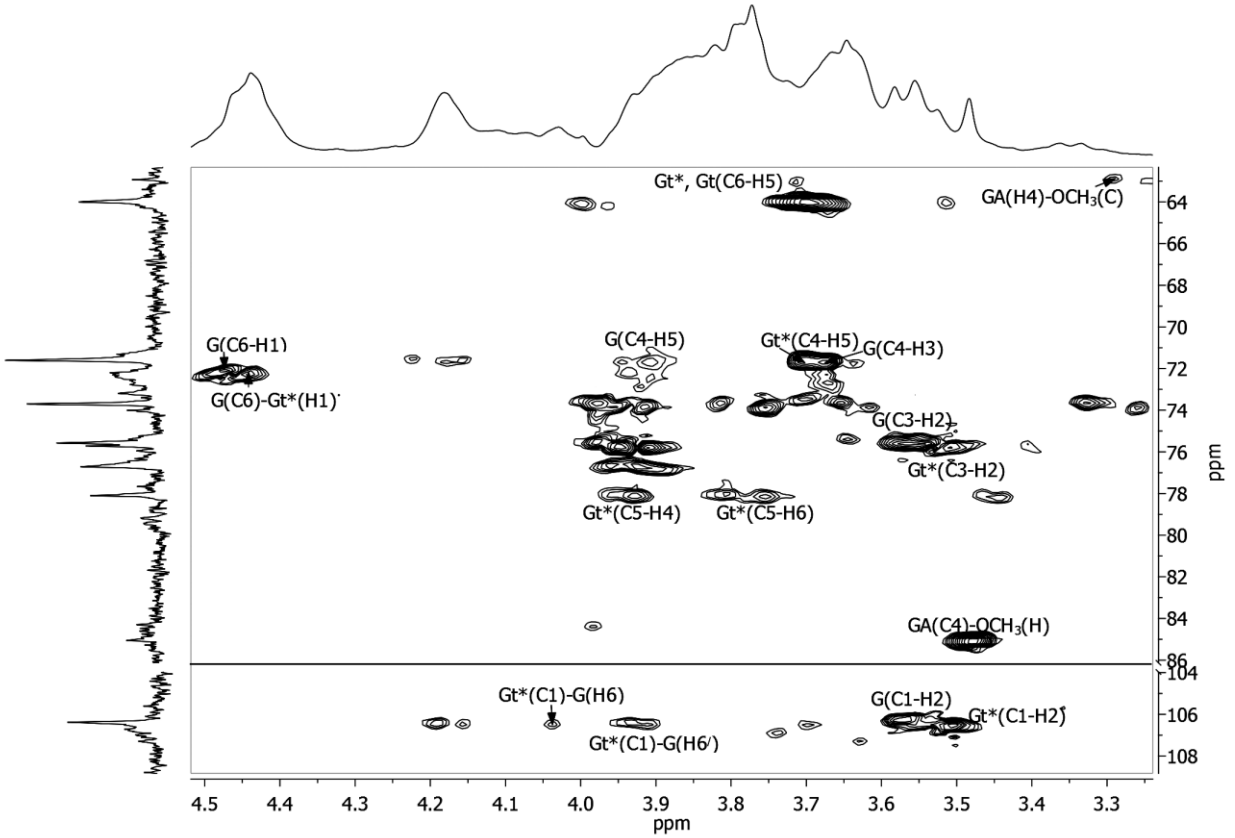

Рисунок 5. Фрагмент спектра $^{1}H/^{13}C$ HMBC фракции HS_W-I_1

Спектр ROESY фракции HS_W-I_1 подтверждает наличие вышеприведенных остатков 1,6-связанной β-D-галактопиранозы, в нем наблюдаются корреляционные кросс-пики: H1 с H3, H5, H6 при 4.47/3.68, 4.47/3.91, 4.47/4.04 м.д., свидетельствующие о присутствии фрагмента: …→6)-β-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→....

Известно, что участки β-1,6-галактана в боковой цепи углеводной части AGP могут быть разной длины и представлены: короткими цепями, состоящими из одного или двух остатков [166, 167, 175], а также длинными цепями, достигающими более чем 20 остатков [173, 210].

В спектре HMBC (рис. 5) фракции HS_W-I_1 идентифицируются корреляционные кросс-пики: C1/H2 106.5/3.52 м.д., C1/H5 106.5/3.70 м.д., C3/H2 75.7/3.52 м.д., C4/H5 71.5/3.70 м.д., C6/H5 64.0/3.70 м.д., C5/H6 78.1/3.76 м.д., C5/H4 78.1/3.92 м.д. остатков T-β-D-Gal*p* (табл. 7). Более того, в данном спектре имеются корреляционные кросс-пики C1/H6;H6' 106.5/4.04;3.92 м.д., C6/H1 72.4/4.45 м.д., свидетельствующие о замещении

остатков 1,6-связанной β-D-галактопиранозы по атому *O*-6 остатками T-β-D-Gal*p*, что указывает на присутствие фрагментов углеводной цепи: β-Gal*p*→6)-β-Gal*p*-(1→….

В гомоядерном спектре COSY данной фракции присутствуют интенсивные корреляционные пики H1/H2, H2/H3, H3/H4 остатков T-β-D-Gal*p*, 1,3- и 1,6-связанной β-D-Gal*p*, а также 4-*O*-Me-β-Glc*p*A (табл. 7). Также в указанном спектре присутствуют интенсивные корреляционные кросс-пики H1/H2 4.49/3.68 м.д. и H1/H2 4.55/3.70 м.д. остатков 1,3,6-β-D-галактопиранозы, которые либо гликозилируют разные моносахаридные остатки, либо гликозилируют одинаковые моносахаридные остатки, но в разные положения (например, по *O*-3 или *O*-6 положению β-D-Gal*p*) (табл. 7).

В аномерной области спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC фракции HS_W-I_1 (рис. 4) имеются сигналы высокой интенсивности остатков T-α-L-Ara*f* при 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., относящиеся к 1,5-связанным остаткам α-L-Ara*f* [124, 154, 155, 211, 212]. Гетероядерный спектр HMBC также свидетельствует о присутствии вышеприведенных остатков α-L-Ara*f*, в нем присутствуют корреляционные кросс-пики: C4/H1 86.8/5.45 м.д. и C4/H1 86.7/5.25 м.д. остатков T-α-L-Ara*f*, C1/H5;5' 110.7/3.87;3.81 м.д. остатков 1,5-α-L-Ara*f*. Более того, в спектре ROESY наблюдаются корреляционные кросс-пики H1/H5;5' 5.09/3.87;3.81 м.д. остатков 1,5-связанной α-L-арабинофуранозы, подтверждающих присутствие фрагментов: …→5)-α-Ara*f*-(1→….

Согласно литературным данным сигнал при 5.25/4.20 м.д. указывает на то, что остатки T-α-L-Ara*f* гликозилируют остатки 1,6-связанной β-D-Gal*p* по 3-му положению [166, 173, 174, 176, 210].

Все вышесказанное позволяет предположить присутствие во фракции HS_W-I_1 фрагментов: …→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или

α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→…,

в соответствии с предыдущими исследованиями AGP [166, 174, 184].

Вероятно, сигнал H1/H2-атомов при 4.49/3.68 м.д. принадлежит 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p* главной углеводной цепи AG-II, замещенных по атому *O*-3 остатками 1,3- или 1,3,6-β-D-галактопиранозы, в то время как сигнал H1/H2-атомов при 4.55/3.70 м.д. относится к 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p* боковой углеводной цепи AG-II, замещенных по атому *O*-3 остатками T- и/или 1,5-связанной α-L-Ara*f*. Аналогичный вывод был ранее сделан в работе Matulová с соавторами [209].

Наиболее интенсивными сигналами спектра ^{1}H-ЯМР фракции HS_W-I_1 являются H1 сигналы остатков T-β-D-Gal*p* (4.45 м.д.), 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p* (4.49-4.55 м.д.) и 1,6-связанной β-D-Gal*p* (4.47 м.д.), что указывает на высокую степень разветвленности боковых углеводных цепей, представленных главным образом данными остатками.

Сигналы высокой интенсивности атомов C/H CH_3O-групп в ^{1}H/^{13}C HSQC спектре (рис. 4) фракции HS_W-I_1 при 62.8/3.48 м.д. и C4/H4 при 85.2/3.28 м.д. указывают на наличие 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A. В спектре HMBC наблюдается интенсивный корреляционный пик при 85.2/3.48 м.д. и пик низкой интенсивности при 62.8/3.28 м.д., подтверждающие, что остатки β-D-Glc*p*A имеют CH_3O-группу по 4-му положению [144, 184].

По литературным данным остатки 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A могут находиться на невосстанавливающих концах боковых цепей β-(1→6)-галактана: 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→… [173, 174].

AGP, обнаруженные в корнях эхинацеи бледной (*Echinacea pallida*) [213], в корнеплодах редьки (*Raphanus sativus*) [214], в кукурузе сахарной (*Zea mays*) [215], в дерезе обыкновенной (*Lycium barbarum*) [184] и аравийской камеди [5, 216], также содержали остатки β-D-GlcA и 4-*O*-Me-β-D-GlcA.

Более того, в ^{1}H/^{13}C HSQC спектре фракции HS_W-I_1 (рис. 4) присутствует корреляционный кросс-пик C4/H4 82.4/3.58 м.д.,

подтверждающий наличие остатков: …→4)-β-D-Glc*p*A-(1→….

Остатки 1,4-связанной β-D-Glc*p*A были ранее обнаружены в AGP, выделенных из дерезы обыкновенной *L. barbarum* [184].

В спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC фракции HS_W-I_1 в сильном поле идентифицируются слабые сигналы C6/H6 атомов при 19.3/1.30 м.д., обусловленные метильной группой остатков α-рамнопиранозы. В аномерной области спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC наблюдаются сигналы остатков T-α-L-Rha*p* при 103.7/4.76 м.д. По литературным данным остатки T-α-L-рамнопиранозы могут находиться на невосстанавливающих концах боковых цепей и связаны с остатком Glc*p*A посредством 1,4-связи: α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→… [166, 169, 188].

Совместный детальный анализ одномерных и двумерных спектров фракции HS_W-I_1 свидетельствует о наличии в боковой углеводной цепи остатков 1,6-связанной β-D-Glc*p*. При анализе гетероядерного спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC (рис. 4) установлено присутствие корреляционных кросс-пиков C6/H6;H6' 66.1/3.98;3.71 м.д., а в спектре HMBC (рис. 5) – корреляционных кросс-пиков C3/H4 73.7/3.65 м.д., C3/H6 73.7/3.98 м.д., C5/H6 при 75.5/3.98 м.д., характерных для остатков: …→6)-β-D-Glc*p*-(1→….

По литературным данным остатки 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A могут находиться на невосстанавливающих концах боковых цепей β-(1→6)-глюкана: 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Glc*p*-(1→… [108].

Также в спектрах ЯМР фракции HS_W-I_1 присутствуют сигналы слабой интенсивности 1,4-связанных остатков α-D-Gal*p*A [217, 218].

Остатки глюкуроновой и галактуроновой кислоты согласно соотношению интегральных интенсивностей присутствуют в приблизительном соотношении 14:1. Таким образом, уроновые кислоты во фракции HS_W-I_1 представлены главным образом остатками 4-*O*-Me-β-D-глюкуроновой кислоты и 1,4-β-D-глюкуроновой кислоты.

Кроме того, в спектре COSY в сильной области идентифицируются корреляционные кросс-пики H6/H3 1.32/4.08 м.д., H6/H2 1.32/4.12 м.д.,

H6/H2 1.24/4.04 м.д., свидетельствующие о присутствии 1,2-связанных остатков α-L-Rha*p* и 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p*. Наличие вышеприведенных остатков α-L-Rha*p* и 1,4-связанной α-D-Gal*p*A указывает на присутствие пектиновых полисахаридов.

При подробном анализе ЯМР спектров фракции HS_W-I_2 можно сделать заключение, что данная фракция характеризуется аналогичными по строению элементами структуры в сравнении с фракцией HS_W-I_1. Различия между фракциями имели место в основном в соотношении остатков β-D-Glc*p*A и α-D-Gal*p*A. Согласно соотношению интегральных интенсивностей остатки глюкуроновой и галактуроновой кислоты во фракции HS_W-I_2 присутствуют в приблизительном соотношении 17:1. Таким образом, во фракции HS_W-I_2, элюируемой 0.1 M NaCl, преобладает β-D-Glc*p*A, и содержатся лишь следы α-D-Gal*p*A.

Согласно моносахаридному составу и соотношению интегральных интенсивностей H1 остатков α-Ara*f*, фракция HS_W-I_1 содержит значительно больше остатков терминальной α-Ara*f* (5.25 м.д.), чем фракция HS_W-I_2. Вероятно, фракция HS_W-I_2 содержит на невосстанавливающих концах боковых цепей больше остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, и меньше остатков терминальной α-Ara*f* (5.25 м.д.), в сравнении с фракции HS_W-I_1.

Кроме того, в одномерных и двумерных спектрах ЯМР фракции HS_W-I_1 присутствуют сигналы в области 3.0-0.8 м.д., вероятно, принадлежащие белковой части молекулы AGP. Известно, что область 3.5-1.5 м.д. содержит сигналы метиленовых протонов алифатических аминокислотных остатков. В области 1.4-0 м.д. и более высоких полях наблюдаются сигналы метальных протонов таких аминокислотных остатков, как аланин, валин, лейцин и изолейцин. Основное количество метальных резонансов приходится на область 1-0.9 м.д. [206, 209, 219].

3.2.4. ЯМР спектроскопия фракции HS_W-V

При подробном анализе ЯМР спектров фракции HS_W-V можно сделать заключение, что данная фракция характеризуется аналогичными по строению элементами структуры в сравнении с фракциями HS_W-I_1 и HS_W-I_2. Различия между фракциями имели место в основном в соотношении остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-связанной α-D-Gal*p*A. В спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC фракции HS_W-V наблюдается сигнал высокой интенсивности C/H-атомов CH_3O-групп – 55.8/3.81 м.д., указывающий на присутствие метилэтерифицированных остатков D-Gal*p*A. Интенсивность сигналов H-1 атомов в спектре ^{1}H-ЯМР остатков 1,4-α-D-Gal*p*A (5.04 м.д.) и 1,4-α-D-Gal*p*A(OMe) (4.95 м.д.), по сравнению с сигналом H-1 остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A (4.48 м.д.), значительно выше, что указывает на преобладание пектиновых полисахаридов в данной фракции.

Фракция HS_W–IV близка по моносахаридному составу к фракции HS_W–V. Таким образом, можно заключить, что эти две последние кислые фракции содержат преимущественно 1,4-связанные остатки α-D-Gal*p*A, характерные для пектиновых полисахаридов.

Предполагается, что арабиногалактановые белки взаимодействуют с другими компонентами клеточной стенки, например, с пектинами, поэтому их эффективное выделение представляет серьезную проблему [1, 4, 156, 183].

Поскольку во фракциях HS_W-I – HS_W-V также присутствуют компоненты пектиновых полисахаридов, то можно предположить, что выделенные арабиногалактановые белки могут быть связаны с пектином.

Из представленных результатов можно сделать вывод, что фракции HS_W-I – HS_W-V представляют собой смесь арабиногалактановых белков и пектиновых полисахаридов и различаются между собой большим или меньшим содержанием остатков 4-*O*-Me-β-D-глюкуроновой кислоты, 1,4-β-D-глюкуроновой кислоты и 1,4-α-D-галактуроновой кислоты.

Установлено, что при последовательной экстракции борщевика водой содержание уроновых кислот увеличивается от 23 до 59%, а содержание AG-II уменьшается, что свидетельствует об уменьшении содержания AGP и увеличении содержания пектиновых полисахаридов.

3.2.5. Выделение полисахарида HS_W-S

Из объединённого водно-спиртового супернатанта, полученного при осаждении фракций HS_W-I, HS_W-II, HS_W-III, HS_W-IV, HS_W-V 4-х кратным объемом этанола, в качестве минорного компонента выделена полисахаридная фракция, при фракционировании которой методом гель-фильтрационной хроматографии получен полисахарид HS_W-S (Mw 11.5 кДа, Mw/Mn 1.4) (рис. 6), соответствующий главному пику на хроматограмме.

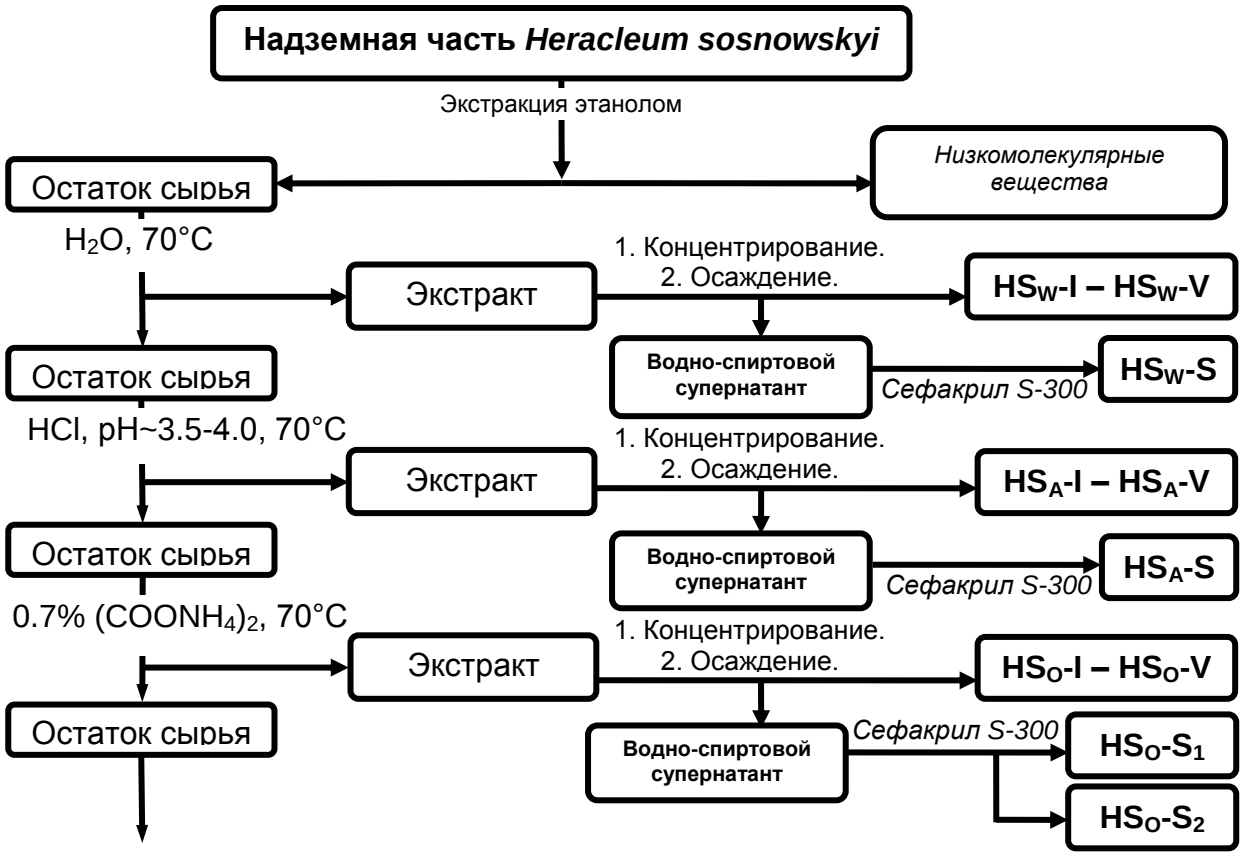

Рисунок 6. Выделение полисахаридов HS_W-S, HS_A-S, HS_O-S_1 и HS_O-S_2 из водно-спиртовых супернатантов.

Углеводная цепь данного полисахарида представлена преимущественно остатками глюкозы (19.7 %) и маннозы (16.8 %), характерными для связующих гликанов класса глюканов и глюкоманнанов. Также полисахарид HS_W-S содержит в минорных количествах остатки уроновых кислот (8.5%), Rha (0.6%), Ara (5.2%), Gal (3.7%) и Xyl (0.8%), а также белок (4.2%). Полисахарид HS_W-S был изучен методом ЯМР спектроскопии.

3.2.6. ЯМР спектроскопия полисахарида HS_W-S

В гомоядерном спектре COSY полисахарида HS_W-S присутствуют интенсивные корреляционные пики H1/H2, H2/H3, H3/H4, H4/H5, H5/H6, H6;6' остатков T-β-D-Glc*p*, 1,4-связанной β-D-Glc*p* и 1,4-связанной β-D-Man*p* (табл. 8). Спектр $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_W-S (рис. 7) подтверждает присутствие вышеуказанных остатков.

Таблица 8. ^{13}C и ^{1}H NMR данные полисахарида HS_W-S

Остатки	N	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'*
β-Man*p*-(1→	Mt	102.6 *4.67*	72.8 *3.99*	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
→4)-β-Man*p*-(1→	M	102.8 *4.76*	72.9 *4.11*	74.4 *3.78*	79.2 *3.79*	77.9 *3.57*	63.1 *4.00;3.83*
β-Glc*p*-(1→	Gt	105.3 *4.51*	75.6 *3.31*	77.5 *3.52*	72.4 *3.41*	77.8 *3.52*	63.1 *3.91;3.73*
→4)-β-Glc*p*-(1→	G	105.3 *4.54*	75.6 *3.38*	76.8 *3.68*	81.4 *3.69*	77.0 *3.65*	63.1 *3.97;3.89*
→4)-β-Glc*p*-(1→	G*	105.3 *4.52*	75.6 *3.36*	76.8 *3.67*	81.4 *3.69*	77.0 *3.65*	63.1 *3.97;3.89*
α-Ara*f*-(1→	At	109.9 *5.16*	83.6 *4.15*	79.3 *3.97*	86.7 *4.06*	63.1 *3.85;3.76*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	A	110.4 *5.10*	83.6 *4.14*	79.3 *3.97*	84.5 *4.19*	69.4 *3.87;3.81*	

н.о.– не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

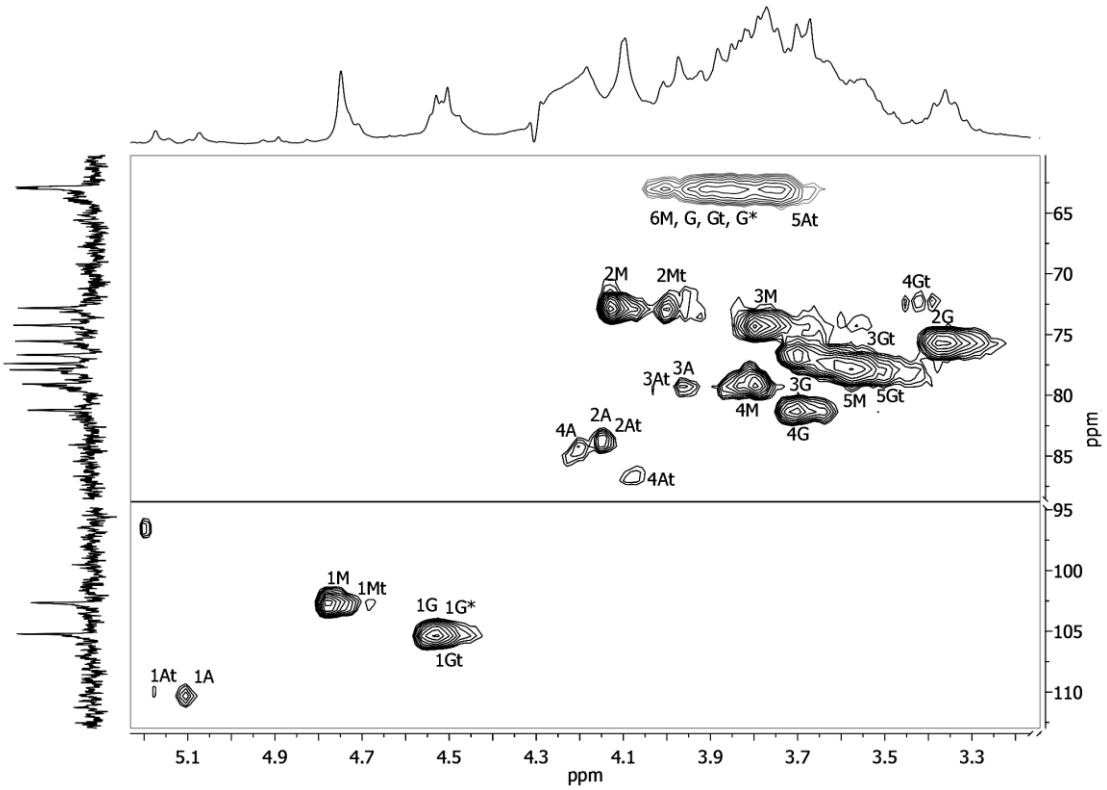

Рисунок 7. Фрагмент спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_W-S (обозначения см. в Таблице 8)

Детальный анализ спектра ROESY полисахарида HS_W-S свидетельствует о присутствии *интра*-гликозильных кросс-пиков: H1 с H2, H3, H5 при 4.76/4.11, 4.76/3.79, 4.76/3.57 м.д. соответственно, а также *транс*-гликозильных кросс-пиков H1/H4 при 4.76/3.79 м.д., что подтверждает наличие участков, состоящих из остатков 1,4-β-D-Man*p*: …→4)-β-Man*p*-(1→4)-β-Man*p*-(1→…. В спектре также присутствуют *интра*-гликозильные кросс-пики: H1 с H3, H6 4.54/3.68 и 4.54/3.97 м.д., относящиеся к остаткам 1,4-связанной β-D-Glc*p*, что свидетельствует о присутствии фрагмента: …→4)-β-Glc*p*-(1→4)-β-Glc*p*-(1→... [208, 220, 221].

Кроме того, в спектре ROESY полисахарида HS_W-S присутствуют *транс*-гликозильные корреляционные кросс-пики: H1/H4 остатков 1,4-связанной β-D-Man*p* и 1,4-связанной β-D-Glc*p* при 4.76/3.69 м.д., H1 остатков 1,4-связанной β-D-Man*p* с H6 остатков 1,4-связанной β-D-Glc*p* при 4.76/3.89 м.д., указывающих на присутствие фрагментов: …→4)-β-Man*p*-(1→4)-β-Glc*p*-(1→...; H1 остатков 1,4-связанной β-D-Glc*p* с

H4 остатков 1,4-связанной β-D-Man*p* при 4.54/3.79 м.д., H1 остатков 1,4-β-D-Glc*p* с H6 остатков 1,4- β-D-Man*p* при 4.54/3.83 м.д., указывающих на присутствие фрагментов: …→4)-β-Glc*p*-(1→4)-β-Man*p*-(1→....

Таким образом, с помощью спектроскопии ЯМР установлено, что главная цепь полисахарида HS_W-S состоит главным образом из остатков 1,4-β-D-маннопиранозы и 1,4-β-D-глюкопиранозы. Соотношение интегральных интенсивностей сигналов атомов H1 остатков 1,4-β-D-маннопиранозы (4.76 м.д.) и H1 остатков 1,4-β-D-глюкопиранозы (4.54 м.д.) спектра ^{1}H-ЯМР составляет ~ 1/0.35, таким образом, доля остатков 1,4-β-D-глюкопиранозы составляет ~ 35 %, что характерно для полисахаридов класса глюкоманнанов. Известно, что доля остатков 1,4-β-D-глюкопиранозы в глюкоманнанах составляет 25-35 % [1].

В спектре COSY корреляционный пик H1/H2 при 4.52/3.36 м.д. остатков 1,4-связанной β-D-Glc*p*, вероятно, указывает на присутствие связующих гликанов класса глюканов.

Моносахаридный состав и результаты ЯМР спектроскопии полисахарида HS_W-S указывают на наличие в нем нескольких классов полисахаридов. Согласно полученным результатам, данный полисахарид содержит, кроме остатков маннозы и глюкозы, также белок, остатки GlcA, арабинозы и галактозы.

В спектрах COSY и ^{1}H/^{13}C HSQC присутствуют сигналы, принадлежащие остаткам T-α-L-Ara*f*, 1,5-связанной α-L-Ara*f* и T-β-D-Gal*p*.

Можно заключить, что полисахарид HS_W-S содержит связующие гликаны классов глюкоманнанов и глюканов и, возможно, небольшую часть пектиновых полисахаридов.

Таким образом, пять полисахаридных фракций, содержащих арабиногалактановые белки и пектиновые полисахариды, были выделены из надземной части *Heracleum sosnowskyi* экстракцией водой. С помощью методов ионообменной хроматографии, гель-хроматографии и спектроскопии ЯМР установлены главные элементы их строения.

Кор углеводной цепи главных по выходу полисахаридов состоит главным образом из 1,3-связанных остатков β-D-галактопиранозы, боковые цепи образованы остатками 1,6-β-D-галактопиранозы, 1,5-α-L-арабинофуранозы, 1,4-β-D-глюкуроновой кислоты, 1,6-β-D-глюкопиранозы. Остатки 1,3,6-β-D-галактопиранозы являются точками ветвления боковых и главной углеводных цепей. Остатки Т-α-L-Ara*f*, Т-D-Gal*p* и Т-α-L-Rha*p* присутствуют на невосстанавливающих концах боковых цепей. Значительная часть β-1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A с помощью β-(1→6)-связи. Незначительная часть глюкуроновой кислоты входит в состав фрагмента: α-Rha*p*-(1→4)-β-Glc*p*A-(→…. Все изученные фракции содержат в дополнение к остаткам 4-*O*-Me-β-D-глюкуроновой кислоты остатки 1,4-α-D-галактуроновой кислоты.

3.2.7. Выделение полисахарида HS_A-S

Показано, что при извлечении пектиновых веществ может происходить выделение компонентов, образовавшихся на разных стадиях метаболизма макромолекул пектина, строение которых может совпадать со структурой боковых цепей разветвленной области пектинов [109, 137]. Выделение таких полисахаридов с небольшим молекулярным весом и более простым строением, с последующим установлением их структуры, способно дать дополнительные данные о строении макромолекулы исходного пектина.

Из объединённых водно-спиртовых супернатантов, полученных при осаждении фракций HS_A-I – HS_A-V 4-х кратным объемом этилового спирта, получена полисахаридная фракция, при последующем фракционировании которой методом гель-фильтрационной хроматографии получен полисахарид HS_A-S (рис. 6) с невысокой средневесовой молекулярной массой Mw 13.9 кДа и низкой степенью полидисперсности Mw/Mn 1.8, соответствующий основному пику на хроматограмме. Моносахаридный состав полисахарида HS_A-S указывает на наличие в нем нескольких классов полисахаридов.

Главными компонентами углеводной цепи являются остатки арабинозы и уроновых кислот, а также остатки маннозы и глюкозы, что предполагает присутствие пектиновых полисахаридов и связующих гликанов класса глюкоманнанов (табл. 9).

Таблица 9. Выход и состав фракций HS_A *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
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-целлюллозой;
** - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

3.2.8. Ионообменная хроматография полисахарида HS_A на ДЭАЭ-целлюлозе

Фракционированием методом ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе показано, что фракция HS_A (получена объединением фракций HS_A-I – HS_A-IV) состоит преимущественно из полисахаридов HS_A-2 и HS_A-3, элюируемых 0.1 и 0.2 M NaCl соответственно, характеризующихся высоким содержанием остатков Gal (8-20%), Ara (4-7%) и гликуроновых кислот (42-67%) (табл. 9).

ЯМР-спектры зарегистрировать не удалось, поскольку полисахариды HS_A-2 и HS_A-3 при растворении образуют гели.

Из полученных результатов можно предположить, что фракция HS_A имеет аналогичные по строению элементы структуры, в сравнении с фракциями HS_W-IV и HS_W-V, экстрагируемыми водой, и представляет собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних.

Из представленных результатов видно, что во фракциях HS_A-1, HS_A-2 и HS_A-3 увеличивается содержание уроновых кислот от 7.5 до 67% с одновременным снижением содержания остатков Gal с 41.7 до 7.8%, что,

вероятно, можно объяснить уменьшением доли AGP и увеличением доли пектиновых полисахаридов.

3.2.9. Выделение полисахаридов HS_O-S_1 и HS_O-S_2

Из объединённых водно-спиртовых супернатантов, полученных при осаждении фракций HS_O-I – HS_O-V 4-х кратным объемом этанола (рис. 6), получена полисахаридная фракция, при последующем фракционировании которой методом гель-фильтрационной хроматографии получены полисахариды HS_O-S_1 (Mw 14.4 кДа, Mw/Mn 1.9) и HS_O-S_2 (Mw 11.7 кДа, Mw/Mn 1.7). Моносахаридный анализ полисахаридов HS_O-S_1 и HS_O-S_2 выявил высокое содержание остатков арабинозы и уроновых кислот, а также остатков маннозы и глюкозы, аналогично полисахариду HS_A-S (табл. 10).

Таблица 10. Выход и состав полисахаридов HS_O-S_1 и HS_O-S_2 (вес. %)

Фракции	Выход*, %	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

* - от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Вероятно, полисахариды HS_O-S_1 и HS_O-S_2 присутствуют в зелёной массе борщевика как свободные полисахариды, образовавшиеся в процессе постсинтетической модификации или биосинтеза макромолекулы пектина. Исследование их структурных особенностей методом ЯМР спектроскопии может существенно дополнить сведения о строении боковых цепей полисахарида HS_O-I.

3.2.10. ЯМР исследования полисахаридов HS_A-S и HS_O-S_2

Подробный анализ ^{13}C- и ^{1}H-ЯМР, TOCSY, COSY, HMBC, ROESY и HSQC (рис. 8) спектров полисахарида HS_O-S_2, позволил установить сигналы высокой интенсивности остатков 1,4-α-D-Gal*p*A, 1,4-α-D-Gal*p*A(OMe)

(СМ 21%), 1,4-α-D-Gal*p*A(OAc) (СА 34%), остатков …→4)-β-D-Gal*p*A, располагающихся на восстанавливающих концах кора полисахарида, а также остатков 1,2-связанной и 2,4-ди-*O*-замещенной α-L-рамнопиранозы (табл. 11) [92, 124, 144, 217, 222].

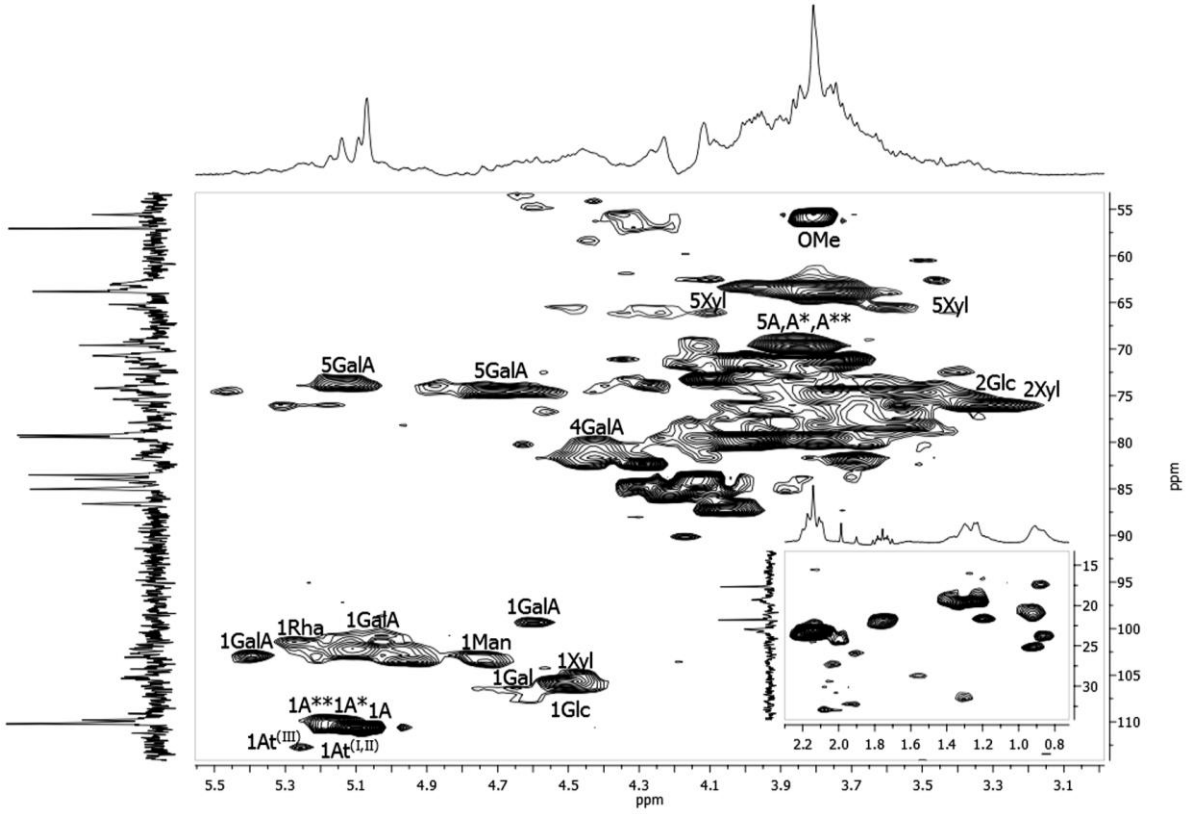

Рисунок 8. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC полисахарида HS_O-S_2

Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2-α-L-Rha*p* и 1,2,4-α-L-Rha*p* ^{1}H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 1:1, из этого следует, что в полисахариде HS_O-S_2 около половины из всех остатков рамнозы являются точками разветвления главной углеводной цепи RG-I.

В спектре ROESY наблюдаются корреляционные кросс-пики: атомов H1 остатков α-L-рамнопиранозы и 1,4-α-D-галактуроновой кислоты при 5.26/5.00 м.д.; атомов H1 остатков α-L-рамнопиранозы с атомами H4 1,4-α-D-галактуроновой кислоты при 5.26/4.42 м.д., атомов H1 остатков α-L-рамнопиранозы с атомами H3 1,4-α-D-галактуроновой кислоты при 5.26/4.12 м.д., которые свидетельствуют о присутствии участков: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→…; атомов H2 остатков

α-L-рамнопиранозы с атомами H1 1,4-α-D-галактуроновой кислоты при 5.00/4.12 м.д., которые свидетельствуют о присутствии участков: ...→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→....

Таблица 11. ^{13}C и ^{1}H NMR данные полисахарида HS_O-S_2

Остатки	N	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'*
→4)-α-Gal*p*A-(1→		100.7 *5.00*	71.5 *3.92*	72.8 *4.12*	81.6 *4.42*	74.4 *4.72*	176.6
→4)-α-Gal*p*A-(1→		102.0 *5.10*	71.0 *3.74*	71.5 *4.02*	81.6 *4.46*	74.4 *4.72*	176.6
→4)-α-Gal*p*A-6-OMe-(1→		102.3 *4.95*	71.0 *3.72*	71.5 *4.00*	81.6 *4.45*	73.7 *5.14*	173.5
→4)-β-Gal*p*A		99.2 4.60	74.5 *3.51*	74.7 *3.77*	81.1 *4.38*	н.о.	176.6
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.5 *5.26*	79.5 *4.12*	72.1 *3.90*	н.о. *3.40*	н.о. *3.76*	19.5 *1.24*
α-Ara*f*-(1→	$At^{(I)}$	110.3 *5.15*	84.1 *4.15*	79.5 *3.98*	87.3 *4.05*	64.1 *3.83;3.73*	
α-Ara*f*-(1→	$A^{(II)}$	110.3 *5.17*	84.1 *4.15*	79.5 *3.98*	87.3 *4.07*	64.1 *3.83;3.73*	
α-Ara*f*-(1→	$A^{(III)}$	112.4 *5.25*	84.3 *4.19*	79.5 *3.98*	87.3 *4.11*	64.1 *3.82;3.72*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	A	110.3 *5.09*	84.1 *4.13*	79.5 *4.01*	85.2 *4.21*	69.7 *3.87;3.81*	
→2,5)-α-Ara*f*-(1→	A**	110.3 *5.19*	90.2 *4.17*	78.1 *4.17*	н.о. *4.28*	69.7 *3.93;3.83*	
→3,5)-α-Ara*f*-(1→	A*	110.3 *5.12*	82.3 *4.29*	85.1 *4.09*	84.5 *4.30*	69.7 *3.93;3.83*	
→4)-β-Xyl*p*-(1→		105.4 *4.51*	75.8 *3.30*	76.6 *3.56*	79.5 *3.78*	65.7 *4.10;3.40*	
→4)-β-Glc*p*-(1→		105.7 *4.52*	75.8 *3.36*	76.9 *3.70*	81.6 *3.69*	77.0 3.65	63.2 *3.97;3.89*
→4)-β-Man*p*-(1→		103.2 *4.74*	72.9 *4.12*	74.6 *3.76*	79.5 *3.78*	77.9 *3.57*	63.2 *4.00;3.83*

н.о. – не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

При анализе двумерных спектров ЯМР полисахарида HS_O-S_2 обнаружены высокоинтенсивные сигналы остатков Т-α-L-Ara*f*, 1,5-, 1,2,5- и 1,3,5-α-L-Ara*f*, а также сигналы невысокой интенсивности 2,3,5-три-*O*-замещенных остатков α-L-Ara*f*, свидетельствующих о наличии высокоразветвленного 1,5-α-L-арабинана (табл. 11) [155, 184, 223, 224]. Можно предположить, что данный арабинан с высокой степенью ветвления представляет собой боковую цепь RG-I, хотя достаточных доказательств, подтверждающих ковалентную связь между остатками α-L-Rha*p* и α-L-Ara*f*, не получено.

Корреляционный кросс-пик в спектре $^{1}H/^{13}C$-HSQC атомов C2/H2 88.0/4.30 м.д. был отнесен к 2,3,5-три-*O*-замещенным остаткам α-L-Ara*f*, установить остальные сигналы, принадлежащие данным остаткам, не удалось, по-видимому, из-за их низкого содержания.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-S_2 установлено присутствие корреляционных кросс-пиков: атомов H1 с H3, H5,5' остатков α-Ara*f* – 5.09/4.01, 5.09/3.87;3.81 м.д., которые свидетельствуют о присутствии фрагмента: …→5)-α-Ara*f*-(1→5)-α-Ara*f*-(1→…; атомов H1 остатков Т-α-L-Ara*f* с атомами H2 2,3,5-три-*O*-замещенных остатков α-L-Ara*f* – 5.15/4.30 м.д., указывающих на присоединение остатков Т-α-L-Ara*f* по 2-му положению к остаткам 2,3,5-три-*O*-замещенной α-L-Ara*f*; атомов H1 остатков Т-α-L-Ara*f* с атомами H3 1,3,5-α-L-Ara*f* – 5.17/4.09 м.д., вероятно, указывающих на присоединение остатков Т-α-L-Ara*f* по 3-му положению к остаткам 1,3,5-α-L-Ara*f* [211, 225].

Соотношение остатков α-L-Ara*f*/(2,4-ди-*O*-замещенная Rha*p*) ~ 11, а также значительное количество Т-α-L-Ara*f*, 1,2,5- и 1,3,5-α-L-Ara*f* в полисахариде HS_O-S_2, вероятно, свидетельствуют о присутствии высокоразветвленных боковых цепей, представленных данными остатками, а также о небольшой длине участков кора рамногалактуронана I.

В спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-S_2 (рис. 8) также имеются сигналы невысокой интенсивности, которые характерны для 1,3-связанных и 3,6-ди-*O*-замещенных остатков β-D-Gal*p*.

В дополнение к доминирующим пектиновым полисахаридам подробный анализ спектров ЯМР позволил установить сигналы высокой интенсивности остатков 1,4-связанной β-D-Man*p* и 1,4-связанной β-D-Glc*p*, что, вероятно, указывает на присутствие связующих гликанов класса глюкоманнанов, как было показано ранее для полисахарида HS_W-S.

Наличие остатков 1,4-связанной β-D-Xyl*p* в небольших количествах, вероятно, указывает на присутствие связующих гликанов класса арабиноксиланов. Известно, что остов молекулы арабиноглюкуроноксилана представляет собой β-D-(1→4)-ксилан, который может быть замещен по C-2 или C-3 атомам остатками арабинозы и глюкуроновой кислоты [203, 204].

Спектроскопией ЯМР установлено, что полисахаридная фракция HS_A-S характеризуется аналогичными по строению элементами структуры в сравнении с фракцией HS_O-S_2.

Таким образом, можно заключить, что фракции, полученные из водно-спиртовых супернатантов, содержали несколько классов полисахаридов и были представлены главным образом пектиновыми полисахаридами, содержащими в боковой углеводной цепи значительные участки высокоразветвленного 1,5-α-L-арабинана, а также связующими гликанами класса глюкоманнанов и класса арабиноксиланов.

3.2.11. Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I на ДЭАЭ-целлюлозе

Фракционированием методом ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе показано, что главная по выходу полисахаридная фракция HS_O-I состоит главным образом из двух фракций пектиновых полисахаридов HS_O-I_1 и HS_O-I_2, элюируемых 0.1 M и 0.2 M NaCl соответственно. Главными компонентами углеводных

цепей данных фракций являются остатки GliA, Gal, Rha и Ara – характерные компоненты главной и боковых углеводных цепей HG и RG-I (табл. 12). Молярные соотношения GliA/Rha для полисахарида HS_O-I_2 (33.2) больше, чем для HS_O-I_1 (8.4), что, вероятно, указывает на меньшее содержание гомогалактуронана и большую долю рамногалактуронана-I в полисахариде HS_O-I_1, по сравнению с HS_O-I_2.

Таблица 12. Выход и состав фракций HS_O-I *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход, % от HS_O-I	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_O-I	12.5*	83.0	4.7	2.6	3.7	0.6	2.6	0.5	2.0
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.

3.2.12. Частичный кислотный гидролиз полисахарида HS_O-I

В результате частичного кислотного гидролиза полисахарида HS_O-I 0.05 М ТФУ получены полисахаридные фрагменты с низкой степенью метилэтерифицирования: HS_O-I-H (СМ 5.1%), HS_O-I-H_1 (СМ 10%) и HS_O-I-H_2 (СМ 9%) (табл. 12) (рис. 9).

Кислотонерастворимый фрагмент HS_O-I-H является главной по выходу и составляет ~ 57% от полисахарида HS_O-I. Главными компонентами углеводной цепи фрагмента HS_O-I-H являются остатки GliA (92%), а также присутствуют остатки Rha и Gal.

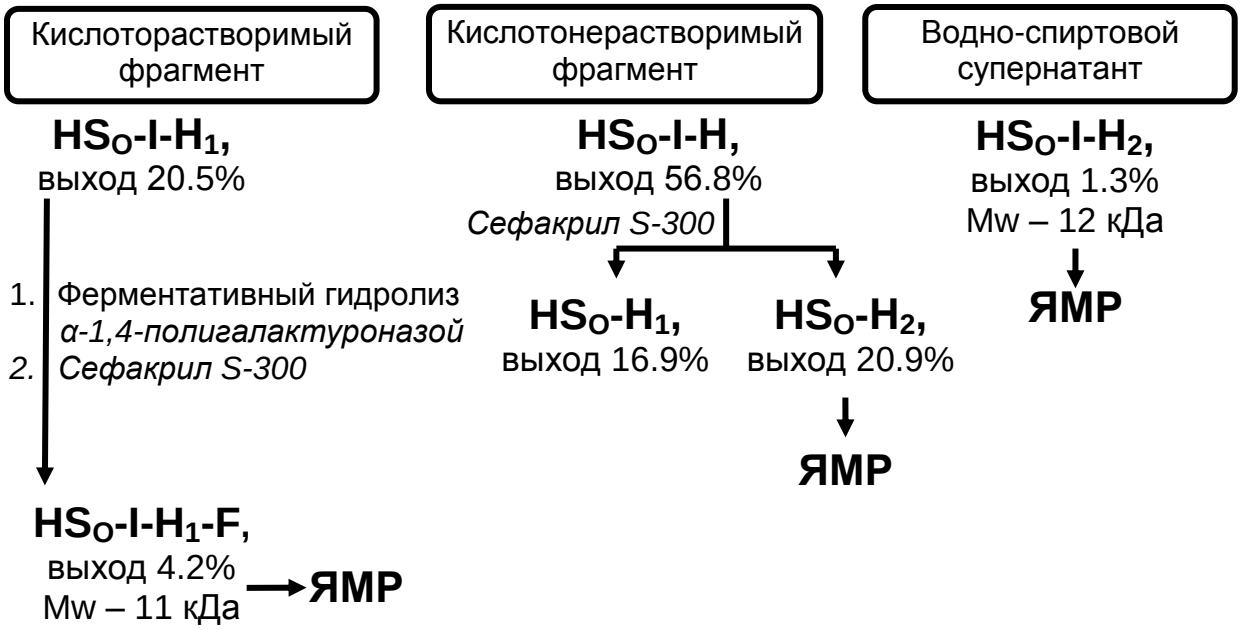

Рисунок 9. Схематическое изображение частичного кислотного гидролиза полисахарида HS_O-I

При последующем фракционировании данного фрагмента методом гель-фильтрационной хроматографии получены две полисахаридные фракции HS_O-H_1 и HS_O-H_2. Данные фракции характеризуются высоким содержанием остатков уроновых кислот (87-96 %), а также наличием остатков Rha и Gal (табл. 12). Наличие среди нейтральных моносахаридов только остатков Gal и Rha может свидетельствовать о замещении остатков Rha исключительно остатками Gal.

Таким образом, показано, что кислотонерастворимый фрагмент HS_O-I-H содержит главным образом участки галактуронана и представляет собой пектовую кислоту.

Главными компонентами углеводной цепи фрагмента HS_O-I-H_1 (кислоторастворимый фрагмент) являются остатки GliA, Rha и Gal, присутствующие в соотношении GliA:Gal:Rha 8.7:1.4:1 (табл. 12).

Из водно-спиртового супернатанта, который был получен осаждением гидролизата 4-х кратным объемом этилового спирта, в качестве минорного компонента выделен фрагмент, при последующем фракционировании которого методом гель-фильтрационной хроматографии получен

полисахарид HS_O-I-H_2 (Mw ~ 12 кДа, Mw/Mn 1.7) (табл. 12), соответствующий основному пику на хроматограмме. При анализе его моносахаридного состава установлено высокое содержание остатков GliA, Gal и Rha (GliA:Gal:Rha 4.0:1.3:1) − характерных компонентов боковой и главной углеводных цепей RG-I (табл. 12).

Вероятно, фрагменты HS_O-I-H_1 и HS_O-I-H_2 содержат значительные участки разветвленной области полисахарида HS_O-I.

При анализе моносахаридного состава полученных в результате частичного кислотного гидролиза полисахаридных фрагментов, видно, что обработка 0.05 М ТФУ привела к удалению почти всех остатков арабинозы. Это может свидетельствовать о фуранозной форме остатков арабинозы (гликозильные связи арабинофураноз кислотолабильны), о наличии боковых цепей, состоящих в основном из остатков арабинозы и/или о том, что на невосстанавливающих концах боковых цепей находятся остатки T-Ara*f*.

Таким образом, в результате кислотного гидролиза полисахарида HS_O-I получены фрагменты, содержащие главным образом линейную область (HS_O-I-H, HS_O-H_1, HS_O-H_2) и фрагменты, содержащие значительные участки разветвленной области (HS_O-I-H_1 и HS_O-I-H_2), строение которых было изучено с помощью спектроскопии ЯМР.

3.2.13. ЯМР исследования полисахарида HS_O-H_2

Подробный анализ спектров ^{13}C-ЯМР (рис. 10), ^{1}H-ЯМР, HSQC, TOCSY, COSY и ROESY полисахарида HS_O-H_2, позволил обнаружить сигналы, которые принадлежат: остаткам 1,4-связанной α-D-Gal*p*A и метилэтерифицированной 1,4-связанной α-D-Gal*p*A (СМ 5%), остаткам α-D-Gal*p*A-(1→…, расположенным на невосстанавливающих концах углеводной цепи, а также остаткам …→4)-β-Gal*p*A, которые находятся на восстанавливающих концах углеводной цепи.

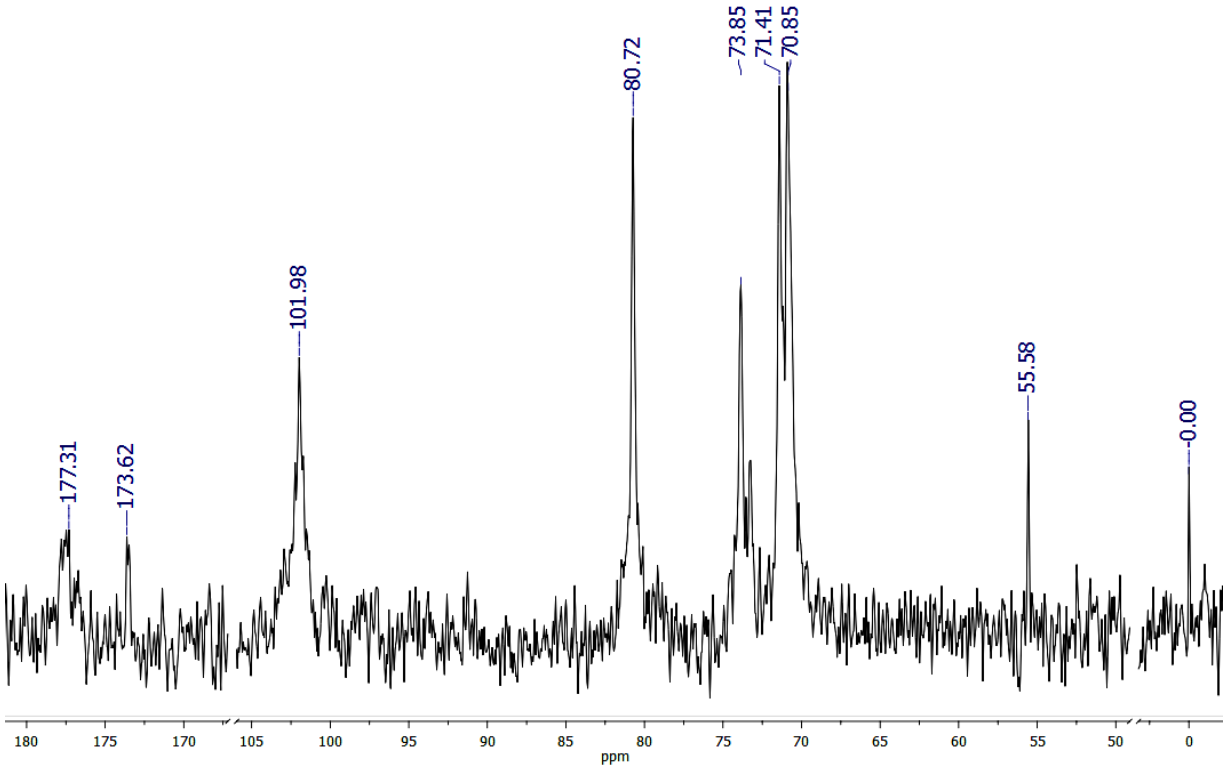

Рисунок 10. ^{13}C-ЯМР спектр галактуронана HS_O-H_2

Также в вышеуказанных спектрах ЯМР имеются сигналы, относящиеся к остаткам 1,4-связанной β-D-Gal*p*, которые свидетельствуют о наличии 1,4-β-D-галактана, являющегося боковыми цепями RG-I (табл. 13).

Таблица 13. Химические сдвиги ^{13}C and ^{1}H ЯМР галактуронана HS_O-H_2

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-Gal*p*A-(1→	101.9 *5.06*	70.9 *3.71*	71.4 *3.91*	73.5 *4.28*	74.0 *4.79*	177.3
→4)-α-Gal*p*A-(1→	101.9 *5.10*	70.9 *3.75*	71.4 *4.00*	80.7 *4.43*	73.9 *4.79*	177.3
→4)-α-Gal*p*A-6-*O*Me-(1→	101.6 *4.96*	71.4 *3.74*	71.6 *4.00*	80.7 *4.45*	73.3 *5.14*	173.6
→4)-β-Gal*p*A	н.о. *4.61*	н.о. *3.49*	н.о. *3.76*	80.7 *4.28*	н.о. *4.06*	177.3
→4)-β-Gal*p*-(1→	н.о. *4.62*	н.о. *3.68*	н.о. *3.76*	н.о. *4.17*	н.о. *3.72*	н.о. *3.82;3.79*

н.о. – не определены.

Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что данные ЯМР спектроскопии подтверждают, что кор полисахарида HS_O-I представляет собой 1,4-α-D-галактопиранозилуронан.

В $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектре галактуронана, кроме того, имеются сигналы C/H-атомов CH_3O-групп – 55.6/3.80 м.д., подтверждающие присутствие незначительных количеств метилэтерифицированной 1,4-α-D-Gal*p*A.

3.2.14. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-H_2

Положение сигналов в одномерных и двумерных спектрах полисахарида HS_O-I-H_2 свидетельствует о присутствии участков, представленных остатками 1,4-связанной α-D-Gal*p*A, α-D-Gal*p*A-(1→..., …→4)-β-D-Gal*p*A (табл. 14). В $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектре (рис. 11) имеются сигналы атомов C/H CH_3O-групп – 55.7/3.82 м.д., которые указывают на наличие метилэтерифицированной α-D-Gal*p*A (СМ 9%).

В аномерной области $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектра полисахарида HS_O-I-H_2 (рис. 11) отмечаются сигналы высокой интенсивности остатков α-L-рамнопиранозы (C1/H1 101.7/5.25 м.д.). В сильном поле данного спектра имеются сигналы C6/H6 при 19.6/1.24,1.31 м.д., принадлежащие CH_3-группе остатков α-L-Rha.

Более того, в $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектре данного полисахарида (рис. 11) наблюдаются корреляционные кросс-пики C2/H2 79.2/4.11 м.д., относящиеся к остаткам 1,2-связанной α-L-рамнопиранозы. В гетероядерном спектре HMBC также имеются интенсивные сигналы остатков α-L-рамнопиранозы: C3/H6 71.9/1.24 м.д., C4/H6 74.8/1.24 м.д., C3/H1 71.9/5.25 м.д., C5/H1 72.4/5.25 м.д., C4/H3 74.8/3.88 м.д. [124, 144, 222]. Гомоядерные двумерные спектры TOCSY, COSY и ROESY полисахарида HS_O-I-H_2 также свидетельствуют о присутствии вышеуказанных остатков α-L-Rha*p*.

При расшифровке спектра ROESY обнаружены корреляционные кросс-пики: H1/H2 5.00/3.91 м.д., H4/H5 4.43/4.75 м.д., H2/H5 3.91/4.75 м.д., H1/H4 5.00/4.43 м.д., H1/H4 5.10/4.46 м.д., H1/H4 4.96/4.45 м.д., подтверждающие присутствие участков:

…→4)-α-D-Gal*p*A-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→…,

…→4)-α-D-Gal*p*A(OMe)-(1→4)-α-D-Gal*p*A(OMe)-(1→….

Таблица 14. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-H_2

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		102.2 *5.06*	71.4 *3.71*	71.8 *3.91*	73.8 *4.29*	74.1 *4.73*	177.0
→4)-α-Gal*p*A-6-OMe-(1→		100.8 *4.96*	71.4 *3.74*	71.8 *4.00*	80.5 *4.45*	73.5 *5.08;5.15*	174.0
→4)-α-Gal*p*A-(1→2		100.8 *5.00*	71.5 *3.91*	73.2 *4.12*	80.5 *4.43*	74.1 *4.75*	177.0
→4)-α-Gal*p*A-(1→		102.2 *5.10*	71.4 *3.75*	71.8 *4.01*	80.5 *4.46*	74.1 *4.75*	177.0
→4)-α-Gal*p*A-(1→		100.8 *5.05*	71.5 *3.91*	73.2 *4.06*	80.4 *4.29*	74.1 *4.74*	177.0
→4)-β-Gal*p*A		99.5 *4.61*	74.4 *3.48*	74.8 *3.76*	80.7 *4.38*	76.7 *4.07*	177.0
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.7 *5.25*	79.2 *4.11*	71.9 *3.88*	74.8 *3.42*	72.4 *3.76*	19.6 *1.24*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→		101.7 *5.25*	79.2 *4.11*	н.о.	н.о. *3.68*	н.о. *3.81*	19.6 *1.31*
β-Gal*p*-(1→	Gt*	106.5 *4.43*	74.2 *3.52*	75.3 *3.66*	71.5 *3.91*	77.6 *3.72*	63.6 *3.77*
β-Gal*p*-(1→	Gt	107.3 *4.60*	74.3 *3.59*	75.4 *3.67*	71.3 *3.91*	77.6 *3.72*	63.6 *3.79;3.76*
→4)-β-Gal*p*-(1→	G*	106.3 *4.62*	74.9 *3.51*	74.8 *3.77*	80.5 *4.17*	77.6 *3.72*	63.6 *3.82;3.79*
→4)-β-Gal*p*-(1→	G*	107.3 *4.65*	75.3 *3.68*	76.2 *3.76*	80.5 *4.17*	77.6 *3.72*	63.6 *3.82;3.79*
→3)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(I)}$	107.3 *4.67*	н.о. *3.78*	84.8 *3.86*	70.7 *4.12*	н.о.	64.0 *3.77*
→6)-β-Gal*p*-(1→	G	106.5 *4.48*	74.2 *3.54*	75.3 *3.69*	71.8 *3.96*	76.8 *3.91*	72.7 *4.03;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(II)}$	н.о. *4.48*	н.о. *3.67*	84.8 *3.86*	н.о.	76.8 *3.91*	72.7 *4.03;3.91*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A	GA	н.о. *4.49*	76.0 *3.35*	78.3 *3.55*	85.2 *3.29*	н.о. *3.71*	179.0

н.о.– не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

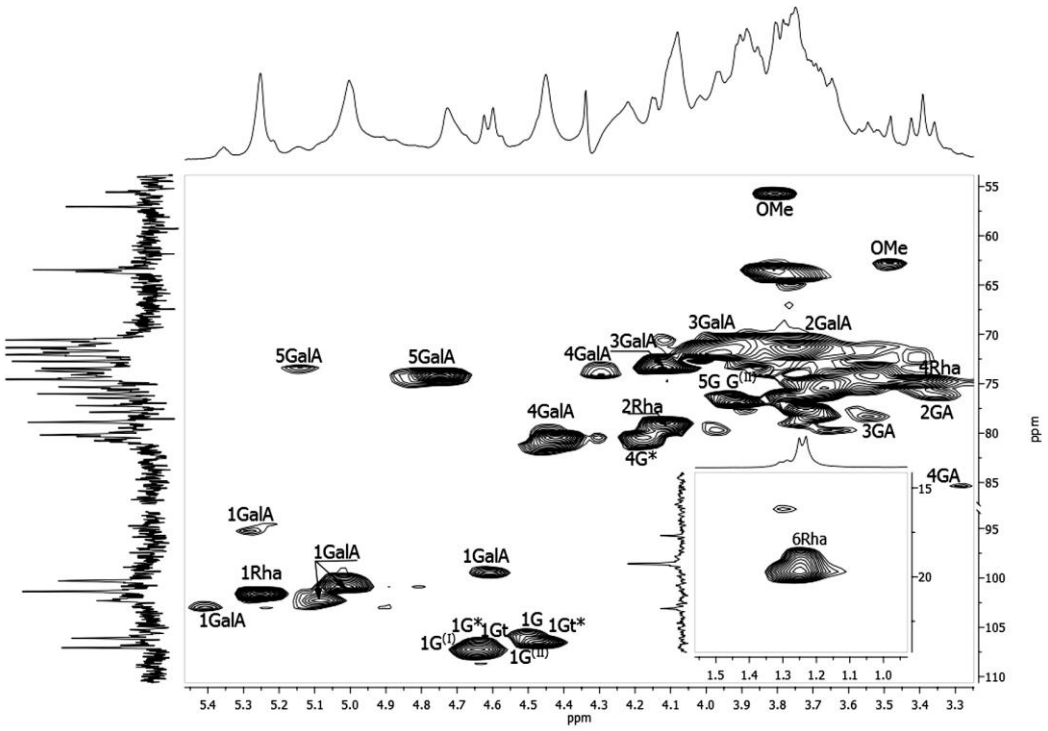

Рисунок 11. Фрагмент спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-H_2

Кроме того, в спектре ROESY полисахарида HS_O-I-H_2 наблюдаются интенсивные сигналы схожие по химическим сдвигам с полисахаридом HS_O-S_2, подтверждающие присутствие участков:

...→2)-α-Rha*p*-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→...; …→4)-α-Gal*p*A-(1→2)-α-Rha*p*-(1→....

В гетероядерном спектре HMBC также присутствует корреляционный кросс-пик атомов C4 остатков 1,4-α-D-Gal*p*A с атомами H1 остатков α-Rha*p* при 80.5/5.25 м.д., подтверждающий присутствие фрагментов: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→....

В двумерном спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC (рис. 11) обнаружены интенсивные сигналы, свидетельствующие о присутствии в углеводной цепи полисахарида HS_O-I-H_2 остатков T-β-D-Gal*p* и 1,4-связанной β-D-Gal*p*, указывающих на присутствие 1,4-β-D-галактана [124, 208].

В спектре COSY удалось соотнести сигнал H1/H2 остатков 1,4-связанной β-D-Gal*p* при 4.65/3.68 м.д., с сигналом H2/H3 при 3.68/3.76 м.д. и с сигналом H3/H4 при 3.76/4.17 м.д. [124]. Остальные сигналы H5 при 3.72 м.д. и H-6;6' при 3.82;3.79 м.д. были определены из спектров TOCSY и ROESY. Эти результаты и анализ всех спектров позволили соотнести

соответствующие резонансы C1-C6 данного остатка в спектре HSQC при 107.3, 75.3, 76.2, 80.5, 77.6 и 63.6 м.д. соответственно. Соотнесение H1-H6 резонансов остатков T-β-D-Gal*p* и 1,6-связанной β-D-Gal*p* были сделаны с помощью аналогичной процедуры.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-H_2 присутствуют корреляционные кросс-пики H1 с H3, H4, H5, H6 остатков 1,4-связанной β-D-галактопиранозы при 4.65/3.76 м.д., 4.65/4.17 м.д., 4.65/3.72 м.д., 4.65/3.79 м.д., что свидетельствует о присутствии фрагмента: …→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-β-D-Gal*p*-(1→… [124, 222].

В одномерных и двумерных спектрах полисахарида HS_O-I-H_2 также присутствуют корреляционные кросс-пики остатков 1,4-связанной β-D-галактопиранозы (H1/H2 4.62/3.51 м.д.), гликозилирующих 2,4-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Rha*p* по атому *O*-4, что свидетельствует о присутствии фрагмента: ...→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→… .

Присутствие вышеуказанных остатков β-D-Gal*p* также подтверждает гетероядерный спектр HMBC, в нем наблюдаются корреляционные кросс-пики: C4/H1 80.5/4.65 м.д. и C1/H2 107.3/3.68 м.д. остатков 1,4-β-D-Gal*p*.

Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2-α-L-Rha*p* (1.24 м.д.) и 1,2,4-α-L-Rha*p* (1.31 м.д.) ^{1}H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 77:23, из этого следует, что большинство остатков α-L-Rha*p* не являются точками разветвления главной углеводной цепи.

Интегральные интенсивности сигналов аномерных протонов, принадлежащих остаткам β-D-галактопиранозы, имеют соотношение G*(4.65 м.д.):G*(4.62 м.д.):G:Gt:Gt*:$G^{(I)}$:$G^{(II)}$ = 39.4:20.2:14.4:11.6:7.0:3.8:1.0 (обозначения смотри в табл. 14). Отсюда можно сделать заключение, что среди вышеприведенных остатков β-D-Gal*p* доминирующими являются 1,4-связанные остатки β-D-Gal*p* (~ 40%) и остатки 1,4-β-D-Gal*p* (~ 20%), гликозилирующие 2,4-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Rha*p* по атому *O*-4.

На долю 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p* приходится ~ 2.5% от массы полисахарида (11 вес.% × 0.23). Массовая доля 1,4-связанных

остатков β-D-Gal*p* (не гликозилирующих остатки Rha*p*) составляет ~ 5.6% (14.4 вес.% × 0.39). Следовательно, молярное соотношение 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p* и 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p* составляет 3.1:1.5. В итоге средняя длина цепей из 1,4-связанной β-D-Gal*p* составляет порядка двух мономеров. Массовая доля 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p*, гликозилирующих остатки 2,4-ди-*O*-замещенной α-L-Rha*p* по атому *O*-4, составляет ~ 2.9% (14.4 вес.% × 0.2). Следовательно, молярное соотношение моносахаридных остатков 1,4-β-D-Gal*p* и 1,2,4-α-L-Rha*p* составляет 1.6:1.5, т.е. ~ 1 мономер.

Таким образом, 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, представленных преимущественно фрагментами: β-Gal*p*→[4)-β-Gal*p*-(1]$_3$→4)-α-Rha*p*-(1→….

Известно, что кислотный гидролиз макромолекул полисахаридов в мягких условиях расщепляет преимущественно гликозидные связи остатков арабинозы в фуранозной форме. Кислотная обработка привела к удалению всех остатков арабинозы и, вероятно, к увеличению доли остатков T-β-D-Gal*p* и 1,6-связанной β-D-Gal*p* и к уменьшению доли 3,6-ди-*O*-замещенных остатков β-D-Gal*p*.

В двумерном спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-H_2 (рис. 11) также имеются сигналы невысокой интенсивности, относящиеся к остаткам 1,3- и 1,3,6-β-D-Gal*p*, а также 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A – характерным компонентам AG-II, вероятно, указывающим на присутствие AGP (табл. 14).

Интегральные интенсивности сигналов H1/H2 остатков 1,6-β-D-Gal*p* боковой цепи и 1,3,6-β-D-Gal*p* главной цепи углеводной части макромолекулы AGP в спектре COSY полисахарида HS_O-I-H_2 имеют соотношение 14.4:1, из этого следует, что средняя длина цепей из остатков 1,6-β-D-Gal*p* составляет ~ 14 мономеров.

Следует отметить, что уроновые кислоты в полисахариде HS_O-I-H_2 представлены главным образом остатками 1,4-связанной α-D-Gal*p*A и минорными количествами 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A.

Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что с помощью ЧКГ определено, что кор полисахарида HS_O-I состоит главным образом из участков частично метилэтерифицированного 1,4-α-D-гомогалактуронана и участков RG-I, остов которого представлен 1,2-α-L-рамно-1,4-α-D-галактуронаном. Боковые цепи RG-I представлены преимущественно остатками T-β-D-Gal*p* и 1,4-связанной β-D-Gal*p*, которые свидетельствуют о присутствии 1,4-β-D-галактана или AG-I.

3.2.15. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-H_1

В результате ферментативного гидролиза α-1,4-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I-H_1, полученного методом частичного кислотного гидролиза полисахарида HS_O-I, с последующим фракционированием ферментолизата методом гельхроматографии на сефакриле S-300 получили фрагмент HS_O-I-H_1-F (Mw ~ 10.5 кДа), соответствующий главному пику на выходной кривой и минорный фрагмент, который далее не исследовали (табл. 15).

Таблица 15. Выход и состав полисахарида HS_O-I-H_1-F *H. sosnowskyi* (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_O-I-H_1-F	4.2	24.0	13.4	н.о.	20.4	0.5	2.5	0.5	1.6

* - от исходного полисахарида HS_O-I; н.о. – не обнаружено.

Молярное соотношение GliA:Rha во фрагменте HS_O-I-H_1-F составляет ~ 1,1:1. Это почти эквимолярное соотношение характерно для RG-I, что позволяет предположить, что кор этого фрагмента состоит главным образом из повторяющихся звеньев …→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→….

Фрагмент HS_O-I-H_1-F был исследован методом ЯМР спектроскопии.

3.2.16. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-H_1-F

Из соотношения интегральных интенсивностей сигналов атомов H6 остатков α-L-Rha*p* (1.24 м.д.) и H1 остатков 1,4-α-D-Gal*p*A (5.01 м.д.) спектра ^{1}H-ЯМР, определено, что кор полисахарида HS_O-I-H_1-F состоит главным образом из чередующихся 1,4-связанных остатков α-D-галактуроновой кислоты и 1,2-связанных остатков α-L-рамнопиранозы.

В ^{1}H/^{13}C HSQC спектре (рис. 12) полисахарида HS_O-I-H_1-F (СМ 10%) имеются сигналы атомов C/H CH_3O-групп 55.8/3.88 м.д., свидетельствующие о присутствии остатков 1,4-α-D-Gal*p*A(OMe).

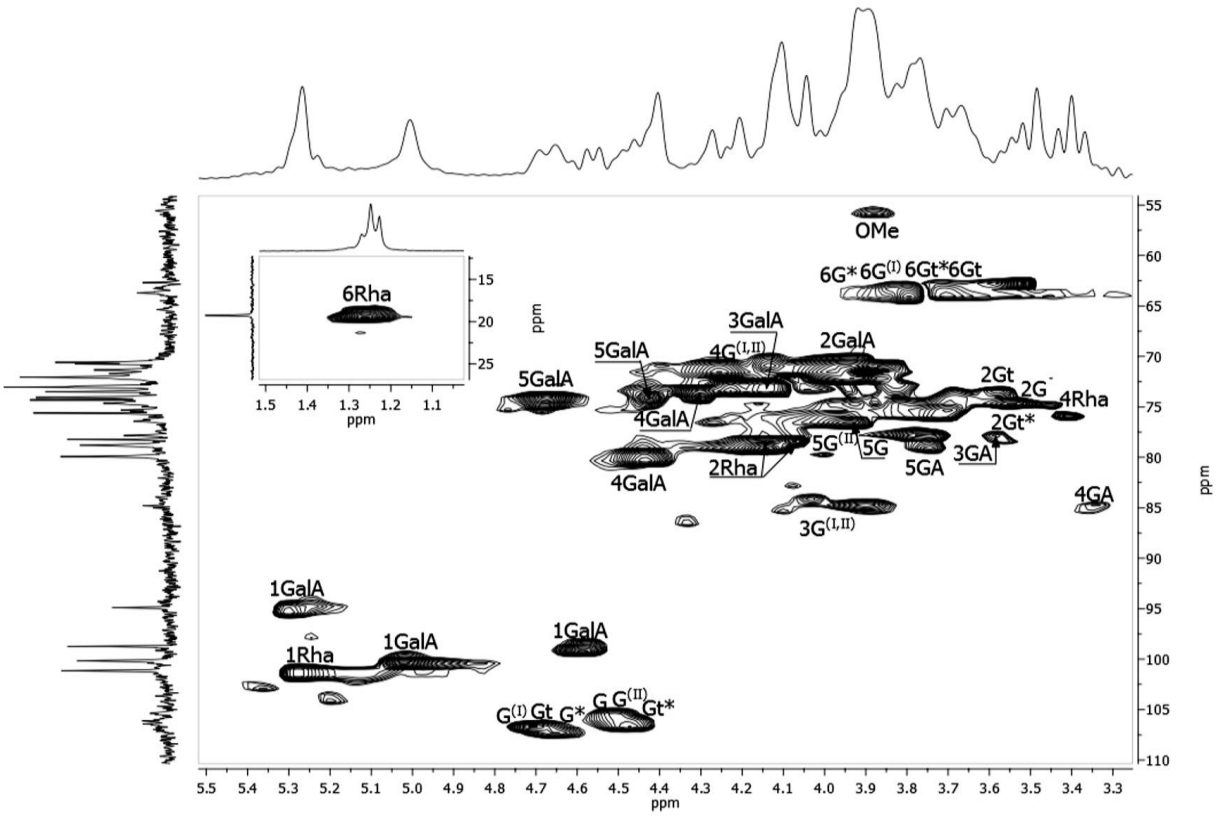

Рисунок 12. Фрагмент спектра ^{1}H/^{13}C HSQC полисахарида HS_O-I-H_1-F

В спектре COSY полисахарида HS_O-I-H_1-F наблюдаются корреляционные пики H1/H2, H2/H3, H3/H4 H4/H5 остатков 1,4-α-D-Gal*p*A, остатков α-D-Gal*p*A-(1→, находящихся на невосстанавливающих концах углеводной цепи, и остатков, представляющих собой α и β аномеры, находящихся на восстанавливающих концах углеводных цепей …→4)-β-Gal*p*A, …→4)-α-Gal*p*A (табл. 16).

Таблица 16. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-H_1-F

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		100.4 *5.01*	70.9 *3.81*	71.4 *3.90*	73.5 *4.28*	74.1 *4.41*	177.9
α-Gal*p*A-(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-Gal*p*A-(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-Gal*p*A-(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-Gal*p*A		95.2 *5.29*	70.9 *3.81*	71.6 *3.99*	80.2 *4.41*	74.1 *4.65*	177.9
→4)-β-Gal*p*A		99.5 *4.60*	74.4 *3.48*	74.8 *3.76*	80.7 *4.38*	76.7 *4.27*	177.9
→4)-β-Gal*p*A		99.2 *4.61*	74.2 *3.52*	73.3 *3.76*	81.0 *4.35*	77.2 *4.06*	177.9
→4)-β-Gal*p*A		99.1 *4.56*	74.4 *3.49*	73.7 *3.68*	н.о. *4.21*	78.6 *4.04*	177.9
→2)-α-Rha*p*-(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-Rha*p*-(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-Gal*p*-(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-Gal*p*-(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-Gal*p*-(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*
→4)-β-Gal*p*-(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*
→3)-β-Gal*p*-(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-Gal*p*-(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-Gal*p*-(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-Glc*p*A-(1→	GA	105.2 *4.48*	н.о. *3.36*	78.1 *3.57*	84.8 *3.28-3.34*	79.0 *3.74*	178.9

н.о.– на определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

Спектр $^{1}H/^{13}C$ HMBC (рис. 13) полисахарида HS_O-I-H_1-F подтверждает присутствие вышеуказанных остатков, в нем имеются корреляционные кросс-пики: атомов C1/H4 95.2/4.41 м.д. остатков …→4)-α-Gal*p*A; атомов C1/H2 99.1/3.49 м.д. и C1/H5 99.1/4.04 м.д. остатков …→4)-β-Gal*p*A.

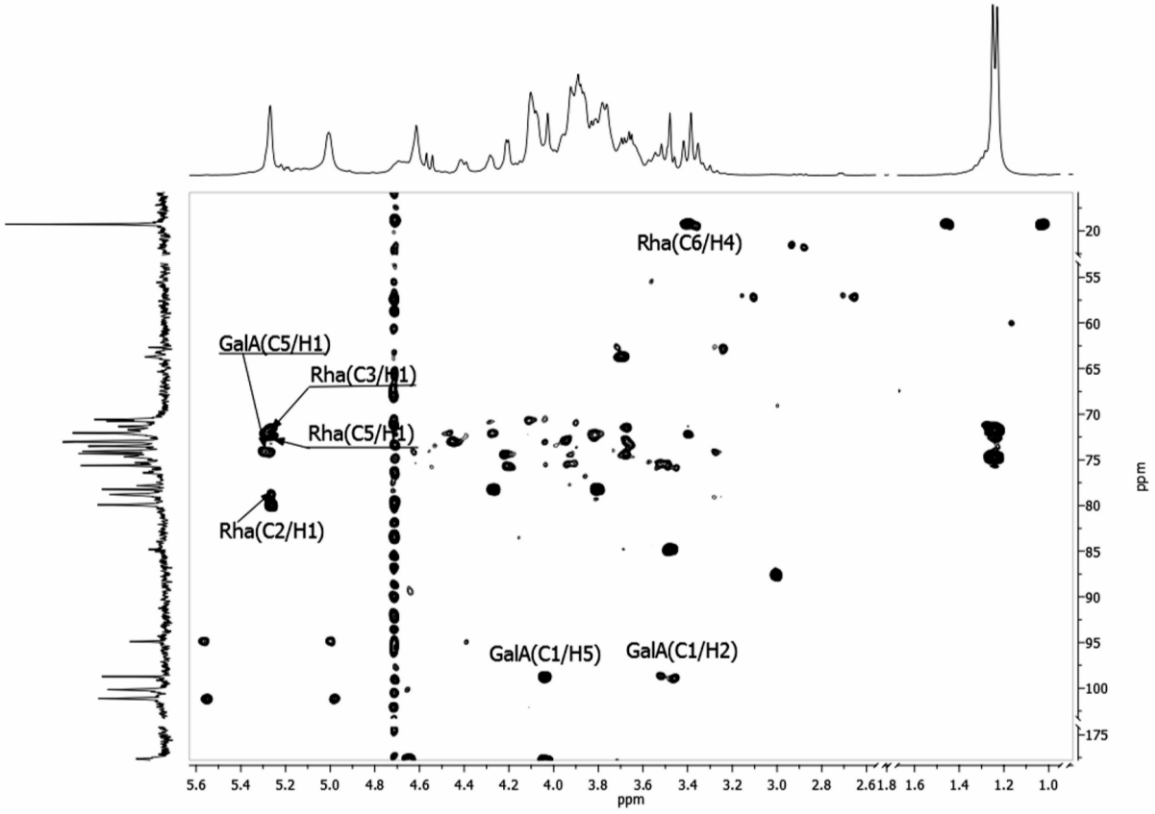

Рисунок 13. Фрагмент спектра $^{1}H/^{13}C$ HMBC полисахарида HS_O-I-H_1-F

В спектрах $^{1}H/^{13}C$ HMBC и ROESY присутствуют высокоинтенсивные сигналы 1,2-связанных остатков α-L-Rha*p* C2/H1 79.0/5.28 м.д., C5/H1 72.2/5.28 м.д., C5/H4 72.2/3.41 м.д., C3/H6 71.9/1.24 м.д., C4/H6 75.8/1.24 м.д., C6/H4 19.3/3.41 м.д., H1/H6 5.28/1.24 м.д., H2/H6 4.12/1.24 м.д., H3/H6 3.89/1.24 м.д., H4/H6 3.41/1.24 м.д., H5/H6 3.79/1.24 м.д.

Также в спектре ROESY полисахарида HS_O-I-H_1-F имеются сигналы высокой интенсивности схожие по химическим сдвигам с сигналами в спектре ROESY полисахарида HS_O-I-H_2, которые свидетельствует о присутствии участков: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→...; ...→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→....

Кроме того, в спектрах $^{1}H/^{13}C$ HMBC и ROESY также присутствуют корреляционные кросс-пики C1/H4 101.4/4.42 м.д., H6/H4,H5 1.24/4.42,4.65 м.д. остатков 1,2-α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A, подтверждающих наличие фрагментов: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→....

Из соотношения 1,4-связанных остатков α-D-Gal*p*A и 1,2-связанных остатков α-L-Rha*p* ~ 1:1 фрагмент HS_O-I-H_1-F с Mw ~ 10.5 кДа, будет иметь ~ 26 повторяющихся звеньев: ...[→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→]$_n$….

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

В гомоядерном спектре COSY наблюдаются сигналы высокой интенсивности атомов H1/H2 4.64/3.61 м.д., H2/H3 3.61/3.79 м.д., H3/H4 3.79/4.17 м.д., свидетельствующие о присутствии остатков 1,4-β-D-галактопиранозы. В спектре ROESY присутствуют корреляционные кросс-пики невысокой интенсивности H1/H3, H1/H4 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p* при 4.62/3.76, 4.62/4.18 м.д., что свидетельствует о невысоком содержании участков: …→4)-β-Gal*p*-(1→4)-β-Gal*p*-(1→…, в отличие от полисахарида HS_O-I-H_2, полученного с помощью метода ЧКГ, где данные остатки были доминирующими.

Интегральные интенсивности сигналов H1/H2 единичного остатка 1,4-β-D-Gal*p* (4.64/3.61 м.д.) и H1/H2 остатков 1,4-связанной β-D-Gal*p* (4.62/3.67 м.д.) спектра COSY имеют соотношение ~ 6:1, что свидетельствует о преобладании в разветвленной области рамногалактуронана I коротких боковых цепей.

Таким образом, детальным анализом спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-H_1-F показано, что он характеризуется наличием больших по длине участков остова RG-I, более низким содержанием 1,4-связанных остатков β-D-галактопиранозы и, следовательно, имеет более короткие боковые цепи, представленные в основном фрагментами: β-Gal*p*-(1→4)-α-Rha*p*-(1→… и

β-Gal*p*→4)-β-Gal*p*-(1→4)-α-Rha*p*-(1→…, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-H_2, характеризующимся наличием более коротких участков остова RG-I и более высоким содержанием 1,4-связанных остатков 1,4-β-D-галактопиранозы и, следовательно, имеющим более длинные боковые цепи, представленные преимущественно фрагментами: β-Gal*p*→[4)-β-Gal*p*-(1]$_3$→4)-α-Rha*p*-(1→….

Вероятно, участки RG-I, содержащие боковые углеводные цепи более чем из одного остатка 1,4-связанной β-D-Gal*p*, были удалены при обработке α-1,4-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I-H_1. Это можно объяснить тем, что значительная часть метоксильных и ацетильных групп была удалена при кислотном гидролизе, что сделало доступным для воздействия фермента участки, состоящие из остатков 1,4-связанной α-D-Gal*p*A, в результате чего короткие участки кора RG-I, перемежающиеся с данными участками гомогалактуронана и имеющие боковые цепи из четырех (преимущественно) остатков β-D-Gal*p*, были удалены из основной цепи полисахарида.

Более того, подробный анализ двумерных спектров полисахарида HS_O-I-H_1-F позволил установить сигналы типичные для остатков T-β-D-Gal*p*, 1,3-β-D-Gal*p*, 1,6-β-D-Gal*p* и 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, а также 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, вероятно, принадлежащих углеводной части макромолекулы AGP (табл. 16) [172, 184, 185].

В спектре ROESY наблюдаются корреляционные кросс-пики: H1/H3,H5,H6-атомов при 4.47/3.67,3.91,4.03 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: …→6)-β-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→..., H1/H3,H5-атомов при 4.69/3.87,3.67 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: …→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→....

Интегральные интенсивности сигналов аномерных протонов остатков β-D-Gal*p* в спектре ^{1}H-ЯМР полисахарида HS_O-I-H_1-F имеют соотношение G*:G:G$^{(I)}$:Gt:Gt*:G$^{(II)}$ = 4.7:4.2:3.5:3.1:2.7:1.0 (обозначения смотри в табл. 16). Можно сделать заключение, что среди вышеприведенных остатков β-D-Gal*p*

доминирующими являются остатки 1,4-β-D-Gal*p* (~24%), 1,6-β-D-Gal*p* (~22%) и 1,3-β-D-Gal*p* (~18%).

Наименьшую интенсивность сигналов имеют 3,6-ди-*O*-замещенные остатки β-D-Gal*p*, что, вероятно, объясняется удалением остатков арабинозы при кислотной обработке.

Интенсивные сигналы C/H-атомов CH_3O-групп в спектрах $^{1}H/^{13}C$ HSQC и $^{1}H/^{13}C$ HSQC-ROESY при 62.8/3.48,3.52 м.д. и C4/H4 при 84.8/3.28,3.34 м.д., свидетельствуют о присутствии остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A. В спектре HMBC также наблюдаются интенсивные корреляционные пики при 84.8/3.48 м.д. и при 62.7/3.28 м.д. подтверждающие, что остатки β-D-глюкуроновой кислоты имеют CH_3O-группу по 4-му положению [184].

По литературным данным остатки 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A могут находиться на невосстанавливающих концах боковых цепей β-(1→6)-галактана: 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→…, либо непосредственно связаны с β-(1→3)-галактаном с помощью β-(1→6)-связи [173, 174, 176].

Остатки галактуроновой и глюкуроновой кислот согласно соотношению интегральных интенсивностей имеют соотношение ~ 8:1. Таким образом, в полисахариде HS_O-I-H_1-F уроновые кислоты были представлены главным образом остатками галактуроновой кислоты.

Тем не менее, остатки, участвующие в ковалентной связи между AGP и пектиновыми полисахаридами, согласно литературным данным, не определены, за исключением работы Tan и др. [185]. В данной работе показано, что арабиногалактановые белки ковалентно присоединены к пектиновым полисахаридам, что предполагает присутствие следующего структурного звена:

…→4-α-D-GalA-1→2-α-L-Rha-1→4-β-D-GlcA-1→6-β-D-Gal→… [185].

Тем не менее, в нашем случае присутствие остатков Gal*p*A, находящихся на восстанавливающих концах углеводных цепей,

(…→4)-β-Gal*p*A, ...→4)-α-Gal*p*A) указывает на то, что аномерные атомы углерода данных остатков не связаны гликозидной связью, что, вероятно, свидетельствует о том, что AGP могут быть связаны с пектиновой макромолекулой иным способом.

Следует отметить, что главная углеводная цепь фрагмента HS_O-I-H_1-F представлена RG-I, при этом среди нейтральных моносахаридов превалирующими являются остатки характерные для AGP, что указывает на то, что AGP непосредственно связаны с участками RG-I.

3.2.17. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I

При ферментативной обработке 1,4-α-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I получен полисахаридный фрагмент HS_O-I-F_1 (выход ~ 25%), характеризующийся более высоким содержанием остатков Gal, Rha и Ara и более низким содержанием остатков GliA, в сопоставлении с исходным полисахаридом HS_O-I (рис. 14, табл. 17).

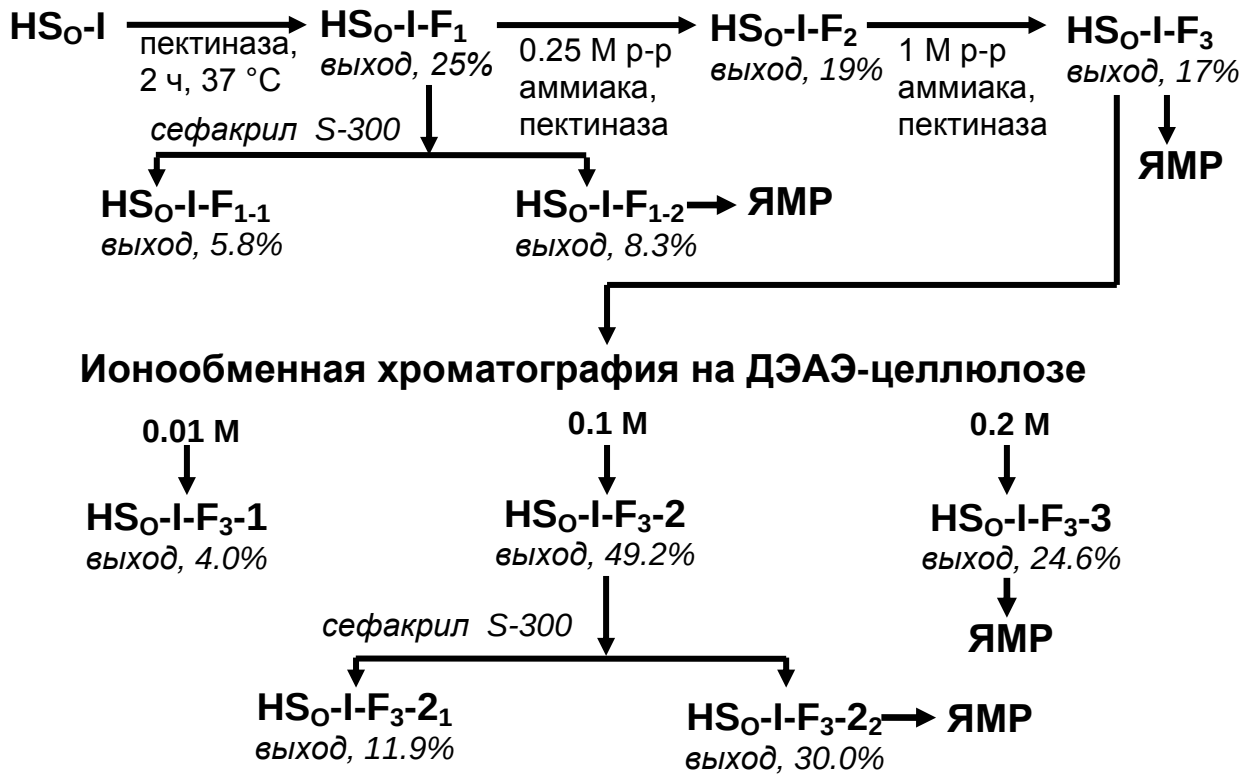

Рисунок 14. Схема ферментативного гидролиза полисахарида HS_O-I с последующей ионообменной хроматографией

Таблица 17. Выход и состав фракций, полученных методом ферментативного гидролиза (вес.%)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды							Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Fuc	Glc	Man	
HS_O-I-F_1	24.9	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

Из представленных результатов видно, что ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I сопровождается значительным расщеплением углеводной цепи, что является доказательством присутствия значительных участков линейного неэтерифицированного галактуронана (табл. 17).

В результате последующего фракционирования фрагмента HS_O-I-F_1 методом гель-фильтрационной хроматографии получены два полисахаридных фрагмента HS_O-I-F_{1-1} (СМ 19%, СА 65%) и HS_O-I-F_{1-2} (СМ 42%, СА 52%). Главными компонентами углеводной цепи которых являются остатки GliA, Gal и Rha (табл. 17). Полученные при ферментативной обработке фрагменты HS_O-I-F_{1-1} и HS_O-I-F_{1-2} (Mw ~ 11.2 кДа) отличаются более высоким содержанием нейтральных моносахаридов, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I (табл. 3). Приведенные результаты свидетельствуют о присутствии в полисахариде HS_O-I как участков линейного α-1,4-D-галактуронана, так и участков разветвленного RG-I.

Фрагмент HS_O-I-F_{1-2} был исследован методом ЯМР спектроскопии.

Известно, что ферментативная активность 1,4-α-D-полигалактуроназы увеличивается после удаления метоксильных и ацетильных групп [230]. Полисахаридный фрагмент HS_O-I-F_1 далее был обработан раствором 0.25 М аммиака для удаления метоксильных и ацетильных групп и подвергнут ферментативной обработке 1,4-α-D-полигалактуроназой, в результате чего получили фрагмент HS_O-I-F_2 (выход 19.0% от полисахарида HS_O-I).

Результаты ЯМР спектроскопии полученного фрагмента свидетельствуют о том, что значительная часть метоксильных (СМ 45%) и ацетильных (СА 64%) групп сохраняется. Наличие метилэтерифицированных карбоксильных групп остатков α-D-Gal*p*A подтверждено сигналами высокой интенсивности атомов С/Н CH_3O-групп 55.4/3.85 м.д. в двумерном спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC. Кроме того, в этом спектре отмечаются сигналы С/Н-атомов CH_3CO- групп при 22.8/2.15;2.19 м.д., свидетельствующие о том, что часть остатков α-D-Gal*p*A ацетилированы по *O*-2 и/или *O*-3 положению. В связи с чем, полисахаридный фрагмент HS_O-I-F_2 был далее обработан раствором 1 М аммиака для удаления метоксильных и ацетильных групп и вновь подвергнут ферментативной обработке 1,4-α-D-полигалактуроназой.

В результате исчерпывающей трехкратной обработки полисахарида HS_O-I получен устойчивый к дальнейшему действию пектиназы фрагмент HS_O-I-F_3 (выход 17.0%), характеризующийся низкой степенью метилэтерифицирования остатков 1,4-связанной α-D-Gal*p*A (СМ 6%). Моносахаридный анализ полученного фрагмента свидетельствует, что молярное соотношение GliA:Rha составляет ~ 2.4:1, что указывает на то, что кор данного фрагмента содержит значительные участки RG-I.

Фрагмент HS_O-I-F_3 был исследован методом ЯМР спектроскопии.

3.2.18. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_{1-2}

Подробный анализ спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-F_{1-2} свидетельствует о присутствии участков, состоящих преимущественно из остатков метилэтерифицированной 1,4-α-D-Gal*p*A и 3-*O*-ацетилированной 1,4-α-D-Gal*p*A, которые не подвергаются действию фермента (рис. 15, табл. 18). Наличие метилэтерифицированных карбоксильных групп остатков α-D-Gal*p*A подтверждено сигналами высокой интенсивности атомов С/Н CH_3O-групп 55.7/3.78;3.82 м.д. в двумерном спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC (рис. 15).

Спектр $^{1}H/^{13}C$ HMBC также свидетельствует о присутствии вышеуказанных остатков, в нем отмечаются высокоинтенсивные сигналы C6(Gal*p*A)/H(OMe) 174.7/3.82 м.д. и 174.2/3.78 м.д., относящиеся к остаткам метилэтерифицированной 1,4-α-D-Gal*p*A.

В $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектре, кроме того, отмечаются сигналы высокой интенсивности C/H-атомов CH_3CO- групп при 23.1/2.13 м.д. и 23.2/2.18 м.д., по всей вероятности, свидетельствующие о том, что остатки α-D-Gal*p*A имеют ацетильные группы по *O*-2 и/или *O*-3 положению. Спектр $^{1}H/^{13}C$ HMBC также доказывает присутствие остатков ацетилированной 1,4-α-D-Gal*p*A, в нем отмечаются высокоинтенсивные сигналы атомов C/H CH_3CO- групп при 176.3/2.13;2.18 м.д.

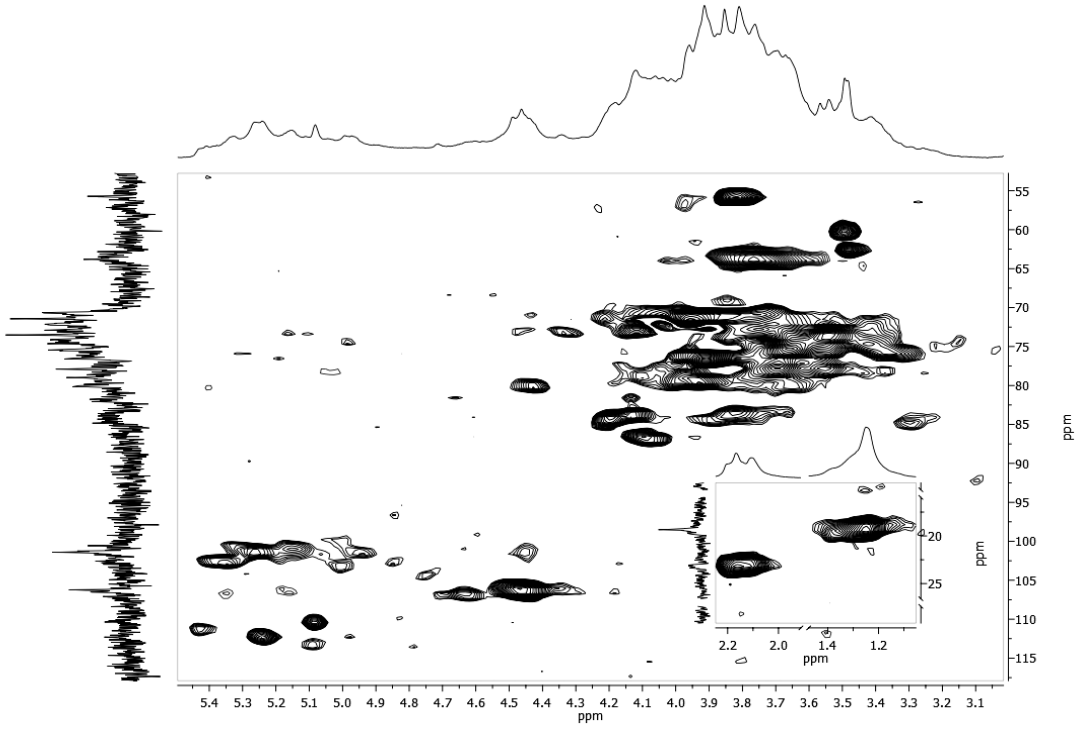

Рисунок 15. Фрагмент спектра **{**$^{1}H,^{13}C$} HSQC полисахарида HS_O-I-F_{1-2}

Сигналы остатков α-D-галактуроновой кислоты полисахарида HS_O-I-F_{1-2}, имеют невысокую интенсивность. Это, вероятно, можно объяснить низкой степенью свободы связей остатков GalA, в сопоставлении с высокоинтенсивными сигналами остатков Ara и Gal, свидетельствующими о высокой подвижности углеводных цепей, представленных данными остатками.

Таблица 18. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-F_{1-2}

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'*
→4)-α-Gal*p*A-OAc-(1→	101.0 *5.14*	70.7 *4.02*	73.3 *5.11*	79.8 *4.47*	н.о.	176.3
→4)-α-Gal*p*A-OMe-(1→	101.7 *5.00*	71.0 *3.83*	71.8 *4.00*	80.1 *4.43*	73.3 *5.17*	174.7/174.2
→2)-α-Rha*p*-(1→	101.3 *5.26*	79.2 *4.04*	71.7 *3.88*	74.6 *3.42*	72.5 *3.75*	19.3 *1.25*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→	101.5 *5.26*	78.9 *4.12*	73.2 *4.08*	83.5 *3.67*	71.7 *3.82*	19.6 *1.31*
β-Gal*p*-(1→	106.3 *4.43*	73.6 *3.52*	75.4 *3.66*	71.4 *3.92*	77.8 *3.69*	63.7 *3.77*
β-Gal*p*-(1→	106.9 *4.60*	74.2 *3.62*	75.4 *3.66*	71.4 *3.89*	77.8 *3.69*	63.7 *3.77*
→4)-β-Gal*p*-(1→	106.8 *4.61*	74.9 *3.69*	76.1 *3.75*	78.7 *4.16*	77.8 *3.69*	63.7 *3.82;3.79*
→3)-β-Gal*p*-(1→	106.6 *4.67*	72.9 *3.78*	83.9 *3.86*	71.5 *4.11*	77.8 *3.69*	63.7 *3.77*
→6)-β-Gal*p*-(1→	106.2 *4.47*	73.6 *3.56*	75.4 *3.69*	71.4 *3.97*	76.6 *3.91*	72.8 *4.04;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	106.2 *4.55*	72.8 *3.71*	83.6 *3.80*	71.0 *4.12*	76.6 *3.91*	72.8 *4.04;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	106.2 *4.48*	72.8 *3.68*	83.6 *3.86*	71.0 *4.21*	76.6 *3.91*	72.8 *4.04;3.91*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A	н.о. *4.49*	75.7 *3.36*	77.9 *3.55*	85.1 *3.30*	н.о. *3.72*	179.5
α-Ara*f*-(1→	110.1 *5.15*	83.8 *4.13*	79.6 *3.95*	86.8 *4.05*	63.8 *3.81;3.71*	
α-Ara*f*-(1→	112.2 *5.24*	84.2 *4.20*	79.6 *3.98*	86.5 *4.13*	63.8 *3.81;3.71*	
α-Ara*f*-(1→	111.3 *5.44*	84.2 *4.19*	79.6 *3.98*	86.5 *4.12*	63.8 *3.81;3.71*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	110.4 *5.09*	83.8 *4.12*	79.6 *4.00*	85.0 *4.21*	69.4 *3.87;3.78*	
→3,5)-α-Ara*f*-(1→	110.5 *5.11*	н.о. *4.28*	н.о. *4.09*	н.о. *4.29*	69.0 *3.95;3.85*	

н.о. – не определены.

В сильном поле $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектра полисахарида HS_O-I-F_{1-2} присутствуют сигналы C6/H6 19.3/1.25 и 19.6/1.31 м.д., обусловленные CH_3-группами остатков α-L-Rha. Более того, в этом спектре отмечаются корреляционные кросс-пики атомов C2/H2 79.2/4.04 м.д., 78.9/4.12 м.д. и C4/H4 83.5/3.67 м.д., свидетельствующие о присутствии 1,2-связанных и 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p*.

Подробный анализ ЯМР спектров полисахарида HS_O-I-F_{1-2} позволил также установить сигналы высокой интенсивности, относящиеся к остаткам T-β-D-Gal*p*, 1,3- и 1,6-связанной β-D-Gal*p*, 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p* и 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, свидетельствующим о том, что данный полисахарид имеет схожие элементы структуры, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-H_1-F.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-F_{1-2} наблюдаются корреляционные кросс-пики: H1/H3 4.67/3.86 м.д., H1/H5 4.67/3.69 м.д., подтверждающие присутствие участков: …→3)-β-Gal*p*-(1→3)-β-Gal*p*-(1→...; H1/H3 4.47/3.69 м.д., H1/H5 4.47/3.91 м.д., H1/H6 4.47/4.04 м.д., свидетельствующие о присутствии значительных участков: …→6)-β-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→....

В гомоядерном спектре COSY данной фракции присутствуют корреляционные кросс-пики H1/H2 4.48/3.68 м.д. и H1/H2 4.55/3.71 м.д., относящиеся к 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p*. Более того, в двумерном спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-F_{1-2} (рис. 15) отмечаются сигналы высокой интенсивности атомов C6/H6;H6′ 72.8/4.04;3.91 м.д., относящиеся к 1,6-связанным и 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p*.

Кроме того, в двумерных ЯМР спектрах полисахарида HS_O-I-F_{1-2} наблюдаются сигналы невысокой интенсивности 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p*, что указывает на их невысокое содержание, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-H_2, полученным с помощью метода ЧКГ, где вышеприведенные остатки были доминирующими.

В аномерной области спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC фрагмента HS_O-I-F_{1-2} имеются сигналы высокой интенсивности остатков T-α-L-Ara*f* при 111.3/5.44 м.д., 112.2/5.24 м.д., а также 1,5-связанных остатков α-L-Ara*f* при 110.4/5.09 м.д., что, по всей вероятности, свидетельствует о присутствии фрагментов …→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,
…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или
α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→….

В спектре COSY также отмечаются сигналы невысокой интенсивности атомов H1/H2 остатков T-α-L-Ara*f* 5.15/4.13 м.д. и 3,5-ди-*O*-замещенной α-L-Ara*f* 5.11/4.28 м.д.

Следует отметить, что в одномерных и двумерных спектрах ЯМР фрагмента HS_O-I-F_{1-2} присутствуют сигналы 3,6-ди-*O*-замещенных остатков β-D-Gal*p* (H1/H2 4.55/3.71 м.д.), которые отсутствовали в спектрах полисахаридов HS_O-I-H_2 и HS_O-I-H_1-F. Вероятно, сигнал H1/H2 при 4.55/3.71 м.д. относится к 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p* боковой углеводной цепи, замещенных остатками T-α-L-Ara*f* и/или 1,5-связанной α-L-Ara*f*, в соответствии с предыдущими исследованиями AGP [166, 173, 176, 210]. Аналогичный вывод был ранее также сделан для фракции HS_W-I_1.

3.2.19. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3

Анализ одномерных и двумерных спектров полисахарида HS_O-I-F_3 позволил обнаружить сигналы, принадлежащие остаткам 1,4-α-D-Gal*p*A, гликозилирующим остатки 1,2-α-L-Rha*p*, а также остаткам 1,2-α-L-Rha*p*, гликозилирующим остатки 1,4-α-D-Gal*p*A (табл. 19), что свидетельствует о присутствии участков: ...→2)-α-Rha*p*-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→...,
…→4)-α-Gal*p*A-(1→2)-α-Rha*p*-(1→....

Следует отметить полное отсутствие в спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-F_3 остатков ацетилированной 1,4-связанной α-D-Gal*p*A и низкое

содержание остатков метилэтерифицированной 1,4-связанной α-D-Gal*p*A (СМ 6%) (рис. 16), в отличие от полисахарида HS_O-I-F_2, где данные остатки составляли значительную часть углеводных цепей макромолекулы пектина.

Таблица 19. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-F_3

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		101.6 *5.01*	71.1 *3.81*	71.4 *3.90*	73.7 *4.29*	74.4 *4.65*	177.8
→4)-α-Gal*p*A-(1→2		100.6 *5.01*	71.5 *3.89*	73.0 *4.12*	80.0 *4.41*	74.4 *4.65*	177.8
α-Rha*p*-(1→		103.7 *4.76*	72.2 *3.93*	72.4 *3.77*	74.7 *3.39*	71.2 4.02	19.4 *1.29*
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.4 *5.30*	79.0 *4.04*	71.6 *3.88*	74.6 *3.41*	72.5 *3.76*	19.4 *1.25*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→		101.4 *5.27*	79.0 *4.12*	73.2 4.08	83.2 *3.67*	71.7 *3.81*	19.4 *1.31*
β-Gal*p*-(1→	Gt*	106.3 *4.43*	73.8 *3.53*	75.5 *3.65*	71.4 *3.92*	78.0 *3.69*	63.8 *3.76*
β-Gal*p*-(1→	Gt	106.9 *4.61*	73.8 *3.52*	75.5 *3.66*	71.4 *3.93*	78.0 *3.69*	63.8 *3.76*
→3)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,3}$	106.9 *4.69*	73.2 *3.78*	83.8 *3.85*	71.3 *4.11*	78.0 *3.69*	63.8 *3.76*
→6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,6}$	106.4 *4.47*	73.7 *3.55*	75.5 *3.69*	71.4 *3.96*	76.6 *3.91*	72.4 *4.04;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{3,6}$	106.2 *4.52*	72.8 *3.71*	83.8 *3.83*	71.0 *4.12*	76.5 *3.90*	72.4 *4.04;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{3,6}$	106.2 *4.48*	72.8 *3.68*	83.8 *3.78*	71.0 *4.20*	76.5 *3.90*	72.4 *4.04;3.91*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A	GA	н.о. *4.48*	75.9 *3.36*	78.0 *3.54*	85.1 3.28	79.4 *3.69*	179.5
α-Ara*f*-(1→	At	112.4 *5.25*	84.3 *4.20*	79.5 *3.95*	86.9 *4.11*	63.8 *3.82;3.72*	
α-Ara*f*-(1→	At*	111.4 *5.42*	84.3 *4.18*	79.5 *3.98*	86.9 *4.12*	63.8 *3.82;3.72*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	$A_{1,5}$	110.5 *5.08*	83.8 *4.12*	79.5 *4.00*	85.0 *4.21*	69.6 *3.87;3.78*	
→3,5)-α-Ara*f*-(1→	$A_{3,5}$	110.5 *5.11*	н.о. *4.28*	н.о. *4.09*	н.о. *4.29*	69.4 *3.95;3.85*	

н.о. – не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

Согласно соотношению интегральных интенсивностей сигналов атомов H6 в ^{1}H-ЯМР спектре, 1,2-связанные остатки α-L-Rha*p* (1.25 м.д.) и 2,4-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Rha*p* (1.31 м.д.) в совокупности с остатками T-α-L-Rha*p* (1.29 м.д.) присутствуют в соотношении 75:25 свидетельствующим о том, что большинство остатков α-L-Rha*p* не являются точками разветвления главной углеводной цепи.

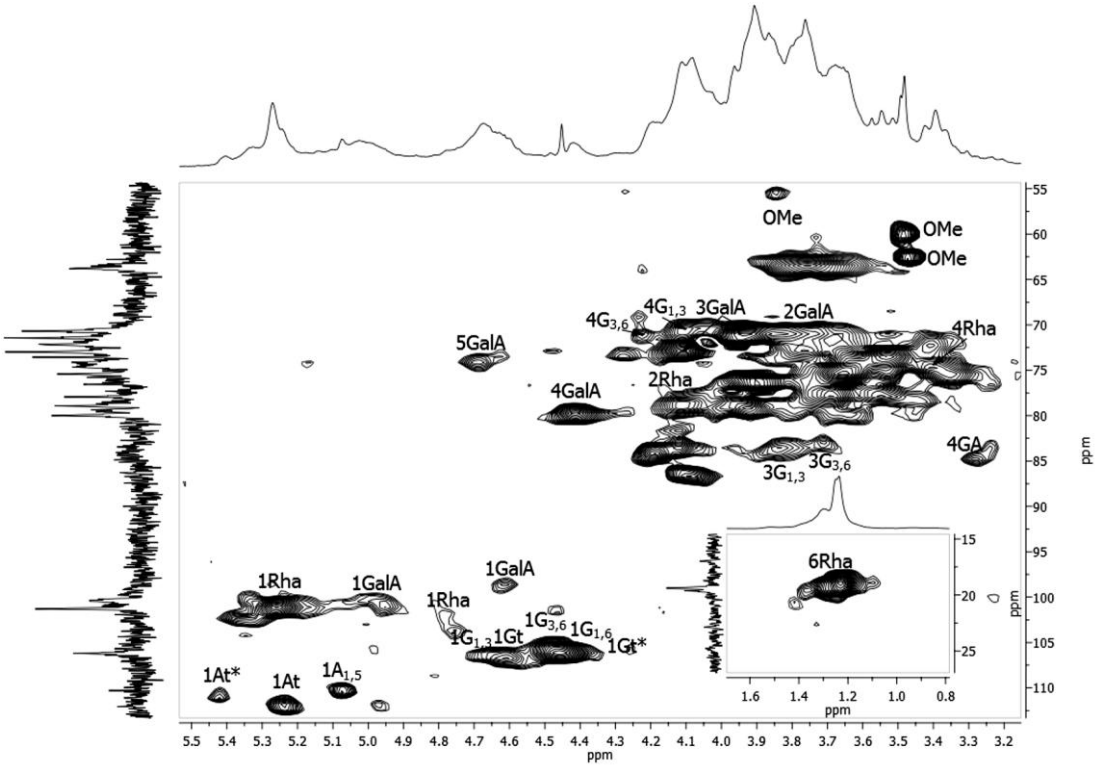

Рисунок 16. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC полисахарида HS_O-I-F_3

Сигналы невысокой интенсивности остатков 1,4-β-D-Gal*p* (4.62/3.68 м.д.) в спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-F_3 свидетельствуют о невысоком содержании данных остатков.

Кроме того, совместный анализ одномерных и двумерных спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-F_3 позволил установить сигналы, относящиеся к остаткам T-β-D-Gal*p*, 6-*O*-, 3-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, T-α-L-Ara*f*, 5-*O*- и 3,5-ди-*O*-замещенной α-L-Ara*f* – характерных компонентов AGP, свидетельствующих о том, что данный полисахарид имеет схожие по строению структурные элементы, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-$F_{1\text{-}2}$.

В спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-F_3 также имеются корреляционные кросс-пики невысокой интенсивности C4/H4 82.4/3.58 м.д., подтверждающие присутствие остатков: …→4)-β-D-Glc*p*A-(1→…, а также C1/H1 103.7/4.76 м.д., свидетельствующие о наличии остатков T-α-L-рамнопиранозы, которые, вероятно, находятся на невосстанавливающих концах боковых цепей и связаны с остатком Glc*p*A посредством 1,4-связи: α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→….

Таким образом, можно заключить, что в полисахариде HS_O-I-F_3, полученном на 3-й ступени ФГ, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-F_{1-2}, полученным на 1-й ступени ФГ, 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 ацетилированного 1,4-α-D-галактопиранозилуронана и участков частично 2-*O*- и в основном 3-*O*- ацетилированного RG-I, боковые цепи которого представлены главным образом остатками 1,4-связанной β-D-Gal*p*, указывающими на наличие 1,4-β-D-галактана или AG-I.

Остатки 3-*O*-, 6-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, T-α-L-Ara*f* и 1,5-связанной α-L-Ara*f*, которые являются характерными компонентами AG-II, вероятно, принадлежат углеводной части макромолекул AGP.

Можно сделать заключение, что результаты, полученные с помощью ФГ, не только подтвердили, но и существенно дополнили полученные при ЧКГ результаты.

3.2.20. Ионообменная хроматография полисахарида HS_O-I-F_3 на ДЭАЭ-целлюлозе

Таким образом, можно сделать заключение, что пектин и AGP продолжительно ассоциируются вместе и не разделяются ни методом частичного кислотного гидролиза, при котором наблюдалось значительное расщепление нейтральных боковых цепей, ни после значительного расщепления главной углеводной цепи методом ферментативного гидролиза.

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-F_3 методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе.

Было установлено, что полисахарид HS_O-I-F_3 состоит главным образом из двух фракций HS_O-I-F_3-2 (выход 49.2%) и HS_O-I-F_3-3 (выход 24.6%), элюируемых 0.1 M и 0.2 M NaCl соответственно (табл. 20). В результате последующего фракционирования фракции HS_O-I-F_3-2 методом гельфильтрационной хроматографии получены фракции HS_O-I-F_3-2_1 и HS_O-I-F_3-2_2. Главными компонентами их углеводных цепей являются остатки GliA, Gal, Ara и Rha (табл. 20).

Таблица 20. Выход и состав фракций, полученных методом ионообменной хроматографии полисахарида HS_O-I-F_3 (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Fuc	Glc	Man
HS_O-I-F_3-1	4.0	-	13.0	6.0	1.5	0.7	0.4	32.5	4.6
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.

3.2.21. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3-2_2

Подробный анализ двумерных и одномерных спектров ЯМР (табл. 21) свидетельствует, что кор полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 состоит главным образом из остатков 1,4-α-Gal*p*A, остатков 1,4-α-Gal*p*A, гликозилирующих 1,2-связанные остатки α-L-Rha*p*, а также из остатков 1,2-α-L-Rha*p*, гликозилирующих 1,4-связанные остатки α-D-Gal*p*A, что свидетельствует о присутствии участков: …→4)-α-Gal*p*A-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→..., …→2)-α-Rha*p*-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→…, …→4)-α-Gal*p*A-(1→2)-α-Rha*p*-(1→....

Также установлено присутствие остатков α-D-Gal*p*A-(1→…, находящихся на невосстанавливающих концах углеводной цепи, и остатков Gal*p*A, представляющих собой α и β аномеры, находящихся на восстанавливающих концах углеводных цепей: …→4)-β-Gal*p*A, …→4)-α-Gal*p*A (рис. 17).

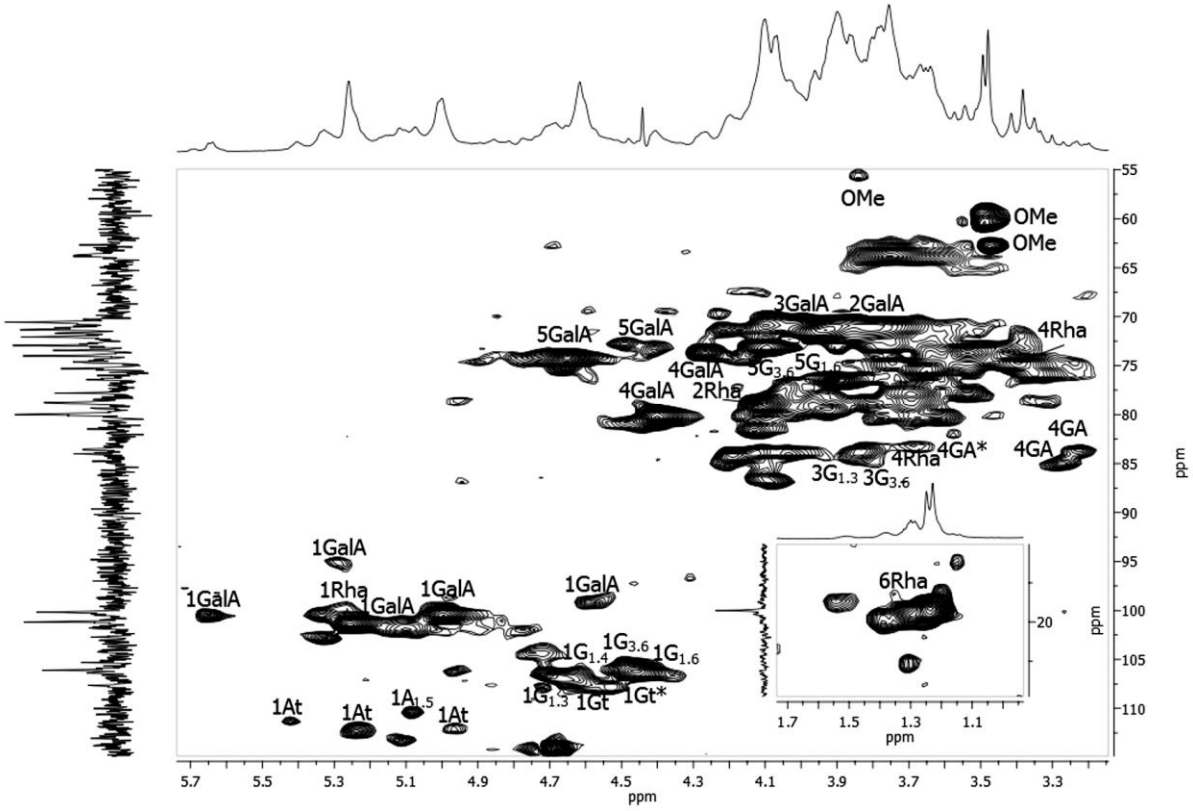

Рисунок 17. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC полисахарида HS_O-I-F_3-2_2

Таблица 21. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-F_3-2_2

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		100.4 *5.01*	71.1 *3.81*	71.5 *3.97*	73.7 *4.29*	74.3 *4.66*	177.7
→4)-α-Gal*p*A-(1→		101.8 *5.08*	71.4 *3.76*	71.8 *4.01*	80.2 *4.40*	74.3 *4.65*	177.7
→4)-α-Gal*p*A-(1→2		100.4 *5.00*	71.7 *3.91*	73.1 *4.11*	80.2 *4.40*	74.3 *4.65*	177.7
→4)-α-Gal*p*A		95.0 *5.29*	70.9 *3.81*	71.6 *3.99*	80.2 *4.41*	74.3 *4.65*	177.7
→4)-β-Gal*p*A		99.1 *4.58*	74.4 *3.48*	74.8 *3.76*	80.7 *4.38*	76.8 *4.06*	177.7
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.4 *5.25*	79.0 *4.12*	71.9 *3.88*	74.8 *3.40*	72.2 *3.79*	19.2 *1.24*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→		101.4 *5.25*	79.0 *4.12*	73.1 *4.08*	83.2 *3.68*	71.7 *3.85*	19.6 *1.29*
β-Gal*p*-(1→	Gt*	107.1 *4.61*	73.7 *3.50*	75.4 *3.66*	71.7 *3.92*	77.9 *3.70*	63.8 *3.78*
β-Gal*p*-(1→	Gt*	106.3 *4.43*	73.7 *3.52*	75.5 *3.66*	71.7 *3.92*	77.9 *3.70*	63.8 *3.78*
→3)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,3}$	106.6 *4.69*	72.9 *3.78*	83.8 *3.83*	71.3 *4.21*	77.9 *3.69*	63.9 *3.78*
→4)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,4}$	107.2 *4.60*	75.4 *3.68*	74.8 *3.77*	80.0 *4.18*	77.9 *3.72*	63.8 *3.82;3.75*
→6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,6}$	106.5 *4.48*	73.7 *3.54*	75.3 *3.69*	71.3 *3.97*	76.6 *3.90*	72.4 *4.03;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{3,6}$	106.2 4.52	73.2 3.69	83.8 *3.85*	70.9 *4.10*	76.6 *3.90*	72.4 *4.03;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{3,6}$	106.2 *4.48*	73.2 *3.68*	83.8 *3.85*	71.3 *4.21*	76.6 *3.90*	72.4 *4.03;3.92*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A-(1→	GA	106.3 *4.46*	75.6 *3.36*	78.1 *3.54*	*85.0* *3.27*	78.9 *3.69*	178.7
4-*O*-Me-β-Glc*p*A-(1→	GA	106.3 *4.46*	75.6 *3.36*	78.1 *3.54*	83.7 *3.23*	78.9 *3.69*	178.7
→4)-β-Glc*p*A-(1→	GA*	105.2 *4.48*	75.6 *3.35*	78.1 *3.55*	82.1 *3.57*	78.9 *3.76*	178.7
α-Ara*f*-(1→	At	111.3 *5.42*	84.2 *4.19*	79.5 *3.98*	86.5 *4.12*	63.8 *3.82;3.73*	
α-Ara*f*-(1→	At	112.3 *5.24*	84.2 *4.20*	79.5 *3.93*	86.8 *4.10*	63.8 *3.82;3.72*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	$A_{1,5}$	110.4 *5.08*	84.1 *4.13*	79.4 *4.02*	85.2 *4.21*	69.3 *3.88;3.81*	

N – обозначения моносахаридных остатков.

В $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектре (рис. 17) полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 также отмечаются сигналы невысокой интенсивности атомов C/H CH_3O-групп 55.8/3.85 м.д., свидетельствующие о присутствии небольших количеств остатков метилэтерифицированной α-D-галактуроновой кислоты (СМ 3%).

Спектры $^{1}H/^{13}C$ HMBC и $^{1}H/^{13}C$ HSQC-NOESY подтверждают присутствие вышеуказанных остатков, в них отмечаются корреляционные кросс-пики: C4/H5 80.2/4.65 м.д., C4/H3 80.2/4.11 м.д., C1/H2 100.4/3.91 м.д., C1/H3 100.4/4.11 м.д., C1/H5 100.4/4.65 м.д., относящиеся к остаткам …→4)-α-Gal*p*A-(1→….

В спектрах $^{1}H/^{13}C$ HMBC, ROESY и $^{1}H/^{13}C$ HSQC-NOESY присутствуют сигналы высокой интенсивности остатков 1,2-α-L-Rha*p* и 1,2,4-α-L-Rha*p* C2/H1 79.0/5.25 м.д., C3/H6 71.9/1.24 м.д., C4/H6 74.8/1.24 м.д., C3/H1 71.9/5.25 м.д., H2/H6 4.12/1.24 м.д., H3/H6 3.88/1.24 м.д., H4/H6 3.40/1.24 м.д., H5/H6 3.79/1.24 м.д..

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 имеются корреляционные кросс-пики: атомов H1 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.25/5.00 м.д.; H1/H4 остатков α-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.25/4.40 м.д., H1/H3 остатков α-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.25/4.11 м.д., свидетельствующих о присутствии участков: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→…; H2/H1 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.00/4.12 м.д., свидетельствующих о присутствии участков: …→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→....

Более того, в спектрах $^{1}H/^{13}C$ HMBC и $^{1}H/^{13}C$ HSQC-NOESY полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 имеются корреляционные кросс-пики:

C1/H4 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 101.4/4.40 м.д.,

H1/C4 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.25/80.2 м.д.,

C1/H3 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 101.4/4.11 м.д.,

C1/H5 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 101.4/4.65 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→....

Интегральные интенсивности сигналов атомов H6 остатков

1,2-α-L-Rha*p* (1.24 м.д.) и 1,2,4-α-L-Rha*p* (1.29 м.д.) в спектре ^{1}H-ЯМР имеют соотношение ~ 75:25, из этого следует, что большинство остатков α-L-Rha*p* не являются точками разветвления главной углеводной цепи.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 присутствуют корреляционные кросс-пики невысокой интенсивности атомов H1/H3,H4 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p* при 4.60/3.77,4.18 м.д., свидетельствующих о невысоком содержании фрагментов: …→4)-β-Gal*p*-(1→4)-β-Gal*p*-(1→….

Подробный анализ двумерных спектров полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 позволил также установить сигналы высокой интенсивности, относящиеся к остаткам T-β-D-Gal*p*, 1,3-связаной β-D-Gal*p*, 1,6-связаной β-D-Gal*p*, 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, а также 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-связаной β-D-Glc*p*A, которые, вероятно, принадлежат углеводной части макромолекул AGP (табл. 21).

В спектре ROESY наблюдаются интенсивные корреляционные кросс-пики: H1/H3,H5,H6 при 4.48/3.69,3.90,4.03 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: …→6)-β-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→..., H1/H3,H5 при 4.69/3.83,3.69 м.д., подтверждающие присутствие фрагментов: …→3)-β-D-Gal*p*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→....

Высокоинтенсивные сигналы атомов C/H CH_3O-групп в спектрах ^{1}H/^{13}C HSQC и ^{1}H/^{13}C HSQC-ROESY при 62.8/3.48 м.д., 60.4/3.49 м.д. и C4/H4 при 85.0/3.27 и 83.7/3.23 м.д. подтверждают наличие остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A. В спектре HMBC также отмечаются интенсивные корреляционные кросс-пики 83.7/3.48 м.д., 85.0/3.49 м.д. подтверждающие, что остатки β-D-Glc*p*A имеют CH_3O-группу по *O*-4 положению.

Также в ^{1}H/^{13}C HSQC спектре полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 (рис. 17) имеется корреляционный кросс-пик C4/H4 82.1/3.57 м.д., указывающий на наличие остатков: …→4)-β-D-Glc*p*A-(1→….

Остатки Gal*p*A и Glc*p*A в полисахариде HS_O-I-F_3-2_2, согласно соотношению интегральных интенсивностей H4 атомов 1,4-α-D-Gal*p*A и H4 атомов 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-β-D-Glc*p*A, присутствуют в соотношении

~2.2:1, что говорит о значительном содержании остатков Glc*p*A (~ 11%).

В аномерной области $^{1}H/^{13}C$ HSQC спектра (рис. 17) отмечаются сигналы высокой интенсивности остатков T-α-L-Ara*f* при 111.3/5.42 м.д., 112.3/5.24 и 112.1/4.96 м.д., а также остатков 1,5-α-L-Ara*f* при 110.4/5.08 м.д. Это позволяет предположить присутствие фрагментов: …→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или

α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→…, как было показано ранее для фракции HS_W-I_1.

Корреляционный кросс-пик в спектре $^{1}H/^{13}C$-HSQC атомов C5/H5 69.6/4.22 м.д. был отнесен к остаткам T-α-L-Fuc*p*, установить остальные сигналы, принадлежащие данным остаткам, не удалось, по-видимому, из-за их низкого содержания. Вероятно, данные остатки находятся на невосстанавливающих концах боковых цепей углеводной части макромолекул AGP, в соответствии с предыдущими исследованиями AGP [174].

Подводя итог вышесказанному, можно сделать заключение, что структурное исследование полисахарида HS_O-I-F_3-2_2 свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи главным образом участков RG-I, боковые цепи которого представлены остатками T-α-L-Ara*f*, T-β-D-Gal*p* и 1,4-связанной β-D-Gal*p*, указывающими на наличие AG типа I. Сигналы высокой интенсивности, принадлежащие 3-*O*-, 6-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p*, остаткам 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, T-α-L-Ara*f* и 1,5-α-L-Ara*f* (характерные для AG-II моносахаридные остатки), указывают на присутствие AGP, как было показано ранее для фракций HS_O-I-$F_{1\text{-}2}$ и HS_O-I-F_3.

3.2.22. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-F_3-3

Подробный анализ ЯМР спектров фрагмента HS_O-I-F_3-3 свидетельствует, что данный фрагмент имеет схожие элементы структуры, в сопоставлении с фрагментом HS_O-I-F_3-2_2 (табл. 22).

Таблица 22. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-F_3-3

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'*
→4)-α-Gal*p*A-(1→2	100.7 *5.02*	70.9 *3.91*	72.8 *4.12*	80.5 *4.43*	73.6 *4.85*	176.1
→2)-α-Rha*p*-(1→	101.8 *5.24*	79.2 *4.12*	71.9 *3.87*	74.8 *3.43*	72.3 *3.72*	19.4 *1.25*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→	101.8 *5.24*	79.3 *4.12*	73.1 *4.08*	83.3 *3.68*	71.7 *3.78*	19.5 *1.30*
β-Gal*p*-(1→	106.5 *4.43*	74.4 *3.52*	75.5 *3.66*	71.0 *3.92*	78.0 *3.70*	63.9 *3.77*
β-Gal*p*-(1→	106.8 *4.63*	74.4 *3.52*	75.5 *3.66*	71.0 *3.92*	78.0 *3.70*	63.9 *3.77*
β-Gal*p*-(1→	106.8 *4.61*	74.4 *3.60*	75.5 *3.66*	71.0 *3.92*	78.0 *3.70*	63.9 *3.77*
→3)-β-Gal*p*-(1→	106.9 *4.68*	72.9 *3.81*	83.7 *3.84*	71.3 *4.21*	78.0 *3.70*	63.9 *3.77*
→4)-β-Gal*p*-(1→	106.7 *4.62*	75.4 *3.68*	74.8 *3.77*	80.0 *4.16*	78.0 *3.70*	63.9 *3.82;3.76*
→6)-β-Gal*p*-(1→	106.5 *4.46*	74.4 *3.55*	75.5 *3.68*	71.3 *3.97*	76.6 *3.89*	72.4 *4.03;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	106.4 *4.48*	73.2 *3.68*	83.7 *3.84*	70.8 *4.12*	76.6 *3.90*	72.4 *4.03;3.92*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A-(1→	106.3 *4.50*	75.4 *3.37*	н.о. *3.54*	н.о. *3.27*	н.о. *3.69*	179.1
α-Ara*f*-(1→	111.4 *5.43*	84.3 *4.20*	79.5 *3.98*	86.9 *4.12*	63.9 *3.82;3.73*	
α-Ara*f*-(1→	112.5 *5.25*	84.2 *4.20*	79.5 *3.95*	86.9 *4.10*	63.9 *3.82;3.72*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	110.5 *5.10*	83.8 *4.13*	79.5 *4.02*	85.2 *4.21*	69.5 *3.88;3.81*	

н.о. – не определены.

В гомоядерном двумерном спектре ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-3 (рис. 18, 19) отмечаются подобные с имеющимися в спектрах ROESY полисахаридов HS_O-I-F_3-2_2, HS_O-I-F_3, HS_O-I-H_1-F, HS_O-I-H_2, HS_O-S_2 корреляционные кросс-пики, свидетельствующие о присутствии участков: ...→2)-α-Rha*p*-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→… и ...→4)-α-Gal*p*A-(1→2)-α-Rha*p*-1→....

Также в спектре ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-3 (рис. 18, 19) отмечаются сильные сигналы, относящиеся к остаткам T-β-D-Gal*p*, 1,4-связанной β-D-Gal*p*, 1,3-связанной β-D-Gal*p*, 1,6-связаной β-D-Gal*p*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, T-α-L-Ara*f* и 1,5-связанной α-L-Ara*f*.

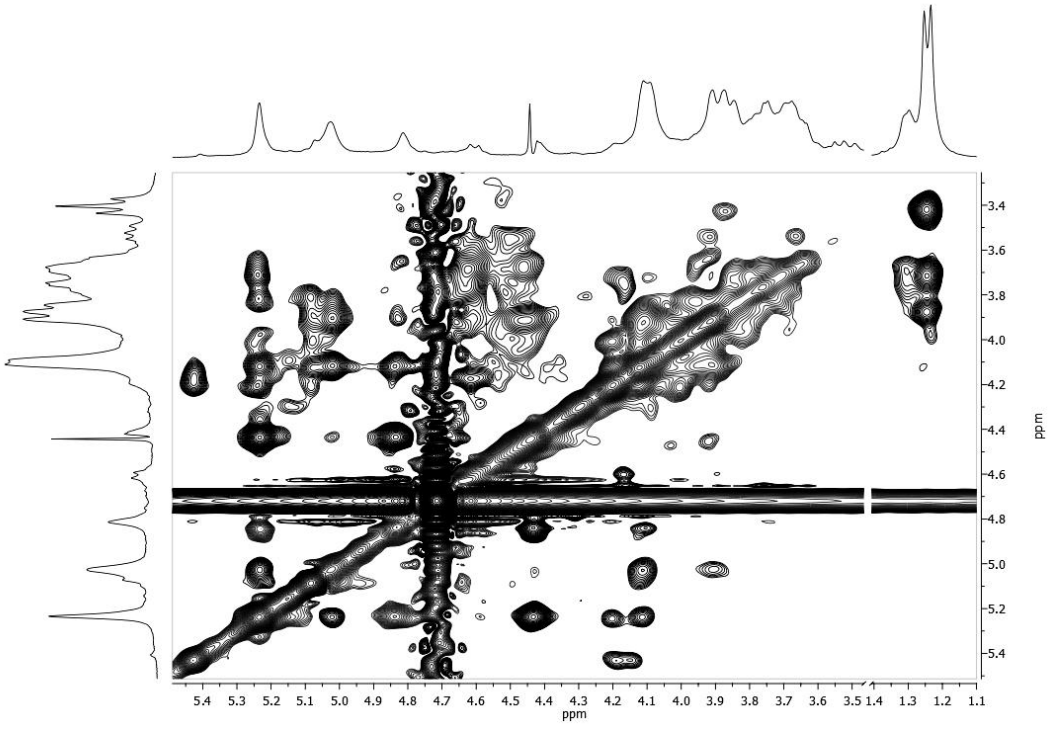

Рисунок 18. Фрагмент спектра ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-3 (температура исследования 303 K)

Следует отметить, что в полисахариде HS_O-I-F_3-3 сигналы, принадлежащие 1,4-связанной β-D-Gal*p*, значительно более интенсивные, а сигналы, принадлежащие 1,3-связаной β-D-Gal*p*, 1,6-связаной β-D-Gal*p* и 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, напротив менее интенсивные, по сравнению с полисахаридом HS_O-I-F_3-2_2.

Можно сделать заключение, что полисахарид HS_O-I-F_3-2_2 имеет более высокое содержание остатков, принадлежащих AG-II, и более низкое

содержание остатков, принадлежащих AG-I, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-F_3-3, что свидетельствует о присутствии в нем большей доли AGP.

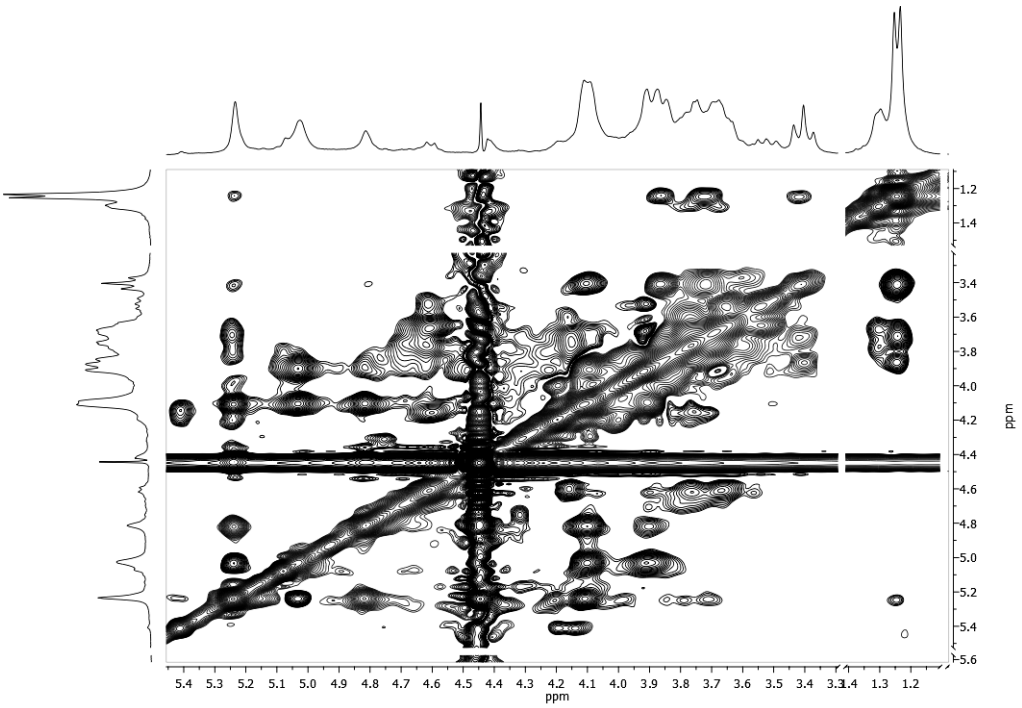

Рисунок 19. Фрагмент спектра ROESY полисахарида HS_O-I-F_3-3 (температура исследования 328 K)

Можно сделать заключение, что полисахарид HS_O-I-F_3-2_2 имеет более высокое содержание остатков, принадлежащих AG-II, и более низкое содержание остатков, принадлежащих AG-I, в сопоставлении с полисахаридом HS_O-I-F_3-3, 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 ионообменной хроматографии, свидетельствует о том, что в полисахариде HS_O-I значительная часть AGP непосредственно связаны с участками RG-I.

3.2.23. Распад по Смиту полисахарида HSo-I

Далее для установления строения пектина из *Heracleum sosnowskyi* был проведен распад по Смиту полисахарида HS_O-I. Метод распада по Смиту позволяет получить новые структурные данные не доступные другими методами углеводной химии.

В результате деградации по Смиту 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 был получен фрагмент HS_O-I-SD_1 (Mw 17 кДа), соответствующий основному пику на хроматограмме. В полисахариде HS_O-I-SD_1 содержание нейтральных моносахаридных остатков (Gal, Rha и Ara) выше, а гликуроновых кислот ниже, чем в исходном полисахариде HS_O-I (табл. 3, 23).

Таблица 23. Выход и состав полисахарида HS_O-I-SD_1 (вес. %)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_O-I-SD_1	12.0	50.0	25.0	6.0	8.7	0.5	0.6	сл.	3.8

* - от исходного полисахарида HS_O-I; сл. - следы.

Полученный фрагмент HS_O-I-SD_1 был изучен с помощью спектроскопии ЯМР.

3.2.24. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-SD_1

Моносахаридный анализ и данные по ЯМР спектроскопии полисахарида HS_O-I-SD_1 (табл. 23, 24) указывают на то, что в результате распада по Смиту существенная часть остатков α-D-GalA разрушается, что свидетельствует о присутствии неацетилированных 1,4-связанных остатков α-D-Gal*p*A, а также ацетилированных 1,4-связанных остатков α-D-Gal*p*A или имеющих точки замещения по 2-му и/или 3-му положению остатков 1,4-α-D-Gal*p*A, неподвергающихся окислению IO_4^-.

Таблица 24. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-SD_1

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		102.4 *5.06*	71.8 *3.71*	71.8 *3.91*	73.8 *4.29*	74.7 *4.72*	177.5
→4)-α-Gal*p*A-(1→		102.4 *5.08*	71.8 *3.78*	71.9 *4.03*	81.8 *4.42*	74.5 *4.80*	177.5
→4)-α-Gal*p*A-(1→2		н.о. *5.01*	71.7 *3.91*	73.2 *4.11*	80.5 *4.42*	74.5 *4.66*	177.5
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.5 *5.26*	80.4 *4.12*	71.9 *3.88*	74.9 *3.41*	72.5 *3.77*	19.5 *1.24*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→		101.5 *5.26*	80.4 *4.12*	73.2 *4.08*	83.5 *3.68*	71.7 *3.85*	19.7 *1.31*
β-Gal*p*-(1→	Gt	107.4 *4.58*	74.3 *3.60*	75.7 *3.65*	71.7 *3.91*	77.6 *3.72*	64.1 *3.77*
β-Gal*p*-(1→	Gt*	н.о. *4.43*	74.6 *3.53*	75.7 *3.66*	71.7 *3.92*	77.6 *3.71*	64.1 *3.77*
→3)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,3}$	106.5 *4.68*	н.о. *3.81*	85.0 *3.90*	71.6 4.23	77.6 *3.72*	64.1 *3.77*
→4)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,4}$	107.4 *4.63*	74.9 *3.68*	76.3 *3.76*	80.5 *4.16*	77.6 *3.71*	64.1 *3.82;3.79*
→6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{1,6}$	106.2 *4.48*	74.6 *3.54*	75.7 *3.68*	71.7 *3.96*	76.5 *3.91*	н.о. *4.04;3.92*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G_{3,6}$	106.0 *4.52*	73.0 *3.66*	83.3 *3.77*	71.6 *4.13*	76.5 *3.91*	н.о. *4.04;3.92*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A	GA	н.о. *4.50*	76.0 *3.36*	н.о. *3.55*	н.о.	н.о. *3.71*	179.5
α-Ara*f*-(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-Ara*f*-(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-Ara*f*-(1→	At**	112.4 *5.24*	84.5 *4.20*	79.6 *3.95*	86.8 *4.13*	64.1 *3.81;3.71*	
→5)-α-Ara*f*-(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-Ara*f*-(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-Ara*f*-(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*	

н.о. – не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

Положение сигналов в одномерных и двумерных спектрах фрагмента HS_O-I-SD_1 свидетельствует о наличии в его главной цепи участков, представленных остатками 1,4-α-D-Gal*p*A, а также остатков α-D-Gal*p*A-(1→..., находящихся на невосстанавливающих концах углеводной цепи (табл. 24, рис. 20).

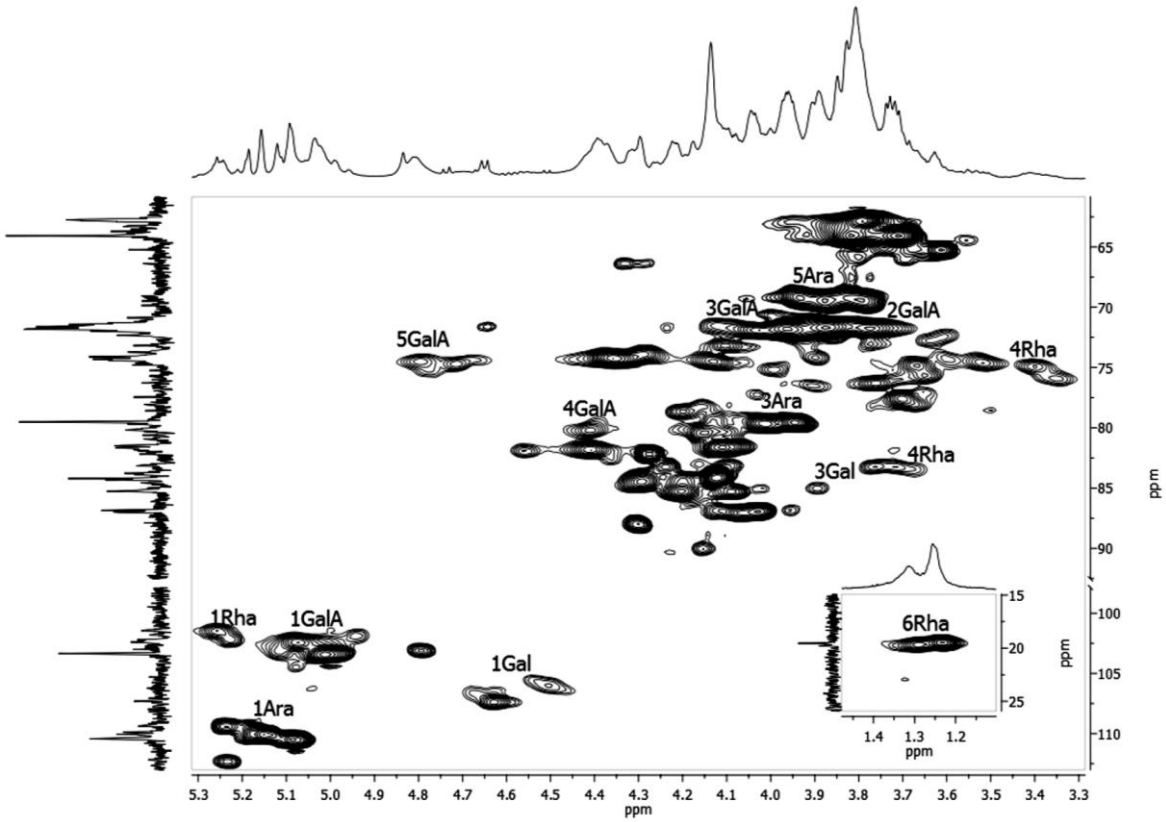

Рисунок 20. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC полисахарида HS_O-I-SD_1

В резонансной области аномерных атомов спектра ^{1}H/^{13}C HSQC полисахарида HS_O-I-SD_1 (рис. 20, табл. 24) имеются сигналы высокой интенсивности остатков α-L-Rha*p* (C1/H1 101.5/5.26 м.д.).

В сильном поле спектра ^{1}H/^{13}C HSQC имеются сигналы атомов C6/H6 19.5/1.24, 19.7/1.31 м.д., принадлежащие CH_3-группе остатков α-L-Rha*p*. Гетероядерный спектр HMBC также свидетельствует о присутствии остатков α-L-Rha*p*, в нем отмечаются корреляционные кросс-пики атомов C3/H6 71.9/1.24 м.д., C4/H6 74.9/1.24 м.д., C3/H1 71.9/5.26 м.д., C5/H1 72.5/5.26 м.д., C4/H3 74.9/3.88 м.д. [144, 222]. Спектры TOCSY, COSY и ROESY также свидетельствуют о присутствии вышеприведенных остатков α-L-Rha*p*.

В спектре ROESY полисахарида HS_O-I-SD_1 наблюдаются аналогичные со спектрами ROESY полисахаридов HS_O-S_2, HS_O-I-H_2, HS_O-I-H_1-F и HS_O-I-F_3 кросс-пики: атомов H1 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.26/5.01 м.д., атомов H1/H4 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.26/4.42 м.д., атомов H1/H3 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.26/4.11 м.д., свидетельствующих о присутствии участков: ...→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→…; атомов H2/H1 остатков α-L-Rha*p*/1,4-α-D-Gal*p*A 5.01/4.12 м.д., подтверждающих присутствие участков: …→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→....

Также в спектре ROESY присутствуют корреляционные кросс-пики атомов H1/H3,H4,H5,H6 1,4-связанных остатков β-D-галактопиранозы: 4.63/3.76,4.16,3.71,3.79 м.д., свидетельствующих о присутствии фрагмента: …→4)-β-Gal*p*-(1→4)-β-Gal*p*-(1→… [222].

Спектры HMBC (рис. 21) и HSQC-ROESY (рис. 22) подтверждают присутствие вышеприведенных остатков β-D-Gal*p*, в них отмечаются корреляционные кросс-пики: C4/H1 80.5/4.63 м.д., C1/H4 107.4/4.16 м.д., C1/H5 107.4/3.71 м.д., C1/H3 107.4/3.76 м.д., C1/H2 107.4/3.68 м.д. 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p*. Кросс-пик в спектре HMBC при 107.4/3.68 м.д. может также принадлежать атомам C1 остатков 1,4-β-D-Gal*p* и H4 остатков 1,2,4-α-L-Rha*p* и указывать на замещение 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p* остатками 1,4-β-D-Gal*p* по *O*-4 положению.

Наличие в ЯМР спектрах полисахаридов, полученных методом распада по Смиту, интенсивных сигналов, принадлежащих остаткам 1,4-связанной β-D-Gal*p*, указывает на то, что ранее данные остатки представляли собой точки разветвления боковой углеводной цепи и, вероятно, были представлены 3,4-ди-*O*-замещенными остатками β-D-Gal*p*.

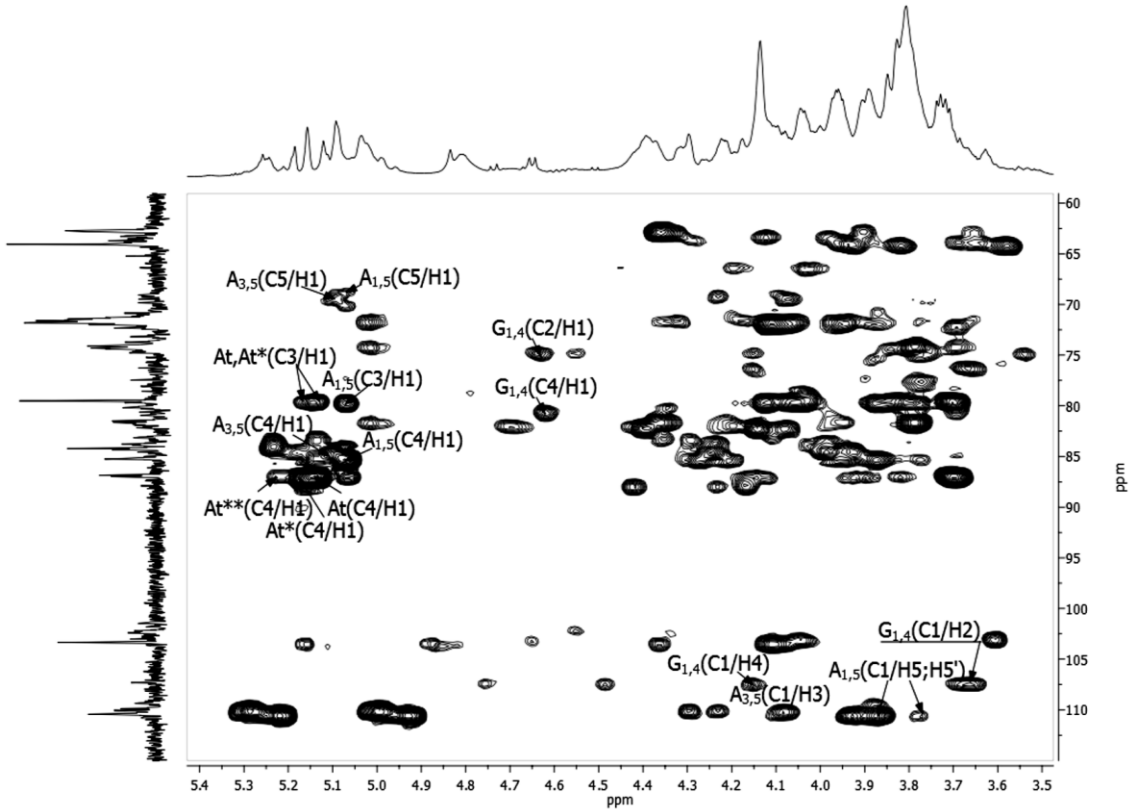

Рисунок 21. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HMBC полисахарида HS_O-I-SD_1

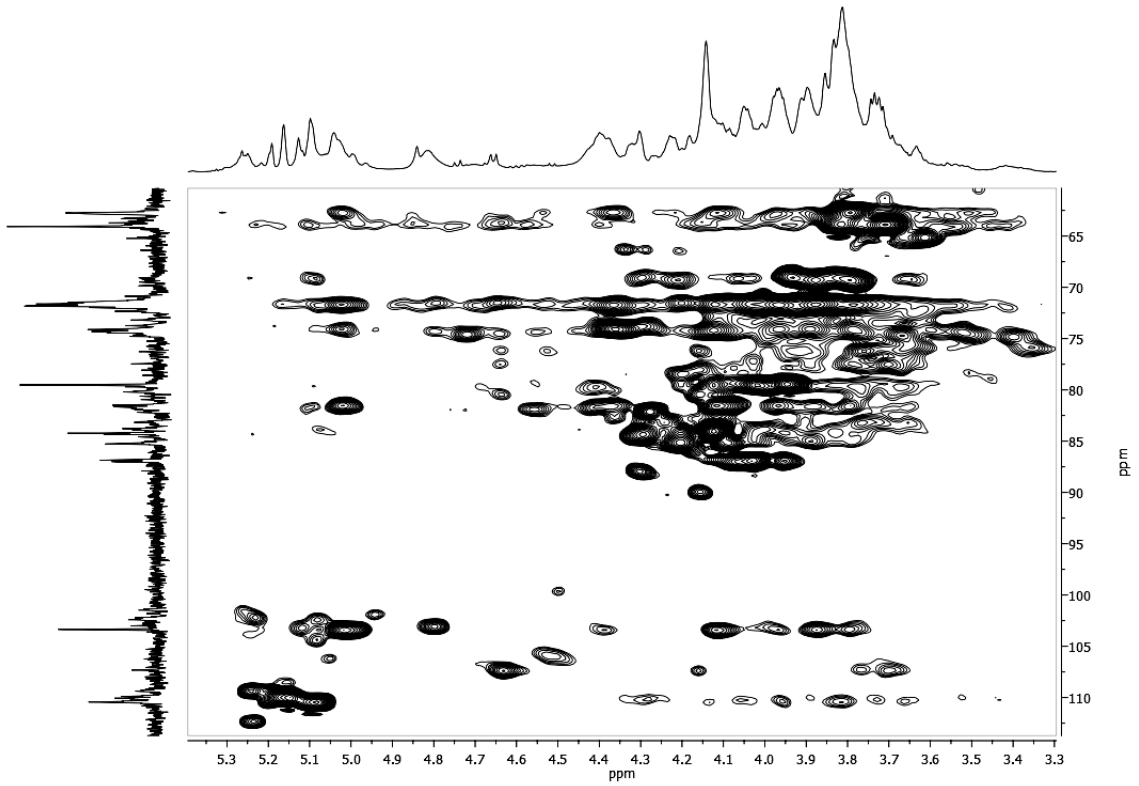

Рисунок 22. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC-ROESY полисахарида HS_O-I-SD_1

Известно, что кислотный гидролиз макромолекул в мягких условиях расщепляет преимущественно гликозидные связи остатков арабинозы в фуранозной форме. Ранее при проведении частичного кислотного гидролиза было показано, что кислотная обработка привела к удалению всех остатков арабинозы, в связи с чем, не представлялось возможным определить: являются ли боковые углеводные цепи RG-I 1,4-β-D-галактаном или AG-I. Значительное количество остатков 1,4-связанной β-D-Gal*p*, наблюдаемых после обработки IO_4^- полисахарида HS_O-I, указывает на то, что некоторая часть боковых цепей данного полисахарида представлена AG-I.

Кроме того, совместный анализ одномерных и двумерных спектров фрагмента HS_O-I-SD_1 позволил установить сигналы, относящиеся к остаткам T-β-D-Gal*p*, 6-*O*-, 3-*O*-, 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p* и 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A (табл. 24) – характерных компонентов AG типа II.

Согласно соотношению интегральных интенсивностей сигналов H1/H2-атомов остатков β-D-Gal*p* спектров ^{1}H-ЯМР и COSY следует, что преобладают остатки 1,4-β-D-Gal*p*. Следующими по интенсивности являются сигналы, принадлежащие остаткам 1,6- и 1,3-β-D-Gal*p*. Значительную интенсивность сигналов остатков 1,6-β-D-Gal*p* можно объяснить окислением IO_4^- остатков T-α-L-Ara*f*, находящихся на периферии макромолекулы, которые ранее гликозилировали остатки 1,6-β-D-Gal*p* по 3-му положению.

Из-за окисления периодатом остатков T-α-L-Ara*f*, присоединённых по 3-му положению к остаткам 1,6-связанной β-D-Gal*p*, интенсивность сигнала, принадлежащего к 3,6-ди-*O*-замещенным остаткам β-D-Gal*p*, была наименьшая из всех других остатков галактозы.

Таким образом, значительная часть остатков 1,6-связанной β-D-Gal*p* боковых цепей замещена остатками α-L-Ara*f* по *O*-3 положению, в соответствии с предыдущими сообщениями по структуре AGP, сделанными различными исследователями с использованием разнообразного растительного сырья [166, 173, 210].

При интерпретации спектров ЯМР полисахарида HS_O-I-SD_1 отмечено присутствие остатков GlcA после окисления IO_4^-, что может указывать на то, что по крайней мере некоторая часть остатков GlcA в AGP замещены, возможно, по 2-му или 3-му положению. Следует отметить, что уроновые кислоты в полисахариде HS_O-I-SD_1 представлены главным образом остатками 1,4-α-D-Gal*p*A и минорными количествами 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A.

Интересно отметить, что после окисления IO_4^- наблюдается высокое содержание арабинозы. Подробный анализ ^{13}C- и ^{1}H-ЯМР спектров при помощи двумерной спектроскопии HSQC, COSY, TOCSY, ROESY и HMBC полисахарида HS_O-I-SD_1 свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи остатков T-, 1,5-α-L-Ara*f*, 1,3,5-α-L-Ara*f* и 1,2,5-α-L-Ara*f*.

В спектре COSY удалось соотнести H1 сигнал остатка 1,5-связанной α-L-Ara*f* при 5.08 м.д. с H2 при 4.12 м.д., H2 с H3 при 4.02 м.д., H3 с H4 при 4.21 м.д., H4 с H5;5' при 3.87;3.78 м.д. Соответствующие резонансы C1-C5 атомов данного остатка были установлены с использованием спектра HSQC.

В ^{1}H/^{13}C HSQC спектре сигналы атомов C1/H1 110.1/5.18 м.д., C2/H2 89.9/4.16 м.д. принадлежат к 2,5-ди-*O*-замещенным остаткам α-L-Ara*f*. Спектр HMBC также свидетельствует о присутствии вышеприведенных остатков α-L-Ara*f* присутствием корреляционных пиков C4/H1 при 84.5/5.18 м.д. [231].

В спектре HMBC (рис. 21) полисахарида HS_O-I-SD_1 установлено присутствие корреляционных пиков: C4/H1 (At) при 86.9/5.14 м.д., C4/H1 (At^*) при 86.9/5.17 м.д., C4/H1 ($A_{1,5}$) при 85.3/5.08 м.д., C4/H1 ($A_{3,5}$) при 84.5/5.11 м.д., C3/H1 (At) при 79.6/5.14 м.д., C3/H1 (At^*) при 79.6/5.17 м.д., C3/H1 ($A_{1,5}$) при 79.6/5.08 м.д. (обозначения смотри в табл. 24), подтверждающих присутствие вышеприведенных остатков α-L-Ara*f* [223].

Более того, в спектре HMBC наблюдаются сигналы высокой интенсивности атомов C1($A_{1,5}$)/H5;5'($A_{1,5}$) 110.5/3.87;3.78 м.д., атомов C5($A_{1,5}$)/H1($A_{1,5}$) 69.4/5.08 м.д., подтверждающих присутствие фрагментов: …→5)-α-Ara*f*-(1→5)-α-Ara*f*-(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, свидетельствующих о присутствии фрагментов: …→5)-α-Ara*f*-(1→3,5)-α-Ara*f*-(1→…, в которых 1,5-связанные остатки α-L-Ara*f* гликозилируют 3,5-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Ara*f* по атому *O*-5.

В спектре ROESY данного полисахарида установлено присутствие корреляционных кросс-пиков: атомов H1/H3,H5,5' 1,5-связанных остатков α-L-Ara*f* при 5.08/4.02, 5.08/3.87;3.78 м.д., подтверждающих присутствие участков: …→5)-α-Ara*f*-(1→5)-α-Ara*f*-(1→…; атомов H1/H3 остатков T-α-L-Ara*f*/1,3,5-α-L-Ara*f* 5.17/4.09 м.д., свидетельствующих о замещении 3,5-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Ara*f* по атому *O*-3 остатками T-α-L-Ara*f*; атомов H1/H5,5' остатков 1,3,5-α-L-Ara*f*/1,5-α-L-Ara*f* 5.11/3.87;3.78 м.д., свидетельствующих о присутствии участков:

…→3,5)-α-Ara*f*-(1→5)-α-Ara*f*-(1→….

Спектры HSQC-NOESY и HSQC-TOCSY (рис. 23) содержат сигналы, также подтверждающие присутствие вышеприведенных остатков α-L-Ara*f*.

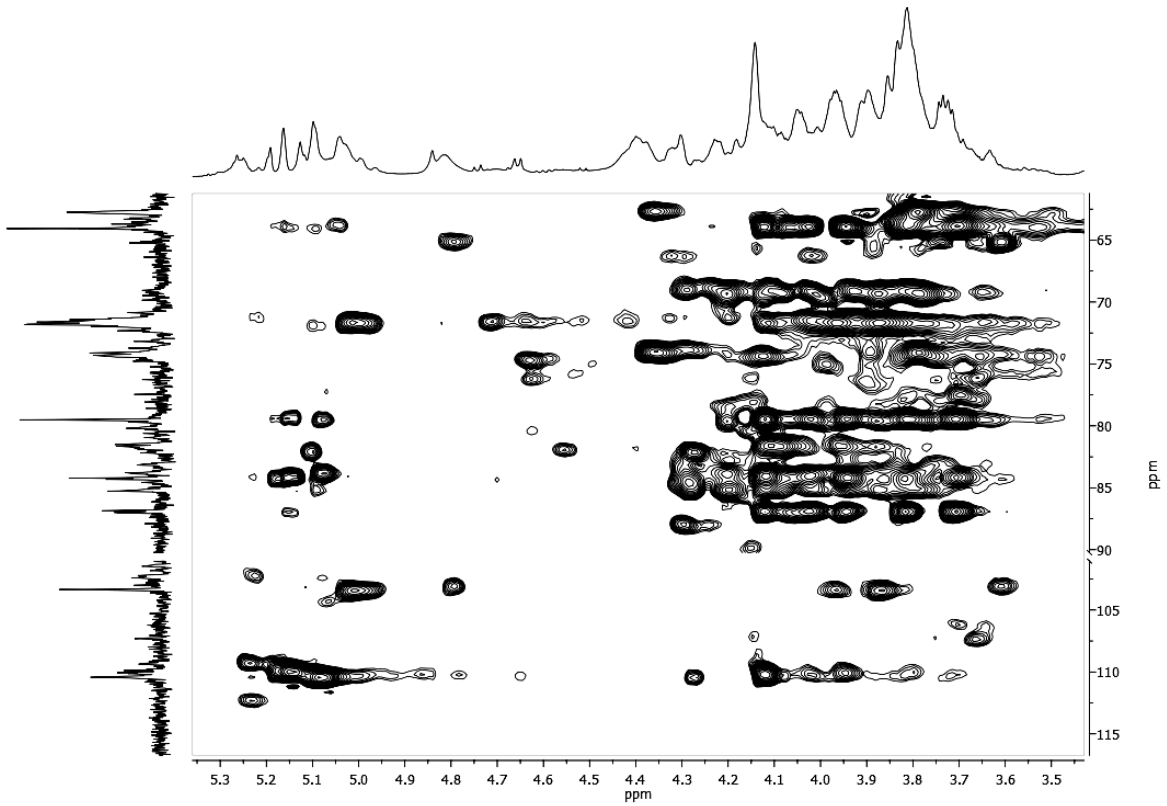

Рисунок 23. Фрагмент спектра $^{1}H,^{13}C$-HSQC-TOCSY полисахарида HS_O-I-SD_1

Наличие 1,5-связанных остатков α-L-Ara*f* может указывать на то, что ранее данные остатки представляли собой точки разветвления боковой углеводной цепи (2,5-ди-*O*- и/или 3,5-ди-*O*-замещенная α-L-Ara*f*). Наличие 2,5-ди-*O*- и 3,5-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Ara*f*, не затронутых при действии периодата, может свидетельствовать о высокой степени разветвленности боковых углеводных цепей.

Таким образом, значительное количество остатков α-L-Ara*f*, отмечаемых после обработки IO_4^- полисахарида HS_O-I, свидетельствует о присутствии в боковой цепи RG-I участков разветвленного 1,5-α-L-арабинана. Данный вывод подтверждается результатами, полученными ранее: объединенные водно-спиртовые супернатанты фракций HS_O-I – HS_O-V (фракция HS_O-S_2) содержали пектиновый полисахарид, содержащий фрагменты высокоразветвленного 1,5-α-L-арабинана в боковой углеводной цепи RG-I.

Интегральные интенсивности сигналов H6-атомов остатков 1,2-α-L-Rha*p* (1.24 м.д.) и 1,2,4-α-L-Rha*p* (1.31 м.д.) ^{1}H-ЯМР спектра имеют соотношение ~ 63:37, из этого следует, что существенная часть 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p* содержит по атому *O*-4 моносахаридные остатки, не подвергающиеся действию IO_4^-, например, 3,4-ди-*O*-замещенные остатки β-D-Gal*p* и/или 3,5-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Ara*f*.

3.2.25. Ферментативный гидролиз полисахарида HS_O-I-SD

В результате ферментативного гидролиза α-1,4-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I-SD, полученного методом распада по Смиту полисахарида HS_O-I, и последующим фракционированием ферментолизата методом гельхроматографии на сефакриле, получили полисахарид HS_O-I-SD-F, соответствующий главному пику на выходной кривой, и минорную фракцию, которую далее не исследовали. Главными

компонентами углеводной цепи полисахарида HS_O-I-SD-F являются остатки GliA, Gal и Rha (табл. 25).

Таблица 25. Выход и состав полисахарида HS_O-I-SD-F (вес.%)

Фракции	Выход*, %	GliA	Нейтральные моносахариды						Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Glc	Man	
HS_O-I-SD-F	10.8	32.0	22.6	3.1	9.5	0.7	2.2	0.2	4.8

* - от исходного полисахарида HS_O-I

ФГ полисахарида HS_O-I-SD сопровождается заметным расщеплением углеводной цепи, поскольку выход полисахарида, полученного после ферментативного гидролиза, составил 30.8%, что подтверждает присутствие значительных участков линейного неэтерифицированного галактуронана.

Полученный при ферментативной обработке полисахарид HS_O-I-SD-F характеризуется значительным содержанием нейтральных моносахаридных остатков и невысоким содержанием уроновых кислот (табл. 25).

3.2.26. ЯМР исследования полисахарида HS_O-I-SD-F

Результаты ЯМР спектроскопии свидетельствуют о наличии в полисахариде HS_O-I-SD-F остатков 1,4-связанной α-D-Gal*p*A, остатков α-D-Gal*p*A-(1→, находящихся на невосстанавливающих концах углеводной цепи, и остатков, представляющих собой β аномеры и находящихся на восстанавливающих концах углеводных цепей …→4)-β-D-Gal*p*A, а также 1,2-связанных и 2,4-ди-*O*-замещенных остатков α-L-Rha*p* (табл. 26).

В спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC (рис. 24) полисахарида HS_O-I-SD-F присутствуют сигналы значительно более высокой интенсивности, по сравнению со спектром $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-SD_1, остатков 1,4-связанной α-D-Gal*p*A, гликозилирующих остатки 1,2-связанной α-Rha*p*, а также остатков 1,2-связанной α-L-Rha*p*, гликозилирующих остатки 1,4-связанной α-D-Gal*p*A, подтверждающих присутствие фрагментов: ...→2)-α-Rha*p*-(1→4)-α-Gal*p*A-(1→..., …→4)-α-Gal*p*A-(1→2)-α-Rha*p*-(1→..., а

интенсивность сигналов остатков 1,4-α-D-галактуроновой кислоты, гликозилирующих остатки 1,4-α-D-галактуроновой кислоты, снизилась.

Таблица 26. ^{13}C и ^{1}H ЯМР данные полисахарида HS_O-I-SD-F

Остатки	N	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-Gal*p*A-(1→		102.3 *5.05*	71.1 *3.71*	71.3 *3.91*	73.5 *4.29*	74.2 *4.71*	177.0
→4)-α-Gal*p*A-(1→2		100.4 *5.02*	71.2 *3.91*	72.5 *4.11*	*80.3* *4.44*	73.5 *4.85*	177.0
→4)-α-Gal*p*A-(1→		102.2 *5.07*	71.1 *3.81*	71.3 3.98	81.4 *4.46*	73.5 *4.85*	177.0
→4)-β-Gal*p*A		98.9 *4.62*	74.0 *3.52*	74.4 *3.77*	80.2 *4.35*	н.о. *4.07*	177.0
→2)-α-Rha*p*-(1→		101.5 *5.23*	79.0 *4.12*	71.9 *3.87*	74.3 *3.42*	72.3 *3.72*	18.9 *1.24*
→2,4)-α-Rha*p*-(1→		101.5 *5.23*	79.0 *4.12*	72.2 4.08	83.3 3.68	71.5 *3.81*	19.2 *1.31*
β-Gal*p*-(1→6		106.1 *4.44*	74.2 *3.52*	75.1 *3.64*	71.3 *3.91*	77.8 *3.71*	63.7 *3.81;3.77*
β-Gal*p*-(1→3	Gt	106.4 *4.61*	74.3 *3.61*	75.1 *3.65*	71.2 *3.91*	77.8 *3.72*	63.7 *3.81;3.77*
→3)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(I)}$	106.3 4.68	72.7 *3.78*	84.7 *3.86*	71.2 *4.21*	77.3 *3.72*	63.7 *3.81;3.77*
→6)-β-Gal*p*-(1→	G	105.9 *4.48*	74.2 *3.53*	75.3 *3.68*	71.4 *3.96*	76.4 *3.91*	н.о. *4.03;3.91*
→3,6)-β-Gal*p*-(1→	$G^{(II)}$	106.0 *4.52*	73.2 *3.69*	83.2 *3.77*	н.о.	76.4 *3.92*	н.о. *4.03; 3.91*
4-*O*-Me-β-Glc*p*A	GA	105.7 *4.50*	75.5 *3.36*	77.8 *3.55*	84.6 *3.29*	н.о. *3.71*	179.0
α-Ara*f*-(1→3)		112.1 *5.23*	84.5 *4.21*	79.4 *3.93*	86.4 *4.11*	63.7 *3.81;3.71*	
→5)-α-Ara*f*-(1→	A	110.0 *5.08*	83.8 *4.12*	79.4 *3.99*	84.0 *4.20*	69.2 *3.87;3.81*	

н.о. – не определены. N – обозначения моносахаридных остатков.

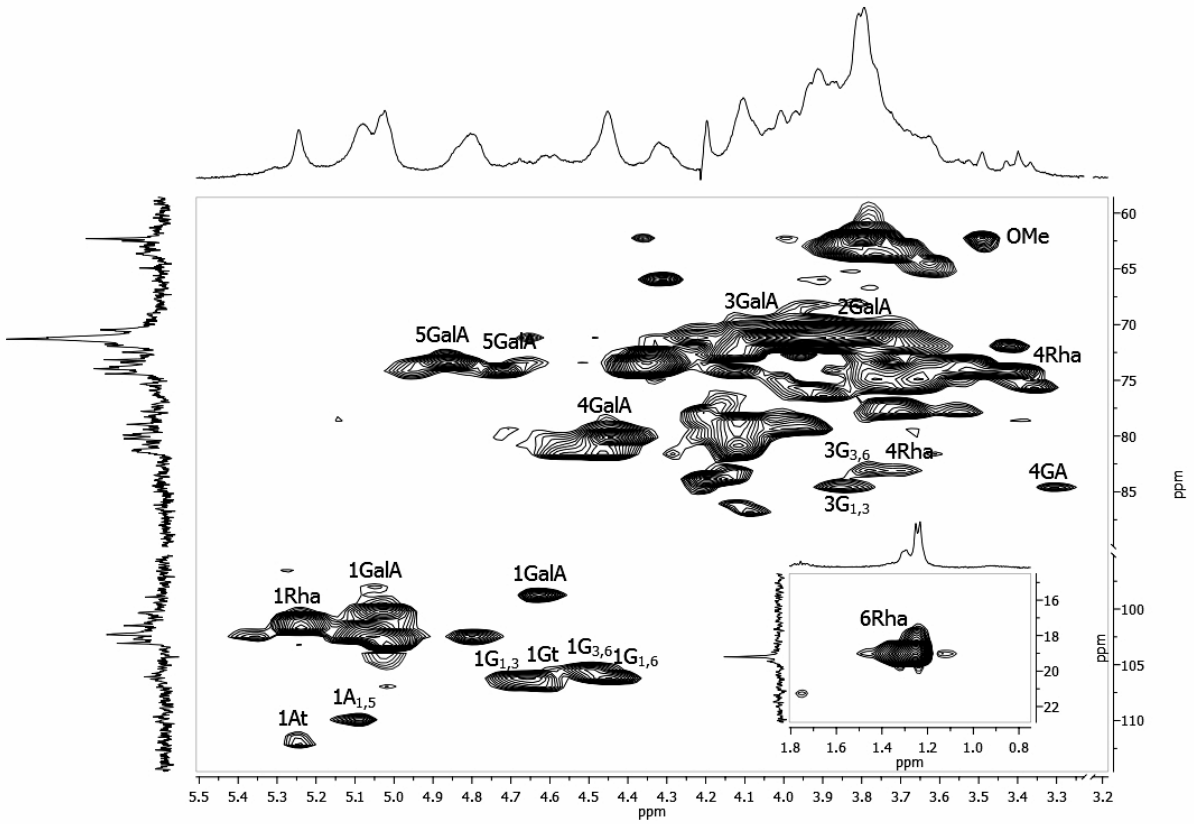

Рисунок 24. Фрагмент спектра {^{1}H,^{13}C} HSQC полисахарида HS_O-I-SD-F

Интересно отметить полное отсутствие в спектрах ЯМР полисахарида HS_O-I-SD-F остатков 1,4-связанной β-D-Gal*p* (4.63/3.67 м.д.), T-α-L-Ara*f* (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-Ara*f* (5.11/4.28 м.д.), в отличие от полисахарида HS_O-I-SD_1, где данные остатки составляли значительную часть боковых углеводных цепей RG-I.

Вероятно, участки RG-I, содержащие в боковых углеводных цепях AG-I и разветвленный 1,5-α-L-арабинан, были удалены при обработке α-1,4-D-полигалактуроназой полисахарида HS_O-I-SD. Это можно объяснить тем, что значительная часть метоксильных и ацетильных групп была удалена при распаде по Смиту, что сделало доступным для воздействия фермента участки, представленные остатками 1,4-α-D-Gal*p*A, 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, подробный анализ одномерных и двумерных спектров полисахарида HS_O-I-SD-F позволил установить сигналы, относящиеся к остаткам 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и T-, 6-*O*-, 3-*O*-, 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p* – характерным компонентам AGP, свидетельствующих о том, что данный полисахарид имеет схожие структурные элементы, в сравнении с полисахаридом HS_O-I-SD_1.

В аномерной области гетероядерного спектра $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-SD-F присутствуют сигналы высокой интенсивности остатков T-α-L-Ara*f* при 112.5/5.24 м.д. и 1,5-α-L-Ara*f* при 110.7/5.08 м.д.

В работах [166, 174, 184] было показано, что AGP, выделенные из различных растительных источников, содержат остатки T-α-L-Ara*f*, связанные посредством α-(1→3)- или α-(1→5)-связи, и характеризуются присутствием фрагментов α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*→… и/или …→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*→….

Как было показано в настоящей работе, остатки арабинозы в боковых углеводных цепях AGP из *H. sosnowskyi* присутствуют преимущественно как терминальные и 1,5-связанные, что свидетельствует о присутствии фрагмента: …→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,
→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или
α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→…

Наличие остатков T- и 1,5-α-L-Ara*f*, наблюдаемых после обработки IO_4^- полисахарида HS_O-I с последующей ферментативной обработкой α-1,4-D-полигалактуроназой, свидетельствует, по всей вероятности о том, что некоторая часть боковых цепей AGP *H. sosnowskyi*, вероятно, представлена 3,5-ди-*O*-замещенными остатками α-L-Ara*f*. Это позволяет предположить в боковой цепи AGP *H. sosnowskyi* присутствие фрагмента: …→6)[α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…, наличие которого и объясняет сохранность 3,6-ди-*O*-замещенных остатков β-D-Gal*p* в боковой цепи полисахарида HS_O-I-SD-F.

Аналогичные остатки (3,5-ди-*O*-замещенной α-L-Ara*f*) были ранее обнаружены в AGP каллусных клеток ели *Picea abies* [232], ксилемы сосны лучистой *Pinus radiata* [233], дерезы обыкновенной *Lycium barbarum* [184] и зеленого кофе *Coffea arabica* [154]. Остатки 1,5-связанной α-L-Ara*f* в AGP были найдены как в вышеуказанных растительных объектах, так и, например, в меде кунцеи вересковидной [165], в зернах овса посевного *Avena sativa* [234], в корнях эхинацеи бледной *Echinacea pallida* [213], аравийской камеди [235, 236], акации [237].

Интенсивность сигналов C/H-атомов CH_3O-групп в спектре $^{1}H/^{13}C$ HSQC полисахарида HS_O-I-SD-F при 62.5/3.48 м.д. и C4/H4 при 84.6/3.29 м.д., значительно выше, чем в полисахариде HS_O-I-SD, что еще раз подтверждает наличие остатков 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, замещенных, возможно, по 2-му или 3-му положению.

В спектре HMBC также наблюдаются интенсивный корреляционный пик при 84.6/3.48 м.д. и пик небольшой интенсивности при 62.5/3.29 м.д. подтверждающие, что остатки β-D-глюкуроновой кислоты имеют CH_3O-группу по 4-му положению [184].

Таким образом, можно заключить, что в полисахариде HS_O-I-SD-F, по сравнению с полисахаридом HS_O-I-SD_1, 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.

Интерпретация результатов, полученных с помощью распада по Смиту и комбинацией методов распада по Смиту и ферментативного гидролизов, подтверждает наличие в главной углеводной цепи полисахарида HS_O-I участков частично ацетилированных 1,4-α-D-галактопиранозилуронана и RG-I, боковые цепи которого представлены остатками T-α-L-Ara*f*, 1,4-связанной β-D-Gal*p*, 3,4-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, указывающими на наличие AG типа I, а также участками разветвленного 1,5-α-L-арабинана (минорный фрагмент). Сигналы высокой интенсивности, принадлежащие

остаткам 3-*O*-, 6-*O*- и 3,6-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, T-α-L-Ara*f* и 1,5-связанной α-L-Ara*f*, вероятно, свидетельствуют о присутствии AGP.

Можно сделать заключение, что подробный анализ двумерных и одномерных спектров фрагментов, полученных после обработки IO_4^- полисахарида HS_O-I, не только подтвердил, но и дополнил результаты, полученные при частичном кислотном и ферментативном гидролизах.

3.2.27. ЯМР исследования белковой части молекулы

В одномерных и двумерных спектрах исследуемых фрагментов также наблюдаются сигналы, принадлежащие белковой части макромолекул.

Известно, что область от 10 до 6 м.д. содержит резонансы протонов амидных групп полипептидной цепи, а область 7.5 - 6.5 м.д. содержит сигналы протонов ароматических колец аминокислотных остатков, таких как тирозин, фенилаланин, триптофан. Область 3.5-1.5 м.д. содержит сигналы метиленовых протонов алифатических аминокислотных остатков. В области 1.4-0 м.д. и более высоких полях (нативные белки) наблюдаются сигналы метальных протонов таких аминокислотных остатков, как аланин, валин, лейцин и изолейцин. Основное количество метальных резонансов приходится на область 1-0.9 м.д. [219].

В спектрах ^{1}H-ЯМР полученных фрагментов присутствуют сигналы в области сильного поля 3.0-0.8 м.д. и в области слабого поля 6.7-8.5 м.д., вероятно, принадлежащие белковой части макромолекул [184, 185, 209]. В спектрах ^{1}H/^{13}C HSQC фрагментов наблюдается целая группа сигналов в области 54-69/3.45-4.70 м.д., а также в области сильного поля C/H-атомов при 17-33/0.8-3.0 м.д. В спектрах HMBC наблюдаются корреляционные пики при 176.6/2.14, 180.1/2.01, 184.3/1.91 м.д., в спектрах ^{1}H/^{13}C HSQC – при 23.1/2.19, 23.0/2.14, 24.0/2.01, 25.9/1.91 м.д., а также целая группа сигналов в области сильного поля C/H-атомов при 17-25/0.8-1.4 м.д., принадлежащие белковой части макромолекул.

3.2.28. Определение аминокислотного состава пептидной части полисахарида HS_W-I_2

Аминокислотным анализом (табл. 27) было установлено, что белковая часть фракции HS_W-I_2 содержала главным образом такие аминокислоты, как гидроксипролин, серин, аланин, треонин, глицин, L-глутаминовая и L-аспарагиновая кислота, характерные для AGP [176, 183, 184, 232, 233].

Таблица 27. Аминокислотный состав (%, моль) фракции HS_W-I_2

аминокислота	HS_W-I_2
L-аланин	14.1
L-серин	12.3
гидрокси-L-пролин	11.0
глицин	9.2
L-треонин	8.0
L-глутаминовая кислота	8.0
L-аспарагиновая кислота	8.0
L-пролин	7.4
L-валин	5.3
L-лизин	5.0
L-лейцин	4.7
L-изолейцин	2.3
L-тирозин	1.9
L-фенилаланин	1.8
D-аспарагиновая кислота	0.5
D-глутаминовая кислота	0.5
L-орнитин	+

3.2.29. Определение биологической активности полисахаридов H. sosnowskyi

Для проведения исследования биологической активности полимеров, выделенных из надземной части *H. sosnowskyi*, было изучено влияние фракций: HS_W-I, которая содержит главным образом свободные AGP; HS_W-III, которая состоит главным образом из AGP и пектиновых полисахаридов; HS_W-V и HS_A-I, представляющих собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних; HS_O-I и HS_O-III, характеризующихся значительным преобладанием пектиновых полисахаридов и минорным количеством AGP; HS_K-I и HS_N-I, содержащих главным образом связующие гликаны класса глюкуроноарабиноксиланов и глюкоманнанов соответственно (табл. 1-5).

Оценивали влияние выделенных полисахаридов на рост проростков по следующим показателям: энергия прорастания, всхожесть, длина корня и длина проростка на 2, 4, 6 и 8 сутки, при этом использовали сравнение скорости прорастания семян и роста опытных и контрольных растений.

Из представленных результатов видно, что практически все испытуемые полисахариды оказывают ростостимулирующее влияние на скорость прорастания и всхожесть семян, рост проростков и корней пшеницы (табл. 28). Наибольшее ростостимулирующее влияние оказывают фракции HS_O-I и HS_O-III, главная углеводная цепь которых представлена главным образом участками частично метилэтерифицированного гомогалактуронана и небольшими участками рамногалактуронана I, боковые углеводные цепи которого представлены преимущественно AG-I. Эти фракции повышают всхожесть на 30 %, в сравнении с контролем. У семян, обработанных растворами вышепредставленных полисахаридов, проростки появляются уже на 2-е сутки после начала инкубации (табл. 28). При обработке семян пшеницы растворами полисахаридов HS_O-I и HS_O-III скорость роста проростков примерно в два раза выше в сравнении с контролем. Наибольший

эффект их действия на рост проростков при проращивании семян отмечается с 2-е по 6-е сутки. Скорость роста корней пшеницы при обрабатывании растворами вышеприведенных полисахаридов также примерно в два раза выше в сравнении с контролем (табл. 28).

Энергию прорастания определяли по количеству, весу и длине проростков. Все испытуемые полисахариды увеличивают энергию прорастания. У семян, обработанных полисахаридами HS_O-I и HS_O-III, энергия прорастания выше в среднем в 1.6 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, из всех испытуемых полисахаридов наибольшее ростостимулирующее влияние на скорость прорастания и всхожесть семян, рост проростков и корней *Triticum aestivum L.* сорта «Иргина», оказывает полисахарид, выделенный из *H. sosnowskyi* экстракцией оксалатом аммония, содержащий главным образом участки α-1,4-D-галактопиранозилуронана.

Следует отметить, что аналогичные результаты были получены при обрабатывании семян злаковых культур: пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. сорта «Иргина», овса *Avena sativa* L. сорта «Кировский» и ржи посевной *Secale cereale* L. сорта «Фаленская» растворами полисахаридов, выделенных из древесной зелени пихты (*Abies sibirica* Ledeb.) и плодов граната (*Punica granatum* L.), где было установлено, что наибольшей биологической активностью в отношении влияния на всхожесть, энергию прорастания и скорость роста проростков и корней вышеуказанных злаковых культур обладают фракции пектиновых полисахаридов, характеризующиеся высоким содержанием GalA, т.е. содержащие значительные участки α-1,4-D-галактуронана [91, 238].

Таблица 28. Влияние полисахаридных фракций, выделенных из борщевика Сосновского, на всхожесть, энергию прорастания, рост проростков и корней пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. сорта «Иргина»

Фракция	Всхожесть, %				ЭП*, %		Длина корня, мм				Длина проростка, мм			
	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	2 сут.	8 сут.	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.	2 сут.	4 сут.	6 сут.	8 сут.
Контроль	43	51	57	67	17	49	7±4	16±5	22±6	30±9	-	8±3	15±5	22±7
HS_W-I	45	53	62	77	23	64	7±4	23±5	33±6	42±7	-	14±4	25±7	30±7
HS_W-III	40	48	56	76	16	60	6±3	15±4	23±5	38±7	-	9±3	14±4	32±9
HS_W-V	41	52	62	75	22	56	7±5	16±5	28±5	38±9	-	9±3	19±6	28±7
HS_A-I	44	50	65	74	18	60	7±5	15±5	31±6	45±8	-	6±2	24±6	35±8
HS_O-I	48	61	72	86	26	76	9±5	27±5	44±9	64±12	2±1	18±5	36±7	42±11
HS_O-III	48	60	70	87	28	77	10±4	29±5	42±7	59±7	3±2	19±4	34±4	44±8
HS_K-I	44	57	64	76	23	69	7±4	25±5	35±5	38±8	-	15±3	19±5	26±8
HS_N-I	45	55	63	73	20	56	7±4	20±5	28±6	40±7	-	10±4	25±7	31±7

* - ЭП – энергия прорастания

Интересно отметить, что при обработке семян растворами фракций HS_W-I, HS_W-III, HS_W-V, наибольшее ростостимулирующее влияние проявляет фракция HS_W-I, содержащая главным образом свободные AGP. Максимальный эффект воздействия этой фракции наблюдается с 4-е по 6-е сутки проращивания семян, однако, к 8-м суткам эксперимента длина корня и проростка практически сравнивается с длиной корня и проростка семян, обработанных полисахаридами HS_W-III и HS_W-V. Таким образом, полученные полисахариды, даже будучи близкими по составу, различаются по биологической активности за счет различий в тонкой структуре.

Для того чтобы найти реальные корреляции между структурными особенностями и биологическими свойствами этих сложных полимеров необходимо дальнейшее накопление информации о взаимосвязи структуры изучаемых полисахаридов и проявляемой ими биологической активности.

3.3. О строении пектина *H. sosnowskyi*

Суммируя полученные данные, можно схематически представить структурные элементы пектиновой макромолекулы *Heracleum sosnowskyi*:

Линейная область: *галактуронан*:

…→4)-α-D-Gal*p*A-(1→[4)-α-D-Gal*p*A-(1]$_n$→4)-α-D-Gal*p*A-(1 →…

...→4)-α-D-Gal*p*A-(1→4)-α-D-Gal*p*A(6-OMe)-(1→…

...→4)-α-D-Gal*p*A-(1→4)-α-D-Gal*p*A(2,3-OAc)-(1→…

Разветвленная область: *рамногалактуронан I*:

главная цепь:

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A-(1→2)-α-L-Rha*p*-(1→….

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A(2,3-OAc)-(1→…

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→4)-α-D-Gal*p*A(6-OMe)-(1→…

точки разветвления: … →2)-α-L-Rha*p*-(1→…

…→4)-β-D-Gal*p*-(1 → 4)

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→…

…→3,4)-β-D-Gal*p*-(1 → 4)

…→2)-α-L-Rha*p*-(1→…

…→3,5)-α-L-Ara*f*-(1 → 4)

боковые цепи: *арабиногалактан типа I:*

β-D-Gal*p*→[4)-β-D-Gal*p*-(1]$_3$→4)-α-L-Rha*p*-(1→…

β-D-Gal*p*→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→…

…→4)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…

β-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→…

точки разветвления: ...→3,4)-β-D-Gal*p*-(1→…

1,5-α-L-арабинан:

…→5)-α-L-Ara*f*-(1→ [5)-α-L-Ara*f*-(1]$_n$→5)-α-L-Ara*f*-(1→ …

…→5)-α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→…

…→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→…

точки разветвления: …→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→…

...→2,3,5)-α-L-Ara*f*-(1→…, ...→2,5)-α-L-Ara*f*-(1→…

3.3.1. О строении углеводной части макромолекул арабиногалактановых белков *H. sosnowskyi*

Суммируя полученные данные, можно схематически представить строение углеводной части макромолекулы AGP *Heracleum sosnowskyi*:

Линейная область:

…→3)-β-D-Gal*p*-(1→[3)-β-D-Gal*p*-(1]$_n$→3)-β-D-Gal*p*-(1→…

точки разветвления: …. →3)-β-D-Gal*p*-(1→…

…→6)-β-D-Gal*p*-(1 → 6)

…→3)-β-D-Gal*p*-(1→…

…→3,6)-β-D-Gal*p*-(1 → 6)

боковые цепи:

…→[6)-β-D-Gal*p*-(1]$_n$→6)-β-D-Gal*p*-(1→…

4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Gal-(1→…

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…

α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→…

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…

α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(1→…

β-D-Gal*p*-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→ …, …→4)-β-D-Glc*p*A-(1→…

3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования можно заключить, что из надземной части борщевика Сосновского *H. sosnowskyi* было получено и охарактеризовано более 55 полисахаридов и их фрагментов, в т.ч. пектиновые полисахариды, арабиногалактановые белки и связующие гликаны. Дана структурная характеристика выделенных полисахаридов и определена их биологическая активность.

Впервые изучен характер изменения выхода и моносахаридного состава арабиногалактановых белков, пектиновых полисахаридов и связующих гликанов, при их выделеннии из надземной части *H. sosnowskyi*. 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%.

С помощью методов ионообменной хроматографии, частичного кислотного и ферментативного гидролизов, распада по Смиту и при сочетании вышеуказанных методов друг с другом были установлены главные элементы строения углеводной части арабиногалактановых белков и пектиновых полисахаридов *H. sosnowskyi*. Для установления положения межмономерных связей и последовательности распределения моносахаридных остатков в цепи, конфигурации гликозидных остатков, размеров окисных циклов, длины боковых цепей и соотношения остатков моносахаридов друг к другу были использованы разнообразные одномерные и двумерные методики спектроскопии ЯМР.

Установлено, что главные по выходу фракции, экстрагируемые водой, состояли главным образом из свободных AGP и минорных количеств пектиновых полисахаридов. Фракции, экстрагируемые раствором HCl, представляли собой смесь AGP и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних. Фракции, экстрагируемые раствором

$(NH_4)_2C_2O_4$, характеризовались значительным преобладанием пектиновых полисахаридов и минорным количеством связанных AGP.

Показано, что при последовательной экстракции борщевика водой, раствором HCl и раствором $(NH_4)_2C_2O_4$ наблюдается уменьшение содержания AGP и увеличение содержания пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

При изучении моносахаридного состава фракций, экстрагируемых водным раствором KOH, установлено, что основными компонентами их углеводных цепей являются остатки ксилозы, глюкозы и уроновых кислот, что, вероятно, указывает на принадлежность данных фракций к связующим гликанам класса глюкуроноарабиноксиланов и ксилоглюканов. Главными компонентами углеводной цепи фракций, экстрагируемых водным раствором NaOH, являются остатки маннозы и глюкозы, что, по всей видимости, указывает на принадлежность данных фракций к связующим гликанам класса глюкоманнанов. Данные фракции также содержали некоторое количество пектиновых полисахаридов.

Впервые установлены структурные элементы пектина надземной части борщевика Сосновского. Обнаружено, что линейная область его кора состоит главным образом из участков частично метилэтерифицированного и частично ацетилированного 1,4-α-D-галактопиранозилуронана. Разветвленная область состоит преимущественно из участков частично 3-*O*-ацетилированного RG-I. Боковые цепи RG-I представлены главным образом фрагментами AG-I и разветвленного 1,5-α-L-арабинана (минорный фрагмент). Точками ветвления углеводных цепей AG-I являются 3,4-ди-*O*-замещенные остатки β-D-Gal*p*. Точками ветвления углеводных цепей разветвленного 1,5-α-L-арабинана являются преимущественно 2,5- и 3,5-ди-*O*-замещенные остатки α-L-Ara*f*. Остатки T-α-L-Ara*f* присутствуют на невосстанавливающих концах AG-I и 1,5-α-L-арабинана.

Подробным анализом двумерных и одномерных ЯМР спектров фрагментов полисахаридов, полученных методом ЧКГ, обнаружено, что они

характеризуются наличием более коротких участков остова RG-I, более высоким содержанием 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p*, свидетельствующих о том, что полученные полисахаридные фрагменты имеют более длинные боковые цепи, представленные преимущественно фрагментами: β-Gal*p*→[4)-β-Gal*p*-(1]$_3$→4)-α-Rha*p*-(1→…, по сравнению с полисахаридными фрагментами, полученными методом ФГ, напротив, характеризующимися присутствием более длинных участков остова RG-I, невысоким содержанием 1,4-связанных остатков β-D-Gal*p* и, следовательно, имеющих более короткие боковые цепи представленные преимущественно фрагментами: β-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→… и
β-D-Gal*p*→4)-β-D-Gal*p*-(1→4)-α-L-Rha*p*-(1→….

Таким образом, структурное исследование пектина *H. sosnowskyi* свидетельствует о присутствии в его углеводной цепи как длинных участков остова RG-I с короткими боковыми углеводными цепями, представленными единичными остатками β-D-Gal*p* и/или 1,4-β-D-Gal*p*, так и коротких участков остова RG-I, имеющих более длинные (порядка трех мономеров 1,4-β-D-Gal*p*) боковые углеводные цепи, представленные AG-I, а также разветвлённым 1,5-α-L-арабинаном.

Впервые установлены структурные элементы углеводной части арабиногалактановых белков надземной части борщевика Сосновского. Показано, что главная цепь макромолекулы AGP состоит главным образом из 1,3-связанных остатков β-D-Gal*p*, а боковые цепи разветвленной области образованы остатками 1,6-связанной β-D-Gal*p*, 1,4-связанной β-D-Glc*p*A и 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A, 1,5-связанной α-L-Ara*f* и 3,5-ди-*O*-замещенной α-L-Ara*f*. Точки ветвления главной и боковых цепей представлены 3,6-ди-*O*-замещенными остатками β-D-галактопиранозы. Значительная часть β-1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A с помощью β-(1→6)-связи, что указывает на присутствие фрагментов: 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→…. Незначительная часть остатков глюкуроновой кислоты входит в состав фрагментов:

α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(→…. Некоторая часть боковых углеводных цепей AGP борщевика представлена остатками 1,5- и 1,3,5-α-L-арабинофуранозы, что свидетельствует о присутствии участков:

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,

…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или

α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→….

Остатки T-β-D-Gal*p*, T-α-L-Ara*f*, T-α-L-Rha*p* и T-α-L-Fuc*p* находятся на невосстанавливающих концах боковых цепей.

Объединённый водно-спиртовой супернатант, полученный при осаждении фракций HS_O-I – HS_O-V 4-х кратным объемом этанола, содержит несколько классов полисахаридов и был представлен главным образом пектиновым полисахаридом, содержащим в боковой углеводной цепи значительные участки высокоразветвленного 1,5-α-L-арабинана, а также связующими гликанами класса глюкоманнанов и класса арабиноксиланов.

Можно заключить, что по крайней мере часть пектина прочно ассоциируется, вероятно, при помощи ковалентной связи с AGP, поскольку белок и пектин продолжительно ассоциируются вместе и их не удалось разделить ни методом частичного кислотного гидролиза, при котором наблюдалось расщепление нейтральных боковых цепей, ни после значительного расщепления посредством ферментативной обработки 1,4-α-D-полигалактуроназой участков главной углеводной цепи, представленных остатками 1,4-α-D-галактуроновой кислоты, ни в результате периодатного окисления, при котором существенная часть остатков α-D-GalA также подверглась разрушению.

В работе Tan с соавторами [185] показано, что арабиногалактановые белки ковалентно присоединены к пектиновым полисахаридам, что предполагает присутствие следующего структурного звена: …→4-α-D-GalA-1→2-α-L-Rha-1→4-β-D-GlcA-1→6-β-D-Gal→…, при этом

показано, что остатки Gal*p*A, находящиеся на восстанавливающих концах углеводных цепей отсутствуют.

Тем не менее, в нашем случае остатки, представляющие собой α и β аномеры, находящиеся на восстанавливающих концах углеводных цепей (…→4)-β-Gal*p*A, …→4)-α-Gal*p*A), присутствуют в ряде полученных фрагментов, что, вероятно, свидетельствует о том, что AGP могут быть связаны с пектиновой макромолекулой иным способом, например, эта связь может быть «образована» посредством «сшивания» через остатки феруловой кислоты или каким-то образом с невосстанавливающих концов.

Интересно отметить, что при увеличении содержания протяжённых участков RG-I параллельно увеличивается содержание участков AG-II, в частности во фрагментах HS_O-I-H_1-F, HS_O-I-F_3, HS_O-I-SD-F и HS_O-I-F_3-2_2, что указывает на то, что AGP непосредственно связаны с протяжёнными участками RG-I, а не галактуронана.

Согласно полученным результатам, а также литературным данным, можно предположить, что некоторые AGP 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.

Показана высокая биологическая активность пектиновых полисахаридов, выделенных из надземной части борщевика Сосновского. Наибольшей биологической активностью в отношении влияния на всхожесть, энергию прорастания и скорость роста побегов и корней *Triticum aestivum* L. сорта «Иргина» обладают фракции пектинов, выделенные из *H. sosnowskyi* экстракцией оксалатом аммония, содержащие главным образом участки частично метилэтерифицированного гомогалактуронана и небольшие участки рамногалактуронана I. Результаты, полученные по

биологической активности, свидетельствуют о перспективности использования надземной части борщевика Сосновского, как источника биологически активных веществ, обладающих ростстимулирующим действием.

Анализируя полученные нами и литературные данные можно сделать заключение, что арабиногалактановые белки и пектиновые полисахариды, выделенные из хмеля обыкновенного (*Humulus lupulus*), имеют схожие по строению структурные элементы, в сравнении с полисахаридами, выделенными из надземной части борщевика Сосновского. При этом в данной работе (Oosterveld, Voragen, Schols, 2002) предполагается, что в *Humulus lupulus* пектин связан с арабиногалактановыми белками, при этом последние имеют достаточно низкую молекулярную массу.

ВЫВОДЫ

1. Из надземной части *Heracleum sosnowskyi* при последовательной экстракции водой, растворами HCl, $(NH_4)_2C_2O_4$, 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 $(NH_4)_2C_2O_4$ 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 ацетилированного 1,4-α-D-галактопиранозилуронана, и разветвленной области, представленной участками частично 2-*O*- и главным образом 3-*O*-ацетилированного 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-Ara*f*, 1,4-связанной β-D-Gal*p*, 3,4-ди-*O*-замещенной β-D-Gal*p*, указывающими на наличие AG-I; а также остатками T-α-L-Ara*f*, 1,5-связанной α-L-Ara*f*, 3,5-ди-*O*-, 2,5-ди-*O*- и 2,3,5-три-*O*-замещенной α-L-Ara*f*, 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-Gal*p*. 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-Ara*f*. Остатки T-α-L-Ara*f* 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-Gal*p*, боковые цепи разветвленной области образованы остатками 1,6-β-D-Gal*p*, 1,5-α-L-Ara*f*, 1,3,5-α-L-Ara*f*, 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A и 1,4-β-D-Glc*p*A. Точками ветвления боковых и главной углеводных цепей являются 3,6-ди-*O*-замещенные остатки β-D-Gal*p*. Значительная часть β-1,6-галактана боковой цепи замещена остатками 4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A с помощью β-(1→6)-связи, что указывает на присутствие фрагментов:
4-*O*-Me-β-D-Glc*p*A-(1→6)-β-D-Gal*p*-(1→…. Незначительная часть Glc*p*A входит в состав фрагментов: α-L-Rha*p*-(1→4)-β-D-Glc*p*A-(→.... Часть боковых углеводных цепей AGP борщевика представлена фрагментами:
…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…
…→6)[α-L-Ara*f*-(1→3,5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→…,
…→6)[α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)]β-D-Gal*p*-(1→… и/или
α-L-Ara*f*-(1→5)-α-L-Ara*f*-(1→3)-β-D-Gal*p*-(1→….
Остатки терминальных β-D-Gal*p*, α-L-Ara*f*, α-L-Rha*p* и α-L-Fuc*p* 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшкова Т. А. Растительная клеточная стенка как динамичная система / Т. А. Горшкова. М.: Наука, 2007. 426 с.
2. Оводов Ю. С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорган. химия. 2009. №3. с. 293-310.
3. Tan L., Showalter A. M., Egelund J., Hernandez-Sanchez A., Doblin M. S., Bacic A. Arabinogalactan-proteins and the research challenges for these enigmatic plant cell surface proteoglycans // Frontiers in Plant Science. 2012. Vol. 3. P. 140.
4. Rumyantseva N. I. Arabinogalactan proteins: Involvement in plant growth and morphogenesis // Biochemistry (Moscow). 2005. Vol. 70(10). P. 1073-1085.
5. Ellis M., Egelund J., Schultz C. J., Bacic, A. Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface? // Plant Physiol. 2010. Vol. 153. P. 403–419.
6. Материал из Википедия - свободная энциклопедия [Электронный ресурс] // Борщевик Сосновского: [сайт] https://ru.wikipedia.org/wiki/Борщевик_Сосновского (дата обращения: 22.04.2016).
7. Тахтаджян А. Л. Жизнь растений. Т.5.2 Цветковые растения/ А.Л. Тахтаджян, А. А. Федоров и др. Под редакцией академика А.Л. Тахтаджяна. М.: Просвещение, 1981. 573 с.
8. Доржиев С. С., Патеева И. Б. Энергоресурсосберегающая технология получения биоэтанола из зеленой массы растений рода Heracleum // Ползуновский вестник. 2011. № 2/2. с. 251-255.
9. Манденова И. П. Фрагменты монографии кавказских борщевиков // Заметки по систематики и географий растении. 1944. вып. 12. с. 15–19.

10. Материал из Журнал "Защита и карантин растений [Электронный ресурс] // Интересные статьи, опубликованные в 2010 - 2016 г.г: [сайт] http://www.z-i-k-r.ru/interest/bor_sosn.pdf

11. Booy O. The Giant Hogweed Best Practice Manual. Guidelines for the management and control of an invasive weed in Europe / O. Booy, M. Cock, L. Eckstein, S. O. Hansen, J. Hattendorf, J. Hüls, S. Jahodová, L. Krinke, L. Marovoková, J. Müllerová, W. Nentwig, C. Nielsen, A. Otte, J. Pergl, I. Perglová, I. Priekule, P. Pusek, H. P. Ravn, J. Thiele, S. Trybush, R. Wittenberg – Hoersholm: Forest and Landscape Denmark, 2005, P. 44.

12. Pimenov M. G., Leonov M. V. The Asian Umbelliferae biodiversity database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian Taxa // Turkish Journal of Botany. 2004. Vol. 28. P. 139–145.

13. OEPP/EPPO Bulletin. *Heracleum mantegazzianum*, *Heracleum sosnowskyi* and *Heracleum persicum* / European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin. 2009. № 39, P. 489–499.

14. Pysek P. Ecology and management of giant hogweed (*Heracleum mantegazzianum*). P. Pysek, M. J. W. Cock, W. Nentwig, H. P. Ravn – Gateshead: UK by Athenaeum Press, 2007, P. 324.

15. Wrzesińska D. Studies on occurrence and harmfulness of celery fly *Philophylla heraclei* L. on sosnówskis hogweed *Heracléum sosnówskyi* Manden. // Journal of Plant Protection Research. 2004. Vol. 44 (3). P. 267-272.

16. Богданов В. Л., Николаев Р. В., Шмелева И. В. Биологическое загрязнение территории экологически опасным растением борщевиком Сосновского // Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение: сб. науч. трудов 1-й Международной телеконференции – Томск: СибГМУ, 2010, с. 27–29.

17. Jahodová S., Trybush S., Pysek P., Wade M., Karp A. Invasive species of *Heracleum* in Europe: an insight into genetic relationships and invasion history // Diversity and Distributions. 2007. № 13. P. 99–114.

18. Lambdon P. W., Pyšek P., Basnou C., Hejda M., Arianoutsou M., Essl F., Jarošík V., Pergl J., Winter M., Anastasiu P., Andriopoulos P., Bazos I., Brundu G., Celesti-Grapow L., Chassot P., Delipetrou P., Josefsson M., Kark S., Klotz S., Kokkoris Y., Kühn I., Marchante H., Perglová I., Pino J., Vila M., Zikos A., Roy D., Hulme P. E. Alien flora of Europe: species diversity, temporal trends, geographical patterns and research needs // Preslia. 2008. Vol. 80(2). P. 101–149.

19. Раков Н. С., Сенатор С. А., Саксонов С. В. Чужеродные виды – источник сорных растений в Самаро-Ульяновском Поволжье // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 272–277.

20. Абрамова Л. М. Чужеродные виды растений на Южной Урале // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 5–10.

21. Кравченко А. В. Адвентивная флора Карелии и основные тенденции ее многолетней динамики // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 133–138.

22. Далькэ И. В., Чадин И. Ф., Захожий И. Г., Малышев Р. В., Головко Т. К. Борщевик Сосновского – инвазивный вид в агроклиматической зоне Республики Коми // II-ая Международная научно-практическая конференция "Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов" – Минск: 2012, с. 440–443.

23. Бочкарев Д. В., Никольский А. В., Смолин Н. В. Трансформация пойменно-лугового фитоценоза при внедрении в него адвентивного сорного вида – борщевика Сосновского // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2011. № 7 (81). с. 36–40.

24. Соколова И. Г. Инвазивные виды Псковской области // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 289–295.

25. Мысник Е. Н., Лунева Н. Н. Распространение видов сорных растений на территории Ленинградской области // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 241–245.

26. Лунева Н. Н., Филиппова Е. В. Постоянство присутствия видов сорных растений в посевах сельскохозяйственных культур в Ленинградской области // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 209–215

27. Филатова И. А., Власов, Ю. В. Борщевик Сосновского «осваивает» новые площади // Защита и карантин растений. 2002. № 12. с. 38–39.

28. Полянский Н. В. Гербициды против борщевика Сосновского // Защита и карантин растений. № 8. 1990. с. 29.

29. Палкина Т. А. Региональные особенности сегетальной флоры Рязанской области // Материалы I Международной научной конференции «Сорные растения в изменяющемся мире: актуальные вопросы изучения разнообразия, происхождения, эволюции» – СПб.: ВИР, 2011, с. 261– 266.

30. Смирнов А. А., Корнева И. Г. Последствия интродукции *Heracleum sosnowskyi* (Apiceae) на Сахалине // Растительные ресурсы. 2010. № 2. с. 18–23.

31. Симонов Г. А., Никульников В. С., Зотеев В. С. Борщевик Сосновского – злостный засоритель полей // Ученые записки Орловского государственного университета. Серия: Естественные, технические и медицинские науки. 2011. № 3. с. 324–326.

32. Материал из Энциклопедия растений [Электронный ресурс] // Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi*):

    [сайт] http://www.wiki-flowers.ru/75-borschevik-sosnovskogo.html (дата обращения: 22.04.2016).

33. Черняк Д. М. Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) и борщевик Меллендорфа (*Heracleum Moellendorff* II Hance) на юге Приморского края (биологические особенности, перспективы использования и биологическая активность) : автореферат дисертации канд. биологических наук: 03.02.14 / Черняк Дарья Михайловна – Владивосток, 2013 – 28 с.

34. Мусихин П. В., Сигаев А. И. Исследование физических свойств и химического состава борщевика Сосновского и получение из него волокнистого полуфабриката // Фундаментальные исследования. 2006. № 3. с. 65–67.

35. Kumar S., Gupta P., Sharma S., Kumar D. A review on immunostimulatory plants // J. of Chin. Integrative Medicine. 2011. V. 9. P. 117-128.

36. Senejoux F., Demougeot C., Cuciureanu M., Miron A., Cuciureanu R., Berthelot A., Girard-Thernier C. Vasorelaxant effects and mechanisms of action of *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae) in rat thoracic aorta // J. Ethnopharmacol. 2013. V. 147. P. 536–539.

37. Firuzi O., Asadollahi M., Gholami M., Javidnia K.. Composition and biological activities of essential oils from four Heracleum species // Food Chem. 2010. Vol. 122. P. 117–122.

38. Bogucka-Kocka A., Smolarz H. D., Kocki, J. Apoptotic activities of ethanol extracts from some Apiaceae on human leukaemia cell lines // Fitoterapia. 2008. Vol. 79. P. 487–497.

39. Dash S., Kanta N. L., Bhise S., Bhuyanl N. Antioxidant and antimicrobial activities of *Heracleum nepalense* D Don root // Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2005. Vol. 4(1). P. 341–347.

40. Webster D., Taschereau P., Lee T. D., Jurgens, T. Immunostimulant properties of *Heracleum maximum* Bartr. // J. Ethnopharmacol. 2006. Vol. 106(3). P. 360–363.

41. Sayyah M., Moaied S., Kamalinejad M. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed // J. Ethnopharmacol. 2005. Vol. 98(1–2). P. 209–211.

42. Oniszczuk A., Waksmundzka-Hajnos M., Skalicka K., Głowniak K., Comparison of matrix-solid phase dispersion and liquid–solid extraction connected with solid-phase extraction in the quantification of selected furanocoumarins from fruits of *Heracleum leskowii* by high performance liquid chromatography // Ind. Crops Prod. 2013. Vol. 50. P. 131–136.

43. Skalicka-Wozniak K., Głowniak K. Pressurized liquid extraction of coumarins from fruits of *Herackeum leskowii* with application of solvents with different polarity under increasing temperature // Molecules. 2012. Vol. 17. P. 4133–4141.

44. Средство для лечения экзематозов: пат. 2057541 Рос. Федерация : МПК6 A61K35/78 / Суханов А. И. ; заявитель и патентообладатель Суханов А. И. - № 92011705/14 ; заявл. 14.12.1992 ; опубл. 10.04.1996, Бюл. № 32, 2001.

45. Способ лечения псориаза: пат. 2076726 Рос. Федерация : МПК6 A61K35/78 / Суханов А. И. ; заявитель и патентообладатель Суханов А. И. - № 93015568/14; заявл. 22.03.1993 ; опубл. 10.04.1997, Бюл. № 16, 2002.

46. Михайлова Е. А., Щербакова Т. П., Шубаков А. А. Изучение эффективности применения препаратов пектиновых полисахаридов на разнотравье в условиях полевого опыта // Материалы международной заочной научно-практической конференции: «Научные достижения биологии, химии, физики» — Новосибирск: «Сибирская ассоциация консультантов», 2012, с.114.

47. Matsumoto T., Moriya M., Sakurai M. H., Kiyohara H., Tabuchi Y., Yamada H.. Stimulatory effect of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L., on G-CSF secretion from intestinal epithelial cells // International Immunopharmacology. 2008. Vol. 8. P. 581–588.

48. Yamada H., Hirano M., Kiyohara H.. Partial structure of an antiulcer pectic polysaccharide from the roots of *Bupleurum falcatum* L. // Carbohydr. Res. 1991. Vol. 219. P. 173–192.

49. Hirano M., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H. Structural studies of endo-polygalacturonase-resistant fragments of an anti-ulcer pectin from the roots of *Bupleurum falcatum* L. // Carbohydr. Res. 1994. Vol. 251. P. 145–162.

50. Sakurai M. H., Matsumoto T., Kiyohara H., Yamada H. B-cell proliferation activity of pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. and its structural requirement // Immunology. 1999. Vol. 97. P. 540–547.

51. Di H., Zhang Y., Chen D. Isolation of an anti-complementary polysaccharide from the root of *Bupleurum chinense* and identification of its targets in complement activation cascade // Chinese Journal of Natural Medicines. 2013. Vol. 11(2). P. 0177−0184.

52. Jin M., Zhao K., Huang Q., Xu C., Shang P. Isolation, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: A review // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 89. P. 713– 722.

53. Zhao L., Wang Y., Shen H.-L., Shen X.-D., Nie Y., Wang Y., Han T., Yin M., Zhang Q.-Y. Structural characterization and radioprotection of bone marrow hematopoiesis of two novel polysaccharides from the root of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels // Fitoterapia. 2012. Vol. 83. P. 1712–1720.

54. Pu X., Ma X., Liu L., Ren J., Li H., Li X., Yu S., Zhang W., Fan W. // Structural characterization and antioxidant activity in vitro of polysaccharides from angelica and astragalus // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 137. P. 154–164.

55. Sun Y., Cui S., Tang J., Gu X. Structural features of pectic polysaccharide from Angelica sinensis (Oliv.) Diels // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 80. P. 544–550.

56. Sun Y. L., Gu X. H., Tang J., Li D. Y.. The preparation, purification and structure analysis of water-soluble polysaccharides from *Angelica sinensis* // Journal of Food and Biotechnology. 2006. Vol. 25. P.1–4.

57. Sun Y. L., Shan F., Cui W. W., Tang J., Gu X. H. NMR analysis of polysaccharide ASP3 from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and its hydrolysis products // Chemical Journal of Chinese University. 2009. Vol. 30. P. 1739–1743.

58. Tomshich S. V., Komandrova N. A., Kalmykova E. N., Prokof'eva N. G., Momontova V. A., Gorovoi P. G., Ovodov Yu. S. Biologically active polysaccharides from medicinal plants of the far east // Chemistry of Natural Compounds. 1997. Vol. 33(2). P. 146-149.

59. Zhang Y., Kiyohara H., Sakurai M. H., Yamada H. Complement activating galactan chains in a pectic arabinogalactan (AGIIb-1) from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa // Carbohydr. Polym. 1996. Vol. 31. P. 149-156.

60. Kiyohara H., Yamada H. Structure of an anti-complementary arabinogalactan from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa // Carbohydr. Res. 1989.Vol. 193. P. 173-192.

61. Kiyohara H., Yamada H., Otsuka Y. Unit structure of the anti-complementary arabinogalacnan from *Angelicu acutiloba* Kitagawa // Carbohydr. Res. 1987. Vol. 167. P. 221-237.

62. Материал из Википедия - свободная энциклопедия [Электронный ресурс] // Гления - Википедия: [сайт] https://ru.wikipedia.org/wiki/Гления (дата обращения: 22.04.2016).

63. Материал из Большая энциклопедия комнатных цветов и растений. Советы по уходу. Консультация [Электронный ресурс] // Лекарственные растения - Сапожниковия растопыренная: [сайт] http://www.klumba.info/flowers/saposhnikovia_divaricata.htm (дата обращения: 22.04.2016).

64. Immerzeel P., Schols H. A., Voragen A. G. J., de Vries S. C. Different arabinogalactan proteins are present in carrot (*Daucus carota*) cell culture medium and in seeds // Physiol. Plant. 2004. Vol. 122. P. 181–189.

65. Immerzeel P., Eppink M. M., de Vries S. C., Schols H. A., Voragen A. G. J. Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins // Physiologia Plantarum. 2006. Vol. 128 (1). P. 18-28.

66. Gibson L. J. The hierarchical structure and mechanics of plant materials // Journal of The Royal Society Interface. 2012. Vol. 9(76). P. 2749-2766.

67. Fangel J. U., Ulvskov P., Knox J. P., Mikkelsen M. D., Harholt J., Popper Z. A., Willats W. G. Cell wall evolution and diversity // Frontiers in Plant Science. 2012. Vol. 3. P. 152.

68. C. L. Jackson, T. M. Dreaden, L. K. Theobald, N. M. Tran, T. L. Beal, M. Eid, Mu Yun Gao, Robert B Shirley, Mark T Stoffel, M Vijay Kumar, Debra Mohnen. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells:

correlation of apoptotic function with pectin structure // Glycobiology. 2007. Vol. 17. № 8. P. 805–819.

69. Li Y. H., Niu Y. B., Wu H. J., Sun Y., Li Q. A., Kong X. H., Liu L., Mei Q. Modified apple polysaccharides could induce apoptosis in colorectal cancer cells // Journal of Food Science. 2010. Vol. 75(8). P. H224–H229.

70. Cheng H., Li S., Fan Y., Gao X., Hao M., Wang J., Zhang X., Tai G., Zhou Y. Comparative studies of the antiproliferative effects of ginseng polysaccharides on HT-29 human colon cancer cells // Medical Oncology. 2011. Vol. 28(1). P. 175–181.

71. Fan Y. Y., Cheng H. R., Li S. S., Wang J., Liu D., Hao M. A., Gao X., Fan E., Tai G., Zhou Y. Relationship of the inhibition of cell migration with the structure of ginseng pectic polysaccharides // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 81(2). P. 340–347.

72. Maxwell E. G., Belshaw N. J., Waldron K. W., Morris V. J. Pectin – An emerging new bioactive food polysaccharide // Trends in Food Science & Technology. 2012. Vol. 24(2). P. 64–73.

73. Liepman A. H., Wightman R., Geshi N., Turner S. R., Scheller H. V. Arabidopsis: a powerful model system for plant cell wall research // Plant J. 2010. Vol. 61. P. 1107-1121.

74. Verhertbruggen Y., Knox J. P. Pectic polysaccharides and expanding cell walls // Plant cell monographs. 2007. Vol. 6. P. 139-158.

75. Braconnot H. Recherches sur un nouvel Acide universellement répadu dans tous les végétaux // Ann. chim. phy. 1825. Vol. 28. P. 173-178.

76. Schols H. A. Complex pectins: structure elucidation using enzymes / H. A. Schols, A. G. J. Voragen // In Pectins and pectinases, Eds. Visser J., Voragen A.G.J. – The Netherlands: Amsterdam, Elsevier Publishers Amsterdam, 1996. – P. 3–19.

77. Yapo B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 86. P. 373–385.

78. Voragen A. G. J., Coenen G. J., Verhoef R. P., Schols H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls // Struct. Chem. 2009. Vol. 20. P. 263-275.

79. Guo X., Meng H., Zhu S., Tang Q., Pan R., Yu S. Stepwise ethanolic precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 136. P. 316–321.

80. Westereng B., Michaelsen T. E., Samuelsen A. B., Knutsen S. H. Effects of extraction conditions on the chemical structure and biological activity of white cabbage pectin // Carbohydr. Polym. 2008. Vol. 72(1). P. 32–42.

81. Yapo B. M., Robert C., Etienne I., Wathelet B., Paquot M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts // Food Chem. 2007. Vol. 100. Vol. 4. P. 1356–1364.

82. Ma S., Yu S.-J., Zheng X.-L., Wang X.-X., Bao Q.-D., Guo X.-M. Extraction, characterization and spontaneous emulsifying properties of pectin from sugar beet pulp // Carbohydr. Polym. 2013. Vol. 98(1). P. 750–753.

83. Maxwell E. G., Colquhoun I. J., Chau H. K., Hotchkiss A. T., Waldron K. W., Morris V. J., Belshaw N. J. Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 136. P. 923–929.

84. Wang X., Chen Q., Lü X. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 38. P. 129–137.

85. Kulkarni S. G., Vijayanand P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa L.*) // LWT–Food Science and Technology. 2010. Vol. 43(7). P. 1026–1031.

86. Seixas F. L., Fukuda D. L., Turbiani F. R. B., Garcia P. S., Petkowicz C. L. de O., Jagadevan S., Gimenes M. L. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) by microwave-induced heating // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 38. P. 186–192.

87. Masmoudi M., Besbes S., Abbes F., Robert C., Paquot M., Blecker C., Attia H. Pectin extraction from lemon by-product with acidified date juice: Effect of extraction conditions on chemical composition of pectins // Food and Bioprocess Technology. 2012. Vol. 5(2). P. 687–695.

88. Chan S.-Y., Choo W.-S. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks // Food Chem. 2013. Vol. 141(4). P. 3752–3758.

89. Vriesmann L.C., Teófilo R.F., Petkowicz C.L.d.O. Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid LWT // Food Science and Technology. 2012. Vol. 49(1). P. 108–116.

90. Ele-Ekouna J.-P., Pau-Roblot C., Courtois B., Courtois J. Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*) // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 83(3). P. 1232–1239.

91. Shakhmatov E. G., Toukach P. V., Michailowa E. A., Makarova E. N. Structural studies of arabinan-rich pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L. Biological activity of pectins of *A. sibirica* // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 113. P. 515–524.

92. Shakhmatov E. G., Udoratina E. V., Atukmaev K. V., Makarova, E. N. Extraction and structural characteristics of pectic polysaccharides from *Abies sibirica* L. // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 123. P. 228–236.

93. Basanta M. F., Ponce N. M. A., Rojas A. M., Stortz C. A. Effect of extraction time and temperature on the characteristics of loosely bound pectins from Japanese plum // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 89(1). P. 230–235.

94. Xu Y., Zhang L., Bailina Y., Ge Z., Ding T., Ye X., Liu D. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grape fruit peel // Journal of Food Engineering. 2014. Vol. 126. P. 72–81.

95. Hosseini S. S., Khodaiyan F. Yarmand M. S. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties // Carbohydr. Polym. 2016. Vol. 140. P. 59–65.

96. Atmodjo M. A., Hao Z., Mohnen, D. Evolving Views of Pectin Biosynthesis // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. Vol. 64. P. 747-779.

97. Peaucelle A., Braybrook S., Hofte H. Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited // Frontiers of Plant Science. 2012. Vol. 3. P. 121.

98. Wolf S., Greiner S. Growth control by cell wall pectins // Protoplasma. 2012. Vol. 249. P. 169-175.

99. Galant A.L., Luzio G. A., Widmer W. W., Cameron R. G. Compositional and structural characterization of pectic material from Frozen Concentrated Orange Juice // Food Hydrocolloids. 2014. Vol. 35. P. 661-669.

100. Christiaens S., Van Buggenhout S., Ngouémazong E. D., Vandevenne E., Fraeye I., Duvetter T., et al. Anti-homogalacturonan antibodies: a way to explore the effect of processing on pectin in fruits and vegetables? // Food Res. Int. 2010. Vol. 44(9). P. 225-234.

101. Vincken J.-P., Schols H. A., Oomen R. J. F. J., McCann,M. C., Ulvskov, P., Voragen A. G. J., Visser R. G. F. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture // Plant Physiology. 2003. Vol. 132. P. 1781-1789.

102. Oomen R. J. F. J., Doeswijk'-Voragen C. H. L., Bush M. S., Vincken J.'P., Borkhardt B., van den Broek L. A. M., Corsar J., Ulvskov P., Voragen A. G. J., McCann M. C., Visser R. G. F. *In muro* fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (*Solanum tuberosum* L.) results

in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development // Plant J., 2002, 30, 403.

103. Oechslin R., Lutz M. V., Amado R. Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I // Carbohydr. Polym. 2003. Vol. 51. P. 301–310.

104. Abdel-Massih R. M., Rizkallah H. D., Saif Al-Din R., Baydoun E. A. H., Brett C. T. Nascent pectin formed in Golgi apparatus of pea epicotyls by addition of uronic acids has different properties from nascent pectin at the stage of galactan elongation // J. Plant Physiol., 2007, vol. 164. P. 1-10.

105. Wu Y., Ai L., Wu J., Cui S. W. Structural analysis of a pectic polysaccharide from boat-fruited sterculia seeds // Int. J. Biol. Macromol. 2013. Vol. 56. P. 76-82.

106. Микшина П. В., Петрова А. А., Горшкова Т. А. Функциональное разнообразие рамногалактуронанов I // Известия Академии наук. Серия химическая. 2015. № 5. С. 1088 – 1098.

107. Аверьянова, Е.В. Пектин: методы выделения и свойства: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ для студентов направлений подготовки 19.03.01 «Биотехнология», 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья», магистрантов направления подготовки 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» / Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьникова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2015. – 42 с.

108. Арифходжаев А. О. Галактаны и галактансодержащие полисахариды высших растений // Химия природных соединений. 2000. № 3. С. 185-197.

109. Оводов Ю. С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорган. Химия. 1998. №24. с. 483-501.

110. Khotimchenko M. Y., Kolenchenko E. A., Khotimchenko Y. S. Zinc-binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions // J. Coll. Interface Sci. 2008. Vol. 323. P. 216-222.

111. Khotimchenko M. Y., Kolenchenko E. A., Khotimchenko Y. S., Khozhaenko E. V., Kovalev V. V. Cerium binding activity of different pectin compounds in aqueous solutions // Coll. Surf. B: Biointerfaces. 2010. Vol. 77. P. 104-110.

112. Ridley B. L., O'Neill M. A., Mohnen D. A. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling // Phytochemistry. 2001. Vol. 57(6). P. 929-967.

113. Round A. N., Rigby N. M., MacDougal A. J., Morris V. J. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy // Carbohydr. Res. 2010. Vol. 345. P. 487-497.

114. Caffall K. H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydr. Res. 2009. Vol. 344. P. 1879-1900.

115. Harholt J., Suttangkakul A., Scheller H. V. Biosynthesis of pectin // Plant Physiol., 2010. Vol. 153. P. 384-395.

116. Vincken J. P. Pectin the hairy thing: evidence that homogalacturonan is a side chain of rhamnogalacturonan I / J. P. Vincken, H. A. Schols, R. J. F. J. Oomen, G. Beldman, R. G. F. Visser, A. G. J. Voragen // In A. G. J. Voragen, H. A. Schols, R. G. F. Visser. Advances in pectin and pectinase research.– Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, P. 47-60.

117. Naran R., Chen G., Carpita N. C. Novel rhamnogalacturonan-I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage // Plant Physiol. 2008. Vol. 148. P. 132-141.

118. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis // Curr. Opin. Plant. Biol. 2008. Vol. 11. P. 266-277.

119. Maxwell E. G., Colquhoun I. J., Chau H. K., Hotchkiss A. T., Waldron K. W., Morris V. J., Belshaw N. J. Rhamnogalacturonan I containing homogalacturonan inhibits colon cancer cell proliferation by decreasing ICAM1 expression // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 132. P. 546–553.

120. de Vries J. A., den Uijl C. H., Voragen A. G. J., Rombouts F. M., Pilnik W. Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances // Carbohydr. Polym. 1982. Vol. 3. P. 193–205.

121. Coenen G. J., Bakx E. J., Verhoef R. P., Schols H. A., Voragen A. G. J. Identification of the connecting linkage between homo or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I // Carbohydr. Polym. 2007. Vol. 70. P. 224–235.

122. Wolf S., Mouille G., Pelloux J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development // Molecular Plant. 2009. Vol. 2. P. 851-860.

123. Makarova E. N., Shakhmatov E. G.. Structural and chemical characterization of abienan, a pectin from the greenery of Siberian fir (*Abies sibirica* L.) // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 707–712.

124. Makarova E. N., Patova O. A., Shakhmatov E. G., Kuznetsov S. P., Ovodov Y. S. Structural studies of the pectic polysaccharide from Siberian fir (*Abies sibirica* Ledeb.) // Carbohydr. Polym. 2013. Vol. 92. P. 1817–1826.

125. Макарова Е. Н., Шахматов Е. Г., Удоратина Е. В., Кучин А. В.. Структурно-химическая характеристика пектинов, арабиногалактанов и арабиногалактановых белков хвойных растений // Известия Академии Наук. Серия химическая. 2015. № 6. С. 1302-1318.

126. Dong C. X., Hayashi K., Mizukoshi Y., Lee J. B., Hayashi T. Structures of acidic polysaccharides from *Basella rubra* L. and their antiviral effects // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84. P. 1084-1092.

127. Vriesmann L. C., Teyfilo R. F., Petkowicz C. L. O. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod huks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84. P. 1230-1236.

128. Yapo B. M. Improvement of the compositional quality of monocot pectin extracts contaminated with glucuronic acid-containing components using a step-wise purification procedure // Food Bioprod. Process. 2010. Vol. 88. P. 283-290.

129. Ralet M. C., Crepeau M. J., Lefebvre J., Mouille G., Hofte H., Thibault J. F. Reduced number of homogalacturonan domains in pectins of an Arabidopsis mutant enhances the flexibility of the polymer // Biomacromolecules. 2008. Vol. 9. P. 454-460.

130. Yapo B. M. Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages // Polym. Rev. 2011. Vol. 51. P. 391-413.

131. Thibault J. F., Renard C. M. G. C., Axelos M. A. V., Roger P., Crepeau M. J. Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis // Carbohydr. Res. 1993. Vol. 238. P. 271-286.

132. Yapo B. M., Lerouge P., Thibault J. F., Ralet M. C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II // Carbohydr. Polym. 2007. Vol. 69. P. 426-435.

133. Yapo B. M. Pineapple and banana pectins comprise fewer homogalacturonan building blocks with a smaller degree of polymerisation as compared with yellow passion fruit and lemon pectins: Implication for gelling properties // Biomacromolecules. 2009. Vol. 10(4). P. 717–721.

134. Mort A. J., Qiu F., Maness N. O. Determination of the pattern of methyl esterification in pectin. Distribution of contiguous nonesterified residues // Carbohydr. Res. 1993. Vol. 247. P. 21-35.

135. Posé S., Kirby A. R., Mercado J. A., Morris V. J., Quesad M. A. Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruits using AFM. // Carbohydr. Polym. 2012, Vol. 88(3). P. 882–890.

136. McNeil M., Darvill A. G., Albersheim P. Structure of plant cell walls X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension–cultured sycamore cells // Plant physiology. 1980. Vol. 66(6). P. 1128–1134.

137. Albersheim, P., Darvill, A. G., O'neill, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants // Progress in biotechnology. 1996. Vol. 14. P. 47-55.

138. Renard, C. M. G. C.; Cr´epeau, M. J.; Thibault, J. F. Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins // Carbohydr. Res. 1995. Vol. 275. P. 155-165.

139. Nakamura A., Furuta H., Maeda H., Nagamatsu Y., Yoshimoto A. Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2001. Vol. 65(10). P. 2249–2258.

140. Prade R.A., Zhan D.F., Ayoubi P., Mort A. J. Pectins, pectinases and plant–microbe interactions // Biotechnol. Genet. Eng. 1999. Vol. 16. P. 361–391.

141. Aspinall G. O., Cottrell I. W., Egan S. V., Morrison I. M., Whyte J. N. C. Polysaccharides of soy-beans. Part IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal // J. Chem. Soc. C, 1967, P. 1071-1080.

142. Gao Q. P., Kiyohara H., Yamada H. Further structural studies of anti–complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* CA Meyer // Carbohydr. Res. 1990. Vol. 196. P. 111–125.

143. Ralet M. C., Crйpeau M. J., Bonnin E. Evidence for a blockwise distribution of acetyl groups onto homogalacturonans from commercial sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin // Phytochemistry. 2008. Vol. 69. P. 1903-1909.

144. Perrone P., Hewage C. M., Thomson A. R., Bailey K., Sadler I. H., Fry S. C. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity // Phytochemistry. 2002. Vol. 60. P. 67-77.

145. Ishii T. O-Acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls // Plant Physiol. 1997. Vol. l 13. P. 1265-1272.

146. Komalavilas P., Mort A. J. The acetylation of O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectin // Carbohydr. Res. 1989. Vol. 189. P. 261-272.

147. Yapo B. M. Etude de la variabilité structurale des pectines (Study of the structural variability of pectins) Ph.D. Thesis. – Nantes, France: Université de Nantes. 2007. P. 163.

148. O'Neill, M. A. The composition and structure of plant primary cell walls / M. A. O'Neill, W. S. York // The plant cell wall. 2003. P. 1–54.

149. Rihouey C., Morvan C., Borissova I., Jauneau A., Demarty M., Jarvis M. C. Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls // Carbohydr. Polym., 1995. Vol. 28. P. 159-166.

150. Sun H. H., Wooten J. B., Ryan Jr. W. S., Bokelman G. H. Structural characterization of a tobacco rhamnogalacturonan // Carbohydr. Polym. 1987. Vol. 7. P. 143-158.

151. Gorshkova T. A., Wyatt S. E., Salnikov V. V., Gibeaut D. M., Ibragimov M. R., Lozovaya V. V., Carpita N. C. Cell-Wall Polysaccharides of Developing Flax Plants // Plant Physiol. 1996. Vol. 110. P. 721-729.

152. Vierhuis E., Schols H. A., Beldman G., Voragen A. G. J. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages // Carbohydr. Polym. 2000. Vol. 43. P. 11-21.

153. Kuhnel S., Hinz S. W. A., Pouvreau L., Wery J., Schols H. A., Gruppen H. Chrysosporium lucknowense arabinohydrolases effectively degrade sugar beet arabinan // Bioresource. Technol. 2010. Vol. 101. P. 8300-8307.

154. Nunes F. M., Reis A., Silva A. M. S., Rosario M., Domingues M., Coimbra M. A. Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans // Phytochemistry. 2008. Vol. 69. P. 1573-1585.

155. Westphal Y., Kühnel S., Waard P., Hinz S.W.A., Schols H.A., Voragen A.G.J. Gruppen H. Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan // Carbohydr. Res. 2010. Vol. 345. P. 1180–1189.

156. Carpita N. C., Gibeaut D. M.. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth // Plant J. 1993. Vol. 3(1). P. 1–30.

157. Lerouge P., O'Neill M. A., Darvill A. G., Albersheim P. Structural characterization of endoglycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I // Carbohydr. Res. 1993. Vol. 243. P. 359-371.

158. Oosterveld A., Beldman G., Schols H. A., Voragen A. G. J. Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp // Carbohydr. Res. 2000. Vol. 328. P. 185-197.

159. Coimbra M. A., Cardoso S. M., Lopes-da-Silva J. A. Olive pomace, a source for valuable arabinan-rich pectic polysaccharides // Chem. Mater. Sci. 2010. Vol. 294. P. 129-141.

160. Lin D., Lopez-Sanchez P., Gidley M. J. Binding of arabinan or galactan during cellulose synthesis is extensive and reversible // Carbohydr. Polym. 2015. Vol. 126. P. 108–121.

161. Delattre C., Fenoradosoa T. A., Michaud P. Galactans: an overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides // Braz. Arch. Biology Technology. 2011. Vol. 54. P. 1075-1092.

162. Hinz S. W. A., Verhoef R., Schols H. A., Vincken J. 'P., Voragen A. G. J. Type I arabinogalactan contains β-D-Galp-(1→3)-β-D-Gal*p* structural elements // Carbohydr. Res. 2005. Vol. 340. P. 2135-2143.

163. Ralet M. C., Bonnin E., Thibault J. F. Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl–esterases // Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 2001. Vol. 753(1). P. 157–166.

164. Rafińska K, Bednarska E. Localisation pattern of homogalacturonan and arabinogalactan proteins in developing ovules of the gymnosperm plant *Larix decidua* Mill. // Sexual plant reproduction. 2011. Vol. 24(1). P. 75-87.

165. Steinhorn G., Sims I. M., Carnachan,S. M., Carr A. J., Schlothauer R. Isolation and characterisation of arabinogalactan-proteins from New Zealand kanuka honey // Food Chem. 2011. Vol. 128(4). P. 949–956.

166. Tan L., Qiu F., Lamport D. T. A., Kieliszewski M. J. Structure of a hydroxyproline (Hyp)-arabinogalactan polysaccharide from repetitive Ala-Hyp expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 13156–13165.

167. Gaspar Y., Johnson K. L., McKenna J. A., Bacic A., Schultz C. J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function // Plant Molecular Biolog. 2001. Vol. 47. P. 161–176.

168. Seifert G. J., Roberts K. The biology of arabinogalactan proteins // Annu. Rev. Plant Biol. 2007. Vol. 58. P. 137–161.

169. Nothnagel E.A. Proteoglycans and related components in plant cells // International Review of Cytology. 1997. Vol. 174. P. 195–291.

170. Serpe M. D., Nothnagel E. A Fractionation and Structural Characterization of Arabinogalactan-Proteins from the Cell Wall of Rose Cells // Plant Physiology. 1995. Vol. 109(3). P. 1007-1016.

171. Paulsen B. S., Craik D. J., Dunstan D. E., Stone B. A., Bacic A. The Yariv reagent: Behaviour in different solvents and interaction with a gum arabic arabinogalactanprotein // Carbohydr. Polym. 2014. Vol. 106. P. 460–468.

172. Tan L., Varnai P., Lamport D. T. A., Yuan C., Xu J., Qiu F., Kieliszewski M. J. Plant O-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 24575–24583.

173. Tryfona T., Liang H.-C., Kotake T., Kaneko S., Marsh J., Ichinose H., Lovegrove A., Tsumuraya Y., Shewry P. R., Stephens E., Dupree P. Carbohydrate structural analysis of wheat flour arabinogalactan protein // Carbohydr. Res. 2010. Vol. 345. P. 2648–2656.

174. Tryfona T., Liang H.-C., Kotake T., Tsumuraya Y., Stephens E., Dupree P. Structural Characterization of Arabidopsis Leaf Arabinogalactan Polysaccharides // American Society of Plant Biologists. 2012. Vol. 160. P. 653-666.

175. Gane A.M., Craik D., Munro S., Howlett L. A., Clarke G. J., Bacic, A. E. A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of rabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana alata* // Carbohydr. Res. 1995. Vol. 277(1). P. 67-85.

176. Redgwell R. J., Curti D., Fischer M., Nicolas P., Fay, L. B. Coffee bean arabinogalactans: Acidic polymers covalently linked to protein // Carbohydr. Res. 2002. Vol. 337. P. 239–253.

177. Showalter A. M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function // Cellular and Molecular Life Sciences. 2001. Vol. 58(10). P. 1399-1417.

178. Fragkostefanakis S., Dandachi F., Kalaitzis P. Expression of arabinogalactan proteins during tomato fruit ripening and in response to mechanical wounding, hypoxia and anoxia // Plant Physiology and Biochemistry. 2012. Vol. 52. P. 112–118.

179. Pettolino F., Liao M.-L., Zhu Y., Mau S.-L., Bacic A. Structure, function and cloning of arabinogalactan-proteins (AGPs): An overview // Food and Food Ingredients Journal of Japan. 2006. Vol. 211. P. 12–25.

180. Taguchi I., Kiyohara H., Matsumoto T., Yamada H. Structure of oligosaccharide side chains of an intestinal immune system modulating arabinogalactan isolated from rhizomes of *Atractylodes lancea* DC // Carbohydr. Res. 2004. Vol. 339. P. 767–770.

181. Togola A., Inngjerdingen M., Diallo D., Barsett H., Rolstad B., Michaelsen T. E., Paulsen B. S. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterization // Journal of Ethnopharmacology. 2008. Vol. 115. P. 423–431.

182. Brecker L., Wicklein D., Moll H., Fuchs E. C., Becker W.-M., Petersen A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phleum pretense* L.) // Carbohydr. Res. 2005. Vol. 340. P. 657–663.

183. Oosterveld A., Voragen A. G. J., Schols H. A. Characterization of hop pectins shows the presence of an arabinogalactan-protein // Carbohydr. Polym. 2002. Vol. 49. P. 407–413.

184. Redgwell R. J., Curti D., Wang J., Dobruchowska J. M., Gerwig G. J., Kamerling J. P., Bucheli P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry

(*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan-proteins // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84(3). P. 1075–1083.

185. Tan L., Eberhard S., Pattathil S., Warder C., Glushka J., Yuan C., Hao Z., Zhu X., Avci U., Miller J. S., Baldwin D., Pham C., Orlando R., Darvill A., Hahn M. G., Kieliszewski M. J., Mohnen D. An Arabidopsis cell wall proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein // The Plant Cell Online. 2013. Vol. 25(1). P. 270-287.

186. Keegstra K., Talmadge K., Bauer W. D., Albersheim, P. The structure of plant cell walls III. A model of the walls of suspensioncultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components // Plant Physiology. 1973. Vol. 51. P. 188–196.

187. Kato Y., Nevins D. J. Structural characterization of an arabinoxylan-rhamnogalacturonan complex from cell walls of *Zea* shoots // Carbohydr. Res. 1992. Vol. 227. P. 315-329.

188. Pellerin P., Vidal S., Williams P., Brillouet J. M. Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content // Carbohydr. Res. 1995. Vol. 277. P. 135 – 143.

189. Nergard C. S., Matsumoto T., Inngjerdingen M., Inngjerdingen K., Hokputsa S., Harding S. E., Michaelsen T. E., Diallo D., Kiyohara H., Paulsen B. S., Yamada H. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae) // Carbohydr. Res. 2005. Vol. 340. P. 115–130.

190. Kirby A. R., MacDougall A. J., Morris V. J. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules // Carbohydr. Polym. 2008. Vol. 71. P. 640–647.

191. Кочетков Н. К. Химия углеводов / Н. К. Кочетков, А. Ф. Бочков, Б. А. Дмитриев, А. И. Усов, О. С. Чижов, В. Н. Шибаев. – М.: Химия, 1967. – 672 с.

192. Оводов Ю. С. Избранные главы биоорганической химии / Ю. С. Оводов. – Сыктывкар: СГУ, 1998. – 222 с.

193. Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. –М.: Из-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.

194. Варбанец Л.Д., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы структурного анализа липополисахаридов // Ред. В.С. Подгорский. Методы исследования эндотоксинов. Киев: Наукова думка. 2006. С. 105-183.

195. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Colorimetric Method for determination of sugar sandrelated substances // Analyt. Chem. 1956. Vol. 28. P. 350-356.

196. York W. S., Darvill A. G., McNeil M. A., Stevenson T. T., Albersheim P. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components // Meth. Enzymol. 1985. Vol. 118. P. 3-40.

197. Usov A. I., Bilan M. I., Klochkova N. G. Polysaccharide of algae 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilutitara* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae) // Bot. Marina. 1995. Vol. 38. P. 43-51.

198. Bradford H. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye-binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.

199. Wood P. J., Siddiqui I. R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity // Anal. Biochem. 1971. Vol. 39. P. 418-423.

200. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // J. Biol. Chem. 1944. V. 153. P. 375-380.

201. Шанина С.Н., Голубев Е.А. Аминокислоты в шунгитах Карелии // Геохимия, 2010. Т. 48. № 9. С. 972-987.

202. Дудкин М. С. Гемицеллюлозы / М. С. Дудкин, В. С. Громов, Н. А. Ведерников, Р. Г. Каткевич, Н. К. Черно. – Рига: Зинатне, 1991. – 488 с.

203. Ebringerova A., Hromadkova Z., Heinze T. Hemicellulose // Adv. Polym. Sci. 2005. Vol. 186. P. 1–67.

204. Doering A., Lathe R., Persson S. An update on xylan synthesis // Mole. Plant. 2012. V. 5. P. 769–771.

205. Prabasari I., Pettolino F. F., Ming-Long Liao M. L, Bacic A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84. P. 484-494.

206. Capek P., Matulová M., Navarini L., Suggi-Liverani F. Structural features of anarabinogalactan-protein isolated from instant coffee powder of *C. arabica* beans // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 80. P. 180–185.

207. Willfor S., Holmbom B. Isolation and characterisation of water-soluble polysaccharides from Norway spruce and Scots pine // Wood Sci. and Technol. 2004. Vol. 38. P. 173–179.

208. Hannuksela T., Penhoat C. H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp // Carbohydr. Res. 2004. Vol. 339. P. 301–312.

209. Matulová M., Capek P., Kaneko S., Navarinic L., Liveranic F. S. Structure of arabinogalactan oligosaccharides derived from arabinogalactan-protein of *Coffea arabica* instant coffee powder // Carbohydr. Res. 2011. Vol. 346. P. 1029–1036.

210. Haque M. A., Kotake T., Tsumuraya Y. Mode of action of β-glucuronidase from *Aspergillus niger* on the sugar chains of arabinogalactan-protein // Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2005. Vol. 69(11). P. 2170–2177.

211. Dourado F., Cardoso S. M., Silva A. M. S., Gama F. M., Coimbra M. A. NMR structural elucidation of the arabinan from *Prunus dulcis* immunobiological active pectic polysaccharides // Carbohydr. Polym. 2006. Vol. 66. P. 27-33.

212. Khramova D. S., Golovchenko V. V., Shashkov A. S., Otgonbayar D., Chimidsogzol A. Ch., Ovodov Yu. S. Chemical composition and immunomodulatory activity of a pectic polysaccharide from the ground thistle *Cirsium esculentum* Siev // Food Chem. 2011. Vol. 126. P. 870-877.

213. Thude S., Classen B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan // Phytochemistry. 2005. Vol. 66(9). P. 1026–1032.

214. Tsumauraya Y., Ogura K., Hashimoto Y., Mukoyama H., Yamamoto S. Arabinogalactan-proteins from primary and mature roots of radish (*Raphanus sativus* L.) // Plant Physiol. 1988. Vol. 86. P. 155–160.

215. Kieliszewski M. J., Kamyab A., Leykam J. F., Lamport D. T. A. A histidine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein // Plant Physiology. 1992. Vol. 99(2). P. 538–547.

216. Konishi T., Kotake T., Soraya D., Matsuoka K., Koyama T., Kaneko S., Igarashi K., Samejima M., Tsumuraya Y. Properties of family 79 β-glucuronidases that hydrolyze β-glucuronosyl and 4-O-methyl-β-glucuronosyl residues of arabinogalactan-protein // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343(7). P. 1191–1201.

217. Petersen B. O., Meier S., Duus J. Ø., Clausen M. H. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343. P. 2830–2833.

218. Taboada E., Fisher P., Jara R., Zúñiga E., Gidekel M., Cabrera J. C., Pereira E., Gutiérrez-Moraga A., Villalonga R., Cabrera G. Isolation and

characterization of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits // Food Chem. 2010. Vol. 123. P. 669–678.

219. Breitmaier E. Carbon 13 NMR spectroscopy: high resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry / E. Breitmaier, W. Voelter. – New York: VCH, 1990. – P. 515.

220. Teleman A., Nordstrom M., Tenkanen M., Jacobs A., Dahlman O. Isolation and characterization of *O*-acetylated glucomannans from aspen and birch wood // Carbohydr. Res. 2003. Vol. 338. P. 525–534.

221. Ghotra B.S., Vasanthan T., Temelli F. Structural characterization of barley β-glucan extracted using a novel fractionation technique // Food Res. Int. 2008. Vol. 41(10). P. 957–963.

222. Mikshina P. V., Gurjanov O. P., Mukhitova F. K., Petrova A. A., Shashkov A. S., Gorshkova T. A. Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 87. P. 853-861.

223. Cardoso S. M., Ferreira J. A., Mafra I., Silva A. M. S., Coimbra M. A. Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides fromolive pulp cell walls // J. of Agr. Food Chem. 2007. Vol. 55. P. 7124–7130.

224. Pastell H., Tuomainen P., Virkki L., Tenkanen M. Step-wise enzymatic preparation and structural characterization of singly and doubly substituted arabinoxylo-oligosaccharides with non-reducing end terminal branches // Carbohydr. Res. 2008. Vol. 343. P. 49-57.

225. Golovchenko V. V., Khramova D. S., Ovodova R. G., Shashkov A. S., Ovodov Yu. S. Structure of pectic polysaccharides isolated from onion *Allium cepa* L. using a simulated gastric medium and their effect on intestinal absorption // Food Chem. 2012. Vol. 134. P. 1813-1822.

226. Daas P. J. H., Meyer-Hansen K., Schols H. A., de Ruiter G. A., Voragen A. G. J. Investigation of the non-esterified galacturonic acid

distribution in pectin with endopolygalacturonase // Carbohydr. Res. 1999. Vol. 318. P. 135-145.

227. Voragen A. G. J., Schols H. A., Gruppen H. Structural studies of plant cell-wall polysaccharides using enzymes // The Proceedings of the International Symposium on Plant Polymeric Carbohydrates – Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry, 1993, P. 1–15.

228. Azadi P., O'Neill M. A., Bergmann C., Darvill A. G., Albersheim P. The backbone of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan I is cleaved by an endohydrolase and an endolyase // Glycobiology. 1995. Vol. 5. P. 783-789.

229. Mutter M., Renard C. M. G. C., Beldman G., Schols H. A., Voragen A. G. J. Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase // Carbohydr. Res. 1998. Vol. 311. P. 155-164.

230. Searle-van Leeuwen M. J. F. Acetyl esterases of *Aspergillus niger*: Purification and mode of action on pectins / M. J. F. Searle-van Leeuwen, J. P. Vincken, D. Schipper, A. G. J. Voragen, G. Beldman // In Pectins and Pectinases. Eds. Visser J., Voragen A.G.J. – The Netherlands: Amsterdam, Elsevier Publishers Amsterdam, 1996. –P. 793-798.

231. Mandal S., Patra S., Dey B., Bhunia S. K., Maity K. K., Islam S. S. Structural analysis of an arabinan isolated from alkaline extract of the endosperm of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Nata Karanja) // Carbohydr. Polym. 2011. Vol. 84. P. 471-476.

232. Karácsonyi Š., Pätoprstý V., Kubačková M. Structural study on arabinogalactan–proteins from *Picea abies* L. Karst // Carbohydr. Res. 1998. Vol. 307. P. 271-279.

233. Putoczki T. L., Pettolino F., Griffin M. D. W., Möller R., Gerrard J. A., Bacic A., Jackson S. L. Characterization of the structure, expression and function of *Pinus radiata* D. Don arabinogalactan-proteins // Planta. 2007. Vol. 226. P. 1131-1142.

234. Göllner E. M., Ichinose H., Kaneko S., Blaschek W., Classen B. An arabinogalactan-protein from whole grain of *Avena sativa* L. belongs to the wattle-blossom type of arabinogalactan-proteins // Journal of Cereal Science. 2011. Vol. 53(2). P. 244-249.

235. Classen B., Thude S., Blaschek W., Wack M., Bodinet, C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea* // Phytomedicine. 2006. Vol. 13. P. 688–694.

236. Sims I. M., Furneaux R. H. Structure of the exudate gum from Merytasinclairii // Carbohydr. Polym. 2003. Vol. 52. P. 423–431.

237. Mollard A. Joseleau J.-P. *Acacia senegal* cells cultured in suspension secrete a hydroxyproline-deficient arabinogalactan protein // Plant Physiology and Biochemistry. 2000. Vol. 32. P. 703–709.

238. Шахматов Е. Г., Макарова Е. Н., Михайлова Е. А., Шубаков А. А., Оводов Ю. С. Общая химическая характеристика полисахаридов плодов граната (*Punica granatum* L.) // Бутлеровские сообщения. 2013. Т. 33. № 3. С. 116–121.

Благодарности

Выражаю огромную благодарность моему научному руководителю Елене Николаевне Макаровой за всестороннюю поддержку, обсуждение результатов и помощь в выполнении работы. Выражаю искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории химии растительных полимеров, особенно Елене Васильевне Удоратиной за помощь, внимание и ценные советы. Отдельная признательность Сергею Петровичу Кузнецову за регистрацию ЯМР спектров и Елене Андрияновне Михайловой (Институт Физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар) за помощь в проведении исследований по биологической активности полисахаридов, Шаниной Светлане Николаевне (Институт Геологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар) за помощь в проведении исследований по аминокислотному составу, а также всем сотрудникам лаборатории физико-химических методов исследования Института химии Коми НЦ УрО РАН.