

УДК 557.114

*Е. Н. Гордина, А. А. Злобин, Е. А. Мартинсон, С. Г. Литвинец***ЧАСТИЧНАЯ СТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИСАХАРИДОВ
КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ СТЕБЛЯ БОРЩЕВИКА ОБЫКНОВЕННОГО
HERACLEUM SOSNOWSKYI MANDEN**

Из каллуса стебля борщевика Сосновского выделены фракции водорастворимых полисахаридов HScI и HScII с содержанием D – галактуроновой кислоты от 24 до 70% соответственно.

Моносахаридный состав гликанов каллуса, а также данные ультрафильтрации, метилирования, ионообменной хроматографии, ферментативного гидролиза свидетельствует о возможном наличии в HScIфрагментов арабинанов, галактана и/или арабиногалактанов, HScII-и протяженных участков 1,4- α -D-гомогалактуронана.

Также показано, что в составе фракций полисахаридов содержатся сопутствующие липиды в состав которых входят пальмитиновая, олеиновая, стеариновая, миристиновая кислоты.

Ключевые слова: борщевик Сосновского, стебли, полисахариды, гликаны.

Полисахариды каллусные ткани растений, благодаря относительно постоянным условиям культивирования, могут быть использованы для получения физиологически активных гликанов, обладающих антимикробными и иммуномодулирующими свойствами. Перспективными объектами с этой точки зрения являются водорастворимые полисахариды борщевика Сосновского, свойства которых, несмотря на широкое распространение данного растения на территории европейской части России, изучены недостаточно полно.

Цель работы – характеристика водорастворимых полисахаридов каллусной ткани стебля борщевика Сосновского.

Каллусную ткань стебля борщевика культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей витамины по прописи Стаба, *мезо*-инозит – 100 мг/л, глицин – 2 мг/л, сахарозу – 30 г/л, а также фитогормоны 2,4-дихлорфенок-сиуксусную кислоту (2,4-Д) – 1,0 мг/л и 6-бензиламинопурин (6-БАП) – 0,1 мг/л. Культивирование каллуса стебля борщевика проводили при 26 °С в темноте в течение 21 сут. Удельная скорость роста каллуса составила $2,00 \pm 0,22$ сут⁻¹.

Для выделения водорастворимых полисахаридов из растительного материала использовали метод последовательной истощающей экстракции водными растворами, позволяющий получить их в состоянии, приближенном к нативному. Фракции резервных полисахаридов HScI экстрагировали из ткани дистиллированной водой при 68 °С, а фракции пектиновых полисахаридов HScII, входящих в состав протопектина клеточных стенок – 0,7%-ным раствором оксалата аммония при 68 °С [1].

Качественный и количественный моносахаридный состав определяли методом хромато-масс-спектрометрии (ГЖХ-МС) перацетатов полиолов и триметилсильльных (ТМС) эфиров моносахаридов [2] после кислотного гидролиза фракций полисахаридов 2М раствором трифторуксусной кислоты (ТФА) при 100 °С в течение 4 ч. Суммарное содержание остатков гликуроновых кислот определяли спектрофотометрическим методом реакцией с 3,5-диметилфенолом и концентрированной серной кислотой [3], белка – по методу Лоури [4], метоксильных групп – по методу [5]. Метилирование образцов полисахаридов проводили по методу Хакамори [6], с последующим гидролизом метилированных полисахаридов 2М раствором ТФА при 100 °С в течение 5 ч, переводом частично метилированных моносахаридных остатков в соответствующие ацетаты и анализом их методом ГЖХ-МС [2].

Выделение веществ липидной природы из образцов полисахаридов проводили по Блайю-Дайэру [7]. Ультрафильтрацию растворов полисахаридов проводили с помощью концентратора Vivacell 250 и мембраны Vivacell 250, ПЭС (Владисарт», Россия) с отсекаемой среднемассовой молекулярной массой – 100 кДа.

Характеристика полученных фракций резервных HScI и пектиновых HScII полисахаридов каллуса борщевика приведена в Таблице 1.

Таблица 1

**Состав резервных и пектиновых полисахаридов каллусной ткани
стебля борщевика**

Фракция	Выход, %*	MeO, %	Содержание, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	Белок
HScI	4,2	8,4	24,1	11,4	19,3	Сл.	2,8	0,5	3,1	19,0
HScII	4,6	4,0	70,0	10,9	3,8	0,7	0,4	0,3	0,9	9,4

Примечания. * – в пересчете на сухое вещество каллусной ткани; Сл. – следовые количества; MeO – метоксильные группы; Сл. – следовые количества; GalA – галактуроновая кислота; Ara – арабиноза; Gal – галактоза; Rha – рамноза; Xyl – ксилоза; Man – манноза; Glc – глюкоза

Из гликуроновых кислот в виде ТМС-производных в составе HScII идентифицированы только остатки галактуроновой кислоты, а в резервных полисахаридах HScI наряду с остатками галактуроновой кислоты в следовых количествах обнаружены также остатки глюкуроновой кислоты. Из нейтральных моносахаридов в составе резервных гликанов HScI каллуса преобладают остатки галактозы и арабинозы. В минорных количествах в них содержатся остатки рамнозы. Фракции пектинов HScII отличаются высоким содержанием остатков галактуроновой кислоты (70,0%) и низким количеством остатков рамнозы (0,7%). Из нейтральных моносахаридов в их составе преобладают остатки галактозы и арабинозы.

Для определения наличия в HScI и HScII веществ липидной природы и их жирнокислотного состава была проведена экстракция фракций полисахаридов каллуса по Блайю-Дайэру [7] с последующим омылением обезжиренных полисахаридов HScI и HScII 2 М спиртовым раствором KOH и экстракцией свободных жирных кислот. Содержание жирных кислот составило 2,6% и 2,5% для

HScI и HScII соответственно. Идентификацию и определение относительного содержания жирных кислот проводили методом ГЖХ-МС после их метилирования в абсолютном метаноле в присутствии BCl_3 .

Как следует из приведенных в таблице 2 результатов, в составе липидных экстрактов преобладают насыщенные жирные кислоты – 73,6% и 77,0% для HScI и HScII соответственно.

Таблица 2

**Относительное содержание жирных кислот, входящих
в состав фракций водорастворимых полисахаридов каллуса**

Жирная кислота		Фракции полисахаридов	
Название	Условное обозначение*	HScI	HScII
Лауриновая	12:0	1,2	0,9
Миристиновая	14:0	6,6	5,2
Пентадекановая	15:0	2,7	2,4
Пальмитиновая	16:0	52,3	59,5
Пальмитолеиновая	16:1 с**	5,2	3,6
Стеариновая	18:0	10,8	9,0
Олеиновая	18:1с	14,8	14,1
Линолевая	18:2с	3,6	2,5
Н.и.	-	2,8	2,8

Примечания: * – C10:0...C18:1: первая цифра – количество атомов углерода в цепи; вторая – число двойных связей; ** 16:1с – *цис*-изомеры кислот

Для удаления из состава HScI и HScII низкомолекулярных фрагментов полисахаридов была проведена их ультрафильтрация с использованием мембран с отсекаемой молекулярной массой 100 кДа. Были получены фракции HScI-и и HScII-и с выходами 81,4% и 90,8%, состав которых практически идентичен исходным полисахаридам HScI и HScII (Таблица 3).

Таблица 3

**Состав фракций после ультрафильтрации резервных
и пектиновых полисахаридов**

Фракция	Выход, %*	MeO, %	Содержание, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	Белок
HScI-u	81,4	8,5	25,5	8,7	17,5	0,4	1,2	0,3	1,8	14,1
HScII-u	90,8	4,7	72,5	7,4	2,7	0,4	0,2	Сл.	0,3	8,9

Примечания. * – выход от массы образца, взятого на ультрафильтрацию; MeO –, Сл. – см. примечания к таблице 1

Для определения гомогенности HScI-u и HScII-u полисахаридов была проведена их ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе водными растворами NaCl возрастающей концентрации. Главные фракции, полученные ионообменной хроматографией, представлены кислыми полисахаридами с содержанием остатков галактуроновой кислоты 6,1-49,3% (HScI-u) и 22,3-70,5% (HScII-u) (Таблица 4 и 5).

Таблица 4

Состав фракций резервных полисахаридов HScI-u после ДЭАЭ-целлюлозы

Концентрация раствора NaCl	Выход, %*	MeO, %	Содержание, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	Белок
0,1 М NaCl	13,8	0,7	6,1	15,1	38,1	0,9	1,1	0,3	1,7	16,5
0,2 М NaCl	26,9	2,7	39,0	6,8	17,4	0,7	1,0	0,2	2,2	10,9
0,3 М NaCl	27,2	1,4	49,3	2,9	6,4	0,3	0,6	0,1	1,2	15,6

Примечания. * – выход от массы образца, взятого на ионообменную хроматографию; MeO – см. примечания к таблице 1

Таблица 5

Состав фракций пектиновых полисахаридов HScII-и после ДЭАЭ-целлюлозы

Концентрация раствора NaCl	Выход, %*	MeO, %	Содержание, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	Белок
0,1 М NaCl	12,9	0,9	30,2	7,0	6,8	0,5	Сл.	0,2	0,1	8,0
0,2 М NaCl	4,9	4,5	62,8	4,1	2,5	0,5	0,1	Сл.	1,1	3,7
0,3 М NaCl	47,1	2,4	70,5	2,9	1,9	0,6	0,3	Сл.	0,3	1,7
0,4 М NaCl	14,1	0,2	22,3	0,7	0,8	Сл.	Сл.	Сл.	0,4	9,5

Примечания. * – , MeO – см. примечания к таблице 1 и 4

Для ферментативного гидролиза полисахаридов каллуса HScI-и и HScII-и использовали пектиназу *Aspergillus niger* (Sigma, США). Длительность реакции ферментализации контролировали с помощью метода Шомоди-Нельсона [8]. Для осаждения продуктов реакции к ферментализату добавляли 4-х кратный объем 96%-ного этилового спирта. В результате были получены фракции полисахаридов HScI-и-F и HScII-и-F, состав которых приведен в Таблице 6.

Таблица 6

Состав фракций полисахаридов после гидролиза HScI-и и HScII-и пектиназой

Фракция	Выход, %*	MeO, %	Содержание, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	Белок
HScI-и-F	43,6	0,70	25,1	4,6	18,5	Сл.	1,1	0,3	9,6	13,3
HScII-и-F	11,3	0,5	71,0	4,5	2,2	0,6	0,4	0,4	13,2	12,1

В ферментолизатах методом ГЖХ-МС в виде ТМС-производных были идентифицированы остатки свободной галактурановой кислоты, что свидетельствует о наличии в полисахаридах HScI-у и HScII-у участков 1,4- α -гомогалактурона.

Результаты метилирования HScI-у и HScII-у указывают на то, что в состав их углеводных цепей входят 1,4-связанные остатки ксилопиранозы, 1,5- и 1,3,5-связанные остатки арабинофуранозы, 1,4-связанные остатки глюкопиранозы, 1,6- и 1,3,6-связанные остатки маннопиранозы, 1,4- и 1,6-связанные остатки галактопиранозы. На терминальных концах углеводных цепей локализованы остатки арабинофуранозы, глюкопиранозы и ксилопиранозы.

Список литературы

1. Оводова Р. Г., Бушинева О. А., Головченко В. В., Попов С. В., Оводов Ю. С. Способ получения из растительного сырья полисахаридов, обладающих иммуностимулирующим действием // Патент РФ № 2149642 от 27.05. 00. (приоритет от 9.08.99.) // БИ. 2000. № 15.
2. York W. S., Darvil A. G., McNeil M., Stevenson T. T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components // Meth. Enzymol. 1986. V. 118. P. 3–40.
3. Usov A. T., Bilan M. I., Klochkova N. G. Polysaccharides of Algae. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (*Rhodophyta*, *Corallinaceae*) // Bot. marina. 1995. V. 38. P. 43–51.
4. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. C. 265–275.
5. Wood P. J., Siddiqui I. R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity // Analyt. Biochem. 1971. Vol. 39. P. 418–428.
6. Nakomori S. A rapid per methylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methyl sulfoxide // J. Biochem. 1964. Vol. 55. № 2. P. 205–208.
7. Кейтс М. Техника липидологии. М.: Мир, 1975. 236 с.
8. ГОСТ Р 53973-2010. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения β -глюканазной активности. Национальный стандарт Российской Федерации. 01.01.2012 г.

ГОРДИНА Елена Николаевна – ассистент кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: l-e-n-o-k@bk.ru

ЗЛОБИН Андрей Александрович – кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: usr00138@vyatsu.ru

МАРТИНСОН Екатерина Александровна – кандидат химических наук, директор института биологии и биотехнологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: biotech.vgu@gmail.com

ЛИТВИНЕЦ Сергей Геннадьевич – кандидат сельскохозяйственных наук, проректор по науке и инновациям, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: litvines@vyatsu.ru