

Българска Академия на Науките
Институт по Органична химия с Център по Фитохимия
Лаборатория Биологично Активни Вещества - Пловдив

Мариана Манолова Николова

ПОЛУЧАВАНЕ и ХАРАКТЕРИСТИКА
на БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕКТИНОВИ
ПОЛИЗАХАРИДИ от ПРАЗ (*Allium porrum* L.)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен „**Доктор**“

Научна специалност:
01.05.01. „Биоогранична химия, химия на природните
и физиологично активните вещества“

Научен ръководител:
доц. д-р **Мария Георгиева Крачанова**

София, 2012 г.

Мариана Манолова Николова

**ПОЛУЧАВАНЕ и ХАРАКТЕРИСТИКА
на БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕКТИНОВИ
ПОЛИЗАХАРИДИ от ПРАЗ (*Allium porrum L.*)**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „Доктор“

Научна специалност:

01.05.01. „Биоогранична химия, химия на природните
и физиологично активните вещества“

Научен ръководител:

доц. д-р **Мария Георгиева Крачанова**

София, 2012 г.

Изследванията, свързани с дисертационния труд са проведени в:

1. Лаборатория биологично активни вещества - Пловдив към Институт по Органична химия с Център по Фитохимия, БАН;

2. Лаборатория по патофизиология на свободните радикали – Институт по биофизика, Академия на науките на Чешката Република.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от колоквиума „Химия на природните съединения“ при ИОХ с ЦФ – БАН на заседание от 24.02.2012 г.

Дисертационният труд е изложен на 146 страници, включва 39 таблици, 23 фигури и 4 схеми. Библиографията обхваща 250 литературни източника. Резултатите са отразени в 5 научни статии и са представени на 4 научни форума.

Защитата на дисертационния труд ще проведе наг. отчаса в зала 111 „Акад. Б. Куртев“ на ИОХ с ЦФ при БАН, кв. „Гео Милев“, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9, на открито заседание на Научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХ с ЦФ при БАН, стая 206, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 9, гр. София.

Използвани съкращения

АНЧ	-	алкохолно-неразтворима част;
НЗ	-	неутрални захари;
СЕ	-	степен на естерификация;
ПУС	-	полиуронидно съдържание;
ПП	-	пектинов полизахарид;
кПП	-	киселинноекстрахируем пектинов полизахарид;
ТЕ	-	Trolox еквивалент;
„hairy“ region	-	разклонена (омрежена) област;
„smooth“ region	-	гладка (неразклонена) област;
Ara	-	арабиноза;
Gal	-	галактоза;
Glc	-	глюкоза;
Fuc	-	фукоза;
Man	-	маноза;
Rib	-	рибоза;
Rha	-	рамноза;
Xyl	-	ксилоза;
GalA	-	галактуронова киселина;
GlcA	-	глюкуронова киселина;
Dha	-	3-дезокси-D-луксо-хептулозарова киселина;
Kdo	-	3-дезокси-D-манно-октолозонова киселина;
ORAC	-	антиоксидантна активност;
Trolox	-	6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман карбоксилова киселина
GC-MS	-	газ хроматография-мас спектрометрия
HPSEC	-	високоэффективна молекулно ситова хроматография

Увод

От откриването на пектиновите вещества от французина Враснонот (1824 г.) до наши дни интересът към тях остава незатихващ и оправдан. Пектини, протопектин, пектинови вещества или полизахариди, пектинови киселини – са наименования на киселинен хетерополизахарид, участващ в изграждането на клетъчната стена на всички плодове и зеленчуци. Все повече растения най-вече различни билки се използват за изолиране на биологично активни пектинови полизахариди. Пектиновите полизахариди притежават различни фармакологични активности, които придават на храната функционални свойства. Имуномодулиращата активност е със съществено значение за пектиновите полизахариди. Те успешно се прилагат при модулиране на имунната система, освен това повлияват системата на комплемента, получаването на антитела, както и върху функцията на макрофагите. За да се прояви имуномодулиращата активност на пектиновите полизахариди важна роля има тяхната структура. Тя все още си остава една от най-сложните структури сред растителните полизахариди, предизвикваща учените да продължават да ги изучават.

От древни времена е известно необятното използване на праза (*Allium porrum* L.) като ароматна храна и лечебна билка. В действителност празът е незаменим за Средиземноморската диета и „царят“ във френската супа от праз и картофи. Освен това празът е богат източник на различни фитонутриенти, които са важни при профилактиката и лечението на редица заболявания включително исхемична болест на сърцето, затлъстяване, хиперхолестеролемия, диабет тип 2, високо кръвно налягане и нарушения в стомашно-чревния тракт като колики и диспепсия.

Интересът към биологично активните вещества на праза (*Allium porrum* L.) е актуален и днес. Обект на нашето изследване са пектиновите полизахариди в праза, които в предварителни изследвания показват изявена имуномодулираща активност.

Цел и задачи на дисертационната работа

Целта на изследването е получаване на пектинови полизахариди от праз (*Allium porrum* L.), определяне на техния състав и биологична активност.

За осъществяването на тази цел си поставихме следните задачи:

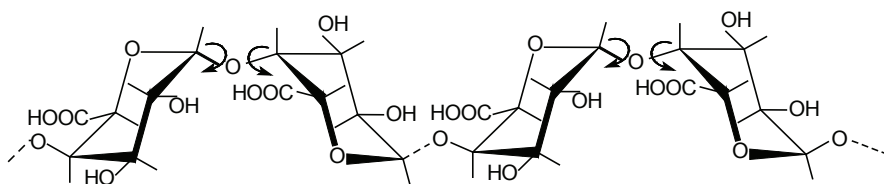
- ✓ Изолиране на пектинови полизахариди от праз;
- ✓ Физико-химично характеризирание на получените пектинови полизахариди;
- ✓ Установяване на връзката състав, структура и биологична активност в пектиновите полизахариди от праз чрез използването на ензими;
- ✓ Хроматографско пречистване и разделяне на получените пектиновите полизахариди от праз и тяхното характеризирание;
- ✓ Определяне на биологичната активност на екстрахираните пектинови полизахариди и на хроматографски пречистените пектинови фракции от праз;
- ✓ Определяне на ниско молекулните компоненти в състава на свеж български праз;
- ✓ Получаване на функционални (лечебни) храни от български праз, богати на биологично активни вещества.

Въведение

Празът (*Allium porrum* L.) принадлежи към род *Allium* на семейство *Alliaceae*. Ботаническото наименование *Allium* произлиза от Келтската дума „*all*“, която означава – пикантност, силна миризма и силен вкус. Родът *Allium* има между 500 и 700 разновидности, които са разпространени в различни региони на света. Към този род принадлежат зеленчуците чесън (*Allium sativum* L.), лук (*Allium cepa* L.) и праз (*Allium porrum* L.)

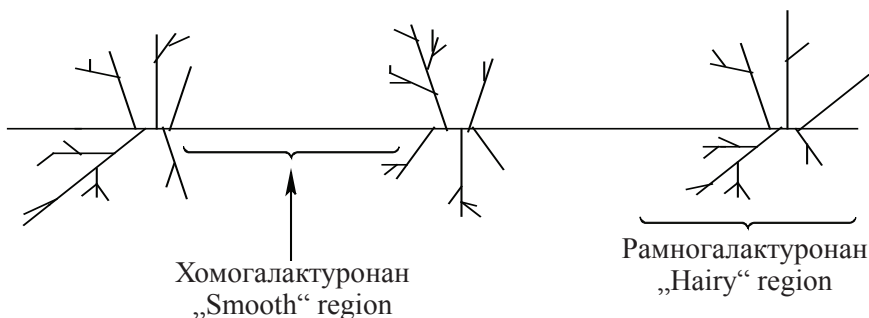
Видовете на род *Allium* са богати на различни биологично активните вещества. Установено е, че празът е храна с балансирано съдържание на: различни органосерни съединения; сапонини; фенолни съединения; органични киселини; монозахариди; фрукто-олигозахариди; полизахариди; минерални вещества и витамини.

Пектиновите полизахариди са едни от най-сложните биополимери. Те са хетерополизахариди, изграждат първичната клетъчна стена и вътреклетъчните области на растенията. Основният монозахарид, който съставя пектиновите полизахариди е α -D-галактуроновата киселина. Тя образува (1 \rightarrow 4)-свързани линейни вериги (фиг. 1). Карбоксилната група (-COOH) в молекулата на галактуроновата киселина е частично естерифицирана с метанол (-COOCH₃). Степента на метилиране варира от 30% до 80% от общото количество на карбоксилните групи в пектиновите полизахариди.



Фиг. 1. Нагъната линейна верига на пектиновата макромолекула - галактуронан

Схематичното представяне на пектиновата макромолекула (фиг. 2.) показва, че тя е изградена от линейни участъци, които се наричат хомогалактуронан („Smooth“ region) и разклонени области наречени рамногалактуронан („Hairy“ region).



Фиг. 2. Схематично представяне на пектиновата макромолекула според De Vries et al.

Структурни компоненти на пектиновите полизахариди са:

- **хомогалактуронан** - изграден само от α - (1 \rightarrow 4) – свързани D – галактуроново киселинни остатъци.

- **рамногалактуронан тип I** - основна верига съставена от α - (1 \rightarrow 4) - свързани D – галактуронови киселинни единици, прекъснати от вмъкнати (1 \rightarrow 2) – свързани L – рамнопиранозидни остатъци в съседство или през едно галактуроново звено. Разклоненията на рамногалактуронан I са от различни неутрални олигозахариди (арабинани, галактани и арабиногалактани) прикрепени предимно към рамнозилните остатъци.



Фиг. 3 Структура на рамногалактуронан I

активност на пектиновата макромолекула зависи от структурата на основните ѝ компоненти.

Резултати и обсъждане

В литературата има оскъдни данни за химичния състав на полизахаридите в лука и чесъна и недостатъчно данни за полизахаридите в прازа.

І част

Пектинови полизахариди от праз, получени чрез последователно фракционно екстрахиране

За изолиране на пектинови полизахариди от праз е приложена лабораторна схема за последователна фракционна екстракция, която е описана от Voragen *et al.* и показва възможността за изолиране на пектинови полизахариди свързани по различен начин в клетъчната стена на растенията.

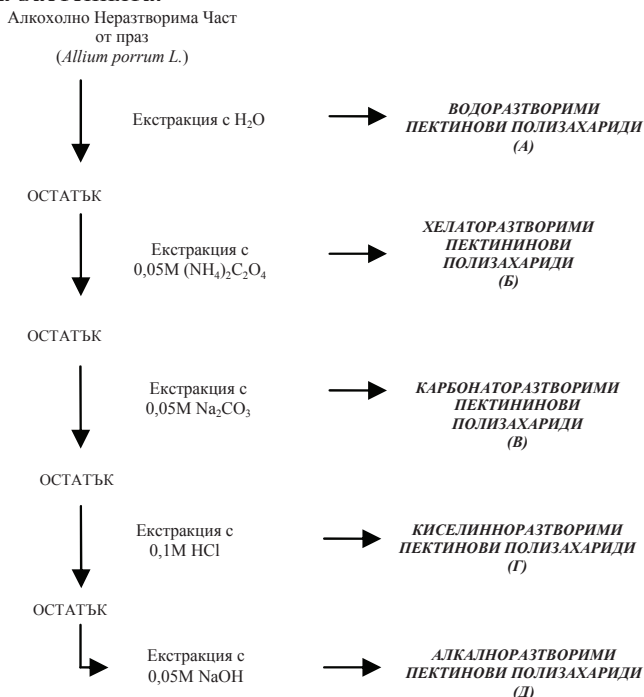


Схема I.1. Схема за лабораторна екстракция на пектинови полизахариди

Въз основа на представената схема са изолирани пет пектинови полизахарида от праз: водноекстрахируем, хелатноекстрахируем, карбонатноекстрахируем, киселинноекстрахируем и алкальноекстрахируем. Изолираните полизахариди са характеризирани по полиуронидно съдържание, степен на естерификация, количество на неутрални захари и белтъчно съдържание (табл. I.1.).

Таблица I.1. Добив и характеристика на пектинови полизахариди, получени чрез последователна екстракция с различни екстрагенти от АНЧ на праз

Вид изолиран пектинов полизахарид	Добив на ПП**, g за 100g АНЧ	ПУС, %	СЕ, %	НЗ, %	Белтък, %
А*	3,4	73,6	76,6	18,4	8,0
Б*	3,1	64,1	61,5	34,3	1,6
В*	3,6	49,3	32,1	48,5	2,2
Г*	3,6	27,5	26,1	71,1	1,5
Д*	2,9	28,0	12,6	70,8	1,3

*А–водноекстрахируем ПП, Б–хелатноекстрахируем ПП, В–карбонатноекстрахируем ПП, Г–киселинноекстрахируем ПП, Д–алкальноекстрахируем ПП; ** ПП–пектинов полизахарид

От данните, представени на табл. I.1. се вижда, че с най-високо ПУС и СЕ са водно- и хелатноекстрахируемите пектинови полизахариди (над 60%). Киселинно- и алкальноекстрахируемите пектинови полизахариди имат ниско съдържание на уронови киселини (под 30%) и високо количество неутрални захари.

Данните от GC анализ за неутралните захари на петте пектинови полизахариди показват, че във всички фракционно изолирани пектинови полизахариди от праз се съдържат монозахаридите рамноза, арабиноза, ксилоза, галактоза и глюкоза. Неутралните захари фукоза и рибоза присъстват само във водноекстрахируемият и карбонатноекстрахируемият пектинов полизахарид (табл. I.2.). Екстракцията, проведена с вода и амониев оксалат е неструктивна за пектинови-

те полизахариди и затова количеството на неутралните захари в тези две фракции е по-ниско (под 35%). Трябва да се отбележи, че полизахаридът, получен с амониев оксалат има по-високо съдържание на галактоза (24%), арабиноза (3,7%) и глюкоза (3,4%) в сравнение с водноекстрахируемия полизахарид.

Таблица 1.2. Монозахариден състав на пектиновите полизахариди от праз, получени чрез последователна екстракция с различни екстрагенти, (в % от общите захари)

Монозахариди	А*	Б*	В*	Г*	Д*
Rha	2,4	3,0	14,4	17,0	28,3
Fuc	-	-	1,1	-	-
Rib	0,8	-	1,2	-	-
Ara	1,6	3,7	9,5	5,1	5,9
Xyl	0,1	0,2	0,3	2,1	2,2
Man	следи	следи	следи	следи	следи
Gal	13,2	24,7	20,0	45,0	30,7
Glc	1,9	3,4	3,3	3,2	4,7
Σ неутрални захари	20,0	35,0	49,8	72,4	71,8
Σ уронови киселини	80,0	65,0	50,2	27,6	28,2
GalA	68,2	50,2	40,3	19,3	18,4
GlcA	11,8	14,8	9,9	8,3	9,8
GalA/Rha	28,4	16,7	2,8	1,1	0,7

*А–водноекстрахируем ПП, Б–хелатноекстрахируем ПП, В–карбонатноекстрахируем ПП, Г–киселинноекстрахируем ПП, Д–алкальноекстрахируем ПП; ** ПП–пектинов полизахарид

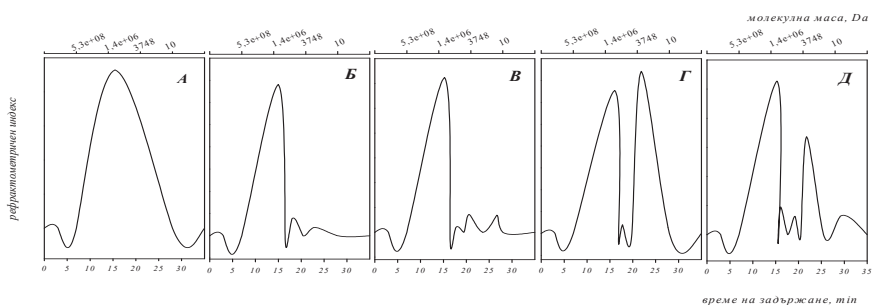
При използването на реагента Na_2CO_3 се получава пектинов полизахарид, в чийто монозахариден състав рязко нараства съдържанието на арабиноза и особено на рамнозата. Следващата екстракция с HCl води до получаване на пектинов полизахарид с ниско полиуронидно съдържание - 27,6% и високо количество на неутрални захари - 72,4%. Този полизахарид се характеризира с най-високото съдържание на галактоза. При екстракцията с разрежена NaOH се полу-

чава полизахарид с високо съдържание на неутрални захари, ниско уронидно съдържание и най-ниско количество белтък.

Доказано е наличието на глюкуронова киселина в пектиновата макромолекула на прازа (табл. I.2.), като количеството ѝ е от 8,3% до 14,3%. До сега няма представени данни за съдържание на глюкуронова киселина в пектинови полизахариди изолирани от род *Allium*.

Важен показател за характеризирането на пектиновата макромолекула ни дава отношението GalA/Rha. При водно- и хелатноекстрахираните пектинови полизахариди този показател е с висока стойност. Това показва, че тези фракции имат повече GalA и се намират в средната ламела на растителната клетъчна стена. С използването на деградивните екстрагенти – HCl и NaOH показателя GalA/Rha намалява, при което нараства количеството на Rha, следователно извлечените пектинови полизахариди са с повече разклонени области. Тези факти ни дават основание да приемем, че пектиновата макромолекула в прازа има различни по състав участъци, които се различават и по начина на свързване в клетъчната стена на прازа.

Получените пектинови полизахариди от праз посредством фракционно екстрахиране са с различна молекулна маса (фиг. I.5.).



Фиг. I.5. HPSEC профил на молекулното разпределение на пектиновите полизахариди в праз, получени чрез последователно екстрахиране с различни екстрагенти: А-водна екстракция; Б-хелатна екстракция; В-карбонатна екстракция; Г-киселинна екстракция; Д-алкална екстракция

Те са молекулно хетерогенни, изключение прави само водно-екстрахируемият пектинов полизахарид, който е хомогенен.

За оценка на биологичната активност на изследваните полизахариди са използвани няколко *in vivo* и *in vitro* теста. Това са: проактивна активност на полизахаридите при експериментална бактериална инфекция, килинг способност на перитонеални макрофаги, активиране на системата на комплемента по класически и алтернативен път.

Таблица 1.3. Имунологична активност на пектинови полизахариди в праз получени чрез последователна екстракция с различни екстрагенти

Вид на пробата	Преживяемост (дни)	Активиране на комплемента (% инхибиране на хемолизата)					Килинг индекс
		Алтернативен път			Класически път		
		1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	1000 µg/ml	500 µg/ml	
А*	17,2±3,2	95,9±3,8	35,4±4,1	19,6±2,3	34,7±2,4	0	12,5±1,8
Б*	12,2±2,5	62,1±8,2	27,4±4,2	9,3±1,5	18,8±4,2	0	10,5±1,6
В*	14,8±3,4	79,9±11,4	28,9±4,4	0	6,7±0,8	0	13,8±1,2
Г*	11,8±2,1	25,3±3,5	6,5±0,8	0	11,2±3,9	0	14,4±3,2
Контрол	6,6±2,1	95,9±3,8	35,4±4,1	19,6±2,3	34,7±2,4	0	5,4±0,9

*А–водноекстрахируем ПП, Б–хелатноекстрахируем ПП, В–карбонатноекстрахируем ПП, Г–киселинноекстрахируем ПП

Третирането на опитни мишки с изолираните пектинови полизахариди от праз (А, Б, В и Г) показва, че полизахаридите причиняват значително увеличение на броя на перитонеални макрофаги в опитните животни. Тези данни корелират и с наблюдаваната протекция при експериментална салмонелна инфекция, изразяваща се в увеличената преживяемост на третираните с полизахаридите мишки (табл. 1.3.). Полизахаридите в прازа показат значително активиране на серумния комплемент, по-силно изразено при алтернативния път

в сравнение с класическия път. Опитите с намаляваща концентрация на полизахаридите от праз открояват водно- и хелатноекстрахируемите полизахариди като добри имуностимулатори.

II част

Изолиране и характеризирание на пектинови полизахариди от праз чрез последователно екстрахиране с вода и солна киселина

При вторият метод за екстракция на пектиновите полизахариди от прера са използвани два реагента - вода и разредена солна киселина. Изолираният водоратоврим пектинов полизахарид е с високо съдържание на урунови киселини и висока степен на естерификация, докато киселината с деградивното си действие върху растителната клетка, повиши добива на киселинно екстрахируемия полизахарид, но съдържанието на урунови киселини е ниско (49,3%), както и степента на естерификация (табл. II.4.).

Таблица II.4. Добив и характеристика на пектиновите полизахариди, получени чрез последователна водна и киселинна екстракция от АНЧ на праз

Показатели	Водно-екстрахируем ПП	Киселинно-екстрахируем ПП
Добив на ПП от АНЧ, g/kg	29,0	51,0
Полиуронидно съдържание, %	72,8	49,3
Степен на естерификация, %	56,3	52,2
Неутрални захари, %	17,2	44,7
Белтък по Лоури, %	10,0	6,6

Съдържанието на белтък в пектиновите полизахариди, получени при последователна екстракция с вода и киселина варира от 10% и 6,6%.

Монозахаридите галактоза и рамноза преобладават и в двата пектинови полизахариди. Тяхното количество в киселинноекстрахируемия пектинов полизахарид нараства, двукратно при галактозата

и петкратно при рамнозата спрямо водноекстрахируемия полизахарид. Анализът показва, че тези полизахариди съдържат глюкоуронова киселина наред с галактууронова киселина (табл. II.5.).

Таблица II.5. Монозахариден състав на пектиновите полизахариди в праз, получени чрез последователна екстракция с вода и киселина

Показатели	Водно-екстрахируем ПП	Киселинно-екстрахируем ПП
Полиуронидно съдържание, %	72,8	49,3
Неурални захари, %	17,2	44,1
Белтък по Лоури, %	10,0	6,6
Монозахариди, mol %		
Rha	2,8	14,1
Rib	1,3	1,3
Ara	1,6	3,8
Xyl	0,3	0,4
Man	<i>следи</i>	<i>следи</i>
Gal	13,3	26,0
Glc	1,7	4,6
GalA	71,1	37,5
GlcA	7,9	12,3

Установено е, че водноекстрахируемият пектинов полизахарид е хомогенен и има молекулна маса 1100 kDa, докато киселинноекстрахируемият пектинов полизахарид е хетерогенен.

Проведената физико-химична характеристика на водно- и киселинноекстрахируемите пектинови полизахариди от праз показва по-нисък вискозитет от този на ябълковия пектин, но те се отличават с по-добре изразени пенообразуващи и емулгиращи свойства.

Таблица II.6. Имуностимулираща активност и килинг ефект на пектиновите полизахариди от праз, получени чрез последователно екстрахиране с вода и киселина

Вид на пробата	Преживяемост (дни)	Активиране на комплемента (% инхибиране на хемолизата)		Килинг ефект
		Алтернативен път	Класически път	
Водно-екстрахируем ПП	17,2±3,2	85,9±3,8	34,7±2,4	6,2±1,4
Киселинно-екстрахируем ПП	10,5±3,2	35,5±6,3	5,7±0,3	4,6±1,5
Ябълков пектин	6,5±1,5	39,3±4,2	6,6±3,3	1,7±0,3
Цитрусов пектин	10,5±3,4	49,4±10,3	2,6±2,5	1,5±0,2
Контрола	5,5±1,1	*	*	2,6±0,3

* нормална хемозила

Пектиновите полизахариди получени чрез водна и киселинна екстракция от праз показват добре изразена имуностимулираща активност в сравнение с ябълков и цитрусов пектин (табл. II.6.).

Съдържанието на белтък в двата полизахарида провокира интереса към отстраняване на този съпътстващ компонент. За целта са използвани различни подходи: с протеолитичен ензимен препарат Pronase E, с имобилизиран ензим хомотрепсин, чрез обработка на полизахаридите със солно-кисел етанол, както и провеждането на йонобменна хроматография. В резултат на това се получиха фракции с намалено до 70% количество белтък (табл. II.7.).

Таблица II.7. Белтъчно съдържание на водноекстрахируемият и киселиноекстрахируемият пектинови полизахариди получени след отстраняването на белтъчната част

Вид на пробата	Количество белтък, %	% на очистване на белтъка спрямо изходната проба	Вид на пробата	Количество белтък, %	% на очистване на белтъка спрямо изходната проба
Водно-екстрахируем пектинов полизахарид	9,2	-	Киселинно-екстрахируем пектинов полизахарид	5,7	-
Полизахарид обработен с HCl/EtOH	8,2	11,0	Полизахарид обработен с HCl/EtOH	4,5	21,0
Полизахарид обработенс имоби-лизиран химотрипсин (pH~7)	8,6	7,0	Полизахарид обработен с имоби-лизиран химотрипсин (pH~7)	4,8	16,0
Полизахарид обработен с ензим Pronase E®	2,7	70,0	Полизахарид обработен с ензим Pronase E®	2,1	63,0

Установи се, че намалението на белтъчното съдържание не оказва влияние върху биологичната активност. Следователно носител на имуностимулиращата активност е полизахаридната макромолекула на прازа.

III част

Хроматографско пречистване и разделяне на пектинови полизахариди от праз получени чрез последователно екстрахиране с вода и разредена солна киселина

Изолираните пектинови полизахариди от праз, получени чрез последователна екстракция с вода и киселина са пречистени посредством йонообменна хроматография върху DEAE – Sepharose fast flow и гел хроматография върху Sephadex G-200.

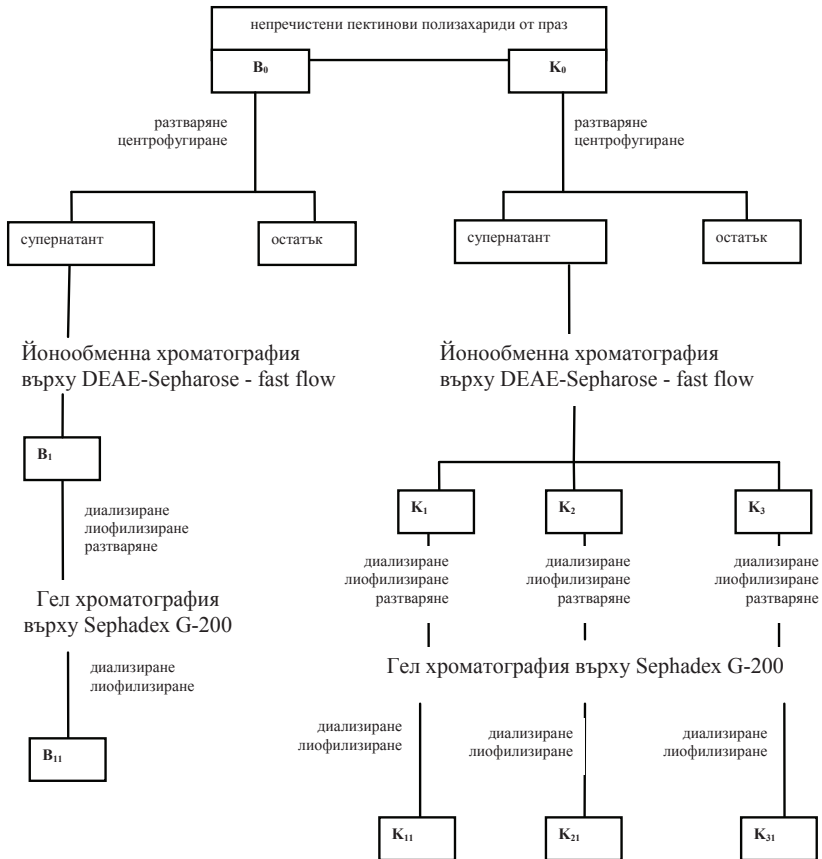


Схема. III.2. Схема за хроматографско пречистване на пектиновите полизахариди от праз

В резултат на пречистването са получени следните фракции: от водноекстрахируемият пектинов полизахарид фракциите V_1 и V_{11} , а от киселинноекстрахируемият пектинов полизахарид три фракции K_1 , K_2 , K_3 след йонобменната хроматография и K_{11} , K_{21} и K_{31} от гел хроматографията.

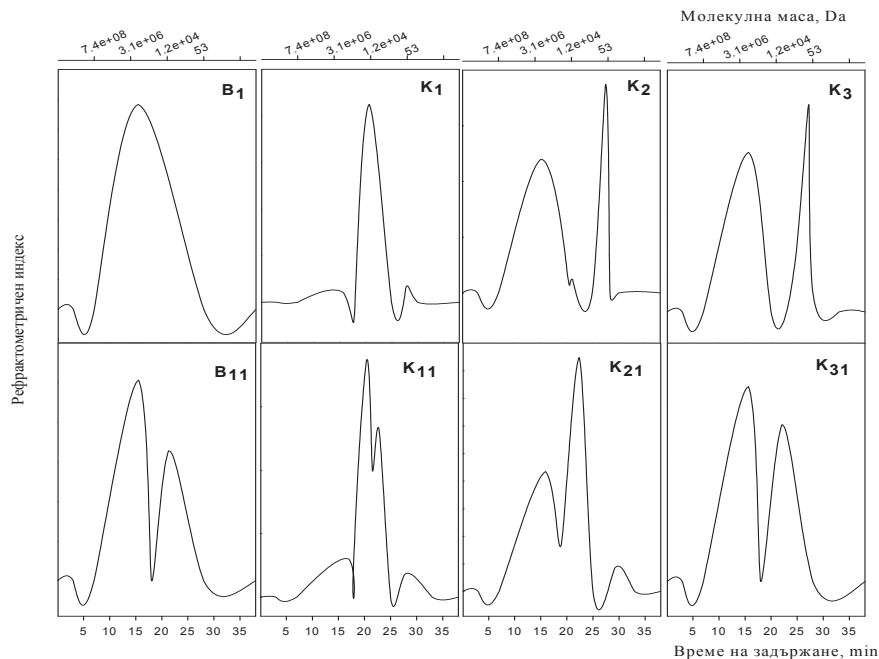
Пречистените водноекстрахируеми фракции – V_1 и V_{11} са с високо съдържание на галактуронова киселина и присъствие на глюкуронова киселина. Преобладаващ неутрален монозахарид в състава им е галактозата (табл. III.8.).

Пречистените фракции на киселинноекстрахируемия пектинов полизахарид се различават по урониден състав, съдържание на неутрални захари и молекулна маса. Фракциите K_1 и K_{11} са с висока молекулна маса и съдържат повече неутрални захари. В тези фракции не е открита глюкуронова киселина. По всяка вероятност това е полизахарид от галактанов тип, тъй като фракциите са изградени основно от монозахарида галактоза (47,0% и 42,8%).

Таблица III.8. Химичен състав на пречистените и разделени върху DEAE-Sephadex fast flow и върху Sephadex G-200 пектинови полизахариди от праз

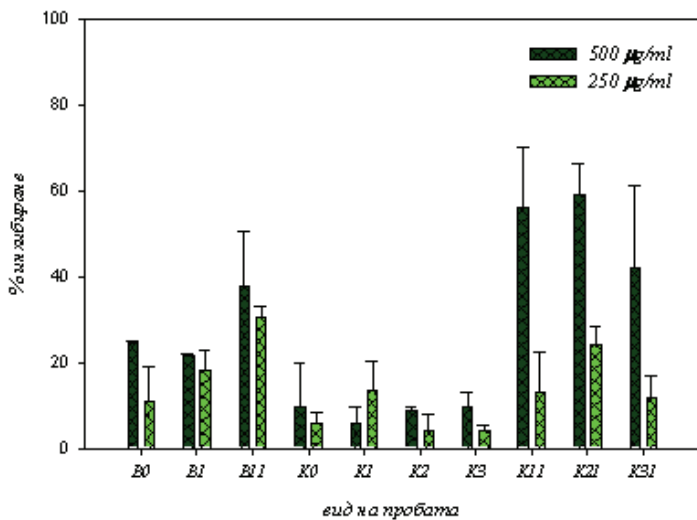
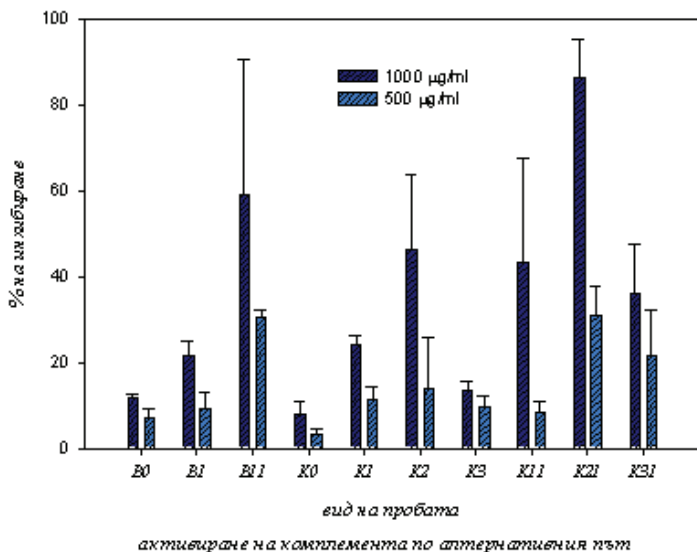
Показатели	V_1	K_1	K_2	K_3	V_{11}	K_{11}	K_{21}	K_{31}
Уронови киселини, %	66,4	38,8	50,5	61,2	66,2	50,7	60,6	67,1
Неутрални захари, %	33,1	59,9	48,0	37,8	33,4	48,0	38,2	31,9
Белтък по Лоури, %	0,5	1,3	1,5	1,0	0,4	1,3	1,2	1,0
Монозахариди, %								
Rha	5,8	8,2	16,0	10,7	0,6	2,2	5,0	16,3
Ara	5,2	4,2	8,0	2,5	0,9	1,0	6,2	следи
Xyl	0,8	-	0,4	0,5	0,8	-	0,4	0,5
Man	следи	следи	следи	следи	следи	следи	следи	следи
Gal	21,2	47,0	19,2	23,6	27,9	42,8	24,4	15,1
Glc	следи	следи	4,5	следи	3,2	2,4	2,2	следи
GalA	59,7	38,8	41,2	43,5	61,6	50,7	53,7	58,2
GlcA	6,7	-	9,3	17,7	4,6	-	6,9	8,9

Другите фракции са кисели полизахариди, тъй като са с високо съдържание на уронови киселини. В тях се открива и глюкуронова киселина, като количеството и е по-високо в K_3 и K_{31} . Монозахаридите галактоза и рамноза преобладават в тези фракции.



Фиг. III.3. HPSEC профил на молекулното разпределение на пектиновите полизахариди от праз получени чрез хроматографско пречистване и разделяне

Пречистените фракции на водноекстрахируемия пектинов полизахарид V_1 и V_{11} се характеризират с по-висока молекулна маса в сравнение с молекулните маси на киселинно пречистените полизахаридни фракции (K_1 , K_2 , K_3 , K_{11} , K_{21} и K_{31}).



Фиг. III.4. Имунологична активност на получените пектинови полизахариди от АНЧ на праз и на хроматографски пречистените фракции

Оказа се, че биологичната активност на пречистените пектинови фракции е по-висока, отколкото в изходните пектинови полизахариди (фиг. III.4). Със значителна имуностимулираща активност се откроява фракцията B₁₁.

IV част

Установяване на връзката състав, структура и биологична активност в пектиновите полизахариди от праз чрез използването на ензими

За установяване на връзката структура - биологична активност на пектиновите полизахариди от праз работихме по представената схема IV.3.: ензима *ендо*-полигалактуроназа и галактан-разграждащи ензими.

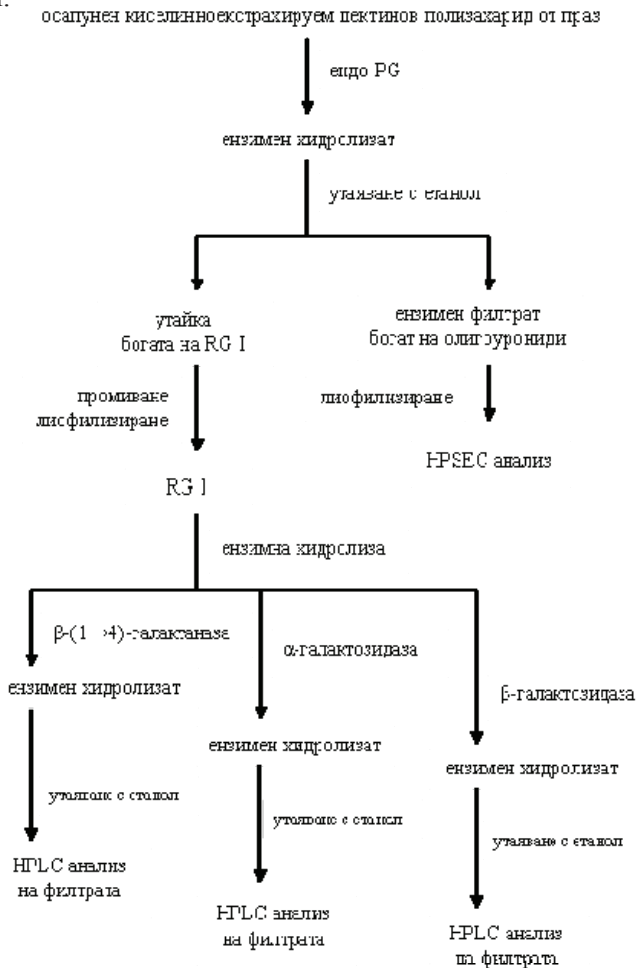


Схема IV.3. Схематично представяне на ензимната хидролиза

При ензимната хидролиза, проведена с *ендо*-полигалактуроназа-та се получи рамногалактуронан I т.е. изолират се разклонените области (“*haïry*“ region) от пектиновата макромолекула.

За определяне вида на връзката между галактозните мономерни звена в получения рамногалактуронан I са използвани галактан-разграждащите ензими: *ендо*- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназа, α -галактозидаза и β -галактозидаза. Установи се, че най-силно разграждане на субстрата (рамногалактуронан I) проявява β -галактозидазата. Хидролизни продукти, които се натрупват са главно монозахаридите галактоза 24,5% и арабиноза 12,6%, в по-малки количества са рамноза и ксилоза. Хидролизата с α -галактозидаза показва слабо разграждане на субстрата (табл. IV.10.).

Таблица IV.10. Съдържание на монозахариди в ензимните хидролизати на рамногалактуронана от киселиннокстрахируемия пектинов полизахарид на праз след действието на *ендо*- β -D-(1,4)-галактаназа, α -галактозидаза и β -галактозидаза

Монозахариди	<i>ендо</i> -(β -1,4)-галактаназа,%	α -галактозидаза,%	β -галактозидаза,%
Ara	6,0	3,6	12,6
Gal	9,4	-	24,5
Rha	-	0,8	3,2
Xyl	-	1,5	1,5
Общо	15,4	5,9	41,8

Базирайки се на специфичното действие на галактан-разграждащите ензими заключаваме, че галактозните звена, изграждащи разклонените вериги на пектиновата макромолекула от праз, са свързани помежду си чрез β -(1 \rightarrow 4)-гликозидни връзки.

Оказа се, че отделеният рамногалактуронан I е с по-висока имуностимулираща активност спрямо изходния полизахарид. Премахването на част от страничните вериги на рамногалактуронана с β -галактозидаза, обаче води до спад в активирането на комплемента (табл. IV.11.).

Таблица IV.11. Активиране на комплемента по класически път на киселинноекстрахируемият пектинов полизахарид и на фракциите получени след действието на пектолитичните ензими

Вид на пробата	Активиране на комплемента (% инхибиране на хемолизата)		
	1250 $\mu\text{g/ml}$	625 $\mu\text{g/ml}$	312 $\mu\text{g/ml}$
кПП	14,3	13,8	9,6
кПП след действие с ендо-PG	44,3	27,2	13,3
кПП след действие с ендо-PG и β -Gal	23,1	4,6	9,4

В резултат на това се установи, че разклонените области в полизахаридната макромолекула от праз са отговорни за проявената биологична активност.

У част

Приложение на свеж български праз за получаване на функционални храни

Направена е характеристика и на други компоненти, съдържащи се в свеж праз с цел получаване на здравословни храни.

Определено е съдържанието на хранителни влакнини. Количеството на общите хранителни влакнини в свеж праз е 26 g/kg свеж праз, от тях неразтворимите хранителни влакнини са 20,7 g/kg свежа суровина и разтворими хранителни влакнини са 5,3 g/kg свеж праз.

Установено е високо количество на макроелемента калий в състава на праз - 17,5 g/kg. В този зеленчук се откриват и важни за човешкия организъм микроелементи като желязо – 40 mg/kg, цинк - 33mg/kg и мед - 8mg/kg свежа суровина, както и следи от селен.

В състава на праз се откриват множество фенолни съединения. Установено е, че с най-високо количество са фенолните киселини: галовата, феруловата и кумарова киселина. В изследвания свеж праз се съдържат флавонолите кверцетин и кемпферол. Наличието на фенолни съединения обуславя антиоксидантната активност на прера, която е определена по ORAC 12,6 $\mu\text{molTE/g}$ свеж праз.

Оказва се, че прераът е богат и на различни органични киселини, като преобладаващо е съдържанието на оксалова, янтърна и ябълчна киселина.

С цел приложението на праз като храна с балансиран състав са разработени различни лечебни храни. На основата на праз е получен пюреобразен продукт при различни хидротермични обработки. Предимството на тази зеленчукова маса е, че съдържа пектинови полизахариди, изведени от клетъчната стена на праз, наред с всички останали важни хранителни вещества за човека. Установи се, че пюреобразните продукти на праз са добра основа за получаване на емулсии от майонезен тип. При смесването на праз с различни зеленчуци са приготвени и функционални храни, които са подходящи за хора с метаболитни заболявания.

Изводи

1. Чрез използването на метод за фракционна екстракция, предложен от Voragen *et al.* са получени пет пектинови полизахарида със съизмерим добив (от 2,9% до 3,6%) и различно съдържание на уროнови киселини (от 27,5% до 73,6%), неутрални захари (от 18,4% до 71,1%) и протеини (от 1,3% до 8,4%).

2. Доказано е, че в пектиновите полизахариди получени от АНЧ на праз се съдържа и глюкуронова киселина наред с обичайната за пектина галактуоронова киселина. Съдържанието на глюкуронова киселина варира между 8% и 15%.

3. В състава на пектиновите полизахариди изолирани от АНЧ на праз се съдържат неутралните захари: рамноза, фукоза, рибоза, арабиноза, ксилоза, галактоза и глюкоза. Галактозата е в най-голямо количество във всички изолирани пектинови полизахарида от АНЧ на праз.

4. Установено е, че с най-силно изразено имуностимулиращо действие са водноекстрахируемият и хелатноекстрахируемият пектинови полизахариди, които имат висока молекулна маса и високо съдържание на галактуоронова киселина.

5. При последователната екстракция с вода и с разрежена солна киселина се получават пектинови полизахариди с добър добив, различаващи се по своя състав: уронави киселини (72,8% и 49,3%), неутрални захари (17,2% и 44,1%), белтък (10% и 6,6%), молекулна маса и молекулна хомогенност.

6. Галактозата и рамнозата са главни неутрални монозахариди във водноекстрахируемите и киселиноекстрахируемите пектинови полизахариди;

7. Пектиновите полизахариди от праз показват по-нисък вискозитет от този на ябълковия пектин, но имат по-добра пенообразуваща способност и висока стабилност на пяната.

8. Водноекстрахируемият пектинов полизахарид изолиран от АНЧ на праз показва по-висока имуностимулираща активност от киселинно екстрахируемия пектинов полизахарид, като по-силно се активира комплемента по алтернативния път, отколкото по класическия път.

9. Установено е, че галактаните преобладават в странични-

те вериги на пектиновия полизахарид получен от АНЧ на праз. Чрез ензимна хидролиза на рамногалактуронана с *ендо*- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназата, α -галактозидаза и β -галактозидаза е доказано, че отделните галактозни остатъци изграждащи галактановата верига, са свързани чрез β -1,4 гликозидна връзка.

10. Потвърдено е, че разклонените области на пектиновите полизахариди изолирани от АНЧ на праз са отговорни за проявената биологична активност.

11. Установено е, че имуностимулираща активност на пектиновите полизахариди в прازа се дължи на страничните галактанови вериги.

12. Водно- и киселинноекстрахируемите пектинови полизахариди са пречистени чрез йонообменна хроматография върху DEAE Sepharose fast flow и чрез гел хроматография върху Sephadex G-200. Определен е състава и биологичната активност на получените полизахаридни фракции.

13. Установено е, че изследваният български праз е с балансирано съдържание на биологично активни компоненти като хранителни влакнини – 26%, в това число и пектинови полизахариди, фенолни съединения, които определят антиоксидантната активност на прازа по ORAC 12,6 $\mu\text{molTE/g}$ свеж праз. От фенолните киселини с най-високо количество е галовата киселина (40 mg/100g свеж праз). Съдържанието на флавонола кверцетин в прازа е най-високо 0,24 mg/100g свеж праз. В състава на прازа преобладават органичните киселини оксалова (71 mg/100g свеж праз), янтьрна (54 mg/100g свеж праз) и ябълчна киселина (24 mg/100g свеж праз).

14. Разработена е лабораторна технология за получаване на пюре от праз с повишено съдържание на пектинови полизахариди, предназначено за производството на функционални (лечебни) храни за различни диети.

15. На основата на праз са получени различни лечебни храни, които съдържат пектинови полизахариди с изявена имуномодулираща активност, поради което са подходящи за превенция на различни заболявания.

Научни приноси

1. Пектиновата макромолекула на праз има различни по състав участъци, които се различават и по начина на свързване в клетъчната стена на праз.

2. Доказано е за първи път, наличието на глюкуронова киселина в уронидния състав на пектиновите полизахариди от праз.

3. Установено е, че в страничните вериги на рамногалактуронана, изолирани от праз преобладават галактаните. Доказано е чрез ензимна обработка на пектиновите полизахариди с *ендо- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназа*, *α -галактозидаза* и *β -галактозидаза*, че галактозните остатъци в галактановите верига са свързани чрез β -1,4 гликозидни връзки.

4. Доказано е чрез обработка с галактан-разграждащи ензими, че галактаните са отговорни за проявената от пектиновите полизахариди антикомплементарна активност.

5. За първи път са по-детайлно изучени пектиновите полизахариди в прازа и потвърдени техните имуностимулиращи свойства.

6. Разработени са рецепти за получаване на функционални (лечебни) храни на основата на праз, които да бъдат използвани от диетолозите при превенцията на метаболитните заболявания.

СПИСЪК
на ПУБЛИКАЦИИ по ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

1. Kratchanova M, **Nikolova M**, Pavlova E, Yanakieva I, Kussovski V. (2010) Composition and properties of biologically active pectic polysaccharides from leek (*Allium porrum*). *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 90(12):2046–2051, **IF: 1,36**;
2. Kratchanova M., **M. Gocheva**, E. Pavlova, I. Yanakiev, D. Nedelcheva, V. Kussovski, A. Slavov (2008) Characteristics of pectic polysaccharides from leek obtained through consecutive extraction with various agents, *Bulgarian Chemical Communications*, 40 (4) 561-567, ISSN 0861-9808., **IF: 0,156**;
3. М. Крачанова, **М. Гочева**, Е. Павлова, В. Късовски, Г. Бекяров (2008) Биологично активни компоненти в праз, В „*Науката за хранене пред нови възможности и предизвикателства*“ (под ред. на проф. д-р. Б. Попов), 208-211;
4. М. Крачанова, **М. Гочева**, Е. Павлова, И. Янакиева, В. Късовски, В. Карагъзов, И. Панчев (2005) Състав и свойства на пектиновите полизахариди от праз (*Allium porrum*), *Научни трудове на УХТ*, том LII, св.4., 23-32;
5. М. Крачанова, Е. Павлова, **М. Гочева**, Ц. Николова, В. Късовски (2003), Йонообменна хроматография на имунологично активни полизахариди от праз върху DEAE-Sepharose fast flow, *Научни трудове на УХТ*, том L свитък 3 стр.405-411.

УЧАСТИЕ в КОНФЕРЕНЦИИ

1. 3rd International Conference „Pectins and Pectinases 2008“, 21-23 April 2008 Wageningen, The Netherlands

1.1. Kratchanova M., **Gocheva M.**, Pavlova E., Ianakieva I., Kussovski V., Karagyozev V., Panchev I. - COMPOSITION AND PROPERTIES OF PECTIC POLYSACCHARIDES FROM LEEK (*Allium porrum*) - poster;

1.2. **Gocheva Mariana**, Kratchanova Maria, Pavlova Elena, Ianakieva Irina, Kussovski Veselin - PURIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PECTIC POLYSACCHARIDES FROM LEEK - poster.

2. VII Национален конгрес по хранене с международно участие „Науката за хранене пред нови възможности и предизвикателства“, 17-19 май 2007, МДУ „Фр. Ж. Кюри“, Варна

2.1. Крачанова М., **М. Гочева**, Ел. Павлова, В. Късовски, Г. Бекаров – Биологично активни компоненти в праз - постер.

3. „Хранителни технологии, функционални храни, хранителни добавки и здраве“ II НАЦИОНАЛНА КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ХРАНЕНЕ Пловдив – УХТ, 19 -20 май 2005 г.

3.1. М. Крачанова, **М. Гочева**, Е. Павлова, И. Янакиева, В. Късовски, В. Карагъзов, И. Панчев - Състав и свойства на пектиновите полизахариди от праз (*Allium porrum*) - постер;

4. EURO FOOD CHEM XII Conference on 24 – 26 September 2003, Conference Center *Oud Sin-Jan*, Brugge, Belgium

4.1. М. Kratchanova, E. Pavlova, **M. Gocheva**, Vs. Kasovski - Ion – exchange chromatography of immunoactive pectic polysaccharides obtained from leek (*Allium porrum*) on DEAE – Sepharose fast flow - poster.

УЧАСТИЕ в ПРОЕКТИ

1. „ПОЛУЧАВАНЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОЛОГИЧНО ЗНАЧЕНИЕ НА ПЕКТИНОВИ ПОЛИЗАХАРИДИ ОТ ПРАЗ (*Allium porrum*)“ през периода 2005-2006; ръководител на младежкия проект – Мариана Гочева, финансиран от Министерство на образованието и науката.

2. „Нови адитиви и функционални храни за превенция на болести, свързани с липидна пероксидация“ финансиран от Националния Иновационен фонд към ИАНМСП – Министерство на икономиката и енергетиката, през периода 2008-2010 г.

Открити са 2 цитата в чужди списания на публикуваните по темата материали.