

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**  
ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ – СОФИЯ  
ЛАБОРАТОРИЯ ПО БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА – ПЛОВДИВ

---

**ас. инж. Манол Христов Огнянов**

**ПОЛУЧАВАНЕ И ЕНЗИМНА МОДИФИКАЦИЯ НА  
БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ПЕКТИНОВИ ПОЛИЗАХАРИДИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на

**ДИСЕРТАЦИЯ**

за придобиване на образователна и научна степен  
**„ДОКТОР“**

Професионално направление: 4.2 „Химически науки“

Научна специалност: 01.05.10 „Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните вещества“

*Научни ръководители:*

доц. д-р Мария Георгиева Крачанова  
проф. д.х.н. Светлана Димитрова Симова

*Рецензенти:*

проф. д.х.н. Цветан Димитров Обретенов  
проф. дн. инж.-хим. Пантелей Петров Денев

**София, 2016**

Дисертационният труд е обсъден на заседание на колоквиума „Химия на природните вещества“ при ИОХ с ЦФ – БАН, състояло се на 09.05.2016 г.

Дисертацията е написана на 265 печатни страници и съдържа 1 схема, 37 таблици и 50 фигури. Библиографската справка обхваща 294 литературни източника.

Изследванията по дисертационния труд са извършени в ЛБАВ-Пловдив при ИОХ с ЦФ-БАН и Лаборатория по хранителна химия на Университета във Вагенинген (Кралство Нидерландия). Изследванията по ЯМР са проведени в Лаборатория „Център по ЯМР спектроскопия“ при ИОХ с ЦФ – БАН. Биологичните анализи са извършени в: ИМ – БАН, кат. „Биология на развитието“ към БФ на ПУ „П. Хилендарски“, Университет Китасато (Япония), Лабораторията по патофизиология на свободните радикали към Института по биофизика при ЧАН (Бърно).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 22.06.2016 г. (сряда) от 14:00 часа в зала № 111 „Акад. Богдан Куртев“, ет. 1 на ИОХЦФ–БАН, жк „Гео Милев“, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 9, на открито заседание на Научното жури в състав:

Доц. д-р Калина Алипиева (ИОХЦФ – БАН) - Председател  
Проф. дн Цветан Обретенов (УХТ – Пловдив и ПУ „П. Хилендарски“)  
Проф. дн Пантелей Денев (УХТ – Пловдив)  
Проф. дн Алберт Кръстанов (УХТ – Пловдив)  
Доц. д-р Мария Крачанова (ИОХЦФ – БАН)

Резервни членове:

Чл.-кор. проф. дн Вася Банкова (ИОХЦФ – БАН)  
Проф. дн Светлана Симова (ИОХЦФ – БАН)  
Проф. дн Милка Кръстева (ХТМУ – София)

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в канцеларията на ИОХЦФ – БАН – стая 206, ул. „Акад. Г. Бончев“ бл. 9 и на интернет страницата на Института ([www.orgchm.bas.bg](http://www.orgchm.bas.bg)) в секция „Процедури“, подсекция „Процедури по придобиване на научни степени“.

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ (LIST OF ABBREVIATIONS)

### на кирилица

АГ-I (II)	арабиногалактан тип I или II
АГП	арабиногалактан-протеини
АНЧ	алкохол-неразтворима част
В(К)ЕПП АНЧ	водно(киселинно)-екстрахиран пектин от АНЧ на портокалови кори
В(К)ЕПЛ АНЧ	водно(киселинно)-екстрахиран пектин от АНЧ на лимониви кори
В(К)ЕППр АНЧ	водно(киселинно)-екстрахиран пектин от АНЧ на праз
В(К)ЕПШ АНЧ	водно(киселинно)-екстрахиран пектин от АНЧ на шипкова люспа
НЗ	неутрални захари
ОПФ	общи полифеноли
<i>endo</i> -ПГ-I (II)	<i>ендо</i> -полигалактуроназа тип I или II
ПЗ	полизахарид(и)
ПЛ	пектин лиаза
ПП	пектинови полизахариди
РГ-I (II)	рамногалактуронан тип I или II
РФК	реактивни форми на кислорода
СА	степен на ацетилиране
с.в.	сухо вещество
СЕ	степен на естерификация
СП	степен на полимеризация
СФ	степен на ферулоилиране
СХ	степен на хидролиза с...
УК	уронови киселини
ХГ	хомогалактуронан
ЦП	цитрусов пектин

### на латиница

DB	degree of blockiness (степен на подреждане в блокове)
DB <sub>abs</sub>	absolute degree of blockiness (абсолютна степен на подреждане в блокове)
ELSD	evaporative light scattering detection (детекция по светоразсейване на изпарена проба)
ESI-IT-MSn	electrospray ionization ion trap mass spectrometry (маспектрометрия с електроспрейна йонизация и анализатор тип „йонен уловител“)
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry (газ-хроматография с маспектрометрия)
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography (хидрофилновзаимодействаща течна хроматография)
HPAEC	high-performance anion-exchange chromatography (високоэффективна анион-обменна хроматография)
HPSEC	high-performance size-exclusion chromatography (високоэффективна елиминираща по размер хроматография)
PAD	pulsed amperometric detection (пулс-амперометрична детекция; електрохимичен детектор)
RI(D)	refractive index detection/detector (рефрактометрична(чен) детекция/детектор)
RT	retention time (време на задържане)

## ИЗПОЛЗВАНИ СИМВОЛИ (LIST OF SYMBOLS)

$\alpha, \beta$	аномерна конфигурация на гликозидната група
$f, p$	фуранозна, пиранозна форма
Ac	ацетил
Me	метил
Hyp	хидроксипролин

## **ВЪВЕДЕНИЕ (INTRODUCTION)**

Пектиновите вещества са възможно най-сложният клас от кисели хетерополизахариди с колоидни свойства, намерени в природата, които изграждат средната ламела и първичните клетъчни стени на всички сухоземни растения. Те са изградени от два основни структурни фрагмента: галактуронан и рамногалактуронан, количеството на които варира според източника и начина на получаване. Интересът към тях не е само от научен, но и от приложен характер. Те са много добри желиращи средства, стабилизатори на емулсии, суспензии и пени и намират голямо приложение в хранителната индустрия, по-специално в производството на желета, конфитюри, млечни произведения, хранителни емулсии, напитки и хранителни добавки.

Досега известната информация относно структурата на пектиновите полизахариди, както и познаването на механизмите на действие на голяма част от пектолитичните ензими, е достатъчна основа за намиране на връзка между структура и биологична активност.

Въпреки интензивните изследвания все още съществуват редица аспекти от характеристиката на пектиновите полизахариди, които подлежат на доизясняване и доуточнение. Все още липсва структурна информация, засягаща разпределението на метилните и ацетилни групи в пектиновите вещества, както и някои структурни особености, което е от съществено значение за обясняването на наблюдаваните физични и биологични свойства.

В допълнение на това и независимо от широкото разпространение все още съществуват и се търсят недооценени суровинни източници на пектинови вещества. Често това са лечебни растения, плодове и зеленчуци, традиционни за съответната страна. В литературата е налична информация за пектини от различни лечебни растения, но поради голямото разнообразие на последните съществуват празнини по отношение на тяхната структура и биологична активност. Оскъдна или напълно липсва информацията за пектинови полизахариди, съдържащи се в лечебни растения, традиционни за нашето географско местоположение. Нашата страна разполага с богата, но недостатъчно изучена суровинна база от лечебни растения, горски плодове и зеленчуци.

Всичко това мотивира необходимостта от провеждането на допълнителни изследвания върху състава, структурата и биологичните свойства на пектиновите вещества, което ще спомогне за по-цялостното им разбиране и по-ефективно използване. За това обаче е необходим комплексен подход при изучаването им, което е породено от техния разнообразен състав и сложна структура. Комбинацията от ензимно модифициране и/или (мулти)ензимен фингърпринтинг с анализа на получените продукти чрез съвременни инструментални техники се утвърждава като мощен подход за изясняването на връзката между структурата и биологичната активност на полизахаридите. Задълбочените изследвания са необходими и за правилната оценка на потенциала им при разработване на функционални храни и фармацевтични продукти.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ (AIM & TASKS)**

**Основната цел на настоящата дисертационна работа е получаването и характеристиката на ензимно модифицирани пектинови полизахариди във връзка с получаването на нови хранителни адитиви.**

Реализирането на посочената цел изисква изпълнението и решаването на конкретни задачи, които могат да бъдат формулирани както следва:

- 1) Осигуряване, съхранение и характеристика на суровини за екстракция на полизахариди;
- 2) Получаване и характеристика на пектинови полизахариди от цитрусови кори, праз, шипка и мурсалски чай;
- 3) Провеждане на ензимна модификация на някои от изолираните полизахариди с endo-ПГ-I и характеристика на хидролизните продукти;
- 4) Допълнителна ензимна модификация на модифицираните продукти с други ензимни препарати (галактан-разграждащи ензими);
- 5) Прилагане на ензимен и мулти-ензимен фингърпринтинг анализ за изучаване структурата на изходни полизахариди и модифицирани продукти;
- 6) Използване на хроматографски и спектрални методи за характеристика на избрани пробни образци от изходни и модифицирани пектини, както и на получените от тях след фингърпринтинг анализ хидролизни продукти;
- 7) Биологична характеристика на изходните полизахариди и получените пектинови модифицирани продукти чрез определяне на антиоксидантна, антикомплементарна, антитуморна, имуномодулираща активност и др.;
- 8) Получаване на функционална напитка.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ (RESULTS & DISCUSSION)

### 1. Характеристика на предварително обработените суровини

Добивът на суровините след съответната обработка, както и сумарното количество на пектин, изолиран след провеждането на водна и киселинна екстракция, са представени в **табл. 1**. От нея се вижда, че в резултат на сушенето портокаловите кори са загубили ~ 72% от масата си, а микровълновата обработка на портокаловите кори не повлиява съществено на добива на обработената и изсушена суровина. От четирите суровини с най-голям добив на АНЧ, изразен на база свежа и суха маса, се откроява шипковата люспа (30.0% св. м. или 76.1% с.в.), която е с относително високо съдържание на с.в. (~39%). Прави впечатление също, че добивът на АНЧ от свежи лимониви (17.5%) и портокалови кори (16.0%) е близо 2 пъти по-нисък спрямо този на шипката, но на база суха маса няма разлика в добивите на лимонивия и шипковия АНЧ – 76.1% (**табл. 1**). Най-нисък добив спрямо свежата и суха маса дава празът (3.5% св. м. или 36.7% с.в.), който е и с най-високо влагосъдържание, респ. малко съдържание на с.в. (9.5%). В резултат на обработката с етанол (96%) портокаловите и лимонивите кори са загубили над 11% от с.в., а близо 37% от с.в. в прازа са алкохолно-разтворими.

**Таблица 1.** Добив (% св. маса) на предварително обработени суровини и пектин получен от тях.

Суровина и вид обработка	Добив на обработена суровина	Добив на пектин
<b>Портокалови кори</b>		
директно сушене	27.7	3.5(12.6)*
микровълново облъчване	28.9	5.2(20.4)
получаване на АНЧ	16.0(57.7)	4.8(29.6)
<b>Лимониви кори</b>		
получаване на АНЧ	17.5(76.1)	4.9(28.4)
<b>Праз</b>		
получаване на АНЧ	3.5(36.7)	0.7(17.8)
<b>Шипкови плодове (люспа)</b>		
получаване на АНЧ	30.0(76.1)	5.7(19.5)

\* стойностите в скобите са за добив на база абс. с.в.

По отношение на сумарния добив на пектин от значение е както вида на суровината, така и вида на нейната обработка. От **табл. 1** е видно, че най-голям добив на водно- и киселинно-екстрахиран пектин се получава, когато екстракцията се провежда от АНЧ на портокалови кори (29.6% с.в.). Предварителното микровълново третиране на портокаловите кори също оказва положителен ефект върху добива на ПЗ (20.4% с.в.). В резултат на него се повишава добивът на пектин с 38% спрямо този получен от директно изсушения материал. Микровълновото облъчване е подходяща обработка на суровината, имайки предвид избягването на продължителната процедура по получаването на АНЧ. От

**табл. 2** се вижда също, че с най-нисък добив на пектин, вследствие на последователните екстракции, се характеризира празът – 0.7% на база свежа маса или 17.8% спрямо абс. с.в. По добив на пектин от АНЧ (28.4%) лимоновите кори се доближават до тези на портокалите. Добивът на пектин от АНЧ на шипкова люспа, изразен на база свежа маса (5.7%) е сравним с този, получен от микровълново третирани портокалови кори (5.3%). Добивът на АНЧ от шипкова люспа е 2 пъти по-голям спрямо този на прازа.

Характеристиката на АНЧ от гореспоменатите суровини беше продължена чрез определяне на въглехидратния състав и резултатите са включени в **табл. 2**. Основните монозахариди в АНЧ от портокалови кори са УК (20.6%) и Glc (20.2%), следвани от по-малки количества Ara (5.5%) и Gal (5.5%). Съдържанието на УК в АНЧ от лимоновите кори (20.5%) не надхвърля това в портокаловия. В АНЧ от праз се забелязват количествени различия в монозахаридния състав. В най-голямо количество се съдържа Glc (21.7%), а УК са близо 1.7 пъти по-малко (13.5%).

**Таблица 2.** Химична характеристика на получената АНЧ (% w/w с.в.) от съответната изходна суровина.

Суровина	Монозахариден състав									Белтък
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	УК	Общо	
Портокалови кори	0.9	0.2	5.5	1.7	2.1	5.5	20.2	20.6	56.7	2.5
	(1.7)*	(0.4)	(11.4)	(3.5)	(3.7)	(9.7)	(35.7)	(33.8)		
Лимонови кори								20.5		
Праз	0.5	0.3	1.4	2.7	1.4	8.6	21.7	13.5	50.1	4.0
	(1.1)	(0.7)	(3.3)	(6.4)	(2.8)	(17.2)	(43.5)	(25.1)		
Шипкови плодове (люспа)	0.3	0.2	3.1	0.6	1.5	3.0	14.4	14.3	37.4	3.4
	(1.0)	(0.6)	(10.0)	(2.0)	(4.0)	(8.0)	(38.8)	(36.0)		

\* стойностите в скобите показват монозахаридния състав в mol%

От анализирани суровини с най-високо Gal (8.6%) съдържание се характеризира АНЧ от праз. Основни монозахариди в АНЧ от шипковата люспа са Glc (14.4%) и УК (14.3%). По подобие на портокаловия АНЧ в по-малки количества се намират Ara (3.1%) и Gal (3.0%). От таблицата се вижда още, че в различни количества са намерени и други НЗ, като Xyl, Man, Rha и Fuc. Въз основа на монозахаридния състав може да се предположи, че АНЧ от изходните суровини е източник на различни типове ПЗ, като целулоза, пектин и хемицелулози. Освен ПЗ компоненти АНЧ съдържа и белтъчни вещества, които в различните суровини заемат между 2.5 и 4.0% (**табл. 2**).

## 2. Получаване и характеристика на полизахаридите

Получените и охарактеризирани АНЧ от изходните суровини бяха подложени на последователна екстракция, първоначално с вода, а след това с разредена HCl киселина. Проведена бе екстракция и на портокалови кори, подложени на микровълнов нагрев. Характеристиката на екстрахираните ПЗ включва определянето на някои основни



показатели, като съдържание на УК, СЕ, СА и др., като получените резултати за цитрусовите пектини са посочени в **табл. 3**. Вижда, че получените от цитрусови кори фракции, независимо от предварителната им обработка, са от пектинов тип поради намереното високо уроново съдържание (> 64%).

Количеството на УК във всички водно-екстрахирани фракции, с изключение на ВЕПП К, е по-ниско, отколкото това в киселинно-екстрахирани фракции. По своята естерификационна степен, изолирана с вода фракция от микровълново облъчените портокалови кори (ВЕПП СВЧ), заедно с тези от АНЧ на портокалови и лимонови кори, са високоестерифицирани (75 – 83%).

**Таблица 3.** Добив (% w/w св. м.) и характеристика на пектинови полизахариди от цитрусови кори.

Проба	Добив*, %	Съдържание на УК	СЕ	СА	СФ	ОПФ	Ред. захари	Белтък
ХПЦП	(57.0)	70.0	59	0.2	0.07	0.7	3.1	0.7
ВЕПП К	0.1(0.3)	79.0	52	0.8	n.d.	n.d.	n.d.	3.8
КЕПП К	3.4(13.6)	67.3	65	0.8	0.02	1.1	4.4	1.9
ВЕПП СВЧ	1.9(7.4)	68.5	83	1.0	0.26	3.2	4.5	1.1
КЕПП СВЧ	3.3(13.0)	72.0	59	1.0	0.04	1.3	5.8	2.5
ВЕПП АНЧ	1.8(11.0)	64.0	81	1.0	0.34	1.6	7.8	1.2
КЕПП АНЧ	3.0(18.6)	74.8	71	0.9	0.05	1.5	5.2	2.8
ВЕПЛ АНЧ	1.8(10.5)	72.3	75	0.8	0.1	5.5	6.8	1.0
КЕПЛ АНЧ	3.1(17.9)	76.4	56	0.7	0.06	1.2	5.9	0.9

\* добивът на ХПЦП и стойностите в скобите са на база абс. с.в.; n.d. не е определяно

Независимо от източника, фракциите получени с киселина, са с по-ниска СЕ и някои от тях (КЕПП СВЧ, КЕПЛ АНЧ) биха могли да се охарактеризират като средноестерифицирани пектини (59 – 56%). За разлика от тях КЕПП АНЧ е високоестерифициран пектин – 71%. Сравнявайки получените резултати прави впечатление и по-ниската СЕ на портокаловите пектини след контролна екстракция (ВЕПП К – 52%; КЕПП К – 65%) спрямо същите, изолирани от АНЧ.

СА на получените цитрусови пектини варира в тесни граници от 0.7 до 1.0%, което съвпада с литературни данни за търговски цитрусови пектини.

Количеството на естерно-свързаната към НЗ (Ara и Gal) ферулова киселина в цитрусовите пектини е отчетено чрез показателя СФ. От ПЗ фракции с най-висока СФ се откроява тази извлечена с вода от микровълново третирани портокалови кори (0.26%) и тази, получена от портокалов АНЧ (0.34%). Пектинът, изолиран от свежите портокалови и лимонови кори съдържа съответно 1.5 mg/100 g и 1.4 mg/100 g естерно-свързана ферулова киселина, а за този от сухите – 53.1 µg/g и 54.7 µg/g. За фракциите ВЕПП АНЧ и ВЕПЛ АНЧ количествата на естерно-свързаната киселина са 840 µg/g и 480 µg/g.

На получените фракции е определено и полифенолното съдържание (ОПФ, **табл. 3**), тъй като независимо от вида на претърпяната обработка на суровината, екстракцията е проведена без отстраняване на флаведото. С най-голямо количество ОПФ се характеризират ВЕПЛ АНЧ (5.5%) и ВЕПП СВЧ (3.2%), а за останалите проби без съществени различия варира в тесен интервал (1.1-1.6%).

От данните в **табл. 3** се вижда още, че вероятно в процеса на екстракция и пречистване на ПЗ са сътуаени и протеини, количеството на които е най-много във фракциите получени с разрежена HCl киселина от портокалови кори: ВЕПП К – 3.8%, КЕПП СВЧ – 2.5% и КЕПП АНЧ – 2.8%. За останалите проби количеството не надхвърля 1.9%.

Данните за останалите ПЗ, изолирани от праз, шипка и мурсалски чай, са оформени в **табл. 4**. От нея се забелязва, че добивът на ПЗ от мурсалски чай (2.5%) изразен на база абс. суха маса е най-нисък, спрямо всички останали ПЗ фракции, което предполага, че тази суровина не е от най-подходящите източници на пектин. Въпреки това фракцията е със сравнително високо уронидно съдържание (59.0%). Съдържанието на УК във фракциите, получени от АНЧ на праз и шипкова люспа, е също високо, но не надвишава това при цитрусовите пектини (**табл. 3**). Интересно изключение от тенденцията за по-високо съдържание на урониди в киселата фракция прави празът: ВЕППр АНЧ – 62.3%; КЕППр АНЧ – 44.4%. В настоящето проучване тази фракция е с най-ниско установеното уроново съдържание (44.4%) спрямо всички останали. Противно на ниския добив фракциите ВЕППШ и ПЗ шипка (лк) са типично кисели (46.1 и 47.8%).

**Таблица 4.** Добив (% w/w св. м.) и характеристика на полизахариди получени от праз, шипка и мурсалски чай.

Проба	Добив, %	Съдържание на УК	СЕ	СА	СФ	ОПФ	Белтък(Нур)§
ВЕППр АНЧ	0.2(4.7)*	62.3	74	2.2	1.1	0.3	2.3(1.7)
КЕППр АНЧ	0.5(13.1)	44.4	65	2.5	0.07	0.2	4.1(1.2)
ВЕППШ АНЧ	3.7(12.6)	63.0	85	4.2	0.7	2.4	2.0(3.7)
КЕППШ АНЧ	2.0(6.9)	67.0	73	3.0	0.2	1.6	4.3(10.5)
ВЕППШ	1.5(4.1)	46.1	64	n.d.	0.8	3.2	2.8
ПЗ шипка (лк)	1.2(3.2)	47.8	62	10.0	1.0	9.6	3.0
ПЗ мурсалски чай	(2.5)	59.0	38	9.0	n.d.	0.5	3.7

\* добив на база абс. с.в.; § съдържание на Нур, като % от белтъка на всяка фракция

С най-висока СЕ се отличават шипковите пектини получени от АНЧ (85 и 73%). Заедно с тези от праз (74 и 65%) спадат към високоестерифицираните пектини, каквито са и цитрусовите ПЗ. По своята СЕ фракциите ВЕППШ (64%) и ПЗ шипка (лк) (62%) са високоестерифицирани и стойностите им са сравними с тези на някои фракции, извлечени от цитрусовите кори (КЕПП К, КЕПП СВЧ). Същевременно те са по-ниски спрямо тези екстрахирани от АНЧ на шипкова люспа. Особено впечатление прави, че от всички изолирани ПЗ само този от мурсалски чай е нискоестерифициран – 38%!

От резултатите в **табл. 4** се вижда, че отделните фракции се различават значително по своята СА, обяснението за което следва да се търси в произхода на суровината. Напр. СА на фракциите от праз е 2 пъти по-висока (2.2 и 2.5%) от тази на цитрусовите пектини (< 1.0%) (**табл. 3** и **4**). Изолираният с лимонена киселина шипков пектин (10%) и ПЗ от мурсалски чай (9%) се отличават с най-висока СА.

По отношение на резултатите за СФ може да се заключи, че с най-висока стойност се характеризира ВЕППр АНЧ (1.1%), но този резултат не е по-висок от този на някои

цитрусови пектини. Прави впечатление, че макар да са изолирани от една суровина двете фракции от праз се различават по този показател. За останалите ПЗ този показател не надвишава 1.0%.

От **табл. 4** е видно, че освен УК в пробите се съдържат и някои не-въглехидратни компоненти, като полифеноли и белтъци. С най-ниско ОПФ съдържание се открояват ПЗ получени от АНЧ на праз (ВЕППр АНЧ – 0.3%; КЕППр АНЧ – 0.2%) и мурсалски чай (0.5%). За отбелязване е, че сред всички фракции с най-високо полифенолно съдържание са тези, получени от шипкови плодове. Фракциите, извлечени с вода и лимонена киселина от предварително необработена суровина, съдържат най-много фенолни компоненти (ВЕПШ – 3.2%; ПЗ шипка (лк) – 9.6%).

Количеството на протеините е най-високо в киселинно-екстрахираните ПЗ от праз и шипкова люспа (4.1 и 4.3%), но тези от праз не са богати на Нур. От **табл. 4** се вижда още, че в най-големи количества Нур се съдържа в КЕПШ от АНЧ. Тя заема 10.5% от бълтъчините, а доста по-малко е нейното количество във ВЕПШ АНЧ (3.7%). Тази АК е най-характерната за протеините, изграждащи клетъчните стени и присъствието ѝ в пробите изпълнява един от въведените критерии за потвърждение наличието на АГ-II. Макар, че са извлечени с различни разтворители не се наблюдава съществена разлика в белтъчното съдържание на фракциите ВЕПШ (2.8%) и ПЗ шипка (лк) (3.0%).

## 2.1. Монозахариден състав на изходните полизахариди

От съществено значение както за биологичните, така и за физикохимичните свойства на ПВ се явява техният химичен състав и строеж. Получените резултати са онагледени в **табл. 5**. От данните се вижда, че изследваните пектини не се различават по качествен състав и основен компонент е GalA. В отделните фракции нейното количество заема стойности между 63.2 и 74.2% (63.1-75.8 mol%). В значително по-малки количества е намерена GlcA, като най-голямо съдържание е открито в киселинно-екстрахираните фракции от портокалови кори (КЕПП СВЧ – 3.2%; КЕПП АНЧ – 3.0%; КЕПЛ АНЧ – 2.2%), а най-малко във водно-разтворимите – ВЕПП СВЧ (1.9%), ВЕПП АНЧ (0.8%) и ВЕПЛ АНЧ (0.5%).

**Таблица 5.** Монозахариден състав (% w/w) на пектинови полизахариди, получени от цитрусови кори.

Монозахариди	ХЩЦ	КЕПП К	ВЕПП СВЧ	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	6.3	6.3	6.9	5.5	7.0	4.7	5.3	4.4
Ara	12.8	11.8	11.4	8.3	6.1	9.3	12.9	7.6
Xyl/Fuc	0.3	0.7	0.5	0.2	0.9	0.9	0.8	0.4
Gal	7.4	11.5	7.3	5.3	15.6	12.7	5.3	5.7
GalA	68.7	65.0	67.0	68.8	63.2	71.8	71.8	74.2
GlcA	1.3	2.4	1.9	3.2	0.8	3.0	0.5	2.2
Общи захари	96.8	97.7	95.0	91.3	93.6	102.4	96.6	94.5

Данните в таблиците разкриват още, че НЗ заемат между 18.1 и 30.3% от захарите на всяка фракция, като най-богати са КЕПП К и ВЕПП АНЧ. От тях в различни количества са намерени Ara (6.1-12.9%) и Gal (5.3-15.6%). Като основна НЗ Ara е намерена в проби

ВЕПП СВЧ (11.4%), ВЕПЛ АНЧ (12.9%). В най-големи количества Gal се открива във фракциите, получени от АНЧ на портокалови кори: ВЕПП АНЧ (15.6%) и КЕПП АНЧ (12.7%), като обработката с алкохол повлиява слабо в положителна посока върху количеството на този монозахарид (КЕПП К – 11.5%). В резултат на последователната екстракция с вода и киселина близо 74% от намереното в АНЧ Gal съдържание е възстановено в двете фракции. В състава на цитрусовите пектини Rha заема между 4.4 и 7.0%, което представлява между 17 и 28% от НЗ.

Данните от монозахаридния състав биха могли да се обобщят, като се оформят различни моларни съотношения (**табл. 6**) между отделните захари, при което се получава допълнителна полезна информация относно структурните особености на екстрахираните ПЗ. Въз основа на установеното по-голямо количество на GalA (63.1-75.8 mol%) в пробите, както и на по-високата стойност на съотношението между GalA и сумата от НЗ (1.8-3.5) може да се предположи, че фракциите, изолирани от цитрусовите кори, съдържат по-дълги и линейни ХГ фрагменти, към които са прикрепени незначителни остатъци от НЗ. Най-добре това е видно за киселинно-екстрахираната фракция от АНЧ на лимонови кори (3.5), а в по-слаба степен за фракцията КЕПП К (1.8). В допълнение съотношението Rha/GalA е показателно както за присъствието, така и за участието на РГ блокове в основния скелет на пектина. РГ-I фрагментът е съставен от периодично и стриктно редуващи се Rha и GalA единици (съотношение 1.0) свързани по следния начин  $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4) - \alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow ]$ . Базирайки се на това и на намерените по-малки съотношения (0.07-0.13) може да се предположи, че в състава на пектиновите фракции, извлечени от цитрусовите кори, се съдържат малки количества от РГ-I сегменти. Най-добре това се вижда при двата лимонови ПЗ (ВЕПЛ и КЕПЛ АНЧ). Въпреки това, РГ-I фрагментите са декорирани с множество, но сравнително къси странични вериги от НЗ. Индикация за това е съотношението (Ara+Gal)/Rha (2.5-4.6), което дава приблизителна представа за средната дължина на страничните вериги. От разглежданите проби с по-голяма държина на веригите би следвало да се характеризират фракциите КЕПП К (3.7), КЕПП АНЧ (4.6) и ВЕПЛ АНЧ (3.5), за извличането на които е използван по-агресивен екстрагент. При тях по всяка вероятност и степента на омрежване би могла да е по-голяма. За отбелязване е, че съотношението между НЗ Ara и Gal, които влизат в състава на РГ-I, е различно за отделните фракции (0.5-3.0). Това вероятно се дължи на естеството на използвания екстрагент и вида на първоначалната обработка на суровината. Напр. при ВЕПЛ АНЧ съотношението Ara/Gal е 3.0, от което се подразбира, че в по-лесно екстрахируемия пектин (този с вода) Ara е 3 пъти повече от Gal. Отношението между двете УК (GalA/GlcA) е различно за отделните фракции, като GalA преобладава във всички проби, особено при ВЕПЛ АНЧ (141.2) и ВЕПП АНЧ (80.6).

Относителните количества (mol%) на ХГ и РГ-I (вкл. НЗ) сегментите в пробите са представени в **табл. 6**. С най-голям дял на ХГ фрагменти се отличават ПЗ екстрахирани с разредена киселина – КЕПП СВЧ (65.6 mol%), КЕПП АНЧ (62.0 mol%) и КЕПЛ АНЧ (70.5 mol%). Съдържанието на РГ-I сегменти в тези фракции е между 2.0 и 2.6 пъти по-малко от това на ХГ и не надвишава 34.2 mol%. С най-голям РГ-I дял се характеризират КЕПП К (41.0 mol%), ВЕПП СВЧ (38.8 mol%) и ВЕПП АНЧ (42.1 mol%).

**Таблица 6.** Съотношения между отделните монозахариди (mol%) и дял на основните пектинови структурни фрагменти, характеризиращи получените от цитрусови кори пектинови полизахариди.

Съотношение	ХПЦП	КЕПП К	ВЕПП СВЧ	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
GalA/Общи НЗ	2.1	1.8	2.2	3.0	1.9	2.2	2.4	3.5
Rha/GalA	0.11	0.11	0.12	0.09	0.13	0.08	0.09	0.07
(Ara+Gal)/Rha	3.2	3.7	2.7	2.5	3.0	4.6	3.5	3.0
Ara/Gal	2.0	1.2	1.8	1.9	0.5	0.9	3.0	1.6
GalA/GlcA	51.8	27.4	35.3	21.3	80.6	24.0	141.2	34.5
ХГ	60.0	56.0	58.8	65.6	56.0	62.0	64.4	70.5
РГ-I	38.3	41.0	38.8	30.7	42.1	34.2	34.1	26.7
ХГ/РГ-I	1.6	1.4	1.5	2.1	1.3	1.8	2.0	2.6

Индивидуалният монозахариден състав на останалите ПЗ фракции, екстрахирани от праз, шипка и мурсалски чай, изразен на база абс. суха маса, е нагледно представен в **табл. 7**. Като основен компонент в ПЗ е намерена GalA, чието съдържание варира от 43% (КЕППр АНЧ) до 65% (КЕППШ АНЧ). Количеството на GlcA е действително малко и не надхвърля 2.0%. При повечето от пробите то е съпоставимо с това при цитрусовите пектини. Единствено изключение се оказва ПЗ шипка (лк), където количеството на GlcA е най-голямо (2.3%, 3.6 mol%).

**Таблица 7.** Монозахариден състав (% w/w) на пектинови полизахариди получени от праз, шипка и мурсалски чай.

Монозахариди	ВЕППр АНЧ	КЕППр АНЧ	ВЕППШ АНЧ	КЕППШ АНЧ	ВЕППШ	ПЗ шипка (лк)	ПЗ мурсалски чай
Rha	1.0	2.4	1.6	4.7	0.6	0.5	1.1
Fuc	0.1	-	0.2	0.1	-	следи	-
Ara	1.4	0.7	6.1	3.0	2.0	4.7	1.6
Xyl	-	-	0.4	0.7	следи	0.3	1.8
Man	-	-	-	-	-	следи	-
Gal	7.4	48.5	4.0	14.2	3.0	5.5	11.0
Glc	0.3	-	1.9	1.4	-	3.7	4.7
GalA	61.0	43.0	61.3	65.0	46.1	45.5	59.0
GlcA	1.3	2.0	1.7	1.9	-	2.3	-
Общи захари	72.5	96.6	77.2	91.0	51.7	62.6	79.2

При отделните проби НЗ съставляват от 5.6 до 51.6% от общите захари. Тенденцията за по-голямо съдържание на НЗ в киселинно-екстрахираните ПЗ, отколкото в тези извлечени с вода, се вижда ясно при всички проби, независимо от вида на суровината (праз или шипка). Особено отчетливо това е при фракциите получени от АНЧ на праз, където ВЕППр АНЧ съдържа 10.2% НЗ, а киселинно-екстрахираната 5 пъти повече – 51.6%. В

този случай НЗ заемат по-голяма част отколкото уронидите (~45%). По подобие на вече разгледаните цитрусови пектини и в този случай изследваните ПЗ не се различават по качествения си монозахариден състав. Основните НЗ са Ara, Gal и Rha, но количествените различия са значителни. В най-големи количества Gal се открива във фракциите КЕППр АНЧ (48.5%), КЕПШ АНЧ (14.2%) и ПЗ мурсалски чай (11.0%), което представлява съответно 94%, 59% и 54% от общите НЗ на съответния ПЗ. Според **табл. 7** Ara е основна НЗ само в състава на ВЕПШ АНЧ (6.1%). В останалите проби тя заема между 0.7 и 4.7% или между 1.0 и 36% от НЗ. Типичният за ПВ монозахарид Rha се съдържа в количества от 0.5% (ПЗ шипка (лк)) до 4.7% (КЕПШ АНЧ), което е между 3 и 11% от НЗ и по-малко спрямо това на цитрусовите пектини. Впечатление прави още наличието на Glc в някои от ПЗ и то в не малки количества (3.7%; 4.7%). Изследваните пектинови фракции съдържат в доста по-малки количества Fuc (0.1-0.2%) и Xyl (0.3-1.8%), а следи от Man са установени само в ПЗ шипка (лк).

Най-високи съотношения (**табл. 8**) между GalA и НЗ са наблюдавани при ВЕПШ (7.2) и ВЕППр АНЧ (5.5), което показва, че те съдържат дълги и линейни ХГ сегменти, дори по-дълги и от тези на цитрусовите пектини (< 3.5). Противно на това КЕППр АНЧ се характеризира с най-ниската стойност на това отношение (0.8), което предполага присъствието на значително по-къси ХГ фрагменти. Същевременно стойностите на съотношението Rha/GalA (0.01-0.09) подсказват, че в състава на пектиновите фракции, извлечени от праз, шипка и мурсалски чай, се съдържат по-малки РГ-I сегменти, съпоставими с дължината на тези при някои цитрусови пектини (КЕПП СВЧ, КЕПП АНЧ, КЕПЛ АНЧ).

РГ-I фрагментите на проби КЕППр АНЧ, КЕПШ АНЧ и ПЗ мурсалски чай би следвало да са с доста висока степен на омреждане, след като отношението (Ara+Gal)/Rha е най-високо при тях (18.8, 21.1, 10.6).

**Таблица 8.** Съотношения между отделните монозахариди (mol%) и дял на основните пектинови структурни фрагменти, характеризиращи получените от праз, шипка и мурсалски чай пектинови полизахариди.

Съотношение	ВЕППр АНЧ	КЕППр АНЧ	ВЕПШ АНЧ	КЕПШ АНЧ	ВЕПШ	ПЗ шипка (лк)	ПЗ мурсалски чай
GalA/Общи НЗ	5.5	0.8	4.2	2.5	7.2	3.5	3.4
Rha/GalA	0.02	0.07	0.03	0.09	0.01	0.01	0.02
(Ara+Gal)/Rha	8.3	18.8	6.3	3.4	8.4	21.1	10.6
Ara/Gal	0.2	0.02	1.8	0.2	0.8	1.0	0.2
GalA/GlcA	46.0	21.3	36.6	34.6	-	19.5	-
ХГ	81.2	39.8	74.5	63.2	86.4	69.4	70.8
РГ-I	16.4	58.3	19.9	32.1	13.5	20.1	20.2
ХГ/РГ-I	5.0	0.7	3.7	2.0	6.4	3.5	3.5

Тези проби се отличават с най-голяма относителна дължина на страничните вериги спрямо останалите проби. Това би могло да се обясни с условията на екстракция и използвания екстрагент. При ПЗ шипка (лк) Ara и Gal, влизащи в състава на АГ странични вериги, са в еквимоларни количества (1:1), за разлика от останалите шипкови фракции, където Ara/Gal е между 0.2 и 1.8. При прازа тази пропорция е различна при двете

фракции: ВЕППр АНЧ – 0.2 и КЕППр АНЧ – 0.02, като последното е най-ниско намереното измежду всички останали фракции. Това навежда на мисълта, че страничните вериги (и то с доста голяма дължина) при КЕППр АНЧ са преимуществено от хомогалактанов тип, тъй като Gal е 50 пъти повече от Ara. Моларното съотношение между GalA и GlcA е различно за отделните проби (19.5-46.0), като най-ниско то е при ПЗ шипка (лк), а GalA е 46 пъти повече от GlcA при ВЕППр АНЧ.

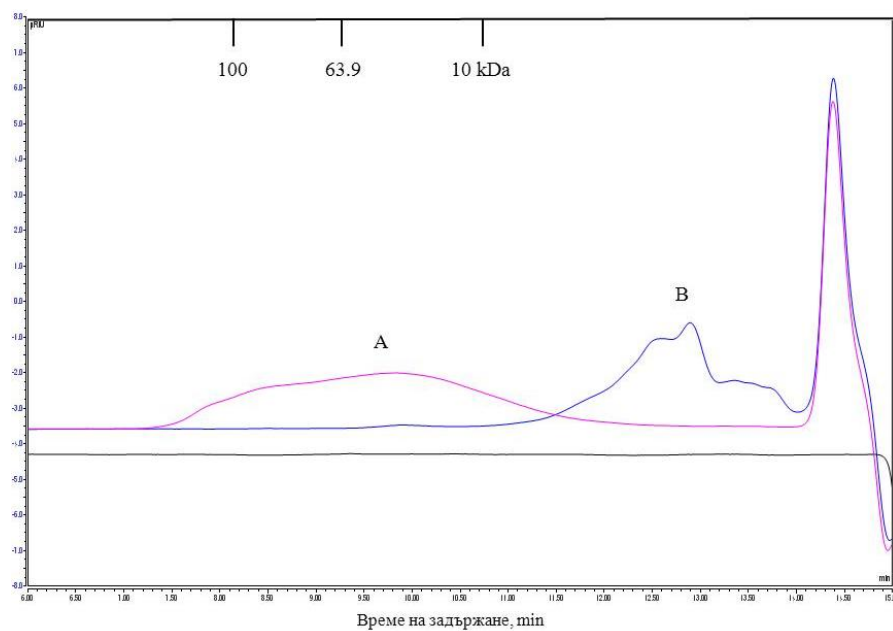
Количества на ХГ и РГ-I (mol%) сегментите в пробите са вменени в **табл. 8**. С най-голям дял на ХГ фрагменти се отличава ПЗ изолиран с вода от свежи шипкови плодове (ВЕПШ) – 86.4 mol%. Проби ВЕППр (81.2 mol%) и КЕПШ (74.5 mol%) от АНЧ се открояват също с голям дял на ХГ сегменти, като съдържанието само на последната фракция е съпоставимо с това на КЕПЛ АНЧ (70.5 mol%). За сметка на това съдържанието на РГ-I сегменти във ВЕПШ е 6.4 пъти по-малко (13.5 mol%) от това на ХГ и същевременно е най-малкото количество намерено въобще. Измежду всички останали фракции КЕППр АНЧ е с най-голям РГ-I дял, който надвишава с 28 до 54% този при отделните цитрусови пектини. Фракциите ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай имат сходни захарни съотношения и пропорции между основните пектинови структурни фрагменти (~70 mol% ХГ и 20 mol% РГ-I), като единствената разлика между тях се оказва по-късите странични вериги от НЗ на втората проба. Всичко това потвърждава факта, че едни и същи структурни елементи на пектина могат да се съдържат в различни количества и пропорции в отделните растителни източници.

## 2.2. Молекулна маса на изходните полизахариди

Молекулната маса и полидисперсността (хомогенност) са съществени характеристики на ПЗ. Отделните фракции се различават по мол. маса и хомогенност, което е свързано или зависи от начина на получаването им. Най-общо водноекстрахируемите пектини се отличават с висока мол. маса и хомогенност, докато тези извлечени с разрежена HCl киселина са с по-ниска мол. маса и по-голяма хетерогенност. Вероятно това е резултат от частичното разграждащо действие, което притежава киселината. С висока хомогенност (100%) се открояват ХПЦП ( $3.5 \times 10^6$  Da), ВЕПП К ( $2.0 \times 10^6$  Da), ВЕПП СВЧ ( $9.1 \times 10^5$  Da) и ВЕПЛ АНЧ ( $4.3 \times 10^6$  Da), като последният е и най-високомолекулният ПЗ. Молекулната нееднородност се повлиява по-скоро от условията на киселинната екстракция, отколкото от първоначалната микровълнова обработка, която всъщност води до промени в капилярно-порестата структура на суровината и подтискане на ензимната активност.

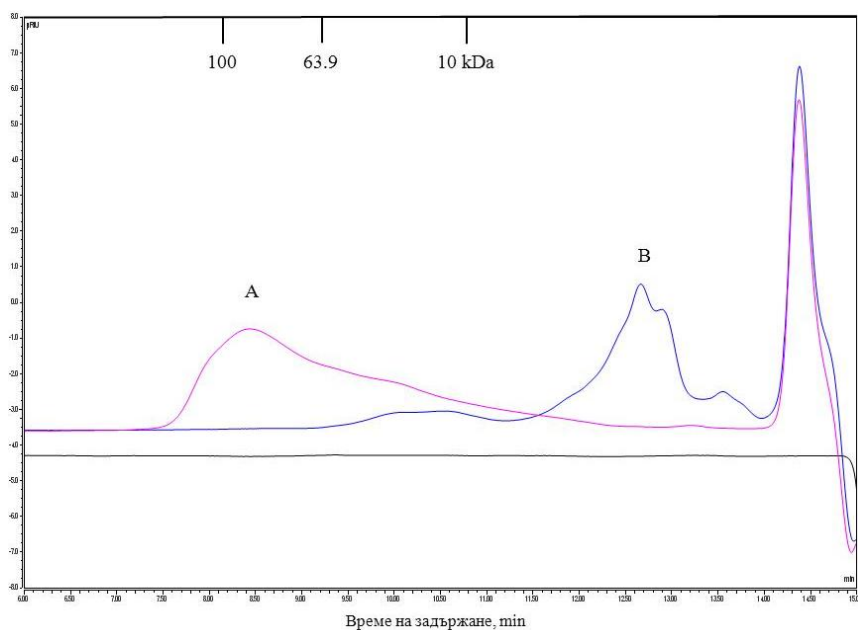
По отношение на фракциите от праз и шипкова люспа се запазва наблюдаваната тенденция. Мол. маса на ВЕППр АНЧ ( $7.7 \times 10^4$  Da) не превишава намереното при цитрусовите пектини. КЕППр АНЧ се откроява с по-голяма хетерогенност и наличие на най-малко три ПЗ популации, като тази с най-малка мол. маса ( $2.4 \times 10^4$  Da) заема най-голям дял – 82%. ВЕПШ АНЧ се откроява като една хомогенна фракция с мол. маса ( $2.5 \times 10^5$  Da). За разлика от нея КЕПШ АНЧ е съставена от две отделни популации, като тази с по-голямата маса ( $2.7 \times 10^5$  Da) заема по-голям дял (88%), а втората с мол. маса от  $1.5 \times 10^4$  Da значително по-малък (12%).

Елуционният профил и разпределението на мол. маси за проби ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай могат да бъдат видяни от **фиг. 1А** и **2А**.



**Фигура 1.** HPSEC елуционен профил на ПЗ шипка (лк) преди (A) и след (B) действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II.

И тази проба демонстрира по-широко молекулярно масово разпределение. Първоначално в областта на високите мол. маси (>100 kDa), започва оформянето на по-голям основен пик, чието отмиване под формата на широка опашка плавно продължава до областта на нискомолекулните съединения (~10 kDa).



**Фигура 2.** HPSEC елуционен профил на ПЗ от мурсалски чай преди (A) и след (B) действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II.



От първата фигура (1А) ПЗ шипка (лк) се елуира като доста широк пик, което показва, че изходният ПЗ се състои от различни мол. популации, разпределението на които по маса обхваща границите както на много високите (>100 kDa), така и на относително нискомолекулни съединения (>10 kDa).

### 3. Ензимна модификация на полизахаридите с *endo*-ПГ-I

Ензимните методи са едни от широко използваните и често са неотменен етап в многостъпалния процес на изучаване и установяване структурата на биополимерите. Същевременно, най-често използваният подход както за отделянето на ПЗ от екстрактите, така и за тяхното фракциониране и пречистване е утаяването с етанол или някои др. органични разтворители. Комбинирането на тези два подхода води до възможност за сепариране и изолиране от хидролизната смес на ензимно модифицирани алкохолно-утаими продукти с различен състав и чистота.

#### 3.1. Ензимна модификация на ПП изолирани от АНЧ на цитрусови кори

По-долу са представени резултатите от проведената серия опити по ензимна модификация на ЦП с *endo*-ПГ-I и  $\beta$ -(1→4)-галактанази.

##### 3.1.1. Молекулна маса на модифицираните продукти

Основен резултат от модификациите е редуцията на мол. маси и увеличението на броя на мол. фрагменти, т.е. хетерогенността. Като се има предвид специфичността на действие на използвания ензим, ясно става, че откритите в етаноловия филтрат по-нискомолекулни вещества би следвало да са  $\alpha$ -D- (1→4)-свързани олигогалактурониди. Неподатливият на хидролиз с *endo*-ПГ-I по-високомолекулен РГ-I би следвало да се акумулира, като основен компонент в алкохолно-утаимата част. Делът на високомолекулните популации в алкохолно-утаимите продукти на КЕПП СВЧ намалява значително ( $2.6 \times 10^5$  Da – 10%) след втората ензимна модификация с  $\beta$ -(1→4)-галактан-разграждащите ензими, докато този на по-нискомолекулните съединения (олигомери) нараства ( $0.8 \times 10^3$  Da – 68%). Въпреки това определена част от по-високомолекулните фрагменти, в повечето проби, се запазва неразградена и след втората модификация.

От изложените дотук данни може да се направи извода, че колкото повече ензими участват в последователното разграждане на пектина, толкова по-съществено е намалението на мол. маса и увеличението на мол. хетерогенност. Поради този факт при всяка следваща стъпка се възстановяват по-малки количества от високомолекулни алкохолно-утаими продукти.

##### 3.1.2 Монозахариден състав на модифицираните продукти

Индивидуалният монозахариден състав на алкохолно-утаимите фракции след действието на *endo*-ПГ-I върху ЦП, изразен на база абс. суха маса, е нагледно представен в **табл. 9**, а този на алкохолно-разтворимата част – **табл. 10**. Определянето му в тези фракции е от особено значение, защото дава възможност да се съди за влиянието и измененията, които предизвикват съответната ензимна модификация и обработка на субстрата. Основен въглехидратен компонент е GalA. В отделните продукти нейното количество заема стойности между 31.0 и 56.4% (45.1-67.1 mol%). Спрямо съдържанието в изходните пектини нейното количество (в зависимост от пробата) е редуцирано между

11% (ВЕПП АНЧ) и 55% (КЕПП СВЧ). Значително по-малката стойност на съотношението GalA/сума НЗ (0.9 спрямо изходна 3.0) подсказват, че разграждането се осъществява по-пълно при КЕПП СВЧ, а противно на него ВЕПП АНЧ, се оказва доста устойчив на ензимно действие макар, че субстратът е осапунен. Следователно осапунването на субстрата е необходимо, но не и достатъчно условие за пълния хидролиз на субстрата. В значително по-малки количества спрямо това на GalA е намерена GlcA (0.4-3.5%; 0.6-4.4 mol%). Сравнявайки го с това в изходните ПЗ става ясно, че количеството на GlcA в алкохолно-неразтворимата част след модификация на проби ВЕПП, КЕПП и ВЕПЛ от АНЧ, се е повишило съответно със 70%, 14% и 29%.

**Таблица 9.** Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-утаимите продукти след модификация на цитрусови пектини с *endo*-ПГ-I.

Монозахариди	ХПЦП	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	13.5	9.1	11.2	11.0	10.4	12.5
Ara	1.5	2.1	1.4	1.5	4.0	2.2
Gal	4.7	20.1	9.5	15.6	7.4	11.5
GalA	46.7	31	56.4	44.4	53.1	49.2
GlcA	0.4	2.6	2.7	3.5	0.7	3.4

По-високите стойности могат да бъдат обяснени с факта, че GlcA е локализирана в резистентни към действието на *endo*-ПГ „космати“ региони (РГ-I и II) и АГ-II/АГП. След модификация на ЦП съдържанието на Rha в алкохолно-неразтворимите продукти се е повишило за всички проби спрямо изходните с между 35-63%. Количеството и в отделните продукти варира между 9.1 и 13.5% (15.5-22.8 mol%), което представлява между 29 и 69% от общите НЗ. Това подсказва, че модифицираните продукти са се „обогатили“ с Rha-съдържащи фрагменти (РГ-I). От намерените по-големи стойности на молните съотношения между Rha/GalA (0.23-0.35) може да се предположи, че в състава на пектиновите фракции, изолирани чрез алкохолна коагулация, основна част заемат РГ блокове. С най-голям РГ-I дял се характеризират КЕПП СВЧ (66.8 mol%), а с най-малък ВЕПП АНЧ (45.6 mol%). От тези данни следва, че повишението на РГ дял спрямо изходното количество (табл. 9) е най-голямо при КЕПП СВЧ (54%), а най-малко при проба ВЕПП АНЧ – само 8% (!). Това предполага, че тази проба е претърпяла най-малко промени и по структура е близка до изходната. Излишното количество от GalA би трябвало да се намира под формата на олигогалактурониди (с различна СП), които са съутаяни наред с високомолекулярния РГ. Друга възможност е GalA единици да изградят неразградени ХГ сегменти. По-голямата пектиназна резистентност на някои от пробите се обяснява със силно „заселените“ със странични вериги от НЗ РГ-I региони и с по-късите ХГ сегменти, при което скоростта на хидролиза силно се намалява.

Съдържанието на Ara (1.4-4.0%) е редуцирано във всички субстрати между 69 (ВЕПЛ АНЧ) и 88% (ХПЦП), а от общите НЗ тя заема от 5-18%. Причините за намалението може да са свързани както с чистотата на използвания ензим, така и с двукратната обработка на хидролизната смес с етанол в процеса на изолиране и пречистване на неразградените високомолекулярни фрагменти. Понижение на Gal съдържание с 36% и 39% се забелязва само при ХПЦП и ВЕПП АНЧ, а при всички

останали проби се забелязва увеличение с 19% (КЕПП АНЧ), 28% (ВЕПЛ АНЧ), 50% (КЕПЛ АНЧ) и 74% (КЕПП СВЧ). Интересно е, че в алкохолно-утаимите продукти не се открива Ху1, противно на присъствието и във всички алкохолно-разтворими части (**табл. 10**). Това показва, че най-вероятно е освободена по време на ензимната хидролиза. Съвсем възможно е наличието на къси ПГ-устойчиви Ху1-заместени GalA последователности осеяни с дълги *endo*-ПГ-разградими ХГ сегменти. Така след хидролиза „незасегнати“ ксилозилирани олигомери могат да бъдат натрупани в разтворимата част, отделяна впоследствие, като супернатант.

**Таблица 10.** Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-разтворимата част след модификация на цитрусови пектини с *endo*-ПГ-I.

Монозахариди	ХПЦП	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	3.5	1.7	3.4	2.5	1.3	1.7
Xyl	0.6	1.2	0.9	1.2	1.3	1.2
Ara	0.7	0.7	0.4	1.1	0.8	0.7
Gal	0.5	0.3	0.3	1.6	0.5	0.3
GalA	22.0	37.8	6.8	26.9	18.7	25.0
GlcA	-	-	0.4	-	-	-
Олигозахариди*	67.1	70.4	67.2	69.3	69.7	68.7

\* % дял на получени след интегриране пикове от общата площ

От **табл. 10** може да се види, че наред с мономерната GalA под действието на ензима се натрупват и алкохолно-разтворими олигомери (кисели и/или неутрални).

С цел потвърждаване природата на връзките между отделните НЗ в страничните вериги, а също така и по-нататъшното изследване влиянието на този тип галактанови вериги върху имунологичната активност на ПП, бяха направени опити за тяхното ензимно отстраняване. За тези цели обогатените на РГ сегменти алкохолно-утаими фракции, след действие с *endo*-ПГ-I, бяха подложени на комбинирана ензимна модификация с  $\beta$ -(1→4)-галактан-разграждащи ензими. От данните за монозахаридния състав се вижда, че основен компонент е GalA и в отделните фракции нейното количество заема стойности между 21.1 и 54.1% (51.2-73.2 mol%). Неразграденият ХГ от предходната модификация би следвало да се запази и тук, т.к. галактан-разграждащите ензими не действат на ХГ. НЗ заемат между 15.3 и 17.5% от захарите на всяка фракция. Като основна НЗ във всички от тях е намерена Ara (10.5-15.2%; 22.6-36.3 mol%), като в резултат от модификацията количеството ѝ се е повишило между 3 (ВЕПЛ АНЧ) и 10 (ХПЦП) пъти. Количеството на Gal в отделните проби варира между 1.0 и 5.3% (1.5-11.5 mol%). Това показва, че съдържанието ѝ е редуцирано между 11% (ВЕПП АНЧ) и 50% (ВЕПЛ АНЧ). Прави впечатление, че количеството на Gal е намаляло най-много във водно-екстрахираните пектини (2-10 пъти). Детектираното остатъчно количество Gal е резултат от неразградени  $\beta$ -(1→4)-гликозидни връзки, но също така и от „нераагирани“ връзки от вида  $\beta$ -(1→3,6). Това позволява да се мисли за присъствието на по-сложно организирания АГ-II, който вероятно е ковалентно свързан към ПЗ, съдържащ ХГ структурни елементи. Очевидно отстраняването на Gal от АГ странични вериги, акумулиращи се в алкохолно-утаимата част, не може да се извърши напълно, поради „пречещото“ влияние на Ara. Показателни

са по-високите стойности на съотношението Ara/Gal – 2.4-15.5 спрямо изходните. В това отношение получените резултати потвърждават залегналото в научната общност мнение за наличие на арабино-4-галактанови странични вериги в ЦП!

В алкохолно-утаимите модифицирани продукти се съдържат фрагменти в чийто състав влиза Rha. Най-вероятно това са основни вериги на „оголени“ РГ-I фрагменти, носещи АГ вериги.

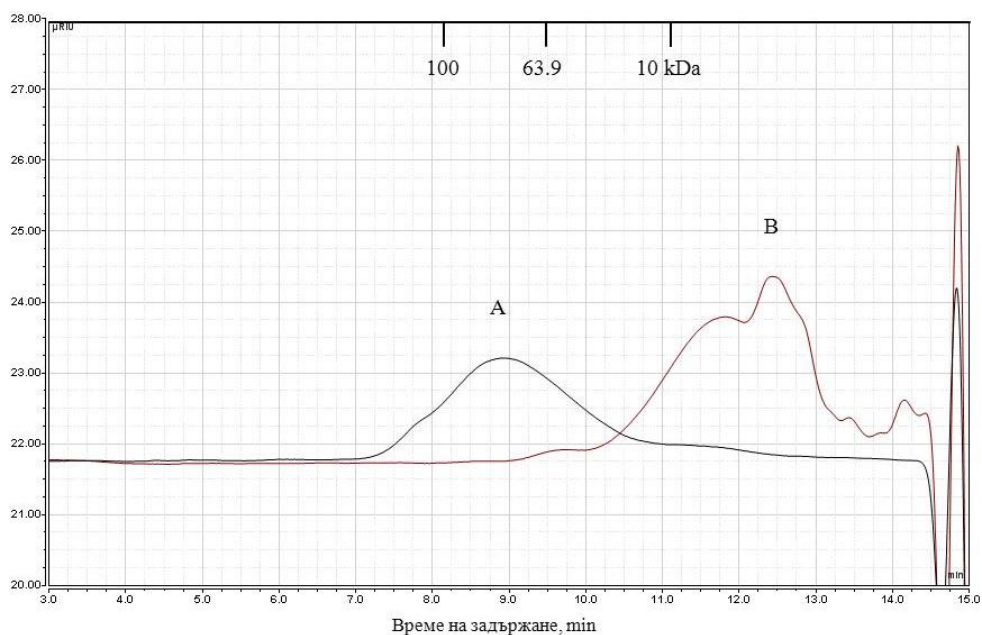
#### 4. Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ

В настоящия раздел са представени резултатите, получени от мулти-ензимния фингърпринтинг анализ, който обхваща два от получените ПП – КЕПП АНЧ и КЕППр АНЧ, както и техните алкохолно-утаими части, изолирани след действието на *endo*-ПГ-I. Чрез този подход се генерират разнообразни „диагностични“ олигомери достатъчни, за да се „реконструира“ първоначалната структура на пектиновия полимер. В тази серия от опити са използвани ПЛ и РГ-модифициращи ензими, поради наблюдавания факт, че *endo*-ПГ-I не е способен да разгради достатъчно съответните високоестерифицирани пектини.

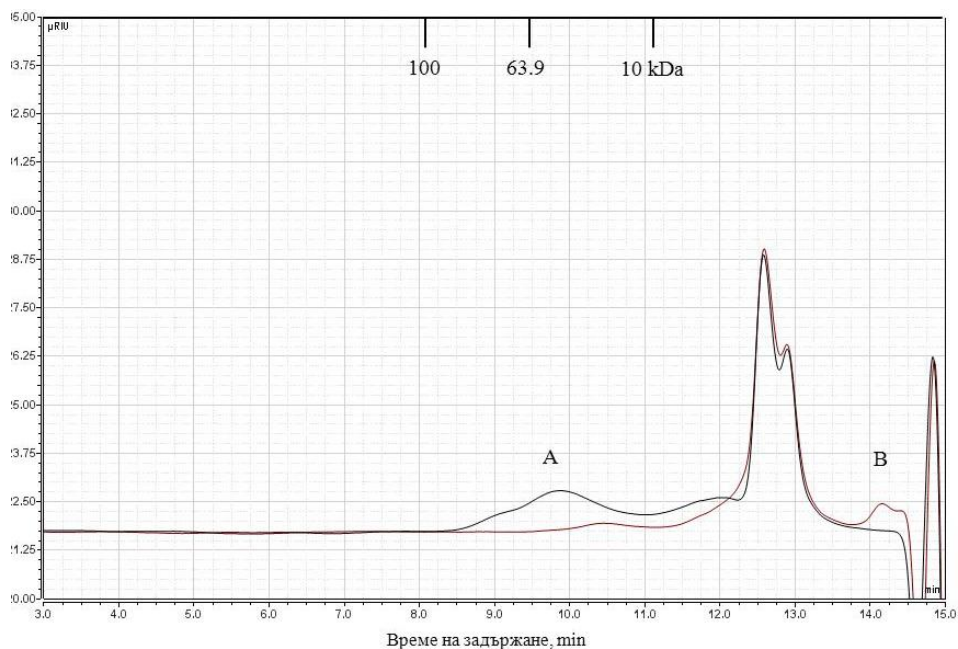
##### 4.1 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕПП АНЧ

###### 4.1.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

На **фиг. 3** и **4** са представени елуционните профили на изходните проби (**A**) и на получените от тях ензимни хидролизати (**B**). Изходният ПЗ е с по-висока мол. маса ( $> 10$  kDa) и се елуира  $< 11.5$  min. Значителна разлика в разпределението по мол. маса се наблюдава след ензимното разграждане (**фиг. 3B**). От фигурата се вижда изместване на пика към по-нискомолекулните фракции ( $\leq 3$  kDa) и олигомери, които се отмиват  $> 11.5$  min. Забелязва се и запазване на широк, но с малък интензитет пик (9-10 min). Той би следвало да обединява силно „резистентни“ на комбинираното ензимно действие РГ-I региони. Измененията в разпределението по мол. маса, които се наблюдават след ензимния фингърпринтинг анализ на алкохолно-утаимата част, получена след действие с *endo*-ПГ-I, са представени на **фиг. 4**. Неразградените високомолекулни ( $\sim 65 - 30$  kDa) фрагменти (РГ-I с НЗ) претърпяват допълнителен по-пълен хидролиз, който води до натрупването на моно- и олигомери ( $\leq 3-5$  kDa), елуиращи се  $> 11.5$  min. Сравнявайки два от профилите на елуиране (**фиг. 3B** и **4B**) се забелязва, че те се различават значително в областта на олигомерите (11-12 min). Първият от тях (**фиг. 3B**) съдържа значително повече и разнообразни олигомери с по-висока мол. маса (съотв. СП). Вторият (**фиг. 4B**) е доста „по-беден“ на олигомери, а мол. маса на тези които присъстват не надвишава 3 kDa. Тези резултати показват, че по-голямата част от проба КЕПП АНЧ е хидролизирана още с първата модификация с *endo*-ПГ-I.



**Фигура 3.** HPSEC елуционен профил на КЕПП АНЧ преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.



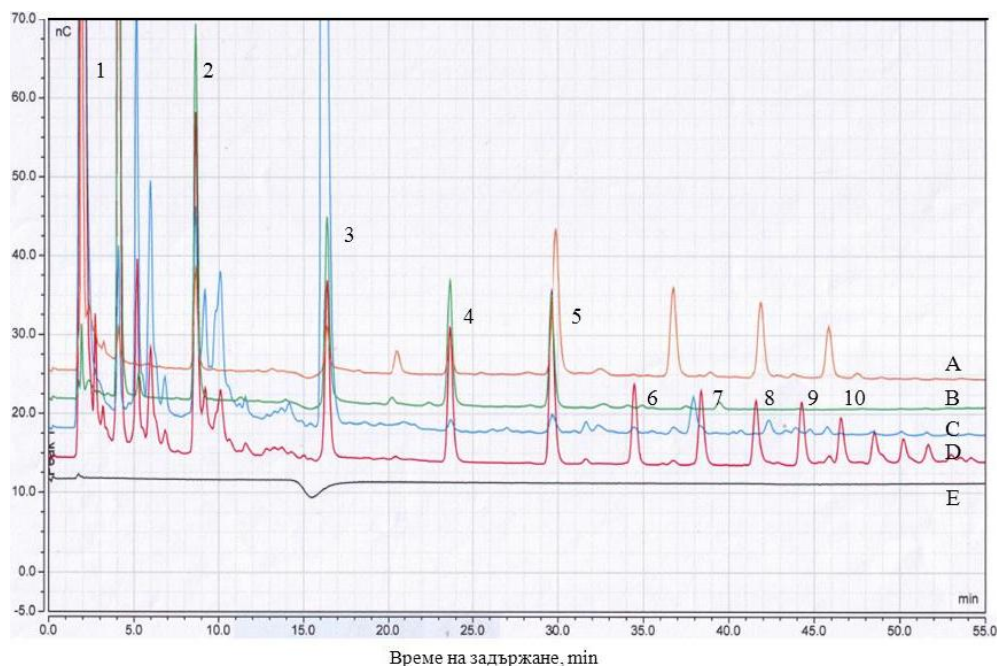
**Фигура 4.** HPSEC елуционен профил на алкохолно-ураимите продукти на КЕПП АНЧ след действието на *endo*-ПГ-I преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

#### 4.1.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

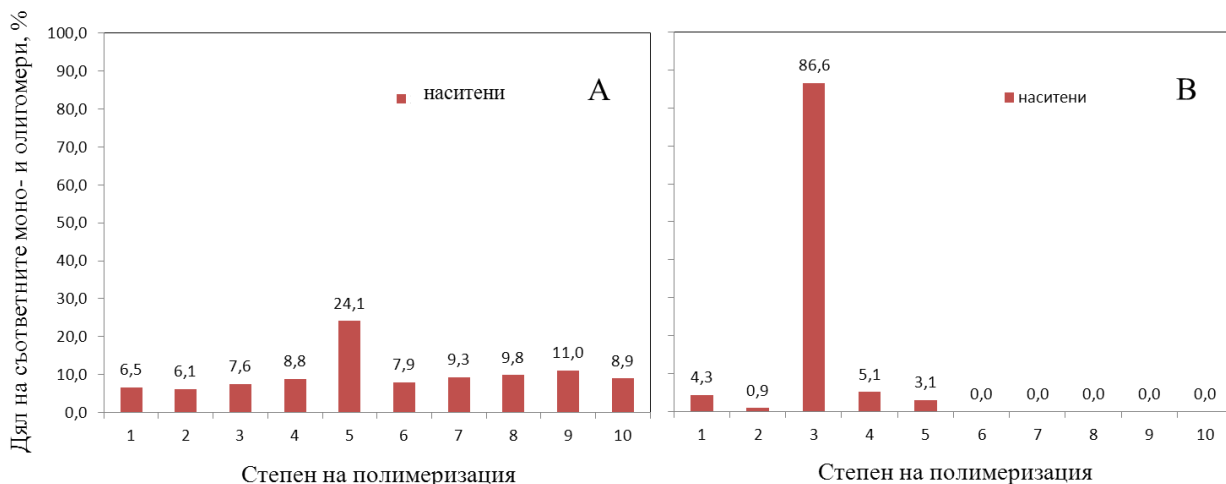
За получаване на информация относно структурата на ХГ в пектиновата макромолекула е необходимо идентифицирането и количественото определяне на наситените и ненаситени олигогалактурониди (вкл. СП), генерирани в резултат на

комбинираното ПГ и ПЛ действие. За тази цел хидролизатите са анализирани чрез НРАЕС с РАD детекция. На **фиг. 5** е представен елуционният профил на пробата. От хроматограмата (**фиг. 5D**) се вижда, че след ензимен хидролиз на изходния (неосапунен) КЕПП АНЧ в средата се натрупват кисели мономери и олигомери с различна СП (2-13). Допълнително на **фиг. 6A** е посочен дялът, който заема всеки от тях спрямо всички освободени олигозахариди. Въз основа на това може да се разсъждава върху начина на разпределение на Me-естери, а впоследствие и да се изчислят някои допълнителни химични показатели. В хидролизната смес на изходния ПЗ най-голям дял заемат пентамерите (5) – 24.1%, следвани от нонамерите (9) – 11.0%. Сборът на моно-, ди- и тримерите не надвишава 20.2% (**фиг. 6A** и **B**), а помежду си те се отнасят както 1.1:1.0:1.2. Малкият дял, който заемат тези олигомери, липсата на превес на някои от тях сред останалите и съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.48$  подсказват, че в ХГ сегменти се съдържат малко блокове от неестерифицирани GalA остатъци. В хидролизата се откриват наситени олигомери с по-голяма СП ( $> 6$ ), които заемат ~ 47% и навярно са естерифицирани. Въпреки че в хидролизния процес участва ензимът ПЛ, осъществяващ нехидролитичното разкъсване на гликозидната връзка между Me-GalA остатъци чрез *trans*-елиминиране във високоестерифицирани пектини, не се детектират ненаситени олигогалактурониди! Това е ясна индикация, че в КЕПП АНЧ не се съдържат големи блокове от Me-естерифицирани GalA остатъци!

Особено интересен се оказва елуционният профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I. Анализираният хидролизат е значително „по-беден“ на олигомери с висока СП ( $\leq 5$ ) (**фиг. 5C**) и противно на досега разглеждания най-голям дял сред олигомерите заемат тримерите (86.6%) (**фиг. 6B**).



**Фигура 5.** НРАЕС-РАD елуционен профил на КЕПП АНЧ (**D**) и алкохолно-утаимата му част (**C**), след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими. Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (**B**); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (**A**); вода (**E**).



**Фигура 6.** Степен на полимеризация и дял (%) на съответните моно- и олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащите ензими върху: изходен КЕПП АНЧ (А); алкохолно-утаима част, получена след действието на *endo*-ПГ-I (В).

Това показва, че в тази проба присъстват няколко големи неразградени и неестерифицирани GalA сегменти, дори и след като осапуненият субстрат е претърпял първоначална модификация. Наблюдаваното допълнително освобождаване на кисели моно- и олигомери може да свържем със синергичното действие на РГ-I-модифициращите ензими. Вероятно с отстраняване на част от страничните вериги от НЗ, както и разграждане на РГ основен скелет, допълнително се откриват части от осапунения, но пространствено недостъпен за *endo*-ПГ-I в първата модификация ХГ. Това показва, че този ХГ е локализиран в непосредствена близост до РГ области.

В резултат на контролния анализ се потвърждава, че някои олигогалактурониди са способни на агрегация и ко-елуиране с по-високомолекулни фрагменти от „косматите“ пектинови региони. Моно- и олигомери със СП 2-3 не са напълно отстранени от алкохолно-утаимата част и те присъстват в пробата им.

При този вид хроматографски анализ не е възможно да се разграничат естерифицирани олигомери от неестерифицираните.

За разделянето и идентифицирането на частично естерифицирани олигоурониди и неутрални олигомери е използвана хидрофилно-взаимодействаща течна хроматография (HILIC), която използва специални ВЕН аминоколони, а за детекция на олигомерите се използват ELSD и ESI-MS детектори свързани последователно. Времето на задържане се увеличава с нарастване общия (нетен) заряд на киселите олигомери или значително намалява в присъствието на Me-естерни групи.

От HILIC-ELSD/MS елуционните профили на хидролизатите се вижда голямото разнообразие от наситени Me-естерифицирани и неестерифицирани олигомери, които се натрупват в хидролизната смес на изходния неосапунен субстрат (КЕПП АНЧ) и чийто произход е свързан с разграждането на ХГ. Единствено ди- и тримерите и малка част от тетрамерите не са Me-естерифицирани ( $2^{00}$ ,  $3^{00}$ ,  $4^{00}$ ). Особено впечатление прави присъствието на не- Me-естерифициран тример, носещ Ac група ( $3^{01}$ ; **GalA-GalA-GalA<sub>Ac</sub>**). Това показва, че пектиновият ХГ от портокалови кори съдържа не само незаместени области, но също така и къси ( $\leq 7$ ) ацелирани GalA-последователности. Освобождаването на такъв вид олигомер говори, че ензимът *endo*-ПГ проявява по-широка специфичност и не е така „претенциозен“ към присъствието на Ac-групи в субстрата.

Същевременно наличието на такъв олигомер затвърждава наблюденията, че остатъци, които са едновременно *O*-ацетилирани и Ме-естерифицирани са рядкост. Сред хидролизните продукти доминират пентамерите носещи една или две Ме групи ( $5^{10}$  и  $5^{20}$ ). Оказва се, че един от продуктите от действието на *endo*-ПГ-II е хексамер ( $6^{20}$ ,  $m/z$  1101.2), за който въз основа на MSn анализ могат да се предложат две структури: **GalA-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA** и **GalA-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA-GalA**. Наред с тях с по-голямо RT се елуират и частично Ме-естерифицирани, но не и *O*-ацетилирани високомолекулни олигоурони ( $7^{20}$ ,  $8^{30-20}$ ,  $10^{40}$ ,  $11^{30}$ ), в които Ме групи са случайно разпределени! В хидролизната смес се съдържат и продукти от действието на РГ-I-модифициращите ензими. Напр. от действието на *endo*-РГХ-A се генерират олигорамногалактурони (**Rha-GalA**)<sub>2</sub>, (**Rha-GalA**)<sub>3</sub>, а също така и галактозилиран (**Rha-GalA**)<sub>2</sub>Gal. Тези олигомери са застъпени в малки количества, а изглежда, че по-голямата част ( $\frac{2}{3}$ ) от тях не са заместени. Като резултат от съвместното действие на *endo*- и *exo*-арабиназата и *endo*-галактаназата се натрупват Gal<sub>2</sub> и Ara<sub>3</sub>, които изграждат част от страничните вериги от НЗ.

По отношение на HILIC елуционния профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I, заслужава да отбележим доминиращото присъствие на неестерифицираните тримери ( $3^{00}$ ), установено по-преди и чрез НРАЕС. Произходът им е свързан с разпада на недоразграден ХГ. Наред с това прави впечатление и наличието на РГ олигомери, които по качествения си състав не се различават от тези получени от изходния неосапунен субстрат – (**Rha-GalA**)<sub>2</sub>, (**Rha-GalA**)<sub>3</sub> и (**Rha-GalA**)<sub>2</sub>Gal. Това дава основание да се приеме, че алкохолно-утаената част след първата модификация съдържа основно РГ-I сегменти.

Въз основа на изложените данни дотук може да се изчислят и някои параметри, допълнително характеризиращи естеството на анализирания проби (КЕПП АНЧ и КЕПП АНЧ *endo*-ПГ-I) (табл. 11). Първият параметър – „абсолютната степен на подреждане в блокове“ ( $DB_{abs}$ ) е математически израз, даващ информация за броя на неестерифицираните GalA остатъци, присъстващи в блокове. За изходен КЕПП АНЧ е получена стойност от 6 mol%. Предвид липсата на превес на ди- и/или тримери в хидролизата може да се предположи, че неестерифицираните блокове са с малка дължина (5-7 остатъка) и се съдържат в малки количества. Това не е изненадващо след като пектинът е високоестерифициран (71%). Ако неестерифицираните блокове са с голяма дължина, то би следвало  $DB_{abs} \approx CX_{ПГ}$ . Нещо повече тези блокове са разположени (кълъстерно, по групи) много близо едни до други (през ~5-11 GalA звена), т.к. преобладаващо (~ 81%) в ензимния хидролизат се съдържат детектируеми Ме-естерифицирани олигомери (5, 6, ... 11). От табл. 11 е видно още, че 31 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПГ-разградими и се възстановяват като наситени олигомери. Чрез показателя  $CX_{ПГMe}$ , се отчита, че по-голямата част (25 mol%) от тях са частично Ме-естерифицирани, но ензимът *endo*-ПГ все още може да ги хидролизира. Същевременно високите стойности на показателя означават, че в пробата присъстват големи блокове от естерифицирани GalA остатъци, чиято  $DB_{abs} = 0$ . Заслужава да се отбележи още и това, че част (~21 mol%) от УК на пробата, които изграждат ХГ остават нехидролизирани! Тези последователности притежават специфично Ме- и Ас-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими ( $DB_{abs} = CX_{ПГ} = CX_{ПЛ} = 0$ ). Получената информация позволява да се приеме, че разпределението на Ме-естерните групи по протежението на ХГ в пектиновата макромолекула на изходния КЕПП от АНЧ



има по-скоро случаен характер и късите неестерифицирани блокове се прекъсват от сравнително дълги естерифицирани GalA остатъци.

**Таблица 11.** Общо съдържание ( $\mu\text{g/mL}$ ) на олигогалактурониди в ензимни хидролизати на КЕПП АНЧ и КЕПП АНЧ след *endo*-ПГ-I и стойности на параметрите, характеризиращи Me-естерното разпределение, получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

Проба	Наситени олигомери	$DB_{abs}$	СЕ	СА	$CX_{ПГ}$	$CX_{ПЛ}$	$CX_{ПГMe}$	Добив
	$\mu\text{g/mL}$							
КЕПП АНЧ	1074.3	6	71	0.9	31	0.0	25	31
КЕПП АНЧ алкохолно-утаима част след <i>endo</i> -ПГ-I	902.2	4	2	0.0	18	0.0	14	18
КЕПП АНЧ алкохолно-утаима част след <i>endo</i> -ПГ-I (контрола)	780.7	n.d.	2	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

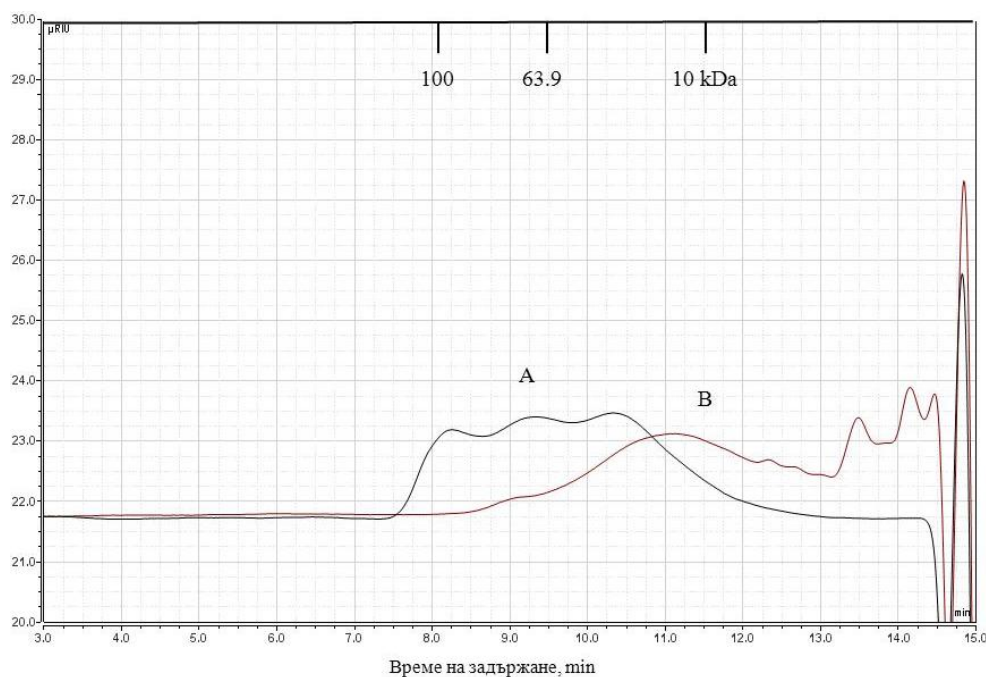
#### 4.4.2 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕППр АНЧ

##### 4.4.2.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

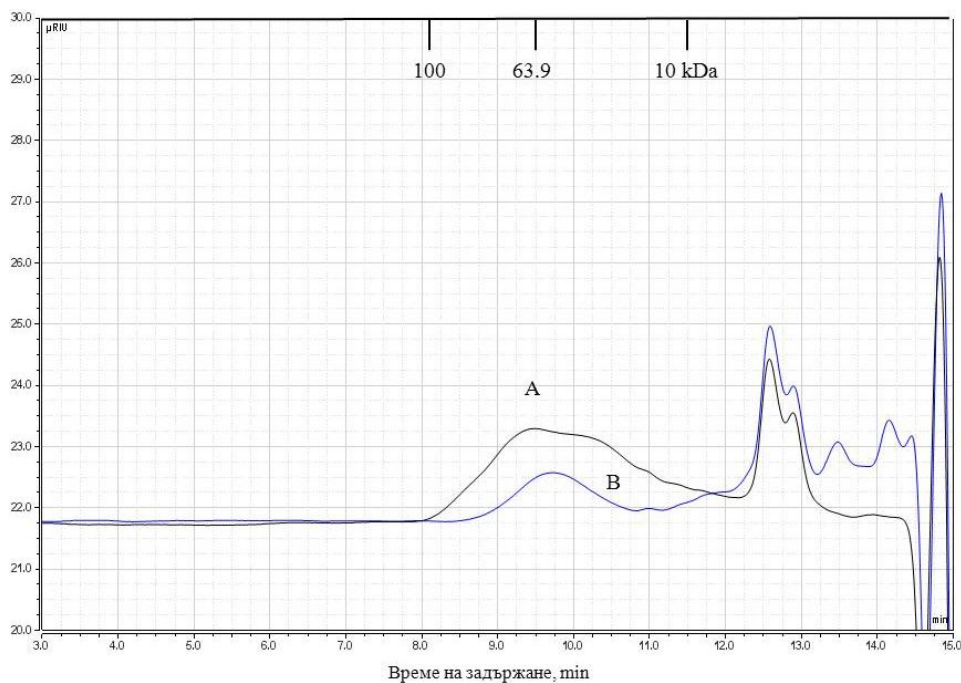
Изходният ПЗ е с по-висока мол. маса ( $\sim 100$  kDa) и се елуира напълно  $< 12.0$  min (фиг. 7). Значителна разлика в разпределението по мол. маса се наблюдава след действието на двата ензима. Наблюдава се изместване на пика към по-нискомолекулните фракции ( $\leq 3$  kDa) и олигомери ( $\leq 1$  kDa), които се отмиват  $> 12.0$  min. Хидролизатът съдържа значително повече и разнообразни олигомери с по-висока мол. маса/респ. СП. Наред с тях, обаче се забелязва и запазването на малки части от високомолекулните втора и трета ПЗ популации ( $\sim 64$ - $20$  kDa; 9-11 min). Това би следвало да са силно „резистентни“ на комбинираното ензимно действие „космати“ региони.

Измененията в разпределението по мол. маса, които се наблюдават след ензимния фингърпринтинг на алкохолно-утаимата част, получена след действие с *endo*-ПГ-I (фиг. 8А и В). Неразградените високомолекулни ( $\sim 100$  –  $30$  kDa) фрагменти (РГ-I с НЗ, а също така и ХГ) претърпяват хидролиз, който води до натрупване на моно- и олигомери ( $\leq 1$ - $5$  kDa) елуиращи се  $> 11.5$  min. Двата профила са донякъде еднакви в областта на олигомерите (11-13 min) и се различават основно по интензитетите. Това показва, че в резултат на допълнителния хидролиз се отделят малко олигомери, които в по-голямата си част са идентични с първоначално присъстващите в субстрата! Профилите се различават значително в областта на високомолекулните продукти, макар че в процеса на хидролиза и на двата субстрата участват едни и същи ензими (фиг. 7В и 8В). Въпреки участието на РГ-модифициращи ензими, се наблюдава запазване на немалка част от пробата неразградена, която е със значително висока мол. маса (8.5-11 min;  $\sim 64$  kDa) (фиг. 8В). Наблюдаваното е в подкрепа на твърдението за доминиращо присъствие на РГ-I региони в КЕППр АНЧ с прикрепен към него силно омержен АГ-II. Високомолекулните фрагменти се разграждат по-пълно, когато пробата не е претърпяла предварително осапунване и ензимна модификация. Навярно след първата модификация се предизвикват такива изменения в субстрата, водещи до изолиране на алкохолно-утаими продукти, които възпрепятстват по-

нататъшното действие на ензимите, способни да хидролизират по-пълно немодифицирания субстрат. Причините за това са свързани най-вече с характеристики на субстрата, играещи важна роля в молекулното разпознаване – ред, дължина и начин на подреждане на разклонените и неразклонени Rha остатъци и странични вериги.



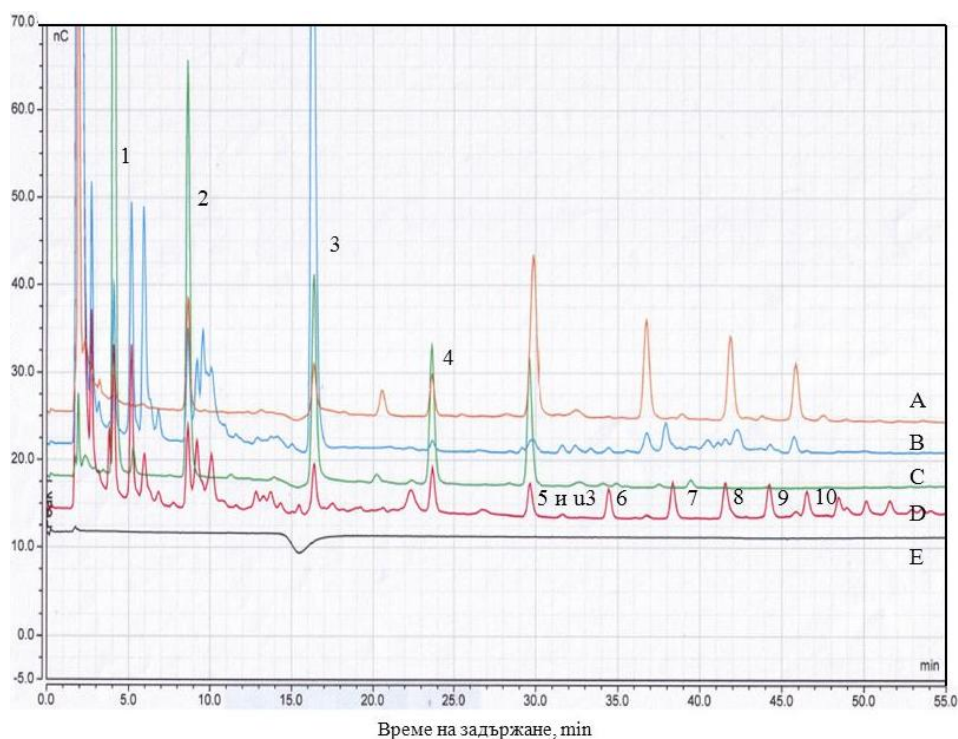
**Фигура 7.** HPSEC елуционен профил на КЕППр АНЧ преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-І-разграждащи пектолитични ензими.



**Фигура 8.** HPSEC елуционен профил на алкохолно-угаимите продукти на КЕППр АНЧ след действието на *endo*-ПГ-І преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-І-разграждащи пектолитични ензими.

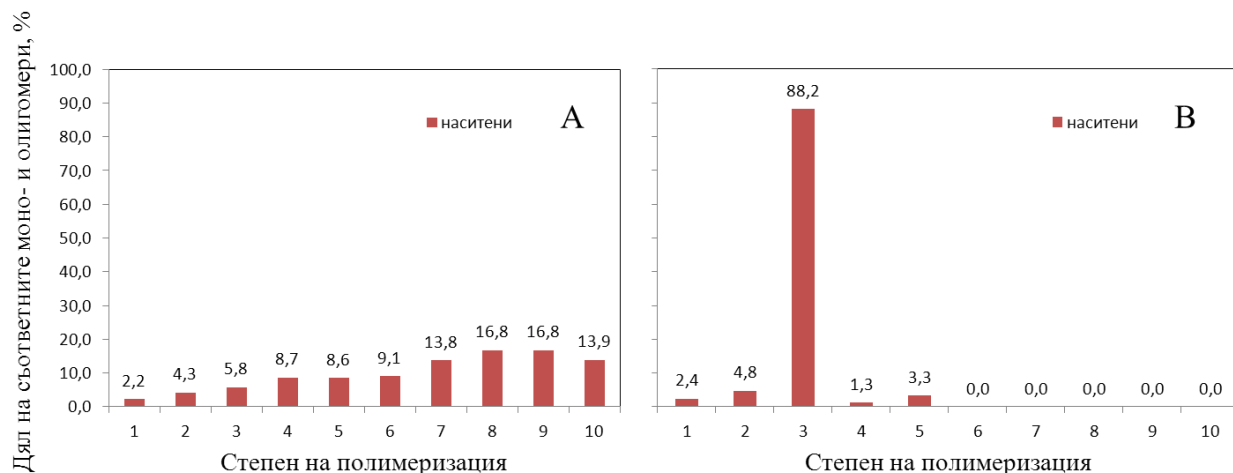
#### 4.4.2.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

Идентифицирането и количественото определяне на наситените и ненаситени олигогалактурониди (вкл. СП), генерирани в резултат на комбинираното ПГ и ПЛ действие, се извършва чрез НРАЕС с РАD детекция (**фиг. 9**). От хроматограмата (**фиг. 9D**) се вижда, че след ензимен хидролиз на изходния (неосапунен) КЕППр АНЧ в средата се натрупват кисели мономери и олигомери с различна СП (2-13). Допълнително на **фиг. 10A** е посочен дялът, който заема всеки от тях спрямо всички освободени олигозахариди. В хидролизната смес на изходния ПЗ най-голям дял заемат наситените окта- (8) и нонамери (9) – общо 33.6%, следвани от хепта- (7) и декамерите (10) – сумарно 27.7%. В хидролизата наситени олигомери с по-голяма СП (> 6), заемат 70%, което е значително повече от това при КЕПП АНЧ (47%). Тези олигомери би следвало да са естерифицирани, като разпределението на Me групи е такова, че не позволява те да бъдат допълнително *endo*-ПГ-разградени. По подобие на КЕПП АНЧ и в хидролизата на КЕППр АНЧ не се детектират ненаситени олигогалактурониди, което е ясен знак, че в КЕППр АНЧ не се съдържат големи блокове от Me-естерифицирани GalA остатъци! Сборът на моно-, ди- и тримерите не надвишава 12.3% (**фиг. 10A**), което е още по-малко от това в хидролизата на КЕПП АНЧ. За разлика от това помежду си те се отнасят както 1.0:2.0:2.6. Малкият дял, който заемат тези олигомери и съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.22$  подсказват, че в ХГ сегменти се съдържат малко блокове от неестерифицирани GalA остатъци, дори по-малко и от тези в КЕПП АНЧ. Всичко това говори за известно сходство в разпределението на Me групи по протежението на ХГ между двете киселинно-екстрахирани фракции от портокал и праз!



**Фигура 9.** НРАЕС-РАD елуционен профил на КЕППр АНЧ (**D**) и алкохолно-утаимата му част (**B**), след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими. Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (**C**); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (**A**); вода (**E**).

Елуционният профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-уаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I може да се види на **фиг. 9B**. В анализирания хидролизат не се откриват олигомери със СП по-голяма от 5 и противно на досега разглеждания най-голям дял сред олигомерите заемат тримерите (88.2%) (**фиг. 10B**).



**Фигура 10.** Степен на полимеризация и дял (%) на съответните моно- и олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащите ензими: изходен КЕППр АНЧ (**A**); алкохолно-уаима част, получена след действието на *endo*-ПГ-I (**B**).

Това показва, че в тази проба присъстват няколко големи неразградени и неестерифицирани GalA сегменти, дори и след като осапуненият субстрат е претърпял първоначална модификация. Наблюдаваното допълнително освобождаване на кисели моно- и олигомери може да свържем със синергичното действие на РГ-I-модифициращите ензими. С отстраняване на част от страничните вериги от НЗ, както и разграждане на РГ основен скелет, допълнително се откриват части от осапунения, но локализиран в непосредствена близост до РГ области и пространствено недостъпен за *endo*-ПГ-I в първата модификация ХГ. Олигомери със СП 1-3 не са напълно отстранени от алкохолно-уаимата част и те присъстват изначално в пробата. Същевременно този опит потвърждава изводите и предположението, че част (10%) от излишното количество GalA, което се съдържа в модифицираните проби, се намира под формата на съугаени олигогалактурониди (СП 1-3). Около 21% от УК би следвало да изграждат нехидролизиран ХГ (30.4 mol%), редуцията на който е 32%.

Разделянето и идентифицирането на частично естерифицирани олигоурониди е извършено чрез НПЛС. В хидролизната смес на изходния неосапунен субстрат (КЕППр АНЧ) се забелязва голямо разнообразие от наситени Me-естерифицирани и неестерифицирани олигомери. Техният произход е свързан с разграждането на ХГ от *endo*-ПГ-II. Единствено ди- и тримерите и част от тетрамерите не са Me-естерифицирани ( $2^{00}$ ,  $3^{00}$ ,  $4^{00}$ ). Сред хидролизните продукти се детектират в малки количества и неестерифицирани тетрамери ( $4^{00}$ ), а пентамерите носят една или две Me групи ( $5^{10}$  и  $5^{20}$ ). Оказва се, че сред продуктите от действието на *endo*-ПГ-II са неацетилирани хекса-, хепта-, окта-, и нонамери, които се елуират с по-голямо RT. Всеки един от тях носи само 2 Me-естерни групи ( $6-9^{20}$ ). Съдържащият се в хидролизата от КЕППр АНЧ ундекамер с 3 Me-естерни групи ( $11^{30}$ ) присъства и в този от КЕППр АНЧ. Въз основа на предложените за

тези олигомери структури може да се допълни, че разпределението на Me групи в тях е случайно.

В хидролизната смес присъстват и разнообразни олигомери, като **(Rha-GalA)<sub>2</sub>**, **(Rha-GalA)<sub>3</sub>** произхождащи от PГ-I сегментите. Наред с тях се натрупват и други заместени рамногалактурониди, като **(Rha-GalA)<sub>3</sub>Ac**, **(Rha-GalA)Gal**, които не се откриват в хидролизата от КЕПП АНЧ. За отбелязване е, че при пектина от праз Ac групи са локализираните преимуществено в PГ-областта, а не в ХГ, т.к. не се откриват ацетилирани олигогалактурониди. За разлика от проба КЕПП АНЧ в резултат от съвместното действие на *endo*- и *exo*-арабиназата и *endo*-галактаназата се натрупват значително повече и качествено разнообразни галактоолигомери – Gal<sub>2</sub>, Gal<sub>3</sub>, Gal<sub>4</sub>, Gal<sub>5</sub>, но не и арабиноолигозахариди! Съдейки по хидролизните продукти в този случай, може да се направи сигурното заключение, че страничните вериги са представени от β-(1→4)-хомогалактан със сравнително голяма дължина.

По отношение на HPLC елуционния профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I заслужава да отбележим доминиращото присъствие на неестерифицираните тримери (3<sup>00</sup>). Произходът им е свързан с хидролиз на недоразграден ХГ. Прави впечатление и наличието на PГ олигомери – **(Rha-GalA)<sub>2</sub>Ac** и **(Rha-GalA)<sub>2</sub>Gal**, по-голямата част от които се различават по качествения си състав от тези получени от изходния неосапунен субстрат. За разлика от хидролизата на КЕПП АНЧ, където са намерени само Gal<sub>2</sub> в много малки количества, тук се откриват както галактодимери, така също и Gal<sub>3</sub>, Gal<sub>4</sub>, но не и Gal<sub>5</sub>. Това дава основание да се приеме, че чрез алкохолно утаяване се изолират основно PГ-I сегменти декорирани със странични вериги от хомогалактан.

Стойностите на параметрите, допълнително характеризиращи естеството на анализираниите проби (КЕППр АНЧ и КЕППр АНЧ *endo*-ПГ-I), са изложени в **табл. 12**. DB<sub>abs</sub> е само 1 mol% от УК на изходния КЕППр АНЧ, което показва, че дялът на освобождаваните под формата на 1<sup>00</sup>, 2<sup>00</sup>, 3<sup>00</sup> е изключително малък и броят на неестерифицираните GalA остатъци присъстващи в блокове в пектина от праз е 6 пъти по-малък от този на портокаловия пектин. Предвид липсата на значителен превес на ди-и/или тримери в хидролизата може да се предположи, че неестерифицираните блокове са и с малка дължина (5-7 остатъка) и се съдържат в малки количества. Ниската стойност показва наличие на силно субституиран ХГ и случайно разпределение на Me-естерните връзки. Индикация за малката дължина на неестерифицираните блокове е и това, че DB<sub>abs</sub> << CX<sub>ПГ</sub>. Освен това преобладаващото съдържание (79%) на детектируеми Me-естерифицирани олигомери (5, 6, ... 11) в ензимния хидролизат показва, че съществуват области от пектиновия ХГ, където тези блокове са разположени (кълъстерно, по групи) много близо едни до други (през ~5-11 GalA звена). От **табл. 12** е видно още, че 12 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПГ-разградими и се възстановяват като наситени олигомери. От високата стойност на показателя CX<sub>ПГMe</sub> е видно, че по-голямата част (11 mol%) от тях са частично Me-естерифицирани, но ензимът *endo*-ПГ все още може да ги хидролизира. Високите стойности означават, че в пробата присъстват големи блокове от естерифицирани GalA остатъци, чиято DB<sub>abs</sub> = 0. Част (30.1%) от УК на пробата, които изграждат ХГ, остават нехидролизирани! Тези области са със специфично Me- и Ac-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими (DB<sub>abs</sub> = CX<sub>ПГ</sub> = CX<sub>ПЛ</sub> = 0). Би следвало тези последователности да са също със случайно разпределение на естерните връзки, т.к. не се детектира излишък на неестерифицирани олигомери. Получената информация позволява да се приеме, че разпределението на Me-

естерните групи по протежението на ХГ в пектиновата макромолекула на изходния КЕППр от АНЧ има доста случаен характер и късите неестерифицирани блокове се прекъсват от сравнително дълги естерифицирани (случайно) GalA остатъци.

Дялът на неестерифицираните „*endo*-ПГ-разградими“ GalA остатъци в алкохолно-утаимата част, получена след предварителна модификация на КЕППр АНЧ, е още по-голям от този на изходния пектин ( $DB_{abs} = 21$ ) (табл. 12). Въпреки че е осапунен след хидролиза се възстановяват още 22 mol% от УК изначално присъстващи в пробата под формата основно на тримери. Поради ниската СЕ (1%) и липсата на олигогалактурониди с по-висока СП би следвало това да са къси (6-7 остатъка) ХГ последователности локализирани в непосредствена близост до РГ-областите. Близките стойности на  $DB_{abs} \approx CX_{ПГ}$  са за очакване, т.к. пробата е осапунена. Логично в хидролизата не се детектират ненаситени олигомери, т.к. пробата е осапунена и липсват дълги последователности от Me-естерифицирани GalA остатъци.

**Таблица 12.** Съдържание ( $\mu\text{g/mL}$ ) на олигогалактурониди в ензимни хидролизати на КЕППр АНЧ и КЕППр АНЧ след *endo*-ПГ-I и стойности на параметрите характеризиращи Me-естерното разпределение, получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

Проба	Наситени олигомери	$DB_{abs}$	СЕ	СА	$CX_{ПГ}$	$CX_{ПЛ}$	$CX_{ПГMe}$	Добив
	$\mu\text{g/mL}$							
КЕППр АНЧ	282.4	1	65	2.5	12	0.0	11	12
КЕППр АНЧ алкохолно-утаима част след <i>endo</i> -ПГ-I	469.6	21	1	0.0	22	0.0	1	22
КЕППр АНЧ алкохолно-утаима част след <i>endo</i> -ПГ-I (контрола)	366.1	n.d.	1	0.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Необходимо е да се отбележи и наблюдаваната липса на ненаситени олигомери отчетена и за двете проби чрез  $CX_{ПЛ} = 0$ .

## 5. Ензимен фингърпринтинг анализ

В тази част са обобщени и представени резултатите, получени за останалите два субстрата – ПЗ шипка (лк) и ПЗ от мурсалски чай. Върху тези проби е действано само с ХГ-разграждащите ензими *endo*-ПГ-II и ПЛ.

### 5.1 Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ шипка (лк)

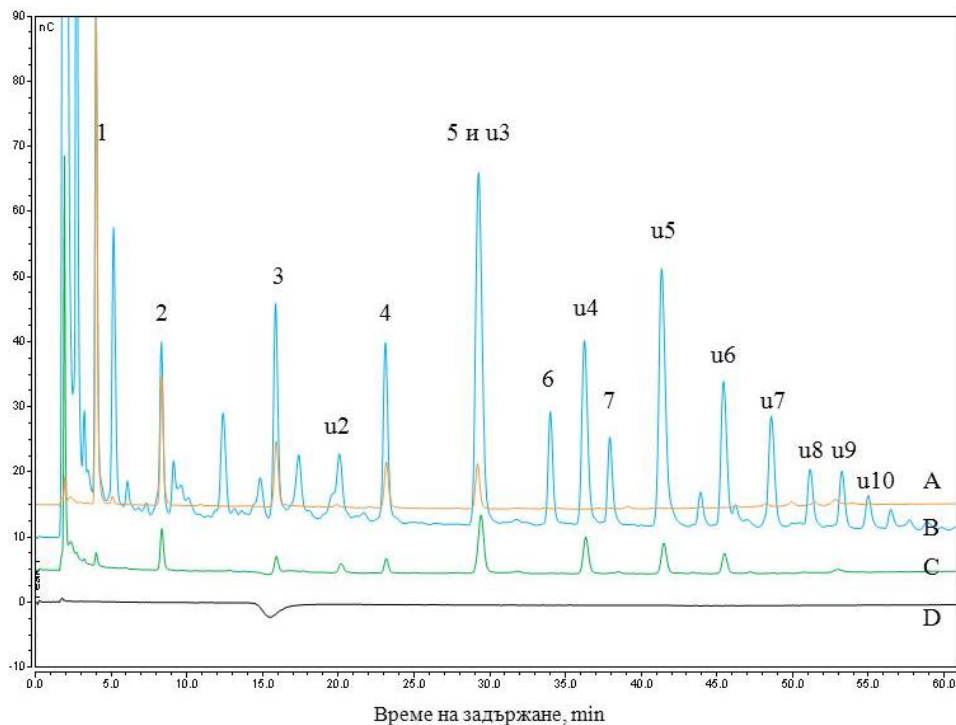
#### 5.1.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

Мол. маса на изходния субстрат вече беше обсъдена и представена на **фиг. 1** към т. 2.2. На същата фигура може да бъде видян и елуционният профил на получения ензимен хидролизат (**В**). След действието на ензимите широкият пик на изходния субстрат се измества към по-нискомолекулните фракции ( $\leq 3$  kDa) и олигомери, които се отмиват  $> 11.0$  min. С това се показва, че високкомолекулният субстрат е претърпял хидролиз в доста

голяма степен, т.к. не се наблюдава запазване на ПЗ популации в областта на високите мол. маси. В по-голямата си част елуционният профил на ПЗ шипка (лк) е сходен с този на КЕПП АНЧ.

### 5.1.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

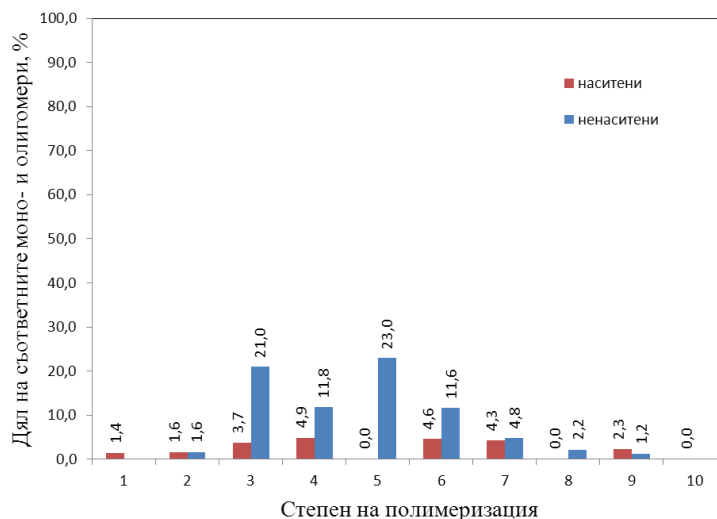
На **фиг. 11** е представен елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените и ненаситените олигомери. За разлика от предходните две проби (КЕПП и КЕППр от АНЧ) в хидролизната среда на ПЗ шипка (лк) се натрупват както наситени, така и ненаситени кисели моно- и олигомери с различна СП (2-12). Дялт, който заема всеки един от тях спрямо всички освободени олигозахариди е посочен на **фиг. 12**.



**Фигура 11.** HPLC-SEC елуционен профил на ПЗ шипка (лк) (B) след действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II. Стандарти наситени олигогалактуроници със СП 1-5 (A); Стандарти ненаситени олигогалактуроници със СП 2-6 (C); вода (D).

Сред наситените олигомери най-голям дял заемат тетра- (4), хекса- (6) и хептамерите (7) – общо 13.8%, следвани от тримерите- (3) и нонамерите (9) – сумарно 6.0%. Не се откриват наситени олигомери с по-голяма от 9 СП. Сборът на моно-, ди- и тримерите е 6.7% (**фиг. 12**), но помежду си те се отнасят както 1.0:1.1:2.6. Малкият дял, който заемат тези олигомери и съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.26$  подсказват, че в ХГ сегменти се съдържат блокове от неестерифицирани GalA остатъци. Трябва да се отбележи и известния превес на тримерите сред останалите моно- и димери, но сумарното им количество е по-малко отколкото в хидролизатите на предходните две проби. Въпреки това, като че ли съществува известно сходство в организацията на неестерифицираната ХГ част между шипковия пектин и фракцията КЕППр от АНЧ, т.к. последния също се характеризира с ниска стойност на съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.22$ . Детектираните ненаситени олигомери

са освободени от ХГ в резултат на ПЛ действие и от **фиг. 11** ясно се вижда, че те доминират в хидролизата – 77.2% спрямо 22.8% наситени олигомери. Сред тях най-голям дял заемат ненаситените пента- (5), три- (3), хексамери (6) – общо 55.6%, следвани от тетра- (4) и хептамерите (7) – 16.6% (**фиг. 12**). Натрупването в големи количества на ненаситени олигогалактурониди е ясна индикация, че в ХГ сегменти на ПЗ шипка (лк) се съдържат големи блокове от Me-естерифицирани GalA остатъци!



**Фигура 12.** Степен на полимеризация и дял (%) на съответните моно- и олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащи ензими върху изходен ПЗ шипка (лк).

Характеристиката на олигоуронидите е извършена чрез HPLC анализ. Единствено ди- и тримерите не са Me-естерифицирани ( $2^{00}$ ,  $3^{00}$ ). Олигомери със СП 3, носещи 1 Me-естерна група също се откриват (**GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA**), но за сметка на това липсват неестерифицирани тетрамери ( $4^{00}$ ). Съотношението между двата вида тримери е 1:1.1 ( $3^{00}:3^{10}$ ). Присъствието на частично естерифицирани съответно с 1, 2 и 3 Me-групи тетра-, пента-, хекса- и хептамери (4, 5, 6 и 7) също е установено. Структурата на  $5^{20}$  (m/z 925.2) може да бъде: **GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA** или **GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA-GalA**. Противно на намерения в КЕПП АНЧ не- Me-естерифициран тример, носещ Ac група ( $3^{01}$ ), в хидролизната смес на ПЗ шипка (лк) се откриват няколко наситени олигомера, които са едновременно O-ацетилirани и Me-естерифицирани ( $6^{21}$ ,  $7^{31}$ ). Пектиновият ХГ от шипков плод съдържа само незаместени области и в него не се срещат само O-ацетилirани GalA последователности. Освобождаването на такъв вид олигомери говори, че ензимът ПЛ проявява по-широка специфичност и като че ли не е така „претенциозен“ към присъствието на Ac-групи в субстрата. Очевидно този пектин е сред редките изключения, в които се срещат едновременно O-ацетилirани и Me-естерифицирани ХГ сегменти. Прецизната анотация на хексамера  $6^{21}$  води до представяне на следната структура за него: **GalA-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Ac</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA** или **GalA-GalA-GalA<sub>Ac</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA**. За отбелязване е, че Ac-група в тези олигомери е винаги позиционирана до Me-GalA звено. По-голямата част от хидролизните продукти на ПЛ са ненаситени 3, 4 и 5, докато GalA олигомери със СП 7, 8 и 9 не се откриват в HPLC елуционния профил. Всеки от олигомерите е естерифициран съответно с по 2, 3 и 4 Me-естера ( $u3^{20}$ ,  $u4^{30}$ ,  $u5^{40}$ ). Сред продуктите с най-голямо структурно разнообразие се



открояват ненаситените пентамери. Изучаване на структурата на  $u5^{32}$  и  $u5^{31}$  показва наличието на рядка и специфична комбинация от субституция, чиято валидност беше установена по-горе и за наситените олигозахариди. В този вид ненаситени олигомери има едно и/или две GalA звена, които са едновременно *O*-ацетилирани и Me-естерифицирани -  $uGalA_{Me}-GalA_{Ac}-GalA_{MeAc}-GalA-GalA_{Me}$  или  $uGalA_{Me}-GalA-GalA_{MeAc}-GalA_{MeAc}-GalA$ !

Стойностите на параметрите, допълнително характеризиращи естеството на анализирания проба, са изложени в **табл. 13**.  $DB_{abs}$  е 9 mol% от УК на изходния ПЗ шипка (лк), което показва, че дялът на освобождаваните под формата на  $1^{00}$ ,  $2^{00}$ ,  $3^{00}$  е малък. Следователно по-голям дял от УК на шипковия пектин са организирани в неестерифицирани GalA блокове. Изглежда техният брой е по-малък, но за сметка на това дължината им е по-голяма (8-10 остатъка) след като ди- и тримерите имат известен превес в хидролизата. От **табл. 13** е видно още, че 15 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПГ-разградими и се откриват като наситени олигомери. За разлика от пробите разгледани до тук  $DB_{abs} > CX_{ПГMe}$ , което показва, че малка част (6 mol%) от наситените олигомери са частично Me-естерифицирани, но ензимът *endo*-ПГ все още може да ги хидролизира. Макар и малко в пектиновия ХГ присъстват и блокове (5-7 остатъка) от случайно естерифицирани GalA остатъци, чиято  $DB_{abs} = 0$ . Тези области са със специфично Me- и Ac-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими. Би следвало тези последователности да са със случайно разпределение на естерните връзки.

**Таблица 13.** Съдържание ( $\mu\text{g/mL}$ ) на олигогалактурониди в ензимен хидролизат на ПЗ шипка (лк) и стойности на параметрите характеризиращи Me-естерното разпределение, получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

Проба	Наситени олигомери	Ненаситени олигомери	$DB_{abs}$	CE	CA	$CX_{ПГ}$	$CX_{ПЛ}$	$CX_{ПГMe}$	Добив
	$\mu\text{g/mL}$								
ПЗ шипка (лк)	362.1	2150.8	9	62	10.0	15	89	6	104

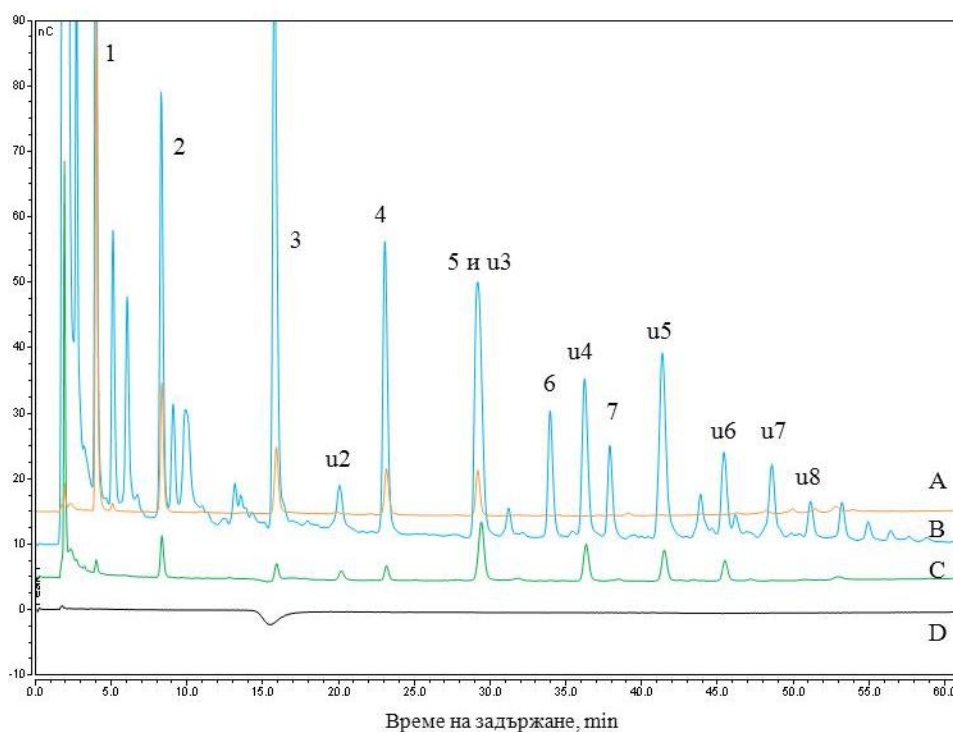
Доминиращото съдържание на ненаситените олигомери се отчита чрез параметъра  $CX_{ПЛ}$ , който за този субстрат има изключително висока стойност (89 mol%) и  $CX_{ПГ} \ll CX_{ПЛ}$ . Като резултат от съвместното действие на ензимите се възстановяват 104% от УК изначално присъстващи в пробата (**табл. 13**). Високите стойности показват изключително голямата степен на разградимост на субстрата и още повече демонстрира, че извлечената с лимонена киселина пектинова фракция е организирана основно като ХГ! Изненадващо липсват недостъпни за *endo*-ПГ и ПЛ области от ХГ регион на ПЗ шипка (лк)! Високата стойност индикира още, че ХГ региони съдържат големи количества от дълги (5-6 остатъка) близкостоящи високоестерифицирани GalA последователности. Получените резултати дават възможност да се разсъждава и върху вида на разпределение на Ac-групи. Тъй като те са локализираните преимуществено в Me-естерифицираните области може да се приеме, че разпределението на Ac-естерните групи по протежението на ХГ в пектиновата макромолекула на ПЗ шипка (лк) няма случаен характер, а по-скоро те са блоково разпределени!

## 5.2 Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ мурсалски чай

### 5.2.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

Мол. маса на изходния субстрат вече беше обсъдена и представена на **фиг. 2** към т. 2.2. На същата фигура може да бъде видян и елуционният профил на получения ензимен хидролизат (**В**). От нея се вижда, че след действието на ензимите първоначално присъстващият пик в областта на високите мол. маси ( $>100$  kDa) на изходния субстрат не се запазва, а вместо това се забелязва изместване към по-нискомолекулните фракции ( $\leq 3$  kDa) и олигомери, които се отмиват  $> 11.5$  min. С това се демонстрира, че високомолекулният субстрат е претърпял хидролиз в голяма степен, но за разлика от ПЗ шипка (лк) тук се наблюдава запазване на части от ПЗ популации в областта на високите мол. маси ( $\sim 55-7$  kDa) под формата на широк пик (9.3-11.3 min). Предвид това, че в хидролизния процес участват само ХГ-разграждащи ензими може да се предположи, че този остатък представлява омержени РГ-региони на ПЗ. В областта на олигомерите ( $>11.5$  min) елуционният профил на ПЗ мурсалски чай е сходен с този на ПЗ шипка (лк) (**фиг. 9В**).

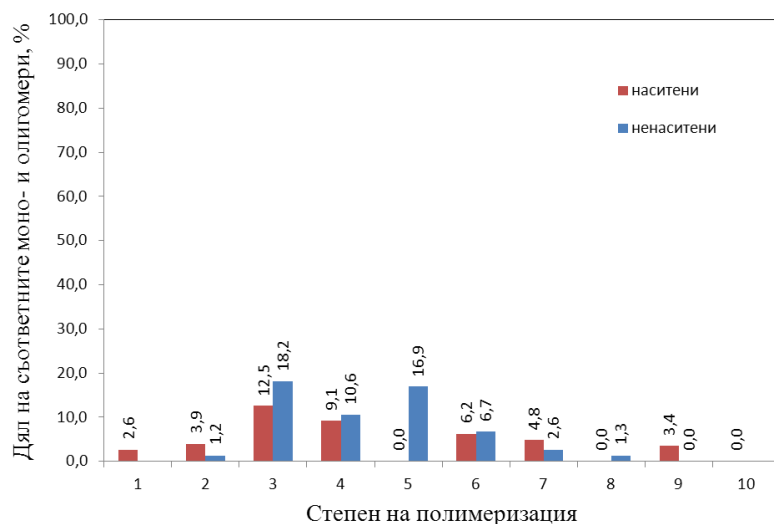
### 5.2.2 Сепариране и идентификация на олигомерите



**Фигура 13.** HPLC-PAD елуционен профил на ПЗ от мурсалски чай (**В**) след действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II. Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (**А**); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (**С**); вода (**Д**).

На **фиг. 13** е представен HPLC-PAD елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените (**А**) и ненаситените (**С**) олигомери. В хидролизната среда на ПЗ мурсалски чай се натрупват както наситени, така и ненаситени кисели моно- и олигомери с различна СП (2-10). По отношение на присъствието на ненаситени олигомери се забелязва известна прилика с този на ПЗ шипка (лк). Сред наситените олигомери най-голям дял (**фиг. 14**) заемат три- (3), тетра- (4) и хексамерите (6) – общо 27.8%, следвани от хекса- (6), хепта- (7) и

димерите – сумарно 14.9%. По подобие с шипковия пектин не се откриват наситени олигомери с по-голяма от 9 СП. Сборът на моно-, ди- и тримерите е 19.0% (**фиг. 14**). Помежду си те се отнасят както 1.0:1.5:4.8. Относително малкият дял, който заемат тези олигомери и едновременно с това ниската стойност на съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.16$  подсказват, че в ХГ сегменти се съдържат значително повече блокове от неестерифицирани GalA остатъци спрямо всички останали проби, които са анализирани. Трябва да се отбележи същественият превес на тримерите (3) сред останалите моно- и димери.



**Фигура 14.** Степен на полимеризация и дял (%) на съответните (моно)олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащи ензими върху изходен ПЗ от мурсалски чай.

Сумарното им количество е единствено съпоставимо с това при КЕПП АНЧ (20.2%), но въпреки това, като че ли не съществува сходство в организацията на неестерифицираната ХГ част между ПЗ от мурсалски чай и фракцията КЕПП от АНЧ, т.к. последният се характеризира с по-висока стойност на съотношението  $1^0/(2^0+3^0) = 0.48$ . Детектираните ненаситени олигомери са освободени от ХГ в резултат на ПЛ-I действие и от **фиг. 14** ясно се вижда, че те доминират, макар и в не голяма степен, в хидролизната смес – 57.5% спрямо 42.5% наситени олигомери. Сред тях най-голям дял заемат ненаситените три- (3), пента- (5), тетрамери (4) – общо 45.7%, следвани от хекса- (6) и хептамерите (7) – 9.3% (**фиг. 14**). Натрупването в големи количества на ненаситени олигогалактурониди е ясна индикация, че в ХГ сегменти на ПЗ мурсалски чай се съдържат големи блокове от Местерифицирани GalA остатъци!

По-нататъшната характеристика на олигоуронидите е извършена чрез HPLC анализ, от където се забелязва голямото разнообразие от наситени и ненаситени Местерифицирани и неестерифицирани олигомери. Ди- и тримерите са единствените не-Местерифицирани олигомери ( $2^{00}$ ,  $3^{00}$ ) присъстващи в хидролизната смес. Прави впечатление и липсата на неестерифицирани тетрамери ( $4^{00}$ ), за разлика от първите две проби (КЕПП и КЕППр АНЧ). За сметка на това пък присъстват такива декорирани с една и две Me групи ( $4^{10}$  и  $4^{20}$ ). Олигомери със СП 3 носещи 1 Me-естерна група също се откриват (**GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA**). Присъствието на частично естерифицирани съответно с 1, 2 и 3 Me-групи тетра-, пента-, хекса- и хептамери (5, 6 и 7) също е установено.

Структурата на  $7^{31}$  ( $m/z$  1333.3) е: **GalA-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Ac</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA**. Противно на намерения в КЕПП АНЧ не- Me-естерифициран тример, носещ Ac група ( $3^{01}$ ), в хидролизната смес на ПЗ мурсалски чай се откриват няколко наситени олигомера, които са едновременно O-ацетилirани и Me-естерифицирани ( $5^{11}$ ,  $6^{21}$ ,  $7^{31}$ ). Последните два бяха открити и в ПЗ шипка (лк). Това показва, че пектиновият ХГ от мурсалски чай съдържа само незаместени области и в него не се срещат само O-ацетилirани GalA последователности. Освобождаването на такъв вид олигомери говори, че ензимът ПЛ проявява по-широка специфичност и не е така „претенциозен“ към присъствието на Ac-групи в субстрата. Пектинът е сред редките изключения, в които се срещат едновременно O-ацетилirани и Me-естерифицирани ХГ сегменти. Прецизната анотация на хексамера  $6^{21}$  води до представяне на следната структура за него: **GalA-GalA-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Ac</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA** или **GalA-GalA-GalA<sub>Ac</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA<sub>Me</sub>-GalA**. За отбелязване е, че Ac-група в тези олигомери е винаги позиционирана до Me-GalA звено.

Основна част от хидролизните продукти на ПЛ са ненаситени 3, 4 и 5, докато GalA олигомери със СП 7, 8 и 9 не се откриват в HILIC елуционния профил. Всеки от олигомерите е естерифициран съответно с по 2, 3 и 4 Me-естера ( $u3^{20}$ ,  $u4^{30}$ ,  $u5^{40}$ ,  $u4^{10}$ ,  $u4^{20}$  и т.н.), но липсват Ac-групи. Сред продуктите с най-голямо структурно разнообразие се открояват ненаситените тетрамери за разлика от ПЗ шипка (лк), където пентамерите са най-застъпени.

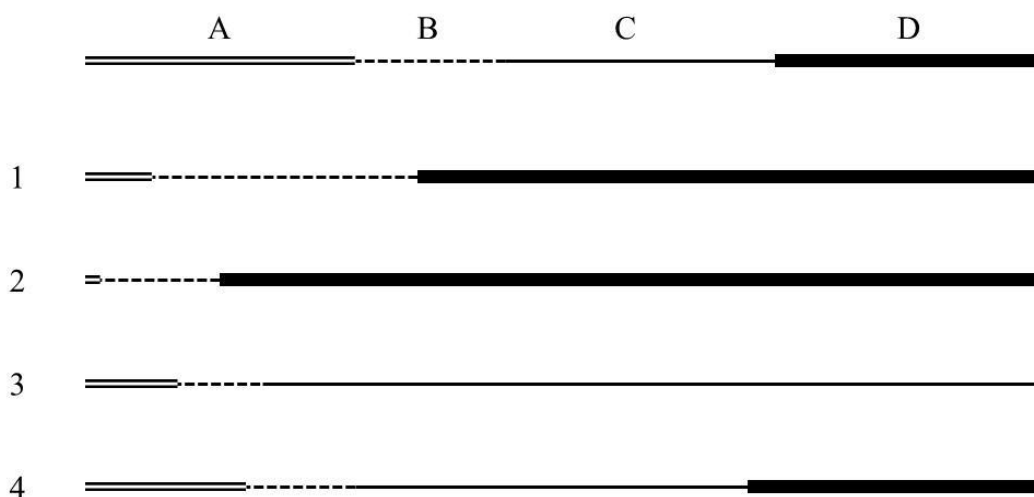
За разлика от ПЗ шипка (лк) при този субстрат не се среща случая, при който едно и/или две GalA звена са едновременно O-ацетилirани и Me-естерифицирани. Още по-интересен е фактът, че Ac-групи се съдържат само в области от ХГ, които се атакуват от *endo*-ПГ, но не и от ПЛ, т.е. такива с ниска СЕ.

Стойностите на параметрите, допълнително характеризиращи естеството на анализираната проба, са изложени в **табл. 14**.  $DB_{abs}$  е 16 mol% от УК на изходния ПЗ мурсалски чай, което е най-високата стойност на този показател от всички изследвани проби. Това показва, че дялът на освобождаваните под формата на  $1^{00}$ ,  $2^{00}$ ,  $3^{00}$  е голям. Следователно по-голям дял от УК на ПЗ от мурсалски чай са организирани в неестерифицирани GalA блокове. Изглежда техният брой е по-малък, но за сметка на това дължината им е по-голяма (>10 остатъка) след като тримерите имат основен превес в хидролизата. Това не бива да е изненада след като е намерено по-преди, че пектинът е нискоестерифициран (38%). Нещо повече тези блокове са разположени по-скоро случайно, т.к. детектируемите Me-естерифицирани олигомери не преобладават в ензимния хидролизат. От **табл. 35** е видно още, че 24 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПГ-разградими ( $SX_{ПГ}$ ) и се възстановяват като наситени олигомери. В противовес на останалите проби стойността на показателя  $SX_{ПГMe}$  е много ниска (8 mol%) ( $DB_{abs} > SX_{ПГMe}$ ), с което се отчита, че много малка част от УК са частично Me-естерифицирани. Въпреки това ензимът *endo*-ПГ все още може да ги хидролизира под формата на наситени естерифицирани олигогалактурониди. Същевременно ниските стойности на показателя означават още, че в пробата присъстват малки блокове (5-7 остатъка) от естерифицирани GalA остатъци притежаващи специфично (случайно) Me- и Ac-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими. Заслужава да се отбележи още и това, че част (29 mol%) от УК на пробата остават нехидролизирани!

**Таблица 14.** Съдържание ( $\mu\text{g/mL}$ ) на олигогалактурониди в ензимен хидролизат на ПЗ мурсалски чай и стойности на параметрите, характеризиращи Ме-естерното разпределение, получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

Проба	Наситени олигомери	Ненаситени олигомери	$DB_{abs}$	СЕ	СА	$CX_{ПГ}$	$CX_{ПЛ}$	$CX_{ПГMe}$	Добив
	$\mu\text{g/mL}$								
ПЗ мурсалски чай	778.6	1484.4	16	38	9.0	24	46	8	71

Доминиращото съдържание на ненаситените олигомери се отчита чрез параметъра  $CX_{ПЛ}$ , който за този субстрат има висока стойност (46 mol%) и  $CX_{ПГ} < CX_{ПЛ}$ . Като резултат от съвместното действие на ензимите се възстановяват 71% от УК изначално присъстващи в пробата (табл. 14). При тази проба е постигнат по-пълнен хидролиз на ХГ региони, отколкото при КЕПП и КЕППр от АНЧ. Високите стойности показват голяма степен на разградимост на субстрата и още повече демонстрира, че извлечената от мурсалски чай пектинова фракция съдържа основно ХГ! Високата стойност индикира още, че ХГ региони съдържат големи количества от дълги (5-6 остатъка) високоестерифицирани GalA последователности. Те са по-малко отколкото тези при ПЗ шипка (лк), но много повече отколкото при останалите две проби. Получените резултати дават възможност да се разсъждава и върху вида на разпределение на Ас-групи. Тъй като те са локализирани преимуществено в Ме-естерифицираните области може да се приеме, че разпределението на Ас-естерните групи по протежението на ХГ в пектиновата макромолекула на ПЗ мурсалски чай има по-скоро блоково разпределение!



**Фигура 15.** Илюстрация на пропорциите на различните блокове, присъстващи в изследваните изходни (немодифицирани) пектини. **A** – блокове от неестерифицирани GalA остатъци ( $DB_{abs}$ ), **B** – област със случайно разпределение на Ме-естерните групи ( $CX_{ПГMe}$ ), **C** – блокове от Ме-естерифицирани GalA остатъци ( $CX_{ПЛ}$ ), **D** – области недостъпни за ПГ и ПЛ действие; **1** – КЕПП АНЧ, **2** – КЕППр АНЧ, **3** – ПЗ шипка (лк), **4** – ПЗ мурсалски чай.

Една подходяща илюстрация, с която се обобщава нагледно получените резултати по ензимния фингърпринтинг анализ на отделните изходни ПЗ, е представена на **фиг. 15**. От нея се вижда присъствието на различни блокове, както и това, че те са в различни

пропорции помежду си. Във всички ПЗ присъстват най-малко по три вида блокове, а при ПЗ от мурсалски чай се откроява наличието и на още един регион.

## 6. Биологична активност на изходни и модифицирани полизахариди

### 6.1. Антиоксидантна активност

Резултатите от анализа са представени в **табл. 15**. С най-голяма ORAC АО активност се откроява ПЗ шипка (лк) – 2022.4  $\mu\text{mol TE/g}$ , който е и с най-голямо ОПФ съдържание, следван от водно-екстрахираните ПЗ от АНЧ на шипкова люспа (543.8  $\mu\text{mol TE/g}$ ) и портокалови кори (458.5  $\mu\text{mol TE/g}$ ). Не всички проби проявиха АО активност чрез HORAC метода. Сравнително високи стойности показаха отново ПЗ шипка (лк) – 164.3  $\mu\text{mol GAE/g}$  и ВЕПП АНЧ – 172.6  $\mu\text{mol GAE/g}$ . Ниските HORAC стойности или липсата на такива би следвало да се тълкуват, като слаба комплексообразуваща способност, дължаща се на високата СЕ на пробата или на това, че самите полифеноли в ПЗ имат ниска способност да комплексообразуват.

Твърдението, че ХГ също участва в процесите на радикалово прихващане не намира потвърждение в нашите опити, тъй като проби с голямо (ХПЦП – 60 mol%, ВЕППр АНЧ – 81 mol%) или малко (КЕППр АНЧ – 39.8 mol%) ХГ съдържание не проявяват активност и по двата метода.

**Таблица 15.** Антиоксидантна активност (Mean  $\pm$  SD) на избрани полизахаридни проби.

Проба	Съдържание на УК	100-СЕ	ОПФ	ORAC, $\mu\text{mol TE/g}$	HORAC, $\mu\text{mol GAE/g}$
ХПЦП	70.0	41	0.7	18.8 $\pm$ 1.0	n.d.
ВЕПП АНЧ	64.0	19	1.6	458.5 $\pm$ 31.4	172.6 $\pm$ 14.2
КЕПП АНЧ	74.8	29	1.5	52.6 $\pm$ 2.7	-
ВЕППр АНЧ	62.3	21	0.3	-	-
КЕППр АНЧ	44.4	35	0.2	2.9 $\pm$ 0.1	-
ВЕППШ АНЧ	61.1	15	2.4	543.8 $\pm$ 25.8	51.8 $\pm$ 4.0
КЕППШ АНЧ	53.0	27	1.6	254 $\pm$ 14.2	44.6 $\pm$ 8.1
ВЕППШ	46.1	36	3.2	265.7 $\pm$ 15.5	-
ПЗ шипка (лк)	47.8	38	9.6	2022.4 $\pm$ 80.0	164.3 $\pm$ 5.9
ПЗ мурсалски чай	59.0	62	0.5	38.0 $\pm$ 2.6	-

### 6.2. Антикомплементарна активност

#### 6.2.1. Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани цитрусови пектини

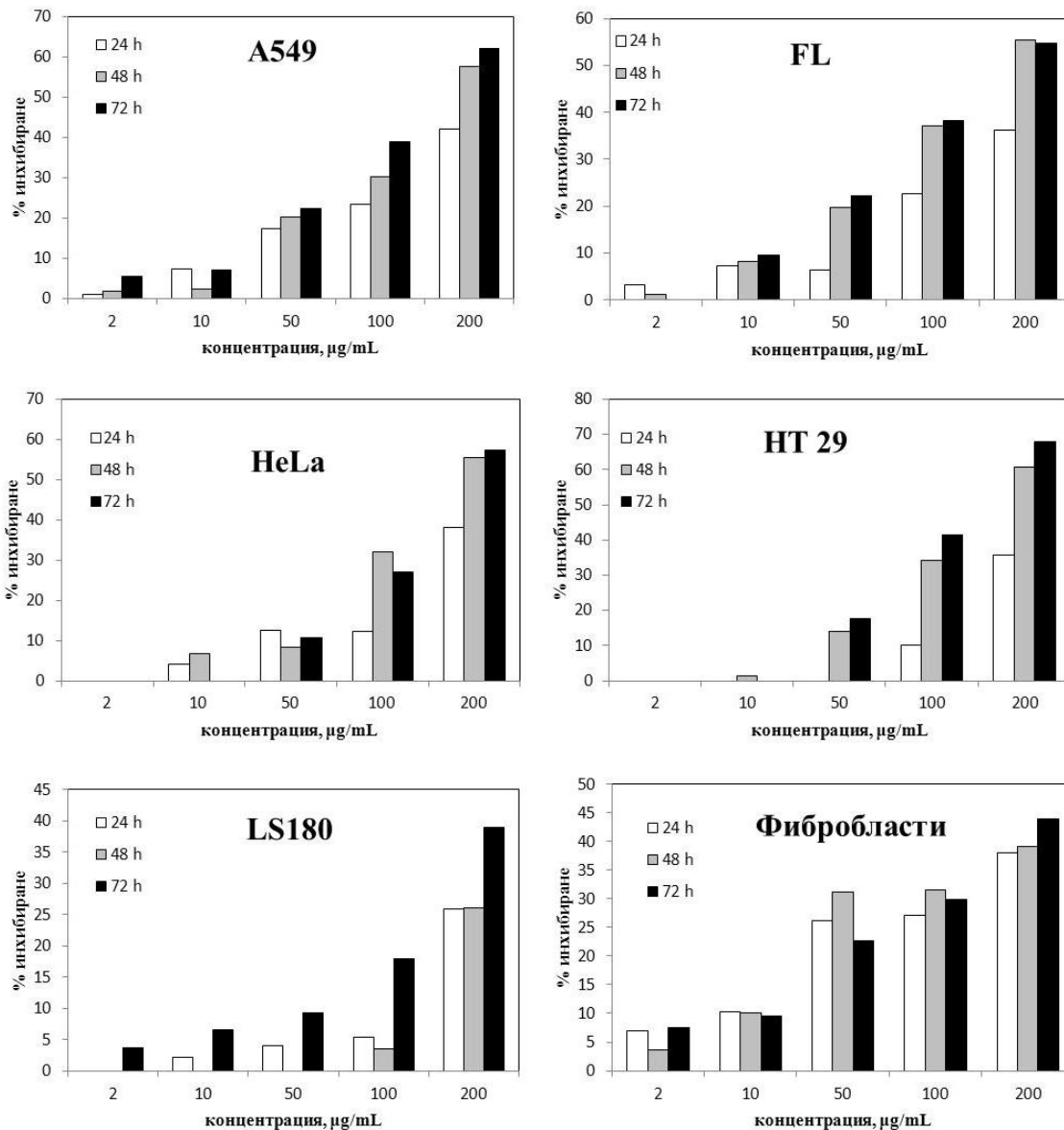
Изходните и модифицираните пектини са значително по-активни по класическия път. Очевидно проявлението на активността е концентрационно-зависимо, но не и пропорционално, т.к. при една и съща концентрация (2.5 mg/mL) по-голяма част от изходните пектини инхибират по-силно хемолизата (40-90%). Сред най-активните проби са и алкохолно-утаимите продукти на ХПЦП и ВЕПП АНЧ, които при 2.5 mg/mL инхибират > 50% хемолизата. Предварителната микровълнова обработка не повлиява

негативно върху проявлението на активността. По алтернативния път пробите проявяват задоволителна активност само при значително по-високи концентрации (5 mg/mL), което показва, че ПЗ са по-добри активатори на класическия път! При всички останали субстрати ензимната модификация с *endo*-ПГ-I е повлияла положително върху активността, макар и в слаба степен. При сравняване на получените резултати може да се направи заключението, че независимо от пътя на активиране на комплемента по-високо инхибиране на хемолизата се наблюдава при по-високи концентрации. Модификацията с  $\beta$ -(1→4)-галактанази като че ли не повлиява негативно върху активността на ХПЦП и ВЕПЛ АНЧ. При всички останали проби наблюдаваната активност се повишава. Навярно това е свързано с хидролизата на  $\beta$ -(1→4)-гликозидни връзки и „отстраняването“ на така свързаните Gal единици. По този начин се повишава дяла на останалите нехидролизирани, но отговорни за активността структури съдържащи  $\beta$ -(1→3,6) връзки.

По отношение на алтернативния път активност не се забелязва при ниските концентрации (2.5 mg/mL). Ензимната модификация се отразява негативно върху комплементарната активност, т.к. и при по-високите дози (5.0 mg/mL) не се забелязва активиране. Единствено при ХПЦП и ВЕПЛ АНЧ се забелязва дозозависима активност. Явно  $\beta$ -(1→4)-гликозидните връзки не са есенциални за проявлението на антикомлементарната активност при така подготвените проби.

### 6.3. Антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност

За по-пълната оценка на биологичния потенциал на ВЕПШ и ВЕППр АНЧ беше проведено и *in vitro* цитотоксично изследване срещу 5 бр. туморни клетъчни линии посредством МТТ анализа. От **фиг. 16**, се вижда, че ВЕПШ АНЧ проявява ясно изразена антитуморна активност и ПЗ е способен да задържа растежа на определени клетъчни линии. Степента на инхибиране на съответните линии и анти-пролиферативният ефект са не само концентрационно зависими, но зависят също така и от продължителността на инкубиране. От особено значение са резултатите за инхибирането на клетъчни линии LS180 и HT29, които са изолирани от човешки колоректален аденокарцином, поради факта, че ПЗ имат непосредствен контакт с епитела на стомашно-чревния тракт.



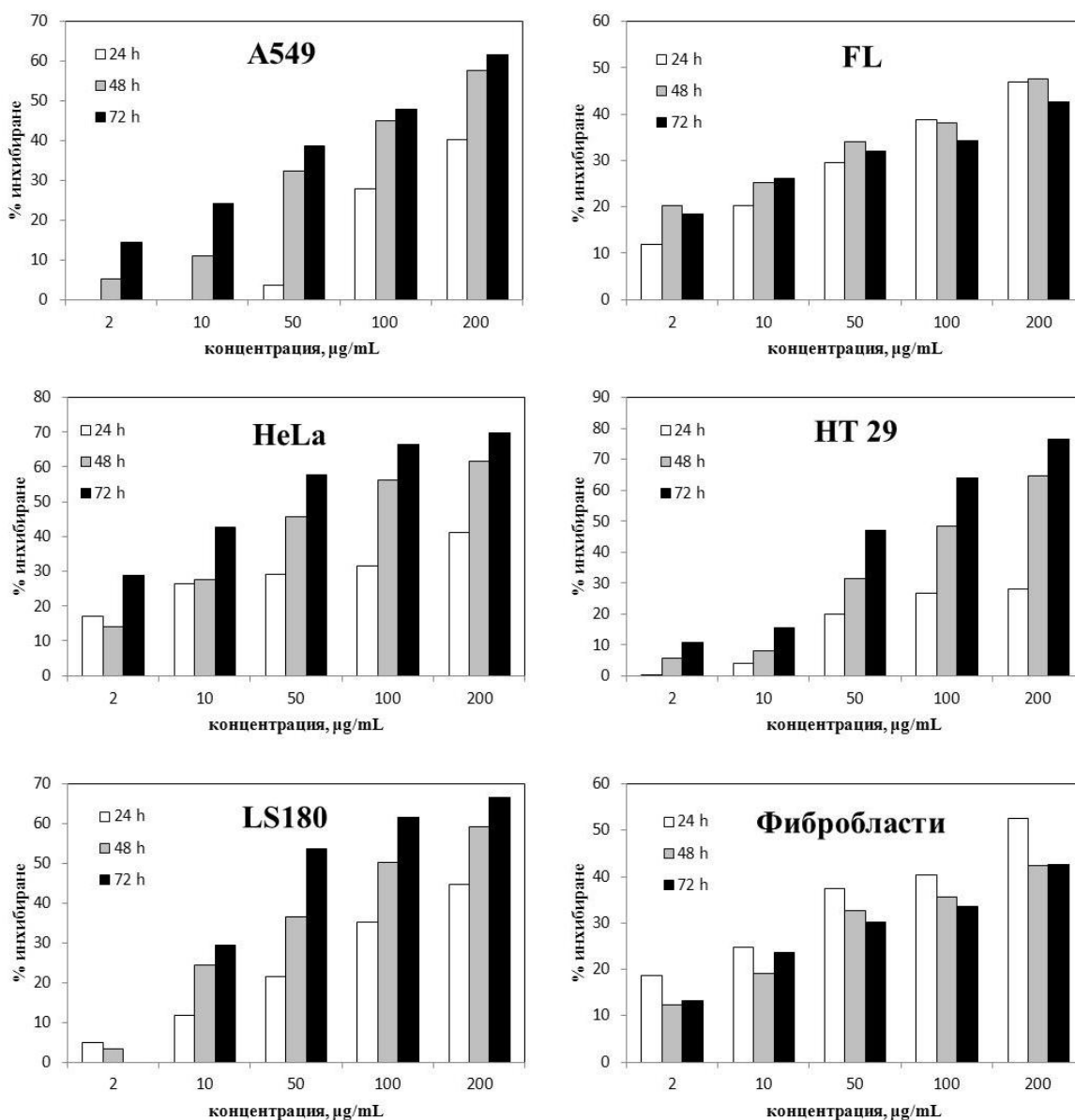
**Фигура 16.** Антитуморна активност (*in vitro* цитотоксичност) на водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на шипкова люспа (ВЕПШ АНЧ) срещу 6 бр. човешки клетъчни туморни линии.

От резултатите се вижда, че при ниските концентрации (2-10 µg/mL) жизнеспособността на клетките HT29 и HeLa се запазва и едва при дози, надхвърлящи 50 µg/mL, се появява определен цитотоксичен ефект. При LS180 по-значим ефект се забелязва едва при > 100 µg/mL. ПЗ от шипков АНЧ демонстрира известен цитотоксичен ефект и срещу нормалната (контролна) фибробластна линия, но при по-ниските концентрации жизнеспособността на тази клетъчна линия е минимално засегната.

При ВЕППр АНЧ се наблюдават сходни ефекти на инхибиране на туморните клетъчни линии, като ефектът е по-силно изразен при по-голяма концентрация на тествания ПЗ и при по-продължително действие (фиг. 17). При клетъчни линии A549, HeLa и HT29 по-сериозен ефект се забелязва едва след 48 и 72 часово култивиране, докато при FL този ефект е наблюдаван и преди това. Може да се отбележи, че ВЕППр АНЧ е по-



активната от двете тествани проби, т.к. инхибиращ ефект оказват и по-малки дози от ПЗ (2-10  $\mu\text{g/mL}$ ). В най-голяма степен това е валидно за линии HeLa и FL.

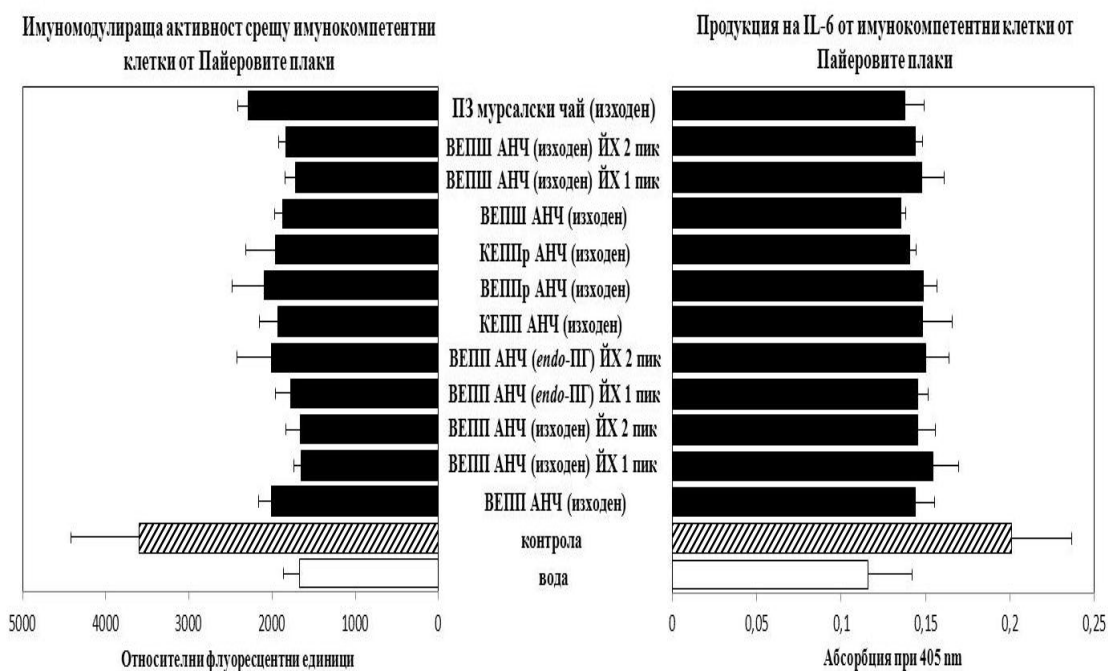


**Фигура 17.** Антитуморна активност (*in vitro* цитотоксичност) на водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на праз (ВЕППр АНЧ) срещу 6 бр. човешки клетъчни туморни линии.

За отбелязване е, че цитотоксичният ефект (20-30%) на ПЗ при фибробластната линия се наблюдава доста бързо (~24 h) и то при ниска концентрация (2-10  $\mu\text{g/mL}$ ). При ВЕПШ АНЧ по-голям % инхибиране се забелязва при > 50  $\mu\text{g/mL}$ , а при концентрация < 10  $\mu\text{g/mL}$  потискането е < 10%. От тези данни може да се направи заключението, че ВЕПШ АНЧ е по-малко токсичен за нормалните клетки, но същевременно притежава и по-слабо изразена активност срещу останалите туморни клетки.

6.4. Измерване на *in vitro* имуномодулираща активност срещу имунокомпетентни клетки от чревни Пайерови плаки

Резултатите от проследяването на *in vitro* имуномодулиращия ефект на серия от изходни, ензимно модифицирани ПЗ, както и хроматографски получени фракции върху имунокомпетентните клетки на чревните Пайерови плаки, са посочени на **фиг. 18**. Ефектът на ПЗ се изразява чрез медирания от Пайеровите плаки хематопоетичен отговор на костно-мозъчните клетки. Когато културалната течност, в която са инкубирани клетките от Пайеровите плаки заедно с изследваните ПЗ, се постави към културалната среда на костно-мозъчните клетки и ако съответните проби са активни, то би следвало, спрямо контролата, да се забележи значително засилване в пролиферацията (намножаването) на тези клетки. Провеждането на такъв анализ е от особено значение и има смисъл, т.к. Пайеровите плаки са важен лимфоиден орган в червата на човек, а като съставна част на храната ПЗ имат пряк контакт с тях.

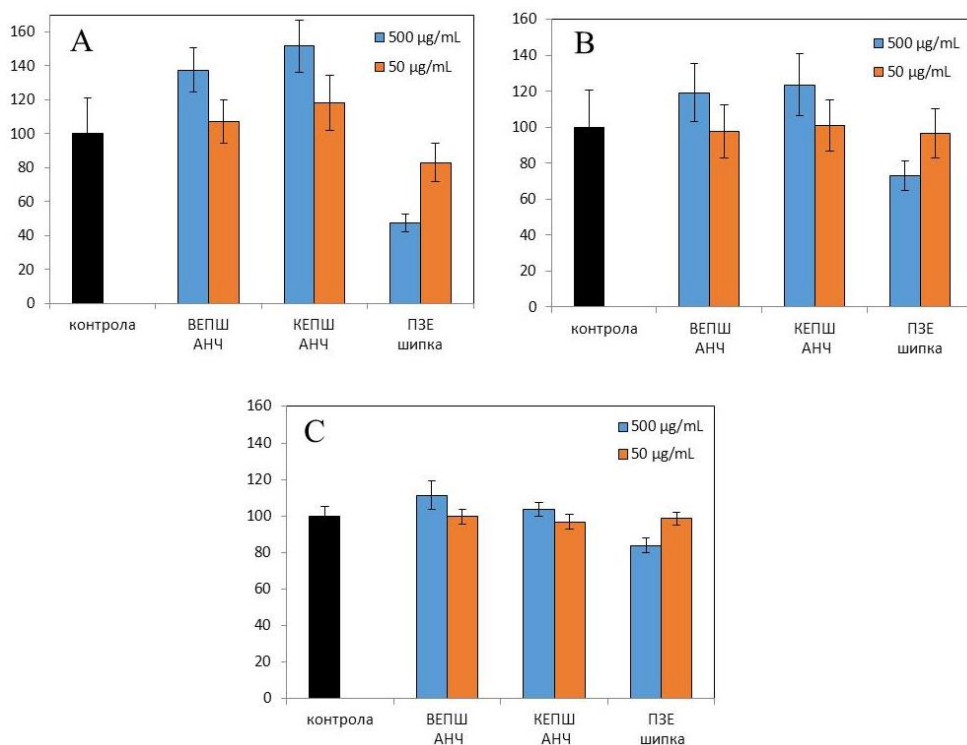


**Фигура 18.** Интестинална имуномодулираща активност на избрани ПЗ и ефект на хроматографското им пречистване върху активността. Положителната контрола представлява ПЗ изолиран от *Astragalus mongholicus* (AMOL-1).

От **фиг. 18** се вижда, че изследваните ПЗ демонстрират известна активност и участват в модуляцията на функциите на чревната имунна система. Всички проби показват активност при избраната тестова концентрация (100  $\mu\text{g/mL}$ ) и засилват продукцията на IL-6 чрез директна стимулация на имунокомпетентните клетки от Пайеровите плаки. Тази активност обаче е по-ниска от активността, която демонстрира положителната контрола (AMOL-1). Въпреки че всички проби показват сходни резултати и разграничението между тях е трудно, би могло да се отбележи, че изходните, и извлечените с вода ПЗ, са по-добри стимулатори, отколкото отделните техни алкохолно-утаими части и фракции. От изходните ПЗ може да открием ПЗ от мурсалски чай (> 2000 единици), следван от ВЕПП, ВЕППр и ВЕПШ от АНЧ – всички ~2000 единици. За отбелязване е, че модифицираните фракции също стимулират продукцията на IL-6, но техните супернатанти оказват пролиферативно действие сравнимо с това на контролната проба с вода (<< 2000 единици).

## 6.5. Измерване продукцията на РФК от фагоцити

Проведено е проучване върху ефекта на ВЕПШ и КЕПШ от АНЧ върху продукцията на РФК от фагоцити. Резултатите от този анализ са показани на фиг. 19. Фагоцитите играят ключова роля в защитата на организма от нахлуващите патогени, а също така и при възпалителните процеси. Те могат да осъществяват транс-епителна миграция и по този начин да взаимодействат с пектина. Ето защо е от особено значение да се познава ефектът на ПЗ върху тях. Чрез спонтанната хемилуминесценция (фиг. 19С) се отчита основната продукция на РФК в неактивирани неутрофили в присъствието на ПЗ. Двата шипкови ПЗ слабо активират продукцията на РФК по дозозависим начин (фиг. 19С). При по-ниските концентрации (50 µg/mL) ефектът е сравним с този на контролата, но при по-високите концентрации той се засилва. Въпреки че изследваните проби демонстрират (макар и слаба) АО активност, се наблюдава активиращ ефект. От друга страна активирането им както с OZP-, така и с PMA индуцира значително нарастване на продукцията на РФК (фиг. 50А и В).



**Фигура 19.** Ефект на шипкови ПЗ върху продукцията на РФК от нестимулирани (С) и стимулирани (OZP- (А) и PMA- (В)) човешки неутрофили. ПЗЕ – полизахариден екстракт.

## 6.6. Получаване на функционална напитка

Разработен е състав и технология за получаване на функционална напитка предвид лечебните свойства на различните плодови суровини, както и възможностите за повишаване на техните биологично-активни свойства чрез подходяща комбинация на съответните компоненти. Добивът на концентрирания екстракт (с.в. 14%) от шипка е 250 L. Добивът на сок от арония (с.в. 17%) е 2 t. Добивът на напитката, подготвена по съответната технология е 150 L. Получената напитка е охарактеризирана по съдържание

на ОПФ (6990.7 mg/L), антоциани (след стерилизация) – 146.9 mg/L и ORAC АО активност – 72456  $\mu\text{mol TE/L}$ . Тя се характеризира с висока АО активност и добра дегустационна оценка.

С получения сок са били проведени биологични и медицински изследвания в Медицински университет – Пловдив, Катедрите по анатомия и по кардиология и в МБАЛ „Медлайн Клиник“ АД – Пловдив, отделение по гастроентерология. Резултатите от биологичните изследвания със стари плъхове са показали, че тази плодова напитка има добре изразен кардиопротективен ефект и антиейджинг ефект, а консумацията и от пациенти, болни от диабет тип II, е довела до подобряване качеството им на живот (кръвната захар се понижала с 8 до 12%).

## ИЗВОДИ (CONCLUSION)

1. Получени и охарактеризирани са по сумарен добив на пектин алкохолно-неразтворими части от портокалови, лимониви кори, праз и шипкова люспа. Установено е, че с най-голям добив на АНЧ се откроява шипковата люспа. С най-голям сумарен добив на пектин се характеризират портокаловите и лимоновите АНЧ. С най-нисък добив на АНЧ и пектин от него се откроява празът. Намерено е, че основни захари в АНЧ от портокалови кори и шипкова люспа са уроновите киселини и Glc, противно на преимущественото съдържание на Glc в този от праз.

2. Получени и охарактеризирани по основни показатели са водно- и киселинно-разтворими пектинови фракции от АНЧ на портокалови и лимониви кори, праз и шипкова люспа. Върху добива повлияват както различните екстракционни условия, така и вида на/и предварителната обработка на суровината. С изключение на ВЕПШ АНЧ всички други водно-екстрахираните фракции са с по-нисък добив спрямо тези извлечени с разредена киселина. Добивът на полизахарид от мурсалски чай е най-нисък спрямо всички останали суровини.

3. Основен монозахариден компонент във всички изходни фракции е GalA. Съдържанието на уронови киселини във водно-екстрахираните фракции е по-ниско, отколкото това в киселинно-екстрахираните, като изключение прави само КЕППр АНЧ. Всички пектини са високоестерифицирани, с изключение на полизахарида от мурсалски чай, който е нискоестерифициран. Полизахаридите от шипка (от АНЧ и цял плод) се характеризират с най-висока СА и ОПФ съдържание за разлика от цитрусовите пектини. Водноекстрахираните пектини се отличават с висока мол. маса и хомогенност, за разлика от тези екстрахираните с разредена солна киселина.

4. Полизахаридните фракции, изолирани от цитрусови кори, заедно с ВЕПШ и ВЕППр от АНЧ, съдържат по-дълги и линейни ХГ фрагменти, за сметка на по-малките количества на РГ-I сегментите. По отношение на този показател фракцията КЕППр АНЧ е с най-голям дял на РГ-I (58.3 mol%). Установено е, че основни неутрални захари в изследваните фракции са Ara, Gal и Rha, но количествените различия са значителни. Единствено при КЕППр АНЧ те заемат по-голям дял отколкото уронидната част.

5. Проведена е ензимна модификация с *endo*-ПГ-I на част от осапунените изходни пектини от цитруси, праз и шипка. Получените алкохолно-утаими части са охарактеризирани по различни показатели. Резултат от модификацията е редуцията на мол. маса и ХГ съдържание, водещи до увеличаване на мол. хетерогенност и съдържание на РГ-I блокове. Намерено е, че Ara съдържание е редуцирано във всички субстрати, но това на Gal се увеличава за повечето от тях. В резултат на ензимното действие върху КЕППр АНЧ се натрупват алкохолно-утаими Rha-съдържащи високомолекулни продукти. Субстратът е „устойчив“ на ПГ действие и притежава структура близка до нативната.

5.1. В резултат на действието с ХГ- и галактан-разграждащите ензими е потвърдено наличието на арабино-4-галактан, а също така и присъствието на АГ-II в цитрусовите и шипкови пектини.

5.2. Установено е чрез гел- и йонообменна хроматография, че изследваните водно-екстрахираните полизахариди от цитрусови кори и шипкова люспа съдържат различни

пектинови популации, различаващи се по СЕ и разпределение на Ме-естерните групи в тях. Осапунването е необходимо, но не и достатъчно условие за пълния хидролиз на ПП от тези суровини.

6. Чрез мулти-ензимен фингърпринтинг и последващ анализ на генерираните олигомери със съвременни аналитични методи е получена ценна структурна информация относно ХГ-фрагменти и редица особености в РГ-I областта. Показано е сходно Ме-естерно разпределение в КЕПП АНЧ и КЕППр АНЧ, но отделните блокове са застъпени в различни количества. И двете проби съдържат големи области от пектинлиазо-неразградими Ме-естерифицирани GalA остатъци, както и малки количества от клъстерно разположени неестерифицирани блокове с малка дължина. Наред с това е установено наличието на големи блокове от частично Ме-естерифицирани GalA последователности и области със специфично Ме- и Ас-естерно разпределение, осигуряващи резистентност към използваните ензими. ХГ на киселинно-екстрахираните пектини съдържа не само незаместени, но и къси области от самостоятелно О-ацетилвани GalA звена, които при КЕППр АНЧ са локализирани преимуществено в РГ-областите.

6.1. Установено е присъствието в алкохолно-утаимите части след *endo*-ПП-I на локализирани в непосредствена близост до РГ-областите на къси неестерифицирани ХГ-последователности.

7. В резултат на ензимния фингърпринтинг анализ на ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай е установено сходство в организацията на неестерифицираната ХГ част между шипковия пектин и КЕППр АНЧ, както и липсата на такова между ПЗ мурсалски чай и фракцията КЕПП АНЧ. ХГ сегменти на ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай са изградени от неестерифицирани и големи близкостоящи пектинлиазо-разградими Ме-естерифицирани GalA блокове, както и от области, които са едновременно блоково О-ацетилвани и случайно Ме-естерифицирани. Установено е, че при ПЗ мурсалски чай Ас-групи са локализирани само в области, които се атакуват само от *endo*-ПП-II и не се срещат едно и/или две GalA звена, които да са едновременно О-Ас- и Ме-естерифицирани.

8. Оценена е ORAC и HORAC АО активност на избрани полизахариди. За проявяваното АО действие има значение не само количеството на ОПФ компоненти, но и индивидуалният им състав. Количеството на ХГ сегменти и СЕ нямат пряка връзка (отношение) към проявяваната активност.

9. Изследвана е биологичната активност на пектин от шипка, праз, портокалови кори и лимонни кори, както и на някои от получените от тях алкохолно-утаими ензимно модифицирани продукти.

10. Изходните полизахариди от цитрусови кори, праз и шипкова люспа, както и техните модифицирани с *endo*-ПП-I алкохолно-утаими продукти, повлияват системата на комплемента по концентрационно-зависим начин, основно по класическия път. Модификацията с галактанази повлиява по-скоро положително върху проявлението на активността, което показва, че при ЦП  $\beta$ -(1→4)-връзките не са есенциални за проявлението ѝ.

11. Водно-екстрахираните полизахаридни фракции от праз и шипкова люспа оказват концентрационно и времево-зависима антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност

срещу 5 бр. туморни клетъчни линии. ВЕППр АНЧ е по-активна, т.к. инхибиращият ефект се наблюдава при по-малки дози, но същевременно ВЕПШ АНЧ е по-малко токсичен за нормалните клетки. И двата полизахарида участват в регулацията на клетъчните субпопулации имащи значение при имунния отговор – В- и Т-клетки, както и повлияват върху функциите на неутрофилите, макрофагите и моноцитите.

12. Изходните, модифицираните и хроматографски получените фракции от шипка, праз, мурсалски чай и портокалови кори демонстрират способност да модулират функциите на чревната имунна система, повлиявайки върху имунокомпетентните клетки на чревните Пайерови плаки. Всички те засилват продукцията, но в по-малка степен отколкото положителната контрола, на оказващия пролиферативен ефект върху костно-мозъчните клетки П-6.

13. Двата изходни шипкови полизахарида, изолирани от АНЧ, слабо активират продукцията на РФК по дозозависим начин.

14. Проведени са производствени опити за получаване на функционална напитка съставена от студено пресован сок от арония, шипков екстракт и 0.4% добавен ябълков пектин, която е показала кардиопротективен и антиейджинг ефект.

## **ПРИНОСИ (SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS)**

Получени са данни за добив на АНЧ от шипкова люспа и за неговия въглехидратен състав, които не се откриват в литературата.

За първи път е екстрахиран с лимонена киселина шипков пектин от цели свежи плодове.

За първи път цитрусовите пектини и тези извлечени от шипка, праз и мурсалски чай са охарактеризирани чрез показателя СФ. За ПЗ от праз, шипкови плодове и мурсалски чай данните за СА са получени също за първи път.

За първи път са получени и охарактеризирани чрез основни химични показатели (съдържание на УК, монозахариден състав, белтък, ОПФ, мол. маса и др.) ПЗ от шипкови плодове (ВЕПШ, ПЗ шипка (лк)) и мурсалски чай.

Приложен е подход за изчисляване на моларни съотношения между отделните захари чрез който е получена информация за относителното РГ (с НЗ) и ХГ съдържание в изходни и модифицирани пектини.

Получени са данни за индивидуалния монозахариден състав и дял на ХГ и РГ фрагменти на ПЗ от шипкови плодове и мурсалски чай (ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай).

За първи път е предоставена информация, която не се открива в литературата за HPSEC мол. маса на шипков пектин изолиран с лимонена киселина от цели плодове, както и за мурсалски чай.

За първи път е демонстрирана възможността за изолиране чрез алкохолна преципитация на модифицирани Rha-съдържащи пектинови фрагменти.

Получени са данни за основни химични характеристики (монозахариден състав, мол. маса и др.) на алкохолно-утаимите продукти за ЦП, както и е потвърдена природата на връзките между отделните НЗ в страничните вериги (арабино-4-галактан и АГ-II).

Потвърдена е възможността за разделяне и изолиране на *endo*-ПГ-I-разградими и устойчиви продукти на ЦП чрез гел- и йонообменна хроматография, както и на възможността за получаване на допълнителна информация относно присъствието на различни ПЗ популации, различаващи се по Ме-естерно разпределение.

Потвърдено е съществуващо в литературата предположение за връзка между белтъка и ХГ, както и това за ковалентна връзка между белтъка и пектиновия РГ-I при ЦП.

За първи път е извършена ензимна модификация с *endo*-ПГ-I на изходни (осапунени и неосапунени) шипкови пектини, като с последваща ЙХ е показано наличието на различаващи се по СЕ и разпределение на Ме-групи ПЗ популации.

За първи път е приложен подходът на мулти-ензимния фингърпринтинг анализ с последващ анализ на генерираните олигозахариди чрез HPSEC, HPAEC, HILIC/ELSD-MSn върху субстрати КЕПП, КЕППр АНЧ и техните алкохолно-утаими продукти след модификация с *endo*-ПГ-I, като е получена информация относно вида на разпределението на Ме-естерните групи и структурата на ХГ и РГ-I.

За първи път е приложен подходът на ензимния фингърпринтинг анализ за ПЗ изолирани от лечебни растения, като шипка (ПЗ шипка (лк)) и мурсалски чай (ПЗ мурсалски чай).

За първи път са приложени и използвани спектрални методи (MALDI-TOF) за изучаване структурата и характеристиката на изходни и модифицирани алкохолно-утаими продукти от шипка, праз и портокали. Демонстрирана е полезността им при получаване на структурна информация.

За първи път е направен опит за изясняване на ролята на ПЗ, изолирани от различни суровини чрез различни екстракционни методи върху проявлението на антиоксидантна активност от тях. Хвърлена е светлина върху ролята на ПЗ в наблюдавания с тяхно участие АО ефект.

Проследено е влиянието на ензимната модификация върху проявлението на *in vitro* антикомплементарната активност. За първи път е получена информация за антикомплементарната активност на шипкови пектини, изолирани от цели свежи плодове, както и за получени чрез ЙХ фракции от изходни и модифицирани продукти на шипков пектин, изолиран от АНЧ.

За първи път е проучена антитуморната активност на шипков пектин и на пектин, екстрахиран от праз, както и влиянието им върху клетъчните субпопулации имащи значение при имунния отговор.

За първи път е измерена *in vitro* имуномодулиращата активност срещу имунокомпетентни клетки от чревни Пайерови плаки и е оценен потенциалът на серия от изходни, модифицирани и хроматографски пречистени пектини от шипка, праз, портокали и мурсалски чай.



За първи път е проведено проучване върху ефекта на ВЕПШ и КЕПШ от АНЧ върху продукцията на РФК от фагоцити.

Разработен е състав и технология за получаване на функционална напитка с висока биологична активност.

## ПУБЛИКУВАНИ МАТЕРИАЛИ И УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ (LIST OF PUBLICATIONS, CONFERENCE TALKS & POSTERS)

### 1. Публикации

Georgiev, Y., **M. Ognyanov**, I. Yanakieva, V. Kussovski, M. Kratchanova (2012). Isolation, characterization and modification of citrus pectins. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 1(3): 223-233. (**JIF 1.1601**)

**Ognyanov M.**, M. Nikolova, I. Yanakieva, V. Kussovski, M. Kratchanova (2013). Influence of composition on the biological activity of pectic polysacchrides from leek. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2(1): 13-20. (**JIF 1.1601**)

**Ognyanov, M. H.**, Y. N. Georgiev, I. Z. Yanakieva, V. K. Kussovski, M. G. Kratchanova (2014). Chemical composition and anti-complementary activity of enzyme-modified citrus pectins. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(A): 79-87. (**IF 0.349**)

**ОГНЯНОВ, М.**, Й. Георгиев, П. Н. Денев, И. Янакиева, М. Крачанова (2014). Биологично активни вещества и здравословни ефекти на шипковите плодове. *Наука Диететика*, 3-4: 14-27.

**Ognyanov, M.**, C. Remoroza, H. A. Schols, Y. Georgiev, M. Kratchanova, Chr. Kratchanov. Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rose hip fruits (*Rosa canina* L.). *Carbohydrate Polymers*, 2016 (подадена за печат и текуща втора корекция) (**IF 4.074**)

### 2. Участия в конференции и симпозиуми

Участие с постер на тема: Immunologically active polysaccharide-containing complexes from traditional and perspective european medicinal plants. Y. Georgiev, **M. Ognyanov**, I. Yanakieva, V. Kussovski, H. Kiyohara, P. Denev, D. Antonova, M. Číž, A. Lojek, H. Yamada, M. Kratchanova. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU-2015). 14-17 October 2015 Plovdiv, Bulgaria.

Участие с доклад-презентация на тема: Spectroscopic characterization of pectic polysaccharides from leek. **M. Ognyanov**, N. Petkova, Y. Georgiev, S. Simova, M. Kratchanova, Chr. Kratchanov. XIII-та Национална конференция с международно участие „Природни науки 2015“ на ШУ „Епископ Константин Преславски“, ДИКПО – Варна, 25-27 септ. 2015.

Участие с доклад-презентация на тема „Биологично-активни вещества и здравословни ефекти на шипковите плодове“. X-та Национална научно-техническа конференция с международно участие „Екология и Здраве 2014“, Дом на науката и техниката – Пловдив, 05 юни 2014.

Участие с доклад-презентация на тема „Шипковите плодове – източник на биологично-активни вещества и техните ефекти - обзор“. VII - ма Национална конференция по хранене в Международен дом на учените „Фредерик Жолио-Кюри“, к.к. „Св. Константин и Елена“, гр. Варна, 16-18 май 2014 г.

Участие с доклад-презентация на тема „Получаване и характеристика на пектинови проби използвайки ензимна и химическа модификация“ в тематична научна школа и научна борса на тема „Зелена Химия“, организирана от Министерството на образованието и науката в изпълнение на проект BG051PO001/3.3-05-001 „Наука и бизнес“ по Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“, 06-09 април 2014 г., гр. Бургас.

**Ognyanov, M.**, Remoroza, C., Schols, H., Georgiev, Y., Kratchanova, M., Gruppen, H., Kratchanov, Chr. Isolation and revealing structure of pectic polysaccharide from rose hip fruit (*Rosa canina* L.). Scientific Works vol. LX „FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY 2013“18-19 October 2013, Plovdiv, pp. 739. 60<sup>th</sup> ANNIVERSARY INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE „FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY 2013“,18-19 October 2013, Plovdiv, University of Food Technologies-Plovdiv.

Georgiev, N. Y., **Ognyanov, H. M.**, Kussovski, K. V., Kratchanova, G. M. Pectinolytic enzymes – application for studying and preparation of immunomodulating pectic polysaccharides from fruits, vegetables and medicinal plants. Scientific Works vol. LX „FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND TECHNOLOGY 2013“18-19 October 2013, Plovdiv, pp. 740-755.

**Manol H. Ognyanov**, Yordan N. Georgiev, Mariana M. Nikolova, Irina Z. Yanakieva, Veselin K. Kussovski, Maria G. Kratchanova. Immunologically Active Plant Pectic Polysaccharides. SEE PhytoChemNet Workshop Medicinal and Aromatic Plants in South East Europe: Environmental and Socio-Economic challenges. The role of MAB reserves. Plovdiv, Bulgaria. 29 May – 1 June 2013.

**Ognyanov, M.**, Y. Georgiev, M. Kratchanova, S. Simova. NMR studies on immunologically active polysaccharides. From Chemical to Systems Biology. 2<sup>nd</sup> SEE-DRUG Workshop - NMR Basics & Applications in Life Sciences 13-15 May 2013.

## ЗАБЕЛЯЗАНИ ЦИТАТИ (CITATION)

**Цитирана статия:** Georgiev, Y., M. Ognyanov, I. Yanakieva, V. Kussovski, M. Kratchanova (2012). Isolation, characterization and modification of citrus pectins. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 1(3): 223-233.

- 1) Logan, K. (2013). Correlating the structure and viscosities of different pectin fibers to *in vivo* human satiety and *in vitro* gastric digestion viscosities using a novel *in vitro* gastric digestion method. MSc Thesis, the University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada, pp. 143.
- 2) Azad, A. K. M., M. A. Ali, Mst. Sorifa Akter, Md. Jiaur Rahman, M. Ahmed (2014). Isolation and characterization of pectin extracted from lemon pomace during ripening. *Journal of Food & Nutrition Sciences*, 2(2): 30-35.
- 3) Amitabha, S. & B. Samhita (2014). Metachromatic interactions of orange (*Citrus sinensis*) peel polysaccharide with cationic dyes. *Research Journal of Chemistry & Environment*, 18(4): 72-77.
- 4) Elizabeth Devi, W., R. N. Shukla, A. Abraham, S. Jarpula & U. Kaushik (2014). Optimized extraction condition and characterization of pectin from orange peel. *International Journal of Research in Engineering & Advanced Technology*, 2(2): 1-9.
- 5) Zhu, Xiaolan, B. Liu, S. Zheng & Y. Gao (2014). Quantitative and structure analysis of pectin in tobacco by  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy. *Analytical Methods*, 6: 6407-6413.
- 6) Mounir, B., Z. Abdeljalil & A. Abdellah (2014). Comparison of the efficacy of two bioflocculants in water treatment. *International Journal of Scientific Engineering & Technology*, 3: 734-737.
- 7) Mounir, B., Z. Abdeljalil & A. Abdellah (2014). Evaluation of the effect of age of cladode and solvent on yield of mucilage and pectin from cactus pads. *International Journal of Scientific & Engineering Research*, 5: 1446-1450.
- 8) Zanella, K. (2013). Extração da pectina da casca da laranja-pera (*Citrus sinensis* L. Osbeck) com solução diluída de ácido cítrico. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, pp. 86.
- 9) Pfaltzgraff, L. A. (2014). The study & development of an integrated & additive-free waste orange peel biorefinery. Doctor of Philosophy Thesis, University of York, pp. 266.
- 10) Zhang, W., P. Xu & H. Zhang (2015). Pectin in cancer therapy: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 44: 258-271.
- 11) Liu B., S. Zheng, Y. Gao, X. Zhu (2015). Quantitative and structure analysis of pectin in tobacco by  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectroscopy. *Acta Tabacaria Sinica*, 21(2): 1-9. doi:10.16472/j.chinatobacco.2014.121
- 12) Zanella, K. & O. P. Taranto (2015). Influence of the drying operating conditions on the chemical characteristics of the citric acid extracted pectins from 'pera' sweet orange

(*Citrus sinensis* L. Osbeck) albedo and flavedo. *Journal of Food Engineering*, 166: 111-118.

- 13) Ogutu, Fr. O., T.-H. Mu, R. Elahi, M. Zhang & H.-N. Sun (2015). Ultrasonic modification of selected polysaccharides-review. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(5): doi: 10.4172/2157-7110.1000446.
- 14) Mohamed, H. A. & B. E. W. Mohamed (2015). Fractionation and physicochemical properties of pectic substances extracted from grapefruit peels. *Journal of Food Processing & Technology*, 6: 473. doi:10.4172/2157-7110.1000473.
- 15) Степанова, Т. М. Инновационные идеи в технологии сладких желированных блюд на основе плодово-ягодного сырья. УДК 664-404.8:664.292: 637.447.

**Цитирана статия: Огнянов, М., М. Nikolova, I. Yanakieva, V. Kussovski, M. Kratchanova (2013). Influence of composition on the biological activity of pectic polysaccharides from leek. *Journal of BioScience & Biotechnology*, 2(1): 13-20.**

- 16) Hong, J., T.-T. Chen, P. Hu, J. Yang, S.-Y. Wang (2014). Purification and characterization of an antioxidant peptide (GSQ) from Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler) seeds. *Journal of Functional Foods*, 10: 1-10.

**Цитирана статия: Огнянов, М. Н., Y. N. Georgiev, I. Z. Yanakieva, V. K. Kussovski, M. G. Kratchanova (2014). Chemical composition and anti-complementary activity of enzyme-modified citrus pectins. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(A): 79-87.**

- 17) Petrova, I., N. Petkova, K. Kyobashieva, P. Denev, A. Simitchiev, M. Todorova, N. Dencheva (2014). Isolation of pectic polysaccharides from celery (*Apium graveolens* var. *rapaceum* D. C.) and their application in food emulsions. *Turkish Journal of Agricultural & Natural Sciences*, 2: 1818-1824.

**Цитирана статия: Огнянов, М., Й. Георгиев, П. Денев, И. Янакиева, М. Крачанова (2014). Биологично активни вещества и здравословни ефекти на шипковите плодове. *Наука Диететика*, 3-4: 14-27.**

- 18) Taneva, I., N. Petkova, I. Dimov, I. Ivanov, P. Denev (2016). Characterization of rose hip (*Rosa canina* L.) fruits extracts and evaluation of their *in vitro* antioxidant activity. *Journal of Pharmacognosy & Phytochemistry*, 5(2): 35-38.