

Получаване и ензимна модификация на биологично
активни пектинови полизахариди

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ИНСТИТУТ ПО ОРГАНИЧНА ХИМИЯ С ЦЕНТЪР ПО ФИТОХИМИЯ – СОФИЯ
ЛАБОРАТОРИЯ ПО БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА – ПЛОВДИВ

ДИСЕРТАЦИЯ

за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

по професионално направление шифър – 4.2 „Химически науки“;

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

Получаване и ензимна модификация на биологично
активни пектинови полизахариди

ас. инж. Манол Христов Огнянов

Научни ръководители:

Доц. д-р Мария Георгиева Крачанова

Проф. д.х.н. Светлана Димитрова Симова

София, 2016

BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES

INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY WITH CENTRE OF PHYTOCHEMISTRY–SOFIA
LABORATORY OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES – PLOVDIV

Ph.D. Dissertation

In partial fulfillment of the requirements for the degree of “Doctor” in Chemical Sciences (4.2)
Doctoral program "Bioorganic chemistry, chemistry of natural and physiologically active substances"

Preparation and enzyme modification of biologically
active pectic polysaccharides

Manol Hristov Ognyanov

Thesis supervisors:

Assoc. Prof. Maria Georgieva Kratchanova, Ph.D.

Prof. Svetlana Dimitrova Simova, D.Sc.

Sofia, 2016

*„Никой от нас не притежава цялата истина,
но всеки от нас се приближава до нея, внасяйки
своя принос в сбора на общите знания“*

Галилео Галилей

(1564 - 1642)

Предварителната обработка и характеристика на използваните суровини, както и екстракцията и характеристиката на получените полизахариди от цитрусови кори, праз и шипкова люспа са осъществени от докторанта, съвместно с докт. Й. Георгиев (ЛБАВ) и И. Янакиева (ЛБАВ). Екстракцията на полизахаридите от свежи шипкови плодове и мурсалски чай са извършени от инж. Ал. Ричнев и инж. В. Андонов (Витанеа ООД и ИТЦ ООД) под ръководството на проф. д.х.н. Хр. Крачанов и предоставени на докторанта за последваща работа и анализ.

Ензимната модификация с *endo*-ПГ-I на полизахариди от цитрусови кори е извършена от докторанта съвместно с докт. Й. Георгиев (ЛБАВ). Молекулната маса на изходните полизахариди и модифицираните алкохолно-утаими продукти от химик И. Янакиева (ЛБАВ).

Гелхроматография и анионообменна хроматография на изходни и ензимно модифицирани продукти са извършени от докторанта.

Ензимната модификация на полизахариди от алкохолно-неразтворима част на праз и шипкова люспа са извършени от докторанта.

Ензимният и мулти-ензимният фингърпринтинг анализ, метанолизата, както и последващите анализи на получените олигомери и монозахариден състав на изходните проби са извършени от докторанта, съвместно с С. Remorosa в Lab. of Food Chemistry, Wageningen University (Wageningen, The Netherlands) под ръководството на prof. dr. H. A. Schols.

Инфрачервените спектрални изследвания са извършени от докторанта и гл. ас. д-р инж. Н. Петкова (УХТ-Пловдив) в кат. „Биохимия“ при Медицински колеж – Пловдив.

Подготовката на пробите за ЯМР спектроскопия е извършена от докторанта, а заснемането им от проф. д.х.н. Св. Симова (Лаборатория Център по ЯМР спектроскопия при ИОХ с ЦФ - БАН).

Антиоксидантната активност на подготвени от докторанта проби е определена от доц. д-р П. Денев (ЛБАВ).

Антикомплементарната активност на изходни и модифицирани проби е определена от доц. д-р В. Късовски (Департамент по инфекциозна микробиология към ИМ – БАН).

Определянето на антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност и флоуцитометричното имунофенотипизиране са извършени от гл. ас. д-р Цв. Бацалова, под ръководството на проф. д.б.н. Б. Джамбазов (кат. „Биология на развитието“ към БФ на ПУ „П. Хилендарски“, Пловдив).

Измерване на *in vitro* имуномодулираща активност срещу имунокомпетентни клетки от чревни Пайерови плаки е извършено от докт. Й. Георгиев (ЛБАВ) в Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Japan под ръководството на prof. H. Yamada и prof. H. Kiyohara.

Измерване продукцията на РФК от фагоцити е извършено от сътрудници в Лабораторията по патофизиология на свободните радикали към Института по биофизика при ЧАН (Бърно) със съдействието на доц. д-р П. Денев (ЛБАВ) под ръководството на М. Šiž и А. Lojcek.

Опитите по получаването на сок от арония и шипка с добавен пектин са извършени от колектива на фирма „Витанеа“ ООД на производствената площадка (КК „Йока“) в с. К. Конаре (общ. Стамболийски, обл. Пловдив) под ръководството на инж. Ал. Ричнев и проф. д.х.н. Хр. Крачанов.

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

СЪДЪРЖАНИЕ (TABLE OF CONTENT)

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ (LIST OF ABBREVIATIONS)	1
ИЗПОЛЗВАНИ СИМВОЛИ (LIST OF SYMBOLS)	4
1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР (LITERATURE REVIEW)	5
1.1 Исторически преглед на развитието на химията на пектиновите вещества	5
1.2 Преглед на развитието на химията на пектиновите вещества в България	7
1.3 Номенклатура и класификация на пектиновите вещества	10
1.4 Химичен състав и структура на пектиновите вещества	11
1.4.1 Хомогалактуронан	13
1.4.1.1 Ксилогалактуронан	15
1.4.1.2 Апиогалактуронан	16
1.4.1.3 Рамногалактуронан II	17
1.4.1.4 Други заместени галактуронани	19
1.4.2 Рамногалактуронан I	19
1.4.2.1 Странични вериги влизащи в състава на рамногалактуронан I	22
1.4.2.1.1 Арабинани	22
1.4.2.1.2 Хомогалактани	23
1.4.2.1.3 Арабиногалактани тип I и II	23
1.5 Модели описващи молекулния строеж на пектиновите вещества	27
1.6 Омрежване и взаимодействие на пектиновите полизахариди с други компоненти на растителната клетъчна стена	30
1.7 Биологична активност и фармакологични ефекти на пектиновите полизахариди	33
1.7.1 Имунологична активност на пектиновите полизахариди. Връзка между структура и активност	39
1.7.1.1 Имуномодулация в стомашно-чревния тракт	39
1.7.1.2 Антикомплементарна активност	41
1.7.1.3 Митогенна активност	42
1.7.1.4 Антитуморна активност	43
1.7.1.5 Премахване на имунни комплекси	47
1.8 Растителна клетъчна стена	47
1.9 Ензимна модификация и пектолитични ензими	49
1.9.1 Хомогалактуронан-разграждащи ензими	51

1.9.1.1 Пектин метилестерази (пектинпектилхидролази) и пектин ацетилестерази	51
1.9.1.2 Полигалактуронази.	51
1.9.1.3 Пектат лиази (полигалактуронатлиази).	53
1.9.1.4 Пектин лиаза (полиметилгалактуронатлиаза)	53
1.9.1.5 Пектинази (полиметилгалактуроназа)	53
1.9.2 Рамногалактуронан-модифициращи ензими	54
1.9.2.1 Рамногалактуронан-разграждащи ензими с ендогенно действие	54
1.9.2.2 Рамногалактуронан рамнохидролаза	57
1.9.2.3 Рамногалактуронан галактуронохидролаза	57
1.9.2.4 Синергизъм при разграждане на рамногалактуронана	57
1.9.3 Ксилогалактуронан-разграждащи ензими.	58
1.9.3.1 <i>Exo</i> - и <i>endo</i> -полигалактуроназа.	58
1.9.3.2 <i>Endo</i> -ксилогалактуронанхидролаза и β -ксилозидаза	58
1.9.4 Арабинан- и арабиногалактан-разграждащи ензими	59
1.9.5 Други	61
1.10 Основни изводи от направения литературен обзор	62
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ (AIM & TASKS)	65
3. МЕТЕРИАЛИ И МЕТОДИ (MATERIALS & METHODS)	66
3.1 Материали	66
3.1.1 Реактиви и разтворители	66
3.1.2 Ензими	66
3.1.3 Суровини	67
3.2 Методи	67
3.2.1 Препаративни методи	67
3.2.1.1 Предварителна обработка на суровините	67
3.2.1.1.1 Директно сушене	68
3.2.1.1.2 Микровълново облъчване	68
3.2.1.1.3 Получаване на АНЧ	68
3.2.1.2 Последователна фракционна екстракция на пектинови полизахариди	68
3.2.1.2.1 Водна екстракция	69
3.2.1.2.2 Киселинна екстракция	69
3.2.1.3 Екстракция на полизахарид от свежи шипкови плодове	70

3.2.1.4	Екстракция на полизахарид от пресовки на мурсалски чай	70
3.2.1.5	Пречистване на търговски цитрусов пектин	71
3.2.1.6	Лиофилизация	71
3.2.2	Аналитични методи	73
3.2.2.1	Спектрофотометрични методи	73
3.2.2.1.1	Определяне на общото съдържание на уронови киселини	73
3.2.2.1.2	Качествена реакция за доказване присъствието на глюкоуронова киселина	73
3.2.2.1.3	Определяне на естерификационна степен	74
3.2.2.1.4	Определяне на ацетилно съдържание	74
3.2.2.1.5	Определяне на белтъчно и L-хидроксипролиново съдържание	74
3.2.2.1.6	Определяне на редуциращи захари (групи)	75
3.2.2.1.7	Определяне на общо количество полифенолни вещества	75
3.2.2.1.8	Определяне на свободна и естерно-свързана ферулова киселина	75
3.2.2.1.9	Определяне на антиоксидантна активност	76
3.2.2.1.9.1	Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC метод	76
3.2.2.1.9.2	Hydroxyl Radical Averting Capacity – HORAC метод	76
3.2.2.2	Хроматографски методи	77
3.2.2.2.1	Определяне на неутрални монозахариди и уронови киселини чрез HPLC-RID метод	77
3.2.2.2.2	Определяне на неутрални монозахариди чрез газ-хроматографски метод	78
3.2.2.2.3	Определяне на монозахариден състав чрез HPAEC-PAD метод (pH > 12)	78
3.2.2.2.4	Определяне на молекулна маса	79
3.2.2.2.5	Гелхроматография	79
3.2.2.2.6	Йонообменна хроматография	80
3.2.2.2.7	Определяне на галактуронови олигомери чрез HPAEC-PAD-UV метод	80
3.2.2.2.8	Определяне на кисели и неутрални олигомери чрез HILIC-ELSD/ESI-MSn метод	81
3.2.2.3	Спектрални методи	81
3.2.2.3.1	MALDI-TOF масспектрометрия	81
3.2.2.3.2	ИЧ-ФТ спектроскопия	82

3.2.2.3.3 ЯМР спектроскопия	82
3.2.3 Ензимни методи	82
3.2.3.1 Осапунване	82
3.2.3.2 Ензимна модификация на ПП изолирани от цитрусови кори и праз . . .	83
3.2.3.2.1 Модификация с <i>endo</i> -ПП-I	83
3.2.3.2.2 Модификация с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими	83
3.2.3.2.3 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ	84
3.2.3.3 Ензимна модификация на ПП изолирани от шипкови плодове	84
3.2.3.3.1 Модификация с <i>endo</i> -ПП-I	84
3.2.3.3.2 Ензимен фингърпринтинг анализ	85
3.2.3.4 Ензимна модификация на ПЗ изолиран от пресовки на мурсалски чай .	85
3.2.3.4.1 Ензимен фингърпринтинг анализ	85
3.2.4 Биологични методи	86
3.2.4.1. Определяне на <i>in vitro</i> антикомплементарна активност	86
3.2.4.2. Изследване на <i>in vitro</i> цитотоксичност и антитуморна активност	87
3.2.4.3. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити	87
3.2.4.4. Измерване на <i>in vitro</i> имуномодулираща активност срещу имунокомпетентни клетки от чревни Пайерови плаки	88
3.2.4.5. Измерване продукцията на РФК от фагоцити	88
3.3 Получаване на функционална напитка	89
3.3.1 Производствен опит за сок от арония и шипка с добавен 0.4% ябълков пектин.	89
3.3.1.1 Получаване на концентриран екстракт от шипка.	89
3.3.1.2 Получаване на сок от арония.	89
3.3.1.3 Технология за сок от арония и шипка с добавен 0.4% ябълков пектин.	89
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ (RESULTS & DISCUSSION)	91
4.1 Характеристика на предварително обработените суровини	91
4.2 Получаване и характеристика на полизахаридите	94
4.2.1 Монозахариден състав на изходните полизахариди	102
4.2.2 Молекулна маса на изходните полизахариди	112
4.3 Ензимна модификация на полизахаридите с <i>endo</i> -ПП-I	116
4.3.1 Ензимна модификация на ПП изолирани от АНЧ на цитрусови кори	117
4.3.1.1 Молекулна маса на модифицираните продукти	118

4.3.1.2	Монозахариден състав на модифицираните продукти	121
4.3.1.3	Гелхроматография на КЕПП и ВЕПІ АНЧ, и на техните модифицирани продукти	128
4.3.1.4	Анионообменна хроматография на изходен ВЕПП АНЧ и на необработен ензимен хидролизат, получен след действието на <i>endo</i> -ПГ-I	131
4.3.2	Ензимна модификация на ПП изолиран от АНЧ на праз	135
4.3.2.1	Молекулна маса на модифицираните продукти	135
4.3.2.2	Монозахариден състав на модифицираните продукти от пектин на праз	135
4.3.3	Ензимна модификация на ПП изолиран от АНЧ на шипкови люспи	136
4.3.3.1	Анионообменна хроматография на изходен ВЕПШ АНЧ и на необработен ензимен хидролизат, получен след действието на <i>endo</i> -ПГ-I	136
4.4	Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ	141
4.4.1	Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕПП АНЧ	141
4.4.1.1	Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти	141
4.4.1.2	Сепариране и идентификация на олигомерите	143
4.4.2	Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕППр АНЧ	153
4.4.2.1	Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти	153
4.4.2.2	Сепариране и идентификация на олигомерите	156
4.5	Ензимен фингърпринтинг анализ	166
4.5.1	Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ шипка (лж)	166
4.5.1.1	Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти	166
4.5.1.2	Сепариране и идентификация на олигомерите	166
4.5.2	Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ мурсалски чай	173
4.5.2.1	Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти	173
4.5.2.2	Сепариране и идентификация на олигомерите	174
4.6	Спектрална характеристика	181
4.7	Биологична активност на изходни и модифицирани полизахариди	192
4.7.1	Антиоксидантна активност	192
4.7.2	Антикомплементарна активност	194
4.7.2.1	Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани цитрусови пектини	195
4.7.2.2	Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани пектини от праз	200

4.7.2.3 Анतिकомплементарна активност на изходни и модифицирани шипкови пектини	202
4.7.3 Антитуморна (<i>in vitro</i> цитотоксична) активност	204
4.7.4 Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити	207
4.7.5 Измерване на <i>in vitro</i> имуномодулираща активност срещу имунокомпетентни клетки от чревни Пайерови плаки	209
4.7.6 Измерване продукцията на РФК от фагоцити	211
4.8 Получаване на функционална напитка	213
5. ИЗВОДИ (CONCLUSION)	215
6. ПРИНОСИ (SCIENTIFIC CONTRIBUTIONS)	219
7. ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)	221
8. ПУБЛИКУВАНИ МАТЕРИАЛИ И УЧАСТИЯ В КОНФЕРЕНЦИИ (LIST OF PUBLICATIONS, CONFERENCE TALKS & POSTERS)	244
9. ЦИТАТИ (CITATION)	246
10. ПРИЛОЖЕНИЕ (APPENDICES)	248
Приложение 1	248
Приложение 2	249
Приложение 2.1	250
Приложение 3	251
Приложение 3.1	252
Приложение 4	253
11. БЛАГОДАРНОСТИ (ACKNOWLEDGEMENTS)	258
12. БИОГРАФИЧНИ ДАННИ (BIOGRAPHY)	262

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ (LIST OF ABBREVIATIONS)

на кирилица

АГ-I (II)	арабиногалактан тип I или II (arabinogalactan type I or II)
АГП	арабиногалактан-протеини (arabinogalactan-proteins)
АЕ	ацетилестераза (acetyl esterase)
АК	аминокиселини (amino acids)
АНЧ	алкохол-неразтворима част (alcohol insoluble solids)
АО	антиоксидант(и)(на)... (antioxidant)
ВУПСА	време за удвояване на простатния специфичен антиген (prostate specific antigen doubling time)
ЕДТА	етилендиаминтетраацетат (ethylenediaminetetraacetate)
ИЧ-ФТ	инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (infrared spectroscopy with Fourier transformation)
ЙХ	йонообменна хроматография (anion-exchange chromatography)
КГ(Х)	ксилогалактуронан(хидролаза) (xylogalacturonan (hydrolase))
КВМК	късоверижни мастни киселини (short-chain fatty acids)
МО	микроорганизми (microorganisms)
МЦП	модифициран цитрусов пектин (modified citrus pectin)
НЗ	неутрални захари (neutral sugars)
ОПФ	обща полифеноли (total phenols)
ПВ	пектинови(те) вещества (pectic substances)
ПГ	полигалактуроназа (polygalacturonase)
endo-ПГ-I (II)	ендо-полигалактуроназа тип I или II (endo-polygalacturonase I or II)
ПГК	полигалактуронова киселина (polygalacturonic acid)
ПЗ	полизахарид(и) (polysaccharides)
П(М)Е	пектин(метил)естераза (pectin methylesterase)
ПЛ	пектин лиаза (pectin lyase)
ПтЛ	пектат лиази (pectate lyase)
ПП	пектинови полизахариди (pectic polysaccharides)
РГ-I (II)	рамногалактуронан тип I или II (rhamnogalacturonan type I or II)
РГаза	рамногалактуроназа (rhamnogalacturonase)
РГГХ	рамногалактуронан галактуронохидролаза (rhamnogalacturonan galacturonohydrolase)

РГЛ	рамногалактуронан лиаза (rhamnogalacturonan lyase)
РГРХ	рамногалактуронан рамнохидролаза (rhamnogalacturonan rhamnohydrolase)
РГХ	рамногалактуронан хидролаза (rhamnogalacturonase hydrolase)
РФК	реактивни форми на кислорода (reactive oxygen species)
СА	степен на ацетилиране (degree of acetylation)
с.в.	сухо вещество (dry solids)
СЕ	степен на естерификация (degree of (methyl)esterification)
СП	степен на полимеризация (degree of polymerization)
СФ	степен на ферулоилиране (degree of feruloylation)
СХ	степен на хидролиза с... (degree of hydrolysis by...)
УК	уронови киселини (uronic acids)
ХВП	хранително-вкусова промишленост (food and flavour industry)
ХГ	хомогалактуронан (homogalacturonan)
ЦП	цитрусов пектин (citrus pectin)
ЯМР	ядрен магнитен резонанс (nuclear magnetic resonance)

на латиница

ААРН	2,2'-azobis-[2-methyl-propionamidin] dihydrochloride (2,2'-азобис-(2-амидино-пропан) дихидрохлорид)
3-AQ	3-aminoquinoline (3-аминохинолин)
DB	degree of blockiness (степен на подреждане в блокове)
DB_{abs}	absolute degree of blockiness (абсолютна степен на подреждане в блокове)
dRG-II-B	Rhamnogalacturonan II dimer borate diester (рамногалактуронан тип II димер образуван чрез борат-диестерна връзка)
DEAE	diethylaminoethyl (диетиламиноетил)
ДНВ	2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-дихидроксибензоена киселина)
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)

HPLC	high-performance anion-exchange chromatography (високоефективна анион-обменна хроматография)
HPSEC	high-performance size-exclusion chromatography (високоефективна елиминираща по размер хроматография)
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometer (матрично-асистирана лазерна десорбция/йонизация в комбинация със спектрометър тип „по време на прелитане“)
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)
TFA	trifluoroacetic acid (трифлуороцетна киселина)
UV	ultraviolet (ултравиолетов)

ИЗПОЛЗВАНИ СИМВОЛИ (LIST OF SYMBOLS)

α, β	аномерна конфигурация на гликозидната група (anomeric configuration)
δ	химично отместване (chemical shift)
f, p	фуранозна, пиранозна форма (furanose and pyranose forms)
S	субстрат (substrate)
Ac	ацетил (acetyl)
Me	метил (methyl)
AcCN	ацетонитрил (acetonitrile)
Нур	хидроксипролин (hydroxyproline)
Gal3	галектин-3 (galectin-3)
(β -Glc)3Y	1,3,5-три-(p - β -D-гликозилоксифенилазо)-2,4,6-трихидроксибензен; β -гликозил Ярив фенилгликозид или реактив на Ярив (1,3,5-tri-(p - β -D-glucosyloxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene; β -glucosyl Yariv phenylglycoside)

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР (LITERATURE REVIEW)

1.1 Исторически преглед на развитието на химията на пектиновите вещества

Химията на ПВ има сравнително дълга история изпълнена с доста интересни моменти. Те са познати на науката още преди да се сложи край на алхимичния мит за философския камък и теорията на витализма да бъде изоставена (Fr. Wöler, 1828). Пектиновите полизахариди все още са обект на особен интерес от учените с разнородни специалности. Това е така не само заради тяхната роля и значение, което имат за растителната клетка и човека, но също така и заради тяхната твърде комплексна природа, която след 225 (!) год. все още е трудно разгадаема и дискуссионна.

Историята им започва през 1790 г. с откриването на „странно пихтиесто вещество“ в плодовете на индийската фурма (тамаринд) от френския фармацевт Louis N. Vauquelin (1763-1829). Той показал, че с „едно обикновено накисване водата отнема от пулпата на тамаринда“ захар, киселини, но също така и смолисти вещества. В своя опит, прибавяйки към получения извлек спирт, получил голямо количество сиво, лепкаво вещество с характеристики на смолисти вещества. Същевременно Vauquelin успешно приготвил захарни желета от него, като установил, че при продължително варене желирната способност на това „пихтиесто вещество“ се губи (Vauquelin, 1790). За съжаление блестящият химик обърнал повече внимание на органичните киселини, отколкото на това „gelée“, като дори пропуснал да го наименува.

Изключително забележителна е 1825 г. в развитието на пектиновата химия. В списание „*Annales de Chimie et de Physique*“ са отпечатани два доклада на френския фитохимик и фармацевт Henri Braconnot (1780-1855). В първия са представени задълбочените изследвания и свойствата на киселина „силно аналогична, дори идентична с тази, която е позната още под неясното име „желе“ („gelée“), появяваща се толкова често в изследванията – отбелязва Braconnot, че самият той не можал да срещне растение, в което да не присъства“. Той пръв доказва киселите свойства на желиращото вещество, при добавяне на захар и метални йони. Заради интересните свойства, които притежава, той отбелязва, че е „немислимо това вещество да остане без приложение“, като приготвил подсладени, различно оцветени, ароматни желета с розова вода. В края на доклада си Braconnot споделя и обобщава: „Това са основните характеристики на тази киселина, които

успях да открия. Вижда се, че една от най-разпространените функции в растения играе особено важна роля и заслужава вниманието на учените... Задал съм си за пролетта да проверя хипотезата си по-задълбочено: дотогава предлагам наименованието „пектин“, от *πηκτις*, коагулум (съсирен), за да различа тази нова киселина от сходните ѝ.“ (Braconnot, 1825a). По-късно във втория си доклад Braconnot за първи път споменал и за възможното медицинско предназначение на приготвените от него желета: „...те са много подходящи, за да излъжат необуздания апетит на един болен човек [...]. Но едно от най-безценните качества, с които отличих разтворимия пектин е това, че може да бъде разгледан, като най-сигурния антидот за премахване на метални соли: оловни, медни, цинкови, антимонови, живачни.“ В заключение Braconnot отбелязал: „Тази нова противоотрова, която предлагам със сигурност ще помогне на отровените индивиди, и няма никакво неудобство в сравнение с използваните досега.“ (Braconnot, 1825b).

„Нова ера“ в пектиновата химия започнала през 1917 г. с откритието от германския биохимик Felix Ehrlich (1877-1942), че D-GalA е основен компонент на пектина от захарно цвекло. Ehrlich *et al.* намерили качествено еднакви продукти със сходни свойства във всички изследвани пектини и предложили за фундаментална структурна единица в пектина цикличната тетрагалактуронова киселина. Цвекловият пектин представлявал една „триацетил-арабино-галакто-диметокси-тетрагалактуронова киселина“ (Ehrlich, 1927; Ehrlich & Schubert, 1929).

През 1923-24 г. К. Smoleński (1876-1943) пръв въвел и използвал термина „полиурониди“ във връзка с предложената от него структура на пектина от захарно цвекло (Smoleński, 1923). За първи път той открил оцетната киселина, като продукт от действието на NaOH и предположил, че тя е естерно свързана (Smoleński, 1924).

През 20-те години на XX в. с увеличаване на знанията по въпросите на пектиновата химия, се увеличил броя и сложността на термините, които се използвали, т.к. всеки автор въвеждал „своя номенклатура“. Всичко това породило необходимостта от класификация на ПВ, като първата успешна такава била изработена през 1926 г. от Комисията по Номенклатура към Американското химическо общество (Kertesz, 1951).

В началото на 30-те години Link *et al.* доказали, че УК имат пиранозна структура (Morell & Link, 1933, 1934). Те направили заключение, че неразграденият ЦП трябва да съдържа полимеризирана GalA с най-малко 8 до 10 мономерни звена, с което се

подразбирала и отворената линейна структура (Morell, Baur, & Link, 1934; Baur & Link, 1935). Дължината на пектиновата верига била ревизирана след работите на германските учени F. A. Henglein, G. Schneider и H. Bock. Те установили аналогия в свойствата на нитро-пектина и нитро-целулозата чрез нитриране, като същевременно доказали и нишковидната структура на пектина (Henglein & Schneider, 1936).

През 1937 г. Ph. A. Levene и L. C. Kreider показали факта, че хидроксилните групи при C-4 и C-5 са ангажирани с образуването на пръстен и кондензирането на отделните гликозидни единици (Levene & Kreider, 1937a). По-късно се установило категорично, че хидроксилната група при C-5 участва в образуването на пиранозната структура на галактуронида (Levene & Kreider, 1937b).

Натрупването на нови знания и продължилата употреба на погрешна терминология, най-вече в индустрията, породили повторното преглеждане, преработване и приемане на нова класификация (Report of the Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances, 1944).

С появата, развитието и бързото навлизане в аналитичната практика на редица инструментални методи и техники за анализ след Втората световна война, станало възможно още по-дълбокото навлизане във въглехидратния състав и структурата на ПВ.

Истинска революция във възгледите на структурната пектинова химия настъпила след задълбочените изследвания на американската и холандската научни школи през 60-те, 70-те и 80-те години на миналия век, като днес техните последователи продължават усилено научните разработки в тази област.

1.2 Преглед на развитието на химията на пектиновите вещества в България

Развитието на пектиновата химия и технология в България започва след края на Втората световна война и несъмнено се свързва с името на проф. Стойко Ангелов Стойков (1904-1962). Под влияние на видни учени в областта на хранителната наука и аграрните технологии в него се породил научен интерес към ПВ и техните суровинни източници. През 1954 г. бил избран за редовен професор и ръководител на Катедрата по „Органична химия и биохимия“ към сформирания тогава Висш институт по ХВП (днес УХТ-Пловдив) (Kratchanov, personal communication). Стойков направил пълни проучвания на различни части на слънчогледа, като пръв намерил, че изсушените и оронени слънчогледови пити

(жълто-кафява зрелост) са най-богати на ПВ, притежаващи добра желирна сила. Според него те били подходящ източник за промишлен добив на пектин (Kertesz, 1951; Stoikoff, 1958).

Работата върху химията и технологията на слънчогледовия пектин била продължена от проф. д.х.н. Христо Г. Крачанов, след постъпването му през 1956 г., като асистент по органична химия при проф. Стойков. Заедно със своите сътрудници той провежда системни изследвания върху синтеза и свойствата на някои деривати (етилови естери) на слънчогледовата ПГК, които показали силно изразени повърхностно-активни свойства и били приложени като пенообразуватели и емулгатори (Kratchanov *et al.*, 1978; Kratchanov, Kuntcheva, & Kirtchev, 1980). Публикувани са няколко статии върху факторите влияещи върху желирните свойства на слънчогледовия пектин (Стойков, Крачанов и Николова, 1962; Kratchanov & Bratanoff, 1982). Известен период от научната си кариера проф. Крачанов посвещава на получаването на оптично-активни катионити и на проучвания на йонообменните свойства на полиуронидите. Моделни изследвания с полигалактуронова и алгинова киселини са проведени по метода на колонната хроматография, като различните фактори (степен на набъбване и вид на йонообменителя, вид на разтворителя и неговото влагосъдържание), влияещи върху ефективността на разделянето, са задълбочено проучени (Kratchanov & Popova, 1968, 1982; Popova & Kratchanov, 1972, 1979). Авторите посочват и възможности за тяхното практическо приложение в хроматографското разделяне на рацемични бази и биологично-активни съединения с основен характер (Popova & Krachanov, 1977; Kratchanov & Popova, 1982). Крачанов *и сътр.* предлагат използването на пектинови деривати (омрежен с епихлорхидрин, амидирани и др.) за деметализиране на хидрогенирано слънчогледово олио (Ivanov *et al.*, 1992). Съвместно със своите сътрудници той получава и изследва свойствата на амидирани пектини, както и процесите на взаимодействие между АК и др. азот-съдържащи съединения и ябълковия пектин (Kratchanova, Denev, & Kratchanov, 1989; Denev & Kratchanov, 1996; Kratchanova, Slavov, & Kratchanov, 2004). Резултатите от лабораторните изследвания върху свойствата на ПВ са послужили за създаването и усъвършенстването на наличните технологии и част от тях били внедрени в редовно производство. Така били създадени нови методи за ускоряване съзряването на вина и стабилизиране на алкохолни напитки (винен дестилат и бренди) с използване на природни адсорбенти (Попова *и сътр.*, 1979). В друга серия от

изследвания била установена възможността за влагането на ябълков пектин в производството на замразени впенени плодови кремове, млечно-плодови десерти, майонезоподобни продукти и в състав на домати заливки за рибни консерви (Крачанов, Фикийн, Карагъзов, 1977; Чанева *и сътр.*, 1978). Проведени са изследвания за приложението на гранулиран ябълков пектин за профилактика на сатурнизма при работници (Stantshev *et al.*, 1979).

Разработените от колектива разнообразни технологични решения върху промишлената екстракция на плодови пектини и приложението на пектина в хранителната, фармацевтичната и текстилната промишленост са защитени с над 30 авторски свидетелства за патенти и полезни модела у нас и в чужбина. Една такава разработка, която е свързана със създаването на оригинален екстрактор за пектин, е методът за повишаване добива на пектин от ябълкови пресовки чрез прилагане на пулсиращо хидротермично въздействие на суровината в турбулентни условия (Kratchanov *et al.*, 1986).

В Научно-изследователския институт по консервна промишленост (днес ИИРХ – Пловдив) са разработени технологии за получаване на пектолитични ензимни препарати от проф. д.б.н. Симеон Чага. В същия институт д-р Христофор Попов и д-р Ангел Аролски са разработили технология за производство на диетични плодови консерви, обогатени с вискоестерифициран пектин.

Приложни изследвания върху ензимната хидролиза на алкалноосапунен слънчогледов пектин са проведени и в Катедрата по „Микробиология“ на ВИХВП от проф. Яна Попова и М. Крачанова. Те патентоват метод за получаване на D-галактуронова киселина директно от слънчогледови пити. Проф. Н. Люцканов *и сътр.* разработват метод за получаване на пречистена бактериална ПЕ и я прилагат успешно за производство на средно- и нискоестерифицирани ябълкови пектини (Kratchanov, *personal communication*).

Научно-приложни изследвания върху използването на пектина в текстилната промишленост и като средство за концентриране на синтетични каучукови латекси са провеждани още във Висшия химикотехнологичен институт (днес ХТМУ-София) под ръководството на проф. д.т.н. инж. Кирил Д. Димов.

Съществени научно-приложни и технологични изследвания са извършвани и в завод „Пектин“ (кв. Църква, гр. Перник) под ръководството на инж. Герчо Караколев. В неговата химична лаборатория през 1954 г. е създаден кръвоспиращият препарат „Хемогел“

(Караколев, Огнянов и Маринов, 1956). Същият колектив разработва и препаратите „Хемостоп“, „Пектодерм“ прилагани за лечение на повърхностни и дълбоки рани, и „Пектан“ за лечение на диария. През 1956 г. е отпечатан първият и единствен до момента научен труд в България, засягащ въпросите на химията, анализа, технологията и приложението на ПВ: „Пектинови вещества. Химия, производство и приложение“ (Караколев, Огнянов и Маринов, 1956).

Понастоящем системните изследвания по пектиновата химия и технология продължават в Лабораторията по биологично-активни вещества – Пловдив към ИОХ с ЦФ – БАН. В резултат на приложните изследвания в ЛБАВ, продължаващи вече 32 г. и съвместната работа с фирмите „Витанеа“ ООД и „Иновативно-Технологичен Център“ ООД са създадени технологии за производство на антиациден гранулиран ябълков и ЦП с витамини и билкови екстракти, подходящи за профилактика и лечение на стомашно-чревни и сърдечно-съдови заболявания. Създадени са редица технологии за производство на функционални (лечебни) храни и напитки („Пектарон“ – нектар от арония с добавен пектин (0.3%); нектар от арония и портокал с добавен пектин (1%); биосок от арония с добавен пектин и др.).

1.3 Номенклатура и класификация на пектиновите вещества

След преработката на по-старата и приемането на новата номенклатура ([Report of the Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances, 1944](#)) са въведени следните термини, които се препоръчва да се използват от изследователите в тази област:

- Протопектин (protopectin). С това понятие се описват водонерастворими форми на ПВ в растителните тъкани, които при непълна хидролиза дават пектин и пектинови киселини, и чийто състав и строеж не е изяснен напълно;

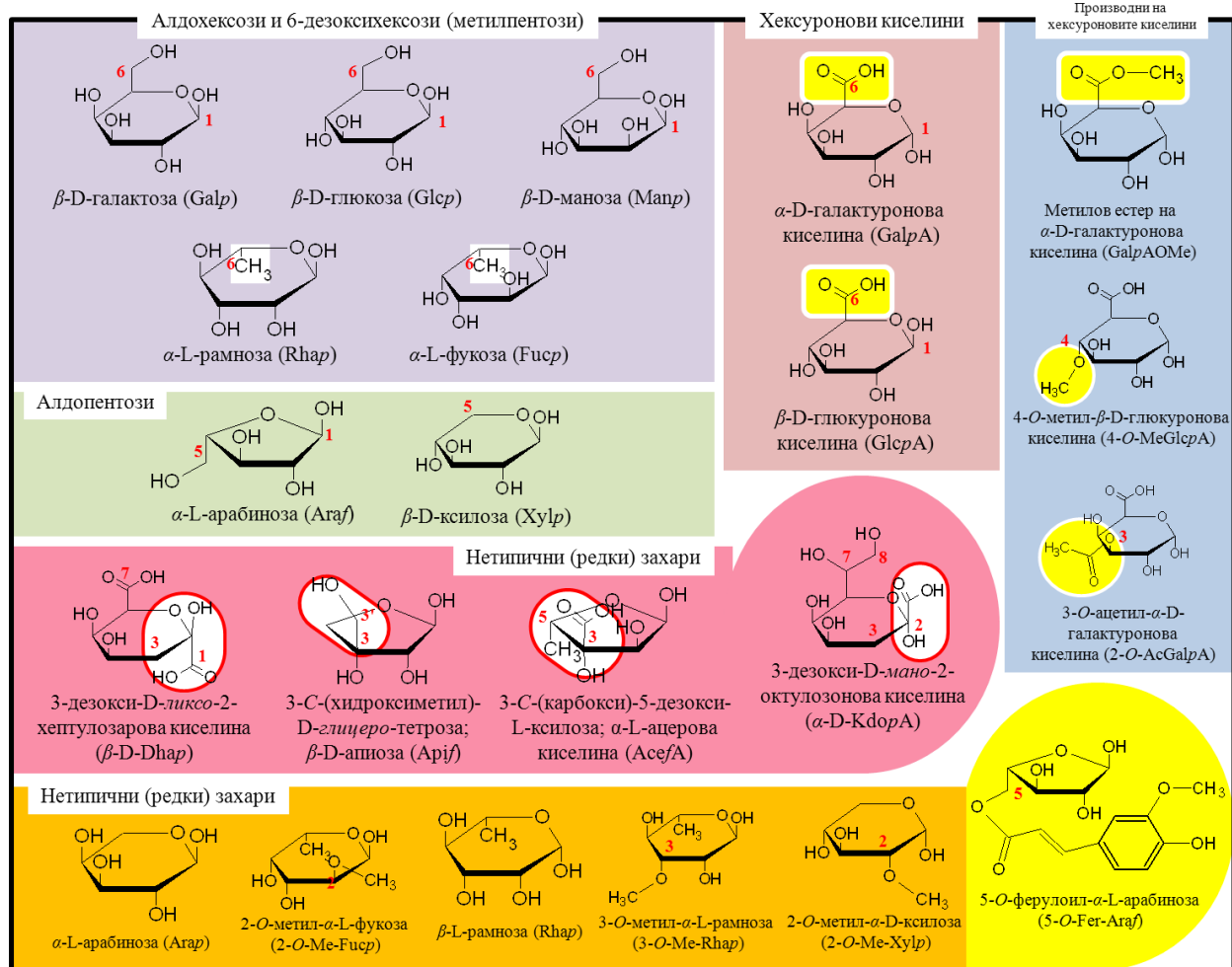
Известни са предположения за структурата на водонерастворимия протопектин и на какво се дължи тази водонерастворимост. Някои от причините за това са: по-голямата молекулна маса на протопектина в сравнение с тази на пектина; механичното оплитане на пектиновите макромолекули с други полимери (целулоза, хемицелулоза, протеини); формиране на множество естерни връзки между карбоксилната група на пектина и алкохолните групи на другите полимери; образуване на amidни и солев тип връзки между карбоксилните групи на пектините и някои базични групи в протеините; образуване на

многобройни вторични връзки (водородни и др.) и поливалентното йонно свързване на карбокси групите с други компоненти на клетъчната стена. Терминът протопектин често се използва, за да се опишат нативните пектинови фракции в клетъчните стени, които не могат да бъдат екстрахирани чрез недеструктивни методи (Sakai *et al.*, 1993; Schols & Voragen, 2002).

- ☑ Пектови киселини и пектати (pectic acids and pectates). Терминът се използва за обозначаване на ПВ съставени основно от колоидална ПГК, която проктически е свободна от метил-естерни групи. Нейните нормални или кисели соли се наричат пектати;
- ☑ Пектинови киселини и пектинати (pectinic acids and pectinates). Те представляват частично естерифицирани с метилов алкохол пектови киселини. Те съдържат гликозидно свързани остатъци на галактууронова киселина и някои НЗ.
- ☑ Пектин (или пектини) (pectin(s)). Терминът обозначава онази част от водоразтворимите пектинови киселини, с вариращо метил-естерно съдържание и степен на неутрализация, които при подходящи условия, в присъствието на захар или киселини, са способни да образуват гел.

1.4 Химичен състав и структура на пектиновите вещества

Пектиновите вещества са възможно най-сложния клас от кисели хетерополизахариди с колоидни свойства, намерени в природата, които изграждат средната ламела и първичните клетъчни стени на всички сухоземни растения. Те съдържат 17 (от общо 20 за клетъчните стени) различни монозахарида, като броят на установените начини за свързване между тях е повече от 20 (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Vincken *et al.*, 2003; O'Neill & York, 2003; O'Neill *et al.*, 2004; Voragen *et al.*, 2009; Jarvis, 2011). На **фиг. 1** са представени основните монозахариди, намерени в ПВ. От нея се вижда, че в състава им влизат както кисели, така и неутрални захари. Най-характерни за тези полимери са GalpA и нейните невъгледридни производни, както и Rhap, Araf и Galp (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001). Допълнително са намерени нетипичните разклонени (Apif и AcefA) и две кето-захари (KdopA и Dhap). Манозата не е типичен компонент на пектина, но е включена тук заради важната роля, която заема в биосинтеза на Rhap и Fucp (Mohnen, 1999).



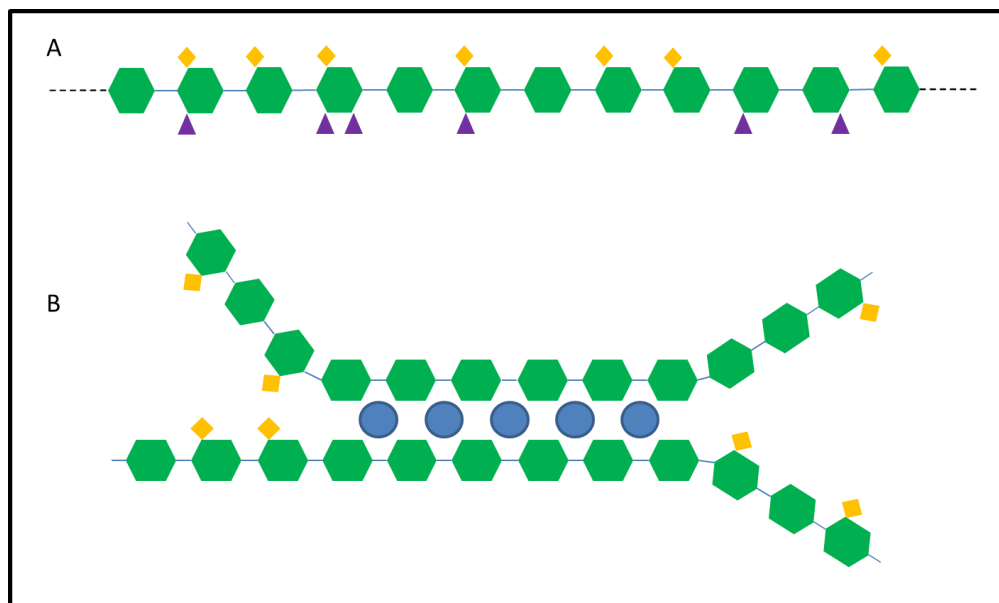
Фигура 1. Схематично представяне в Хауърдов вид на основните монозахариди и някои от техните производни, влизачи в състава на пектиновите вещества.

В резултат на дългогодишните изследвания (продължаващи активно и днес) се приема, че ПВ са съставени от три структурни компонента, количеството на които може да варира според източника: хомогалактуронан, рамногалактуронан тип I и рамногалактуронан тип II (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Voragen *et al.*, 2009). С основание някои автори причисляват рамногалактуронан II и останалите новооткрити сегменти (ксило- и апиогалактуронан) към групата на галактуронаните, като приемат, че основните структурни фрагменти са два: галактуронан и рамногалактуронан тип I (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; O'Neill & York, 2003; Vincken *et al.*, 2003). Според Albersheim *et al.* (1996) и Mohnen (1999) ксило- и апиогалактуронаните присъстват само в някои растения и заради това не трябва да се приемат, като типични фрагменти, изграждащи пектина.

1.4.1 Хомогалактуронан

Хомогалактуронанът е линеен полизахарид, който доминира в повечето пектини, заради което фината му структура е изучена в големи детайли. Заема от 60 % до 85 % от общото пектиново съдържание и 15-20% от с.в. на клетъчните стени (тип I) (O'Neill & York, 2003). Основната верига на ХГ представлява α -(1→4)-свързани D-GalpA звена (конформация тип „стол“ 4C_1) (фиг. 1 и 2А), които могат да са естерифицирани с метанол на C-6 позиция (обикновено ~70%) и/или ацетилирани на O-2 и/или O-3 позиция (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Albersheim *et al.*, 1996). Броят mol метанол отнесени към 100 mol GalpA единици определя „степената на естерификация“ на всеки пектин, като пектинът се нарича високоестерифициран, ако стойността е > 50% и нискоестерифициран при стойност < 50% (Schols & Voragen, 2002). Някои автори въвеждат и използват термина средноестерифициран пектин (Kratchanov, personal communication). Приема се, че ХГ се синтезира напълно естерифициран, като разпределението на метил-естерните групи в него се определя впоследствие от ендогенните ПМЕ и от условията, при които се екстрахира (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Schols & Voragen, 2002). Дължината на веригата е обект на дискусия, но минималната дължина, която е открита в ябълков, цитрусов и в цвеклов пектин е 72-100 GalpA остатъка (Thibault *et al.*, 1993). Mohnen (1999) отбелязва също, че са намерени дължини от 30 и 200 звена.

Физичните свойства на пектина зависят строго от СЕ. Според някои автори хомогалактуронанов блок, съдържащ над 10 неестерифицирани карбоксилни групи, става чувствителен към наличието на Ca^{2+} йони и се получава омрежване на пектиновата молекула с калциеви мостове от типа „egg-box“ (фиг. 2В) (Grant *et al.*, 1973; Daas *et al.*, 2001). Според други необходимият брой деестерифицирани GalpA звена, за образуване на стабилни зони на свързване между два ХГ фрагмента, е 8-15 (Ralet & Thibault, 2002; Ralet *et al.*, 2012). При това, не само количеството, но и разпределението на естерните групи е от значение за физичните свойства на пектина, което може да бъде равномерно, случайно или блоково (Schols & Voragen, 2002). Оказва се, че то е доста комплексно, т.к. варира както на вътрешномолекулно, така и на междумолекулно ниво.



Фигура 2. Схематично представяне на метил-естерифициран (C-6) и/или ацетилян (O-2 и/или O-3) ХГ фрагмент (А); взаимодействие на два ХГ фрагмента чрез Ca^{2+} йонни мостове и образуване на стабилна димерна структура от типа „egg-box“ (В). **Забележка:** подходът и идеята за схематично представяне на структурите по този начин са взаимствани (с разрешение) от Leijdekkers, A. G. M. (2015). Characterization of sugar beet pulp derived oligosaccharides. PhD Thesis. Wageningen University, 174 p. По-нататък съм създал, адаптирал и използвал свои фигури по възприетия подход. Ключът за „разчитането“ на използваните геометрични форми и цветове е поместен в **прил. 1**.

Върху проблема за разпределението на метилните групи в ХГ е отделено особено внимание през последните 35 години (Taylor, 1982; De Vries *et al.*, 1983; Kravtchenko *et al.* 1993; Daas *et al.*, 1999; Daas, Voragen, & Schols, 2000; Limberg *et al.*, 2000a, 2000b; Ralet *et al.*, 2012), но значителен напредък е получен съвсем скоро с работите на Schols *et al.*, след въвеждането на мулти-ензимния-фингърпринтинг-MALDI-TOF мас-скрининг метод в анализа на ПП (Remoroza *et al.*, 2014a, 2014b).

По подобие на СЕ са въведени няколко термина за количествена оценка на броя блокове (дълги последователности от не- и/или естерифицирани GalpA звена) по протежението на ХГ: „степен на блòковост или блокуване“ или „степен на подреждане в блокове“ („degree of blockiness“) – представляващ съотношението между количествата на неестерифицираните моно-, ди- и тримери, освободени след *endo*-ПП-II действие, и общото количество на неестерифицирана GalpA, съдържаща се в съответната проба; „абсолютна степен на блòковост или блокуване“ („absolute degree of blockiness“) – съотношение между количествата на освободените неестерифицирани моно-, ди- и тримери и общото уроново съдържание на пробата (вкл. метил-естерифицирана GalpA) (Daas *et al.*, 1999). По аналогия

с горепосочените термини, описващи големината на неестерифицираните GalpA фрагменти, Ralet *et al.* (2012) въвеждат параметри за описване големината на метил-естерифицираните участъци, получени след действието на ПЛ (DBMe и DB_{abs}Me).

Remoroza *et al.* (2014a, 2014b) намират, че олигомерите, освободени след ПЛ не винаги съдържат последователности от метил-естерифицирани GalpA звена. Ето защо те предлагат и въвеждат два допълнителни параметъра: „степен на хидролиза чрез *endo*-ПГ-II“ („CX_{II}“) и „степен на хидролиза чрез ПЛ“ („CX_{ПЛ}“). Първият представлява съотношение между сумата на количествата на всички наситени олигомери със СП от 1-8 (с и без естерна група) и тоталното съдържание на GalpA. Вторият е съотношение между сумата на количествата на всички естерифицирани ненаситени олигомери със СП от 2-8 и общото уроново съдържание в пробата.

В литературата се откриват опити за едновременното „картографиране“ на ацетилните и метил-естерните групи в пектин от захарно цвекло, като след комбиниран ензимен хидролиз (*f*-ПМЕ, *endo*-ПГ-I и др.), са направени някои интересни заключения: присъствието на *O*-2 и *O*-3 ацетилирани олигомери е приблизително едно и също; не е намерено едновременно *O*-2 и *O*-3-диацетилиране; наличието на GalpA остатъци, които са едновременно *O*-ацетилирани и метил-естерифицирани е рядкост, но в намерените случаи ацетилната група може да бъде или на *O*-2 или *O*-3 позиция; наличието на метил-естерифицирани остатъци нагоре по веригата от *O*-3-ацетилиран остатък е рядкост, но в случая на *O*-2 ацетилиране метил-естерифицирани звена нагоре по ХГ веригата са често срещани (Ralet *et al.*, 2005). В крайна сметка е показано, че ацетилните групи имат блоково разпределение (Ralet, Crépeau, & Bonnin, 2008; Remoroza *et al.*, 2014b).

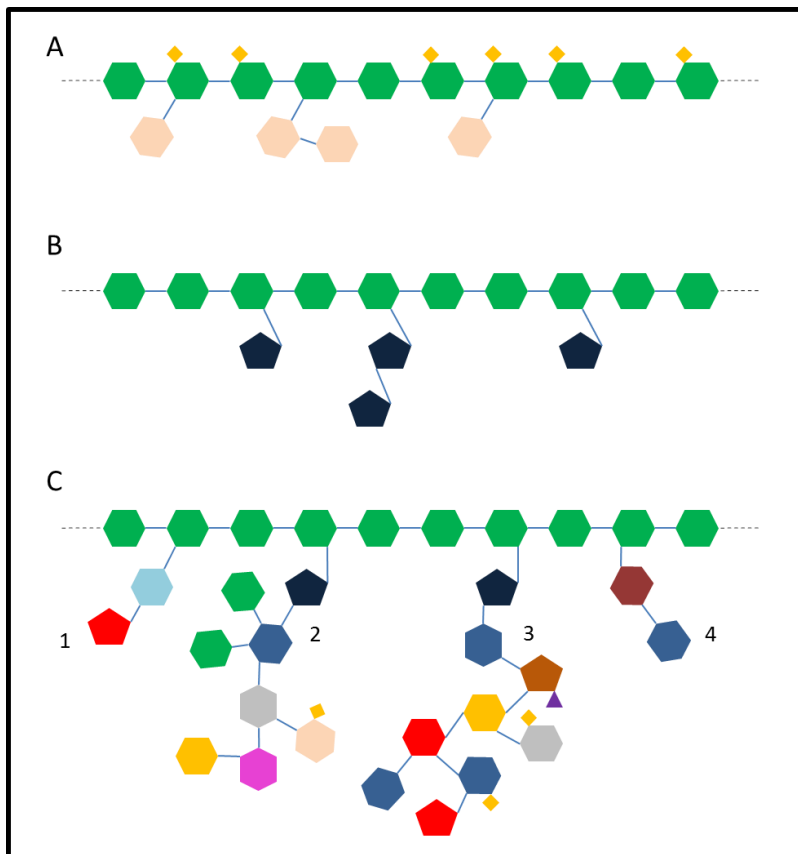
1.4.1.1 Ксилогалактуронан

В литературата се откриват няколко доклада, в които се описва, че към част от GalpA звена в ХГ, получен от някои репродуктивни тъкани (плодове и семена) на растения (ябълки, памук, диня и др.), са прикрепени чрез β -(1 \rightarrow 3)-гликозидни връзки мономерни и/или димерни D-Xylp остатъци (фиг. 1 и 3А) (Schols *et al.*, 1995; Mohnen, 1999; Voragen *et al.*, 2009). Schols, Coenen, & Voragen (2009) описват някои съобщения, които демонстрират повсеместното разпространение на този фрагмент, макар и в малки количества, в клетъчните стени от *Arabidopsis thaliana* и бяло зеле. Изолирани са различни популации от

този фрагмент, в който съотношението между *Xylp* и *GalpA* варира от 0.4-0.9, а СЕ е в границите 40-90% (Schols *et al.*, 1995; Albersheim *et al.*, 1996). Степента на ксилозилиране може да варира между 25% (диня) и 75% (ябълка), а молекулната маса достига 20-30 kDa (Schols *et al.*, 1995; Yu & Mort, 1996; Voragen *et al.*, 2009). КГ е изолиран от хидролизната смес на ябълкови модифицирани „космати области“, на които е действано с РГаза, която разгражда скелета на РГ-I, но не и КГ (Schols *et al.*, 1995).

1.4.1.2 Апиогалактуронан

Към групата на заместените галактуронани се причислява и намереният в клетъчните стени на приспособените за живот във водна среда едноседелни растения (водна леща (сем. *Lemnaceae*) и морска трева (сем. *Zosteraceae*)) апиогалактуронан (Ovodov *et al.*, 1971; Hart & Kindel, 1970; O'Neill & York, 2003; Caffall & Mohnen, 2009). Съдържанието на D-Apī в тях се движи от 7.9 до 38.1%, като тези с по-високо съдържание не се разграждат от пектолитични ензими. СЕ е много ниска 1.0-3.5% (Hart & Kindel, 1970). Изучаването на тяхната структура показва, че към основния полигалактуронов гръбнак са прикрепени чрез β -(1→2)-гликозидни връзки, както мономерни D-Apīf остатъци, така и апиобиозилни димери, изградени от [β -D-Apīf-(1→3')- β -D-Apīf-(1→)] (фиг. 1 и 3B) (Ovodov *et al.*, 1971; O'Neill & York, 2003). Характерен представител на тази група е полученият от *Zostera marina* L. зостерин, 25% от чиято молекула представлява апиогалактуронан. При пълен хидролиз в кисела среда е намерено съотношение между *GalpA* и Apīf ~4:5, а като продукти на перйодатно окисление, редукция и метилиране са получени 2,3,4-три-*O*-метил-D-Apī (основен продукт), 2,3,6-три- (в следи), 2,6- и 3,6-ди-*O*-метил-Gal. Това доказало, че главната верига на зостерина съдържа разклонения на 2-, 3- или на 2,3-позиция от терминални D-Apī остатъци (Ovodov *et al.*, 1971).



Фигура 3. Схематично представяне на структурата на заместени галактуронани. Ксилогалактуронан (A) – ксилозилни и ксиобиозилни остатъци са прикрепени към C-3 на основния галактуронанов скелет. Апиогалактуронан (B) – апиозилни и апиобиозилни остатъци са прикрепени към C-2 на основния галактуронанов скелет. Силно разклонен галактуронан (изграден от четири основни вида странични вериги) или рамногалактуронан тип II (C).

1.4.1.3 Рамногалактуронан II

Без съмнение от всички заместени галактуронани рамногалактуронан тип II е най-сложно устроеният, но същевременно в относително малки количества и най-разпространеният в растителния свят ПЗ. Той представлява 28 до 36 членна мега-олигозахаридна структура, изградена от 11-13 различни гликозилни остатъци, свързани помежду си с повече от 22 различни гликозидни връзки (O'Neill *et al.*, 2004; Bar-Peled, Urbanowicz, & O'Neill, 2012; Buffetto *et al.*, 2014). Наименованието му е доста подвеждащо, но в началото се е смятало, че поради съдържанието на Rhap в него, представлява структурна разновидност на преди това изолирания РГ-I. Впоследствие е намерено, че рамнозното съдържание е доста по-ниско и се съдържа в страничните вериги, а не в основната. Затова някои автори използват и термина „силно омержен галактуронан“

(Schols & Voragen, 2002; O'Neill *et al.*, 2004). Фрагментът е получен и частично охарактеризиран за първи път от полигалактуроноза-третиранни клетъчни стени, изолирани от суспензионни култури на обикновения явор, а по-късно и от червено вино (Darvill, McNeil, & Albersheim, 1978; Doco & Brillouet, 1993; O'Neill *et al.*, 2004). Той заема между 1-5% от с.в. на клетъчните стени (тип I), 10-11% от пектина и молекулната му маса достига ~5-10 kDa (Albersheim *et al.*, 1996; O'Neill & York, 2003; Yapo, 2011c). Чрез използването на антитела е локализиран в първичната клетъчна стена и в близост до цитоплазмената мембрана, но не и в средната ламела (O'Neill *et al.*, 2004). Към O-2 и/или O-3 място на основния галактуронанов скелет, състоящ се най-малко от 8 или 9 GalpA звена, свързани помежду си чрез α -(1→4)-гликозидни връзки, са прикрепени 4 (според някои 5) типа странични вериги (често обозначавани от А-Е), изградени от нетипични (редки) захари (фиг. 1 и 3С). Допълнителни изследвания показали, че две от тези вериги са структурно различни дизазахариди, изградени от 3-дезокси-D-ликсо-2-хептулозарова киселина, свързана към олиго-GalpA скелета [β -L-Araf-(1→5)- β -D-DhapA-(2→)] и 3-дезокси-D-мано-2-октулозонова киселина [α -L-Rhap-(1→5)- β -D-KdopA-(2→)], са прикрепени към O-3 място (фиг. 3С.1 и 3С.4) (York *et al.*, 1985a; Stevenson, Darvill, & Albersheim, 1988; Yapo, 2011c; Buffet *et al.*, 2014). В състава на другите два олигозахарида – един хептаолигомер и един нонаолигомер, които са прикрепени към O-2 място, влизат апиоза (Apif), ацерова киселина (AcefA) – единственият разклонен, кисел, дезокси-монозахарид в природата, GlcpA, β -L-Arap и 2-O-метилни производни на Xylp, Fucp и Rhap (фиг. 3С.2 и 3С.3) (Darvill, McNeil, & Albersheim, 1978; Spellman *et al.*, 1983; O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Caffall & Mohnen, 2009; Yapo, 2011c; Bar-Peled, Urbanowicz, & O'Neill, 2012). Ролята му за растителните клетки не е потвърдена (приема се основно структурна) със сигурност. Точната подредба на олигозахаридните вериги по протежението на ХГ не е изучена задълбочено, а структурата му непрекъснато се обновява, още повече, че според O'Neill & York (2003) има все повече доказателства, че страничните вериги не могат да бъдат структурно идентични при всички растения (Hervé du Penhoat *et al.*, 1999; Bar-Peled, Urbanowicz, & O'Neill, 2012; Buffet *et al.*, 2014).

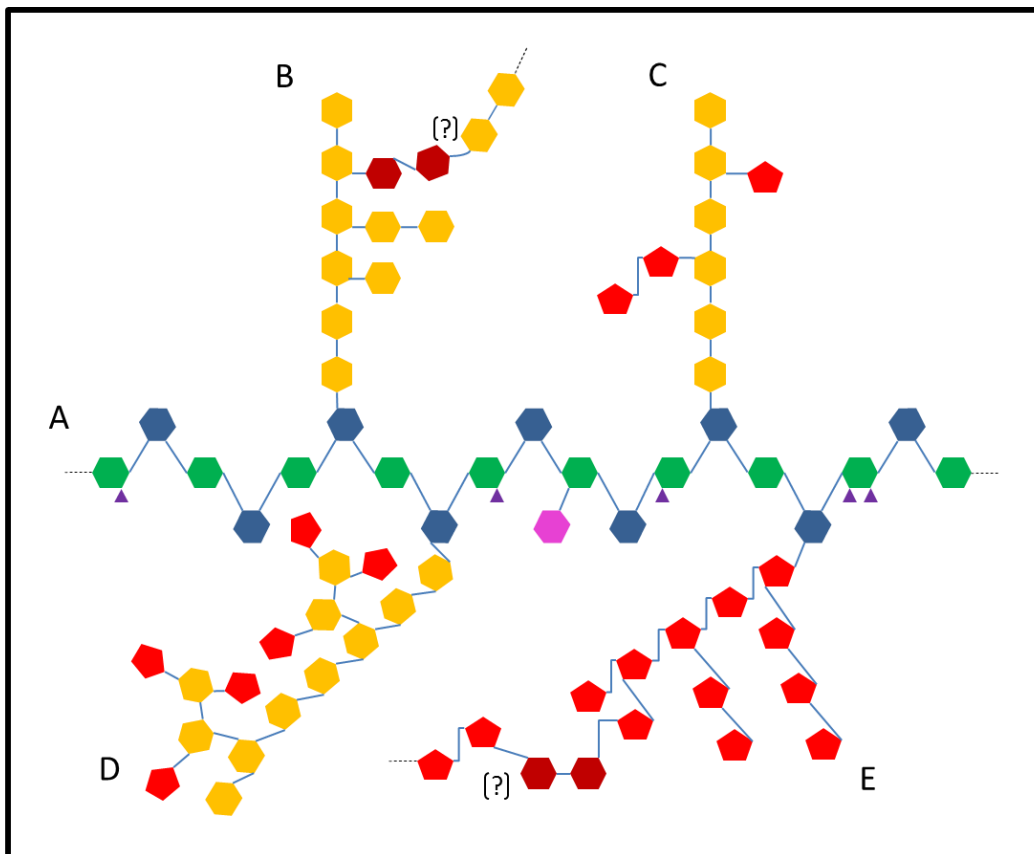
1.4.1.4 Други заместени галактуронани

Наред с гореописаните в литературата се срещат данни за наличието на други структурни фрагменти в малки количества и в някои лечебни растения (блатен петолистник, корейски жен-шен, градински карамфил и др.) и зеленчуци (домати), като галактуроногалактуронан, галактогалактуронан и арабиногалактуронан. Основният скелет на тези сегменти представлява ХГ, към който на *O*-2 и/или *O*-3 позиция може да са прикрепени мономерни, димерни и/или олигомерни звена на захари, като α -D-GalpA, α -L-Araf или β -D-Galp (Yapo, 2011c, 2011d; Yapo & Gnakri, 2014).

1.4.2 Рамногалактуронан I

В своята 10-та по ред статия, посветена на изучаването на структурата на растителните клетъчни стени, Albersheim *et al.* отбелязват наличието на нелинеен пектинов фрагмент, изолиран от третиран с *endo*-ПГ клетъчни стени от суспензионни култури на обикновен явор. От тяхната маса той заема 7-15% (~36% при тези от картофи), а от общото пектиново съдържание 23% (McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980; O'Neill & York, 2003; Caffall & Mohnen, 2009). В началото е разпознат като основен макромолекулен компонент на клетъчните стени и въз основа на това му е отредена основна роля в изградения предварителен хипотетичен структурен модел на пектина, който с малки корекции е възприет и днес (Talmadge *et al.*, 1973).

Основният гръбнак на този ПЗ фрагмент е съставен от приблизително еднакво количество периодично и стриктно редуващи се рамнозни и галактуронови единици свързани по следния начин $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow]$ (фиг. 1 и 4A) (McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980; O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Albersheim *et al.*, 1996; Yapo *et al.*, 2007). Обикновено дялът, който заема тази структура от общия РГ-I е ~30% (Lerouge *et al.*, 1993). Въмъкването на L-Rhap в основния скелет поражда конформационни изменения в него, често описвани като „чупки“, „усуквания“ или „изкълчване“ (kinking and buckling function) (фиг. 4A) (Rees & Wight, 1971; Talmadge *et al.*, 1973).



Фигура 4. Схематично представяне на структурата на основния скелет на рамногалактуронан тип I (A) и прикрепените към него странични вериги от неутрални захари: галактан (B); арабиногалактан тип I (C); арабиногалактан тип II (D); разклонен арабинан (E). За простота са илюстрирани по-къси странични вериги, но обикновено дължината им може да варира от 1 до 50 единици.

Едни и същи рамногалактуронанови олигомери са получени от различни източници, като цитруси, ябълки и цвекло, което потвърждава фундаменталната му роля. Дължината на тези вериги варира от 3-10 повторения на GalpA-Rhap димера при пектина от захарно цвекло до 200-300 звена при пектин от яворово дърво. Не е ясно дали в процеса на кисела екстракция основната верига не се разрушава и това да води до подценяване дължината на този фрагмент (Darvill *et al.*, 1985; Renard, Crépeau, & Thibault, 1995; Schols & Voragen, 2002; Voragen *et al.*, 2009). Степента на полимеризация е оценена на 2000, а молекулната маса от около 200 kDa при пектина от обикновен явор до около 700-900 kDa при този получен от ленени стъбла (Darvill *et al.*, 1985; Albersheim *et al.*, 1996; Yapo, 2011d). Отношението Rhap:GalpA варира от 0.05 до 1.0, което показва, че не винаги техните количества са равни. Но според общоприетите схващания това се дължи на остатъци от неразграден ХГ (Schols & Voragen, 2002; Yapo, 2011d).

Според някои автори липсват доказателства за естерифицирани GalpA звена в богатите на Rhap региони в пектина, но за сметка на това са ацетилвани на строго специфично място. Например, обработването на клетъчни стени, изолирани от моркови, памук, тютюн и домати с безводен HF и последващо пречистване, води до натрупването на неацетилвани и ацетилвани само на O-3 място димери (Komalavilas & Mort, 1989; Lerouge *et al.*, 1993; Ridley, O'Neill & Mohnen, 2001). Изчислено е, че наличието на ацетилни групи, както на O-2, така и O-3 места е енергетично благоприятно, като най-важният принос идва от ацетиловата група на O-2 положение (Schols, Posthumus, & Voragen, 1990; Schols & Voragen, 2002). В по-нови изследвания чрез MALDI-TOF маспектрометрия е показано наличието на ацетилвани, предварително получени чрез пречистени ензими, рамногалактуронанови олигомери от пектина на бамя. ESI-IT маспектърът показал, че не само галактуронозилните звена са ацетилвани, но и рамнозилните и то специфично на O-3 позиция (Sengkhamparn *et al.*, 2009).

В зависимост от произхода на клетъчната стена от 20% до 80% (най-често 50%) от (1→2)-свързаните рамнозилни звена се разклоняват на O-3 и O-4 позиция (най-често срещано), като образува т. нар. Y-образна точка на разклонение (фиг. 4A). Видът и количеството на страничните вериги, в състава на които влизат арабинозни и/или галактозни остатъци, зависят от вида на суровината и екстракционния метод (Lerouge *et al.*, 1993; O'Neill & York, 2003). Големината на тези разклонения варира от 1 до 50 и повече гликозилни звена (McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980, 1982; Mohnen, 1999; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Schols & Voragen, 2002; Caffall & Mohnen, 2009). Не е установен универсален модел в реда и начина на подреждане на разклонените и неразклонени рамнозилни остатъци, но се счита, че разпределението им върху основния скелет не е случайно (Darvill *et al.*, 1985; Schols & Voragen, 2002).

Обикновено GalpA не са заместени с единични или олигозахаридни вериги, но през последните години това твърдение е опровергано, след като Renard, Crépeau, & Thibault (1999) показали директното свързване на β -D-GlcpA към O-3 на 2% от GalpA звена в РГ-I област на цвекловия пектин (фиг. 4A). Това предположение беше доказано и допълнено с някои подробности съвсем скоро с работата на Leijdekkers *et al.* (2015). Те показаха наличието на изомерни пектинови олигозахариди, в които GlcpA е свързана директно към

GalpA на O-2 или O-3 позиция, а също така и възможността за едновременното присъствие на ацетилна група и GlcpA, като заместители.

1.4.2.1 Странични вериги, влизащи в състава на рамногалактуронан I

Естеството на страничните вериги, прикрепени към O-4 положение на разклонените рамнозилни остатъци, е все още под въпрос, т.к. според някои автори са известни най-малко седем различно свързани гликозилови остатъци към това място на основната верига (McNeil, Darvill, & Albersheim, 1982). На проверка подлежи дали РГ-I е отделен полимер с голям брой различни странични вериги или е семейство от съвместно изолирани и пречистени полизахариди, всеки от които притежава един и същ основен скелет, но различни набори от странични вериги.

Към настоящия момент в литературата е залегнало схващането, че ролята на странични вериги в РГ-I се изпълнява от олиго- и/или полимерни вериги, като арабинани (арабани), линейни и/или разклонени хомогалактани и арабиногалактани (тип I, II и III) (Beldman *et al.*, 1997; Mohnen, 1999; Schols & Voragen, 2002; O'Neill & York, 2003; Vincken *et al.*, 2003; Voragen *et al.*, 2009; Yapo, 2011d). Според Caffall & Mohnen (2009) страничните вериги са изградени основно от един тип арабинани и три типа галактани, като към последните са причислени и различните типове арабиногалактани, които са известни към момента.

1.4.2.1.1 Арабинани

Арабинаните са омрежени хомополизахариди с основна верига съставена от α -L-Araf остатъци свързани посредством (1 \rightarrow 5)-гликозидни връзки помежду си. Възможно е към арабинозилните звена от основната верига, чрез (1 \rightarrow 2) и/или (1 \rightarrow 3) гликозидни връзки, да са закачени от едно до три α -L-Araf олигомерни звена (фиг. 4E). Възможността за прикрепяне в края на арабинановата веригата на α -(1 \rightarrow 5)-свързана Agar е показана от Wefers, Tyl, & Bunzel (2015). Молекулната маса на някои арабинани може да достигне до 10 kDa, а количествата им в клетъчни суспензионни култури на обикновен явор-10%. Дължината на арабинановите вериги, както и тяхната степен на омрежване зависят от растителната суровина и екстракционния подход. Напр. третирането на РГ-I от обикновен явор с *endo*-арабинаназа, води до натрупването на серия от арабинозо-съдържащи

олигомери със СП от 2 до 20 (Talmadge *et al.*, 1973; Lerouge *et al.*, 1993). Други автори не изключват възможността за още по-голяма СП (100-200 общо, от които 50-80 в състава на линейната верига) (Yapo, 2011d). За описание структурата на някои арабинани е въведен т.нар. „comb-like“ модел. Арабинани в свободна и в прикрепена към пектина форма са намерени в клетъчните стени на ябълки, захарно цвекло, рапица, кайсии, домати, моркови, зеле, пашърнак, соя, круши, грейпфрут, карамбола и др. (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Schols, Posthumus, & Voragen, 1990; Beldman *et al.*, 1997; Mohnen, 1999; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Schols & Voragen, 2002; Voragen *et al.*, 2009; Leivas, Iacomini, & Cordeiro, 2015).

1.4.2.1.2 Хомогалактани

Този вид странични вериги са изградени от β -D-Galp монозахаридни звена свързани помежду си чрез (1 \rightarrow 4)-гликозидни връзки и заемат ~8% от клетъчните стени, получени от обикновен явор (Talmadge *et al.*, 1973; McNeil, Darvill, & Albersheim, 1982; O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990). Обикновено се приема, че са линейни хомополизахариди и СП се движи в обхвата от 2 до 50 звена, но Yapo (2011d) описва случай, в който от тютюневи листа е получен галактан с изключително висока СП от 370. Показана е и възможността за прикачването на малък брой къси D-Galp остатъци чрез β -(1 \rightarrow 6) гликозидни връзки към основния скелет (**фиг. 4B**). Такъв чист галактан е изолиран от лупина, картофи, слънчогледови пити, соеви зърна и тютюн, но като цяло се среща рядко (Schols & Voragen, 2002; O'Neill & York, 2003; Caffall & Mohnen, 2009).

1.4.2.1.3 Арабиногалактани тип I и II

Пектинът, в състава на който е намерен АГ-I, е изолиран от цитрусови плодове, картофи, ябълки, киви, лук, зеле и др. Този тип е застъпен в растителната тъкан и най-често асоцииран с пектиновия РГ-I фрагмент (Caffall & Mohnen, 2009). Главната верига представлява линеен галактан, изграден от β -D-Galp остатъци свързани помежду си с (1 \rightarrow 4)-гликозидни връзки. Към главната верига на O-3 позиция са прикрепени мономерна α -L-Araf и/или къси вериги съставени от α -(1 \rightarrow 5)-свързани помежду си Araf остатъци (**фиг. 4C**) (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009; Yapo, 2011d). Оказва се, че структурното разнообразието на този тип странични вериги, присъстващи в соевите ПВ, е

доста по-голямо, отколкото може да се предположи. Резултатите на [Huisman et al. \(2001\)](#) показват недвусмислено наличието на β -(1→4)-D-Galp олигозахариди, носещи крайно свързана (от нередукциращия край) Agar и смес от линейни олигогалактозни остатъци, примесени във вътрешността с (1→5)-свързани Araf звена. Средната дължина на тези странични вериги достига 45-50 остатъка. Наличие на крайно свързана Agar към галактани и арабинани от семена на щир е доказано от [Wefers, Tyl, & Bunzel \(2015\)](#).

Чрез използване на специфични галактанази и различни 2D ЯМР експерименти е показано наличието и на β -(1→3)-галактозилни остатъци във вътрешността на АГ-I от картофи, наред с обичайно присъстващите β -(1→4). Съотношението между двата вида връзки е оценено на ~160 (картофи, соя и цитруси) и 250 (лук), което показва, че този изключително рядко срещащ се тип връзка е общовалидна структурна характеристика за АГ-I. Авторите предполагат, че това може да се дължи на „грешка“ в биосинтеза на този тип фрагменти ([Hinz et al., 2005](#)).

В листата на стевия е намерена друга нетипична структурна разновидност на този тип арабиногалактани. Основната верига е образувана от β -(1→6)-свързани помежду си D-Galp остатъци, като 38% от тях се разклоняват на O-3 позиция с мономерна Galp или арабианова странична верига. В последната е намерено, че L-Ara мономерите заемат крайни позиции, както във фуранозна, така и в пиранозна форма и са свързани помежду си чрез 2-, 5-, и 3,5-гликозидни връзки ([De Oliveira et al., 2013](#)).

Поради сходства в структурата им някои автори не правят строго разграничение между този тип арабино-4-галактани и разгледаните хомогалактани ([Schols & Voragen, 2002](#)).

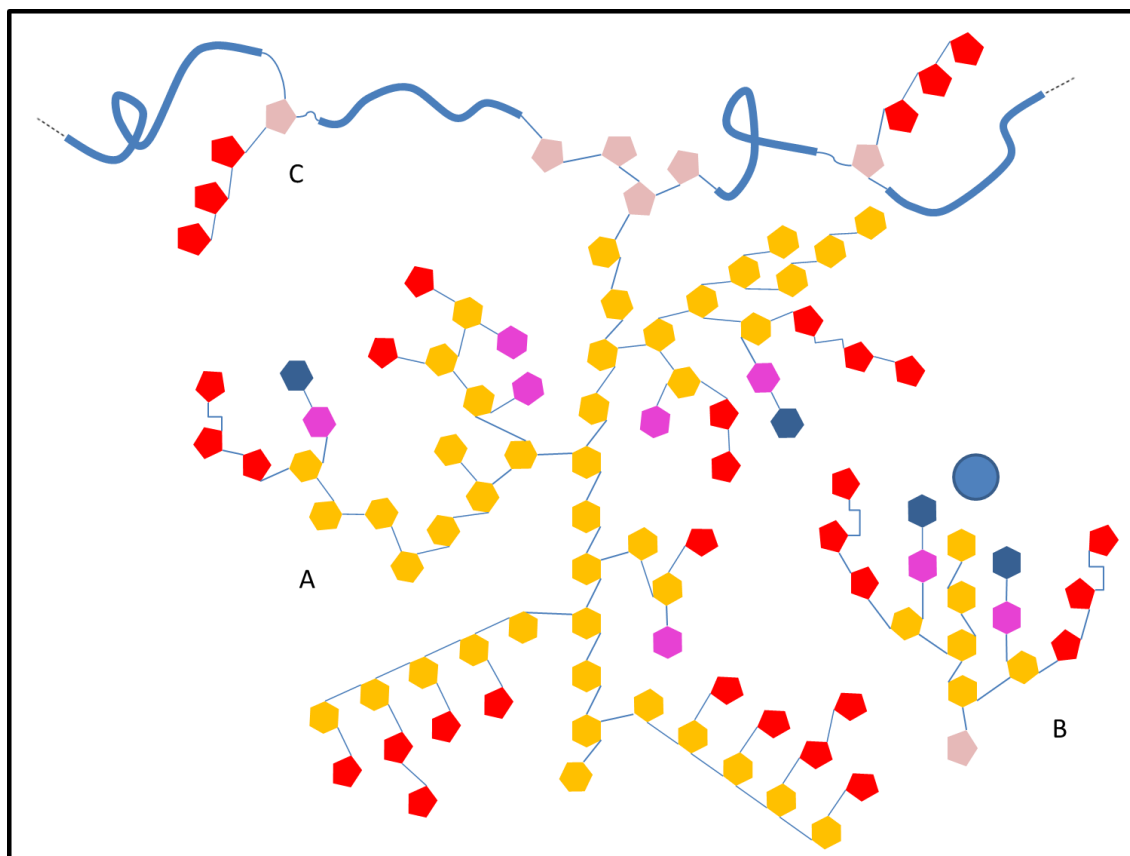
Арабиногалактановите ПЗ тип II са по-разпространени от гореописаните. Срещат се най-вече в листата, стъблата и корените на растенията. АГ-II е силно омрежен галактан, чиято основна верига се състои от D-Galp звена свързани чрез (1→3)-гликозидни връзки. Във вътрешната част на веригата преобладава (1→3) тип свързване, а (1→6) се среща главно във външните участъци (**фиг. 4D**). При някои ПЗ от този тип основната верига може да бъде съставена от 25 до 200 мономерни единици. В повечето от случаите към моно-, ди- и три-Galp разклоненията, чрез (1→3)- или (1→6)-гликозидни връзки, могат да са прикачени α -L-Araf и в по-малка степен β -L-Arap ([Fincher, Stone, & Clarke, 1983](#); [Schols & Voragen, 2002](#); [Caffall & Mohnen, 2009](#); [Voragen et al., 2009](#); [Yapo, 2011d](#)). Външната част

на веригата завършва с L-Araf звена свързани помежду си пък с (1→3) гликозидни връзки. Наличието на по-дълги олигомерни вериги, изградени от Galp и Araf звена, свързани помежду си чрез 3,4,6-, 2,3,6-, 3,4-, 3,6- и 3-връзки, също са основен компонент на този тип странични вериги (фиг. 4D и 5A). Молното съотношение между Gal:Ara е ~6:1, но са намерени също 10:90 и 85:15. Молекулната маса на този тип странични вериги не надвишава 120 kDa (Fincher, Stone, & Clarke, 1983; Pal, 2008).

В растенията АГ-II е често асоцииран с протеини, като образува отделен клас протеоглигани, наречен арабиногалактан-протеини. Заедно с екстензина и някои лектини, те образуват групата на структурните богати на Нур гликопротеини. Повечето от тях са намерени в първичната клетъчна стена и в пространствата около нея. Според вида на техния протеинов скелет те се подразделят на „класически“ и „некласически“ (Pal, 2008). „Класическите“ АГП притежават специфична гликозил-фосфатидилинозитолна опашка, с която се закрепват към цитоплазмената мембрана. АГП са с висока молекулна маса (~100-300 kDa). Белтъчната част заема от 2 до 10%, като най-голямо е съдържанието на аминокиселините Pro, Нур, Ala, Ser и Thr (Lamport & Northcote, 1960; Fincher, Stone, & Clarke, 1983; Gaspar *et al.*, 2001; Pal, 2008). В *Arabidopsis thaliana* дължината на полипептидната верига достига от 10 до 369 АК, а при други до 739 (Lamport, Varnai, & Seal, 2014). Полимерната въглехидратна молекула е закачена към белтъчната компонента чрез алкално стабилна гликозидна връзка между β -D-Galp и Нур (фиг. 5A). Приема се, че няма значителна разлика в състава и структурата на въглехидратната част на АГ-II и АГП, но в състава на последния са намерени някои особености (Du, Clarke, & Bacic, 1996; Showalter, 2001). Освен познатите Galp и Araf се съдържат и др. захари в по-малки количества (mol%), като L-Rhap (<11%), L-Fucp, D-Manp (<16%), D-Xylp (<7%), D-Glcp (<4%), D-GlcpA (<28%) и D-GalpA (<26%). Тези захари влизат в състава на страничните АГП вериги, както и в т.нар. Нур-АГ субединици, които са широко разпространени и имат сравнително проста, консервативна, бифуркетна конструкция от (Araf)₃-Galp-(Rhap-GlcpA) (фиг. 5A и 5B) (Tan *et al.*, 2010). Наличието на GlcpA, свързваща по-здраво Ca²⁺ йони, отколкото GalpA на пектиновия ХГ, отнежда, вероятно, допълнителна роля на АГП, като резервоар на Ca²⁺ йони за клетката (Lamport, Varnai, & Seal, 2014). По подобие на екстензина (прил. 3.1), към някои АГП са прикрепени къси арабинозни олигозахариди от

типа Нур-(Агаф)₃ (фиг. 1; фиг. 5А и 5С) (Fincher, Stone, & Clarke, 1983; Gaspar *et al.*, 2001; Showalter, 2001).

Добре познат пример за АГП, при който по-голямата част (>90%) се пада на въглехидратния остатък, е гума арабика от *Acacia senegal*, както и този получен от лиственица (р. *Larix*) (Schols & Voragen, 2002; Pal, 2008). Арабино-(1→3,6)-галактанови ПЗ и комплексите им с протеини са изолирани също от някои лечебни растения, като *A. acutiloba*, *Echinacea purpurea*, *Panax giseng*, *Vupleurum falcatum* и др. (Yamada *et al.*, 1985; Yamada & Kiyohara, 2007).



Фигура 5. Схематично представяне на арабиногалактан тип II-протеин, изграден от галактанов гръбнак, прикрепен към полипептидна верига, и странични вериги, съдържащи Agar, Rhap, GlcpA (А); O-Нур-арабиногалактанова субединица с фуркетна форма, взаимодействаща с Ca²⁺ йони (В); Иминокиселината Нур от полипептидната верига е гликозилирана с арабинотриозилни остатъци (С).

Все още не е ясно и се дискутира дали тези ПЗ са част от пектиновата макромолекула (Immerzeel *et al.*, 2006). Поради добрата си водоразтворимост е възможно те да се ко-екстрахират с пектина и впоследствие да се премахват трудно от РГ молекула (Mohnen, 1999; Vincken *et al.*, 2003; Voragen *et al.*, 2009; Yapo, 2011d). Поради тази причина някои

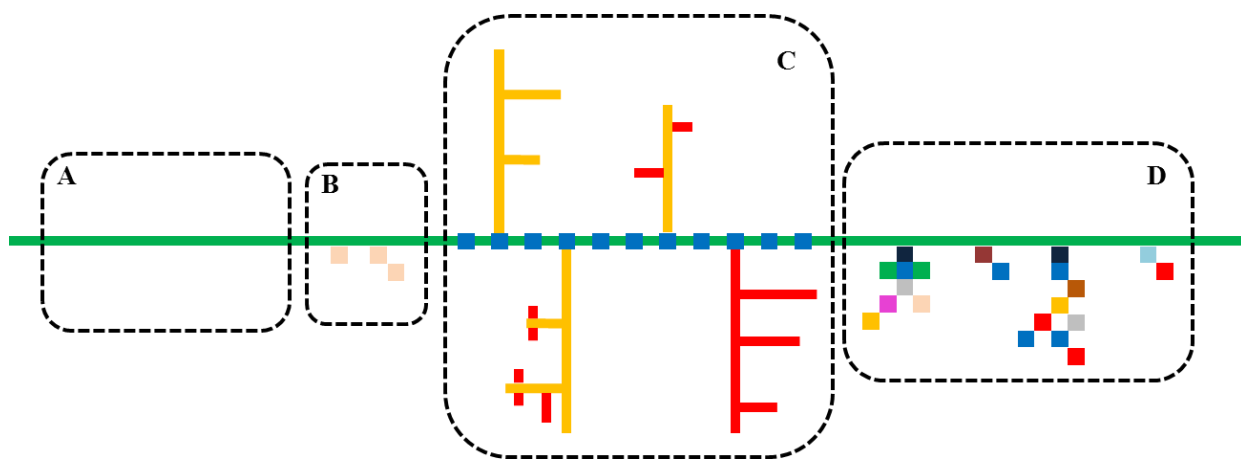
учени обособяват трети тип от АГ, към който се причисляват ПЗ, които съдържат АГП, като странична верига (Beldman *et al.*, 1997; Yamada & Kiyohara, 2007).

За разграничението на АГП от останалите ПЗ, както и за доказване принадлежността на неизследван ПЗ към тази група, са въведени три основни критерия: а) присъствие на АГ-П вериги; б) високо съдържание на Нур в белтъчната компонента и в) способност да се свързват към специален клас синтетични фенил-азогликозидни багрила (β -Glc)3Y (реактив на Yarıv) (Fincher, Stone, & Clarke, 1983; Du, Clarke, & Bacic, 1996; Showalter, 2001).

За описване структурното многообразие на тази голяма група ПЗ са предложени два основни модела: „разцъфнал плет“ („wattle-blossom“) и „усукано космато въже“ („twisted hairy rope“). Съществува и по-нов модел, в който АГП се представят, като „богато украсена огърлица“ („necklace“). Илюстрация на тези модели, както и по-подробно обяснение могат да бъдат намерени в цитираната по въпроса литература (Fincher, Stone, & Clarke, 1983; Du, Clarke, & Bacic, 1996; Showalter, 2001; Lamport, Varnai, & Seal, 2014).

1.5 Модели, описващи макромолекулния строеж на пектиновите вещества

С увеличаването на информацията относно ПП се демонстрира тяхната твърде комплексна структура, която трудно би могла да бъде обобщена в един единствен структурен модел (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Albersheim *et al.*, 1996; Voragen *et al.*, 2009). Приема се, че основните структурни елементи, като ХГ, РГ-I и II са ковалентно свързани помежду си, образувайки една обща мултиполимерна структура. Все още, обаче липсва единомислие относно начина на свързване между отделните фрагменти и останалите компоненти на клетъчната стена (**фиг. 6 и 7**) (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; O'Neill & York, 2003; Vincken *et al.*, 2003; Caffall & Mohnen, 2009; Yapo & Gnakri, 2014). В допълнение е показано, че КГ е също ковалентно свързан към ХГ и е част от пектина, намираща се в близост до РГ-I (Schols *et al.*, 1995; Yu & Mort, 1996; Schols, Coenen, & Voragen, 2009). Аранжирането на тези структурни фрагменти се описва с два основни модела, като през последните години някои учени предлагат и възприемат някои модификации и комбинации от тях (**прил. 2; фиг. 6 и 7**) (Vincken *et al.*, 2003; Schols, Coenen, & Voragen, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Buffetto *et al.*, 2014; Yapo & Gnakri, 2014).



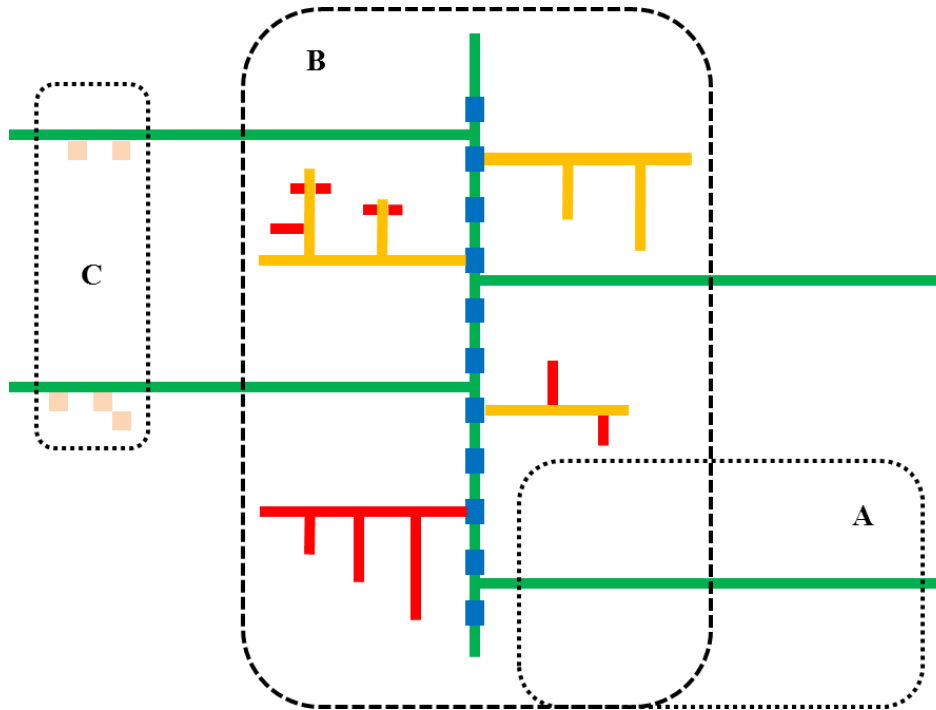
Фигура 6. Схематично изобразяване на предполагаемия модел на редуващи се „гладки“ и „космати“ области. ХГ (А); КГ (В); РГ-I със странични вериги от НЗ (С); РГ-II (D).

Първият модел, представен на фигурата по-горе, е своеобразна линейна комбинация от различните пектинови структурни фрагменти, които бяха разгледани досега. В състава на линейните региони влизат ХГ и неговите заместени производни (фиг. 6А, В и D), а т. нар. „космата“ област се формира от РГ-I основен скелет и прикрепени към него олиго- или полимерни вериги от НЗ (фиг. 6С) (De Vries *et al.*, 1981, 1982; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Schols & Voragen, 2002).

Този модел притежава редица „слабости“, като напр. невъзможността да обясни повишената КГ разградимост след отстраняването на ХГ чрез *endo*-ПГ, както и слабото понижение на мол. маса след *endo*-действаща КГХ, съчетано с освобождаването на значителни количества ксилоолигоуроници от *exo*-ПГ. Подробен структурен анализ на РГ олигомери, съдържащи арабинанови и АГ вериги, разкрива, че след отстраняването на последните *endo*-ПГ може да освободи допълнително количество „чисти“ олигогалактуроници, които като че ли не са интегрална част от РГ областта. Съществуването на излишък от GalpA предполага и наличие на повече ХГ вериги на един РГ-I. Напр. пресметнато е, че средно 17 ХГ блока се падат на едно РГ-I ядро при киселинно-екстрахиран лимонов пектин и 8 ХГ на 1 РГ-I при този от захарно цвекло (Ralet & Thibault, 2009). При това не са открити предполагаемите олигомери, след *endo*-ПГ действие, които да съдържат единична L-Rhap (Vincken *et al.*, 2003; McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980; Voragen *et al.*, 2009).

„Преодоляването“ на трудностите, както и намирането на обяснение на редица експериментални факти, става след приемането на втория модел на „страничните вериги“

(Vincken *et al.*, 2003; Voragen *et al.*, 2009). В него ХГ е поставен като странична верига на основния РГ-I скелет, като фрагментът може да бъде закачен или към L-Rhap, или към GalpA на РГ-I (фиг. 7А и В).



Фигура 7. Схематично изображение на модела със „страничните вериги“, познат и като модел на „РГ-I, като основна верига“. ХГ, като странична верига на РГ-I (А); основна верига от РГ-I и прикрепени странични вериги от НЗ (В); КГ (С).

Структурните различия в двата модела трябва да водят до разлики в хидродинамичните свойства на пектина, както и до неподатливостта му на ензимна атака, водеща до изменения в механичните свойства и цялостта на клетъчната стена. Напр. според втория модел трябва да се очаква по-малък хидродинамичен обем, но също така и по-голяма пектизна резистентност, поради силно „заселените“ с НЗ РГ-I региони. Според този модел структурните различия в отделните пектини се дължат както на различния баланс между ХГ и РГ-I, така и в различното „декориране“ на свръхпроменливия РГ-I скелет (Ralet & Thibault, 2009). Наличието на доказателства, подкрепящи двата модела, води до съставянето на трети комбиниран модел на „страничните вериги и косматите области“, който все още не е всеобщо приет. При него ХГ присъства заедно с РГ-I в основния скелет, а също така и като странична верига в РГ-I региона (прил. 2) (Ralet & Thibault, 2009; Schols, Coenen, & Voragen, 2009).

Илюстрация на „алтернативен“ модел може да бъде видяна допълнително в **прил. 2.1.**

1.6 Омрежване и взаимодействие на пектиновите полизахариди с други компоненти на растителната клетъчна стена

Полизахаридите заемат приблизително 90% от с.в. (от тях 20-30% са целулоза и 35% ПП) на клетъчните стени. Освен това те не са самостоятелни компоненти, а са заобиколени от други съставки, като (глико)протеини, фенолни естери и минерали. Техният дял обикновено не надхвърля 10% от с.в., но противно на това тяхното взаимодействие с пектина играе значителна роля при формирането, растежа и поддържането цялостта на клетъчната стена (Darvill *et al.*, 1985; O'Neill & York, 2003). Различните типове взаимодействия трябва да се имат предвид както при разглеждането на структурата и свойствата на пектина, така и при съставянето на модели, описващи структурата на клетъчните стени, т.к. това води до изграждането на по-обективна представа за тях (Keegstra *et al.*, 1973; Jarvis, 2011).

В пектиновата химия се разглеждат два основни типа взаимодействия – вътре- (между отделните пектинови фрагменти) и междумолекулни (на пектина с останалите съставки на кл. стена). При това се срещат ковалентни връзки, към които се причисляват различни гликозидни, естерни (уроноилни и ферулоилни), етерни и бифенилни (при окислително омрежване на феноли), етерни (ферулоил-ПЗ) и борат-диолни връзки. Към нековалентни връзки се включват образуването на йонни Ca^{2+} мостове, водородни и хидрофобни връзки, йонни връзки между ПЗ и белтъци и някои др. (Fry, 1986; Iiyama, Lam, & Stone, 1994; Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Voragen *et al.*, 2009; Jarvis, 2011; Zaidel & Meyer, 2012).

Два пектинови ХГ образуват йонни връзки със свободните карбоксилни групи и наличните Ca^{2+} йони по модела „egg-box“. Това са едни от най-застъпените връзки, чрез които може да се осъществи свързването на антипаралелни ХГ сегменти на отделени една от друга пектинови молекули в т. нар. „зони на свързване“ (**фиг. 2В**).

Част от пектина не се разтваря при обработката с буферни и хелатиращи агенти, но след третиране с разтвори на основи, се освобождават фракции, което показва, че съществуват неметил-естерни групи между карбоксилната група на GalpA и алкохолните

групи на някои гликозилни остатъци. Предполага се, че чрез такъв тип уриноилни връзки се извършва свързването на ПП с други ХГ фрагменти, както и с останалите ПЗ на клетъчната стена, като целулоза и хемицелулози. Показано е, че ~5% от GalpA остатъците в пектина от спанак имат потенциал за omрежване. Подобен тип преплитане е доста вероятен, имайки предвид способността на ПМЕ да катализира реакции на *trans*-естерификация и ацилиране, енергия за които черпи от съществуващата метил-естерна връзка. (Fry, 1986; Voragen *et al.*, 2009; Jarvis, 2011; Zaidel & Meyer, 2012).

Съществуват убедителни доказателства за присъствието на тетравалентна 1:2 борат-диолна връзка в кл. стени на покритосеменни и голосеменни растения, чрез която се осъществява свързването на две молекули РГ-II и образуването на димер (**фиг. 3С.2** и **прил. 3**) (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; O'Neill & York, 2003; O'Neill *et al.*, 2004; Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Yapo, 2011c; Zaidel & Meyer, 2012). Единственият монозахарид в РГ-II, който има β -D-*erythro*-фуранозна конфигурация и е „способен“ на такова свързване е Аp1 (**фиг. 1**). Апиозилните остатъци са 3'-свързани в РГ-II мономера, но в димерната му форма поне 30% от тях са 2,3,3'-свързани, което показва, че O-2 и O-3 на два от четирите 3'-свързани звена в димерния РГ-II са свързани чрез боратни йони (1:2). С помощта на селективна киселинна хидролиза на пер-O-метириани РГ-II димери е доказано, че участие в omрежването на този фрагмент взимат O-2 и O-3 от апиозилните остатъци на 2-O-Me-Xylp-съдържащата странична верига (**фиг. 3С.2**), но не и Аp1 от другата. Приема се, че този тип omрежване е обратимо и се извършва спонтанно (самостоятелно) *in muro*, и то с участието само на един боратен йон, т.к. е наблюдавано *in vitro* и в отсъствие на ензими. Интересно е да се отбележи, че ~95% от РГ-II в растения от „див тип“ е в димерна форма, докато при някои мутантни типове (*Mur1-1*, *Mur1-2*) на *A. thaliana* димерната форма достига само 50% (Ridley, O'Neill, & Mohnen, 2001; Caffall & Mohnen, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Buffetto *et al.*, 2014). Възможността за образуване на димери и в присъствието на някои тежки и редкоземни метали (Pb^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , La^{3+} , Eu^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+}), при определено рН, е също отбелязана (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Vincken *et al.*, 2003). Предвид състава и подходящата конфигурация на някои други пектинови сегменти (апиогалактуронан; **фиг. 3В**), наличието на подобен тип връзка между тях е също доста вероятно (Jarvis, 2011).

В ПЗ от някои двуседелни, като спанак и цвекло, е показано присъствие на 1 ферулоилен естерен заместител на всеки 250 гликозилни остатъка. Те заемат ~0.5% от кл. стени, като феруловата киселина се свързва към нередуциращия край на НЗ, като *Araf* и/или *Galp*. При хидролиза с *Driselase*[®], в която липсва ферулоил естеразна активност, се генерират два основни ферулоилрани фрагмента: *FerA-6-D-Galp-(1→4)-D-Galp* и *FerA-3-L-Arap-(1→3)-Araf*, които заемат 60-70% от общото ферулатно съдържание в стените (**фиг. 1**) ([Wong, 2006](#)). В цвекловите първични стени феруловата киселина (45-50%) е закачена към *O-6* позицията на *Galp* единици от хомогалактаните. Предполага се, че ферулоилните естери са обект на пероксидазно и/или лакказно-катализирано окислително свързване помежду си, при което се образуват вътре- и междумолекулни диферулоилни мостове ([Oosterveld et al., 1997](#)). Феруловите дехидродимери заемат 22% от общото ферулно съдържание в пектина от захарно цвекло. Няколко типа дехидродимери (8-*O-4'*, 5-5', 8-5' (и в бензофуранова форма), 8-8', 4-*O-5'*) са изолирани и пречистени от клетъчни стени, като техните количества варират значително в зависимост от източника ([Oosterveld et al., 1997](#); [Ralet et al., 2005a](#); [Wong, 2006](#); [Zaidel & Meyer, 2012](#)). Допуска се, че чрез такива мостове се осъществява връзката както между отделните пектинови субфрагменти (РГ-I, АГ-I, арабинани), така и между отделните ПЗ в първичните стени (пектин с хемицелулози и др.) (**фиг. 4В** и **4Е**). Вероятно диферулоилните мостове са отговорни за редукцията на клетъчния растеж, резистентността към екзопатогени, както и за екстрахируемостта на ПП. Също така се счита, че те играят съществена роля при лигнификацията и осъществяват пряката връзка на ПЗ с лигнина ([Iiyama, Lam, & Stone, 1994](#); [Ralet et al., 2005a](#)).

Независимо от относително малкото си съдържание протеините са повсеместно застъпени в кл. стени. Все още предположенията за директна ковалентна връзка, образувана чрез димеризация между ферулоил-естерните групи и АК Тур, Phe (ароматни) и Cys са твърде спекулативни ([Iiyama, Lam, & Stone, 1994](#)). Не са намерени и преки доказателства за формирането на amidна връзка между неестерифицираната –COOH група в *GalpA* и свободната –NH₂ групата в някои АК (Lys, Asn). Противно на това е установено, че повечето от протеините съдържат богати на Тур последователности, които биха могли да се включат в образуването на изодитиризинови димери (аналогични на фенолните димери), които да осъществяват междумолекулното omрежване на самите белтъци ([Fry, 1986](#); [Iiyama, Lam, & Stone, 1994](#)). Същевременно [Qi et al. \(1995\)](#) привеждат редица

доказателства в подкрепа на твърдението си за ковалентна връзка между екстензина и пектиновия РГ-I. Напр. при премахване на значителна част от ПЗ (>90% GalpA, целулоза, хемицелулози и др.) компоненти на кл. стени, ~100% от екстензина остава все още неразтворим. Едновременно с това почти 30% от Rhap, изграждаща близо 1/3 от РГ-I, остава също неразтворима. Допълнителната обработка с трипсин довежда до солубилизиране на ~50% от екстензина и на 2% от остатъчната Rhap. Според авторите най-простото обяснение е, че протеинът задържа част от пектиновия РГ-I. Според тях две хипотези за начина на свързване биха били правдоподобни и доказуеми: връзка чрез арабино-3,6-галактани, както е предложил още [Keegstra et al. \(1973\)](#), или чрез фенолно омрежване между ферулоилираните захарни остатъци в пектина и някои ароматни АК от протеина. [Immerzeel et al. \(2006\)](#) използват преципитацията с $(\beta\text{-Glc})_3\text{Y}$ и Cu^{2+} йони, за да получат АГП фракции от моркови, съдържащи големи количества от GalpA. Според тях това е индикация за вероятна ковалентна връзка между този тип АГ и пектиновия ХГ.

Не е известно дали протеин-пектиновите взаимодействия се основават само на специфични химични връзки и дали физичното оплитане не играе също роля в това. Последното е доста вероятно поради високата молекулна маса, която притежават полимерите и наличието на междумолекулни примки, сформирани чрез изодитиризиновите мостове ([Fry, 1986](#)). Поради множеството хидроксилни и заредени групи ($-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_3^+$ и др.) е възможно образуването на многобройни водородни и йонни връзки.

1.7 Биологична активност и фармакологични ефекти на пектиновите полизахариди

Полизахаридите, изолирани от растения, са обект на изучаване от дълго време, фокусирайки се главно върху техните физични и химични отнасяния. В резултат на дългогодишната употреба на тези вещества са наблюдавани редица биологични явления и фармакологични ефекти, като хемостатичен ефект, бързо заздравяване на рани, благотворно влияние върху стомашно-чревния тракт и др., които са били бързо оценени. С това ПП намират своето практическо приложение в медицината ([Kertesz, 1951](#)). Още повече те са основен компонент и неделима част от храната на човека през всички етапи на еволюционното му развитие ([Ovodov, 2009](#)). Те се съдържат в добре познати отдавна със

своя лечебен ефект растения (билки, плодове и зеленчуци), които се използват в народната медицина (Paulsen & Barsett, 2005; Yamada & Kiyohara, 2007). Независимо от това едва модерната наука демонстрира, че ПЗ, способни да формират гел или вискозни разтвори, показват различна по естество биологична активност. През последните 30 години нараства интереса не само към биологичните им свойства, но и към стремежа за намиране на точното им научно обяснение. Според Wagner & Kraus (2000) главните причини за късното развитие на този аспект се дължат на: липсата на подходящ метод за изолирането и пречистването на достатъчни количества от чист биоактивен полизахарид по възпроизводим начин; неизвестна връзка между структура и активност, главно защото наличните методи за тестване на активност са незадоволителни; липса на информация за точния механизъм на действие на имуномодулаторите; липса на информация, касаеща фармакокинетиката и бионаличността след перорален и парентерален прием на полимери. Изучаването им става възможно благодарение на разработването и навлизането на методи за по-пълно изолиране, пречистване и охарактеризиране на природните полимери, а едновременно с това се откриха чувствителни *in vitro* методи за оценка на ефекта им върху имунната система.

Пръв Braconnot обърнал внимание на възможността и предложил евентуално медицинско приложение на приготвените от него пектинови желета, като детоксиканти по отношение на тежките метали (Braconnot, 1825b). Много по-късно учените инициират разнообразни изследвания по отношение на комплексообразователните свойства на пектина спрямо тежки метали (Pb, Hg, As, Cd). Stantshev *et al.* (1979) препоръчали приема (8-10 g/d) на гранулиран ябълков пектин (CE 48%) за профилактика и лечение на сатурнизма сред работници, след като установили, че средните нива на Pb в урината на опитната група, се покачили (от 115 на 167.08 µg/L) достоверно в рамките на 30-дневния лечебен курс. Khotimchenko & Kolenchenko (2007) провели изследване с нискоестерифициран пектин върху плъхове, получаващи вътрестомашно оловен ацетат (100 mg/kg). Данните показали, че пектинът ефективно стимулира освобождаването на Pb от вътрешните органи и спомага за нормализирането на биохимичните параметри на черния дроб. Допълнителни клинични изследвания потвърждават значителната редукция на Pb, As и Cd след прием (3×5 g/d) на търговски ензимно-третиран ЦП (PectaSol® и др.) от деца и възрастни, като това не оказва влияние върху нивата на есенциалните

микронутриенти (Eliaz *et al.*, 2006; Eliaz, Guardino, & Hughes, 2006; Zhao *et al.*, 2008). Авторите обясняват това явление с наличието на GalA олигомери и РГ-II фрагменти. Ролята на РГ-II е изучена допълнително, като е показано, че РГ-II е способен да образува специфични димери не само с В, но и с някои тежки и редкоземни (лантаниди) метали (Pb, Ba, Sr, La, Eu, Ce, Pr, Nd). Интересно е, че йони на метали от алкалоземната група не са ефективни в това отношение (Pellerin & O'Neill, 1998). Известно е също, че именно този фрагмент редуцира значително интестиналното акумулиране на Pb *in vivo* (при плъхове), но не повлиява абсорбцията на Mg, Zn и Fe (Tahiri *et al.*, 2000). Необходимо е в бъдеще да се определи как и под каква форма РГ-II се включва в кръвния поток.

Способността на пектина да премахва металните йони и на някои радиоактивни изотопи е също демонстрирана. В двойно-сляпо, плацебо-контролирано проучване, нивата на радионуклида ¹³⁷Cs намалели с 62.6% след като деца консумирали в продължение на 3 седмици ябълков пектин (5 g/d) заедно с радиоактивно „чиста“ храна. Контролната група понижила нивата на ¹³⁷Cs само с 13.9% (Nesterenko *et al.*, 2004).

В редица изследвания е проучена антимицробната активност на ябълков, лимонен или търговски ЦП и хидролизати от тях срещу най-често срещаните бактериални причинители на стомашно-чревни заболявания, като *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Според авторите по-голяма активност проявяват пектиновите хидролизати, отколкото нативният пектин. Въпреки, че механизмът не е напълно установен е доказано, че фактори, като СЕ, СП (<10) на получените олигомери и концентрацията им повлияват върху антибактериалната активност (El-Nakeeb & Yousef, 1970; Li, Yamauchi, & Kato, 1997; Daoud, Sura, & Abdel-Massih, 2013; Wu *et al.*, 2014). Вероятно тази активност е свързана с влияние върху пермеабилитета на кл. мембрана. Интересно е, че ензимните хидролизати показват по-слаба активност спрямо плесени и дрожди. За да повишат активността на ябълковия пектин някои автори прилагат модификация с висши мастни киселини (Calce *et al.*, 2014).

През последните години различни изследвания привличат внимание доказвайки, че ПЗ, изолирани от кл. стени на различни растения, притежават антиоксидантна активност или поне имат отношение към нея (Francine *et al.*, 2014; Mengome *et al.*, 2014). Hayami, Motomura, & Nishizawa (2007) установили, че наблюдаваните изменения в АО активност, по време на узряване на бобовите растения, се повлияват от състава и количеството на

пектиновата фракция. Те установили, че СЕ на галактуронана е в обратна зависимост с АО действие ($R^2=0.84$), което предполага, че последното е резултат от редуцираната естерификация в главните вериги на пектиновите молекули. [Pristov, Mitrović, & Spasojević \(2011\)](#) провели сравнително изследване на влиянието на $\cdot\text{OH}$ и $\cdot\text{O}_2^-$ радикали, генерирани от Fe^{2+} и Cu^{2+} -включваща Фентънова система върху трите основни ПЗ, намиращи се в кл. стена (целулоза, пектин и хемицелулози). Те намерили, че пектинът и ксиланът показват значителна $\cdot\text{OH}$ -улавяща способност и силно подтискат образуването им, докато при целулозата тази възможност е сведена до нула. От друга страна тестваните ПЗ показали сходна $\cdot\text{O}_2^-$ -улавяща способност. Според авторите АО активност се дължи на присъствието на многобройни специфични функционални групи, като $-\text{COOH}$ и $-\text{OH}$ способни да свързват метални йони. От малкото опити да се осветли механизмът на АО активност става ясно, че отговорни за антирадикаловата способност на ПП, са алкално-лабилни естерни връзки. Изследователите предполагат, че ХГ също участва в процесите на радикалово прихващане, т.к. след осапунване и хидролиза с *endo*-ПП, ефективната концентрация за намаляване с 50 % на изходния DPPH нараства значително ([Mengome et al., 2014](#)). В допълнение на това [Li et al. \(2014\)](#) демонстрират, че пента-олигогалактурониди, получени от пектин на глог, притежават концентрационно-зависеща радикал-улавящата способност срещу $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$ и $\cdot\text{DPPH}$. Суплементацията на мишки с олигомерите значително повишава активността на АО ензими, като супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион пероксидаза. Данните получени от анализа на три ПЗ фракции от стевия показват, че по-добрата АО активност на една от тях може да се дължи и на по-високото съдържание на белтъци и полифеноли ([Francine et al., 2014](#)).

Последните доклади демонстрират, че пектинът и неговите структурни фрагменти притежават потенциала на пребиотици, като ограничават растежа и предпазват гастроинтестиналния тракт от адхезия на патогенни бактерии ([Hotchkiss et al., 2003](#); [Endress, 2011](#); [Gómez et al., 2014](#); [Wicker et al., 2014](#)). Пребиотиците са способни селективно да стимулират растежа/респ. активността на определен вид полезни за гостоприемника чревни бактерии ([Meyer, 2015](#)). Към днешна дата пребиотичните свойства са потвърдени само *in vitro*, като в бъдещи изследвания остава да бъдат потвърдени и *in vivo*. Олигозахаридите получени от нискоестерифициран ябълков пектин (8%) или от високоестерифициран ЦП имат по-голяма пребиотична активност *in vitro*, отколкото

изходния неразграден пектин (Hotchkiss *et al.*, 2003). Получените от нискоестерифициран пектин олигозахариди показват по-голяма пребиотична активност в сравнение с тези получени от високоестерифициран пектин, т.к. се ферментират по-бързо и по-пълно (Dongowski & Lorenz, 1998; Olano-Martin, Gibson, & Rastall, 2002). Пектиновите олигозахариди притежават бифидогенен ефект и повишават нивата на *Eubacterium rectale* (Hotchkiss *et al.*, 2003; Manderson *et al.*, 2005). В повечето случаи пребиотичният им индекс е по-малък (сравним с този на резистентното нишесте) и не съвпада с този на фрукто-олигозахаридите, което показва, че не са селективни като тях (Olano-Martin, Gibson, & Rastall, 2002; Manderson *et al.*, 2005). За да се установи на коя структура се дължи пребиотичният ефект са изследвани ябълков хомо- и РГ-I, арабинани и соев АГ. Според Van Laere *et al.* (2000) само последните два субстрата са способни да предизвикат пълна ферментация с участието на *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp. и *Clostridium* spp. АГ-I от захарно цвекло също представлява *in vitro* бифидогенен фактор, т.к. ферментира до КВМК (оцетна, пропионова и маслена киселини), които подкисляват средата. Според авторите именно тази структура е отговорна за пребиотичните свойства на пектина (Al-Tamimi *et al.*, 2005). Съвсем скоро беше оценена *in vitro* ферментируемостта на отделните пектинови фрагменти (Onumpai *et al.*, 2011). Оказва се, че селективните субстрати, стимулиращи развитието на бифидните бактерии, даващи високи добиви на КВМК, са неутралните арабинани, галактани и получени от тях олигомери. Единствено GalA-съдържащите полимери или олигомери със СП > 5 не спомагат (или значително забавят) растежа на МО от групата *Bacteroides/Prevotell*. В многобройни статии се потвърждават и описват положителните регулаторни биосвойства и на КВМК (Kles & Chang, 2006; Yamada & Kiyohara, 2007).

Добре известно е, че ПВ оказват влияние и върху липидния метаболизъм чрез способността им да понижават серумните нива на липопротеините, нископлътностния холестерол, и да повишават екскрецията на жлъчни киселини (Dongowski, 1995; Groudeva *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014; Wicker *et al.*, 2014). Ефектите са наблюдавани при сравнително висок прием (15 g/d) на гранулиран високоестерифициран (75%) ябълков пектин за период от 90 дни от 109 пациента (Groudeva *et al.*, 1997). Установени са различни специфични и неспецифични механизми, някои все още спорни, по които се извършва взаимодействието на пектина с липидите (Endress, 2011). Предполага се, че ПЗ

свързва чисто физически холестерола още с приемането на храната и по този начин намалява абсорбцията му. Едновременно с това пектинът свързва и образуватите жлъчни киселини в процеса на храносмилане. Не се изключва и възможността за инхибиране на панкреатичните липази и триглицеридите. Предполага се, че такова взаимодействие има електростатична и/или хидрофобна природа. Структурни параметри, като СЕ и разпределението на свободните -COOH групи имат отношение към проявлението на ефекта, т.к. нискоестерифицираният пектин свързва по-слабо липопротеините, отколкото високоестерифицирания пектин (Dongowski, 1995). В своето моделно изследване Paul Roblot, Courtois, & Courtois (2010) показват чрез серия от ЯМР експерименти, че само ХГ последователности с висока мол. маса могат да „улавят“ и „задържат“ молекули на холестерола и линоленовата киселина. Според китайско проучване пента-олигозахаридите подобряват разстройствата в обмяната на холестерола, индуцирани от висококалорийна липидогенна диета у мишки, като значително намаляват активността и генната експресия на ключови ензими от холестеролния анаболизъм в черния дроб. Освен това тези олигомери поддържат тенденцията на високи нива на фекална екскреция на холестерола и в дози от 300 mg/kg съществено подобряват чернодробната стеатоза у мишки (Zhu et al., 2013; Li et al., 2014). Хипохолестеролемичната активност на ПВ е свързана и с продукцията на КВМК в процеса на пектиновия метаболизъм, които подтискат микробната холестерол синтетаза (Endress, 2011; Wicker et al., 2014).

Наред с по-гореописаните активности и ефекти ПВ притежават способността да регулират глюкозния метаболизъм, понижавайки нивата на кръвната захар и инсулина. Пектинът подобрява симптоматиката на различни стомашно-чревни заболявания, като колити, гастрити и язви (Endress, 2011). Cipriani et al. (2009) изследвали противоязвената активност на листата на бразилското растение *Maytenus ilicifolia* в плъхове, като установили, че тя може да се дължи на съдържащата се в тях ПГК. Последната редуцирала стомашните лезии индуцирани от етанол на 50% при 103 mg/kg. Противоязвеният ефект на ПЗ се дължи на мукоадхезивния ефект, а така също и на способността да намалява секрецията на киселина и пепсин, да повишава секрецията на мукус и да неутрализира радикали. Cipriani et al. (2009) са получили също пектинов АГ-I от соево брашно с гастропротективно действие.

1.7.1 Имунологична активност на пектиновите полизахариди. Връзка между структура и активност

Описаните дотук ефекти са свързани и се проявяват основно в храносмилателната и ендокринна система. Наблюдавани са обаче и други активности, като имуностимулираща, антитуморна, апаптозо-индуцираща и др., което предполага, че ПП притежават имунофармакологично действие и повлияват на имунната система (Yamada & Kiyohara, 2007). Измежду проявяваните активности имуностимулиращата изглежда най-съществена, т.к. се приема, че имунната система е дълбоко замесена в поддържането на хомеостазата, а нейното нарушаване и дисбаланс са причина за редица заболявания. Като имуноактивни субстанции растителните ПЗ от пектинов тип започват да се разглеждат преди 30 год. Започнатата дискусия се концентрира върху структурния аспект, който може би е отговорен за проявяваната биоактивност. Тогава за първи път японските учени Н. Yamada и Н. Kiyohara от Университета Китасато (гр. Токио, Япония) изолирали чрез екстракция с гореща вода от корените на *Angelica acutiloba* антикомплементарно активните полизахариди АGIIa и АGIIb-1. Първият бил охарактеризиран като арабино-3,6-галактан и активирал системата на комплемента както по класически, така и по алтернативен път (Yamada *et al.*, 1985).

Имуностимулиращата активност на ПВ се изразява в неспецифично активиране на комплемента, лимфоцитна пролиферация, продуциране на антитела, стимулиране на макрофагова фагоцитоза, Т-лимфоцити, естествени (NK) килърни клетки и регулация на Fc-рецептора на макрофаги за почистване на организма от имунни комплекси (Yamada & Kiyohara, 1999, 2007).

1.7.1.1 Имуномодулация в стомашно-чревния тракт

Възможно е водоразтворимите ПЗ да изразяват своите клинични ефекти и чрез интестинална имуностимулация. Имуномодулиращата способност на ПВ върху интестиналната имунна система се свързва с образуването на имунни комплекси между ПЗ и IgA, и по-нататъшно свързване на имунните комплекси с рецептор за IgA върху пиноцитозните М-клетки от Пайеровите плаки (Yamada & Kiyohara, 2007; Kiyohara *et al.*, 2011; Suh *et al.*, 2013). Пайеровите плаки са важен лимфоиден орган в червата, който е известен като индуктивен център за IgA продуцирането.

Hong *et al.* (1998) изолирали фракция ARL-5 от корена на *Atractylodes lancea* DC. Тя показала *in vitro* и *in vivo* имуномодулираща активност, изразяваща се в активиране на Т-клетките в Пайеровите плаки и секреция на хемopoетични растежни фактори. ARL-5 фракцията била фракционирана на други шест, като активният ARL-5IIA-1-1 фрагмент дал положителна реакция с $(\beta\text{-Glc})_3\text{Y}$. С помощта на АГ-разграждащи ензими е било доказано, че именно $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3)}$ -галактана, носещ странични вериги от $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{6)}$ -галактани е отговорен за проявяваната активност. Присъствието на страничните вериги било задължително, което предполага по-добра комуникация с клетъчните повърхностни рецептори. Активността на ARL-5IIA-1-1 била сравнена с тази на АГ от акация, лиственица и соя, като последните показали значително по-ниска активност. Suh *et al.* (2013) са получили пектинов полизахарид CUI-3IIb-3-2 от кори на сацума (*Citrus unshiu*), притежаващ мощна имуномодулираща активност върху имунните Т- и В-клетки от Пайеровите плаки. Установено било, че CUI-3IIb-3-2 е типичен пектинов ПЗ с ХГ и РГ-I региони и молекулна маса 18 kDa. При ензимна модификация с *endo*-ПГ полизахаридът понижил своята активност. При *per os* приемане от мишки СЗН/HeJ той предизвиквал повишение в пролиферацията на костномозъчни клетки и продуцирането на GM-CSF/IL-6 от Т- и В-клетки на Пайеровите плаки. В изследването за сравнение на активността на CUI-3IIb-3-2 били използвани търговски ПП, които обаче не показали такава мощна активност. Kiyohara, Matsumoto, & Yamada (2002) фракционирали ПЗ TJ-48 до 5 компонента, като F-5 след едноседмичен прием от мишки (СЗН/HeJ), показал слаба, но статистически значима интестинална имуномодуляция. За да установят активния компонент на фракция F-5, съдържаща протеини, лигнин и ПП, изследователите я подложили на ензимно и химическо разграждане. При последващ тест на активността се оказало, че отговорен компонент е ПЗ, а не останалите компоненти на фракцията. След хроматографско разделяне и пречистване било намерено, че активният компонент в ПЗ е структура съдържаща $\beta\text{-(1}\rightarrow\text{3,6)}$ -галактан. Друго изследване показва, че ПП изолиран от *Biophytum petersianum* и фрагменти (ВPII.1 и ВPII.2) притежават имуномодулираща активност срещу имунокомпетентните клетки в Пайеровите плаки. Хидролиза с *exo*-(1 \rightarrow 3)-галактаназа на ВPII.2 довела до понижаване на IL-6 продукцията, но пък не променила активността на ВPII.1. Използването на *endo*- β -D-(1 \rightarrow 4)-галактаназа довело до изчезване на активността, което навежда на мисълта, че β -D-(1 \rightarrow 4)-галактан-съдържащите странични вериги играят също важна роля в експресията на

активността, освен β -D-(1 \rightarrow 3,6)-връзките (Grønhaug *et al.*, 2011). Малко преди това Kiyohara *et al.* (2010) намират, че активността на АГ и пектиновите АГ-I и тип II, изолирани от *Astragalus mongholicus*, се свързва с наличието на β -(1 \rightarrow 3)-галактани, омержени с β -(1 \rightarrow 6)-галактоолигозахариди със СП \leq 8. Изненадващо те установили още, че ензимното премахване на крайните β -D-GlcрА остатъци от β -D-(1 \rightarrow 3,6)-галактанови странични вериги в РГ-I не променя активността.

1.7.1.2 Антикомплементарна активност

Комплементното активиране допринася за инфламаторните отговори, в допълнение към защитните реакции на организма, а инхибирането на комплементното активиране при възпаление би била добра терапевтична стратегия за третирането на редица болести (Yamada & Kiyohara, 2007). Повечето антикомплементарни полизахариди са изолирани чрез екстракция с топла вода от някои лечебни растения (Paulsen & Barsett, 2005).

Намерено е, че пектинът от *B. falcatum* и някои други хетероглигани, които съдържат странични вериги от β -(1 \rightarrow 3,6)-D-галактан, проявяват антикомплементарна активност (Yamada, 1994; Yamada & Kiyohara, 1999). Действието с α -L-арабинофуранозидази на арабино-3,6-галактан или увеличава активността, или не я изменя. Може би тази структура е есенциална за проявата на антикомплементарната активност. Друг антикомплементарно действащ пектин, изолиран от *A. acutiloba*, е съставен от 90% ХГ и малки количества от силно омержени РГ-I. Разграждането на пектина с *endo*-ПП след осапунване води до натрупването на (1 \rightarrow 4)-олигогалактурониди и фрагменти от разкронената РГ област, която има много по-мощна комплемент-активираща способност, отколкото съответния изходен пектин. Отделените олигогалактурониди имат драстично по-слаба активност или въобще не ѝ повлияват. В някои случаи дори инхибират алтернативния път (Kiyohara, Cyong, & Yamada, 1988). Според Popov & Ovodov (2013) преобладаващото съдържание на макромолекулен фрагмент, като ХГ в изолираните пектини, води до проява на имunosупресивна активност и имуностимулаторният ефект на омержените области може да се разкрие, ако се премахне инхибиторния ефект на полигалактуронана. В крайна сметка според тях многостранното действие на пектина върху имунната система е резултат от неговото структурно разнообразие. Крачанова *и сътр.* са провели изследвания върху получаването на ПЗ фракции от кл. култури на слънчоглед и тютюн, и оценката на техния

имуностимулиращ и протективен потенциал (*in vitro* и *in vivo*) (Крачанова и сътр., 1990; Radoucheva *et al.*, 1995). Изследванията били разширени с включването на пектини от праз, ябълки, шипки, оронени слънчогледови пити и портокали. На базата на проведените биологични тестове за отчитане преживяемостта на инфектирани със *Salmonella dublin* 1953 и *Yersinia pseudotuberculosis* опитни мишки и плъхове, килинг ефекта и гликолитичната активност на перитонеални миши макрофаги, учените са заключили, че ПВ от праз притежават добри имунопротективни свойства. Тези от слънчоглед и тютюн се оказали добри неспецифични модулатори на имунната активност (Radoucheva *et al.*, 1995; Крачанова и сътр., 2000). По-късно те задълбочили имунологичните изследванията чрез определяне на антикомплементарна активност и проследяване ефекта на ПП от свеж праз и АНЧ върху продукцията на РФК и азота от фагоцити. ПЗ довели до активиране на макрофагите, понижали продукцията на реактивните форми на кислорода, но стимулирали експресията на индуцируемата азотен оксид-синтетаза от макрофагите. Тези ПЗ показали и най-висока способност да активират серумния комплемент, като ефектът бил по-изявен по алтернативния път, но при сравнително високи дози (Kratchanova *et al.*, 2010; Nikolova *et al.*, 2013).

Редица други изследвания с ПЗ, получени от лечебни растения, обобщени от Paulsen & Barsett (2005) и Yamada & Kiyohara (2007), затвърждават изказаните по-горе твърдения, че тези силно омрежени и разклонени области в пектина са отговорни за експресията на активността. Разрушаването на РГ ядро и/или отделянето на страничните неутрални олигозахаридни вериги на пектиновата молекула по химичен или ензимен път редуцира активността. Това навежда на мисълта, че максимална активност притежава комбинацията между РГ и неутрални олигозахаридни странични вериги (Yamada, 1994; Yamada & Kiyohara, 1999). Затова неутралните въглехидратни вериги, съдържащи (1→3,6)-свързани помежду си β -D-Galp прикрепени към основната РГ верига, са минимално необходимата структура за проява на биоактивност.

1.7.1.3 Митогенна активност

Показано е, че някои ПП могат да активират лимфоцитната пролиферация. Отново от корените на *B. falcatum* е бил изолиран активен пектинов фрагмент vupleuran 2IIc, но този път с мощна митогенна активност. Vupleuran 2IIc представлява ПП с мол. маса 63 kDa,

86% уроново съдържание, СЕ 70%. При някои (1→4)-свързани α -D-GalpA остатъци имало разклонения на 2 и 3 позиция. След седемдневен перорален прием на пектиновата фракция (BR-2) от опитни С3Н/HeJ мишки се индуцирали пролиферативни отговори в спленцити. Той показвал също силна митогенна активност върху миши В-лимфоцити от далак и клетки от Пайеровите плаки. Bupleuran 2IIc иницирал узряването на В-клетките до активирани В-клетки и подтиквал производството на имуноглобулини (IgG и IgG), и IL-6 от В-клетки. При изследванията е бил използван и ЦП за сравнение, но не показал подобна активност. След модификация с *endo*-PII е доказано, че именно разклонените региони от този пектин са отговорни за проявяваната активност. Митогенната активност се редуцирала в присъствието на анти-bupleuran 2IIc антитяло или сегмент от него. Антигенният епитоп за свързване с В-клетките бил изграден от РГ скелет, с разклонения от арабинани, β -1,3-галактани, с β -1,6-D-Galp вериги, съдържащи в края β -D-GlcpA или 4-O-Me-D-GlcpA. До това предположение учените стигнали след модификация на активния ПЗ с пектолитични ензими. Друг митогенен ПП (GR-2IIc) бил изолиран от корените на *G. uralensis*. По аналогия с горния пример и при него активността се дължала на неутралните олигозахаридни вериги от разклонените региони (Yamada, 1994; Yamada & Kiyohara, 2007).

1.7.1.4 Антитуморна активност

В литературата се откриват и поредица от доклади за директен ефект на ЦП и МЦП върху метастазирането и пролиферацията на туморни клетки (Zhang, Xu, & Zhang, 2015). Здравословните ползи за човека, свързани с консумацията на цитрусови плодове, са документирани, като до голяма степен те се дължат на естествените вещества в плодовете. Интересът към тях е довел до по-подробни изследвания за определяне на механизмите на действие в организмите (Patil *et al.*, 2006). В едно изследване е проследен ефектът на ЦП върху пролиферативния капацитет на 4 малигнени клетъчни линии, които се изразява в подтискане на два колоректални карцинома (HuCC, HT-29) и една еритролевкемична клетъчна линия (K562) по дозо-зависим начин. И трите инхибирани линии продуцират Gal3, като антипролиферативният ефект на ЦП може да се дължи на способността му да инхибира Gal3 експресия (Bergman *et al.*, 2010). Интравенозното вкарване на ЦП показва, че той се свързвал специфично за повърхността на раковите клетки (Glinsky & Raz, 2009).

Пектинова фракция, изолирана от *A. acutiloba*, която е богата на АГ-I структура, показвала ясно изразена противотуморна активност. Забелязано било, че ПЗ с такава активност трябва да съдържат галактан като странична верига и вида на свързването между отделните звена да е β -(1→4) (Yamada & Kiyohara, 2007). Трябва да се подчертае, че молекулното тегло на търговските пектинови препарати, е прекалено голямо за интестинална абсорбция и че пектинът, като хранителна фибра, преминава през гастроинтестиналния тракт до дебелото черво до голяма степен (> 90%) непроменен (Saito *et al.*, 2005), затова редуцията на молекулното тегло и разрушаването на четвъртичната структура са от голямо значение за антираковата активност. Същевременно било открито, че за разлика от нативния ЦП, ензимно, термично или химически получените МЦП се абсорбират по-добре от организма (Maxwell *et al.*, 2012) и проявяват значително по-големи терапевтични ефекти върху туморната метастаза и апоптоза в експериментални животински модели и при клинични изследвания (Platt & Raz, 1992; Pienta *et al.*, 1995; Fuchs, 2003; Glinsky & Raz, 2009; Leclere, van Cutsem, & Michiels, 2013). Описано е, че МЦП засяга различни етапи от раковата метастаза, като премахва анти-аноикс ефекта, породен от Gal3, ефективно редуцира туморната адхезия и агрегация, стимулира апоптозата чрез свързване на Gal3 (Yamada & Kiyohara, 2007; Glinsky & Raz, 2009; Maxwell *et al.*, 2012; Zhang, Xu, & Zhang, 2015). Съобщено е, че пероралният прием (0.1-1.0%) на МЦП успешно инхибира метастазата на B16-F1 меланома (в белия дроб), аденокарцинома на простатата MAT-LyLu (в белия дроб) на плъх, човешки рак на гърдата MDA-MB-435 и карцином DU-145 на простатата (в белия дроб и костите), и човешки колонен карцином LSLiM6 (в черния дроб) в мишки или плъхове. Учените предполагат, че МЦП премахва образуването на хомотипови агрегати на B16-F1 клетки, което става чрез свързване на адхезивни молекули като Gal3 с въглехидратни вериги на гликоконюгати на B16-F1 клетките. Същевременно е показано, че изходният ЦП усилва хомотиповото агрегиране на B16-F1, водейки до повишение на колониите на B16-F1 клетките в белите дробове в експериментален модел (Platt & Raz, 1992; Pienta *et al.*, 1995). Ramachandran *et al.* (2011) са изследвали *in vitro* имуностимулиращата активност на химически МЦП върху НК-клетки и Т-цитотоксични клетки при 0.8 mg/mL. Активираните НК-клетки от човешка кръв показвали повишена способност за *in vitro* убиване на левкемични туморни клетки K562. Предполага се, че тази активност се дължи основно на наличието на ненаситени

олигогалактуроници с ниска СЕ, които притежават имуностимулираща активност. Пектинът е бил с моларна мол. маса 3320 Da. [Zhang, Xu, & Zhang \(2015\)](#) описват, че термично- и лъчево-третираните пектини също инхибирали пролиферацията на HT-29 колоректални ракови линии.

Технологията за получаване на химически МЦП се състои в третиране при високо рН (10.0), последвано от третиране при ниско рН (3.0), при което се загубват желиращите и стабилизиращи свойства на пектина, но значително се подобрява бионаличността в организма ([Platt & Raz, 1992](#); [Pienta et al., 1995](#); [Leclere, van Cutsem, & Michiels, 2013](#)). Тази обработка води до натрупването на къси, неразкрити и ненаситени кисели олигомерни продукти, както и на Gal-олигозахариди и фрагменти от РГ. МЦП се характеризира с мол. маса 10-20 kDa и ниска СЕ (< 10%). Последните са ключови параметри във фармакокинетиката на модифицирания пектин, благодарение на които той може да преминава в кръвообръщението, да се свързва към и инхибира прометастазни регулаторни клетъчни рецептори, като Gal3 върху туморните клетки. Съвсем скоро [Courts \(2013\)](#) е изследвал за първи път абсорбирането на биологично-активни олигозахариди от МЦП през имобилизиран върху порьозна мембрана монослой от туморни клетки, предизвикващи рак на дебелото черво от карциномната клетъчна линия Сасо-2 (НТВ-37). Той е установил, че късоверижните галактани (СП 2-7) и АГ фрагменти (СП 3-6) преминавали през моделния чревен епител чрез пасивна парацелуларна дифузия, за разлика от полиуронидите. Смята се, че основната активна захар в МЦП е D-Gal и че Gal-олигомерите са отговорни за анти-Gal3 активността ([Eliaz, Guardino, & Hughes, 2006](#); [Courts, 2013](#)). Според някои учени важни детайли относно състава и технологията на получаване на МЦП не се съобщават (!) или там където е налична информация не е ясно дефинирана ([Yamada & Kiyohara, 2007](#); [Morris et al., 2013](#)). Липсата на такава информация не е спряла реализацията на клинични изследвания и създаването на суплементи. При такива проучвания МЦП се използва в количество 15 g/d. Отново толкова се препоръчва от производители за превенция и при хирургически намеси ([Fuchs, 2003](#); [Eliaz, Guardino, & Hughes, 2006](#); [Morris et al., 2013](#)). [Strum, Scholz, Eliaz et al.](#) са изследвали клинично терапевтичния ефект на МЦП (Pecta-Sol[®]) върху пациенти с рак на простатата. Пилотното изследване включило пациенти, при които третирането на рака е било неуспешно или заболяването се е появило отново. ВУПСА е полезен индикатор за предсказване прогресирането на рака на простатата.

Пациентите приемали 15 g/d МЦП на три дози, като над 30% се удължило ВУПСА в 4 от 7 пациента. Три години след проведеното изследване всички пациенти били живи. За провеждане на II фаза от клинично изследване, отново били използвали пациенти с рак на простата след простатектомия, лъчетерапия или криохирургия, на които било измервано ВУПСА. На болните били давани отново 15 g МЦП на ден в продължение на 1 година. Десет човека завършили изследването, като при осем от тях терапията била успешна. ВУПСА в половината от пациентите се повишило двукратно в интервала от 129-941% след 12 м. лечение. Авторите заключили, че МЦП може да удължи ВУПСА в мъже с повтарящ се рак на простатата (Fuchs, 2003; Eliaz, Guardino, & Hughes, 2006). Пилотно клинично изследване обхващало 49 пациента (36-82 г.) с напреднал стадий на солидни тумори и метастазиране, за които не е било намерено ефективно лечение. Солодните тумори при различните пациенти били рак на простатата, дебелото черво, черния дроб и белите дробове, бъбрека, гърдата, фаринкса, на шийката на матката, на панкреаса и стомаха. Пациентите били оценени по функционалната скала на Karnofsky със 60 пункта и с предполагаема продължителност на живот най-малко 3 месеца. Те приемали ензимно-МЦП в дневни дози от 15 g на три порции с плодов сок. Като резултат от изследването 6/29 пациента стабилизирани или подобрили качеството си на живот. Единадесет от 49 пациента показали стабилно състояние на болестта след 8 седмично третиране и 6/49 пациента запазили това състояние за повече от 24 седмици. Предполага се, че пектин с по-ниско метоксилно съдържание и по-ниска молекулна маса (< 10 kDa) може да бъде по-ефективен за превенция на туморното метастазиране (Morris *et al.*, 2013).

МЦП притежава GRAS статут, както изходния пектин. Като странични ефекти са били наблюдавани втечняване на фекалната маса и стомашно-чревен дискомфорт (Fuchs, 2003; Eliaz, Guardino, & Hughes, 2006). Лидер в производството на МЦП е САЩ, а някои от по-известните световни фирми и техните продукти на пазара са EcoNugenics (PectaSol-C[®]), AOR (MCP), Source Naturals (PectImmune[™]), Vital Nutrients (MCP), Thorne Research (Fractionated Pectin Powder) и др.

Zhang, Xu, & Zhang (2015) отбелязват, че не само ЦП и неговите модифицирани продукти притежават активност, но също така и ПЗ изолирани от ябълки, картофи и цвекло. Според Yaneva *et al.* (2002) негативните последици върху клетъчните елементи от имунната система на пациенти болни от рак на гърдата, породени от постоперативната

лъчетерапия, могат да се преодолеят чрез системен прием на комбинация от ябълков пектин (15 g/2 d) и арониев концентрат (20 mL).

1.7.1.5 Премахване на имунни комплекси

Някои ПП активират фагоцитите за отстраняване на натрупани имунни комплекси. Взаимодействието на циркулиращи антитела и антигени, при което се образуват имунни комплекси, е нормален феномен, но може да доведе до образуване на локални възпаления и да причини развитие на автоимунни заболявания. От *B. falcatum* е изолиран пектинов полизахарид *burpleuran 2IIb*, който специфично усилвал функцията на макрофагите в отстраняването на имунни комплекси през Fc рецептора. *Burpleuran 2IIb* е ПЗ с мол. маса 23 kDa, състоящ се от типичните пектинови фрагменти. Чрез ензимна модификация с *endo*-ПГ били хидролизирани ХГ сегменти, при което се получили три фракции: олиго-GalpA, РГ-I - и РГ-II- подобни продукти, като последните се характеризирали с най-мощна активност по отношение активирането на макрофаги за почистването на имунни комплекси (Yamada, 1994; Yamada & Kiyohara, 1999, 2007). От листата на *P. ginseng* е изолиран пектинов фрагмент (GL-4IIb-2), съдържащ характерните за РГ-II ди-, окто- и ноноолигозахаридни структури. Доказано е, че GL-4II-b повишавал почистването от имунните комплекси. Това е първият изолиран биологично-активен пектинов РГ-II. От листата на същото растение е изолиран и пектиновият фрагмент GL-RIII, който представлявал dRG-II-B. GL-RIII и GL-4II-b притежавали относително висока активационна способност за IL-6 продукция в макрофаги. При разрушаване на борат-диестерните връзки се понижавала активационната способност на ПЗ върху макрофагите, която се възстановявала след редимеризация (Paulsen & Barsett, 2005).

1.8 Растителна клетъчна стена

Клетките на образувателната (меристемна) тъкан в растенията са обградени от тънък (0.1-1 μm дебелина) полутвърд полизахарид-съдържащ хидрогел, наречен „първична клетъчна стена“. Тази стена е достатъчно здрава, за да устои на вътрешния тургор, генериран в рамките на клетката. Заедно със средната ламела (богата на ПЗ област между две съседни кл. стени) образуват апопластите. Въз основа на относителния дял на ПВ, и структурните особености на хемицелулозните ПЗ, са обособени два основни типа кл. стени

– тип I и II. Установено е, че тези от тип I са изградени от малко на брой ПЗ, но с извънредно сложна структура. Те заемат приблизително 90% от с.в. (от тях 20-30% са целулоза и 35% пектинови полизахариди, ксилоглюкан и/или глюкоманан) на клетъчните стени, а останалата част (около 10%) се пада на структурните (глико)протеини, фенолни естери и минерали. Обикновено те се съдържат във всички двуседелни, не-житни едноседелни и голосеменни растения. ПВ в кл. стена се разделят на две фракции: хидратирана желираща фракция (средната ламела) и неразтворима фракция (протопектин), която се свързва чрез водородни връзки с целулозата. Ролята на първата фракция е да поддържа необходимото хидратационно ниво на клетката и да слепя клетките с образуването на тъкани. Неразтворимата фракция допълнително подсилва стената, участва в образуването на отрицателния заряд и се предполага, че представлява хидратационен филтър за кл. стена от тип I. Стени тип II се намират в житните растения (ориз, ечемик) и са богати на арабиноксилан, но съдържанието на пектин в тях е < 10% (Darvill *et al.*, 1985; O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990; Carpita & Gibeaut, 1993; O'Neill & York, 2003). В живите тъкани водата може да достигне до 70 % от обема на първичните стени. Същевременно е изказана хипотеза, с която се постига и консенсус относно номенклатурата на ПЗ. Според нея само шест ПЗ, сред които и пектиновите, са общи за всички висши растения (Albersheim *et al.*, 1996).

Различните модели за ултраструктурата на първичната клетъчна стена до голяма степен се основават на непълна структурна информация, получена от анализа на ПЗ смеси. За първи път Albersheim *et al.* приложили пречистени ензими (полигалактуронази, глюканази, протеази и др.) за изучаване структурата на ПЗ, като представили и първия хипотетичен модел на открития от тях рамногалактуронанов фрагмент (Talmadge *et al.*, 1973). Малко по-късно те получили доказателства за наличие на ковалентна връзка между ксилоглюкани и пектинови ПЗ, а също така и между пектина и структурните протеини. Предвид получената информация те предложили и предполагаем модел на растителната клетъчна стена (Keegstra *et al.*, 1973). Липсата на убедителни доказателства за съществуването на ковалентни връзки между не-целулозните компоненти на стените довело някои изследователи на въпрос дали основната стена е ковалентно омрежен макромолекулен комплекс. В момента най-популярните модели подчертават нековалентни взаимодействия между полимерите и предвиждат две независими, но взаимодействащи си

мрежи. Едната мрежа се състои от ПП (ХГ, РГ-I и II) (O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990), а втората се състои от целулоза и ксилоглокани. В допълнение е напълно възможно да съществува и трета, съставена от (глико)протеини (Fry, 1986; Carpita & Gibeaut, 1993; O'Neill & York, 2003; Jarvis, 2011).

Първичните стени са основен текстуриращ компонент на храни от растителен произход. Процеси, като зреене и срок на годност на плодове и зеленчуци са свързани и зависят от качествените и количествени промени на клетъчно-стенните компоненти. Ферментирани плодови продукти (вкл. и вино) съдържат значителни количества от ПЗ компоненти на първичните стени. Повечето от тях се използват като желиращи, стабилизиращи и текстуриращи агенти в ХВП, а резултатите от редица проучвания показват и проявление на здравословни ефекти за човека. Въз основа на това структурата и организацията на първичните кл. стени са от особен интерес за учените.

1.9 Ензимна модификация и пектолитични ензими

Ензимите, катализиращи хидролизата на ПВ, се обозначават като пектолитични или пектинази. Много детайлни обзорни статии са посветени на пектолитичните ензими и тяхното приложение, затова ще бъдат отбелязани само тези ензими, имащи роля в изследването на отделните пектинови фрагменти (Kertesz, 1951; Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Sakai *et al.*, 1993; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Vincken, Voragen, & Beldman, 2003; Wong, 2008; Pedrolli *et al.*, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016).

Всички пектинази могат да бъдат разделени на две основни групи: хидролази и транселиминази. Хидролазите от своя страна се подразделят на естерази и деполимерази. Пектолитичните ензими могат да се класифицират и според субстрата, върху който действат, като се обособят две основни групи: хомогалактуронан-разграждащи ензими и рамногалактуронан-модифициращи (разграждащи) ензими (Voragen & Pilnik, 1989; Wong, 2008; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Pedrolli *et al.*, 2009; Voragen *et al.*, 2009). Списък на пектолитичните ензими, участващи в разграждането на ПВ, е показан на **табл. 1**.

Таблица 1. Ензими, използвани за изучаване структурата на пектиновите вещества. Ензимите са сортирани по класове и субстрати.

Ензимен клас	ЕС	Субстрат	CAZy клас
Хидролази	3.2.-		
<i>endo</i> -Полигалактуроназа	3.2.1.15	XГ	GH28
<i>exo</i> -Полигалактуроназа	3.2.1.67	XГ	GH28
Δ -4,5-Ненаситена-глюкуронозил хидролаза	3.2.1.-	XГ	GH88
Ненаситена рамногалактуронан хидролаза	3.2.1.172	XГ	GH105
Рамногалактуронан галактуронохидролаза/ <i>exo</i> -рамногалактуроназа	3.2.1.173	РГ-I	GH28
Рамногалактуронан рамнохидролаза/ α -L-рамнозидаза	3.2.1.174	РГ-I	GH78
Рамногалактуронан хидролаза/ <i>endo</i> -рамногалактуроназа	3.2.1.171	РГ-I	GH28
α -L-Арабинофуранозидаза	3.2.1.55	РГ-I/АГ	GH43,51,54
<i>endo</i> -Арабинаназа	3.2.1.99	РГ-I/АГ	GH43
<i>exo</i> -Арабинаназа	3.2.1.-	РГ-I/АГ	GH93
<i>endo</i> - β -(1 \rightarrow 4)-Галактаназа	3.2.1.89	РГ-I/АГ	GH53
<i>endo</i> - β -(1 \rightarrow 6)-Галактаназа		РГ-I/АГ	
β -(1 \rightarrow 4)-D-Галактозидаза	3.2.1.23	РГ-I	GH2,35
<i>exo</i> - β -(1 \rightarrow 4)-Галактаназа	-	РГ-I/АГ	
<i>exo</i> - β -(1 \rightarrow 6)-Галактаназа	-	РГ-I/АГ	
<i>exo</i> - β -(1 \rightarrow 3)-Галактаназа	-	РГ-I/АГ	
β -(1 \rightarrow 4)-D-Ксилозидаза	3.2.1.37	КГ	GH3,43
Лиази			
Пектин лиази	4.2.2.10	XГ	PL1
Пектат лиаза	4.2.2.2	XГ	PL1,3,9
Рамногалактуронан лиаза	4.2.2.23/24	РГ-I	PL4,11
Естерази			
Пектин ацетилестераза	3.1.1.-	XГ	
Пектин метилестераза	3.1.1.11	XГ	CE8
Ферулоил естераза	3.1.1.73	РГ-I	CE1
Рамногалактуронан ацетилестераза	3.1.1.86	РГ-I	CE12

В литературата е описан и ензимът протопектиназа, който действа на протопектина, но въпросът за съществуването му е спорен, поради сложните превръщания, които трябва да извършва самостоятелно. Ензимите, носещи това име, са способни да разграждат

водонерастворими нативни пектинови фракции в клетъчната стена на растителните клетки. Като резултат от тяхното действие се получава водоразтворим пектин (Sakai *et al.*, 1993). Повечето протопектинази са изучени в детайли и се оказва, че някои от тях принадлежат към вече познати полигалактуронази и пектин лиази.

1.9.1 Хомогалактуронан-разграждащи ензими

1.9.1.1 Пектин метилестерази (пектинпектилхидролаза) и пектин ацетилестераза

Тези ензими (ЕС 3.1.1.11) катализират премахването на метил-естерната връзка на С-6 място в GalpA-последователности от ХГ и превръща високоестерифицирания пектин в нискоестерифициран (СЕ < 50%). Ензимът действа само тогава, когато в непосредствена близост се намира поне една свободна карбоксилна група. ПМЕ се среща в много висши растения, но особено активен е в домати, цитруси, череша, манго, папая, лук, праз и репички. Растителната пектинестераза има рН оптимум около 7.0 и действа по протежението на една галактуронова верига, като създава последователност от блокове със свободни карбоксилни групи. Противно на нея плесенната пектинестераза има рН оптимум между 4.0-5.0 и действа на случаен принцип, като създава неравномерно разпределение на метил-естерифицираните групи. Ензимите от растителен и плесенен произход се инхибират от присъствието на ацетилни групи, но има данни, че тези от бактериален толерират присъствието им (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Voragen *et al.*, 2009; Remoroza *et al.*, 2015).

Пектин АЕ отцепват ацетилни групи от О-3 и/или О-2 позиция от ацетилираните GalpA единици в ХГ област, като я превръщат в Ca²⁺ чувствителна и способна за формиране на гел от калциев пектинат.

1.9.1.2 Полигалактуронази

ПГ могат да се разделят на такива, действащи безпорядъчно във вътрешността на субстратната верига- *endo*-ПГ (ЕС 3.2.1.15) и такива, които действат последователно от нередущия край на веригата- *exo*-ПГ (ЕС 3.2.1.67), премахвайки моно-, ди- и три-галактуронове киселини. Те могат да се разделят и според тяхната толерантност към метилните-групи в ПГК. Полигалактуроназните ензими катализират хидролитичното разкъсване на α -D-(1→4) О-гликозидните връзки в полигалактуронана. Разграждането

може да протече по един от следните два механизма: случаен във вътрешността на веригата (*endo*-ПГ) или в нейния нередуциращ край (*exo*-ПГ) (Pilnik & Rombouts, 1981). Като цяло са предпочитани субстрати с ниска СЕ, защото за образуване на ензим-субстратния комплекс е необходимо наличие на две свободни карбоксилни групи до връзката за разграждане. Високоестерифицираният пектин и поли-*Me-GalpA* не се хидролизират. Високомолекулните субстрати се хидролизират по-бързо отколкото нискомолекулните, а активността на ензимите се понижава с намаляване дължината на веригата. Наблюдавани са малки изменения в скоростта на реакцията при субстрати със СП повече от 24, но при по-ниска от тази стойност, скоростта на хидролиза намалява. Втората фаза от разпадането се характеризира с хидролиза на пентамери и тетрамери, но с по-ниска степен. Финалната фаза е свързана с много бавно разграждане на тримери до димери и мономери. Тригалактурановата киселина е най-малкият олигомер получен след хидролиза. Димерите никога не се атакуват от ензима, а мономери не се акумулират. Във всеки случай връзката, намираща се в непосредствена близост до нередуциращия край на субстрата, е защитена от ензимно въздействие. Съобщено е, че оптималното рН на действие на *endo*-ПГ е между 3.6-5.5. рН оптимумът се измества към по-киселата област при намаляване на мол. маса на субстрата. При домати хидролизата на ПГК III (мол. маса 3.2 kDa) протича най-пълно при рН 4.2, докато при най-късите олигомери рН оптимумът е около 2.0. Ензимът не изисква като кофактори метални йони, въпреки че съществуват съмнения за нуждата от моновалентни катиони. Ефектът на катиони, като Na^+ върху активността, се свързва с подобряване на разтворимостта на полигалактурановия субстрат. Катиони като Ca^{2+} , които взаимодействат със субстрата и формират агрегати (формира се гел), са инхибитори в концентрации по-големи от 0.4 mM. Агрегатите, които се формират не са достъпни за ефективна ензимна атака, а самият ензим може дори да се свърже и имобилизира към такава матрица (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Sakai *et al.*, 1993; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009).

Деестерифицираният пектинов полимер или полигалактуранан е предпочитан субстрат за *exo*-ПГ. Спрямо пектина е наблюдавано четирикратно увеличение на активността при субстрат пектова киселина. Понякога СЕ не оказва влияние върху СХ, но големината на субстрата влияе върху ензимната активност, т.к. скоростта на хидролиза и афинитетът към субстрата нарастват с увеличаване на СП. Ензимът атакува субстратната

молекула откъм нередущиращия край, като в най-голямо количество, като краен продукт, се освобождава GalpA. Данните сочат, че ензимът не остава прикрепен към първата атакувана субстратна молекула, а по-скоро се дисоциира и реасоциира с друг субстрат. Този верижен механизъм води до равномерно скъсяване на високомолекуления субстрат и до появата на нискомолекулни крайни продукти. Оптималната рН стойност на *exo*-ПГ се намира в интервала 4.6-6.0 и зависи от субстратната големина. За своето действие ензимът изисква наличие от 0.4 до 0.5 mM Ca²⁺ йони. Наличието на хелатиращи агенти, като ЕДТА или лимонена киселина, води до редуция на активността почти до нула. Високите концентрации на Ca²⁺ и Na⁺ йони води до субстратна инсолубилизация и последващо намаление на активността (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Pedrolli *et al.*, 2009; Voragen *et al.*, 2009).

1.9.1.3 Пектат лиази (полигалактуронатлиаза)

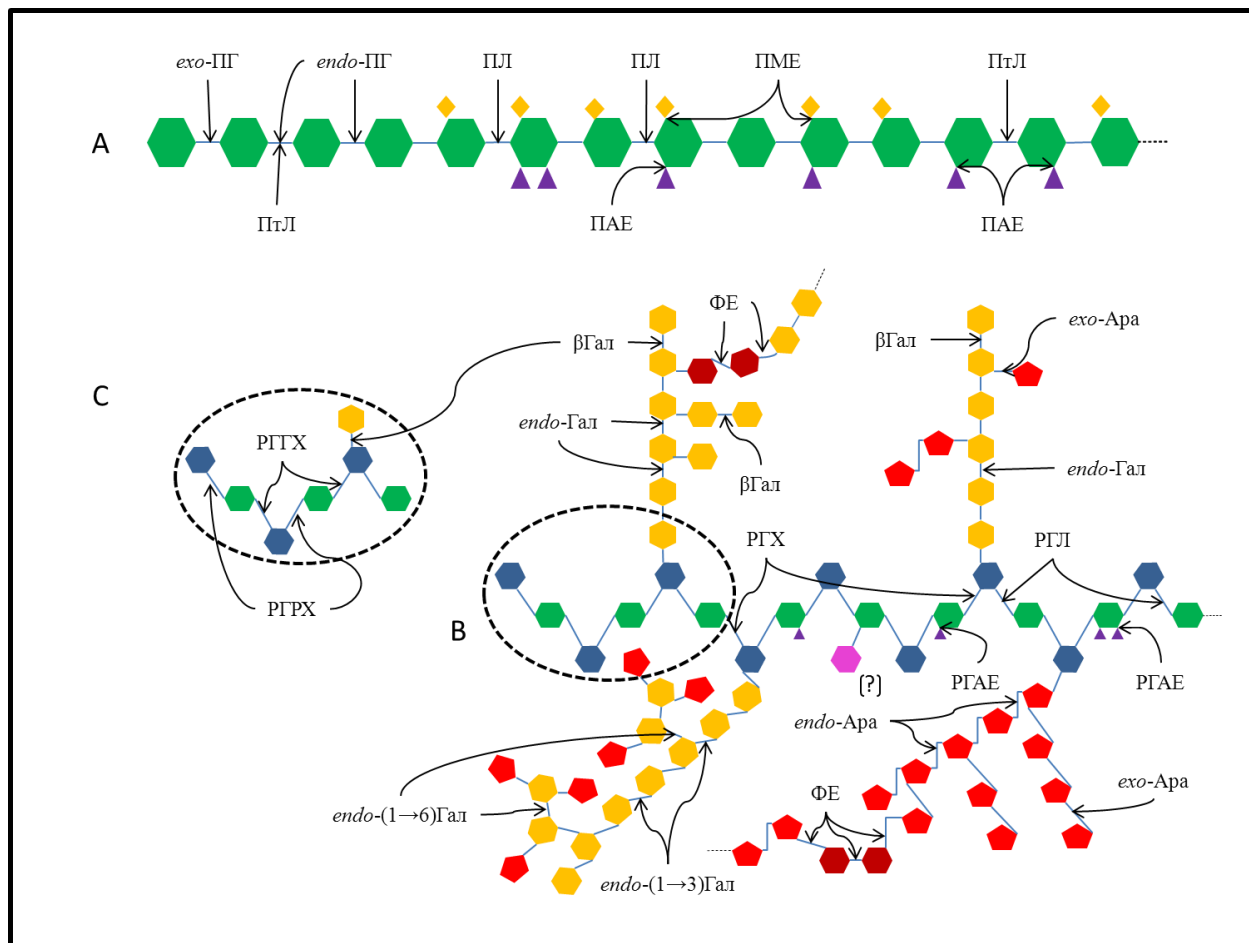
ПтЛ разграждат нехидролитично гликозидните връзки в пектовата киселина чрез реакция на *trans*-елиминиране. Те проявяват субстратна специфичност към наличието на свободни карбоксилни групи в съседство на α -(1→4)-връзките, които се разрушават. Към тази група ензими принадлежат такива с *endo*-(EC 4.2.2.2) и *exo*-(EC 4.2.2.9) действие, като предпочитаният субстрат е нискоестерифициран пектин. Действат в комплекс с ПЕ. Друга тяхна особеност е абсолютната необходимост от Ca²⁺ за проявяване на активност (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009).

1.9.1.4 Пектин лиаза (полиметилгалактуронатлиаза)

Осъществяват нехидролитичното разкъсване на гликозидната връзка между метилирани галактуронови остатъци чрез *trans*-елиминиране и затова предпочитани субстрати са високоестерифицирани пектини. След реакцията на *trans*-елиминиране се образува двойна връзка в галактуроновия остатък между C-4 и C-5 атоми. ПЛ се продуцират единствено от МО и то плесенни гъби. рН оптимумът на действие се различава в зависимост от СЕ. Оптималната стойност на рН е 6.0, но при нискоестерифицирани субстрати се наблюдава намаление в него (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009).

1.9.1.5 Пектинази (полиметилгалактуроназа)

Тази група ензими хидролизира безпорядъчно α -(1→4)-D-гликозидни връзки във вътрешността на пектина. Ензимите разграждат нативния пектин толкова по-бързо, колкото е по-висока СЕ на субстратната молекула. При наличието в средата на пектинестерази се намалява активността на ензима. Открити са ензими от тази група с *endo*- и *exo*-действие (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Sakai *et al.*, 1993). На **фиг. 8А** е представена схема на действието на хомогалактуронан-разграждащи ензими.



Фигура 8. Схематично илюстриране на действието на пектолитичните ензими. Разграждането на връзките в пектина става чрез хидролиза и чрез *trans*-елиминирање. ХГ-разграждащи ензими (А); РГ-модифициращи ензими (В); Действие на РГХ и РГРХ върху РГ фрагмент отделен след действието на РГХ (С). **Съкращения:** ФЕ, ферулоил естераза; β Гал, β -галактозидаза; *endo*-Гал, *endo*-(1→4)-галактаназа; *endo*-(1→3,6)Гал, *endo*-(1→3,6)-галактаназа; *endo*/*exo*-Ара, *endo*/*exo*-арабинаназа. Съкращенията на останалите ензими се намират в списъка „Използвани съкращения“ в началото на работата.

1.9.2 Рамногалактуронан-модифициращи ензими

1.9.2.1 Рамногалактуронан-разграждащи ензими с ендеогенно действие

Тези ензими са открити и изучени през последните 30 години (Voragen & Pilnik, 1989). Schols *et al.* (1990) получили за първи път след пречистване на търговския ензимен препарат Ultra SP (от *Asp. aculeatus*) ензимът РГаза, който бил способен да разгражда модифицираните „космати“ области на ябълковия пектин. С негова помощ те получили тетрамери, пентамери и хексамери, изградени от редуващи се галактуронови и рамнозни мономери, към които са прикачени арабинозни и галактозни звена.

Тези ензими действат изключително на РГ и е доказано, че не действат на ХГ области в ПП. Към този вид пектинази се включват две групи деполимеризиращи ензими: едните катализират разцепването на връзката между α -GalpA-(1→2)- α -Rhap в РГ-I, което е съпроводено с поглъщане на вода, а другите разкъсват нехидролитично, чрез *trans*-елиминирание, същия вид връзка (РГЛ), при което се формира двойна връзка между C-4 и C-5 на GalpA (McKie *et al.*, 2001; Mutter *et al.*, 1998a, 1998c; Pedrolli *et al.*, 2009; Voragen *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2016). Допълнително са открити два специфични ензима за РГ-I верига: РГРХ и РГГХ. РГАЕ е била идентифицирана като съпътстващ ензим. Последният специфично премахва ацетилни групи от O-2 и O-3 хидроксилните групи на галактуронозилните звена в РГ основна верига. Деацетилирането е „есенциална“ първа стъпка по пътя на разграждането на РГ-I от РГХ и РГЛ. Тези ензими имат рН оптимум на действие в интервала 5.0-6.0. Сравняването на първичната структура на ензимите разкрива наличието на няколко „региона“, повечето от които са пектиназо-специфични, а някои *endo*-РГХ специфични (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Vincken, Voragen, & Beldman, 2003; Wong, 2008; Voragen *et al.*, 2009). Интересно е да се отбележи, че *endo*-РГЛ от *P. cellulose* е снабден с целулозно-свързващ модул, което е изключение за пектолитичните ензими. Значението на това не е доизяснено. Тази *endo*-РГХ се различава от останалите по високия рН оптимум (9.5) и необходимостта от Ca²⁺ (McKie *et al.*, 2001).

Изследвана е третичната структура на *endo*-РГХ от *A. aculeatus* и е установено, че тя е много подобна на някои други пектинази. Детайлното изучаване на структурата на продуктите от действието на *endo*-РГХ и *endo*-РГЛ показва, че разграждането се извършва на различни места в главната РГ верига. Олигомерните продукти, получени след въздействие с *endo*-РГХ (от *A. aculeatus*), съдържат две или три дизахаридни единици, в които рамнозилният мономер е от нередуциращия край на веригата, а галактуронозилният от редуциращия край (Rhap-GalpA) (Colquhoun *et al.*, 1990). Рамнозният остатък може да

бъде заместен от една галактозна единица. Подобни продукти се откриват и след хидролитичното действие на *endo*-РГХ от *A. niger* върху деацетилирани силно омрежени РГ области, съдържащи арабинан и АГ (Colquhoun *et al.*, 1990). Отношението между различните олигозахаридни продукти е различно за всеки ензим, получен от *A. aculeatus*. Олигозахаридите освобождавани от *endo*-РГЛ (*A. aculeatus*) се различават от предходните по това, че съдържат ненаситен GalpA остатък от нередуциращия край и Rhap от редуциращия край. Изглежда, че се продуцират и малки фрагменти с Δ -4,5-GalpA-Rhap дизахаридни верига. Различията в специфичността на *endo*-РГХ и *endo*-РГЛ са илюстрирани на **фиг. 8В**. От написаното по-горе може да се заключи, че *endo*-РГХ и *endo*-РГЛ действат на сходни части от РГ-вата верига. Когато един и същ регион от пектиновата молекула се атакува от няколко РГ-разграждащи ензими, като индикация за това служи промяната в молекулното тегло. Премахването на арабинановите разклонения от осапунения „космат регион“ увеличава ефективно активността на *endo*-РГЛ, докато отделянето на галактановата странична верига води до редукция в активността (Mutter *et al.*, 1998a, 1998c). *Endo*-РГЛ от *P. cellulose* може да разгражда галактозилирани олигозахариди с основно звено (Rhap-GalpA)₃, като се има предвид, че първоначално не е действовано с β -галактозидаза (McKie *et al.*, 2001). Този пример показва, че страничните вериги играят важна роля в молекулното разпознаване. Различните РГ-разграждащи ензими се различават значително по проявявания толеранс към страничните вериги или по техните изисквания към състава ѝм. Предполага се, че *endo*-РГЛ действа повече на случаен принцип, отколкото *endo*-РГХ (Vincken, Voragen, & Beldman, 2003).

Механизмът на действие на три различни РГ ензима, действащи върху линеен РГ с различна дължина, е различен. Напр. две *endo*-РГХ-и изискват най-малко 9 или 10 гликозилни звена, за да проявят активност, докато *endo*-РГЛ изисква повече от 12 гликозилни остатъка. *Endo*-РГХ от *A. aculeatus* „предпочита“ да разгражда 4 или 5 гликозидни остатъка по-далеч от страна на нередуциращия край (Mutter *et al.*, 1998a, 1998c). Ензимът от *B. fuckeliana* отделя 5 или 7 гликозидни остатъка по-навътре от редуциращия край. *Endo*-РГЛ от *A. aculeatus* разгражда малки субстрати. Олигозахариди с дължина по-голяма от 16 се разграждат на 6 място преди редуциращия край, а по-късите на 4-та позиция. Този пример потвърждава, че РГ-разграждащите ензими имат значителни различия в механизма си на действие в зависимост от микробиалния си произход.

1.9.2.2 Рамногалактуронан рамнохидролаза

РГРХ е *exo*-действащ ензим, получен в чист вид след пречистване на търговски пектолитичен препарат. Характерно за този ензим е, че действа на нередуциращия краен рамнозен остатък свързан α -(1 \rightarrow 4) с GalpA (**фиг. 8С**). Ензимът е способен да разгражда и синтетични субстрати, като *p*-нитро-фенил- α -рамнозид. РГРХ може да доразгради продуктите от действието на *endo*-РГХ. Важно условие е първоначално рамнохидролаза да премахне GalpA остатъци от РГ-та верига. Ензимът не толерира присъствието на Gal-заместители и действа чрез инверсия на аномерната конфигурация на връзката в субстрата ([Mutter et al., 1994, 1998c](#); [Wong, 2008](#); [Pedrolli et al., 2009](#); [Voragen et al., 2009](#)).

1.9.2.3 Рамногалактуронан галактуронохидролаза

РГГХ действат съвместно с РГРХ на хидролизните продукти на *endo*-РГХ (**фиг. 8С**). Ензимът атакува специфично галактуроновия остатък намиращ се на нередуциращия край на РГ-олигозахаридите. Олигогалактурониди от ХГ не се разграждат от този ензим. Не е намерена активност и спрямо хидролизните продукти образуващи се при действието на *endo*-РГЛ, което показва, че ензимът не е способен да освобождава Δ -4,5-GalpA звена. От експериментите относно кинетиката на реакциите с този ензим, проведени със субстрат линеен РГ, може да се заключи, че нискомолекулните субстратни вериги са предпочитани и се хидролизират с по-голяма скорост. До този момент в литературата няма данни дали има известна хомоложност с *exo*-ППГ. Първите продукти от хидролизата са β -D-GalpA, което показва, че РГГХ е инвертиращ ензим ([Mutter et al., 1998b, 1998c](#); [Wong, 2008](#); [Pedrolli et al., 2009](#); [Voragen et al., 2009](#)).

1.9.2.4 Синергизъм при разграждане на рамногалактуронана

Необходимо е да се отбележи, че поради сложния състав и структура пълна деполимеризация на пектиновите „космати“ региони не може да бъде извършена без съвместното действие на много „спомогателни“ ензими (**фиг. 8А, В и С**). Ензими като *endo*-галактаназа, *endo*-арабиназа, арабинофуранозидаза и β -галактозидаза улесняват действието на РГ-разграждащите ензими. Друг ензим имащ важна роля при разграждането на РГ е РГАЕ, който премахва до 70 % от ацетилните групи в омрежените области. Ацетил-естерните групи в ХГ не се хидролизират от този ензим. Те пречат на действието

на двата основни *endo*-ПГ-разграждащи ензима. Напр. по-пълно разграждане на силно разклонените фрагменти се наблюдава при едновременното действие на *endo*-ПГХ и ПГАЕ, отколкото при самостоятелното действие на *endo*-ПГХ. Подобни резултати са получени и с *endo*-ПГЛ (De Vries *et al.*, 2000; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Vincken, Voragen, & Beldman, 2003; Wong, 2008; Voragen *et al.*, 2009).

1.9.3 Ксилогалактуронан-разграждащи ензими

1.9.3.1 *Exo*- и *endo*-полигалактуроназа

Exo-ПГ изолиран от *Asp. aculeatus* е първият ензим, за който е демонстрирано, че е способен да разгражда деестерифициран КГ (Beldman *et al.*, 1996). Този протеин не проявява абсолютна специфичност към КГ, а може и да разгради деестерифициран ХГ, като краен продукт се образува GalpA. Ензимът е способен да освобождава от нередукциращия край Xyl-GalA дизахариди и/или моногалактуронова киселина. Изглежда, че *exo*-ПГ от *A. aculeatus* не е абсолютно специфичен към субстрата и проявява активност към наличието на ксилозни заместители в главната ХГ верига. Тази особеност се среща и в други *exo*-ПГ изолирани от плесенни гъби от род *Aspergillus* (Kester, Benen, & Visser, 1999).

Активността на *endo*-ПГ, проявена към осапунени КГ фрагменти, зависи силно от степента на ксиланизация. Например ябълковият КГ (вискоестерифициран и омрежен) е резистентен към всички тествани на него *endo*-ПГ, вкл. *endo*-ПГ-I и *endo*-ПГ-II от *Asp. niger*. По-слабо омрежения КГ, изолиран от диня, се разгражда до моно-, ди- и тригалактуронова киселини и до серия ксилозо-съдържащи олигогалактурониди (Yu & Mort, 1996). Отношението на Xyl:GalA в получените олигогалактурониди е 1:4 и 1:5. Резултатите показват, че *endo*-ПГ не проявява толерантност към ксилозо-заместени субстрати, за разлика от *exo*-ПГ.

1.9.3.2 *Endo*-ксилогалактуронанхидролаза и β -ксилозидаза

След експресия на гени на *A. tubingensis* в дрожди от вида *Kluyveromyces lactis*, е открит *endo*-действащ ензим, проявяващ активност към КГ (van der Vlugt-Bergmans *et al.*, 2000). Сходството между *endo*-ксилогалактуроназата и *exo*-ПГ е свързано със субстратната специфичност. *Endo*-КГХ разгражда КГ деестерифицирани области. Ниската активност на

endo-КГХ към неестерифициран ХГ и неговата висока активност спрямо осапунен КГ показва, че ензимът има изисквания за наличие на ксилозни странични вериги (докато *exo*-ПГ проявява по-широка специфичност към субстрата). Затова се приема, че *endo*-КГХ разкъсва връзките в КГ и то тези между две ксилозилирани галактуронови остатъка (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Pedrolli *et al.*, 2009; Voragen *et al.*, 2009).

Изглежда възможно и други пектолитични ензими да притежават ксилогалактуроназна активност. Действието на ПМЕ се възпрепятства от ксилозните странични вериги, подобно на *endo*-ПГ. Възможно е дизахаридите от типа Xyl-GalA да се разграждат от β -ксилозидаза (Schols *et al.*, 1995; Kester, Benen, & Visser, 1999) и КГ да става подходящ субстрат за действието на *endo*-ПГ едва след действието на β -ксилозидаза.

1.9.4 Арабинан- и арабиногалактан-разграждащи ензими

Поради изобилието от Ага-съдържащи структури в пектина и някои други растителни клетъчни ПЗ, арабинан-разграждащите (арабинанази) ензими играят важна роля в деградацията на растителния материал (Rombouts *et al.*, 1988; Beldman *et al.*, 1997).

Арабинаназите могат да се разделят на четири класа:

- ☑ *endo*-арабинанази;
- ☑ *exo*-арабинанази;
- ☑ α -L-Арабинофуранозидази;
- ☑ арабиноксилан арабинофуранохидролаза. В тази група се включват и ензими, специфични за ксилан и ксилан-съдържащи олигозахариди с *exo*-действие.

Втората група от ензими, които играят важна роля в деградацията на пектиновите странични вериги са галактаназите. Те могат да се разделят на три класа:

- ☑ *endo*-галактанази, които разграждат вътрешните връзки в галактановите вериги;
- ☑ *exo*-галактанази;
- ☑ β -D-галактозидази.

Последните два премахват крайните галактозни звена от къси галакто-олигозахариди или от галактозо-съдържащи полизахариди.

Описани са два ясно различаващи се помежду си арабинофуранозидазни ензима. Тип А не е активен спрямо полимерен субстрат, а предпочита олигозахариди. Тип В, обаче разгражда еднакво добре олигомерни и полимерни субстрати. Някои α -L-

арабинофуранозидази са способни да отделят *Araf* не само от арабинанов полимер, но също така и от арабиноксилан (De Vries *et al.*, 2000).

Основни продукти от действието на тези класове ензими са моно-и/или олигомерни арабинозни звена от арабинан и АГ. Ензимът α -L-арабинофуранозидаза катализира хидролизата откъм нередуциращия край на молекулата на α -L-арабинофуранозидите, откъсвайки α -L-*Araf*. Той действа на α -(1→5)-арабинаните и на АГ съдържащи α -(1→3)-и/или α -(1→5)-гликозидни връзки. Принципно действието на α -L-арабинопиранозидазата е сходно с това на α -L-арабинофуранозидазата само, че откъсва α -L-*Arap*. *Endo*- α -(1→5)-L-арабинаназа (ЕС 3.2.1.99) хидролизира безпорядъчно α -(1→5)-връзките във вътрешността на арабинозидите. *Endo*-арабинаназите предпочитат несубституирани линейни субстрати. Те се възползват от действието на арабинофуранозидазите тип В, които премахват страничните вериги от разклонения арабинанов полимер. Бактериалната *endo*-арабинаназа, продуцира като крайни продукти *Araf* и арабинобиоза, а действието на арабинаназа, изолирана от *A. niger*, води до натрупване на арабинобиоза и арабиотриоза (Rombouts *et al.*, 1988). Открит е подобен ензим и с *exo*-действие, който атакува нередуциращия край на страничната арабинанова верига. Всички арабинофуранозидази описани дотук могат да хидролизират и синтетични субстрати, като *p*-нитро-фенил- α -L-арабинофуранозид. Този субстрат може да се използва за разграничаване на арабинофуранозидази от арабиноксилан арабинофуранохидролаза, т.к. последния не е способен да хидролизира синтетични субстрати. Част от този ензимен клас се синтезират само от МО, но арабинофуранозидазата е намерена и в моркови, соя и спанак (De Vries *et al.*, 2000; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; De Vries & Visser, 2003).

Галактан-разграждащите ензими включват *endo*- и *exo*- β -(1→4)-D-галактаназа. Те съответно хидролизират случайно β -(1→4)-гликозидните връзки във вътрешността/респ. от нередуциращия край на β -D-галактановата верига или АГ-I. От различни видове базидиомицети са изолирани и галактанази, с *endo*- и *exo*-действие, които разкъсват β -(1→3) и β -(1→6)-гликозидни връзки (Ichinose *et al.*, 2008). Тези ензими действат и на галактоолигозахариди със СП по-голяма от 3. Крайните продукти от тяхното действие са Gal_p и галактобиоза. Интересно е, че *exo*- β -(1→3) и β -(1→6)-галактаназите действат и на АГ-II, който съдържа главно този вид връзки. Еукариотната β -(1→4)-галактаназа освобождава предимно галактобиоза и Gal_p от галактановите вериги (Lahaye, Vigouroux, &

Thibault, 1991). pH Оптимумите на действие на тези ензими се разполагат в областта 4.3-5.0 (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; De Vries & Visser, 2003).

1.9.5 Други

В процеса на синергично разграждане на ПВ освен описаните пектолитични, арабинан- и АГ-разграждащи ензими, вземат участие и някои други хидролази, като β -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23), β -D-глюкуронидаза (ЕК 3.2.1.31) и ферулоил естераза.

Галактановите вериги в пектиновата супрамолекула представляват субстрат за действието на ензима β -галактозидаза. Природният субстрат за действието му е лактозата, но е известно, че проявява активност и към гликолипиди, гликопротеини и редица други синтетични вещества. Ензимът катализира хидролитичното разграждане на β -D-галактозните връзки от нередуциращия край, отцепвайки Gal-остатъци. В зависимост от продуцентите и източниците ензимът е способен също да освобождава β -(1 \rightarrow 6)-свързани D-Galp остатъци от нередуциращия край на галактановата верига. Той показва активност върху α -L-арабинопиранозиди и β -фукопиранозиди. Скоростта на хидролиза на гликозидните връзки за β -галактозидазата от *A. niger*, *K. fragilis* и *E. coli* намалява в реда: β -(1 \rightarrow 6), β -(1 \rightarrow 4), β -(1 \rightarrow 3) и β -(1 \rightarrow 2). β -Галактозидазата проявява и трансферазно действие при високи субстратни концентрации или при висока конверсия на субстрата (De Vries *et al.*, 2000; Mahoney, 2003).

Ензимът β -D-глюкуронидаза катализира хидролитичното освобождаване откъм нередуциращия край на странично свързаната β -D-GlcpA и нейният метилов естер в АГ. Нейната активност се благоприятства от предварителното модифициране на субстрата с арабинанази и галактанази (Haque, Kotake, & Tsumuraya, 2005). В пектиновия АГ D-GlcpA може да бъде свързана чрез (1 \rightarrow 4,6)-гликозидни връзки към D-Galp, чрез (1 \rightarrow 4) връзки към L-Fucp. Потвърдено е, че GlcpA е закачена към D-GalpA в РГ на O-2 или O-3 място (Renard, Crépeau, & Thibault, 1999; Leijdekkers *et al.*, 2015). Тя е компонент на въглехидратната част на АГП, както и влиза в състава на олигозахаридните структури на РГ-II (Du, Clarke, & Bacic, 1996; Showalter, 2001). Вероятно, заради разнообразието от структури към които е прикрепена GlcpA, са необходими няколко типа глюкуронидазни ензими (Schols, personal communication).

Ферулоил естеразата е индуцируем ензим, подклас на карбоксиловите естерази, който влиза в състава на ксилан-разграждащите ензимни комплекси. Тези ензими се класифицират на тип А, В, С и D в зависимост от тяхната специфика и обект на действие. Едни отделят диферулоилни остатъци, а други ферулова киселина от нейните метилови естери. Участва в разрушаването на ксилан- и пектин-лигниновите омержени комплекси. Този ензим играе роля в деструкцията на ферулоилните мостове, т.к. отделя феруловата киселина, свързана към нередуциращия край на H3 (De Vries *et al.*, 2000; Wong, 2006).

Всички гореописани ензими са намерени в прокариоти и в малък брой еукариоти, а също така и в някои растения и животни.

1.10 Основни изводи от направения Литературен обзор

Въз основа на направения Литературен обзор могат да се направят следните изводи:

- ☑ Повече от две столетия ни делят от откриването на пектиновите вещества. Въпреки интензивните изследвания на тези комплексни растителни полизахариди все още съществуват редица аспекти от тяхната природа и характеристика, които подлежат на доизясняване и доуточнение.
- ☑ ПВ заемат голяма част от първичните кл. стени тип I на растенията. Те са изградени от два основни структурни фрагмента: галактуронан и рамногалактуронан, количеството на които варира според източника и начина на получаване. Към главната верига на рамногалактуронана са свързани като странични вериги арабинани, хомогалактани, арабиногалактани и други олигозахариди, съставени от неутрални монозахариди. Голямото структурно разнообразие се описва с няколко хипотетични структурни модела. По-пълното разбиране на природата на тези вещества е свързано с отчитането на взаимодействието им с останалите компоненти на клетъчните стени.
- ☑ Известни са различни растителни суровини за получаване на пектин, методите за екстракция, анализ и модификация, както и приложението му в различни области.
- ☑ ПВ намират основно приложение в хранително-вкусовата промишленост за производство на (функционални) храни, напитки и хранителни добавки.
- ☑ Досега известната информация относно структурата на ПП, както и познаването на механизмите на действие на голяма част от пектолитичните ензими е достатъчна

основа за обвързването и търсенето на връзката между структура и биологична активност. Все още липсва структурна информация, засягаща разпределението на метилните групи в ПП, както и някои структурни особености, което е от съществено значение за обясняването на наблюдаваните физични свойства. Установена е определена зависимост между структура и проявявана биологична активност. Всичко това мотивира необходимостта от провеждането на допълнителни изследвания върху състава, структурата и биологичните свойства на ПВ, което ще спомогне за по-цялостното им разбиране и по-ефективно използване.

- ☑ Необходим е комплексен подход при изучаването на ПВ, което е породено от техния разнообразен състав и сложна структура. Комбинацията от ензимно модифициране с анализа на получените продукти чрез съвременни инструментални техники се утвърждава като мощен подход за изясняването на връзката между структурата и биологичната активност на ПЗ.
- ☑ Независимо от широкото разпространение все още съществуват и се търсят недооценени суровинни източници на ПВ. Често това са лечебни растения, плодове и зеленчуци, традиционни за съответната страна. В литературата е налична информация за ПП от различни лечебни растения, но поради голямото разнообразие на последните съществува празнина по отношение връзката между структура и биологична активност на ПП. Оскъдна е информацията за ПП на лечебни растения, традиционни за нашето географско местоположение. За нашата страна остава недостатъчно изучена богатата суровинна база от лечебни растения, горски плодове и зеленчуци, които притежават биологична ценност.
- ☑ Не е изненадващо, че пектинът показва толкова много здравословни ефекти и многообразна биологична активност. Това безспорно се дължи на комплексната структура на ПП. Механизмите на протичащите функционални процеси в стомашно-чревния тракт и имунната система в него не са напълно установени. Приема се, че отговорна за по-голямата част от биоактивността на повечето ПЗ е РГ-I омрежената област. Много от тях имат прикачени странични вериги от АГ-I и тип II. Някои от получените чрез химични, физични и ензимни методи модифицирани продукти от ПП показват значителна имунологична активност, надвишаваща тази на изходните ПЗ. Разгадаването на първичната и вторична структура на ПП, както и възможността

за получаването ѝм в чист вид, позволява на науката да определи какви са „минималните“ структурно-необходими фрагменти за проявлението на даден тип биологична активност. Изясняването на редица други особености, свързани с РГ-I и II, са все още предизвикателство и прогресът в тази област остава малък.

- ☑ Въпреки че са известни доста детайли относно структурата на ПВ, само в малко от случаите, касаещи приложението на традиционни лечебни растения в японската и китайска *Капро* медицина, е установено кой точно структурен фрагмент е отговорен за проявяваната активност. Към настоящия момент, обаче няма достатъчно изследвания върху имунологичните свойства на плодовете и зеленчуците, които са естествена част от нашата ежедневна диета. Вероятно това е така поради големия интерес към „доказалите се“ лечебни растения, използвани в класическата или традиционна (алтернативна) медицина на много народи по света.
- ☑ Концепцията за лечение и превенция на базата на природни вещества стимулира засилване в изследванията на състава и свойства на ПВ и техните модифицирани продукти, както и създаването на естествени нутрацевтици и лекарствени продукти от тях. Следователно изследванията върху ролята на пектинови фрагменти за диетична превенция на социално значими заболявания са изключително полезни за обществото.
- ☑ Интересът към ПВ не е само от научен, но и от приложен характер. Необходими са задълбочени изследвания за правилната оценка на потенциала им при разработване на функционални храни и фармацевтични продукти.

2. 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 хранителни адитиви или функционални напитки.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ (MATERIALS & METHODS)

3.1 Материали

3.1.1 Реактиви и разтворители

(+)-Арабиногалактан (от лиственица), 2М реактив на Folin-Ciocalteu, 1-метилимидазол ($\geq 99\%$), фенол ($\geq 99\%$), 4-амино-5-хидразино-1,2,4-триазол-3-тиол (Purpald[®], $\geq 99\%$), β -D-глюкозопентаацетат, Na₂SO₃ (безводен), серия от монозахаридни стандарти (L-(+)-Ara, D-(+)-Glc, D-(+)-Gal, D-(+)-Fru, D-(+)-Xyl, D-(+)-GalA ($\geq 97\%$), *муо*-инозитол) с чистота $\geq 99\%$, ферулова киселина и CH₃COONa×3H₂O бяха закупени от Sigma-Aldrich и Sigma Life Sci. Декстран Блу от *Leuconostoc* ssp., 3-хидроксифенил, D-(+)-GalA, NaNO₃ бяха доставени от Fluka Chemika и Fluka Analytical (Slovakia) чрез местния представител. Тиогликолова киселина ($\geq 98\%$), TFA (99%), карбазол, амонячен разтвор (28-30%, Emsure[®]), H₃PO₄ (85%), FeCl₃×6H₂O, NaBH₄, Na₂B₄O₇×10H₂O, хидроксиламониев хлорид бяха набавени от Merck (Darmstadt, Germany). Сярна киселина (95%, AnalaR Normapur), солна киселина (37%), перхлорна киселина (70%), NH₄HCO₃ (AppliChem GmbH), Coomassie[®] Brilliant Blue (Amresco[®]), 4-хидроксифенилхидразид (РАНВАН) (98%), 4-диметиламинобензалдехид, D-Man, L-Rha, L-Fuc, D-GlcA (98+%) (Alfa Aesar, Germany) са закупени и доставени чрез местното представителство на VWR Prolabo. Органичните разтворители, използвани за приготвяне на мобилните фази, са с качество за HPLC анализ (Chromasolv[®]) и бяха закупени от представителството на Sigma-Aldrich. Всички останали органични разтворители бяха набавени от местни доставчици и бяха с качество „чист за анализ“.

3.1.2 Ензими

Ензимът алкохол оксидаза (*Pichia pastoris*, 10-40 U/mg, A2404) беше поръчан от Sigma-Aldrich и доставен чрез местното им представителство. *Endo*-III-I-M2 (EC 3.2.1.15) от *Asp. aculeatus* (5000 U/mL), *endo*- β -(1→4)-галактаназа (EC 3.2.1.89) от *Asp. niger* (1300 U/mL), β -галактозидаза (EC 3.2.1.23) от *Asp. niger* (4000 U/mL), са търговски достъпни ензимни препарати и бяха поръчани от Megazyme International Ltd. (Bray, Co. Wicklow, Ireland). Тези препарати са използвани директно и не са подлагани на допълнително пречистване. Рамногалактуронан хидролаза-A (EC 3.2.1.B9) от *Asp. aculeatus*, *endo*-

арабиназа (ЕС 3.2.1.99) от *Asp. aculeatus*, *Myceliophthora thermophile* (C1) *exo*-арабиназа (ЕС 3.2.1.1), *endo*-галактаназа (ЕС 3.2.1.89) от *Asp. aculeatus*, *endo*-ПГ-II (ЕС 3.2.1.15) и ПЛ-I (ЕС 4.22.10), и двата от *Asp. niger*, са високопречистени и добре охарактеризирани ензими, които бяха любезно предоставени от Prof. Dr. Henk A. Schols (Lab. of Food Chemistry, Wageningen University) в процеса на нашите съвместни изследвания. Подробна информация за тях може да бъде намерена в посочената от [Remoroza et al. \(2014a\)](#) литература.

3.1.3 Суровини

Като източници за получаване на ПЗ бяха използвани плодове, зеленчуци и билки. От плодовете бяха избрани цитрусови (портокали (*Citrus sinensis* (L.) var. *Valencia*) и лимони (*Citrus limon* L., Аржентина)) и шипкови плодове (*Rosa canina* L.). За сравнение в настоящето изследване беше включен търговски стандартизиран (26% захари-пълнители) ЦП (Danisco[®], Чехия) със СЕ 74.2% (56.1% УК). Към групата на зеленчуците беше включен празът (*Allium porrum* L.). От лечебните растения бяха избрани стръкове мурсалски (пирински) чай (*Sideritis scardica* L.). Цитрусовите плодове са внесени от Гърция и заедно с праса, който е местно производство, бяха закупени от търговската мрежа в гр. Пловдив. Шипковите плодове (оранжево-червени) бяха доставени в замразено състояние в полиетиленови пликосе от местен производител от района на Родопите (Пазарджишка област), а мурсалският чай е култивиран и доставен в хартиени пликосе от ЕТ „Ве Пе Пи – Веско Пипев“ (гр. Велинград, обл. Пазарджик).

3.2 Методи

3.2.1 Препаративни методи

3.2.1.1 Предварителна обработка на суровините

Портокалите и лимоните бяха добре измити с вода и подсушени. След това корите бяха отделени от месестата част без разделяне на албедео и флаведео. Свежите кори бяха нарязани на малки кубчета и веднага подложени на предварителна обработка за последващо извличане на ПП. Портокаловите кори бяха подложени и на трите вида предварителни обработки, а от лимоновите кори беше получена само АНЧ. Предварително почистените и измити стръкове праз бяха нарязани на парчета с големина 8-10 mm и

веднага бяха подложени на последваща обработка за получаване на АНЧ. Шипковите плодове бяха измити и подсушени. За получаването на АНЧ беше използвана само люспата. За тази цел плодът беше разполовен, а месестата част беше почистена от семките и допълнително раздробена.

3.2.1.1.1 Директно сушене: портокаловите кори (2×200 g) бяха разстелени върху часовникови стъкла и изсушени при 60°C в лабораторна вентилационна сушилня. Директно изсушените портокалови кори бяха използвани като контролна суровина за екстрахиране на ПП.

3.2.1.1.2 Микровълново облъчване: обработката беше осъществена по метода използван от [Kratchanova, Pavlova, & Panchev \(2004\)](#). Портокаловите кори (2×200 g) бяха поставени в кристализатори, омокрани с вода и облъчени в микровълнова печка (Samsung, MX235) за 10 min, с ток със свръхвисока честота (СВЧ) при 2450 MHz и 0.63 kW. След това корите бяха доизсушени при 60°C в лабораторна сушилня.

3.2.1.1.3 Получаване на АНЧ: 1 kg свежи нарязани портокалови или лимонови кори бяха прибавени към 2.5 L предварително загрят до 65-70°C етанол (96% v/v). При тази температура сместа престоява 1 h, след което нагриването се преустановява и течността с изходната суровина се оставя на стайна температура за едно денонощие. АНЧ беше промита двукратно (2×500 mL, с престой от 15 min) с 96% етанол. Промитата АНЧ беше филтрувана през платно, разстелена върху метални тави и изсушена при 60°C в лабораторна сушилня.

Получените след всяка обработка суровини бяха изсушавани и съхранявани в полиетиленови пликове при стайна температура до употреба.

3.2.1.2 Последователна фракционна екстракция на пектинови полизахариди

От трите вида предварително обработени портокалови кори и единият вид обработени лимонови кори беше проведена последователна екстракция с гореща дест. вода и 0.5% (w/v) воден разтвор на HCl. При избраната екстракционна схема бяха изолирани водно- и киселинно-екстрахируеми ПП. По същата схема бяха получени и ПЗ от АНЧ на праз и шипкови плодове (**схема 1**).

3.2.1.2.1 Водна екстракция

Към 50 g от обработените портокалови (лимонови) кори, праз или шипкова люспа бяха прибавени 1250 mL (1:25) дест. вода и получената смес беше нагрята при непрекъснато разбъркване за 10 min при 82°C. След това сместа беше хомогенизирана (за кратко) с пасатор и подложена на повторно нагриване при същите условия за още 50 min. Накрая вискозната маса бе филтрувана през платно, при което бяха получени суров екстракт (E_1) и твърд остатък (O_1) (схема 1). Последният беше подложен на повторна екстракция за 10 min с 500 mL дест. вода и образуваният екстракт бе отново сепариран. Двата водни екстракта бяха обединени и коагулирани с двукратен обем охладен 96% (v/v) етанол, съдържащ 1% (v/v) HCl. Утаяването беше проведено за 1 h в хладилник. Образуваният пектинов коагулат беше сепариран чрез филтруване през платно и подложен на последващо частично тристепенно пречистване, вкл. следните стъпки: 1) еднократно промиване със 70% етанол, съдържащ 2.1% HCl; 2) промиване със 70% етанол до неутрално рН; 3) еднократно промиване с 96% етанол.

3.2.1.2.2 Киселинна екстракция

С твърдия остатък (O_1) отделен след водната екстракция от портокалови (лимонови) кори, праз или шипкова люспа беше проведена екстракция с 0.5% воден разтвор на HCl (рН < 2.0). За целта към него бяха прибавени 1000 mL гореща 0.5% HCl (1:20) и образуваната смес беше хомогенизирана с пасатор. Условията на провеждане на двукратната екстракция и последващото изолиране и пречистване на пектините са идентични с условията на водната екстракция с разликата, че при коагулацията на пектина от суровите екстракти (E_2) беше използван само охладен 96% етанол (1:2). Изолираните и пречистени водно- и киселинно-екстрахируеми пектини бяха изсушени при 60°C в лабораторна сушилня, смлени с кафемелачка, и съхранявани при стайна температура в полиетиленови пликове.

В резултат на проведената двустъпална екстракция бяха получени шест фракции (по три водно- и три киселинно-екстрахируеми) ПП от портокалови кори и съответно две фракции от лимонови кори. Те бяха означени както следва: ВЕПП К, КЕПП К (водно- и киселинно-екстрахируеми пектини от портокалови кори - контроли); ВЕПП АНЧ и КЕПП АНЧ; ВЕПП СВЧ и КЕПП СВЧ (получени след микровълнов нагрев) и ВЕПЛ АНЧ и

КЕПЛ АНЧ (от лимонови кори). От прازа и шипковите плодове бяха получени по две фракции, означени както следва: ВЕПШ АНЧ и КЕПШ АНЧ (водно- и киселинно-екстрахируеми пектини от АНЧ на шипкова люспа); ВЕППр АНЧ и КЕППр АНЧ (водно- и киселинно-екстрахируеми пектини от АНЧ на праз).

3.2.1.4 Екстракция на полизахарид от свежи шипкови плодове

50 g замразени шипкови плодове (37% с.в.) бяха суспендирани и хомогенизирани в 250 mL 1% (w/w) разтвор на лимонена киселина (рН 2.0). Сместа бе нагрята за 1 h при 80°C при непрекъснато разбъркване. Полученият екстракт (рН 2.65) беше отделен от плодовата маса чрез филтруване през платно и коагулиран чрез добавянето на двукратен обем охладен 96% (v/v) етанол. Сместа престоя за 1 h в хладилник. Пектиновият коагулат беше отделен чрез филтруване и впоследствие промит последователно със 70% солнокисел етанол (2.1% HCl), 70% етанол до неутрално рН и накрая с 100 mL 96% етанол. Полученият ПЗ бе изсушен при 50°C в лабораторна сушилна до постоянно тегло. По-нататък в текста тази проба е означена като „ПЗ шипка (лк)“.

В друг експеримент чрез екстракция с дест. вода беше получен ПЗ от замразени шипкови плодове. 100 g плодове бяха смесени и хомогенизирани чрез пасатор с 400 mL дест. вода (1:4 проба:екстрагент). Получената смес беше загрята (80°C) на водна баня за 1 h при непрекъснато разбъркване. Плодовата маса беше отделена от екстракта чрез центрофугиране (4000 rpm; 20 min, 4°C). Полученият супернатант беше коагулиран с двукратен обем охладен 96% (v/v) етанол, съдържащ 0.1% (v/v) HCl (техническа, $\omega=32\%$, $\rho=1.16$ g/mL). Последващите стъпки на отделяне на коагулирания ПЗ и промиването му с алкохол бяха идентични с тези описани по-горе. По-нататък в текста тази проба е означена като „ВЕПШ“.

3.2.1.5 Екстракция на полизахарид от пресовки на мурсалски чай

25 g влажни (25 % с.в., получени от 10 g сух мурсалски чай) пресовки от мурсалски чай бяха смесени със 100 mL гореща дест. вода. Към получената смес бяха добавени 125 mL 1% (v/v) HCl и след хомогенизация беше подложена на ултразвуково въздействие за 1 h при 80°C във вана (Elmasonic P70H, Elma[®] Germany) при режим 80 kHz и 100% мощност. След филтруване през платно и хартиен филтър към екстракта бяха добавени 500 mL 96%

етанол. Сместта престоива в хладилник в продължение на 30 min, след което бе центрофугирана (20 min, 4000 rpm, 4°C). Допълнителното пречистване на сепарирания коагулат включваше гореописаните в т. 3.2.1.2.1 стъпки. В текста тази проба е означена като „ПЗ мурсалски чай“.

3.2.1.6 Пречистване на търговски цитрусов пектин

Пречистването на търговския ЦП чрез елуиране на колона с органичен разтворител, съдържащ HCl, беше проведено по разработения от [Kratchanov & Popova \(1990\)](#) метод. Към 100 g от пектина бяха прибавени 1.0 L 50% солнокисел етанол (2.1% HCl). След няколкократно разбъркване сместа беше оставена в покой за 20 h при стайна температура. Набъбналият пектин беше прехвърлен в хроматографска колона (100×5 cm) и през нея бяха елуирани (30 mL/h) последователно 2.0 L 70% солнокисел етанол и над 2.0 L 70% етанол до неутрална реакция. Накрая пектинът беше промит с 0.5 L 96% етанол и изсушен за 20 h при 50°C във вакуум сушилня (SPT 200). Изсушеният пектин бе фино смлян и съхраняван при стайна температура до употреба. Той беше означен като ХПЦП (хроматографски пречистен цитрусов пектин).

3.2.1.7 Лиофилизация

Някои от изходните ПЗ и всички след химическо осапунване, и ензимно модифициране бяха подложени на сублимационно сушене. Лиофилизацията беше проведена в лабораторен лиофилизатор Cryodos-50 (Telstar Industrial, S.L., Terrassa, Spain) при -45°C и 0.2 mbar подналягане или в Christ® Alfa 1-4 LD plus до достигане на влагосъдържание под 10%. Всички лиофилизати бяха съхранявани в полиетиленови пликове при стайна температура.

На **схема 1** са представени в обобщен вид основните стъпки при получаването на пектиновите полизахариди.

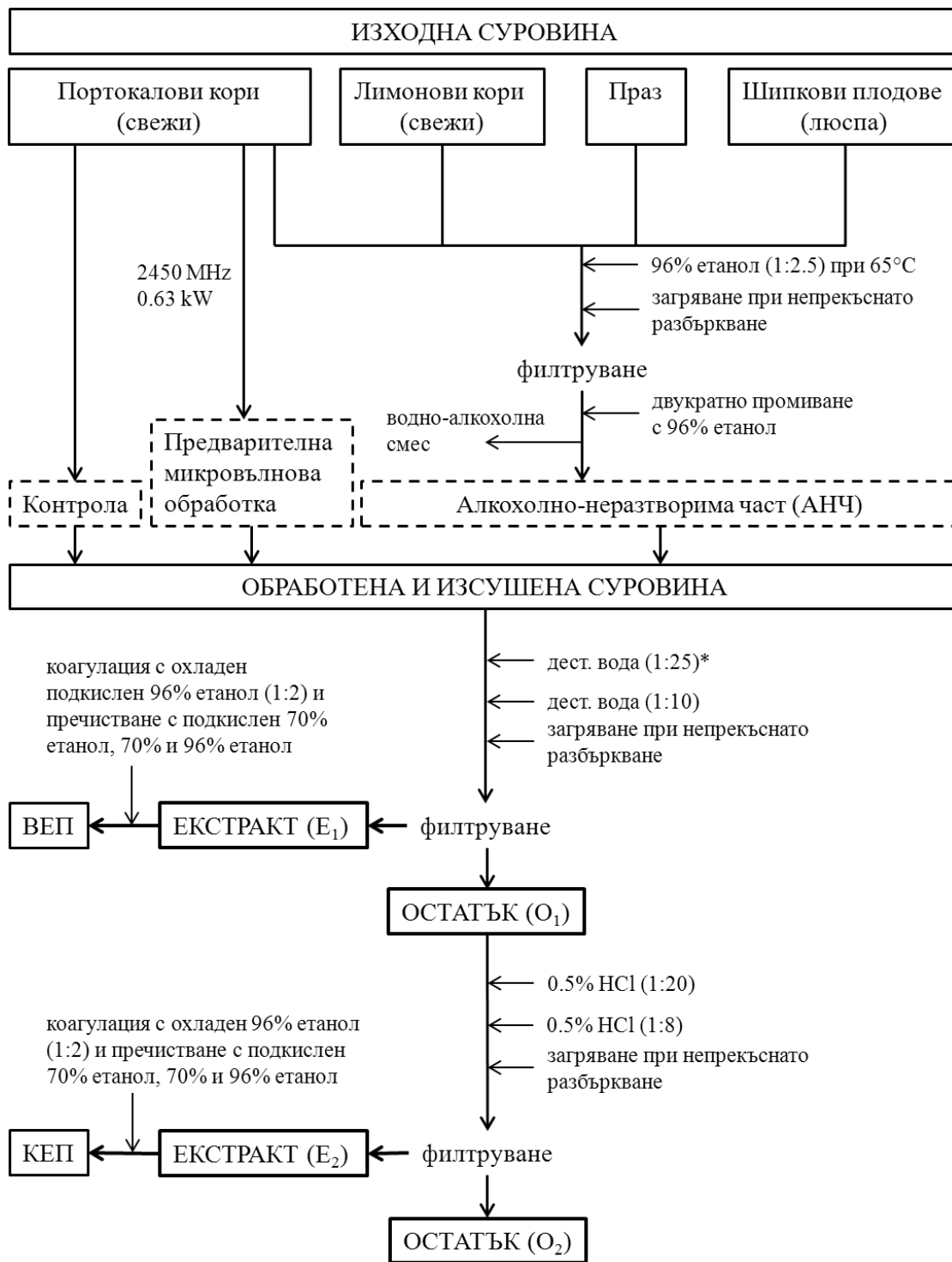


Схема 1. Основни стъпки при получаване на пектинови полизахариди от портокалови и лимонови кори, праз и шипка със съответните предварителни обработки. (* при АНЧ от шипка 1:30; ВЕП/КЕП – водно/киселинно екстрахиран полизахарид).

3.2.2 Аналитични методи

3.2.2.1 Спектрофотометрични методи

3.2.2.1.1 Определяне на общо съдържание на уронови киселини

Анхидроуроновото съдържание на изходните ПП и техните модифицирани продукти беше определено колориметрично с 3-хидроксифенил по метода на [Blumenkrantz & Asboe-Hansen \(1973\)](#), с използване на D-GalA като стандарт (5.0-100.0 µg/mL). Светлинната абсорбция на цветното съединение бе измерена при 520 nm на UV/VIS спектрофотометър HALO RB-10 (Dynamica, Australia). За някои от пробите съдържанието беше определено чрез автоматизирания вариант на метода на автоанализатор система Skalar San++ (Skalar Analytical BV, Breda, The Netherlands). Абсорбцията беше измервана при 530 nm, а за построяване на стандартна права беше използвана D-GalA в концентрационен интервал 12.5-100.0 µg/mL ([Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973](#); [Thibault, 1979](#)).

За анализиране на фракциите след йонообменна и гелхроматография беше използван микроплейт вариантът на карбазоловия метод със стандарт D-GalA (5.0-80.0 µg/mL) ([Bitter & Muir, 1962](#); [Cesaretti et al., 2003](#)). За целта подходящо разредените проби и стандарти бяха накапвани в 96-ямкови PS-микроплейтове с плоско дъно (Greiner Bio-One, Germany). Абсорбцията на розово-виолетовото оцветяване беше измервана в режим на възбуждане при 544 nm на флуориметър FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Germany).

Определянето на УК в растителните материали и в обработените изходни суровини беше извършено по метода на [Ahmed & Labavitch \(1978\)](#), като предварително смленият материал (10-13 mg) беше подложен на прехидролизна стъпка с прибавянето на 0.45 mL 72% (w/w) H₂SO₄ при 30°C за 1h. След разреждане (12 пъти) с дест. вода хидролизата беше продължена за 3 h при 100°C.

3.2.2.1.2 Качествена реакция за доказване присъствие на глюкуронова киселина

Като първичен тест за доказване наличието на GlcA в някои от пробите беше използвана специфична цветна реакция открита и описана от [Dische \(1947\)](#). Тя се основава на взаимодействието на GlcA с D-Man и тиогликолова киселина, при което се образува тъмно розов цвят. Индикация за присъствие на GlcA е положителната (> +0.012) разлика между измерените при 530 (510) nm и 480 nm абсорбции ($\Delta A_{530-480}$). При голям излишък от

други хексуранови киселини и неутрални захари тестът е по-малко чувствителен. При условията на реакцията GalA не дава оцветяване.

3.2.2.1.3 Определяне на естерификационна степен

Пектиновите проби (1 mg/mL) бяха осапунени (0.5 M NaOH, 1 h) и след неутрализация (1 M HCl) количеството на освободения метанол беше определено чрез комбинирания ензимно-колориметричен метод на [Klavons & Bennett \(1986\)](#). Анализът беше извършен съгласно процедурата описана от [Anthon & Barrett \(2008\)](#) с използване на ензимна дозировка 0.1 U/10 μ L, абс. метанол като стандарт (1.0-20.0 μ g/mL) и 4-амино-5-хидразино-1,2,4-триазол-3-тиол (Purpald[®]) като хромоген. Абсорбцията беше измерена при 550 nm. CE (%) беше изразена като брой mol метанол към 100 mol GalA.

3.2.2.1.4 Определяне на ацетилно съдържание

Ацетилното съдържание беше определено фотометрично по хидроксамовия метод на [McComb & McCready \(1957\)](#) с използване на β -D-глюкозопентаацетат (12.0-60.0 μ g/mL) като стандарт. Светлинната абсорбция беше измерена при 520 nm. За някои от пробите освободената след осапунване (0.1 M NaOH, 1 h) оцетна киселина беше определена ензимно-колориметрично с помощта на търговски достъпен ензимен кит (Megazyme Inter. Ireland Ltd. (Bray, Co. Wicklow, Ireland)). Анализът беше проведен съгласно инструкциите на производителя. Измерванията в този случай бяха направени на микроплейт-рийдър Infinite[®] F500 (Tecan, Switzerland), управляван от i-control[™] 1.6 софтуер. CA (%) беше изразена като брой mol ацетилни групи към 100 mol GalA.

3.2.2.1.5 Определяне на белтъчно и L-хидроксипролиново съдържание

Белтъчното съдържание във всички водоразтворими пектинови проби беше определено по багрилно-свързващия метод на [Bradford \(1976\)](#). 250 μ L от пробата (1.0-5.0 mg/mL) бяха смесени с 2.5 mL от багрилото. Светлинната абсорбция беше измерена при 595 nm след 5 min престой на сместа при стайна температура. Стандартната права беше построена с говежди серумен албумин (10.0-100.0 μ g/mL). Във всички останали проби (от АНЧ) белтъчното съдържание бе оценено по метода на Kjeldahl ($N \times 6.25$). За установяване

наличието на протеини във фракциите след гел- и йонообменна хроматография беше измервана абсорбцията при 280 nm.

Съдържанието на L-хидроксипролин в съответната проба (~5 mg) беше определено след киселинен хидролиз (6 M HCl, 16 h, 110°C) по колориметричния метод на [Kivirikko & Liesmaa \(1959\)](#). За стандарт беше използван *cis*-4-L-хидроксипролин (0.5-10.0 µg/mL). Хидролизът беше извършен в облодънни Ругех® (16×100 mm) епруветки с тефлонирани запушалки. Приготвянето на реактивите и ходът на анализа бяха извършени по описаната от [York et al. \(1985b\)](#) последователност.

3.2.2.1.6 Определяне на редуциращи захари (групи)

Редуциращите групи в пектиновите проби бяха определени по РАНВАН метода на [Lever \(1972\)](#). Разтворът на реактива се приготвя непосредствено преди работа. За стандарт беше използвана D-GalA (5.0-100.0 µg/mL). Абсорбцията беше измерена при 410 nm.

3.2.2.1.7 Определяне на общо количество полифенолни вещества

Общите полифеноли бяха определени по спектрофотометричния метод на [Singleton & Rossi \(1965\)](#) с реактива на Folin-Сiocalteu. За анализ се отпипетират 3.0 mL от разтвора на съответната проба (1.25 mg/mL), към които се добавят 0.2 mL дест. вода, 0.2 mL от реактива и 0.6 mL 20% (w/v) Na₂CO₃. След разбъркване пробите бяха темперирани за 5 min при 50°C. Светлинната абсорбция на охладените проби беше измервана при 765 nm срещу контролна проба. Резултатите се изчисляват спрямо стандартна права, построена с разтвори на ферулова киселина (40.0-200.0 µg/mL), като за анализирането им бяха взимани 0.2 mL и разреждани с 3.0 mL дест. вода.

3.2.2.1.8 Определяне на свободна и естерно-свързана ферулова киселина

Свободната и естерно-свързана ферулова киселина беше определена по метода на [Micard, Renard, & Thibault \(1994\)](#), използвайки ферулова киселина като стандарт. За анализа бяха използвани пряко приготвени разтвори на проби (1.25 mg/mL) в 0.05 M глицин-NaOH буфер с pH 10.0 (1:10 проба:буфер). Количеството на свързаната и свободна ферулова киселина беше изчислено въз основа на измерените при 345 и 375 nm абсорбции и известните за тези дължини на вълните моларни абсорбционни коефициенти ϵ_f

(свободна): 345 nm – 19662 L/(mol.cm); 375 nm – 7630 L/(mol.cm) и ϵ_e (естерно свързана): 345 nm – 23064 L/(mol.cm); 375 nm – 31430 L/(mol.cm). Степента на ферулоилиране (%) беше изчислена въз основа на Gal и Aga съдържание.

3.2.2.1.9 Определяне на антиоксидантна активност

3.2.2.1.9.1 Oxygen Radical Absorbance Capacity – ORAC метод

Използван е методът, разработен от [Ou, Hampsh-Woodill, & Prior \(2001\)](#) с някои модификации. Той се основава на инхибирането в спада на флуоресценцията на флуоресцеин при окислението му в присъствие на АО. Като генератор на пероксилни радикали се използва термичното разлагане на AAPH. 170 μ L флуоресцеин (70 nmol/L) и 10 μ L проба се темперират за 20 min при 37°C в апарата. Към реакционната смес се прибавят 20 μ L AAPH (51.5 mM крайна конц.). Сместа се разклаща и се отчита флуоресценцията на всяка минута до достигане на нулева стойност. За изразяване на АО активност се използва сравнение с резултатите, получени за стандартни разтвори на Trolox (6.25, 12.5, 25, 50 и 100 μ M), въз основата на които се построява стандартна права. Концентрацията на АО в пробата е правопропорционална на площта под затихващата крива на флуоресценция. За една ORAC единица се приема площта под затихващата крива на флуоресценция на разтвор на Trolox с концентрация 1 μ M. Резултатите се изразяват в μ mol Trolox еквиваленти.

3.2.2.1.9.2 Hydroxyl Radical Averting Capacity – HORAC метод

Методът е разработен от [Ou et al. \(2002\)](#) и измерва комплексобразуващата способност на даден АО в условия на реакция на Фентън, предизвикана от взаимодействие между Co (II) и H₂O₂. Разтворът на Co (II) беше приготвен по следния начин: 15.7 mg CoF₂×4H₂O и 20 mg пиколинова киселина се разтварят в дест. вода. Приготвя се и 0.55 M разтвор на H₂O₂ във вода. Накратко 170 μ L флуоресцеин (крайна конц. 60 nM) и 10 μ L проба се темперират при 37°C за 20 min директно в апарата. След това към реакционната смес се прибавят 10 μ L H₂O₂ (крайна конц. 27.5 mM) и 10 μ L от кобалтовия разтвор (крайна конц. 230 μ M). След разклащане се отчита началната флуоресценция, след което на всяка минута беше правено измерване до достигане на нулева флуоресценция. За построяване на стандартна права се използват разтвори на галова киселина (100, 200, 400,

500 и 600 μM). За една HORAC единица се приема площта под затихващата крива на флуоресценция на разтвор на галова киселина с концентрация 1 μM . Резултатите се изразяват в μmol еквиваленти галова киселина.

Всички разтвори бяха приготвяни във фосфатен буфер (75 mM, pH = 7.4). Двата анализа бяха проведени в 96-ямови непрозрачни микроплетйи (NuncloTM Δ Surface; NuncTM A/S, Denmark). Измерванията бяха извършени на FLUOstar OPTIMA флуориметър (BMG LABTECH, Germany), като беше използвана вълна на възбуждане 485 nm и вълна на излъчване 520 nm.

3.2.2.2 Хроматографски методи

3.2.2.2.1 Определяне на неутрални монозахариди и уронови киселини чрез HPLC-RID метод

20 mg от изходните или ензимно модифицирани цитрусови ПЗ бяха хидролизирани с 2 M TFA (10 mL) за 1 h при 121°C. Като вътрешен стандарт беше използван инозитол (1 mg/mL). Охладената проба беше подложена на трикратно вакуумизпаряване (50°C) до сухо за отделяне на киселината. Изсушеният хидролизат бе разтворен с 1 mL дейонизирана вода и филтруван (0.2 μm). Анализът беше проведен на HPLC-хроматографска система Agilent Technologies[®] 1220 Infinity LC (USA) с RI детектор (1260 Infinity, Germany), колона Zorbax Carbohydrate (4.6 \times 150 mm, 5 μm , Agilent) и предколона Zorbax Reliance Cartridge (Agilent). Системата е управлявана от софтуер EZChrom Elite Compact версия 3.3.2 SP2. Като мобилна фаза беше използван 80% (v/v) AcCN при скорост на потока 1.0 mL/min. Обемът на инжектираната проба беше 20 μL , а отделните монозахариди бяха идентифицирани (35°C) чрез сравняване на времената на задържане с тези на стандартите. Супернатантите след ензимна модификация бяха анализирани директно.

Уроновите киселини в получените при същите условия и обработки както по-горе хидролизати бяха анализирани чрез HPLC-хроматографска система Waters (USA) съставена от помпа (модел 501), колона Aminex HPX-87H (300 \times 7.8 mm, BioRad) свързана с предколона AG 50W-X4 (50 \times 4.6 mm) и RI детектор (Waters R401). Като мобилна фаза беше използвана 4 mM H₂SO₄, при скорост на потока 0.8 mL/min. Обемът на инжектираната проба беше 100 μL , а пиковете на съответните киселини бяха

идентифицирани чрез сравняване на времената на задържане с тези на стандартите. Анализът беше проведен при 25°C.

3.2.2.2.2 Определяне на неутрални монозахариди чрез газ-хроматографски метод

Киселинно-екстрахираните ПЗ от АНЧ на портокалови кори и праз, заедно с тези получени от шипка, мурсалски чай и фракциите им след гел-хроматография бяха анализирани за неутрални захари чрез газ-хроматографски метод, използвайки инозитол като вътрешен стандарт (1 mg/mL) (Albersheim *et al.*, 1967; Englyst & Cummings, 1984). Пробите (10-13 mg) бяха обработени със 72% (w/w) H₂SO₄ (0.45 mL) за 1 h при 30°C, а след разреждане до 1 M H₂SO₄ хидролизата беше продължена за 3 h при 100°C. Преди анализа хидролизираните неутрални монозахариди бяха превърнати в съответните алдитол ацетати (Blakeney *et al.*, 1983). Анализът беше извършен на газов хроматограф Thermo Scientific Focus GC Interscience снабден с аутосемплер (AS 3000 Thermo Sci.), колона DB-225 (15 m×0.53 mm×1 µm) с максимална работна температура 220°C и пламъчно-йонизационен детектор. Управлението, настройките, събирането и обработката на данните беше извършено със софтуер Xcalibur™ 2.1 (Thermo Sci.).

3.2.2.2.3 Определяне на монозахариден състав чрез НРАЕС-PAD метод (pH > 12)

Едновременното определяне на неутралния монозахариден и урониден състав в пробите беше извършено чрез НРАЕС-PAD метод (pH > 12) след метанолиза и TFA хидролиза по метода на De Ruiter *et al.* (1992). Към претеглени (~2 mg) на аналитична везна (Mettler Toledo XS 105) и изсушени разтвори на всяка проба бяха прибавени по 1 mL 3 N HCl в сух метанол. След обдухване със сух N₂ пробите бяха инкубирани за 16 h при 80°C в подгряващ блок (Stuart block heater SBH200D/3). След охлаждане и изсушаване под струя сух въздух пробите бяха подложени на хидролиза с 2 M TFA за 1 h при 121°C. Подходящо разредените хидролизати бяха анализирани на НРАЕС (Dionex Corp., USA) хроматографска система снабдена с CarboPac PA 1 колона (2×250 mm), предколона и система за пост-колонно добавяне на основа (Dionex, USA). Milli-Q-вода, 0.1 M NaOH (A) и 1 M NaOAc в 0.1 M NaOH (B) бяха използвани като елуенти при скорост на потока 0.4 mL/min, а при скорост на потока 0.1 mL/min беше пост-колонно добавяна 0.5 M NaOH. За разделянето беше използван следният градиент за (A): 0-30.0 min, 0 mM; 30.0-30.1 min, 0-

100 mM; 30.1-50.0 min, 100 mM. Едновременно с това (B): 0.0-30.1 min, 0 mM; 30.1-45.0 min, 0-400 mM; 45.1-50.0, 1000 mM. Milli-Q-вода беше използвана между 0.0-30.0 min, а пост-колонната добавка на 0.5 M NaOH беше използвана между 0.0-30.1 min. След всяка проба колоната беше измита за 5 min с 1 M NaOAc в 0.1 M NaOH и за 8 min с 0.1 M NaOH, а впоследствие еквилибрирана с Milli-Q-вода за 15 min. На този анализ бяха подложени всички ПЗ изолирани от шипкови плодове и праз.

3.2.2.2.4 Определяне на молекулна маса

Молекулните маси на изходните и модифицираните цитрусови ПЗ бяха определени чрез HPSEC система Waters (USA), състояща се от две последователно свързани колони Ultrahydrogel[®] 120 и Ultrahydrogel[®] 500 (7.8×300 mm, Waters), помпа (модел 501) и RI детектор (Waters R-401). Като мобилна фаза беше използван 0.1 M NaNO₃, при скорост на елуиране 0.6 mL/min и температура на колоната 25°C. За построяването на калибрационна права бяха използвани пулуланови стандарти (Pullulan Shodex[®] Standard P-82, Showa Denko-K.K., Japan) с мол. маси в интервала 5.9-788 kDa. Обемът на инжектираната проба (2 mg/mL) беше 80 µL.

Разпределенията на мол. маси на изходните киселинно-екстрахираните ПЗ от портокалови кори, праз, свежи шипкови плодове и мурсалски чай, заедно с техните изолирани модифицирани продукти и ензимни хидролизати, бяха определени чрез HPSEC Dionex Ultimate 3000 система конфигурирана с четири колони (TSK-Gel super AW; Tosoh Bioscience, Tokyo, Japan): една предпазна (6×40 mm) и три сепариращи колони (4000, 3000 и 2500) (6×150 mm). Пробите (2-2.5 mg/mL) бяха авто-инжектирани (20 µL) и елуирани при 55°C с 0.2 M NaNO₃ при скорост на потока 0.6 ml/min. Елуирането беше следено с RI детектор (Shodex RI 101; Showa Denko K.K., Kawasaki, Japan), а за калибриране на системата бяха използвани пектинови стандарти (10-100 kDa) (Remoroza *et al.*, 2012). Обработката на данните беше извършена чрез софтуерен продукт Chromeleon[®] 7 (Dionex).

3.2.2.2.5 Гелхроматография

КЕПП АНЧ и ВЕПЛ АНЧ, както и техните модифицирани продукти с *endo*-ПП-I и β -(1→4)-галактанази бяха подложени на гелхроматографско фракциониране. Разделянето беше извършено на хроматографска система Pharmacia Biotech (Sweden) с помпа HiLoad P-

50, колекторно устройство GradiFrac[®] и колона НК 16/100, запълнена със Sephacryl S-300 HR (разделителна способност в интервала 2-400 kDa). Инжектираната проба (2.0 mL, 3.0 mg/mL) беше елуирана с 0.05 M NaOAc буфер (pH 5.0) при скорост 1.0 mL/min. Изходните субстрати бяха елуирани с 200 mL буфер, а модифицираните с 250 mL. Обемът на събираните фракции беше 5 mL. Празният обем на колоната ($V_0 = 57$ mL) беше определен чрез Декстран Блу 2000. Молекулните маси на избраните фракции бяха определени по предварително построена стандартна права с декстранови стандарти (35-200 kDa) и включване на GalA и ПГК (25 kDa).

3.2.2.2.6 Йонообменна хроматография

Водно-екстрахираните ПЗ от АНЧ на портокалови кори и шипкова люспа, заедно с техните необработени с алкохол ензимни хидролизати след действие с *endo*-ПГ-I бяха подложени на препаративна йонообменна хроматография. Разделянето беше извършено на хроматографска система Pharmacia Biotech (Sweden) с помпа HiLoad P-50, колекторно устройство GradiFrac[®] и колона ХК-26/40, запълнена с DEAE Sepharose™ fast flow (GE Healthcare, Bio-Science AB, Sweden). Проба (20 mL, 5.0 mg/mL) беше инжектирана в колоната чрез суперлуп (50 mL). Обемът на събираните фракции беше 17 mL. Дейонизирана вода (B) и 1 M NH₄HCO₃ (A) бяха използвани като елуенти при скорост на потока 1 mL/min. За разделянето беше използван следният линеен градиент за (B): 0-200 mL, 100%; 200-1900 mL, (100-0)%. Едновременно с това (A): 0-200 mL, 0% (0 M); 200-1900 mL, (0-100)% (0-1 M). Фракциите, съдържащи съответния пик, бяха обединявани, вакуумконцентрирани и лиофилизирани. След всяка проба колоната беше промивана и насищана с 1 M NH₄HCO₃ за 2 h при поток 1 mL/min.

3.2.2.2.7 Определяне на галактуронови олигомери чрез HPAEC-PAD-UV метод

Количеството на (не)наситените олигогалактурониди в ензимните хидролизати на киселинно-екстрахираните ПЗ от портокалови кори и праз, свежи шипкови плодове и мурсалски чай беше определено, използвайки ICS 5000 HPAEC система (Dionex Corp. Sunnyvale, CA, USA), контролирана от Chromeleon 7.0 софтуер (Dionex Corp.) и снабдена с електрохимичен (PAD) и UV детектор. Преди анализа пробите бяха разредени с Milli-Q-вода (1:1) и центрофугирани. 10 µL бяха авто-инжектирани в предколона CarboPac PA-1

(2×25 mm) свързана с анион-обменна CarboPac PA-1 колона (2×250 mm). Елуирането беше извършено с участието на две мобилни фази (A) 0.1 M NaOH и (B) 1 M NaOAc в 0.1 M NaOH при скорост на потока 0.3 mL/min. За разделянето беше използван следният градиент: 0-60 min, (20-70)% (B), 60-65 min, (70-100)% (B), 65-70 min, 100% (B), 70-70.1 min, (100-20)% (B). Колоната беше ре-еквилибрирана с 20% (B) за 15 min (Remoroza *et al.*, 2014a). За калибриране на системата бяха използвани серия от стандарти: смес от наситени олигомери със СП 1-5 и смес от ненаситени олигомери със СП 2-6.

3.2.2.2.8 Определяне на кисели и неутрални олигомери чрез HILIC-ELSD/ESI-MSn метод

Сепарирането, идентифицирането и количественото определяне на кисели и неутрални пектинови олигозахариди, отделени в резултат на ензимното действие, беше извършено чрез комбиниран HPLC-маспектрометричен анализ. Ензимните хидролизати на киселинно-екстрахираните ПЗ от портокалови кори и праз, свежи шипкови плодове и мурсалски чай бяха разредени до 1 mg/mL в 50% (v/v) AcCN и анализирани на Thermo Accela UHPLC (Thermo Sci., Waltham, MA, USA) система, свързана към ELSD (Agilent 1200 серия, Gen Tech Scientific Inc., NY, USA) и ESI-IT-MSn (LTQ XL MS, ion trap, Thermo Sci., San Jose, CA, USA) детектори. Хроматографското разделяне беше осъществено на Acquity UPLC BEH Amide колона (1.7 μ m, 2.1×150 mm) в комбинация с предколونا VanGuard (1.7 μ m, 2.1×5 mm; Waters Corp., Milford, MA, USA). Елуирането на пробата (5 μ L) беше извършено при скорост на потока 0.5 mL/min и температура на колоната 35°C. Мобилните фази и използваният градиент при разделянето са добре описани от Remoroza *et al.* (2014a). Контролът върху системата и обработката на резултатите бяха извършени чрез софтуер Thermo Xcalibur™ 2.2.

3.2.2.3 Спектрални методи

3.2.2.3.1 MALDI-TOF маспектрометрия

1 μ L от обезсоления разтвор на съответната проба беше смесен с 1 μ L от матричния разтвор (2,5 DHB, 10 mg/mL в 30% (v/v) AcCN) върху MALDI-плейт (MTP 384 Brucker Daltonics, Bremen, Germany) и изсушен под струя сух топъл въздух. Анализът беше извършен на работна станция Ultraflex (Brucker Daltonics, Germany), снабдена с азотен лазер, опериращ при 337 nm. Йоните, получени при най-ниската лазерна мощност (35%),

бяха детектирани в положителен режим. Смес от малтодекстрини (1 mg/mL в 50% (v/v) AcCN) с мол. маси в обхвата 300-3000 Da бяха използвани за калибриране (Sengkhampan *et al.*, 2009).

3.2.2.3.2 ИЧ-ФТ спектроскопия

ИЧ спектрите на изследваните ПЗ (4 mg) са регистрирани на ИЧ-ФТ спектрофотометър Nicolet Avatar 330 (Thermo Electron Corp., USA) в таблетка KBr. Заснемането на спектъра беше извършено в интервала между 4000 и 400 cm^{-1} със 132 сканирания. Анализът и обработката на получените спектри бяха осъществени с помощта на софтуерен продукт SPrekwin32 версия 1.71.5.

3.2.2.3.3 ЯМР спектроскопия

Всяка от пробите (10-20 mg) беше разтворена в 1 mL D_2O (euriso-top[®], 99.96% D) и лиофилизирана. Изсушените проби бяха отново разтворени в 0.6 mL D_2O при 25°C и прехвърлени в 5 mm ЯМР кювети Norell. ЯМР спектрите са заснети на апарат Bruker Advance II+ 600 MHz. Всички химични отмествания са представени в ppm и са отнесени спрямо вътрешен стандарт ацетон (δ 2.22 ppm за ^1H и δ 31.54 ppm за ^{13}C) или спрямо сигнала на H_2O (δ 4.75 ppm при 300K, δ 4.84 ppm при 293K). Анализът и обработката на получените спектри бяха осъществени с помощта на софтуерен продукт Bruker TopSpin версия 2.1.

3.2.3 Ензимни методи

3.2.3.1 Осапунване

Исходните цитрусови ПЗ (с изкл. на ВЕПП К), заедно с тези изолирани от АНЧ на праз и шипка, бяха подложени на осапунване с 0.1 M NaOH за премахване на Местерните и Ас-групи. За целта пробите бяха омокряни с 1 mL абс. етанол и разтворени в 0.1 M NaOH в концентрация 10 mg/mL (pH ~12.5). Разтворените проби бяха доосапунени в хладилник (4°C). Деестерификацията траеше 24 h от момента на прибавяне на основата. След корекция на pH до ~6.0 с 3 M HCl осапунените ПЗ бяха коагулирани (2 h, 4°C) с 96% (v/v) етанол (1:2). Утаените пектини бяха сепарирани чрез филтруване на Бюхнерова фуния и обилно промити с 96% етанол (~500 mL). Излишният алкохол беше премахнат

чрез притискане и получените пектинови коагулати бяха разтворени с дейонизирана дест. вода в пластмасови контейнери и лиофилизирани.

3.2.3.2 Ензимна модификация на ПП, изолирани от цитрусови кори и праз

3.2.3.2.1 Модификация с *endo*-ПГ-I

С изключение на водно- и киселинно-екстрахираните фракции от директно изсушените портокалови кори всички останали цитрусови ПП (вкл. ХПЦП) и ПЗ от АНЧ на праз бяха подложени на ензимна модификация с *endo*-ПГ тип I. Съответната проба (5 mg/mL) беше разтворена в 50 mM NaOAc буфер (pH 5.0) и инкубирана с 0.042 U/5 mg S *endo*-ПГ-I при 40°C за 24 h в клатачна водна баня (ST-402, Nüve, Turkey). Ензимните единици бяха подбрани на базата на използваните (0.016 U/3-4 mg S) от [Sengkhampan et al. \(2009\)](#). След края на инкубирането пектиновите проби бяха подложени на директно коагулиране с 96% (v/v) етанол (1:2) за 2 h при 4°C. Образуваните преципитати бяха сепарирани чрез центрофугиране (4000 rpm, 20 min; Megafuge 1.0 R, Heraeus, Germany), като супернатантите с алкохолно разтворимите захари бяха отдекантирани и запазени. Утайките от алкохолно неразтворимите фрагменти бяха ре-суспендирани в по 100 mL 80% (v/v) етанол и отново центрофугирани. Накрая промитите утайки бяха разтворени в дейонизирана вода (система Adrona Crystal, EU) и лиофилизирани. Обединените и вакуумконцентрирани (50°C, 0.8 bar; ~50 mL) супернатанти от всяка проба бяха също лиофилизирани.

В допълнителен експеримент ензимният хидролизат на водно-екстрахирания ПЗ от АНЧ на портокалови кори не беше алкохолно утаен, а беше директно подложен на йонобменна хроматография (т. 3.2.2.2.6).

3.2.3.2.2 Модификация с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими

За частично отстраняване на β -(1→4)-галактановите странични вериги на РГ-I регионите от алкохолно утаените модифицирани продукти, изолирани след действие с *endo*-ПГ-I (т. 3.2.3.2.1), беше използвана комбинация от *endo*- β -(1→4)-галактаназа и β -галактозидаза. Ензимната хидролиза беше проведена с 2.5 U/5 mg S *endo*- β -(1→4)-галактаназа и 0.8 U/5 mg S β -галактозидаза. Условиата на инкубирането и последващата обработка бяха извършени както в т. 3.2.3.2.1. В резултат на тази втора ензимна

модификация бяха получени отново два крайни продукта при всеки полизахарид – алкохолно-утаим и алкохолно-разтворим (супернатант). Ензимните единици за *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназата бяха подбрани на базата на използваните от [Sengkhampan et al. \(2009\)](#) 2.5 U/3-4 mg S, а за β -галактозидазата от [De Vries et al. \(2000\)](#) 4.2 μ g Enz/2.5 mg S, [Hellin et al. \(2005\)](#) 0.12 U/4 mg S и [Sengkhampan et al. \(2009\)](#) 0.04 U/3-4 mg S.

3.2.3.2.3 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ

С цел получаване на повече информация относно структурните особености (разпределение на Me-естерните връзки и др.) на изходните и получените след модификация алкохолно-утаими продукти беше използван подходът на ензимния фингърпринтинг анализ. За целта бяха избрани киселинно-екстрахирани ПЗ от портокалови кори и праз, заедно с техните алкохол-утаени продукти след действието на *endo*-ПГ-I (т. 3.2.3.2.1). Всички проби (5 mg/mL) бяха разтворени в 50 mM NaOAc буфер (pH 5.0). Хидролизът беше извършен при 40°C и непрекъснато разбъркване (Termomixer erpendorf, 850 rpm) на два етапа по следния начин: първоначално инкубиране на пектиновите разтвори със смес от ПГ-I-модифициращи ензими (*endo*-галактаназа + *endo/exo*-(C1)-арабиназа + РГХ-A) и ПЛ-I за 6 h, последвано от добавяне на *endo*-ПГ-II (ХГ-разграждащ ензим) и инкубиране за нови 18 h. След приключването на хидролиза ензимите бяха инактивирани чрез загряване при суха топлина (100°C) за 5-6 min. Хидролизатите бяха центрофугирани за 10 min при 5°C (14250 rpm, Hermle Z233 MK2). Получените супернатанти бяха анализирани чрез серия от методи (т. 3.2.2.2.4, 3.2.2.2.7, 3.2.2.2.8, 3.2.2.3.1) описани по-горе. Успоредно с опитните проби бяха разработени и контролни (1 mg/mL).

3.2.3.3 Ензимна модификация на ПП изолирани от шипкови плодове

3.2.3.3.1 Модификация с *endo*-ПГ-I

На тази модификация беше подложен водно-екстрахираният ПЗ от свежи шипкови плодове (ВЕПШ) и осапуненият водно-екстрахиран ПЗ от АНЧ на шипкови люспи. Процесът на осапунване беше извършен по начин и условия, описани в т. 3.2.3.1. След корекция на рН до ~5.5 с оцетна киселина беше прибавен еквивалентен обем от 50 mM NaOAc буфер (pH 5.0), при което бяха достигнати подходящите концентрация и рН на

субстрата за ензимно въздействие (5 mg/mL). Условието на хидролиза и ензимните единици бяха същите, както описаните в т. 3.2.3.2.1. Ензимната реакция беше прекратена чрез загряване на пробата на кипяща водна баня за 5 min. Полученият хидролизат от ВЕПШ АНЧ не беше алкохолно утаен, а след центрофугиране (6000 rpm, 20 min; MPW-260R, Poland) беше подложен на препаративна йонообменна хроматография. Хидролизатът на ВЕПШ беше обработен с етанол по начина описан в т. 3.2.3.2.1. Изолираните алкохолно-утаими продукти бяха повторно разтворени в дейонизирана вода и интензивно диализирани (mwco 3500 Da, Membra-cel[®], 22 mm/5 m, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) за 48 h срещу дест. вода. Остатъкът след диализа беше лиофилизиран.

3.2.3.3.2 Ензимен фингърпринтинг анализ

За този анализ беше избран екстрахираният чрез 1% (w/w) разтвор на лимонена киселина ПЗ от свежи шипкови плодове (т. 3.2.1.4). Всички проби (5 mg/mL) бяха разтворени в 50 mM NaOAc буфер (pH 5.0). Хидролизът беше извършен при 40°C и непрекъснато разбъркване (Termomixer erpendorf, 850 rpm) със смес от ПЛ-I и *endo*-ПГ-II (ХГ-разграждащи ензими) за 24 h. Инактивирането на ензимите беше извършено чрез загряване при суха топлина (100°C) за 5-6 min. Хидролизатите бяха центрофугирани за 10 min при 5°C (14250 rpm, Hermle Z233 MK2). Получените супернатанти бяха анализирани чрез серия от методи (т. 3.2.2.2.4, 3.2.2.2.7, 3.2.2.2.8, 3.2.2.3.1), описани по-горе. Успоредно с опитните проби бяха разработени и контролни (1 mg/mL).

3.2.3.4 Ензимна модификация на ПЗ, изолиран от пресовки на мурсалски чай

3.2.3.4.1 Ензимен фингърпринтинг анализ

Изолираният ПЗ от мурсалски чай беше подложен на ензимен фингърпринтинг анализ със смес от ПЛ-I и *endo*-ПГ-II (ХГ-разграждащи ензими) за 24 h при условия идентични с тези в т. 3.2.3.3.2.

3.2.4 Биологични методи

3.2.4.1 Определяне на *in vitro* антикомплементарна активност

Имунологичната активност на изходните и модифицираните полизахариди беше оценена *in vitro* чрез микроварианта на теста за определяне на антикомплементарна активност, разработен от Klerx *et al.* (1983). Анализът се основава на изследване способността на ПЗ да активират комплемента от нормален човешки кръвен серум по класическия или алтернативния път. Това активиране се оценява чрез процента на инхибиране на хемолизата на прицелни клетки (животински еритроцити като антигени) в присъствие на третиран с ПЗ кръвен серум в сравнение с контролен, нетретиран с ПЗ серум. Степента на хемолиза се определя чрез фотометрично измерване на освободения от еритроцитите хемоглобин.

При изследване активирането на класическия път на комплемента беше използван физиологичен разтвор, буфериран с веронален буфер (25 mM, pH 7.4), съдържащ 15 mM CaCl₂ и 5 mM MgCl₂. Като прицелни антигени бяха използвани овнешки еритроцити сензибилизирани с антисерум от заешки IgM антитела. При изследване активирането на алтернативния път беше използван физиологичен разтвор, буфериран с 25 mM веронален буфер (pH 7.4), съдържащ 5 mM MgCl₂ и 8 mM етиленгликолтетраацетат. Индикаторната система бяха заешки еритроцити, които не бяха сензибилизирани с антитела срещу тях. Ефектът от комплементното активиране беше определен след предварително инкубиране при 37°C за 45 min на подходящо разреден серум (даващо 50% лизис на еритроцитите) и изследваната концентрация на ПЗ (~5 mg/mL и други подходящи разреждания от тази). След това третираният серум беше инкубиран при 37°C за 90 min, поотделно с прицелните еритроцити за двата комплементни пътя. Накрая беше определен спектрофотометрично освободеният хемоглобин от еритроцитите в отделените супернатанти при 541 nm. Активността беше изразена като % инхибиране на общата комплементна хемолиза и изчислена по формулата:

$$\text{Инхибиране на } TCH_{50} \% = \frac{TCH_{50}^K - TCH_{50}^П}{TCH_{50}^K} \times 100$$

TCH_{50}^K – обща компл. хемолиза при 50% хемолитична активност на контролен серум;

$TCH_{50}^П$ – обща компл. хемолиза при 50% хемолитична активност на третиран с ПЗ серум.

3.2.4.2 Изследване на *in vitro* цитотоксичност и антитуморна активност

На водно-екстрахираните ПЗ от АНЧ на праз и шипка беше направена *in vitro* оценка на цитотоксичния потенциал и антитуморната активност чрез колориметричния МТТ (тетразолиев) анализ (Mosmann, 1983). За тези тестове бяха използвани 6 бр. човешки клетъчни линии – от които една нормална фибробластна линия, изолирана от човешка тестикуларна тъкан и следните 5 туморни линии:

- ☑ А549 (получени от човешки карцином на белия дроб, епитело-подобна клетъчна линия, ATCC CCL 185, NBIMCC 2404);
- ☑ FL (епитело-подобна клетъчна линия, получена от нормален човешки амнион, ATCC CCL 62, NBIMCC 94);
- ☑ HeLa (човешки цервикален аденокарцином, ATCC CCL-2, NBIMCC 164);
- ☑ LS 180 (епитело-подобни човешки клетъчни линии (тип В по класификацията на Дюкс, колоректален аденокарцином, ATCC CL-187);
- ☑ HT29 (епителна клетъчна линия, получена от човешки колоректален аденокарцином, ATCC HTB-38);

Получените резултати се представят като проценти оцелели клетки по отношение на 100% нетретирани клетки. От графичните зависимости бяха определени IC₅₀ стойностите - това е концентрацията, при която остават живи половината от максималното количество клетки.

3.2.4.3 Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити

Анализът се състои в третиране на бели кръвни клетки с ПЗ и измерване продукцията на IL-6, брой на Т- и В-субклетъчни популации чрез флоуцитометричен анализ. Кръвни проби бяха получени от здрави доброволци след писменото им съгласие за това. След подходящо лизиране и отстраняване на червените кръвни клетки, получената фракция от бели кръвни клетки (левкоцити) беше поставена в 96-ямкова плака, съдържаща DMEM среда, допълнена с 10% фетален телешки серум и антибиотици. В трикратно повторение клетките бяха третирани с отделните ПЗ (100 µg/ml за 48h при 37°C, 5% CO₂ в овлажнен инкубатор). Контролните клетки бяха култивирани в същата среда без ПЗ при същите условия. След 48 h инкубиране културалната течност беше отстранена и използвана за измерване продукцията на IL-6 и други цитокини чрез ELISA метод, съгласно инструкциите на производителя. Третираниите и контролните клетки по-нататък бяха

оцветявани с флуорохром-конюгирани антитела (имунофенотипни маркери), за да се определи броят на Т-клетъчните субпопулации, В-клетки, моноцити, CD64+ и белите кръвни клетки. След допълнително добавяне на флуорохром-конюгирани антитела, инкубиране за 15 min при 4°C и двукратно промиване с FACS буфер, пробите бяха анализирани на поточен цитометър (FC500, Beckman Coulter). Всички процедури бяха извършвани при строго стерилни условия. За разпознаване и отнасяне на специфичните маркери беше използвана информация, публикувана на уеб-сайта: http://www.biolegend.com/essential_markers.

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

Способността за *in vitro* имуномодулиращата активност беше измерена чрез отчитане на засиленото производство на цитокини от клетки на Пайеровите плаки, оказващи пролиферативен ефект върху костно-мозъчни клетки (Hong *et al.*, 1998; Grønhaug *et al.*, 2011). Суспензия (2×10^6 клетки/mL; 180 μ L) от клетки, които бяха предварително изолирани от Пайеровите плаки на мишки (СЗН/HeJ, 7-8 седмици), беше култивирана съвместно с вода (контрола) или със съответната проба (20 μ L) в 96-ямкова плака с плоско дъно (FALCON 3072) за 6 дни при 37°C във влажна атмосфера (5% CO₂ – 95% въздух). Полученият супернатант (50 μ L) по-нататък беше култивиран за 6 дни във влажна атмосфера (5% CO₂ – 95% въздух) с костно-мозъчна клетъчна суспензия (5.0×10^5 клетки/mL; 100 μ L), получена от 7-10 седмични женски мишки (СЗН/HeJ). Всички процедури бяха извършвани при строго стерилни условия. Броят на пролифериралите костно-мозъчни клетки беше измерен чрез Alamar Blue™ анализ, както е описано от Hong *et al.* (1998). Количеството на IL-6 беше измерено чрез сандвич ELISA метод, съгласно инструкциите на производителя.

3.2.4.5 Измерване продукцията на РФК от фагоцити

Хепаринизирана (50 IU/mL) кръв беше взета чрез венепункция на междинната лакътна вена от здрави доброволци (n = 6; на гладно). Кинетичната крива на продуциране на РФК от фагоцити беше съставена чрез непрекъснатото измерване на луминолна хемилуминесценция за период от 60 min при 37°C на микроплейт луминометър LM-01T

(Immunotech, Prague, Czech Republic). Като активатори бяха използвани опсонизирани зимозанови частици (OZP) или форбол-12-миристат-13-ацетат (РМА). Спонтанната хемилуминесценция (без активатор) беше измервана и включвана при всеки анализ. Подробната процедура е описана от [Lojek et al. \(2002\)](#). На този анализ бяха подложени ВЕПШ и КЕПШ от АНЧ. За сравнение беше използван и полизахариден екстракт от шипка, получен, охарактеризиран и любезно предоставен за анализ от инж. Й. Георгиев (ЛБАВ-Пловдив).

3.3 Получаване на функционална напитка

3.3.1 Производствен опит за сок от арония и шипка с добавен 0.4% ябълков пектин

Опитите по получаването на сока от арония и шипка с добавен пектин са извършени от колектива на фирма „Витанеа“ ООД на производствената площадка (КК „Йока“) в с. К. Конаре (общ. Стамболийски, обл. Пловдив).

3.3.1.1 Получаване на концентриран екстракт от шипка

Сто kg плод шипка се разбива с 1 t вода при 80°C за 30 min, филтрува се на буюер преса. Полученият филтрат се концентрира ([Kratchanov, personal communication](#)).

3.3.1.2 Получаване на сок от арония

Към замразен плод арония (0.8 t) се прибавят 500 L вода и чрез разбъркване при 80°C за 30 min се провежда екстракция. Полученият екстракт се филтрува на буюер преса, като сокът се прехвърля в екстрактор и се смесва с допълнителни 1.2 t плод арония. Допълнително се извършва хомогенизация при 50°C за 30 min. След нея полученият сок се филтрува на буюер преса ([Kratchanov, personal communication](#)).

3.3.1.3 Технология за сок от арония и шипка с добавен 0.4% ябълков пектин

Плод арония (200 kg) се смесва и хомогенизира със 63 L воден екстракт от арония (с.в. 10%), като след филтруване са получени 160 L сок от арония. Към 60 L от този сок се прибавят 15 kg шипков плод, като се хомогенизира за 40 min при 60°C, а към други 60 L се прибавят 600 g ябълков пектин. След интензивна хомогенизация се събират остатъкът от първия сок от арония с филтрувания шипково-арониевия екстракт и обогатения с пектин

сок от арония. Опаковането е извършено в стъклени бутилки от 200 mL, като след затваряне е извършена стерилизация (КК „Йока“) ([Kratchanov, personal communication](#)). Технологичната документация е посочена в **прил. 4**.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ (RESULTS & DISCUSSION)

4.1 Характеристика на предварително обработените суровини

Първа стъпка в настоящето изследване бе изборът на подходящи суровини и вида на съответната им обработка преди същинската екстракция на ПЗ. Основни критерии за подбор бяха някои данни от предварителни изследвания в ЛБАВ върху имунологичната активност на ПЗ (Крачанова и сътр. 2000), а също така и липсата на информация относно ПЗ компоненти или техни основни характеристики, практическа значимост в храненето на човек, достъпност на суровината, традиции в употребата им и индустриално значение на съответните суровини. Въз основа на това бяха селектирани представители от плодове, зеленчуци и билки (т. 3.1.3).

Свежите цитрусови кори бяха подложени на различни предварителни обработки, с цел проследяване на тяхното влияние върху добивите и химичната характеристика на получените пектини. Портокаловите кори бяха директно изсушени, микровълново облъчени или обработени с 96% (v/v) етанол за получаване на АНЧ. Лимоновите кори, празът и шипковата люспа бяха обработени само с 96% етанол за получаване на АНЧ (схема 1).

Добивът на суровините след съответната обработка, както и сумарното количество на пектин, изолиран след провеждането на водна и киселинна екстракция, са представени в **табл. 2**. От нея се вижда, че в резултат на сушенето портокаловите кори са загубили ~ 72% от масата си, а микровълновата обработка не повлиява добива на обработена суровина. Малката разлика се дължи на непълното изсушаване на суровината след микровълновия нагрев. 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 лимоновия и шипковия АНЧ – 76.1% (**табл. 2**). В резултат на 20 min обработка с кипящ 80% (v/v) етанол на отпадащите кори от производството на цитрусови сокове *Yapo et al. (2007)* получават 72% добив на АНЧ, което е сравнимо с полученото от нас за лимонив АНЧ. 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

влажностно съдържание, респ. малко съдържание на с.в. (9.5%). От данните в таблицата следва още, че в резултат на обработката с етанол (96%) портокаловите и лимоновите кори са загубили над 11% от с.в., а близо 37% от с.в. в прازа са алкохолно-разтворими. Процедурата по получаването на АНЧ се препоръчва, като начална стъпка при обработката на растителния материал (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Schols & Voragen, 2002), т. к. се инактивират ендогенните ензими и се отстраняват нискомолекулните (алкохолно-разтворими) органични вещества с хидрофилна или липофилна природа (захари, орг. киселини, АК, восъци, пигменти и др.). В АНЧ се съдържат останалите компоненти на клетъчните стени, като ПЗ, белтъци, лигнин и др. В литературата не се откриват данни за добив на АНЧ от шипкова люспа, а за този от праз резултатите са съпоставими с тези от предходно изследване (4.2%) на същата суровина (Kratchanova *et al.* 2010). Нашите данни съответстват на получения от Eaks & Sinclair (1980) добив (53.0%) на АНЧ от корите (31.1% с.в.) на напълно узрели портокали (сорт *Valencia*). В друго проучване чрез използване на азеотропна смес от вода, етанол и толуен Bicu & Mustata (2011) получават по-нисък добив на АНЧ от портокалови кори (48.4%).

Таблица 2. Добив (% св. маса) на предварително обработени суровини и пектин получен от тях.

Суровина и вид обработка	Добив на обработена суровина	Добив на пектин
Портокалови кори		
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)
Лимонови кори		
получаване на АНЧ	17.5(76.1)	4.9(28.4)
Праз		
получаване на АНЧ	3.5(36.7)	0.7(17.8)
Шипкови плодове (люспа)		
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. 2 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.), но не и от директно изсушената суровина (12.6% с.в.). Предварителното микровълново третиране на изходната суровина, служещо за бързо инактивиране на пектолитичната ензимна активност (Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004), 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. Подобно повишение, но с 45% в добива на пектин, е наблюдавано от Kratchanova, Pavlova, & Panchev (2004) при облъчването на портокалови кори (сорт *Navel*). Въпреки че добивът не надхвърля този от АНЧ, микровълновото облъчване е подходяща обработка на суровината, имайки предвид избягването на продължителната процедура по получаването на АНЧ. В литературата се срещат разнообразни експериментални постановки, но използваният подход се ограничава до микровълновото облъчване на сместа през време на конвенционалната екстракция с киселина (Yeoh, Shi, & Langrish, 2008; Guo *et al.*, 2012). В такива случаи добивите (18.13%) (Guo *et al.*, 2012) на ПЗ не надвишават тези, получени с използвания от нас метод. 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. Това не е изненада, имайки предвид, че още Kertesz (1951) ги охарактеризира, като една от най-богатите суровини на пектин. Прави впечатление, че 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%). Макар, че добивът на АНЧ от шипкова люспа е 2 пъти по-голям спрямо този на прازа, разликата в добивите на пектин е 1.7% в полза на шипковата люспа.

Характеристиката на АНЧ от гореспоменатите суровини беше продължена чрез определяне на въглехидратния състав, резултатите от който са оформени в **табл. 3**. Основните захари в АНЧ от портокалови кори са УК (20.6%) и Glc (20.2%), следвани от по-малки количества Aga (5.5%) и Gal (5.5%). Подобен качествен състав, но по-голямо въглехидратно съдържание (85%), докладват Prabasari *et al.* (2011), след като изучават състава на получения от албедо на портокалови кори АНЧ. Съдържанието на УК в АНЧ от лимоновите кори (20.5%) не надхвърля това в портокаловия и е в съгласие с намереното от De Vries *et al.* (1984) – 20.7%. Поради естеството на суровината 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 3. 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%

Впечатление прави още, че от всички 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. 3).

4.2 Получаване и характеристика на полизахаридите

Получените и охарактеризирани АНЧ от изходните суровини бяха подложени на последователна екстракция, първоначално с вода, а след това с разрежена HCl киселина. Прилагането на такъв екстракционен подход позволява изолиране на различни ПЗ фракции (водоразтворима и киселинноразтворима) и изучаване на някои специфични структурни особености. В табл. 4 са представени данните за количеството на екстрахираните УК и добива на някои ПЗ. От резултатите се вижда, че водоекстрахираните ПЗ от АНЧ на

портокалови и лимониви кори представляват съответно 34.0 и 37.0% от цялото количество урониди, като значителна част от уронидите не могат да се екстрахират с вода. Това се осъществява чрез използването на разредена киселина, като екстрахиращ агент, чрез която се разрушават киселинно-лабилни гликозидни връзки. При това се повишава както добивът, така и % на екстрахираните УК. Над 65% от изходните УК се съдържат в тези фракции. Вероятно по-голямата част от уронидите в портокаловите и лимоновите кори се намират в свързано, а не в свободно състояние, за извличането на които се изисква по-агресивен екстрагент (киселина). Описаното наблюдение е валидно и за фракциите получени от АНЧ на праз. При тази получена с вода са извлечени 21.5% от съдържащите се в АНЧ УК. Добивът на киселинната фракция (13.1%) е близо 3 пъти по-голям от този на водната и съдържа 43.1% от УК на суровината.

Таблица 4. Данни за уронидния състав в съответната фракция, получена след последователна екстракция от АНЧ (% w/w с.в.).

Фракция	Добив на съответната пектинова фракция	УК във фракцията	Добив на чист пектин	% на екстрахираните УК от общото уронидно съдържание
Портокалови кори				
ВЕПП АНЧ	11.0	64.0	7.0	34.0
КЕПП АНЧ	18.6	74.8	14.0	67.0
Лимониви кори				
ВЕПЛ АНЧ	10.5	72.3	7.6	37.0
КЕПЛ АНЧ	17.9	76.4	13.6	66.0
Праз				
ВЕППр АНЧ	4.7	62.3	2.9	21.5
КЕППр АНЧ	13.1	44.4	5.8	43.1
Шипкова люспа				
ВЕПШ АНЧ	12.6	63.0	7.9	55.5
КЕПШ АНЧ	6.9	67.0	4.6	32.3
Шипкови плодове				
ВЕПШ	4.1	46.1	1.9	13.2
ПЗ шипка (лк)	3.2	47.8	1.6	10.8

От данните следва още, че около 35% от уронидното съдържание на АНЧ от праз не се екстрахира при възприетите условия. Интересно изключение се наблюдава при шипковия АНЧ. За разлика от останалите суровини добивът на водната фракция (12.6%) е близо 2 пъти по-голям от този на киселинно-екстрахираната (6.9%). Същевременно с вода са извлечени 55.5% от изходните урониди, докато с киселина – 32.3%, но въпреки това в крайния остатък след екстракцията остават 12.2% асоциирани урониди. По отношение на шипковите плодове ние си поставихме за цел и получаването на ПЗ фракции чрез провеждането на екстракция с вода и лимонена киселина от нетретирани (цели) шипкови плодове. Въпреки че търговският пектин обикновено се екстрахира чрез третиране на наличната суровина с гореща вода или с горещи разредени разтвори на неорганични киселина при ниско рН (Kertesz, 1951; Sakai *et al.*, 1993; Voragen *et al.*, 2009) в литературата са докладвани и методи за екстракция на плодови пектини в присъствие на лимонена киселина (Kurita, Fujiwara, & Yamazaki, 2008; Pinheiro *et al.*, 2008; Yapo, 2009a, 2009b; Vriesmann, Teófilo, & Petkowicz, 2012; Kermani *et al.*, 2015). Нейната употреба е по-привлекателна, тъй като тя е естествена и безопасна хранителна добавка, използването на която е благоприятно също от екологична гледна точка (Pinheiro *et al.*, 2008; Yapo, 2009a). Резултатите в **табл. 4** обаче показват, че добивите на такива фракции са по-ниски от тези, получени от АНЧ. Също така по-голямата част (> 86%) от уронидите остават неекстрахиращи и вероятно са допълнително омержени (естерно-свързани) с останалия растителен матрикс. Трябва да отбележим, че различните екстракционни условия (температура, продължителност, рН и хидромодул) повлияват на добива. В конкретния случай фракциите ВЕПШ и ПЗ шипка (лк) не са получени от АНЧ, хидромодулът е значително по-малък (1:5), но температурата и времето на екстракция са идентични с тези, използвани от [Крчанова и сътр. \(2000\)](#). В допълнение на това е наблюдавано, че добивите на пектин от цитрусови кори са малко по-ниски, когато екстракцията се извършва с лимонена киселина (Kurita, Fujiwara, & Yamazaki, 2008) или при по-високо рН (2.4) (Yapo, 2009b). Освен това тя е слаба органична киселина с комплексобразователни свойства и поради това нековалентно свързаният пектин с ниска естерификационна степен, задържан в клетъчните стени от Ca^{2+} йонни мостове, би могъл да се извлече. По всяка вероятност по-ниският добив на ПЗ шипка (лк) може да се обясни с използвания „нетрадиционен“ екстрагент, неговата концентрация (1%), сравнително по-високото рН (2.65), както и с

времето и температурата на екстракция. В достъпната литература не се открива информация за извлечен с лимонена киселина шипков пектин, но получените тук данни са доста близки до съобщените от [Chambat, Joseleau, & Barnoud \(1981\)](#) за извлечения с амониев оксалат от клетъчни култури на синкавата роза (*R. glauca*) кисел полимер (3.5% добив и 7.1% екстрахирани УК). [Кирчев, Крачанов и Генов \(1980\)](#) подложили на екстракция с амониев оксалат и оксалова киселина сушена шипкова люспа, като получили значително по-голям добив (9.9%) от нашия, но логично обяснение за това се намира с вида на екстрагента, неговата концентрация (0.5%) и най-вече в значително по-големия хидромодул (1:40).

Допълнителното охарактеризиране 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. 5**. За улеснение при възприемането в таблицата са включени и данните за добива на съответните ПЗ фракции. От **табл. 5** ясно се вижда, че получените от цитрусови кори фракции, независимо от предварителната им обработка, са от пектинов тип поради намереното високо уроново съдържание (> 64%).

Таблица 5. 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

Количеството на УК във всички водно-екстрахирани фракции, с изключение на ВЕПП К, е по-ниско, отколкото това в киселинно-екстрахираните 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%).

Тук прави впечатление, че 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%. Подобна тенденция по отношение както на съдържанието на УК, така и в СЕ е наблюдавана от [Yapo et al. \(2007\)](#) при водно- (76.5%) и киселинно-екстрахираните (65.1%) фракции от АНЧ на цитрусови кори. С висока СЕ са и трите фракции, получени от АНЧ на лимоново алbedo – 70-74% ([De Vries et al., 1984](#)). [Крачанова и сътр. \(2000\)](#) са получили ВЕПП АНЧ и КЕПП АНЧ със СЕ 76.6% и 65.5%. 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. Това е свързано с протичането на странични деестерификационни процеси по време на директното сушене на свежите кори, с участието на собствената им ПМЕ, която при избраната температура е запазила част от активността си ([Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004](#)).

СА на получените цитрусови пектини варира в тесни граници от 0.7 до 1.0%. Приема се, че по-високите стойности на този показател за някои ПВ (от слънчоглед – 10%; захарно цвекло – 35%; моркови – 13% и др.) се отразяват негативно върху желиращите им свойства ([Стойков, Крачанов и Николова, 1962](#); [Ralet, Crépeau, & Bonnin, 2008](#); [Voragen, Beldman, & Schols, 2001](#); [Remoroza et al., 2014a](#)). В своето изследване [Kar & Arslan \(1999\)](#) са получили чрез киселинна екстракция ПЗ фракция от портокалови кори с висока СЕ, но с малко по-ниска СА – 0.37%. [Prabasari et al. \(2011\)](#) са екстрахирали с буфер и хелатиращи агенти ПЗ фракции от АНЧ на портокалово алbedo със СА 2%.

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 третираните портокалови кори (0.26%) и тази, получена от портокалов АНЧ (0.34%). Въз основа на задълбочена литературна справка не бяха открити данни за количественото определяне на този показател в пектини, екстрахираните от портокалови и лимонови кори, но [Wang, Chuang, & Ku \(2007\)](#) са показали, че в корите на повечето цитруси се съдържа повече ферулова киселина, отколкото в

месестата част. Според [Gorinstein et al. \(2001\)](#) общото съдържание на ферулова киселина в портокалови и лимонови кори, спрямо свежата маса е 39.2 mg/100 g и 44.9 mg/100 g, а според [Wang, Chuang, & Hsu \(2008\)](#) – 45.3 µg/g и 59.1 µg/g спрямо абс. сухата маса. Ние изчислихме, че 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. Наличието на омрежване от такъв тип е доказано за ПЗ, получени от суровини, като захарно цвекло и спанак ([Fry, 1986](#); [Oosterveld et al., 1997](#); [Wong, 2006](#); [Zaidel & Meyer, 2012](#)).

На получените фракции е определено и полифенолното съдържание (ОПФ, **табл. 5**), 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%). Резултатите за проби ВЕПП СВЧ (3.2%) и ВЕПП АНЧ (1.6%) затвърждават възгледа, че с получаването на АНЧ се отстранява част от полифенолните компоненти на суровината. Намерените стойности са по-високи от тези посочени от [Kravtchenko, Voragen, & Pilnik \(1992\)](#) за два нестандартизирани търговски лимонови пектина (А-0.18%; В-0.15%).

От данните в **табл. 5** се вижда още, че вероятно в процеса на екстракция и пречистване на ПЗ са съутаени и протеини, количеството на които е най-много във фракциите получени с разредена 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%. По този показател нашите проби не се различават съществено от данните на други изследователи. Напр. за двата търговски лимонови пектина [Kravtchenko, Voragen, & Pilnik \(1992\)](#) посочват 3.0 и 3.3% белтъчно съдържание, а за извлечените от АНЧ на цитрусови кори водна и киселинна фракция [Yapo et al. \(2007\)](#) дават съответно 2.7 и 4.1%.

В **табл. 5** са поместени и данните за пречиствения търговски ЦП. Вижда се, че след пречистването на 100 g, от него от вложените при стандартизацията захари-пълнители, се възстановяват 57 g сух пектин. В резултат от пречистването се повишава съдържанието на УК от 50% до 70%, но СЕ слабо се понижава от 66% до 59%. Освен това от всички цитрусови пектини ХПЦП се характеризира с най-ниско съдържание на ОПФ (0.7%) и

белтък (0.7%). Наблюдаваните тенденции са в съответствие с тези, установени от [Kratchanov & Popova \(1990\)](#) върху пречистването на пектин от ябълки, моркови и слънчогледови пити.

Данните за останалите ПЗ, изолирани от праз, шипка и мурсалски чай, са оформени в **табл. 6**. 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. По отношение на добива на ПЗ сравнения с достъпната литература не могат да се направят, тъй като последният е изолиран за първи път. Въпреки ниския добив тази фракция 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. 5**). 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, но съпоставимо с това от предходно изследване (49.3%) ([Kratchanova et al. 2010](#)). Противно на ниския добив фракциите ВЕПШ и ПЗ шипка (лк) са типично кисели (46.1 и 47.8%), а стойностите са съпоставими с тези за оксалатно-екстрахираната фракция (48%) на [Chambat, Joseleau, & Barnoud \(1981\)](#).

Таблица 6. 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)
ВЕПШ АНЧ	3.7(12.6)	63.0	85	4.2	0.7	2.4	2.0(3.7)
КЕПШ АНЧ	2.0(6.9)	67.0	73	3.0	0.2	1.6	4.3(10.5)
ВЕПШ	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 ВЕПШ (64%) и ПЗ шипка (лж) (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. По-ниската естерификационна степен на ПЗ шипка (лж) би могла да се обясни с условията на екстракция и използвания екстрагент, за чиято концентрация е показано, че е най-важният фактор, повлияващ на СЕ (Pinheiro *et al.*, 2008). По стойност метил-естерното съдържание на тази фракция е много близко до това на оксалатно-разтворимия пектин (64.3%), изолиран от необработена предварително суровина (Кирчев, Крачанов и Генов, 1980). Особено впечатление прави, че от всички изолирани ПЗ само този от мурсалски чай е нискоестерифициран – 38%!

От резултатите в **табл. 6** се вижда, че отделните фракции се различават значително по своята СА, обяснението за което би могло 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. 5 и 6**). Изолираният с лимонена киселина шипков пектин (10%) и ПЗ от мурсалски чай (9%) се отличават с най-висока СА. По отношение на този показател резултатите за шипковите ПЗ от АНЧ са съпоставими с намерените от Кирчев, Крачанов и Генов (1980) за оксалатните фракции. За ПЗ от праз и мурсалски чай данните са получени за първи път.

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, което вероятно се дължи на структурни особености. За останалите ПЗ този показател не надвишава 1.0%.

От **табл. 6** 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. Логично след обработката с етанол по-голямата част от фенолните компоненти в суровината са отстранени, но въпреки това в процеса на екстракция преминават такива вещества (ВЕПШ АНЧ – 2.4%; КЕПШ АНЧ – 1.6%). Фракциите, извлечени с вода и лимонена киселина от предварително необработена

суровина, съдържат най-много фенолни компоненти (ВЕПШ – 3.2%; ПЗ шипка (лк) – 9.6%). Това може би не е изненада, след като е установено, че шипката е първенец по количество на полифеноли (1934.3 mg GAE/100 g) сред 26 други български плодове (Denev *et al.*, 2013). По подобие с цитрусовите пектини и тук 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. 6** се вижда още, че в най-големи количества Нур се съдържа в КЕПШ от АНЧ. Тя заема 10.5% от белтъчините, а доста по-малко е нейното количество във ВЕПШ АНЧ (3.7%). Въз основа на това може да се изчисли, че най-малката мол. маса на белтък с Нур съдържание 10.5% е 1250 Da, а за 3.7% - 3544 Da или кратна на тези стойности. 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. Допълнително е необходимо да се изследва способността на тези ПЗ да се свързват към (β -Glc)3Y багрилото. 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%). Вероятно, поради използвания аналитичен метод Kratchanova *et al.* (2010) намират по-високи стойности за белтъчно съдържание в ПЗ от праз (ВЕППр АНЧ – 10.0%; КЕППр АНЧ – 6.6%). За хелатно-разтворимите фракция от синкавата роза Chambat, Joseleau, & Barnoud (1981) дават по-ниски стойности за протеиново съдържание (1.4 и 1.5%). По отношение на този показател за останалите фракции сравнение не може да се направи, тъй като не се откриват данни в научната литература.

4.2.1 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. Във връзка с това специално внимание заслужава определянето на въглехидратния състав на съответните пектинови фракции. Хидролизата на цитрусовите пектини беше проведена с 2 M TFA в продължение на 1 h при 121°C (вж. 3.2.2.2.1). Получените резултати, изразени на база абс. суха маса, са дадени в **табл. 7**, а тези изчислени в mol% са онагледени в **табл. 8**. 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 7. Монозахариден състав (% w/w) на пектинови полизахариди, получени от цитрусови кори.

Монозахариди	ХПЦП	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. В съгласие с повечето автори (Yaro *et al.*, 2007; Prabasari *et al.*, 2011) в най-малки количества (0.2-0.9%) са намерени Xyl и Fuc, но независимо от този факт присъствието на Xyl предполага наличието на КГ. Количеството на НЗ намерено от нас е малко по-ниско от това, установено от Крачанова и сътр. (2000) – 35-36%. Според авторите основни захари в изолирания от портокалови кори пектин са Ara, Rha и Gal, като количествата на Rha (5.4-5.6%) са съпоставими с тези от настоящето проучване, а тези на Gal (4.6-4.5%) с тези на ВЕПП СВЧ и КЕПП СВЧ. В допълнение на това е отчетено и присъствието на Man и Glc, които не са типични за ПВ. По-рано Yaro *et al.* (2007) установяват идентичен качествен състав, но поради естеството на използваната

от тях суровина намират и някои количествени различия, изразяващи се в по-ниско съдържание на Rha и Gal. Според [Kravtchenko, Voragen, & Pilnik \(1992\)](#) Ara, Gal и Rha са основни НЗ в два търговски лимонови пектина.

Таблица 8. Монозахариден състав (mol%) на пектинови полизахариди получени от цитрусови кори.

Монозахариди	ХПЦП	КЕПП К	ВЕПП СВЧ	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	7.3	7.2	8.2	6.8	8.5	5.2	6.2	5.3
Ara	15.9	14.5	14.5	11.1	7.9	11.0	16.1	9.8
Xyl/Fuc	0.4	0.9	0.6	0.3	1.2	1.1	1.0	0.5
Gal	7.8	12.0	7.9	6.0	17.2	12.8	5.6	6.3
GalA	67.3	63.1	67.0	72.4	64.5	67.1	70.6	75.8
GlcA	1.3	2.3	1.9	3.4	0.8	2.8	0.5	2.2

Данните от монозахаридния състав биха могли да се обобщят, като се оформят различни моларни съотношения между отделните захари, при което се получава допълнителна полезна информация относно структурните особености на екстрахираните ПЗ. Изготвените съотношения са дадени в **табл. 9**. 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). Но според [Yapo et al. \(2007\)](#) водната фракция (4.0), получена от цитрусови кори, съдържа по-дълги ХГ сегменти за сметка на киселата (~2.0). 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 $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-(1}\rightarrow]$ (**фиг. 1 и 4А**) ([McNeil, Darvill, & Albersheim, 1980](#); [O'Neill, Albersheim, & Darvill, 1990](#); [Albersheim et al., 1996](#); [Schols & Voragen, 2002](#); [Yapo, 2011d](#)). 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, което е и в съгласие с

наблюдаваното по-преди от [Yapo et al. \(2007\)](#). 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. В своето проучване [Yapo et al. \(2007\)](#) отново са стигнали до подобен извод за киселинно-извлечения ПЗ. 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, за което има данни ([Yapo, 2009a](#)), 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. Не бива да се забравя по-голямата стабилност на киселинно-лабилната връзка между Rha-Ara и/или Ara-Ara в условията на „по-меката“ екстракция с вода. Gal навярно пък се освобождава в по-големи количества след обработката с киселина (Ara/Gal = 1.6). Изчислените стойности са в съгласие с намерените преди от [De Vries et al. \(1984\)](#), които за пектин от АНЧ на лимоново алbedo са изчислили отношение между тези захари 2.3.

Таблица 9. Съотношения между отделните монозахариди (mol%) и дял на основните пектинови структурни фрагменти, характеризиращи получените от цитрусови кори пектинови полизахариди.

Съотношение	ХЩЦП	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

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).

Ако използваме предложените от [M'sakni et al. \(2006\)](#) уравнения бихме могли да изчислим относителните количества (mol%) на ХГ и РГ-I (вкл. НЗ) сегментите в пробите (**табл. 9**). Предвид това с най-голям дял на ХГ фрагменти се отличават ПЗ екстрахирани с разрежена киселина – КЕПП СВЧ (65.6 mol%), КЕПП АНЧ (62.0 mol%) и КЕПЛ АНЧ (70.5 mol%). За сметка на това 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%. Според резултатите с най-голям РГ-I дял се характеризират КЕПП К (41.0 mol%), ВЕПП СВЧ (38.8 mol%) и ВЕПП АНЧ (42.1 mol%). По отношение на киселата фракция от цитрусови кори подобни твърдения са направили [Yapo et al. \(2007\)](#) след като намират, че ХГ заема 64 mol%, а РГ-I – 31.1 mol%. Според [Prabasari et al. \(2011\)](#) основен дял от ПЗ екстрахирани с хелатиращи агенти и буфери от портокалово албедро заема ХГ (83 mol%). Подобен подход е използван и от [Alba, Laws, & Kontogiorgos \(2015\)](#) при охарактеризирането на нискоестерифицирания пектин на бамята, както и от [Yapo \(2011d\)](#).

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. 10**. Изчислените резултати в mol% са оформени в отделна **табл. 11**. Като основен компонент в ПЗ е намерена GalA, чието съдържание варира от 43% (КЕППр АНЧ) до 65% (КЕППШ АНЧ). В литературата обаче липсват данни за съдържанието на GlcA за получени от шипкови плодове и мурсалски чай ПЗ. Ето защо от особен интерес беше нейното определяне в тях, още повече, че предварителният качествен тест (**табл. 12**) показва отсъствието ѝ в тези проби. Липсата на GlcA беше потвърдена с изненада и за проба ПЗ шипка (лк) чрез HPLC-RID метода (вж. 3.2.2.2.1). Обяснения за това могат да се търсят както в естеството на субстрата, така и в условията на киселинен хидролиз на съответните проби. Напр. GlcA може да влиза в състава на страничните АГП вериги, както и в т. нар. Нур-АГ субединици (**фиг. 5А и 5В**) ([Du, Clarke, & Bacic, 1996](#); [Showalter, 2001](#); [Tan et al., 2010](#)). Друга възможност е директното свързване на β -D-GlcpA към GalpA звена в РГ-I област (**фиг. 4А**) ([Renard, Crépeau, & Thibault, 1999](#); [Leijdekkers et al., 2015](#)). Различната локализация се свързва с определен вид гликозидни връзки с различна „податливост“ на хидролиза.

Таблица 10. Монозахариден състав (% w/w) на пектинови полизахариди получени от праз, шипка и мурсалски чай.

Монозахариди	ВЕППр АНЧ	КЕППр АНЧ	ВЕПШ АНЧ	КЕПШ АНЧ	ВЕПШ	ПЗ шипка (лж)	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

Според [De Ruiter et al. \(1992\)](#) УК често са ангажирани в киселинно-резистентни гликозидни връзки от типа на алдобиурононите киселини (GalA-Rha, GlcA-Xyl, GalA-GlcA), а използваните киселини за хидролиз (TFA, HCl, H₂SO₄) не са способни да разградят напълно тези връзки, което би могло да доведе до подценяване количеството на съответните УК ([Schols, personal communication](#)).

Таблица 11. Монозахариден състав (mol%) на пектинови полизахариди получени от праз, шипка и мурсалски чай.

Монозахариди	ВЕППр АНЧ	КЕППр АНЧ	ВЕПШ АНЧ	КЕПШ АНЧ	ВЕПШ	ПЗ шипка (лж)	ПЗ мурсалски чай
Rha	1.6	2.8	2.4	5.9	1.3	0.9	1.6
Fuc	0.2	-	0.3	0.1	-	-	-
Ara	2.4	0.9	9.7	4.0	4.8	9.2	2.5
Xyl	-	-	0.6	0.9	-	0.6	2.8
Man	-	-	-	-	-	-	-
Gal	10.8	51.8	5.4	16.3	6.1	9.2	14.5
Glc	0.4	-	2.6	1.6	-	6.3	6.2
GalA	82.8	42.6	76.9	69.1	87.7	70.2	72.4
GlcA	1.8	2.0	2.1	2.0	-	3.6	-

Според авторите разработеният от тях метод е по-подходящ за отдиференцирането на двете УК, тъй като при подбраните условия на хидролиза (метанолиза и TFA хидролиза)

УК се освобождават по-пълно, а деструкцията им е сведена до минимум ([De Ruiter et al., 1992](#); [Schols, personal communication](#)). Именно този подход беше използван и в този случай, като резултатите за съдържанието на GlcA са вменени в **табл. 10** и **11** (mol%). Както се вижда 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%). Резултатите разкриват още, че 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 всяка вероятност в кисела среда се освобождават повече киселинно-лабилни гликозидни и/или естерни връзки, в които са ангажирани немалка част от НЗ в прازа. 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. Особено впечатляващ е фактът, че докато с вода се екстрахират само 4.0% от изходното Gal съдържание в АНЧ от праз, то с киселина се извличат 74%. Също както намираме в този случай, Gal, Rha и GalA са били определени от [Kratchanova et al. \(2010\)](#), като най-застъпени захари в пектина от праз (КЕППр АНЧ). Както се вижда от **табл. 10** 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. Като цяло по-малките количества Ага в киселинните фракции би могло да се обясни с лабилността на гликозидните връзки от типа Rha-Ara и Ага-Ага при условията на кисела екстракция. 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%). Оказва се, че 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 (лж). По всяка вероятност за някои от пробите (ПЗ шипка (лж), ПЗ мурсалски чай) наред с ПВ са ко-екстрахирани и преципитирани и други типове ПЗ (ксилоглюкан). Според [Alba, Laws, & Kontogiorgos \(2015\)](#) присъствието на Glc и малки количества от Fuc и Xyl е индикация и за наличие на РГ-II.

Таблица 12. Качествен тест за GlcA за някои от изследваните проби.

Проба	$\Delta A_{530-480}$	Цвят	Резултат
ВЕПШ АНЧ	-0.096	кафяв	-
КЕПШ АНЧ	-0.045	кафяв	-
ВЕППр АНЧ	-0.059	кафяв	-
КЕППр АНЧ	-0.483	кафяво-червен	-
ПЗ мурсалски чай	-0.013	кафяво-червен	-
АГ (контрола)	0.284	розов	+

Оскъдна е информацията в литературата по отношение на монозахаридния състав на пектина от шипкови плодове. Посоченият от нас качествен състав е в съгласие с този на [Kukhta et al. \(1979\)](#). Те установили, че пектинът, който е бил извлечен от венчелистчета на шипковия цвят (*R. canina* L.) е изграден от Rha, Man, Ara, Gal, Xyl и Glc в съотношение 5.0 : 1.0 : 6.0 : 4.9 : 1.1 : 4.7. В друго изследване пък чрез хартиена хроматография сред продуктите от киселинен хидролиз (2N H₂SO₄, 66 h) са детектирани Glc, Xyl, Ara, Gal и GalA, но не и Rha, Fuc и Man ([Khodzhaeva et al., 1998](#)). Съществено впечатление прави както високото съдържание на Rha (3.5-4.5%), така и по-малките количества на Ara (1.0-1.3%) и Gal (0.4-1.3%) в пектина от диворастяща шипка, намерено от [Кирчев, Крачанов и Генев \(1980\)](#). Това без съмнение е свързано с частичния киселинен хидролиз и отстраняването на част от страничните вериги от НЗ вследствие на шесткратното пречистване на пектиновите препарати със солно-кисел етанол преди анализа. Данни по отношение на монозахаридния състав на проби ВЕПШ, ПЗ шипка (лж) и ПЗ мурсалски чай не са налични в литературата и представените тук са принос към изучаването на съответните ПВ.

По-нататъшната обработка на данните от въглехидратния анализ позволява разкриването на още някои интересни структурни различия между съответните проби (**табл. 13**). Така например най-високи съотношения 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, при които това съотношение не превишава 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).

Таблица 13. 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

РГ-I фрагментите на проби КЕППр АНЧ, КЕПШ АНЧ и ПЗ мурсалски чай би следвало да са с доста висока степен на омрежване, след като отношението (Ara+Gal)/Rha е най-високо при тях (18.8, 21.1, 10.6). Тези проби се отличават с най-голяма относителна дължина на страничните вериги спрямо останалите проби. Интересно е, че страничните вериги от НЗ при ПЗ, получени от шипков АНЧ, са с по-малка дължина, отколкото тези получени от необработени (свежи) шипкови плодове. Така например моларното съотношение при ПЗ шипка (лк) е 21.1, а при КЕПШ АНЧ – 3.4, от което би следвало, че страничните вериги на първия ПЗ са 6.2 пъти по-дълги от тези на КЕПШ АНЧ. Това би могло да се обясни с условията на екстракция и използвания екстрагент. В своето изследване [Yapo \(2009a\)](#) обръща внимание на това, че от жълта маракуя с лимонена киселина се екстрахира по-малко пектин, но за сметка на това, поради по-слабо изразения деградивен ефект, дължината на веригите му е по-голяма. При ПЗ шипка (лк) Ara и Gal,

влизаци 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 преразпадане 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.

Изчислените количества на ХГ и РГ-I (mol%) сегментите в пробите са вменени в **табл. 13**. С най-голям дял на ХГ фрагменти се отличава ПЗ изолиран с вода от свежи шипкови плодове (ВЕПШ) – 86.4 mol% или това е между 18 и 35% повече спрямо това на цитрусовите пектини (56-71 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 КЕПШ 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. Съпоставено с това на отделните цитрусови пектини то е между 32 и 51% по-малко. По отношение на този показател твърде интересна се оказва проба КЕППр АНЧ. Измежду всички останали тази фракция е с най-голям РГ-I дял, който надвишава с 28 до 54% този при отделните цитрусови пектини. Очевидно той е ~ 4 пъти повече и от ВЕППр АНЧ (16.4 mol%). Въпреки че [Kratchanova et al. \(2010\)](#) не изказват подобни твърдения, анализирайки по-задълбочено публикувания от тях монозахариден състав може да се допусне, че РГ-I е основен компонент в КЕППр АНЧ. Особено любопитен е фактът, че 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. Подобна информация за тези две проби не се открива в достъпната литература. Съпоставяния на отделните пектинови структурни фрагменти обаче са правени за ПВ от ябълки, захарно цвекло, соя, грозде, боровинки и касис, като данните са обобщени и нагледно оформени в отделни обзорни статии ([Voragen, Beldman, & Schols, 2001](#); [Schols & Voragen, 2002](#); [Voragen et al., 2009](#)). Така напр. се оказва, че ХГ е основен структурен компонент в ПШ,

изолирани от грозде (65%), касис (68%) и боровинка (65%). Според авторите ХГ в по-малки количества се съдържа в цвекловите резанки (29%) и ябълките (36%), а още по-изумителна е неговата липса в соята (0%). В по-големи количества РГ-I е застъпен в пектина от грозде (10%) и соя (15%), а в по-малки в този извлечен от цвекло (4%) и ябълки (1%). За сметка на това пък делът на страничните вериги от НЗ при тези източници се оказва доста голям (цвекло – 48%, ябълки – 47%). Измежду изброените с най-висока степен на омрежване се характеризира соевият РГ-I (60%). ПВ от ябълка и соя показват немалко съдържание на КГ фрагменти (4 и 21%). 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.

4.2.2 Молекулна маса на изходните полизахариди

Молекулната маса и полидисперсността (хомогенност) са съществени характеристики на ПЗ. Тяхното определяне е неотменен етап в сравнително трудния процес на изучаване както на структурата, така и на биологичните свойства на различните ПЗ. Данните за мол. маса на изходните цитрусови пектини са изложени в **табл. 14**, а тези за фракциите, екстрахирани от АНЧ на праз и шипкова люспа в **табл. 15**. Допълнително HPSEC елуционния профил на КЕПП АНЧ е представен на **фиг. 17А**. От таблиците се вижда, че 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 (3.5×10^6 Da), ВЕПП К (2.0×10^6 Da), ВЕПП СВЧ (9.1×10^5 Da) и ВЕПЛ АНЧ (4.3×10^6 Da), като последният е и най-високомолекулният ПЗ. Независимо, че според [Kratchanova, Pavlova, & Panchev \(2004\)](#) подобрите тук условия на микровълново облъчване на портокаловите кори водят до повишение на мол. маса (~16%), в този случай ВЕПП СВЧ е хомогенен, а мол. му маса е близка до контролната ВЕПП К проба. КЕПП СВЧ също не се отличава с по-голяма хетерогенност от контролната фракция (КЕПП К). Това показва, че мол. 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 (Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004). В сравнение с установеното тук Yaro *et al.* (2007) определят съответно средната бройна и масова мол. маса на деестерифицирани ЦП между 83300 до 251000 g/mol и 111000 до 380000 g/mol. Крачанова и сътр. (2000) изчисляват M_n за ВЕПП и КЕПП от АНЧ съответно 52000 и 97000 Da.

Таблица 14. Молекулна маса (Da) на пектинови полизахариди, получени от цитрусови кори.

Проба	Молекулна маса	%
ХПЦП	3.5×10^6	100
ВЕПП К	2.0×10^6	100
КЕПП К	9.3×10^5	62
	5.6×10^5	33
	1.1×10^4	5
ВЕПП СВЧ	9.1×10^5	100
КЕПП СВЧ	8.4×10^5	91
	6.0×10^3	9
ВЕПП АНЧ	9.6×10^5	84
	2.6×10^2	16
КЕПП АНЧ	7.0×10^5	91
	8.0×10^3	9
ВЕПЛ АНЧ	4.3×10^6	100
КЕПЛ АНЧ	4.1×10^6	5
	8.6×10^5	79
	4.6×10^2	16

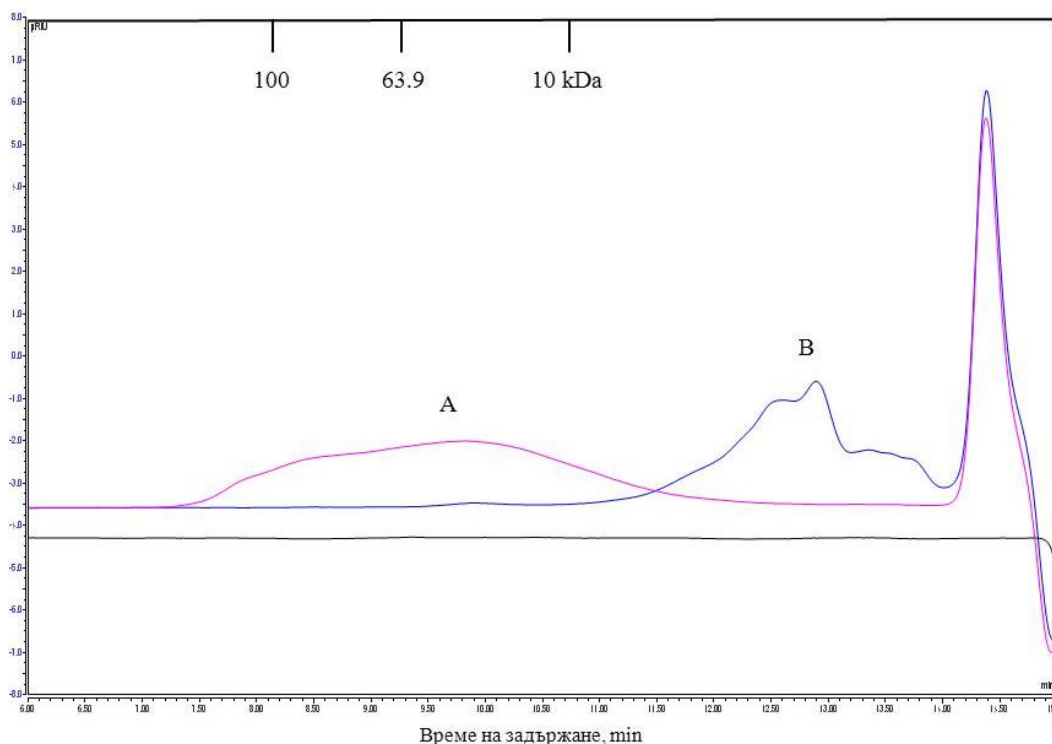
По отношение на фракциите от праз и шипкова люспа се запазва наблюдаваната тенденция. Мол. маса на ВЕППр АНЧ (7.7×10^4 Da) не превишава намереното при цитрусовите пектини. КЕППр АНЧ се откроява с по-голяма хетерогенност и наличие на най-малко три ПЗ популации, като тази с най-малка мол. маса (2.4×10^4 Da) заема най-голям дял – 82%. Тава е видно и от допълнително представения HPSEC елуционен профил на тази проба (фиг. 24А). В сравнение с посочените тук Kratchanova *et al.* (2010) намират

по-високи стойности на мол. маси (1.1×10^6 Da; 1.6×10^4 Da до 9.5×10^5 Da), но общата насока се запазва. ВЕПШ АНЧ се откроява като една хомогенна фракция, чиято мол. маса (2.5×10^5 Da) е съпоставима по стойност с тези на някои киселинно-екстрахирани цитрусови пектини. За разлика от нея КЕПШ АНЧ е съставена от две отделни популации, като тази с по-голямата маса (2.7×10^5 Da) заема по-голям дял (88%), а втората с мол. маса от 1.5×10^4 Da значително по-малък (12%). Наблюдаваното разпределение на мол. маси е в съгласие с публикуваните по-преди от [Khodzhaeva et al. \(1998\)](#) данни. Като стойности за вискозиметрично определената мол. маса те посочват 9.8, 14.9 и 15.0 kDa. За екстрахирания от венчелистчетата на шипков цвят пектин [Kukhta et al. \(1979\)](#) дават стойност на вискозиметрично определена мол. маса 27290 Da.

Таблица 15. Молекулна маса (Da) на пектинови полизахариди, получени от праз и шипкова люспа.

Проба	Молекулна маса	%
ВЕППр АНЧ	7.7×10^4	100
КЕППр АНЧ	4.8×10^5	5
	9.8×10^4	13
	2.4×10^4	82
ВЕПШ АНЧ	2.5×10^5	100
КЕПШ АНЧ	2.7×10^5	88
	1.5×10^4	12

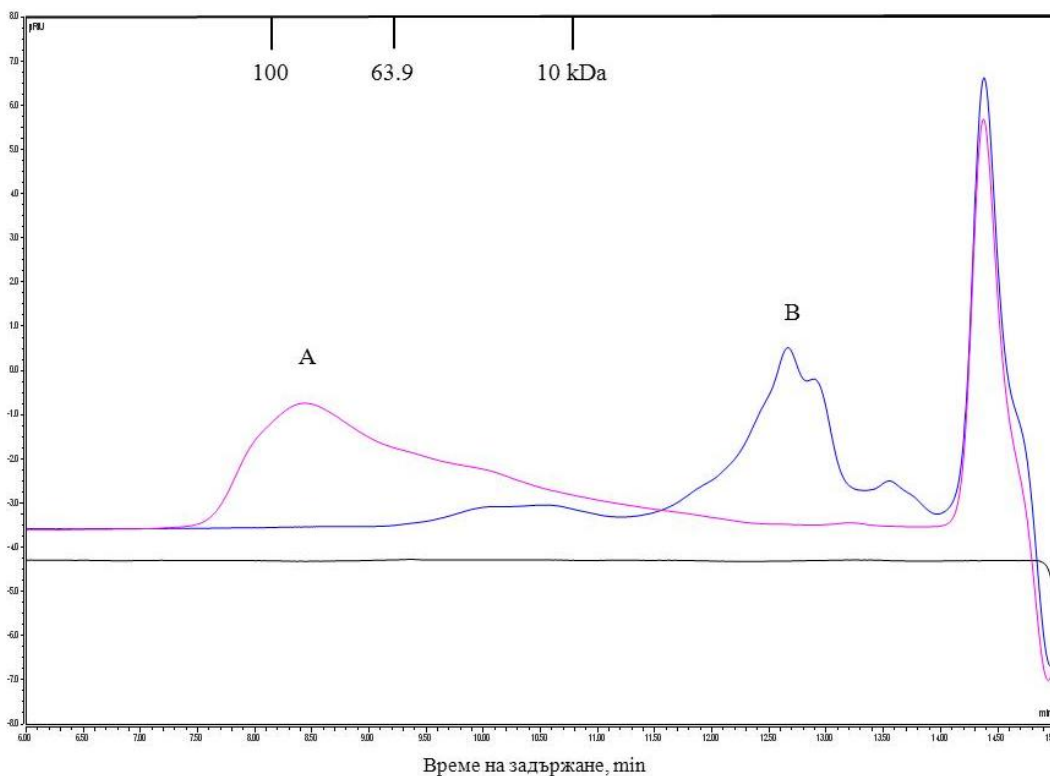
Елуционният профил и разпределението на мол. маси за проби ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай могат да бъдат видяни от **фиг. 9А** и **10А**. Както се вижда от първата фигура (**9А**) ПЗ шипка (лк) се елуира като доста широк пик, започващ от 7.5 min. Това показва, че изходният ПЗ се състои от различни мол. популации, разпределението на които по маса обхваща границите както на много високите (>100 kDa), така и на относително ниско-молекулни съединения (>10 kDa). Според [Kravtchenko, Voragen, & Pilnik \(1992\)](#) формата на пика се определя от химичния състав (странични вериги) и строеж на пектиновата макромолекула. Те допълват своите твърдения и с факта, че страничните вериги и Rha повишават гъвкавостта, а от там и компактността на макромолекулата, което пък се отразява в увеличаване на RT.



Фигура 9. HPSEC елуционен профил на ПЗ шипка (лк) преди (A) и след (B) действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II.

По-широките пикове също показват, че в рамките на пробата размерите на молекулите не са еднакви. Както беше отбелязано по-преди в тази проба ХГ заема немалка част (~70 mol%), което предполага, че формата на молекулата не би следвало да е така компактна. Още повече, че РГ е осеян с доста дълги странични вериги от НЗ, което същевременно се отразява на размерите на молекулата и образуването на асоциати, а това от своя страна влияе върху начина и времето на елуиране. Въз основа на това би следвало да се оформи по-широк, „разлят“ пик, което се и наблюдава. Не се откриват публикувани резултати относно мол. маса на шипков пектин, изолиран с лимонена киселина от цели плодове.

Още по-интересен елуционен профил притежава ПЗ от мурсалски чай (**фиг. 10А**). Въпреки сходните захарни съотношения и пропорции между основните пектинови структурни фрагменти с вече разгледаната фракция ПЗ шипка (лк), присъствието на по-къси странични вериги от НЗ (**табл. 13**) се отразява върху HPSEC профила. Имайки предвид последното и по-голямото Rha съдържание в тази проба (**табл. 10 и 11**) би могло да се приеме присъствието на по-компактна (гъвкава) молекула.



Фигура 10. 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.

И тази проба демонстрира по-широко молекуломасово 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). Информация в достъпната научна литература относно тази характеристика за ПЗ от мурсалски чай не беше открита.

4.3 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 (Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Schols & Voragen, 2002; Schols, personal communication). Добрите резултати се дължат на абсолютната специфичност и селективност на ензимите по отношение на конфигурация и типа на гликозидната връзка, както и по отношение на броя атоми в пръстена (Voragen *et al.*, 2009). 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 (Guo *et al.*, 2016).

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. Това от своя страна позволява проследяването и изучаването на влиянието на ензимната модификация върху биологичната активност на тези модифицирани продукти в зависимост от специфичността на използваните ензими, избягвайки продължителното фракциониране с помощта на хроматографските методи. Допълнително би могла да се получи ценна структурна информация и да се проследят измененията в субстрата в зависимост от чистотата и характеристиките на използваните ензимни препарати.

4.3.1 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 β -(1→4)-галактанази. Поради ниските добиви на ВЕПП и КЕПП К, те не бяха включени в тези опити. В **табл. 16** са дадени добивите на останалите осапунени и модифицирани пектини. От нея се вижда, че добивът на ЦП след алкално осапунване се движи в границите 83-99%. Така получените деестерифицирани пектини са „подходящ“ субстрат за действието на *endo*-ПГ-I, като добивът на алкохолно-утаимите продукти при отделните проби не надвишава 50%. Той е най-нисък при ВЕПП АНЧ (28%), а най-голям (42%) при ХПЦП. Очевидно това е първоначална индикация за успешно протекъл хидролизен процес на ХГ фрагменти. Това не е изненада предвид специфичността на ПГ действие и относително високия дял на ХГ сегменти (56.0-70.5 mol%) в подбраните проби. Добивът на алкохолно-утаимите продукти след действие с галактан-разграждащи ензими, изчислен на база *endo*-ПГ-I продукти, варира в по-тесни граници от 49 до 54%, а изразен спрямо изходните нетретиран ПЗ – от 13 до 19%.

Таблица 16. Добив на осапунени и алкохолно-утаими продукти (% w/w) след модификация на цитрусови пектини с *endo*-ПГ-I и β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими.

Добив	ХПЦП	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
осапунен	86	95	87	83	88	99
<i>endo</i> -ПГ-I	42*	39	28	39	41	29
β -(1→4)-галактанази	53	49	54	51	52	54

* разликата до 100 % е добивът на алкохолно-разтворимите продукти

4.3.1.1 Молекулна маса на модифицираните продукти

В подкрепа на изказаните по-горе твърдения се явяват и резултатите за мол. маса и хомогенност на модифицираните продукти (**табл. 17** и **18**). Съпоставянето на данните от двете таблици с тези на изходните (немодифицирани) ПЗ (**табл. 14**) показва, че основен резултат от модификациите е редуцията на мол. маси и увеличението на броя на мол. фрагменти, т.е. хетерогенността. Напр. след действието на *endo*-ПГ-I върху КЕПП СВЧ отделените алкохолно-утаими продукти са с по-ниска мол. маса спрямо изходния ПЗ. Те са съставени от три отделни популации, като тази с по-голямата маса (2.3×10^5 Da) заема по-голям дял (76%). Алкохолно-разтворимата част включва три популации с разпределение на мол. маси от 0.6×10^3 до 1.1×10^5 Da, но те не превишават по стойност тези в утаените продукти. След модификация на ХПЦП с *endo*-ПГ-I са се запазили само 20% от изходната молекулна фракция, с преимуществен алкохолно-утаим фрагмент с мол. маса 4.8×10^5 Da (79%). Като се има предвид специфичността на действие на използвания ензим, ясно става, че откритите в етаноловия филтрат по-нискомолекулни вещества би следвало да са α -D-(1 \rightarrow 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 (2.6×10^5 Da – 10%) след втората ензимна модификация с β -(1 \rightarrow 4)-галактан-разграждащите ензими, докато този на по-нискомолекулните съединения (олигомери) нараства (0.8×10^3 Da – 68%) (**табл. 18**). Тази тенденция се запазва и при останалите проби, като разпределението е в интервала от 0.3×10^3 до 9.5×10^4 Da. Интересен пример в това отношение се явява ВЕПЛ АНЧ. Изходният ПЗ се характеризира с мол. маса 4.3×10^6 Da (100%) (**табл. 14**) и въпреки, че алкохолно-утаените продукти след действието на *endo*-ПГ-I са с по-ниска мол. маса (2.6×10^5 Da), запазва своята хомогенност (100%). След действието с галактанази мол. маса се редуцира, а алкохолно-утаимата част е съставена от три популации с мол. маси от 1.4×10^4 Da (26%) до 8.6×10^4 Da (13%). При него се наблюдава и най-съществено понижение на мол. маса. Въпреки това определена част от по-високомолекулните фрагменти, в повечето проби, се запазва неразградена и след втората модификация. Наличието на някои по-високомолекулни фрагменти в супернатантите вероятно се дължи на преминаването им от алкохолно-разтворимата част при отдекантирането.

В допълнение HPSEC елуционният профил на алкохолно-утаимата част след действие на *endo*-ПГ-I на проба КЕПП АНЧ е показан съответно на **фиг. 18А**, а този на изходния ПЗ на **фиг. 17А**. От тях става ясно, че освен редукцията на мол. маса на изходния ПЗ, в резултат на ензимния хидролиз и последваща алкохолна преципитация, се възстановяват неразградени високомолекулни (~65 – 30 kDa) фрагменти (РГ-I с НЗ), но също така и някои фрагменти (олигомери) с по-ниска мол. маса (около и под 10 kDa).

Таблица 17. Молекулна маса (Da) на модифицирани с *endo*-ПГ-I пектинови полизахариди получени от цитрусови кори.

Проба	Алкохолно-утаими продукти		Алкохолно-разтворима част	
	Молекулна маса	%	Молекулна маса	%
ХПЦП	3.6×10^6	21	4.4×10^4	38
	4.8×10^5	79	2.7×10^4	4
			0.7×10^4	33
			0.5×10^4	25
КЕПП СВЧ	3.1×10^5	13	1.1×10^5	48
	2.3×10^5	76	7.6×10^4	36
	0.1×10^4	11	0.6×10^3	16
ВЕПП АНЧ	9.9×10^5	19	5.4×10^4	43
	5.6×10^5	11	0.4×10^4	57
	2.1×10^5	64		
	1.4×10^5	6		
КЕПП АНЧ	1.7×10^5	22	1.1×10^5	61
	2.6×10^5	67	5.0×10^4	22
	4.6×10^4	11	0.6×10^4	17
ВЕПЛ АНЧ	2.6×10^5	100	5.9×10^4	52
			0.7×10^4	45
			0.3×10^4	3
КЕПЛ АНЧ	1.5×10^6	28	9.3×10^4	68
	3.2×10^5	72	3.1×10^4	32

Таблица 18. Молекулна маса (Da) на модифицирани с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими пектинови полизахариди получени от цитрусови кори.

Проба	Алкохолно-утаими продукти		Алкохолно-разтворима част	
	Молекулна маса	%	Молекулна маса	%
ХПЦП	1.9×10^6	18	5.8×10^5	16
	4.2×10^5	56	7.6×10^4	30
	2.6×10^5	10	3.4×10^4	48
	5.7×10^4	16	0.2×10^4	5
КЕПП СВЧ	3.0×10^5	20	9.5×10^4	10
	2.6×10^5	10	3.5×10^4	22
	4.7×10^4	70	0.8×10^3	68
ВЕПП АНЧ	4.8×10^5	21	2.3×10^5	20
	2.0×10^5	79	1.3×10^4	28
			0.8×10^4	32
			0.3×10^3	20
КЕПП АНЧ	1.4×10^6	21	2.8×10^5	12
	3.0×10^5	79	7.6×10^4	47
			0.6×10^3	41
ВЕПЛ АНЧ	8.6×10^4	13	5.6×10^4	32
	3.2×10^4	61	3.5×10^4	32
	1.4×10^4	26	1.2×10^4	24
			0.2×10^3	12
КЕПЛ АНЧ	2.5×10^5	17	1.3×10^5	21
	5.4×10^4	25	4.3×10^4	40
	2.4×10^4	46	3.6×10^4	21
	0.3×10^4	12	0.1×10^4	18

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.

В литературата се срещат малко изследвания на макромолекулните свойства на ензимно модифицирани ЦП, а стойности на мол. маси на алкохолно-утаени продукти от

ЦП не са открити. В изследването си [Yapo et al. \(2007\)](#) получават редица пектинови фрагменти (ХГ, РГ-I, РГ-II) чрез ензимна модификация на ЦП. За освобождаването на РГ-I фрагменти от ХГ учените използват *endo*-ПГ-II. Сепарирането на РГ-I от хидролизната смес и по-нататъшното му охарактеризиране е извършено чрез хроматографски техники. За изолираните от киселинно-екстрахирания ПЗ РГ-I домени те дават стойност за M_n 52600 g/mol и за M_w 56500 g/mol, което потвърждава наблюдаваното от нас. В друго изследване [Suh et al. \(2013\)](#) фракционират чрез хроматографски методи изходен ПЗ (CUI-3) от сацума до най-активната му (CUI-3Pb-3-2) фракция с мол. маса от 18 kDa. Впоследствие от нея чрез ензимно третиране с *endo*-ПГ и гел-хроматографско разделяне успяват да изолират и докажат, че се натрупват основно неразградени силно омержени РГ фрагменти (PG-1) и олигогалактурониди (PG-2). За съжаление авторите не посочват техните мол. маси, но би могло да се предположи, че те са по-малки от тази на изходния ПЗ (< 18 kDa).

4.3.1.2 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. 19**, а този на алкохолно-разтворимата част е оформен в **табл. 20**. Определянето му в тези фракции е от особено значение, т.к. това дава възможност да се съди за влиянието и измененията, които предизвикват съответната ензимна модификация и обработка на субстрата. Сравняването на данните от **табл. 19** с тези на изходните (**табл. 7**) проби показва, че 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). Тези данни, а и 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. Това може да се обясни с факта, че ВЕПП АНЧ се характеризира с относително по-голям дял на РГ-I сегменти (респ. по-малък на ХГ) и по-дълги странични вериги от НЗ (**табл. 9**), които възпрепятстват ензимното действие. 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 19. Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-утаимите продукти след модификация на цитрусови пектини с *endo*-ПГ-I.

Монозахариди	ХЩЦП	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) (Renard, Crépeau, & Thibault, 1999; Bar-Peled, Urbanowicz, & O’Neill, 2012; Leijdekkers *et al.*, 2015) и АГ-II/АГП (Du, Clarke, & Basic, 1996; Showalter, 2001). Допълнително данните в табл. 19 разкриват, че НЗ заемат между 19.7 и 31.3% от захарите на всяка фракция, като най-богати са КЕПП СВЧ и КЕПП от АНЧ. Особено интересен е фактът, че 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. Поради факта, че съотношението на Rha/GalA в РГ-I блока е 1.0 (или много близо до това) (Albersheim *et al.*, 1996; Schols & Voragen, 2002; Yapo, 2011d), то след

приспадане на съответното количество Rha от това на GalA, очевидно става ясно, че излишното количество от GalA би трябвало да се намира под формата на олигогалактурониди (с различна СП), които са съгънати наред с високомолекулярния РГ. Присъствието им дава основание да се мисли, че действителната степен на хидролиза е по-голяма и в този случай бихме имали значително „подценяване“. Друга възможност е GalA единици да изграждат неразградени ХГ сегменти. Ако последното е вярно, то излиза, че ПВ, в този случай, могат да се опишат със структурния модел на „страничните вериги“, при който няколко ХГ се явяват странични вериги на един основен РГ-I скелет (**фиг. 7; прил. 2.1С**) ([Vincken et al., 2003](#)). 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. В случая редуцията на ХГ съдържание (29.5-51.5 mol%) (спрямо изходното) след модификация е от 9% при ВЕПП АНЧ до 55% при КЕПП СВЧ. Сравнявайки резултатите от **табл. 19** с тези от **табл. 13** се откроява интересният факт, че едва след модификация на някои ЦП количеството на РГ-I дяла в тях достига (ХПЦП – 55.5 mol%, КЕПП АНЧ – 56.2 mol%) и дори надвишава (КЕПП СВЧ – 66.8 mol%) този в някои изходни немодифицирани проби (КЕППр АНЧ – 58.3 mol% и КЕППш АНЧ – 32.1 mol%).

Могат да се приведат редица изследвания на чужди автори, при които е демонстрирана подобна тенденция след модификация с *endo*-ПГ-I. Напр. [Suh et al. \(2013\)](#) модифицират с *endo*-ПГ ПЗ фракция CUI-3Pb-3-2, а от нея изолират РГ-I фракция (PG-1) с повишено съдържание на Rha, Gal и Ara съответно с 42%, 40%, 34% в сравнение с изходния ПЗ. Количеството на GalA е редуцирано с 54% и стойността е съпоставима с полученото от нас за КЕПП СВЧ (55%). В друго изследване, чрез *endo*-ПГ-II, [Yapo et al. \(2007\)](#) успяват да отстранят ~70% от изходното GalA съдържание (66.3 mol%) на ЦП, като количеството на Rha в крайния продукт (19 mol%) след хроматографиране нарастнало с 87%. [Ros, Schols, & Voragen \(1998\)](#) получават „модифицирани космати региони“ от пектин на лимоново алbedo, като крайни продукти от действието на *endo*-ПГ и ПМЕ. Авторите установяват повишено съдържание на Rha, Ara, Gal и Xyl в тях, но и значително понижение на GalA (~83%; > 5 пъти). Съдържанието на общи захари в отделните фракции (58-86%) е сравнимо с намереното от нас (65-81%). Тенденцията е валидна не само за ПЗ екстрахирани от цитруси, но и за някои лечебни растения ([Kiyohara et al., 2010](#)).

По отношение на останалите НЗ се наблюдават също някои интересни количествени изменения (**табл. 19**). Съдържанието на Ага (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 високомолекулни фрагменти. Въпреки високата електрофоретична чистота на препарата, в предоставения от производителя сертификат, са отбелязани и няколко много ниски стойности на странични специфични активности: *endo*-арабинаназна (< 0.001 U/mg) и арабинофуранозидазна (< 0.0004 U/mg). Проявлението им се свежда до минимум, поради неколкостратното разреждане на препарата преди окончателното му влагане. Не на последно място е необходимо да се отбележи, че ензимната активност е относителна и зависи от естеството на пектиновия субстрат. Не може обаче да се изключи и втората възможност, поради натрупаните в литературата данни за това. Още [Kertesz \(1951\)](#) поднася обобщена информация по проблема, според която „баластни материали“, като арабани, могат да се отделят от ПВ чрез преципитация със 70% етанол. Последното, заедно с лабилността на гликозидните връзки от типа Rha-Ara и Ara-Ara, в слабо кисела среда, каквато е налична и в случая (pH 5.0), би могло да води до частичен хидролиз и преминаване на Ага единици (олигомери) в алкохолно-разтворимата част, което се и наблюдава (**табл. 20**). Понижение на Gal съдържание с 36% и 39% се забелязва само при ХПЦП и ВЕПЛ АНЧ, а при всички останали проби, по аналогия с наблюдаваното и от други автори ([Ros, Schols, & Voragen, 1998](#); [Yapo et al., 2007](#); [Kiyohara et al., 2010](#); [Suh et al., 2013](#)), 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. 20**). Това показва, че най-вероятно е освободена по време на ензимната хидролиза. Ензимът *endo*-ПГ проявява, макар и слаба, толерантност към осапунени КГ фрагменти, която зависи силно от степента на ксиланизация. Напр. по-слабо омрежения КГ, изолиран от диня, се разгражда до моно-, ди- и тригалактуронова киселини и до серия Ху1-съдържащи олигогалактурониди ([Yu & Mort, 1996](#)). 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. Въз основа на това, по-скоро може да приемем твърдението за присъствие на Xyl-GalA единици (част от КГ) в изходните пектини, отколкото тези за ко-екстрахирани хемицелулози. [Schols et al. \(1995\)](#) са получили Xyl-заместени ХГ субединици от „модифицирани космати региони“ на ябълков пектин и добре са обяснили явлението.

Таблица 20. Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-разтворимата част след модификация на цитрусови пектини с *endo*-ПГ-I.

Монозахариди	ХЩЦП	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. 20** може да се види, че наред с мономерната GalA под действието на ензима се натрупват и алкохолно-разтворими олигомери (кисели и/или неутрални (?)). [Combo et al. \(2012\)](#) изследват 6 комерсиални пектиназни препарата и показват, че основни продукти от действието на един от тях (*endo*-ПГ-I-M2, Megazyme), използван и от нас, са три-(58%), ди-(18%) и мономери (13%). Авторите провеждат опитите си с 0.2% ПГК и отбелязват още, че ензимът е със слаба конвертираща способност на първоначално генерираните олигомери с по-висока СП (4-9). За разлика от тях нашите опити са проведени с осапунени ЦП, което несъмнено оказва влияние върху вида на олигомерния профил (СП, количество и др.). За съжаление на този етап от изследванията, чрез използвания HPLC-RID метод не беше възможно количественото им определяне и получаването на допълнителна информация за техния състав.

До момента въз основа на въглехидратния състав на изходните ЦП е демонстрирано, че страничните вериги от НЗ са от арабиногалактанов тип (**табл. 7 и 8**). Според някои данни от литературата в ЦП се среща предимно арабино-4-галактани (АГ-I) и арабинани (свободна и/или свързана форма) ([Ros, Schols, & Voragen, 1998](#); [Voragen, Beldman, &](#)

Schols, 2001; Yapo *et al.*, 2007; Prabasari *et al.*, 2011). 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*-ПП-I, бяха подложени на комбинирана ензимна модификация с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими. Резултатите от монозахаридния анализ на получените две фракции са представени в **табл. 21** и **22**. От данните (**табл. 21**) 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. Това се обяснява със специфичността на използваните ензими, но също така свидетелства и за наличието на арабинанови вериги. Основната цел на проведената модификация изглежда изпълнена след като 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% (ВЕП АНЧ) и 50% (ВЕПЛ АНЧ). Прави впечатление, че количеството на Gal е намаляло най-много във водно-екстрахираните пектини (2-10 пъти). Логично обяснение може да се търси в синергичното действие между двата ензима (De Vries *et al.*, 2000). Детектираното остатъчно количество Gal е резултат от неразградени β -(1→4)-гликозидни връзки, но също така и от „нерагирани“ връзки от вида β -(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! За сравнение данните публикувани от Grønhaug *et al.* (2011) също демонстрират възможността за редукцията на (1→4)-свързана Gal чрез

действие с β -(1→4)-галактаназа, но то също е непълно, поради наличието на β -(1→3)-свързани помежду си Gal единици.

Таблица 21. Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-утаимите продукти след модификация на цитрусови пектини с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими.

Монозахариди	ХЩЦП	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	0.6	0.8	1.0	1.0	1.2	0.5
Xyl	-	0.4	0.1	-	следи	0.2
Ara	15.2	10.6	13.2	10.5	11.9	11.8
Gal	1.7	5.3	1.0	4.3	3.7	4.0
GalA	34.5	28.6	54.1	24.8	36.3	21.1
GlcA	1.6	0.5	0.7	0.3	1.0	-

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. Количеството на GlcA е относително малко и варира в границите 0.3-1.6%, като в КЕПЛ АНЧ киселината дори не е открита. Характерна особеност е, че пектиновите разклонени региони, и по-специално галактановите странични вериги (в АГ-II и АГП), могат да бъдат заместени с GlcA и/или 4-O-Me-GlcA, като нередущащ краен остатък (Du, Clarke, & Basic, 1996; Showalter, 2001; Haque, Kotake, & Tsumuraya, 2005).

Таблица 22. Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-разтворимата част след модификация на цитрусови пектини с β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими.

Монозахариди	ХЩЦП	КЕПП СВЧ	ВЕПП АНЧ	КЕПП АНЧ	ВЕПЛ АНЧ	КЕПЛ АНЧ
Rha	0.4	1.3	0.5	0.1	0.8	1.6
Xyl	следи	следи	0.1	-	0.2	следи
Ara	0.4	0.4	0.7	0.9	1.0	1.1
Gal	3.4	11.4	4.9	15.5	1.4	7.5
GalA	2.1	2.0	2.3	2.1	2.0	1.0
GlcA	-	0.4	-	-	-	-
Олигозахариди*	77.8	45.2	80.1	57.6	85.0	69.7

* % дял на получени след интегриране пикове от общата площ

Затова разграждането с галактанази води до освобождаване на алкохолно-разтворими (галакто)олигозахариди, заместени с GlcA. Това е причина за по-малкото количество в

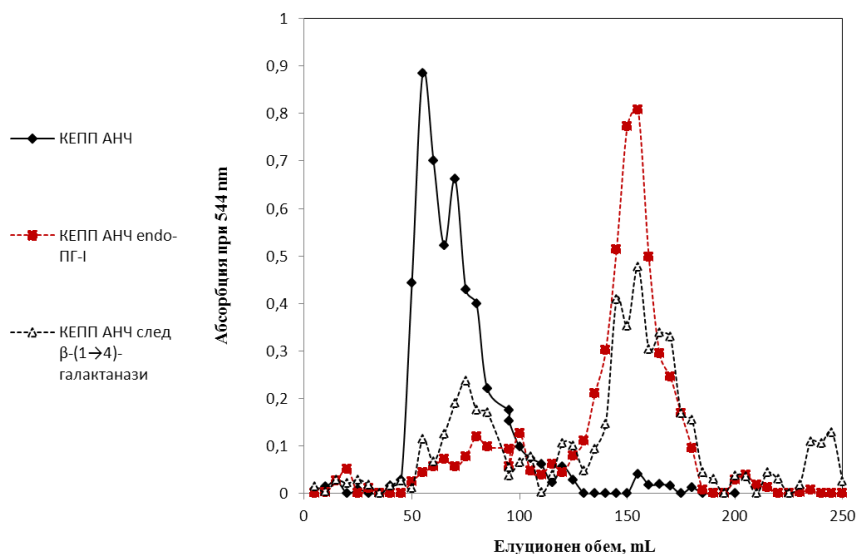
утаимите продукти (**табл. 21**). [Grønhaug et al. \(2011\)](#) установяват, че след действието с *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназата на *endo*-ПГ-третираните ПП от *B. petersianum* Klotzsch GlcA не се открива, което потвърждава и нашия извод.

Захарният състав на алкохолно-разтворимите фракции е представен в **табл. 22**. Очаквано в тях най-голямо е съдържанието на мономерна Gal (1.4-15.5%), отделена в резултат на комбинираното ензимно действие. Чрез използвания HPLC-RID метод образуваните галакто ди- и олигомери не могат да се определят без допълнително хидролизиране на супернатанта и последващо определяне, като мономери. „Липсата“ на мономерна GlcA в супернатанта се обяснява отново с директния захарен анализ. Присъствието на споменатите по-горе нехидролизирани допълнително GlcA-заместени (галакто)олигомери води до „маскиране“ и „подценяване“ на GlcA съдържание. Подобно на *endo*-ПГ, *endo*- β -(1 \rightarrow 4)-галактаназата и β -галактозидазата не са подлагани на допълнително пречистване. От ензимния сертификат на галактаназата се вижда, че препаратът съдържа странични специфични ензимни активности, като полигалактуроназна (0.15 U/mg), *endo*-арабинаназна (0.02 U/mg), ксиланазна. Препаратът на β -галактозидазата е значително по-чист. По-важен е обаче фактът, че самият ензим притежава широка специфичност, която се изразява в хидролиза на различни β -D-галактозиди, α -L-арабинозиди и β -D-ксилозиди ([De Vries et al., 2000](#); [Mahoney, 2003](#)). Затова наличието на Aga, Xyl и GalA може да бъде обяснено с чистотата и специфичността на действие на използваните ензими. Друга възможност за произхода на мономерната GalA би могла да се свърже със съутаяването ѝ наред с високомолекулните фрагменти („примес“) още в предходната модификация с *endo*-ПГ, като на този етап, чрез допълнителната алкохолна обработка, се е „освободила“ и преминала в разтворимата част. Това твърдение подлежи на допълнителна проверка в по-следващи анализи. Дялът (%) на олигозахаридите е извлечен от хроматограмите и също е представен в **табл. 22**.

4.3.1.3 Гелхроматография на КЕПП и ВЕПЛ АНЧ, и на техните модифицирани продукти

Промените в мол. маси, настъпващи в резултат на ензимната модификация на два от субстратите, както и разпределението на уронидните фрагменти, може да се види ясно и от проведения гелхроматографски анализ. На **фиг. 11** и **12** са представени хроматограмите с разпределението на мол. маси съответно за проба КЕПП и ВЕПЛ АНЧ и техните

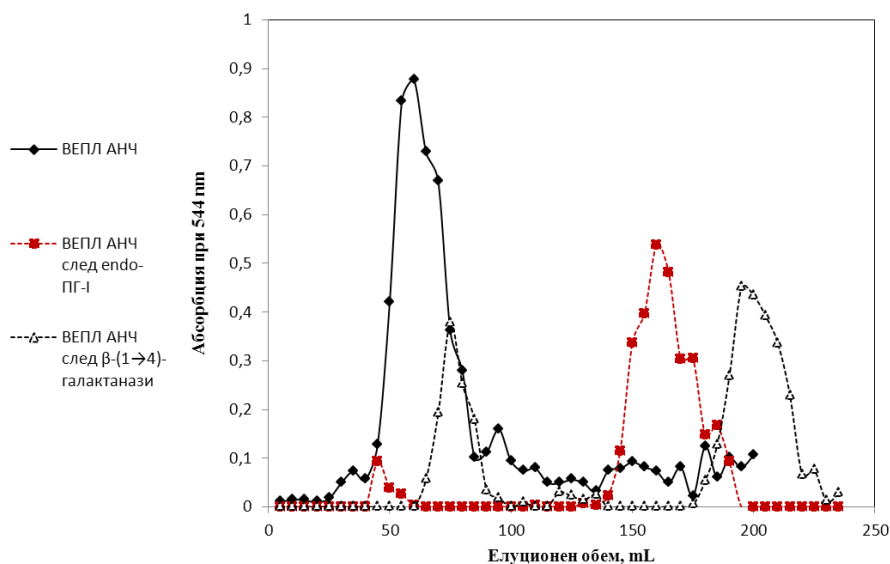
модифицирани продукти. Двата субстрата бяха подбрани на базата на предварително направените химични характеристики и имунологична оценка. От **фиг. 11** се вижда, че изходният ПЗ е с висока мол. маса, т.к. се елуира, като един голям сборен пик, още в самото начало с обем на задържане ($V_R = 60 \text{ mL}$) близък до V_0 на колоната. Въз основа на елуционния обем на пика е изчислена средна мол. маса $2.2 \times 10^5 \text{ Da}$, което по порядък съответства на намереното по-преди (**табл. 14**). Малките разлики може би се дължат на различните стандарти използвани при конструирането на отделните калибрационни прави. В рамките на самия пик, както е за очакване, с повишаване на елуционния обем се наблюдава понижаване на средната мол. маса на съответните суб-популации. Такава зависимост е наблюдавана и от [Ralet & Thibault \(2002\)](#) при фракционирането на деестерифицирани пектини.



Фигура 11. Гелхроматография на КЕПП АНЧ и на алкохолно-утаимите продукти, получени след последователно действие с *endo*-ПГ-I и β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими.

С особен интерес е проследен елуционният профил на алкохолно-утаимата част след действие с *endo*-ПГ-I. От него се вижда, че с алкохол са се утаили както високомолекулни вещества, така и не малка част нискомолекулни олигомери. На мястото на големия сборен пик е детектиран по-малък разлят подобен пик с по-голям елуционен обем ($V_R = 75-80 \text{ mL}$), на който мол. маса е $\sim 8.0 \times 10^4 \text{ Da}$. Ниското уроново съдържание и сравнително високата мол. маса, подсказват локализирането на неутрални РГ фракции, които обаче не са освободени напълно от присъствието на неразградени ХГ сегменти. Образоването на пик с елуционен обем между 130-180 mL е ясно доказателство за ефекта от действието на

endo-ПГ-I върху киселата част на ПЗ. Максимумът му се наблюдава при елуционен обем малко над 150 mL, на който съответства средна мол. маса $\sim 4.0 \times 10^3$ Da и СП ~ 22 . Поради значително по-бавното му елуиране, в него вероятно са концентрирани кисели олигомери, но и мономерна GalA ($V_R > 165$ mL). Логично промяна в елуционния профил след действие с галактан-разграждащи ензими не се наблюдава. Пикът (< 80 mL), съответстващ на по-високите мол. маси се е запазил, като се е повишил абсорбционният максимум на детектираните УК, вероятно в резултат от концентриране на GalA съдържание след частично отстраняване на неутралната Gal. Също така от хроматограмата се вижда, че се е запазил пикът с елуционен обем ~ 150 mL, но той вече е представен с по-нисък абсорбционен максимум. За сравнение [Prabasari et al. \(2011\)](#) успяват да изолират три пика от *endo*-ПГ хидролизат на пектин от портокалово алbedo. Въз основа на въглехидратния анализ, за първия от тях, е установено, че съдържа РГ фрагменти, а останалите два съответно РГ-II и олигогалактурониди.



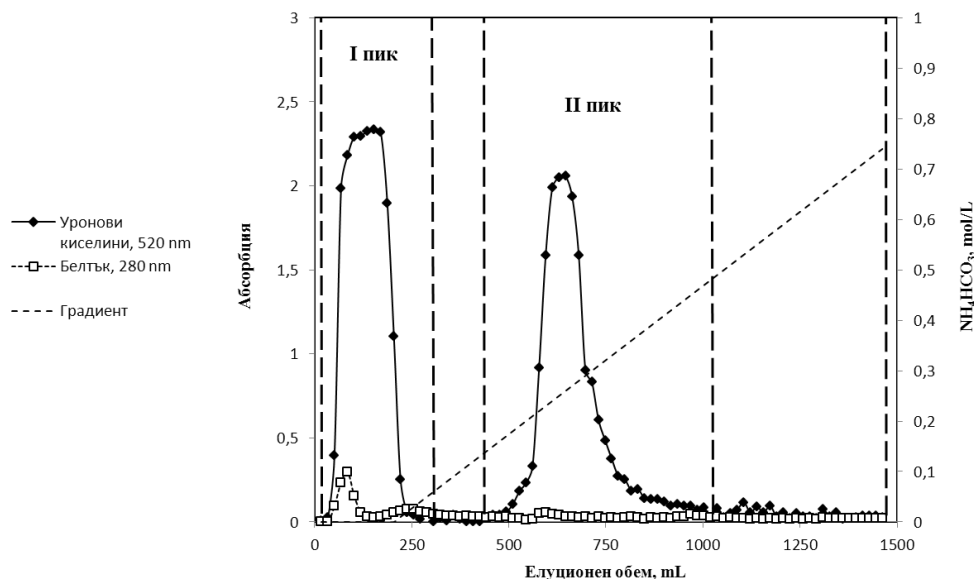
Фигура 12. Гелхроматография на ВЕПЛ АНЧ и на алкохолно-утаимите продукти, получени след последователно действие с *endo*-ПГ-I и β -(1→4)-галактан-разграждащи ензими.

Исходният ВЕПЛ АНЧ и алкохолно-утаимите продукти показват сходен с вече наблюдавания елуционен профил на КЕПП АНЧ. От **фиг. 12** се вижда, че изходният пектин е високомолекулен (2.0×10^5 Da), т.к. преминава бързо през колоната ($V_R \sim 60$ mL). След действието с *endo*-ПГ-I се забелязва, че се е запазила малка част от изходния субстрат с мол. маса 3.2×10^5 Da, която е неразградена и утаена при обработката с етанол. Наред с това се откроява появата на нов интензивен пик, който се елуира с ~ 160 mL буфер

и чиято средна мол. маса е $\sim 3.2 \times 10^3$ Da. По аналогия с вече отбелязаното по-горе пикът съдържа олигогалактурониди. Получените резултати се явяват в подкрепа на тези докладвани по-преди от [Ros, Schols, & Voragen \(1998\)](#). Авторите са анализирали разпределението на НЗ и УК в ензимни хидролизати (лимоново алbedo) чрез гелхроматография, като намират, че повечето от тях съдържат устойчива на ПГ-действие високомолекулна фракция („космати региони“) и олигогалактурониди, елуиращи се значително по-бавно. В своето изследване [Yapo et al. \(2007\)](#) получават три фракции (I, II, III), първата от които съдържа > 10% деестерифициран изходен пектин и ~92% ПГ-резистентен материал, за който впоследствие доказват, че съответства на РГ-I. Третият пик, елуиращ се с обем близък до общия на колоната, представлява олигогалактурониди.

4.3.1.4 Анионообменна хроматография на изходен ВЕПП АНЧ и на необработен ензимен хидролизат, получен след действието на *endo*-ПГ-I

Известно е, че някои пектини притежават особена чувствителност към Ca^{2+} и имат различни желирни свойства, въпреки сходните си химични характеристики (GalA, НЗ, СЕ, СА) ([Kravtchenko, 1992](#)). Разбира се, това е свързано с разпределението на заредените групи ($-\text{COO}^-$) по протежението на основния пектинов скелет ([Kravtchenko et al., 1992](#); [Ralet & Thibault, 2002](#)). Ето защо от голямо значение е изследването и определянето на хомогенността по отношение на заряда на някои от получените проби. Затова изходната фракция ВЕПП от АНЧ е подложена на ЙХ с цел да се отдиференцират и фракционират различаващите се по заряд ПЗ популации. Елуционният профил е представен на **фиг. 13**, а добивът и мол. маси на съответните суб-фракции (пикове) в **табл. 23**. От фигурата се вижда, че се елуират две основни популации, като първата (пик I) е по-слабо свързана към пълнежа на колоната и се отмива лесно само с дест. вода и елуент с малка йонна сила. Част от вложената проба (пик II), обаче е захваната прекалено здраво и за освобождаването и е необходимо елуиране при по-голяма йонна сила (0.2-0.5 M NH_4HCO_3).



Фигура 13. Анионообменна хроматография на изходен ВЕПП АНЧ.

Интересно е, че и двата пика представляват пектинови високомолекулни хомогенни (100%) популации (табл. 23). Въз основа на въглехидратния анализ (табл. 24) основни компоненти и в двете фракции са УК (94.3 и 92.5 mol%). НЗ се съдържат и в двете фракции, но в много малки количества (5.7 и 7.5 mol%). Това подсказва, че изолираните фракции преимуществено са изградени от ХГ сегменти (пик I и II съответно 94 и ~92 mol%), а РГ блокове заемат незначителна част (5.1 и 7.0 mol%). По-здравото задържане на фракция (пик) II говори, че тази пектинова популация се характеризира с по-ниска СЕ спрямо първата. Още повече, че елуирането му със закъснение, с по-голяма йонна сила на фазата, е първа индикация за по-скоро блоково разпределение на неестерифицираните GalA-единици. Несвързаната фракция (пик I) заема по-голям дял от пробата (~50%) и би трябвало да се характеризира с висока СЕ. От получените тук резултати може да се обобщи, че ВЕПП АНЧ се състои от различни популации от пектинови макромолекули, характеризирани се с нееднакво разпределение на Me-естерните групи. Познавайки се на резултатите на [Schols et al. \(1989\)](#), според които елуционното време на хроматографския пик е пропорционално на СЕ, потвърдено по-късно и от [Ralet & Thibault \(2002\)](#), можем да направим заключението, че пектинът притежава случайно разпределение на Me-групи.

Таблица 23. Добив (% с.в.) и молекулна маса (Da) на фракциите, получени след анионообменна хроматография на изходни и модифицирани пектинови полизахариди от АНЧ на портокалови кори.

Проба	Хроматографски пик	Добив	Молекулна маса	%
ВЕПП АНЧ	I	49	1.2×10^5	100
	II	25	1.1×10^5	100
ВЕПП АНЧ <i>endo</i> - ПГ-I	I	50	2.8×10^3 0.6×10^3	39 61
	II	7	2.9×10^3	100

Проучена е и хомогенността на пробата след ензимен хидролиз. На **фиг. 14** е представен елуционният профил на необработения с етанол ензимен хидролизат, получен след действието на *endo*-ПГ-I, а добивът и мол. маси са поместени в **табл. 23**. И в този случай вложеният материал се елуира в два основни пика. Първият е по-тесен и симетричен и се характеризира с по-голям добив (50%), докато вторият пик е със значително по-нисък добив (7%).

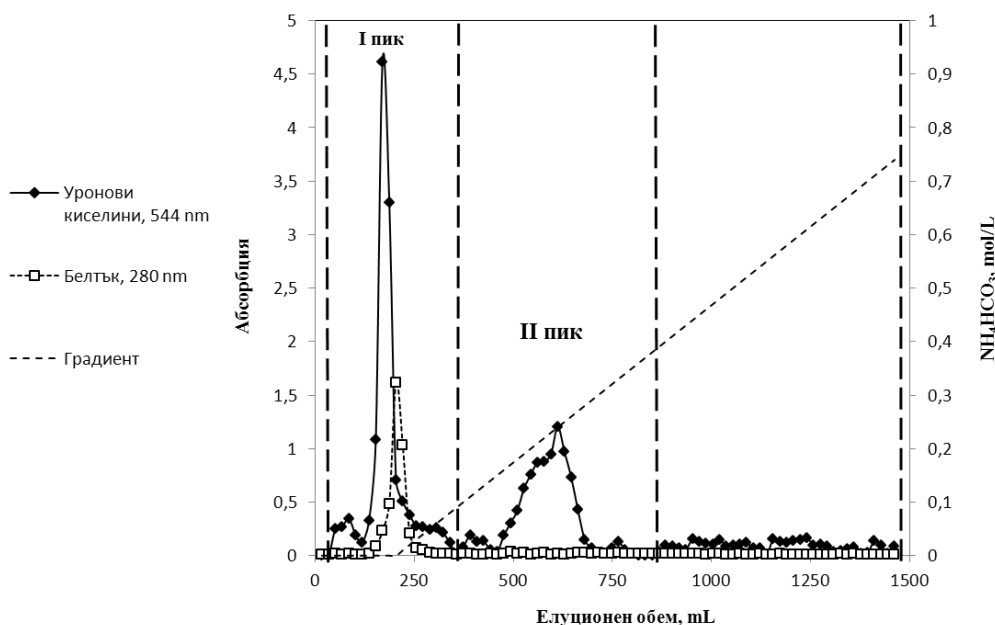
Таблица 24. Монозахариден състав (% w/w) на фракциите, получени след анионообменна хроматография на изходни и модифицирани пектинови полизахариди от АНЧ на портокалови кори.

Проба	Хроматографски пик	Монозахариден състав								
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	УК	Общо
ВЕПП АНЧ (изходен)	I	0.2 (0.3)*	-	1.4 (2.3)	0.1 (0.2)	-	1.6 (2.2)	0.5 (0.7)	72.4 (94.3)	76.2
	II	0.5 (0.8)	0.1 0.2	2.0 (3.4)	-	0.1 (0.1)	1.3 (2.0)	0.6 (1.0)	68.1 (92.5)	72.7

* стойностите в скобите показват монозахаридния състав в mol%

Последващият HPSEC анализ показва, че двете фракции се отличават със значително по-малка мол. маса спрямо изходните, но също така се забелязва промяна и в тяхната хомогенност. По-слабо свързаната фракция (пик I) обединява две олигомерни суб-популации, първата от които, отговаря по мол. маса на олигомери със средна СП ~16. Вероятно това са къси РГ фрагменти. Втората суб-популация, която заема значително по-голям дял (61%), навярно съдържа неестерифицирани три- и/или тетрамери (м. маса 600 Da). Втората фракция се задържа по-здраво към пълнежа на колоната и се отмива

значително по-бавно с по-голяма йонна сила на разтвора. Предвид механизма на действие на ензима *endo*-ПГ-I (Pilnik & Rombouts, 1981; Voragen & Pilnik, 1989; Sakai *et al.*, 1993; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Combo *et al.*, 2012) върху осапуения субстрат може да се предположи, че пик II съдържа олигогалактурониди (средна СП ~16). Това потвърждава протичането на хидролиз, който обаче е непълен. Резултатите затвърждават допуснатото по-преди твърдение, че този субстрат (ВЕПП АНЧ) „затруднява“ действието на ензима.



Фигура 14. Анионообменна хроматография на ензимен хидролизат получен след действието на *endo*-ПГ-I върху осапуен ВЕПП АНЧ.

Особено впечатление прави наличието на белтък само в първата фракция (пик I) на изходния неосапуен пектин (фиг. 13). Предвид, че основен компонент в нея е GalA, би могло да се допусне, че съществува връзка между протеините (АГП) и пектиновия ХГ. Подобно твърдение е изказано по-рано и от Immerzeel *et al.* (2006) за АГП фракции от моркови. Присъствието на белтък, обаче в първата фракция след ензимния хидролиз, при който е отстранена част от ХГ (фиг. 14), дава достатъчно основание да се мисли, че съществуващата ковалентна връзка е между белтъка и пектиновия РГ-I. Делът на РГ в тази фракция (пик I) е малък, но за сметка на това дължината на страничните вериги е по-голяма (Ara+Gal/Rha = 15.0) (табл. 24). Получените резултати подкрепят наблюдението на Qi *et al.* (1995), които привеждат редица факти в подкрепа на твърдението си за ковалентна връзка между екстензина и пектиновия РГ-I. Въпреки че премахват значителна част от ПЗ (>90% GalpA, целулоза, хемицелулози и др.), ~100% от екстензина (белтъка) остават все

още неразтворими. Едновременно с това почти 30% от R_{hap}, изграждаща близо 1/3 от РГ-I, остава също неразтворима. Според авторите най-елементарното обяснение е, че протеинът задържа част от пектиновия РГ-I. Въз основа на данните получени до тук хипотезата за свързване чрез арабино-3,6-галактани, както е предложил още Keegstra *et al.* (1973), не би била без основание в този случай. Suh *et al.* (2013) модифицират с *endo*-ПГ ПЗ фракция CUI-3Пb-3-2, а от нея изолират РГ-I фракция (PG-1), съдържаща и протеини, а присъствието им в олигомерната фракция не е детектирано.

4.3.2 Ензимна модификация на ПП изолиран от АНЧ на праз

4.3.2.1 Молекулна маса на модифицираните продукти

HPSEC елуционен профил на алкохолно-утаимата част след действие на *endo*-ПГ-I на проба КЕППр от АНЧ е показан на **фиг. 25А**. Сравнявайки го с изходния (**фиг. 24А** и **табл. 15**) се откроява липсата на една от по-високомолекулните ПЗ популации (> 100 – 90 kDa), но останалата част от профила е много близка до тази на изходния. Очевидно редуцията на мол. маса се дължи на ензимното действие, при което се отстранява част от ХГ сегменти. Едновременно с това сходството на профилите говори за запазване на голяма част от пектиновата макромолекула. Последното се дължи на особеностите в структурата на тази фракция. Предвид тези данни се затвърждава фактът, че в КЕППр АНЧ основен дял заемат наситените с НЗ РГ-области, чиято мол. маса може да отнесем в областта ~70 – 40 kDa.

4.3.2.2 Монозахариден състав на модифицираните продукти от пектин на праз

Индивидуалният въглехидратен състав на алкохолно-утаимата фракция след действието на *endo*-ПГ-I върху КЕППр от АНЧ е нагледно представен в **табл. 25**. И в този случай се забелязват сходни на предходно отбелязаните за модифицираните ЦП зависимости. От таблицата се вижда, че основен въглехидратен компонент (91.1% от НЗ) в модифицираната фракция е Gal, като спрямо изходния субстрат нейното количество незначително се е повишило (от 49.7 на 51.1 mol%). В резултат на ензимното действие съдържанието на УК – втория основен компонент, намалява с 28%, което потвърждава протичането на хидролиз.

Таблица 25. Монозахариден състав (% w/w) на алкохолно-утаимите продукти след модификация на киселинно-екстрахиран пектин от праз с *endo*-ПГ-I.

Проба	Монозахариден състав								
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	УК	Общо
КЕППр АНЧ (изходен)	0.6 (0.9)*	-	0.7 (1.1)	0.3 (0.4)	-	38.1 (49.7)	0.5 (0.6)	43.9 (45.9)	84.1
КЕППр АНЧ (алкохол-утаима част след <i>endo</i> -ПГ-I)	0.8 (1.3)	-	1.3 (2.5)	0.2 (0.5)	-	33.7 (51.1)	0.5 (0.8)	31.6 (41.7)	68.1

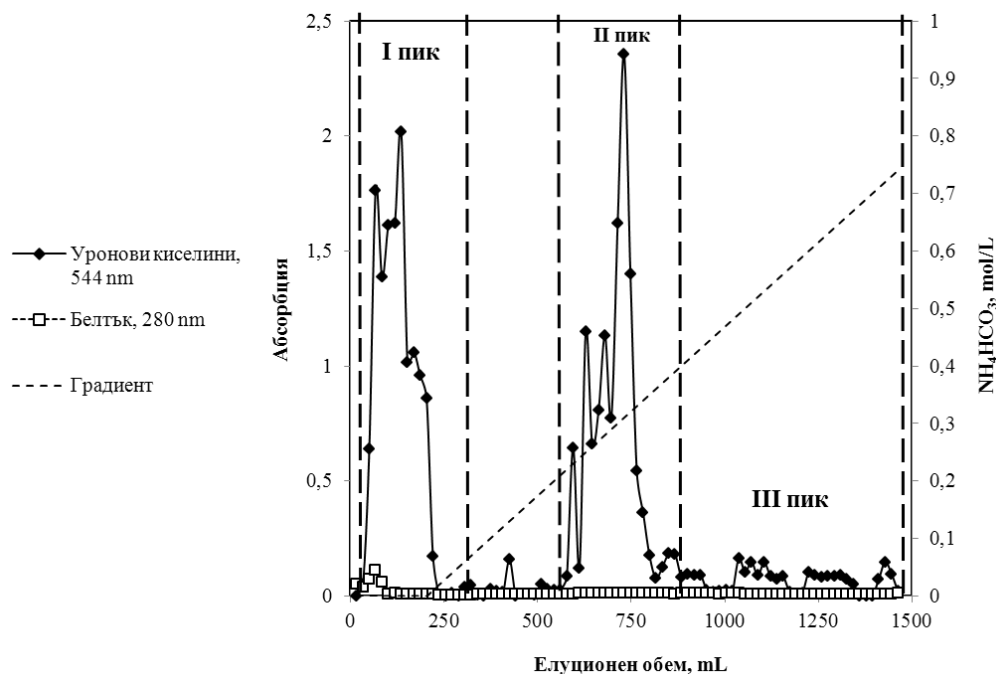
* стойностите в скобите показват монозахаридния състав в mol%

Но и при този субстрат ензимът „изпитва затруднения“ да хидролизира ХГ структури. След приспадането на Rha съдържание, ненадвишаващо 2.3% от общите НЗ в модифицираните продукти, остава не малка част от УК, които би трябвало да са организирани под формата на неразграден ХГ! Логично обяснение за наблюдаваното може да открием отново в естеството (състав и структура) на изходния ПЗ, припомняйки си отбелязаните по-преди негови характеристики (табл. 13 и коментарите към нея). Една от тях е относително по-малкият дял на ХГ сегменти в изходната проба. В алкохолно-неразтворимите продукти след модификацията Ara (1.3%; 2.5 mol%) заема 4.4% от общите НЗ. Това показва, че нейното количество, противно на наблюдаваното досега, се е повишило с ~49%. Факт е „обогатяването“ на Rha-съдържащи фрагменти (РГ-I), т.к. съдържанието на Rha в модифицирания продукт е нарастнало с 25%. От съотношенията Rha/GalA (преди 0.02, след 0.03) и GalA/общи НЗ (преди 0.9, след 0.8) може да се предположи, че в състава на пектиновите фракции основна част заемат РГ блокове (56.2 mol%) или субстратът притежава структура, доста близка до нативната, поради устойчивостта на ензимното действие. Тя от своя страна е породена от доста високата степен на омрежване. В случая редуцията на ХГ съдържание след модификация е 10.2%, а дялът на РГ сегменти се е повишил само със 7%.

4.3.3 Ензимна модификация на ПП изолиран от АНЧ на шипкови люспи

4.3.3.1 Анионообменна хроматография на изходен ВЕПШ АНЧ и на необработен ензимен хидролизат, получен след действието на *endo*-ПГ-I

Изходната фракция ВЕПШ от АНЧ е подложена на ЙХ с цел да се фракционират различаващите се по заряд ПЗ популации. Елуционният профил е представен на **фиг. 15**, а добивът и мол. маси на суб-фракциите (пикове) в **табл. 26**.



Фигура 15. Анионообменна хроматография на изходен ВЕПШ АНЧ.

От фигурата се вижда, че се елуират две основни популации, като първата (пик I) е по-слабо свързана към пълнежа на колоната и се отмива лесно само с дест. вода и елуент с малка йонна сила. Тъй като пробата не е осапунена, то първата получена фракция е с по-висока СЕ. Част от вложената проба (пик II) се задържа по-здраво и за освобождаването и е необходимо елуиране при по-голяма йонна сила (0.2-0.5 М NH_4HCO_3). Към пълнежа на колоната остават свързани няколко ПЗ популации, които заемат малък дял (5%) и са обединени в един сборен пик III, елуиращ се с 0.4-0.8 М NH_4HCO_3 . И трите пика представляват хомогенни (100%) пектинови популации с висока мол. маса: $1.0-1.5 \times 10^5$ Да (**табл. 26**). Предвид въглехидратния анализ (**табл. 27**) главни компоненти в първите две фракции са УК (87.5 и 92.7 mol%). Логично съдържанието на НЗ е по-голямо в първата фракция (12.6 mol%), докато във втората НЗ заемат 7.4 mol% от общите захари. Това показва, че изолираните фракции са преимуществено изградени от ХГ сегменти, по-големи количества от които се намират във втората фракция (92.2 mol%). Според резултатите с по-голям РГ-I дял от двете основни фракции се характеризира несвързаната фракция (пик

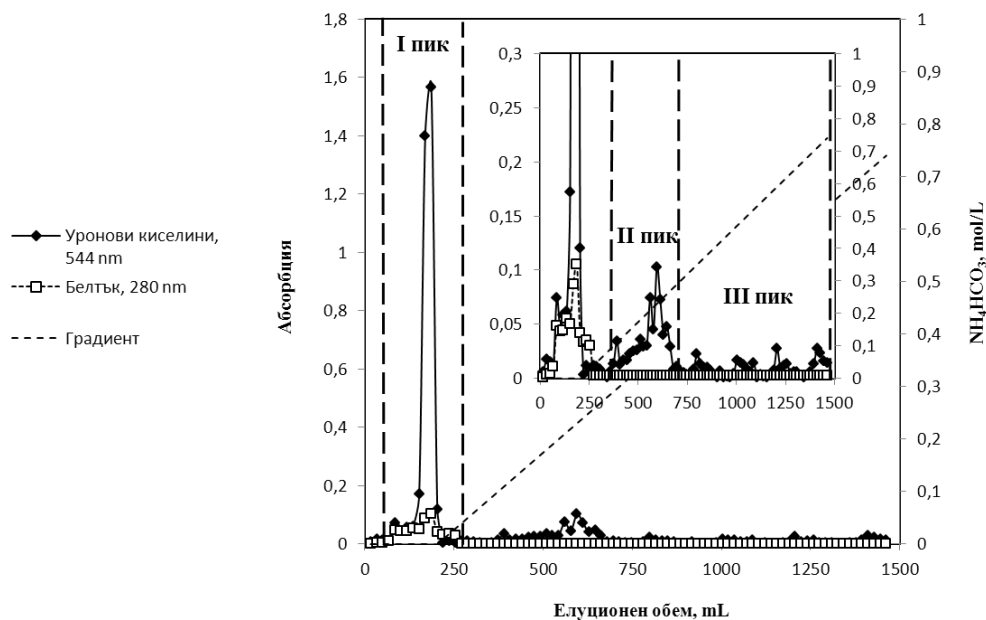
I) (10.6 mol%). Във втората ПЗ суб-популация неговото съдържание е 7.8 mol%, което е ~12 пъти по-малко от това на ХГ. За съжаление третата ПЗ популация (пик III) беше получена в малък добив, непозволяващ извършването на монозахариден анализ, но предвид здравето свързване към пълнежа на колоната и характеристиките на предходните две фракции, би следвало тя да обединява ХГ фрагменти с много ниска СЕ и блоково разпределение на неестерифицираните GalA-единици. От представеното до момента може да се направи заключението, че изходният ВЕПШ АНЧ е съставен преимуществено от ХГ сегменти и включва в себе си най-малко три ПЗ популации, различаващи се по СЕ и разпределение на Me-групи. Последното не бива да се изключва, като допълнителен фактор, наред с общия нетен заряд на молекулата, повлияващ разделянето на пробата.

Таблица 26. Добив (% с.в.) и молекулна маса (Da) на фракциите, получени след анионообменна хроматография на изходни и модифицирани пектинови полизахариди от АНЧ на шипкова люспа.

Проба	Хроматографски пик	Добив	Молекулна маса	%
ВЕПШ АНЧ	I	39	1.5×10^5	100
	II	30	1.0×10^5	100
	III	5	1.2×10^5	100
ВЕПШ АНЧ <i>endo</i> - ПГ-I	I	55	2.7×10^3	39
			0.5×10^3	61
	II	12	2.5×10^3	83
			0.7×10^3	17
III	4	6.1×10^3	49	
		0.4×10^3	51	

Изходната проба след осапунване е подложена на действие на *endo*-ПГ-I и необработения с етанол ензимен хидролизат е отново анализиран чрез ЙХ с цел проследяване измененията в хомогенността на пробата по отношение на нейния заряд. Елуционният профил е представен на **фиг. 16**, а добивът и мол. маси са поместени в **табл. 26**. И в този случай вложеният материал се елуира в два основни пика. Първият се отмива като единичен симетричен и тесен пик и се характеризира с по-голям добив (55%), а вторият със значително по-малък (12%). Този факт би следвало да се тълкува като наличие на доста „тясно“ разпределение на СЕ, което в случая е свързано с осапунването на пробата, при което СЕ е еднакво ниска за всички ПЗ популации. От своя страна това е

индикация за присъствие на олигогалактурониди. След втория пик, с по-голяма йонна сила на разтвора, се отмиват няколко ПЗ суб-популации, които заемат малък дял (4%) и са обединени в един сборен пик III.



Фигура 16. Анионообменна хроматография на ензимен хидролизат получен след действието на *endo*-ПГ-I върху осапунен ВЕПШ АНЧ.

HPSEC анализ показва, че двете фракции се отличават със значително по-малка мол. маса спрямо изходните (от $10^5 \rightarrow 10^3$), но също така се забелязва промяна и в тяхната хомогенност. По-слабо свързаната фракция (пик I) обединява две олигомерни суб-популации, първата от които притежава мол. маса 2700 Da, но заема по-малък дял (39%). От монозахаридния анализ (табл. 27) се вижда, че основен компонент в тази фракция са УК (87.5 mol%). Присъствието на НЗ, като Ara (6.3 mol%), Gal (5.3 mol%) и следи от Rha, е индикация за наличие на къси РГ фрагменти. Втората суб-популация, която заема значително по-голям дял (61%), навярно съдържа неестерифицирани тримери (м. маса ~500 Da). Втората фракция (пик II), която е свързана по-здраво към йонообменителя и се отмива значително по-бавно, потвърждава протичането на хидролиз, водещ до натрупването на олигомери с висока средна СП (~14). Фракция III се състои от неестерифицирани ди- и тримери.

Таблица 27. Монозахариден състав (% w/w) на фракциите, получени след анионообменна хроматография на изходни и модифицирани пектинови полизахариди от свежи шипкови плодове и АНЧ на шипкова люспа.

Монозахариди	ВЕПШ АНЧ		ВЕПШ АНЧ <i>endo</i> -ПГ-I	ВЕПШ <i>endo</i> -ПГ-I	
	Хроматографски пик			Алкохолно-утаими продукти	Алкохолно- разтворима част
	I	II	I		
Rha	0.3(0.5)	0.3(0.5)	следи	0.4(0.7)	следи
Fuc	следи	следи	-	0.1(0.2)	-
Ara	3.2(5.6)	2.5(4.3)	0.6(6.3)	3.0(5.4)	0.2(5.4)
Xyl	0.2(0.3)	-	-	0.1(0.2)	-
Man	0.1(0.1)	-	-	следи	-
Gal	2.6(4.0)	1.7(2.5)	0.6(5.3)	3.0(4.6)	0.1(2.3)
Glc	1.4(2.1)	0.1(0.1)	0.1(1.0)	1.0(1.5)	-
УК	63.6(87.5)	69.1(92.7)	10.6(87.5)	61.3(87.4)	4.3(92.2)
Общи захари	71.4	73.7	12.0	68.9	4.6

* стойностите в скобите показват монозахаридния състав в mol%

Представляваше интерес в отделен експеримент да се провери възможността за ензимна модификация на шипков пектин, който не е осапунен предварително. За тази цел беше избрана проба ВЕПШ (СЕ = 64%), получена от свежи шипкови плодове. В този случай добивът на алкохолно-утаимите продукти е 76%, което е значително повече сравнено с добивите на тези, получени от ЦП (**табл. 16**). Този факт дава основание да се мисли, че тази проба е претърпяла малко промени и по-голямата част от изходната проба е възстановена в алкохолно-утаените продукти, чийто състав и структура са близки до тези на нативната проба. Последното може да бъде видяно и в монозахаридния състав, посочен в **табл. 27**. УК са основен компонент (87.4 mol%), както и в изходния субстрат (**табл. 13**), което показва, че след модификацията ХГ съдържание (86.7 mol%) почти не се е изменило. Наред с УК са намерени и НЗ в различни количества, а в алкохолно-разтворимата част присъстват навярно основно олигогалактурониди (моно-, ди- и тримери) след като УК заемат 92.2 mol% от въглехидратния ѝ състав. Резултатите от този опит са очаквани, тъй като изходният субстрат не е осапунен, а за успешното и по-пълно протичане на хидролиз са предпочитани субстрати с ниска СЕ (Pilklik & Rombouts, 1981; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009). Все пак освобождаването на УК от субстрата в процеса на хидролиз свидетелства за присъствието на относително малък дял на блоково

разпределение на неестерифицирани GalA-единици, чието количество не е малко за този субстрат (36%). Същевременно „затрудненията“ в хидролиза могат да се обяснят и с вида на разпределението на Me- и Ac-групи. Повече светлина върху въпроса за присъствието и вида на разпределение на естерните групи би могла да се хвърли чрез провеждането на ензимен фингърпринтинг и задълбочен анализ на състава и структурата на получените олигомери!

Не са открити за сравнение в достъпната литература данни за провеждане на ензимна модификация с *endo*-ПГ-I на ПЗ от шипкови плодове и последващ анализ на получения хидролизат чрез ЙХ, което без съмнение е принос, свързан с изучаването на проблемите на химията на ПВ от шипкови плодове.

4.4 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ

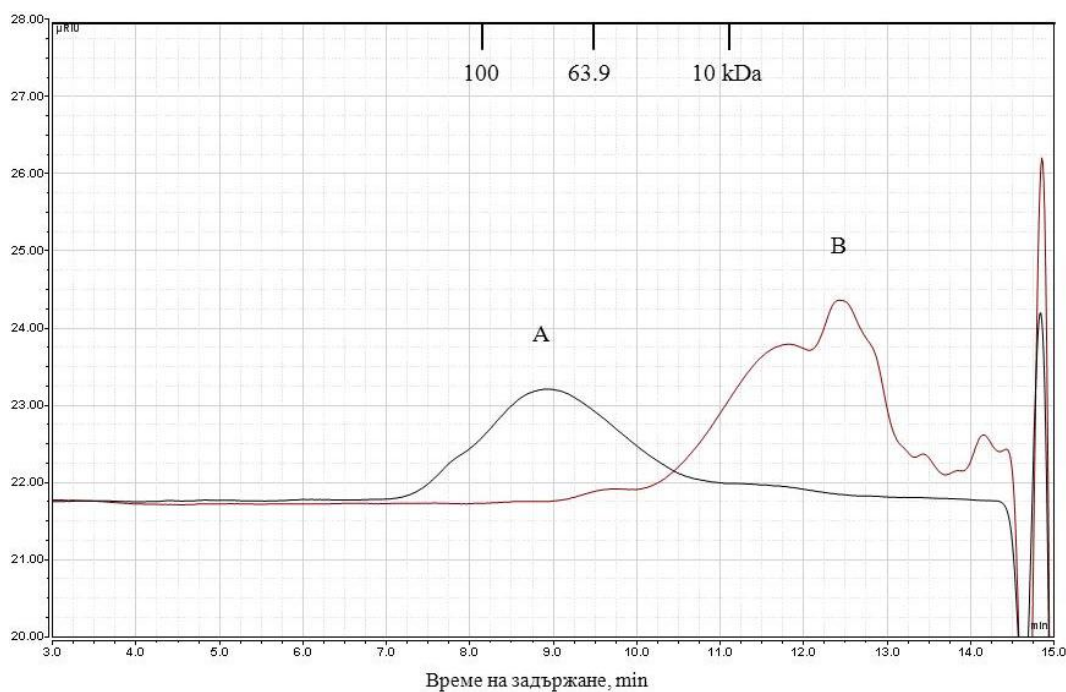
В настоящия раздел са представени резултатите, получени от мулти-ензимния фингърпринтинг анализ, който обхваща два от получените ПП – КЕПП АНЧ и КЕППр АНЧ, както и техните алкохолно-утаими части, изолирани след действието на *endo*-ПГ-I. Чрез този подход се генерират разнообразни „диагностични“ олигомери 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 вискоестерифицирани пектини.

4.4.1 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕПП АНЧ

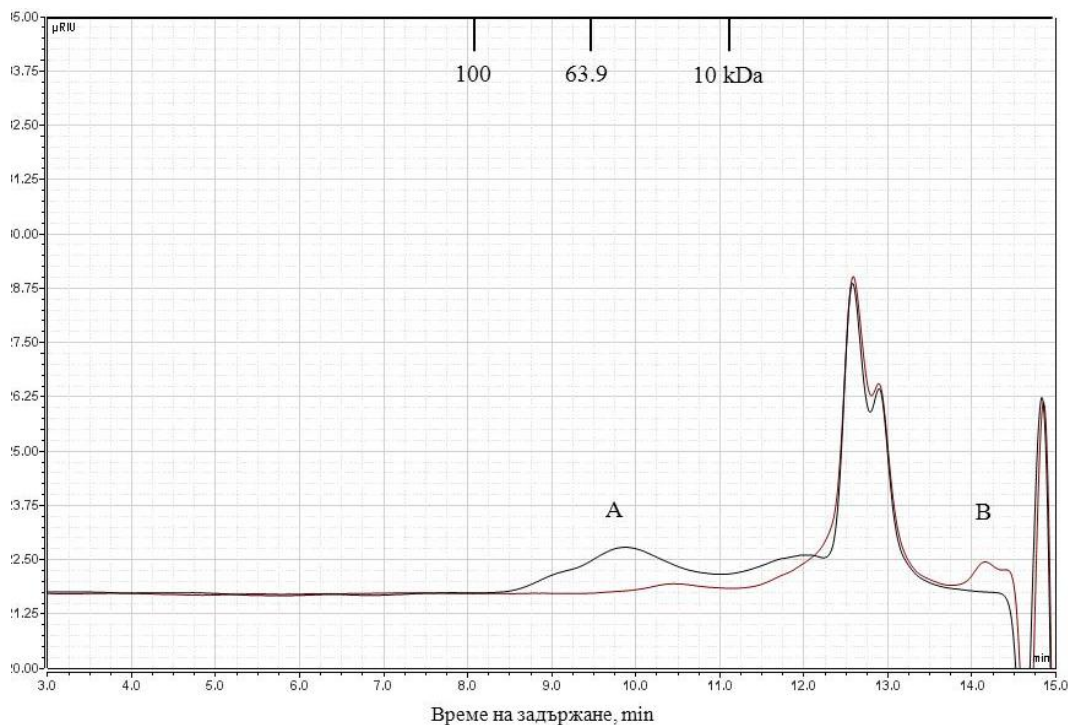
4.4.1.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

За изследване разпределението по мол. маси преди и след ензимната модификация пробите са анализирани чрез HPSEC хроматография. Съответно на **фиг. 17** и **18** 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. 17B**). От фигурата се вижда изместване на пика към по-нискомолекулните фракции (≤ 3 kDa) и олигомери, които се отмиват > 11.5 min. Наред с тях, обаче се забелязва и запазването на широк, но с малък интензитет пик (9-10 min). Той би следвало да обединява силно „резистентни“ на комбинираното ензимно действие РГ-I

региони. Особено интересни са измененията в разпределението по мол. маса, които се наблюдават след ензимния фингърпринтинг анализ на алкохолно-утаимата част, получена след действие с *endo*-ПП-I (фиг. 18). Както се вижда неразградените високомолекулни (~65 – 30 kDa) фрагменти (РГ-I с НЗ) претърпяват допълнителен по-пълен хидролиз, който води до натрупването на моно- и олигомери (≤ 3 -5 kDa), елуирани се > 11.5 min. Очевидно и в този случай, както е наблюдавано и в първия, присъства много малка неразградима част от пробата (10-11 min; ~20 kDa) (фиг. 17В). Сравнявайки два от профилите на елуиране (фиг. 17В и 18В) се забелязва, че те се различават значително в областта на олигомерите (11-12 min). Може да се отбележи, че първият от тях (фиг. 17В) съдържа значително повече и разнообразни олигомери с по-висока мол. маса (съотв. СП). Вторият (фиг. 18В) 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*-ПП-I.



Фигура 17. HPSEC елуционен профил на КЕПП АНЧ преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.



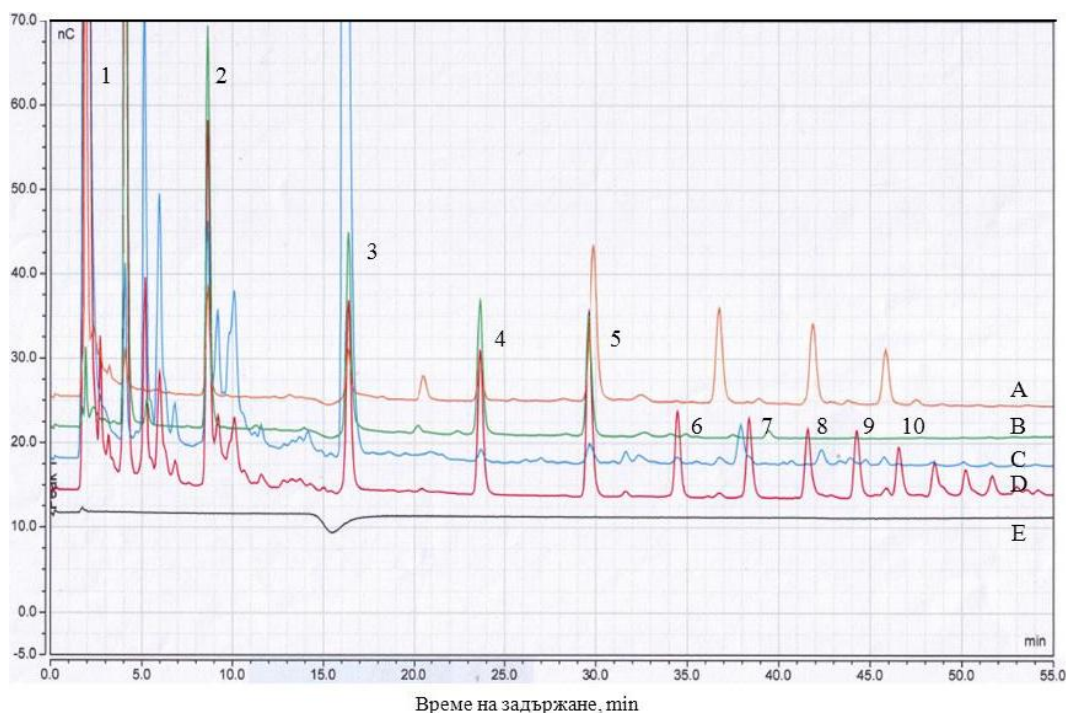
Фигура 18. HPSEC елуционен профил на алкохолно-утаимите продукти на КЕПП АНЧ след действието на *endo*-ПГ-I преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

4.4.1.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

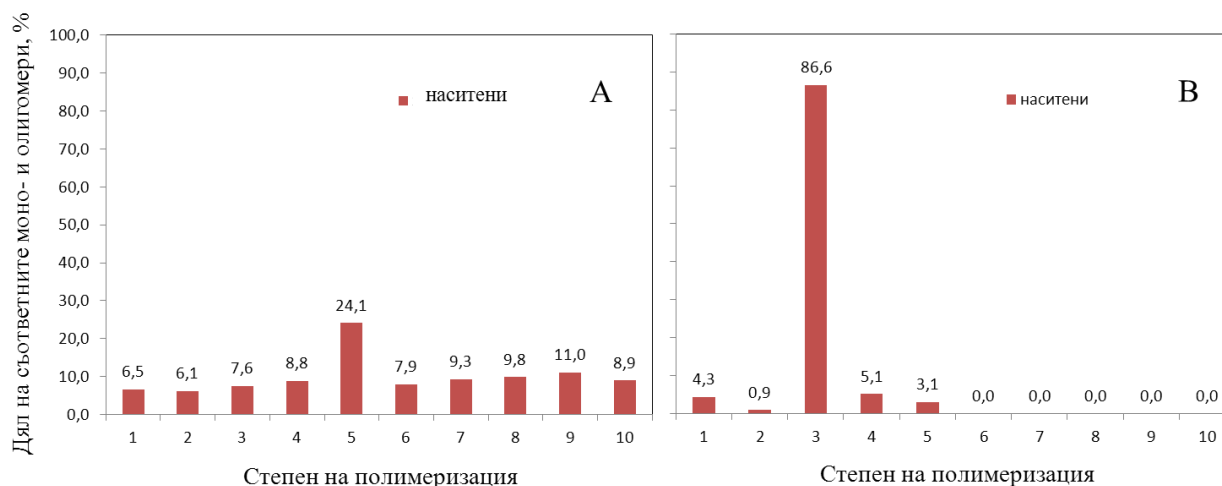
За получаване на информация относно структурата на ХГ в пектиновата макромолекула е необходимо идентифицирането и количественото определяне на наситените и ненаситени олигогалактурониди (вкл. СП), генерирани в резултат на комбинираното ПГ и ПЛ действие. За тази цел хидролизатите са анализирани чрез НРАЕС с РАD детекция. На **фиг. 19** е представен елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените и ненаситените олигомери. От хроматограмата (**фиг. 19D**) 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. 20A** 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 (**табл. 28**). Напр. 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. 20A 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*-елиминирание във високоестерифицирани пектини (Voragen & Pilnik, 1989; Voragen, Beldman, & Schols, 2001; Voragen *et al.*, 2009), 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 (≤ 5) (фиг. 19С) и противно на досега разглеждания най-голям дял сред олигомерите заемат тримерите (86.6%) (фиг. 20В).



Фигура 19. НРАЕС-PAD 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).

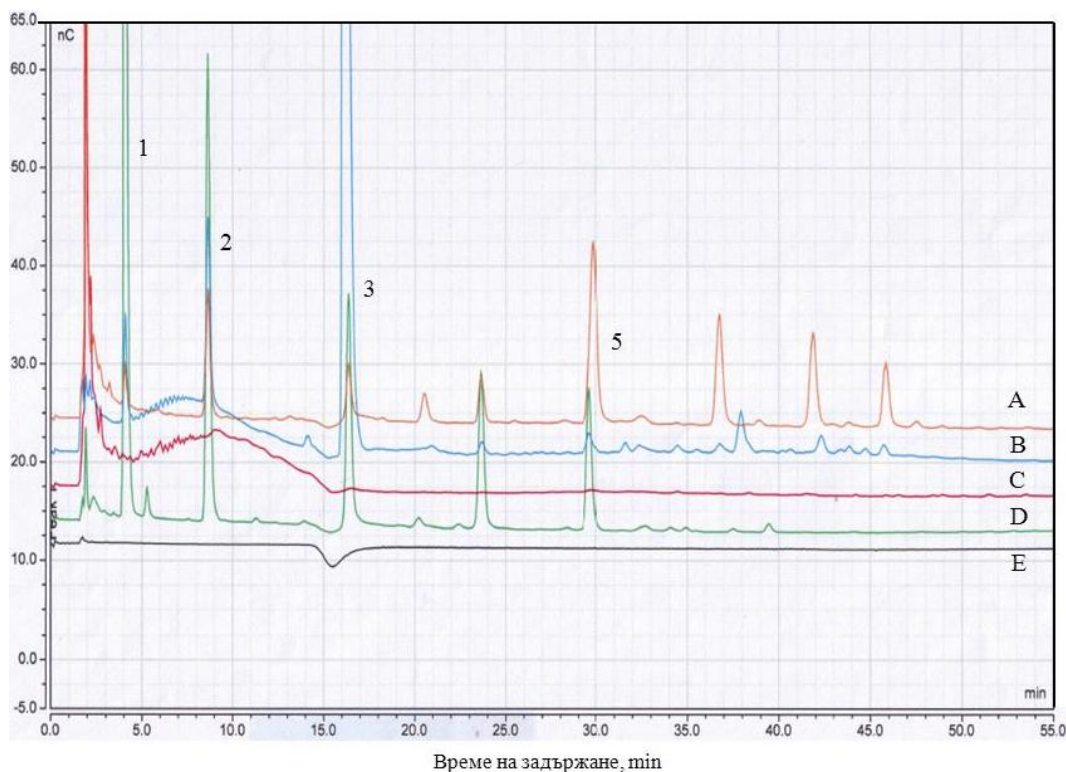


Фигура 20. Степен на полимеризация и дял (%) на съответните моно- и олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащите ензими върху: изходен КЕПП АНЧ (А); алкохолно-утаима част, получена след действието на *endo*-ПГ-I (В).

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. Подобно предположение за лимитиращо действие на веригите от НЗ върху ензима са направили още [De Vries et al. \(1982\)](#) и [Kravtchenko et al. \(1993\)](#).

По-задълбоченият преглед на **фиг. 21** потвърждава наблюденията и преди факт, че някои олигогалактурониди са способни на агрегация и ко-елуиране с по-високомолекулни фрагменти от „косматите“ пектинови региони ([Rombouts & Thibault, 1986](#); [Kravtchenko et al., 1993](#)). В този случай чрез контролния анализ е демонстрирано, че моно- и олигомери (СП 1-3) не са напълно отстранени от алкохолно-утаимата част и те присъстват изначално в пробата (**фиг. 21В**), което налага приспадането им. Същевременно този опит потвърждава изводите и предположението, че част (16%) от излишното количество GalA, което се съдържа в модифицираните проби, се намира под формата на съутаени (моно)олигогалактурониди (СП 1-3) (вж. т. 4.3.1.2). Само 17% от УК би следвало да

изграждат нехидролизиран ХГ (23.7 mol%), редукцията на който е 62%, а не предварително изчислените 36%. Очевидно РГ-съдържание е 70.8 mol%.



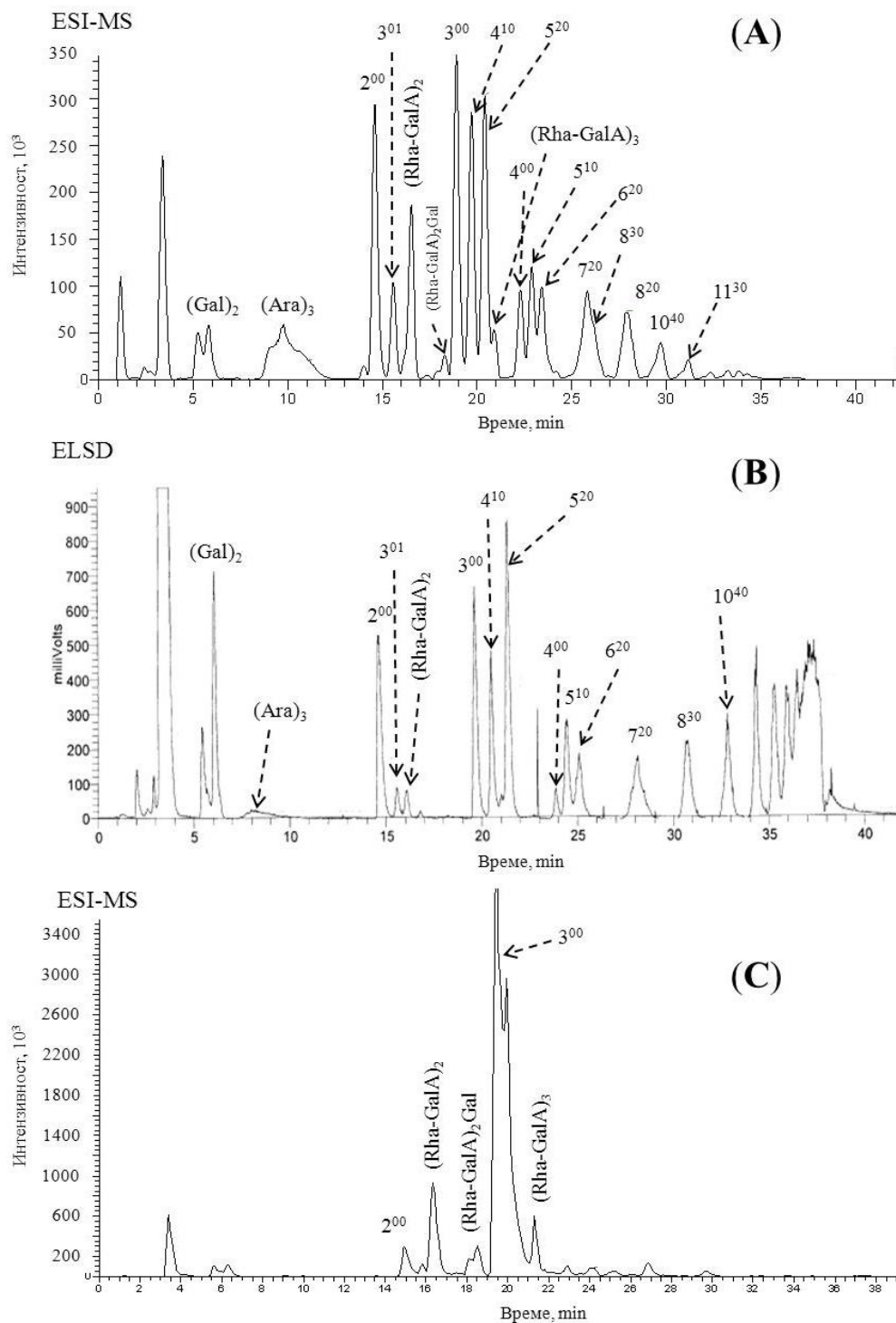
Фигура 21. HPLC-PAH елуционен профил на немодифицирани контролни проби на изходен КЕПП АНЧ (С) и алкохолно-угаимата му част, получена след действието на *endo*-ПГ-I (В). Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (D); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (А); вода (Е).

При този вид хроматографски анализ не е възможно да се разграничат естерифицирани олигомери от неестерифицираните (Daas *et al.*, 1999). Това налага друг подход за по-пълното изясняване на структурата на съответните фрагменти.

През последните години един нов вид хроматография набира популярност в анализа на кисели и неутрални олигомери – хидрофилно-взаимодействаща течна хроматография (HILIC), която използва специални ВЕН аминоколони, а за детекция на олигомерите се използват ELSD и ESI-MS детектори свързани последователно. Принципът на разделяне се основава на хидрофилни взаимодействия между анализа и стационарната фаза, към която се задържат с голям афинитет силно полярните вещества. Чрез този вид хроматография е възможно разделянето и идентифицирането на частично естерифицирани олигоурониди, като времето на задържане се увеличава с нарастване общия (нетен) заряд на киселите олигомери или значително намалява в присъствието на Me-естерни групи. Това е свързано

с екраниращото действие на Me група върху карбоксилната група на GalA ([Westphal et al., 2010](#); [Leijdekkers et al., 2011](#); [Remoroza et al., 2012](#)).

На **фиг. 22** са представени HILIC-ELSD/MS елуционните профили на хидролизатите, а допълнително данни за m/z стойностите, RT, концентрацията и структурата на идентифицираните олигозахариди са обобщени и оформени в **табл. 28**. От хроматограмата (**фиг. 22A**) 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_{Ac}**). Това показва, че пектиновият ХГ от портокалови кори съдържа не само незаместени области, но също така и къси (≤ 7) ацетилвани 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 на [Ralet et al. \(2005\)](#), че остатъци, които са едновременно *O*-ацетилвани и Me-естерифицирани са рядкост. Въпреки високата СЕ на субстрата (71%) в хидролизата се детектират в малки количества неестерифицирани тетрамери (4^{00}), които според [Daas, Voragen, & Schols \(2000\)](#), се освобождават от нискоестерифицирани пектини ($< 35\%$). Вероятно поради ниската мол. маса афинитетът на ензима към този олигомер е силно занижен и се възпрепятства допълнителното му разграждане до моно- и тримери. Сред хидролизните продукти доминират пентамерите носещи една или две Me 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 ([Remoroza et al., 2012](#)) могат да се предложат две структури: **GalA-GalA-GalA_{Me}-GalA-GalA_{Me}-GalA** и **GalA-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA-GalA** (**табл. 28**). Наред с тях с по-голямо RT се елуират и частично Me-естерифицирани, но не и *O*-ацетилвани високомолекулни олигоурониди (7^{20} , 8^{30-20} , 10^{40} , 11^{30}), в които Me групи са случайно разпределени!



Фигура 22. HILIC-ELSD/ESI-IT-MSn елуционен профил на ензимни хидролизати на КЕПП АНЧ (А и В) и алкохолно-угаимата му част (КЕПП АНЧ *endo*-ПГ-I) (С), получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими. Анотация на пикетите: 3^{00} , СП 3; 0-Ме-естер; 0-Ас група; u-ненаситен GalA остатък.

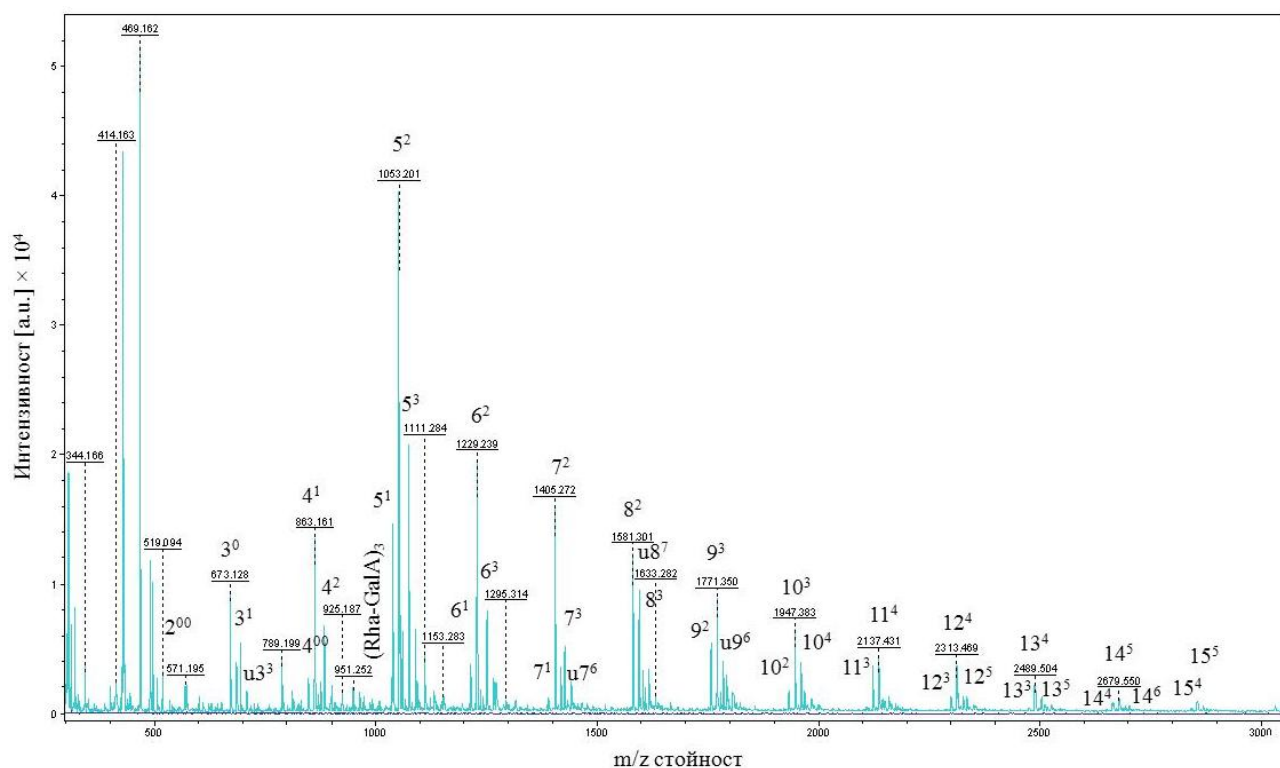
По-нататъшният преглед показва, че в хидролизната смес се съдържат и продукти от действието на РГ-I-модифициращите ензими. Напр. от действието на *endo*-РГХ-А се генерират олигорамногалактурониди **(Rha-GalA)₂**, **(Rha-GalA)₃**, а също така и галактозилиран **(Rha-GalA)₂Gal**. Тези олигомери са застъпени в малки количества, а изглежда, че по-голямата част (2/3) от тях не са заместени. Като резултат от съвместното действие на *endo*- и *exo*-арабиназата и *endo*-галактаназата се натрупват Gal₂ и Ara₃, които изграждат част от страничните вериги от НЗ.

Таблица 28. Време на задържане (min), m/z стойност, концентрация и предполагаема структура на олигомери присъстващи в ензимни хидролизати на КЕПП АНЧ.

RT, min	m/z стойност	Концентрация, µg/mL		Структура
КЕПП АНЧ				
5.79	387.1		(Gal) ₂	Gal-Gal
9.72	395.1		(Ara) ₃	Ara-Ara-Ara
14.56	369.1	66.00	2 ⁰⁰	GalA-GalA
15.61	587.2	2.20	3 ⁰¹	GalA-GalA-GalA _{Ac}
16.51	657.1		(Rha-GalA) ₂	Rha-GalA-Rha-GalA
18.22	823.2		(Rha-GalA) ₂ Gal	Rha-GalA-Rha _{Gal} -GalA Rha _{Gal} -GalA-Rha-GalA
18.88	545.1	79.14	3 ⁰⁰	GalA-GalA-GalA
	735.2	90.80	4 ¹⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
20.40	925.3	133.90	5 ²⁰	GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA
20.89	965.2		(Rha-GalA) ₃	Rha-GalA-Rha-GalA-Rha-GalA
22.20	721.1	5.00	4 ⁰⁰	GalA-GalA-GalA-GalA
22.92	911.26	125.10	5 ¹⁰	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
23.50	1101.2	85.8	6 ²⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA
25.85	638.2	99.4	7 ²⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA
	1277.3			
26.15	733.3	90.34	8 ³⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} - GalA-GalA
27.91	1453.3	14.90	8 ²⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA- GalA
29.69	1833.4		10 ⁴⁰	GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA-

RT, min	m/z стойност	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Структура
31.25	1995.4	11 ³⁰	GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA- GalA _{Me} -GalA-GalA-GalA-GalA

Структурата на получените олигомери е изучена и чрез маспектрометричен фрагментационен анализ, като на **фиг. 23** е показан съответният MALDI-TOF мас-спектър. От него се затвърждават резултатите за доста разнороден олигомерен състав, получени чрез HILIC и HPAEC. Вижда се присъствието на Me-естерифицирани олигогалактуронидни фрагменти с различна СП (2-15), като тези с по-висока СП (12-15) носят съответно 4 и 5 Me-групи и не се наблюдават в HILIC хроматограмата. Последните се характеризират с ниска СЕ (~30%), което предполага случайно разпределение на естерните групи в тях. [Limberg *et al.* \(2000a, 2000b\)](#) прилагат също разработения от тях MALDI-MS метод, за да анализират продуктите от проведения ензимен фингърпринтинг.



Фигура 23. MALDI-TOF маспектър на ензимен хидролизат, получен след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими върху КЕПП АНЧ.

По отношение на HPLC елуционния профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I (фиг. 22C), заслужава да отбележим доминиращото присъствие на неестерифицираните тримери (3^{00}), установено по-преди и чрез НРАЕС (фиг. 20). 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)₂, (Rha-GalA)₃ и (Rha-GalA)₂Gal. Това дава основание да се приеме, че алкохолно-утаената част след първата модификация съдържа основно РГ-I сегменти. Анализираният хидролизат не съдържа олигомери със СП по-висока от 5 (фиг. 22C).

Въз основа на изложените дотук данни може да се изчислят и някои параметри (вж. т. 1.4.1), допълнително характеризиращи естеството на анализирания проби (КЕПП АНЧ и КЕПП АНЧ *endo*-ПГ-I). Резултатите са изложени в табл. 29. 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%), а според Daas, Voragen, & Schols (2000) присъствието и средната големина на неестерифицираните блокове намалява с повишаване на СЕ. Ако неестерифицираните блокове са с голяма дължина, то би следвало $DB_{abs} \approx CX_{ПГ}$ (Remoroza *et al.*, 2014b). 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 Местерифицирани олигомери (5, 6, ... 11). От табл. 29 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 Местерифицирани, 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 Me- и Ac-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими ($DB_{abs} = CX_{ПГ} = CX_{ПЛ} = 0$). В своите изследвания Remoroza *et al.* (2014a, 2014b) отбелязват, че след едностъпковия ензимен фингърпринтинг ~ 60% от ХГ на пектина от захарно цвекло остава „недостъпен“ за тези два ензима. За да избегнат тези затруднения те въвеждат двустъпковия ензимен фингърпринтинг с участието на плесенна ПМЕ и последващо повторно действие на *endo*-ПГ-II. Ензимът успява да освободи допълнително още 42% от общото GalA съдържание на пробата под формата на Me-естерифицирани GalA олигомери (Remoroza *et al.*, 2014b). Получената информация позволява да се приеме, че разпределението на Me-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 29. 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.

Дялът на неестерифицираните „*endo*-ПГ-разградими“ GalA остатъци в алкохолно-утаимата част, получена след предварителна модификация на КЕПП АНЧ, е още по-малък от този на изходния пектин ($DB_{abs} = 4$) (табл. 29). Въпреки че е осапунен след хидролиза се възстановяват още 18 mol% от УК изначално присъстващи в пробата под формата основно на тримери. Поради ниската СЕ (2%) 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. Ниската DB_{abs} стойност в този случай привидно е в противоречие с резултатите на Remoroza *et al.* (2014a). Според тях субстрати с ниска СЕ (B0100) са изключително податливи на действието на *endo*-ПГ и трябва да се

характеризират с високи стойности на показателите $DB_{abs} \approx CX_{III} \approx 100\%$. Обяснение за наблюдаваното може да намерим във факта, че предварително тази проба е претърпяла модификация и голяма част от освободените олигомери, които иначе биха „участвали“ в изчислението на тези параметри, са отстранени от хидролизната смес чрез алкохолна преципитация.

Поради важното значение за ХВП търговските ЦП (лимон, лайм) са били обект на изследване на тяхното Me-естерно разпределение чрез ензимен фингърпринтинг с *exo*-, *endo*-III и/или PLL и по-рано, но не и с PG-модифициращи ензими (Daas *et al.*, 1999; Daas, Voragen, & Schols, 2000; Daas *et al.*, 2001; Limberg *et al.*, 2000a, 2000b; Ngouémazong *et al.*, 2011). След задълбочен анализ и сравняване на получените резултати с литературните данни се вижда, че разпределението на Me групи в изследвания КЕПП АНЧ е сходно на това, което притежават получените от Daas, Voragen, & Schols (2000) случайно естерифицирани или деестерифицирани пектини (R70, B71, CR52). Серията (R70, R52, R32) характеризираща се със случайно разпределение на естерните групи е получена след осапунване на естерифициран пектин (M93). Количеството на освободените неестерифицирани олигомери било значително по-малко (1.0, 3.7, 16.6%) (Daas *et al.*, 1999). Намерената тук DB_{abs} стойност е в съгласие с установеното от Ngouémazong *et al.* (2011), че при цитрусови пектини със $CE \geq 70\%$ се наблюдават много ниски DB и DB_{abs} . Напр. за пектин F71 (F-серия) DB_{abs} е 7.8%, а за този със $CE 75.5 \pm 0.2\%$ от алкалноосапунената C-серия $DB_{abs} = 0.26$.

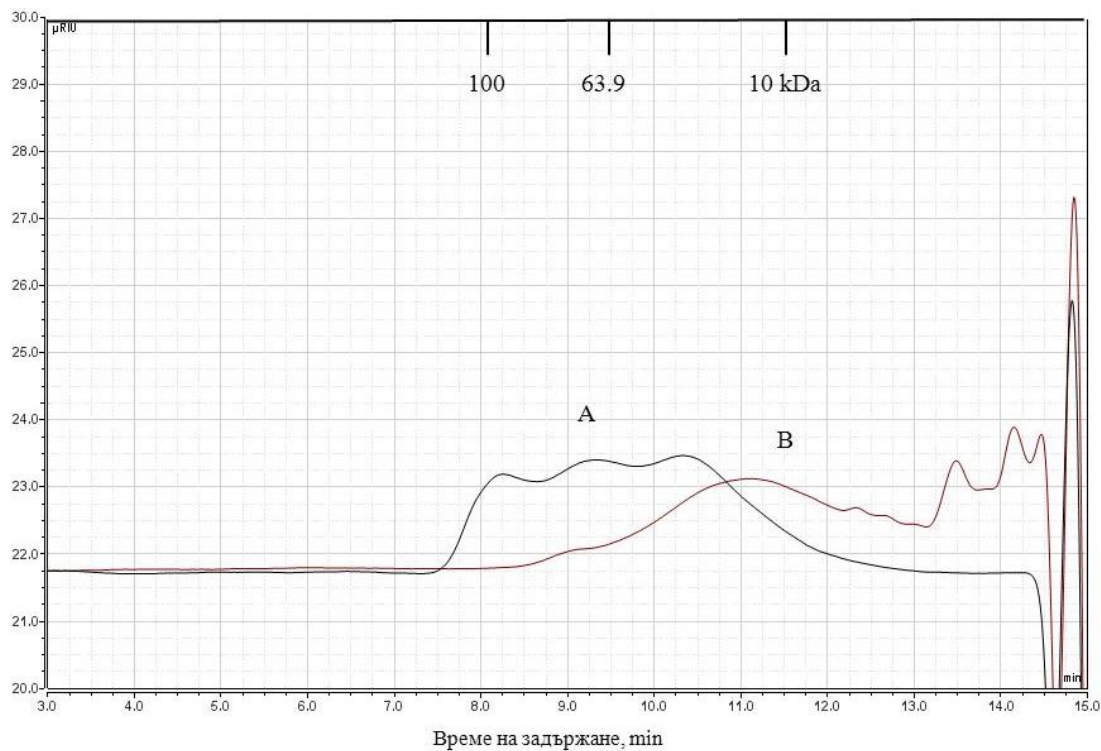
4.4.2 Мулти-ензимен фингърпринтинг анализ на КЕППр АНЧ

4.4.2.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

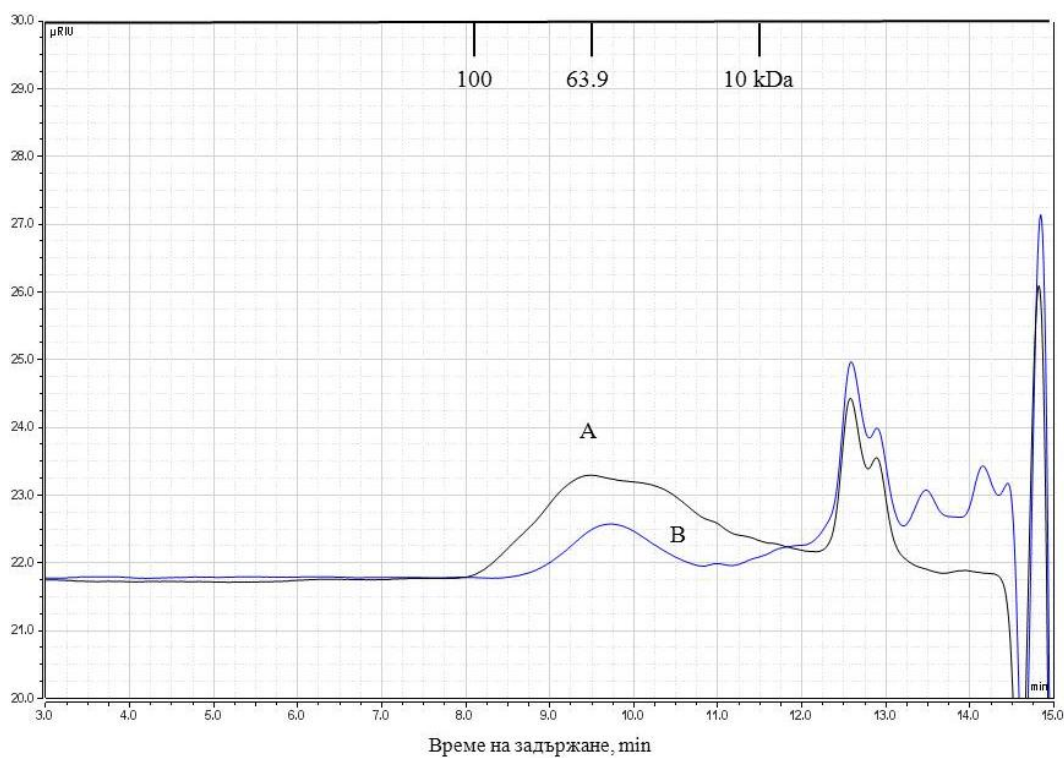
За изследване разпределението по мол. маси преди и след ензимния фингърпринтинг пробите са анализирани чрез HPSEC хроматография. На **фиг. 24** и **25** са представени елуционните профили на изходните проби (**A**) и на получените от тях ензимни хидролизати (**B**). Изходният ПЗ е с по-висока мол. маса (~ 100 kDa) и се елуира напълно < 12.0 min. Значителна разлика в разпределението по мол. маса се наблюдава след действието на двата ензима (**фиг. 24B**). От фигурата се вижда изместване на пика към по-нискомолекулните фракции (≤ 3 kDa) и олигомери (≤ 1 kDa), които се отмиват > 12.0 min. Може да се отбележи, че 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 (~ 64-20 kDa; 9-11 min). Това би следвало да са силно „резистентни“ на комбинираното ензимно действие „космати“ региони.

Особено интересни са измененията в разпределението по мол. маса, които се наблюдават след ензимния фингърпринтинг на алкохолно-утаимата част, получена след действие с *endo*-ПГ-I (фиг. 25А и В). Както се вижда неразградените високомолекулни (~100 – 30 kDa) фрагменти (РГ-I с НЗ, а също така и ХГ) претърпяват хидролиз, който води до натрупването на моно- и олигомери ($\leq 1-5$ kDa) елуирани 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! За сметка на това се забелязва, че 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. 24В и 25В). Очевидно и в този случай, 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; ~64 kDa) (фиг. 25В). Наблюдаването е в подкрепа на изказаните по-преди твърдения за доминиращо присъствие на РГ-I региони в КЕППр АНЧ с прикрепен към него силно омержен АГ-II (фиг. 5). За отбелязване е, че 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 могат да бъдат 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 24. HPSEC елуционен профил на КЕППр АНЧ преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

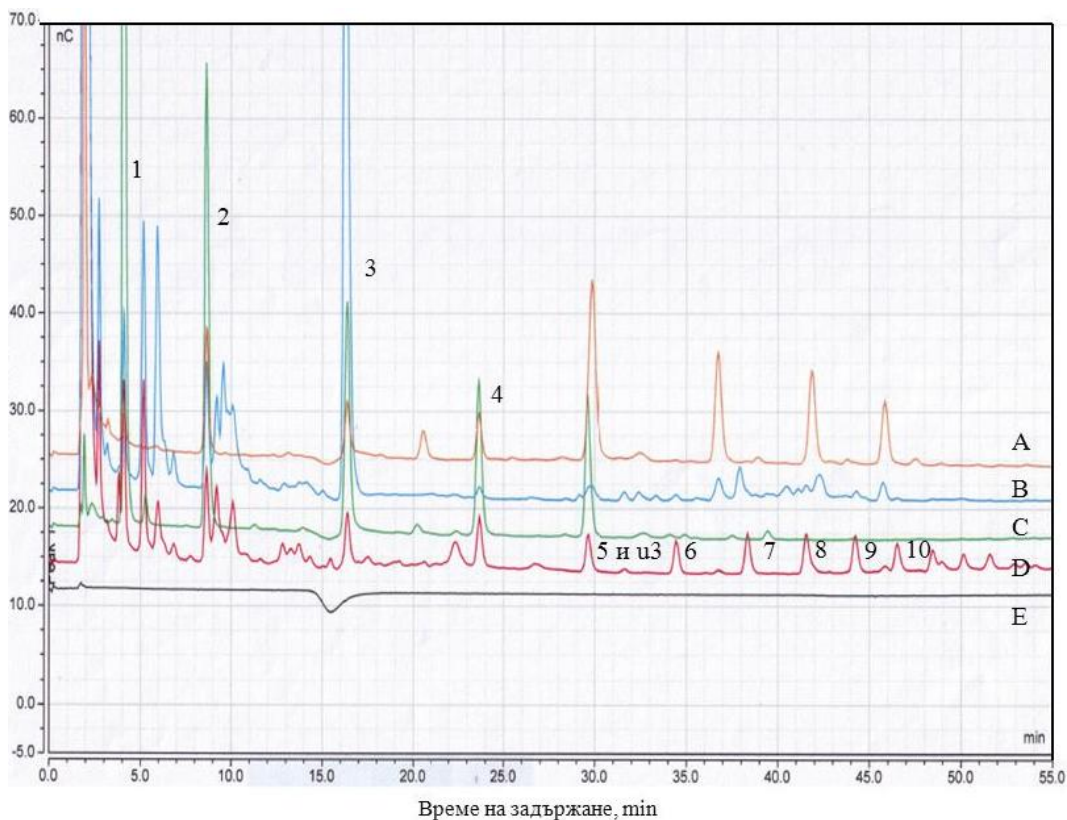


Фигура 25. HPSEC елуционен профил на алкохолно-угаимите продукти на КЕППр АНЧ след действието на *endo*-ПГ-I преди (А) и след (В) действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

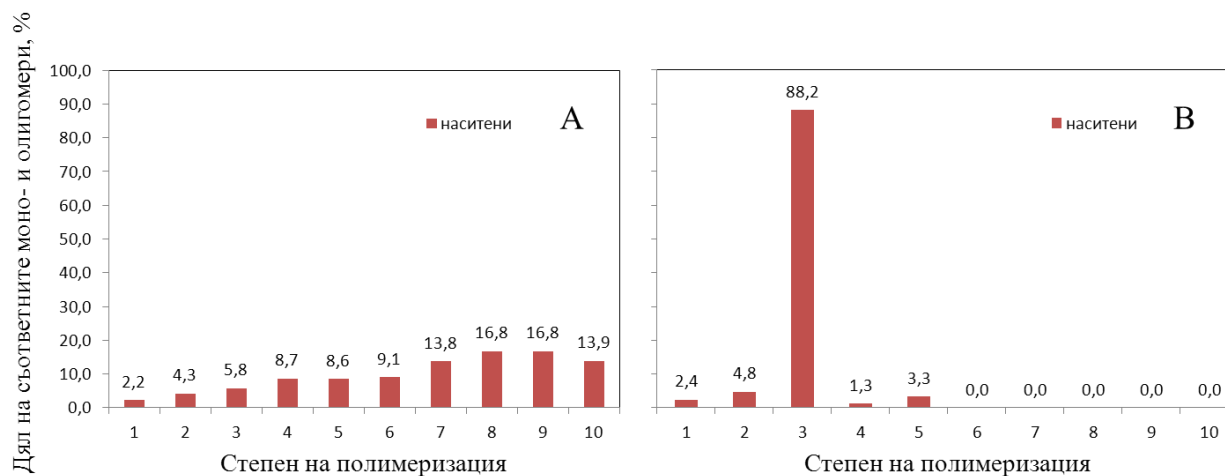
4.4.2.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

По аналогия с вече разгледания случай с проба КЕПП АНЧ и тук 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 РАД детекция. На **фиг. 26** е представен елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените и ненаситените олигомери. От хроматограмата (**фиг. 26D**) 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. 27A** 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. 27A**), 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!

Елуционният профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I може да се види на **фиг. 26B**. 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. 27B**).



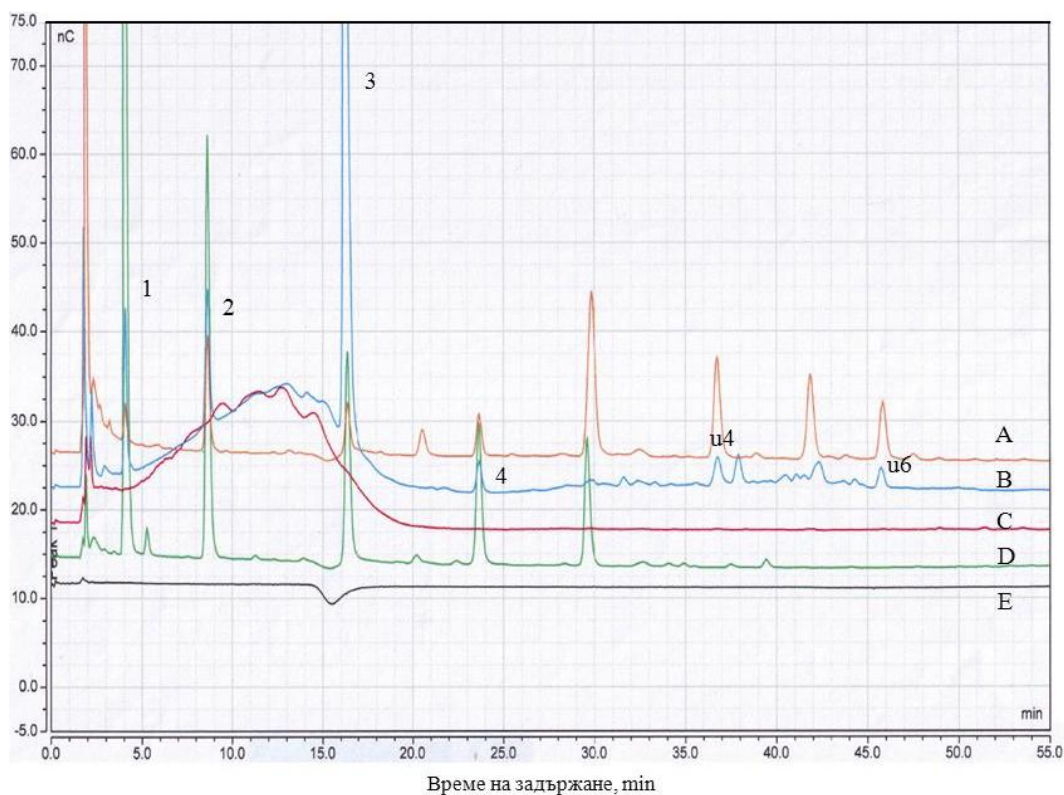
Фигура 26. HPLC-SEC елуционен профил на КЕППр АНЧ (D) и алкохолно-утаимата му част (B), след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими. Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (C); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (A); вода (E).



Фигура 27. 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-утаима 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. Задълбоченият преглед на **фиг. 28** потвърждава наблюденията и преди за алкохолно-утаимата част на КЕПП АНЧ факт, че моно- и олигомери (СП 1-3) не са напълно отстранени от алкохолно-утаимата част и те присъстват изначално в пробата (**фиг. 28В**). 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 сътуаени (моно)олигогалактурониди (СП 1-3) (вж. т. 4.3.1.2). Около 21% от УК би следвало да изграждат нехидролизиран ХГ (30.4 mol%), редукцията на който е 32%, а не предварително изчислените 10%.

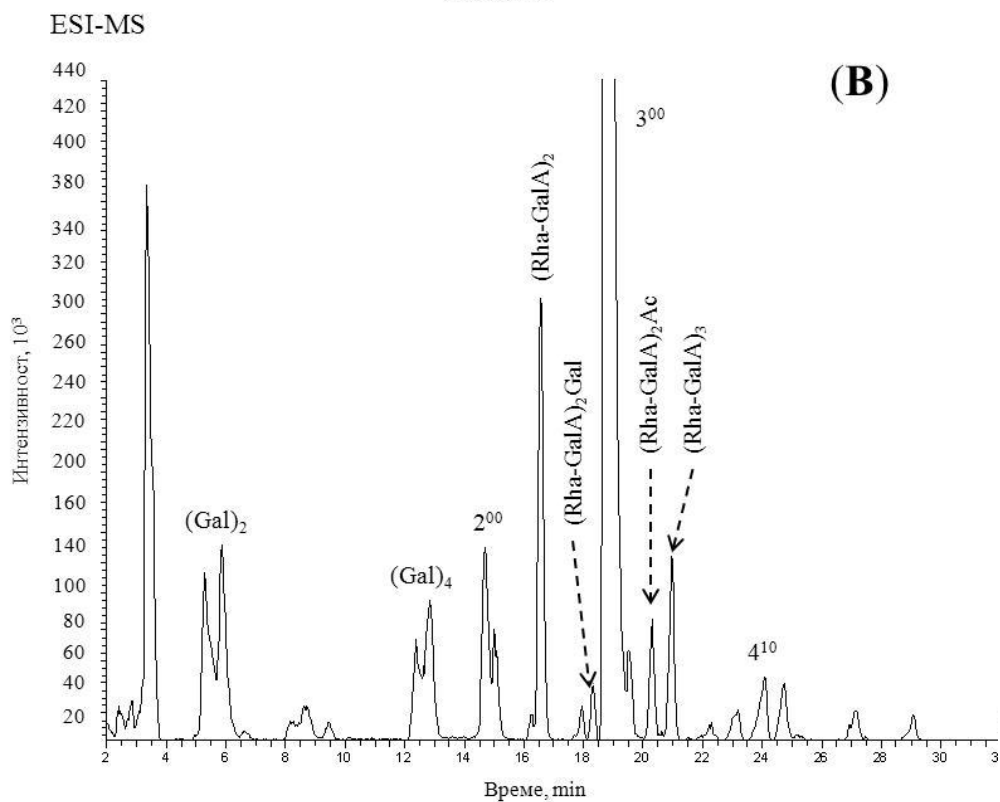
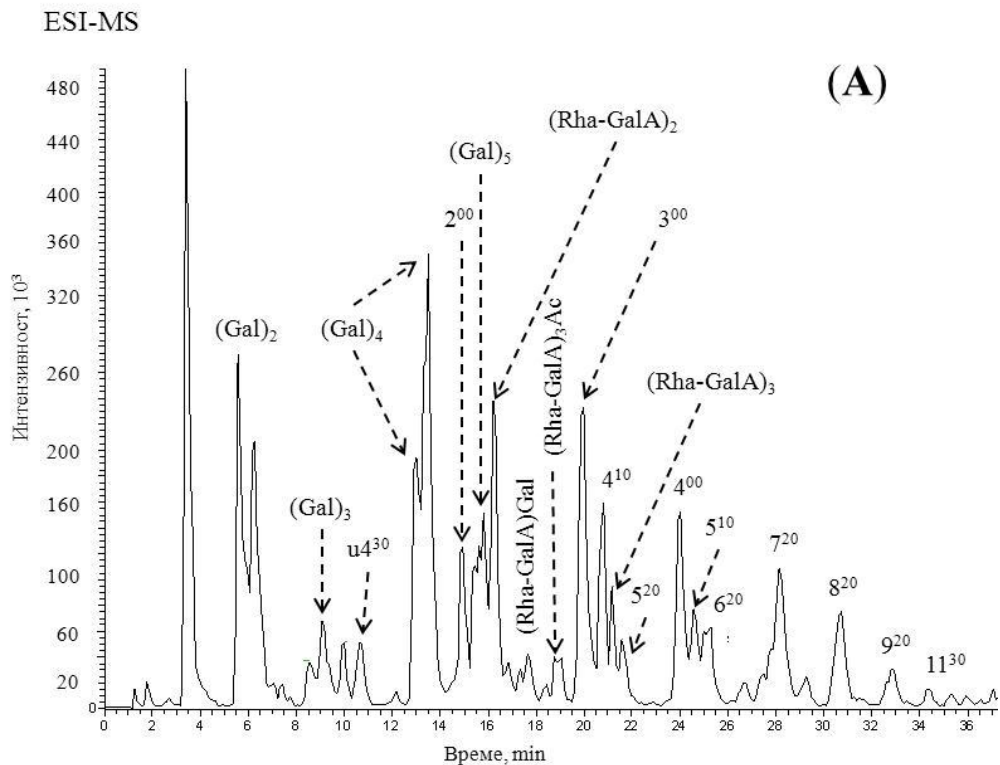


Фигура 28. НРАЕС-РАD елуционен профил на немодифицирани контролни проби на изходен КЕППр АНЧ (С) и алкохолно-утаимата му част, получена след действието на *endo*-ПГ-I (В). Стандарти наситени олигогалактурониди със СП 1-5 (D); Стандарти ненаситени олигогалактурониди със СП 2-6 (А); вода (Е).

Разделянето и идентифицирането на частично естерифицирани олигоурони е извършено чрез HPLC, като на **фиг. 29** са представени съответните елуционни профили на хидролизатите. Допълнително данните за m/z стойностите, RT, концентрацията и структурата на идентифицираните олигозахариди са обобщени и оформени в **табл. 30**. От хроматограмата (**фиг. 29А**) се вижда голямото разнообразие от наситени Me-естерифицирани и неестерифицирани олигомери, които се натрупват в хидролизната смес на изходния неосапунен субстрат (КЕППр АНЧ). 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}). Особено впечатление прави присъствието, макар и в много малки количества, на ненаситен Me-естерифициран тетрамер, носещ 3 Me-групи ($u4^{30}$). За него могат да се предложат две структури: **$uGalA_{Me}-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Me}$** и **$uGalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA$** (**табл. 30**). Това показва, че пектиновият ХГ от праз съдържа не само незаместени области, но също така и къси Me-естерифицирани GalA-последователности. Освобождането на такъв вид олигомер е в резултат на ПЛ действие и наличието му не следва да е изненада предвид по-малкото ХГ (и по-къси вериги) съдържание съчетано със сравнително високата СЕ (65%) за тази проба. 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 неацетилизирани 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 КЕПП АНЧ ундекамер с 3 Me-естерни групи (11^{30}) присъства и в този от КЕППр АНЧ. Въз основа на предложените за тези олигомери структури (**табл. 30**) може да се допълни, че разпределението на Me групи в тях е случайно.

По-нататъшният преглед показва, че в хидролизната смес присъстват и разнообразни олигомери, като **$(Rha-GalA)_2$** , **$(Rha-GalA)_3$** произхождащи от РГ-I сегментите. Те са намерени и в ензимния хидролизат на пектина от портокал. Наред с тях се натрупват и други заместени рамногалактуроници, като **$(Rha-GalA)_3Ac$** , **$(Rha-GalA)Gal$** , които не се откриват в хидролизата от КЕПП АНЧ. За отбелязване е, че при пектина от праз Ac групи са локализираны преимуществено в РГ-областта, а не в ХГ, т.к. не се откриват ацетилизирани олигогалактуроници. 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 – Gal₂, Gal₃, Gal₄, Gal₅, но не и арабиноолигозахариди! Липсата на последните се обяснява с изключително малките количества на Ага детектирани в тази проба (само 0.9 mol%, **табл. 10** и **11**). 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.



Фигура 29. HILIC-ESI-IT-MSn елуционен профил на ензимни хидролизати на КЕППр АНЧ (A) и алкохол-утаимата му част (КЕППр АНЧ *endo*-ПГ-I) (B), получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими. **Анотация на пикове:** 3⁰⁰, СП 3; 0-Ме-естер; 0-Ас група; u-ненаситен GalA остатък.

По отношение на HILIC елуционния профил и разпределението на киселите олигомери на алкохолно-утаената част, получена след първата модификация с *endo*-ПГ-I (фиг. 29В) заслужава да отбележим доминиращото присъствие на неестерифицираните тримери (3^{00}), установено по-преди и чрез НРАЕС (фиг. 25 и 26). Освен тях се откриват и 2^{00} и 4^{10} . Анализираният хидролизат не съдържа галактурониди със СП по-висока от 5. Произходът им е свързан с хидролиз на недоразграден ХГ. Наред с това, прави впечатление и наличието на РГ олигомери – $(\text{Rha-GalA})_2\text{Ac}$ и $(\text{Rha-GalA})_2\text{Gal}$, 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_2 в много малки количества, тук се откриват както галактодимери, така също и Gal_3 , Gal_4 , но не и Gal_5 (фиг. 29В). Това дава основание да се приеме, че чрез алкохолно утаяване се изолират основно РГ-I сегменти декорирани със странични вериги от β -(1 \rightarrow 4)-хомогалактан.

Таблица 30. Време на задържане (min), m/z стойност, концентрация и предполагаема структура на олигомери присъстващи в ензимни хидролизати на някои от изследваните ПЗ фракции.

RT, min	m/z стойност	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$	Структура	
КЕППр АНЧ				
5.65	387.2		$(\text{Gal})_2$	Gal-Gal
9.07	549.2		$(\text{Gal})_3$	Gal-Gal-Gal
10.70	745.2	0.5	$u4^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}$
13.4	711.3		$(\text{Gal})_4$	Gal-Gal-Gal-Gal
14.90	369.1	12.00	2^{00}	GalA-GalA
15.60	873.4		$(\text{Gal})_5$	Gal-Gal-Gal-Gal-Gal
16.21	657.1		$(\text{Rha-GalA})_2$	Rha-GalA-Rha-GalA
17.58	511.1		$(\text{Rha-GalA})\text{Gal}$	$\text{Rha}_{\text{Gal}}\text{-GalA}$
18.80	1007.2		$(\text{Rha-GalA})_3\text{Ac}$	$\text{Rha-GalA}_{\text{Ac}}\text{-Rha-GalA-Rha-GalA}$ $\text{Rha-GalA-Rha-GalA}_{\text{Ac}}\text{-Rha-GalA}$
19.89	545.1	20.00	3^{00}	GalA-GalA-GalA
20.72	735.2		4^{10}	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
21.34	965.2		$(\text{Rha-GalA})_3$	Rha-GalA-Rha-GalA-Rha-GalA
21.76	925.3	25.00	5^{20}	GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA

RT, min	m/z стойност	Концентрация, µg/mL		Структура
				GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA
24.03	721.1		4 ⁰⁰	GalA-GalA-GalA-GalA
24.03	911.2	101.05	5 ¹⁰	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
25.33	1101.2	98.07	6 ²⁰	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA
28.22	1277.3	50.00	7 ²⁰	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA
30.63	1453.3	56.00	8 ²⁰	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA- GalA
32.82	1629.3	75.15	9 ²⁰	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA- GalA-GalA GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA- GalA-GalA
34.37	1995.4	24.04	11 ³⁰	GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA- GalA _{Me} -GalA-GalA-GalA-GalA GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA- GalA _{Me} -GalA-GalA-GalA GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA-GalA _{Me} - GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA

Стойностите на параметрите (вж. т. 1.4.1), допълнително характеризиращи естеството на анализиранияте проби (КЕППр АНЧ и КЕППр АНЧ *endo*-ПГ-I), са изложени в **табл. 31**. DB_{abs} е само 1 mol% от УК на изходния КЕППр АНЧ, което показва, че дялът на освобождаваните под формата на 1⁰⁰, 2⁰⁰, 3⁰⁰ е изключително малък. За сравнение същият параметър при портокаловия пектин има стойност 6 mol%, което показва, че броя 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. Това не е изненадващо след като пектинът е високоестерифициран (65%), а уроновото съдържание е по-малко (42.6 mol%) от това в изследваната портокалова пектинова фракция (67.1 mol%), характеризираща се също с висока, но съпоставима СЕ (71%). 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_{abs} << CX_{ПГ}

(Remoroza *et al.*, 2014b). Освен това преобладаващото съдържание (79%) на детектируеми Ме-естерифицирани олигомери (5, 6, ... 11) в ензимния хидролизат показва, че съществуват области от пектиновия ХГ, където тези блокове са разположени (кльстерно, по групи) много близо едни до други (през ~5-11 GalA звена). От **табл. 31** 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 $CX_{ПГMe}$ е видно, че по-голямата част (11 mol%) от тях са частично Ме-естерифицирани, но ензимът *endo*-ПГ все още може да ги хидролизира. 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 (30.1%) от УК на пробата, които изграждат ХГ, остават нехидролизирани! Тези области са със специфично Ме- и Ас-естерно разпределение, което осигурява резистентност към *endo*-ПГ и ПЛ ензими ($DB_{abs} = CX_{ПГ} = CX_{ПЛ} = 0$). Би следвало тези последователности да са също със случайно разпределение на естерните връзки, т.к. не се детектира излишък на неестерифицирани олигомери. Структурата на тези резистентни фрагменти би могла да се изучи допълнително чрез двустъпковия мулти-ензимен фингърпринтинг (Remoroza *et al.* 2014b). Получената информация позволява да се приеме, че разпределението на Ме-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.

Таблица 31. 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 Ме-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.

Делът 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. 31). 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. Това означава, че единствените освободени в средата олигомери от *endo*-ПГ са наситени и неестерифицирани (2^{00} и 3^{00}), което се и вижда от **фиг. 27В** и **29В**. Логично в хидролизата не се детектират ненаситени олигомери, т.к. пробата е осапунена и липсват дълги последователности от Me-естерифицирани GalA остатъци. Такава тенденция е наблюдавана и от други автори (Ralet *et al.*, 2012; Remoroza *et al.*, 2014a). Според тях субстрати с ниска СЕ са изключително податливи на действието на *endo*-ПГ и трябва да се характеризират с високи стойности на показателите DB_{abs} и $CX_{ПГ}$. Обяснение за наблюдаваното може да намерим във факта, че предварително тази проба е претърпяла модификация и голяма част от освободените олигомери, които иначе биха „участвали“ в изчислението на тези параметри, са отстранени от хидролизната смес чрез алкохолна преципитация.

Необходимо е да се отбележи и наблюдаваната липса на ненаситени олигомери отчетена и за двете проби чрез $CX_{ПЛ} = 0$. За сравнение в своите изследвания върху Me-естерното разпределение на цвекловия пектин Remoroza *et al.* (2014a, 2014b) получават нулеви стойности за $CX_{ПЛ}$ само когато изходният пектин (SBP6230) е хидролизиран с плесенна ПМЕ, за която е известно, че премахва естерните групи на случаен принцип, а не блоково! Напр. пробата F5129 се характеризира със следните параметри: $DB_{abs} = 16$, $CX_{ПГ} = 38$, $CX_{ПЛ} = 0$. Това показва, че вида на Me-естерното разпределение в пектиновия ХГ на тази проба е случайно. Ниски стойности в диапазона 1-3 mol% те получават за проби (F4429, P4628, B5326 и B3124) с ниска СЕ, която е постигната или чрез действие на плесенна ПМЕ, или чрез осапунване (Remoroza *et al.*, 2014a). Limberg *et al.* (2000a) също са дискутирали въпроса за влиянието на СЕ на пектин от мексикански лайм върху ПЛ активност. Авторите установяват, че ензимът е най-активен върху субстрат с висока СЕ 81% (E81), а деестерификацията му води до драстичен спад в активността. Едновременно с

това те отбелязват, че плесенната ПМЕ „разрушава“ по-ефективно онези области от субстрата (F43), където ПЛ може да действа ефективно. Въз основа на резултатите на Limberg *et al.* може да се направи заключението, че субстрати, в които Ме-естерните групи са разпределени случайно не са податливи на ПЛ действие.

За съжаление липсват данни в достъпната литература, с които биха могли да се съпоставят обсъдените по-горе резултати за КЕППр АНЧ. До момента мулти-ензимният фингърпринтинг анализ не е прилаган за изучаване структурата на ПЗ, изолирани от праз и представените тук резултати представляват особен принос към изучаване структурата на тези ПЗ.

4.5 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.

4.5.1 Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ шипка (лк)

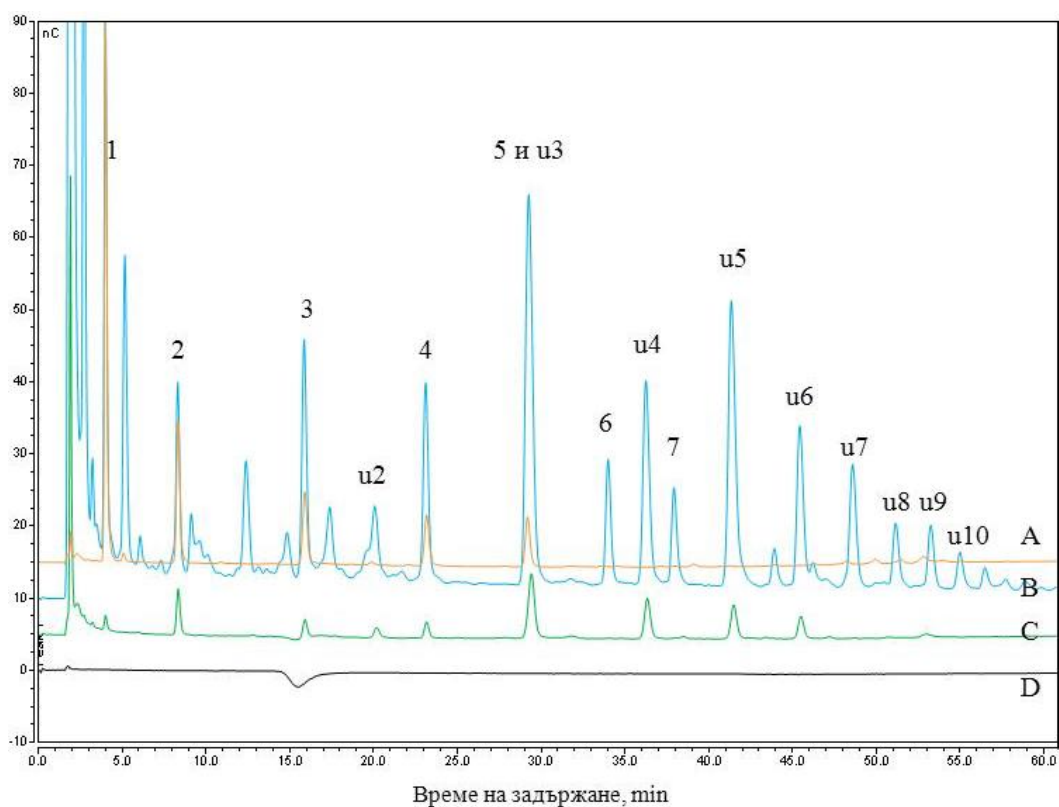
4.5.1.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

За изследване разпределението по мол. маса преди и след ензимния фингърпринтинг пробата е анализирана чрез HPSEC хроматография. Мол. маса на изходния субстрат вече беше обсъдена и представена на **фиг. 9** към т. 4.2.2. На същата фигура може да бъде видян и елуционният профил на получения ензимен хидролизат (**В**). От фигурата се вижда, че след действието на ензимите широкият пик на изходния субстрат се измества към понискомолекулните фракции (≤ 3 kDa) и олигомери, които се отмиват > 11.0 min. С това се показва, че високомолекулният 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 (**фиг. 17В**).

4.5.1.2 Сепариране и идентификация на олигомерите

Идентифицирането и количественото определяне на наситените и ненаситени олигогалактурониди (вкл. СП), генерирани в резултат на комбинираното ПГ и ПЛ

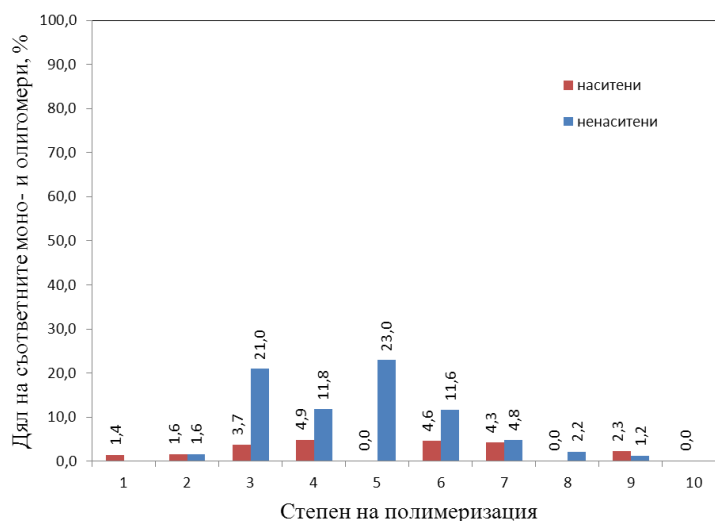
действие, се извършва чрез НРАЕС с РАD детекция. На **фиг. 30** е представен елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените и ненаситените олигомери. От хроматограмата (**фиг. 30В**) се вижда, че за разлика от предходните две проби (КЕПП и 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). Дялът, който заема всеки един от тях спрямо всички освободени олигозахариди е посочен на **фиг. 31**.



Фигура 30. НРАЕС-РАD елуционен профил на ПЗ шипка (лк) (**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**).

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. 31**), 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. 30** 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. 31**). 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!

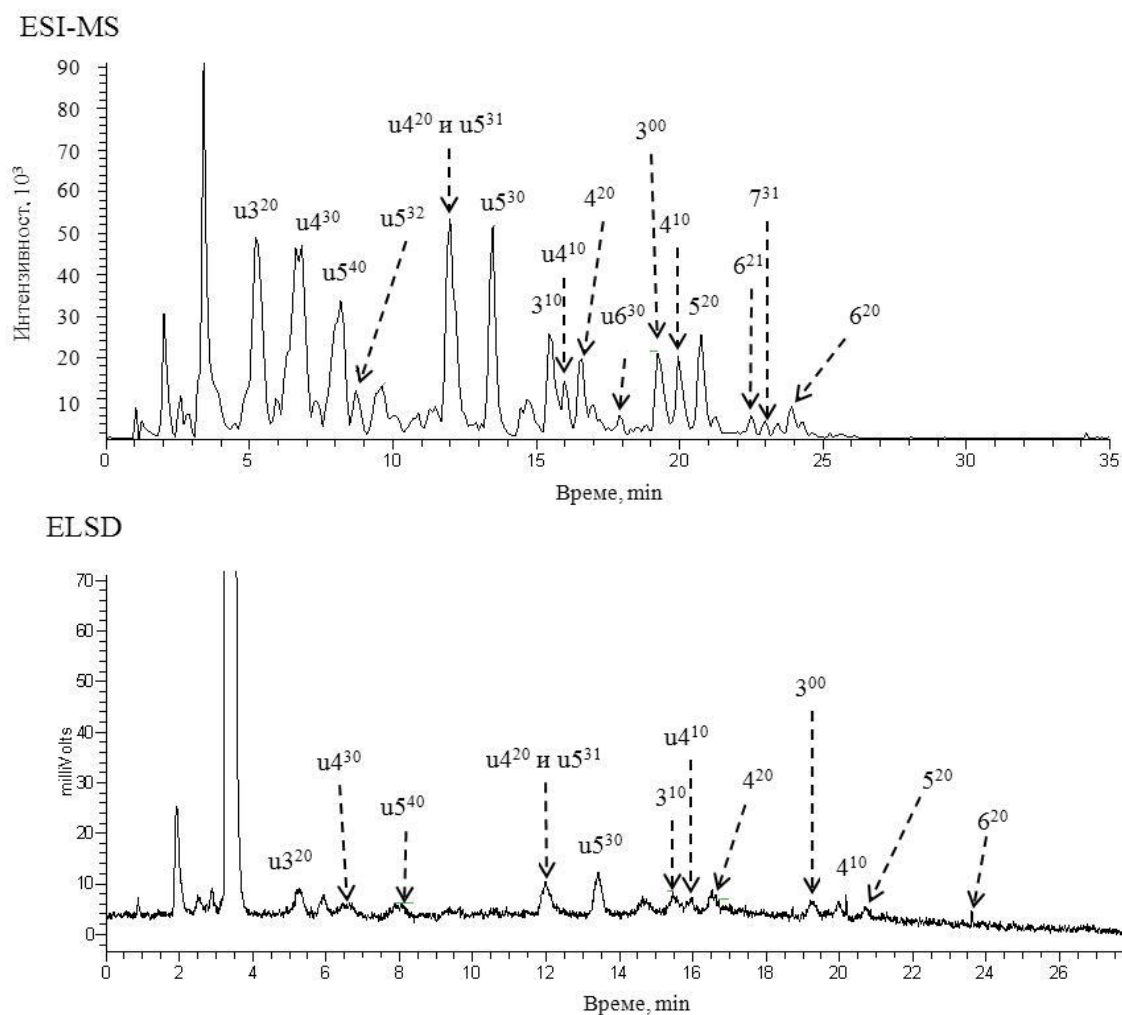


Фигура 31. Степен на полимеризация и дял (%) на съответните моно- и олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащи ензими върху изходен ПЗ шипка (лк).

Характеристиката на олигоуронидите е извършена чрез HILIC анализ, като на **фиг. 32** са представени съответните ESI-MS и ELSD елуционни профили на хидролизата. Данните за m/z стойностите, RT, концентрацията и структурата на идентифицираните олигозахариди са обобщени и оформени в **табл. 32**. От хроматограмата (**фиг. 32**) се вижда голямото разнообразие от наситени и ненаситени Me-естерифицирани и неестерифицирани олигомери, които се натрупват в хидролизната смес на изходния неосапунен субстрат (ПЗ шипка (лк)). Техният произход е свързан с разграждането на ХГ

от *endo*-ПГ-II и ПЛ. Единствено ди- и тримерите не са Ме-естерифицирани (2^{00} , 3^{00}). Прави впечатление и липсата на неестерифицирани тетрамери (4^{00}), за разлика от предходните две проби. Олигомери със СП 3, носещи 1 Ме-естерна група също се откриват (**GalA-GalA_{Me}-GalA**). Съотношението между двата вида тримери е 1:1.1 (3^{00} : 3^{10}). Присъствието на частично естерифицирани съответно с 1, 2 и 3 Ме-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_{Me}-GalA-GalA_{Me}-GalA** или **GalA-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA-GalA**. Противно на намерения в КЕПП АНЧ не- Ме-естерифициран тример, носещ Ас група (3^{01}), в хидролизната смес на ПЗ шипка (лк) се откриват няколко наситени олигомера, които са едновременно *O*-ацетилirани и Ме-естерифицирани (6^{21} , 7^{31}). Това показва, че 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 Ас-групи в субстрата. Очевидно този пектин е сред редките изключения, както смятат [Ralet et al. \(2005\)](#), в които се срещат едновременно *O*-ацетилirани и Ме-естерифицирани ХГ сегменти. Такива двойно естерифицирани наситени олигомери са намерени в немалки количества и в цвекловия пектин ([Remoroza et al., 2014b](#)). Прецизната анотация на хексамера 6^{21} води до представяне на следната структура за него: **GalA-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Ac}-GalA_{Me}-GalA** или **GalA-GalA-GalA_{Ac}-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA**. За отбелязване е, че Ас-група в тези олигомери е винаги позиционирана до Ме-GalA звено, което е в съгласие с резултатите на [Remoroza et al. \(2012\)](#) за пектина от захарно цвекло. 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 Ме-естера ($u3^{20}$, $u4^{30}$, $u5^{40}$). Сред продуктите с най-голямо структурно разнообразие се открояват ненаситените пентамери. Напр. извършването на структурно 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*-ацетилirани и Ме-естерифицирани - $uGalA_{Me}-GalA_{Ac}-GalA_{MeAc}-GalA-GalA_{Me}$ или $uGalA_{Me}-GalA-GalA_{MeAc}-GalA_{MeAc}-GalA$! Наблюдаването е в съгласие с намереното по-преди от [Remoroza et al. \(2014b\)](#). Интересен

факт е липсата на напълно Me-естерифицирани GalA олигозахариди сред анализиранияте продукти. В подкрепа на това се явяват и резултатите на Ralet *et al.* (2012), които също намират високоестерифицирани ненаситени олигомери със СП 3-7 след ПЛ фингърпринтинг на деестерифициран с растителна ПМЕ цитрусов пектин (СЕ 64%).



Фигура 32. HILIC-ELSD/ESI-IT-MSⁿ елуционен профил на ензимен хидролизат на ПЗ шипка (лк), получен след действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПГ-II. **Анотация на пиковите:** 6²¹, СП 6; 2-Me-естер; 1-Ас група; u-ненаситен GalA остатък.

Таблица 32. Време на задържане (min), m/z стойност, концентрация и предполагаема структура на олигомери присъстващи в ензимни хидролизати на някои от изследваните ПЗ фракции.

RT, min	m/z стойност	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$		Структура
ПЗ шипка (лк)				
5.20	555.2	220.05	$u3^{20}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$
6.82	745.3		$u4^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
8.18	935.3		$u5^{40}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}$
9.5	1007.3		$u5^{32}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Ac}}-\text{GalA}_{\text{MeAc}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{MeAc}}-\text{GalA}_{\text{MeAc}}-\text{GalA}$
11.99	963.3	262.74	$u5^{31}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Ac}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{MeAc}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
13.48	921.2	281.33	$u5^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
15.45	559.2	176.84	3^{10}	$\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
15.90	717.1	144.05	$u4^{10}$	$u\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
16.60	749.3	174.84	4^{20}	$\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
17.89	1097.2		$u6^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}$
19.24	545.2	154.58	3^{00}	$\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}$
20.10	735.0		4^{10}	$\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
20.76	925.2		5^{20}	$\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$ $\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}$
21.27	1115.2		6^{30}	$\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}$ $\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}$
22.49	1143.3		6^{21}	$\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Ac}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$ $\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Ac}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
22.97	1333.3		7^{31}	$\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Ac}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$
23.92	1101.2		6^{20}	$\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}$ $\text{GalA}-\text{GalA}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}_{\text{Me}}-\text{GalA}-\text{GalA}$

Стойностите на параметрите, допълнително характеризиращи естеството на анализирания проба, са изложени в **табл. 33**. DB_{abs} е 9 mol% от УК на изходния ПЗ шипка

(лк), което показва, че дялът на освобождаваните под формата на 1⁰⁰, 2⁰⁰, 3⁰⁰ е малък. За сравнение същият параметър при портокаловия пектин и този от праз има по-малки стойности – съответно 6 mol% и 1 mol%. 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 една страна това е донякъде изненадващо след като пектинът е високоестерифициран (62%), но от друга – не, припомняйки си, че ПЗ е екстрахиран с лимонена киселина, способна да освобождава нековалентно свързания пектин, задържан от Ca²⁺ йонни мостове. Според Ralet & Thibault (2002) и Ralet et al. (2012) минималната дължина на деметилирания GalA блок способен да образува зона на свързване между два ХГ чрез Ca²⁺ мостове е между 8-15, което напълно съответства на установената тук. От табл. 33 е видно още, че 15 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПГ-разградими и се възстановяват 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 (DB_{abs} = CX_{ПГ} = CX_{ПЛ} = 0). Би следвало тези последователности да са със случайно разпределение на естерните връзки.

Таблица 33. Съдържание (µg/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
	µg/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} << CX_{ПЛ}. Освободеното количество ненаситени олигомери е ~ 6 пъти по-голямо от това на наситените. Като резултат от съвместното действие на ензимите се възстановяват 104% от УК изначално присъстващи в пробата (табл. 33). 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. Подобни високи стойности на $CX_{ПЛ}$ не са наблюдавани от други автори, но [Remoroza et al. \(2014a\)](#) отбелязват, че $CX_{ПГ} < CX_{ПЛ}$, когато субстратът е високоестерифициран. Напр. за проба E7329 намират $CX_{ПЛ} = 22 \text{ mol\%}$, а за изходния цвеклов пектин (SBP6230) посочват $CX_{ПЛ} = 17 \text{ mol\%}$. [Limberg et al. \(2000a\)](#) също коментират, че ПЛ е най-активна при субстрат с висока СЕ. Получените резултати дават възможност да се разсъждава и върху вида на разпределение на Ас-групи. Тъй като те са локализирани преимуществено в Местерифицираните области може да се приеме, че разпределението на Ас-естерните групи по протежението на ХГ в пектиновата макромолекула на ПЗ шипка (лк) няма случаен характер, а по-скоро те са блоково разпределени! Получените резултати подкрепят твърдението на [Ralet, Crépeau, & Bonnin \(2008\)](#) и [Remoroza et al. \(2014b\)](#), които установяват също блоково разпределение на Ас-групи в цвекловия пектин.

Липсват данни в достъпната литература, с които биха могли да се съпоставят обсъдените по-горе резултати за ПЗ шипка (лк). Към настоящия момент ензимният фингърпринтинг анализ не е прилаган за изучаване структурата на ПЗ изолирани от шипкови плодове и представените тук резултати представляват особен принос към изучаване структурата на тези ПЗ.

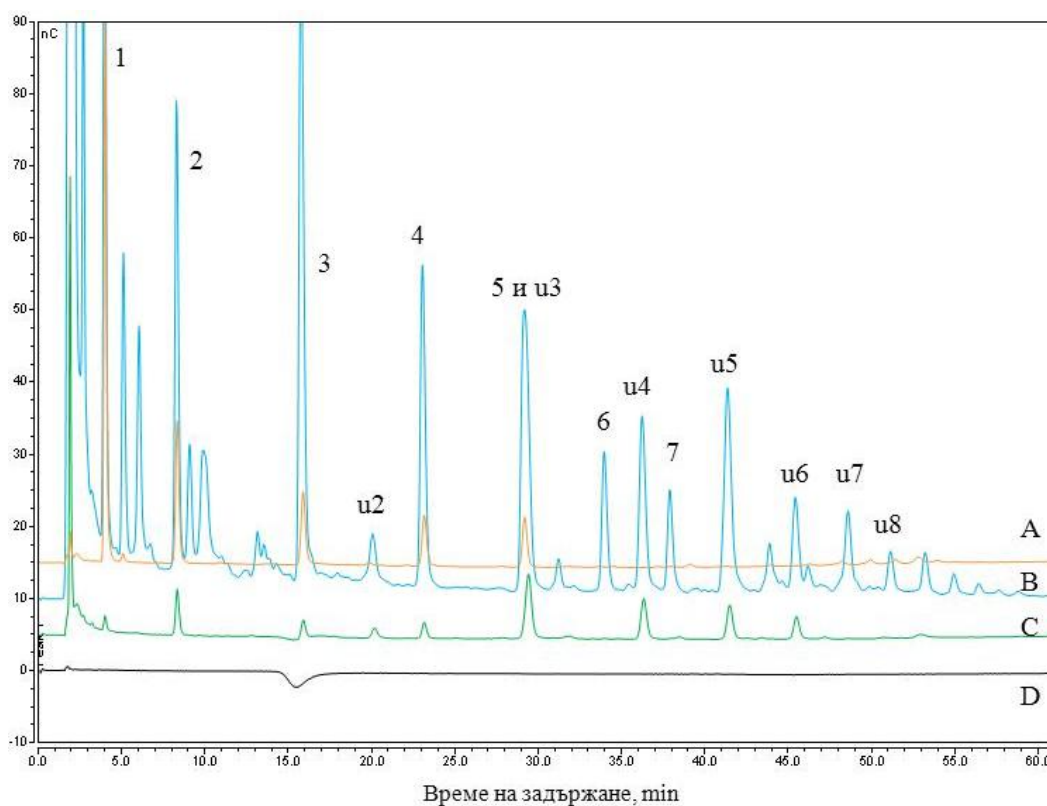
4.5.2 Ензимен фингърпринтинг анализ на ПЗ мурсалски чай

4.5.2.1 Разпределение по молекулна маса на хидролизните продукти

За изследване разпределението по мол. маса преди и след ензимния фингърпринтинг пробата е анализирана чрез HPSEC хроматография. Мол. маса на изходния субстрат вече беше обсъдена и представена на **фиг. 10** към т. 4.2.2. На същата фигура може да бъде видян и елуционният профил на получения ензимен хидролизат (**B**). От нея се вижда, че след действието на ензимите първоначално присъстващият пик в областта на високите мол. маси ($>100 \text{ kDa}$) на изходния субстрат не се запазва, а вместо това се забелязва изместване към по-нискомолекулулните фракции ($\leq 3 \text{ kDa}$) и олигомери, които се отмиват $>$

11.5 min. С това се демонстрира, че високомолекулярният 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 (~55-7 kDa) под формата на широк пик (9.3-11.3 min). Този факт е особено интересен, т.к. фракциите ПЗ шипка (лк) и ПЗ мурсалски чай имат сходни захарни съотношения и пропорции между основните пектинови структурни фрагменти (~70 mol% ХГ)! От това би следвало да има различия в СХ на двата субстрата. 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**).

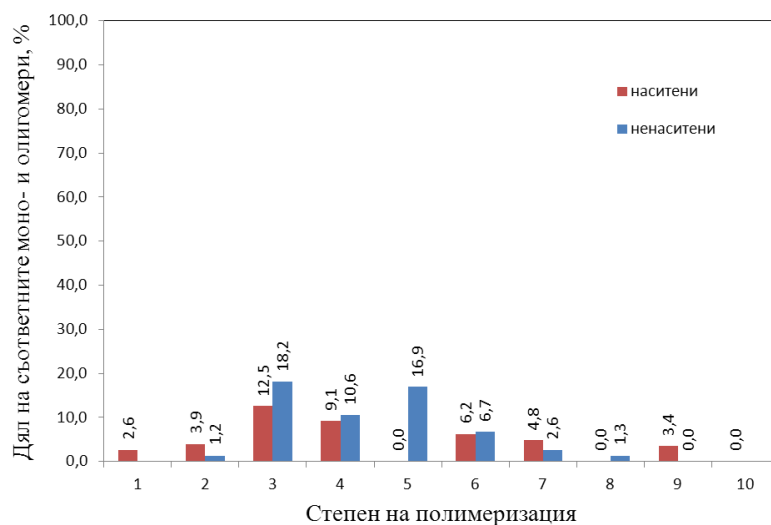
4.5.2.2 Сепариране и идентификация на олигомерите



Фигура 33. НРАЕС-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**).

Количественото определяне и идентифициране на наситените и ненаситени олигогалактурониди (вкл. СП), генерирани в резултат на комбинираното действие на ХГ-

разграждащите ензими (*endo*-ПГ и ПЛ), е извършено чрез НРАЕС с РАD детекция. На **фиг. 33** е представен елуционният профил на пробата и разпределението на двата вида използвани стандарти, съответно за наситените (А) и ненаситените (С) олигомери. От хроматограмата (**фиг. 33В**) се вижда, че за разлика от първите две проби (КЕПП и КЕППр от АНЧ) 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). Дялът, който заема всеки един от тях спрямо всички освободени олигозахариди е посочен на **фиг. 34**. Сред наситените олигомери най-голям дял 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. 34**). 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 съществуващият превес на тримерите (3) сред останалите моно- и димери.

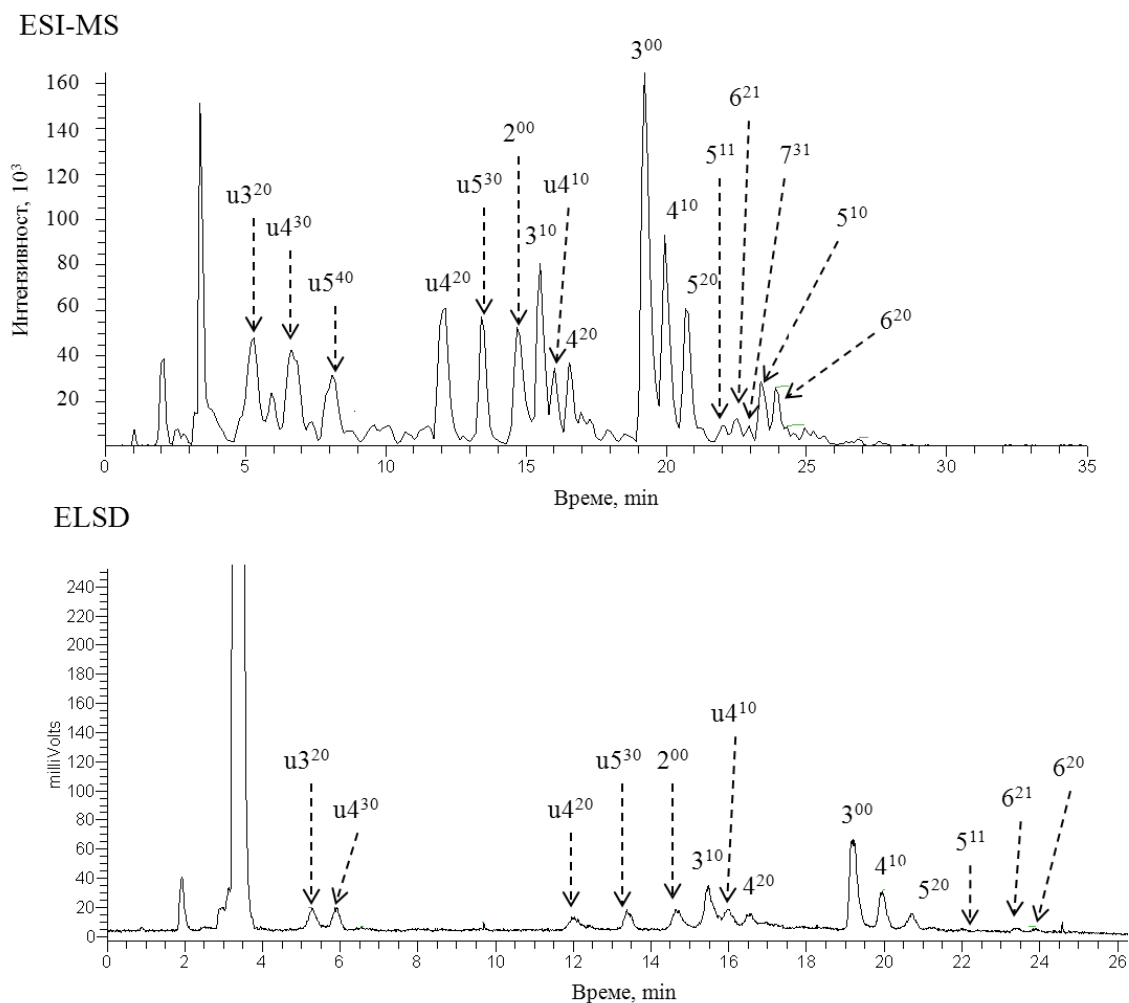


Фигура 34. Степен на полимеризация и дял (%) на съответните (моно)олигомери от общото количество освободени олигогалактурониди в резултат на действието с ХГ-разграждащи ензими върху изходен ПЗ от мурсалски чай.

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. 34** 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. 34**). Натрупването в големи количества на ненаситени олигогалактуроници е ясна индикация, че в ХГ сегменти на ПЗ мурсалски чай се съдържат големи блокове от Ме-естерифицирани GalA остатъци!

По-нататъшната характеристика на олигоуронидите е извършена чрез HILIC анализ, като на **фиг. 35** са представени съответните ESI-MS и ELSD елуционни профили на хидролизата. Данните за m/z стойностите, RT, концентрацията и структурата на идентифицираните олигозахариди са обобщени и оформени в **табл. 34**. От хроматограмата (**фиг. 35**) се вижда голямото разнообразие от наситени и ненаситени Ме-естерифицирани и неестерифицирани олигомери, които се натрупват в хидролизната смес на изходния неосапунен субстрат (ПЗ мурсалски чай). Произходът им е свързан с разграждането на ХГ региони от *endo*-ПГ-II и ПЛ-I. Ди- и тримерите са единствените не-Ме-естерифицирани 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 Ме групи (4^{10} и 4^{20}). Олигомери със СП 3 носещи 1 Ме-естерна група също се откриват (**GalA-GalA_{Me}-GalA**). Присъствието на частично естерифицирани съответно с 1, 2 и 3 Ме-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_{Me}-GalA_{Me}-GalA_{Ac}-GalA_{Me}-GalA**. Противно на намерения в КЕПП АНЧ не- Ме-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 Ме-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 Ас-групи в субстрата. Пектинът е сред редките изключения, както смятат Ralet *et al.* (2005), в които се срещат едновременно *O*-ацетилвани и Me-естерифицирани ХГ сегменти. Такива двойно естерифицирани наситени олигомери са намерени в немалки количества и в цвекловия пектин (Remoroza *et al.*, 2014b). Прецизната анотация на хексамера 6^{21} води до представяне на следната структура за него: **GalA-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Ac}-GalA_{Me}-GalA** или **GalA-GalA-GalA_{Ac}-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA**. За отбелязване е, че Ас-група в тези олигомери е винаги позиционирана до Me-GalA звено, което е в съгласие с резултатите на Remoroza *et al.* (2012) за пектина от захарно цвекло.



Фигура 35. HILIC-ELSD/ESI-IT-MS_n елуционен профил на ензимен хидролизат на ПЗ от мурсалски чай, получен след действието на ХГ-разграждащите пектолитични ензими ПЛ-I и *endo*-ПЛ-II. Анотация на пиковите: 6^{21} , СП 6; 2-Me-естер; 1-Ас група; u-ненаситен GalA остатък.

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.

Таблица 34. Време на задържане (min), m/z стойност, концентрация и предполагаема структура на олигомери присъстващи в ензимни хидролизати на някои от изследваните ПЗ фракции.

RT, min	m/z стойност	Концентрация, $\mu\text{g/mL}$		Структура
ПЗ мурсалски чай				
5.30	555.1	80.13	$u3^{20}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA-GalA}_{\text{Me}}$
6.64	745.2	79.00	$u4^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}$
8.24	935.2		$u5^{40}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}_{\text{Me}}$
12.12	731.1	87.50	$u4^{20}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}$
13.45	921.2	78.65	$u5^{30}$	$u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{GalAGalA}_{\text{Me}}\text{GalAGalA}_{\text{Me}}$ $u\text{GalA}_{\text{Me}}\text{GalAGalA}_{\text{Me}}\text{GalA}_{\text{Me}}\text{GalA}$
14.85	369.1	56.07	2^{00}	GalA-GalA
15.50	569.1	124.04	3^{10}	GalA-GalA _{Me} -GalA
16.17	717.1	71.45	$u4^{10}$	$u\text{GalA-GalA-GalA}_{\text{Me}}\text{-GalA}$
16.55	749.0		4^{20}	GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA
19.22	545.2	134.05	3^{00}	GalA-GalA-GalA
19.95	735.0		4^{10}	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
20.68	925.3	72.03	5^{20}	GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA
22.23	953.2	10.78	5^{11}	GalA-GalA-GalA _{MeAc} -GalA-GalA GalA-GalA-GalA _{Ac} -GalA _{Me} -GalA
22.63	1143.2	12.11	6^{21}	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Ac} -GalA _{Me} -GalA GalA-GalA-GalA _{Ac} -GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA
23.05	1333.3		7^{31}	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA _{Ac} -GalA _{Me} -GalA
23.36	455.1	33.23	5^{10}	GalA-GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA
	911.2			
24.06	550.1		6^{20}	GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA-GalA _{Me} -GalA
	1101.2			GalA-GalA-GalA _{Me} -GalA _{Me} -GalA-GalA

Напр. структурното изследване на $u4^{30}$ и $u5^{40}$ води до представяне на следните структури: **$uGalA_{Me}-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Me}$** или **$uGalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA$** и съответно **$uGalA_{Me}-GalA-GalA_{Me}-GalA_{Me}-GalA_{Me}$** . За разлика от ПЗ шипка (лж) при този субстрат не се среща случая, при който едно и/или две GalA звена са едновременно *O*-ацетилвани и Me-естерифицирани. Още по-интересен е фактът, че Ac-групи се съдържат само в области от ХГ, които се атакуват от *endo*-ППГ, но не и от ПЛ, т.е. такива с ниска СЕ. Наблюдаваното е в съгласие с намереното от [Remoroza et al. \(2014b\)](#).

Стойностите на параметрите, допълнително характеризиращи естеството на анализираната проба, са изложени в **табл. 35**. 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. За сравнение същият параметър при портокаловия пектин, от праз и шипка има доста по-малки стойности – съответно 6 mol%, 1 mol% и 9 mol%. 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%). Според [Daas, Voragen, & Schols \(2000\)](#) присъствието и средната големина на неестерифицирани блокове намалява с повишаване на СЕ. Напр. [Remoroza et al. \(2014b\)](#) установяват едни от най-високите DB_{abs} (19 и 29 mol%), когато на ензимен фингърпринтинг подлагат нискоестерифицирани субстрати (P3429, B3124). Неестерифицираните блокове са с по-голяма дължина спрямо останалите субстрати, т.к. $CX_{ПП}$ не е >> от DB_{abs} ([Remoroza et al., 2014b](#)). Нещо повече тези блокове са разположени по-скоро случайно, т.к. детектируемите Me-естерифицирани олигомери не преобладават в ензимния хидролизат. Намерената тук DB_{abs} стойност е съпоставима с изчислените от [Ngouémazong et al. \(2011\)](#) за цитрусови пектини от алкалноосапунената С-серия със СЕ 35.4% – 19.2%. От **табл. 35** е видно още, че 24 mol% от УК на изходния субстрат са *endo*-ПП-разградими ($CX_{ПП}$) и се възстановяват като наситени олигомери. В противовес на останалите проби стойността на показателя $CX_{ППMe}$ е много ниска (8 mol%) ($DB_{abs} > CX_{ППMe}$), с което се отчита, че много малка част от УК са частично Me-естерифицирани. Въпреки това ензимът *endo*-ППГ все още може да ги хидролизира под формата на наситени естерифицирани олигогалактурониди.

Таблица 35. Съдържание ($\mu\text{g/mL}$) на олигогалактурониди в ензимен хидролизат на ПЗ мурсалски чай и стойности на параметрите, характеризиращи Me-естерното разпределение, получени след действието на ХГ- и РГ-I-разграждащи пектолитични ензими.

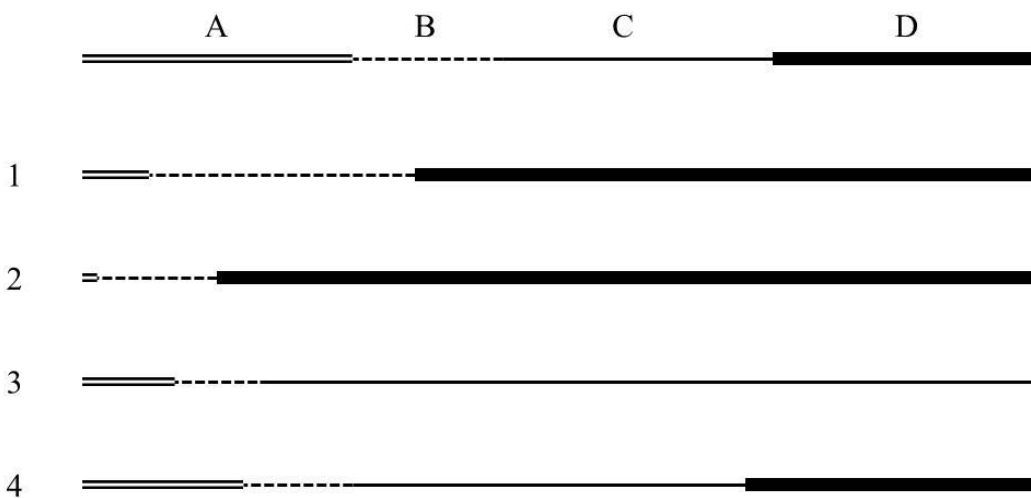
Проба	Наситени олигомери	Ненаситени олигомери	DB_{abs}	СЕ	СА	$CX_{\text{ПГ}}$	$CX_{\text{ПЛ}}$	$CX_{\text{ПГMe}}$	Добив
	$\mu\text{g/mL}$								
ПЗ мурсалски чай	778.6	1484.4	16	38	9.0	24	46	8	71

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 ($DB_{\text{abs}} = CX_{\text{ПГ}} = CX_{\text{ПЛ}} = 0$). Заслужава да се отбележи още и това, че част (29 mol%) от УК на пробата остават нехидролизирани! Доминиращото съдържание на ненаситените олигомери се отчита чрез параметъра $CX_{\text{ПЛ}}$, който за този субстрат има висока стойност (46 mol%) и $CX_{\text{ПГ}} < CX_{\text{ПЛ}}$. Освободеното количество ненаситени олигомери е ~ 2 пъти по-голямо от това на наситените. Като резултат от съвместното действие на ензимите се възстановяват 71% от УК изначално присъстващи в пробата (табл. 36). 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. Не могат да се приведат подобни стойности на $CX_{\text{ПЛ}}$ от други автори. Дори този случай е донякъде озадачаващ, т.к. [Remoroza et al. \(2014a\)](#) отбелязват, че $CX_{\text{ПГ}} < CX_{\text{ПЛ}}$, когато субстратът е високоестерифициран, а СЕ на ПЗ от мурсалски чай е ниска (38%)! Напр. за проби от цвеклов пектин с близка СЕ (F4429, P3429, B3124) те намират $CX_{\text{ПЛ}}$ съответно нулеви или < 1 mol% стойности! За изходния цвеклов пектин (SBP6230) посочват $CX_{\text{ПЛ}} = 17$ mol%. [Limberg et al. \(2000a\)](#) също отбелязват, че ПЛ е най-активна при субстрати с висока СЕ. Въпреки тази констатация за пектин от лайм от P-, F- и B-серията характеризиращи се със СЕ 41%, 43% и 34% се натрупват, макар и в по-малки количества ненаситени олигомери с различна СП. Получените резултати дават възможност да се разсъждава и върху вида на разпределение на Ac-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!

Не се откриват данни в достъпната литература с които биха могли да се съпоставят обсъдените по-горе резултати за ПЗ мурсалски чай. Към настоящия момент ензимният фингърпринтинг анализ не е прилаган за изучаване структурата на ПЗ изолирани от лечебни растения (мурсалски чай) и представените тук резултати представляват особен принос към изучаване структурата на тези ПЗ.

Една подходяща илюстрация, с която се обобщава нагледно получените резултати по ензимния фингърпринтинг анализ на отделните изходни ПЗ, е представена на **фиг. 35**. 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.

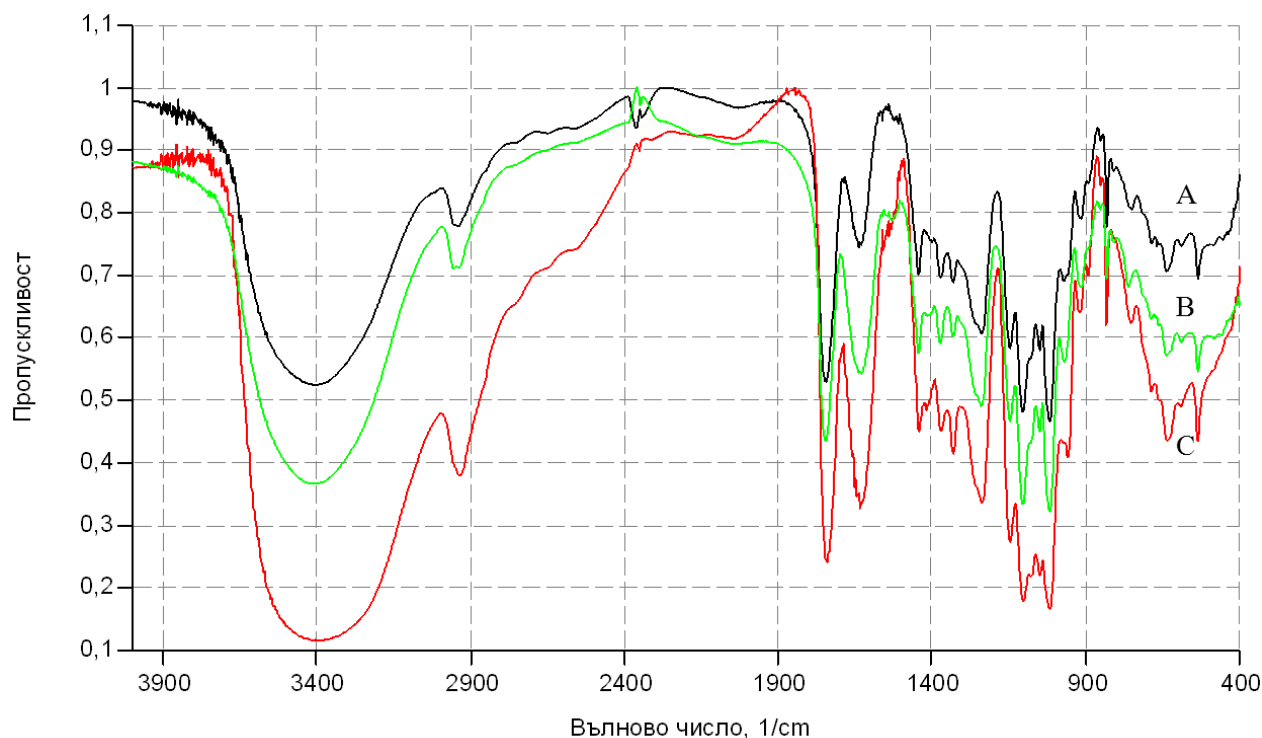


Фигура 36. Илюстрация на пропорциите на различните блокове, присъстващи в изследваните изходни (немодифицирани) пектини. **A** – блокове от неестерифицирани GalA остатъци (DB_{abs}), **B** – област със случайно разпределение на Ме-естерните групи ($CX_{ПГMe}$), **C** – блокове от Ме-естерифицирани GalA 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.

4.6 Спектрална характеристика

Спектралната характеристика на някои от пробите беше продължена чрез ИЧ спектроскопия. На **фиг. 37** са представени ИЧ-ФТ спектри на изходни и модифицирани ПЗ

от шипкови плодове, а на **фиг. 38** тези от праз след съответната обработка. Въз основа на получените спектри и наличните литературни данни е направено отнасяне на отделните ивици на поглъщане с присъствието на определени функционални групи.



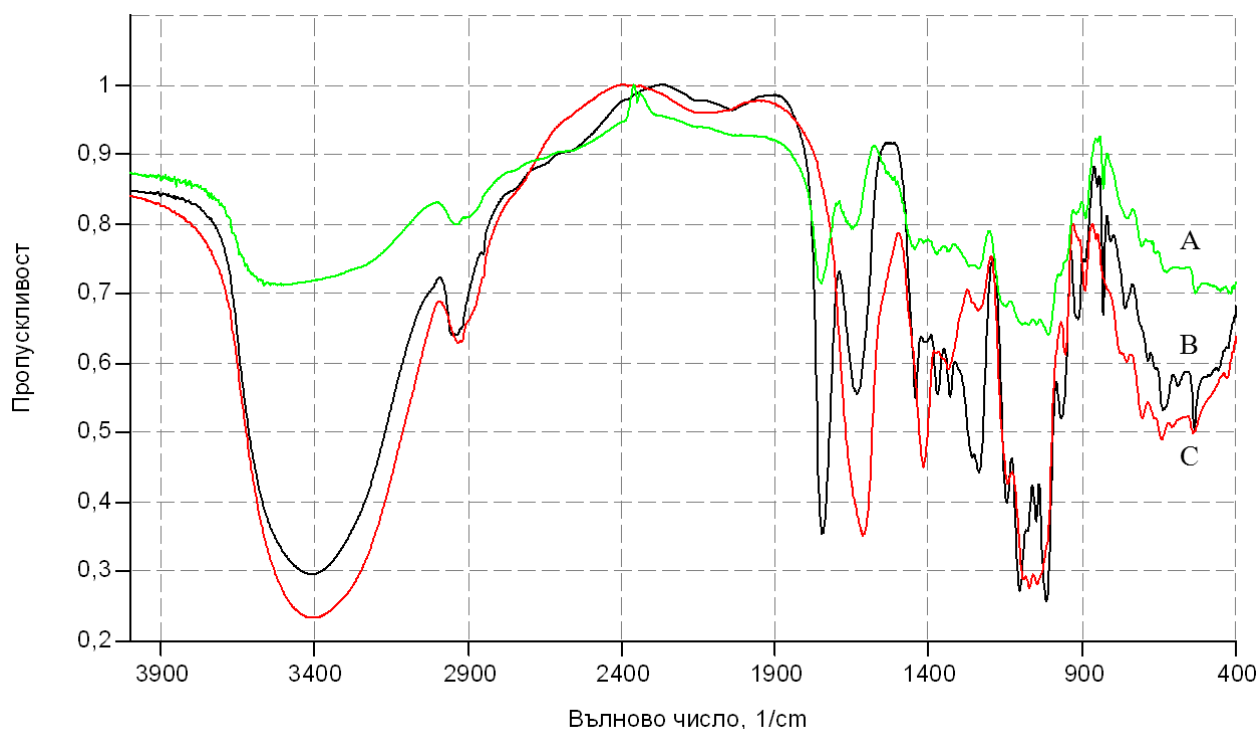
Фигура 37. ИЧ-ФТ спектри на ПП от АНЧ (ВЕРШ АНЧ (А) и КЕРШ АНЧ (С)) на шипкови плодове и на алкохолно-утаимата част след модификация на ВЕРШ с *endo*-ПГ-I (В).

Първоначално би могло да се отбележи, че независимо от начина на екстракция и обработка на шипковите ПЗ в техните ИЧ-ФТ спектри се наблюдават области (3900 до 2000 cm^{-1}) с идентични максимуми на поглъщане, но с известни различия в техните интензитети (**фиг. 37А, В, С**). Свободните хидроксилни групи показват ивица за О–Н валентни трептения в интервала от 3730-3520 cm^{-1} (2.68 до 2.84 μm). Разширяването на тази ивица и изместването ѝ към по-големите дължини на вълните (2.84 до 3.22 μm , 3520 до 3100 cm^{-1}) е индикация за участието на тези групи в между- и вътремолекулни водородни връзки (Stuart Tipson, 1968). В спектрите се наблюдава още и ивица на поглъщане при $\sim 2940\text{-}2960 \text{ cm}^{-1}$ (3.40 до 3.38 μm), която се свързва с валентните вибрационни трептения на връзката С–Н от CH_2 групата, а според Monsoor, Kalapathy, & Proctor (2001) също от $\nu(\text{CH}_3)$ на метиловия естер. В ИЧ-спектрите на изходните ПП от

АНЧ на шипка (**фиг. 37А и С**) се наблюдава ивица със слаб интензитет при $\sim 2650\text{ cm}^{-1}$ ($3.77\text{ }\mu\text{m}$), която според [Synytsya et al. \(2003\)](#) се отдава на $\nu(\text{OH})_{\text{COOH}}$. Наличието на ясно отчетливо трептене в областта $1745\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$ (5.73 до $5.76\text{ }\mu\text{m}$) е характерно за ПВ, като се свързва с валентните колебания на свободната и естерната карбонилна група от метиловия естер $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}$ (COOMe) на GalA ([Filippov, 1972, 1992](#)). Сравнително интензивните поглъщания при $1630\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ (6.13 до $6.09\text{ }\mu\text{m}$) и тези при 1440 cm^{-1} ($6.94\text{ }\mu\text{m}$) се отдават съответно на валентните асиметрични $\nu_{\text{as}}(\text{O}=\text{C}-\text{O})$ и симетрични $\nu_{\text{s}}(\text{O}=\text{C}-\text{O})$ вибрации на естерифицираната карбоксилна група. Нормалните деформационни трептения $\delta(\text{H}_2\text{O})$ се припокриват с асиметричните валентни трептения на карбоксилатния анион. Според [Schulz & Baranska \(2007\)](#) „ножичните“ деформационни колебания за С-Н групата в пектина се намират също в областта $1440\text{-}1444\text{ cm}^{-1}$, $\delta(\text{CH})$. По отношение на тези ивици на поглъщане не се установяват различия и при трите шипкови проби (**фиг. 37А, В и С**). Ивиците в т. нар. област на „пръстовите отпечатащи“ между $1430\text{-}910\text{ cm}^{-1}$ (7 до $11\text{ }\mu\text{m}$) се отнасят за скелетните трептения на пиранозния пръстен на монозахаридите. Наблюдаваното в ИЧ-спектрите поглъщане при $\sim 1371\text{ cm}^{-1}$ ($7.29\text{ }\mu\text{m}$) се преписва на „ножичните“ деформационни трептения от метиленовата група $\delta(\text{CH}_2)$ и валентните вибрации на връзката С-С, $\nu(\text{CC})$, а тези при 1330 cm^{-1} ($7.51\text{ }\mu\text{m}$) и 1236 cm^{-1} ($8.09\text{ }\mu\text{m}$) се отдават на $\delta(\text{CH})$ на пръстена. В областта между 1200 cm^{-1} и 1000 cm^{-1} са разположени характеристичните ивици за $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$ от етерната връзка в пръстена (1146 cm^{-1} , $8.72\text{ }\mu\text{m}$), както и скелетните валентни вибрации за С-О и С-С на гликозидната връзка и пиранозния пръстен ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, $9.04\text{ }\mu\text{m}$, $\nu(\text{CO})(\text{CC})$). Ивицата при $\sim 1016\text{ cm}^{-1}$ ($9.84\text{ }\mu\text{m}$) в спектрите се наблюдава поради валентните трептения на връзките С-О, С-С и деформационните „ножични“ вибрации на О-С-Н в пръстена, $\delta(\text{OCH})$. Според [Barros et al. \(1997\)](#) проби богати на УК показват интензивни пикове при 1100 cm^{-1} и 1018 cm^{-1} . Характеристичните трептения в ИЧ-спектъра при 956 cm^{-1} и 918 cm^{-1} (10.46 и $10.89\text{ }\mu\text{m}$) следва да се отдадат на деформационните „ножични“ трептения на връзките $\delta(\text{CCH})$ и $\delta(\text{CON})$. [Schulz & Baranska \(2007\)](#) отнасят ивицата при 973 cm^{-1} на трептенията на OCH_3 групата и $\nu(\text{C1-O5-C5-C6-O6})$ в пръстена. Припокриване на „извънравнинните“ деформационни трептения на $\gamma(\text{C}-\text{OH})$ от пиранозния пръстен с $\gamma(\text{OH})$ вибрациите от него се откриват при 833 cm^{-1} ($12.00\text{ }\mu\text{m}$) и потвърждават наличието на α -аномерната форма. По-нататъшното различаване, тълкуване и отнасяне на ИЧ-спектрите в нискочестотните вибрации на пиранозния пръстен (< 700

cm⁻¹) се затруднява, поради комплексната природа на ПЗ и би било спекулативно. Въпреки че ИЧ спектралните данни на [Khodzhaeva et al. \(1998\)](#) и [Kukhta et al. \(1979\)](#) за получените от тях шипкови пектини не са задълбочено отнесени, те все пак са в подкрепа на описаното тук.

ИЧ спектри на ензимно модифицирани шипкови пектини не са намерени. Видимото сходство в спектрите е за очакване, тъй като съответните пектини не се различават съществено по съдържание на GalA (61-65%, [табл. 19](#) и [22](#)), а мол. маса е също сходна ([табл. 25](#)). Заслужава внимание и фактът, че алкохолно-утаимата част на модифицирания с *endo*-ПГ-I шипков пектин дава също подобен на останалите два (немодифицирани ПЗ) спектър ([фиг. 37В](#)). Възможно обяснение може да намерим във фактите, че количеството на УК в модифицирания продукт е идентично с това на ВЕПШ АНЧ (61.3%) и че ензимната модификация е проведена с високоестерифициран пектин (64%), който не е алкалноосапунен. Въз основа на това би могло да се допусне, че ПЗ не е подходящ субстрат за действието на ензима *endo*-ПГ-I и че промяната в мол. маса не е значителна.



Фигура 38. ИЧ-ФТ спектри на изходни ПП от АНЧ на праз (ВЕППр АНЧ (В) и КЕППр АНЧ (А)) и на алкохолно-утаимата част след модификация на КЕППр АНЧ с *endo*-ПГ-I (С).

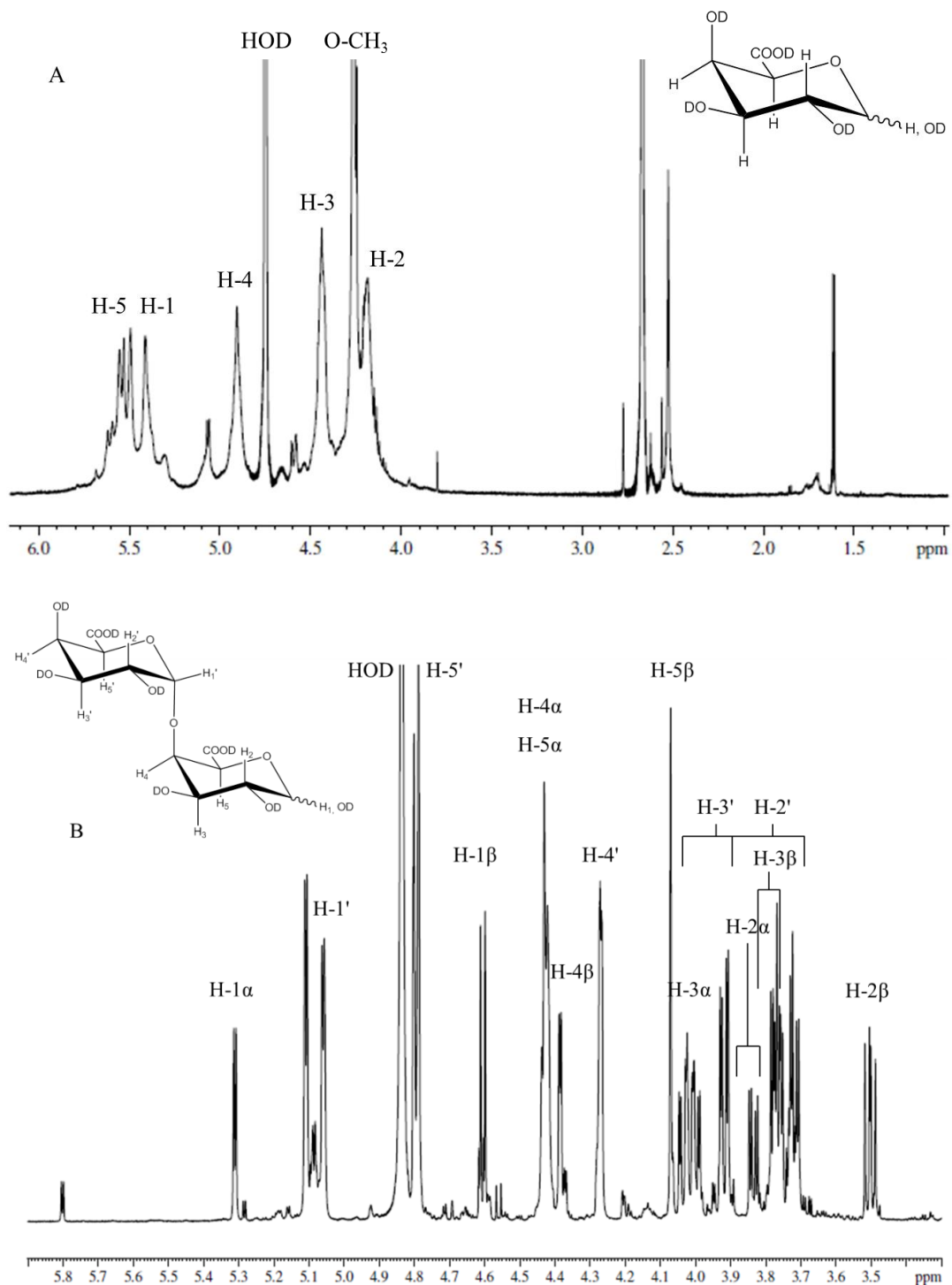
В ИЧ-спектрите на ПЗ от праз са наблюдават идентични ивици с вече разгледаните, но и някои интересни различия в спектралната област 1400-400 cm^{-1} . За изходния ВЕППр АНЧ се забелязват следните ивици на поглъщане (**фиг. 38В**): 3411 cm^{-1} – $\nu(\text{OH})$; 2939 cm^{-1} – $\nu(\text{CH})$ от CH_2 ; 1747 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} и 1442 cm^{-1} съответно за $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}$, $\nu_{\text{as}}(\text{O}=\text{C}-\text{O})$ и $\nu_{\text{s}}(\text{O}=\text{C}-\text{O})$ вибрационни трептения на естерифицираната карбоксилна група. В областта на „пръстовите отпечатащи“: 1371 cm^{-1} – $\delta(\text{CH}_2)$ и $\nu(\text{CC})$; 1330 cm^{-1} – $\delta(\text{CH})$ в пръстена; 1145 cm^{-1} , 1103 cm^{-1} и 1016 cm^{-1} – $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, $\nu(\text{CO})$, $\nu(\text{CC})$, $\delta(\text{OCH})$ в пръстена; 968 cm^{-1} и 831 cm^{-1} – за $\nu(\text{C1-O5-C5-C6-O6})$ и $\gamma(\text{C-OH})$ в пръстена. В спектъра на КЕППр АНЧ (**фиг. 38А**) се забелязват някои разлики в „аномерния“ регион, както и изместване на асиметричните валентни трептения за $\text{O}=\text{C}-\text{O}$ групата от 1635 cm^{-1} на 1653 cm^{-1} свързано с присъствието на $\delta(\text{H}_2\text{O})$. Друга забележима разлика е липсата на характерните за пектина ивици на поглъщане при $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ и 1016 cm^{-1} . Позовавайки се на [Kačuráková et al. \(2000\)](#) абсорбция в областта между 890-910 cm^{-1} следва да се тълкува като присъствие на β -D-гликозидно свързани помежду си монозахаридни единици. Според същите автори РГ полимерът има типични максимуми на поглъщане при 1070 cm^{-1} и 1043 cm^{-1} , но ивицата при 1072 cm^{-1} е също специфична за β -галактани. Вероятно наблюдаваните ивици при 1074 cm^{-1} и 1049 cm^{-1} следва да се тълкуват като наличие на β -арабиногалактан, тъй като последният има два максимума при 1074 cm^{-1} и 1045 cm^{-1} ([Kačuráková et al. 2000](#)). Твърдението не е без основание, имайки предвид монозахаридния състав на фракцията, според който Gal се съдържа в най-големи количества (**табл. 10**), а също така и преимуществото на РГ-I фрагменти спрямо това на ХГ (**табл. 13**).

Едновременно с това от изключителен интерес беше да се проучат спектралните характеристики и на алкохолно-утаимата част на ензимно-модифицирания КЕППр АНЧ и да се сравнят с тези на изходния пектин. От ИЧ-спектъра (**фиг. 38С**) е видно, че характерните за немодифицирания пектин честоти при 1740 и 1652 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{COOH}}$, $\nu_{\text{as}}(\text{O}=\text{C}-\text{O})$) липсват. Прави впечатление, че на тяхно място са се появили два характерни пика при 1614 и 1417 cm^{-1} . Според [Filippov \(1972, 1992\)](#), [Gnanasambandam & Proctor \(2000\)](#) и [Synytsya et al. \(2003\)](#) ивиците в областта 1640-1620 cm^{-1} и 1420-1410 cm^{-1} следва да се отнасят съответно за симетричните и асиметрични валентни вибрации на карбоксилатния анион (COO^-), когато липсва сигнала за естерната карбонилна група. Това не е изненадващо след като преди ензимната модификация изходният пектин е подложен на

осапунване. Известно припокриване в спектрите на изходния и модифициран пектин се наблюдава в регионите свързани с колебанията на пиранозния пръстен – 1336, 1238, 1141 cm^{-1} за $\delta(\text{C-H})$, $\nu(\text{C-O-C})$. В този спектър се открояват също ивиците при 1072, 1047 и 890 cm^{-1} характерни за наличие на β -D-гликозидна връзка и арабиногалактан, открити и в изходния ПЗ. Трептенето със слаб интензитет при 954 cm^{-1} се отдава на „ножичните“ деформации на С-С-Н и С-ОН групите. В литературата не се откриват ИЧ спектри на изходни и модифицирани ПП от праз и получаването им тук е своеобразен принос в спектралната им характеристика.

Като част от изследванията по получаването и характеристиката на ПЗ от шипкови плодове е включена и ЯМР спектроскопия. Интерпретацията на спектрите е извършена с помощта на информация, получена от другите („конвенционални“) методи (мол. маса, монозахариден състав и др.) и литературни данни. На **фиг. 39** и **40** са представени съответно протонните и въглеродните спектри на изходния ВЕПШ АНЧ и на фракцията, получена след негов ензимен хидролиз и хроматографско разделяне (ВЕПШ АНЧ *endo*-ПГ-I пик I след ЙХ). Данните за химичните отмествания (δ) са поместени в **табл. 36**. След сравнение между двете фигури се забелязва основно, че спектрите (^1H и ^{13}C) на изходния ПЗ съдържат по-малко сигнали и следователно по-просто се интерпретират. За сметка на това разшифроването на останалите спектри е по-сложна задача.

В показания на **фиг. 39А** ^1H -спектър се наблюдава присъствието на ясен синглетен сигнал при δ 4.26 ppm от протоните на метокси група (O-CH_3) на естерифициран пектин. Останалите наблюдавани сигнали в по-слабо поле при δ 4.43, 4.90, 5.41 следва да се припишат на H-3, H-4 и H-1 протоните на GalpA. Сигналят за H-2 (δ 4.19) в спектъра се припокрива частично с този за O-CH_3 . За съжаление други видове захари не могат да бъдат определени, поради високата молекулна маса и незначителното им количество в изследвания пектин (**табл. 10** и **15**).



Фигура 39. $^1\text{H-NMR}$ спектри на изходен ВЕПШ изолиран от АНЧ (А) и на първата фракция (пик I), получена след разделяне чрез ЙХ на ензимен хидролизат след действието на *endo*-ПГ-I (В). $\delta \text{D}_2\text{O} = 4.75 \text{ ppm}$ при 300K за (А) и $\delta \text{D}_2\text{O} = 4.84 \text{ ppm}$ при 293K за (В).

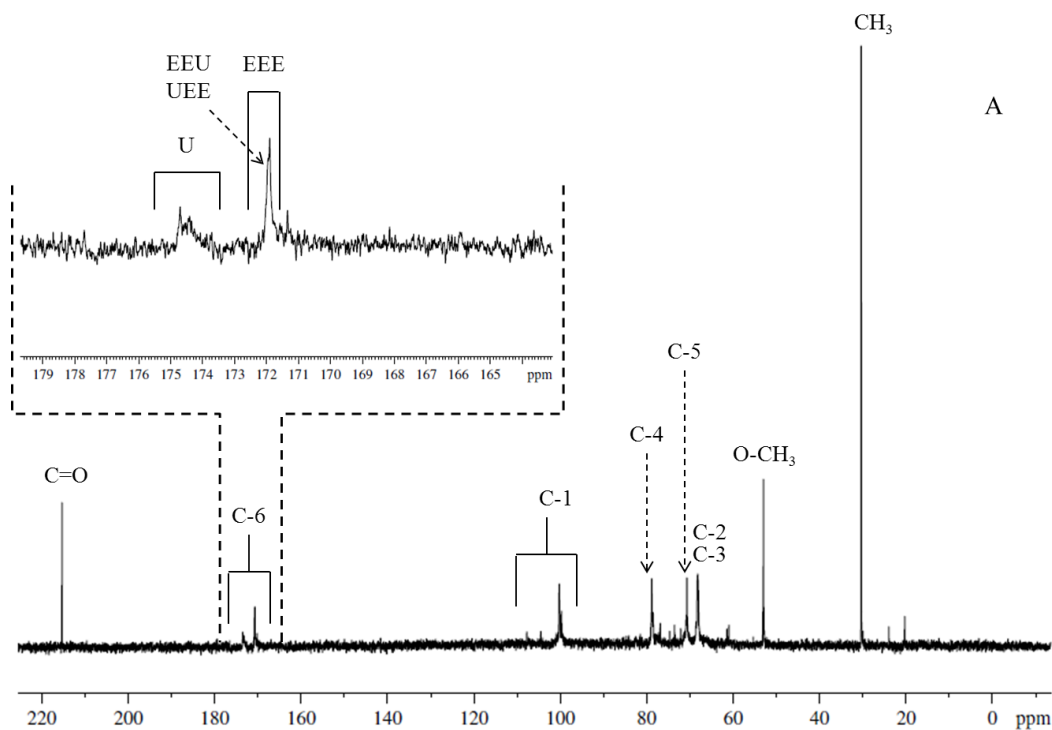
$^1\text{H-NMR}$ спектър (фиг. 39В) на ензимномодифицираната и хроматографски пречистената пектинова проба може да бъде разделен на три характерни региона: (1) δ

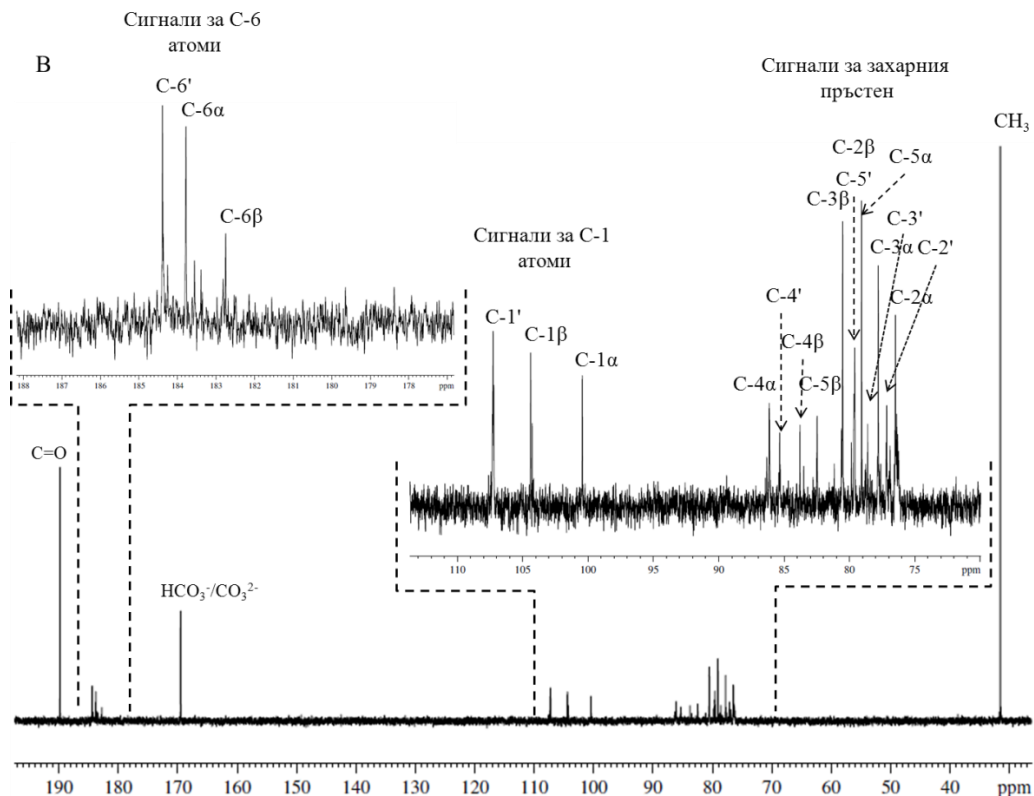
3.45-4.15 асоцииран с H-2 и H-3 от редуциращите и нередуциращите захарни остатъци; (2) δ 4.15-4.90 свързан с H-4 на редуциращи и нередуциращи захарни остатъци, H-5 (α и β аномер) от редуциращ захарен остатък, както и за аксиален H-1; (3) δ 4.90-5.40 асоцииран с H-5 от нередуциращ захарен остатък и екваториален H-1. В този спектър не се наблюдава сигнал за протоните от O-CH₃, т.к. преди хидролиз пробата е осапунена. Показаният тук ЯМР спектър е подобен в по-голямата си част с тези получени от [Tjan, Voragen, & Pilnik \(1974\)](#) и [Rinaudo, Ravanat, & Vincendon \(1980\)](#) за серия от (не)естерифицирани олигоурони, получени след ензимен хидролиз и пречистване чрез ЙХ.

По отношение на ¹³C-спектрите (**фиг. 40А**) се открояват няколко области, присъщи за естерифицирана GalA. Във въглеродния спектър се наблюдава сигнал за метокси-група при 54.19 ppm. Аномерните C-1 атоми, които са свързани с два кислородни атома в пиранозния пръстен са силно деекранирани и резонират в сравнително слабо поле (101.45 ppm; 100.94 ppm). Другите C-атоми от пръстена резонират в по-силно поле, както следва: C-2 и C-3 са частично припокрити в интервала δ 69.29 – 69.39 ppm; а C-5 и C-4 се откриват при δ 71.89 и 80.04 (**табл. 36**). Особено информативна е областта от 170 до 180 ppm (Me-естер-карбонилна област), в която се появяват сигналите за карбоксилните C-6 атоми в различно състояние – естерифицирани (E) и неестерифицирани (U) ([Westerlung et al., 1991](#); [Catoire et al., 1998](#); [Neiss et al., 1999](#)). Според тези автори в зависимост от качеството на спектъра и SE на съответния пектин може да се получи информация относно разпределението на Me-естерните групи по триадни структури, т.к. δ на централния C-6 се влияе от остатъците, намиращи се в съседство (напр. UEU, EEE, UUU) ([Westerlung et al., 1991](#)). На спектъра на **фиг. 40А** тази област е представена увеличено и ясно се вижда, че естерифицираните C-6 групи резонират като остър пик в тесния интервал 171.63 и 172.20 ppm. По-широк сигнал в областта 173.60 до 175.00 ppm е за неестерифицираните групи и триади от вида UUU. Тези данни показват, че спектърът на изходния ВЕПШ АНЧ, съответства на високоестерифициран пектин, съдържащ области с различно разпределение на Me-естерните групи. В тази си област съответният спектър е сходен на получения от [Westerlung et al. \(1991\)](#) ¹³C ЯМР спектър на нативен високоестерифициран пектин от папая (SE 70%). Допълнително авторите отбелязват още, че карбоксилната група в пектина от папая и тютюн е случайно разпределена. Полученият спектър съответства и на този представен от [Catoire et al. \(1998\)](#) за частично деполимеризиран ябълков пектин с висока

СЕ (72%). В по-ново време [Alba, Laws, & Kontogiorgos \(2015\)](#) доказват, че сигнали в карбонилната област около 172 ppm съответстват на C-6 за естерифицирана –COOH група в (1→4)-свързана GalA, докато сигналът в по-слабо поле (174 ppm) се отнася за неестерифицирана карбоксилна група от GalA. В спектъра на изходния ПЗ са видими още няколко сигнала (δ 60-80 ppm) с по-малък интензитет, които вероятно се дължат на НЗ (галактоза и др.), изграждащи пектиновите „космати“ региони. Сигналите при δ 31.54 и 216.51 ppm се отнасят за CH₃ и C=O групи на ацетона, използван като стандарт.

¹³C ЯМР-спектърът на ензимномодифицираната и хроматографски пречистената пектинова проба (**фиг. 40В**) може да бъде разделен на три характерни региона, в които се намират сигналите съответно за захарния пръстен (75-90 ppm), за C-1 (100-110 ppm) и C-6 атоми (180-185 ppm). За разлика от ¹³C спектъра на изходния ПЗ в този не се наблюдава характерния сигнал при δ 54.19 ppm за O-CH₃ групата, поради факта, че пробата е осапунена преди ензимния хидролиз. Останалите сигнали са в добро съответствие с тези на олигогалактурониди, на които спектри представят [Rinaudo, Ravanat, & Vincendon \(1980\)](#), което говори за близост и в химичния им строеж.





Фигура 40. ^{13}C -ЯМР спектри на изходен ВЕПШ изолиран от АНЧ (А) и на първата фракция (пик I), получена след разделяне чрез ЙХ на ензимен хидролизат след действието на *endo*-ПГ-I (В). δ $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ = 31.54 ppm за (А) и (В). U-неестерифициран остатък, E-естерифициран остатък.

Необходимо е да отбележим, че сигналите на C-1' за α -аномера на нередукциращите звена в дизахарид се намират в по-силно поле в сравнение с β -аномера. Позицията на сигналите в $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ЯМР спектрите, както и от получените допълнително двумерни (HSQC, COSY) спектри в процеса на нашата работа демонстрират наличието на (1 \rightarrow 4)-свързана α -D-GalpA. Впечатление прави присъствието на сигнал (δ 169.47 ppm) със сравнително висок интензитет, който може да се отдаде на наличието на остатъчни количества от бикарбонат, влизаш в състава на използвания като елуент в ЙХ NH_4HCO_3 . Според [Mani, Peruzzini, & Stoppioni \(2006\)](#), които са разработили ^{13}C ЯМР метод за изследване равновесните процеси в системата $\text{CO}_2/\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$, двойката $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ се характеризира с ясен единичен сигнал, който в зависимост от рН на средата се характеризира с δ 161.50-165.23 ppm.

Таблица 36. Химични отмествания на сигналите на въглеродните и водородните атоми в ^{13}C - и ^1H -ЯМР-спектрите на изследваните проби.

Проба	Остатък	Химично отместване (δ , ppm)						
		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	O-CH ₃
		H-1	H-2	H-3	H-4	H-5		O-CH ₃
ВЕПШ АНЧ	поли-(α -D-GalpA)	101.45	69.29	69.37	80.04	71.89	171.90/174.69	54.19
		5.41	4.19	4.43	4.90	5.49-5.61		4.26
ВЕПШ АНЧ <i>endo</i> -ПГ-I пик I след ЙХ	α	100.43	76.47	77.78	86.13	79.06	183.77	-
		5.31	3.85	4.05	4.43	4.43		
	β	104.39	79.84	80.52	83.78	82.47	182.74	-
		4.61	3.50	3.78	4.39	4.07		
	,	107.26	77.13	78.59	85.34	79.58	184.38	-
		5.06	4.06	3.93	4.27	4.80		

4.7 Биологична активност на изходни и модифицирани полизахариди

4.7.1 Антиоксидантна активност

В процеса на работа нашето внимание беше привлечено от твърденията в някои изследвания, че растителните ПЗ притежават АО активност (Hayami, Motomura, & Nishizawa, 2007; Pristov, Mitrović, & Spasojević, 2011; Francine *et al.*, 2014; Mengome *et al.*, 2014). Тези твърдения не са без основание, имайки предвид наличието на някои функционални групи в ПВ (-COOH, OH), които са способни да комплексообразуват и/или улавят радикали. Същевременно те могат да бъдат поставени под съмнение, тъй като в процеса на екстракция се извличат някои белтъци и полифеноли, които са типични представители на АО. Оценката на *in vitro* АО активност на съответните проби беше извършена посредством ORAC и HORAC методите. Най-общо улавянето (неутрализирането) на свободни радикали може да се извърши по два механизма – трансфер на водороден атом (ТВА) и трансфер на единичен електрон (ТЕЕ). Всеобщо разбиране е, че методите базирани на ТВА изразяват способността на даден АО да неутрализира физиологически най-значимите пероксидни радикали по начин, по който това става в организма. ORAC методът изразява способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксидни радикали чрез ТВА. HORAC методът е показател за превантивното действие на АО. Той отразява комплексообразуващите свойства на дадена проба в условия на реакцията на Фентън и следователно способността ѝ да предпазва от образуване на хидроксилни радикали. Тъй като последните са най-реактивоспособната форма на кислорода е от особено значение да се оцени способността на даден АО или проба да предотвратят тяхното образуване. Резултатите от анализа са представени в **табл. 37**, в която са включени и някои химични характеристики на ПЗ, имащи отношение към тълкуването на получените данни. От таблицата се вижда, че 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.

Таблица 37. 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	-
ВЕПШ АНЧ	61.1	15	2.4	543.8 \pm 25.8	51.8 \pm 4.0
КЕПШ АНЧ	53.0	27	1.6	254 \pm 14.2	44.6 \pm 8.1
ВЕПШ	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	-

Напр. от всички изследвани проби ПЗ от мурсалски чай е с най-ниска СЕ, респ. най-много свободни карбоксилни групи (62%) способни да комплексообразуват, но не показва HORAC активност. Противно на това ПЗ изолирани от АНЧ на шипка (ВЕПШ и КЕПШ АНЧ) съдържат по-малко свободни карбоксилни групи (високоестерифицирани), но проявяват (макар и ниска) HORAC активност. ПП от портокалови кори се характеризират с едно и също ОПФ съдържание и въпреки, че КЕПП АНЧ има с 10% повече свободни карбоксилни групи, не проявява АО активност по HORAC метода. За разлика от него ВЕПП АНЧ дава най-висока активност по този метод. Сравнявайки КЕПП и КЕПШ от АНЧ се вижда, че те не се различават значително по своето полифенолно съдържание, дял на ХГ фрагмент и процент на свободни карбоксилни групи. Последният, обаче проявява HORAC АО активност и над 4 пъти по-висока антирадикалова способност (254 $\mu\text{mol TE/g}$) спрямо първата проба. Липса на АО активност и по двата метода показват ПЗ изолирани от АНЧ на праз, които се отличават и с най-ниско ОПФ съдържание. [Čiž et al. \(2010\)](#) недвусмислено показват, че ORAC, TRAP и HORAC стойностите са строго зависими от количеството на ОПФ. Вероятно за АО действие има значение не само количеството на ОПФ, които се абсорбират към ПЗ през време на екстракцията и изолирането му, но и индивидуалният им състав. Той пък от своя страна зависи от вида на суровината, нейната

обработка и използвания екстрагент. Известно съмнение може да се постави и върху предположението на някои автори, че ХГ също участва в процесите на радикалово прихващане (Mengome *et al.*, 2014). Очевидно то 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. Поинтересни биха били въпросите свързани с механизма на полифенолната абсорбция при екстракция на ПВ и вида на връзката „ПЗ-полифеноли“, които не са обект на изследване в настоящата работа.

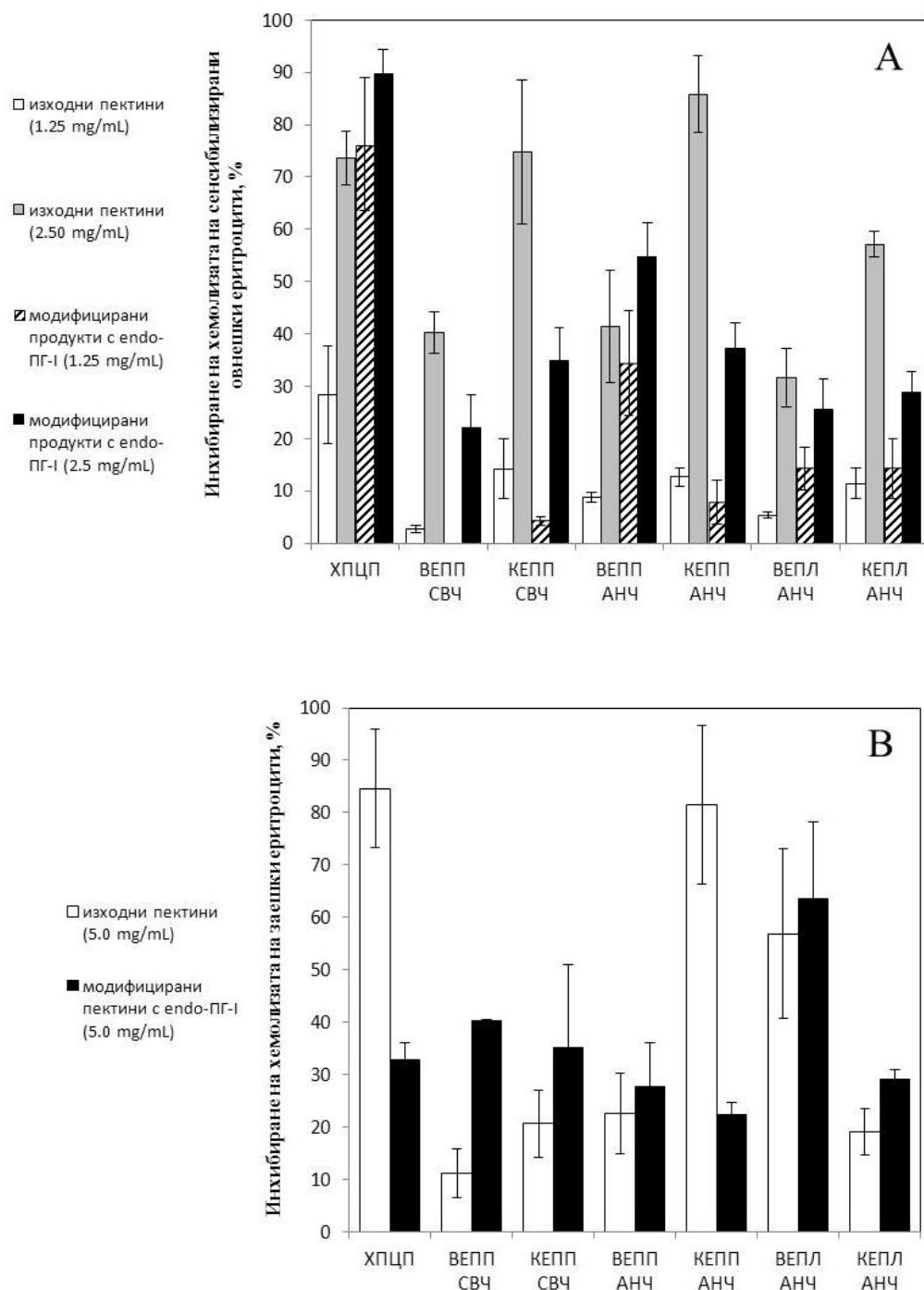
4.7.2 Антикомплементарна активност

Изследването на влиянието на ПП върху системата (нейни елементи) на комплемента става чрез *in vitro* тест за антикомплементарна активност – един от най-широко използваните за изследване на имуномодулиращи съединения. Той включва инкубиране на нормален човешки серум с някои комплементни регулатори, като оставащият комплементен титър се измерва функционално чрез използване хемолизата на антитяло-сенсibiliзирани овчи еритроцити. При активиране на комплемента по време на предварителната инкубация на кръвен серум с изпитваните пектини, част от него се изчерпва и при последващо добавяне на индикаторните серуми, хемолизата е по-слаба в сравнение с нетретираните серуми. Колкото по-висок е численият израз на % инхибиране на хемолизата, и то при възможно по-ниска концентрация, толкова по-силно е активирането на комплемента. Регулиращите вещества за хемолитичната активност на комплемента се отнасят като антикомплементарни вещества. Комплементните активатори водят до понижаване на хемолизата, поради редуциране на комплементния титър чрез активирането на комплементната система. Комплементните инхибитори водят до инхибиране на хемолизата, поради инхибиране на определена стъпка в комплементната активационна каскада чрез съвместното съществуване на инхибитори в анализираната система (Samuelsen *et al.*, 1999; Zou *et al.*, 2014).

Комплементното активиране допринася за инфламаторните отговори, в допълнение към защитните реакции на организма, а инхибирането на комплементното активиране при възпаление би била добра терапевтична стратегия за третирането на редица болести (Yamada & Kiyohara, 2007).

4.7.2.1 Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани цитрусови пектини

Резултатите от проведените анализи на антикомплементарната активност на ЦП са представени в следващите няколко фигури, като на **фиг. 41** са оформени графично данните получени за изходните и ензимно модифицирани алкохолно-утаими части на ЦП. От **фиг. 41А** се вижда, че 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. По-слабата активност на някои от модифицираните проби би могла да се свърже със състава им. По-преди беше демонстрирано, че моно- и олигогалактурониди (СП 1-3) не са напълно отстранени от алкохолно-утаимата част и присъстват изначално в пробата заедно с по-високомолекулните фрагменти от „косматите“ пектинови региони. Такива олигомери може да „маскират“ иначе доста активните модифицирани омрежени региони (Yamada & Kiyohara, 2007), но също така и наличието на определена (малка) част от неразграден ХГ в пробите, което също беше установено. Kiyohara, Cyong, & Yamada (1988) наблюдават също подобен феномен след действието на *endo*-ПП върху AR-2IIa и AR-2IIb. Активността се понижила от 59.5% до 29.0% и 62.6% до 42.8% при 1000 µg/mL. След хроматографско сепариране на олигомерите от ензимно-резистентната фракция обаче се отчела по-висока активност. Заслужава да се отбележи и това, че предварителната микровълнова обработка не повлиява негативно върху проявлението на активността. По алтернативния път (**фиг. 41В**) пробите проявяват задоволителна активност само при значително по-високи концентрации (5 mg/mL), което показва, че ПЗ са по-добри активатори на класическия път! В този случай по-активни са само изходните ХПЦП и КЕПП от АНЧ (> 80%). Висока активност се наблюдава и при изходния ВЕПЛ АНЧ (~60%). При всички останали субстрати ензимната модификация с *endo*-ПП-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.



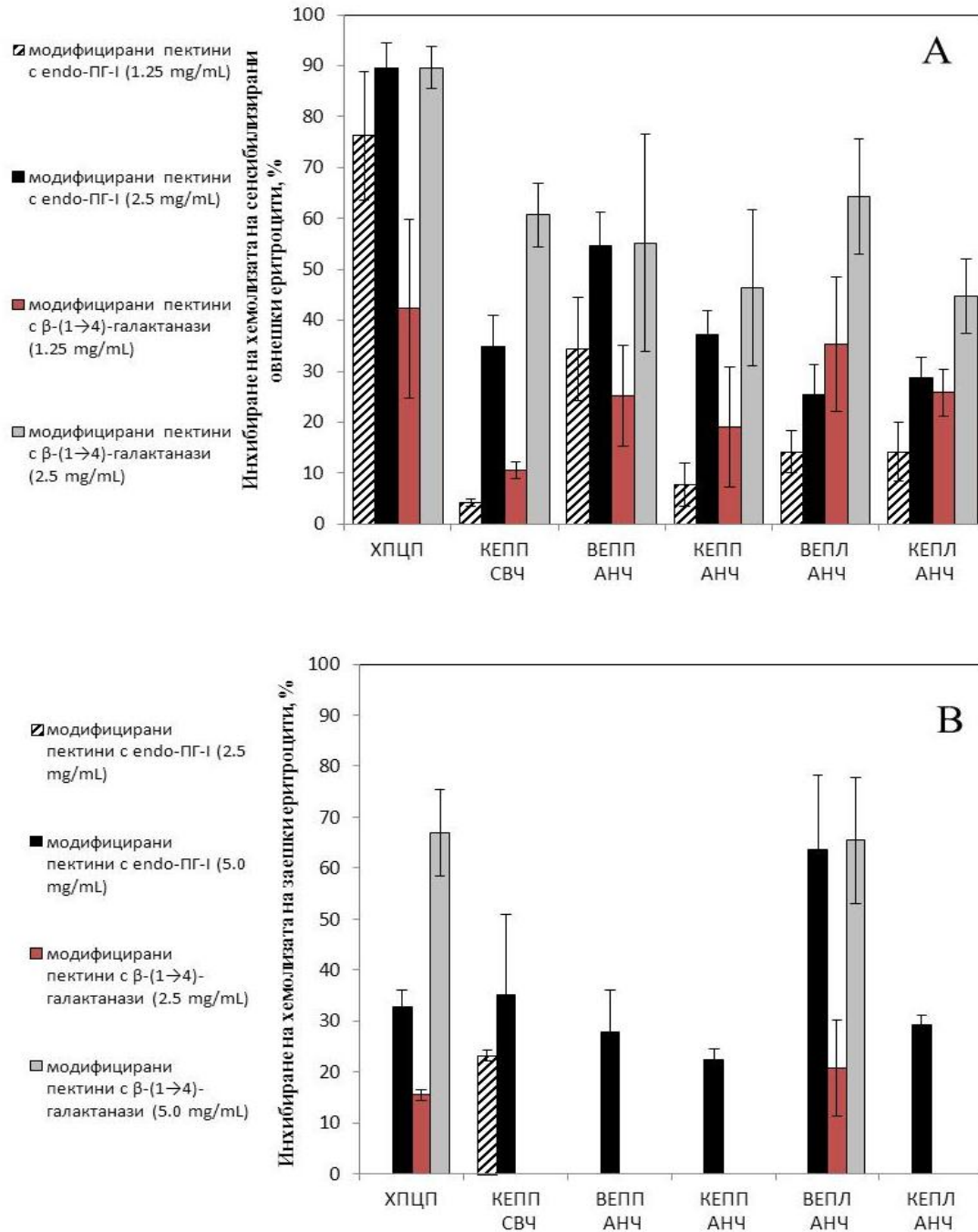
Фигура 41. Антикомплементарна активност на изходни ПЗ и алкохолно-утаимите продукти на модифицирани с *endo*-ПГ-I ПП от цитрусови кори, определена чрез *in vitro* активирание на комплемента от човешки серум по класически (А) и алтернативен път (В).

При съпоставяне на получените тук резултатите с тези от по-старо изследване на [Крачанова и сътр. \(2000\)](#) се вижда, че активността на ВЕПП и КЕПП от АНЧ е по-ниска. При концентрация от 1 mg/mL от съответната ПЗ фракция авторите получават по-високи

резултати по класическия път (~95%), което е в съгласие с полученото от нас. Само ПЗ от портокал (~50%) и слънчогледови пити (> 50%) показали, че повлияват алтернативния път на активиране на комплемента, което навярно е свързано с по-малката тествана концентрация на останалите.

Според общоприетото схващане активирането на комплемента се дължи на комбинацията от РГ скелет и странични вериги от НЗ (Yamada & Kiyohara, 2007). Според други схващания проявлението зависи точно от определен тип свързване между отделните НЗ. Напр. есенциални за проявата на комплементарната активност се считат въглехидратни вериги съставени от (1→6)-свързани β -Gal единици (Kiyohara, Cyong, & Yamada, 1988). В този случай е проследена ролята на (1→4)-свързаните помежду си β -Gal единици върху комплементарната активност. На **фиг. 42** са представени сравнителни резултати. Модификацията с β -(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 β -(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 β -(1→3,6) връзки. Единствено при по-ниски концентрации (1.25 mg/mL) модификацията на ВЕПП АНЧ се отразява негативно върху проявяваната активност.

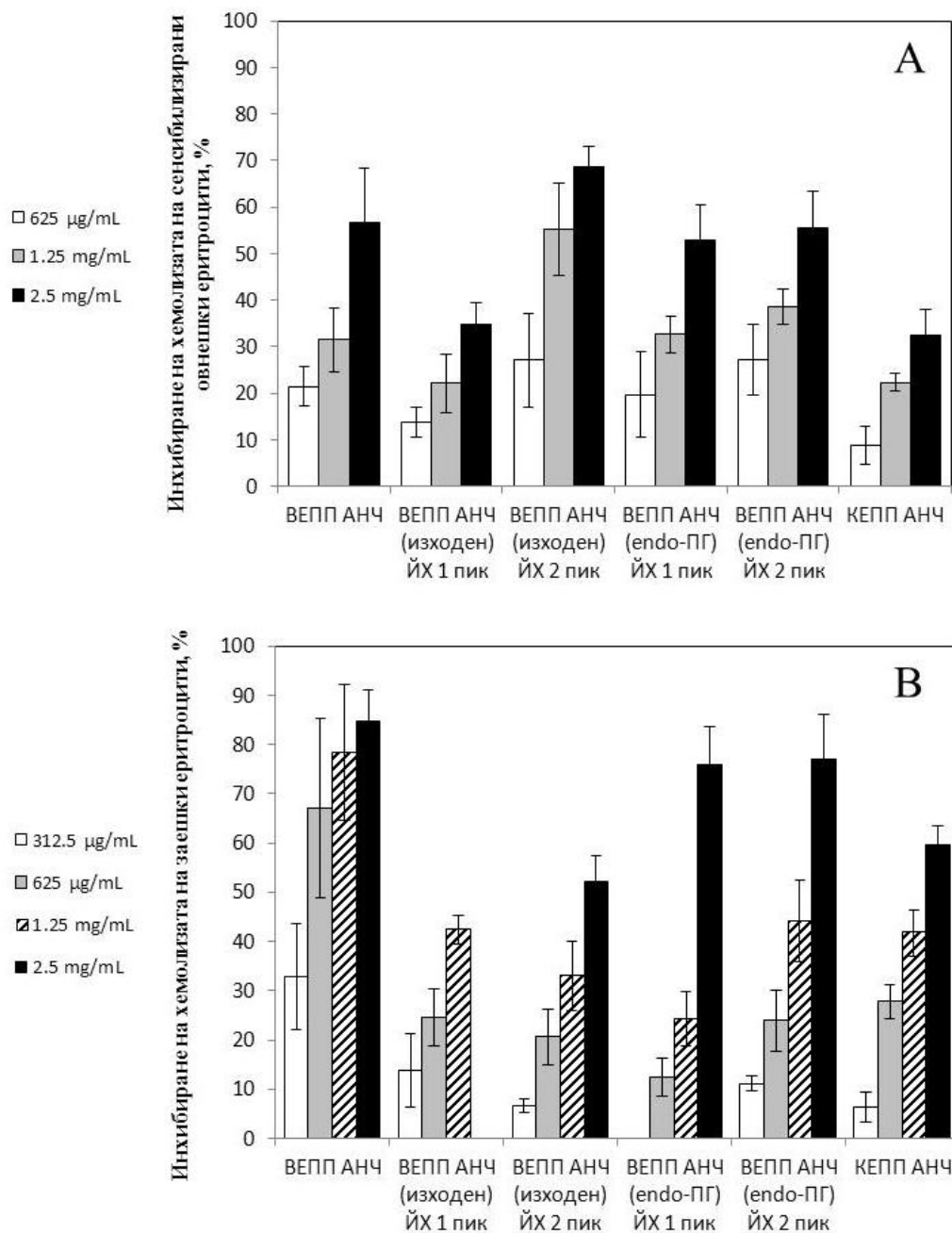
По отношение на алтернативния път активност не се забелязва при ниските концентрации (2.5 mg/mL). Ензимната модификация се отразява негативно върху комплементарната активност, т.к. и при по-високите дози (5.0 mg/mL) не се забелязва активиране. Единствено при ХПЦП и ВЕПЛ АНЧ се забелязва дозозависима активност. Явно β -(1→4)-гликозидните връзки не са есенциални за проявлението на антикомплементарната активност при така подготвените проби. Те обаче са необходими при стимулираната експресия на IL-6 от клетките на чревните Пайерови плаки, след като Grønhaug *et al.* (2011) разградили фракции ВРП.1 and ВРП.2 от ПЗ на *B. petersianum* Klotzsch чрез *endo*- β -D-(1→4)-галактаназа и *exo*- β -L-арабинофуранозидаза и активността рязко се понижила. Вероятно наблюдаваното не е универсална зависимост и определени структурни фрагменти оказват влияние върху определен тип активност.



Фигура 42. Антикомплементарна активност на алкохолно-утаимите продукти на модифицирани с *endo*-ПГ-I и β -(1 \rightarrow 4)-галактаназы ПП от цитрусови кори, определена чрез *in vitro* активирание на комплемента от човешки серум по класически (А) и алтернативен път (В).

По-голяма яснота относно проявлението на този тип активност може да се постигне ако се проведе хроматографско фракционирание и последващ анализ на фракциите. Получените резултати са графично оформени и представени на **фиг. 43**. Отново се забелязва, че проявлението на активността е дозо-зависимо и по двата пътя на активирание

на комплемента. След ЙХ съответните фракции демонстрират различна активност, което показва, че активността се дължи на различни ПЗ популации с различен състав и строеж. Напр. „ВЕПП АНЧ ЙХ I пик“ инхибира в по-малка (< 40% при 2.5 mg/mL) степен хемолизата, съответно активира по-слабо класическия път.



Фигура 43. Антикомплементарна активност на ВЕ и КЕ ПЗ от АНЧ на портокалови кори и на фракциите получени след йонообменна хроматография, определена чрез *in vitro* активиране на комплемента от човешки серум по класически (А) и алтернативен път (В). ЙХ – йонообменна хроматография.

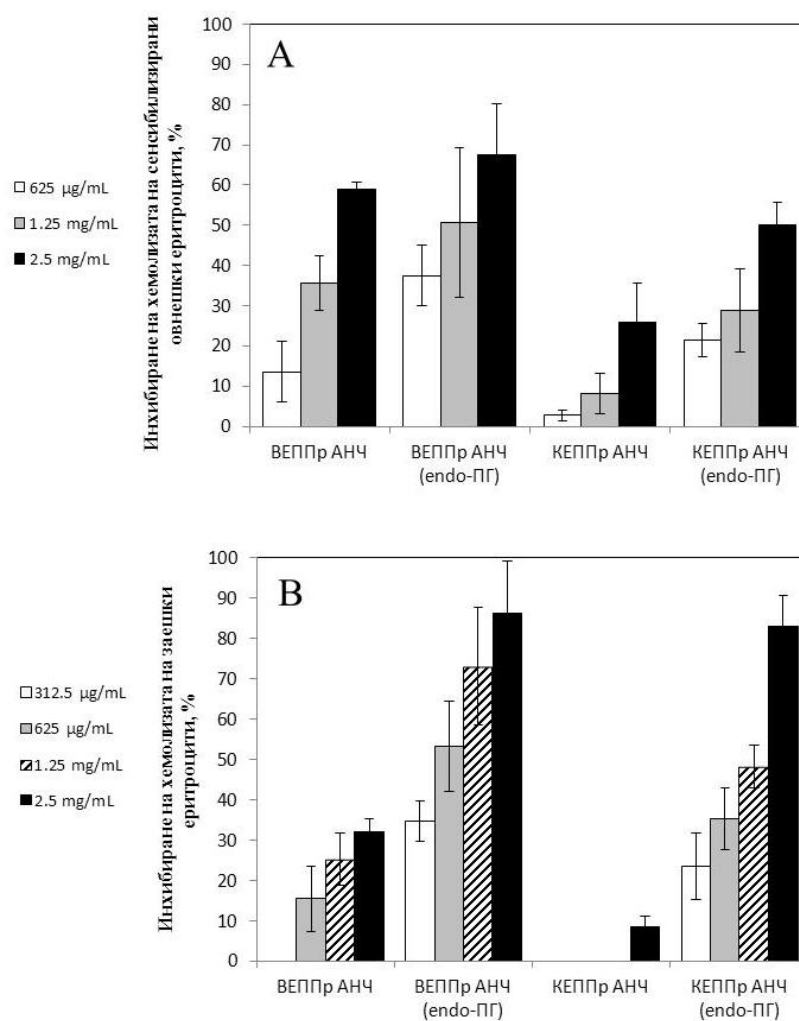
За сметка на това втората фракция („2 пик“) демонстрира по-висока активност спрямо изходната при една и съща концентрация (~70% при 2.5 mg/mL). Причината за това би могла да е свързана най-вече със структурата на двете фракции, т.к. по мол. маса и състав между тях не се наблюдават съществени различия (табл. 23 и 24). Интересен факт е, че ензимната модификация или не оказва влияние, или то е много слабо положително върху активирането на комплемента по класическия път. Би могло да се допусне, че присъстващите олигоуроници в „1 пик“ оказват потискащо влияние върху експресията на иначе доста активната комбинация от PГ-I и HЗ.

По алтернативния път на активиране на комплемента пробите показват активност и при по-ниски концентрации (10-30% при 312.5 µg/mL). Оказва се, че в този случай ензимната модификация повлиява положително. Напр. за ВЕПП АНЧ „1 пик“ и „2 пик“ след ЙХ е отчетено по-голямо инхибиране на хемолизата по алтернативния път, отколкото спрямо това по класическия път. За сравнение [Samuelsen et al. \(1999\)](#) фракционират чрез ЙХ суров ПЗ екстракт от корени на *Plantago major* L. на 4 (А, В, С, D) кисели фракции. Най-активни по дозозависим начин (3-750 µg/mL) в комплементарния тест се проявили тези с по-висока мол. маса – А, В, С, но не и D. Съдържанието на (1→4)-свързани УК било най-високо във фракция В, но въпреки по-ниското количество на УК, С и D се задържали по-здраво за пълнежа на колоната.

4.7.2.2 Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани пектини от праз

На **фиг. 44** са представени резултатите от теста за комплемент-активираща способност на ПЗ изолирани от праз. В този случай активирането отново е концентрационно зависимо, като изходният ВЕППр АНЧ повлиява в значително по-голяма степен (при 2.5 mg/mL – 60%) класическия път спрямо тази на КЕППр АНЧ (при 2.5 mg/mL - < 30%). Особено отчетливо се забелязва, че алкохолно-утаимите фракции след ензимната модификация с *endo*-ПГ-I инхибират в по-голяма степен хемолизата спрямо съответната изходна ПЗ фракция. Едва след модификация КЕППр АНЧ достига активността на изходния ВЕППр АНЧ, което обуславя необходимостта от провеждането на модификация за някои проби с ниска активност. Изходните проби проявяват по-слаба активност по алтернативния път. От **фиг. 44В** е видно, че КЕППр АНЧ демонстрира активност едва при най-високата концентрация (~10% при 5 mg/mL). За сметка на това пък

модифицираните продукти показват особено висока активност по алтернативния път, дори и при двукратно по-ниски концентрации (312 $\mu\text{g}/\text{mL}$) спрямо най-ниските тествани и даващи активност по класическия път. Както беше показано по-преди алкохолно-утаимата част на КЕППр АНЧ се характеризира с по-голям дял на РГ-I фрагменти и навярно активирането на комплемента по алтернативния път и по-голямата активност се дължат именно на това. В подкрепа на твърденията се явяват и резултатите на [Крачанова и сътр. \(2000\)](#), които също установяват, че КЕППр АНЧ проявява много слаба активност по алтернативния път (< 10% при 1 mg/mL). Съпоставими с получените тук са и данните за ВЕППр АНЧ, т.к. авторите намират, че при 1 mg/mL инхибирането на хемолизата на заешки еритроцити е < 30%.



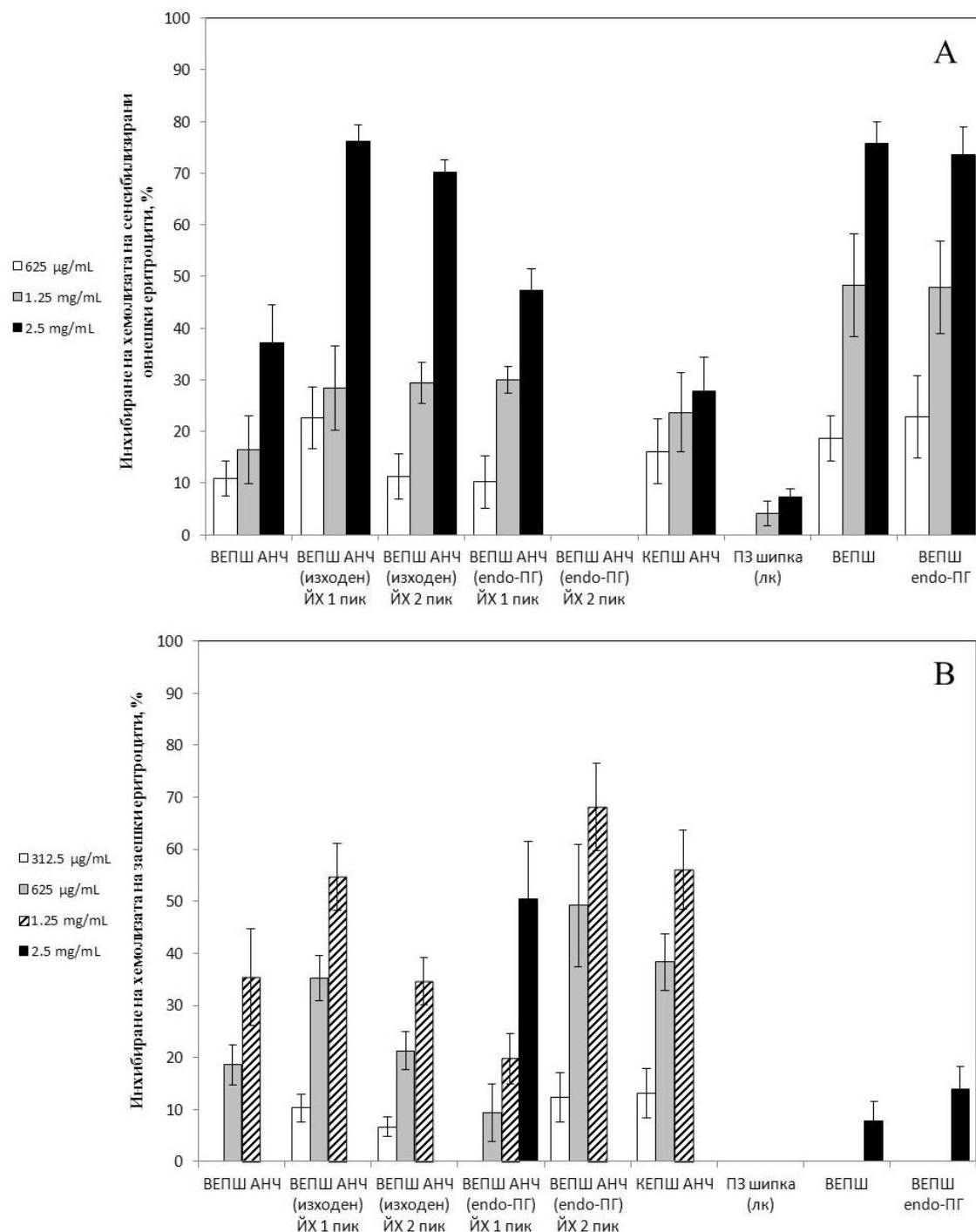
Фигура 44. Антикомплементарна активност на ПП от АНЧ на праз и на алкохолно-утаимите им продукти след модификация с *endo*-ПГ-I, определена чрез *in vitro* активиране на комплемента от човешки серум по класически (А) и алтернативен път (В).

4.7.2.3 Антикомплементарна активност на изходни и модифицирани шипкови пектини

Чрез отделна серия от анализи беше оценено влиянието на серия от ПП екстрахирани от шипкови плодове и АНЧ върху системата на комплемента. На **фиг. 45** са представени получените резултати. Изходният ВЕПШ от АНЧ проявява по-слаба активност спрямо КЕПШ АНЧ по класическия път, но и двете фракции проявяват по-голяма активност по алтернативния път. При едни и същи концентрации (625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) КЕПШ инхибира в по-голяма степен (~40%) хемолизата, сравнявайки го с ВЕПШ (< 20%). Хроматографски разделените ПЗ фракции (пик 1 и 2) еднакво добре активират както класическия, така и алтернативния път. Пречистените модифицирани шипкови пектини показват съществени различия. Докато за ВЕПШ АНЧ (*endo*-ПГ, ЙХ пик 1) не се наблюдават особени разлики по двата пътя (**фиг. 45А** и **В**), то изненадващо „пик 2“ не участва в активирането на комплемента по класическия път, независимо от тествания широк концентрационен диапазон (0.625-2.5 mg/mL). За сметка на това обаче се забелязва висока комплемент-активираща способност по алтернативния път и то при концентрации, които не дават активност по класическия път (312.5 и 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Обяснение за това може да се търси в състава на отделните фракции, тяхната мол. маса, която е по-ниска от тази на другите фракции, както и от чистотата на самата проба. В първата преобладава GalA, респ. ХГ, а частта на предполагаемо по-активния РГ-I е незначителна (**табл. 27**).

Особено интересни са данните за ПЗ изолирани от цели шипкови плодове. Екстрахираният с вода от шипкови плодове ПЗ демонстрира висока комплемент активираща способност по класическия път, която е съпоставима с тази на хроматографски разделените фракции от ВЕПШ АНЧ. ВЕПШ показва по-висока активност от екстрахирания също с вода, но от АНЧ на шипкова люспа ПЗ – при 2.5 mg/mL > 70%, спрямо < 40% при същата концентрация. Тази проба се характеризира с по-малка чистота (~52% общи захари) (**табл. 10**) от ВЕПШ АНЧ, т.к. е екстрахирана директно от необработените плодове, които съдържат и представляват хетерогенна смес от други комплементарни активатори, като полифеноли, протеини и др, за които има данни, че присъстват (**табл. 6**). При тази проба ХГ дял е значително повече (ХГ/РГ-I – 6.4) (**табл. 13**) отколкото при ВЕПШ АНЧ и не би следвало да проявява значителна активност. Вероятно проявената тук се дължи на „странични“ съпътстващи ПЗ вещества. Ензимната модификация на този ПЗ (ВЕПШ *endo*-ПГ) не води до промяна в активността, но това е

обяснимо предвид малките промени, които причинява *endo*-ППГ в неосапунения високоестерифициран (СЕ 64%) субстрат.

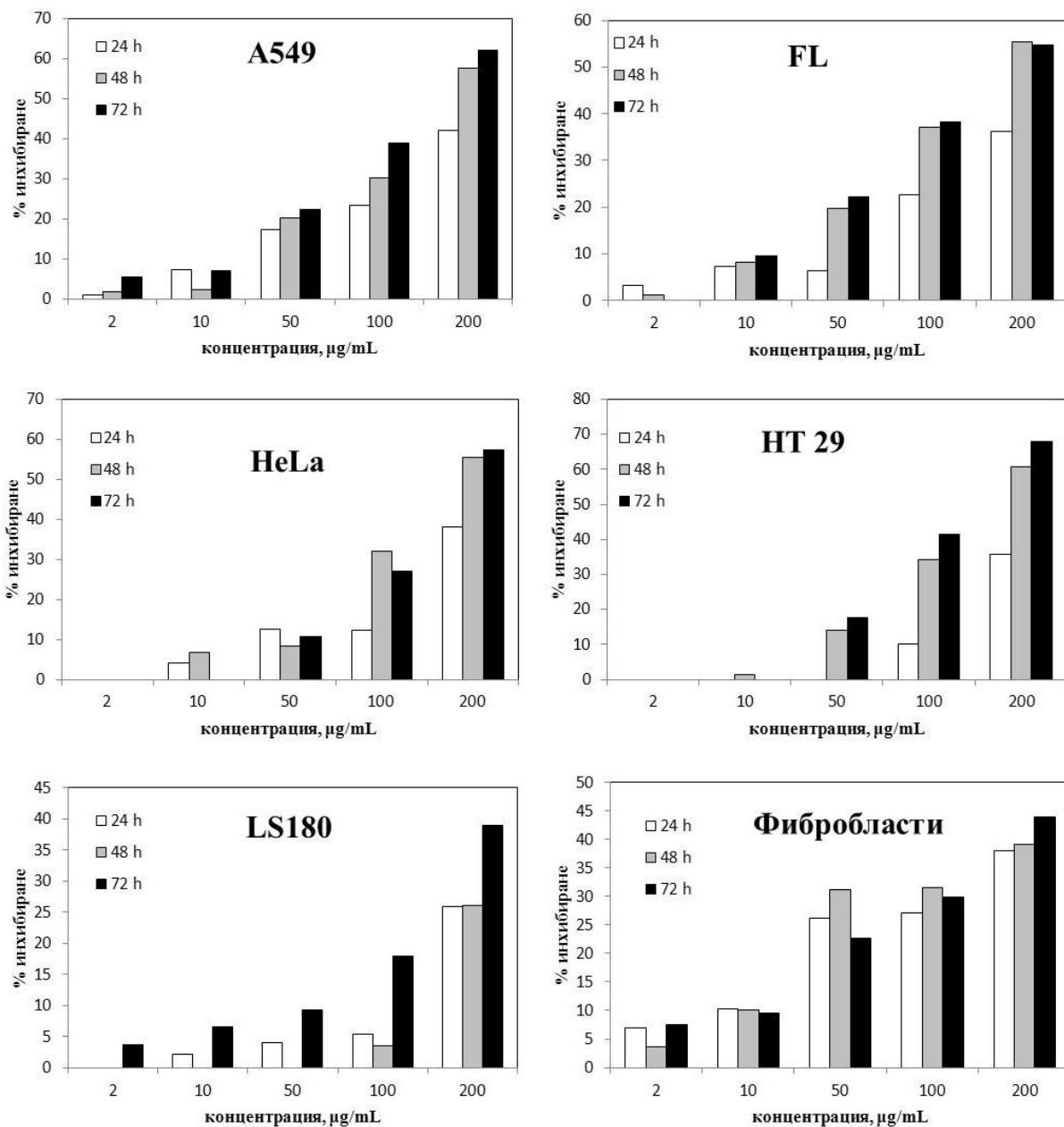


Фигура 45. Антикомплементарна активност на ПП получени от шипкови плодове след съответната предварителна обработка, ензимна модификация и йонообменна хроматография, определена чрез *in vitro* активиране на комплемента от човешки серум по класически (А) и алтернативен път (В). ЙХ – йонообменна хроматография.

Същевременно тези проби не показват активност при тестваните концентрации и като че ли не участват в активирането на комплемента по алтернативния път. От представените резултати прави впечатление и ПЗ шипка (лк). По класическия път тази фракция демонстрира много слабо инхибиране на хемолизата до незначително ($< 10\%$ при 2.5 mg/mL), а по алтернативния път такова въобще не беше отчетено, дори и при най-високата тествана концентрация (2.5 mg/mL). За съжаление твърде малко са публикациите засягащи тези проблеми. В по-старо изследване се демонстрира, че при 1 mg/mL ВЕПШ от АНЧ показва активност $< 10\%$ по класическия път, а КЕПШ притежава по-висока ($\sim 60\%$). По алтернативния път и двете фракции показват слаба активност ($\sim 20\%$) при използваната концентрация (Крачанова и сътр. 2000), което е по-ниско от намереното тук.

4.7.3 Антитуморна (*in vitro* цитотоксична) активност

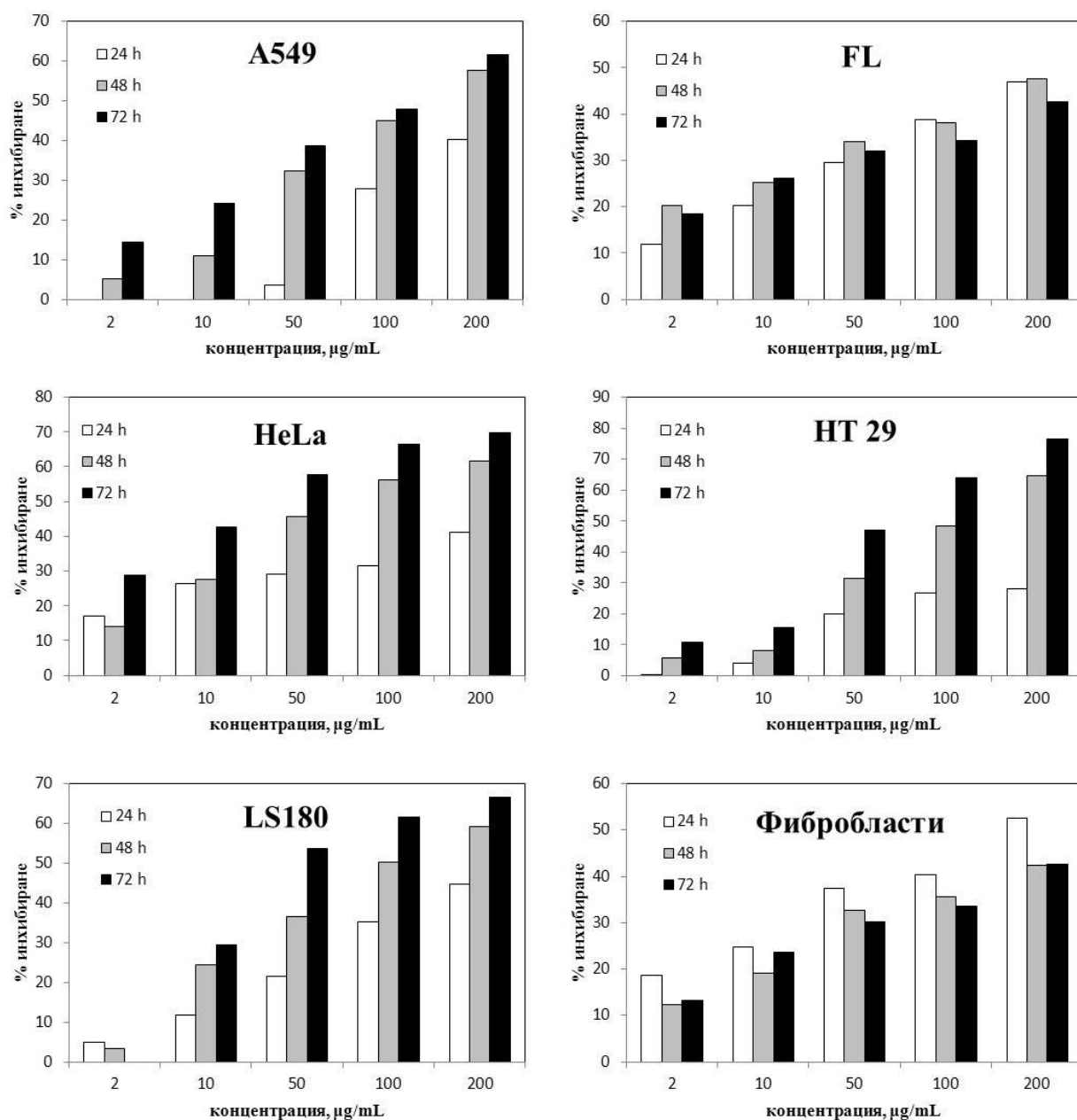
За по-пълната оценка на биологичния потенциал на ВЕПШ и ВЕППр АНЧ беше проведено и *in vitro* цитотоксично изследване срещу 5 бр. туморни клетъчни линии посредством МТТ анализа. От **фиг. 46**, където са представени резултатите за ВЕПШ АНЧ, се вижда, че изследваният ПЗ проявява ясно изразена антитуморна 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. Т.е. при по-голяма концентрация за по-дълго време инхибирането е по-голямо. 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. От резултатите се вижда, че при ниските концентрации ($2\text{-}10 \text{ }\mu\text{g/mL}$) жизнеспособността на клетките HT29 и HeLa се запазва и едва при дози, надхвърлящи $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$, се появява определен цитотоксичен ефект. При LS180 по-значим ефект се забелязва едва при $> 100 \text{ }\mu\text{g/mL}$. 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.



Фигура 46. Антитуморна активност (*in vitro* цитотоксичност) на водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на шипкова люспа (ВЕПШ АНЧ) срещу 6 бр. човешки клетъчни туморни линии.

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. 47). При клетъчни линии А549, 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. 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%.



Фигура 47. Антитуморна активност (*in vitro* цитотоксичност) на водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на праз (ВЕПШ АНЧ) срещу 6 бр. човешки клетъчни туморни линии.

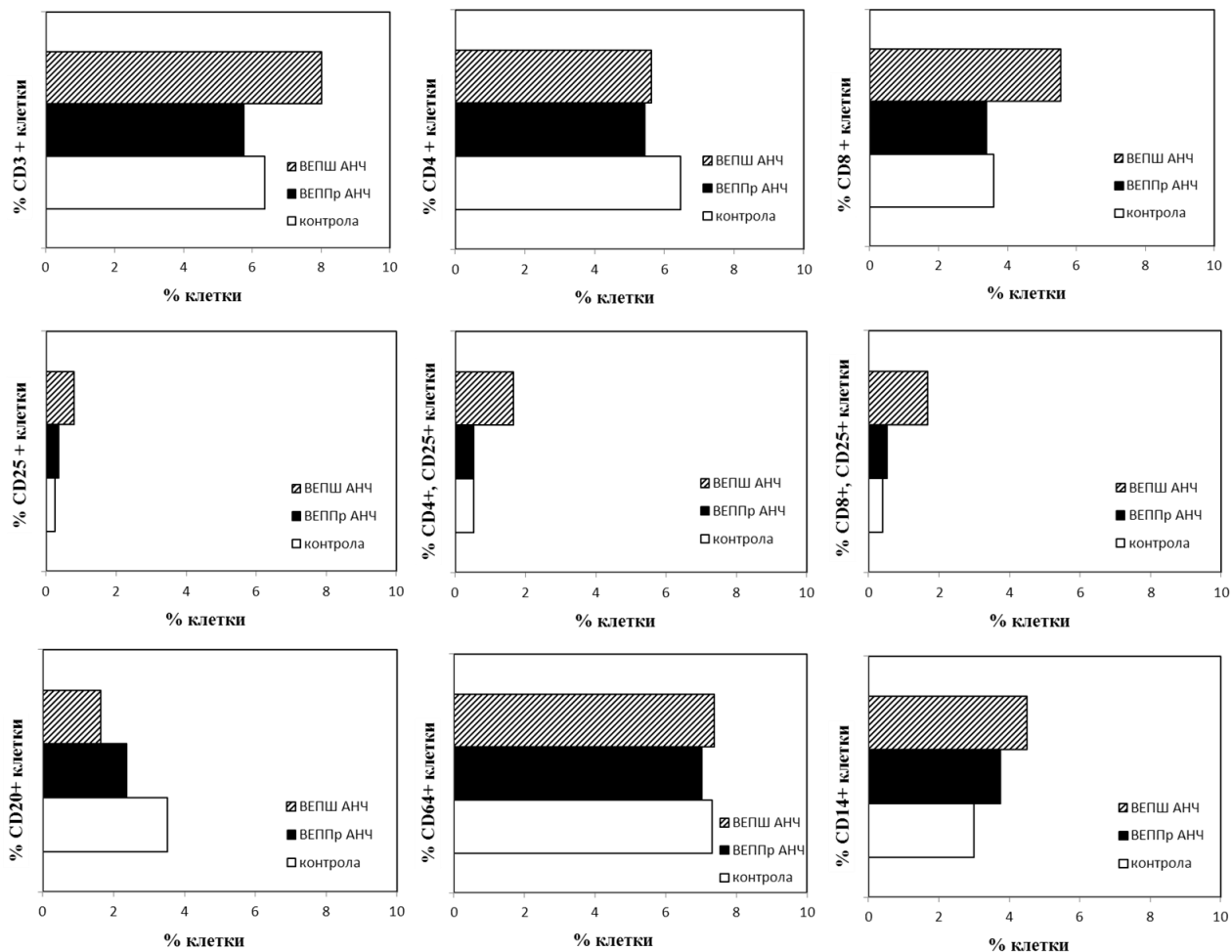
От тези данни може да се направи заключението, че ВЕПШ АНЧ е по-малко токсичен за нормалните клетки, но същевременно притежава и по-слабо изразена активност срещу останалите туморни клетки. Трудно би могло да се установи корелация между съответните проби и цитотоксичната активност, но тя навярно се определя от състава и структурата на страничните вериги от НЗ. Въпреки че и двете проби се характеризират с близки стойности на GalA и Rha съдържание (**табл. 10**), то различия се откриват именно в състава/респ. строежа на страничните вериги от НЗ. ВЕППр АНЧ се характеризира с по-дълги и разклонени странични вериги от НЗ, в които по-голям дял заема Gal (**табл. 13**). При ВЕПШ АНЧ РГ фрагменти заемат относително по-голям дял, но пък страничните вериги са „по-бедни“ на Gal, по-къси и степента на омрежване е по-малка!

След обстоен преглед в достъпната литература не се открива информация за проведени цитотоксични анализи на ПП от шипка и праз. Подобни тестове върху туморни линии (TOV-112D, A549, T47D, HeLa) с тинктури и чайове, приготвени от плодове, корени и листа на *R. rugosa* Thunb., обаче са проведени от [Olech et al. \(2012\)](#). В повечето от случаите инхибирането било между 75 и 95% при концентрация 100 µg/mL на 48 h от инкубирането.

4.7.4 Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити

Анализът се състои в третиране на бели кръвни клетки с ПЗ и измерване продукцията на IL-6, брой на Т- и В-клетъчни субпопулации чрез флоуцитометричен анализ. Третираните и контролните клетки се оцветяват с флуорохром-конюгирани антитела (имунофенотипни маркери), за да се определи броят на Т-клетъчните субпопулации, В-клетки, моноцити, CD64+, белите кръвни клетки и др. Появата на определени маркери (антигени) по повърхността на определени клетъчни популации е важно, т.к. по тях може да се съди както за развитието на дадено заболяване, така и за взаимоотношенията на клетките в микрообкръжаващата среда. На **фиг. 48** са графично илюстрирани резултатите от проведения анализ. От фигурата се вижда, че и двата ПЗ участват в регулацията на клетъчните субпопулации имащи значение при имунния отговор – В- и Т-клетки. Напр. ВЕПШ АНЧ стимулира експресията на CD3+, CD8+ маркирани клетъчни субпопулации, което следва да се тълкува, като стимулиране (ускоряване) узряването на Т-клетките и диференцирането им от останалите клетъчни популации, съдържащи се в човешката кръв. Експресията на CD25 (част от веригата на IL-2 рецептор) маркерните антигени показва

присъствието на активирани Т-регулаторни и В-клетки. Останалите маркери, като CD4 и CD8 могат да се експресират и от останалите клетки, като естествените клетки убийци (NK клетки), дендритните клетки и моноцитите. В процеса на зреене на Т-клетките най-напред се формира CD8, а след това CD4. И двата ПЗ потискат експресията на CD4, което се свързва с разпознаването на определени молекули. Последните маркери са критични за контрола на вирусните инфекции.



Фигура 48. Флоуцитометрично имунофенотипизиране на левкоцити третирани с водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на праз (ВЕППр АНЧ) и водно-екстрахиран пектинов полизахарид от АНЧ на шипкова люспа (ВЕПШ АНЧ).

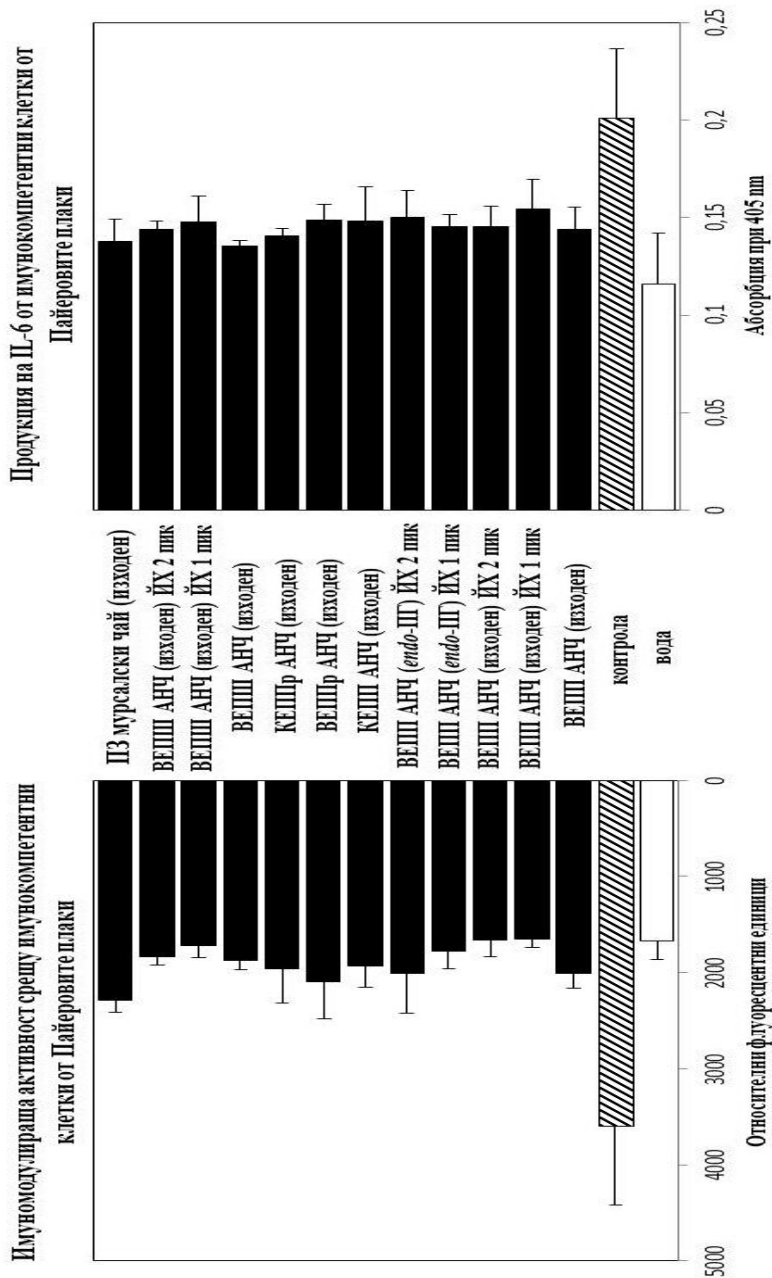
Тестваните ПЗ потискат експресията на В-клетъчно-свързания антиген CD20+. Такъв маркер е свръх експресиран при някои видове лимфоми и левкемии и потискането му е от особено значение. Изследваните ПЗ не повлияват експресията на неутрофилно специфичния рецептор CD64. Високата (интензивна) системна експресия от неутрофили е

свързана с възпалителни процеси. В този случай ПЗ не участват в проинфламаторните процеси. Засилване на продукцията на CD14+ маркер е индикация за промени във функциите на макрофагите и моноцитите. Присъствието им е свързано с потискане на апоптозата на съответните клетъчни популации. Този маркер представлява липополизахарид-свързващ протеин (Fc-рецептор) и участва в активирането на макрофагите. От данните може да се заключи, че шипковият пектин е добър имуномодулятор и заедно с пектина от праз вземат участие в процесите на активирането на имунния отговор. В литературата не са намерени данни, с които може да се сравнят получените тук.

4.7.5 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. 49**. За сравнение е включена и положителна контрола AMOL-1, която представлява ПЗ изолиран от *Astragalus mongholicus*. Ефектът на ПЗ се изразява чрез медирания от Пайеровите плаки хематопоеичен 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 ([Yamada & Kiyohara, 2007](#)). От **фиг. 49** 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 µg/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-угаими части и фракции. От изходните ПЗ може да открием ПЗ от мурсалски чай (> 2000 единици), следван от ВЕПП, ВЕППр и ВЕППШ от АНЧ – всички ~2000 единици.



Фигура 49. Интестинална имуномодулираща активност на избрани ПЗ и ефект на хроматографското им пречистване върху активността. Положителната контрола представлява ПЗ изолиран от *Astragalus mongholicus* (AMOL-1).

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 ($\ll 2000$ единици).

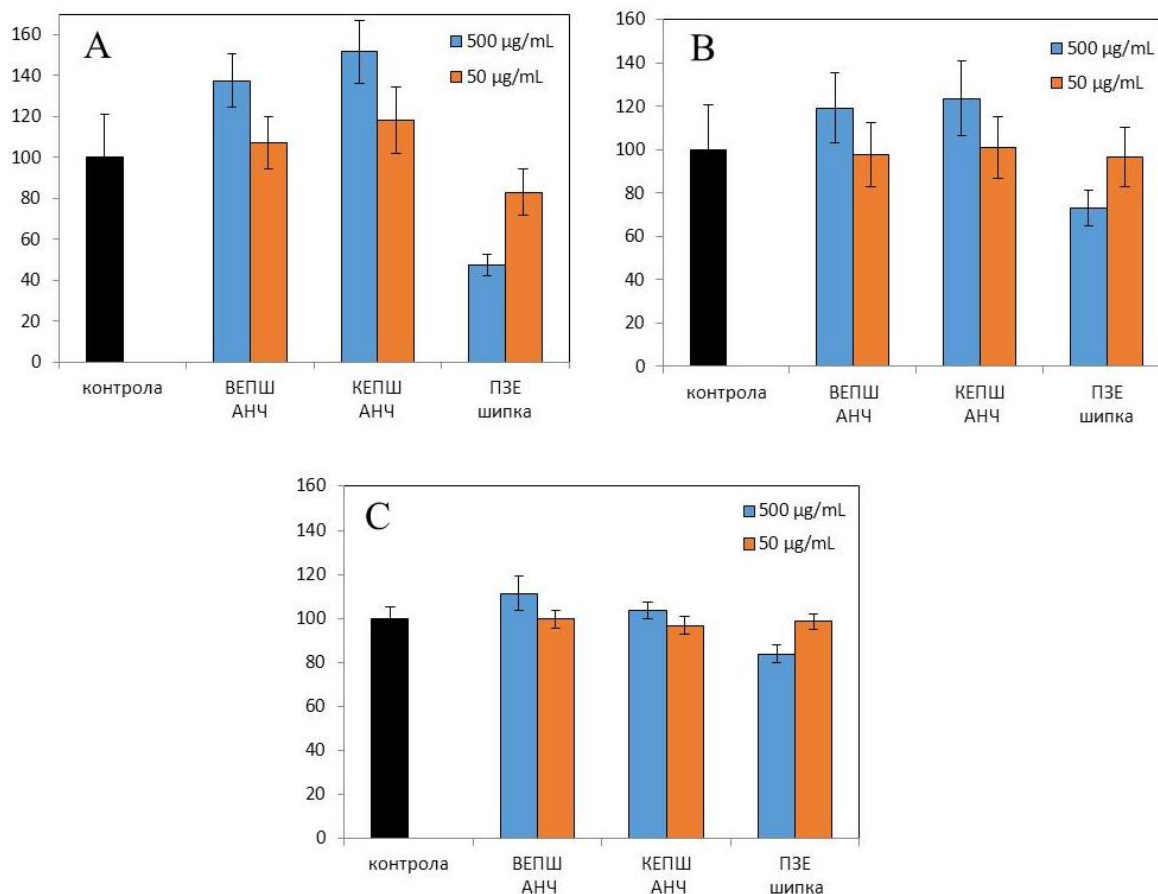
В достъпната литература не се намират резултати от същия *in vitro* тест на ПЗ от праз, шипка и техни модифицирани продукти, което е своеобразен принос към биологичното охарактеризиране на тези пектини. За сметка на това са достъпни изследвания с други ПЗ, изолирани предимно от различни части на лечебни растения (Yamada & Kiyohara, 2007; Kiyohara *et al.*, 2010). Напр. Suh *et al.* (2013) са получили типичен пектинов ПЗ с ХГ и РГ-I региони (CUI-3IIb-3-2) от кори на сацума, който притежавал мощна имуномодулираща активност върху имунните Т- и В-клетки от Пайеровите плаки (100 $\mu\text{g/mL}$, ~ 3000 единици). При ензимна модификация с *endo*-ПГ полизахаридът понижавал своята активност. При *per os* приемане от мишки СЗН/HeJ той предизвиквал повишение в пролиферацията на костномозъчни клетки и продуцирането на GM-CSF/IL-6 от Т- и В-клетки на Пайеровите плаки. За сравнение авторите са използвали и търговски цитрусов и ябълков пектин, като при 100 $\mu\text{g/mL}$ единиците не надвишават 1700 и 1400 единици. В друго *in vivo* изследване Kiyohara, Matsumoto, & Yamada (2002) фракционирали ПЗ TJ-48, като фракция F-5 след едноседмичен прием от мишки (СЗН/HeJ), показала слаба (100 $\mu\text{g/mL}$, ~ 2000 единици), според авторите, но статистически значима интестинална имуномодулация. Друго изследване показва, че ПП изолиран от *Biophytum petersianum* и фрагменти (ВРП.1 и ВРП.2) от него притежават имуномодулираща активност срещу имунокомпетентните клетки в Пайеровите плаки (при 100 $\mu\text{g/mL}$ > 3000 единици) (Grønhaug *et al.*, 2011).

4.7.6 Измерване продукцията на РФК от фагоцити

Заедно с гореописаните анализи, с помощта на които се оценява биологичната активност и значимост, е проведено и проучване върху ефекта на ВЕПШ и КЕПШ от АНЧ върху продукцията на РФК от фагоцити. Резултатите от този анализ са показани на **фиг. 50**. Към тях за сравнение са добавени и резултати получени от тестването на проба ПЗЕ шипка. 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. 50С) се отчита основната продукция на РФК в неактивирани неутрофили в присъствието на ПЗ. В настоящето изследване двата шипкови ПЗ слабо активират продукцията на РФК по дозозависим начин (фиг. 50С). При по-ниските концентрации (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 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 (табл. 38), 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).

По-интересни са резултатите за сравнителната проба ПЗЕ шипка. От данните се забелязва, че ефектът на ПЗЕ шипка намалява и в двата случая, при активирани и неактивирани клетки с PMA и OZP, когато концентрацията е 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Фигура 50. Ефект на шипкови ПЗ върху продукцията на РФК от нестимулирани (С) и стимулирани (OZP- (А) и PMA- (В)) човешки неутрофили. ПЗЕ – полизахариден екстракт.

Този ефект е по-изразен, когато използваната концентрация на ПЗ е 500 µg/mL. В случая не бива да се изключва и възможността наблюдаваното понижение да се дължи на АО активност на съдържащите се полифенолни вещества (или др.) в пробата (19.6%), които потискат хемилуминесценцията чрез улавяне на образуваните РФК. При по-висока концентрация (500 µg/mL) на пробата освен по-висока концентрация на ПЗ се осигурява и по-голяма („активна“) концентрация на останалите „съпътстващи вещества“ в пробата, участващи в инхибиране продукцията на РФК. Въпреки че са изолирани от един и същ вид суровина, двата шипкови ПЗ се различават по своя ефект от ПЗЕ шипка. Вероятно този вид активност се определя от състава и структурата на тестваните ПЗ, който от своя страна зависи от първоначалната обработка (или липсата на такава) на суровината и екстракционния подход при извличането на ПЗ. Строго съпоставяне на получените тук данни с литературните не може да се направи, поради липсата на информация за влиянието на шипковите ПЗ върху неутрофилите. Въпреки това резултатите са в съгласие с намереното и от други автори за ПЗ извлечени от други растителни видове. Напр. в своите изследвания [Schepetkin et al. \(2008\)](#) изолират ПЗ от опунция (*Opuntia polyacantha*) и доказват, че той притежава не само имуномодулаторна активност, но и способност да активира продукцията на РФК. В литературата съществуват обаче и данни, които се различават в по-голямата си част от получените тук. [Nikolova et al. \(2013\)](#) проучват ефекта на ПЗ от праз и съобщават, че ПЗ от праз понижават по концентрационно-зависим начин едновременно както спонтанно, така и РМА и OZP-стимулираната продукция на РФК.

4.8 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 описаната технология (т. 3.3.1.3) е 150 L ([Kratchanov, personal communication](#)). Получената напитка е охарактеризирана по съдържание на ОПФ (6990.7 mg/L), антоциани (след стерилизация) – 146.9 mg/L и ORAC АО активност – 72456 µmol 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 показали, че тази плодова напитка има добре изразен кардиопротективен ефект и антиейджинг ефект, а консумацията и от пациенти, болни от диабет тип II, довела до подобряване качеството им на живот (кръвната захар се понижила с 8 до 12%) ([Kratchanov, personal communication](#)).

5. ИЗВОДИ (CONCLUSION)

5.1 Получени и охарактеризирани са по сумарен добив на пектин алкохолно-неразтворими части от портокалови, лимонови 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.

5.2 Получени и охарактеризирани по основни показатели са водно- и киселинно-разтворими пектинови фракции от АНЧ на портокалови и лимонови 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-екстрахирани фракции са с по-нисък добив спрямо тези извлечени с разрежена киселина. Добивът на полизахарид от мурсалски чай е най-нисък спрямо всички останали суровини.

5.3 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 вискоестерифицирани, 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 екстрахирани с разрежена солна киселина.

5.4 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 НЗ в изследваните фракции са Ara, Gal и Rha, но количествените различия са значителни. Единствено при КЕППр АНЧ НЗ заемат по-голям дял отколкото уронидната част.

5.5 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 Ага 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.

5.5.1 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.

5.5.2 Установено е чрез гел- и йонообменна хроматография, че изследваните водно-екстрахирани полизахариди от цитрусови кори и шипкова люспа съдържат различни пектинови популации, различаващи се по СЕ и разпределение на Me-естерните групи в тях. Осапунването е необходимо, но не и достатъчно условие за пълния хидролиз на ПП от тези суровини.

5.6 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 Me-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 Me-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 Me-естерифицирани GalA последователности и области със специфично Me- и Ac-естерно разпределение, осигуряващи резистентност към използваните ензими. ХГ на киселинно-екстрахираните пектини съдържа не само незаместени, но и къси области от самостоятелно O-ацетилвани GalA звена, които при КЕППр АНЧ са локализираны преимуществено в РГ-областите.

5.6.1 Установено е присъствието в алкохолно-утаимите части след *endo*-ПГ-I на локализираните в непосредствена близост до РГ-областите на къси неестерифицирани ХГ-последователности.

5.7 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 пектинлиази-разградими Ме-естерифицирани GalA блокове, както и от области, които са едновременно блоково *O*-ацетилвани и случайно Ме-естерифицирани. Установено е, че при ПЗ мурсалски чай Ас-групи са локализираните само в области, които се атакуват само от *endo*-ПГ-II и не се срещат едно и/или две GalA звена, които да са едновременно *O*-Ас- и Ме-естерифицирани.

5.8 Оценена е ORAC и HORAC АО активност на избрани полизахариди. За проявяването 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.

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

5.10 Изходните полизахариди от цитрусови кори, праз и шипкова люспа, както и техните модифицирани с *endo*-ПГ-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 β -(1→4)-връзките не са есенциални за проявлението ѝ.

5.11 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.

5.12 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 ПЛ-6.

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

5.14 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 антиейджинк ефект.

6. 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 Me-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 демонстрирано присъствието на различаващи се по СЕ и разпределение на Me-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 информацията относно вида на разпределението на Me-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 способности върху проявлението на антиоксидантна активност от тях. Хвърлена е светлина върху ролята на ПЗ в наблюденията с тяхно участие АО ефект.

Проследено е влиянието на ензимната модификация върху проявлението на *in vitro* антикомплементарната активност. За първи път е получена информацията 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.

7. ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Караколев, Г., Ил. Огнянов, М. Маринов (1956). Пектинови вещества. Химия, производство и приложение. Държавно из-во „Наука и изкуство“, С., 159 стр.
- Кирчев, Н., Хр. Крачанов и Н. Генов (1980). Характеристика на пектиновите вещества на диворастящи шипки. *Н. тр. на ВИХВП*, т. 27, св. 2: 109-119.
- Крачанов, Хр., Ал. Фикиин, В. Карагъзов (1977). Приложение на ябълковия пектин в производството на замразени впенени плодови кремове. *Н. тр. на ВИХВП*, т. 24, св. 1: 149-160.
- Крачанова, М., Ив. Панчев, Ил. Динков, Л. Щерева – Метод за получаване на пектин – Авторско свидетелство за изобретение № 50891 с приоритет от 30.07.1990 г., рег. № 92567.
- Крачанова, М., Е. Павлова, Л. Рачева, В. Късовски, П. Денев (2000). Имунологично активни пектинови полизахариди от растителен произход. *Н. тр. на ВИХВП*, т. 44, св. 1: 208-214.
- Попова, М., Д. Начков, Цв. Обретенов, Хр. Крачанов, Н. Кирчев (1979). Върху приложението на природни адсорбенти за стабилизиране на алкохолни напитки. II. Обработка на винен дестилат и бренди с полиурониди. *Н. тр. на ВИХВП*, т. 26, св. 2: 189-196.
- Стойков, Ст., Хр. Г. Крачанов, В. Николова (1962). Фактори, влияещи на желирните свойства на слънчогледовия пектин. III. Влияние на ацетилното съдържание върху здравината на 65% захарни желета. *Н. тр. на ВИХВП*, т. 9: 245-250.
- Чанева, М., Ст. Стамов, Хр. Крачанов, А. Братанов (1978). Технология и състав на доматиена заливка за рибни консерви. *Трудове на Института по рибна промишленост – Бургас*, т. 5-6: 149-157.
- Ahmed, A. el R. & J. M. Labavitch (1978). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*, 1: 361-365.
- Alba, K., A. P. Laws, & V. Kontogiorgos (2015). Isolation and characterization of acetylated LM-pectins extracted from okra pods. *Food Hydrocolloids*, 43: 726–735.
- Albersheim, P., D. J. Nevins, P. D. English, & A. Karr (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydrate Research*, 5: 340-345.
- Albersheim, P., A. G. Darvill, M. A. O'Neill, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1996). An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: *Pectins and Pectinases*, J. Visser & A. G. J. Voragen (Eds.). Elsevier Science B.V., vol. 14, pp. 47-55.

- Al-Tamini, M. A. H. M., R. J. Palframan, J. M. Cooper, G. R. Gibson, & R. A. Restall (2005). *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 407-414.
- Anthon, G. E. & D. M. Barrett (2008). Combined enzymatic and colorimetric method for determining the uronic acid and methylester content of pectin: Application to tomato products. *Food Chemistry*, 110: 239–247.
- Bar-Peled, M., B. R. Urbanowicz, & M. A. O'Neill (2012). The synthesis and origin of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II – insights from nucleotide sugar formation and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3: 1-12.
- Barros, M., A. M. Coimbra, A. Barros, D. Rutledge, & I. Delgadillo (1997). Analysis of uronic acid in pectic material by FT-IR spectroscopy. In: *Spectroscopy of Biological Molecules: Modern Trends*, P. Carmona, R. Navarro & A. Hernanz (Eds.). Kluwer Academic Publishers, pp. 275-276.
- Baur, L. & K. P. Link (1935). The methylglycosides of the naturally occurring hexuronic acids: IV. Polygalacturonic acid-methylglycosides derived from Ehrlich's "Pektolsäure" and "Pektolactonsäure". *Journal of Biological Chemistry*, 109: 293-299.
- Beldman, G., L. A. M. van den Boek, H. A. Schols, M. J. F. Searle-Van Leeuwen, K. M. J. van Leare, & A. G. J. Voragen, (1996). An exogalacturonase from *Aspergillus aculeatus* able to degrade xylogalacturonan. *Biotechnology Letters*, 18: 707-712.
- Beldman, G., H. A. Schols, S. M. Pitson, M. J. F. Searle-van Leeuwen, & A. G. J. Voragen (1997). Arabinans and arabinan degrading enzymes. In: *Advances in Macromolecular Carbohydrate Research*, R. J. Sturgeon (Ed.). JAI Press Inc., vol. 1, pp. 1-64.
- Bergman, M., D. Djaldetti, H. Salman, & H. Bessler (2010). Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 64: 44-47.
- Bicu, I. & F. Mustata (2011). Cellulose extraction from orange peel using sulfite digestion reagents. *Bioresource Technology*, 102: 10013–10019.
- Bitter, T. & H. M. Muir (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4: 330-334.
- Blakeney, A. B., P. J. Harris, R. J. Henry, & B. A. Stone (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydrate Research*, 113: 291-299.
- Blumenkrantz, N. & G. Asboe-Hansen (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54: 484-489.
- Braconnot, H. (1825a). Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Annales de Chimie et de Physique*, 28: 173-178.
- Braconnot, H. (1825b). Nouvelles observations sur l'acide pectique. *Annales de Chimie et de Physique* 30: 96–102.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Buffetto, F., D. Ropartz, X. J. Zhang, H. J. Gilbert, F. Guillon, & M.-C. Ralet (2014). Recovery and fine structure variability of RGII sub-domains in wine (*Vitis vinifera* Merlot). *Annals of Botany*, 114 (6): 1327-1337.
- Caffall, K. H. & D. Mohnen (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344: 1879–1900.
- Calce, E., E. Mignogna, V. Bugatti, M. Galdiero, V. Vittoria, & S. De Luca (2014). Pectin functionalized with natural fatty acids as antimicrobial agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 68: 28-32.
- Carpita, N. C. & D. M. Gibeaut (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3: 1-30.
- Catoire, L., R. Goldberg, M. Pierron, C. Morvan, & C. Harvé du Penhoat (1998). An efficient procedure for studying pectin structure which combines limited depolymerization and ¹³C NMR. *European Biophysics Journal*, 27: 127-136.
- Cesaretti, M., E. Luppi, F. Maccari, & N. Volpi (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*, 54: 59–61.
- Chambat, G., J.-P. Joseleau, & F. Barnoud (1981). The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures of *Rosa glauca*. *Phytochemistry*, 20: 241-246.
- Cipriani, T. R., C. G. Mellinger, L. M. de Souza, C. H. Baggio, C. S. Freitas, M. C. A. Marques, P. A. J. Gorin, G. L. Sasaki, & M. Iacomini (2009). Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*, 78: 361-363.
- Číž, M., H. Čížová, P. Denev, M. Kratchanova, A. Slavov, & A. Lojek (2010). Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control*, 21: 518–523.
- Colquhoun, I. J., G. A. de Ruiter, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1990). Identification by NMR spectroscopy of oligosaccharides obtained by treatment of the hairy region of apple pectin with rhamnolacturonase. *Carbohydrate Research*, 206: 131-144.
- Combo, A. M. M., M. Aguedo, D. Goffin, B. Wathelet, & M. Paquot (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 588-596.
- Courts, F. L. (2013). Profiling of modified citrus pectin oligosaccharide transport across Caco-2 cell monolayers. *PharmaNutrition*, 1: 22-31.

- Daas, P. J. H., K. Meyer-Hansen, H. A. Schols, G. A. De Ruiter, & A. G. J. Voragen (1999). Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*, 318: 135-145.
- Daas, P. J. H., A. G. J. Voragen, & H. A. Schols (2000). Characterization of non-esterified galacturonic acid sequences in pectin with endopolygalacturonase. *Carbohydrate Research*, 326: 120–129.
- Daas, P. J. H., B. Boxma, A. M. C. P. Hopman, A. G. J. Voragen, & H. A. Schols (2001). Nonesterified galacturonic acid sequence homology of pectins. *Biopolymers*, 58: 1-8.
- Daoud, Z., M. Sura, & R. M. Abdel-Massih (2013). Pectin shows antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. *Advances in Bioscience & Biotechnology*, 4: 273-277.
- Darvill, A. G., M. McNeil, & P. Albersheim (1978). Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiology*, 62: 418-422.
- Darvill, A. G., P. Albersheim, M. McNeil, J. M. Lau, W. S. York, T. T. Stevenson, J. Thomas, S. Doares, D. J. Gollin, P. Chelf, & K. Davis (1985). Structure and function of plant cell wall polysaccharides. *Journal of Cell Sciences*, Suppl. 2: 203-217.
- Denev, P. & Chr. Kratchanov (1996). Influence of some cations on the reaction of apple pectin with ammonia in homogeneous media. In: *Pectins and Pectinases*, J. Visser & A. G. J. Voragen (Eds.). Elsevier Science B.V., *Progress in Biotechnology*, 14: 527-533.
- Denev, P., A. Lojek, M. Ciz, & M. Kratchanova (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of Bulgarian fruits. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 19: 22-27.
- De Oliveira, A. J. B., L. M. C. Cordeiro, R. A. C. Gonçalves, L. F. Ceole, T. Ueda-Nakamura, & M. Iacomini (2013). Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-β-D-galactan core from *Stevia rebaudiana* leaves. *Carbohydrate Polymers*, 94: 179-184.
- De Ruiter, G., H. A. Schols, A. G. J. Voragen, & Fr. M. Rombouts (1992). Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid-containing polysaccharides with high-performance anion-exchange chromatography using methanolysis combined with TFA hydrolysis is superior to four other methods. *Analytical Biochemistry*, 207: 176-185.
- De Vries, J. A., A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, & W. Pilnik (1981). Extraction and purification of pectins from alcohol insoluble solids from ripe and unripe apples. *Carbohydrate Polymers*, 1: 117-127.
- De Vries, J. A., F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1982). Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydrate Polymers*, 2: 25-33.
- De Vries, J. A., F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1983). Distribution of methoxyl groups in apple pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 3: 245-258.

- De Vries, J. A., F. M. Rombouts, A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1984). Comparison of the structural features of apple and citrus pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 4: 89–101.
- De Vries, R. P., H. C. M. Kester, C. H. Poulsen, J. A. E. Benen, & J. Visser (2000). Synergy between accessory enzymes from *Aspergillus* in the degradation of plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 327: 401-410.
- De Vries, R. P. & J. Visser (2003). Enzymes releasing L-arabinose and D-galactose from the side chains of pectin. In: *Handbook of Food Enzymology*, J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen & D. W.S. Wong (Eds.). Marcel Dekker, Inc., ch. 70.
- Dische, Z. (1947). A specific color reaction for glucuronic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 171: 725-730.
- Doco, T. & J.-M. Brillouet (1993). Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243: 333-343.
- Dongowski, G. (1995). Influence of pectin structure on the interaction with bile acids under *in vitro* conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, 201: 390-398.
- Dongowski, G. & A. Lorenz (1998). Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by *in vitro* treatment of pectin with human faecal flora. *Carbohydrate Research*, 314: 237-244.
- Du, H., A. E. Clarke, & A. Bacic (1996). Arabinogalactan-proteins: a class of extracellular matrix proteoglycans involved in plant growth and development. *Trends in Cell Biology*, 6: 411-414.
- Eaks, I. L. & W. B. Sinclair (1980). Cellulose-hemicellulose fractions in the alcohol-insoluble solids of Valencia orange peel. *Journal of Food Science*, 45: 985–988.
- Ehrlich, F. (1927). Neue Untersuchungen über Pektinstoffe. *Angewandte Chemie*, 40: 1305–1313.
- Ehrlich, F. & Fr. Schubert (1929). Über die Chemie der Pektinstoffe: Tetra-galakturonsäuren und d-Galakturonsäure aus dem Pektin der Zuckerrübe. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 62: 1974-2027.
- Eliaz, I., A. T. Hotchkiss, M. L. Fishman, & D. Rode (2006). The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. *Phytotherapy Research*, 20: 859-864.
- Eliaz, I., J. Guardino, & K. Hughes (2006). The health benefits of modified citrus pectin. In: Potential health benefits of citrus, B. S. Patil, N. D. Turner, E. G. Miller, J. S. Brodbelt (eds.). *ACS Symposium Series*, 936: 199-210.
- El-Nakeeb, M. A. & R. T. Yousef (1970). Study of antimicrobial action of pectin. I. Antibacterial and antifungal activities of pectin. *Planta Medica*, 18: 201-209.

- Endress, H. U. (2011). Pectins: production, properties and applications. In: *Renewable Resources for Functional Polymers and Biomaterials*, P.A. Williams (ed.). RSC Polymer Chemistry Series, 1: 210-260.
- Englyst, H. N. & J. H. Cummings (1984). Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst*, 109: 937-942.
- Filippov, M. P. (1972). IR spectra of pectin films. *Journal of Applied Spectroscopy*, 17: 1052-1054.
- Filippov, M. P. (1992). Practical infrared spectroscopy of pectic substances. *Food Hydrocolloids*, 6: 115-142.
- Fincher, G. B., B. A. Stone, & A. E. Clarke (1983). Arabinogalactan-protein: structure, biosynthesis, and function. *Annual Review of Plant Physiology*, 34: 47-70.
- Francine, M. K., W. A. Louise, F. S. Pythagore, A.-T. Barbara, S. Gustave, & T. Boudjeko (2014). Antioxidant properties of cell wall polysaccharides of *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2: 962-969.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology*, 37: 165-186.
- Fuchs, N. K. (2003). Modified citrus pectin (MCP). A super nutraceutical. In: *Basic Health Publications Inc. series*, C. Rosenberg (ed.), North Bergen, USA, pp. 43, ISBN: 1-59120-104-7.
- Gaspar, Y., K. L. Johnson, J. A. McKenna, A. Bacic, & C. J. Schultz (2001). The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, 47: 161-176.
- Glinsky, V. V. & A. Raz (2009). Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets. *Carbohydrate Research*, 344: 1788-1791.
- Gnanasambandam, R. & A. Proctor (2000). Determination of pectin degree of esterification by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 68: 327-332.
- Gorinstein, S., O. Martín-Belloso, Y.-S. Park, R. Haruenkit, A. Lojek, M. Číž, A. Caspi, I. Libman, & S. Trakhtenberg (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74: 309-315.
- Gómez, B., B. Gullón, C. Remoroza, H. A. Schols, J. C. Parajó, & J. L. Alonso (2014). Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 62: 9769-9782.
- Grant, G. T., E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. C. Smith, & D. Thom (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters*, 32: 195-198.

- Groudeva, J., M. G. Kratchanova, I. N. Panchev, & Chr. G. Kratchanov (1997). Application of granulated apple pectin in the treatment of hyperlipoproteinaemia. I. Deriving the regression equation to describe the changes. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 204: 374-378.
- Grønhaug, T. E., H. Kiyohara, A. Sveaass, D. Diallo, H. Yamada, & B. S. Paulsen (2011). Beta-D-(1→4)-galactan-containing side chains in RG-I regions of pectic polysaccharides from *Biophytum petersianum* Klotzsch. contribute to expression of immunomodulating activity against intestinal Peyer's patch cells and macrophages. *Phytochemistry*, 72: 2139-2147.
- Guo, X., D. Han, Huping Xi, L. Rao, X. Liao, X. Hu, & J. Wu (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88: 441-448.
- Guo, X., H. Meng, S. Zhu, Q. Tang, R. Pan, & S. Yu (2016). Stepwise ethanolic precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract. *Carbohydrate Polymers*, 136: 316-321.
- Hart, D. A. & P. K. Kindel (1970). Isolation and partial characterization of apiogalacturonans from the cell wall of *Lemna minor*. *Biochemical Journal*, 116: 569-579.
- Haque, M. A., T. Kotake, & Y. Tsumuraya (2005). Mode of action of β -glucuronidase from *Aspergillus niger* on the sugar chains of arabinogalactan-protein. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, 69: 2170-2177.
- Hayami, I., Y. Motomura, & T. Nishizawa (2007). Antioxidant activity of cell wall polysaccharides in mung bean sprout hypocotyls. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 54: 247-252.
- Hellin, P., M.-C. Ralet, E. Bonnin, & J.-F. Thibault (2005). Homogalacturonans from lime pectins exhibit homogeneous charge density and molar mass distributions. *Carbohydrate Polymers*, 60: 307-317.
- Henglein, F. A. & G. Schneider (1936). Über die Veresterung von Pektinstoffen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 69: 309-324.
- Hervé du Penhoat, C., C. Gey, P. Pellerin, & S. Perez (1999). An NMR solution study of the mega-oligosaccharide, rhamnogalacturonan II. *Journal of Biomolecular NMR*, 14: 253-271.
- Hinz, S. W. A., R. Verhoef, H. A. Schols, J.-P. Vincken, & A. G. J. Voragen (2005). Type I arabinogalactan contains β -D-Galp-(1→3)- β -D-Galp structural elements. *Carbohydrate Research*, 340: 2135-2143.
- Hong, T., T. Matsumoto, H. Kiyohara, & H. Yamada (1998). Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patches by oral administration of Kampo (Japanese herbal) medicine, "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine*, 5: 353-360.

- Hotchkiss, A. T., E. Olano-Martin, W. E. Grace, G. R. Gibson, & R. A. Rastall (2003). Pectic oligosaccharides as prebiotics. In: *Oligosaccharides in Food and Agriculture*, G. Eggleston & G. L. Côté (eds.). *ACS Symposium Series*, 849: 54-62.
- Huisman, M. M. H., L. P. Brüll, J. E. Thomas-Oates, J. Haverkamp, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (2001). The occurrence of internal (1→5)-linked arabinofuranose and arabinopyranose residues in arabinogalactan side chains from soybean pectic substances. *Carbohydrate Research*, 330: 103-114.
- Ichinose, H., T. Kotake, Y. Tsumuraya, & S. Kaneko (2008). Characterization of an *Endo-β*-1,6-galactanase from *Streptomyces avermitilis* NBRC14893. *Applied & Environmental Microbiology*, 74: 2379-2383.
- Iiyama, K., T. B.-T. Lam, & B. A. Stone (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*, 104: 315-320.
- Immerzeel, P., M. M. Eppink, S. C. de Vries, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (2006). Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiologia Plantarum*, 128: 18-28.
- Ivanov, K., M. Popova, P. Denev, & Chr. Kratchanov (1992). Application of polyuronides for removing heavy metals from vegetable oils II. Application of chemically modified polyuronides for demetalization of hydrogenated sunflower oil. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 194: 26-28.
- Jarvis, M. C. (2011). Plant cell walls: Supramolecular assemblies. *Food Hydrocolloids*, 25: 257-262.
- Kačuráková, M., P. Capek, V. Sasinková, N. Wellner, & A. Ebringerová (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43: 195-203.
- Keegstra, K., K. W. Talmadge, W. D. Bauer, & P. Albersheim (1973). The structure of plant cell walls. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components. *Plant Physiology*, 51: 188-196.
- Kar, F. & N. Arslan (1999). Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, l-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*, 40: 285-291.
- Kermani, Z. J., A. Shpigelman, H. T. T. Pham, A. M. Van Loey, & M. E. Hendrickx (2015). Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure. *Food Hydrocolloids*, 44: 424-434.
- Kertesz, Z. I. (1951). *The Pectic Substances*. Interscience Publishing Inc., New York.
- Kester, H. C. M., J. A. E. Benen, & J. Visser (1999). The exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis* is also active on xylogalacturonan. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 30: 53-57.

- Khodzhaeva, M. A., Sagdullaev, B. T., Turakhozhaev, M. T., & Kh. N. Aripov (1998). Carbohydrates of the fruit of *Rosa canina*. *Chemistry of Natural Compounds*, 34: 736-737.
- Khotimchenko, M. Yu. & E. A. Kolenchenko (2007). Efficiency of low-esterified pectin in toxic damage to the liver inflicted by lead treatment. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine*, 144: 60-62.
- Kivirikko, K. I. & M. Liesmaa (1959). A colorimetric method for determination of hydroxyproline in tissue hydrolysates. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 11: 128-133.
- Kiyohara, H., J. C. Cyong, & H. Yamada (1988). Structural characterization of anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagava. *Carbohydrate Research*, 182: 259-275.
- Kiyohara, H., T. Matsumoto, & H. Yamada (2002). Intestinal immune system modulating polysaccharides in a Japanese herbal (Kampo) medicine, Juzen-Taiho-To. *Phytomedicine*, 9: 614-624.
- Kiyohara, H., T. Uchida, M. Takakiwa, T. Matsuzaki, N. Hada, T. Takeda, T. Shibata, & H. Yamada (2010). Different contributions of side-chains in β -D-(1 \rightarrow 3,6)-galactans on intestinal Peyer's patch-immunomodulation by polysaccharides from *Astragalus mongholicus* Bunge. *Phytochemistry*, 71: 280-293.
- Kiyohara, H., K. Nonaka, M. Sekiya, T. Matsumoto, T. Nagai, Y. Tabuchi, & H. Yamada (2011). Polysaccharide-containing macromolecules in a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, Hochuekkito: dual active ingredients for modulation of immune functions on intestinal Peyer's patches and epithelial cells. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, vol 2011, Article ID 492691, 13 pp.
- Klavons, J. A. & R. D. Bennett (1986). Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 34: 597-599.
- Klerx, J. P. A. M., C. J. Beukelman, V. H. Dijk, & J. M. N. Willers (1983). Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *Journal of Immunological Methods*, 63: 215-220.
- Kles, K. A. & F. B. Chang (2006). Short-chain fatty acids impact on intestinal adaptation, inflammation, carcinoma, and failure. *Gastroenterology*, 130: S100-S105.
- Komalavilas, P. & A. J. Mort (1989). The acetylation at O-3 of galacturonic acid in the rhamnose-rich portion of pectins. *Carbohydrate Research*, 189: 261-272.
- Kratchanov, Christo G., personal communication.

- Kratchanov, Chr. & M. Popova (1968). Résolutions chromatographiques de racémiques sur échangeurs d'ions naturels, optiquement actifs: I. Résolution de bases organiques sur l'acide polygalacturonique. *Journal of Chromatography A*, 37: 297-303.
- Kratchanov, Chr., St. Stamov, M. Popova, & M. Kuntscheva (1978). Emulgierfähigkeit von Äthylestern des Sonnenblumenpektins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 167: 338-341.
- Kratchanov, Chr. G., M. Kuntcheva, & N. Kirtchev (1980). Synthesis and properties of ethyl esters of sunflower pectic acid. *Carbohydrate Research*, 80: 350-353.
- Kratchanov, Chr. G. & M. Il. Popova (1982). Application of polyuronides as optically active ion exchangers. *Journal of Chromatography A*, 241: 197–203.
- Kratchanov, C. & A. Bratanoff (1982). Characterization of sunflower pectins depending on the maturity stage of plants. *Helia*, 05: 49-52.
- Kratchanov, C., K. Marev, N. Kirchev, & A. Bratanoff (1986). Improving pectin technology: extraction using pulsating hydrodynamic action. *Journal of Food Technology*, 21: 751-761.
- Kratchanov, Chr., P. Denev, & M. Kratchanova (1989). Reaction of apple pectin with ammonia. *International Journal of Food Science & Technology*, 24: 261-267.
- Kratchanov, Ch. & M. Popova (1990). Increasing the purity of polyuronic sorbents. *Journal of Chromatography A*, 509: 239–243.
- Kratchanova, M., E. Pavlova, & I. Panchev (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56: 181-185.
- Kratchanova, M., A. Slavov, & Chr. Kratchanov (2004). Interaction of pectin with amino acids and other amino compounds in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 18: 677–683.
- Kratchanova, M., M. Nikolova, E. Pavlova, I. Yanakieva, & V. Kussovski (2010). Composition and properties of biologically active pectic polysaccharides from leek (*Allium porrum*). *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 90: 2046-2051.
- Kravtchenko, T. P. (1992). Studies on the structure of industrial high methoxyl pectins. Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen, The Netherlands, pp. 171.
- Kravtchenko, T. P., A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1992). Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydrate Polymers*, 18: 17-25.
- Kravtchenko, T. P., M. Penci, A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1993). Enzymic and chemical degradation of some industrial pectins. *Carbohydrate Polymers*, 20: 195-205.
- Kukhta, E. P., V. Ya. Chirva, G. N. Shadrin, & L. P. Stazaeva (1979). Pectin substances of essential-oil crops II. Isolation and characterization of the pectin of *Rosa canina*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15: 187-188.

- Kurita, O., T. Fujiwara, & E. Yamazaki (2008). Characterization of the pectin extracted from citrus peel in the presence of citric acid. *Carbohydrate Polymers*, 74: 725–730.
- Lahaye, M., J. Vigouroux, & J.-F. Thibault (1991). *Endo-β-1,4-D-galactanase* from *Aspergillus niger* var. *aculeatus*: purification and some properties. *Carbohydrate Polymers*, 15: 431-444.
- Lampart, D. T. A. & D. H. Northcote (1960). Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. *Nature*, 188: 665-666.
- Lampart, D. T. A., P. Varnai, & C. E. Seal (2014). Back to the future with the AGP–Ca²⁺ flux capacitor. *Annals of Botany*, 114: 1069-1085.
- Leijdekkers, A. G. M., M. G. Sanders, H. A. Schols, & H. Gruppen (2011). Characterizing plant cell wall derived oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1218: 9227– 9235.
- Leijdekkers, A. G. M., J.-H. Huang, E. J. Bakx, H. Gruppen, & H. A. Schols (2015). Identification of novel isomeric pectic oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography coupled to traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 404: 1–8.
- Leivas, C. L., M. Iacomini, & L. M. C. Cordeiro (2015). Structural characterization of a rhamnogalacturonan I-arabinan-type I arabinogalactan macromolecule from starfruit (*Averrhoa carambola* L.). *Carbohydrate Polymers*, 121: 224-230.
- Leclere, L., P. van Cutsem, & C. Michiels (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *Frontier in Pharmacology*, 4: 128. doi: 10.3389/fphar.2013.00128
- Lerouge, P., M. A. O’Neill, A. G. Darvill, & P. Albersheim (1993). Structural characterization of endo-glycanase-generated oligoglycosyl side chains of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Research*, 243: 359-371.
- Levene, P. A. & L. C. Kreider (1937a). Oxidation and hydrolysis of polygalacturonide methyl ester to *levo*-tartaric acid. *Journal of Biological Chemistry*, 120: 591-595.
- Levene, P. A. & L. C. Kreider (1937b). The ring structure of α -methyl-d-galacturonide and its derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 120: 597-606.
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, 47: 273-279.
- Li, T., R. Yamauchi, & K. Kato (1997). Antibacterial activity of enzymolysate of haw pectin. *Journal of Applied Glycoscience*, 44: 489–495.
- Li, T., S. Li, Y. Dong, R. Zhu, & Y. Liu (2014). Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. *Food Chemistry*, 145: 335-341.

- Limberg, G., R. Körner, H. C. Buchholt, T. M. I. E. Christensen, P. Roepstorff, & J. D. Mikkelsen (2000a). Analysis of different de-esterification mechanisms for pectin by enzymatic fingerprinting using endopectin lyase and endopolygalacturonase II from *A. Niger*. *Carbohydrate Research*, 327: 293–307.
- Limberg, G., R. Körner, H. C. Buchholt, T. M. I. E. Christensen, P. Roepstorff, & J. D. Mikkelsen (2000b). Quantification of the amount of galacturonic acid residues in blocksequences in pectin homogalacturonan by enzymatic fingerprinting with exo- and endo-polygalacturonase II from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 327: 321–332.
- Lojek, A., L. Kubala, H. Cizova, & M. Ciz (2002). A comparison of whole blood neutrophil chemiluminescence measured with cuvette and microtitre plate luminometers. *Luminescence*, 17: 1–4.
- Mahoney, R. R. (2003). β -Galactosidase. In: *Handbook of Food Enzymology*, J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen & D. W.S. Wong (Eds.). Marcel Dekker, Inc., ch. 65.
- Manderson, K., M. Pinart, K. M. Tuohy, W. E. Grace, A. T. Hotchkiss, W. Widmer, M. P. Yadhav, G. R. Gibson, & R. A. Rastall (2005). *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied & Environmental Microbiology*, 71: 8383-8389.
- Mani, F., M. Peruzzini, & P. Stoppioni (2006). CO₂ absorption by aqueous NH₃ solutions: speciation of ammonium carbamate, bicarbonate and carbonate by a ¹³C NMR study. *Green Chemistry*, 8: 995–1000.
- Maxwell, E. G., N. J. Belshaw, K. W. Waldron, & V. J. Morris (2012). Pectin – an emerging new bioactive food polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 24: 64-73.
- McComb, E. A. & R. M. McCready (1957). Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. *Analytical Chemistry*, 29: 819–821.
- McKie, V. A., J.-P. Vincken, A. G. J. Voragen, L. A. M. van den Broek, E. Stimson, & H. J. Gilbert (2001). A new family of rhamnogalacturonan lyases contains an enzyme that bind to cellulose. *Biochemistry Journal*, 355: 167-177.
- McNeil, M., A. G. Darvill, & P. Albersheim (1980). Structure of plant cell walls. X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiology*, 66: 1128-1134.
- McNeil, M., A. G. Darvill, & P. Albersheim (1982). Structure of plant cell walls. XII. Identification of seven differently linked glycosyl residues attached to O-4 of the 2,4-linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I. *Plant Physiology*, 70: 1586-1591.
- Mengome, L. E., A. Voxeur, J. P. Akue, & P. Lerouge (2014). Screening of antioxidant activities of polysaccharides extracts from endemic plants in Gabon. *Bioactive Carbohydrates & Dietary Fibre*, 3: 77-88.

- Meyer, D. (2015). Health benefits of prebiotic fibers. *Advances in Food & Nutrition Research*, 74: 47-91.
- Micard, V., C. M. G. C. Renard, & J.-F. Thibault (1994). Studies on enzymatic release of ferulic acid from sugar-beet pulp. *LWT-Food Science and Technology*, 27: 59-66.
- Mohnen, D. (1999). Biosynthesis of pectins and galactomannans. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry (Carbohydrates and their derivatives including tannins, cellulose, and related lignins)*, B. M. Pinto (ed.). Oxford, Elsevier, vol. 3, pp. 497-527.
- Monsoor, M. A., U. Kalapathy, & A. Proctor (2001). Determination of polygalacturonic acid in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 74: 233-238.
- Morell, S. & K. P. Link (1933). The methylglycosides of the naturally occurring hexuronic acids: I. The preparation of methyl-d-galacturonide. *Journal of Biological Chemistry*, 100: 385-396.
- Morell, S. & K. P. Link (1934). The methylglycosides of the naturally occurring hexuronic acids: II. The kinetics of the hydrolysis of α -methyl-d-galacturonide. *Journal of Biological Chemistry*, 104: 183-188.
- Morell, S., L. Baur, & K. P. Link (1934). The methylglycosides of the naturally occurring hexuronic acids: III. Polygalacturonic acid methylglycosides derived from pectin. *Journal of Biological Chemistry*, 105: 1-13.
- Morris, V. J., N. J. Belshaw, K. W. Waldron, & E. G. Maxwell (2013). The bioactivity of modified pectin fragments. *Bioactive Carbohydrates & Dietary Fibre*, 1: 21-37.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
- M'sakni, N. H., H. Majdoub, S. Roudesli, L. Picton, D. Le Cerf, C. Rihouey, & C. Morvan (2006). Composition, structure and solution properties of polysaccharides extracted from leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *European Polymer Journal*, 42: 786-795.
- Mutter, M., G. Beldman, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1994). Rhamnogalacturonan α -D-rhamnopyranohydrolase. A novel enzyme specific for the terminal non-reducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan region in pectin. *Plant Physiology*, 106: 241-250.
- Mutter, M., I. J. Colquhoun, G. Beldman, H. A. Schols, D. Bakx, & A. G. J. Voragen (1998a). Characterization of recombinant rhamnogalacturonan α -L-rhamnopyranosyl-(1,4)- α -D-galactopyranosyl-uronide lyase from *Aspergillus aculeatus*. An enzyme that fragments rhamnogalacturonan I region of pectins. *Plant Physiology*, 117: 141-152.
- Mutter, M., G. Beldman, S. M. Pitson, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1998b). Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase: an enzyme that specifically

removes the terminal non-reducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions in pectin. *Plant Physiology*, 117: 153-163.

- Mutter, M., C. M. G. C. Renard, G. Beldman, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1998c). Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterisation of RG degradation products of new RG using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. *Carbohydrate Research*, 311: 155-164.
- Neiss, T. G., H. N. Cheng, P. J. H. Daas, & H. A. Schols (1999). Compositional heterogeneity in the pectic polysaccharides: NMR studies and statistical analysis. *Macromolecular Symposia*, 140: 165-178.
- Nesterenko, V. B., A. V. Nesterenko, V. I. Babenko, T. V. Yerkovich, & I. V. Babenko (2004). Reducing the ¹³⁷Cs-load in the organism of “Chernobyl” children with apple-pectin. *Swiss Medical Weekly*, 134: 24-27.
- Ngouémazong, D. E., F. F. Tengweh, T. Duvetter, I. Fraeye, A. V. Loey, P. Moldenaers, & M. Hendrickx (2011). Quantifying structural characteristics of partially de-esterified pectins. *Food Hydrocolloids*, 25: 434-443.
- Nikolova, M., G. Ambrozova, M. Kratchanova, P. Denev, V. Kussovski, M. Ciz, & A. Lojek (2013). Effects of pectic polysaccharides isolated from leek on the production of reactive oxygen and nitrogen species by phagocytes. *Journal of Medicinal Food*, 16: 711-718.
- Olano-Martin, E., G. R. Gibson, & R. A. Rastall (2002). Comparison of the *in vitro* bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 505-511.
- Olech, M., R. Nowak, R. Los, J. Rzymowska, A. Malm, & K. Chrusciel (2012). Biological activity and composition of teas and tinctures prepared from *Rosa rugosa* Thunb. *Central European Journal of Biology*, 7(1): 172-182.
- O'Neill, M. A., P. Albersheim, & A. G. Darvill (1990). The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: *Methods in Plant Biochemistry*, P. M. Dey & J. B. Harborne, (eds.). Academic Press, London, vol. 2, pp. 415-441.
- O'Neill, M. A. & W. S. York (2003). The composition and structure of plant primary cell walls. In: *The Plant Cell Wall*, J. K. C. Rose (Ed.). *Annual Plant Reviews*, 8: 1-35.
- O'Neill, M. A., T. Ishii, P. Albersheim, & A. G. Darvill (2004). Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 109–139.
- Onumpai, C., S. Kolida, E. Bonnin, & R. A. Rastall (2011). Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied & Environmental Microbiology*, 77: 5747-5754.

- Oosterveld, A., J. H. Grabber, G. Beldman, J. Ralph, & A. G. J. Voragen (1997). Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydrate Research*, 300: 179-181.
- Ou, B., M. Hampsh-Woodill, & R. L. Prior (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49: 4619-4626.
- Ou, B., M. Hampsch-Woodill, J. Flanagan, E. K. Deemer, R. L. Prior, & D. Huang (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50: 2772-2777.
- Ovodov, Yu. S., R. G. Ovodova, O. D. Bondarenko, & I. N. Krasikova (1971). The pectic substances of *Zosteraceae*: Part IV. Pectinase digestion of zosterine. *Carbohydrate Research*, 18: 311-318.
- Ovodov, Yu. S. (2009). Current views on pectin substances. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35: 269-284.
- Pal, A. (2008). Arabinogalactan protein and arabinogalactan: biomolecules, with biotechnological and therapeutic potential. In: *Bioactive Molecules & Medicinal Plants*, K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (eds.). Springer-Verlag, pp. 255-270.
- Pau-Roblot, B. Courtois, & J. Courtois (2010). Interaction between polysaccharides uronic acid sequences and lipid molecules. *Comptes Rendus Chimie*, 13: 443-448.
- Paulsen, P. S. & H. Barsett (2005). Bioactive pectic polysaccharides. *Advances in Polymer Science*, 186: 69-101.
- Pedrolli, D. B., A. C. Monteiro, E. Gomes, & E. C. Carmona (2009). Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, 3: 9-18.
- Pellerin, P. & M. A. O'Neill (1998). The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis*, 26: 32-36.
- Pienta, K. J., H. Naik, A. Akhtar, K. Yamazaki, T. S. Replogle, J. Lehr, T. L. Donat, L. Tait, V. Hogan, & A. Raz (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 87: 348-353.
- Pilnik, W. & F. M. Rombouts (1981). Pectic enzymes. In: *Enzymes and Food Processing*, G. G. Birch, N. Blakebrough, K. J. Parker (Eds.). Springer Netherlands, pp. 105-128.
- Pinheiro, E. R., I. M. D. A. Silva, L. V. Gonzaga, E. R. Amante, R. F. Teófilo, M. M. C. Ferreira, & R. D. M. C. Amboni (2008). Optimization of extraction of high-ester pectin from passion

- fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99: 5561–5566.
- Platt, D. & A. Raz (1992). Modulation of the lung colonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. *Journal of the National Cancer Institute*, 84: 438-442.
- Popov, S. V. & Yu. S. Ovodov (2013). Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry (Moscow)*, 78: 823-835.
- Popova, M. Il. & Chr. G. Kratchanov (1972). Chromatographic resolution of racemates on natural optically active ion exchangers IV. Influence of the solvent on the optical resolution of racemic bases on sunflower pectic acid. *Journal of Chromatography A*, 72: 192-197.
- Popova, M. I. & Kh. G. Krachanov (1977). Chromatographic separation of atropine on sunflower pectic acid. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 11: 1550-1551.
- Popova, M. H. & Chr. G. Kratchanov (1979). Chromatographic resolution of racemates on natural optically active ion exchangers: VIII. Influence of the hydration of the polyuronide and the water contents of the eluent on the effectiveness of chromatographic resolution. *Journal of Chromatography A*, 175: 332-334.
- Prabasari, I., F. Pettolino, M.-L. Liao, & A. Bacic (2011). Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization. *Carbohydrate Polymers*, 84: 484-494.
- Qi, X., B. X. Behrens, P. R. West, & A. J. Mort (1995). Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures. Evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin. *Plant Physiology*, 108: 1691-1701.
- Radoucheva, T., K. Dilova, N. Markova, V. Kusovski, & M. Krachanova (1995). Immunoprotective effect of polysaccharide fractions isolated from the biomass of *Helianthus annuus* and *Nicotiana tabacum* plants. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 48(11-12): 103-105.
- Ralet, M.-C. & J.-F. Thibault (2002). Interchain heterogeneity of enzymatically deesterified lime pectins. *Biomacromolecules*, 3: 917-925.
- Ralet, M.-C., J. C. Cabrera, E. Bonnin, B. Quéméner, P. Hellin, & J.-F. Thibault (2005). Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemistry*, 66: 1832–1843.
- Ralet, M.-C., G. André-Leroux, B. Quéméner, & J.-F. Thibault (2005a). Sugar beet (*Beta vulgaris*) pectins are covalently cross-linked through diferulic bridges in the cell wall. *Phytochemistry*, 66: 2800-2814.
- Ralet, M.-C., M.-J. Crépeau, & E. Bonnin (2008). Evidence for a blockwise distribution of acetyl groups onto homogalacturonans from a commercial sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin. *Phytochemistry*, 69: 1903–1909.

- Ralet, M.-C. & J.-F. Thibault (2009). Hydrodynamic properties of isolated pectin domains: a way to figure out pectin macromolecular structure? In: *Pectins and pectinases*, H. A. Schols, R. G. F. Visser & A. G. J. Voragen (eds.). Wageningen Academic Publishers, pp. 35-48.
- Ralet, M.-C., M. A. K. Williams, A. Tanhatan-Nasseri, D. Ropartz, B. Quéméner, & E. Bonnin (2012). Innovative enzymatic approach to resolve homogalacturonans based on their methylesterification pattern. *Biomacromolecules*, 13: 1615–1624.
- Ramachandran, C., B. J. Wilk, A. Hotchkiss, H. Chau, I. Eliaz, & S. J. Melnick (2011). Activation of human T-helper/inducer cell, T-cytotoxic cell, B-cell, and natural killer (NK)-cells and induction of natural killer cell activity against K562 chronic myeloid leukemia cells with modified citrus pectin. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 11: 59.
- Rees, D. A. & A. W. Wight (1971). Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for α -1,4 galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. *Journal of the Chemical Society B*, 1366-1372.
- Remoroza, C., S. Cord-Landwehr, A. G. M. Leijdekkers, B. M. Moerschbacher, H. A. Schols, & H. Gruppen (2012). Combined HILIC-ELSD/ESI-MSn enables the separation, identification and quantification of sugar beet pectin derived oligomers. *Carbohydrate Polymers*, 90: 41-48.
- Remoroza, C., H. C. Buchholt, H. Gruppen, & H. A. Schols (2014a). Descriptive parameters for revealing substitution patterns of sugar beet pectins using pectolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*, 101: 1205-1215.
- Remoroza, C., S. Broxterman, H. Gruppen, & H. A. Schols (2014b). Two-step enzymatic fingerprinting of sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers*, 108: 338-347.
- Remoroza, C., M. Wagenknecht, H. C. Buchholt, B. M. Moerschbacher, H. Gruppen, & H. A. Schols (2015). Mode of action of *Bacillus licheniformis* pectin methylesterase on highly methylesterified and acetylated pectins. *Carbohydrate Polymers*, 115: 540–550.
- Renard, C. M. C. G., M.-J. Crépeau, & J.-F. Thibault (1995). Structure of the repeating units in the rhamnogalacturonic backbone of apple, beet and citrus pectins. *Carbohydrate Research*, 275: 155-165.
- Renard, C. M. C. G., M.-J. Crépeau, & J.-F. Thibault (1999). Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins. *European Journal of Biochemistry*, 266: 566-574.
- Report of the Committee for the Revision of the Nomenclature of Pectic Substances (1944). *Chemical & Engeneering News*, 22: 105-106.
- Ridley, B. L., M. A. O'Neill, & D. Mohnen (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57: 929-967.

- Rinaudo, M., G. Ravanat, & M. Vincendon (1980). NMR investigation on oligo- and poly(galacturonic acid)s; gel formation in the presence of Ca²⁺ counterions. *Die Makromolekulare Chemie*, 181: 1059–1070.
- Rombouts, F. M. & J.-F. Thibault (1986). Enzymic and chemical degradation and the fine structure of pectins from sugar-beet pulp. *Carbohydrate Research*, 154: 189-203.
- Rombouts, F. M., A. G. J. Voragen, M. F. Searle-Van Leeuwen, C. C. Geraeds, H. A. Schols, & W. Pilnik (1988). The arabinases of *Aspergillus niger*: purification and characterization of two α -L-arabinofuranosidase and an *endo*-1,5- α -L-arabinase. *Carbohydrate Polymers*, 9: 25-47.
- Ros, J. M., H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (1998). Lemon albedo cell walls contain distinct populations of pectic. *Carbohydrate Polymers*, 37: 159-166.
- Saito, D., S. Nakaji, S. Fucuda, T. Shimoyama, J. Sakamoto, & K. Sugawara (2005). Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin. *Nutrition*, 21: 914-919.
- Sakai, T., T. Sakamoto, J. Hallaert, & E. J. Vandamme (1993). Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 39: 213-294.
- Samuelsen, A. B., I. Lund, J. M. Djahromi, B. S. Paulsen, J. K. Wold, & S. H. Knutsen (1999). Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. *Carbohydrate Polymers*, 38: 133-143.
- Schepetkin, I. A., G. Xie, L. N. Kirpotina, R. A. Klein, M. A. Jutila, & M. T. Quinn (2008). Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *International Immunopharmacology*, 8(10): 1455–1466.
- Schols, Henk A., personal communication.
- Schols, H. A., J. C. E. Reitsma, A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1989). High-performance ion exchange chromatography of pectins. *Food Hydrocolloids*, 3: 115-121.
- Schols, H. A., C. C. J. M. Geraeds, M. F. Searle-van Leeuwen, F. J. M. Kormelink, & A. G. J. Voragen (1990). Rhamnogalacturonase: a novel enzyme that degrades the hairy regions of pectins. *Carbohydrate Research*, 206: 105-115.
- Schols, H. A., M. A. Posthumus, & A. G. J. Voragen (1990). Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydrate Research*, 206: 117-129.
- Schols, H. A., E. J. Bakx, D. Schipper, & A. G. J. Voragen (1995). A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. *Carbohydrate Research*, 279: 265-279.

- Schols, H. A. & A. G. J. Voragen (2002). The chemical structure of pectins. In: *Pectins and their Manipulation*, G. B. Seymour & J. P. Knox (eds.). Blackwell Publishing, pp. 1-29.
- Schols, H. A., G.-J. Coenen, & A. G. J. Voragen (2009). Revealing pectin's structure. In: *Pectins and pectinases*, H. A. Schols, R. G. F. Visser & A. G. J. Voragen (eds.). Wageningen Academic Publishers, pp.19-34.
- Schulz, H. & M. Baranska (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43: 13-25.
- Sengkhampan, N., E. J. Bakx, R. Verhoef, H. A. Schols, T. Sajjaanantakul, & A. G. J. Voragen (2009). Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research*, 344: 1842-1851.
- Showalter, A. M. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 58: 1399-1417.
- Silva, I. R., C. Jers, A. S. Meyer, & J. D. Mikkelsen (2016). Rhamnogalacturonan I modifying enzymes: an update. *New Biotechnology*, 33: 41-54.
- Singleton, V. L. & J. A. Rossi, Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology & Viticulture*, 16: (1965) 144-158.
- Smoleński, K. (1923). Badania nad związkami pektynowymi. *Roczniki Chemii*, 3: 86-152.
- Smoleński, K. (1924). Kwas octowy, jako produkt hydrolizy substancji pektynowej. *Roczniki Chemii*, 4: 72-74.
- Spellman, M. W., M. McNeil, A. Darvill, P. Albersheim, & K. Henrick (1983). Isolation and characterization of 3-C-carboxy-5-deoxy-L-xylose, a naturally occurring, branched-chain, acid monosaccharides. *Carbohydrate Research*, 122: 115-129.
- Stantshev, St., Chr. Kratschanov, M. Popova, N. Kirtshev, & M. Martshev (1979). Anwendung von granuliertem Pektin bei Bleiexponiertem. *Zeitschrift für die Gesamte Hygiene und ihre Grenzgebiete*, 25: 585-587.
- Stevenson, T., A. G. Darvill, & P. Albersheim (1988). 3-Deoxy-d-lyxo-2-heptulosaric acid, a component of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 179: 269-288.
- Stoikoff, St. (1958). Zur Chemie und Technologie der Pektinstoffe aus Sonnenblumenböden. *Nahrung*, 2: 287-296.
- Stuart Tipson, R. (1968). Infrared spectroscopy of carbohydrates. A review of the literature. U.S. Department of Commerce, *National Bureau of Standards Monograph* 110: 1-21.

- Suh, H.-J., H.-S. Yang, K.-S. Ra, D.-O. Noh, Ki-H. Kwon, J.-H. Hwang, & K.-W. Yu (2013). Peyer's patch-mediated intestinal immune system modulating activity of pectic-type polysaccharide from peel of *Citrus unshiu*. *Food Chemistry*, 138: 1079-1086.
- Synytysya, A., J. Čopíková, P. Matějka, & V. Machovič (2003). Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydrate Polymers*, 54: 97-106.
- Tahiri, M., P. Pellerin, J. C. Tressol, T. Doco, D. Pépin, Y. Rayssiguier, & C. Coudray (2000). The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *Journal of Nutrition*, 130: 249-253.
- Talmadge, K. W., K. Keegstra, W. D. Bauer, & P. Albersheim (1973). The structure of plant cell walls. I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. *Plant Physiology*, 51: 158-173.
- Tan, L., P. Varnai, D. T. A. Lamport, C. Yuan, J. Xu, F. Qiu, & M. J. Kieliszewski (2010). Plant O-hydroxyproline arabinogalactans are composed of repeating trigalactosyl subunits with short bifurcated side chains. *Journal of Biological Chemistry*, 285: 24575-24583.
- Taylor, A. J. (1982). Intramolecular distribution of carboxyl groups in low methoxyl pectins – A review. *Carbohydrate Polymers*, 2: 9-17.
- Thibault, J.-F. (1979). Automatisation du dosage des substances pectiques par la method au meta-hydroxydiphenyl. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 12: 247-251.
- Thibault, J.-F., C. M. G. C. Renard, M. A. V. Axelos, P. Roger, & M.-J. Crépeau (1993). Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis. *Carbohydrate Research*, 238: 271-286.
- Tjan, S. B., A. G. J. Voragen, & W. Pilnik (1974). Analysis of some partly and fully esterified oligogalactopyranuronic acids by P.M.R. spectrometry at 220 MHz. *Carbohydrate Research*, 34: 15-23.
- Van Laere, K. M. J., R. Hartemink, M. Bosveld, H. A. Schols, & A. G. J. Voragen (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 48: 1644-1652.
- Van der Vlugt-Bergmans, C. J. B., P. J. A. Meeuwssen, A. G. J. Voragen, & A. J. J. van Ooyen (2000). *Endo*-xylogalacturonan hydrolase: a novel pectinolytic enzyme. *Applied & Environmental Microbiology*, 66: 36-41.
- Vauquelin, M. (1790). Analyse de tamarin, et réflexions sur quelques unes des ses préparations médicinales. *Annales de Chimie*, 5: 92-106.
- Vincken, J.-P., H. A. Schols, R. J. F. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. J. Voragen, & R. G. F. Visser (2003). If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology*, 132: 1781-1789.

- Vincken, J.-P., A. G. J. Voragen, & G. Beldman (2003). Enzymes degrading rhamnogalacturonan and xylogalacturonan. In: *Handbook of Food Enzymology*, J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen & D. W.S. Wong (Eds.). Marcel Dekker, Inc., ch. 73.
- Voragen, A. G. J. & W. Pilnik (1989). Pectin-degrading enzymes in fruit and vegetable processing. In: *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*, J. R. Whitaker & P. E. Sonnet (Eds.). ACS Symposium Series, 389: 93-115.
- Voragen, A. G. J., G. Beldman, & H. A. Schols (2001). Chemistry and enzymology of pectins. In: *Advanced Dietary Fibre Technology*, B. V. McCleary & L. Prosky (eds.). Blackwell Science, pp. 379-398.
- Voragen, A. G. J., G.-J. Coenen, R. P. Verhoef, & H. A. Schols (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in the plant cell walls. *Structural Chemistry*, 20: 263-275.
- Vriesmann, L. C., R. F. Teófilo, & C. L. de O. Petkowicz (2012). Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid. *LWT - Food Science & Technology*, 49: 108-116.
- Wagner, H. & S. Kraus (2000). News on immunologically active plant polysaccharides. In: *Bioactive Carbohydrate Polymers*, B. S. Paulsen (ed.). Klüwer Academic Publisher, Dordrecht, pp. 1-14.
- Wang, I.-C., Y.-C. Chuang, & Y.-H. Ku (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 102: 1163-1171.
- Wang, I.-C., Y.-C. Chuang, & H.-W. Hsu (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106: 277-284.
- Wefers, D., C. E. Tyl, & M. Bunzel (2015). Neutral pectin side chains of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) contain long, partially branched arabinans and short galactans, both with terminal arabinopyranoses. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 63: 707-715.
- Westerlung, E., P. Åman, R. E. Andersson, & R. Andersson (1991). Investigation of the distribution of methyl ester groups in pectin by high-field ¹³C NMR. *Carbohydrate Polymers*, 14: 179-187.
- Westphal, Y., H. A. Schols, A. G. J. Voragen, & H. Gruppen (2010). Introducing porous graphitized carbon liquid chromatography with evaporative light scattering and mass spectrometry detection into cell wall oligosaccharide analysis. *Journal of Chromatography A*, 1217: 689-695.
- Wicker, L., Y. Kim, M.-J. Kim, B. Thirfield, Z. Lin, & J. Jung (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*, 42: 251-259.
- Wong, D. W. S. (2006). Feruloyl esterase. A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 133: 87-112.

- Wong, D. (2008). Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *Protein Journal*, 27: 30-42.
- Wu, M.-C., H.-c. Li, Po-H. Wu, P.-H. Huang, & Y.-T. Wang (2014). Assessment of oligogalacturonide from citrus pectin as a potential antibacterial agent against foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 79: M1541–M1544.
- Yamada, H., H. Kiyohara, J.-C. Cyong, & Y. Otsuka (1985). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* – IV. Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Molecular Immunology*, 22: 295-304.
- Yamada H. (1994). Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 25: 269-276.
- Yamada, H. & H. Kiyohara (1999). Complement-activating polysaccharides from medicinal herbs. In: *Immunomodulatory Agents from Plants*, H. Wagner (ed.). Springer Basel AG, 161-202.
- Yamada, H. & H. Kiyohara (2007). Immunomodulating activity of plant polysaccharide structures. In: *Comprehensive Glycoscience: from chemistry to systems biology*, J. P. Kamerling (Ed.). Elsevier, Amsterdam, vol. 4, section II, pp. 663-694.
- Yaneva, M. P., A. D. Botushanova, L. A. Grigorov, J. L. Kokov, E. P. Todorova, & M. Krachanova (2002). Evaluation of the immunomodulatory activity of aronia in combination with apple pectin in patients with breast cancer undergoing postoperative radiation therapy. *Folia Medica*, 44(1-2): 22-25.
- Yapo, B. M., P. Lerouge, J.-F. Thibault, & M.-C. Ralet (2007). Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Polymers*, 69: 426–435.
- Yapo, B. M. (2009a). Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 57: 1572–1578.
- Yapo, B. M. (2009b). Lemon juice improves the extractability and quality characteristics of pectin from yellow passion fruit by-product as compared with commercial citric acid extractant. *Bioresource Technology*, 100: 3147–3151.
- Yapo, B. M. (2011c). Pectin rhamnogalacturonan II: on the “Small stem with four branches” in the primary cell walls of plants. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, vol. 2011, Article ID 964521, 11 pp doi:10.1155/2011/964521.
- Yapo, B. M. (2011d). Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews*, 51: 391-413.
- Yapo, B. M. & D. Gnakri (2014). Pectic polysaccharides and their functional properties. *Polysaccharides*, pp. 1-18. doi: 10.1007/978-3-319-03751-6_62-1

- Yeoh S., J. Shi, & T. A. G. Langrish (2008). Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218: 229-237.
- York, W., A. G. Darvill, M. McNeil, & P. Albersheim (1985a). 3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 138: 109-126.
- York, W. S., A. G. Darvill, M. McNeil, T. T. Stevenson, & P. Albersheim (1985b). Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods in Enzymology*, 118: 3-40.
- Yu, L. & A. J. Mort (1996). Partial characterization of xylogalacturonans from cell walls of ripe watermelon fruit: inhibition of endopolygalacturonase activity by xylosylation. In: *Pectins and Pectinases*, J. Visser & A. G. J. Voragen (Eds.). Elsevier Science B.V., *Progress in Biotechnology*, 14: 79-98.
- Zaidel, D. N. A. & A. S. Meyer (2012). Biocatalytic cross-linking of pectic polysaccharides for designed food functionality: structures, mechanisms, and reactions. *Biocatalysis & Agricultural Biotechnology*, 1: 207-219.
- Zhang, W., P. Xu, & H. Zhang (2015). Pectin in cancer therapy: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 44: 258–271.
- Zhao, Z. Y., L. Liang, X. Fan, Z. Yu, A. T. Hotchkiss, B. J. Wilk, & I. Eliaz (2008). The role of modified citrus pectin as an effective chelator of lead in children hospitalized with toxic lead levels. *Alternative Therapies In Health & Medicine*, 14: 34-38.
- Zhu, R., T. Li, Y. Dong, Y. Liu, S. Li, G. Chen, Z. Zhao, & Y. Jia (2013). Pectin pentasaccharide from hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. *major*) ameliorates disorders of cholesterol metabolism in high-fat diet fed mice. *Food Research International*, 54: 262-268.
- Zou, Y.-F., X.-Fu Chen, K. E. Malterud, F. Rise, H. Barsett, K. T. Inngjerdigen, T. E. Michaelsen, & B. S. Paulsen (2014). Structural features and complement fixing activity of polysaccharides from *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* L. T. Shen roots. *Carbohydrate Polymers*, 113: 420–429.

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

8.1 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 polysaccharides 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**)

8.2 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. 60th 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. 2nd SEE-DRUG Workshop - NMR Basics & Applications in Life Sciences 13-15 May 2013.

9. ЦИТАТИ (CITATION)

Цитирана статия: Georgiev, Y., M. Oгnyanov, 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}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}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: Ognyanov, M., M. 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.

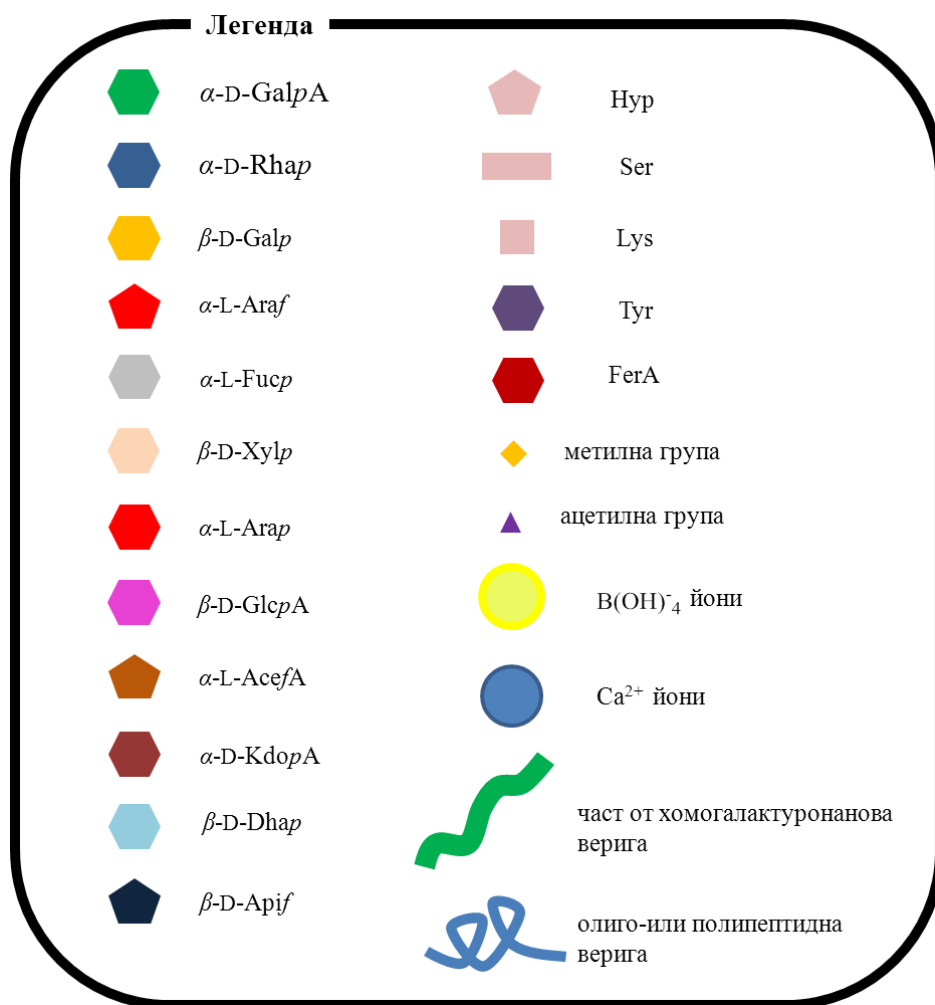
Цитирана статия: Ognyanov, M. H., Y. N. Georgiev, I. Z. Yanakieva, V. K. Kussovski, M. G. Kratchanova (2014). Chemical composition and anti-complementary activity of enzyme-modified citrus pectins. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(A): 79-87.

- 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.

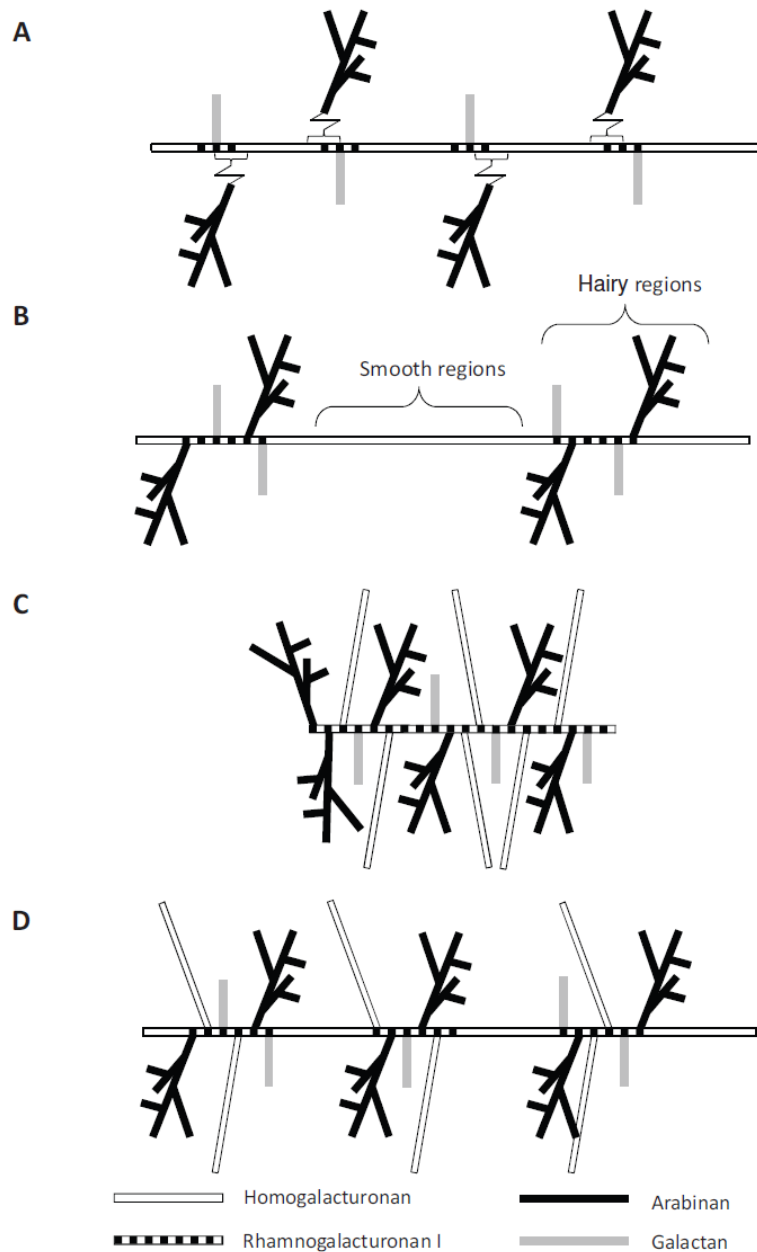
Цитирана статия: Огнянов, М., Й. Георгиев, П. Денев, И. Янакиева, М. Крачанова (2014). Биологично активни вещества и здравословни ефекти на шипковите плодове. *Наука Диететика*, 3-4: 14-27.

- 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.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ 1 (APPENDICES)

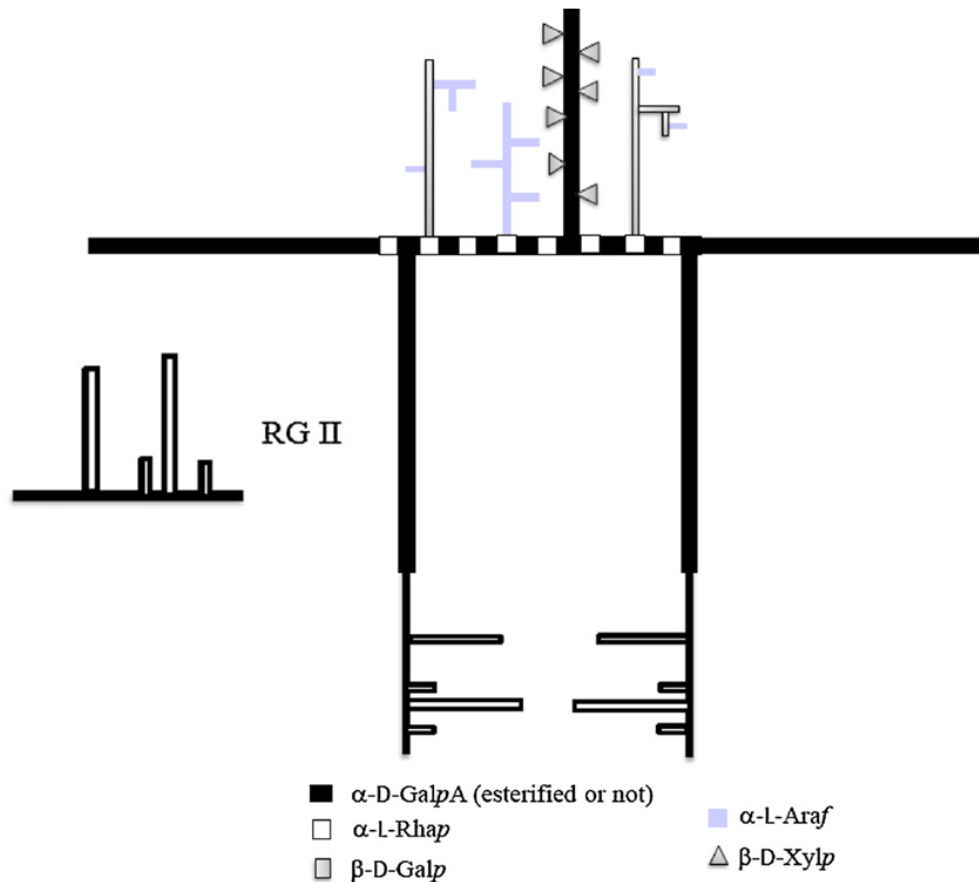


ПРИЛОЖЕНИЕ 2



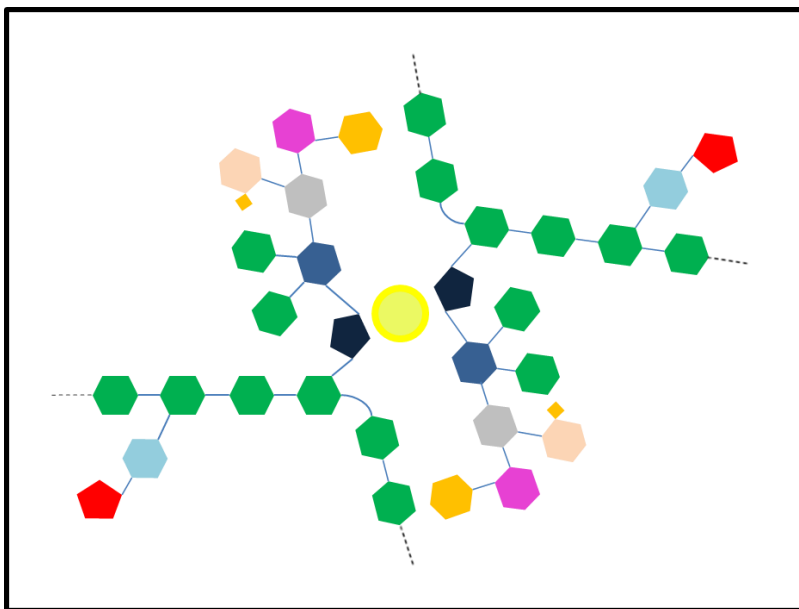
Основни („традиционни“) хипотетични пектинови структурни модели: Рамногалактуронанов модел (Talmadge *et al.*, 1973) (A); Модел на редуващи се „гладки“ и „космати“ области (De Vries *et al.*, 1981, 1982; Schols & Voragen, 2002) (B); Модел на „страничните вериги“ (Vincken *et al.*, 2003) (C); Комбиниран модел на „страничните вериги и косматите области“ (Ralet & Thibault, 2009; Schols, Coenen & Voragen, 2009) (D). Фигурата е копирана (с разрешение) от Kühnel, S. (2011). Characterization of cell wall degrading enzymes from *Chrysosporium lucknowense* C1 and their use to degrade sugar beet pulp. PhD Thesis. Wageningen University, 192 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.1



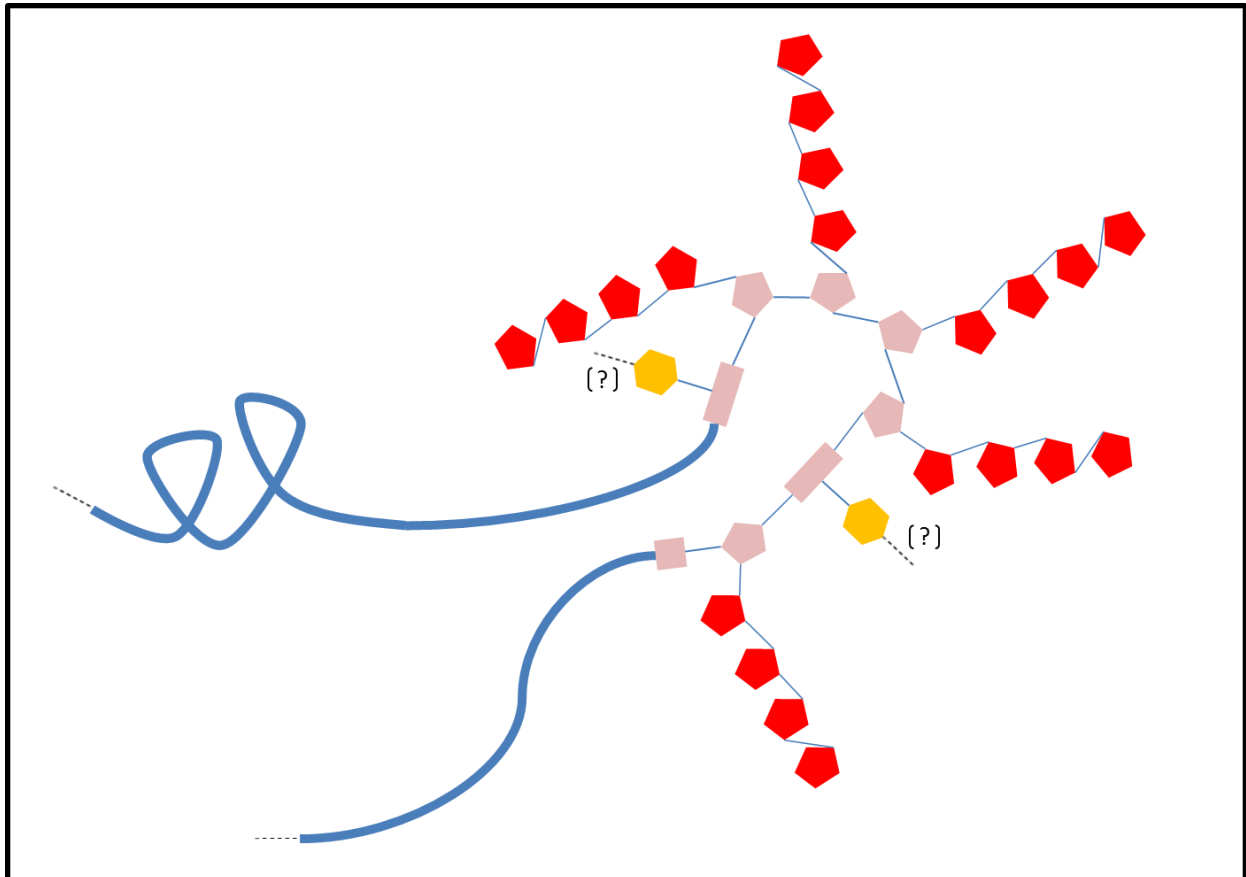
Алтернативен („нетрадиционен“) „living thing-like“ модел описващ пектиновата структура (Yapo & Gnakri, 2014). В този нов хипотетичен модел се смята, че цялостният гръбнак на пектиновата молекула, се състои от редуващи се два неразклонени ХГ блока и един РГ-I сегмент или ядро. Последният е „украсен“ с познатите странични вериги от НЗ (арабинани, галактани и др.). Точките на разклонение на страничните вериги, както и тяхната ориентация не са известни със сигурност. Двата ХГ блока от основната верига могат да са в хоризонтално или вертикално положение (нагоре или надолу), благодарение на гъвкавостта на (1→2)-свързаните L-Rhap единици, чрез които те се прикрепят към РГ-I скелета. В допълнение два ориентирани надолу и перпендикулярно скрепени към РГ-I ядро ХГ блока, образуват „ствола“ на пектиновия комплекс. Два отделни РГ-II блока могат да бъдат свързани към редуциращите краища на два разделени пространствено ХГ сегмента, като те са ориентирани по такъв начин, че да се благоприятства образуването на РГ-II димери с участието на боратни йони (B⁻). Последната конструкция изгражда своеобразните „корени“ на пектиновата макромолекула. Моделът надгражда съществуващия модел на „страничните вериги“ и с някои изключения е аналогичен на комбинирания модел „странични вериги – космати области“.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3



Структура на 1:2 борат-диолен естер, чрез който се осъществява свързването между две молекули РГ-II. Боратните йони са ковалентно свързани с четири атома кислород (*O*-2 и *O*-3) от два β -D-Арі остатъка. Борният атом е хирален център и поради тази причина може да се образуват два диастереоизомера, като все още не е установено, кой от двата (или и двата) се среща в природата.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.1



Повечето учени считат, че екстензинът е един от най-добре изучените гликопротеини. Между 40 и 50 % от масата му се пада на белтъчната компонента (мол. м. ~ 40000), като сумарният заряд на молекулата е положителен. Аминокиселините Pro, Hур, Ser и Lys са най-застъпени. Две от тях изграждат многократно повтарящи Ser-(Hур)₄ региони, които са гликозилирани с три- и/или тетра-Araf олигозахариди (Hур-Aга₃, Hур-Aга₄). Ролята на гликозилната част вероятно е свързана с пространственото стабилизиране на полипептидната верига. Близко 96% от въглехидратната част се заема от Araf остатъци, а $\sim 4\%$ на Galp. Към Ser са прикрепени единични галактозни звена (Ser-Gal), като се предполага, че чрез тази връзка се осъществява свързването с галактановите и/или арабиногалактановите странични вериги в пектиновите ПЗ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Република България	ТЕХНОЛОГИЧНА ДОКУМЕНТАЦИЯ	№:
		Ревизия 1
	ПРОИЗВОДСТВО НА СОК ОТ АРОНИЯ, ШИПКА И 0.4% ПЕКТИН	Утвърждавам, Управител ИТЦ: Христо Крачанов

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Технологичната документация се отнася за производство на сок от арония, шипка и 0.4% ябълков пектин. Този сок е комплекс от три природни съставки – сок от арония, екстракт от шипка (*R. canina* L.) и ябълков пектин. Те са мощни имуностимулатори, които укрепват имунната система и допринасят за профилактика от ракови заболявания. Този сок е особено подходящ за прием през есенно-зимния сезон, когато организъмът е изложен на по-чести вирусни заболявания и настинки. Сокът подпомага адаптирането на организма, особено при рязка смяна на климатичните условия, подпомага възстановяването след боледуване, допринася за по-леко превъзможване на стресови ситуации. Екстрактът от шипка е известен с благоприятното си въздействие.

Сокът от арония, шипка и 0.4% ябълков пектин се произвежда в бутилки от 250 и 750 mL при дневна доза 125 mL.

2. ТЕХНИЧЕСКИ ИЗИСКВАНИЯ

Използваните при производство на продукта суровини и материали отговарят на действащите стандартизационни документи или са разрешени за тази цел от МЗ.

2.1. Активни и помощни вещества

- 2.1.1. Студено пресован сок от арония-сертификат на производител
- 2.1.2. Екстракт от шипка-сертификат на производител
- 2.1.3. Ябълков пектин-сертификат от производител
- 2.1.4. Лимонена киселина-сертификат на производител
- 2.1.5. Стъклени бутилки от 350 и 750 mL-сертификат на производител
- 2.1.6. Индивидуални картонени кутии от хромлукс хартия,
художествено оформени-сертификат от производителя
- 2.1.7. Кашони от трипластов картон-сертификат от производителя

2.1.8. Тиксо широко-сертификат от производителя

2.2. МАШИНИ И СЪОРЪЖЕНИЯ

- 2.2.1. Чукова мелница за смилане на плодовете на шипката;
- 2.2.2. Екстрактор – хомогенизатор ЕП-12 за получаване на сок от арония и на екстракт от шипка и за хомогенизация на пектина;
- 2.2.3. Мултибюхер-преса за пресоване на плодовете – арония и получаване на плодов сок;
- 2.2.4. Везни (електронни) до 20 kg и до 100 kg;
- 2.2.5. Контейнери за съхранение на междинните продукти и крайния продукт;
- 2.2.6. Автоматизирана система за разфасоване на сока в стъклените бутилки и за етикетиране на бутилките.

Производството на сок от арония, шипка и 0.4% пектин е съобразена с добрата производствена практика и добрата хигиенна практика.

При производството задължително се спазва изискването за хигиена на храните.

3. ЗДРАВНО-ХИГИЕННИ И КАЧЕСТВЕНИ ПОКАЗАТЕЛИ И НОРМИ

Сок от арония, шипка и 0.4% ябълков пектин отговаря на следните качествени и хигиенни изисквания:

3.1. Характеристика на продукта:

Наименование на показателите	Характеристика и норми
Външен вид	Тъмно-червена течност в стъклена бутилка
Цвят	Тъмно-червен
Мирис	Слаб специфичен
Маса на съдържимото в 1 бутилка, в mL	250 mL \pm 2.5%
Идентичност	Съгл. т. 5.2.2

3.2. Микробиологични показатели

Наименование на показателите	Характеристика и норми
<p>Микробиологични показатели</p> <ul style="list-style-type: none"> - Общ брой мезофилни аеробни и факултативно анаеробни, микроорганизми, CFU/g не повече от: - Колиформи в 1.0 g от продукта, - <i>Escherichia coli</i> в 1 g от продукта - <i>Salmonella</i> sp. в 25.0 g от продукта - <i>Pseudomonas</i> sp. в 1.0 g от продукта - <i>Staphylococcus aureus</i> в 1.0 g от продукта - Други патогенни микроорганизми - Спори на микроскопични плесени и дрожди, CFU/g не повече от: - Дрожди, CFU/g не повече от: 	<p>Не се допускат</p> <p>Не се допускат</p> <p>Не се допускат</p> <p>Да не се установяват</p> <p>Да не се установяват</p> <p>Не се допускат</p> <p>100</p> <p>100</p>

4. МЕТОДИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ И МЕТОДИ ЗА ЛАБОРАТОРЕН АНАЛИЗ

4.1. Вземането на проби се извършва съгласно БДС – 3836 – 80 и Наредба 5/2006.

4.2. Методи за контрол.

4.2.1. Мирис – оценява се органолептично

4.2.2. Външен вид.– Ph. Eur. III.

4.2.3. Определяне на средната маса и равномерност на масата.

За не по-малко от 18 бутилки отклонението от средната маса не трябва да бъде по-голямо от $\pm 2.5\%$. За индивидуалните маси – за не повече от 2 бутилки се допуска отклонение от средната маса по-голямо от ± 7.5 на сто, но не по-голямо от ± 15 на сто от средната маса.

4.2.4. Определяне на микробното съдържание.

Изпитването се извършва съгласно БДС 12334/86 и БДС 4336-73.

5. ОПИСАНИЕ НА ТЕХНОЛОГИЧНИЯ ПРОЦЕС

5.1. Машины и съоръжения - съгл. т. 2.2

5.2. Технологичен процес:

Производството на сок от арония, шипка и 0,4% ябълков пектин се осъществява по следния начин:

1. Смилане на шипковите плодове в чукова мелница;
2. Екстракция на шипката с 1% лимонена к-на в деминерализирана питейна вода.
3. Филтруване на екстракта в мултибюхерпреса;
4. Концентриране на екстракта до 15% във вакуумапарат;
5. Студено пресоване на арония;
6. Смесване на концентрирания екстракт от шипка, сок от арония и пектин в екстрактор-хомогенизатор ЕП-12
7. Дозировка на получения сок в автоматизираната линия за пълнене и етикетирание в стъклени бутилки от 250 mL;
8. Нареджане на бутилките в кашони;
9. Експедиция по предназначение.

6. СЪХРАНЕНИЕ И ТРАНСПОРТ

- 6.1. Сокът от арония, шипка и 0.4% ябълков пектин опакован в потребителска и транспортна опаковка има срок на съхранение 18 месеца при температура 15 – 25°C в сухи и защитени от пряка слънчева светлина складови помещения, Наредба 5/2006.
- 6.2. Транспортира се в закрити превозни средства, съгл. БДС 12545-74, Наредба 5/2006

7. ОПИСАНИЕ И РЕД ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА ПРОИЗВОДСТВЕНИЯ КОНТРОЛ

Производственият контрол се извършва съгласно стандартни инструкции за контрол на технологичния процес, разработен в съответствие с изискванията на Добрата Производствена Практика.

Входящ контрол- на постъпващите суровини, опаковъчни и спомагателни материали. Технологичен контрол - по т. 4 се осъществява в ОКК.

Изходящ контрол. От всяка партида се отделят представителни мостри, които се съхраняват в продължение на 2 и половина години (1 година след изтичане срока на годност). За всяка крайна партида се издава сертификат за качество.

8. ДОКУМЕНТАЦИЯ

Всяка партида се придружава със сертификат за качество, издаден от ОКК на производителя.

При производството на сок от арония, шипка и 0.4% ябълков пектин се спазват изискванията на Наредба № 5 на МЗ и МЗГ от 25.05.2006 г. за хигиената на храните (ДВ, бр. 55/2006 г.).

11. БЛАГОДАРНОСТИ (ACKNOWLEDGEMENTS)

Бих искал да изразя своите най-искрени благодарности към научния ми ръководител доц. д-р Мария Г. Крачанова за проявеното отношение и внимание към моята работа, за подкрепата, разбирането и най-вече за търпението и предоставянето ми на достатъчно време за оформяне на ръкописа на настоящата дисертация! Изказвам специални благодарности и на проф. д.х.н. Христо Г. Крачанов за подкрепата, ценните житейски съвети, както и за понякога доста продължителните, но същевременно и доста поучителни дискусии. За отделените лични финансови средства за подпомагане на немалка част от разработките по дисертацията и за прегледа на ръкописа и критичните бележки към него, направени и от двамата, съм също признателен!

Изключително признателен съм на проф. д.х.н. Светлана Д. Симова – също ръководител на моята дисертация и на доц. д-р Павлета Шестакова за проявеното търпение и съветите при запознаването ми с основите на ЯМР спектроскопията, а също така за възможността да посетя курса по ЯМР!

Тук е мястото да изкажа искрената си благодарност и признателност на доц. д-р инж. Петко Н. Денев (р-л ЛБАВ) и на маг. инж. Йордан Н. Георгиев, който в момента е редовен докторант. Петко, благодаря ти за проведените анализи за АО активност по дисертацията, както и за ползотворните дискусии, подкрепата, полезните съвети и споделените забавни истории и моменти в нашата съвместна работа ☺. Данчо, ти ме затрудняваш още повече, т.к. в този момент трудно се намират думи, с които накратко може да се опишат прекрасните впечатления и възхищения от теб в отделните етапи от нашето познанство. Благодаря ти за всеотдайността и помощта при съвместно провежданите „рамо до рамо“ анализи – доста често продължаващи до късно вечерта, подкрепата, полезните дискусии по разнообразни проблеми, както и за забавните моменти и истории ☺, които за радост съпътстват нашето ежедневие! Ти си един от малкото хора, които могат да се опишат освен с тривиалното „колега“ и с кратката, но изпълнена с голямо значение за мен дума – приятел ☺! На двама ви съм благодарен също така и за прегледа на ръкописа и направените бележки към него.

Бързам да благодаря и на химик Ирина Ж. Янакиева без чиято помощ и усърдна работа голяма част от представените (т. 4.2.1 и 4.2.2) хроматографски анализи на ЦП не биха били реалност! Признателен съм и на останалите колеги (технически персонал) от

ЛБАВ за техническата помощ при някои от анализите, а също така и на колегите от фирма ВИТАНЕА ООД и ИТЦ ООД за съдействието при суровинното обезпечаване на моята работа и извършването на производствените опити по получаването на функционалната напитка.

В следващите няколко реда бих искал да отбележа и спомена за огромната роля и значение, които изиграха за мен две (макар и сравнително кратки) посещения в Laboratory of Food Chemistry, Wageningen University (Wageningen, The Netherlands)! Огромна е признателността ми към prof. dr. Henk A. Schols и prof. dr. ir. Harry Gruppen за предоставената ми възможност да посетя ръководената от тях лаборатория и да реализирам немалка част от експериментите по настоящата дисертация! С респект и уважение поднасям своите благодарности към Henk, който винаги намираше и отделяше немалко време за полезни дискусии, съвети и напътствия. Не мога да не отбележа и възхищението си и дори изумлението си от начина, по който организираше времето за експерименти, преподаване, срещи и ръководство на докторанти, а също така и от критичния начин, по който оценя и коментира научните резултати! Благодаря на секретар Jolanda van den Boomgaard-den Hertog за техническата организация по съответните визити и за топлото посрещане. На Connie Remoroza, PhD (тогава докторант) благодаря за съвместната съзидателна работа и колегиалното отношение към мен. На останалите колеги, с които имах възможност да се запозная и разговарям – Jie-Hong Huang, PhD (тогава докторант) и ing. Edwin J. Vakx благодаря за отделеното време за дискусии, проявеното търпение, внимание и оказваната помощ при софтуерен проблем. Изключително признателен съм на Uttara Ramasamy, PhD (тогава докторант) и на студент Bertus Schoonlingen за помощта при получаването на алдитол ацетатите и въглехидратния анализ. Не мога да скрия и признателността си от съвместната работа с Melliana S. Jonathan, PhD, която ми оказва необходимата помощ и съдействие при организирането на метанолизния анализ! На всички вас: „Oprechte dank voor de hulp en advies. Hartelijk bedankt“ 😊😊😊

В част от изследванията, предмет на дисертацията участваха активно и колеги от други научни центрове. Изказвам своята благодарност към нашите чешки приятели Milan Čiž, Antonin Lojek и техните сътрудници от Лабораторията по патофизиология на свободните радикали към Института по биофизика при ЧАН (Бърно) за извършването на

биологични анализи свързани с оценката на ефекта на шипковите ПЗ върху продукцията на РФК! За провеждането на анализите по антитуморна активност и имунофенотипизиране поднасям благодарност на проф. д.б.н. Балик Джамбазов и гл. ас. д-р Цветелина Бацалова от катедра „Биология на развитието“ към БФ на ПУ „П. Хилендарски“, Пловдив. Огромна е благодарността ми към доц. д-р Веселин К. Късовски от Департамента по инфекциозна микробиология към Института по микробиология „Акад. Стефан Ангелов“ при БАН, София, който изпълни нелеката задача по определяне на антикомплементарната активност на множество проби. Благодарност изказвам и на prof. Haruki Yamada, с когото имах удоволствието да се запозная лично, и prof. Hiroaki Kiyohara от Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Japan за възможността да проведем съвместни изследвания и предоставянето на резултатите за оценка на имуномодулиращия потенциал на някои наши пектинови проби!

В списъка от лица допринесли са реализирането на този труд бих искал да добавя още и имената на: Maria Binder (PhD student, Poznań University, Poznań, Poland), Dr hab. inż. Aleksander Dziurzyński (Assist. Prof., Institute of Wood Chemical Technology, Poznań, Poland), Doc. Mgr. Andriy Synytsya, (PhD from the Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic), на които бих искал да благодаря за сериозното и отговорно отношение към моята работа, за предоставянето на литература на английски и полски език и помощта с превода, както и за някои съвети по разработения в самото начало метод за ацетилно съдържание.

На последно, но не по значение място, искам да благодаря на Ваня и Трайчо Петкови, както и на гл. ас. д-р инж. Надежда Тр. Петкова, които ме приеха в семейството си безрезервно и с грижите и помощта си, осигуриха необходимата творческа обстановка допринесла за реализирането на този труд. За оказаната помощ с превода от френски език съм също признателен на Н. Петкова.

Запазвам края, за да благодаря и на моите родители, Христо и Лиляна Огнянови, които въпреки голямата дистанция „непрекъснато са до мен“ и търпеливо ме подкрепят и окуражават в моите начинания.

В основната си част настоящият дисертационен труд е осъществен с финансовата подкрепа от следните основни проекти: 1) BG051PO001/3.3-05-0001 „Наука и Бизнес“. Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на

човешките ресурси“, съфинансирана от Европейския социален фонд на Европейския Съюз;
2) BG161PO003-1.1.05-0024-C0001 „Получаване на нутрацевтици с антиоксидантно и имуностимулиращо действие“, осъществен с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на конкурентноспособността на българската икономика“ 2007-2013 г.

На всички останали, които са имали отношение към изработването на дисертационния труд и неволно съм пропуснал тук...

БЛАГОДАРЯ ВИ!



12. БИОГРАФИЧНИ ДАННИ

Манол Хр. Огнянов е роден на 20 ноември 1985 г. в гр. Варна, където преминава и детството му. През 2004 г. завършва с отличие средно образование в Професионална гимназия по туризъм „Проф. д-р Ас. Златаров“, гр. Варна (бивш ТОХ), като придобива втора степен на професионална квалификация по специалността „Техника и технология на хляба и хлебните изделия“. През 2009 г. придобива диплома за висше образование за образователно-квалификационна степен „Бакалавър“ по специалност „Биотехнологии“ и професионална квалификация „Инженер“ от Университета по хранителни технологии в гр. Пловдив. През следващата година завършва редовно, също с отличен успех и магистърския курс на същата специалност. Научно-изследователската си кариера започва още като студент в магистърския курс след постъпването му като инженер-технолог в Лабораторията по биологично-активни вещества в Пловдив (ЛБАВ) към Института по органична химия с Център по фитохимия (гр. София) към БАН, където изработва и магистърската си теза озаглавена „Ензими за изучаване структурата на биологично-активни полизахариди“. От януари 2011 г. е зачислен като редовен докторант. През май 2012 г. участва в конкурсната процедура за „Подбор на пост докторанти и млади учени за едномесечни обучения във високотехнологични научни комплекси и инфраструктури“ по проект „Наука и бизнес“, а през октомври за кратко посещава Лабораторията по свободни радикали и патофизиология в Института по биофизика към ЧАН в гр. Бърно (Чехия). През май 2013 г. осъществява едномесечна специализация в Лабораторията по хранителна химия към катедрата по „Аграрни технологии и хранителна наука“ на Университета във Вагенинген (Кралство Нидерландия). През октомври 2014 г. съгласно план-програмата на проект „Получаване на нутрацевтици с антиоксидантно и имуностимулиращо действие“ извършва оперативна командировка в същата лаборатория, където продължава усвояването на съвременните методи за получаване, модификация и характеристика на полизахариди. Участвал е в 10 научно-изследователски проекта на един от които е бил ръководител, както и на над 10 конференции, семинари и симпозиуми. Автор е на 13 публикации, от които 5 в съавторство. От 1 февруари 2014 г. е отчислен с право на защита и е назначен на длъжността „асистент“ в ЛБАВ-Пловдив, където продължава своята изследователска работа.



За контакти:

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Институт по Органична химия с Център по Фитохимия – София

Лаборатория по биологично активни вещества – Пловдив

гр. Пловдив, П.К. 4000; бул. Руски № 139, ет. 1

  032 64 27 59 (служебен)

 mogn@orgchm.bas.bg или mogn@abv.bg

BIOGRAPHY

Manol H. Ognyanov was born on 20th of November 1985 in Varna (Bulgaria), where he spent his childhood. In 2004 he graduated with excellent mark secondary education and got certificate of qualification in “Technique and technology of bread and bakery products” from the Vocational Secondary School of Tourism “Prof. Dr. Assen Zlataroff” (former Technical school of Public Catering), Varna. In 2009 he received bachelor’s degree higher education diploma in Biotechnology from the University of Food Technology – Plovdiv. He received a diploma for professional qualification “Engineer”. Next year he graduated with honours master's degree in the same specialty. He began research career as a student in the master's course after enrolling as an engineer-technologist at the Laboratory of Biologically Active Substances – Plovdiv (LBAS) at the Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry (Sofia), BAS, where he did master's thesis entitled “Enzymes for studying the structure of biologically active polysaccharides”. He was assigned for a Ph.D. student at the beginning of January 2011. In May 2012, he participated in competition procedure “Selection of postgraduate students and young scientists for one-month training in high-tech research centers and infrastructure” project “Science and Business”. Flying visit in the Laboratory of Free Radicals and Pathophysiology at the Institute of Biophysics (AS CR) in Brno (Czech Republic) was performed in October. In May 2013, he realized one-month specialization in the Laboratory of Food Chemistry at the Department of Agrotechnology and Food Science of Wageningen University (The Netherlands). According to the research plan of the project “Preparation of nutraceuticals with antioxidant and immunostimulating activity” he re-visited the Laboratory of Food Chemistry where he continued training in methods for isolation, modification and characterization of polysaccharides. He has participated in 10 research projects one of which was headed by himself and more than 10 conferences, seminars and symposia. He is author of 13 publications, including 5 as co-author. Since February 1st, 2014 he has been charged with the right of defense and was appointed to the position of "assistant professor" in LBAS, where he continues his research projects.

Correspondence should be addressed:



BULGARIAN ACADEMY OF SCIENCES

Institute of Organic chemistry with Centre of Phytochemistry – Sofia

Laboratory of Biologically Active Substances – Plovdiv

4000 Plovdiv, Bulgaria

139 Ruski blvd., 1st floor

  (+359) 32 64 27 59

 mogn@orgchm.bas.bg or mogn@abv.bg