

УДК 547.458:547.458.87:547.458.88

СТРУКТУРНО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕКТИНА ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ *PICEA ABIES*

© **Е.Г. Шахматов, Е.Н. Макарова***

*Институт химии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, ул. Первомайская, 48,
Сыктывкар, 167982 (Россия), e-mail: makarowa.elena-ma@ya.ru*

Цель настоящей работы – установление структурных особенностей полисахаридов, выделенных из древесной зелени ели обыкновенной *Picea abies* экстракцией водным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Полученный полисахарид был исследован методами ионообменной хроматографии, частичного кислотного гидролиза и спектроскопии ЯМР. Показано, что он содержал полимеры различной структуры, среди которых основным компонентом являются пектиновые полисахариды, представленные главным образом участками низкометилэтерифицированного и низкоацетилированного 1,4- α -D-галактопиранозилуронана и минорными участками частично 2-O- и/или 3-O- ацетилированного рамногалактуронана I (RG-I). Боковые углеводные цепи разветвленной области RG-I представлены преимущественно высокоразветвленным 1,5- α -L-арабиноном и минорными участками 1,4- β -D-галактана. В дополнение к доминирующим пектинам выделенный полисахарид содержал также связующие гликаны класса глюкоманнанов, что указывает на тесное взаимодействие этих полисахаридов в клеточных стенках. Таким образом, впервые определены особенности строения пектина древесной зелени *P. abies*, экстрагируемого раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Можно заключить, что древесную зелень *P. abies* – многотоннажный отход лесоперерабатывающей промышленности – можно рассматривать как потенциальный источник пектиновых веществ. Результаты изучения структуры компонентов древесной зелени *P. abies* могут быть положены в основу разработки и совершенствования новых технологий комплексного использования этого сырья.

Ключевые слова: *Picea abies*, пектин, арабинан, галактан, глюкоманнан, структура.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Химия» Института химии Коми НЦ УрО РАН.

Введение

Пектиновые вещества – это группа высокомолекулярных полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок и межклеточных образований растений совместно с целлюлозой, гемицеллюлозой, лигнином. Основными компонентами пектиновых веществ являются гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан-I (RG-I), рамногалактуронан-II, арабинан, галактан, арабиногалактан, апиогалактуронан и ксилогалактуронан, из чего можно заключить, что пектиновые вещества – весьма сложные по структуре полисахариды [1–3].

Сырьем для промышленного получения пектинов служат выжимки плодов и корочки цитрусовых: грейпфрутов, лимонов, апельсинов, мандаринов, яблочные выжимки, жом сахарной свеклы, корзинки подсолнечника.

Основным природоформирующим фактором в России, дающим различные виды полезной продукции, являются лесные ресурсы, большую часть из которых составляют хвойные растения. В различных видах хвойных деревьев были обнаружены пектиновые полисахариды и кислые арабиногалактаны, например, у *Pinus sylvestris* [4], *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* [5–8].

Ель обыкновенная (*Picea abies*) – хвойное вечнозеленое дерево, один из видов рода Ель (*Picea*) семейства Сосновые (*Pinaceae*). Древесная зелень ели, к которой относят хвою, листья и неодревесневшие побеги

Шахматов Евгений Геннадьевич – кандидат химических наук, научный сотрудник,
e-mail: shachmatow-eg@yandex.ru

Макарова Елена Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник,
e-mail: makarowa.elena-ma@ya.ru

ветвей диаметром в отрубе не более 8 мм, является составной частью лесосечных отходов и представляет несомненный интерес для исследования структуры полисахаридных комплексов, которые она содержит, поскольку имеется возможность ее

* Автор, с которым следует вести переписку.

круглогодичного использования и достаточная обеспеченность сырьевой базой. Известно, что экстракты, полученные из ели, обладают широким спектром физиологической активности [9, 10].

В предыдущей работе из древесной зелени ели *P. abies* методом последовательной экстракции водой, растворами HCl, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, KOH и NaOH были выделены фракции, содержащие арабиногалактановые белки (АГБ) и пектиновые полисахариды, а также связующие гликаны классов глюкуроноксианов и глюкоманнанов [11]. Ранее было установлено, что фракция, экстрагируемая водой из древесной зелени *P. abies*, состояла главным образом из АГБ и минорных количеств пектиновых полисахаридов [12], а фракция, экстрагируемая раствором HCl, представляла собой смесь АГБ и пектиновых полисахаридов с преобладанием последних [13]. В связи с этим научный интерес представляет изучение главной по выходу фракции, выделенной из древесной зелени ели *P. abies* экстракцией раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$.

Настоящая работа посвящена установлению структурных особенностей полисахаридов, выделенных из древесной зелени *P. abies* экстракцией водным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, с помощью методов структурной химии углеводов. Полученные полисахариды будут исследованы методами ионообменной хроматографии, частичного кислотного гидролиза, а также спектроскопии ^1H и ^{13}C ЯМР, с привлечением методов корреляционной спектроскопии TOCSY, COSY, HSQC, HSQC-TOCSY и спектроскопии ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат ROESY и многосвязной спектроскопии НМВС.

Изучение химического состава и строения полисахаридов, входящих в экстракты древесной зелени *P. abies*, могут быть положены в основу разработки и совершенствования новых технологий комплексного использования этого сырья, что имеет решающее значение по использованию этого многотоннажного отхода лесоперерабатывающей промышленности.

Экспериментальная часть

Выделение полисахаридов из P. abies. Древесная зелень *P. abies* была собрана вблизи г. Сыктывкара (Республика Коми, Россия). Образцы отбирали с 10–20 растущих деревьев в середине января. Для исследования древесной зелени срезали ветви из верхней, средней и нижней частей кроны деревьев в четырех геодезических направлениях. Свежесобранную предварительно измельченную на ножевой мельнице РМ-120 (размер частиц 0.5–15 мм) древесную зелень ели последовательно экстрагировали органическими растворителями (этилацетат, хлороформ) в аппарате Сокслета для удаления экстрактивных веществ.

Полученное воздушно-сухое сырье (100 г) экстрагировали дистиллированной водой (1 л) при периодическом перемешивании в течение 2 ч при 70 °С. Применяли пятикратную экстракцию. Объединенный экстракт фильтровали, концентрировали и центрифугировали. Супернатант собирали и осаждали четырьмя объемами 96% этанола. Полученный осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде, диализовали против дист. воды (диализные мешки 12–14 кДа) и лиофильно высушивали. Получили полисахарид РА_W (2 г).

Остаток сырья экстрагировали водой, подкисленной HCl до pH ~3.5–4, при периодическом перемешивании и $t \sim 70\text{--}71$ °С в течение 2 ч. Применяли пятикратную экстракцию. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше. Получили полисахарид РА_A (1 г).

Остаток сырья экстрагировали 0.7%-ным водным раствором щавелевокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ при 70 °С при периодическом перемешивании в течение 2 ч при 70 °С. Полученные экстракты обрабатывали, как описано выше. В результате был получен полисахарид РА_O (2.6 г).

Общие экспериментальные условия. Содержание углеводов определяли реакцией с фенолом в присутствии конц. серной кислоты [14]. Содержание урсонных кислот (UA) определяли по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты (калибровочный график построен для D-галактуроновой кислоты (Sigma-Aldrich), фотоколориметрирование проводили при двух длинах волн: 400 и 450 нм) [15]. Содержание белка определяли по методу Бредфорда (калибровочный график построен для бычьего сывороточного альбумина, фотоколориметрирование проводили при 595 нм) [16]. Содержание метоксильных групп определяли по реакции с пентан-2,4-дионом (калибровочный график построен для метанола, фотоколориметрирование проводили при 412 нм) [17]. Степень ацетилирования определяли с использованием процедуры Bédouet [18]. Все измерения проводили в трех аналитических повторностях и использовали средние значения для расчетов.

Спектры поглощения анализируемых растворов измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 (PharmaSpec).

Гель-фильтрационную хроматографию выполняли на хроматографической системе (Pharmacia, Швеция), применяли колонки (1.3×37 см) с молекулярными ситами Sephacryl (сефакрил) S-300 (Sigma), элюент – дистиллированная вода, свободный объем $V_0=12$ мл, скорость элюции – 0.25 мл/мин, сбор фракций – по 3 мл. Элюцию углеводов контролировали по положительной реакции аликвоты элюата на углеводы с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, фотоколориметрирование проводили при 480 нм [14]. Фракции, соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали и лиофилизовали.

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

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

Спектры ЯМР были зарегистрированы при температуре исследования 300–328 К на приборе Bruker AVANCE-II-300 (Германия), для 3–5%-ных растворов полисахаридов, после 1–2-кратной лиофилизации образцов из D₂O и последующего растворения их в 99.9% D₂O. Химические сдвиги приведены по отношению к внутреннему стандарту DSS (sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-sulfonate) (Sigma-Aldrich) (δ_H/δ_C 0.00 м.д.). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР производили на основании данных двумерных экспериментов. Двумерные гомоядерные (COSY, TOCSY, ROESY) и гетероядерные (HSQC, HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY и HMBC) спектры регистрировали с использованием стандартных методик фирмы «Bruker». Время смешивания 90 мс и 200 мс использовали для экспериментов TOCSY и ROESY соответственно.

Качественное и количественное определение нейтральных моносахаридов проводили с помощью метода ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [12].

Ионообменная хроматография полисахарида PA₀ на ДЭАЭ-целлюлозе. Полисахарид PA₀ (146 мг) растворяли в 0.01 М NaCl (3 мл) и фракционировали на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой (ОН⁻-форма, 34.5×2.2 см). Фракции элюировали последовательно 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 М NaCl со скоростью 1 мл/мин. Элюцию углеводов контролировали по методу Dubois [14]. Фракции (по 5 мл), соответствующие отдельным пикам на выходной кривой, объединяли, концентрировали, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридные фракции PA₀-I₀ (0.01 М NaCl, 19 мг), PA₀-I₁ (0.1 М NaCl, 55 мг), PA₀-I₂ (0.2 М NaCl, 36.4 мг) и PA₀-I₃ (0.3 М NaCl, 3 мг). Фракцию PA₀-I₁ (38,7 мг) растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и фракционировали методом гельхроматографии. В результате получили две полисахаридные фракции PA₀-I₁-1 (12.8 мг) и PA₀-I₁-2 (19.9 мг). Фракцию PA₀-I₂ (34.3 мг) растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и фракционировали методом гельхроматографии. В результате получили две полисахаридные фракции PA₀-I₂-1 (8.5 мг) и PA₀-I₂-2 (11.7 мг).

Частичный кислотный гидролиз полисахарида PA₀. К полисахариду PA₀ (500 мг) добавляли 0.05 М ТФУ (90 мл) и термостатировали в течение 4 ч при 70 °С. Кислотонерастворимую фракцию отделяли центрифугированием после охлаждения реакционной смеси. Нерастворимый осадок далее диспергировали в воде и постепенно приливали 1 М водный раствор NH₃ до полного растворения осадка, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридный фрагмент, который растворяли в дист. воде и разделяли методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. В результате получили фракцию PA₀-H₁ (29.4 мг), соответствующую главному пику на выходной кривой.

Кислоторастворимую фракцию (супернатант) концентрировали и осаждали 4-кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде, диализовали и лиофилизовали. В результате получили полисахаридный фрагмент PA₀-H (283.6 мг).

Водно-спиртовой супернатант концентрировали, диализовали против дист. воды (мембраны 3.5 кДа) и лиофилизовали. Получили углеводную фракцию, которую растворяли в дистиллированной воде (1 мл) и фракционировали методом гельхроматографии на колонке с сефакрилом S-300. В результате получили полисахаридный фрагмент PA₀-H₂ (84.1 мг), соответствующий главному пику на выходной кривой.

Обсуждение результатов

Пектиновые полисахариды, как правило, экстрагируют водой, хелатирующими агентами, горячей разбавленной кислотой и холодной разбавленной щелочью, которые часто применяют последовательно. Известно, что при экстракции растительного сырья водой извлекаются полисахариды, в том числе пектиновые полисахариды, наиболее слабо связанные с компонентами клеточной стенки. Хелатирующие агенты связывают ионы кальция и приводят к высвобождению из клеточной стенки молекул пектиновых веществ, которые не закреплены в ней с помощью других типов связей [19–21].

Свежесобранную древесную зелень ели последовательно экстрагировали этилацетатом и хлороформом для удаления экстрактивных веществ. Далее методом последовательной экстракции растительного сырья водой, растворами HCl и $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ получили пектинсодержащие полисахариды (пицеаны) PA_W , PA_A и PA_O соответственно (рис. 1). Установлено, что в древесной зелени *P. abies* присутствует, главным образом, пектиновый полисахарид, экстрагируемый раствором $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ (табл. 1). PA_W (СМ 74%) и PA_A (СМ 75%) представляют собой высокометилэтерифицированные полисахариды, в то время как PA_O (СМ 48%), напротив, имеет низкую степень метилэтерификации.

Главными компонентами углеводной цепи полисахарида PA_O являются остатки UA (68%), Aga (11.6%) и Gal (3.6%), являющиеся характерными компонентами пектиновых полисахаридов (табл. 1). Анализ моносахаридного состава показал, что при последовательной экстракции *P. abies* водой, водными растворами HCl и $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, содержание урсонных кислот (UA) увеличивается от 34 до 68%, что, вероятно, указывает на увеличение содержания пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

При фракционировании методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе (OH^- -форма) показано, что полисахарид PA_O состоит, главным образом, из двух фракций $\text{PA}_O\text{-I}_1$ (выход 37.7%) и $\text{PA}_O\text{-I}_2$ (выход 24.9%), элюируемых 0.1 М и 0.2 М NaCl соответственно.

Минорная фракция, элюируемая 0.01 М NaCl ($\text{PA}_O\text{-I}_0$), характеризуется значительно меньшим содержанием остатков UA (23%), значительно более высоким содержанием остатков галактозы, арабинозы, глюкозы и маннозы, по сравнению с последующими фракциями, что, вероятно, указывает на присутствие в ней арабианов, арабиногалактанов и связующих гликанов классов глюканов, маннанов и/или галактоглюкоманнанов (табл. 1).

Для сравнения: ядровая древесина *P. abies* содержала ~45% арабиногалактанов, 45–50% галактоглюкоманнанов и 5–10% других полисахаридов, в то время как ядровая древесина сосны обыкновенной *P. sylvestris* содержала ~80% арабиногалактанов, 10% галактоглюкоманнанов и меньше чем 10% других полисахаридов. Полисахариды *L. sibirica* на 97% были представлены арабиногалактанами [22].



Рис. 1. Схема экстракции древесной зелени ели обыкновенной

Таблица 1. Выход и состав фракций PA_w, PA_w и PA_o, выделенных из древесной зелени ели обыкновенной *P. abies* (вес. %)

Фракции	Выход, % от PA _o	UA	Нейтральные моносахариды								Белок
			Gal	Ara	Rha	Xyl	Fuc-OMe	Fuc	Glc	Man	
PA _w	2.0*	34	11.5	11.7	1.8	0.8	0.9	0.5	5.6	5.0	4.2
PA _w	1.0*	45	8.6	19.5	2.8	0.9	0.5	0.3	4.0	8.3	1.4
PA _o	2.6*	68	3.6	11.6	2.2	0.3	0.2	0.2	1.5	3.4	1.0
PA _o -I ₀	13.0	19	14.2	37.5	4.4	1.0	–	–	6.3	16.1	1.4
PA _o -I ₁ -1	12.5	44	11.3	25.8	4.3	1.5	0.8	–	0.8	0.9	0.9
PA _o -I ₁ -2	19.4	74	1.4	2.4	2.6	0.3	0.1	0.3	0.5	0.6	0.5
PA _o -I ₂ -1	8.0	68	3.7	6.2	3.8	0.4	0.3	0.3	0.8	1.0	1.3
PA _o -I ₂ -2	11.0	72	1.6	2.7	2.9	0.4	0.2	0.4	0.6	0.7	0.5
PA _o -H	56.7	78	3.9	3.1	1.9	0.4	0.1	0.1	1.2	2.9	0.9
PA _o -H ₁ -1	5.9	87	1.2	2.1	2.2	0.3	0.1	0.3	0.4	0.5	1.8
PA _o -H ₂ -1	16.8	46	3.2	18.5	3.2	0.5	–	–	1.6	2.9	3.6

* – от массы воздушно-сухого обезжиренного сырья.

Установлено, что в полученных фракциях PA_o-I₀, PA_o-I₁-1, PA_o-I₁-2, PA_o-I₂-1 и PA_o-I₂-2 содержание уруновых кислот увеличивается от 19 до 74%, а содержание нейтральных моносахаридных остатков Ara и Gal снижается с 37.5 до 2.4% и с 4.4 до 2.6% соответственно, что, вероятно, можно объяснить увеличением доли пектиновых полисахаридов в выделенных фракциях.

Фракция PA_o-I₀ была изучена методом ЯМР спектроскопии.

При анализе одномерных и двумерных спектров ЯМР полисахарида PA_o-I₀ были обнаружены сигналы, принадлежащие остаткам 1,4-связанной α-D-GalpA и остаткам, находящимся на восстанавливающих ...-4)-β-D-GalpA, ...-4)-α-D-GalpA и невозстанавливающих α-GalpA-(1→... концах углеводной цепи (табл. 2).

В сильном поле спектра ¹H/¹³C HSQC имеются сигналы C-6/H-6 атомов при 19.7/1.25, 1.30 м.д., принадлежащие CH₃-группам остатков α-L-Rha (рис. 2).

Наличие вышеприведенных остатков 1,4-α-D-GalpA, 1,2-α-L-Rhap и 1,2,4-α-L-Rhap указывает на присутствие пектиновых полисахаридов в полисахариде PA_o-I₀.

Интегральные интенсивности сигналов H-6 атомов остатков 1,2-α-L-Rhap (1.25 м.д.) и остатков 1,2,4-α-L-Rhap (1.30 м.д.) ¹H-ЯМР спектра имеют соотношение ~1.2 : 1, из этого следует, что почти половина остатков α-L-Rhap являются точками разветвления главной углеводной цепи, при этом содержание остатков 2,4-ди-О-замещенной α-L-Rhap составляет ~45% от общего содержания остатков рамнозы.

При анализе двумерных спектров ЯМР полисахарида PA_o-I₀ (табл. 2) обнаружены сигналы высокой интенсивности остатков Т-α-L-Araf, 1,3- и 1,5-связанной α-L-Araf, 2,5-ди-О-, 3,5-ди-О- и 2,3,5-три-О-замещенной α-L-Araf, свидетельствующих о наличии высокоразветвленного 1,5-α-L-арабинана, являющегося боковой углеводной цепью RG-I.

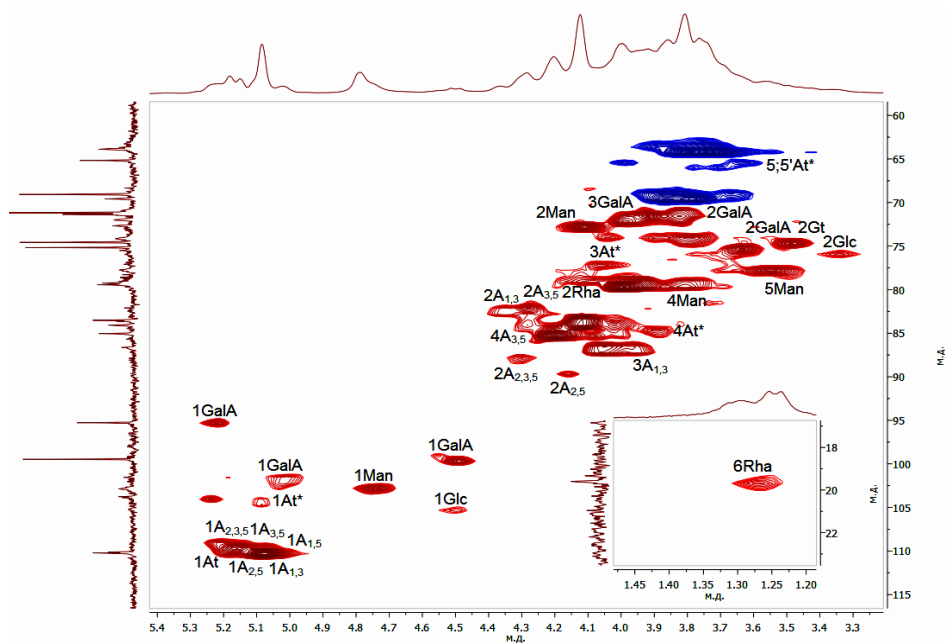
В спектре ROESY полисахарида PA_o-I₀ (рис. 3) установлено присутствие *интра*- и *транс*-гликозильных корреляционных пиков: H-1/H-5,5' при 5.09/3.87, 3.81 м.д. остатков 1,5-связанной α-L-Araf, указывающих на наличие фрагментов: ...→5)-α-Araf-(1→5)-α-Araf-(1→...; H1(T-α-L-Araf)/H2(1,2,3,5-α-L-Araf) при 5.14, 5.17/4.30 м.д., указывающих на замещение остатков 2,3,5-три-О-замещенной α-L-Araf по 2-му положению остатками Т-α-L-Araf.

В спектре HMBC присутствуют сигналы C1(1,5-α-L-Araf)/H5(1,5-α-L-Araf) при 110.3/3.87, 3.81 м.д., C5(1,5-α-L-Araf)/H1(1,5-α-L-Araf) при 69.1/5.09, C1(T-α-L-Araf)/H2, H3(1,2,3,5-α-L-Araf) при 109.6/4.31, 4.26 м.д., подтверждающих присутствие фрагментов: ...→5)-α-Araf-(1→5)-α-Araf-(1→..., а также ...→5)-[(T-α-L-Araf)-(1→2,3)]-α-Araf-(1→..., подтверждающих замещение остатков 2,3,5-три-О-замещенной α-L-Araf по 2-му и 3-му положению остатками Т-α-L-Araf.

В спектре ¹H/¹³C HSQC-TOCSY установлено присутствие кросс-пиков: C-1/H-2 при 110.3/4.12 м.д., C-2/H-1, H-3, H-4 при 83.7/5.09, 4.02, 4.21 м.д., C-3/H-2, H-4, H-5,5' при 79.5/4.12, 4.21, 3.87, 3.81 м.д., C-4/H-2, H-5,5' при 85.2/4.12, 4.02, 3.87, 3.81 м.д., C-5/H-3, H-4 при 69.1/4.02, 4.21 м.д. остатков 1,5-связанной α-L-Araf; C-3/H-2, H-4 при 84.9/4.29, 4.31 м.д. остатков 3,5-ди-О-замещенной α-L-Araf, C-4/H-2, H-3, H-5,5' при 86.5/4.14, 3.96, 3.82, 3.72 м.д., C-5/H-3, H-4 при 63.8/3.96, 4.05–4.07 м.д. остатков Т-α-L-Araf [23, 24].

Таблица 2. ^{13}C и ^1H ЯМР данные полисахарида PA₀-I₀ (стандарт DSS)

Остатки		C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
		<i>H-1</i>	<i>H-2</i>	<i>H-3</i>	<i>H-4</i>	<i>H-5;5'</i>	<i>H-6;6'</i>
→4)-α-GalpA-(1→		101.8	71.7	71.9	–	–	177.8
		5.02	3.82	3.98	4.40		
→4)-α-GalpA		95.4	71.6	71.9	–	–	178.0
		5.23	3.81	3.99	4.38	4.42	
→4)-β-GalpA		99.5	74.6	74.4	–	77.0	177.0
		4.50	3.49	3.75	4.37	4.05	
→2)-α-Rhap-(1→		–	79.0	71.8	74.6	72.5	19.7
		5.26	4.12	3.88	3.39	3.76	1.25
→2,4)-α-Rhap-(1→		–	79.0	72.7	82.7	70.9	19.7
		5.26	4.12	4.08	3.69	3.84	1.30
β-Galp-(1→	Gt	106.2	73.6	75.2	71.7	77.4	63.6
		4.44	3.53	3.65	3.92	3.69	3.81;3.74
→5)-α-Araf-(1→	A _{1,5}	110.3	83.7	79.5	85.2	69.1	
		5.09	4.12	4.02	4.21	3.87;3.81	
→3,5)-α-Araf-(1→	A _{3,5}	110.3	81.9	84.9	84.1	68.9	
		5.11	4.29	4.10	4.31	3.93;3.83	
→2,5)-α-Araf-(1→	A _{2,5}	109.8	89.6	77.9	84.5	68.9	
		5.18	4.16	4.18	4.28	3.93;3.83	
→2,3,5)-α-Araf-(1→	A _{2,3,5}	109.0	87.9	83.1	83.9	68.9	
		5.23	4.31	4.26	4.30	3.93;3.83	
→3)-α-Araf-(1→	A _{1,3}	109.7	82.4	86.6	84.1	63.8	
		5.17	4.36	3.96	4.23	3.87;3.78	
→3)-α-Araf-(1→	A _{1,3}	109.7	82.4	86.6	84.1	63.8	
		5.20	4.37	3.96	4.18	3.87;3.78	
α-Araf-(1→	At	109.6	83.8	79.5	86.5	63.8	
		5.15	4.14	3.96	4.05	3.82;3.72	
α-Araf-(1→	At	109.6	83.8	79.5	86.5	63.8	
		5.17	4.14	3.96	4.07	3.82;3.72	
β-Araf-(1→	At*	104.1	78.6	77.1	84.7	65.7	
		5.08	4.12	4.05	3.89	3.79;3.72	
→4)-β-Manp-(1→		102.9	72.6	74.4	79.2	77.6	63.4
		4.75	4.12	3.82	3.82	3.57	3.89;3.75
→4)-β-Glcp-(1→		105.3	75.7	76.8	81.4	77.5	63.6
		4.52	3.36	3.68	3.70	3.62	3.97;3.82

Рис. 2. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида PA₀-I₀

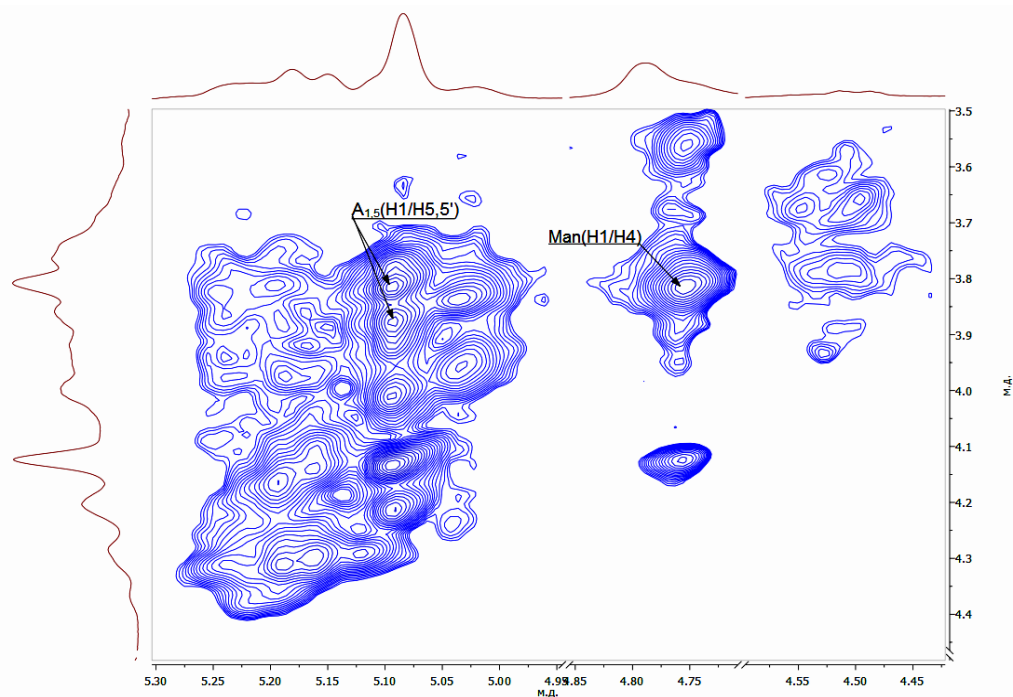


Рис. 3. Фрагмент спектра ROESY полисахарида PA₀-I₀

Хотя большинство остатков L-Araf имели α-аномерную конфигурацию, были обнаружены остатки T-β-L-Araf, находящиеся на не восстанавливающих концах боковых цепей (рис. 2, табл. 2).

Высокое соотношение остатков α-L-Araf/2,4-ди-O-замещенной Rhap ~18.9 (37.5/1.98), а также значительное количество T-α-L-Araf, 2,5-ди-O-, 3,5-ди-O- и 2,3,5-три-O-замещенной α-L-Araf в полисахариде PA₀-I₀, свидетельствуют о присутствии длинных высококоразветвленных боковых цепей, представленных 1,5-α-L-арабином, а также о небольшой длине участков кора рамногалактуронана I.

Длина боковых цепей арабирана и степень их ветвления зависят от вида растения и способа выделения и может варьировать, например, в платане от 2 до 20, в сахарной свекле – от 18, 45 до 118 остатков арабинозы [25].

Пектиновые полисахариды, содержащие в боковой углеводной цепи значительные участки высококоразветвленного 1,5-α-L-арабирана, были ранее обнаружены во внутренней коре *P. abies* [10].

В дополнение к доминирующим пектиновым полисахаридам подробный анализ спектров ЯМР позволил установить сигналы высокой интенсивности остатков 1,4-связанной β-D-Manp и 1,4-связанной β-D-Glcp, что указывает на присутствие связующих гликанов класса глюкоманнанов. Спектр ROESY полисахарида PA₀-I₁ содержит корреляционные кросс-пики не только между протонами в моносахаридных циклах, но и целый ряд межзвеньевых корреляций. Детальный анализ данного спектра свидетельствует о присутствии *интра*- и *транс*-гликозильных кросс-пиков: H-1/H-2, H-3, H-4, H-5 при 4.75/4.12, 3.82, 3.82, 3.57 м.д., которые подтверждают наличие участков, состоящих из остатков 1,4-связанной β-D-Manp: ...→4)-β-Manp-(1→4)-β-Manp-(1→... [26]. В спектре также присутствуют кросс-пики: H-1/H-2, H-3, H-4 при 4.52/3.36, 3.68, 3.70 м.д., относящиеся к остаткам 1,4-связанной β-D-Glcp, что свидетельствует о присутствии фрагментов: ...→4)-β-Glcp-(1→...

Кроме того, в спектре COSY наблюдаются сигналы невысокой интенсивности H1/H2 при 4.93/3.53 м.д. остатков T-α-Xylp, вероятно, принадлежащих связующим гликанам класса ксилоглюканов.

Таким образом, показано, что PA₀-I₀ представлял собой смесь нескольких полисахаридов и содержал главным образом пектиновый полисахарид, содержащий высококоразветвленный 1,5-α-L-арабиран, а также связующие гликаны класса глюкоманнанов и ксилоглюканов.

Сеть пектиновых полисахаридов, как полагают, является структурно независимой от линейных микрофибрилл целлюлозы и соединяющих их связующих гликанов. Однако пектины часто выделяются вместе со связующими гликанами и их разделение обычно затруднено. Возможно, это обусловлено физическими взаимодействиями и/или ковалентной связью.

Присутствие комплексов «пектин-ксилан-ксилоглюкан» было обнаружено в щелочных экстрактах из цветной капусты и паренхимы баклажана [27]. Из листьев Горца сахалинского была выделена фракция, состоящая из глюкуроноксилана, ксилоглюкана и пектинового полисахарида (в частности, RG-I), содержащего

в боковой цепи участки 1,5- α -L-арабинана [28]. Ковалентные связи между пектином и ксилоглюканом также описаны в работе Park & Cosgrove [29]. Связанный с пектином ксилоглюкан был обнаружен в четырех плодах – томатах, баклажанах, клубнике и яблоках [30].

ЯМР исследования полисахарида PA₀-I₁-2. Положение сигналов в 1D/2D-ЯМР спектрах полисахаридов PA₀-I₁-2 (табл. 3) свидетельствует о присутствии остатков 1,4-связанной α -D-GalpA и остатков, находящихся на восстанавливающих ... \rightarrow 4)- β -D-GalpA, ... \rightarrow 4)- α -D-GalpA и невосстанавливающих α -GalpA-(1 \rightarrow ... концах углеводной цепи (рис. 4).

При интерпретации спектра ROESY обнаружены корреляционные кросс-пики: H1/H2, H3, H4 при 5.08/3.76, 3.99, 4.42 м.д., принадлежащие остаткам 1,4-связанной α -D-GalpA, указывающим на наличие участков галактопиранозилуронана: ... \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow ...

В спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC (рис. 5) присутствуют сигналы высокой интенсивности C6/H4 атомов при 177.7/4.41 м.д., C1/H4 при 101.5/4.41, H1/C3, C4, C5 при 5.08/71.2, 80.4, 73.7, принадлежащие остаткам 1,4-связанной α -D-GalpA, C-6/H-5 атомов при 177.0/4.05, C-1/H-2, H5 при 98.5/3.52, 4.05, принадлежащие остаткам ... \rightarrow 4)- β -D-GalpA, C-1/H-4 при 94.5/4.38 м.д. принадлежащие остаткам ... \rightarrow 4)- α -D-GalpA.

Таблица 3. ^{13}C и ^1H ЯМР данные полисахарида PA₀-I₁-2 (стандарт DSS)

Остатки	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5;5'	H-6;6'
\rightarrow 4)- α -GalpA-(1 \rightarrow	101.5 5.08	70.6 3.76	71.2 3.99	80.4 4.41	73.7 4.77	177.7
\rightarrow 4)- α -GalpA-(1 \rightarrow 2	– 5.00	71.2 3.91	73.1 4.12	80.3 4.41	– 4.65	177.5
α -GalpA-(1 \rightarrow	101.5 5.06	70.6 3.72	72.0 3.92	73.2 4.29	74.6 4.76	177.7
\rightarrow 4)- α -GalpA	94.5 5.30	70.6 3.81	71.2 3.99	80.3 4.38	73.1 4.41	178.0
\rightarrow 4)- β -GalpA	98.5 4.57	74.0 3.52	74.7 3.77	79.9 4.37	76.7 4.05	177.0
\rightarrow 2)- α -Rhap-(1 \rightarrow	– 5.24	78.7 4.12	71.7 3.88	– 3.39	72.5 3.77	19.2 1.25
\rightarrow 2,4)- α -Rhap-(1 \rightarrow	– 5.24	78.7 4.12	– 4.08	– 3.69	70.6 3.84	19.5 1.30
\rightarrow 4)- β -Galp-(1 \rightarrow	– 4.63	75.2 3.68	– 3.76	79.8 4.17	– 3.72	63,8 3.82;3.79
\rightarrow 5)- α -Araf-(1 \rightarrow	– 5.08	83.4 4.13	79.2 4.02	84.7 4.21	– 3.87; 3.81	

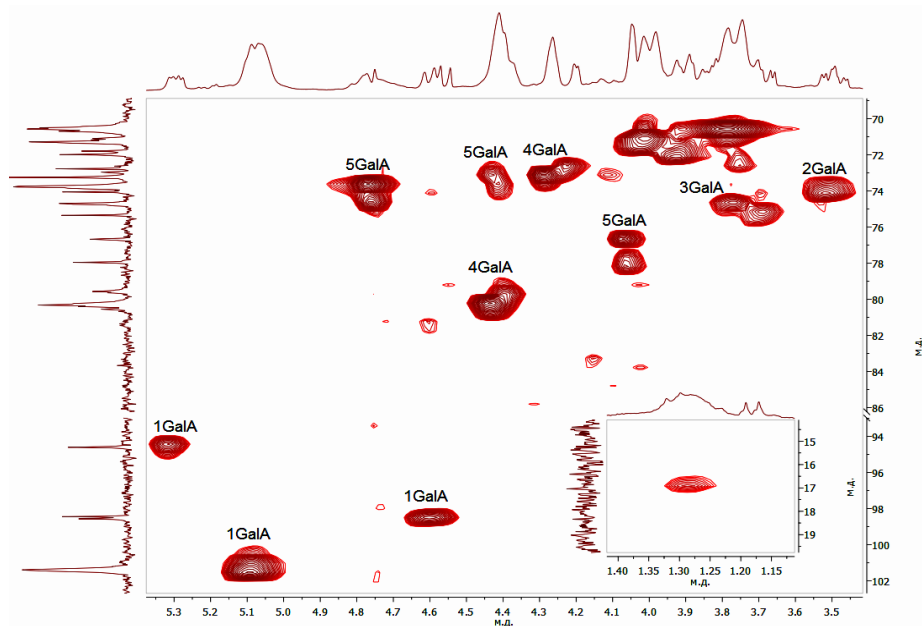


Рис. 4. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида PA₀-I₁-2

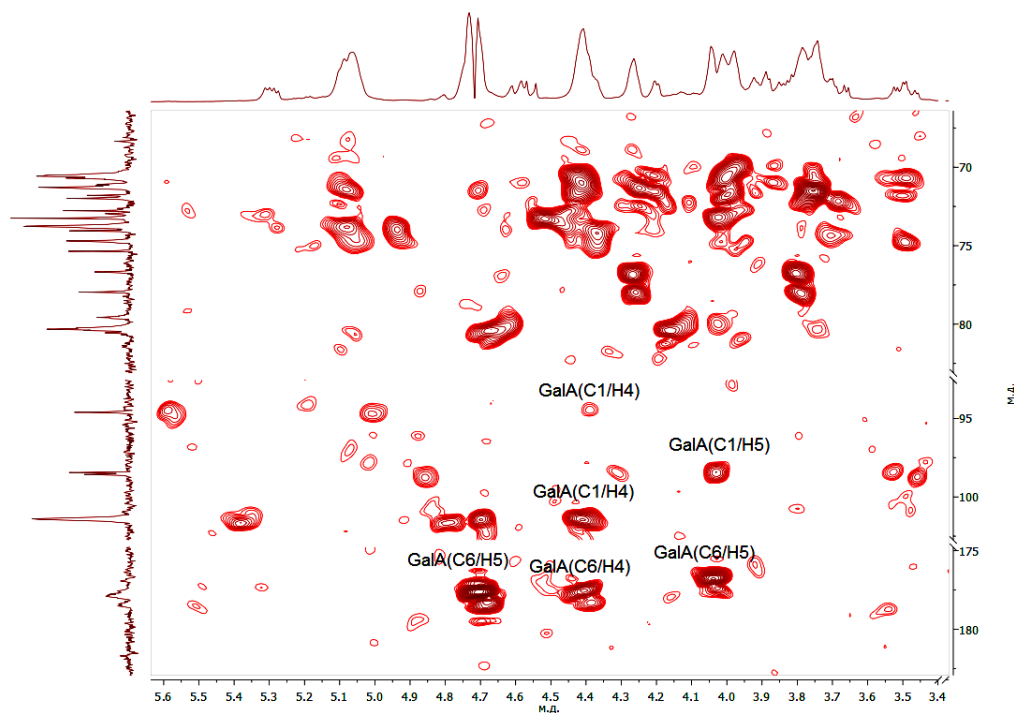


Рис. 5. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC полисахарида $\text{PA}_0\text{-I}_1\text{-2}$

При анализе одномерных и двумерных спектров полисахарида $\text{PA}_0\text{-I}_1\text{-2}$ также были обнаружены сигналы низкой интенсивности, принадлежащие остаткам 1,5-связанной $\alpha\text{-L-Ara}_f$ и 1,4-связанной $\beta\text{-D-Galp}$.

Частичный кислотный гидролиз полисахарида PA_0 . В результате частичного кислотного гидролиза полисахарида PA_0 0.05 М ТФУ получены полисахаридные фрагменты: $\text{PA}_0\text{-H}$, $\text{PA}_0\text{-H}_1$ и $\text{PA}_0\text{-H}_2$ (табл. 1). Кислоторастворимая фракция $\text{PA}_0\text{-H}$ является главной по выходу и составляет 56.7% от полисахарида PA_0 . Кислотонерастворимую фракцию фракционировали методом гельхроматографии и в результате получили фракцию $\text{PA}_0\text{-H}_1$ (СМ 11%, СА 5%). Главными компонентами углеводной цепи данных фракций являются остатки UA (табл. 1).

Из водно-спиртового супернатанта был выделен фрагмент, при дальнейшем фракционировании которого методом гелилтрации был получен полисахарид $\text{PA}_0\text{-H}_2$. Моносахаридный анализ данного полисахарида выявил высокое содержание остатков UA и Ara, являющихся характерными компонентами пектиновых полисахаридов (табл. 1).

ЯМР исследования полисахарида $\text{PA}_0\text{-H}_1$. При анализе спектров ЯМР полисахарида $\text{PA}_0\text{-H}_1$ были обнаружены сигналы, принадлежащие остаткам 1,4- $\alpha\text{-D-GalpA}$, остаткам метилэтерифицированной и/или ацетилированной 1,4- $\alpha\text{-D-GalpA}$, остаткам $\alpha\text{-D-GalpA}$ -(1→..., расположенным на невозстанавливающих концах углеводной цепи (табл. 4).

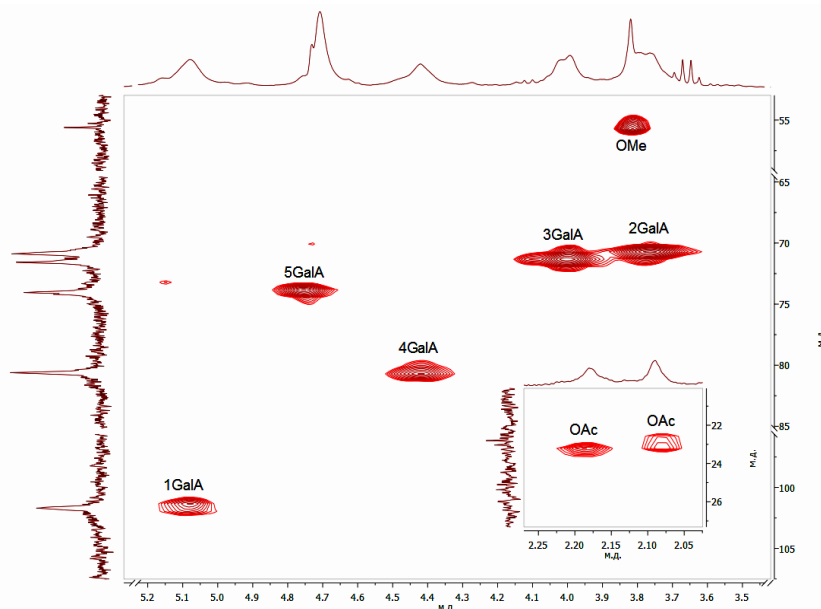
Наличие метилэтерифицированных карбоксильных групп остатков $\alpha\text{-D-GalpA}$ подтверждено сигналами C/H-атомов CH_3O -групп при 55.5/3.82 м.д. в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC. Спектр $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HMBC также свидетельствует о присутствии вышеуказанных остатков, в нем отмечают сигналы C6(GalpA)/H(OMe) при 173.7/3.82 м.д., относящиеся к остаткам метилэтерифицированной 1,4- $\alpha\text{-D-GalpA}$. Наличие метильных групп ацетата CH_3CO - подтверждено сигналами C/H-атомов при 23.3/2.19 м.д. и 23.1/2.08 в спектре $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -HSQC (рис. 6) [31, 32].

В спектре ROESY полисахарида $\text{PA}_0\text{-H}_1$ наблюдаются *интра*- и *транс*-гликозильные кросс-пики: H-1/H2, H3, H4 при 5.06/3.76, 4.00, 4.42 м.д. и H-1/H2, H3, H4 при 4.92/3.75, 4.03, 4.45 м.д. остатков $\alpha\text{-D-GalpA}$, указывающие на наличие фрагментов галактуронана: ...→4)- $\alpha\text{-D-GalpA}$ -(1→4)- $\alpha\text{-D-GalpA}$ -(1→... и ...→4)- $\alpha\text{-D-GalpA}$ (OMe)-(1→4)- $\alpha\text{-D-GalpA}$ (OMe)-(1→...

Все вышеперечисленное свидетельствует о присутствии в полисахариде PA_0 низкометилэтерифицированного и/или низкоацетилированного 1,4- $\alpha\text{-D}$ -галактопиранозилуронана.

Таблица 4. ^{13}C и ^1H ЯМР данные полисахарида PA₀-H₁ (стандарт DSS)

Остатки	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5;5'	H-6;6'
$\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$	101.6 5.04	70.6 3.72	72.0 3.90	73.1 4.26	74.5 4.75	177.5
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-(1}\rightarrow$	101.6 5.06	70.6 3.76	71.4 4.00	80.4 4.42	73.7 4.75	178.1
$\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-GalpA-OMe-(1}\rightarrow$	102.7 4.92	70.6 3.75	71.5 4.03	80.4 4.45	73.4 5.15	173.7

Рис. 6. Фрагмент спектра $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида PA₀-H₁

Выводы

Полимеры различного строения были получены из древесной зелени *Picea abies* последовательной экстракцией водой (PA_W), раствором HCl (PA_A) и раствором (NH₄)₂C₂O₄ (PA_O). Установлено, что в древесной зелени *P. abies* содержится, главным образом, низкометилэтерифицированный пектин, экстрагируемый раствором (NH₄)₂C₂O₄.

Обобщая полученные результаты с результатами, полученными ранее [12, 13], можно заключить, что фракция PA_W содержала главным образом арабиногалактановые белки и минорные количества пектиновых полисахаридов; фракция PA_A, содержала смесь арабиногалактановых белков и пектиновых полисахаридов, с преобладанием последних; а главная по выходу фракция PA_O, состояла, главным образом, из пектиновых полисахаридов.

Впервые определены особенности строения пектина древесной зелени *P. abies*, экстрагируемого раствором (NH₄)₂C₂O₄, и показано, что его главная цепь содержит участки низкометилэтерифицированного и низкоацетилированного 1,4- α -D-галактуронана и участки частично 2-*O*- и/или 3-*O*- ацетилированного RG-I. Боковые цепи разветвленной области RG-I содержат преимущественно остатки T- α -L-Araf, 1,3- и 1,5- α -L-Araf, 2,5-ди-*O*-, 3,5-ди-*O*- и 2,3,5-три-*O*-замещенной α -L-Araf, наличие которых свидетельствует о наличии высокоразветвленного 1,5- α -L-арабинана. При анализе ЯМР спектров также были обнаружены сигналы низкой интенсивности, принадлежащие остаткам 1,4-связанной β -D-Galp, указывающие на присутствие минорных участков 1,4- β -D-галактана.

В дополнение к доминирующим пектиновым полисахаридам полисахарид PA_O содержал также связующие гликаны класса глюкоманнанов, что указывает на тесную связь этих полисахаридов в клеточных стенках. Тем не менее необходимы дальнейшие исследования для определения природы вышеуказанных потенциальных взаимодействий.

Таким образом, древесную зелень *P. abies* – многотоннажный отход лесоперерабатывающей промышленности – можно рассматривать как потенциальный источник пектиновых веществ.

Список литературы

1. Harholt J., Suttangkakul A., Scheller H.V. Biosynthesis of pectin // *Plant physiology*. 2010. Vol. 153. Pp. 384–395. DOI: 10.1104/pp.110.156588.
2. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // *Carbohydrate Research*. 2009. Vol. 344. Pp. 1879–1900. DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.021.
3. Voragen A.G., Coenen G.J., Verhoef R.P., Schols H.A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls // *Structural Chemistry*. 2009. Vol. 20. Pp. 263–275.
4. Бутылкина А.И., Левданский В.А., Кузнецов Б.Н. Изучение состава экстрактивных веществ, выделенных из коры сосны различными методами // *Химия растительного сырья*. 2011. №2. С. 77–82.
5. Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Остроухова Л.А. Арабиногалактан лиственницы – свойства и перспективы использования // *Химия растительного сырья*. 2003. №1. С. 27–27.
6. Иванова Н.В., Попова О.В., Бабкин В.А. Изучение влияния различных факторов на выход и некоторые характеристики пектиновых веществ коры лиственницы // *Химия растительного сырья*. 2003. №4. С. 5–7.
7. Ефремов А.А., Кондратьев Т.А. Выделение пектина из нетрадиционного растительного сырья и применение его в кондитерском производстве // *Химия растительного сырья*. 2008. №4. С. 171–176.
8. Иванова Н.В., Оводова Р.Г., Бабкин В.А. Общая характеристика полисахаридов коры лиственницы // *Химия растительного сырья*. 2006. №1. С. 15–20.
9. Fyhrquist P., Virjamo V., Hiltunen E., Julkunen-Tiitto R. Epi dihydropipridine, the main piperidine alkaloid compound of Norway spruce (*Picea abies*) shows promising antibacterial and anti-Candida activity // *Fitoterapia*. 2017. Vol. 117. Pp. 138–146. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.01.011.
10. Le Normand M., Mélida H., Holmbom B., Michaelsen T.E., Inngjerdingen M., Bulone V., Paulsen B.S., Ek M. Hot-water extracts from the inner bark of Norway spruce with immunomodulating activities // *Carbohydrate Polymers*. 2014. Vol. 101. Pp. 699–704. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.067.
11. Makarova E.N., Shakhmatov E.G., Belyy V.A. Seasonal dynamics of polysaccharides in Norway spruce (*Picea abies*) // *Carbohydrate Polymers*. 2017. Vol. 157. Pp. 686–694. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.035.
12. Makarova E.N., Shakhmatov E.G., Belyy V.A. Structural studies of water-extractable pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Picea abies* greenery // *Carbohydrate Polymers*. 2018. Vol. 195. Pp. 207–217. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.074.
13. Shakhmatov E.G., Belyy V.A., Makarova E.N. Structure of acid-extractable polysaccharides of tree greenery of *Picea abies* // *Carbohydrate Polymers*. 2018. Vol. 199. Pp. 320–330. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.027.
14. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analytical chemistry*. 1956. Vol. 28. Pp. 350–356.
15. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. Polysaccharides of algae. 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae) // *Botanica marina*. 1995. Vol. 38. Pp. 43–52. DOI: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43.
16. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. Pp. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
17. Wood P.J., Siddiqui I.R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity // *Analytical Biochemistry*. 1971. Vol. 39. Pp. 418–423. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90432-5.
18. Bédouet L., Courtois B., Courtois J. Rapid quantification of O-acetyl and O-methyl residues in pectin extracts // *Carbohydrate Research*. 2003. Vol. 338. Pp. 379–383. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00500-1.
19. Prabasari I., Pettolino F., Liao M.L., Bacic A. Pectic polysaccharides from mature orange (*Citrus sinensis*) fruit albedo cell walls: Sequential extraction and chemical characterization // *Carbohydrate Polymers*. 2011. Vol. 84. Pp. 484–494. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.012.
20. Salato G.S., Ponce N.M., Raffo M.D., Vicente A.R., Stortz C.A. Developmental changes in cell wall polysaccharides from sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars with contrasting firmness // *Postharvest biology and technology*. 2013. Vol. 84. Pp. 66–73. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.04.009.
21. Taboada E., Fisher P., Jara R., Zúñiga E., Gidekel M., Cabrera J.C., Pereira E., Gutiérrez-Moraga A., Villalonga R., Cabrera G. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits // *Food Chemistry*. 2010. Vol. 123. Pp. 669–678. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.030.
22. Willför S., Holmbom B. Isolation and characterisation of water soluble polysaccharides from Norway spruce and Scots pine // *Wood Science and Technology*. 2004. Vol. 38. Pp. 173–179.
23. Cardoso S.M., Ferreira J.A., Mafra I., Silva A.M., Coimbra M.A. Structural ripening-related changes of the arabinan-rich pectic polysaccharides from olive pulp cell walls // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007. Vol. 55. Pp. 7124–7130. DOI: 10.1021/jf070769.
24. Westphal Y., Kühnel S., Waard P., Hinz S.W.A., Schols H.A., Voragen A.G.J., Gruppen H. Branched arabino-oligosaccharides isolated from sugar beet arabinan // *Carbohydrate Research*. 2010. Vol. 345. Pp. 1180–1189. DOI: 10.1016/j.carres.2010.03.042.
25. Yapo B.M. Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages // *Polymer Reviews*. 2011. Vol. 51. Pp. 391–413. DOI: 10.1080/15583724.2011.615962.

26. Hannuksela T., Penhoat C.H. NMR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp // *Carbohydrate Research*. 2004. Vol. 339. Pp. 301–312. DOI: 10.1016/j.carres.2003.10.025.
27. Femenia A., Rigby N.M., Selvendran R.R., Waldron K.W. Investigation of the occurrence of pectic-xylan–xyloglucan complexes in the cell walls of cauliflower stem tissues // *Carbohydrate Polymers*. 1999. Vol. 39. Pp. 151–164. DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00003-X.
28. Košťálová Z., Hromádková Z., Berit. S.P., Ebringerová A. Bioactive hemicelluloses alkali-extracted from *Fallopia sachalinensis* leaves // *Carbohydrate Research*. 2014. Vol. 398. Pp. 19–24. DOI: 10.1016/j.carres.2014.08.009.
29. Park Y.B., Cosgrove D.J. Xyloglucan and its Interactions with Other Components of the Growing Cell Wall // *Plant and Cell Physiology*. 2015. Vol. 56. Pp. 180–194. DOI: 10.1093/pcp/pcu204.
30. Cornuault V., Posé S., Knox J.P. Disentangling pectic homogalacturonan and rhamnogalacturonan-I polysaccharides: evidence for sub-populations in fruit parenchyma systems // *Food Chemistry*. 2018. Vol. 246. Pp. 275–285. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.025.
31. Perrone P., Hewage C.M., Thomson A.R., Bailey K., Sadler I.H., Fry S.C. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity // *Phytochemistry*. 2002. Vol. 60. Pp. 67–77. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00039-0.
32. Petersen B.O., Meier S., Duus J.Ø., Clausen M.H. Structural characterization of homogalacturonan by NMR spectroscopy-assignment of reference compounds // *Carbohydrate Research*. 2008. Vol. 343. Pp. 2830–2833. DOI: 10.1016/j.carres.2008.08.016.

Поступила в редакцию 12 апреля 2020 г.

После переработки 1 мая 2020 г.

Принята к публикации 14 мая 2020 г.

Для цитирования: Шахматов Е.Г., Макарова Е.Н. Структурно-химическая характеристика пектина древесной зелени *Picea abies* // *Химия растительного сырья*. 2020. №4. С. 59–71. DOI: 10.14258/jcprm.2020047648.

*Shakhmatov E.G., Makarova E.N.** STRUCTURAL AND CHEMICAL CHARACTERISTIC OF PECTIN FROM *PICEA ABIES* GREENERY

Institute of Chemistry, Federal Research Center “Komi Science Centre UB RAS”, ul. Pervomaiskaya, 48, Syktyvkar, 167982 (Russia), e-mail: makarowa.elena-ma@ya.ru

The present work aimed to determine structural features of polysaccharides derived from the *P. abies* foliage by extraction with a $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ solution. The isolated polysaccharide was studied in detail by the methods of ion exchange chromatography, partial acidic hydrolysis and NMR spectroscopy. It was shown that this polysaccharide contained polymers of various structures. The major constituents of PA₀ were low-methoxyl and low-acetylated 1,4- α -D-galacturonan and by minor parts of partly 2-O- and/or 3-O- acetylated rhamnogalacturonan-I (RG-I). The side carbohydrate chains of the branched region of RG-I were represented predominantly by highly branched 1,5- α -L-arabinan and minor portions of 1,4- β -D-galactan. In addition to the dominant pectins, polysaccharide PA₀ contained binding glycans of the glucomannans class, which indicated a close interaction of these polysaccharides in the cell walls. Thus, the structural features of pectin woody *P. abies*, extracted with a solution of $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, were first determined. It can be concluded that *P. abies* woody greens, a large tonnage waste from the wood processing industry, can be considered as a potential source of pectin substances. The results of studying the structure of components of woody green *P. abies* can be the basis for the development and improvement of new technologies for the integrated use of this raw material.

Keywords: *Picea abies*, pectin, arabinan, galactan, glucomannan, structure.

* Corresponding author.

References

1. Harholt J., Suttangkakul A., Scheller H.V. *Plant physiology*, 2010, vol. 153, pp. 384–395. DOI: 10.1104/pp.110.156588.
2. Caffall K.H., Mohnen D. *Carbohydrate Research*, 2009, vol. 344, pp. 1879–1900. DOI: 10.1016/j.carres.2009.05.021.
3. Voragen A.G., Coenen G.J., Verhoef R.P., Schols H.A. *Structural Chemistry*, 2009, vol. 20, pp. 263–275.
4. Butylkina A.I., Levdanskiy V.A., Kuznetsov B.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2011, no. 2, pp. 77–82. (in Russ.).
5. Medvedeva Ye.N., Babkin V.A., Ostroukhova L.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2003, no. 1, pp. 27–27. (in Russ.).
6. Ivanova N.V., Popova O.V., Babkin V.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2003, no. 4, pp. 5–7. (in Russ.).
7. Yefremov A.A., Kondratyuk T.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2008, no. 4, pp. 171–176. (in Russ.).
8. Ivanova N.V., Ovodova R.G., Babkin V.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2006, no. 1, pp. 15–20. (in Russ.).
9. Fyhrquist P., Virjamo V., Hiltunen E., Julkunen-Tiitto R. *Fitoterapia*, 2017, vol. 117, pp. 138–146. DOI: 10.1016/j.fitote.2017.01.011.
10. Le Normand M., Mélida H., Holmbom B., Michaelsen T.E., Inngjerdigen M., Bulone V., Paulsen B.S., Ek M. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 101, pp. 699–704. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.09.067.
11. Makarova E.N., Shakhmatov E.G., Belyy V.A. *Carbohydrate Polymers*, 2017, vol. 157, pp. 686–694. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.035.
12. Makarova E.N., Shakhmatov E.G., Belyy V.A. *Carbohydrate Polymers*, 2018, vol. 195, pp. 207–217. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.074.
13. Shakhmatov E.G., Belyy V.A., Makarova E.N. *Carbohydrate Polymers*, 2018, vol. 199, pp. 320–330. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.07.027.
14. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.T., Smith F. *Analytical chemistry*, 1956, vol. 28, pp. 350–356.
15. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. *Botanica marina*, 1995, vol. 38, pp. 43–52. DOI: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43.
16. Bradford M.M. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, pp. 248–254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
17. Wood P.J., Siddiqui I.R. *Analytical Biochemistry*, 1971, vol. 39, pp. 418–423. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90432-5.
18. Bédouet L., Courtois B., Courtois J. *Carbohydrate Research*, 2003, vol. 338, pp. 379–383. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00500-1.
19. Prabasari I., Pettolino F., Liao M.L., Bacic A. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 84, pp. 484–494. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.12.012.
20. Salato G.S., Ponce N.M., Raffo M.D., Vicente A.R., Stortz C.A. *Postharvest biology and technology*, 2013, vol. 84, pp. 66–73. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2013.04.009.
21. Taboada E., Fisher P., Jara R., Zúñiga E., Gidekel M., Cabrera J.C., Pereira E., Gutiérrez-Moraga A., Villalonga R., Cabrera G. *Food Chemistry*, 2010, vol. 123, pp. 669–678. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.05.030.
22. Willför S., Holmbom B. *Wood Science and Technology*, 2004, vol. 38, pp. 173–179.
23. Cardoso S.M., Ferreira J.A., Mafra I., Silva A.M., Coimbra M.A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, vol. 55, pp. 7124–7130. DOI: 10.1021/jf070769.
24. Westphal Y., Kühnel S., Waard P., Hinz S.W.A., Schols H.A., Voragen A.G.J., Gruppen H. *Carbohydrate Research*, 2010, vol. 345, pp. 1180–1189. DOI: 10.1016/j.carres.2010.03.042.
25. Yapo B.M. *Polymer Reviews*, 2011, vol. 51, pp. 391–413. DOI: 10.1080/15583724.2011.615962.
26. Hannuksela T., Penhoat C.H. *Carbohydrate Research*, 2004, vol. 339, pp. 301–312. DOI: 10.1016/j.carres.2003.10.025.
27. Femenia A., Rigby N.M., Selvendran R.R., Waldron K.W. *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 39, pp. 151–164. DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00003-X.
28. Košťálová Z., Hromádková Z., Berit. S.P., Ebringerová A. *Carbohydrate Research*, 2014, vol. 398, pp. 19–24. DOI: 10.1016/j.carres.2014.08.009.
29. Park Y.B., Cosgrove D.J. *Plant and Cell Physiology*, 2015, vol. 56, pp. 180–194. DOI: 10.1093/pcp/pcu204.
30. Cornuault V., Posé S., Knox J.P. *Food Chemistry*, 2018, vol. 246, pp. 275–285. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.025.
31. Perrone P., Hewage C.M., Thomson A.R., Bailey K., Sadler I.H., Fry S.C. *Phytochemistry*, 2002, vol. 60, pp. 67–77. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00039-0.
32. Petersen B.O., Meier S., Duus J.Ø., Clausen M.H. *Carbohydrate Research*, 2008, vol. 343, pp. 2830–2833. DOI: 10.1016/j.carres.2008.08.016.

Received April 12, 2020

Revised May 1, 2020

Accepted May 14, 2020

For citing: Shakhmatov E.G., Makarova E.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 59–71. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.2020047648.

