



УДК 547.458.8.02:577.114.5

## СТРУКТУРА АРАБИНОГАЛАКТАНА ДРЕВЕСИНЫ ЛИСТВЕННОЙ СИБИРСКОЙ (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.)

Антонова Г.Ф., Усов А.И. \*

Институт леса и древесины им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения Академии наук СССР, Красноярск;

\* Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва

С помощью методов метилирования, расщепления по Смитту, спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, частичного гидролиза и щелочной деградации изучено строение водорастворимого арабиногалактана, выделенного из древесины сибирской лиственницы. Арабиногалактан имеет высокоразветвленную структуру, в основе которой лежит главная цепь из 1→3-связанных  $\beta$ -D-галактопиранозных остатков, большинство из которых несут боковые ответвления при С-6. В ответвлениях содержатся остатки 3-О-замещенной арабинофуранозы и 6-О-замещенной галактопиранозы, а также 3,6-ди-О-замещенные остатки галактопиранозы; концевыми невосстанавливающими остатками являются арабинофураноза, арабинопираноза и галактопираноза.

Высокоразветвленные арабиногалактаны (АГ), основа молекулы которых построена из остатков  $\beta$ -D-галактопиранозы с преобладанием связей 1→3 в главной цепи и 1→6 в ответвлениях, содержатся во многих растительных тканях [1, 2]; богатым источником их служит древесина лиственниц. Наиболее детально исследовано строение арабиногалактана из лиственницы западной (*Larix occidentalis*); в США осуществлено промышленное получение этого полисахарида [3] для использования в качестве эмульгатора, связующего компонента или нетоксичной пищевой добавки. Для арабиногалактанов лиственниц, произрастающих в нашей стране, предложены способы крупномасштабного выделения и разнообразные области применения [4], однако подробные структурные исследования не проводились. Настоящая работа посвящена изучению строения арабиногалактана, выделенного из древесины лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb.

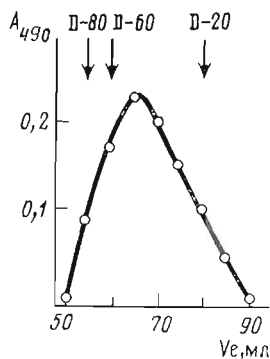


Рис. 1. Гель-хроматография АГ и декстранов D-80, D-60 и D-20 на колонке с сефадексом G-75

Арабиногалактан получали водной экстракцией измельченной древесины и очищали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе [5]. Полученный полисахарид, гомогенный по данным ультрацентрифугирования и гель-хроматографии, имел молекулярную массу около 40 000 (рис. 1),  $[\alpha]_D^{+10}$  (вода), и содержал D-галактозу и L-арабинозу в мольном отношении 7,5 : 1; уронеовые кислоты отсутствовали.

Типы связей моносахаридных звеньев в арабиногалактане были установлены методом метилирования. Полностью метилированный арабиногалактан, полученный трехкратной обработкой полисахарида по методу Хакомори [6], гидролизовали, продукты гидролиза восстанавливали, ацетилировали и анализировали методом хроматомасс-спектрометрии [7]. Результаты анализа представлены в табл. 1. Из данных метилирования следует, что арабиногалактан представляет собой высокоразветвленную молекулу, в которой главными звеньями являются остатки галактопиранозы, не имеющие заместителей (концевые), несущие один заместитель в положении 6 или же два заместителя в положениях 3 и 6 (точки ветвле-

Продукты метилирования арабиногалактана (I), полимерной фракции после его частичного гидролиза (II) и вещества, полученного трехкратным расщеплением арабиногалактана по Смитсу (III)

Производные полиолов	T <sub>отн</sub>	Относительное содержание		
		I	II	III
1,4-Ас <sub>2</sub> -2,3,5-Ме <sub>3</sub> -арабит	0,42	0,09	0,03	
1,5-Ас <sub>2</sub> -2,3,4-Ме <sub>3</sub> -арабит	0,51	0,09	0,06	
1,3,4-Ас <sub>3</sub> -2,5-Ме <sub>2</sub> -арабит	0,65	0,10	0,06	
1,5-Ас <sub>2</sub> -2,3,4,6-Ме <sub>4</sub> -дульцит	1,00	1,00	1,00	1,00
1,3,5-Ас <sub>3</sub> -2,4,6-Ме <sub>3</sub> -дульцит	1,39	0,16	0,10	14,05
1,5,6-Ас <sub>3</sub> -2,3,4-Ме <sub>3</sub> -дульцит	1,70	0,80	0,76	
1,3,5,6-Ас <sub>4</sub> -2,4-Ме <sub>2</sub> -дульцит	2,36	0,83	0,81	

Примечание. ГЖХ, времена удерживания T и площади пиков измеряли относительно 1,5-ди-О-ацетил-2,3,4,6-тетра-О-метилдульцита (T 3,75 мин).

ния); в существенно меньших количествах имеются концевые остатки арабинофуранозы и арабинопиранозы, а также остатки арабинофуранозы с заместителем в положении 3 и 3-О-замещенные остатки галактопиранозы. Фуранозную форму имеют около двух третей остатков арабинозы, содержащихся в полисахариде.

При частичном гидролизе в условиях расщепления фуранозидных связей и последующем осаждении смесью метанол — ацетон, 1 : 1, из арабиногалактана были получены высокомолекулярная фракция (главный продукт) и низкомолекулярная фракция, в составе которой кроме арабинозы и галактозы были найдены два олигосахариды (табл. 2). Преимущественное отщепление арабинозы и одновременное сохранение части остатков арабинозы в полимерной фракции согласуется с данными метилирования о том, что арабиноза находится как в фуранозной, так и в пиранозной

Таблица 2

Моносахаридный состав арабиногалактана и фракций, полученных при его частичном гидролизе \*

Образец	Gal/Ara, моль/моль
Арабиногалактан	7,5 : 1
Полимерная фракция	10 : 1
Низкомолекулярная фракция	0,35 : 1

Таблица 3

Моносахаридный состав продуктов расщепления арабиногалактана по Смитсу (Gal/Ara, моль/моль)

Количество образцов	Полимерная фракция	Низкомолекулярная фракция	
		до полного гидролиза	после полного гидролиза
1	9,22 : 1	1,27 : 1	0,65 : 1
2	95 : 1	Ara	0,87 : 1
3	Gal	Ara	—

\* ГЖХ продуктов полного гидролиза в виде ацетатов полиолов; до гидролиза в низкомолекулярной фракции обнаружены галактоза и арабиноза в соотношении 0,59:1 и олигосахариды с R<sub>Gal</sub> 0,24 и 0,75 (BX).

формах. Появление галактозы в гидролизате на первый взгляд противоречит результатам метилирования, но может объясняться обилием концевых остатков этого моносахарида, которые, несмотря на пиранозную форму, способны отщепляться уже в сравнительно мягких условиях. Образование галактозы и галактобиозы при мягком кислотном гидролизе отмечалось для арабиногалактанов из других источников [2]. В целом частичный гидролиз затрагивает лишь концевые участки полимера и мало изменяет макромолекулу, о чем свидетельствуют данные ультрацентрифугирования и результаты метилирования полимерной фракции (табл. 1), а также спектры <sup>13</sup>C-ЯМР (см. ниже).

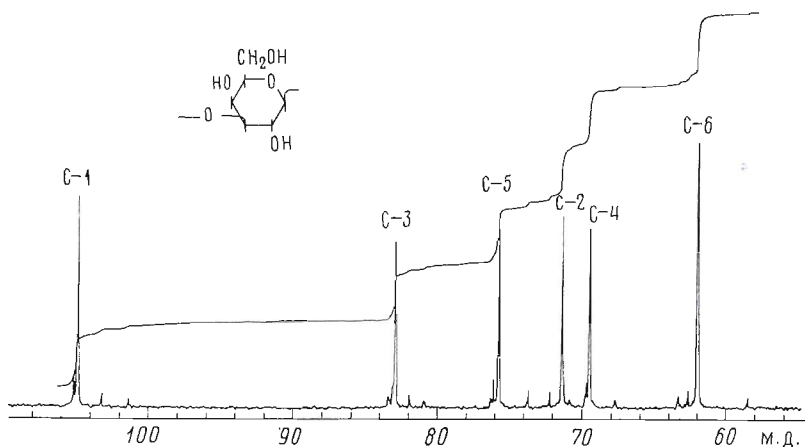


Рис. 2. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР продукта трехкратной обработки АГ по Смиуту

Для выяснения общего плана построения молекулы арабиногалактана было проведено трехкратное расщепление полисахарида по Смиуту. Мягкий гидролиз после каждой обработки проводили 1 М трифторуксусной кислотой и осаждали полимерную фракцию смесью метанол — ацетон, 1 : 1. Состав полученных фракций приведен в табл. 3. Дегрированный полисахарид даже после двух ступеней окисления содержит наряду с галактозными арабинозные остатки. Это означает, по-видимому, что некоторые 3-О-замещенные остатки арабинозы непосредственно присоединены к центральной галактановой цепи. По данным ультрацентрифугирования, высокомолекулярная фракция после первой обработки по Смиуту содержит не менее трех компонентов, различающихся по молекулярной массе, а после второго расщепления по Смиуту аналогичная фракция представляет собой один компонент с молекулярной массой ниже 15 000. Растворимость полимерных фракций в воде заметно уменьшается с каждой обработкой по Смиуту, несмотря на снижение молекулярной массы, что свидетельствует об уменьшении степени разветвленности молекулы.

Высокомолекулярная фракция, полученная после третьей обработки по Смиуту, имеет молекулярную массу около 10 000. Ее строение следует из данных метилирования (табл. 1) и спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, который (с точностью до малоинтенсивных минорных пиков) соответствует линейному  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-галактопиранану (рис. 2). Этот спектр отличается от спектра  $^{13}\text{C}$ -ЯМР исходного арабиногалактана (рис. 3) тем, что наиболее интенсивные сигналы в последнем принадлежат концевым невосстанавливающим или 6-О-замещенным остаткам  $\beta$ -галактопиранозы; сигналы небольшой интенсивности отвечают углеродным атомам остатков арабинофуранозы и арабиопиранозы. Отнесение сигналов в спектрах проведено сравнением со спектрами метил- $\beta$ -D-галактопиранозиды, его 3-О-метил- и 3,6-ди-О-метилпроизводных [8], ряда олигосахаридов, содержащих 3-О-замещенные остатки D-галактопиранозы [9], а также метиларабинозидов [10]. Интерпретация минорных пиков предположительна, тем не менее  $\beta$ -конфигурация остатков L-арабиопиранозы в полисахариде следует из положения сигнала C-5 при 64,5 м.д. и соответствующего ему сигнала C-1 в районе 101 м.д.; о  $\beta$ -конфигурации остатков L-арабинофуранозы свидетельствует отсутствие в спектре сигналов в районе 109—110 м.д., характерных для C-1  $\alpha$ -арабинофуранозидов [10]. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полимерной фракции, полученной при частичном гидролизе арабиногалактана, отличается от спектра исходного полисахарида только отсутствием минорных пиков, относящихся к углеродным атомам остатков арабинофуранозы.

Наличие в молекуле арабиногалактана центральной  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-галактановой цепи приводит к тому, что полисахарид при нагревании со щелочью

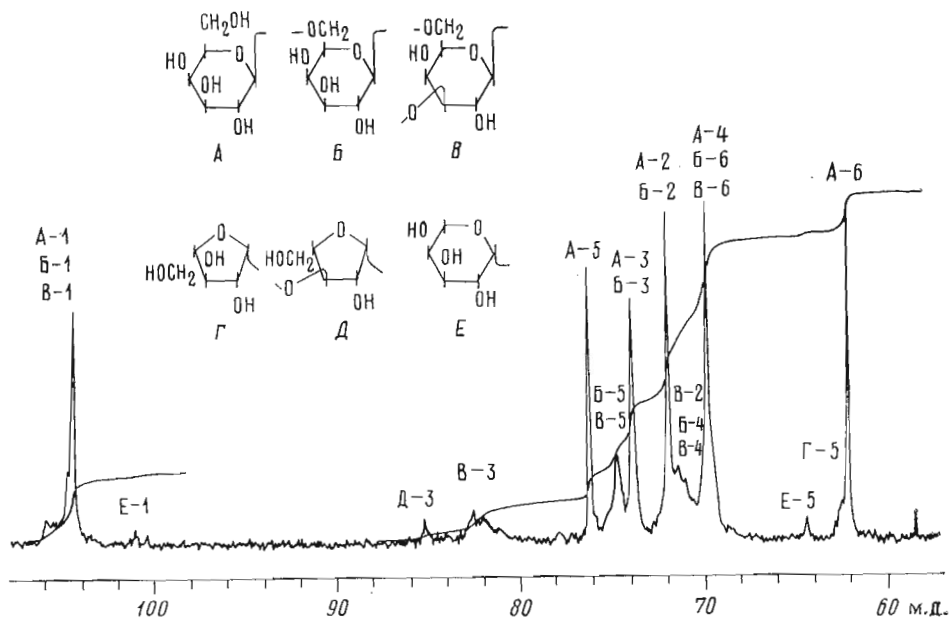


Рис. 3. Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР АГ (цифра в обозначении пика соответствует номеру углеродного атома в мономерном звене)

претерпевает глубокое расщепление (ср. [11]). Как показала гель-хроматография на сефадексе G-25, продукты щелочной деградации представляют собой набор олигосахаридных фрагментов, которые можно, очевидно, использовать в дальнейшем для более детального исследования структуры боковых цепей арабиногалактана.

Исходя из всех полученных данных, можно заключить, что арабиногалактан сибирской лиственницы по основным особенностям строения сходен с аналогичными полисахаридами других видов лиственниц [1, 2]. Он имеет высокоразветвленную молекулу с главной цепью, построенной преимущественно из 1→3-связанных  $\beta$ -D-галактопиранозных остатков, большинство из которых несет боковые ответвления при С-6. Боковые цепи содержат 3,6-ди-О- и 6-О-замещенные остатки  $\beta$ -D-галактопиранозы и 3-О-замещенные остатки  $\beta$ -L-арабинофуранозы, а концевыми невосстанавливающими остатками являются  $\beta$ -D-галактопираноза,  $\beta$ -D-арабинофураноза и  $\beta$ -L-арабинопираноза.

### Экспериментальная часть

Гель-хроматографию проводили на колонке (1,9×70 см) с сефадексом G-75, откалиброванной по декстранам с молекулярной массой 20 000, 60 000 и 80 000, и на колонке (1,9×58 см) с сефадексом G-25 при промывании водой. Содержание сахаров во фракциях определяли по реакции с фенолом и конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [12].

Для определения моносахаридного состава 10 мг полисахарида в 1 мл 1 н.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  нагревали 3,5 ч при 100° С, гидролизат нейтрализовали  $\text{BaCO}_3$ , фильтровали, деионизировали катионитом КУ-2 ( $\text{H}^+$ -форма) и использовали для хроматографического анализа.

БХ выполняли на бумаге Filtrak FN-11 в системе растворителей бутанол-1 — пиридин — вода (6 : 4 : 3), ТСХ — на пластинках Silufol, импрегнированных 0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , в системе растворителей бутанол-1 — ацетон — вода (2 : 7 : 1). Зоны восстанавливающих сахаров обнаруживали кислым анилинфталатом.

ГЖХ выполняли на хроматографе Pye Unicam 104 с пламенно-ионизационным детектором, скорость  $\text{N}_2$  50 мл/мин. Нейтральные моносахариды анализировали в виде ацетатов полиолов [13] на колонке (0,6×120 см)

с 3% ECNSS-M на хромосорбе Q при 180° С, ацетаты частично метилированных полиолов — на колонке (0,6×120 см) с 3% OV-1 на диатомите С при 180° С. Хроматомасс-спектрометрию ацетатов частично метилированных полиолов проводили на приборе Varian MAT 111 на колонке (0,3×100 см) с 5% OV-1 на хромосорбе Q при программированном повышении температуры от 110 до 250° С со скоростью 8° С/мин.

Спектры <sup>13</sup>С-ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 для 2% растворов полисахаридов в D<sub>2</sub>O при 35° С. Химические сдвиги измеряли относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта и пересчитывали относительно тетраметилсилана по уравнению  $\delta_{TMS} = \delta_{DMSO} + 39,5$  м.д.

Ультрацентрифугирование выполняли на центрифуге Beckman E для 0,7% водных растворов полисахаридов при 20° С и 60 000 об/мин.

*Выделение арабиногалактана.* Опилки древесины 150-летней лиственницы обрабатывали водой (1:10 по весу) при 20° С с перемешиванием и сменой растворителя через каждые 12 ч до полного извлечения водорастворимых углеводов (контроль по реакции с фенолом и конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). После отделения опилок объединенный раствор концентрировали, прибавляли 8 объемов этанола, осадок отделяли, промывали этанолом, эфиром и сушили над CaCl<sub>2</sub>. 5 г полученного препарата растворяли в 10 мл воды, центрифугировали для удаления нерастворимых частиц, раствор наносили на колонку (2×65 см) с DEAE-целлюлозой в фосфатной форме. Элюцию проводили 0,05 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, собирая фракции по 10 мл. Фракции 9—17 объединяли, диализовали против дистиллированной воды, концентрировали и осаждали арабиногалактан этанолом, как описано выше; выход 90% от нанесенного на колонку вещества.

*Метилирование.* 50 мг полисахарида растворяли в DMSO и обрабатывали метилсульфинилкарбанионом и CH<sub>3</sub>I [14]. По окончании реакции смесь разбавляли хлороформом, диализовали, концентрировали в вакууме и лиофилизовали. Полученное вещество еще дважды обрабатывали метилирующими агентами в тех же условиях. Метилированный полисахарид растворяли в 2 мл 85% HCOOH, нагревали 1 ч при 100° С, упаривали, остатки кислоты отгоняли с водой, продукты формолиза растворяли в 2 мл 1 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и нагревали 7 ч при 100° С. Раствор нейтрализовали BaCO<sub>3</sub>, метилированные моносахариды восстанавливали NaBH<sub>4</sub> и ацетилювали [15], полученную смесь исследовали методами ГЖХ и хроматомасс-спектрометрии (табл. 1).

*Расщепление по Смитчу.* Раствор 4 г арабиногалактана в 400 мл 0,15 М NaIO<sub>4</sub> выдерживали 3 сут в темноте при 4° С, прибавляли 2 мл этиленгликоля, через 1 ч раствор диализовали, обрабатывали 4 г NaBH<sub>4</sub> в течение 4 сут, снова диализовали, концентрировали и лиофилизовали. Остаток растворяли в 400 мл 1 М трифторуксусной кислоты, выдерживали 48 ч при 20° С, концентрировали в вакууме до 65 мл и приливали 260 мл смеси метанол—ацетон, 1:1. Осадок отделяли, промывали ацетоном и высушивали над CaCl<sub>2</sub>. Выход 1,27 г. Для повторной обработки в тех же условиях использовали 1 г этого вещества и 100 мл 0,1 М NaIO<sub>4</sub>. Выход полимерной фракции 0,51 г. Для третьего окисления использовали 0,45 г этой фракции и 100 мл 0,07 М NaIO<sub>4</sub>; выход полимерного продукта 0,14 г. Низкомолекулярные фракции получали упариванием соответствующих маточных растворов (табл. 3).

*Щелочная деградация.* 50 мг арабиногалактана растворяли в 17,5 мл 0,1 н. NaOH, деаэрировали, пропуская азот, и нагревали в атмосфере азота 24 ч при 78° С. Раствор нейтрализовали CO<sub>2</sub>, концентрировали и использовали для гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Clarke A. E., Anderson R. L., Stone B. A. *Phytochemistry*, 1979, v. 18, № 4, p. 521—540.
2. Timell T. E. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1965, v. 20, p. 409—483.
3. Adams M. F., Ettling B. V. In: *Industrial Gums*/Ed. Whistler R. L., BeMiller J. N. N. Y.: Acad. Press, 1973, p. 415—427

4. Антонова Г. Ф., Тюкавкина Н. А. Химия древесины, 1983, № 2, с. 89-96.
5. Антонова Г. Ф. Химия древесины, 1977, № 4, с. 97-100.
6. Nakomori S.-I. J. Biochem., 1964, v. 55, № 2, p. 205-208.
7. Björndal H., Hellerqvist C. G., Lindberg B., Svensson S. Angew. Chem. Int. Ed. Eng., 1970, v. 9, № 8, p. 610-619.
8. Усов А. И., Яроцкий С. В. Биоорган. химия, 1977, т. 3, № 6, с. 746-751.
9. Шапков А. С., Усов А. И., Книрель Ю. А., Дмитриев Б. А., Кочетков Н. К. Биоорган. химия, 1981, т. 7, № 9, с. 1364-1371.
10. Gorin P. A. J., Mazurek M. Can. J. Chem., 1975, v. 53, № 8, p. 1212-1223.
11. Young R. A., Sarkanen K. V. Carbohydr. Res., 1977, v. 59, № 1, p. 193-201.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. Anal. Chem., 1956, v. 28, № 3, p. 350-356.
13. Слонекер Дж. В кн.: Методы исследования углеводов. М.: Мир, 1975, с. 22-25.
14. Конрад Г. Е. В кн.: Методы исследования углеводов. М.: Мир, 1975, с. 276-278.
15. Джонс Г. Дж. В кн.: Методы исследования углеводов. М.: Мир, 1975, с. 26-37.

Поступила в редакцию  
29.V.1984

## STRUCTURE OF ARABINOGALACTAN FROM SIBERIAN LARCH (*LARIX SIBIRICA* LEDEB.) WOOD

ANTONOVA G. F., USOV A. I.\*

*V. N. Sukachev Forest and Wood Institute, Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR, Krasnoyarsk; \* N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Structure of arabinogalactan from Siberian larch wood was investigated by methylation analysis, Smith degradation, <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, partial acid hydrolysis, and alkaline degradation. Arabinogalactan was found to be a highly branched polymer containing 1→3-linked backbone of β-D-galactopyranosyl residues with branching points at C-6 of the majority of these residues. Side chains contain 3,6-di-O-substituted and 6-O-substituted galactopyranosyl residues, 3-O-substituted arabinofuranosyl residues, as well as arabinofuranosyl, arabinopyranosyl, and galactopyranosyl non-reducing terminal units.