

Пектиновые полисахариды каллусной ткани стебля борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.)

© 2019. Е. Н. Гордина, ассистент, А. А. Злобин, к. х. н., доцент,
Е. А. Мартинсон, к. т. н., директор института,
С. Г. Литвинец, к. с.-х. н., проректор,
Вятский государственный университет,
610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, 36,
e-mail: l-e-n-o-k@bk.ru, biotech.vgu@gmail.com, litvinets@list.ru

Неконтролируемое распространение борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) в средней полосе Российской Федерации является актуальной проблемой, так как площади, занятые растением, с каждым годом значительно увеличиваются.

Применяемые методы борьбы с борщевиком (выкашивание, обработка гербицидами, использование геотекстиля и т. д.) недостаточно эффективны, так как его семена сохраняют всхожесть продолжительное время, а корни глубоко проникают в почву. Данные методы не предполагают использование биомассы борщевика, которая может служить источником физиологически активных веществ, в том числе пектиновых полисахаридов, содержание которых в растении составляет 10–17%. Кроме того, строение и свойства водорастворимых гликанов борщевика Сосновского изучены недостаточно полно.

Для получения водорастворимых полисахаридов использовали каллусную ткань стебля борщевика Сосновского, так как культуры клеток и тканей растений являются модельным объектом для синтеза фитополисахаридов. Для изучения состава и строения водорастворимых полисахаридов каллусной ткани борщевика использовали частичный кислотный и ферментативный гидролиз, ультрафильтрацию, ионообменную хроматографию, а также метилирование.

Было показано, что водорастворимые гликаны каллуса борщевика представлены резервными полисахаридами – арабинанами, галактанами и/или арабиногалактанами с содержанием урсонных кислот до 24%, а также пектиновыми полисахаридами – линейным гомогалактуронаном (рамногалактуронаном) и рамногалактуронаном-I, с содержанием галактуроновой кислоты 70,5–73,9%.

Результаты метилирования позволяют предположить, что углеводные цепи резервных полисахаридов образованы 1,5-связанными остатками L-арабинофуранозы, 1,6- и 1,3,6-связанными остатками D-галактопиранозы, 1,4- и 1,4,6-связанными остатками D-глюкопиранозы и 1,3,6-связанными остатками D-маннопиранозы, а на нередуцирующих концах их углеводных цепей локализованы терминальные остатки D-ксилопиранозы и D-глюкопиранозы. В состав боковых углеводных цепей пектиновых полисахаридов входят 1,5-связанные остатки L-арабинофуранозы, 1,6- и 1,3,6-связанные остатки D-галактопиранозы, 1,4-связанные остатки D-глюкопиранозы, 1,4-связанные остатки D-ксилопиранозы, 1,3,6-связанные остатки D-маннопиранозы, а также 1-связанные остатки D-глюкопиранозы и D-ксилопиранозы.

Ключевые слова: *Heracleum sosnowskyi* Manden., каллусная ткань, водорастворимые полисахариды, пектиновые полисахариды, моносахаридные остатки, ионообменная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, метилирование.

Pectic polysaccharides of callus tissue of the stem of *Heracleum sosnowskyi* Manden.

© 2019. E. N. Gordina ORCID: 0000-0002-7490-9132, A. A. Zlobin ORCID: 0000-0002-2129-8999,
E. A. Martinson ORCID: 0000-0002-0364-4106, S. G. Litvinets ORCID: 0000-0001-8583-5274,
Vyatka State University,
36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
e-mail: l-e-n-o-k@bk.ru, biotech.vgu@gmail.com, litvinets@list.ru

The uncontrolled growth of Sosnovsky's hogweed (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) in the central regions of the Russian Federation is a pressing problem, because areas occupied by this plant significantly increase each year.

The methods used for the destruction of Sosnovsky's hogweed (mowing, the use of herbicides, the use of geotextile, etc.) are not effective enough, because the hogweed seeds remain viable for a long time, and its roots penetrate deep into the soil. These methods do not involve the use of Sosnovsky's hogweed biomass, which can serve as a source of physiologically active substances, including pectin polysaccharides, whose content in the plant is 10 to 17%. In addition, the structure and properties of water-soluble glycans of the Sosnovsky's hogweed are not fully understood.

Cultures of plant cells and tissues are a model object for the synthesis of phytopolysaccharides, therefore we used the callus tissue of the Sosnovsky's hogweed stem to obtain water-soluble polysaccharides. We used partial acid and enzymatic hydrolysis, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, and methylation, in order to study the composition and structure of water-soluble polysaccharides of the Sosnovsky's hogweed callus tissue.

We have found that water-soluble glycans from Sosnovsky's hogweed callus are reserve polysaccharides – arabinans, galactans and/or arabinogalactans content of uronic acids with up to 24%, and pectic polysaccharides – linear gomogalakturonan (ramnogalakturonan) and ramnogalakturonan-I, with a galacturonic acid content of 70.5–73.9%.

We obtained the results of methylation which suggest that the carbohydrate chains of the reserve polysaccharides are formed by 1,5-linked L-arabinofuranose residues 1,6- and 1,3,6-linked D-galactopyranose residues, 1,4- and 1,4,6-linked residues of D-glucopyranose and 1,3,6-linked residues of D-mannopyranose, and terminal residues of D-xylopyranose and D-glucopyranose are located at the non-reducing ends of their carbohydrate chains. The carbohydrate side chains of pectin polysaccharides include 1,5-linked L-arabinofuranose residues, 1,6- and 1,3,6-linked D-galactopyranose residues, 1,4-linked D-glucopyranose residues, 1,4-linked D-xylopyranose residues, 1,3,6-linked D-mannopyranose residues, as well as 1-linked D-glucopyranose and D-xylopyranose residues.

Keywords: *Heracleum sosnowskyi* Manden., callus tissue, water-soluble polysaccharides, pectin polysaccharides, monosaccharide residues, ion exchange chromatography, chromato-mass spectrometry, methylation.

Несмотря на актуальность проблемы неконтролируемого распространения борщевика Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) в средней полосе России, эффективных методов борьбы с ним не разработано.

В то же время биомассу борщевика можно использовать как источник биологически активных веществ, включая пектины. Несмотря на высокое содержание (до 17%) пектинов в борщевике, их строение и свойства изучены недостаточно полно [1–3]. Культуры клеток и тканей различных растений являются удобным объектом для изучения биосинтеза гликанов, а также наработки фитополисахаридов с относительно постоянным составом и строением для определения структурной детерминированности их физиологической активности [4–7].

Целью данной работы является химическая характеристика пектиновых полисахаридов каллусной ткани стебля борщевика Сосновского.

Объекты и методы исследования

Каллусную ткань стебля борщевика Сосновского культивировали в темноте при 26 °С на питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением агара – 7 г/л, сахарозы – 30 г/л, глицина – 2 мг/л, мио-инозита – 100 мг/л, витаминов по прописи Стаба и фитогормонов 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) – 2,0 мг/л и 6-бензиламинопурина (6-БАП) – 0,1 мг/л. Масса эксплантов – 50–60 мг. Длительность культивирования – 21 сут.

Количественное содержание остатков галактуроновой кислоты в полисахаридах определяли реакцией с 3,5-диметилфенолом [8], белка – по методу Лоури [9] с использованием бычьего сывороточного альбумина,

содержание метоксильных групп – по методу [10]. Спектрофотометрические определения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-mini 1240 (Япония).

Идентификацию моносахаридных остатков проводили методом газо-жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГЖХ-МС) в виде триметилсилильных (ТМС) эфиров после кислотного гидролиза фракций полисахаридов 2М раствором трифторуксусной кислоты (ТФУ) при 100 °С в течение 5 ч. Количественное определение моносахаридных остатков проводили с помощью ГЖХ-МС после гидролиза образцов 2М раствором ТФУ, содержащей в качестве внутреннего стандарта мио-инозит (0,1 мг/мл), при 100 °С в течение 4 ч, с последующим восстановлением моносахаридов боргидридом натрия в 2М растворе гидроксида аммония в течение 4 ч и ацетилирования полиолов уксусным ангидридом [11].

Для метилирования пектиновых полисахаридов каллуса использовали метод Хакамори [12]. Гидролиз метилированных полисахаридов проводили 2М раствором ТФУ при 100 °С в течение 5 ч. Метилловые эфиры моносахаридов переводили в соответствующие ацетаты полиолов и анализировали методом ГЖХ-МС.

ГЖХ-МС ТМС-эфиров моносахаридов, перацетатов полиолов и частично метилированных ацетатов полиолов проводили на газовом хроматографе G2589A (Agilent Tech., США) с масс-селективным детектором 5973 INERT (Agilent Tech., США) на капиллярной колонке HP-5MS (0,25 мм x 30 м, Hewlett-Packard, США). Количество вводимой пробы – 1 мкл. Температура испарителя – 260 °С. Температурный режим термостата колонки – 175 → 250 °С (градиент – 3 °С/мин) для ТМС-

эфиров и перацетатов полиолов; 130 → 250 °С (градиент – 5 °С/мин) для метилированных ацетатов полиолов.

Ионообменную хроматографию пектиновых полисахаридов проводили на колонке (37 см x 1,5 см) с DEAE-целлюлозой (Fluka, Германия) в Cl⁻ -форме ступенчатым элюированием 0,01; 0,1; 0,2 и 0,3 М растворами NaCl со скоростью потока растворителя 30 мл/ч. Выход фракций полисахаридов из колонки контролировали качественной реакцией по методу [13]. Фракции, соответствующие отдельным пикам, диализовали и лиофильно высушивали.

Ультрафильтрацию растворов пектиновых полисахаридов проводили с помощью ячейки концентратора Vivacell 250 (Владисарт, Россия) и мембран Vivacell 250, ПЭС (Владисарт, Россия) с отсекаемыми среднемассовыми молекулярными массами – 10, 30 и 100 кДа. Полученные фракции полисахаридов упаривали до минимального объёма под вакуумом и лиофильно высушивали.

Частичный кислотный гидролиз пектиновых полисахаридов проводили 0,05 М раствором ТФУ при 100 °С в течение 8 ч. Осадок отделяли центрифугированием и лиофильно высушивали. К супернатанту приливали 4-х кратный объём 96%-ного этанола, отделяли осадок центрифугированием, промывали этиловым спиртом, растворяли в дистиллированной воде, доводили pH полученного раствора до 4,5–5,0 с помощью разбавленного (1:1) раствора NH₄OH, диализовали и лиофильно высушивали. К водно-спиртовому супернатанту приливали 10-ти кратный объём 96%-ного этанола и обрабатывали осадок полисахаридов как описано выше, а супернатант упаривали досуха и идентифицировали свободные моносахариды в виде ТМС-эфиров методом ГЖХ-МС.

Ферментативный гидролиз пектиновых полисахаридов проводили с помощью α-1,4-эндо-полигалактуроназы *Rhizopus* sp. (Sigma, США). Длительность ферментализации контролировали с помощью метода [14] до прекращения увеличения концентрации в ферментализате восстанавливающих сахаров. Фермент инактивировали при 100 °С в течение 10 мин. Денатурированный белок отделяли центрифугированием и последовательно осаждали продукты ферментализации 4-х и 10-ти кратными объёмами 96% этанола. Полученные осадки растворяли в дистиллированной воде, диализовали и лиофильно высушивали.

Для выделения водорастворимых полисахаридов (ВРПС) каллусную ткань раз-

рушали однократным замораживанием-оттаиванием, обрабатывали 0,4%-ным раствором формалина при 50 °С для инактивации ферментов, а затем последовательно экстрагировали ткань дистиллированной водой при 68 °С (водорастворимые полисахариды – HScI) и 0,7%-ным водным раствором оксалата аммония при 68 °С (пектиновые полисахариды – HScII) после обработки растительного материала при 50 °С разбавленным раствором HCl при pH 3,8–4,0 [15]. Полноту экстракции полисахаридных фракций из каллусной ткани контролировали качественной реакцией по методу [13].

Экстракты упаривали, диализовали и осаждали полисахариды 4-х кратным объёмом 96% этанола, растворяли в дистиллированной воде и лиофильно высушивали.

Все водные растворы, а также пробы для ГЖХ-МС-анализа упаривали под вакуумом при 40–50 °С на роторном испарителе IKA HV 10 basic (Германия). Центрифугирование растворов проводили на центрифуге Sigma 2-16 PK (Германия) в течение 10–15 мин при 3000–9000 об./мин. Термостатирование проб проводили на водяной бане LB-200 (Россия) и в суховоздушном термостате Binder (Германия). Диализ растворов проводили с помощью плёнок для диализа (Cellu-Sep H1, Бельгия) со средними отсекаемыми молекулярными массами 5–8 кДа. Для высушивания растворов образцов использовали лиофильную сушилку ALPHA 2-4LD plus (Германия).

Результаты и обсуждение

Суммарное содержание ВРПС HScI и пектиновых HScII полисахаридов каллуса борщевика Сосновского составило 8,8%. Характеристика полученных фракций приведена в таблице 1.

Из гликуроновых кислот в виде ТМС-производных в составе ВРПС каллуса HScI идентифицированы остатки D-галактуроновой кислоты и следовые количества остатков D-глюкуроновой кислоты, а в HScII – только остатки D-галактуроновой кислоты. Причём фракция пектиновых полисахаридов HScII характеризуется высоким их содержанием (70,0–73,9%) при низком количестве остатков L-рамнозы (0,3–0,7%).

Из нейтральных моносахаридов в составе водорастворимых гликанов HScI преобладают остатки D-галактозы, L-арабинозы, D-глюкозы и D-ксилозы, а в HScII – L-арабинозы и D-галактозы.

Таблица 1 / Table 1

Состав гликанов каллусной ткани борщевика
Composition of glycans of the hogweed callus tissue

Фракция Fraction	Выход Yield, %*	MeO, %	Содержание / Content, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	белок protein
HScI	4,2	1,9	24,1	9,7	19,6	0,2	3,1	0,4	5,0	18,0
HScII	4,6	2,7	70,0	10,9	3,8	0,7	0,4	0,3	0,9	9,4

Примечания: * – в пересчёте на сухое вещество каллусной ткани; MeO – метоксильные группы; GalA – D-галактуроновая кислота; Ara – L-арабиноза; Gal – D-галактоза; Rha – L-рамноза; Xyl – D-ксилоза; Man – D-манноза; Glc – D-глюкоза.

Notes: * – calculated on the dry substance of the callus tissue; MeO – methoxylene group; GalA-D – galacturonic acid; Ara-L – arabinose; Gal-D – galactose; Rha-L – rhamnose; Xyl-D – xylose; Man-D – mannose; GLS-d-glucose.

Таблица 2 / Table 2

Состав фракций пектиновых полисахаридов HScII-и после ультрафильтрации
The composition of the pectin polysaccharides' HcII-u fractions after ultrafiltration

Фракция Fraction	Отсекаемая молекулярная масса, кДа / Cut-off molecular weight, kDa	Выход Yield, %*	MeO, %	Содержание / Content, %								
				GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	белок protein	
HScII-1u	> 100	90,8	3,0	68,2	3,5	1,8	0,4	Сл. Tr.	0,1	0,6	11,5	
HScII-2u	10–30	0,8	2,0	34,4	6,4	10,4	0,8	3,9	0,5	12,3	14,5	
HScII-3u	< 10	4,3	1,3	25,0	3,1	4,3	0,2	2,2	0,6	6,9	10,6	

Примечание: Сл. – следовые количества.

Note: Tr. – trace quantities.

Для дальнейшего изучения была выбрана фракция пектиновых полисахаридов HScII каллуса борщевика. При ультрафильтрации HScII через мембраны с отсекаемыми молекулярными массами 10, 30 и 100 кДа были получены фракции, состав которых приведён в таблице 2.

Как следует из полученных результатов, пектиновые полисахариды HScII представлены высокомолекулярными гликанами и являются достаточно гомогенными – выход главной фракции HScII-1u, полученной с помощью мембраны с диапазоном отсекаемых молекулярных масс более 100 кДа, составляет 90,8%.

Можно отметить, что минорные фракции HScII-2u и HScII-3u, входящие в состав пектинов HScII, характеризуются относительно низким содержанием остатков D-галактуронової кислоты (34,4 и 25,0% соответственно) и повышенным количеством остатков D-глюкозы, D-галактозы и D-арабинозы.

При ионообменной хроматографии HScII-1u на DEAE-целлюлозе 0,01; 0,1; 0,2 и 0,3 М растворами NaCl были получены фракции пектиновых полисахаридов с содержанием остатков D-галактуронової кислоты от 41,6 до 70,5% и метоксильных групп от 0,9 до 4,5% (табл. 3).

При ионообменной хроматографии HScII получен состав нейтральных моносахаридов. Он представлен фракциями: HScII-1u-1d, HScII-1u-2d, HScII-1u-3d и HScII-1u-4d.

Фракция HScII-1u-4d, элюируемая из колонки 0,3 М раствором NaCl с выходом 47,1%, содержит 70,5% остатков D-галактуронової кислоты, незначительное количество остатков L-рамнозы (0,3%), а также L-арабинозы, D-галактозы, D-ксилозы и D-глюкозы. Это указывает на то, что она представлена линейным гомогалактуронатом (рамногалактуронатом) и рамногалактуронатом-I [16].

В результате частичного кислотного гидролиза HScII-1u 0,05 М раствором ТФУ (100 °С, 8 ч) была получена минорная фракция HScII-1u-1h (нерастворимый в ТФУ остаток после гидролиза), а также главная фракция HScII-1u-2h и фракция HScII-1u-3h (последовательной обработкой гидролизата 4-х и 10-ти кратными объемами 96%-ного этилового спирта соответственно). Состав фракций приведён в таблице 4.

Состав фракции HScII-1u-1h свидетельствует о том, что она представлена гомогалактуронатом, содержащим минорные количества остатков D-галактозы и D-глюкозы. Их наличие указывает на то, что они участвуют в присоединении боковых углеводных цепей

рамногалактуронана-I к кору молекулы пектиновых полисахаридов HScII-1u каллуса борщевика.

Состав продуктов исчерпывающего ферментативного гидролиза HScII-1u эндополигалактуроназой *Rhizopus* sp. приведён в таблице 5.

Среди продуктов ферментативного гидролиза в виде ТМС-производных идентифицированы остатки D-галактуроновой кислоты, что свидетельствует о присутствии в углеводных цепях полисахаридов участков α -1,4-D-галактуронана, а существенное снижение остатков D-галактуроновой кислоты в HScII-1u-f по сравнению с HScII-1u говорит о том, что они достаточно протяжённые.

Результаты метилирования пектиновых полисахаридов HScII-1u-f, полученных в ходе ферментативного гидролиза, по Хакамори указывают на то, что в состав их углеводных цепей входят 1,5-связанные остатки L-арабинофуранозы, 1,6- и 1,3,6-связанные остатки D-галактопиранозы, 1,4-связанные остатки D-глюкопиранозы, 1,4-связанные остатки D-ксилопиранозы, 1,3,6-связанные остатки D-маннопиранозы, а также 1-связанные D-глюкопиранозы и D-ксилопиранозы. Полученные данные свидетельствуют о широком спектре углеводного состава каллусной ткани стебля борщевика Сосновского, что может быть использовано в биотехнологической промышленности при получении различной продукции.

Таблица 3 / Table 3

Состав фракций пектиновых полисахаридов HScII-u1, полученных при ионообменной хроматографии / Composition of the pectin polysaccharides' fractions HS-II-u1 obtained by ion-exchange chromatography

Фракция Fraction	Выход Yield, %*	MeO, %	Содержание / Content, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	белок protein
HScII-1u-1d (0,01 M NaCl)	1,0	2,9	48,3	10,6	5,6	0,6	0,3	0,3	0,5	9,8
HScII-1u-2d (0,1 M NaCl)	12,9	0,9	41,6	7,0	6,8	0,5	Сл. Tr.	0,2	0,1	7,6
HScII-1u-3d (0,2 M NaCl)	4,9	4,5	62,8	4,1	2,5	0,5	0,1	Сл. Tr.	1,1	3,7
HScII-1u-4d (0,3 M NaCl)	47,1	2,4	70,5	2,9	1,9	0,6	0,3	Сл. Tr.	0,3	1,7

Примечание: Сл. – следовые количества.

Note: Tr. – trace quantities.

Таблица 4 / Table 4

Состав продуктов пектиновых полисахаридов после частичного кислотного гидролиза / The composition of the of pectin polysaccharides' products after partial acid hydrolysis

Фракция Fraction	Выход Yield, %*	MeO, %	Содержание / Content, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	белок protein
HScII-1u-1h	1,0	Н.о. N.d.	86,9	–	0,9	Сл. Tr.	–	–	0,2	7,9
HScII-1u-2h	10,0	0,5	76,5	–	1,0	Сл. Tr.	–	–	0,5	10,4
HScII-1u-3h	4,6	0,3	55,2	0,6	1,8	0,2	2,9	0,1	2,6	15,6

Примечание: Н.о. – не определялось, Сл. – следовые количества.

Note: N.d. – not been determined, Tr. – trace quantities.

Таблица 5 / Table 5

Состав фракции пектиновых полисахаридов после ферментализации / Composition of pectin polysaccharides' fraction after fermentolysis

Фракция Fraction	Выход Yield, %*	MeO, %	Содержание / Content, %							
			GalA	Ara	Gal	Rha	Xyl	Man	Glc	белок protein
HScII-1u-f	73,1	3,6	57,9	8,6	6,0	1,0	2,1	0,4	1,6	6,4

Выводы

1. Из каллусной ткани стебля борщевика Сосновского с суммарным выходом 8,8% выделены фракции водорастворимых полисахаридов HScI и пектиновых полисахаридов HScII.

2. Полученные данные указывают на то, что водорастворимые полисахариды HScI каллуса представлены арабинанами, галактанами (арабиногалактанами).

3. Показано, что высокомолекулярные пектиновые полисахариды протопектинового комплекса клеточных стенок каллусной ткани стебля борщевика отличаются высоким содержанием остатков D-галактуроновой кислоты и низким содержанием остатков L-рамнозы, т. е. содержат протяжённые участки линейного гомогалактуронана/рамногалактуронана и разветвлённые области, представленные рамногалактуронаном-I.

4. С помощью метода метилирования показано, что боковые углеводные цепи рамногалактуронана-I образованы 1,5-связанными остатками L-арабинофуранозы, 1,6- и 1,3,6-связанными остатками D-галактопиранозы, 1,4-связанными остатками D-глюкопиранозы, 1,4-связанными остатками D-ксилопиранозы, 1,3,6-связанными остатками D-маннопиранозы и терминальными остатками D-глюкопиранозы и D-ксилопиранозы.

References

1. Shakhmatov E.G., Mikhailova E.A., Makarova E.N. Structural-chemical characteristics and biological activity of polysaccharides of *Heracleum sosnowskyi* Manden. // *Khimiya rastitelnogo syrya*. 2015. No. 4. P. 15–22 (in Russian).

2. Shakhmatov E.G., Atukmaev K.V., Makarova E.N. Structural characteristics of pectic polysaccharides and arabinogalactan proteins from *Heracleum sosnowskyi* Manden. // *Carbohydr. Polym.* 2016. V. 136. P. 1358–1369. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.041>.

3. Senejoux F., Demougeot C., Cuciureanu M., Miron A., Cuciureanu R., Berthelot A., Girard-Thernier C. Vaso-relaxant effects and mechanisms of action of *Heracleum sphondylium* L. (Apiaceae) in rat thoracic aorta // *J. Ethnopharmacol.* 2013. V. 147. P. 536–539. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.030>.

4. Ridley B.L., O'Neill M.A., Mohnen D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related

signaling // *Phytochemistry*. 2001. V. 57. P. 929–967. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.030>.

5. Popov S.V., Gunter E.A., Markov P.A., Smirnov V.V., Khranova D.S., Ovodov Yu.S. Adjuvant effect of lemnna, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration // *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2006. V. 28. P. 141–152. doi: <https://doi.org/10.1080/8923970600626098>.

6. Thompson J.E., Fry S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured *Rose* cells // *Planta*. 2000. V. 211. P. 275–286.

7. Goubet F., Morvan C. Synthesis of cell wall galactans from flax (*Linum usitatissimum* L.) suspension-cultured cell // *Plant Cell Physiol.* 1994. V. 35. No. 5. P. 719–727. doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078649>.

8. Usov A.T., Bilan M.I., Klochkova N.G. Polysaccharides of algae. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae) // *Bot. marina*. 1995. V. 38. P. 43–51. doi: <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.43>.

9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Pholin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265–275.

10. Wood P.J., Siddiqui I.R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity // *Analyt. Biochem.* 1971. V. 39. P. 418–428. doi: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90432-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90432-5).

11. York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components // *Meth. Enzymol.* 1986. V. 118. P. 3–40. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(86\)18062-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(86)18062-1).

12. Hakomori S. A rapid per methylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methyl sulfoxide // *J. Biochem.* 1964. V. 55. No. 2. P. 205–208.

13. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* 1956. V. 28. P. 350–356.

14. GOST R 54905-2012. Enzyme preparations. Methods for the determination of the enzymatic activity of “beta”-glucanase (in Russian).

15. Ovodova R.G., Bushneva O.A., Golovchenko V.V., Popov S.V., Ovodov Yu.S. The method of obtaining polysaccharides with immunostimulating action from plant raw materials // RF Patent No. 2149642. Application: 08.09.1999. Date of publication: 27.05.2000. Bull. No. 15 (in Russian).

16. Ovodov Yu.S. Modern concepts of pectin substances // *Bioorganicheskaya khimiya*. 2009. V. 5. No. 3. P. 293–310 (in Russian).