

УДК 577.114:581.143

Получение и свойства гидрогелевых матриц на основе пектинов каллусных культур

© 2020 Е.А. ГЮНТЕР^{1,*}, О.В. ПОПЕЙКО¹, Е.И. ИСТОМИНА^{2,**}¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, 167982, Россия²Институт химии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар, 167982, Россия

*e-mail: gunter-ea@mail.ru

**e-mail: istomina-ei@chemi.komisc.ru

Поступила в редакцию 17.09.2019 г.

После доработки 04.11.2019 г.

Принята к публикации 30.04.2020 г.

Получены гидрогелевые матрицы из пектинов каллусных культур *Silene vulgaris* (SVC), *Tanacetum vulgare* (TVC), *Lemna minor* (LMC) и яблочного пектина (AU701), отличающиеся по прочности геля, содержанию ионов кальция в гелях и морфологии поверхности. В процессе инкубации в условиях искусственной гастральной среды (рН 1,25) прочность гелей и содержание кальция в них снижались. Степень деградации гидрогелей из пектинов SVC, LMC и TVC в течение 4 ч постепенно увеличивалась, тогда как гидрогели из пектина AU701 разрушались в течение 2 ч. Степень деградации гидрогелей увеличивалась в ряду TVC < SVC < AU701. Гели, приготовленные из пектинов с низкой степенью метилэтерификации, разветвленности и высокой линейностью, подвергались меньшей деградации. Гели из пектина TVC имели самую высокую прочность и были наиболее устойчивы при рН 1,25. Полученные данные могут быть использованы для получения гидрогелевых матриц с заданными физико-химическими и функциональными свойствами.

Ключевые слова: каллусная культура, пектиновые полисахариды, гидрогели, гастральная среда.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-63-72

Пектины относятся к классу гликаногалактуронанов. В основе строения пектина лежит линейная цепь из α -1,4-связанных остатков D-галактуроновой кислоты, образующих линейный галактуронан [1, 2]. Отдельные участки галактуронана могут быть связаны одним или двумя остатками L-рамнопиранозы, включенными в линейную цепь 1,2-связью и образующими линейную область рамногалактуронана. Большинство пектинов разветвлены. Разветвленные пектины, чаще всего, представлены рамногалактуронаном I (RG-I) и рамногалактуронаном II (RG-II). Остатки D-галактуроновой кислоты основной цепи галактуронана частично метилэтерифицированы. Пектины с низкой степенью метилэтерификации (менее 50%) формируют гели в присутствии ионов кальция, при этом происходит кросс-связы-

вание молекул пектина ионами кальция [1–3]. На формирование геля и его функциональные свойства влияют как структурные характеристики пектина (длина углеводных цепей, молекулярная масса, разветвленность полисахарида, степень метилэтерификации карбоксильных групп остатков галактуроновой кислоты, степень ацетилирования), так и концентрация пектина и ионов кальция, рН и температура [3].

Пектины широко применяются в пищевой и фармацевтической промышленности. Гели на их основе в связи с хорошей биосовместимостью и нетоксичностью используют в качестве матрицы для доставки лекарств [4–6]. Пектины и пектиновые гели разрушаются кишечной микрофлорой и поэтому могут доставлять противовоспалительные лекарственные средства в толстый кишечник

Список сокращений: *Silene vulgaris* (SVC), *Tanacetum vulgare* (TVC), *Lemna minor* (LMC), яблочный пектин (AU701), арабиноза (Ara), галактоза (Gal), D-галактуроновая кислота (GalA), рамноза (Rha), ксилоза (Xyl).

[6, 7]. Вместе с тем быстрое набухание и разрушение гелей в кислой среде желудка осложняет адресную доставку лекарственных средств. Для решения проблемы быстрой деградируемости в гастральной среде используют пектины в комбинации с полиакрилатными производными, с гидроксипропилметилцеллюлозой или хитозаном, что позволяет в некоторой степени улучшить кислото- и водоустойчивость пектиновых комплексов [8, 9].

Поскольку гелеобразующие свойства пектинов зависят от особенностей их строения, для получения гелей в работе были использованы пектины с различающимися химическими характеристиками, выделенные из каллусных культур лекарственных растений, распространенных на территории европейского Севера России. Эти пектиновые полисахариды обладают противовоспалительной [10], иммуномодулирующей [11] и адьювантной активностью [12]. Пектины, полученные биотехнологическим путем и различающиеся своим строением, формируют гели с разными физико-химическими характеристиками и функциональными свойствами. Предварительные исследования, проведенные нами, показали, что при изменении условий культивирования каллусной культуры *Silene vulgaris* M. (G.) (концентрация CaCl_2 , 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), сахарозы и галактозы) изменялись химические характеристики пектиновых полисахаридов, что приводило к формированию пектиновых гелей, обладавших различной способностью к деградации в растворе HCl при pH 2,0, 4,0 и в 0,9% растворе NaCl при pH 6,0 [13]. В условиях искусственной гастроэнтеральной среды преднизолон-содержащие пектин-кальциевые гелевые частицы, изготовленные из пектинов каллусных культур, меньше подвергались деградации чем частицы из яблочного пектина [14].

Полученные данные послужили основанием для более детального исследования свойств гелей из пектинов каллусных культур при инкубации в искусственной гастральной среде с целью создания гидрогелевых матриц-носителей, устойчивых в кислой среде желудка. Полученные гидрогелевые матрицы могут иметь потенциальное значение для разработки систем доставки лекарств в различные отделы желудочно-кишечного тракта.

Цель настоящей работы – исследование влияния химических характеристик пектинов каллусных культур и физико-химических характеристик гидрогелей на их основе на степень деградации гидрогелевых частиц в условиях искусственной гастральной среды.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Общие аналитические методы. В полисахаридных фракциях определяли содержание гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, калибровочный график строили по D-галактуроновой кислоте [15]. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе СФ-103 («Аквилон», Россия). Степень метилэтерификации определяли по ранее описанному методу [16]. Средневесовую молекулярную массу (M_w) полисахаридов определяли с помощью ВЭЖХ, которую проводили способом, описанным ранее [17]. Для анализа использовали хроматографическую систему: насос SD-200 (Dynamax, США), колонку Shodex Asahipak GS-620HQ (7,6 мм × 30 см) (Shimadzu, Япония) и предколонку Shodex GS-26 7B (7,6 мм × 5 см) (Shimadzu), термостат СТО-10AS (Shimadzu), детектор-рефрактометр RID G136A (Shimadzu). Элюирование проводили 0,15 М NaCl при 40 °С со скоростью потока 0,5 мл/мин. Для калибровки колонки использовали декстрансульфаты с молекулярными массами 36–50, 400–600 и 1400 кДа (Sigma, США). Характеристическую вязкость определяли, используя вискозиметр Оствальда, при 25 °С в дистиллированной воде. Кислотный гидролиз полисахаридов проводили по методике, описанной ранее [18]. Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [19]. ГЖХ выполняли на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США) с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке VF-5 ms (30 м × 0,25 мм, Varian), газ-носитель – гелий. ГЖХ ацетатов полиолов проводили в программе: от 175 °С (1 мин) до 250 °С (2 мин) со скоростью подъема температуры 3 °С/мин. Разветвленность полисахарида определяли как соотношение следующих моносахаридных остатков, входящих в состав полисахарида, $(\text{Ara} + \text{Gal})/\text{Rha}$ [20]. Линейность полисахарида определяли как соотношение моносахаридных остатков $\text{GalA}/(\text{Ara} + \text{Gal} + \text{Rha} + \text{Xyl})$ [20].

Условия культивирования каллусных культур. Каллусные культуры смолевки обыкновенной *Silene vulgaris* (M.) G. (SVC), пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L. (TVC) и ряски малой *Lemna minor* L. (LMC) из коллекции культур клеток группы биотехнологии Института физиологии Коми НЦ УрО РАН выращивали на модифицированной среде Мурасиге и Скуга [21]. Каллусные культуры SVC и LMC культивировали на среде с добавлением, 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Каллус

TVC культивировали в присутствии 1,5 мг/л 2,4-Д, и 0,5 мг/л БАП. Каллусы выращивали при температуре 26 ± 1 °С в темноте, субкультивировали с интервалом 21 сут (смолевка обыкновенная) и 28 сут (пижма обыкновенная и ряска малая).

Выделение пектиновых веществ. Выделение пектинов из каллусных культур SVC, TVC и LMC проводили путем экстракции водой и 0,7% раствором оксалата аммония по методике, описанной ранее [13]. Полученные пектины растворяли в дистиллированной воде и отделяли от низкомолекулярных компонентов ультрафильтрацией в ячейке (Millipore, США) с помощью полисульфоновой мембраны («Владисарт», Россия) с размерами пор 300 кДа. Фракции с молекулярными массами более 300 кДа концентрировали и лиофилизовали. Таким образом получены фракции пектинов SVC, TVC и LMC.

Получение, характеристика и анализ текстуры пектин-кальциевых гидрогелевых частиц. Гидрогелевые частицы получали из 1%-растворов пектинов, SVC, TVC и LMC, а также из коммерческого яблочного пектина AP (AU701, Herbstreith & Fox, Германия) методом ионотропного гелеобразования. Пектин (20 мг) растворяли в дистиллированной воде (2 мл), затем полученный раствор по капле добавляли в 1,0 М раствор хлорида кальция и перемешивали в течение 20 мин при 24 °С. Полученные частицы промывали дважды в дистиллированной воде. Для 20 гидрогелевых частиц каждого вида пектина определяли диаметр, площадь поверхности, объем и плотность, используя оптический микроскоп («Алтами», Россия) с фотокамерой и программу для анализа изображений (ImageJ 1.46g program, National Institutes of Health, USA). Для калибровки использовали линейную шкалу, один пиксель соответствовал 0,024 мм.

Степень синерезиса гидрогелевых частиц была определена после центрифугирования гелей при 3000 об/мин в течение 30 мин, и выражена как весовые % водной фракции, вытесненной из гелевого матрикса.

Предел прочности полученных гидрогелей определяли с помощью анализатора текстуры (TA-XT Plus, Texture Technologies Corp., Stable Micro Systems, Англия), оснащенного цилиндрическим зондом (P/0.5R) диаметром 12,7 мм. Скорость движения зонда до деформации при сжатии на 50–80% при испытании образца гидрогеля составляла 0,1 мм/с. Определение и обработку максимумов пиков полученных кривых для гидрогелей проводили с помощью программы Texture Exponent 6.1.4.0 (Stable Micro Systems). Эксперименты проводили в десяти повторностях.

Сканирующая электронная микроскопия и элементный анализ пектин-кальциевых гелевых частиц. Гелевые частицы лиофилизовали, затем форму и рельеф поверхности частиц исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа (Tescan Vega3 SBU, Чехия) при 20 кВ. Элементный состав сухих гелевых частиц определен методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Система энергодисперсионного микроанализа INCA Energy X-ACT, Oxford Instruments, Англия). Содержание элементов выражали в атомных % (ат.%).

Степень деградации гидрогелевых частиц в условиях искусственной гастральной среды. 20 пектин-кальциевых гидрогелевых частиц помещали в искусственную гастральную среду (рН 1,25) и инкубировали в течение 4 ч. Искусственную гастральную среду (рН 1,25) готовили согласно [22]: KCl (1,12 г/л), NaCl (2,00 г/л), CaCl₂ (0,11 г/л), KН₂РO₄ (0,40 г/л), HCl (2,00 г/л). Частицы встряхивали на шейкере (Titramax 1000, Heidolph, Германия) при 100 об/мин и 37 °С. Диаметр частиц измеряли через 1, 2, 3 и 4 ч, как описано выше. Степень деградации гелевых частиц (DD, %) определяли согласно следующей формуле:

$$DD = 100\% - (d_1/d_0 \times 100\%),$$

где d_1 – диаметр частицы (мм) после определенного времени инкубации в кислой среде, d_0 – исходный диаметр частицы (мм).

Статистический анализ. При статистической обработке данных вычисляли среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение. Достоверность оценивали по t -критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пектин-кальциевые гидрогелевые матрицы получали из пектинов SVC, TVC, LMC, а также из коммерческого яблочного пектина AU701. Содержание остатков D-галактуроновой кислоты в пектинах SVC, TVC, LMC и AU701 составило 91, 89, 61 и 91%, соответственно [13]. Пектины SVC, TVC и AU701 характеризовались высокой линейностью (15,9, 15,0 и 10,6, соответственно) и низкой разветвленностью полисахарида (3,0, 4,5 и 2,0, соответственно). Пектин LMC имел низкую линейность (2,0) и высокую разветвленность (13,2). Молекулярная масса для SVC, TVC, LMC и AU701 составила 410, 666, 500 и 401 кДа, соответственно. Характеристическая вязкость была выше у пектина TVC (6,1 дл/г), чем у пектинов SVC, LMC и AU701 (2,0, 3,8 и 2,1 дл/г соответственно).

Степень метилэтерификации у пектинов каллусных культур SVC (10%), LMC (12%) и TVC (6%) была ниже, чем у AU701 (40%).

Пектин-кальциевые гидрогелевые матрицы в виде гидрогелевых частиц были получены путем ионотропного гелеобразования, при этом межмолекулярные поперечные связи возникали между дивалентными ионами кальция и отрицательно заряженными карбоксильными группами пектиновых макромолекул [6, 23]. Диаметр (1,97 мм), площадь поверхности (11,89 мм²) и объем (3,88 мм³) гидрогелевых частиц из TVC были наименьшими, а плотность (1,25 мг/мм³) и прочность (622,8 мН) – наибольшими по сравнению с другими частицами (табл. 1, 2). Диаметр (3,56 мм), площадь поверхности (53,55 мм²) и объем (37,48 мм³) гидрогелевых частиц из AU701 были выше, чем у частиц из пектинов каллусных культур (табл. 1). При этом плотность (0,40 мг/мм³) и прочность (150,4 мН) гелевых частиц из AU701 была наименьшей (табл. 2). С помощью корреляционного анализа показана достоверная положительная взаимосвязь между прочностью гелей и молекулярной массой ($R^2 = 0,97$,

$p < 0,05$, $n = 8$), а также вязкостью ($R^2 = 0,94$, $p < 0,05$, $n = 8$) пектинов. Чем больше молекулярная масса и вязкость пектина, тем выше прочность пектин-кальциевого геля. Высокая прочность и плотность гидрогелевых частиц из TVC, вероятно, обусловлены большей молекулярной массой и вязкостью пектина TVC по сравнению с другими пектинами.

Степень синерезиса гидрогелевых частиц из SVC, LMC и TVC была близкой (54–60%), тогда как для частиц из AU701 была выше в 1,2–1,3 раза (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о большей стабильности гидрогелей на основе пектинов каллусных культур по сравнению с гидрогелями из яблочного пектина.

Сканирующей электронной микроскопией установлено, что сухие гелевые частицы из пектинов SVC и LMC имели каплевидную форму и рельеф поверхности с крупными складками (рис. 1a,b). Частицы, приготовленные из пектина TVC, имели более округлую форму и неровный рельеф поверхности (рис. 1c). Для частиц из пектина AU701 характерна каплевидная форма и пористая морфология поверхности (рис. 1d).

Таблица 1

Характеристика пектин-кальциевых гидрогелевых частиц
Characterization of the pectin-calcium hydrogel particles

Тип гелевых частиц	Диаметр, мм	Площадь поверхности, мм ²	Объем, мм ³	Плотность, мг/мм ³	Степень синерезиса, весовые %
SVC	2,30 ± 0,14*	16,29 ± 1,44*	6,20 ± 0,81*	1,17 ± 0,17*	59,77 ± 2,00*
LMC	3,07 ± 0,22*	29,68 ± 4,28*	15,32 ± 3,38*	0,66 ± 0,05*	54,11 ± 1,88*
TVC	1,97 ± 0,13*	11,89 ± 1,41*	3,88 ± 0,69*	1,25 ± 0,25*	57,73 ± 2,75*
AU701	3,56 ± 0,35	53,55 ± 11,78	37,48 ± 12,27	0,40 ± 0,15	69,17 ± 2,43

*различия достоверны при сравнении с AU701 ($p < 0,05$).

*the differences are significant when compared with AU701 ($p < 0.05$).

Таблица 2

Прочность (мН) пектин-кальциевых гидрогелевых частиц в процессе инкубации в искусственной гастральной среде

The strength (mN) of the pectin-calcium hydrogel particles during the incubation in a simulated gastric medium

Тип гелевых частиц	Время инкубации, ч		
	0	2	4
SVC	250,1 ± 30,4 ^c	137,3 ± 39,1 ^{a,b}	89,8 ± 24,5 ^a
LMC	271,2 ± 73,3 ^c	62,4 ± 11,7 ^a	54,4 ± 13,9 ^a
TVC	622,8 ± 71,2 ^c	198,9 ± 40,3 ^{a,b}	150,7 ± 21,2 ^a
AU701	150,4 ± 38,6	н.о.	н.о.

^aразличия достоверны при сравнении с 0 ч ($p < 0,05$), the differences are significant when compared with 0 h ($p < 0.05$),

^bразличия достоверны при сравнении прочности частиц при 2 и 4 ч инкубации ($p < 0.05$), the differences are significant when compared a particle strength at 2 h and 4 h of incubation ($p < 0.05$),

^cразличия достоверны при сравнении с AU701 при 0 ч инкубации ($p < 0,05$), the differences are significant when compared with AU701 at 0 h of incubation ($p < 0.05$),

н.о. – не определено (not determined).

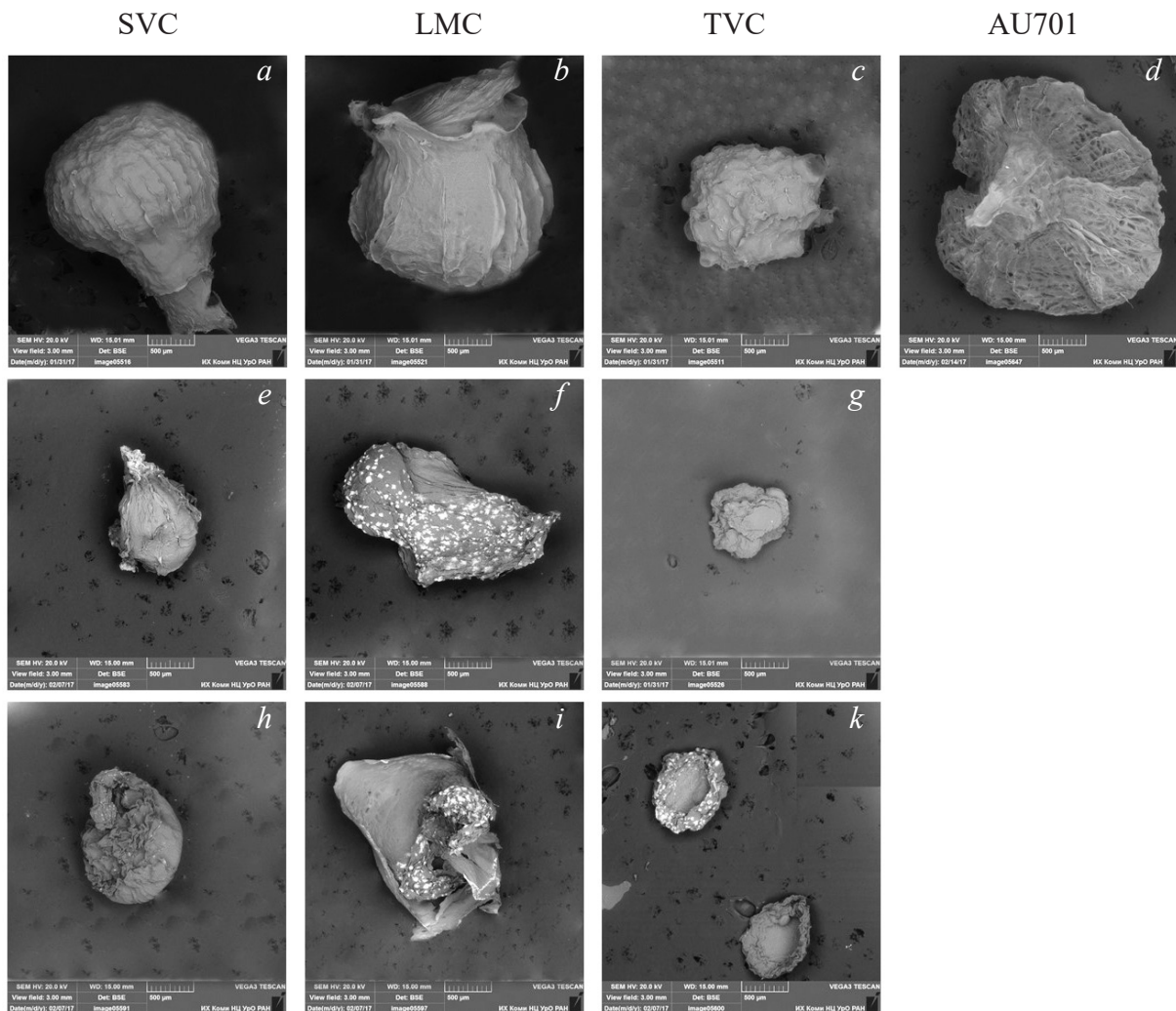


Рис. 1. Сканирующая электронная микроскопия пектин-кальциевых гелевых частиц: до инкубации в искусственной гастральной среде - SVC (a), LMC (b), TVC (c), AU701 (d); через 2 ч инкубации - SVC (e), LMC (f), TVC (g); через 4 ч инкубации - SVC (h), LMC (i), TVC (k). Шкала 500 мкм.

Fig. 1. Scanning electron microscopy of the pectin-calcium gel particles: before incubation in a simulated gastric medium – SVC (a), LMC (b), TVC (c), AU701 (d); after 2 h of incubation, SVC (e), LMC (f), TVC (g); after 4 h of incubation – SVC (h), LMC (i), TVC (k). Scale bar 500 µm.

Методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии определен элементный состав гелевых частиц. Основными элементами в составе частиц были углерод (44–54 ат.%), кислород (40–49 ат.%) и кальций (1,7–5,5 ат.%). Наименьшее содержание кальция отмечено для частиц из коммерческого яблочного пектина AU701 (табл. 3), что связано с более высокой степенью метилэтерификации пектина (40%) и, как следствие, меньшим количеством свободных отрицательно заряженных карбоксильных групп, способных связывать ионы кальция. Наиболее высокое содержание кальция обнаружено в гелевых частицах из пектина TVC с наименьшей степенью метилэтерификации. Выявлена отрицательная корреляция между содержанием кальция в

гелях и степенью метилэтерификации пектина ($R^2 = -0,99$, $p < 0,05$, $n = 8$). Показана достоверная положительная корреляция между исходным содержанием кальция в гелях и их прочностью ($R^2 = 0,74$, $p < 0,05$, $n = 8$). Таким образом, чем выше содержание кальция в пектин-кальциевом геле, тем выше его прочность.

Исследована степень деградации полученных гидрогелевых частиц в условиях искусственной гастральной среды (pH 1,25) в течение 4 ч. Все типы гелевых частиц наиболее интенсивно подвергались деградации в первый час инкубации в кислой среде (рис. 2), что проявлялось в существенном уменьшении их размеров и прочности (рис. 1, табл. 2.). Гелевые частицы из пектина AU701 полностью разрушились в течение второго

Элементный анализ пектин-кальциевых частиц при инкубации в искусственной гастральной среде
The elemental analysis of the pectin-calcium particles during the incubation in a simulated gastric medium

Тип гелевых частиц	Время, ч	Элементы, атомные %		
		Ca	Na	K
SVC	0	4,92 ± 0,32 ^c	0	0
	2	0,45 ± 0,10 ^{a,b}	2,16 ± 0,30 ^b	1,04 ± 0,11 ^b
	4	0,30 ± 0,04 ^a	3,83 ± 1,11	1,72 ± 0,45
LMC	0	4,25 ± 0,38 ^b	0	0
	2	0,27 ± 0,02 ^{a,b}	1,76 ± 0,28 ^b	0,78 ± 0,11 ^b
	4	0,09 ± 0,04 ^a	0,64 ± 0,22	0,39 ± 0,16
TVC	0	5,53 ± 0,78 ^c	0	0
	2	0,16 ± 0,02 ^a	1,54 ± 0,51 ^b	0,91 ± 0,23 ^b
	4	0,16 ± 0,01 ^a	0,69 ± 0,08	1,02 ± 0,05
AU701	0	1,65 ± 0,37	0	0
	2	н.о.	н.о.	н.о.
	4	н.о.	н.о.	н.о.

^aразличия достоверны при сравнении с 0 ч ($p < 0,05$),
the differences are significant when compared with 0 h ($p < 0.05$),

^bразличия достоверны при сравнении 2 ч и 4 ч инкубации ($p < 0,05$),
the differences are significant when compared 2 h and 4 h of incubation ($p < 0.05$),

^cразличия достоверны при сравнении с AU701 при 0 ч инкубации ($p < 0,05$),
the differences are significant when compared with AU701 at 0 h of incubation ($p < 0.05$),

н.о. – не определено (not determined).

часа инкубации в кислой среде. Наблюдали постепенное увеличение степени деградации частиц из пектинов SVC, LMC и TVC в течение 2–4 ч. Наименьшая степень деградации при pH 1,25 в течение 4 ч характерна для частиц из TVC. Степень деградации гидрогелевых частиц увеличивалась в ряду TVC < SVC < LMC < AU701 (рис. 2).

Для выявления взаимосвязи между химическими характеристиками пектинов, прочностью гидрогелей и степенью деградации гелевых частиц, а также определения степени вклада отдельных характеристик пектинов и гидрогелей в степень устойчивости гидрогелей, был проведен корреляционный анализ (табл. 4). Выявлена положительная зависимость между степенью деградации гелевых частиц через 1–4 ч инкубации и степенью метилэтерификации ($R^2 = 0,81–1,00$, $p < 0,05$, $n = 6$) пектина. Иначе говоря, чем меньше степень метилэтерификации пектина, тем меньше степень деградации гелевых частиц. Гели, приготовленные из пектинов каллусных культур с низкой степенью метилэтерификации (6–12%), подвергались меньшей деградации в искусственной гастральной среде по сравнению с гелями из яблочного пектина с более высокой степенью метилэтерификации (40%) (рис. 1). Высокое значение коэффициента корреляции в течение 1–4 ч указывает на то, что этот фактор в значительной

степени влиял на устойчивость гидрогелей в кислой среде на протяжении всего времени инкубации частиц.

Показана достоверная отрицательная корреляция между линейностью пектина и степенью

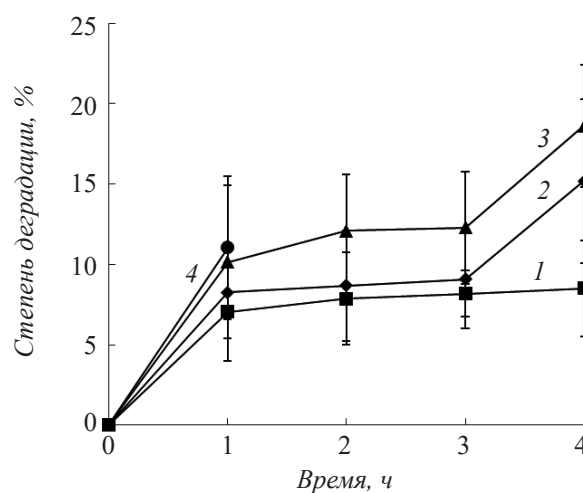


Рис. 2. Степень деградации (DD) пектин-кальциевых гидрогелевых частиц в условиях искусственной гастральной среды (pH 1,25, 37 °C): TVC (1), SVC (2), LMC (3), AU701 (4).

Fig. 2. The degree of degradation (DD) of the pectin-calcium hydrogel particles in a simulated gastric environment (pH 1.25, 37 °C): TVC (1), SVC (2), LMC (3), AU701 (4).

Корреляционный анализ между химическими характеристиками пектинов, прочностью гидрогелей и степенью деградации гелевых частиц в процессе инкубации в искусственной гастральной среде

Correlation analysis between the chemical characteristics of pectins, the strength of hydrogels and the degree of degradation of the gel particles during incubation in a simulated gastric medium

Характеристика	Степень деградации, %			
	1ч	2ч	3ч	4ч
СМ, %	0,81*	0,89*	0,90*	1,00*
Mw, кДа	-0,68	-0,34	-0,37	-0,77*
Линейность пектина	-0,66	-0,97*	-0,96*	-0,72*
Разветвленность пектина	0,20	0,95*	0,94*	0,67
Вязкость, дл/г	-0,62	-0,25	-0,28	-0,70
Прочность геля, мН	н.о.	-0,96*	н.о.	-1,00*

Примечание: представлены коэффициенты корреляции (R^2), СМ – степень метилэтерификации пектина, Mw – молекулярная масса пектина, н.о. – не определено.

*Статистическая значимость данных ($n = 6, p < 0,05$).

Note: correlation coefficients (R^2) are presented, СМ – degree of methylesterification of pectin, Mw - molecular weight of pectin, н.о. – not determined

*Statistical significance of values ($n = 6, p < 0.05$).

деградации гелевых частиц через 2–4 ч инкубации ($R^2 = -0,72(-0,97), p < 0,05, n = 6$). Как следует из данных, приведенных в табл. 4, чем выше линейность пектина, тем меньше степень деградации гелевых частиц. Гели, приготовленные из пектина каллусной культуры LMC с низкой линейностью (2%), подвергались большей деградации в искусственной гастральной среде по сравнению с гелями из пектинов каллусов SVC и TVC с более высокой линейностью (15,9 и 15,0%) (рис. 1). Более низкое значение коэффициента корреляции может свидетельствовать о том, что линейность пектина в меньшей степени определяла устойчивость гидрогелей в кислой среде по сравнению со степенью метилэтерификации пектина.

Выявлена положительная корреляция между степенью деградации гелевых частиц через 2–3 ч инкубации и разветвленностью пектина ($R^2 = 0,94-0,95, p < 0,05, n = 6$) (табл. 4). Данные указывают на то, что чем меньше разветвленность пектина, тем меньше степень деградации гелевых частиц. Гели, полученные из пектинов каллусных культур SVC и TVC с низкой степенью разветвленности (3,0–4,5%), подвергались меньшей деградации в искусственной гастральной среде по сравнению с гелями из пектина LMC с большей степенью разветвленности (13,2%) (рис. 1). Высокое значение коэффициента корреляции указывает на то, что разветвленность пектина в значительной степени влияла на устойчивость гидрогелей в кислой среде в течение второго и третьего часа инкубации. В течение четвертого часа инкубации этот фактор влиял на устойчивость гидро-

гелей в меньшей степени чем линейность и степень метилэтерификации пектина.

Таким образом, гели, приготовленные из пектинов с низкой разветвленностью и степенью метилэтерификации и высокой линейностью, подвергались меньшей деградации в искусственной гастральной среде.

С помощью сканирующей электронной микроскопии сухих частиц показано, что через 2 ч инкубации в кислой среде происходило значительное уменьшение размеров и деструкция формы всех типов частиц (рис. 1e,f,g), кроме того, существенное разрушение частиц из LMC (рис. 1f). После 4 ч инкубации при pH 1,25 показано уменьшение размеров и изменение формы всех типов частиц, а также разрушение частиц на основе SVC и LMC (рис. 1h,i). При этом гелевые частицы из пектина TVC практически не разрушались через 4 ч инкубации (рис. 1k). Микрорельеф поверхности всех типов частиц до инкубации в искусственной гастральной среде был более ровным (рис. 3a,b,c,d), чем таковой частиц подвергнутых обработке кислой средой. Микрорельеф поверхности частиц из пектинов SVC, LMC и TVC через 2 и 4 ч инкубации в кислой среде желудка был со значительными неровностями и складками (рис. 3e-k), что свидетельствовало о деструктивных изменениях в частицах.

Методом текстурного анализа установлено, что прочность гидрогелевых частиц из пектинов SVC, LMC и TVC снижалась через 2 ч инкубации в 1,8, 4,4 и 3,1 раза соответственно, а через 4 ч – в 2,8, 5,0 и 4.1 раза соответственно (табл. 2).

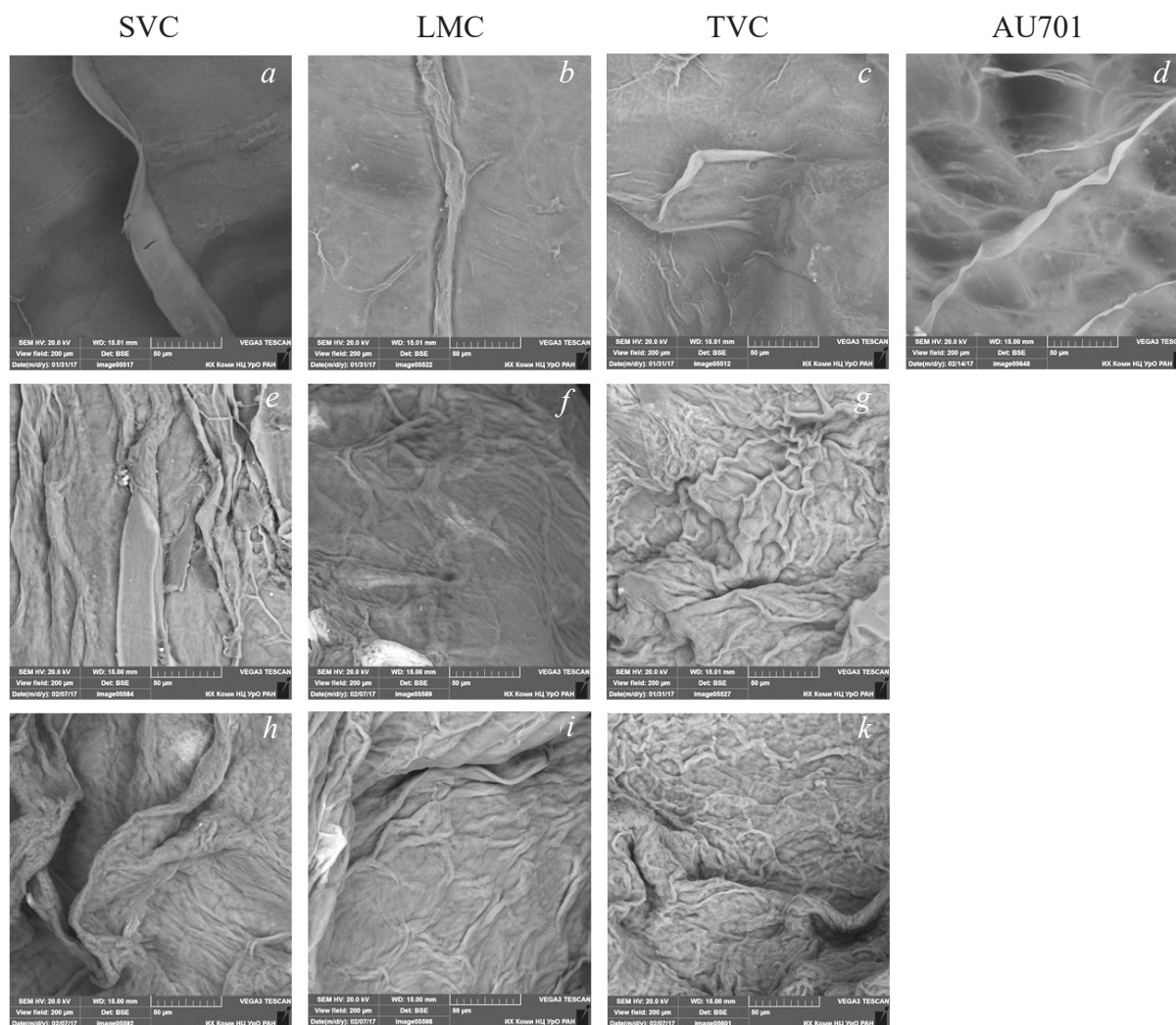


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия пектин-кальциевых гелевых частиц: до инкубации в искусственной гастральной среде – SVC (a), LMC (b), TVC (c), AU701 (d); через 2 ч инкубации – SVC (e), LMC (f), TVC (g); через 4 ч инкубации – SVC (h), LMC (i), TVC (k). Шкала 50 мкм.

Fig. 3. Scanning electron microscopy of the pectin-calcium gel particles: before incubation in a simulated gastric medium – SVC (a), LMC (b), TVC (c), AU701 (d); after 2 h of incubation, SVC (e), LMC (f), TVC (g); after 4 h of incubation – SVC (h), LMC (i), TVC (k). Scale bar 50 µm.

При этом прочность гидрогелевых частиц из пектина TVC на протяжении всего времени инкубации была выше, чем таковая частиц из пектинов SVC и LMC. Прочность частиц из LMC в процессе обработки кислой средой была наименьшей по сравнению с частицами из пектинов TVC и SVC. Выявлена достоверная отрицательная корреляция между прочностью и степенью деградации гелевых частиц через 2 ч ($R^2 = -0,96$, $p < 0,05$, $n = 6$) и 4 ч ($R^2 = -1,00$, $p < 0,05$, $n = 6$) инкубации (табл. 4). Более прочные гели медленнее разрушались в искусственной гастральной среде. Таким образом, частицы из пектина TVC, обладавшие наиболее высокой прочностью геля, в меньшей степени подвергались деградации в кислой среде, чем частицы из пектинов SVC, LMC и AU701.

В процессе инкубации в кислой среде содержание ионов кальция в гелевых частицах существенно снижалось (табл. 3). Через 2 и 4 ч инкубации содержание кальция в частицах снизилось на 91–97% и 94–98% соответственно. При этом в составе частиц были обнаружены ионы натрия и калия. Эти ионы присутствовали в составе искусственной гастральной среды и в результате происходило замещение ими ионов кальция в составе пектин-кальциевого геля, что приводило к формированию гидрофильных, со слабыми поперечными сшивками гелей, которые постепенно разрушались. Ранее подобное явление было показано другими исследователями на примере пектин-кальциевых гелевых пленок, инкубированных в присутствии 0,1 M NaCl и в результате потерявших до 90% ионов кальция [24].

Низкая степень деградации частиц из TVC может быть обусловлена большой прочностью и плотностью частиц, а также такими химическими характеристиками пектина, как низкая разветвленность и степень метилэтерификации полисахарида, высокая линейность пектина.

Высокая степень деградации, деструкция формы и размеров при инкубации в кислой среде, характерные для частиц из ЛМС, могут быть связаны с быстрым снижением прочности частиц (в 4,4–5,0 раз) и потерей ионов кальция в процессе инкубации, а также со строением пектина (низкая линейность и высокая разветвленность пектина).

Наиболее интенсивная деградация (в течение двух часов) гидрогелевых частиц из яблочного пектина по сравнению с таковыми на основе пектинов каллусных культур, вероятно, связана с большей степенью метилэтерификации пектина AU701, с низким исходным содержанием ионов кальция в геле (низкой ион-связывающей способностью пектина) и прочностью геля, а также с пористым рельефом поверхности частиц. Ранее нами была показана быстрая деградация пектин-кальциевых и пектин-хитозановых гелевых частиц, приготовленных из яблочного пектина [14, 25].

Таким образом, из пектинов каллусных культур получены гидрогелевые матрицы, которые обладали низкой степенью деградации в условиях искусственной гастральной среды (pH 1,25) в отличие от коммерческого яблочного пектина. Медленная деградация гидрогелей на основе пектинов каллусных культур связана как с высокой прочностью гелей, так и с химическими характеристиками пектинов. Гидрогели на основе пектина каллуса TVC были наиболее устойчивы в условиях кислой среды желудка. Пектины, полученных биотехнологическим путем, открывают возможность получения гидрогелевых матриц с заданными физико-химическими и функциональными свойствами. Пектины каллусной культуры TVC – пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., могут быть потенциально использованы для получения гидрогелевых матриц с контролируемым высвобождением лекарственных средств в желудочно-кишечном тракте, которые устойчивы к деградации в условиях гастральной среды.

ЛИТЕРАТУРА

- Albersheim P., An J., Fleshour G., et al. Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochem. Soc. Trans.*, 1994, 22(2), 374–378. doi: 10.1042/bst0220374
- Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах. *Биоорганическая химия*, 2009, 35(3), 293–310. doi: 10.1134/S1068162009030017
- Fraeye I., Duvetter T., Doungla E., et al. Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, 21(5), 219–228. doi: 10.1016/j.tifs.2010.02.001
- Ribeiro L.N.M., Alcântara A.C.S., Darder M., et al. Pectin-coated chitosan-LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 2014, 463(1), 1–9. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.035
- Prezotti F.G., Cury B.S.F., Evangelista R.C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. *Carbohydr. Polym.*, 2014, 113, 286–295. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.07.021
- Chambin O., Dupuis G., Champion D., et al. Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. *Int. J. Pharm.*, 2006, 321(1-2), 86–93. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.05.015
- Assifaoui A., Bouyer F., Chambin O., et al. Silica-coated calcium pectinate beads for colonic drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 2013, 9(4), 6218–6225. doi: 10.1016/j.actbio.2012.11.031
- Liu L.S., Fishman M.L., Hicks K.B., et al. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. *Drug Deliv.*, 2005, 13(6), 417–423. doi: 10.1080/10717540500394935
- Park H.-S., Lee J.-Y., Cho S.-H., et al. Colon delivery of prednisolone based on chitosan coated polysaccharide tablets. *Arch. Pharm. Res.*, 2002, 25(6), 964–968. doi: 10.1007/BF02977020
- Оводов Ю.С., Головченко В.В., Гюнтер Е.А., Попов С.В. Пектиновые вещества растений европейского Севера России. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2009, 112.
- Popov S.V., Popova G.Y., Ovodova R.G., et al. Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytes. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1999, 21(9), 614–622. doi: 10.1016/S0192-0561(99)00032-6
- Popov S.V., Günter E.A., Markov P.A., et al. Adjuvant effect of lemnin, pectic polysaccharide of callus culture of *Lemna minor* L. at oral administration. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2006, 28(1), 141–152. doi: 10.1080/08923970600626098
- Günter E.A., Popeyko O.V., Markov P.A., et al. Swelling and morphology of calcium pectinate gel beads obtained from *Silene vulgaris* callus modified pectins. *Carbohydr. Polym.*, 2014, 103, 550–557. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.071
- Günter E.A., Popeyko O.V. Calcium pectinate gel beads obtained from callus cultures pectins as promising systems for colon-targeted drug delivery. *Carbohydr. Polym.*, 2016, 147, 490–499. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.026

15. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. Polysaccharides of algae, 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of falginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (*Rhodophyta*, *Corallinaceae*). *Bot. Marina*, 1995, 38, 43–51. doi: org/10.1515/botm.1995.38.1-6.43
16. Wood P.J., Siddiqui I.R. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochem*, 1971, 39(2), 418–428. doi: 10.1016/0003-2697(71)90432-5
17. Knutsen S.H., Murano E., D'Amato M., et al. Modified procedures for extraction and analysis of carrageenan applied to the red alga *Hypnea musciformis*. *J. Appl. Phycol.*, 1995, 7(6), 565–576. doi: 10.1007/BF00003944
18. Гюнтер Е.А. Пектиновые вещества каллусной культуры и нативного растения *Silene tatarica* L. *Химия природных соединений*. 2016, (3), 399-403. doi: 10.1007/s10600-016-1672-x
19. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., et al. Isolation and characterization of plant cell wall and cell-wall components. *Meth. Enzymol.*, 1985, 118, 3–40. doi: 10.1016/0076-6879(86)18062-1
20. Houben K., Jolie R.P., Fraeye I., et al. Comparative study of the cell wall composition of broccoli, carrot: and tomato: structural characterization of the extractable pectins and hemicelluloses. *Carbohydr. Res.*, 2011, 346(9), 1105–1111. doi: org/10.1016/j.carres.2011.04.014
21. Murashige T., Skoog S. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, 15(3), 473–479. doi: org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
22. Gebara C., Chaves K.S., Ribeiro M.C.E., et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Res. Int.*, 2013, 51(2), 872–878. doi: 10.1016/j.foodres.2013.02.008
23. Sriamornsak P., Thirawong N., Cheewatanakornkool K., et al. Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate. *Int. J. Pharm.*, 2008, 352(1-2), 115–122. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.10.038
24. Sriamornsak P., Kennedy R.A. Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. *Int. J. Pharm.*, 2008, 358(1-2), 205–213. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.03.009
25. Гюнтер Е.А., Мелехин А.К., Попов С.В., и др. Адгезивные свойства пектин-хитозановых композитных гелей *Химия природных соединений*. 2017, (5), 704-709. doi: 10.1007/s10600-017-2133-x.

Preparation and Properties of Hydrogel Matrices based on Pectins from Callus Cultures

E.A. GÜNTER^{1,*}, O.V. POPEYKO¹, and E.I. ISTOMINA^{2,**}

¹*Institute of Physiology of Komi Science Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982, Russia*

²*Institute of Chemistry of Komi Science Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982, Russia*

*e-mail: gunter-ea@mail.ru

**e-mail: istomina-ei@chemi.komisc.ru

Received September 17, 2019

Revised November 4, 2019

Accepted April 30, 2020

Abstract—Hydrogel matrices have been obtained from pectins of *Silene vulgaris* (SVC), *Tanacetum vulgare* (TVC) and *Lemna minor* (LMC) callus cultures, and from apple pectin (AU701). They differed in gel strength, calcium ion content and surface morphology. During the incubation under simulated gastric conditions (pH 1.25), the gel strength and calcium content decreased. The degradation degree of hydrogels grew in the range TVC < SVC < LMC < AU701. The degradation degree of hydrogels from the SVC, LMC, and TVC pectins gradually increased over 4 hours, while hydrogels from the AU701 pectin were destroyed within 2 hours. The gels prepared from pectins with low methyl esterification, low branching and high linearity underwent less degradation. The TVC pectin gels had the highest strength and were most stable at pH 1.25. The data obtained can be used to produce hydrogel matrices with desired physicochemical and functional properties.

Key words: callus culture, pectin polysaccharides, hydrogels, gastric medium

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-63-72