

УДК 577.114

РАМНОГАЛАКТУРОНАН I ЖЕЛАТИНОЗНЫХ ВОЛОКОН ЛЬНА ФОРМИРУЕТ ГЕЛЬ, ОБЛАДАЮЩИЙ ГИПЕРЭЛАСТИЧНЫМИ СВОЙСТВАМИ

© 2015 П.В. Микшина*, А.А. Петрова,
Д.А. Файзуллин, Ю.Ф. Зуев, Т.А. Горшкова

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского
научного центра РАН, 420111 Казань, ул. Лобачевского, 2/31;
факс: +7(843)292-7347, электронная почта: p.mikshina@gmail.com

Поступила в редакцию 08.02.15

После доработки 27.02.15

Рамногалактуронаны I – сложные, крайне вариабельные по структуре и свойствам пектиновые полисахариды, широко представленные в различных источниках. Сложность строения и разнообразие рамногалактуронанов I служат причиной ограниченных сведений о свойствах и надмолекулярной организации этих полисахаридов, в т.ч. о взаимосвязи между этими параметрами и функцией рамногалактуронанов I в растительной клетке. В работе на примере рамногалактуронана I желатинозных волокон льна впервые установлена способность этих пектиновых полисахаридов образовывать при физиологических концентрациях гидрогели, обладающие гиперэластичными свойствами. По данным ИК-спектроскопии в гелеобразующем рамногалактуронане I клеточной стенки волокон льна присутствуют молекулы воды, более прочно удерживаемые полисахаридом по сравнению с не формирующим гель рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля. При возрастании силы связывания воды рамногалактуронаном I наблюдается повышение модуля упругости и понижение коэффициента Пуассона геля, формируемого этим полисахаридом. Модель захвата гиперэластичного рамногалактуронана I латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы, построенная с применением метода конечных элементов, подтвердила пригодность геля из рамногалактуронана I с установленными свойствами для функционирования в условиях желатинозной клеточной стенки, что позволяет рассматривать этот ткане- и стадияспецифичный пектиновый полисахарид как важный фактор в создании контрактильности желатинозных волокон.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: желатинозные волокна, полисахариды, рамногалактуронан I, сорбция воды, гель, упруго-пластические свойства.

Растительная клеточная стенка служит источником необозримого множества углеводных структур, построенных главным образом на базе десяти типов полисахаридных остовов. Разнообразие полисахаридов клеточной стенки, в т.ч. имеющих одинаковый тип остова, сопряжено, по всей видимости, с их «функциональной пригодностью» [1]. Однако критерии, определяющие «функциональную пригодность» полисахаридов клеточной стенки, до сих пор не определены. Одним из таких критериев может служить способность к формированию надмолекулярных структур, характеризующихся определен-

ными физико-химическими и механическими свойствами. Результатом такой способности служит, в частности, образование отдельными полисахаридами гелей различного типа. Способ гелеобразования и свойства формируемого геля при этом могут отличаться не только для структурно-отдаленных полисахаридов, но даже в пределах полисахаридов, построенных на основе одного типа остова [2–5].

Среди наиболее охарактеризованных гелеобразующих полисахаридов высших растений ключевое место занимают пектины, включающие полигалактуроновую кислоту и рамногалактуронаны I и II. Способность пектинов к гелеобразованию связывают главным образом с наличием в их структуре высоко- и низкометоксильированной полигалактуроновой кислоты [6–8]. Принято считать, что рамногалактуронаны высших растений при отсутствии в структуре фрагментов гомогалактуронана гелей не образу-

Принятые сокращения: RGF – рамногалактуронан I волокон льна до встраивания в клеточную стенку, RGf_{cw} – рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, RGr – рамногалактуронан I первичной клеточной стенки картофеля, ОВ – относительная влажность.

* Адресат для корреспонденции.

ют [9], хотя для ряда из этих полисахаридов была продемонстрирована способность к агрегированию с участием модифицирующих групп и/или нейтральных боковых цепей [10–13]. Необычные ассоциаты пектиновых молекул, не содержащих участков полигалактуронана, были охарактеризованы для ткане- и стадияспецифичных рамногалактуронанов I волокон льна, присутствующих на стадии формирования третичных клеточных стенок. Такие клеточные стенки характерны для многих растительных волокон и названы, благодаря гелеподобному виду, желатинозными (от «gelatinous»). Особенности пространственной организации ассоциатов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна состоит в том, что заряженный остов полисахарида, построенный из чередующихся димеров [$\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap(1 \rightarrow)], расположен на поверхности, а нейтральные галактановые цепи, взаимодействуя друг с другом, формируют ядро и удерживают составляющие ассоциат молекулы [13]. В желатинозных слоях клеточной стенки ассоциаты такого типа оказываются «запечатанными» между латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы. Это служит причиной эффективного натяжения микрофибрилл и, как следствие, возникновения характерных для волокон контрактильных свойств [14–18]. Локализация и функционирование рамногалактуронана I в условиях давления, возникающего при взаимодействии микрофибрилл целлюлозы, предполагает наличие у этого полисахарида определенных упруго-пластических свойств. Благодаря особому типу секретиции содержимого везикул Гольджи при формировании третичной клеточной стенки [19] рамногалактуронан I может быть выделен и до встраивания в клеточную стенку [20].

Цель этой работы состоит в установлении физико-химических и механических особенностей тканеспецифичного рамногалактуронана I, определяющих «функциональную пригодность» этого полисахарида как элемента третичной клеточной стенки желатинозных волокон. Для этого будет проведено сопоставление свойств этого полисахарида и высокомолекулярного рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку желатинозных волокон льна, а также рамногалактуронана I тонкой первичной клеточной стенки картофеля, не способного к формированию ассоциатов особого типа. Будет охарактеризована способность исследуемых рамногалактуронанов I к гелеобразованию, включая особенности сорбционных свойств этих полисахаридов по отношению к воде как ключевому фактору в образовании характерных для полисахаридов гидрогелей.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Растительный материал. Объектом исследований служили растения льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Могилевский из коллекции ВНИИ льна (г. Торжок). Растения выращивали в условиях вегетационного опыта в ящиках со слоем почвы 50 см на открытом воздухе при естественном освещении и ежедневном поливе. Для выделения рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку использовали волокнистую часть отрезков стебля (10 см) ниже точки слома [21] растений на стадии быстрого роста (40 дней после посева). Для выделения рамногалактуронана I из клеточной стенки использовали зрелые изолированные волокна (100 дней после посева).

Выделение и очистка рамногалактуронанов I. Рамногалактуронан I волокон льна до встраивания в клеточную стенку (RGf) выделяли как высокомолекулярный полимер, попадающий в супернатант при гомогенизации ткани в буфере (10 mM NaOAc, pH 5,0, 10 мл на 1 г ткани). Содержащиеся в осветленном гомогенате полимеры фильтровали и осаждали этанолом до конечной концентрации 80%, осадок высушивали, перерастворяли и хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (12 × 400 мм, «Pharmacia», Швеция). Элюент – 0,01 M пиридин/уксусная кислота, pH 4,5, скорость потока – 0,25 мл/мин, объем собираемых фракций – 1,0 мл. Для анализа отбирали фракции, соответствующие 700–2000 кДа [20, 22]. Содержание углеводов в каждой фракции определяли фенол-сернокислотным методом [23]. Для калибровки колонки использовали пуллуланы с M_w 1660, 380, 100 и 48 кДа («Showa Denko», Япония) и низким индексом полидисперсности (1,09–1,19).

Рамногалактуронан I желатинозной клеточной стенки (RGfcw) выделяли из предварительно отмытых 1%-ным оксалатом аммония и 4 M KOH волокон льна согласно методике, разработанной Гурьяновым с соавт. [22]. Для полного разрушения микрофибрилл целлюлозы использовали 8%-ный раствор LiCl («Merck», Германия) в обезвоженном на молекулярных ситах (4 Å, «Sigma», Германия) N,N-диметилацетамиде («AppliChem», Германия) и целлюлазу (Cellusoft-L, «Novo Nordisk Bioindustrie S.A.», Франция; 750 EGU/G). Очистку рамногалактуронана I, составляющего основной объем полученной фракции полимеров, проводили с помощью геле-фильтрации на колонке с сефарозой CL-4B (12 × 400 мм, «Pharmacia», Швеция) при тех же условиях, что использовались для разделения буферозэкстрагируемых полимеров. Для анализа отбирали фракции, соответствующие 100–400 кДа [22, 24].

Очистку коммерческого препарата рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля (RGp) («Megazyme», Ирландия) от низкомолекулярных примесей проводили на колонке с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция).

Получение гелей из рамногалактуронанов I. Для получения гелей из рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля было использовано три подхода [25]:

1) высушенный препарат полисахарида насыщали водой (соотношение полисахарид : вода 4 : 1 с последующим увеличением доли воды в образце);

2) раствор полисахарида нагревали на водяной бане при температуре 90° в течение 5 мин и охлаждали при комнатной температуре;

3) раствор полисахарида выдерживали в микроволновой печи при мощности 584 Вт в течение 1 мин, затем заливали в блистеры с ячейками диаметром 10,3 мм и охлаждали при комнатной температуре до застывания.

Эксперименты по одноосному сжатию. Для определения модуля Юнга и коэффициента Пуассона полученные гели подвергали одноосному сжатию (рис. 1). Измерения проводили с по-

мощью микрометра с цифровым отсчетным устройством (МКЦ-25-0.001, «Челябинский инструментальный завод», Россия), оценивая изменение высоты геля после приложения давления. В качестве источника давления использовали грузы различной массы (1, 2, 5, 10, 20, 100 и 200 г). Перед измерением систему выдерживали в течение 30 с в свободном от давления состоянии (восстановление исходной высоты гелевого блока) (рис. 1, а). После установки груза на гелевый блок систему выдерживали в течение 20 с до прихода в равновесное состояние, после чего фиксировали величину установившейся нагрузки (рис. 1, б). Силу, приложенную к гелевому блоку, рассчитывали как произведение массы груза и ускорения свободного падения, а давление – исходя из величины силы и площади поверхности гелевого блока.

Модуль Юнга и коэффициент Пуассона рассчитывали по формулам (1) и (2) соответственно:

$$E = \frac{Fl}{S\Delta l}, \quad (1)$$

где E – модуль Юнга; F – сила, приложенная к гелевому блоку; S – площадь поверхности геля,

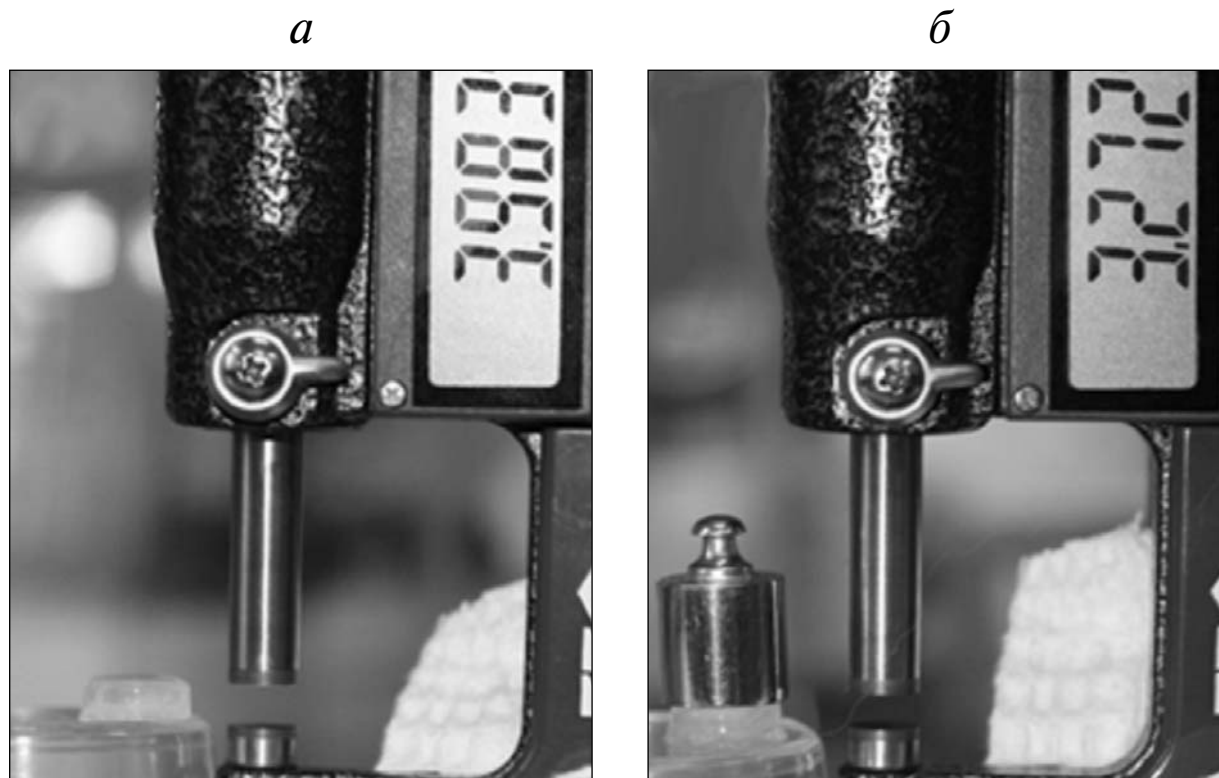


Рис. 1. Установка для экспериментов по одноосному сжатию. Гелевый блок рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна с соответствующими показаниями микрометра до (а) и после (б) оказания давления

по которой распределено действие силы; l – высота гелевого блока; Δl – модуль изменения высоты гелевого блока в результате упругой деформации (измеренного в тех же единицах, что и длина l);

$$\mu = \left| \frac{\varepsilon'}{\varepsilon} \right|, \quad (2)$$

где μ – коэффициент Пуассона, ε' – деформация гелевого блока в поперечном направлении, ε – продольная деформация гелевого блока.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры записывали на приборе IR Affinity1 («Shimadzu», Япония) в диапазоне 700–4000 см^{-1} с разрешением 4 см^{-1} , количество накоплений 128. Образцы рамногалактуронанов I растворяли в воде в концентрации 10 мг/мл, 5 мкл раствора наносили на поверхность германиевого кристалла приставки однократного нарушенного полного внутреннего отражения MIRacle ATR и высушивали. Пленку помещали в герметичную камеру, через которую пропускали поток воздуха с регулируемой относительной влажностью (ОВ) H_2O или D_2O . Температура подготовки образцов и измерений составляла 25°.

Для определения сорбционных свойств рамногалактуронанов I по отношению к воде снимали ИК-спектры пленок при двух значениях ОВ: близкой к насыщению (99%) и близкой к нулю (над пятиокисью фосфора). Количество прочно связанной воды определяли по интенсивности остаточной полосы деформационных колебаний ОН-связей воды при 1640 см^{-1} . Для этого осуществляли разложение спектра в этой области на отдельные компоненты, соответствующие поглощению воды и групп полисахарида. Количество слабо связанной воды определяли по площади полосы поглощения 1640 см^{-1} , полученной вычитанием спектра «сухого» образца из спектра образца при насыщающей ОВ.

Доступность растворителю ОН-групп в составе полисахарида и гидратной воды оценивали по скорости дейтерообмена. Пленки образцов увлажняли до насыщения в парах H_2O , после чего помещали образец в насыщающие пары D_2O . Спектры записывали в течение времени, необходимого для регистрации полной кинетической кривой Н-D-обмена.

Компьютерное моделирование. Моделирование захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы проводили методом конечных элементов с использованием программной системы AnsysWorkbench 15.0. При построении модели создавали двумерную конструкцию, включающую рамногалактуронан I, располо-

женный между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке (0,3 МПа) [26]. Поскольку микрофибриллы целлюлозы обладают линейной упругостью, при моделировании заданной конструкции использовали характеристики, представленные в литературе для целлюлозы льна: длина микрофибрилл – 6 мкм, диаметр – 3 нм [27, 28], модуль Юнга – 130 ГПа [29], коэффициент Пуассона – 0,4 [30]. Необходимые для построения модели параметры рамногалактуронана I (модуль Юнга, коэффициент Пуассона, константы Муни–Ривлина) были получены из результатов экспериментов по одноосному сжатию, диаметр ассоциата рамногалактуронана – 40 нм [13].

Для определения констант Муни–Ривлина C_{01} и C_{10} использовали формулы (3) и (4):

$$C_{01} = \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \cdot \frac{1 - \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}}{\frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}}, \quad (3)$$

$$C_{10} = \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} - C_{01} \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}, \quad (4)$$

где σ – экспериментальное напряжение, возникающее в образце (определено по формуле (5)), λ – степень деформации образца ($\lambda = h/h_0$), h_0 – исходная высота гелевого блока до оказания давления, h – высота гелевого блока после оказания давления, n – количество экспериментальных точек.

$$\sigma = \frac{F_{\text{упр}}}{S}, \quad (5)$$

где $F_{\text{упр}}$ – сила упругости, возникающая в геле при деформации (определена по формуле (6)), S – площадь поверхности гелевого блока, по которой распределено действие силы.

$$F_{\text{упр}} = -k\Delta l, \quad (6)$$

где k – жесткость геля (определена по формуле (7)), Δl – величина деформации.

$$k = \frac{ES}{L_0}, \quad (7)$$

где E – модуль Юнга; S – площадь поверхности гелевого блока, по которой распределено действие силы; L_0 – высота гелевого блока.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установление гелеобразующей способности рамногалактуронанов I. При насыщении рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля водой в соотношении 4 : 1 все полисахариды полностью впитывали воду, растворения при этом не наблюдалось. Добавление большего количества воды в образцы приводило к растворению рамногалактуронанов, гели при этом не образовывались даже при выдерживании образцов при 4° вне зависимости от концентрации полисахаридов. Однако растворы рамногалактуронанов I льна и картофеля, получаемые при насыщении водой, визуально отличались: если раствор RGr вне зависимости от концентрации представлял собой жидкость, то RGf при соотношении с водой 1 : 2,5 образовывал вязкий сироп, а RGfcw – гелеподобные зернистые пасты. Аналогичным образом полисахариды вели себя и при нагреве на водяной бане.

После воздействия электромагнитным излучением в микроволновой печи рамногалактуронаны I волокон льна образовали гели при комнатной температуре; минимальная концентрация полисахаридов, при которой наблюдалось образование гелей, составила 4%. Визуально гель, образуемый RGf, был более мягким, чем гель, полученный RGfcw. Состояние рамногалактуронана I картофеля после нагревания в микроволновой печи не изменялось. К образованию геля из этого полисахарида не приводило ни последующее охлаждение образца и выдерживание при 4°, ни добавление Ca^{2+} (0,62 мМ) [31] в раствор полисахарида, ни максимальное повышение его концентрации путем высушивания. Во всех случаях для RGr выявлялись только два состояния: вязкий раствор или пленка.

Упруго-пластические свойства гелей из рамногалактуронанов I волокон льна. Для установления упруго-пластических свойств рамногалактуронанов I волокон льна был проведен эксперимент по одноосному сжатию. Параметры воздействий на гели из RGf и RGfcw представлены в табл. 1. По результатам эксперимента установлена зависимость степени деформации гелей от величины оказываемого на них давления, а также рассчитаны модули Юнга (физическая величина, характеризующая свойства материала сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации) и коэффициенты Пуассона (величина отношения относительного поперечного сжатия к относительному продольному растяжению).

Кривые зависимости деформации от давления для гелей из рамногалактуронанов I волокон льна имеют вогнутую форму (рис. 2), что характерно для водных гелей, в частности для гелей на основе гиалуроновой кислоты [32]. Такой кривой характеризуются материалы, которые разрушаются раньше, чем начинают течь под давлением, например, эластомеры.

Определенные на основе параметров, полученных из экспериментов по одноосному сжатию, согласно формулам (1) и (2) модуль Юнга и коэффициент Пуассона составляют для геля из RGf 9,3 кПа и 0,495, а для геля RGfcw – 13,7 кПа и 0,483 соответственно. Такие значения параметров свидетельствуют, что гели из этих полисахаридов представляют собой гиперэластичный материал (обладают низким модулем Юнга в сочетании с коэффициентом Пуассона выше 0,48 [33]).

Сорбция воды рамногалактуронанами I. Для сопоставления рамногалактуронанов I, имеющих различную способность к гелеобразованию, по характеристикам сорбции ими воды ис-

Таблица 1. Характеристики деформации гелей из рамногалактуронанов I волокон льна (RGf и RGfcw) в экспериментах по одноосному сжатию

Масса груза, г	Сила, приложенная к гелевому блоку, Н	Давление, оказываемое на гелевый блок, кПа	Деформация гелевого блока, мм/мм	
			RGf	RGfcw
1	0,010	0,118	0,153 ± 0,03	0,125 ± 0,03
2	0,020	0,237	0,197 ± 0,03	0,132 ± 0,04
5	0,049	0,592	0,250 ± 0,03	0,154 ± 0,05
10	0,098	1,183	0,317 ± 0,04	0,174 ± 0,04
20	0,196	2,366	0,362 ± 0,06	0,234 ± 0,05
100	0,981	11,832	0,592 ± 0,04	0,379 ± 0,05
200	1,962	23,664	0,780 ± 0,07	0,571 ± 0,07

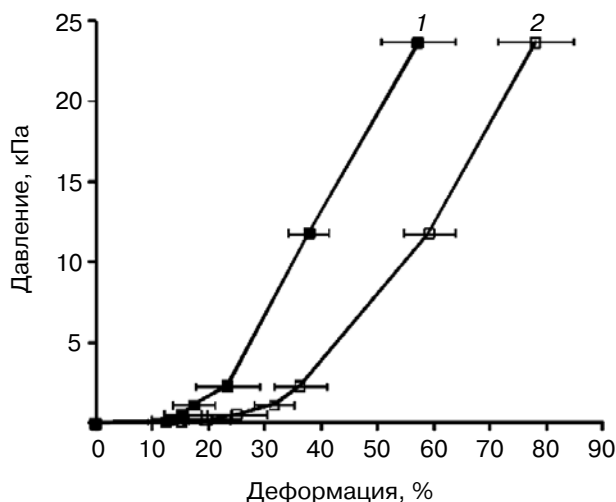


Рис. 2. Кривые зависимости деформации гелевых блоков образцов RGfcw (1) и RGf (2) от давления

пользовали ИК-спектроскопию. На рис. 3 приведены спектры сухих и увлажненных пленок образцов RGf, RGfcw и RGp. Спектры сорбированной воды получены посредством определения разности спектров сухого и влажного образцов. Форма и интенсивность полос поглощения в области валентных колебаний сорбированной воды может быть представлена суммой как минимум трех компонент с частотой максимума в области 3240, 3400 и 3560 см^{-1} (рис. 3). Положение максимумов обусловлено различиями в силе водородных связей, образуемых молекулами воды в матрице полисахарида [34]. В образцах RGf и RGfcw относительная интенсивность и число компонент спектра легкоудаляемой воды практически одинаковы. Интенсивность поглощения воды в RGp значительно выше, а форма полосы искажена протяженным поглощением в низкочастотной области вплоть до 2500 см^{-1} , что характерно для воды, сорбированной на заряженных кислотных группах [35]. На высокое содержание ионизованных кислотных остатков в RGp указывают интенсивные полосы на частотах 1608 и 1410 см^{-1} . В то же время количество прочносвязанной воды, определяемой по остаточному поглощению на 1640 см^{-1} в спектрах сухих образцов, в RGp меньше, чем в RGf и RGfcw.

Оценка доступности ОН-групп рамногалактуронанов I растворителю. Доступность ОН-групп растворителю оценивали по скорости и степени замещения протонов на дейтероны. Скорость замещения протонов в ОН-группах зависит от ряда факторов [36], из которых наибольшее значение при прочих равных условиях имеют сте-

рические ограничения, обусловленные водородным связыванием или плотностью пространственной упаковки полимерных цепей. На рис. 4 приведены кинетические кривые Н-D-обмена, представляющие собой зависимость интенсивности поглощения на частоте 3400 см^{-1} от вре-

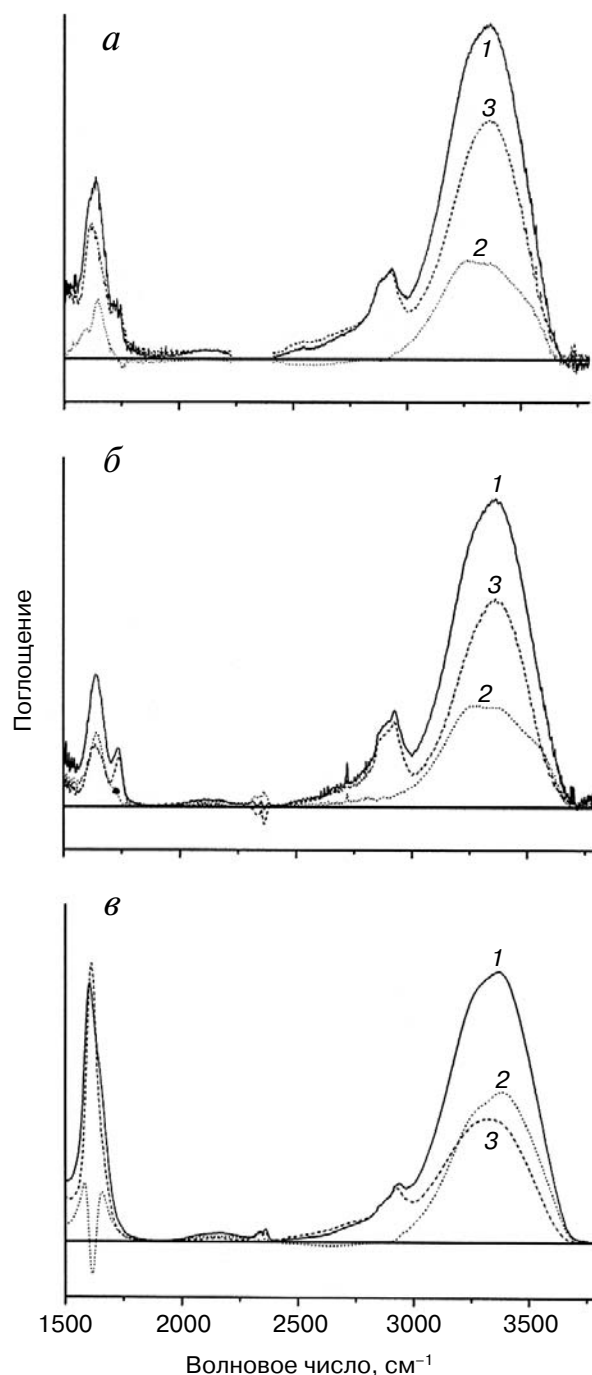


Рис. 3. ИК-спектры пленок образцов: а — RGfcw, б — RGf, в — RGp. 1 — Влажный образец, 2 — сухой образец, 3 — разность между спектрами влажного и сухого образцов

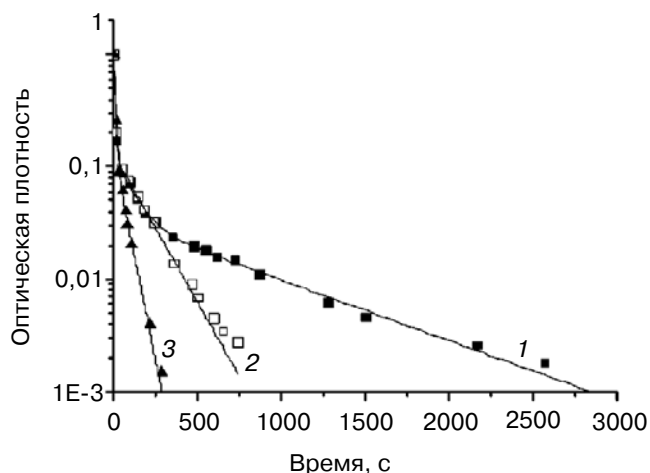


Рис. 4. Нормированные зависимости кинетики H-D-обмена по полосе 3400 см^{-1} пленок образцов: RGf (1), RGf (2), RGp (3). Сплошными линиями обозначены аппроксимации экспоненциальными зависимостями (см. табл. 2)

мени экспозиции системы в парах D_2O для образцов RGf, RGf_{cw} и RGp. Зависимости аппроксимировали суммой трех экспонент, параметры аппроксимации приведены в табл. 2.

Количество и относительные веса компонент разложения для рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля существенно различаются. Так, для RGf и RGp параметры аппроксимации кинетических кривых H-D-обмена описываются двумя экспоненциальными компонентами, а для RGf_{cw} — тремя. Перекрытие полос поглощения OH-групп воды и полисахаридов в области 3400 см^{-1} затрудняет отнесение компонент. Однако поглощение в области 1640 см^{-1} содержит вклад только поглощения воды, и кинетика обмена, регистрируемая по этой полосе, имеет лишь одну компоненту с постоянной времени, близкой к наименьшей из величин, приведенных в табл. 2. Таким образом, наиболее быстро реакция обмена протонов протекает в молекулах слабосвязанной воды и, вероятно, в

части гидратированных OH-групп полисахаридов, не включенных в систему водородных связей. Более медленный обмен характерен для OH-групп воды и полисахарида, задействованных в образовании водородных связей. Третья, наибольшая по величине постоянная времени, наблюдается только в образце RGf_{cw} и описывает замещение протонов в крайне медленно обмениваемых OH-группах.

Параметры аппроксимации соответствующей кинетической кривой для RGp свидетельствуют о слабом межмолекулярном связывании OH-групп в этом полисахариде, в то время как в RGf порядка трети OH-групп, а в RGf_{cw} порядка половины OH-групп задействованы, по всей видимости, в образовании водородных связей и обмениваются со средней скоростью (табл. 2). Более сложная форма и большая длительность кинетики дейтерозамещения в RGf_{cw} (рис. 4, табл. 2) свидетельствует о наличии наряду с быстро и медленно обмениваемыми в данных условиях протонами OH-групп полисахарида и крайне медленно обмениваемых протонов. Их количество, оцениваемое при сравнении интенсивности полос поглощения OH-групп в исходно сухом и во влажном образцах с высокой степенью дейтерозамещения, свидетельствует, что в RGf_{cw} порядка 10% всех OH-групп стерически недоступны растворителю.

Таким образом, с помощью ИК-спектроскопии установлено, что в гелеобразующих образцах рамногалактуронанов I волокон льна присутствуют молекулы воды, более прочно удерживаемые полисахаридами по сравнению с не формирующим геля рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля. Повышение степени удерживания воды рамногалактуронаном I при этом сопряжено с увеличением прочности формируемого им геля и может быть связано с появлением в структуре образца более плотно упакованных областей.

Моделирование захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы. Для проверки пригодности геля из рамногалактуронана I с ус-

Таблица 2. Параметры аппроксимации кинетических кривых H-D-обмена экспоненциальными компонентами. Полоса валентных колебаний OH-групп (3400 см^{-1}) в образцах RGf, RGf_{cw} и RGp, нормированная по максимуму полосы

Образец	Вес комп. 1	Постоянная времени 1, с	Вес комп. 2	Постоянная времени 2, с	Вес комп. 3	Постоянная времени 3, с
RGf	0,68	13	0,32	77	—	—
RGf _{cw}	0,34	10	0,53	58	0,13	840
RGp	0,87	10	0,13	60	—	—

тановленными свойствами для функционирования в условиях желатинозной клеточной стенки была построена модель, включающая этот полисахарид, расположенный между двумя микрофибриллами целлюлозы (рис. 5, *а*). На одну из микрофибрилл оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке (0,3 МПа) [26]. Поскольку при таком давлении полисахарид будет претерпевать существенные деформации, при моделировании использовали модель Муни–Ривлина для гиперэластичных материалов [37]. Необходимые для моделирования константы Муни–Ривлина C_{01} и C_{10} были рассчитаны по формулам (3) и (4) и составили для семи точек экспериментальных данных 395,8 и 2751,2 Па соответственно.

При расположении RGfsw между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке, происходит существенное сжатие этого полисахарида (рис. 5, *б*).

Однако показатели деформации RGfsw в продольном направлении демонстрируют, что в этом случае его полного «сдавливания» микрофибриллами не происходит. Показатели напряжения, возникающего в RGfsw при оказании давления, близки к нулю (0,3 МПа, рис. 5, *в*), как и основная часть деформации ($4,98 \times 10^{-8}$ мкм/мкм, рис. 5, *г*). По закону Гука величина упругой деформации (деформации гиперэластичного RGfsw) полностью определяется механическими напряжениями, т.е. пропорциональна приложенному к этому телу напряжению. Напряжение при деформации RGfsw в условиях приложенного давления (0,3 МПа) составило 0,3 МПа. Следовательно, гиперэластичный RGfsw с установленными механическими параметрами не разрушается при воздействии на систему давления, уровень которого соответствует тургорному давлению растительной клетки.

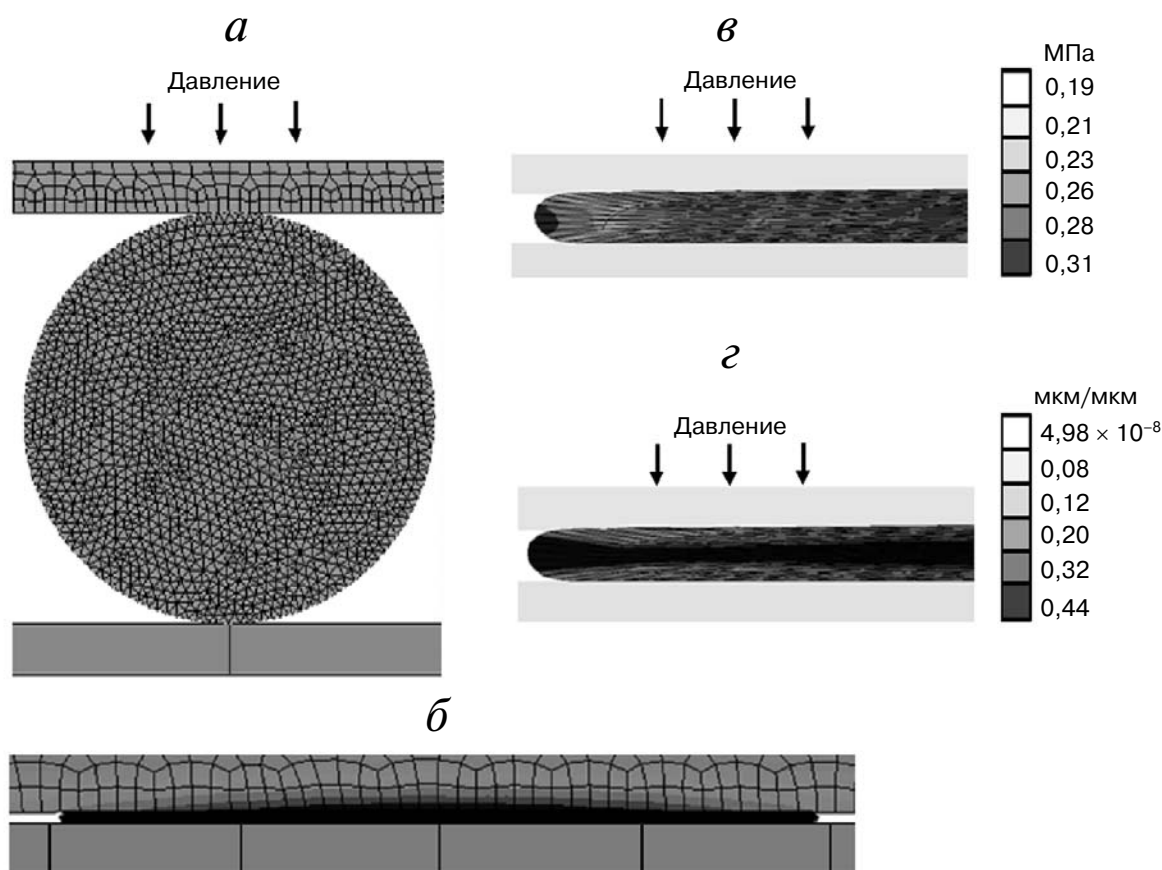


Рис. 5. Моделирование деформации рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна при расположении между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке. *а* – Конечно-элементная модель RGfsw, *б* – конечно-элементная модель RGfsw после оказания давления, *в* – напряжение в продольном направлении RGfsw (МПа), *г* – деформация RGfsw в продольном направлении (мкм/мкм). Упруго-пластические свойства RGfsw, используемые при моделировании, определены с помощью экспериментов по одноосному сжатию

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рамногалактуронаны I представляют собой наиболее сложноорганизованный в структурном плане класс растительных полисахаридов, широко представленный в различных источниках и типах клеточных стенок [15, 38–42]. Описанные надмолекулярные структуры рамногалактуронанов I образованы главным образом с участием модифицирующих групп и/или нейтральных боковых цепей [10–12]. Принципиальным отличием рамногалактуронана I желатинозных волокон льна от рамногалактуронанов I других типов клеточных стенок служит способность к самоассоциации, в результате которой образуются надмолекулярные структуры особого типа: остов расположен на поверхности, а галактановые цепи, взаимодействуя друг с другом, формируют ядро ассоциата [13]. Такая пространственная структура рамногалактуронана I желатинозных волокон обеспечивает: а) способность этого полисахарида сохранять гидродинамический объем при уменьшении молекулярной массы за счет действия эндогенных ферментов (гидролизу подвергаются цепи, не участвующие в поддержании ассоциата); б) наличие заряженной поверхности (карбоксылные группы GalpA).

Показано, что при концентрациях выше 0,08% ассоциаты рамногалактуронана I волокон льна способны к агрегированию до более крупных частиц (142–192 нм) [13], а при концентрации ~4% этот полисахарид формирует гидрогель, обладающий гиперэластичными свойствами, классификационно относящийся к сильному физическим гелям [25, 43]. Способность формировать такой гель кардинально отличает рамногалактуронан I волокон от других рамногалактуронанов I, в т.ч. от сходного по составу, но функционально отличного полисахарида из первичной клеточной стенки, который играет роль компонента, «связывающего» соседние клетки друг с другом. В связи с этим гелеобразующая способность рамногалактуронана I может рассматриваться как один из факторов «функциональной пригодности» этого полисахарида в растительных волокнах.

Механизм формирования физических гидрогелей основан на образовании пространственной сетки вследствие переплетения полимерных цепей при участии молекул воды в качестве растворителя. *In vitro* гели из рамногалактуронанов I волокон льна были получены только при воздействии на полисахариды электромаг-

нитным излучением дециметрового диапазона (в микроволновой печи). Микроволновое излучение широко используется для ускорения химических реакций в органической химии. Полагают, что основным фактором воздействия микроволнового излучения в указанных случаях является тепловой эффект, обусловленный движением молекул воды и полярных групп органических веществ [44, 45]. Наличие в образцах рамногалактуронанов I волокон льна молекул воды, более прочно удерживаемых по сравнению с молекулами воды в образце рамногалактуронана I картофеля, может обеспечивать гелеобразующую способность этих полисахаридов. Более того, повышение силы связывания воды сопряжено с повышением модуля упругости и понижением коэффициента Пуассона, формируемого рамногалактуронаном I геля. Известно, что водоудерживающая способность рамногалактуронанов I с боковыми галактановыми цепями выше, чем с арабинановыми [46, 47]. Наличие прочно связанной воды в образце рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна может способствовать формированию локальных упорядоченных зон между галактановыми цепями этого полисахарида, участвующими в гелеобразовании. Это предположение подтверждается и результатами ИК-спектроскопии, демонстрирующими повышение степени структурированности образующего наиболее плотный гель рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна.

Упруго-пластические свойства геля из рамногалактуронана I волокон льна отличаются от свойств классического пектинового гелеобразователя — полигалактуроновой кислоты. Значения модуля Юнга сформированного из полигалактуронана геля варьируют в зависимости от температуры и степени метоксилирования полисахарида, но не превышают 10 кПа [2, 3, 48, 49]. При этом коэффициент Пуассона гелей из полигалактуронана близок к определенному для рамногалактуронана I волокон льна и составляет 0,4–0,5 [50]. Эти отличия демонстрируют большую пригодность геля из рамногалактуронана I (более упругого и несжимаемого по сравнению с полигалактуронаном) на роль ключевого полисахарида матрикса, функционирующего в условиях высокого давления.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проекты № 14-04-31462 и № 15-04-02560).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшкова Т.А., Козлова Л.В., Микшина П.В. (2013) Пространственная структура полисахаридов растительных клеточных стенок и ее функциональная значимость, *Биохимия*, **78**, 1069–1089.
2. Vithanage, C.R., Grimson, M.J., Wills, P.R., Harrison, P., and Smith, B.G. (2010) Rheological and structural properties of high-methoxyl esterified, low-methoxyl esterified and low-methoxylamidated pectin gels, *J. Texture Studies*, **41**, 899–927.
3. Ngouemazong, E.D., Jolie, R.P., Cardinaels, R., Van Loey, A., Moldenaers, P., and Hendrickx, M. (2012) Stiffness of Ca²⁺-pectin gels: combined effect of degree and pattern of methylesterification for various Ca²⁺ concentrations, *Carbohydr. Res.*, **348**, 69–76.
4. Mitsumata, T., Honda, A., Kanazawa, H., and Kawai, M. (2012) Magnetically tunable elasticity for magnetic hydrogels consisting of carrageenan and carbonyl Iron particles, *J. Phys. Chem.*, **116**, 12341–12348.
5. Brenner, T., Wang, Z., Achayuthakan, P., Nakajima, T., and Nishinari, K. (2013) Rheology and synergy of k-carrageenan/locust bean gum/konjacglucomannan gels, *Carbohydr. Polymers*, **98**, 754–760.
6. Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., and Thom, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model, *FEBS Lett.*, **32**, 195–198.
7. Fishman, M.L., and Cooke, P.H. (2009) The structure of high-methoxyl sugar acid gels of citrus pectin as determined by AFM, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1792–1797.
8. Yapo, B.M., and Gnakri, D. (2014) Pectic polysaccharides and their functional properties, *Polysaccharides*, pp. 1–18. DOI: 10.1007/978-3-319-03751-6_62-1.
9. Yapo, B.M. (2011) Rhamnogalacturonan-I: a structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages, *Polymer Rev.*, **51**, 391–413.
10. Oosterveld, A., Beldman, G., Schols, H.A., and Voragen, A.G. (2000) Characterization of arabinose and ferulic acid rich pectic polysaccharides and hemicelluloses from sugar beet pulp, *Carbohydr. Res.*, **328**, 185–197.
11. Sengkhamparn, N., Sagis, L.M.C., de Vries, R., Schols, H.A., Sajjaanantakul, T., and Voragen, A.G.J. (2010) Physicochemical properties of pectins from Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), *Food Hydrocolloids*, **24**, 35–41.
12. Morris, G.A., Ralet, M.-C., Bonnina, E., Thibault, J.-F., and Harding, S.E. (2010) Physical characterisation of the rhamnogalacturonan and homogalacturonan fractions of sugar beet (*Beta vulgaris*) pectin, *Carbohydr. Polymers*, **82**, 1161–1167.
13. Mikshina, P.V., Idiyattullin, B.Z., Petrova, A.A., Shashkov, A.S., Zuev, Y.F., and Gorshkova, T.A. (2015) Physicochemical properties of complex rhamnogalacturonan I from gelatinous cell walls of flax fibers, *Carbohydr. Polymers*, **117**, 853–861.
14. Mellerowicz, E.J., Immerzeel, P., and Hayashi, T. (2008) Xyloglucan: the molecular muscle of trees, *Ann. Botany*, **102**, 659–665.
15. Горшкова Т.А., Гурьянов О.П., Микшина П.В., Ибрагимова Н.Н., Мокшина Н.Е., Сальников В.В., Агеева М.В., Аменицкий С.И., Чернова Т.Е., Чемикосова С.Б. (2010) Особый тип вторичной клеточной стенки, формируемый растительными волокнами, *Физиология растений*, **57**, 328–341.
16. Gorshkova, T., Brutch, N., Chabbert, B., Deyholos, M., Hayashi, T., Lev-Yadun, S., Mellerowicz, E.J., Morvan, C., Neutelings, G., and Pilate, G. (2012) Plant fiber formation: state of the art, recent and expected progress, and open questions, *Crit. Rev. Plant Sci.*, **31**, 201–228.
17. Mellerowicz, E.J., and Gorshkova, T.A. (2012) Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell-wall structure and composition, *J. Exp. Bot.*, **63**, 551–565.
18. Mikshina, P.V., Chernova, T.E., Chemikosova, S.B., Ibragimova, N.N., Mokshina, N.Y., and Gorshkova, T.A. (2013) in *Cellulose* (van de Ven, T., and Godbout, L., eds), InTech, Rijeka, pp. 91–112.
19. Salnikov, V.V., Ageeva, M.V., and Gorshkova, T.A. (2008) Homofusion of Golgi secretory vesicles in flax phloem fibers during formation of the gelatinous secondary cell wall, *Protoplasma*, **233**, 269–273.
20. Gorshkova, T.A., Wyatt, S.E., Salnikov, V.V., Gibeaut, D.M., Ibragimov, M.R., Lozovaya, V.V., and Carpita, N.C. (1996) Cell-wall polysaccharides of developing flax plants, *Plant Physiol.*, **110**, 721–729.
21. Gorshkova, T.A., Salnikov, V.V., Chemikosova, S.B., Ageeva, M.V., Pavlencheva, N.V., and van Dam, J.E.G. (2003) Snap point: a transient point in *Linum usitatissimum* bast fiber development, *Ind. Crops and Products*, **18**, 213–221.
22. Gurjanov, O.P., Ibragimova, N.N., Gnezdilov, O.I., and Gorshkova, T.A. (2008) Polysaccharides, tightly bound to cellulose in the cell wall of flax bast fibre: isolation and identification, *Carbohydr. Polymers*, **72**, 719–729.
23. Dubois, M., Gilles, K.A., and Hamilton, J.K. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350–356.
24. Mikshina, P.V., Gurjanov, O.P., Mukhitova, F.K., Petrova, A.A., Shashkov, A.S., and Gorshkova, T.A. (2012) Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres, *Carbohydr. Polymers*, **87**, 853–861.
25. Gulrez, S.K.H., Al-Assaf, S., and Phillips, G.O. (2011) Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications progress, in *Molecular and environmental bioengineering – from analysis and modeling to technology applications* (Carpim, A., ed.), InTech, Rijeka, pp. 117–150.
26. Zimmermann, U., Husken, D., Schulze, E.-D. (1980) Direct turgor pressure measurements in individual leaf cells of *Tradescantia virginiana*, *Planta*, **149**, 445–453.
27. Perez, S., Mazeau, K. (2005) in *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2nd ed. (Dumitriu, S., ed.), Marcel Dekker, N.Y., pp. 41–68.
28. Ioelovich, M. (2008) Cellulose as a nanostructured polymer: a short review, *BioResources*, **3**, 1403–1418.
29. Sturcova, A., Davies, G.R., and Eichhorn, S.J. (2005) The elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers, *Biomacromolecules*, **6**, 1055–1061.
30. Bos, H.L. (2004) *The potential of flax fibres as reinforcement for composite materials*, Technische Universiteit Eindhoven, Proefschrift, Eindhoven.
31. Kastner, H., Einhorn-Stoll, U., and Senge, B. (2012) Structure formation in sugar containing pectin gels – influence of Ca²⁺ on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH, *Food Hydrocolloids*, **27**, 42–49.
32. Jha, A.K., Malik, M.S., Farach-Carson, M.C., Duncan, R.L., and Jia, X. (2010) Hierarchically structured, hyaluronic acid-based hydrogel matrices via the covalent integration of microgels into macroscopic networks, *RSC J.*, **6**, 5045–5055.
33. Robertson, C.G., Bogoslovov, R., and Roland, C.M. (2007) Effect of structural arrest on Poisson's ratio in nanoreinforced elastomers, *Phys. Rev.*, **75**, 051403.
34. Sekine, Y., Takagi, H., Sudo, S., Kajiwar, Y., Fukazawa, H., and Ikeda-Fukazawa, T. (2014) Dependence of struc-

- ture of polymer side chain on water structure in hydrogels, *Полимер*, **55**, 6320–6324.
35. Цундель Г. (1972) *Гидратация и межмолекулярное взаимодействие*, Мир, Москва.
 36. Hofstetter, K., Hinterstoisser, B., and Salmen, L. (2006) Moisture uptake in native cellulose – the roles of different hydrogen bonds: a dynamic FT-IR study using deuterium exchange, *Cellulose*, **13**, 131–145.
 37. Коробейников С.Н. (2000) *Нелинейное деформирование твердых тел*, Изд-во СО РАН, Новосибирск.
 38. McNeil, M., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (1980) Structure of plant cell walls: X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells, *Plant Physiol.*, **66**, 1128–1134.
 39. Goubet, F., Bourlard, T., Girault, R., Alexandre, C., Vandeveld, M.C., and Morvan, C. (1995) Structural features of galactans from flax fibres, *Carbohydr. Polymers*, **27**, 221–227.
 40. Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochem.*, **57**, 929–967.
 41. Western, T.L., Skinner, D.J., and Haughn, G.W. (2000) Differentiation of mucilage secretory cells of the *Arabidopsis* seed coat, *Plant Physiol.*, **122**, 345–355.
 42. Naran, R., Chen, G., and Carpita, N.C. (2008) Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage, *Plant Physiol.*, **148**, 132–141.
 43. Ahmed, E.M. (2015) Hydrogel: preparation, characterization, and applications, *J. Adv. Res.*, **6**, 105–121.
 44. Richel, A., and Paquot, M. (2012) in *Carbohydrates – comprehensive studies on glycobiology and glycotechnology* (Chang, Ch.-F., ed.), InTech, Rijeka, pp. 21–36.
 45. Bezakova, Z., Hermannova, M., Drimalova, E., Malovikova, A., Ebringerova, A., and Velebny, V. (2008) Effect of microwave irradiation on the molecular and structural properties of hyaluronan, *Carbohydr. Polymers*, **73**, 640–646.
 46. Ulvskov, P., Wium, H., Bruce, D., Jorgensen, B., Qvist, K.B., Skjot, M., Hepworth, D., Borkhardt, B., and Sorensen, S.O. (2005) Biophysical consequences of remodeling the neutral side chains of rhamnogalacturonan I in tubers of transgenic potatoes, *Planta*, **220**, 609–620.
 47. Larsen, F.H., Byg, I., Damager, I., Diaz, J., Engelsen, S.B., and Ulvskov, P. (2011) Residue specific hydration of primary cell wall potato pectin identified by solid-state ¹³C single-pulse MAS and CP/MAS NMR spectroscopy, *Biomacromolecules*, **12**, 1844–1850.
 48. Cardenas, A., Goycoolea, F.M., and Rinaudo, M. (2008) On the gelling behaviour of “nopai” (*Opuntia ficusindica*) low methoxyl pectin, *Carbohydr. Polymers*, **73**, 212–222.
 49. Ngouemazong, E.D., Nkemamin, N.F., Cardinaels, R., Jolie, R.P., Fraeye, I., Van Loey, A.M., Moldenaers, P., and Hendrickx, M.E. (2012) Rheological properties of Ca²⁺-gels of partially methylesterified polygalacturonic acid: effect of “mixed” patterns of methylesterification, *Carbohydr. Polymers*, **88**, 37–45.
 50. Park, H., Park, K., and Shalaby, W.S.W. (1993) *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, USA.

RHAMNOGALACTURONAN I FORMS THE GEL WITH HYPERELASTIC PROPERTIES

**P. V. Mikshina, A. A. Petrova, D. A. Faizullin,
Yu. F. Zuev, T. A. Gorshkova**

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Lobachevskogo 2/31, Kazan 420111, Russia;
fax: +7(843)292-7347, E-mail: p.mikshina@gmail.com*

Received February 8, 2015

Revision received February 27, 2015

Rhamnogalacturonans I are complex pectin polysaccharides that are extremely variable in structure and properties and widely represented in various sources. The complexity and diversity of structure of rhamnogalacturonans I limit information about the properties and supramolecular organization of these polysaccharides, including the relationship between these parameters and the functions of rhamnogalacturonans I in plant cells. This report on the example of rhamnogalacturonan I from flax gelatinous fibers describes for the first time the capacity of this type of pectic polysaccharides to form hydrogels with hyperelastic properties at physiological concentrations. According to IR-spectroscopy, the water molecules are more tightly retained in the gelling rhamnogalacturonan I from flax fiber cell wall in comparison with the non-gel-forming rhamnogalacturonan I from primary cell wall of potato. With increasing strength of water binding by rhamnogalacturonan I, there is an increase of elastic modulus and decrease of Poisson's ratio of gel formed by this polysaccharide. A model of hyperelastic rhamnogalacturonan I capture by interacting cellulose microfibrils, constructed using the finite element method, confirmed the suitability of the rhamnogalacturonan I gel with established properties for the function in the gelatinous cell wall. This allows us to consider this tissue- and stage-specific pectic polysaccharide as an important factor in the creation of gelatinous fiber contractility.

Key words: gelatinous fibers, polysaccharides, rhamnogalacturonan I, water sorption, gel, elastoplastic properties