

УДК 581.143:577.114

ПЕКТИНОВЫЕ ВЕЩЕСТВА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *Silene vulgaris* (M.) G.

© 2011 г. Е. А. Гюнтер, Ю. С. Оводов

Институт физиологии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, 167982

e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

Поступила в редакцию 06.09.2009 г.

Из каллусной культуры смолевки обыкновенной *Silene vulgaris*, (M.) G. выделена пектин-белковая фракция SVC, в составе которой в качестве основных компонентов содержались остатки D-галактуроновой кислоты, галактозы, арабинозы, рамнозы и белка. С помощью методов ионообменной хроматографии, ультрафильтрации, кислотного и ферментативного гидролиза показано, что SVC содержит смесь молекул линейного пектина, разветвленного пектинового полисахарида и пектин-белкового полимера. Фрагмент линейной цепи галактуронана составлял более половины всей углеводной цепи силенана. Разветвленная область макромолекулы представлена рамногалактуронаном I. Пектин-белковый полимер состоял в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с молекулярной массой более 300 кДа и белка.

Пектины являются основным компонентом первичных клеточных стенок высших растений и играют важную роль в регуляции пористости структуры и механических свойств клеточной стенки, а также участвуют в регуляции процессов роста и развития растений [1]. Пектины представляют собой галактуронаны и рассматриваются, как полимеры D-галактуроновой кислоты, которые имеют линейные области галактуронана и рамногалактуронана (smooth regions) и разветвленные области (hairy regions), представленные рамногалактуронаном I и рамногалактуронаном II (RGI и RGII), с боковыми цепями из галактана, арабинана, арабиногалактанов и других более сложных фрагментов [1–3].

Кроме того, различают смешанные углеводсодержащие биополимеры (гликоконъюгаты), которые, наряду с полисахаридными цепями, содержат полипептидные, белковые или липидные фрагменты. Достаточно хорошо изученными гликоконъюгатами являются арабиногалактановые белки (АГБ), которые обнаружены практически во всех растениях [4]. Они вовлечены в ряд фундаментальных процессов, связанных с развитием растительных клеток (пролиферация и растяжение клеток, соматический эмбриогенез). АГБ являются макромолекулами со сложной структурой, которые содержат более 90% углеводов (арабиногалактан II) и 2–10% белков. Арабиногалактановые цепи присоединены ковалентными связями к остаткам гидроксипролина, серина или треонина полипептидного ко́ра. В настоящее время нет прямых доказательств существования пектин-белковых комплексов. Однако с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) было впервые показано, что экстракт пектина, полученного из сахарной свеклы, содержит смесь линейных молекул пектина, разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком, присоединенным к од-

ному концу пектиновой цепи [5]. Ранее высказывалось предположение о наличии ковалентной связи между пектином и белком [6]. Полученные с помощью АСМ данные подтверждают это предположение, однако не являются прямым доказательством наличия этой связи: не исключается возможность физической ассоциации пектина и белка. Необходимо дополнительное исследование, чтобы идентифицировать тип пектин-белковой связи в комплексах, определить роль пектина и белка в комплексе и в растительной клеточной стенке [5].

Предварительные исследования, проведенные нами, показали, что силенан, пектин каллуса смолевки обыкновенной [*Silene vulgaris* (M.) G., *Oberna behen* (L.) I.], экстрагируется совместно с белками. Однако изучение строения пектин-белковых полимеров до настоящего времени не проводилось.

Установлено, что макромолекула силенана состоит из линейных и разветвленных областей [7]. Линейная область представлена α -1,4-D-галактуронаном и α -1,2-рамно- α -1,4-D-галактуронаном, который одновременно является главной углеводной цепью разветвленной области силенана – рамногалактуронана I. Боковые цепи разветвленной области построены из остатков α -1,5-связанной арабинофуранозы и β -1,3-, β -1,4-, β -1,6-связанной галактопиранозы [8]. Изучены качественные и количественные изменения полисахаридов в течение ростового цикла культуры смолевки [9], а также показано влияние гормональных факторов [10], углеводов [11, 12], кальция, фосфата, азота [13] и ультрафиолетового облучения [14] на рост клеток и продуцирование полисахаридов. Показана иммуномодулирующая активность силенана каллусной культуры смолевки, в частности, усиление поглотительной способности и миелопероксидазной активности фагоцитов пери-

ферической крови человека и макрофагов брюшной полости крыс [15].

Ранее было показано, что каллусные и суспензионные культуры смолевки обыкновенной продуцируют близкие по строению пектины [16]. Сходство в строении пектинов позволяет применять каллусные культуры как исходный материал при масштабировании процесса получения биологически активных пектиновых веществ. В связи с этим каллусные культуры с высоким содержанием полисахаридов являются перспективным источником для получения суспензионных культур и создания на их основе линий—продуцентов ценных соединений для медицины, косметики, пищевой промышленности и для сельского хозяйства.

Применение культур клеток растений позволит получать пектин-белковые комплексы, характеризующиеся заданным строением и свойствами и стандартизованные по химическому составу и биологической активности. Клеточные культуры, продуцирующие в большом количестве физиологически активные пектин-белковые полимеры, могут служить альтернативным сырьевым источником для получения новых ценных гликоконъюгатов без ущерба природным популяциям.

Цель работы — получение и общая химическая характеристика пектиновых веществ, продуцируемых каллусной культурой смолевки обыкновенной.

МЕТОДИКА

Условия культивирования каллусной культуры. Каллусную культуру смолевки обыкновенной [*Silene vulgaris* (M.) G. = *Oberna behen* (L.) I.] выращивали на агаризованной модифицированной среде Мурасиге и Скуга [17] с добавлением ауксина — 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (1.0 мг/л) и цитокинина — 6-бензиламинопурина (0.5 мг/л). Каллус субкультивировали с интервалом в 21 сут при $26 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте.

Общие аналитические методы. В полисахаридных фракциях определяли содержание гликуроновых кислот (**ГУК**) по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [18], содержание белка — методом Лоури. Спектрофотометрические измерения проводили на приборе Ultrospec 3000 (“Pharmacia Biotech”, Великобритания). Газожидкостную хроматографию (**ГЖХ**) выполняли на приборе Hewlett-Packard 4890A (“Hewlett-Packard”, США) с пламенно-ионизационным детектором и интегратором HP 3395A на капиллярной колонке RTX-1 (0.25 мм × 30 м) (“Restek”, США), газ-носитель — аргон. Все растворы концентрировали в вакууме на роторном испарителе при 40–50°C. Центрифугирование растворов проводили при 6000 g в течение 15 мин. Полисахаридные фракции лиофилизовали на лиофильной сушке (“VirTis”, США).

Выделение полисахаридов. Выделение полисахаридных фракций из каллуса проводили по методике, описанной в работе [16]. В результате получили пектин-белковую фракцию из каллусной культуры смолевки обыкновенной (**SVC**).

Полный кислотный гидролиз. Полисахаридные фракции (по 2.0–2.5 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (0.5 мл) при 100°C в течение 3–4 ч. Гидролизаты упаривали в вакууме с метиловым спиртом до полного удаления трифторуксусной кислоты. В качестве внутреннего стандарта использовали мио-инозит (0.5 мг/мл). Моносахариды идентифицировали с помощью ГЖХ в виде соответствующих ацетатов полиолов [19].

Ионообменная хроматография на ДЭАЭЦ. Полисахаридные фракции растворяли в небольшом количестве воды и наносили на колонку (1.5 × 43 см) с ДЭАЭЦ (ОН⁻-форма, скорость элюции 54 мл/ч). Элюцию осуществляли последовательно водными растворами 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 и 1.0 М хлорида натрия. Фракции отбирали по 10 мл. Выход полисахарида контролировали по реакции на углеводы с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [20]. Объединенные фракции, соответствующие отдельным пикам, диализовали, концентрировали и лиофилизовали.

Молекулярно-массовое распределение полисахаридов. Полисахариды (30–60 мг) растворяли в дистиллированной воде (100–150 мл) и последовательно разделяли по молекулярной массе в ультрафильтрационной ячейке (“Millipore”, США) с помощью ультрафильтрационных мембран (полисульфон, “Владисарт”, Россия) с различными размерами пор (300, 100, 50 и 10 кДа). Фракции концентрировали и лиофилизовали. В результате получали фракции с молекулярными массами более 300 кДа (**SVC-I**); с молекулярными массами 100–300 кДа (**SVC-II**) и с молекулярными массами 50–100 кДа (**SVC-III**).

Жесткий кислотный гидролиз. Фракцию SVC (100 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (20 мл) при 100°C в течение 5 ч. Полученный осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом трижды, затем растворяли в воде с добавлением 1 М аммиака до pH 5.0 и лиофилизовали. В результате жесткого кислотного гидролиза получили полисахаридный фрагмент (**SVC-G**) (выход 54%).

Ферментативный гидролиз. Ферментативный гидролиз пектина SVC из каллуса смолевки проводили с помощью пектиназы (α -1,4-D-галактопиранозилураназа, КФ 3.2.1.15, Sigma, 753 ед./г, оптимум pH 4.0 при 25°C) с преобладающей эндо-активностью. Фракцию SVC (150 мг) растворяли в 15 мл дистиллированной воды и добавляли водный раствор пектиназы (3 мг). Смесь инкубировали в течение 6 ч при 25°C, pH 4.0. Действие фермента останавливали путем кипячения инкубационной смеси, полученный осадок удаляли центрифугированием.

Таблица 1. Характеристика полисахаридных фракций SVC, полученных в результате фракционирования на ДЭАЭЦ и ультрафильтрации

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							ГУК, %	Белок, %
		Гал	Ара	Рам	Глю	Кси	Ман	сумма		
SVC	10.6*	1.7	1.4	0.9	0.7	0.5	0.7	5.9	63.5	11.6
SVC-1	21.5**	3.4	3.2	2.0	2.0	0.3	0.5	11.4	65.0	7.7
SVC-2	14.7**	2.6	1.7	1.6	1.4	0.2	0.3	7.8	76.2	3.5
SVC-I	77.1***	1.6	1.7	1.2	0.4	0.3	0.5	5.7	81.9	14.1
SVC-II	0.8***	10.8	5.1	2.7	2.3	1.1	1.1	23.1	55.9	1.7
SVC-III	0.4***	19.7	11.7	5.5	3.0	5.0	1.9	46.8	29.6	0

* Выход от сухой биомассы каллуса.

** Выход от количества полисахарида, нанесенного на колонку с ДЭАЭЦ.

*** Выход от фракции SVC.

Супернатант концентрировали и осаждали 4-кратным объемом 96%-ного этанола. Осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом до отсутствия свободной галактуроновой кислоты, растворяли в дистиллированной воде и лиофилизовали. В результате ферментативного гидролиза получили фракцию SVC-P (выход 51.7%), представляющую собой смесь фрагментов. Фракцию SVC-P разделяли на ультрафильтрационных мембранах, в результате чего получили фрагменты с молекулярными массами более 300 кДа (SVC-PI), 100–300 кДа (SVC-PII), 50–100 кДа (SVC-PIII) и 10–50 кДа (SVC-PIV). Для фрагментов с молекулярными массами (MM) более 10 кДа дана общая химическая характеристика.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из каллусной культуры смолевки обыкновенной выделена пектин-белковая фракция SVC. Выход SVC от сухой массы составил 10.6%, содержание полисахарида на 1 л питательной среды – 0.83 г/л.

В составе SVC в качестве основных компонентов углеводной цепи содержались остатки D-галактуроновой кислоты (64%), галактозы (1.7%), арабинозы (1.4%) и рамнозы (0.9%) (табл. 1). Соотношение арабиноза-галактоза равнялось 1 : 1.2. Присутствовавшие в образце остатки глюкозы, ксилозы и маннозы, скорее всего, являлись компонентами сопутствующих пектинам резервных полисахаридов и гемицеллюлоз. Содержание белка в SVC составляло 12%.

При анализе SVC методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭЦ получены следующие фракции: SVC-1 (элюция 0.2 M NaCl) и SVC-2 (элюция 0.4 M NaCl) (табл. 1). Фракции имели близкий качественный моносахаридный состав и различались содержанием галактуроновой кислоты и белка. Для фракции SVC-1 отмечено пониженное содержание галактуроновой кислоты и более высокое содержание белка по сравнению с фракцией SVC-2. Основ-

ными нейтральными компонентами углеводной цепи полученных фракций являлись остатки галактозы, арабинозы и рамнозы.

Присутствие белка во фракциях, разделенных на ДЭАЭЦ, свидетельствует о том, что белок, вероятно, связан с пектином ковалентными связями. Ранее на примере пектина сахарной свеклы было показано, что белок не может быть отделен от пектина с помощью хроматографии в присутствии 4 M NaCl [21], что также подтверждает предположение о ковалентной связи пектина и белка. Таким образом, фракция SVC состояла из кислых пектин-белковых полимеров, отличающихся незначительной гетерогенностью.

С помощью ультрафильтрации через мембраны с разным диаметром пор определено молекулярно-массовое распределение SVC. Установлено, что основной по выходу (77%) являлась фракция SVC-I с молекулярной массой более 300 кДа, в которой доминирующими моносахаридами являлись галактуронозная кислота, галактоза и арабиноза (табл. 1). Фракции SVC-II и SVC-III с молекулярными массами 100–300 и 50–100 кДа были минорными, их выход составлял 0.8% и 0.4% соответственно. В моносахаридном составе этих фракций увеличивалось относительное содержание остатков галактозы, арабинозы и рамнозы и снижалось количество остатков галактуроновой кислоты. Содержание белка было максимальным во фракции SVC-I и составило 14%, тогда как во фракциях SVC-II и SVC-III обнаружены следовые количества белка.

Полученные данные указывают на то, что SVC представляет собой смесь пектин-белкового полимера, состоящего в основном из слабо разветвленных пектиновых фрагментов с молекулярной массой более 300 кДа и белка, и сильно разветвленного пектинового полисахарида с молекулярными массами 50–300 кДа. Для пектина сахарной свеклы также было показано, что он содержит смесь линейных молекул пектина, разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком [5].

Таблица 2. Характеристика фрагментов SVC, полученных в результате ферментативного гидролиза

Фракция	Выход, %	Нейтральные моносахариды, %							ГУК, %	Белок, %
		Гал	Ара	Рам	Глю	Кси	Ман	сумма		
SVC-P	51.7*	3.0	1.8	0.5	0.8	0.4	0.7	7.2	55.3	9.2
SVC-PI	71.4**	2.2	1.6	0.5	0.5	0.2	0.6	5.6	54.0	12.8
SVC-PII	24.3**	2.3	2.0	0.9	0.5	0.2	0.2	6.1	78.1	0
SVC-PIII	1.1**	9.6	3.0	1.6	5.0	4.1	2.8	26.1	50.3	0
SVC-PIV	1.3**	8.4	2.6	2.8	5.9	3.0	3.7	26.4	11.6	0

* Выход от фракции SVC.

** Выход от фракции SVC-P.

В результате ферментативного гидролиза SVC с помощью пектиназы (α -1,4-D-галактопиранозилураназа, КФ 3.2.1.15) с преобладающей эндо-активностью получена смесь фрагментов SVC-P, при разделении которой на ультрафильтрационных мембранах выявлены фракции, отличающиеся по молекулярной массе (табл. 2). Основным по выходу (71%) являлся фрагмент SVC-PI с молекулярной массой более 300 кДа, в составе которого преобладали остатки галактуронової кислоты, галактозы и арабинозы. Фрагмент SVC-PII с молекулярной массой 100–300 кДа отличался от SVC-PI более высоким содержанием галактуронової кислоты. Минорные фрагменты SVC-PIII (ММ 50–100 кДа) и SVC-PIV (ММ 10–50 кДа) имели более низкое содержание галактуронової кислоты и повышенное содержание нейтральных моносахаридных остатков. Белок (13%) обнаружен только в составе фракции SVC-PI.

Присутствие в большом количестве галактуронової кислоты, а также расщепление полисахарида с помощью пектиназы свидетельствует о том, что α -1,4-D-галактуронан является главной углеводной цепью SVC, что подтверждает принадлежность этого полисахарида к классу пектинов. Содержание во фракциях SVC-PI–SVC-PIV остатков арабинозы и галактозы, обычно входящих в состав боковых цепей пектинов, а также присутствие остатков рамнозы свидетельствует о том, что образовавшиеся под действием пектиназы фрагменты углеводной цепи SVC содержат разветвленные участки, представленные рамногалактуронаном I. Боковые цепи силенана, скорее всего, представляют собой арабинаны, галактаны и (или) арабиногалактаны.

Присутствие в составе доминирующей фракции SVC-PI белка, который не отщеплялся от полисахарида после проведения ферментативного гидролиза, свидетельствует о том, что фракция SVC содержала пектин-белковые полимеры.

В результате жесткого кислотного гидролиза SVC получен фрагмент галактуронана SVC-G, в ко-

тором содержание остатков галактуронової кислоты равнялось 98%. Выход фрагмента составлял 54%.

Таким образом, макромолекула силенана состоит из линейных и разветвленных областей. Фрагмент линейной цепи галактуронана составляет более половины всей углеводной цепи силенана. Разветвленная область макромолекулы представлена рамногалактуронаном I. Присутствие в составе силенана белка, подтвержденное методами ионообменной хроматографии, ультрафильтрации и ферментативного гидролиза, указывает на то, что SVC представляет собой пектин-белковый полимер. SVC содержит смесь линейного и разветвленного пектинового полисахарида и комплекса пектина с белком.

Полученные сведения о составе, содержании и закономерностях биосинтеза силенана в каллусной культуре смолески обыкновенной необходимы для практического использования культуры клеток, в частности для получения суспензионных культур – продуцентов биологически активных веществ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума РАН (грант “Молекулярная и клеточная биология”), совместным грантом УрО РАН и ДВО РАН, программы “Ведущие научные школы”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Albersheim P., An J., Fleshour G., Fuller M.S., Guillen R., Ham K.-S., Hahn M.G., Huang J., O'Neil M., Whitcombe A., Williams M.V., York W.S., Darvill A.G.* // Biochem. Soc. Trans. 1994. V. 22. P. 374–378.
2. *Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 1998. Т. 24. № 7. С. 483–501.
3. *Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 2009. Т. 35. № 3. С. 293–310.
4. *Nothnagel E.A.* // Int. Rev. Cytol. 1997. V. 174. P. 195–291.
5. *Kirby A.R., MacDougal A.J., Morris V.J.* // Food Biophys. 2006. V. 1. P. 51–56.
6. *Keegstra K., Talmadge K., Bauer W.D., Albersheim P.H.* // Plant Physiol. 1973. V. 51. P. 188–199.
7. *Оводова П.Г., Бушинева О.А., Шапков А.С., Оводов Ю.С.* // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. № 9. С. 686–692.

8. Бушнева О.А., Оводова Р.Г., Шашков А.С., Чижов А.О., Оводов Ю.С. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 12. С. 1687–1696.
9. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Phytochemistry. 2002. V. 59. № 7. P. 703–708.
10. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Biotech. News Int. 2001. V. 6. № 1. P. 14–15.
11. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 1641–1645.
12. Гюнтер Е.А., Оводов Ю.С. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 8. С. 1079–1087.
13. Günter E.A., Ovodov Yu.S. // J. Biotechnol. 2005. V. 117. P. 385–393.
14. Günter E.A., Kapustina O.M., Popeyko O.V., Ovodov Yu.S. // Carbohydr. Res. 2007. V. 342. P. 182–189.
15. Popov S.V., Popova G.Y., Ovodova R.G., Bushneva O.A., Ovodov Y.S. // Int. J. Immunopharmacol. 1999. V. 21. P. 614–622.
16. Гюнтер Е.А., Оводов Ю.С. // Прикл. биохимия микробиология. 2007. Т. 43. № 1. С. 94–101.
17. Murashige T., Skoog S. // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 3. P. 473–479.
18. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. // Bot. Marina. 1995. V. 38. № 1. P. 43–51.
19. York W.S., Darvill A.G., McNeil M., Stevenson T.T., Albersheim P. // Meth. Enzymol. 1985. V. 118. P. 3–40.
20. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 2. P. 350–356.
21. Williams P.A., Sayers C., Viebke C., Senan C., Mazoyer J., Boulenger P.J. // J. Agric Food Chem. 2005. V. 53. P. 3592.

Pectin Substances of the Callus Culture of *Silene vulgaris* (M.) G.

Ye. A. Gyunter and Yu. S. Ovodov

Institute of Physiology, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, 167982 Russia
e-mail: gunter@physiol.komisc.ru

Received September 6, 2009

Abstract—Pectin–protein fraction SVC was isolated from the callus culture of the bladder campion (*Silene vulgaris*). The main components in it were residues of D-galacturonic acid, galactose, arabinose, rhamnose, and protein. Using ion-exchange chromatography, ultrafiltration, and acid and enzymatic hydrolysis, it was shown that SVC contained a mixture of molecules of linear pectin, branched pectin polysaccharide, and pectin–protein polymer. A fragment of the linear chain of galacturonan amounted to more than half of the entire carbohydrate silenan chain. The branched area of the macromolecule is represented by rhamnogalacturonan I. The pectin–protein polymer consisted mainly of protein and weakly branched pectin fragments with molecular mass of more than 300 kDa.