

УДК 577.34

## ИОНООБМЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *Phyllophora crispa*

© 2011 г. Н. Р. Мейчик, Н. И. Попова, Ю. И. Николаева, И. П. Ермаков, А. Н. Камнев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

e-mail: meychik@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2010 г.

Исследованы ионообменные свойства клеточных стенок, выделенных из таллома красной водоросли *Phyllophora crispa*. Определены ионообменная способность и коэффициент набухания клеточной стенки при различных рН (2–12) и постоянной ионной силе раствора (10 мМ). Установлено, что поведение клеточных стенок *P. crispa* как ионообменников обусловлено присутствием в их матриксе двух типов катионообменных групп и аминокрупп. Определено количество групп каждого типа и константы их ионизации, а также интервалы рН, в которых катионообменные группы становятся ионизированными и могут принимать участие в обменных реакциях с катионами внешней среды. Высказано предположение, что ионогенные группы с  $pK_a \sim 5$  являются карбоксильными группами уроновых кислот, а с  $pK_a \sim 7.5$  – карбоксильными группами аминокислотных фрагментов. Определено, что белок является основным компонентом полимерного матрикса клеточных стенок, так как его доля составляла 36%.

Макрофиты являются важнейшими доминантами биоценоза Черного моря. Они выполняют функцию одного из основных продуцентов прибрежной зоны, укрепляют прибрежные грунты, препятствуют проникновению антропогенных веществ и одновременно являются кормовой базой, а также местом нереста и укрытия рыб и беспозвоночных. С практической точки зрения, важными представителями морских макрофитов являются красные водоросли. Из них выделяют компоненты клеточной стенки агары и каррагинаны, которые находят широкое применение в качестве гелеобразователей и загустителей в атомной энергетике, в пищевой, текстильной, лакокрасочной, кожевенной промышленности, а также в микробиологических и фармацевтических процессах [1, 2]. Эти морские организмы являются надежными индикаторами состояния окружающей среды. Кроме того, они могут быть использованы в качестве природных биосорбентов, свойства которых, в первую очередь, определяются их экстраклеточным матриксом [3–9]. Так, например, показано, что до 80% от общего количества ионов кадмия накапливается в клеточных стенках *Gracilaria cornea* и только 20% локализовано в клетке [8].

По современным представлениям клеточная стенка – сложноорганизованная, многофункциональная система. Она представляет собой внешний компартмент растительной клетки, который первым контактирует с наружным раствором и модифицирует его состав за счет реакций обмена между ионообменными группами полимерного матрикса стенок и ионами среды, а эффективность модификации внешнего раствора клеточными стенками определяется их ионообменными свойствами, которые играют важную роль в поглощении веществ рас-

тительными организмами как в нормальных, так и экстремальных условиях ионного окружения (в частности, в присутствии повышенных концентраций тяжелых металлов).

Исследованию особенностей функционирования клеточных стенок красных водорослей как природных ионообменников посвящены немногочисленные публикации [8, 9]. Более того, до настоящего времени отсутствовали подходы к оценке состава ионообменных групп клеточных стенок водорослей, которые могут вступать в реакции обмена с ионами внешней среды. Методология исследования клеточной стенки корней наземных высших растений без использования методов физической и химической деструкции была разработана для количественного описания поведения этого природного ионообменника и выявления особенностей участия ее матрикса в таком сложном физиологическом процессе, как является поглощение минеральных элементов из внешней среды [10, 11].

Цель работы – исследование состава ионогенных групп, которые определяют ионообменные свойства клеточных стенок у красной водоросли *Phyllophora crispa*, являющейся одним из субдоминантов в верхних отделах фитали в прибрежных биоценозах Черного моря [12].

### МЕТОДИКА

**Объекты исследования.** Использовали черноморскую красную водоросль *Phyllophora crispa* (Hudson) P.S. Dixon. (= *P. nervosa* (DC.) Grev). Сбор талломов осуществляли водолазным способом на глубине 8 м в районе мыса Малый Утриш. Собранный материал был высушен при комнатной температуре и макси-

мально возможно очищен от обрастателей разного происхождения.

**Выделение клеточной стенки.** В описанную ранее для корней высших растений методику [10, 11] внесли некоторые изменения. Высушенный материал помещали в стеклянную ионообменную колонку ( $V = 200$  мл), промывали в динамических условиях последовательно 1%-ным NaOH (~0.5 л), дистиллированной  $H_2O$  (~2 л), 1%-ной HCl (~0.5 л), далее дистиллированной водой до отсутствия  $Cl^-$  в промывных водах. Определение хлорид-иона проводили титрометрическим методом с азотнокислой ртутью. На конечной стадии препараты обрабатывали спиртом и ацетоном, а затем высушивали при комнатной температуре. Полученные таким образом препараты в тексте обозначаются как “стандартизированные” клеточные стенки. Оценка качества изолированных клеточных стенок контролировали описанным ранее способом [10], используя флуоресцентную микроскопию (микроскоп AxioPlan 2 imaging MOT, “Carl Zeiss”, Германия). В выделенных клеточных стенках отсутствовали внутриклеточные структуры, а в препаратах полностью сохранялась архитектура тканей.

**Определение ионообменных групп.** Использовали метод потенциометрического титрования. Навески сухих препаратов клеточной стенки по  $40 \pm 0.1$  мг помещали в шлифованные бюксы с притертой пробкой (объем ~50 мл) и заливали растворами NaOH или HCl (12.5 мл) различной концентрации, но с постоянной ионной силой, которую создавали соответствующими растворами 10 mM NaCl. По истечении 48 ч образцы отделяли от раствора, обсушивали фильтровальной бумагой, определяли массу сырого материала ( $G_F^{CW}$ ), высушивали при  $50^\circ C$  до постоянного веса, определяли сухую массу ( $G_D^{CW}$ ) и рассчитывали весовой коэффициент набухания клеточной стенки. В растворах до и после контакта с образцами определяли pH и концентрацию кислоты или щелочи титрованием с индикатором метиловым красным. По изменению концентрации  $H^+$  или  $OH^-$  в растворе рассчитывали сорбционную способность клеточной стенки при  $pH_i$  по формуле:

$$S_i^{кат(ан)} = \frac{(C^{исх} - C^{равн})V}{g}, \quad (1)$$

где  $S_i$  – сорбционная емкость образцов по катионам ( $S_i^{кат}$ ) или анионам ( $S_i^{ан}$ ), мкмоль/г сухой массы клеточной стенки;  $C^{исх}$  и  $C^{равн}$  – исходная и соответствующая равновесная концентрации NaOH или HCl в растворе, mM;  $V$  – объем раствора, мл;  $g$  – навеска образца, г.

Расчет кривых титрования  $S_i = f(pH_i)$  проводили по разработанной ранее методике согласно дифференциальным кривым ( $dS_i/dpH_i = f(pH_i)$ ), как описано в работах [10, 11]. По дифференциальным кри-

вым определяли число типов групп в клеточной стенке *P. crista*, а также их количество ( $\Delta S^j$ ). В этом случае степень ионизации ( $\alpha_j$ ) групп может быть рассчитана по формуле:

$$\alpha_j = \frac{S_i^j}{\Delta S^j}, \quad (2)$$

где  $S_i^j$  – количество диссоциированных групп  $j$ -типа при  $pH_i$ .

Чтобы рассчитать константу ионизации для каждой ионогенной группы, использовали модифицированное Грегором уравнение Хендерсона–Хасельбаха [10]:

$$pH = pK_a + n \log_{10} \left( \frac{\alpha}{1 - \alpha} \right), \quad (3)$$

где  $pK_a$  – кажущаяся константа ионизации ионогенной группы полимера,  $\alpha$  – степень ионизации,  $n$  – константа, зависящая от строения полимерной матрицы и природы противоиона [13]. Если зависимость  $pH = f \left( \log_{10} \left( \frac{\alpha}{1 - \alpha} \right) \right)$  является прямолинейной, то в соответствии с уравнением (3) значение  $pH$ , при котором прямая пересекает ось  $y$ , будет равно величине  $pK_a$ , а тангенс угла ее наклона будет соответствовать значению константы  $n$  (уравнение (3)).

С установленными значениями параметров ( $\Delta S^j$ ,  $pK_a^j$ ,  $n^j$ ) рассчитывали  $S_i^{pac}$  по суммарному уравнению [14]:

$$S_i^{pac} = S_o^{кат} - \sum_{j, i=1}^{k, m} \frac{\Delta S^j}{1 + 10^{\left( \frac{pK_a^j - pH_i}{n^j} \right)}}, \quad (4)$$

где  $S_i^{pac}$  – расчетное значение ионообменной способности клеточной стенки при соответствующем значении  $pH_i$ ;  $S_o^{кат}$  – максимальная катионообменная способность клеточных стенок;  $\Delta S^j$  – количество ионогенных групп  $j$ -го типа;  $S_o^{кат}$ ,  $\Delta S^j$  и  $S_i^{pac}$  выражены в мкмоль на 1 г сухой массы клеточных стенок;  $pK_a^j$  – кажущаяся константа ионизации ионогенных групп  $j$ -типа;  $n^j$  – константа уравнения (3) для ионогенных групп  $j$ -типа;  $k$  – число точек на потенциометрической кривой,  $m$  – число типов ионогенных групп.

Адекватность примененного подхода к описанию кислотно-основного равновесия оценивали методом регрессионного анализа, определяя параметры уравнения:

$$S_i^{pac} = B \cdot S_i^{эксп} + A, \quad (5)$$

где  $S_i^{эксп}$  и  $S_i^{pac}$ , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – экспериментальная и рассчитанная по уравнению (4) ионообменная способность при соот-

ветствующем значении  $pH_i$ ;  $A$  и  $B$  – параметры регрессии.

**Содержание аминокрупп.** Для определения количества аминокрупп в полимерном матриксе клеточных стенок методом неводного титрования в уксусной кислоте [15] навеску растертого и сухого препарата клеточных стенок (20 мг) заливали 7 мл 10 мМ раствора хлорной кислоты в ледяной уксусной кислоте. По истечении 2 сут образцы отделяли от раствора. До и после контакта с клеточными стенками раствор титровали 10 мМ раствором бифталата калия в ледяной уксусной кислоте в присутствии индикатора кристаллического фиолетового. Содержание свободных аминокрупп ( $N_{NH_2}$ ) определяли по формуле [15]:

$$N_{NH_2} = \frac{(V_{исх} - V_{кон}) \times N_{бфк} \times V_{общ}}{V_a \times g}, \quad (6)$$

где  $V_{исх}$  и  $V_{кон}$  – количество бифталата калия, пошедшее на титрование исходного и конечного (после контакта с препаратами) раствора, мл;  $N_{бфк}$  – нормальность бифталата калия, мМ;  $V_a$  – количество раствора, взятого для титрования, мл;  $V_{общ}$  – общий объем раствора, которым заливали навеску образца, мл;  $g$  – навеска образца, г.

**Весовой коэффициент набухания матрикса.** Для определения в талломе водоросли весового коэффициента набухания полимерного матрикса клеточных стенок в воде и растворах набухшие в воде или растворах стандартизованные клеточные стенки обсушивали фильтровальной бумагой и определяли их сырую массу ( $G_F^{cw}$ ). Затем образцы клеточных стенок высушивали при комнатной температуре и определяли их сухую массу ( $G_D^{cw}$ ). Весовой коэффициент набухания стандартизованных клеточных стенок ( $K^{cw}$ ) определяли по формулам [16]:

$$K^{cw} = \frac{G_F^{cw} - G_D^{cw}}{G_D^{cw}}, \quad (7)$$

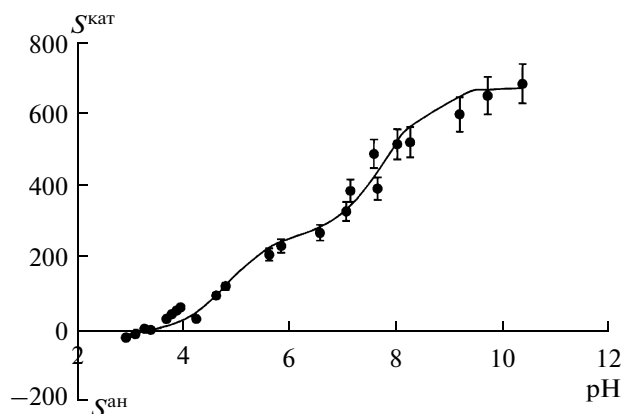
где  $G_F$  и  $G_D$  – сырая и сухая масса образцов, г; индекс  $cw$  обозначает клеточную стенку.

**Определение элементов.** Элементный анализ таллома водоросли и выделенных из него клеточных стенок определяли на полуавтоматическом CHNS-анализаторе Perkin-Elmer 2400 (Швейцария).

**Статистическая обработка.** Использовали редактор Excel 7.0. Числа – средние значения из 3–8 повторностей и их стандартные отклонения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные (рис. 1) показывают, что у *P. crisper* клеточные стенки характеризовались как анионо- ( $S^{ан}$ ), так и катионообменной способностью ( $S^{кат}$ ). В водных растворах  $S^{ан}$  составляла 80, а



**Рис. 1.** Кривая потенциометрического титрования клеточных стенок, изолированных из таллома *P. crisper*.  $S$ , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – ионообменная способность клеточных стенок по катионам ( $S^{кат}$ , положительные значения) и анионам ( $S^{ан}$ , отрицательные значения). Сплошная линия – расчетная кривая (уравнение (6)), точки – экспериментальные данные. Бары – стандартные отклонения.

$S^{кат}$  достигала 700 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок. Эти данные позволяют заключить, что так же, как у высших растений, клеточные стенки красной водоросли являются природным катионообменником, так как обладают, в основном, катионообменными свойствами. Но сравнительный анализ значений  $S^{кат}$  и  $S^{ан}$  показывает, что клеточные стенки таллома характеризуются в 1.5–2 раза меньшей сорбционной способностью и по анионам, и по катионам по сравнению с оболочками, изолированными из корней высших растений [10].

Экспериментальная кривая потенциометрического титрования для клеточных стенок *P. crisper*, так же, как и для полифункциональных ионитов, имела сложный полисигмоидный характер, что свидетельствует о наличии в полимерном матриксе нескольких типов функциональных групп. Анализ указанных зависимостей показал, что кривые имели три точки перегиба, что свидетельствует о наличии в структуре клеточных стенок красной водоросли трех типов функциональных групп. Таким образом, по дифференциальным кривым определяли число типов групп в клеточной стенке *P. crisper*, а также их количество ( $\Delta S^j$ ). Используя значения  $\alpha_i$  (уравнение (2)), соответствующие им величины  $pH_i$  и уравнение (3), для каждой ионогенной группы были рассчитаны  $pK_a^j$  и  $n^j$  (табл. 1). Следует отметить, что уравнение (3) успешно используется для описания процессов кислотно-основного равновесия как в структуре полифункциональных синтетических ионообменников [14, 17], так и природных ионитов, к которым принадлежит клеточная стенка растений [10, 11, 18]. Расчеты показали, что выбранная модель полностью соответствует полученным в настоящей работе экспериментальным данным, о чем свиде-

тельствовали величины коэффициентов корреляции ( $r_{corr}$ ) зависимостей  $S_i^{расч} = f(S_i^{эксп})$  (рис. 2).

Таким образом, в структуре полимерного матрикса клеточных стенок *P. crispata* выявлено 3 типа ионогенных групп, которые способны принимать участие в ионообменных реакциях при соответствующих условиях.

Известно, что в клеточных стенках красных водорослей в составе кислых полисахаридов присутствуют сульфатные и карбоксильные группы. Данные элементного анализа свидетельствуют, что клеточные стенки *P. crispata* содержали 1.9% серы (табл. 2). Эти результаты соответствуют существующим представлениям о том, что сульфатированные галактаны являются важной составляющей полисахаридов красных водорослей [19, 20]. Однако предположение о том, что выявленные нами кислотные группы с  $pK_a \sim 4.95$  являются сульфогруппами, не соответствует полученным экспериментальным данным (табл. 1), так как эти группы в составе полимеров характеризуются значением  $pK_a \sim 1$  [16]. На основании изложенного можно заключить, что в составе сульфатированных галактанов *P. crispata* присутствуют алкилированные сульфатные группы, содержание которых достигает 600 мкмоль/г сухой массы клеточной стенки (табл. 2). Можно предположить, что у *P. crispata* эти группы участвуют в образовании сульфоновых поперечных связей между линейными полисахаридными цепями, подобно тем, которые присутствуют в синтетических сульфосодержащих ионитах [21].

Сопоставление полученных в настоящей работе значений  $pK_a$  с известными данными по химическому составу клеточных стенок красных водорослей [21] и анализ значений  $pK_a$  для различных типов групп в низкомолекулярных соединениях [22] привели нас к заключению, что группы с  $pK_a \sim 4.95$  являются карбоксильными группами уроновых кислот.

Данные элементного анализа клеточной стенки и таллома *P. crispata* свидетельствуют, что важным компонентом ее полимерного матрикса является не только серу-, но и азотсодержащие полимеры, так как доля азота в стенках составляла 5.8% (табл. 2). В работе Тэлмеджа с соавт. [23] оценивали содержание белка в полимерном матриксе клеточных стенок ( $G_{бел}$ ) по данным анализа общего азота ( $N_{кк}$ ), проводя расчет по формуле:  $G_{бел} = N_{кк} \times 6.25$ . Аналогичные расчеты, проведенные для *P. crispata*, показывают, что у исследуемой красной водоросли белок является мажорным компонентом полимерного матрикса, так как его доля составляет 36% в расчете на единицу сухой массы клеточной стенки.

Известно, что белки в клеточных стенках водорослей, так же, как и в стенках высших растений, являются гликопротеинами, которые могут содержать до 10% свободных аминогрупп [24]. В соответствии с нашими данными, при титровании полимерного

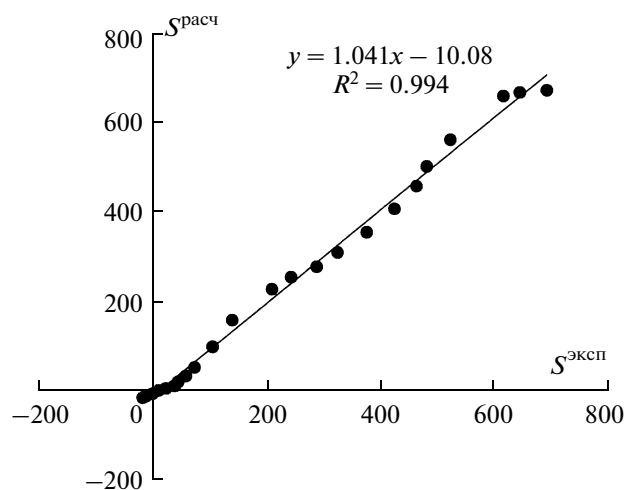
**Таблица 1.** Параметры уравнения  $pH = pK_a + \log_{10} \left( \frac{\alpha}{1 - \alpha} \right)$

для клеточных стенок *Phyllophora crispata* при ионной силе раствора 10 мМ NaCl

$j$	$pK_a^j$	$n^j$	$R_j^2$	$k$	$\Delta S^j$
1	$2.88 \pm 0.05$	0.22	0.931	5	$80 \pm 10$
2	$4.60 \pm 0.03$	0.939	0.961	10	$260 \pm 15$
3	$7.67 \pm 0.08$	1.098	0.964	10	$400 \pm 20$

Примечание.  $j$ -тип группы;  $pK_a^j$  – константа ионизации группы  $j$ -типа;  $n^j$  – константа уравнения для группы  $j$ -типа;  $R_j^2$  – коэффициент корреляции;  $\Delta S^j$  (мкмоль/г сухой массы клеточных стенок) – количество групп  $j$ -того типа;  $k$  – количество точек на прямой; 1 – аминогруппы, 2 – карбоксильные группы уроновых кислот, 3 – катионообменные группы второго типа. Приведены средние значения и их стандартные отклонения.

матрикса клеточных стенок в водной среде в области  $pH < 3.5$  происходит не выделение протона, а наоборот, его поглощение (рис. 1), т.е. в этой области  $pH$  происходит титрование основных групп в соответствии с реакцией:  $\sim RNH_2 + HCl \rightarrow [RNH_3]^+Cl^-$ , причем их количество составило 80 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок (табл. 1). Можно полагать, что группы, выявляемые в указанной области  $pH$ ,



**Рис. 2.** Соответствие между экспериментальными и расчетными данными потенциметрического титрования клеточной стенки таллома *P. crispata*.

$S_i^{эксп}$  и  $S_i^{расч}$ , мкмоль/г сухой массы клеточных стенок – экспериментальная и рассчитанная по уравнению (5) ионообменная способность клеточных стенок таллома *P. crispata* при соответствующем значении  $pH_i$ . На диаграмме представлено уравнение линии тренда.

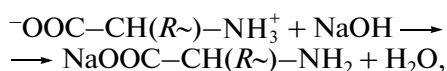
**Таблица 2.** Элементный анализ таллома *Phyllophora crispa* и изолированной из него клеточной стенки

Растительный материал	N(I)	C(I)	H(I)	S(I)	N(II)	S(II)
Таллом	2.98 ± 0.12	36.75 ± 0.59	6.12 ± 0.02	1.37 ± 0.19	2.13	0.43
Клеточная стенка	5.77 ± 1.00	41.37 ± 2.00	6.69 ± 0.21	1.92 ± 0.31	4.12	0.60

Примечание. Величины N(I), C(I), H(I), S(I) приведены в процентах, а N(II) и S(II) — в мМ азота и серы/г сухой массы таллома и клеточных стенок соответственно. Приведены средние значения из трех аналитических повторностей и их стандартные отклонения. I — данные элементного анализа, II — расчетные значения.

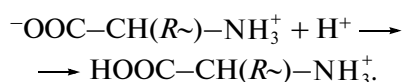
являются аминогруппами в полимерной структуре клеточной стенки, так как других основных групп в клеточной стенке не существует.

Для клеточных стенок высших растений было показано, что при титровании в водной среде происходит неполное определение аминогрупп в составе полимерного матрикса, вследствие образования внутрисолевой формы свободными аминокислотными фрагментами ( $-\text{COO}^-\text{NH}_3^+$ ) в составе полимерного матрикса, и для полной их идентификации необходимо использовать метод неводного титрования [15]. Применение последнего к стандартизованным препаратам клеточных стенок *P. crispa* показало, что они содержат  $436 \pm 24$  мкмоль аминокрупп/г сухой массы клеточных стенок, и это более чем в 5 раз превышает значение, полученное при титровании в водной среде. Эти данные позволяют предполагать, что, так же, как и у высших растений, в полимерном матриксе клеточных стенок красной водоросли присутствуют свободные аминокислотные фрагменты. Это предположение подкрепляется следующими данными. Число выявленных нами групп с  $pK_a \sim 7.7$  составляет 420 мкмоль/г сухой массы клеточных стенок, которое в пределах погрешности эксперимента совпадает с общим содержанием аминогрупп, установленных методом неводного титрования. Далее можно полагать, что при добавлении NaOH в интервале pH 6.0–9.0, в котором мы наблюдали выделение протона, происходит депротонирование аминогрупп и одновременно разрушение цвиттер-ионной формы по реакции:



где R~ — полимерная цепь матрикса клеточной стенки.

В соответствии со значениями  $pK_a$  карбоксильной группы аминокислот ( $pK_a \sim 2$ ; [22]) при титровании кислотой и pH ≤ 3.5 начинается протонирование карбоксильной группы аминокислотного остатка, цвиттер-ионная форма разрушается, и аминогруппы приобретают положительный заряд:

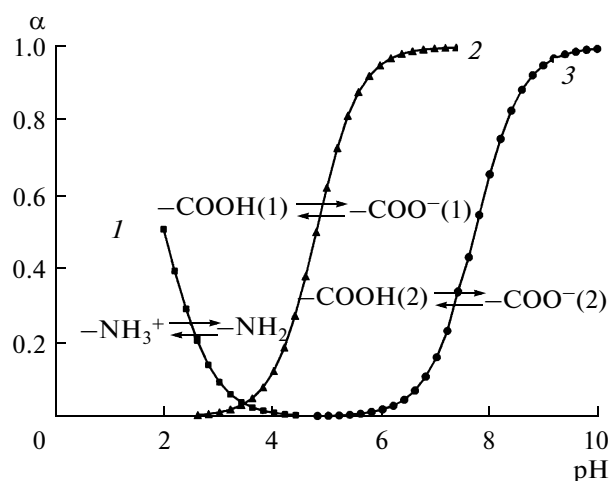


Именно поэтому, только при концентрации HCl в среде более 0.5 мМ проявляется анионообменная способность клеточной стенки.

Степень ионизации слабых кислот и оснований, к которым относятся и ионогенные группы в полимерном матриксе клеточных стенок *P. crispa*, зависит лишь от двух факторов: от значений pH и  $pK_a$ . Последнее, как известно, является постоянной для любой кислоты или основания. Следовательно, для фиксированного значения pH степень ионизации  $\alpha$  зависит только от природы кислоты (основания), независимо от того, была ли она предварительно нейтрализована [22]. Уравнение для расчета  $\alpha$  выглядит следующим образом:

$$\alpha = \left\{ 1 / \left[ 1 + 1/10^{[(pH-pK_a)/n]} \right] \right\}, \quad (8)$$

и может быть использовано для определения  $\alpha$  ионогенных групп клеточной стенки при соответствующих значениях pH внешней среды (рис. 3). Например, при pH 6.0 94% карбоксильных групп с  $pK_a \sim 5$  ионизировано, в то время как все карбоксильные группы с  $pK_a \sim 7.7$  не способны к реакциям



**Рис. 3.** Зависимость степени ионизации  $\alpha$  различных ионогенных групп в клеточных стенках таллома *P. crispa* от pH внешнего раствора. Линии соединяют расчетные значения, которые получены по уравнению (8) с параметрами табл. 1: 1 — аминогруппы, 2 — карбоксильные группы; 3 — карбоксильные группы второго типа.

обмена с катионами внешней среды; при рН 8.0 обе указанные группы ионизированы на 100 и 65% соответственно. Следует отметить, что аминокислоты всегда закрыты (т.е. не диссоциированы) при физиологических условиях (рН 4.0–9.0) и, следовательно, не принимают участие в обменных реакциях с катионами внешней среды при этих условиях (рис. 3).

Одним из важных физико-химических показателей, которые количественно характеризуют свойства полимеров клеточных стенок как ионообменника, является набухание. Количественной характеристикой этого процесса служит весовой коэффициент набухания, равный отношению количества воды в полимере к 1 г его сухой массы. Причиной набухания ионообменных материалов в водном растворе является наличие гидрофильных групп, причиной нерастворимости — существование поперечных связей. Степень набухания ионообменного материала зависит от свойств ионита и состава внешнего раствора. Известно, что способность к набуханию возрастает с уменьшением степени поперечной связанности, с увеличением общего количества ионогенных групп, с увеличением степени их диссоциации, с уменьшением концентрации раствора и зависит от радиуса гидратированного иона, которым заполняется сорбент [16].

Результаты настоящего исследования показали, что величина коэффициента набухания варьирует от 1.5 до 1.9 г H<sub>2</sub>O в расчете на единицу сухой массы клеточных стенок в интервале рН 4.0–10.0 (рис. 4). Основываясь на знаниях о физико-химических закономерностях набухания синтетических ионообменных материалов можно полагать, что главный фактор, который определяет способность к набуханию — это степень сшивки полимерных цепей в структуре клеточных стенок. Этот параметр невозможно определить экспериментальным путем, однако есть возможность оценить его величину непосредственным методом [14].

В соответствии с данными о набухании клеточных стенок высших растений [10] и результатами настоящей работы можно полагать, что у *P. crista* степень сшивки полимерных цепей в клеточных стенках выше по сравнению с корнями растений. Этот вывод следует из сравнительного анализа значений коэффициента набухания в растворах, который свидетельствует, что у красной водоросли этот параметр в 2–10 раз меньше, чем у высших растений. Полученные результаты показывают, что, в отличие от высших растений, у *P. crista* объем клеточных стенок варьирует в небольших пределах и мало зависит от ионных условий и рН в среде (рис. 4).

Таким образом, мы установили, что ионообменные свойства полимерного матрикса клеточной стенки *P. crista* обусловлены присутствием в ее составе двух типов катионообменных групп, которые способны принимать участие в обменных реакциях с ионами окружающей среды. Это карбоксильные

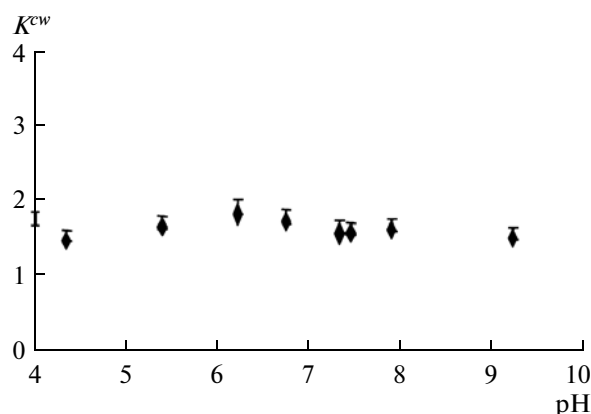


Рис. 4. Зависимость коэффициента набухания  $K^{cw}$  клеточных стенок, изолированных из таллома *P. crista*, от рН внешнего раствора. Значения  $K^{cw}$  выражены в г H<sub>2</sub>O в расчете на 1 г сухой массы клеточных стенок. Бары — стандартные отклонения.

группы урновых кислот и карбоксильные группы, принадлежащие, вероятно, аминокислотным фрагментам. По-видимому, отличие в физико-химических свойствах внеклеточного матрикса красных водорослей и наземных высших растений является отражением не столько их таксономического положения, сколько различных условий обитания и различий в способах переноса воды и ионов от мест поглощения к местам утилизации.

Разработанный подход к количественной оценке ионообменных свойств полимерного матрикса клеточных стенок *P. crista* может быть применен к определению аналогичных свойств у других видов водорослей. Учитывая, что именно внеклеточный матрикс за счет механизмов ионного обмена выступает как сорбент, количественные показатели, характеризующие сорбционные свойства клеточных стенок других видов водорослей, могут быть использованы при их отборе в качестве объектов экологического мониторинга и биосорбентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 04-04-49379-а и № 08-04-01398-а) и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” по направлению “Клеточные технологии” (Государственный контракт № П-403).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Максимова О.В. // Биология черноморских агарофитов. М.: ИОРАН, 1993. С. 7–24.
2. Возжинская В.Б., Камнев А.Н. Эколого-биологические основы культивирования и использования морских донных водорослей. М.: Наука, 1994. 202 с.
3. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга. М.: МГУ, 1985. 248 с.

4. Камнев А.Н., Воскобойников Г.М., Вершинин А.О., Жильцова Л.В., Возжинская В.Б. // Биология черноморских агарофитов. М.: ИОРАН, 1993. С. 141–162.
5. Torcuoglu S., Guven K.C., Balks N., Krbasoglu C. // Chemosphere. 2003. V. 52. № 10. P. 1683–1688.
6. Vilar V.J.P., Botelho C.M.S., Boaventura R.A.R. // Water Res. 2006. V. 40. № 2. P. 291–302.
7. Murphy V., Hughes H., McLoughlin P. // Water Res. 2007. V. 41. № 4. P. 731–740.
8. Garca-Ros V., Freile-Pelegri Y., Robledo D., Mendoza-Cozatl D., Moreno-Sanchez R., Gold-Bouchot G. // Aquatic Toxicol. 2007. V. 81. № 1. P. 65–72.
9. Herrero R., Lodeiro P., Rojo R., Ciorba A., Rodriguez P., Sastre de Vicente M.E. // Bioresource Technol. 2008. V. 99. № 10. P. 4138–4146.
10. Meychik N.R., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 2001. V. 234. № 2. P. 181–193.
11. Meychik N.R., Nikolaeva J.I., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 2005. V. 277. № 1–2. P. 163–174.
12. Калугина-Гутник А.А. Фитобентос Черного моря. Киев: Наукова Думка, 1975. 248 с.
13. Шатаева Л.А., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Е. Карбоксильные иониты в биологии. Л.: Наука, 1979. 286 с.
14. Лейкин Ю.А., Мейчик Н.Р., Соловьев В.К. // Журн. физич. химии. 1978. Т. 52. № 7. С. 1420–1424.
15. Мейчик Н.Р., Николаева Ю.И., Ермаков И.П. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 8. С. 1145–1151.
16. Гельферих Ф. Иониты. М.: Иностранная литература, 1962. 490 с.
17. Мейчик Н.Р., Лейкин Ю.А., Гейнрих И.А. // Журн. физич. химии. 1989. Т. 63. № 8. С. 2164–2168.
18. Meychik N.R., Yermakov I.P. // Plant and Soil. 1999. V. 217. № 1–2. P. 257–264.
19. Kloareg B., Quatrano R. // Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 1988. V. 26. P. 259–315.
20. Усов А.И. // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки. Матер. II междунаучно-практической конф. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. С. 38–52.
21. Тверской В.А., Федотов Ю.А., Вдовин П.А., Дубяга В.П. // Мембраны. Сер. Критические технологии. 2007. Т. 36. № 1. С. 17–40.
22. Альберт А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований. Л.: Химия, 1964. 140 с.
23. Talmadge K.W., Keegstra K., Bauer W.D., Albersheim P. // Plant Physiol. 1973. V. 51. № 1. P. 158–173.
24. Gassab G.I. // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. P. 281–309.

## Ion-Exchange Properties of Cell Walls of Red Seaweed *Phyllophora crispa*

N. R. Meichik, N. I. Popova, Yu. I. Nikolaeva, I. P. Yermakov, and A. N. Kamnev

*Department of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*  
*e-mail: meychik@mail.ru*

Received June 20, 2010

**Abstract**—Research into ion-exchange properties of cell walls isolated from thallus of red seaweed *Phyllophora crispa* was carried out. Ion-exchange capacity and the swelling coefficient of the red alga cell walls were estimated at various pH values (from 2 to 12) and at constant ionic strength of a solution (10 mM). It was established that behavior of cell walls as ion-exchangers is caused by the presence in their matrix of two types of cation-exchange groups and amino groups. The amount of the functional group of each type was estimated, and the corresponding values of  $pK_a$  were calculated. It can be assumed that ionogenic groups with  $pK_a \sim 5$  are carboxyl groups of uronic acids, and ionogenic groups with  $pK_a \sim 7.5$  are carboxyl groups of the proteins. Intervals of pH in which cation-exchange groups are ionized and can take part in exchange reactions with cations in the environment are defined. It was found that protein was a major component of cell wall polymeric matrix because its content was 36%.