

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И
БИОФИЗИКИ КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ПЕТРОВА АННА АНДРЕЕВНА

**СВОЙСТВА ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОГО РАМНОГАЛАКТУРОНАНА I,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
ЖЕЛАТИНОЗНЫХ ВОЛОКОН ЛЬНА**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, проф. Горшкова Т.А.

Казань 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Третичная клеточная стенка как определяющий фактор в функционировании желатинозных волокон	12
1.2. Основные полисахариды, принимающие участие в функциональной специализации желатинозной клеточной стенки	19
1.2.1. Целлюлоза	19
1.2.2. Рамногалактуронаны I	20
1.2.2.1. Модели построения остова рамногалактуронанов I	21
1.2.2.2. Боковые цепи рамногалактуронанов I	25
1.2.2.3. Характер и расположение модифицирующих групп	27
1.3. Характеристика механических свойств полимеров, входящих в состав растительных клеточных стенок	29
1.3.1. Характеристика механических свойств материалов	29
1.3.2. Гели на основе пектиновых полисахаридов и их механические свойства	32
1.4. Проблемы анализа физико-химических свойств полисахаридов и подходы к их решению	36
1.5. Компьютерное моделирование структуры и свойств физиологических систем	44
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	53
2.1. Растительный материал	53
2.2. Выделение рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку	53
2.3. Выделение рамногалактуронана I волокон льна после встраивания в клеточную стенку	54
2.4. Коммерческие препараты полисахаридов	56
2.5. Моносахаридный анализ	57

2.6. Получение гелей из рамногалактуронанов I	58
2.7. Одноосное сжатие гелей	58
2.8. Динамическое рассеяние света	59
2.9. ИК-спектроскопия	59
2.10. ЯМР спектроскопия	60
2.11. Ферментативный гидролиз рамногалактуронанов I	61
2.12. Химический гидролиз (β -элиминирование) рамногалактуронанов I	62
2.13. Компьютерное моделирование	63
2.14. Статистическая обработка данных	64
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ	65
3.1. Механические свойства рамногалактуронанов I	65
3.1.1. Установление гелеобразующей способности рамногалактуронанов I	66
3.1.2. Характеристика упруго-пластических свойств гелей из рамногалактуронанов I	69
3.2. Физико-химические параметры рамногалактуронанов I, сопряженные с формированием надмолекулярной структуры	73
3.2.1. Гидродинамические свойства и агрегирование рамногалактуронанов I	73
3.2.2. Сорбционные свойства рамногалактуронанов I по отношению к воде	83
3.2.3. Выявление характеристичных структурных параметров рамногалактуронанов I желатинозной клеточной стенки	88
3.2.3.1. Сопоставление состава и элементов структурной организации рамногалактуронанов I первичной и третичной клеточных стенок	88
3.2.3.2. Анализ продуктов ферментативного и химического гидролизом рамногалактуронанов I, выделенных из	100

первичной и третичной клеточных стенок	
3.3. Компьютерное моделирование участия гелей из рамногалактуронана I в создании натяжения в клеточной стенке желатинозного типа	110
3.3.1. Создание и характеристика конечно-элементной модели захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы	110
3.3.2. Характеристика деформаций рамногалактуронана I и микрофибрилл целлюлозы в желатинозной клеточной стенке	117
3.3.3. Соотнесение параметров, полученных для захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы <i>in silico</i> , с характеристиками клеточной стенки <i>in vivo</i>	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129

ВВЕДЕНИЕ

Постановка проблемы и ее актуальность.

Рамногалактуронаны – пектиновые компоненты клеточной стенки, которая во многом определяет особенности биологии растительного организма и выполняет многочисленные функции. Функциональная специализация клеточной стенки базируется на разнообразии строения ее полимеров, в первую очередь полисахаридов. Рамногалактуронаны I относят к наиболее сложноорганизованным и вариабельным по структуре полисахаридам растительных клеточных стенок. Эти полисахариды представляют обширную группу полимеров, объединяемых на основе наличия в их структуре остова из чередующихся димеров [$\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap(1 \rightarrow)]. Разнообразие многих деталей строения этих полимеров настолько велико, что рамногалактуронаны I можно считать предельным вариантом вариабельности структуры полисахаридов. Разновидности рамногалактуронанов I уникальны не только для каждого растения, но и в различных тканях одного растения, а иногда и на разных стадиях развития одной ткани. Осознание этого разнообразия, ставшее возможным благодаря развитию методов анализа строения сложных углеводов, остро поставило вопрос об изучении взаимосвязи структуры полисахарида с его свойствами и функцией в растительном организме.

Рамногалактуронаны I, традиционно считавшиеся компонентами первичных клеточных стенок и секретируемых слизей (Carpita and Gibeaut, 1993; Caffall and Mohnen, 2009; Naran et al., 2008), обнаружены как ключевой компонент матрикса в третичной клеточной стенке (часто называемой желатинозным слоем или G-слоем) (Gur'janov et al., 2007; Горшкова и др., 2010; Mellerowicz and Gorshkova, 2012). Третичная клеточная стенка формируется только в желатинозных растительных волокнах и резко отличается от других типов клеточной стенки исключительно высоким содержанием целлюлозы (85-90%) и аксиальным расположением её микрофибрилл (Muller et al., 2006; Горшкова, 2007).

Основная функция желатинозных волокон в растении заключается в поддержании и перемещении органов в пространстве, в частности, при механическом воздействии. В реализации этой функции ключевую роль играют особый состав и структура желатинозной клеточной стенки, обеспечивающие натяжение микрофибрилл целлюлозы (Clair et al., 2008). Существует гипотеза, согласно которой особые свойства желатинозных слоев формируются за счет латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы при захвате ими полисахаридов матрикса (Mellerowicz et al., 2008, Mellerowicz and Gorshkova, 2012). На примере флоэмных волокон льна продемонстрировано, что в качестве полисахарида, «запечатанного» между микрофибриллами, может выступать тканеспецифичный рамногалактуронан I с боковыми галактановыми цепями (Горшкова и др., 2010; Roach et al., 2011; Mellerowicz and Gorshkova, 2012). Благодаря наличию мощно развитой клеточной стенки желатинозные волокна льна можно очистить от клеток других типов, что позволяет обойти проблему гетерогенности растительных образцов и исследовать определенный тип клеток на определенной стадии развития. Ткане- и стадияспецифичность рамногалактуронана I волокон льна, а также необычная способность сохранять гидродинамический объем при значительном уменьшении молекулярной массы (Gurjanov et al., 2008; Горшкова и др., 2010; Mikshina et al., 2012) позволяют предполагать наличие у этого полисахарида особенностей физико-химических и механических свойств. Характеристика этих параметров позволит не только конкретизировать существующую гипотезу о реализации механизма создания натяжения в растительных волокнах, но и сформировать комплекс возможных подходов для характеристики свойств сложных полисахаридов растительного происхождения, что крайне актуально как с фундаментальной, так с прикладной точек зрения.

Цель и задачи исследований.

Целью работы была характеристика физико-химических и механических свойств тканеспецифичного рамногалактуронана I как ключевого компонента клеточной стенки, обеспечивающего функционирование желатинозных волокон.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать способность тканеспецифичного рамногалактуронана I флоэмных волокон льна к формированию гидрогелей; установить их упруго-пластические свойства.

2. Сопоставить поведение в концентрированных и разбавленных растворах рамногалактуронанов I с различной функциональной нагрузкой; определить гидродинамические параметры этих полимеров.

3. Выявить физико-химические характеристики рамногалактуронана I флоэмных волокон льна, сопряженные с формированием его надмолекулярной структуры.

4. Построить компьютерную модель захвата рамногалактуронана I с установленными свойствами и параметрами латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы с учетом физиологических условий в клеточной стенке.

Научная новизна работы.

Охарактеризованы свойства тканеспецифичного рамногалактуронана I, участвующего в формировании третичной клеточной стенки. Впервые установлены структурные особенности рамногалактуронана I волокон льна, позволяющие этому полисахариду участвовать в создании натяжения в желатинозной клеточной стенке.

Впервые для рамногалактуронанов I, на примере рамногалактуронана I желатинозных волокон, выявлена способность к образованию прочных физических гелей. Показано, что формирование геля происходит в результате действия на полисахарид эффекта, сопряженного с движением молекул воды, более прочно удерживаемых полисахаридом по сравнению

с не формирующим гель рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля. Установлено, что гель из рамногалактуронана I желатинозных волокон обладает гиперэластичными свойствами.

Впервые выявлена способность молекул рамногалактуронана I желатинозных волокон к самоассоциации. Продемонстрировано формирование из единичных молекул рамногалактуронана I надмолекулярных структур двух уровней: ассоциат молекул и агрегат ассоциатов молекул.

С помощью моделирования методом конечных элементов впервые рассчитано, что при захвате гиперэластичного рамногалактуронана I волокон льна латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы этот полисахарид сохраняет компактность, а не распределяется вдоль всей поверхности микрофибрилл. Показано, что такое поведение полисахарида при воздействии на систему давления, уровень которого соответствует тургорному давлению в растительной клетке, способствует повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

Научно-практическая значимость.

Полученные данные вносят существенный вклад в понимание механизма создания контрактильности растительных волокон хозяйственно ценных культур. На примере рамногалактуронана I сформирован комплекс подходов для характеристики свойств и структуры сложных полисахаридов, что открывает новые перспективы в исследовании этого класса молекул. Изучение особых свойств рамногалактуронана I и его взаимодействия с другими полисахаридами клеточной стенки вносит существенный вклад в понимание ее биомеханики и механизмов функционирования. Экспериментальные данные и методические приемы, изложенные в работе, могут быть использованы в сельскохозяйственных, биологических и биотехнологических учреждениях, занимающихся исследованием растительной биомассы и биологического сырья для создания

инновационных технологий, а также в учебном процессе при чтении курсов лекций по физиологии растений, гликобиологии и биофизике в ВУЗах.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора в исследования.

Работа проводилась с 2010 по 2015 гг. в соответствии с планом научных исследований КИББ КазНЦ РАН по темам «Механизмы формирования растительной клеточной стенки – основного компонента возобновляемого сырья» (гос. регистрационный номер 0123-2014-0005), «Формирование и модификация надмолекулярной структуры растительных клеточных стенок» (гос. регистрационный номер 0120.0 408625). Исследования автора, как исполнителя данной тематики, поддержаны грантами РФФИ № 11-04-01602 «Трехмерная организация полисахаридов матрикса клеточной стенки: роль в создании натяжения в желатинозной клеточной стенке растительных волокон», № 12-04-97077 «Супрамолекулярная структура сложных полисахаридов матрикса растительных клеточных стенок: анализ с использованием комплекса физических методов», № 12-04-31418 «Роль прочно связанных с целлюлозой полисахаридов в формировании и функционировании растительных клеточных стенок различного типа», № 14-04-31462 «Физико-механические свойства тканеспецифичных рамногалактуронанов I как основа формирования контрактильности растительных волокон». Научные положения диссертации и выводы базируются на результатах собственных исследований автора, либо полученных при его непосредственном участии совместно с сотрудниками КИББ КазНЦ РАН с.н.с., к.б.н. Микшиной П.В., с.н.с., к.б.н. Идиятуллиным Б.З. (ЯМР-спектроскопия), с.н.с., к.б.н. Файзуллиным Д.А. (ИК-спектроскопия), в.н.с. ИОХ РАН д.х.н., проф. Шашковым А.С. (ЯМР-спектроскопия).

Положения, выносимые на защиту.

1. Функционирование третичной клеточной стенки желатинозных волокон обусловлено взаиморасположением и свойствами входящих в ее состав полимеров.

2. Рамногалактуронаны I желатинозных волокон льна способны формировать прочные физические гели, обладающие гиперэластичными свойствами.

3. Молекулы рамногалактуронана I волокон льна обладают тремя уровнями организации, что может реализовываться за счет присутствующей в их структуре прочносвязанной воды, отсутствия фрагментов полигалактуронана в остове и особенности распределения боковых цепей на нем.

4. Попадание рамногалактуронана I с установленными свойствами между латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы приводит к созданию эффективного натяжения в клеточной стенке.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы доложены на VII съезде Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011), 21 Международном симпозиуме по гликоконъюгатам «Glyco21» (Вена, Австрия, 2011), IV Всероссийской школе-конференции «Химия и биохимия углеводов» (Саратов, 2011), Международном конгрессе по биоорганической химии «Бутлеровский конгресс» (Казань, Россия, 2011), I Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Казань, 2012), Международной школе-конференции по полисахаридам растений и водорослей «PSP 2012» (Нант, Франция, 2012), Кластере конференций по органической химии «ОргХим-2013 (Репино, 2013), XIII Международной конференции по клеточной стенке «Cell Wall Meeting» (Нант, Франция, 2013), II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014), VIII съезде Общества физиологов растений России (Петрозаводск, 2015), семинаре по моделированию клеточной стенки

«Multiscale Modeling of Cell Wall Mechanics, Growth in Walled Cells» (Банф, Канада, 2015).

Реализация результатов исследования.

По материалам диссертации опубликовано 18 работ, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 155 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 43 рисунка и 9 таблиц. Список литературы включает 231 источник; из них 211 иностранных.

Благодарности.

Выражаю благодарность моему научному руководителю Татьяне Анатольевне Горшковой за всестороннюю поддержку, огромное терпение и понимание. Выражаю искреннюю благодарность всем сотрудникам лаборатории механизмов роста растительных клеток за помощь, внимание и теплую атмосферу. Особо хочу поблагодарить к.б.н. Микшину Полину Владимировну за неоценимую помощь на протяжении всех этапов осуществления работы, вопросы и ответы, похвалы и журение, без которых данная работа была бы невозможна. Отдельная признательность д.х.н. Шашкову А.С. (ИОХ РАН, Москва) и к.б.н. Идиятуллину Б.З. (КИББ КазНЦ РАН, Казань) за помощь в проведении ЯМР-анализа, к.б.н. Файзуллину Д.А. (КИББ КазНЦ РАН, Казань) за помощь в проведении исследований с помощью ИК-спектроскопии. Выражаю глубокую признательность д.х.н. Зуеву Ю.Ф. за обсуждение результатов, ценные советы и указания. Благодарю коллег из лаборатории молекулярной биологии за помощь и весело проведенное время.

Благодарю моих родителей, друзей и коллег, особенно Мокшину Н.Е. и Козлову Л.В., за моральную поддержку, терпение и умные разговоры на балконе.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Третичная клеточная стенка как определяющий фактор в функционировании желатинозных волокон

Растительные волокна – клетки механической ткани, склеренхимы, обладающие исключительной длиной и мощно развитой третичной клеточной стенкой. Степень выраженности клеточной стенки логично делает волокна интересным объектом для изучения как общих принципов формирования и функционирования клеточной стенки, так и ее особенностей в специализированных клетках.

Спецификой волокон многих видов растений является наличие особого, отличного от классического (ксиланового), типа утолщенной клеточной стенки, который может достигать 15 мкм в толщину и составлять основную массу клеточной стенки (Биогенез растительных волокон,.. 2009). Клеточная стенка такого типа изначально получила название G-слой (от “gelatinous” – "желатинозный"). В ранних работах ее отличительными чертами считались гелеподобный внешний вид при исследовании набухших волокон, выделенных при обработке щелочью, а также способность отделяться от других слоев клеточной стенки. Позднее было выявлено исключительно высокое содержание целлюлозы в G-слое, которое может достигать 80-90% (Kaku et al., 2009; Gorshkova et al., 2012). Волокна, содержащие G-слой, называют желатинозными. В последнее время желатинозный слой считают третичной клеточной стенкой, поскольку он откладывается вслед за вторичной и имеет кардинально отличающиеся от нее характеристики (Mellerowicz, Gorshkova, 2012).

Желатинозный тип строения клеточной стенки был впервые описан в конце XIX в. как особый слой, формируемый в реактивной древесине

двудольных (цит. по Clair, 2005). Реактивная древесина формируется в ответ на изгиб побега и характеризуется анатомическими и биохимическими изменениями ксилемы, проявляясь в виде эксцентричного радиального роста побега (Fahn, 1990). У древесных пород двудольных реактивную древесину называют древесиной натяжения, которую в литературе также называют тяговой древесиной (Лотова, 2001); она расположена, как правило, на верхней стороне согнутого побега. Составной частью реактивной древесины и основной ее отличительной характеристикой, описанной для многих видов растений, служит образование в волокнах G-слоя. Желатинозные волокна могут быть сгруппированы в пучки или располагаться поодиночке среди других растительных клеток. Желатинозные волокна могут возникать в небольших количествах и в нормальной древесине; их образование связывают со слабыми механическими воздействиями (например, ветром) или с необходимостью коррекции расположения побега в вертикальной плоскости (Mellerowicz et al., 2001).

Желатинозные волокна широко представлены в растениях различных таксономических групп, причем не только в древесной части стебля. К ним относятся, например, флоэмные волокна льна (*Linum usitatissimum*), конопли (*Cannabis sativa*), рами (*Boehmeria nivea*), крапивы (*Urtica dioica*) (Gorshkova et al., 2009), волокна древесины натяжения эвкалипта (*Eucalyptus gigantea*) (Wardrop, Dadswell, 1948) и тополя (*Populus alba*) (Norberg, Meier 1966), волокна в воздушных корнях фикуса (*Ficus benjamina*) (Zimmermann et al., 1968), волокна, выявляемые у голосеменных и других таксономических групп, например волокна эфедры (*Ephedra campylopoda*) (Lev-Yadun, 1999), гнетума (*Gnetum gnemon*) (Tomlinson, 2003), хвоща (*Equisetum hyemale*) (Gierlinger et al., 2008).

Эффективность желатинозных волокон может быть весьма заметной. Так, воздушные корни фикуса Бенджамина (*Ficus benjamina*) при укоренении их в горшке с почвой, способны его приподнимать,

причем выраженность эффекта пропорциональна степени развития желатинозных волокон (Zimmermann et al., 1968) (рис. 1в). Желатинозные волокна могут также развиваться в цветоносах и, таким образом, помогать им поддерживать тяжелые плоды (Sivan et al., 2010); например, волокна в длинных цветоносах колбасного дерева, *Kigelia pinnata* (Jacq.) DC. позволяют им выдерживать механическую нагрузку от плодов весом до 10 кг (рис. 1з). Таким образом, желатинозные волокна выполняют важные функции: обуславливают передвижение зрелых органов и/или придают им специфические свойства, такие как гибкость и дополнительная прочность, что используется в различных физиологических ситуациях (Yoshida et al., 2002; Clair et al., 2003; Fang et al., 2008; Fisher, 2008; Abasolo et al., 2009).

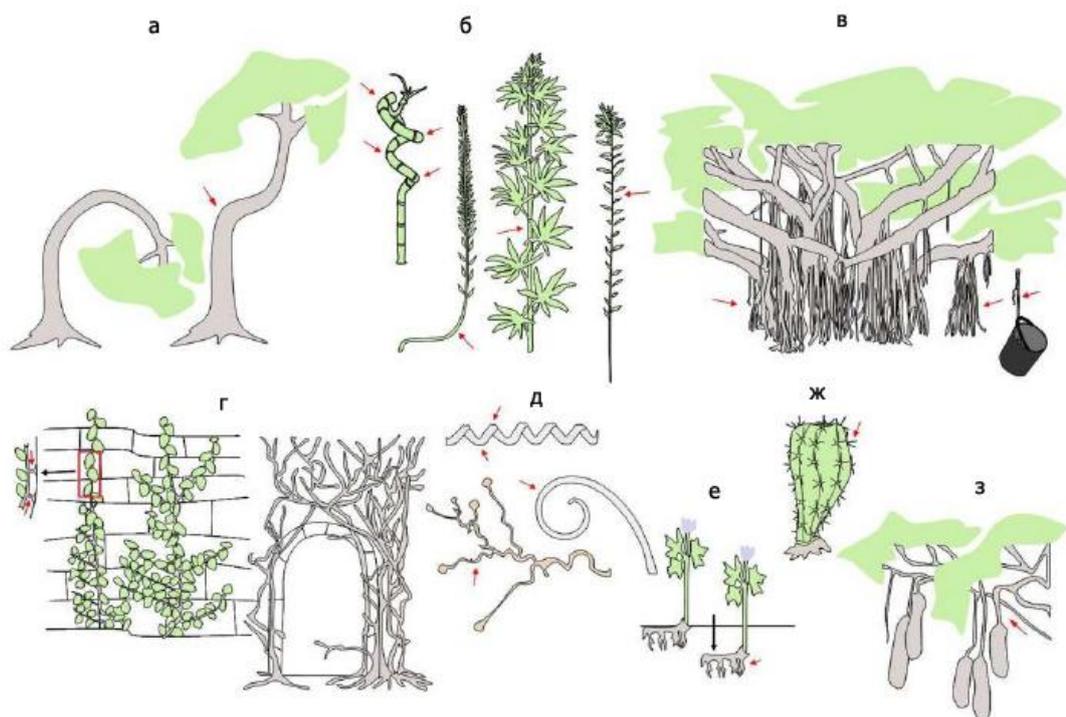


Рис. 1. Примеры развития желатинозных волокон в различных физиологических ситуациях: (а) – формирование древесины натяжения в молодых деревьях для их возвращения в вертикальное положение, если оно по каким-то причинам было нарушено, (б) – конститутивное развитие желатинозных волокон в травянистых растениях с высоким соотношением высоты и диаметра стебля, (в) – укорачивание воздушных корней после того как они достигают почвы для обеспечения эффективной поддержки тяжелых ветвей (если корни укоренить в горшке с почвой, они могут поднять его вверх), (г) – развитие целлюлозных волокон в «присосках»

лазающих растений для прикрепляется к подложке, (д) – вовлечение желатинозных волокон в скручивание лозы или усиков и удлинение у вьющихся растений, (е) – углубление побегов геофитов в почву посредством сокращения корней в ходе адаптивных реакций, (ж) – развитие желатинозных волокон в колючках кактусов для придания специфических механических свойств, (з) – формирование желатинозных волокон в цветоносах для поддержания тяжелых плодов (Mikshina et al., 2013).

При анализе желатинозных волокон с помощью микроскопии совместно со спектрометрией (Gierlinger, Schwanninger, 2006; Gierlinger et al., 2008; Gorzsas et al., 2011), выделения G-слоев с помощью ультразвука (Norberg, Meier 1966; Furaya et al., 1970; Nishikubo et al., 2007; Kaku et al., 2009) и многочисленных биохимических анализов полимеров изолированных волокон (Davis et al., 1990; van Hazendonk et al., 1996; Mooney et al. 2001; Cronier et al., 2005; Горшкова и др., 2010) были установлены существенные отличия G-слоев от вторичной клеточной стенки: а) толщина до 15 мкм (в то время как толщина клеточной стенки ксиланового типа 1-2 мкм); б) аксиальное расположение микрофибрилл целлюлозы; в) отсутствие лигнина; г) высокая доля галактозо содержащих полимеров среди нецеллюлозных полисахаридов; д) интенсивная постсинтетическая модификация слоев клеточной стенки; е) повышенная кристалличность целлюлозы и увеличенный размер кристаллитов; ж) отсутствие ксилана – ключевого полисахарида матрикса вторичной клеточной стенки.

Желатинозные слои клеточной стенки обладают существенно иными механическими свойствами, чем лигно-ксилано-целлюлозные. Одним из важных показателей в определении механических свойств является модуль Юнга (модуль продольной упругости) – физическая величина, характеризующая свойства материала сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации. С повышением модуля Юнга повышается прочность материала на разрыв. Значение модуля

продольной упругости более чем в два раза выше у желатинозных слоев по сравнению с ксилановыми (Abe, Yamamoto, 2005).

Значительные отличия механических свойств желатинозной клеточной стенки могут быть связаны с их мезопористостью, продемонстрированной группой ученых под руководством Бруно Клэра (Clair et al., 2008; Chang et al., 2009; 2015). Согласно их исследованиям, желатинозный слой древесины натяжения имеет мезопористую структуру со средним диаметром пор равным 7 нм (рис. 2а, Clair et al., 2008) и характерной формой в виде чернильницы (рис. 2б, Clair et al., 2008). По мере созревания желатинозного слоя поры увеличиваются в диаметре с 2 до 50 нм (рис. 2в, Chang et al., 2015).

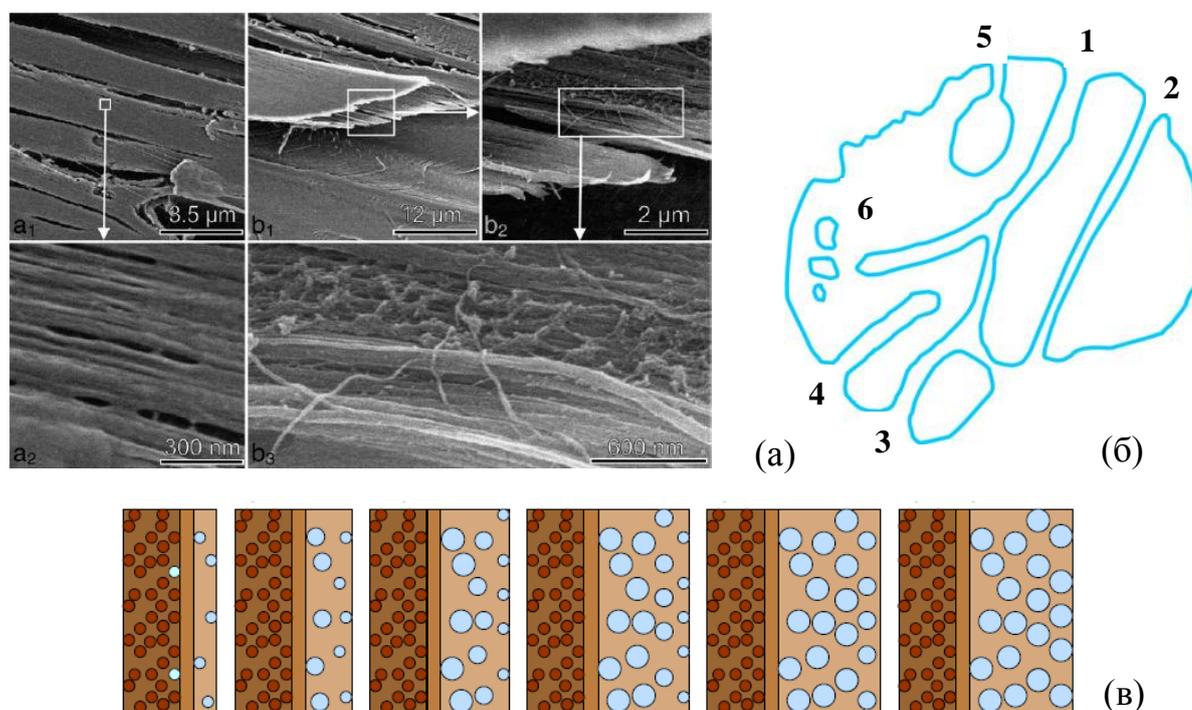


Рис. 2. Мезопористость желатинозного слоя. (а) Поры в желатинозном слое древесины натяжения (Clair et al., 2008), (б) форма пор: 1, 2, 3 – открытая пора; 1, 3 – связанная пора; 4 – цилиндрическая слепая пора; 5 – чернильница; 6 – закрытая пора (Rouquerol et al., 1999) (в) увеличение пор в процессе созревания желатинозного слоя (Chang et al., 2015).

Особенностью желатинозных слоев является наличие контрактивных свойств – способности к сокращению (Clair et al., 2006;

2011), с которой, собственно, и связывают функциональную роль желатинозных волокон как элементов реакционной древесины (Mellerowicz et al., 2008). Наличие механического напряжения в кристаллах целлюлозы в клеточных стенках волокон древесины натяжения было продемонстрировано с помощью рентгеноструктурного анализа. Увеличение шага кристаллической решетки служит показателем наличия напряжения микрофибрилл. Ключевым вопросом остается механизм создания напряженности.

Существует гипотеза возникновения контрактильных свойств желатинозных волокон, согласно которой микрофибриллы целлюлозы, взаимодействуя латерально, «захватывают» матричные полисахариды. Присутствие между микрофибриллами целлюлозы «запечатанного» полисахарида препятствует их взаимодействию и создает натяжение, которое и лежит в основе особых механических свойств желатинозных волокон (рис. 3).

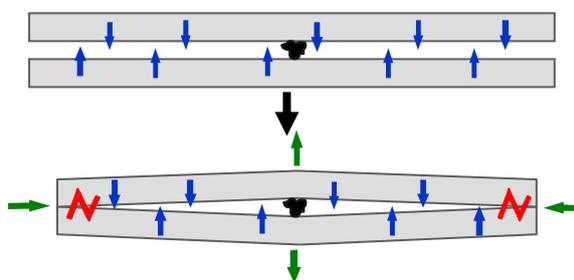


Рис. 3. Схема создания натяжения микрофибрилл целлюлозы в клеточной стенке желатинозного типа за счет натяжения латерально взаимодействующих микрофибрилл целлюлозы при захвате ими полисахаридов матрикса (Mikshina et al., 2013).

Первоначально в качестве «запечатанного» полисахарида в G-слоях волокон древесины натяжения у тополя был предложен ксилоглюкан (Mellerowicz et al., 2008; Nishikubo et al., 2007). Ксилоглюкан, действительно, важен для функционирования желатинозных волокон древесины: снижение его содержание в трансгенных растениях, в которые введен ген фермента, расщепляющего остов этого полисахарида, резко

снижало способность согнутых стволов возвращаться в вертикальное положение (Baba et al., 2009). Однако его функция заключается не в создании натяжения микрофибрилл целлюлозы в G-слое, а в связывании G-слоя с предшествующим ксилановым слоем, поскольку именно на границе вторичной и третичной клеточной стенки иммуноцитохимически локализуется и ксилоглюкан, и активность ксилоглюкан-эндотрансгликозилазы (Mellerowicz et al., 2008; Baba et al. 2009).

При изучении формирования третичной клеточной стенки желатинозных волокон льна было выявлено четыре ключевые особенности: 1) интенсивная перестройка уже отложенных слоев (Gorshkova et al., 2004; Gorshkova et al., 2005), 2) необычная динамика пузырьков аппарата Гольджи (Salnikov et al., 2008), 3) наличие ткане- и стадияспецифичного полисахарида – рамногалактуронана I с особой структурой и свойствами, который удерживается микрофибриллами целлюлозы исключительно прочно (Gorshkova et al., 2004; Gurjanov et al., 2007, 2008; Gorshkova et al., 2009), 4) высокая активность β -галактозидазы и присутствие значительных количеств свободной галактозы (Gorshkova et al., 2009; Микшина и др., 2009). Эти особенности позволили предложить в качестве «запечатанного» полисахарида ткане- и стадияспецифичный рамногалактуронан I (Горшкова и др., 2010; Mikshina et al., 2013). Аналогичный полисахарид, а также высокая активность β -галактозидазы были недавно обнаружены и в клеточных стенках волокон древесины натяжения тополя (Gorshkova et al., 2015).

Для конкретизации механизма возникновения контрактильных свойств необходима детальная характеристика двух главных участников этого процесса – микрофибрилл целлюлозы и рамногалактуронана I.

1.2. Основные полисахариды, принимающие участие в функциональной специализации желатинозной клеточной стенки

1.2.1. Целлюлоза

Высокое содержание целлюлозы (до 85% от сухой массы клеточной стенки) является характерной чертой клеточной стенки желатинозного типа. Долгое время клеточную стенку желатинозного типа считали полностью состоящей из целлюлозы (Norberg, Meier, 1966; Bowling, Vaughn, 2008). Для микрофибрилл целлюлозы желатинозных слоев характерно очень низкое значение угла наклона (Mellerowicz et al., 2001; Donaldsson, 2008). Иными словами они располагаются практически параллельно продольной оси клетки во всем слое. Было показано, что переход к формированию желатинозного слоя сопровождается переориентацией кортикальных микротрубочек, которые располагаются вдоль продольной оси клетки (Prodhan, 1995; Ageeva et al., 2005); отмечена повышенная плотность микротрубочек, число которых достигает 20 на 1 мкм длины клеточной стенки (Prodhan, 1995).

Известно, что микрофибрилла целлюлозы содержит несколько десятков молекул гомополимера, состоящего из β -(1 \rightarrow 4)-D-глюкозы. Степень полимеризации молекул целлюлозы составляет порядка 10000. Индивидуальные цепи в микрофибрилле связаны между собой водородными связями и силами Ван-дер-Ваальса; длина одной такой цепи достигает 2-3 мкм.

Наиболее распространенной формой целлюлозы является целлюлоза I, которая и присутствует в растениях. Внутри микрофибрилл этого типа целлюлозы отдельные молекулы располагаются параллельно друг другу, т.е. их восстанавливающие концы направлены в одну сторону (Gardner, Blackwell, 1974). При этом термодинамически более выгодной, поскольку появляется возможность для дополнительной водородной связи,

является целлюлоза II, которая образуется при самосборке молекул целлюлозы в антипараллельной ориентации *in vitro* (Алешина и др., 2001). Целлюлоза II, в отличие от целлюлозы I, подвергается гидролизу целлюлазой, на чем основаны многие методы деградации этого полисахарида (Wada et al., 2010).

Ключевой особенностью микрофибрилл целлюлозы в волокнах, формирующих клеточную стенку желатинозного типа, является наличие кристаллических участков (кристаллитов) с большими размерами по сравнению с большинством других растительных объектов (Viëtor et al., 2002; Sturcova et al., 2004). Рентгеноструктурный анализ позволил установить, что диаметр сечения кристаллитов целлюлозы в G-слое волокон древесины натяжения (6.5 нм) существенно больше, чем в соседнем S-слое (около 3 нм), соответственно, площадь их сечения больше примерно в четыре раза (Muller et al., 2006). Это дало основание предполагать наличие в желатинозных слоях латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы, чему способствует одинаковая (продольно оси клетки) ориентация микрофибрилл, а также отсутствие лигнина и значительных количеств полисахаридов матрикса, разделяющих микрофибриллы друг от друга.

1.2.2. Рамногалактуронаны I

В отличие от линейного гомополисахарида целлюлозы, рамногалактуронаны I представляют собой предельный вариант сложного гетерополисахарида, в отношении структуры которого до сих пор нет единого общепринятого мнения. Молекулы рамногалактуронана могут быть уникальны не только для каждого растения, но и в различных тканях одного растения, а иногда и на разных стадиях развития одной ткани (Gorshkova et al., 1996; Mikshina et al., 2012).

1.2.2.1. Модели построения остова рамногалактуронанов I

Рамногалактуронаны I представляют собой сложные пектиновые полисахариды, остов которых построен из чередующихся димеров [$\rightarrow 4$)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap(1 \rightarrow)] (Lau et al., 1985). Число димеров в остове рамногалактуронанов из различных источников может варьировать. Так, например, в клетках платана рамногалактуронан I может иметь более 300 таких димеров (McNeil et al., 1980; Albersheim et al., 1996). С другой стороны из сахарной свеклы были выделены рамногалактуронаны с максимальной длиной остова всего в 30 чередующихся остатков L-Rhap и D-GalpA (Renard et al., 1995). Остов рамногалактуронана, выделенного из коммерческих цитрусовых пектинов, содержал 15-40 повторов (Prade et al., 1999; Nakamura et al., 2001; Yapo et al., 2007). Вариабельность протяженности остова продемонстрирована и в пределах одного объекта. Свидетельством этого служит наличие двух различных популяций остовов рамногалактуронана (15 и 35 димеров), выделенных после обработки полигалактуроназой, у цитрусовых и трех популяций (15, 28 и 100 димеров) у соевых пектинов (Nakamura et al., 2001; Yapo et al., 2007).

Четкое чередование остатков L-Rhap и D-GalpA в остове рамногалактуронанов I соблюдается не всегда. Например, в пектинах сои после частичного гидролиза кислотой и частичного ацетилирования показано наличие фрагментов GalpA-GalpA-Rhap и GalpA-Rhap-Rhap (Aspinall et al., 1967). А во фракциях нейтральных углеводов, полученных после β -элиминирования и обработки полигалактуроназой пектинов из листьев женьшеня, с помощью ГЖХ-МС было продемонстрировано наличие димеров L-Rhap (Gao et al., 1990).

Широко распространено мнение, что рамногалактуронан I ковалентно соединен с гомогалактуронаном, связанным в свою очередь с рамногалактуронаном II и ксилогалактуронаном, тем самым формируя сложные соединения пектиновых веществ *in muro* (Voragen et al., 1995;

Schols, Voragen, 1996; O'Neill, York, 2003). Эта точка зрения базируется на том факте, что из «смеси» пектинов, в состав которых входят остатки L-Rhap, D-GalpA, L-Araf, D-Galp и D-Xylp, получить индивидуальный полисахарид возможно только после химического или ферментативного гидролиза. Остается спорным вопрос, каким образом различные структурные блоки расположены в пектиновой макромолекуле. На сегодняшний момент существует несколько гипотетических моделей.

Первая модель («rhamnogalacturonan») – модель, предложенная для полимера из первичной клеточной стенки, который был получен из клеток суспензионной культуры платана с помощью частичного кислотного гидролиза и ферментативного гидролиза полигалактуроназой. В этой модели макромолекулярный комплекс состоит из трисахаридов [L-Rhap-(1→4)- D-GalpA-(1→2)- L-Rhap], чередующихся с гомогалактуронановой последовательностью, содержащей примерно 8 остатков (1→4)- D-GalpA (такие основные продукты были получены после гидролиза полисахарида полигалактуроназой). Макромолекула будет иметь зигзагообразную форму, вследствие наличия (1→2)-связи остатков рамнозы. В случае наличия (1→4)-связи молекула имеет линейную форму (Talmadge et al., 1973) (рис. 4).

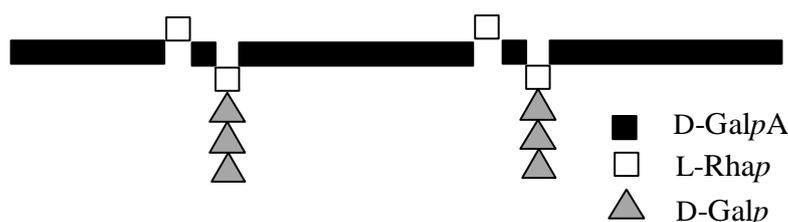


Рис. 4. Первая («rhamnogalacturonan») модель строения пектиновой макромолекулы согласно Talmadge et al., 1973.

Вторая модель («traditional») – модель попеременного расположения блоков гомогалактуронана так называемых «гладких» (линейных) областей пектина, и блоков рамногалактуронана I или «волосатых» (разветвленных) областей (De Vries et al., 1982). Блоки разветвленного рамногалактуронана I подразделяют на

слаборазветвленную и сильноразветвленную области (Оводов, 2009). В этой модели разветвленные участки размещены на линейном остове, близко к концам макромолекулярного комплекса, чтобы объяснить наблюдаемую обратную зависимость между содержанием нейтральных углеводов и молекулярной массой некоторых фракций пектина (рис. 5). Доля рамногалактуронана I, составляющего «волосатую» область, варьирует для пектинов из различных источников от 5 до 48 % (De Vries et al., 1982; Jackson et al., 2007; Yapo et al., 2007). В ходе дальнейших исследований эта модель получила некоторые дополнения (Coenen et al., 2007) и была использована как структурная модель пектинов независимо от растительного источника (Prade et al., 1999; Ralet et al., 2001; Schols, Voragen, 1996).

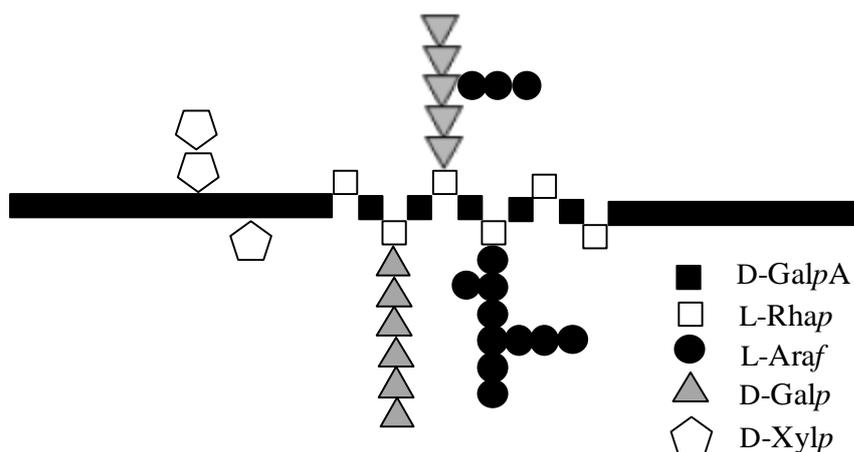


Рис. 5. Вторая («traditional») модель строения пектиновой макромолекулы согласно De Vries et al., 1982.

Третья модель («RG-I backbone») – модель, в которой гомогалактуронан является боковой цепью рамногалактуронанового остова (Vincken et al., 2003), хотя до конца не ясно, является ли гомогалактуронан сам по себе боковой цепью или «привит» на боковые цепи из нейтральных углеводов. Согласно модели «RG-I backbone», макромолекулярный комплекс представляет собой исключительно «волосатый» тип пектиновой молекулы; боковые цепи могут состоять из нейтральных сахаров (арабинана, галактана, арабиногалактана I и,

возможно, арабиногалактана II), гомогалактуронана и ксилогалактуронана (рис. 6).

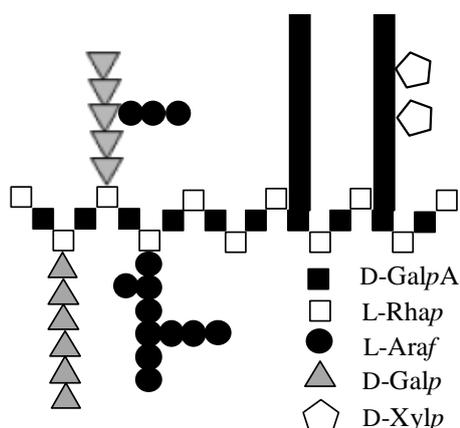


Рис. 6. Третья («RG-I backbone») модель строения пектиновой макромолекулы согласно Vincken et al., 2003.

Четвертая модель («living thing») – некий симбиоз второй и третьей моделей. В этой модели пектиновый комплекс состоит из двух линейных гомогалактуронановых элементов и одного кора рамногалактуронана I, встроенного между ними. Последний декорирован нейтральными гликанами (арабином, галактаном, арабиногалактаном) и ксилогалактуронаном в виде боковых цепей (Уаро, 2011) (рис. 7). К боковым цепям, представленным гомогалактуронаном, могут быть присоединены молекулы рамногалактуронана II. Существование такой модели подтверждается лишь косвенно. Например, ферментативные комбинации [рамногалактуронангидролаза + галатаназа + арабиназа + арабинофуранозидаза + галактозидаза], согласно второй модели, должны давать гомогалактуронановые, ксилогалактуронановые и рамногалактуронановые фрагменты. Однако, отдельных фрагментов ксилогалактуронана и рамногалактуронанов I и II получено не было, что не может быть объяснено ни второй, ни третьей моделью. А исследование пектина клеточной стенки тыквы продемонстрировало наличие рамногалактуронана II в линейных боковых гомогалактуронановых цепях (Fissore et al., 2007).

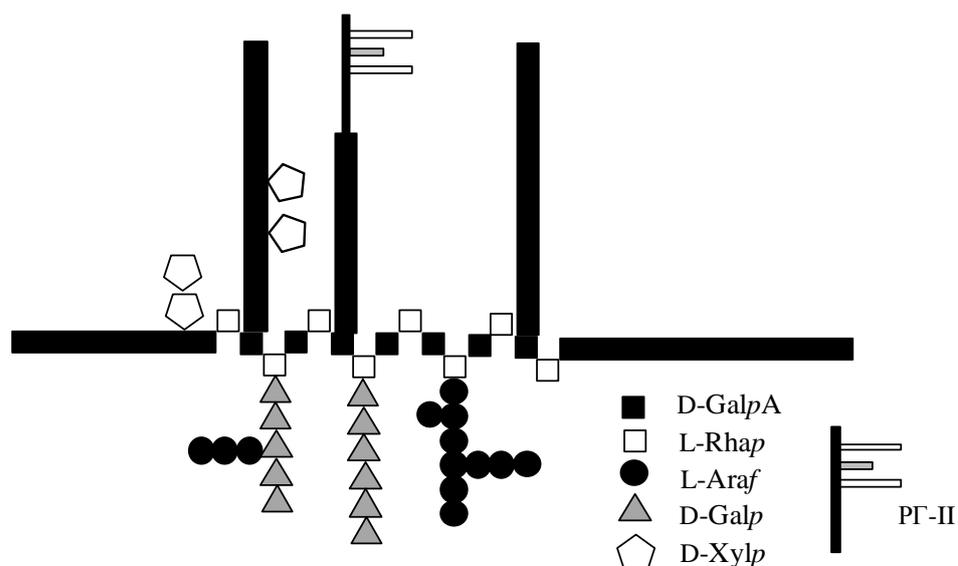


Рис. 7. Четвертая («living thing») модель строения пектиновой макромолекулы согласно Уаро, 2011.

В настоящее время ни одна из моделей не может быть, как отвергнута, так и принята за единственно верную, так как накопившийся на данный момент пласт информации демонстрирует широкую вариабельность структуры остова. Тем не менее, однозначно ясно, что существуют блоки рамногалактуронана I, которые обычно регулярны по строению и имеют длину от 15 до 300 димеров $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap(1}\rightarrow]$ (McNeil et al., 1980; Albersheim et al., 1996). В большинстве случаев рамногалактуронан I соединен (не ясно, каким образом) с полигалактуроновыми участками и выделяется в чистом виде только после воздействия полигалактуроназой.

1.2.2.2. Боковые цепи рамногалактуронанов I

Размах вариабельности рамногалактуронану I придает не столько встречающаяся (как отмечалось выше) нерегулярность строения остова, сколько количество и разнообразие боковых цепей различной длины и структуры. Остов рамногалактуронана I, как правило, замещен по положению O-4 L-Rhap (Carpita, Gibeaut, 1993; O'Neill et al., 1990; Schols,

Voragen, 1994). Исключением является остов рамногалактуронана из слизи семян льна, в котором было обнаружено замещение остатков рамнозы по О-3 положению (Naran et al., 2008). Также считается, что остатки D-GalpA в остове рамногалактуронана I не замещены боковыми цепями, хотя в единичной работе, выполненной на рамногалактуронане I, выделенном из сахарной свеклы, продемонстрировано замещение примерно 2% этого остатка по О-3 единичным остатком D-GlcpA (Renard et al., 1999). Степень замещения L-Rhap может варьировать от 20 до 96% в зависимости от источника полисахарида (Albersheim et al., 1996), от стадии «процессинга» полисахарида (Gorshkova et al., 1996; Mikshina et al., 2012), от стадии развития источника полисахарида (Vierhuis et al., 2000).

Главным образом, боковые цепи представлены одиночными остатками L-Araf и D-Galp или линейными и разветвленными арабинанами и галактанами, а также арабиногалактанами (Albersheim et al., 1996; Ridley et al., 2001); их наличие, пропорции, длина и детали структуры отличаются в зависимости от источника происхождения и локализации полисахарида в тканях растения (Bush et al., 2001; Bush, McCann, 1999; Oomen et al., 2003; Willats et al., 2006).

Арабинаны (иногда их называют гомоарабинаны) имеют линейный остов из (1→5)-связанных остатков α -L-Araf, замещенных по О-2 и/или О-3 положениям (Carpita, Gibeaut, 1993), с одним остатком α -L-Araf или короткими (1→3)-связанными цепями α -L-Araf, хотя неразветвленные арабинаны также были описаны (Nakamura et al., 2001).

Галактаны (или гомогалактаны) – обычно линейные цепи (1→4)-связанных остатков β -D-Galp, могут иметь замещения по О-2 или О-3 положениям, при этом боковые цепи представлены одиночным остатком β -D-Galp, и замещение по О-6 положению, боковые цепи – одиночная α -L-Araf.

Арабиногалактаны I – (1→4)-связанный β -D-галактан, несущий в О-3 положении один остаток α -L-Araf и/или короткие (1→2)/(1→3)-

связанные цепи α -L-Araf. Они представляют собой наиболее распространенные гетерогенные боковые цепи рамногалактуронанов I.

Арабиногалактаны II – более разветвленные, чем арабиногалактаны I; являются самыми сложными боковыми цепями рамногалактуронанов I. Арабиногалактаны II – (1→3)- β -D-галактаны, несущие в O-6 положении относительно короткие (1→6)-связанные β -D-Galp, которые в свою очередь замещены в O-3, O-4 и/или O-6 позициях остатком α -L-Araf и (1→3)/(1→5)-связанными цепями α -L-Araf. К остаткам α -L-Araf могут быть присоединены остатки L-Fucp (в положении O-2) и L-Rhap (в положении O-5), а иногда в O-4 позиции остаток β -D-Galp (Yaro et al., 2011; Carpita, Gibeaut, 1993). Однако принадлежность арабиногалактанов II к рамногалактуронану I, как ковалентно связанной боковой цепи, до сих пор надежно не доказана.

Помимо перечисленных широко распространенных типов боковых цепей рамногалактуронана I, в качестве ответвления может выступать ксилогалактуронан (цепи из (1→4)-связанных остатков α -D-GalpA, к которым в положении O-3 присоединены терминальные остатки Xylp и фрагменты из двух остатков Xylp, соединенных (1→4)-связью), а также апиогалактуронан. В последнем одиночные, 1→2- или 1→5-связанные остатки D-Arif присоединяются 1→2- и/или 1→3-связями к остаткам D-GalpA главной углеводной цепи (Oechslein et al., 2003). Рамногалактуронан I из слизи, выделяемой семенами льна, содержит редкий моносахарид L-Galp, присоединенный к остатку рамнозы в O-3 положении (Naran et al., 2008).

1.2.2.3. Характер и расположение модифицирующих групп

Кроме разветвлений в виде боковых цепей, рамногалактуронаны I могут быть частично ацетилированы. Ацетилирование происходит по O-2, O-3 положению D-GalpA (Ishii, 1997; Perrone et al., 2002), а также по O-3

положению L-Rhap (Sengkhampan et al., 2009). Степень ацетилирования галактуроновой кислоты рамногалактуронановых блоков варьирует, в частности, у рамногалактуронанов I, выделенных из первичных клеточных стенок льна, ацетилировано 29-83% GalpA (Rihouey et al., 1995), а у рамногалактуронанов I, выделенных из слизи, продуцируемой семенами льна при набухании – 5-14% (Naran et al., 2008). Считается, что метилированы у рамногалактуронанов I только остатки GalpA; в зависимости от источника рамногалактуронана I доля метилэтерифицированной GalpA в составе этого полисахарида варьирует от 47 до 100% (Sun et al., 1987; Rihouey et al., 1995).

В структуре рамногалактуронанов I может присутствовать феруловая кислота (Saulnier, Thibault, 1999). Феруловая кислота присоединена в O-2 положении остатков Ara₆f в (1→5)-связанных арабинах или в O-6 положении (1→4)-связанных остатков Galp в галактанах (Guillon, Thibault, 1989; Guillon et al., 1989). За счет создания мостиков из остатков феруловой кислоты между цепями полимеры могут взаимодействовать друг с другом.

Разнообразие строения рамногалактуронанов создает базу для обеспечения различий в свойствах отличающихся вариантов, однако физико-химические свойства этих полимеров до сих пор охарактеризованы крайне слабо. Для более точного описания особенностей свойств этих полисахаридов необходимо использование целого комплекса методов, позволяющих обойти возникающие при анализе сложности. Функциональная специфика различных рамногалактуронанов может быть связана с особенностями их механических свойств.

1.3. Характеристика механических свойств полимеров, входящих в состав растительных клеточных стенок

1.3.1. Характеристика механических свойств материалов

Механические свойства материалов определяются их способностью противостоять различным внешним воздействиям (сжатие, растяжение, кручение, изгиб и т.д.). Характеристика механических свойств материалов позволяет установить возможность их участия в выполнении той или иной функции в изучаемом объекте.

Одной из основных характеристик механических свойств являются параметры упруго-пластической деформации материала, т.е. изменение геометрической формы объекта при воздействии внешней силы. Различают упругую деформацию (материалы восстанавливают свою первоначальную форму и размер после снятия нагрузки) и пластическую деформацию (материалы не способны полностью восстановить исходную форму).

Для характеристики упруго-пластических свойств материала могут быть использованы эксперименты, основанные на шести деформированных состояниях (рис. 8). Эксперименты по трехосному сжатию проводят, например, при инженерно-геологических изысканиях, в других случаях обычно используют более простые варианты. Основываясь на полученных экспериментальных данных, зависимость степени деформации материала от величины оказываемого на него давления представляют в виде кривой.

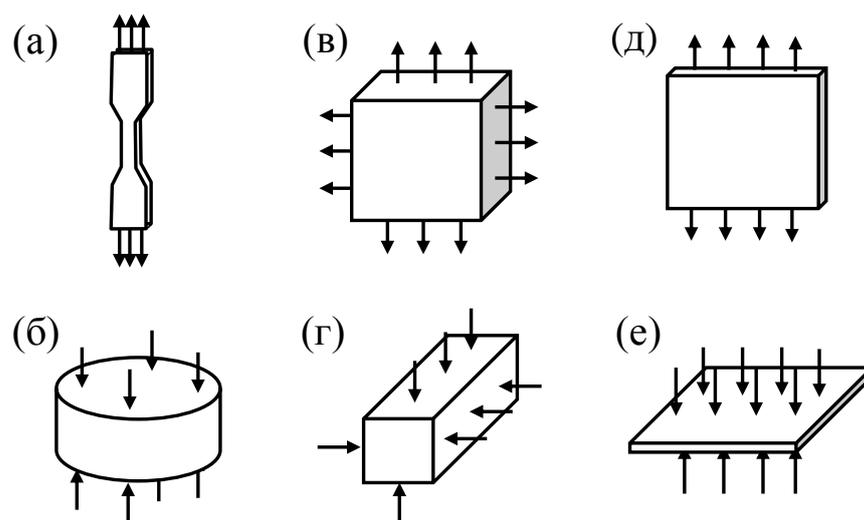


Рис. 8. Простые деформированные состояния материалов: (а) – одноосное растяжение, (б) – одноосное сжатие, (в) – двухосное растяжение, (г) – двухосное сжатие, (д) – плоское растяжение, (е) – плоское сжатие (Горбулинский, 2013).

Существует три основных типа кривых зависимости деформации от давления (рис. 9).

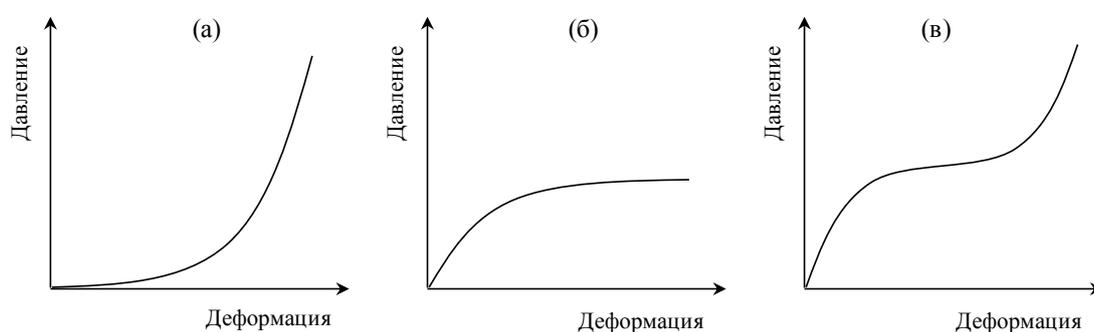


Рис. 9. Типы кривых зависимости деформации от давления: вогнутая (а), выгнутая (б) и сигмоидальная (в), характеризующие гиперэластичные, пластичные и образующие «шейку» пластичные материалы, соответственно (Roylance, 2001).

Вогнутая кривая характеризует материалы, которые разрушаются раньше, чем начинают течь под давлением, например, гиперэластичные материалы. Такие кривые в частности характерны для водных гелей, например, для гелей на основе гиалуроновой кислоты (Jha et al., 2010). Выгнутая кривая характеризует материалы, текущие при оказании высокого давления, например, пластичные металлы, такие как алюминий.

Сигмоидальная кривая характерна для материалов, образующих так называемые «шейки» при растяжении (рис. 10), когда давление неравномерно распределено по длине образца, например, непластичные металлы (Roylance, 2001).

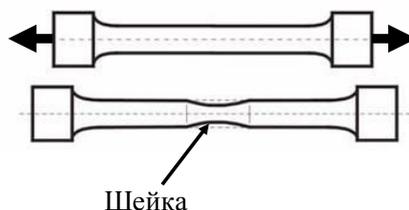


Рис. 10. Образование «шейки» при растяжении непластичного металла.

Двумя основными параметрами упруго-пластичных свойств материала служат модуль Юнга и коэффициент Пуассона. Модуль Юнга – физическая величина, характеризующая свойства материала сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации. Модуль Юнга может варьировать в очень больших диапазонах в зависимости от упруго-пластических свойств материала (например, 1 кПа для гидрогелей (Vithanage et al., 2010) и 520 ГПа для иридия (Merker et al., 2001)). Коэффициент Пуассона – величина отношения относительного поперечного сжатия к относительному продольному растяжению. Для абсолютно хрупкого материала коэффициент Пуассона равен 0, для абсолютно несжимаемого – 0.5 (Mott, Rol, 2009).

Учитывая поведение материала при деформации (разрушение, текучесть, образование «шейки» и др.), характер кривой зависимости деформации от давления и значения модуля Юнга и коэффициента Пуассона, материалы можно разделить на два класса: изотропные и анизотропные. Изотропный материал обладает одинаковыми физическими и механическими свойствами вне зависимости от направления оказания воздействия и, как следствие линейной упругостью (металлы, прессованные пластинки, бетон и др.). Анизотропный материал

характеризуется различными свойствами в зависимости от направления оказания воздействия и обладает нелинейной упругостью (материалы, обладающие волокнистой структурой; песчанники, кристаллы и др.).

Особое место в этой классификации занимают эластомеры – полимеры, которые способны растягиваться до размеров, во много раз превышающих их начальную длину, и, что существенно, возвращаться к исходному размеру, когда нагрузка снята. Эти полимеры обладают вязкоупругими свойствами, имеют низкий модуль Юнга и коэффициент Пуассона близкий 0.5. При решении математических задач эластомеры принято относить к однородным изотропным материалам. Однако, реальные эластомеры это сложные микрокомпозиты (переплетенные макромолекулы, химически или физически сшитые между собой с образованием трехмерной сложной сети). Так как макромолекулы, входящие в состав сети, различны по своим параметрам и их структура слабо регулярна, в процессе деформации эластомеры могут характеризоваться различными упруго-пластическими свойствами в зависимости от направления воздействия. Они способны образовывать как зоны кристаллизации (зоны микровключений), так и зоны разрушения (зоны микропор) (Левин и др., 2004). Таким образом, эти полимеры нельзя однозначно отнести ни к изотропным, ни к анизотропным материалам.

Установление механических свойств компонентов растительного организма может проводиться как на уровне производных макромолекул (например, гели на основе растительных полисахаридов), так и на уровне компонентов клетки (например, клеточная стенка).

1.3.2. Гели на основе пектиновых полисахаридов и их механические свойства

Гели – структурированные системы, состоящие из высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ. Наличие

трёхмерного полимерного каркаса (сетки) придает гелям механические свойства твёрдых тел: отсутствие текучести, способность сохранять форму, прочность и способность к деформации (пластичность и упругость).

Гели принято разделять на химические (необратимые) и физические (обратимые). Химические гели представляют собой ковалентно связанные сети. В формировании физических, в свою очередь, принимают участие более слабые связи (ионные, водородные или гидрофобные) (Hennink, Nostrum, 2002) – все эти взаимодействия являются обратимыми, и могут быть нарушены изменением физических условий или применением напряжений (Rosiak, Yoshii, 1999) (рис. 11).

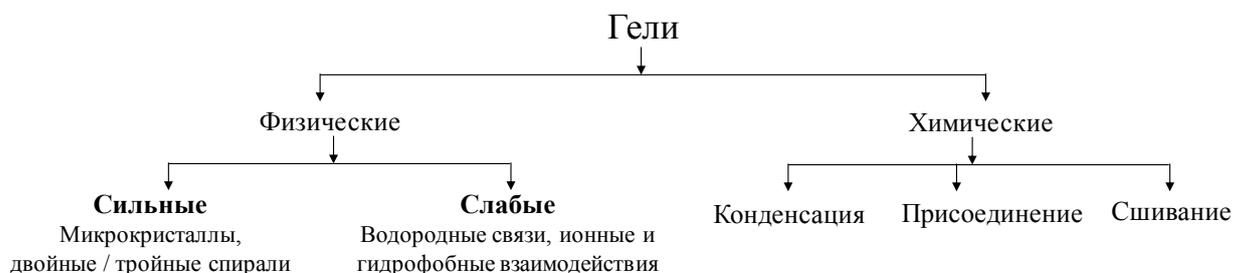


Рис 11. Классификация типов гелей и механизмов гелеобразования согласно Gulrez et al., 2011.

Термин гидрогель описывает трехмерные структурные сети, полученные из синтетических и/или натуральных полимеров, которые могут абсорбировать и удерживать значительное количество воды (Rosiak, Yoshii, 1999). Объем воды и проницаемость являются наиболее важными характерными чертами гидрогеля. Полярные гидрофильные группы, в первую очередь, гидратируются при контакте с водой, что приводит к образованию прочно связанной воды (толщина слоя 2-3 молекулы воды). В результате полимерные сети разбухают, и на поверхности молекулы оказываются гидрофобные группы, которые также способны взаимодействовать с молекулами воды. Это приводит к образованию гидрофобно-связанной воды (слабосвязанная вода). Сети могут поглощать

дополнительную воду за счет осмоса, которая заполняет пустоты между цепями полимера (свободная вода). Последним этапом насыщения водой в зависимости от природы и состава гидрогеля является распад или растворение (Gulrez et al., 2011).

Гидрогели на основе растительных полисахаридов относятся к группе физических гелей, что, главным образом, связано с их физиологической ролью в организме и способностью к переходу гель-золь (Rubinstein, Colby, 2003). В зависимости от особенностей структуры полисахарида в настоящее время существует ряд методов формирования гидрогелей.

1. Нагрев и последующее охлаждение раствора полисахарида приводит к формированию соединительных зон путем запутывания спиральных структур молекул (каррагинан, агароза – Funami et al., 2007).

2. Ионно-связанные гели образуются при добавлении ионов ди- и тривалентных металлов, так называемые «egg-box» (низкометилованные пектины – Grant et al., 1973; Yapo, Gnakri, 2014).

3. Гелеобразование за счет кислых условий (pH 2.0-3.5) и высокого содержания растворимых углеводов (например, сахароза 55-65%) – высокометилованные пектины). Кислые условия предотвращают депротонирование неэтерифицированных остатков галактуроновой кислоты, а растворимые углеводы уменьшают активность воды и способствуют образованию водородных связей между пектиновыми цепями (Fishman, Cooke 2009; O'Brien et al., 2009).

4. Увеличение прочности геля при замораживании-оттаивании (ксантан – Giannouli, Morris, 2003).

Для пектинов общепринято два ключевых способа гелеобразования из четырех. Оба способа основаны на образовании зон взаимодействия между остатками GalpA цепей. В зависимости от степени метоксилирования пектинов при гелеобразовании формируются либо «egg-box» («ячейка для яиц») структуры («кальциевые гели» из

низкометоксилированных пектинов) (Grant et al., 1973), либо трехмерные сети, в которых иммобилизованы растворитель и низкомолекулярные углеводы, необходимые для снижения активности воды при стимуляции образования гидрофобных связей между метоксильными группами («кислые гели» из высокометоксилированных пектинов) (Fishman, Cooke 2009; O'Brien et al., 2009).

В зависимости от способа получения механические свойства гидрогелей могут существенно отличаться. Так, например, разбавленный агарозный гель (0.5%) имеет модуль Юнга 30 кПа (Nayar et al., 2012), а с повышением концентрации агарозы значение модуля Юнга растет (3% – 52 кПа (Ross, Scanlon, 1998); 5% – 2300 кПа (Nayar et al., 2012)). Это объясняется изменением механических свойств геля. Если гели с низкой концентрацией являются несжимаемыми, т.е. коэффициент Пуассона близок 0.5 (Dunstan et al., 2001; Herbert et al., 2009), то с повышением концентрации гели становятся сжимаемыми, значение коэффициента Пуассона снижается до 0.32 (Ross, Scanlon, 1998).

Интересная картина наблюдается при формировании геля из классического пектинового гелеобразователя – полигалактуроновой кислоты. Значение модуля Юнга зависит от температуры формирования геля: при 5°C 6.5 кПа – для высокометилованных и 1.8 кПа – для низкометилованных полигалактуронанов, а при 20°C 4.9 кПа и 0.95 кПа, соответственно (Vithanage et al., 2010). Аналогичные значения для гидрогелей из полигалактуроновой кислоты были получены в ряде работ, причем модуль Юнга не превышал 10 кПа вне зависимости от концентрации (Cardenas et al., 2008; Ngouemazong et al., 2012). Коэффициент Пуассона гелей из полигалактуроновой кислоты составил 0.4-0.5 (Park et al., 1993).

Таким образом, не только концентрации, но и метод получения геля позволяет варьировать его механические свойства, что может приблизить к

пониманию физиологической роли полисахарида в растительном организме.

Гели, получаемые на основе растительных полисахаридов, в ряде случаев можно отнести к эластомерам (наличие упругой деформации, низкое значение модуля Юнга (Cardenas et al., 2008; Ngouemazong et al., 2012) и коэффициент Пуассона 0.4-0.5 (Park et al., 1993)). Такие упруго-пластические свойства гелей могут быть связаны с выполняемой этими полисахаридами функцией в растительном организме.

1.4. Проблемы анализа физико-химических свойств полисахаридов и подходы к их решению

Физико-химические свойства биополимеров сопряжены с их физиологической ролью и являются неотъемлемой частью характеристики осуществляемых с их участием процессов. С этой точки зрения, полисахариды занимают особое положение, как наиболее слабо охарактеризованные биополимеры. Связано это, прежде всего, со спецификой и сложностью их строения. В отличие от нуклеиновых кислот и белков, где все мономеры связаны между собой одним и тем же типом связи с участием одних и тех же атомов, каждый моносахарид способен образовывать связь с участием разных атомов углерода. Разнообразие в типах мономеров и в положениях, по которым осуществляется связь между ними, а также внутри- и межмолекулярные взаимодействия приводят к необозримому множеству полисахаридных структур, определенным образом организованных в пространстве. В связи с этим, комплексные подходы, позволяющие обстоятельно оценить физико-химические параметры биополимеров с матричным характером синтеза (например, белков), не могут быть применены для полисахаридов в алгоритмичном варианте, что существенно осложняет задачу для исследователя и интерпретацию результатов.

Кроме этого, структура полисахаридов непосредственно в геноме не кодируется, и существует некоторая вариабельность многих параметров их строения (молекулярная масса, длина и расположение боковых цепей, наличие модифицирующих групп и т.д.). Размах этой вариабельности ограничивается «функциональной пригодностью», которая во многом основана на параметрах пространственной организации и способности к формированию надмолекулярных образований определенного типа (Горшкова и др., 2013). Следовательно, в случае полисахаридов выполнение функции обеспечивает не конкретная молекулярная структура, а определенный тип молекул, обладающий некоторой степенью гетерогенности. Это и служит ключевой причиной, определяющей трудности при анализе физико-химических свойств полисахаридов. Дополнительным препятствием для ряда методов становится зачастую высокая молекулярная масса природных полисахаридов, которая часто имеет достаточно сложную корреляцию с размером молекулы.

Следовательно, несмотря на то, что арсенал современных методов, используемых для изучения физико-химических свойств и структуры полимеров, достаточно велик, большинство из них применимы, главным образом, лишь к линейным гомополисахаридам и сталкиваются со значительными трудностями при работе со сложными, сильно разветвленными гетерополисахаридами, в частности, с такими как рамногалактуронаны I.

Существенную информацию о невалентных взаимодействиях и конформационных особенностях полисахаридов, как в твердом состоянии, так и в растворе, дают инфракрасная спектроскопия (IR, FTIR, ИКС) и спектроскопия комбинационного рассеяния (рамановская, СКР), позволяющие легче обнаруживать С-С скелетные колебания, что существенно для конформационного анализа полисахаридов; эти подходы успешно применяются при анализе полимеров растительной клеточной стенки (McCann et al., 1992; Kasurakova et al., 2000). Среди полисахаридов

клеточной стенки с помощью ИКС достаточно детально охарактеризованы целлюлоза (Cael et al., 1975), пектины (McCann et al., 1992; Chen et al., 1997; Wellner et al., 1998) и ксиланы (Coimbra et al., 1999; Kacurakova et al., 1994; 1998; 1999; Sun et al., 1998). С применением ИКС и СКР, в сочетании, в некоторых случаях, с дифракционными подходами и ИК-дихроизмом, можно получить существенные сведения о системе водородных связей, ориентации боковых групп, их доступности для растворителей, определить направление колебаний отдельных атомов и их групп и распределение заместителей по главной цепи, идентифицировать полисахаридную структуру и подтвердить ее состав, оценить степень ионизации карбоксильных групп уроновых кислот и др. Благодаря использованию поляризованного света, ИКС применяется для изучения ориентации полисахаридных молекул, поскольку если молекулы ориентированы, интенсивность определенных инфракрасных сигналов зависит от угла между направлением вектора напряженности электрического поля входящего инфракрасного излучения и направлением изменения дипольного момента молекулы (Chen et al., 1997). С появлением инфракрасной микроспектроскопии стало возможным получать колебательные спектры клеточных стенок отдельных клеток на определенных стадиях их развития и отслеживать изменение их архитектуры (McCann et al., 1992; McCann et al., 1993), сочетание этой техники с возможностью гидратации образцов позволило приблизить условия эксперимента к существующим *in vivo* (Chen et al., 1997). Комбинация ИКС с техникой получения реплик после быстрого замораживания, протравливания и оттенения, позволяющей визуализировать клеточные стенки при максимально возможном разрешении в близком к *in vivo* состоянии при хорошем сохранении трехмерной пространственной взаимосвязи компонент макромолекул (McCann et al., 1990; McCann, Roberts, 1991; Satiat-Jeunemaitre et al., 1992), дало возможность определять присутствие и ориентацию некоторых

специфических химических связей в стенке (McCann et al., 1992).

Основные проблемы при интерпретации результатов ИКС связаны с наличием структурной воды в полости полисахаридов (Kacurakova, Wilsonb, 2001) и значительным воздействием окружающей среды, а также с необходимостью разработки алгоритмов проведения деконволюции колебательных спектров сложных веществ, ввиду низкого разрешения полос, приводящего к меньшему числу визуализированных максимумов на спектрах по сравнению с фактическим количеством отдельных компонентов (Nikonenko et al., 2002).

В настоящее время классические методы ЯМР спектроскопии прекрасно справляются с задачами, касающимися установления структуры на уровне отдельных молекул. Однако при исследовании пространственного строения многокомпонентных комплексов, образованных, например, с помощью нековалентных взаимодействий, появляются серьезные трудности, связанные с уширением и наложением сигналов отдельных компонентов системы на спектрах, а также с ограничением информации о динамике молекул системы, так или иначе связанной с ее массой и упаковкой. Значительным препятствием для анализа природных растительных полисахаридов и их комплексов с помощью экспериментов ЯМР в растворе, используемых для решения структурных задач в отношении углеводов в классическом варианте, является их высокая молекулярная масса и размер частиц. Получение удобных для ЯМР анализа фрагментов полисахаридов, участвующих в формировании комплексов, может привести к такому изменению их физико-химических свойств, в результате которого они не смогут реализовывать эту способность. Низкое сродство некоторых углеводов углеводным взаимодействиям, нестабильность комплексов, химический обмен и усреднение резонансных сигналов составляют еще одну группу проблем. Наконец, конформации и относительные ориентации мономеров в гомофильных комплексах являются более сложными для анализа

методом ЯМР, чем гетерофильные комплексы, компоненты которых дают отдельные резонансные сигналы (Geyer, 2002). Вместе с этим, ЯМР спектроскопия позволяет напрямую наблюдать за комплексами в растворе, выявлять комплементарные молекулярные поверхности взаимодействующих молекул. Информативными при исследовании формирования надмолекулярных комплексов, в том числе на основе углеводов, и их физико-химических свойств являются также и другие разновидности ЯМР спектроскопии: диффузионно-упорядоченная (DOSY) в растворе и твердотельные эксперименты с вращением под магическим углом.

С помощью DOSY можно исследовать молекулярную динамику полисахаридов и их комплексов, процессы комплексообразования углеводов в присутствии катионов, определять гидродинамические радиусы и молекулярные массы их частиц (Simpson, 2002; Viel et al., 2003; Politi et al., 2006), а также проводить разделение сложных смесей (Kählig et al., 2002), что и было изначальной целью этого метода и дало ему второе название ЯМР хроматографии. Недостатками этого метода является возникновение артефактов при проведении эксперимента и ошибок при численной интерпретации полученных данных. Возможные способы устранения этих недостатков представлены в обзоре С.В. Харламова и Ш.К. Латыпова (2010).

Для характеристики структуры, молекулярной динамики и межмолекулярных взаимодействий полисахаридов первичных клеточных стенок в условиях, близких к естественным, в последнее время активно используется технология многомерной твердотельной ^{13}C ЯМР спектроскопии с вращением под магическим углом (Dick-Pérez et al., 2011; Bootten et al., 2011; Wang et al., 2012). Этот метод, в отличие от трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ), позволяет избежать высушивания стенок, что минимизирует химические и физические превращения в ходе подготовки образца, и не требует протяженной

упорядоченности молекул в нескольких плоскостях, в отличие от рентгеноструктурного анализа (РСА) (Newman et al., 1996; Bootten et al., 2011). Твердотельный ^{13}C ЯМР может быть использован для разделения полимеров клеточной стенки по разнице в их подвижности, зависящей от их положения и взаимодействия с другими молекулами (Bootten et al., 2004). ^{13}C ЯМР техника позволяет изучать различные типы подвижности полисахаридов (жесткие, полужесткие, подвижные и высокоподвижные). Для оценки подвижности полисахаридов клеточной стенки, в основном, используют два вида твердотельного ^{13}C ЯМР в сочетании с вращением под магическим углом (Tang et al., 1999) – кросс-поляризация (CP/MAS) и возбуждение одноимпульсного ядерного спинового эха (SPE/MAS). В первом варианте подавляются сигналы от относительно мобильных молекул, во втором – относительно жестких (Newman, 1999). Обзор полисахаридов клеточной стенки с различной степенью подвижности и их характеристика с помощью твердотельного ^{13}C ЯМР, ^1H - и ^{13}C релаксации представлен в работе Bootten et al., 2011.

С помощью твердотельной 2D и 3D ^{13}C ЯМР спектроскопии с вращением под магическим углом охарактеризована конформация молекул целлюлозы, находящиеся на поверхности и внутри кристаллитов (Newman et al., 1994; 1999; 2004); получена информация о взаимодействии пектинов с целлюлозой и ксилоглюканом (Dick-Pérez et al., 2011; 2012), лигнина с гемицеллюлозами (ксилан) и целлюлозой (Foston et al., 2012) и др.

Для исследования полисахаридов используют малоугловое рассеяние рентгеновских лучей (МУР, SAXS) и нейтронов (МУН, SANS), динамическое (ДРС, DLS) и статическое (СРС, SLS) рассеяние света. Разрешающая способность методов рассеяния связана с длиной волны источника излучения (0.1–0.3 нм для МУР, 0.2–1.0 нм для МУН и 436–633 нм для ДРС и СРС), чем короче длина волны, тем выше разрешение (Wang and Cui, 2005).

Дифракционные методы рассеяния (МУР и МУН) схожи в

теоретическом обосновании и способах обработки данных и используются для исследования неупорядоченных полисахаридов без специальной пробоподготовки. Основные формулы, связывающие интенсивность рассеяния со структурой объекта, определяются только рассеивающей способностью неоднородностей (Волков, 2009). Слабой стороной, ограничивающей применение этих методов к углеводам, является сложность интерпретации результатов при работе с полидисперсными образцами из-за усреднения анализируемых параметров.

Рассеяние света подразделяют на динамическое, статическое и электрофоретическое. Более широкое распространение при изучении углеводных объектов получили первые два.

Динамическое рассеяние света позволяет измерять броуновское движение частиц, как характеристику их размеров, итогом измерения является коэффициент трансляционной диффузии и полученный в результате расчета гидродинамический радиус. Суть метода динамического светорассеяния заключается в следующем: луч лазера, падающий на кювету с анализируемым веществом, рассеивается частицами, движущимися хаотически (броуновское движение). В результате колебания локальной плотности частиц, наблюдается колебание интенсивности рассеянного ими света, спектр которого и анализируется. Первоначальный тип получаемых данных – спектр флуктуаций рассеиваемой интенсивности света (число фотонов, детектируемых в единицу времени). Затем с помощью имеющегося в приборе цифрового коррелятора, оценивающего изменение сигнала за определенный интервал времени, и посредством быстрого Фурье-преобразования происходит перевод полученного спектра в вид автокорреляционной функции, из которой извлекается информация о размерах частиц, полидисперсности образца, а также о присутствии в нем агрегатов (рис. 12).

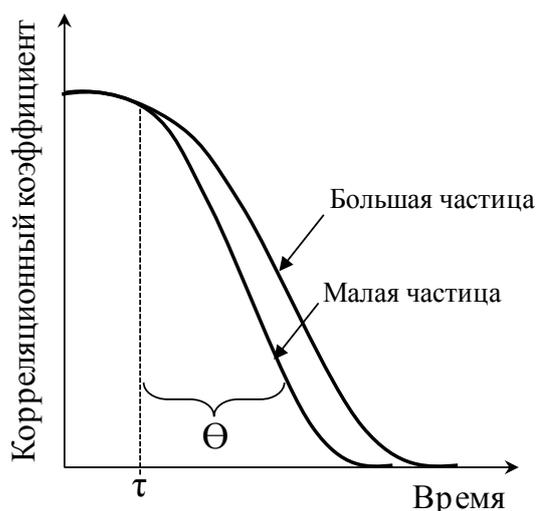


Рис. 12. Автокорреляционные функции частиц разного размера. Θ – угол затухания (дает информацию о полидисперсности распределения), τ – время затухания корреляции (дает информацию о диаметре частиц), базовая линия дает информацию о наличии больших частиц/агрегатов.

Определение размеров дисперсных частиц на основе регистрации динамического рассеяния света основаны на идентификации частиц по эффективному коэффициенту самодиффузии, а заключения об их размерах базируются на соотношениях, связывающих коэффициент самодиффузии частиц с их гидродинамическим радиусом. Широкое распространение получило уравнение Стокса-Эйнштейна, используемое применительно к сферическим частицам (1):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (1)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, R – гидродинамический радиус частицы, η – вязкость среды, в которой взвешены частицы, D – коэффициент самодиффузии.

При статическом светорассеянии измеряется усредненная во времени общая интенсивность как функция угла рассеяния. Используя статическое светорассеяние, можно определить средневесовую молекулярную массу, радиус инерции, второй вириальный коэффициент, характеризующий взаимодействие полимера с растворителем и форму макромолекул в растворе, а также термодинамический радиус объекта.

При использовании этих методов стоит особо учитывать необходимость высокой степени чистоты образца. Для получения адекватной и полной картины о возможной форме и конформации полисахарида или агрегата, зачастую, требуется достаточно продолжительный и комплексный эксперимент, включающий построение модели Зимма и учета ρ -параметра. Подробное представление о методах светорассеяния применительно к полисахаридным структурам разных типов пространственной организации, а также экспериментальные решения и физико-математическая обработка результатов представлены в ряде работ (Wang and Cui 2005; Burchard, 2008).

1.5. Компьютерное моделирование структуры и свойств физиологических систем

В настоящее время методы компьютерного моделирования и биоинформатики являются мощными средствами изучения структуры, свойств и поведения как отдельных молекул и биохимических процессов, так и целых физиологических систем. Если еще недавно компьютер рассматривался лишь как средство для обработки массива данных, полученных экспериментально, то сейчас появляются возможности чисто компьютерного эксперимента.

Первые работы по моделированию биополимеров появились еще в 70-е годы XX века (Levitt, Warshel, 1975; McCammon et al., 1977), однако широкое развитие компьютерное моделирование получило в 90-е годы XX века (Van Gunsteren et al., 1989; 1993; 1996; French, Brady, 1990; Cornell et al., 1995). Основные вычислительные подходы моделирования отдельных молекул – метод молекулярной механики, молекулярной динамики, Монте-Карло – используют эмпирические силовые поля (Metropolis et al., 1953; Alder, Wainwright, 1957; Warshel, Levitt, 1976; Burkert, Allinger, 1982).

Выбор параметров силового поля осуществляется на основании воспроизведения свойств изучаемых систем.

Наиболее развитые области моделирования связаны с изучением белков и нуклеиновых кислот, что объясняется возможностью их секвенирования, а, следовательно, относительно простым получением исходных данных. В отличие от белков и нуклеиновых кислот, полисахариды обладают микрогетерогенностью, что осложняет процесс создания их трехмерной модели. Прогноз 3D структуры углеводов, как и полимеров других органических классов, основан на поиске наиболее низкоэнергетических конформеров, что в наибольшей степени соответствует нативному состоянию полимера. Необходимость специальных расчетов структуры углеводов связана с зависимостью их конформационного поведения от стерео-электронных эффектов (аномерного, экзоаномерного и гош-эффектов), а также с их повышенной конформационной гибкостью, а в некоторых случаях – с наличием заряда (Perez et al., 2000). Параметры, используемые в потенциальных энергетических расчетах, получают из экспериментальных структурных и спектроскопических данных. На первом этапе работы необходимы данные о составе, связях и расположении отдельных радикалов, полученные с помощью масс-спектрометрии, ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, ЯМР. Основные программы для определения силовых полей углеводов – GLYCAM06 (Kirschner et al., 2008), CHARMM36 (Brooks et al., 2009) и GROMOS 45A4 (Soares et al., 2005), а также AMBER (Case et al., 2005).

В настоящее время существует очевидная дилемма при выборе масштаба моделирования – чем более детальный уровень модели требуется, тем меньше размер системы, который можно рассмотреть. Поэтому еще одним активно развивающимся методом компьютерного моделирования является мультимасштабное или огрубленное моделирование (Coarse-grain Simulation). Этот метод используется для моделирования макромолекул, имеющих размер в диапазон 10-1000 нм.

Мультимасштабное моделирование позволяет упрощать трехмерную модель и представлять ее в виде единых центров (частиц), каждый из которых является низкоэнергетической конформацией близлежащих групп атомов (Karimi-Varzaneh, Muller-Plathe, 2012). Такое представление молекул позволяет моделировать надмолекулярные образования, например, микрофибриллы целлюлозы, состоящие из 36 глюкозных цепей (Glass et al., 2012). С другой стороны метод мультимасштабного моделирования является конечной точкой в процессе моделирования, т.е. требуется проведение моделирования детальной модели или фрагмента системы со всеми конфигурациями и степенями свободы с дальнейшим сокращением имеющихся степеней свободы так, чтобы упрощенная модель имела те же структурные свойства, что и детальная модель. Таким образом, метод мультимасштабного моделирования объединяет три уровня молекулярного моделирования: квантово-химический, классическую молекулярную динамику и огрубление. Следовательно, процесс этот очень длительный и ресурсозатратный. И, несмотря на преимущества этого метода при создании супраструктур, моделирование целых физиологических систем таким симулированием, если и возможно, то очень затруднительно.

Для создания моделей физиологических систем (органы, ткани растений, их рост и развитие) в настоящее время используются программы на основе метода конечных элементов – COMSOL, ANSYS, ABAQUS и др. (Bolduc et al., 2006; Fayant et al., 2010; Geitmann, 2010; Kha et al., 2010; Flores et al., 2011; Nayot et al., 2012; Yi, Puri, 2012; Николаев, 2013). Этот метод основан на решении дифференциальных уравнений с частными производными, а также интегральных уравнений, возникающих при решении задач прикладной физики (Галлагер, 1984). Суть метода заключается в разбиении области, в которой ищется решение дифференциальных уравнений, на конечное количество подобластей (элементов). В каждом из элементов произвольно выбирается вид

аппроксимирующей функции (в простейшем случае, это полином первой степени). Значения функций на границах элементов (в узлах) являются решением задачи и заранее неизвестны (рис. 13). Коэффициенты аппроксимирующих функций обычно ищутся из условия равенства значения соседних функций на границах между элементами (в узлах). Затем эти коэффициенты выражаются через значения функций в узлах элементов. Составляется система линейных алгебраических уравнений. Количество уравнений равно количеству неизвестных значений в узлах, на которых осуществляется поиск решения исходной системы, прямо пропорционально количеству элементов и ограничивается только имеющимися вычислительными мощностями. Так как каждый из элементов связан с ограниченным количеством соседних, система линейных алгебраических уравнений имеет разреженный вид, что существенно упрощает её решение (Стренг и Фикс, 1977).

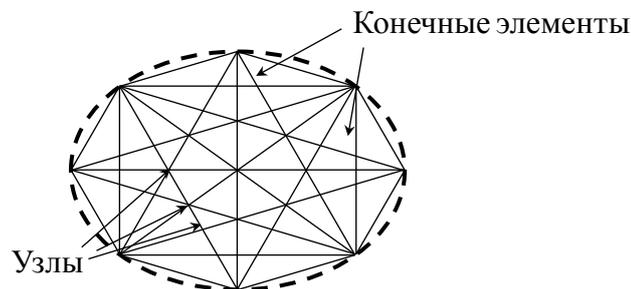


Рис 13. Конечно-элементная модель.

Одним из важных условий построения модели является наличие данных о физических свойствах не одиночной молекулы, а целых надмолекулярных образований, входящих в состав исследуемой структуры. Причем набор этих данных сильно варьирует в зависимости от упруго-пластичных свойств объекта. Минимальный набор, требуемый для построения образования из веществ с линейной эластичностью, – это плотность, модуль Юнга и коэффициент Пуассона, которые полностью характеризуют упругие свойства изотропного материала. В случае

гиперэластичных материалов, помимо перечисленных выше параметров, необходимы кривые связи между напряжениями и деформацией, получаемые на основе экспериментов по одно-, двух- или трехосному сжатию/растяжению, параметр несжимаемости, а также константы, рассчитываемые на основе выбранной модели эластомера (Neo-Hookean, Arruda-Boyce, Blatz-Ко, Mooney-Rivlin и др.). Для характеристики механических свойств клеточных стенок проводят тест на микрорастяжение (включает в себя как тест на целые органы растений и фрагменты тканей, так и тесты на отдельные клетки (главным образом, волокна)). Тесты проводятся в условиях клетки или ткани, поэтому для вывода информации непосредственно по клеточной стенке необходимо учитывать ряд параметров – плотность ткани, длина клетки, межклеточные взаимодействия, тургорное давление и др. Для первичных клеточных стенок, наиболее широко используется метод крипа, в котором определенный вес прикрепляется к ткани и в течение длительного времени записываются значения удлинения (Шарова, 2004; Suslov, Verbelen, 2006; Cosgrove, 2011). Другим вариантом микрорастяжения является одноосное растяжение. В этом случае концы ткани или клетки с помощью клея крепятся на опорах, к которым прикладывается нагрузка (Groom et al., 2002; Burgert et al., 2005). Комбинирование одноосного растяжения со световой и/или сканирующей микроскопией позволяет добиться уникальных успехов в изучении деформации клеток при оказании давления (Thygesen et al., 2007; Eder et al., 2008). Для измерения механических свойств при меньшем масштабе, может быть использована атомно-силовая микроскопия (АСМ). При АСМ отклонения кантиливера должны быть преобразованы в силу с учетом вертикального смещения и жесткости пружины кантиливера. Основная цель применения АСМ для механической характеристики клеточных стенок в создании изображения, основанного на механических свойствах клеточных стенок (кривые зависимости деформации от давления). Получение экспериментальных

данных по биомеханике клеточной стенки напрямую связано со стадией ее развития – если установление механических свойств вторичной и третичной клеточных стенок, в силу их большей толщины, особой сложности не составляло, то свойства первичной клеточной стенки, в первую очередь, исследовались на целых гипокотилиях разных видов растений (Cosgrove, 1993, 2011; Kutschera, Kohler, 1994; Ryden et al., 2003). Однако в настоящее время даже клетки меристемы стали предметом активных исследований изменения локальной жесткости клеточной стенки (Peaucelle et al., 2011).

Важным этапом моделирования является разбивка объектов на конечные элементы. Следует отметить, что правильное создание сетки объектов, служащее результатом такой разбивки, является одной из сложностей применения метода конечных элементов. Форма и плотность сетки модели зависит от поставленной задачи. В первую очередь, необходимо выбрать тип элемента (для двумерного моделирования – это треугольные или квадратные элементы), а также порядок элементов. Конечные элементы могут быть линейные (элементы первого порядка) или параболические (элементы второго порядка) (рис. 14). Линейные элементы имеют узлы только на углах и их грани прямые. Параболические элементы могут иметь узлы на середине каждой стороны и поэтому их грани могут быть параболическими. Так как конечные элементы более высокого порядка имеют более сложную математическую функцию, при одинаковом количестве элементов в модели они более точны. При этом, конечные элементы первого порядка более стабильны, что сказывается на сходимости решения. В случае моделирования больших деформаций принято использовать треугольные конечные элементы первого порядка как более стабильные (Kokcharov, Vurov, 2013).

Еще одним условием и сложностью правильного создания сетки является формирование контактных пар. Контактная пара состоит из двух поверхностей – контактной и целевой, разделяемых в зависимости от

степени деформации, перемещения и формы. Приуроченность объекта к конкретному типу определяет плотность сетки при его моделировании. Контактные поверхности претерпевают большие перемещения или деформации, либо имеют неровные поверхности и нуждаются в плотной сетке, целевые – находятся в стационарном положении и высокой плотности сетки не требуют.

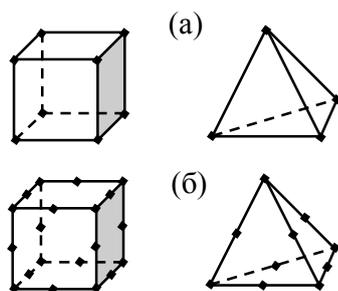


Рис. 14. Порядок элементов: а – элементы первого порядка, б – элементы второго порядка.

Для получения оптимальной сетки необходимо оценить ее качество и добавлять элементы только там, где это необходимо. Для оценки качества сетки существует ряд критериев (рис. 15).

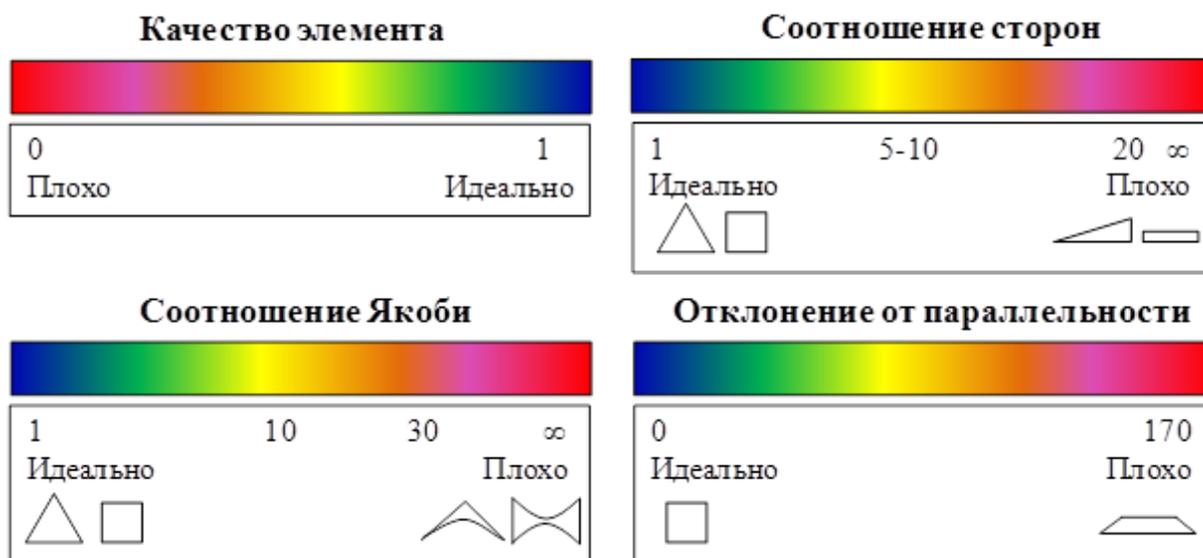


Рис. 15. Критерии качества сетки, характеризующие адекватность расчета модели.

Критерий «качество элемента» базируется на отношении объема к длине ребра элемента, «соотношение сторон» зависит от удлинения

элемента, «соотношение Якоби» основано на искривлении формы ребер, «отклонение от параллельности» характеризует только квадратные элементы.

Еще одним способом проверки качества сетки и адекватности расчета служит выявление участков с высокой степенью ошибки вычислений. Отображение ошибки показывает распределение значений энергии соседних элементов (в случае появления элементов с высокой степенью ошибки к улучшению результатов может привести сгущение сетки).

Метод конечных элементов широко используется для решения задач механики деформируемого твёрдого тела, теплообмена, гидродинамики и электродинамики. Однако развитие этого метода применительно к биологическим системам (в частности, к формированию клеточной стенки) до сих пор находится в зачаточном состоянии. В большинстве работ клеточная стенка рассматривается в виде однородного материала. Исключение составляют работы Kha et al (2010) и Yi и Puri (2012). Kha с соавторами рассматривают первичную клеточную стенку растений как сеть из целлюлозы и гемицеллюлоз, ими была создана программа WallGen, осуществляющая стохастическую самосборку клеточной стенки и позволяющая на основе модулей упругости, размеров микрофибрилл и гемицеллюлозных цепей, молекулярной массы гемицеллюлоз, расположения микрофибрилл и объемной доли полимеров в сети производить расчеты механических изменений в наноструктуре, которые могут произойти в естественных условиях. В работе Yi и Puri (2012) метод конечных элементов был применен для изучения гипотезы связывания гемицеллюлоз и микрофибрилл целлюлозы как одного из основных механизмов растяжения первичной клеточной стенки в ходе роста клетки. Метод конечных элементов позволил произвести расчет напряжений, которые создаются при формировании и растяжении первичной клеточной стенки. Эти работы послужили первыми примерами

использования метода конечных элементов для моделирования свойств клеточных стенок, напрямую связанных с их физиологическими функциями.

Метод конечных элементов может быть полезным для понимания механизмов функционирования желатинозных клеточных стенок. В настоящее время остается непонятным, как рамногалактуронан I, полисахарид, характерный, главным образом, для первичных клеточных стенок и не образующий в них плотных структур, подобных гелю (Уаро, 2011), способен играть роль «запечатанного» полисахарида при формировании третичной клеточной стенки и приводить к натяжению микрофибрилл целлюлозы. В нашем исследовании мы попытались установить особенности структуры, а также физико-химических и механических свойств ткане- и стадияспецифичного рамногалактуронана I и смоделировать его участие в процессах, происходящих в клеточной стенке желатинозных волокон льна.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. 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 естественной освещенности и ежедневном поливе. Для извлечения рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку использовали растения на стадии быстрого роста (27 дней после посева); средняя высота растения в этот период составляла 22 ± 2 см. Для извлечения рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку использовали высушенные растения на стадии желтой спелости (100 дней после посева).

2.2. Выделение рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку

Для выделения рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку использовали волокнистую часть 10-ти сантиметровых участков стебля льна ниже точки слома, где волокна формируют желатинозную клеточную стенку. Рамногалактуронан I выделяли из волокнистой части стебля как высокомолекулярный полимер, попадающий в супернатант при гомогенизации ткани в 50 мМ NaOAc буфере, pH 5.5. Полученный при растирании ткани в буфере гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об/мин. Надосадочную жидкость фильтровали, кипятили 10 мин для инактивации эндогенных ферментов, центрифугировали в течение 10 мин при 8000 об/мин и фильтровали. Содержащиеся в осветленном

гомогенате полимеры осаждали этанолом до конечной концентрации 80%, осадок высушивали и перерастворяли в деионизованной воде.

Для очистки рамногалактуронана I от других полимеров, попадающих в супернатант при гомогенизации ткани в буфере, использовали гель-проникающую хроматографию на колонке с сефарозой CL-4B (12×400 мм, Pharmacia, Швеция) с эффективной областью разделения для полисахаридов в диапазоне масс от 30 до 2000 кДа. Элюцию проводили 0.01 М раствором пиридина и уксусной кислоты. Скорость элюирования 0.25 мл/мин. Объем собираемых фракций 1 мл. Постороение хроматограмм осуществляли по соотношению объема элюции и содержанию углеводов во фракциях. Содержание углеводов определяли с помощью фенол-сернокислого метода Дюбуа (Dubois et al., 1956), исходя из значений оптической плотности каждой фракции при 490 нм.

Область выхода рамногалактуронана I приходилась на 5-11 мл элюции после 8 мл свободного объема колонки, что соответствовало диапозону молекулярных масс 700-2000 кДа (Gorshkova et al., 1996; Gorshkova, Morvan, 2006). Объединенные фракции (5-11) высушивали на ротормном испарителе досуха при температуре воды в водяной бане 50-60°C. Для всех дальнейших экспериментов образец перерастворяли в деионизованной воде.

2.3. Выделение рамногалактуронана I волокон льна после встраивания в клеточную стенку

Для выделения рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку использовали пучки волокон высушенных растений льна на стадии желтой спелости. Изолированные пучки волокон аккуратно измельчали в ступке с избытком воды. Гомогенат промывали ацетоном и кипятили в смеси хлороформа и этанола (1:2). Рамногалактуронан I после встраивания в клеточную стенку выделяли как полимер, прочно

удерживаемый микрофибриллами целлюлозы. Для удаления матричных полисахаридов, слабо удерживаемых микрофибриллами целлюлозы гомогенат кипятили на водяной бане в 1% оксалате аммония (рН 5.0) в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 10000 об/мин; полученный осадок растворяли и выдерживали в 4 н. КОН+3% H_3BO_4 в течение 2 ч с последующим центрифугированием в течение 6 мин при 10000 об/мин. Все супернатанты удаляли. Осадок отмывали водой до нейтрального рН.

Прочно удерживаемые микрофибриллами целлюлозы полисахариды получали по методике, разработанной Гурьяновым с соавторами (Gurjanov et al., 2008), основанной на обработке целлюлозы органическим растворителем, способствующим переходу нативной целлюлозы I в целлюлозу II, подвергающейся гидролизу целлюлазой. Для полного разрушения микрофибрилл целлюлозы использовали 8% раствор LiCl (Merck, Германия) в обезвоженном на молекулярных ситах (4Å, Sigma, Германия) N,N-диметилацетамиде (AppliChem, Германия) и целлюлазу (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustriie S.A., Франция; 750 EGU/G).

Навеску LiCl (40 г) сушили при 180°C в течение 4-5 ч, добавляли 500 мл обезвоженного на молекулярных ситах ДМА и растворяли на шейкере в течение ночи. Осадок, полученный после обработки 0.5% оксалатом аммония и 4 н. КОН (5 г), отмывали водой в течение часа и дважды ацетоном в течение 40 мин. Полученный материал, содержащий целлюлозу и прочно удерживаемые целлюлозой полимеры, заливали 50 мл ДМА на 1 ч, затем центрифугировали и заливали свежей порцией ДМА (50 мл) и выдерживали на шейкере в течение ночи. После чего, раствор центрифугировали и растворяли полученный осадок в растворе ДМА с LiCl на шейкере в течение 3 суток. Полученный раствор по каплям приливали в воду из соотношения вода:раствор – 1:1 и перемешивали. Смесь выдерживали ночь на шейкере, а затем промывали водой 4 раза.

Объединенные супернатанты собирали, диализовали в мешках с диаметром пор 12 000 и концентрировали на роторном испарителе при температуре воды в водяной бане 50-60°C (ДМА I).

Осадок, оставшийся после отделения фракции ДМА I, гидролизовали целлюлазой (Cellusoft-L; Novo Nordisk Bioindustriie S.A., Франция; 750 ед. акт./г) в течение 48 ч, при 37°C (ДМА II). Инкубацию проводили в 250 мл 0.01 М NaOAc буфере с добавлением 0,02% NaN₃ (pH 5.2), объем целлюлазы – 0.5 мл. Процедуру проводили дважды. Фермент инактивировали кипячением раствора на водяной бане в течение 5 мин. Фракции ДМА I и ДМА II объединяли и обессоливали на колонке с сефадексом G₂₅ (19×400 мм, Pharmacia, Швеция, скорость элюирования 1.1 мл/мин) по схеме: сбор 20 мл после 28 мл слива (фракция полимеров, прочно удерживаемых микрофибриллами целлюлозы).

Очистку рамногалактуронана I, составляющего основной объем полученной фракции полимеров, проводили с помощью гель-фильтрации на колонке с сефарозой CL-4B (12 × 400 мм, «Pharmacia», Швеция) при тех же условиях, что использовались для разделения полимеров, попадающих в буфер при гомогенизации ткани (раздел 2.2).

Область выхода рамногалактуронана I приходилась на 5-26 мл элюции после 8 мл свободного объема колонки, что соответствовало диапозону молекулярных масс 100-400 кДа (Gurjanov et al., 2008; Mikshina et al., 2012). Объединенные фракции (5-26) высушивали на роторном испарителе досуха при температуре воды в водяной бане 50-60°C. Для всех дальнейших экспериментов образец перерастворяли в деионизованной воде.

2.4. Коммерческие препараты полисахаридов

Для установления особенностей тканеспецифического рамногалактуронана I, определяющих функциональную пригодность этого

полисахарида как элемента третичной клеточной стенки желатинозных волокон, во всех экспериментах проводили сопоставление этого полисахарида, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, с рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля (Megazyme, Ирландия). Этот полисахарид сходен с рамногалактуронаном I клеточной стенки волокон льна по составу и времени элюции при гель-фильтрации, но кардинально отличается по локализации и выполняемой функции.

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

В качестве стандартов в ряде экспериментов были использованы коммерческие препараты пуллуланов с молекулярными массами 1660, 380, 186, 100 и 48 кДа (Showa Denko, Япония) с низким индексом полидисперсности (1.09–1.19).

2.5. Моносахаридный анализ

Разделение и детектирование моносахаридов проводили с помощью метода высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPLC) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США), используя импульсный амперометрический детектор (Dionex, США). Скорость элюирования 1 мл/мин. Температура колонки 30°C. Элюенты: А – 15 мМ NaOH, В – 100 мМ NaOH в 1 М NaOAc. Градиентное элюирование проводили следующим образом: 0-20 мин А-100%; 20-21 мин А-90%, В-10%; 21-31 мин А – 70%, В – 30%; 31-41 мин В-100%; 41-70 мин А-100%.

Для определения моносахаридов перед хроматографированием образцы гидролизовали 2 М ТФУ при 120°C в течение 1 ч, высушивали и для ввода перерастворяли в деионизованной воде. Содержание моносахаридов в образцах определяли по калибровочным кривым,

полученным для стандартов. Перед вводом стандарты моносахаридов гидролизовали при тех же условиях, что и образцы. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения PeakNet.

2.6. Получение гелей из рамногалактуронанов I

Для получения гелей из рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля было использовано три подхода (Gulrez et al., 2011):

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

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.

2.7. Одноосное сжатие гелей

Измерения проводили с помощью 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). После установки груза на гелевый блок систему выдерживали в течение 20 с до прихода в равновесное состояние, после чего фиксировали величину установившейся

нагрузки. 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.

2.8. Динамическое рассеяние света

Образцы рамногалактуронанов I и пуллуланов растворяли в деионизованной воде, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин и пропускали через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм. Размер частиц определяли на приборе Zetasizer Nano при 30°C с использованием He–Ne лазера при длине волны 633 нм. Измерения проводили в режиме обратного рассеяния при положении детектора под углом 173°. Определение гидродинамического радиуса частиц углеводов проводили в диапазоне концентраций от 0,025 до 5 мг/мл в 10 повторностях. Анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Malvern DTS, версия 5.0.

2.9. 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) H₂O или D₂O. Температура подготовки образцов и измерений составляла 25°C.

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-Д обмена.

2.10. ЯМР спектроскопия

Для обмена протонов гидроксильных групп на дейтерий образцы рамногалактуронанов I (10-20 мг) растворяли в D_2O (99,9% Ferak, Германия), высушивали досуха и перерастворяли в D_2O (99,994%, Aldrich, США).

^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, TOCSY и NOESY спектры записывали на ЯМР-спектрометре AVANCE III 600 МГц (Bruker, Германия) при 303 К, используя стандартные протоколы экспериментов с подавлением сигнала от воды. Обработку и анализ данных осуществляли с использованием программного обеспечения Topspin 2.1 (Bruker, Германия).

2.11. Ферментативный гидролиз рамногалактуронанов I

Для гидролиза остова и боковых цепей рамногалактуронанов I использовали высокоочищенные и хорошо охарактеризованные препараты

эндо-1,4- β -D-галактаназы из *Aspergillus aculeatus* (Novo-Ferment A.G., Basel., Switzerland), рамногалактурон гидролазы из *Aspergillus aculeatus* (Novo Nordisk, A/S), любезно предоставленные Н. А. Schols (Вагенингенский университет, Нидерланды).

Для дополнительной очистки ферментов от солей 2 мг препарата растворяли в 0.5 мл 0.01 М NaOAc буфера с добавлением 0,02% NaN₃, pH 5.0 и пропускали через колонку с сефадексом G₂₅ (Bio-Rad, США). Элюцию проводили тем же буфером. Содержание белка определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

Перед гидролизом ферментами рамногалактуронаны I сапонифицировали. Для этого 5 мг рамногалактуронана I растворяли в 0.1 мл деионизованной воды и 0.1 мл 0.06 М NaOH. Выдерживали полученный раствор в течение 2-3 ч при 4°C и нейтрализовали 0.2 мл 0.03 М уксусной кислоты. Объем доводили до 1 мл 0.03 М NaOAc буфером, pH 5.0.

Инкубацию полисахаридов с ферментом (25 мкг белка на 5 мг субстрата) проводили при 40°C в течение 48 ч на термостатируемом шейкере-инкубаторе IS-971R (Jeio Tech, Корея) при 120 об/мин. Реакцию останавливали кипячением раствора на водяной бане в течение 10 мин.

Гидролизаты, полученные после обработки ферментами, хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (12×400 мм, Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили 0.01 М раствором пиридина и уксусной кислоты. Скорость элюирования 0.25 мл/мин. Объем собираемых фракций – 1 мл.

Во всех экспериментах определение содержания углеводов проводили с помощью фенол-сернокислого метода Дюбуа (Dubois et al., 1956).

2.12. Химический гидролиз (β -элиминирование) рамногалактуронанов I

Реакцию β -элиминирования остова рамногалактуронанов I проводили по методике Deng с соавторами (2006). Для повышения эффективности β -элиминирования в водной среде остов рамногалактуронанов I предварительно метилировали по карбоксильной группе. Для этого 20 мг полисахарида растворяли в 320 мкл деионизованной воды (в стеклянной пробирке с притертой крышкой), затем приливали 4 мл диметилсульфоксида (AppliChem, Германия), содержащего 40 мг тетрабутиламмония фторида (Fluka, Швейцария) и 20 мкл йодистого метана (Sigma, США). Полученный раствор перемешивали на шейкере в горизонтальном положении в течение 16-18 часов при комнатной температуре. После инкубации в реакционную смесь приливали 12 мл охлажденной деионизованной воды. Полученный раствор центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин для удаления йода. Супернатант подвергали диализу (12000-14000 Да) в течение 48 часов. Раствор высушивали на роторном испарителе досуха при температуре воды в водяной бане 50-60°C. Для удаления следов тетрабутиламмония фторида проводили обессоливание на колонке с сефадексом G₂₅. Элюцию проводили 0.01 М раствором пиридина и уксусной кислоты. Раствор высушивали досуха. Для реакции β -элиминирования раствор метилированного остова (10мг) нагревали при 155°C в 5 мл 0.2 М боратного буфера (pH 7.3) в течение 150 мин в завинчивающейся пробирке. Реакцию останавливали погружением пробирки в холодную воду.

Полученные продукты гидролиза хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (12×400 мм, Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили 0.01 М раствором пиридина и уксусной кислоты. Скорость элюирования 0.25 мл/мин. Объем собираемых фракций 1 мл. Определение содержания

углеводов проводили с помощью фенол-сернокислого метода Дюбуа (Dubois et al., 1956).

2.13. 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, расположенный между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке (0,3 МПа) (Zimmermann et al., 1980). 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 (Perez, Mazeau, 2005; Ioelovich, 2008) модуль Юнга – 130 ГПа (Sturcova et al., 2005), коэффициент Пуассона – 0,4 (Bos, 2004). Необходимые для построения модели параметры рамногалактуронана I (модуль Юнга, коэффициент Пуассона, константы Муни–Ривлина) были получены из результатов экспериментов по одноосному сжатию; диаметр рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна – из результатов по динамическому рассеянию света.

2.14. Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных математических методов (расчет среднеквадратического отклонения, сравнение средних по критерию Стьюдента) средствами программ Microsoft Excel-2010. Критерий вероятности $P < 0.05$ принимали

достаточным для достоверной разницы опытной и контрольной групп данных.

ГЛАВА 3

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Механические свойства рамногалактуронанов I

Основная физиологическая роль рамногалактуронана I в третичной клеточной стенке желатинозных волокон состоит, по всей видимости, в обеспечении эффективного натяжения микрофибрилл целлюлозы и, как следствие, в формировании контрактильных свойств растительных волокон (Горшкова и др., 2010; Mikshina et al., 2013). Согласно гипотезе о механизме создания натяжения в желатинозной клеточной стенке латерально взаимодействующие микрофибриллы целлюлозы «запечатывают» между собой полисахарид матрикса (Mellerowicz et al., 2008). Для обеспечения натяжения микрофибрилл упруго-пластические свойства захваченного ими полисахарида должны позволять ему выдерживать значительное давление, оказываемое на микрофибриллы при отложении слоев клеточной стенки (тургорное давление 0.3 – 1 МПа (Zimmermann et al., 1980)), и не подвергаться при этом существенным деформациям.

Ключевыми параметрами, характеризующими упруго-пластические свойства материалов, служат модуль Юнга и коэффициента Пуассона и связь между напряжением и деформацией. Эти характеристики могут быть получены по результатам экспериментов по одно-, двух- или трехосному сжатию/растяжению. Оценка этих величин позволяет установить характер упругости материала и определить к какому классу он относится, а также выявить возможность его участия в выполнении той или иной функции в изучаемом объекте. Одной из возможностей характеристики механических свойств полимеров является создание гелей на их основе.

3.1.1. Установление гелеобразующей способности рамногалактуронанов I

Гелеобразование является одним из важных свойств пектиновых молекул. С химической точки зрения для пектинов общепринято два ключевых способа гелеобразования. Оба способа основаны на образовании зон взаимодействия между остатками GalpA цепей. Принято считать, что рамногалактуронаны I, в структуре которых отсутствуют протяженные участки полигалактуроновой кислоты, гелей не формируют (Уаро, 2011). Однако функционирование рамногалактуронана I желатинозных волокон в условиях высокого давления предполагает особые механические свойства этого полисахарида, отличные от традиционных вариантов рамногалактуронанов I, характерных для первичных клеточных стенок.

Способность к гелеобразованию сравнивали у трех рамногалактуронанов: 1) рамногалактуронана I, выделяемого из клеточной стенки волокон льна после растворения целлюлозы; 2) рамногалактуронана I волокон льна, выделяемого до встраивания в клеточную стенку; и 3) типичного представителя рамногалактуронана I первичной клеточной стенки – коммерческого препарата, выделенного из картофеля и используемого в качестве контрольного варианта. Характеристики состава этих полимеров приведены в опубликованных ранее работах (Gurjanov et al., 2007, 2008; Mikshina et al., 2012), а также в главе 3.2.3.1, посвященной установлению особенностей их структуры. Рамногалактуронаны I льна и картофеля, полученные из клеточных стенок, имеют сходное время элюции при гель-фильтрации, а полимер, выделенный из волокон льна до встраивания в клеточную стенку, элюируется в значительно более высокомолекулярной области и имеет существенно более высокое соотношение Gal/Rha. Для получения гелей из этих полимеров было использовано три подхода формирования физических гелей (Gulrez et al., 2011):

1) Насыщение водой сухого препарата полисахарида до образования гидрогеля. Такой метод формирования геля предполагает, что полисахарид был выделен в форме геля, и гидратация возвращает его исходную форму.

2) Нагрев на водяной бане раствора полисахарида до 80-90°C с последующим охлаждением. При повышении температуры цепи полимера способны физически запутываться с образованием трехмерной сети, а последующее охлаждение приводит к полимеризации.

3) Выдерживание в микроволновой печи раствора полисахарида с последующим охлаждением. Этот способ формирования геля отличается от стандартного нагрева на водяной бане действием электромагнитных волн на присутствующую в растворе воду.

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°C вне зависимости от концентрации полисахаридов. Такое поведение полисахаридов при этом подходе может объясняться тем, что даже если рамногалактуронаны I в клеточных стенках существуют в форме геля, то после многочисленных химических обработок в ходе выделения (разделы 2.2 – 2.4) они перестают пребывать в гелеподобном состоянии. Однако свойства формируемых рамногалактуронанами I льна и картофеля структур при насыщении водой визуально отличались: если рамногалактуронан картофеля растворялся полностью, то при тех же концентрациях рамногалактуронан, выделенный до встраивания в клеточную стенку, образовывал вязкий сироп, а рамногалактуронан клеточной стенки – гелеподобные зернистые пасты.

Аналогичные результаты были получены при нагреве полисахаридов на водяной бане. Способ, подходящий для получения геля

из линейных полисахаридов, таких как агароза (Griess et al., 1998), в случае рамногалактуронанов I не вызвал ожидаемого результата.

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, который образовал рамногалактуронан, выделенный до встраивания в клеточную стенку, был более мягким, чем гель, полученный из рамногалактуронана клеточной стенки. Состояние рамногалактуронана I картофеля после нагревания в микроволновой печи не изменялось. К образованию геля из этого полисахарида не приводили ни последующее охлаждение образца и выдерживание при +4°C, ни добавление Ca^{2+} (0.62 мМ, Kastner et al., 2012) в раствор полисахарида, ни максимальное повышение его концентрации путем высушивания. Во всех случаях для рамногалактуронана картофеля выявлялось только два состояния: вязкий раствор или пленка.

Таким образом, для рамногалактуронанов I, на примере рамногалактуронанов I желатинозных волокон, впервые была выявлена способность к образованию прочных физических гелей, формирующихся при воздействии электромагнитным излучением. Получение геля из рамногалактуронана I позволяет извлечь информацию о базовых характеристиках упруго-пластических свойств этого полисахарида – модуле Юнга (физическая величина, характеризующая свойства материала сопротивляться растяжению/сжатию при упругой деформации) и коэффициенте Пуассона (величина отношения относительного поперечного сжатия к относительному продольному растяжению), необходимых для формирования картины создания натяжения в клеточной стенке желатинозных волокон.

3.1.2. Характеристика упруго-пластических свойств гелей из рамногалактуронанов I

Гидрогели из-за их упруго-пластических свойств можно отнести к эластомерам (раздел 1.3.1). В зависимости от способа формирования (физический или химический) и полученной структуры (однородная или гетерогенная) гидрогели могут характеризоваться как изотропные, так и анизотропные материалы (Obolonkova et al., 1974; Hudson, 2011). Гели из рамногалактуронана I были получены физическим способом и имели однородную структуру, что говорит в пользу отнесения их к изотропным материалам, т.е. их свойства не должны меняться в зависимости от направления воздействия. Для характеристики механических свойств полисахаридного геля нами был выбран метод одноосного сжатия.

По результатам одноосного сжатия геля из рамногалактуронана I волокон льна была установлена зависимость степени деформации этого полисахарида от величины оказываемого на него давления, а также рассчитаны его модуль Юнга и коэффициент Пуассона.

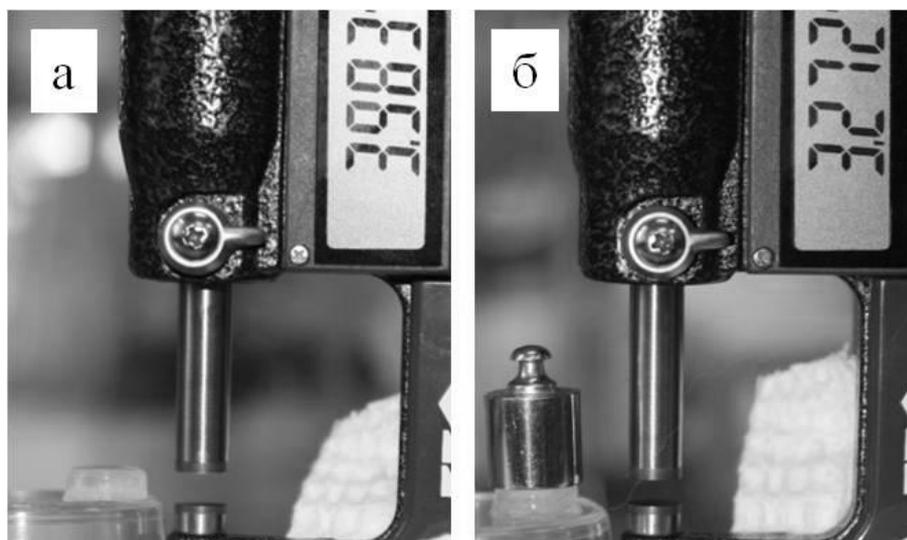


Рис. 16. Установка для экспериментов по одноосному сжатию. Гелевый блок рамногалактуронана I клеточной стенки с соответствующими показаниями микрометра до (а) и после (б) оказания давления.

Параметры воздействий на гели из рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, представлены в таблице 1. Из данных таблицы видно, что гели, полученные из исследуемых полимеров, имеют различную деформацию при одинаковых нагрузках.

Табл. 1. Характеристика деформации геля из рамногалактуронанов I волокон льна 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	
			Рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку	Рамногалактуронан I после встраивания в клеточную стенку
0	0	0	0±0	0±0
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

Полученные данные позволили построить кривые зависимости деформации от давления, которые служат важной характеристикой упруго-пластических свойств материала. Деформационные кривые для гелей из рамногалактуронанов I желатинозных волокон имели вогнутую форму (рис. 17), что свидетельствует о том, что гели из рамногалактуронанов относятся к гиперэластичным материалам (раздел 1.3.1).

В ходе эксперимента было обнаружено, что 4% гели из рамногалактуронана I, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, восстанавливают исходную высоту гелевого блока после снятия нагрузки, т.е. обладают упругой деформацией. Такая деформация исчезает после прекращения действия на тело внешних сил, при этом тело принимает первоначальные размеры и форму (Ландау и Лифшиц, 1987).

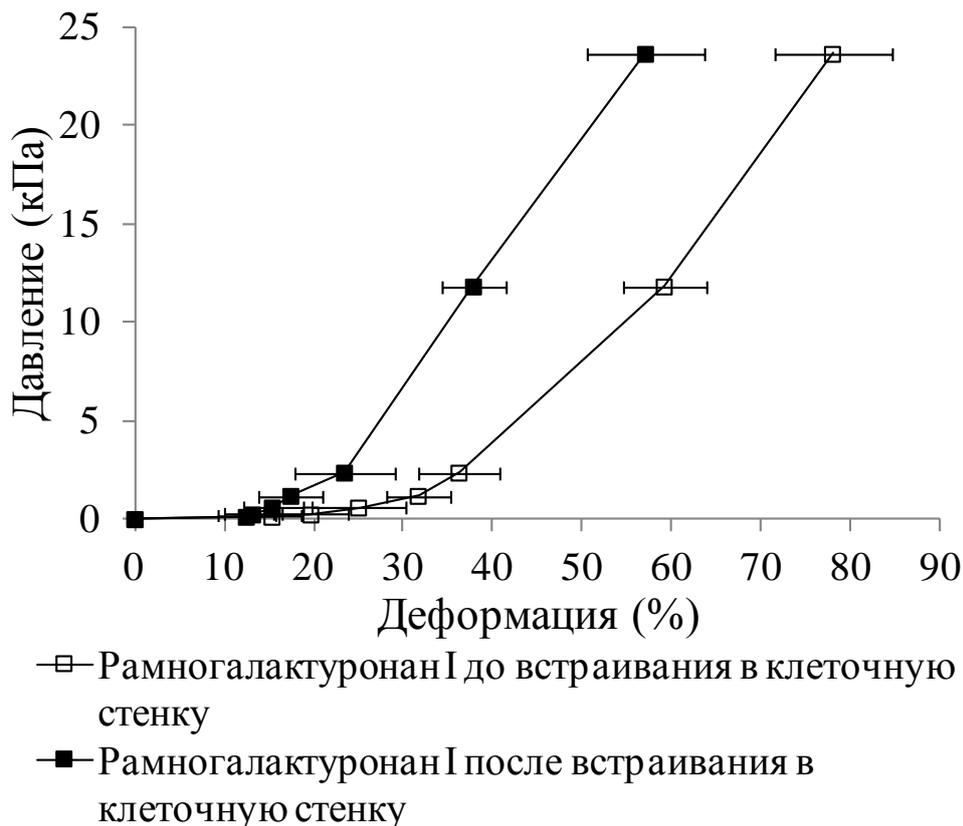


Рис. 17. Кривые зависимости деформации гелевых блоков образцов рамногалактуронанов I желатинозных волокон от давления.

Параметры, полученные из экспериментов по одноосному сжатию, позволили рассчитать модуль Юнга и коэффициент Пуассона, определенные согласно формулам (2) и (3).

$$E = \frac{Fl}{S\Delta l}, \quad (2)$$

где E – модуль Юнга, F – сила, приложенная к гелевому блоку, S – площадь поверхности геля, 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 высота l).

$$\mu = \left| \frac{\varepsilon'}{\varepsilon} \right|, \quad (3)$$

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

Модуль Юнга и коэффициент Пуассона составили для геля из рамногалактуронана до встраивания в клеточную стенку 9.3 кПа и 0.495 и для геля из рамногалактуронана после встраивания в клеточную стенку 13.7 кПа и 0.483, соответственно. Данные, полученные с помощью эксперимента по одноосному сжатию (наличие упругой деформации, вогнутый характер кривых зависимости деформации от давления, низкие значения модуля Юнга и значения коэффициента Пуассона выше 0.48), свидетельствуют о том, что гели из рамногалактуронанов I волокон льна представляют собой гиперэластичный материал (Robertson et al., 2007).

Таким образом, рамногалактуронаны I желатинозных волокон отличает нехарактерная для рамногалактуронанов I первичной клеточной стенки способность формировать гиперэластичные физические гели. Такая особенность продемонстрирована для рамногалактуронанов I впервые и, судя по всему, лежит в основе функциональной пригодности этих полисахаридов, как необходимых элементов для формирования натяжения микрофибрилл целлюлозы в третичных клеточных стенках желатинозных волокон. Обеспечивать гелеобразующую способность рамногалактуронана I могут: а) элементы структуры и особенности организации этого полисахарида; б) факторы его микроокружения, на роль ключевого из которых при формировании физических гелей используемыми в работе способами претендуют молекулы воды. В связи с этим следующий этап работы посвящен выявлению физико-химических параметров рамногалактуронана I, сопряженных с формированием его надмолекулярной структуры и способностью к образованию сильных физических гелей.

3.2. Физико-химические параметры рамногалактуронанов I, сопряженные с формированием надмолекулярной структуры

Для установления физико-химических параметров рамногалактуронанов I желатинозной клеточной стенки, сопряженных с формированием надмолекулярной структуры этих полисахаридов, и необходимых для реализации механизма создания натяжения в клеточной стенке было охарактеризовано поведение этих полисахаридов в растворе, выявлены особенности их сорбционных свойств по отношению к воде, включая оценку доступности ОН-групп рамногалактуронанов I растворителю, и определены их структурные особенности, которые могут обеспечивать способность к самоассоциации. Во всех экспериментах, как и при установлении механических свойств рамногалактуронанов I (раздел 3.1), в качестве ключевого подхода для сопряжения установленных параметров и свойств рамногалактуронанов I с функциональной пригодностью проводили сопоставление рамногалактуронанов I волокон льна, формирующих клеточную стенку желатинозного типа с рамногалактуронаном I из тонкой первичной клеточной стенки картофеля.

3.2.1. Гидродинамические свойства и агрегирование рамногалактуронанов I

Для получения информации о гидродинамических свойствах рамногалактуронанов I льна в работе было использовано динамическое рассеяние света – один из основных подходов, позволяющих оценить коэффициенты самодиффузии и, соответственно, установить гидродинамические радиусы частиц в разбавленных и концентрированных растворах.

Для контроля всех этапов анализа образцов, а также для получения уравнений зависимости между коэффициентом самодиффузии, рассчитанным по соотношению Стокса-Эйнштейна (уравнение 1), и молекулярной массой в работе были использованы хорошо охарактеризованные ранее (Nishinari et al., 1991; Viel et al., 2003) коммерческие препараты пуллуланов (Showa Denko, Japan) с молекулярными массами 1660, 380, 100 и 48 кДа и низким индексом полидисперсности (от 1.09 до 1.19).

Ранее для рамногалактуронана I волокон льна была выявлена необычная способность сохранять гидродинамический объем молекул при существенном уменьшении молекулярной массы (Gur'janov et al., 2007; Микшина, 2009; Микшина и др., 2009). Уменьшение молекулярной массы в этих экспериментах достигалось в результате действия β -(1 \rightarrow 4)-галактаназы (Gur'janov et al., 2007; Микшина, 2009) или эндогенной β -(1 \rightarrow 4)-галактозидазы (Микшина и др., 2009), а сохранение гидродинамического объема оценивалось с помощью гель-фильтрации. В качестве одного из ключевых объяснений такой особенности рамногалактуронана I волокон льна была выдвинута идея о способности этого полисахарида формировать особые надмолекулярные структуры. Характеристика фрагмента, полученного после обработки галактаназой, время выхода которого при гель-фильтрации совпадает со временем выхода полисахарида до гидролиза этим ферментом, может способствовать расшифровке принципов формирования этих структур. В связи с этим, при изучении поведения рамногалактуронанов I в растворе с помощью динамического светорассеяния, эксперименты проводили как на исходных полисахаридах, так и на фрагменте, полученном после гидролиза рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна галактаназой (фрагмент Γ_1), который содержит весь остов полимера и часть боковых цепей (Gal/Rha снижается до 1.7, по сравнению с 3.8 в исходном полимере, табл. 2).

Табл. 2. Моносахаридный состав рамногалактуронанов I, моль%

	Rha	Ara	Gal	Glc	GalA	Gal/Rha
Рамногалактуронан I картофеля	8	4	71	2	15	8.9
Рамногалактуронан I волокон льна до встраивания в клеточную стенку	4	2	89	1	4	22.3
Рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна	17	3	64	1	15	3.8
Фрагмент Γ_1	23	6	40	2	29	1.7

Спектры флуктуаций рассеиваемой интенсивности света, полученные для пуллуланов и рамногалактуронанов I (рис. 18), свидетельствуют о том, что образцы не содержали частиц загрязнителей, что может стать причиной получения некорректных результатов, а также демонстрируют отсутствие термального градиента, агрегации или осаждения частиц в ходе измерения.

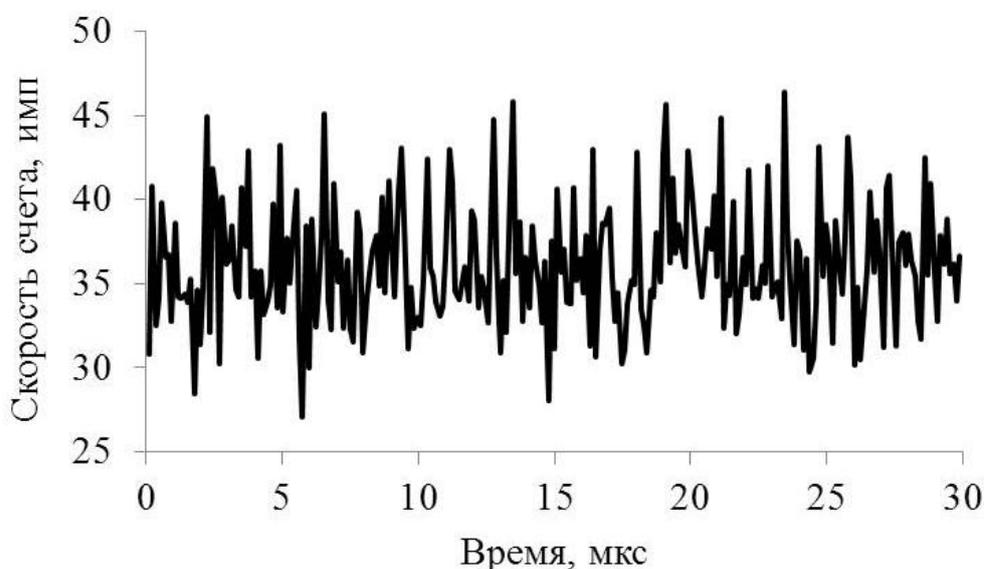


Рис. 18. Спектр флуктуаций рассеиваемой интенсивности света, полученный для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна.

Анализ автокорреляционных функций интенсивности излучения разбавленных образцов пуллуланов с помощью программного обеспечения Malvern DTS, 5.0 выявил присутствие одного типа частиц, мультимодального распределения не наблюдалось (рис. 19а). Для образцов рамногалактуронана I картофеля и рамногалактуронана I волокон льна после встраивания в клеточную стенку было выявлено присутствие двух типов частиц (рис. 19в, 19г), а для рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку – трех типов частиц (рис. 19б). Из-за сложности корректного разделения трех компонент, выявленных для рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до встраивания в клеточную стенку, дальнейшего анализа этого полисахарида с помощью динамического светорассеяния, подразумевающего определение гидродинамического радиуса частиц, не проводили.

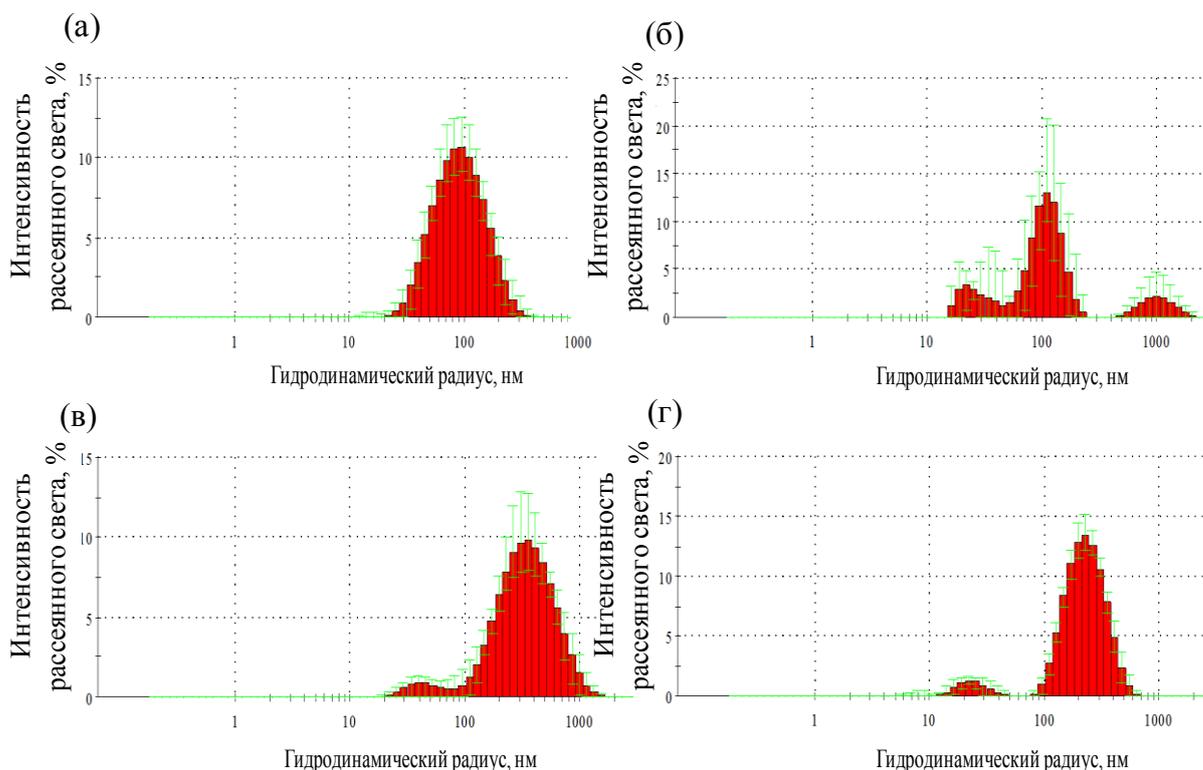


Рис. 19. Интенсивность света, рассеиваемого частицами пуллулана (а), рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку (б), рамногалактуронана I картофеля (в), рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (г) (по 10 повторностей). Приведены результаты для разбавленных растворов полисахаридов.

Обработка результатов, полученных для рамногалактронана I клеточной стенки волокон льна, а также его фрагмента, полученного после гидролиза галактаназой (Γ_1), подразумевала разделение вкладов двух компонент в интенсивность рассеянного частицами света по алгоритму, предложенному Шибаяма с соавторами для анализа мультимодального распределения (Shibayama et al., 2006).

Гидродинамические радиусы частиц в образцах рамногалактуронана I картофеля, рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и фрагмента Γ_1 определяли в диапазоне концентраций от 0.025 до 10 мг/мл; для установления истинных размеров частиц этих полисахаридов экстраполировали полученную кривую зависимости размера от концентрации образца на бесконечное разведение раствора.

Для определения веса каждой компоненты (w_1 и w_2) использовали формулу 4:

$$w_1 = \begin{cases} \frac{G(\Gamma_1)/R_1^3}{G(\Gamma_1)/R_1^3 + G(\Gamma_2)/R_2^3} & (qR_1, qR_2 \leq 1.78) \text{ (а)} \\ \frac{G(\Gamma_1)/R_1^3}{G(\Gamma_1)/R_1^3 + G(\Gamma_2)R_2 q^4 / 1.78^4} & (qR_1 < 1.78 \leq qR_2) \text{ (б)} \\ \frac{G(\Gamma_1)R_1}{G(\Gamma_1)R_1 + G(\Gamma_2)R_2} & (1.78 \leq qR_1, qR_2) \text{ (в)} \end{cases} \quad (4)$$

где w_i – вес компоненты, $G(\Gamma_i)$ – функция распределения скорости затухания ($\Gamma = \tau^{-1}$, где Γ – характеристичная скорость затухания, τ – время затухания), R_i – гидродинамический радиус частиц, q – величина вектора рассеяния, определенная по формуле (5).

$$q = (4\pi n/\lambda)\sin(\Theta/2) \quad (5)$$

где n – показатель преломления среды измерения, λ – длина волны лазера в вакууме, Θ – угол рассеяния света.

Для всех образцов, за исключением двух вариантов (при концентрациях 0.1 и 0.8 мг/мл) для фрагментов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, полученных при гидролизе галактаназой, значения qR_1 были меньше 1.78, а qR_2 – больше 1.78 (табл. 3). Следовательно, расчет веса каждой компоненты для всех образцов, за исключением двух обозначенных, проводили по формуле (4б), а для отмеченных фрагментов по формуле (4а). Функцию распределения скорости затухания определяли, исходя из амплитуды пиков интенсивности рассеянного частицами света по формуле (6).

$$G(\Gamma_1) = \frac{A_1(q)}{A_1(q) + A_2(q)} \delta(\Gamma - D_1 q^2)$$

$$G(\Gamma_2) = \frac{A_2(q)}{A_1(q) + A_2(q)} \delta(\Gamma - D_2 q^2) \quad (6)$$

где $A_i(q)$ – амплитуда пика интенсивности рассеянного частицей света, D_i – коэффициент самодиффузии частиц.

Полученные весовые величины для второй компоненты всех анализируемых образцов вне зависимости от их концентрации ничтожно малы (табл. 3); при высоких концентрациях рамногалактуронана I волокон льна (0.8 – 5 мг/мл) бимодального распределения вообще не наблюдалось. В связи с этим, при построении зависимости размеров частиц рамногалактуронанов I от концентрации этих углеводов в растворе (рис. 19), а также во всех дальнейших обсуждениях вторую компоненту не учитывали.

При экстраполяции кривых зависимости размера частиц от концентрации образца на бесконечное разведение наименьший гидродинамический радиус (~ 3.5 нм) выявляли для частиц фрагментов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, полученных после гидролиза полисахарида галактаназой (Γ_1); гидродинамический радиус

наименьших частиц рамногалактуронана I клеточных стенок клеток картофеля и волокон льна составил порядка 24-27 нм.

Табл. 3. Гидродинамические радиусы, фактор qR и весовые вклады двух компонент в общую интенсивность рассеяния света частицами рамногалактуронана I клеточной стенки картофеля, рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и фрагментов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, полученных после удаления значительной части галактановых цепей галактаназой (Γ_1), при различных концентрациях углеводов в образце.

Концентрация углеводов в образце, мг/мл	Рамногалактуронан I картофеля					
	R_1	R_2	qR_1	qR_2	w_1	w_2
0.025	29.2	238.7	0.77	6.29	0.98	3.3×10^{-3}
0.1	26.4	195.0	0.70	5.14	0.97	1.7×10^{-2}
0.4	31.0	182.7	0.82	4.81	0.98	8.6×10^{-3}
0.8	24.4	181.5	0.64	4.78	0.99	1.6×10^{-2}
5.0	27.9	201.0	0.74	5.29	0.97	1.2×10^{-2}
	Рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна					
0.025	24.4	203.0	0.64	5.35	0.99	6.3×10^{-3}
0.1	24.9	214.7	0.66	5.66	0.98	8.0×10^{-3}
0.2	22.5	225.3	0.59	5.93	0.99	7.6×10^{-3}
0.4	20.9	210.9	0.55	5.56	0.99	1.2×10^{-2}
0.8	216.3				1.00	
1.7	226.5				1.00	
2.5	250.1				1.00	
5.0	286.1				1.00	
	Фрагмент рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (Γ_1)					
0.1	3.5	37.0	0.09	0.97	0.99	9.8×10^{-6}
0.2	4.4	87.9	0.12	2.32	0.99	5.9×10^{-2}
0.8	2.9	30.1	0.08	0.79	0.99	7.8×10^{-6}
1.7	29.0	378.7	0.76	9.98	0.99	2.5×10^{-4}
5.0	35.0	396.4	0.92	10.44	0.99	6.7×10^{-5}
10.0	28.3	559.1	0.75	14.73	0.98	1.2×10^{-4}

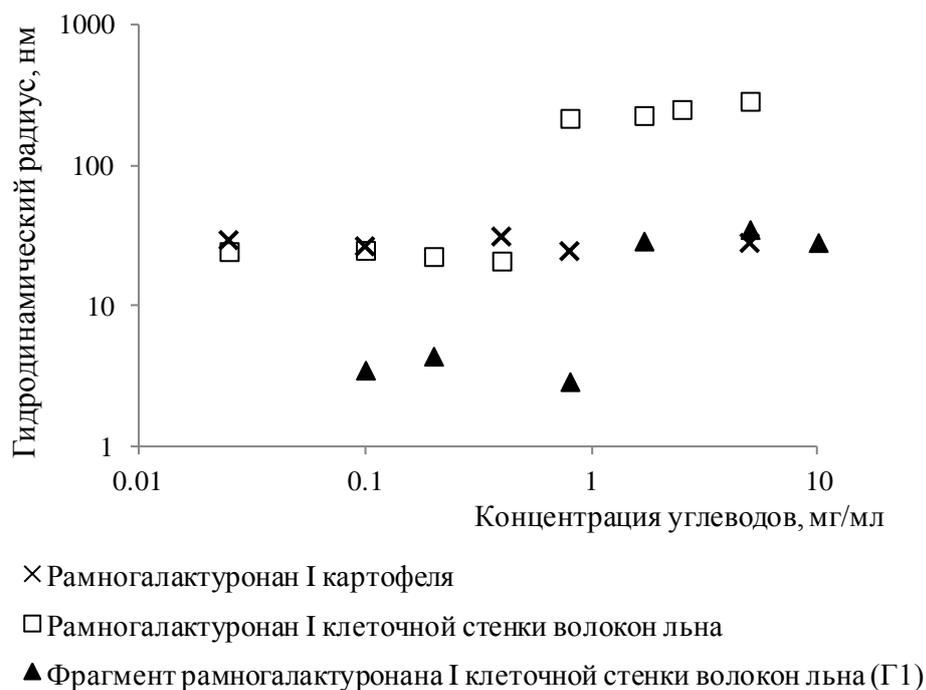


Рис. 20. Зависимость размеров частиц рамногалактуронанов I клеточных стенок волокон льна и клеток картофеля, и фрагментов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, полученных после удаления значительной части галактановых цепей галактаназой, от концентрации.

Для рамногалактуронана I картофеля при увеличении концентрации в растворе изменения гидродинамического радиуса не отмечалось. По мере увеличения концентрации рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, также как и его фрагмента Г₁, наблюдался скачкообразный переход (при концентрации 0.8-1.7 мг/мл), сопровождающийся практически десятикратным увеличением размера частиц: с 3.5 нм до 30 нм – для фрагмента Г₁, с 24 нм до 240 нм – для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (рис. 20). Такой резкий переход может объясняться способностью частиц рамногалактуронана I волокон льна к агрегированию.

Таким образом, с помощью динамического рассеяния света для образцов рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и его фрагмента, полученного после гидролиза галактаназой, было выявлено два

состояния частиц. Частицы имели меньшую подвижность и, соответственно, больший гидродинамический радиус при высоких концентрациях и большую подвижность и меньший гидродинамический радиус при разведении (рис. 20). Размеры и подвижность частиц рамногалактуронана I первичной клеточной стенки при изменении концентрации оставались постоянными, что свидетельствует об отсутствии способности этого полисахарида к самоагрегированию, в частности, при отсутствии в растворе каких-либо дополнительных компонентов.

Возможным объяснением картины, наблюдаемой при анализе рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и фрагмента этого полисахарида методом динамического рассеяния света, может быть наличие трех уровней организации молекул (рис. 21). Первый уровень («элементарное звено», рис. 21а) может быть выявлен только после удаления значительной части боковых цепей галактаназой. Такие структуры характеризуют фрагменты рамногалактуронана I льна в разбавленных растворах. Гидродинамический радиус частиц этого уровня составляет ~3.5 нм.

Второй уровень организации («ассоциат элементарных звеньев», рис. 21б) включает частицы высококонцентрированных растворов фрагмента и исходный рамногалактуронан I льна в разбавленных растворах. Гидродинамический радиус этих частиц составляет 24-27 нм. В формировании и поддержании стабильности ассоциатов, по всей видимости, принимают участие галактановые боковые цепи, поскольку удаление их значительной части приводит к распаду ассоциатов на «элементарные звенья» при разведении образца (фрагмент Γ_1).

Третий уровень – «агрегаты ассоциатов» (рис. 21в) – наблюдается только для высококонцентрированных растворов рамногалактуронана I клеточной стенки льна. Размер этих агрегатов достигает 250 нм. После гидролиза рамногалактуронана I галактаназой таких агрегатов не образуется, что предполагает участие в этом процессе галактановых цепей.

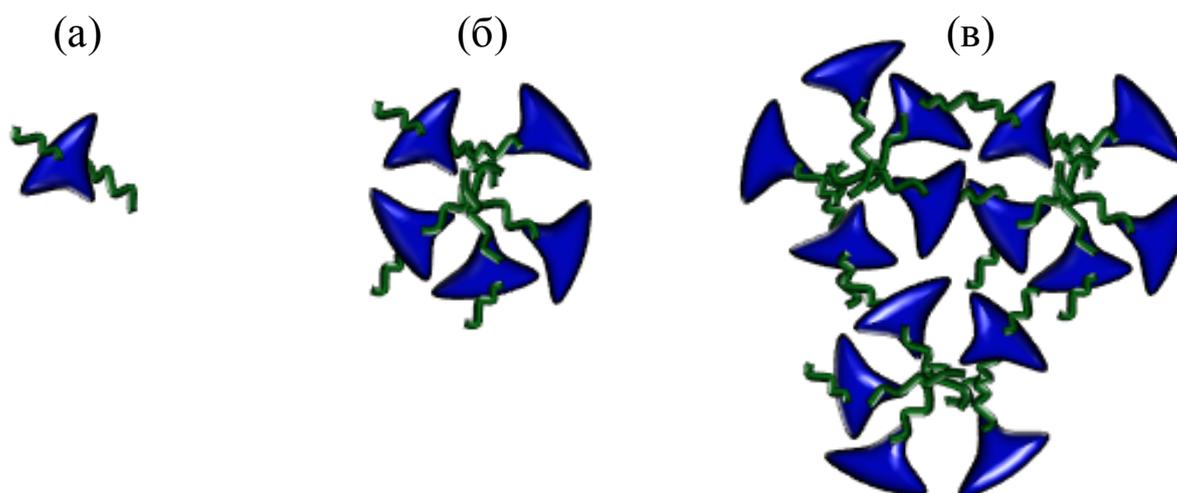


Рис. 21. Три уровня пространственной организации молекул рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна: а) «элементарное звено»; выявляется только для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна после удаления значительной части боковых галактановых цепей (фрагмент Γ_1), б) «ассоциат элементарных звеньев»; включает частицы рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна в разбавленных растворах и частицы высококонцентрированных растворов фрагмента Γ_1 , в) «агрегаты ассоциатов»; наблюдаются при высоких концентрациях рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна в растворе.

Переход между уровнями при простом разведении водного раствора, без внесения дополнительных реагентов, позволяет предполагать, что в формировании ассоциатов принимают участие молекулы воды. В связи с чем, следующий этап работы включал характеристику сорбционных свойств рамногалактуронанов I по отношению к воде.

3.2.2. Сорбционные свойства рамногалактуронанов I по отношению к воде

Для сопоставления сорбционных свойств рамногалактуронанов I, имеющих различную способность к агрегированию и гелеобразованию, по отношению к воде использовали ИК-спектроскопию. На рисунке 22 приведены спектры сухих и увлажненных пленок образцов

рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, и рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля. Спектры сорбированной воды получены посредством определения разности спектров сухого и влажного образцов. Сорбированную рамногалактуронанами I волокон льна и картофеля воду в зависимости от силы связывания с полярными группами полимера можно разделить на несколько групп. 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. 22). Положение максимумов обусловлено различиями в силе водородных связей, образуемых молекулами воды в матрице полисахарида (Sekine et al., 2014). В образцах рамногалактуронанов I волокон льна, выделенных до и после встраивания в клеточную стенку, относительная интенсивность и число компонент спектра легкоудаляемой воды практически одинаковы. Интенсивность поглощения воды в рамногалактуронане I картофеля 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 (Цундель, 1972). На высокое содержание ионизованных кислотных остатков в рамногалактуронане I картофеля 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 рамногалактуронане I картофеля меньше, чем в рамногалактуронанах I волокон льна.

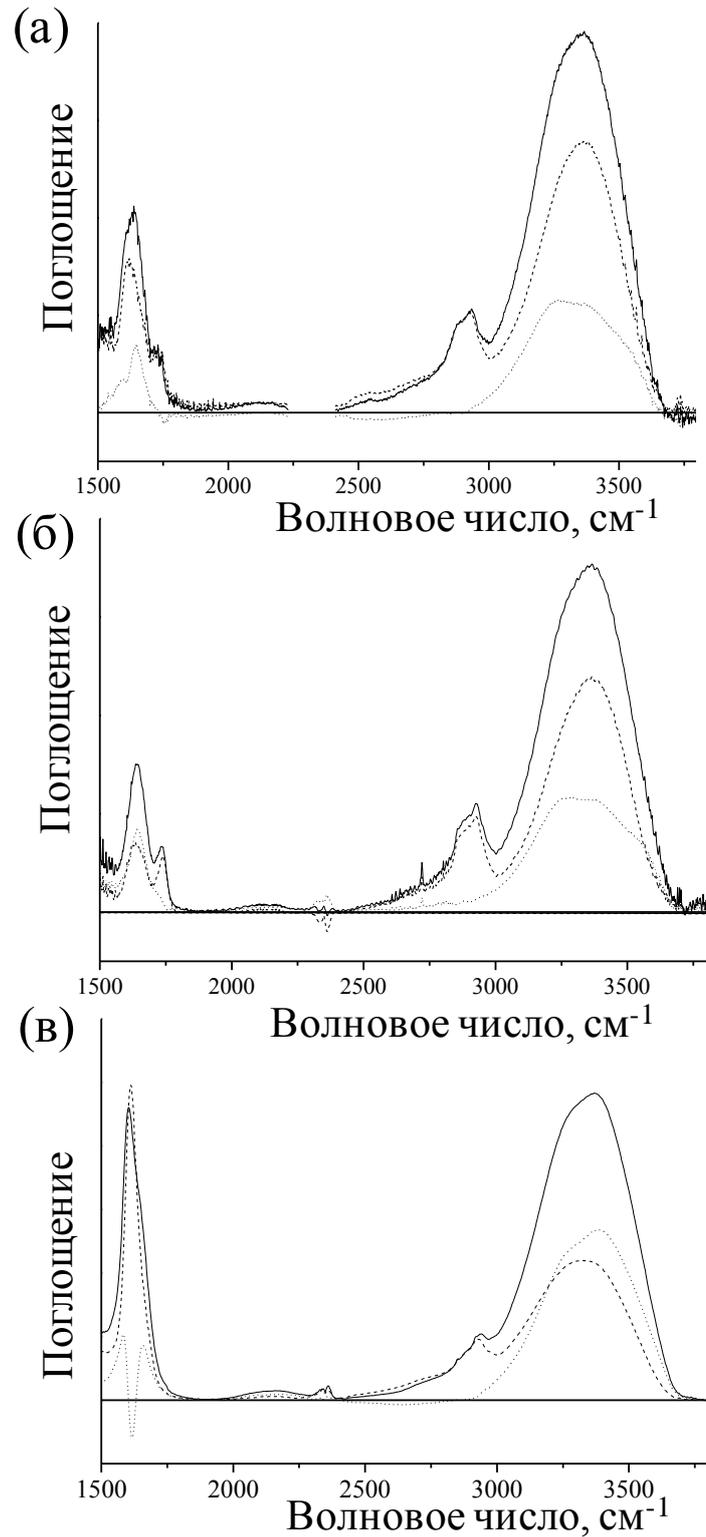


Рис. 22. ИК-спектры пленок образцов: а – рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, б – рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна, в – рамногалактуронан I картофеля. Тонкой штриховой линией обозначен сухой образец, сплошной линией – влажный, пунктиром – разность между спектрами влажного и сухого образцов.

Для оценки доступности ОН-групп рамногалактуронанов I растворителю определяли скорость и степень замещения протонов на дейтероны. Скорость замещения протонов в ОН-группах зависит от ряда факторов (Hofstetter et al., 2006), из которых наибольшее значение при прочих равных условиях имеют стерические ограничения, обусловленные водородным связыванием или плотностью пространственной упаковки полимерных цепей. На рисунке 23 приведены кинетические кривые Н-D обмена, представляющие собой зависимость интенсивности поглощения на частоте 3400 см^{-1} от времени экспозиции системы в парах D_2O для образцов рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до и после встраивания в клеточную стенку, и рамногалактуронана I картофеля. Зависимости аппроксимировали суммой трех экспонент, параметры аппроксимации приведены в таблице 4.

Табл. 4. Параметры аппроксимации кинетических кривых Н-D обмена экспоненциальными компонентами. Полоса валентных колебаний ОН-групп (3400 см^{-1}) в образцах рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до (РЛ) и после встраивания в клеточную стенку (РЛ_{КС}), и рамногалактуронана I картофеля (РК), 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
РЛ	0.68	13	0.32	77	-	-
РЛ _{КС}	0.34	10	0.53	58	0.13	840
РК	0.87	10	0.13	60	-	-

Количество и относительные веса компонент разложения для рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля существенно различаются. Так, для рамногалактуронана I волокон льна, выделенного до встраивания в клеточную стенку, и рамногалактуронана I картофеля параметры аппроксимации кинетических кривых Н-D обмена описываются двумя экспоненциальными компонентами, а для рамногалактуронана I

клеточной стенки волокон льна – тремя. Перекрывание полос поглощения ОН-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 таблице 4. Таким образом, наиболее быстро реакция обмена протонов протекает в молекулах слабосвязанной гидратной воды и, вероятно, в части гидратированных ОН-групп полисахаридов, не включенных в систему водородных связей. Более медленный обмен характерен для ОН-групп воды и полисахарида, задействованных в образовании водородных связей. Третья, наибольшая по величине постоянная времени, наблюдается только в образце рамногалатуронана I клеточной стенки волокон льна и описывает замещение протонов в крайне медленно обмениваемых ОН-группах.

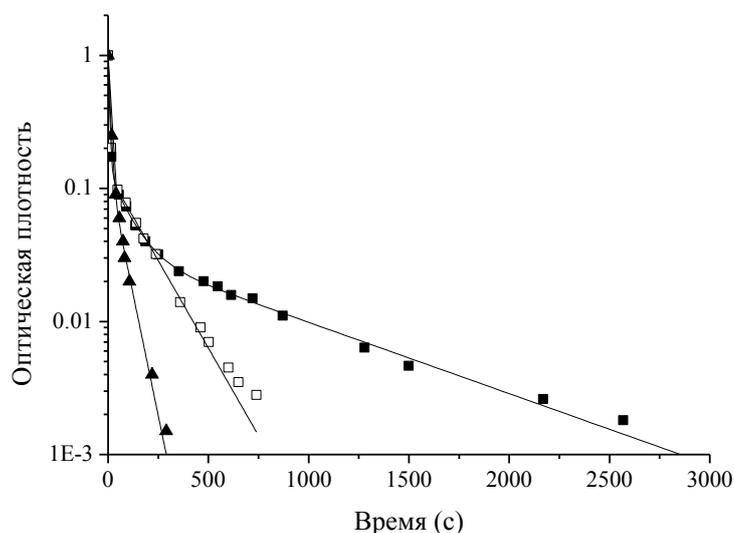


Рис. 23. Нормированные зависимости кинетики Н-D обмена по полосе 3400 см^{-1} пленок образцов: рамногалатуронан I клеточной стенки волокон льна (темные квадраты), рамногалатуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна (светлые квадраты), рамногалатуронан I картофеля (треугольники). Сплошными линиями обозначены аппроксимации экспоненциальными зависимостями.

Параметры аппроксимации соответствующей кинетической кривой для рамногалактуронана I картофеля свидетельствуют о слабом межмолекулярном связывании ОН-групп в этом полисахариде, в то время как в рамногалактуронане I, выделенном до встраивания в клеточную стенку волокон льна, порядка трети ОН-групп, а в рамногалактуронане I клеточной стенки волокон льна порядка половины ОН-групп задействованы, по всей видимости, в образовании водородных связей и обменивается со средней скоростью (табл. 4). Более сложная форма и бóльшая длительность кинетики дейтерообмена в рамногалактуронане I клеточной стенки волокон льна (рис. 23, табл. 4) свидетельствует о наличии, наряду с быстро и медленно обмениваемыми в данных условиях протонами ОН-групп полисахарида, и крайне медленно обмениваемых протонов. Их количество, оцениваемое при сравнении интенсивности полос поглощения ОН-групп в исходно сухом и во влажном образцах с высокой степенью дейтерозамещения, свидетельствует, что в рамногалактуронане I клеточной стенки волокон льна порядка 10% всех ОН-групп стерически недоступны растворителю.

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

3.2.3. Выявление характеристичных структурных параметров рамногалактуронанов I желатинозной клеточной стенки

Очевидно, что формирование надмолекулярной структуры рамногалактуронанов I желатинозной клеточной стенки волокон льна, выражающееся, в частности, в способности к самоагрегированию и образованию прочных физических гелей, сопряжено со строением и определенной структурной организацией этого полисахарида. Согласно результатам, полученным с помощью динамического светорассеяния и ИК-спектроскопии (разделы 3.2.1 и 3.2.2), в качестве ключевых элементов, принимающих участие в формировании надмолекулярной структуры этого полисахарида, выступают боковые галактановые цепи. Другими детерминантами могут служить особенности строения остова рамногалактуронана I, во многом определяющие общую конформацию его макромолекулы и предполагающие ту или иную локализацию и направленность боковых цепей. В связи с этим, следующий этап работы включал характеристику элементов структурной организации рамногалактуронанов I волокон льна и выявление особенностей строения, отличающих эти полисахариды от рамногалактуронанов I первичной клеточной стенки.

3.2.3.1. Сопоставление состава и элементов структурной организации рамногалактуронанов I первичной и третичной клеточных стенок

При анализе рамногалактуронанов I картофеля и волокон льна с помощью гель-проникающей и анионообменной хроматографии выявлен ряд сходств и отличий этих полисахаридов. Так, характер профиля и молекулярно-массовое распределение рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (пик с максимум в области 200 кДа согласно

калибровочной кривой, полученной по пуллуланам) были практически идентичны этим характеристикам рамногалактуронана I картофеля; в то время как рамногалактуронан I волокон льна, выделенный до встраивания в клеточную стенку имел меньшее время удерживания (пик с максимумом в области 1600 кДа) и был представлен более узким и выраженным пиком (рис. 24).

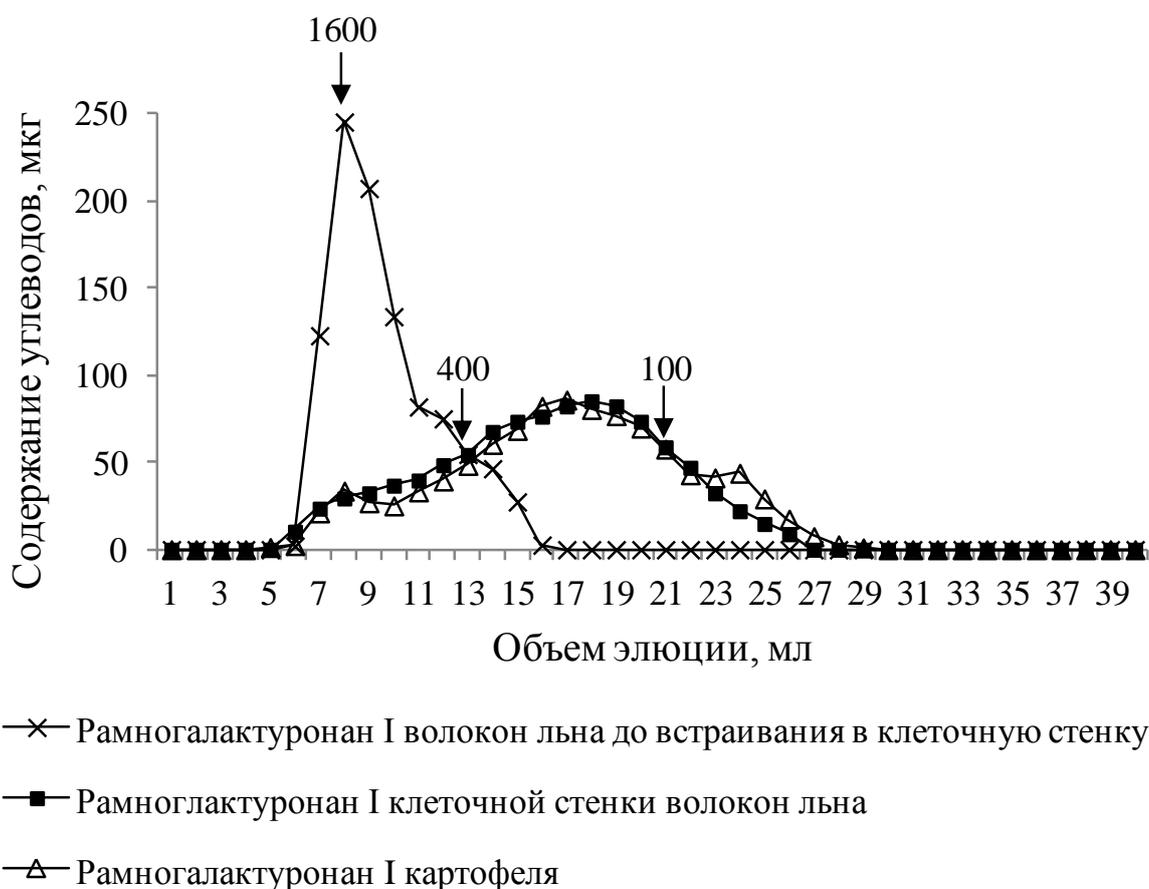


Рис. 24. Профили элюции рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля на колонке с сефарозой CL-4В. Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству углеводов. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

Несмотря на сходное время удерживания при гель-фильтрации рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна и картофеля, моносахаридный состав этих полисахаридов существенно отличается (табл. 2). Прежде всего, эти отличия затрагивают состав остова

рамногалактуронанов. Соотношение GalA/Rha свидетельствует в пользу отсутствия в составе остова рамногалактуронана I волокон льна фрагментов полигалактуроновой кислоты; вдвое большее количество остатков галактуроновой кислоты по сравнению с остатками рамнозы в составе рамногалактуронана I картофеля предполагает наличие в структуре этого полисахарида включений из олигомеров гомогалактуронана (табл. 2). Эти заключения подтверждаются результатами ЯМР анализа. На HSQC спектре рамногалактуронана I картофеля четко выявляется наличие кросс-пика, относящегося к H1/C1 \rightarrow 4)- α -GalpA-(1 \rightarrow 4)- α -GalpA-(1 \rightarrow (5.08/100.8) (рис. 25а), отсутствующего на HSQC спектре рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (рис. 25б).

Соотношение остатков галактозы и рамнозы в составе сходных по времени удерживания при гель-фильтрации рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна (3.8) и картофеля (8.9) (табл. 2) предполагает в структуре последнего либо более длинные галактановые цепи, либо их большее количество. Однако сами по себе галактановые цепи, судя по всему, единственным параметром, определяющим способность к формированию надмолекулярных структур и гелей, не является. Наглядной демонстрацией этого служит то, что не формирующий гелей и не способный к самоагрегированию рамногалактуронан I картофеля по соотношению Gal/Rha занимает промежуточное положение между рамногалактуронаном I волокон льна до и после встраивания в клеточную стенку (табл. 2). Ключевую роль в обеспечении этих свойств у рамногалактуронанов I волокон льна могут играть особенности распределения галактановых цепей по остову и их протяженность. Для установления степени замещения остатков рамнозы рамногалактуронанов I, а также для получения сведений об их степени полимеризации, эти полисахариды были охарактеризованы с помощью ^1H и корреляционной (COSY) ЯМР спектроскопии.

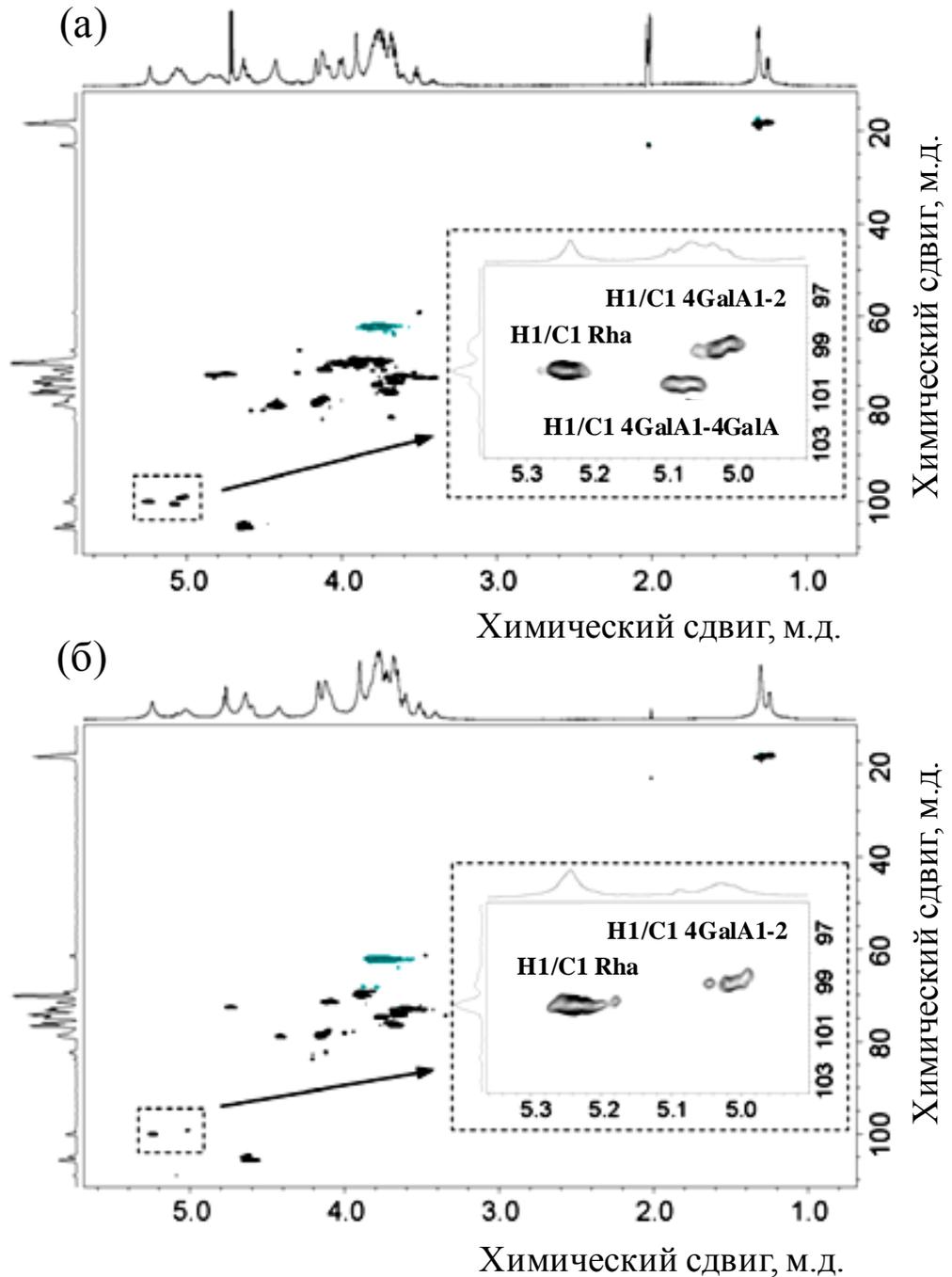


Рис. 25. HSQC ЯМР спектры рамногалактуронана I картофеля (а), рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна (б).

^1H спектр рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна, представлен, главным образом, сигналами остатков галактопиранозы; сигналы остатков остова при этом практически не выражены (рис. 26), по всей видимости, из-за большого содержания

галактозы (табл. 2). Поскольку оценить доли замещенных и незамещенных остатков рамнозы по ^1H спектру, полученному для рамногалактуронана I волокон льна до встраивания в клеточную стенку, не представлялось возможным, дальнейший его анализ в исходном виде с помощью ЯМР был нецелесообразен и малоинформативен, и в этой работе не проводился.

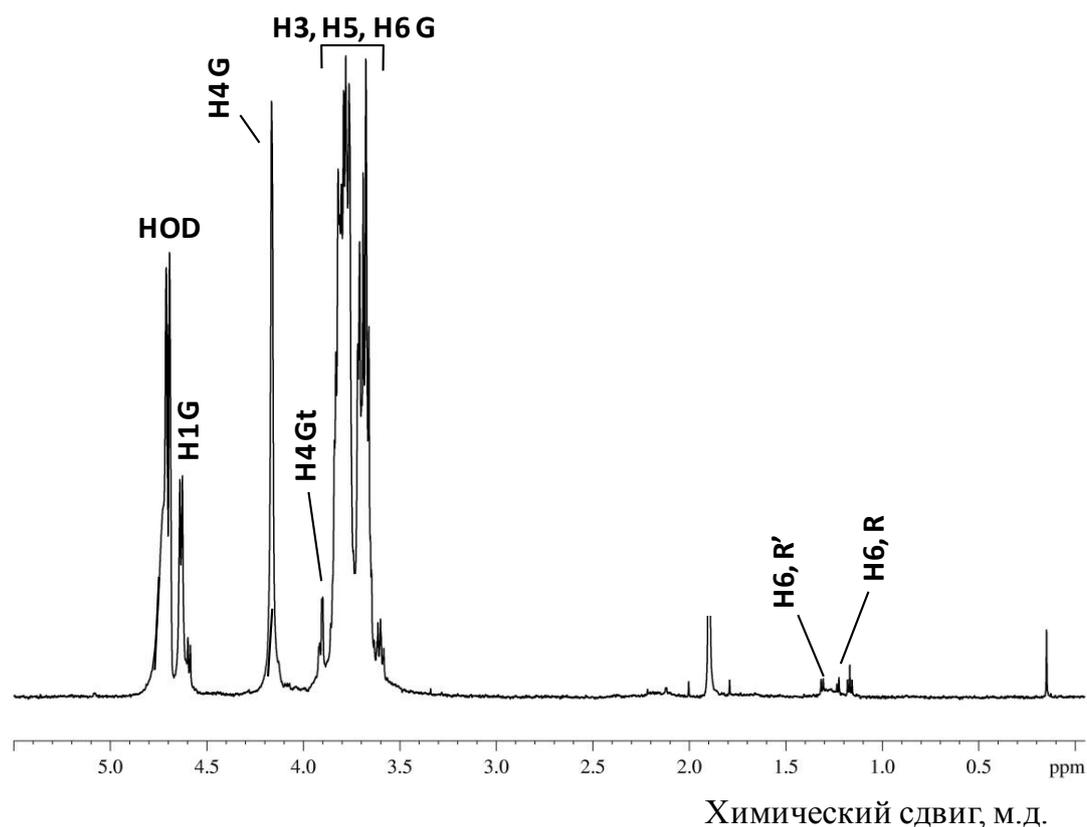


Рис. 26. ^1H ЯМР спектр рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна. H1G – H-1 1,4-Gal, H4G – H-4 1,4-Gal, H4Gt – H-4 терминальной Galp H3G – H-3 1,4-Gal, H5G – H-5 1,4-Gal, H6G – H-6 1,4-Gal, H6R' – H-2 2,4-Rha, H6R – H-6 2-Rha.

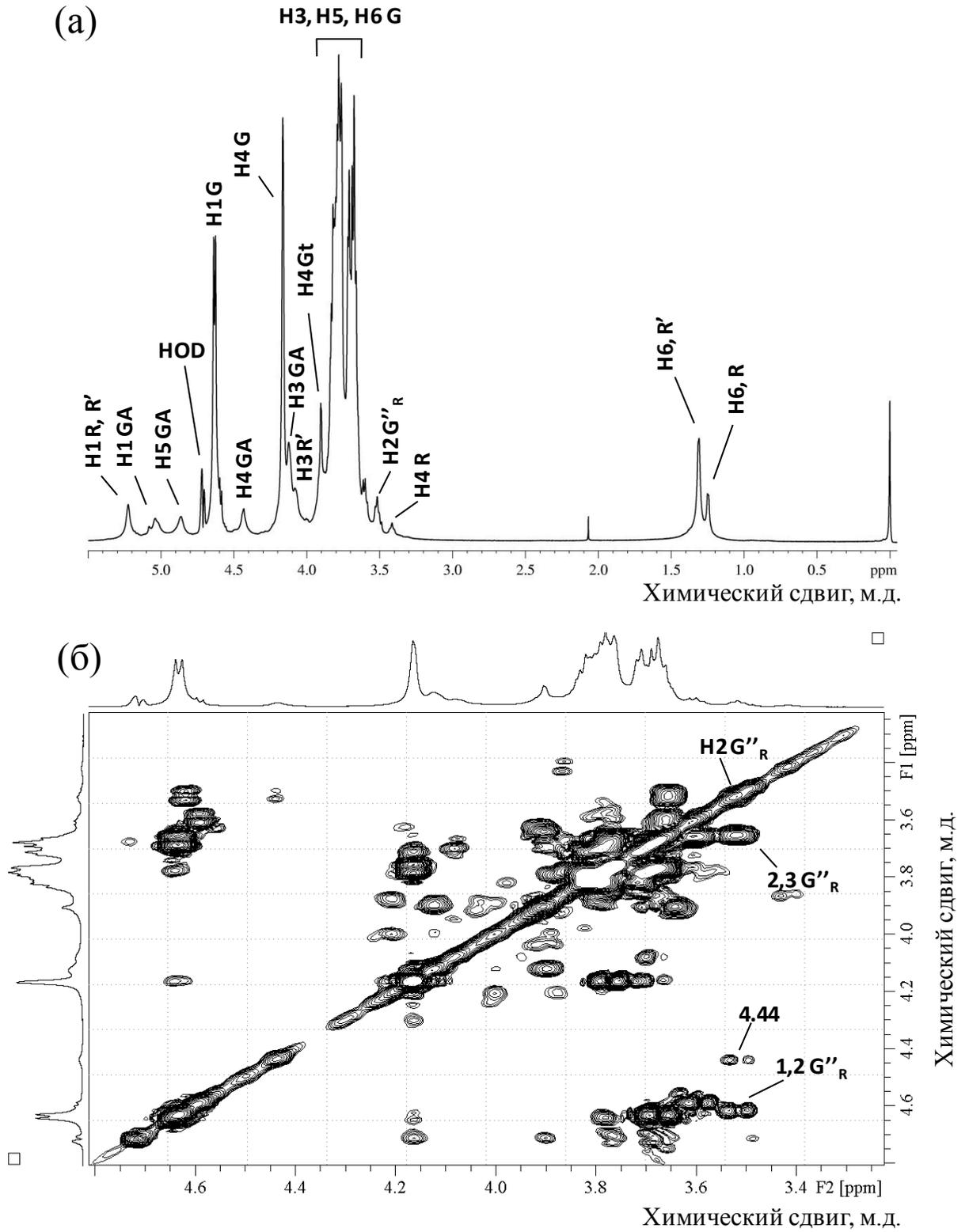


Рис. 27. ^1H ЯМР спектр (а) и фрагмент COSY спектра (б) рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна.

Табл. 5. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C для углеводных остатков рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна

Остаток	C-1 H-1	C-2 H-2	C-3 H-3	C-4 H-4	C-5 H-5	C-6 H-6,6'
GA	99.4, 99.7 5.03, 5.05	69.6 3.91	71.6 4.11	79.0 4.43	72.4 4.85	175.0
GA'	100.8, 100.9 5.11, 5.09	70.0 4.02	71.0 4.13	79.2 4.44	72.4 4.85	175.0
R	100.6 5.23	78.2 4.11	70.2 3.87	73.8 3.41	71.0 3.70	18.3 1.24
R'	100.6 5.23	78.6 4.12	71.1 4.07	82.2 3.68	69.4 3.78	18.5 1.31
G	106.1 4.62	73.6 3.68	75.1 3.76	79.4 4.16	76.2 3.70	62.6 3.82, 3.79
G _t	106.1 4.59	73.2 3.60	74.1 3.65	70.4 3.91	76.9 3.67	62.3 3.80, 3.74
G _R	105.2 4.60	73.5 3.52	75.1 3.78	79.4 4.16	76.2 3.70	62.6 3.82, 3.79
G' _R	105.9 4.64	72.8 3.60	74.9 3.77	78.0 4.12	75.9 3.67	62.6 3.80, 3.75
G'' _R	104.9 4.59	72.8 3.53	74.2 3.66	70.2 3.90	76.8 3.68	62.3 3.80, 3.73

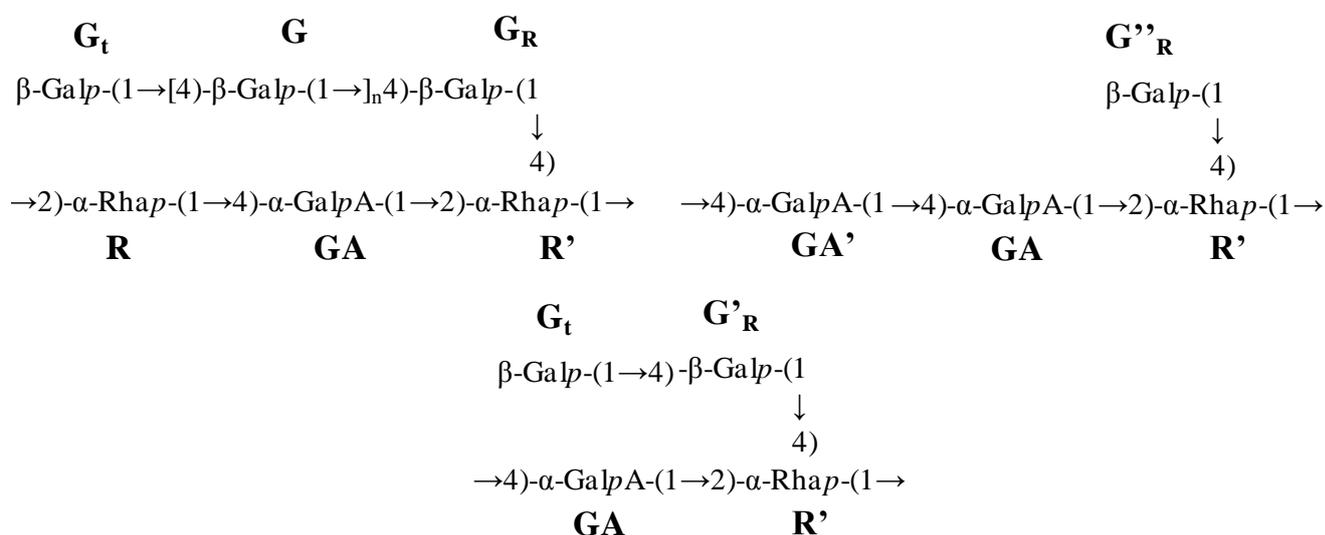


Рис. 28. Схема последовательности моносахаридных остатков, входящих в состав рамногалактуронана I и связей между ними.

При анализе рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна по соотношению интенсивности сигналов H6,6' остатков рамнозы (рис.

27а) установлено, что пропорция замещенной по О-4 положению (2,4-Rha, протоны у С6, 1.31 м.д.) и незамещенной рамнозы (2-Rha, протоны у С6, 1.24 м.д.) составляет 72% и 28%. Судя по данным ЯМР анализа, боковые галактановые цепи рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна представлены как олигомерами из β -(1 \rightarrow 4)-связанных остатков галактопиранозы, так и единичными остатками этого моносахарида. Доля галактозы, приходящейся на замещения остатков рамнозы в виде единичного остатка может быть определена по выраженному на спектрах сигналу H2 этого остатка (3.53 м.д.) (рис. 26а). На COSY спектре (рис. 27б) видно, что в интенсивность H2 сигнала терминальной галактозы на протонном спектре (3.53 м.д.) вносят вклад две молекулярные системы. Первая система включает кросс-пики H2 этого остатка с H1 и H3 (4.59 м.д. и 3.66 м.д., соответственно), вторая – сигнал 4.44 м.д., не относящийся к галактозе. Судя по интенсивности этих сигналов, очевидно, что только 2/3 интенсивности сигнала при 3.53 м.д. приходится на H2 терминальной галактозы. Доля рамнозы, замещенной остатками терминальной галактозы, от общего количества замещенной рамнозы была оценена из отношения интенсивностей сигналов при 3.53 м.д. и 1.31 м.д. на ^1H спектре полисахарида и составила 91% от замещенных по О-4 остатков рамнозы и 66% от всех остатков рамнозы остова.

Сравнение отношения Gal/Rha, полученного из моносахаридного состава (3.8, табл. 2) рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, и отношения интегральных величин H1 галактозы (5.37 для сигнала при 4.60 м.д.) и H1 рамнозы (1.00 для сигнала при 5.23 м.д.) выявило завышение сигналов β -(1 \rightarrow 4)-галактозы на ^1H ЯМР спектре этого полисахарида в 1.4 раза (5.37/3.8) по сравнению с сигналами остова. При введении поправочного коэффициента (1.4) было установлено, что доля остатков рамнозы, замещенной остатками терминальной галактозы составляет 47% от общего количества рамнозы в остова полисахарида. Доля незамещенных остатков рамнозы и остатков рамнозы, замещенных

единичным остатком галактозы, составляет 75% (28+47%, соответственно). Доли рамнозы с терминальной галактозой, и, соответственно, терминальной галактозы, представляющей боковые цепи из единичного остатка, составляют по 8% (17×0.47) от всех углеводных остатков в полимере.

На основании выше приведенных данных была рассчитана средняя длина боковых олигомерных галактановых цепей рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна. Доля остатков рамнозы, замещенных олигомерными боковыми цепями, составляет 4% всех углеводных остатков (17×0.25); доля остатков галактозы, формирующих олигомерные боковые цепи, – 56% (64–8). Следовательно, средняя длина олигомерных галактановых боковых цепей рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна составляет 14 мономеров ($56/4$).

Анализ ^1H ЯМР спектра рамногалактуронана I картофеля (рис. 29а) показал, что доли замещенных по О-4 положению и незамещенных остатков рамнозы составили 77% и 23%, соответственно. На COSY спектре для сигнала $\text{H}_2 \text{G}''_{\text{R}}$ (3.53 м.д.) выражено два кросс-пика, соответствующих корреляциям этого протона с H_1 и H_3 ($\text{H}_1/\text{H}_2 \text{G}''_{\text{R}}$ – 4.59/3,53 м.д. и $\text{H}_2/\text{H}_3 \text{G}''_{\text{R}}$ – 3,53/3.66 м.д.), в отличие от рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, на COSY спектре рамногалактуронана I картофеля сигналы других молекулярных систем, не относящихся к остаткам терминальной галактозы, в области кросс-пиков для 3.53 м.д. отсутствуют (рис. 29б). С учетом этого факта, расчеты, проведенные подобным образом, что и для рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна показали, что рамногалактуронан I картофеля содержит 20% рамнозы, замещенной единичными остатками галактозы, и 57% – замещенной олигомерными галактановыми цепями. Средняя длина олигомерных боковых цепей этого полисахарида сопоставима с рамногалактуронаном I клеточной стенки волокон льна и составляет 15 моносахаридных остатков (табл. 6).

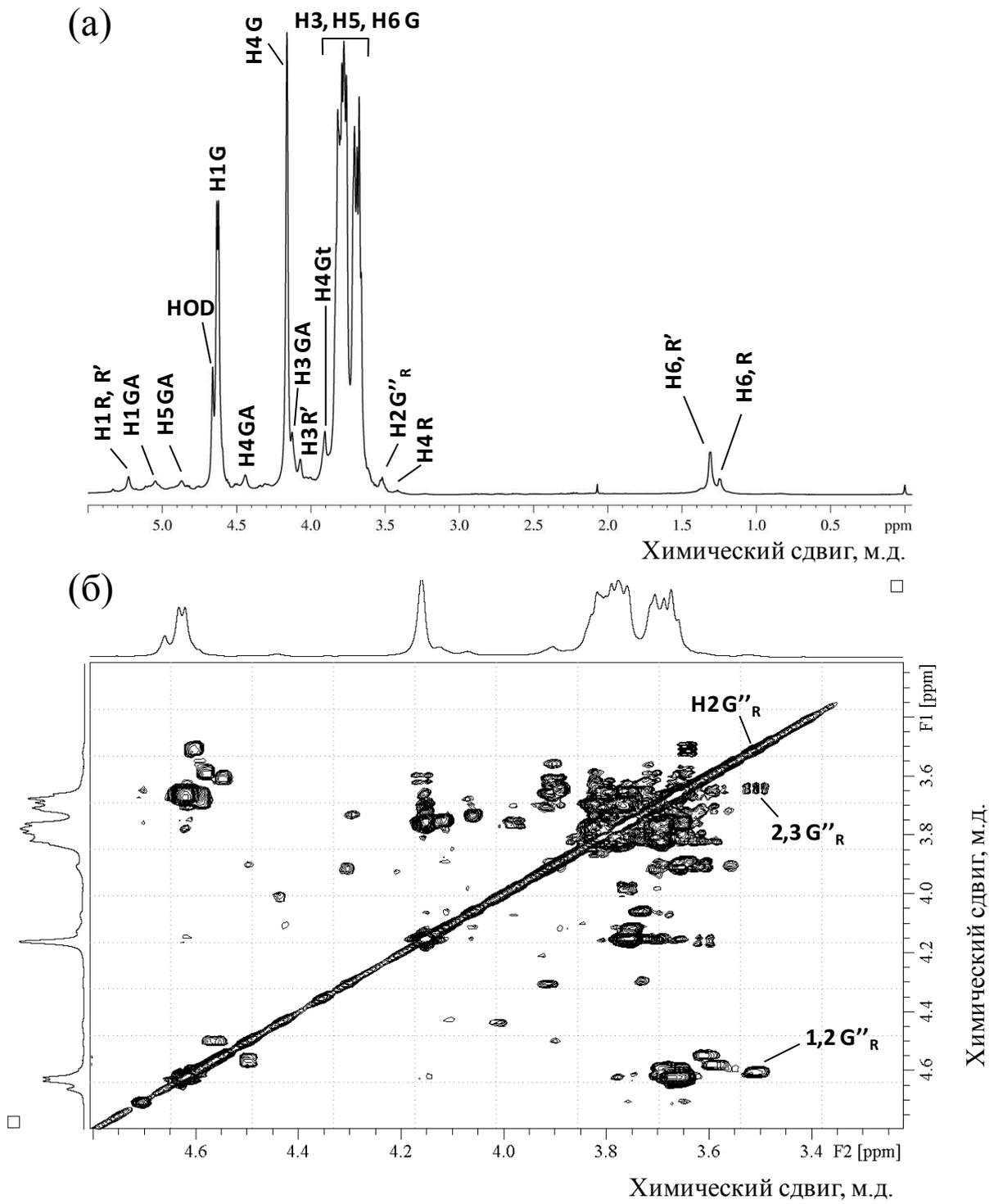


Рис. 29. ^1H ЯМР спектр (а) и фрагмент COSY спектра (б) рамногалактуронана I картофеля.

Табл. 6. Структурные характеристики рамногалактуронанов I клеточных стенок волокон льна и клеток картофеля

	Рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна	Рамногалактуронан I картофеля
Замещенная по O-4 рамноза	72%	77%
Незамещенная рамноза	28%	23%
Gal/Rha (ВЭАОХ)	3.80	8.90
Gal/Rha (ЯМР, по сигналам H1)	5.37	14.80
Поправочный коэффициент*	1.40	1.66
Рамноза, замещенная единичным остатком галактозы	47%	20%
Рамноза, замещенная олигомерными галактановыми цепями	25%	57%
Средняя длина олигомерных боковых цепей	14 моносахаридных остатков	15 моносахаридных остатков

* – поправочный коэффициент учитывает степень завышения сигналов ^1H галактозы по сравнению с сигналами ^1H рамнозы на спектрах ЯМР, принимая во внимание данные моносахаридного состава, полученные с помощью анионообменной хроматографии.

Таким образом, сопоставление сходных по молекулярно-массовому распределению рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна и картофеля с помощью ЯМР спектроскопии позволило выявить ряд структурных параметров этих полисахаридов, которые могут быть вовлечены в обеспечение их свойств, в частности, сопряженных со способностью к формированию надмолекулярных структур. Отсутствие в структуре остова рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна фрагментов из полигалактуроновой кислоты, кардинально отличающее этот полисахарид от большинства охарактеризованных рамногалактуронанов I (Talmadge et al, 1973; Lau et al., 1985; Carpita, Gibeaut, 1993; Rihouey et al., 1995; Oechslin et al., 2003; Caffall, Mohnen, 2009; Yaro, 2011) и, в частности, от рамногалактуронана I первичной

клеточной стенки картофеля, может способствовать пространственной близости боковых галактановых цепей, замещающих остатки рамнозы по О-4 положению. Степень замещения остатков рамнозы остова рамногалактронанов I клеточной стенки волокон льна и картофеля сопоставима (табл. 6). Однако, в рамногалактуронане I картофеля доля рамнозы, замещенной олигомерными боковыми цепями, более чем вдвое превышает этот показатель рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна. При этом средняя длина олигомерных цепей у этих полисахаридов сопоставима. Большая часть боковых цепей рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, в отличие от рамногалактуронана I картофеля (20% от всей замещенной рамнозы), представлена единичным остатком (47% от всей замещенной рамнозы). Совокупность этих данных позволяет заключить, что, по всей видимости, ключевую роль в обеспечении способности рамногалактуронана I к самоассоциации играет распределение боковых цепей на остове, либо их различающееся по длине распределение при схожих средних показателях (рис. 30).

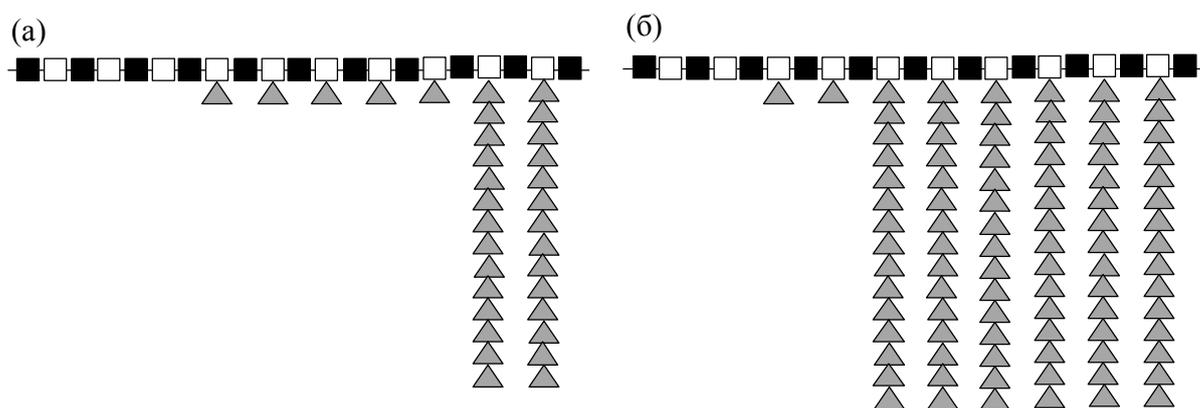


Рис. 30. Схема рамногалактуронанов I клеточной стенки волокон льна (а) и картофеля (б), построенная с учетом полученных данных по доле остатков рамнозы, содержащих боковые цепи из единичного остатка галактозы. Локализация боковых цепей по длине остова и их распределение по длине до настоящего времени не охарактеризованы.

Ранее было показано, что при гидролизе эндогалактаназой значительной части боковых цепей рамногалактуронана I, выделенного

после встраивания в клеточную стенку, изменения гидродинамического объема этого полисахарида не происходит (Микшина, 2009; Mikshina et al., 2012). Исходя из свойств фермента, не способного гидролизовать единичные остатки галактозы, и соотношения Gal/Rha полученного после гидролиза фрагмента полисахарида (1.7), строение этого фрагмента схоже со строением исходного полисахарида (рис. 30а), однако характеризуется более короткими боковыми цепями (~ 6 моносахаридных остатков). Очевидно, что значительное удаление галактановых боковых цепей не приводит к потере способности рамногалактуронана I волокон льна к самоассоциации. Однако неясно, какова минимальная степень полимеризации остова этого полисахарида необходима для обеспечения этой способности. Одним из классических подходов химии углеводов, позволяющих решить эту задачу, служит ферментативный и химический гидролиз полисахарида и анализ полученных фрагментов.

3.2.3.2. Анализ продуктов ферментативного и химического гидролизом рамногалактуронанов I, выделенных из первичной и третичной клеточных стенок

Способность сохранять гидродинамический объем при значительном уменьшении молекулярной массы была продемонстрирована не только при частичном гидролизе рамногалактуронанов I волокон льна эндогалактаназой, приводящий к удалению значительной части боковых цепей, но и обработке другим ферментом – рамногалактуронангидролазой, разрушающей остов: часть фрагментов так же сохраняла гидродинамический объем частиц исходного полимера (Микшина, 2009). Одна из причин этого может быть связана с наличием конформационных особенностей молекул этих полисахаридов, в частности, – ограничивающих доступность для фермента, и, как следствие, низкой

степени разрушения остова рамногалактуронанов I. Для исключения этого при гидролизе остова в работе были проведены эксперименты с последовательной обработкой рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля, несколькими специфичными ферментами.

Для получения фрагментов рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля использовали две схемы ферментативного гидролиза:

1) обработка исходных полисахаридов рамногалактуронангидролазой (РГ-г) из *Aspergillus aculeatus* с последующей инкубацией общего гидролизата с β -(1 \rightarrow 4)-галактаназой (гал-за) из *Aspergillus aculeatus*;

2) гидролиз исходных полисахаридов β -(1 \rightarrow 4)-галактаназой из *Aspergillus aculeatus* с последующей обработкой общего гидролизата рамногалактуронангидролазой из *Aspergillus aculeatus*,

а также химическое разрушение остова рамногалактуронанов посредством реакции β -элиминирования (Deng et al., 2006).

Используемые нами ферменты представляли собой высокоочищенные и хорошо охарактеризованные препараты. Побочных активностей и дополнительных компонентов в составе этих препаратов не обнаружено.

Согласно литературным данным по исследованию действия рамногалактуронан гидролазы на остов рамногалактуронана I, гидролизу подвергаются фрагменты остова со степенью полимеризации 9 и выше (Mutter et al., 1998; Gurjanov et al., 2007). Минимальный фрагмент, образующийся в процессе гидролиза, имеет степень полимеризации 4 и представлен структурой (рамноза-галактуроновая кислота)₂. Максимальный размер фрагмента, не подвергающегося дальнейшему гидролизу, равен 8 и имеет структуру (рамноза-галактуроновая кислота)₄. Продукты гидролиза со степенью полимеризации остова 4-8 могут быть линейными (Schols et al., 1994; Mutter et al., 1998), а также разветвленными,

то есть содержащими боковые цепи, в частности, из β -D-1 \rightarrow 4-галактозы (Schols et al., 1990).

При воздействии β -(1 \rightarrow 4)-галактаназы на галактановые боковые цепи пектинов основными продуктами гидролиза являются галактоза и галактобиоза, в меньшей степени, галактотриоза и галактотетраоза (van de Vis et al., 1991). При этом фермент не способен отщеплять ближайшие к остову рамногалактуронана I звенья боковых цепей, оставляя не тронутой галактотриозу, присоединенную к остатку рамнозы (Gurjanov et al., 2007).

Последовательная обработка рамногалактуронанов I волокон льна специфичными ферментами приводила к существенному гидролизу этих полисахаридов (рис. 31а, 31б). Однако и в случае последовательной обработки рамногалактуронангидролазой, затем галактаназой, и в случае последовательной обработки галактаназой, затем рамногалактуронангидролазой, часть полисахарида продолжала элюировать в области выхода исходного полимера. После гидролиза рамногалактуронана I картофеля специфичными ферментами в любой последовательности на хроматограммах выявлялся только один пик в низкомолекулярной области (рис. 31в).

Наиболее наглядно способность сохранять гидродинамический объем после значительного уменьшения массы полисахарида выражена на профилях рамногалактуронана I волокон льна, полученного до встраивания в клеточную стенку (рис. 31а). Для этого полисахарида была наиболее выражена и различная степень гидролиза в зависимости от последовательности использования ферментов. Предобработка рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку галактаназой, по всей видимости, повышала степень разрушения остова этого полисахарида при последующей инкубации с рамногалактуронангидролазой, что выражалось в уменьшении пика в высокомолекулярной области и возрастании количества низкомолекулярных продуктов (рис. 31а).

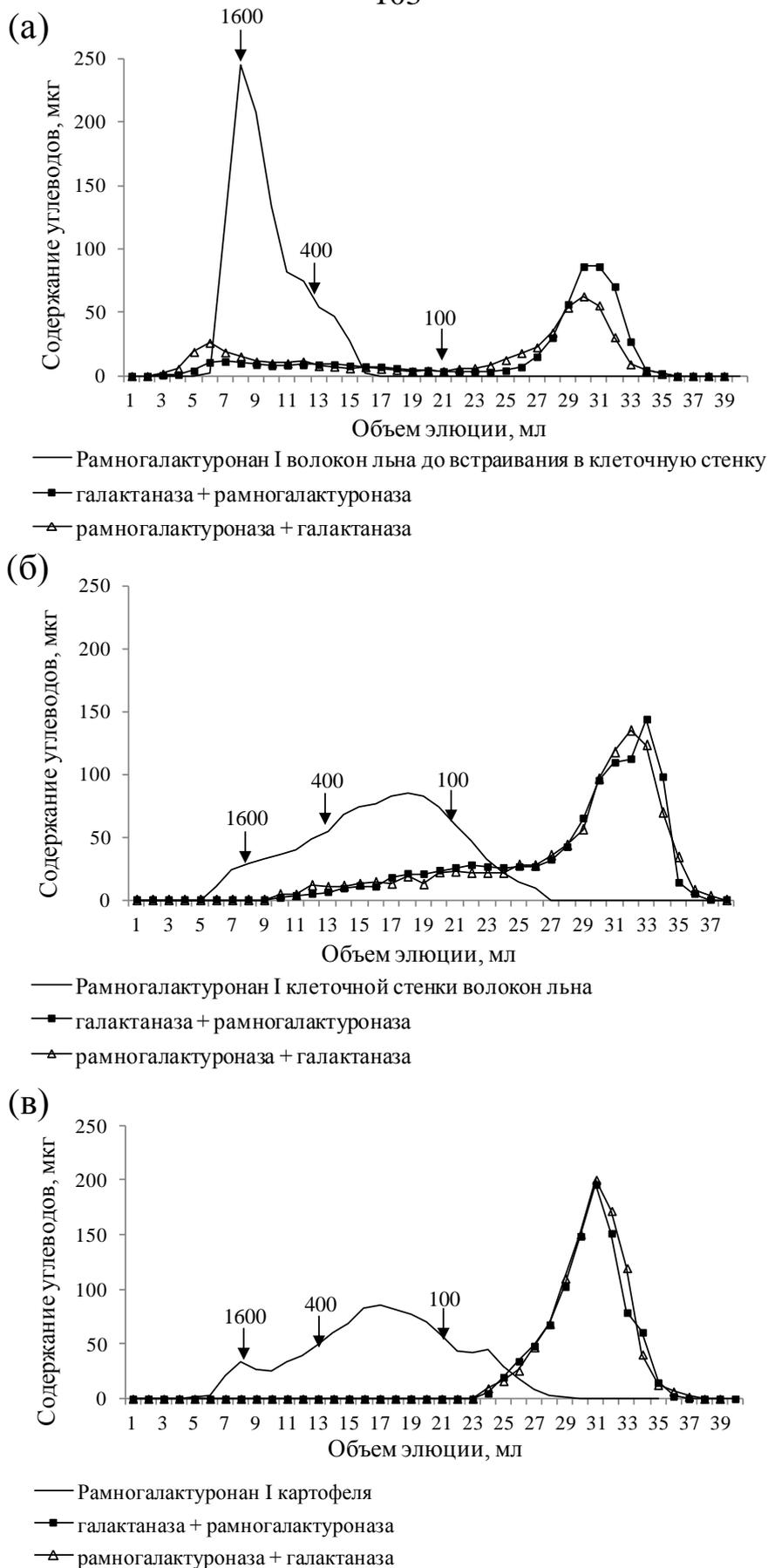


Рис. 31. Профили элюции фрагментов, полученных после последовательного гидролиза рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля специфичными ферментами и разделения на колонке с

сефарозой CL-4В. Результаты гидролизом: (а) рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку волокон льна, (б) рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, (в) рамногалактуронана I картофеля. Представленные на хроматограммах профили выравнены по количеству углеводов. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

Соотношение остатков галактозы и рамнозы во фракциях, выходящих в высокомолекулярной области, при различной последовательности гидролиза рамногалактуронана I волокон льна, полученного до встраивания в клеточную стенку, было сопоставимо и не превышало трех (табл. 7). Моносахаридный анализ проводился для фракций, элюирующих в высокомолекулярной области (5-11 мл), и для остальной области хроматограммы (12-35 мл).

Табл. 7. Моносахаридный состав фракций (5-11 мл элюции), полученных после последовательного гидролиза рамногалактурона I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна, галактаназой и рамногалактуронангидролазой (гал-за+РГ-г) и рамногалактуронангидролазой и галактаназой (РГ-г+гал-за).

Рамногалактуронан I до встраивания в клеточную стенку волокон льна					
	моносахаридный состав, моль%				
	Rha	Ara	Gal	GalA	Gal/Rha
Исходный	4	2	89	4	22.0
РГ-г+гал-за	моносахаридный состав, моль%				
	22	2	52	20	2.4
	доля моносахарида во фрагментах, % от моносахарида в исходном полимере				
	25	9	3	25	
гал-за+РГ-г	моносахаридный состав, моль%				
	20	2	57	22	2.8
	доля моносахарида во фрагментах, % от моносахарида в исходном полимере				
	10	3	2	11	

Суммарное содержание углеводов в гидролизованном образце было численно равно содержанию углеводов в исходном полимере. При

расчете доли моносахаридов во фрагментах учитывали содержание моносахаридов в исходном полимере и содержание моносахаридов во фракции, продолжающей элюировать в высокомолекулярной области (мкг).

При последовательной обработке рамногалактуронана I, выделенного до встраивания в клеточную стенку волокон льна, рамногалактуронангидролазой и галактаназой во фрагментах фракции, время выхода которой приходится на высокомолекулярную область, остается всего $\frac{1}{4}$ остова и 3% боковых галактановых цепей (табл. 7). Следовательно, если молекулярная масса исходного полисахарида составляла 2000 кДа, молекулярная масса этого фрагмента должна быть не более 104 кДа. При предварительном отщеплении значительной части боковых цепей этого рамногалактуронана I галактаназой и последующем гидролизе остова рамногалактуронангидролазой доля остова во фрагментах, время выхода которых приходилось на область элюции исходного полисахарида, не превышала 10%, а боковые галактановые цепи содержали всего лишь 2% галактозы от содержания этого моносахарида в исходном полимере (табл. 7). Соответственно, молекулярная масса таких фрагментов должна составлять ~ 57 кДа.

Безусловно, *in muro* столь существенного гидролиза рамногалактуронана I не происходит. Во-первых, до сих пор не продемонстрировано наличие в клеточной стенке гидролаз, разрушающих остов рамногалактуронанов. Во-вторых, природа устроила галактановые цепи рамногалактуронана I волокон льна таким образом, что они могут подвергаться гидролизу *in muro* только до определенного предела. Связано это с двумя фактами: 1) гидролиз боковых цепей рамногалактуронана I в клеточной стенке осуществляется с помощью β -(1 \rightarrow 4)-галактозидазы (Микшина и др., 2009; Roach et al., 2011), способной отщеплять остатки β -(1 \rightarrow 4)-галактозы только последовательно и по одному; при этом в структуре боковых галактановых цепей рамногалактуронана I волокон

льна присутствуют минорные включения, отличные от β -(1 \rightarrow 4)-галактозы, в частности, остатки арабинозы и (1 \rightarrow 3)- и (1 \rightarrow 6)-галактозы (Mikshina et al., 2012), выступающие в качестве препятствия для действия эндогенной галактозидазы; 2) в клеточной стенке волокон льна галактаназ, способных гидролизовать олигомерные цепи, в том числе при наличии в их структуре минорных компонентов, отличных от основного моносахарида, составляющего боковую цепь, не обнаружено.

Однако следует заметить, что даже предельный вариант ферментативного гидролиза, проведенного в работе и включающего как удаление значительной части боковых цепей, так и частичную дегградацию остова рамногалактуронанов I, не только не приводил к полному разрушению этого полисахарида, но и выявлял в качестве одного из продуктов фрагменты, время выхода с колонки которых при гель-фильтрации совпадало со временем выхода исходного высокомолекулярного рамногалактуронана I до гидролиза. Минимальный фрагмент рамногалактуронана I волокон льна, обладающий способностью сохранять гидродинамический объем, а, следовательно, и время выхода с колонки при гель-фильтрации, был выявлен с помощью последовательного гидролиза боковых цепей и остова рамногалактуронана I (вариант: гал-за + РГ-г). Он содержал всего десятую часть остова и 2% боковых галактановых цепей исходного полисахарида.

Одним из структурных факторов, обеспечивающих способность таких фрагментов рамногалактуронана I сохранять гидродинамический объем, может служить некоторая протяженность остова. Для получения доказательств в пользу этого предположения был проведен полный химический гидролиз остовов рамногалактуронанов I с помощью реакции β -элиминирования.

Конечным результатом оптимального проведения такого способа разрушения рамногалактуронанов I является гидролиз 60-70% остова до

димера, состоящего из остатков рамнозы и непредельного производного галактуроновой кислоты (Deng et al., 2006).

При разделении фрагментов, полученных при разрушении остовов рамногалактуронанов I картофеля и волокон льна путем β -элиминирования, с помощью гель-фильтрации для всех трех случаев выявлено отсутствие пиков в области элюции исходных полисахаридов (рис. 32); время выхода всех продуктов приходилось на область, соответствующую молекулярной массе менее 100 кДа (согласно калибровочной кривой, построенной для пуллуланов) (рис. 32). При этом профили низкомолекулярных продуктов гидролиза различных рамногалактуронанов I отличались. На хроматограмме продуктов химического гидролиза рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку волокон льна выражен пик, время выхода которого соответствует более высокой молекулярной массе (рис. 32а); на профилях рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна и картофеля этот пик отсутствует (рис. 32б, 32в).

Поскольку рамногалактуронан I, выделенный до встраивания в клеточную стенку, имеет наибольшее соотношение Gal/Rha (табл. 2), наличие более высокомолекулярных продуктов химического гидролиза остова этого полисахарида, может объясняться, прежде всего, большей длиной их боковых цепей. Гетерогенность остальных полученных в результате разрушения остовов рамногалактуронанов I фрагментов может объясняться как неполным гидролизом остова, так и различной длиной их боковых цепей. Так, масс-спектрометрический анализ фрагментов рамногалактуронана, выделенного из клеточной стенки волокон льна выявил цепи длиной до 26 остатков галактозы (Gur'janov et al., 2007).

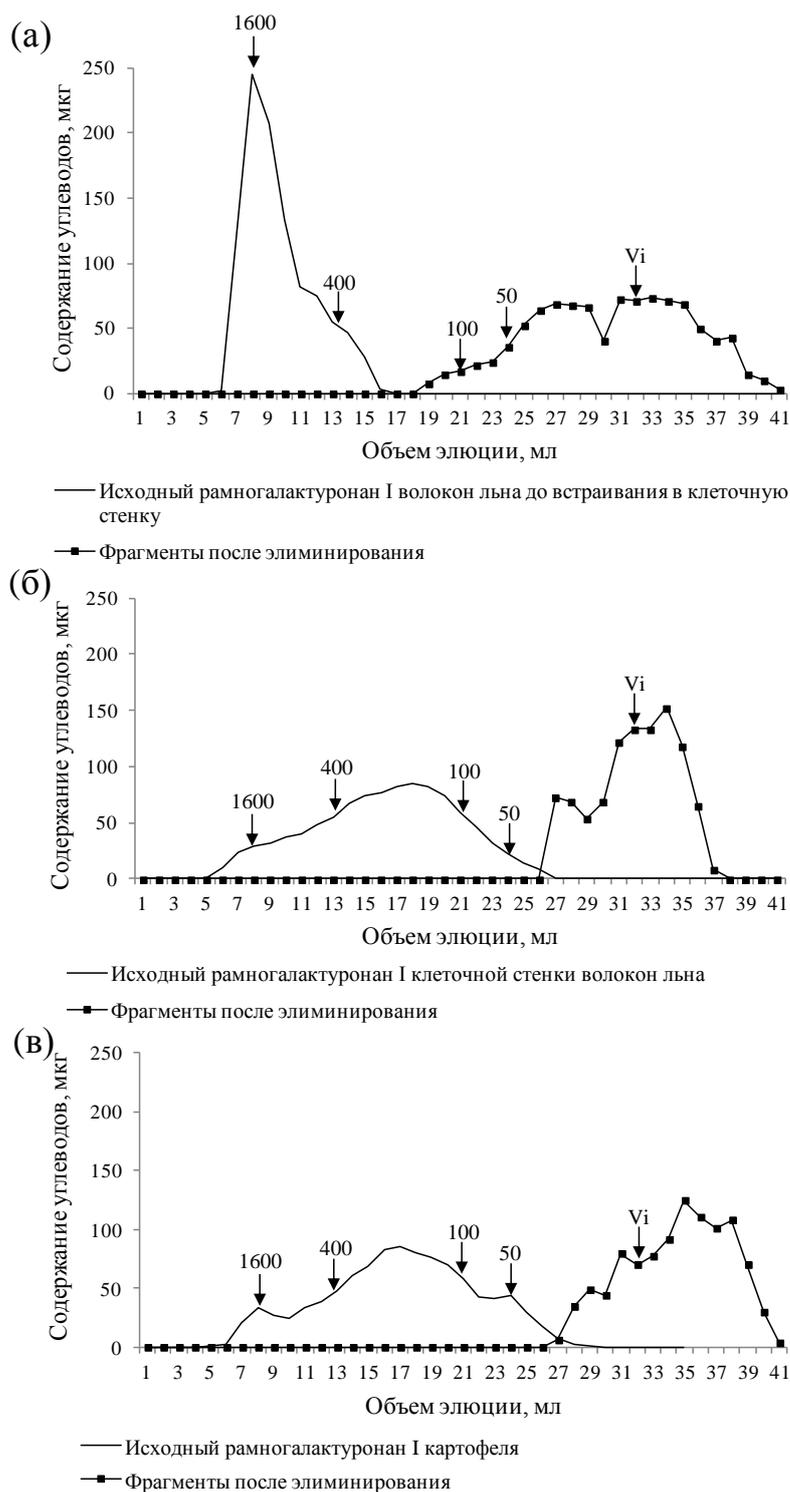


Рис. 32. Профили элюции фрагментов, полученных после химического гидролиза остовов рамногалактуронанов I волокон льна и картофеля, при разделении на колонке с сефарозой CL-4В. (а) Рамногалактуронан I, выделенный до встраивания в клеточную стенку волокон льна, (б) рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, (в) рамногалактуронан I картофеля. Представленные на хроматограмме профили выравнены по количеству углеводов. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы.

Таким образом, фрагменты рамногалактуронанов I, полученные в результате химического разрушения основной части остова до димеров, не проявляют способности сохранять гидродинамический объем молекул этих полисахаридов. Сопряженная с разрушением остова утрата этой способности предполагает участие в ее обеспечении большей протяженности остова, по крайней мере, более двух углеводных остатков. Это может быть связано не только с непосредственным вовлечением самого протяженного остова в формирование надмолекулярных структур рамногалактуронанов, но и, вероятно даже в большей мере, с необходимостью наличия у фрагмента, способного к самоассоциации, более чем одной галактановой цепи.

По результатам проведенной в работе характеристики физико-химических свойств рамногалактуронанов I третичной клеточной стенки волокон льна можно выделить ряд особенностей этого полисахарида, отличающих его от рамногалактуронана I первичной клеточной стенки (рамногалактуронан I картофеля) и обеспечивающих, по всей видимости, функциональную пригодность этого полисахарида: 1) способность молекул к самоагрегированию, подтверждающуюся, в частности, наличием трех уровней организации молекул рамногалактуронанов I волокон льна, выявленных с помощью динамического светорассеяния; 2) присутствие в структуре агрегатов упорядоченных и плотно упакованных областей, подтверждающееся наличием необмениваемых ОН-групп (порядка 10%, задействованы в образовании связей) и прочно удерживаемых молекул воды, выявляемой с помощью ИК-спектроскопии; 3) отсутствие в структуре фрагментов полигалактуронової кислоты – характерного компонента большинства охарактеризованных рамногалактуронанов I, во многом определяющего их свойства и геометрию макромолекул; 4) способность поддержания гидродинамического объема при значительном уменьшении молекулярной массы (выявленный минимальный фрагмент,

сохраняющий эту способность, включает 10% остова и 2% боковых цепей от исходного полисахарида). Таким образом, рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна представляет собой ассоциат нескольких молекул, сформированный, судя по всему, за счет взаимодействующих друг с другом боковых цепей и не содержащий в структуре фрагментов полигалактуронана. Такие ассоциаты способны сохранять гидродинамический объем (диаметр частиц порядка 40 нм) даже при уменьшении молекулярной массы в 35 раз и образовывать устойчивый физический гидрогель с гиперэластичными свойствами в физиологических концентрациях.

Установленные свойства и характеристики рамногалактуронана I позволяют проверить существующую гипотезу о механизме создания натяжения в клеточной стенке желатинозных волокон с помощью компьютерного моделирования системы, предполагающей захват этого полисахарида латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы при условии воздействия на них тургорного давления со стороны протопласта.

3.3. Компьютерное моделирование участия гелей из рамногалактуронана I в создании натяжения в клеточной стенке желатинозного типа

3.3.1. Создание и характеристика конечно-элементной модели захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы

Для проверки функциональной пригодности рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна с помощью метода конечных элементов была построена модель, включающая этот полисахарид, расположенный между двумя микрофибриллами целлюлозы. При этом использовали

модель гиперэластичных материалов Муни-Ривлина, как наиболее точно описывающую большие деформации (Коробейников, 2000; Egholm et al., 2006), характерные для анализируемой в нашем случае системы. Необходимые для моделирования константы Муни-Ривлина для геля из рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна C_{01} и C_{10} были рассчитаны по формулам (7) и (8) и составили для семи (1, 2, 5, 10, 20, 100 и 200 г) экспериментальных точек -395.8 Па и 2751.2 Па, соответственно.

$$C_{01} = \frac{\frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} - \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}}{1 - \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-2} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \cdot \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}} \quad (7)$$

$$C_{10} = \frac{\sum_{i=1}^n \sigma_i (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})}{2 \sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} - C_{01} \frac{\sum_{i=1}^n \lambda_i^{-1} (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2}{\sum_{i=1}^n (\lambda_i^2 - \lambda_i^{-1})^2} \quad (8)$$

где σ – экспериментальное напряжение, возникающее в образце (определено по формуле (9)), λ – степень деформации ($\lambda = h/h_0$), h_0 – исходная высота гелевого блока до оказания давления; h – высота гелевого блока после оказания давления, n – количество точек экспериментальных данных.

$$\sigma = \frac{F_{УПР}}{S} \quad (9)$$

где $F_{УПР}$ – сила упругости, возникшая в геле при деформации (определена по формуле (10)), S – площадь поверхности гелевого блока, по которой распределено действие силы.

$$F_{УПР} = -k\Delta l \quad (10)$$

где k – жёсткость геля (определена по формуле (11)), Δl – величина деформации.

$$k = \frac{E S}{L_0} \quad (11)$$

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

Упруго-пластические свойства рамногалактуронана I были охарактеризованы с помощью экспериментов по одноосному сжатию геля из этого полисахарида, то есть на макроуровне. Однако размеры, необходимые для построения модели, установленные с помощью динамического рассеяния света, характеризуют этот полисахарид на микроуровне. Очевидно, что переход от макро- к мезо- или микроуровню существенно меняет механические свойства большинства материалов.

Для проверки возможности использования информации о рамногалактуронане I, полученной на разных масштабных уровнях, в экспериментах по симулированию захвата этого полисахарида латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы был проведен предварительный эксперимент по моделированию, выявляющий характер изменения свойств системы при переходе с макро- на микроуровень. Для построения модели использовалась программа ANSYS 15.0 (ANSYS Inc.), обладающая нелинейными аналитическими возможностями расчета, которые необходимы для решения задачи с гиперэластичным материалом. Так как высота полученного нами геля составила 4 мм, модель представляла собой блоки с длиной стороны от 4 м (для оценки перехода на макроуровень) до 40 нм (размер исследуемого ассоциата – наноуровень) с сеткой от 0.4 м до 4 нм, соответственно, жестко зафиксированных с нижней стороны и подвергающихся давлению в 1 кПа сверху (рис. 33).

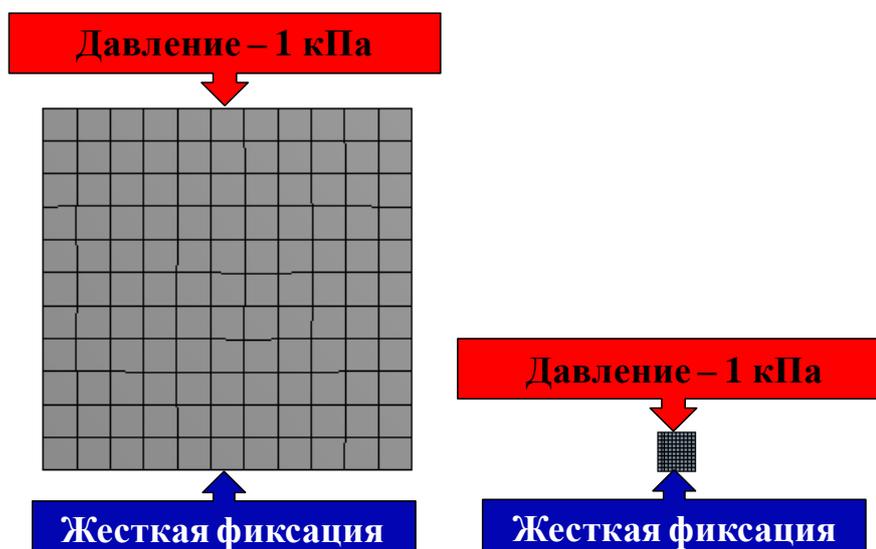


Рис. 33. Конечно-элементная модель блоков со свойствами рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна на макро- и микроуровнях при односторонней жесткой фиксации и оказании давления с противоположной стороны.

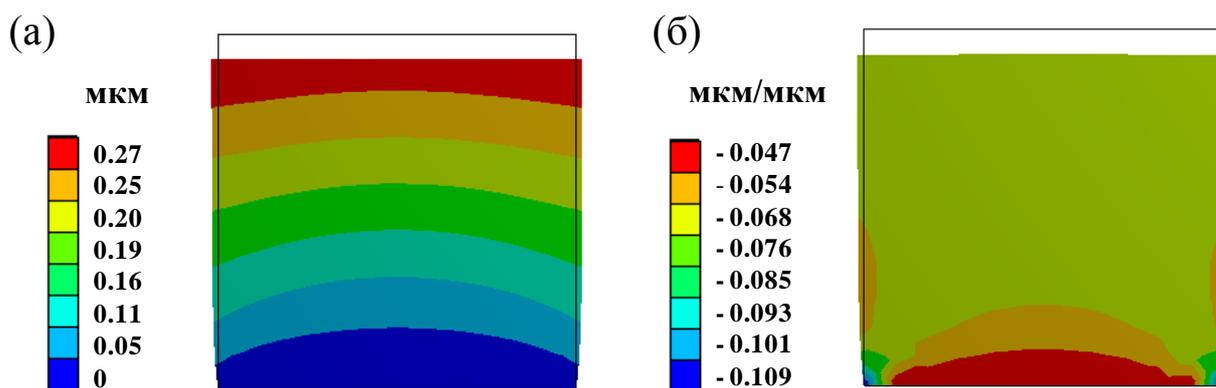


Рис. 34. Общая (а) и упругая (б) деформации блока из рамногалактуронана I с длиной стороны 4 мкм после оказания на него давления в 1 кПа.

Общая деформация блоков (рис. 34а) отличалась в соответствии с их масштабами (табл. 8), но во всех случаях составила 6.8% от исходной величины. При анализе упругой деформации (рис. 34б) было установлено, что уровень деформации блоков при давлении на одну из сторон в 1 кПа и жесткой фиксации противоположной стороны был одинаков (табл. 8).

Табл. 8. Общая и упругая деформации блоков из рамногалактуронана I при оказании на них давления 1 кПа.

Длина стороны блока, мкм	Размер сетки, мкм	Общая деформация, мкм	Упругая деформация, мкм/мкм
4000000	400000	2.73×10^5	-0.047
400000	40000	2.73×10^4	-0.047
40000	4000	2.73×10^3	-0.047
4000	400	2.73×10^2	-0.047
400	40	2.73×10^1	-0.047
40	4	2.73	-0.047
4	0.4	2.73×10^{-1}	-0.047
0.4	0.04	2.73×10^{-2}	-0.047
0.04	0.004	2.73×10^{-3}	-0.047

Линейная зависимость степени деформации от размера, а также идентичные значения упругой деформации позволяют считать, что параметры рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, установленные на разных масштабных уровнях могут быть использованы в одномасштабном эксперименте, то есть можно применять характеристики, полученные для гелей из рамногалактуронана I клеточной стенки волокон льна, к ассоциатам этого полисахарида.

Исходная модельная конструкция захвата микрофибриллами ассоциата рамногалактуронана I представлена на рисунке 35. Модель состояла из трех компонентов – двух микрофибрилл целлюлозы и расположенного между ними ассоциата рамногалактуронана I с установленными параметрами (рис. 35). Для воссоздания влияния тургора на клеточную стенку со стороны протопласта к одной из микрофибрилл было приложено давление в 0.3 МПа (Zimmermann et al., 1980). Вторая микрофибрилла была упруго зафиксирована с учетом рассчитанной по формуле (11) жесткости клеточной стенки – 3.6×10^8 Н/м³ (модуль Юнга – 27.88 ГПа (Yamamoto et al., 2009 – для желатинозной клеточной стенки дуба). Параметры клеточной стенки были определены по результатам электронной микроскопии (Salnikov et al., 2008).

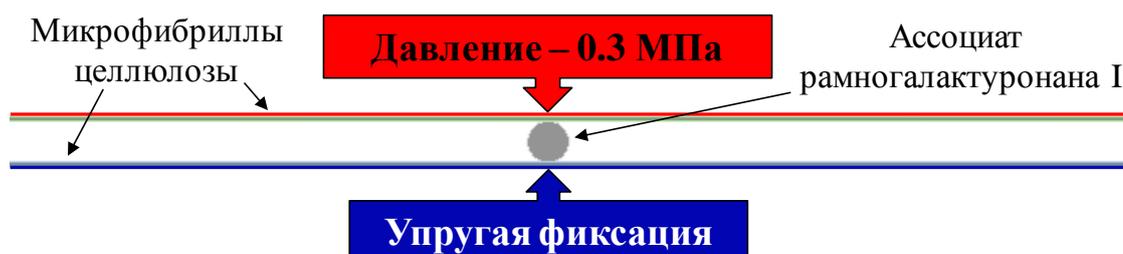


Рис. 35. Исходная модельная конструкция захвата ассоциата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы.

При создании сетки модели было проведено формирование контактных пар. В случае моделирования микрофибрилл целлюлозы верхняя микрофибрилла подвергается большим перемещениям (контактная) и требует плотной сетки из квадратных конечных элементов первого порядка, а нижняя находится в стационарном положении (целевая) и требует неплотной сетки из квадратных конечных элементов второго порядка. Рамногалактуронан I претерпевает большие деформации и обладает неровной поверхностью, что также характеризует его как контактную поверхность и обуславливает необходимость высокой плотности сетки из треугольных элементов первого порядка (рис. 36). Общее число конечных элементов модели составило 35911, число узлов – 42725.

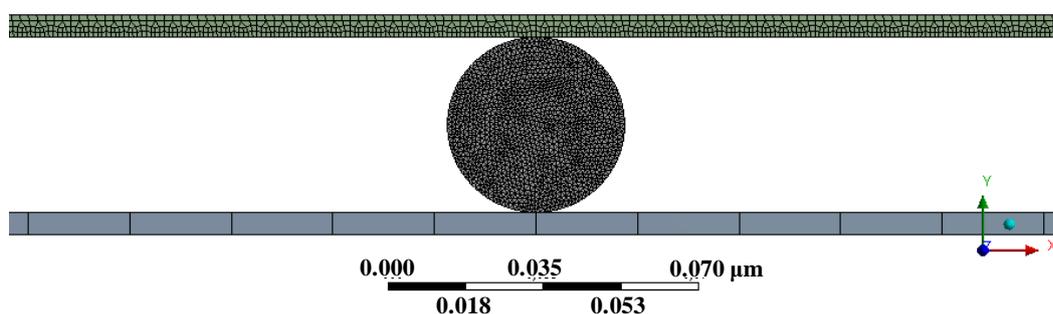


Рис. 36. Конечно-элементная модель захвата ассоциата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы.

Конечно-элементная модель захвата микрофибриллами целлюлозы рамногалактуронана была охарактеризована четырьмя критериями адекватности качества сетки (рис. 37). Качество элемента составило $0.83 \pm$

0.12; соотношение сторон – 1.29 ± 0.39 ; соотношение Якоби – 1.41 ± 0.50 ; отклонение от параллельности – 13.76 ± 11.27 . Это свидетельствует об оптимальности построенной сетки.

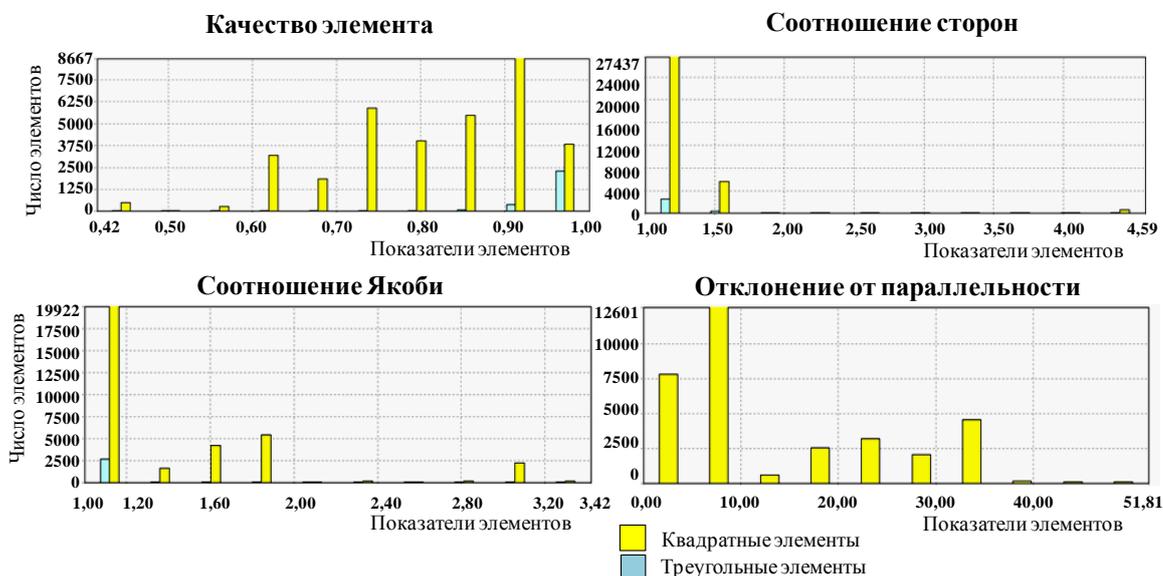


Рис. 37. Качество элементов сетки модели захвата ассоциата рамногалактуронана I латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы.

Еще одним способом проверки качества сетки и адекватности расчета послужило выявление участков с высокой степенью ошибки вычислений. Низкие показатели разницы энергий усредненного и неусредненного напряжения, характеризующие структурную ошибку, свидетельствуют, что в построенной модели захвата ассоциата рамногалактуронана I латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы элементы с высокой степенью ошибки вычислений отсутствуют (рис. 38).

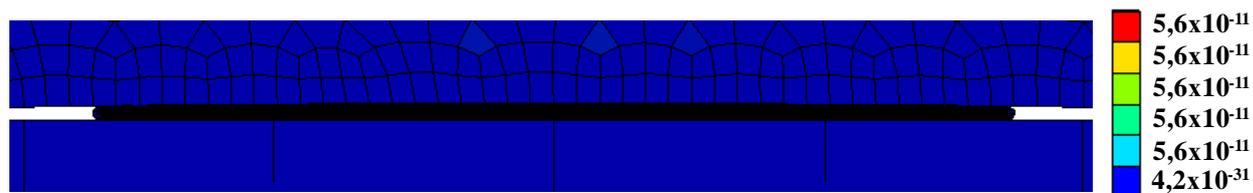


Рис. 38. Оценка ошибки вычислений для конечных элементов системы, включающей ассоциат рамногалактуронана I и микрофибриллы целлюлозы.

Таким образом, созданная для сконструированной модели сетка может считаться оптимальной.

3.3.2. Характеристика деформаций рамногалактуронана I и микрофибрилл целлюлозы в желатинозной клеточной стенке

Для подтверждения достоверности гипотезы о создании натяжения в желатинозной клеточной стенке с механической позиции при моделировании системы оценивали деформацию микрофибриллы целлюлозы, на которую оказывали давление, и рамногалактуронана I в продольном направлении (мкм/мкм) при сдавливании между двумя микрофибриллами (рис. 39в). Знак показателей шкалы на рисунке определяет вид продольной деформации объектов: положительные значения показывают процесс растяжения, отрицательные – сжатия (рис. 39б). При деформации верхней микрофибриллы целлюлозы в продольном направлении в середине системы (рис. 39г) выявлено наличие обоих процессов. В нижней части микрофибриллы происходит деформация сжатия, а в верхней растяжения. Такая картина обеспечена наличием между микрофибриллами рамногалактуронана с заданными упруго-пластическими свойствами.

В модели концы микрофибрилл не закреплены, поэтому на концах верхней микрофибриллы при наличии между ними рамногалактуронана возникали напряжение (рис. 39д) и деформация (рис. 39е) на сжатие. Кроме этого на концы верхней микрофибриллы оказывается сила противодействия, направленная на растяжение (4×10^{-3} мкН, рис. 39ж). Согласно третьему закону Ньютона: сила действия равна силе противодействия. При пересчете напряжения, возникающего на концах микрофибрилл (-0.0004 МПа) с учетом площади поперечного сечения микрофибриллы (9×10^{-6} мкм²) сила действия составила -4×10^{-3} мкН.

Таким образом, при попадании лишь одного ассоциата между двумя латерально взаимодействующими микрофибриллами возникает сила 4×10^{-3} мкН, направленная на сжатие. *In muro* такая сила может создавать натяжение за счет взаимодействия соседних микрофибрилл, приводящего к фиксации положения взаимодействующих участков.

Показатели деформации ассоциата рамногалактуронана I в продольном направлении демонстрируют, что при расположении этого полисахарида между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке, он растягивается (рис. 39и), однако его полного «сдавливания» микрофибриллами не происходит. Показатель напряжения, возникающего в ассоциате рамногалактуронана I при оказании давления составил 0.2-0.3 МПа (рис. 39з). Различия в деформации и напряжении микрофибрилл целлюлозы и рамногалактуронана I связаны с их упруго-пластическими свойствами. Деформации материалов с линейной упругостью (микрофибриллы целлюлозы) являются необратимыми, то есть после снятия нагрузки деформации не исчезают, и система приходит к новому равновесному состоянию, отличному от исходного. В то время как по закону Гука величина упругой деформации (деформации гиперэластичного рамногалактуронана) полностью определяется механическими напряжениями, то есть пропорциональна приложенному к этому телу напряжению. В нашем случае к рамногалактуронану было приложено давление в 0.3 МПа, и напряжение при деформации также составило 0.3 МПа. Таким образом, рамногалактуронан при наличии гиперэластичных свойств способен сохранять компактность при воздействии на систему давления, равного тургорному давлению в растительной клетке.

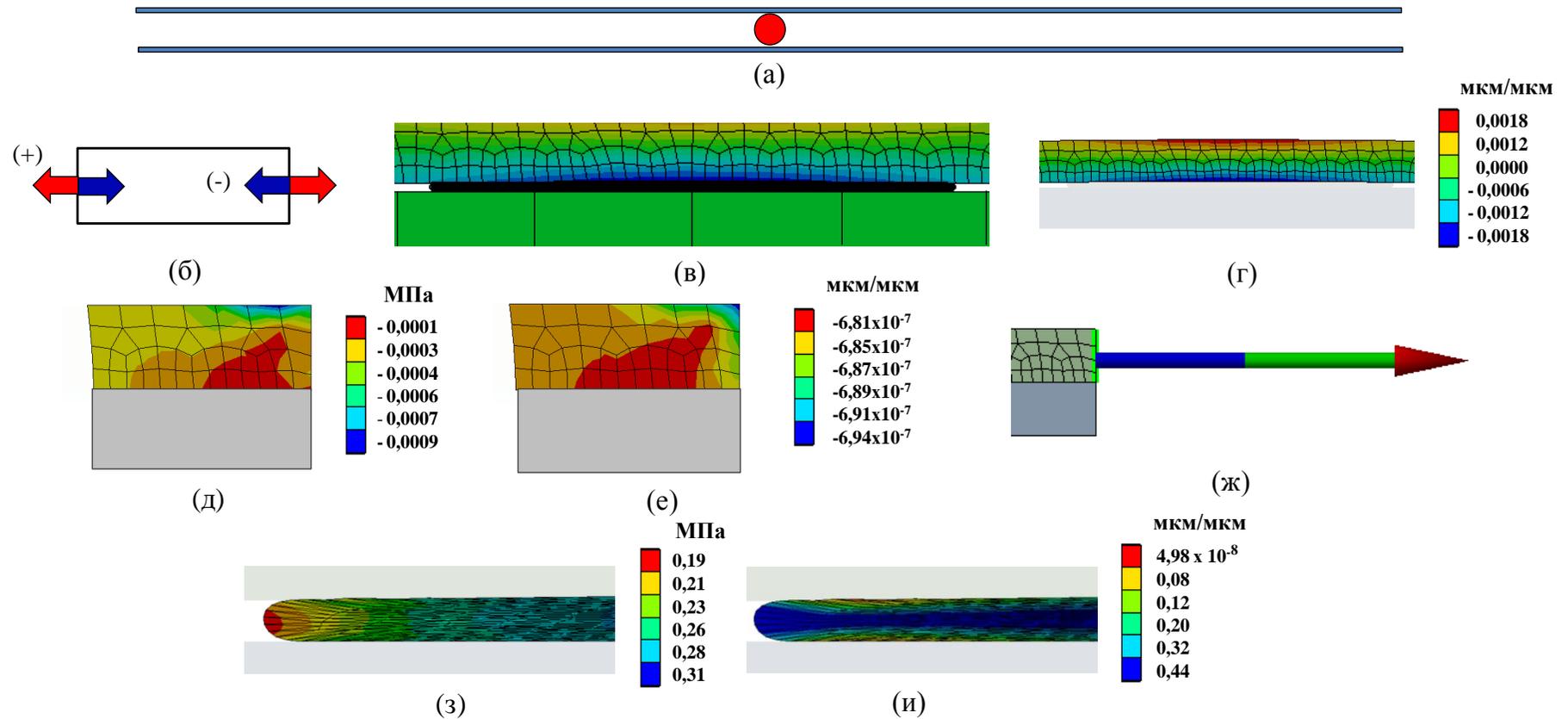


Рис. 39. Моделирование деформации рамногалактуронана I при расположении между двумя микрофибриллами целлюлозы, на одну из которых оказывается давление, соответствующее тургорному давлению в клетке: (а) исходная модельная конструкция захвата микрофибриллами целлюлозы ассоциата рамногалактуронана I, (б) вид продольной деформации (сжатие, растяжение), (в) конечно-элементная модель после оказания давления, (г) деформация верхней микрофибриллы целлюлозы в продольном направлении (мкм/мкм), (д) напряжение в продольном направлении на конце верхней микрофибриллы при наличии рамногалактуронана I (в середине системы) (МПа), (е) деформация в продольном направлении на конце верхней микрофибриллы при наличии рамногалактуронана I (в середине системы) (мкм/мкм), (ж) сила противодействия, возникающая на конце верхней микрофибриллы, (з) напряжение рамногалактуронана I в продольном направлении (МПа), (и) деформация рамногалактуронана I в продольном направлении (мкм/мкм)

3.3.3. Соотнесение параметров, полученных для захвата рамногалактуронана I микрофибриллами целлюлозы *in silico*, с характеристиками клеточной стенки *in vivo*

Одним из подходов верификации построенной модели может служить ее соответствие предложенной модели мезопористой структуры желатинозной клеточной стенки (Clair et al., 2008; Chang et al., 2009; 2015; рис. 2). Формирование пор в желатинозной клеточной стенке (2-50 нм), а также увеличение их диаметра по мере созревания может обуславливаться наличием «запечатанного» между микрофибриллами целлюлозы рамногалактуронана I.

Форма поры, образующейся при захвате ассоциата рамногалактуронана I латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы, характеризуется суженным началом поры с дальнейшим расширением по мере приближения к ассоциату, т.е. имеет, по выражению авторов описавших мезопористую структуру желатинозных слоев волокон древесины (Chang et al., 2015), форму чернильницы. Размер поры по длине, судя по результатам моделирования, составляет 30 нм (рис. 40).

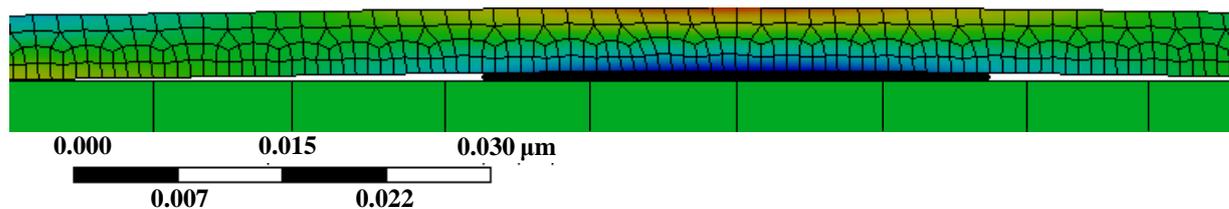


Рис. 40. Масштабное представление пор, формирующихся между микрофибриллами целлюлозы при «запечатывании» ими ассоциата рамногалактуронана I.

Ранее было показано, что синтезированный в аппарате Гольджи рамногалактуронан I после секреции за пределы плазмалеммы и встраивания в формирующуюся клеточную стенку подвергается действию эндогенной галактозидазы (Микшина и др., 2009). Укорочение боковых цепей может привести не только к изменению конформации рамногалактуронана I, о чем

свидетельствует его элюция в более низкомолекулярной области при гель-фильтрации, но и к изменению механических свойств полисахарида. В этом случае для характеристики динамики изменения размера пор между микрофибриллами целлюлозы при наличии распределенного между ними рамногалактуронана I в качестве исходной точки может быть использована модель, включающая охарактеризованный с помощью одноосного сжатия (раздел 3.1.2) гель из высокомолекулярного рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку волокон льна, расположенный между микрофибриллами целлюлозы и еще не модифицированный посредством действия галактозидазы (рис. 41б, 41в). Размеры рамногалактуронана I первой модели (рис. 41б) были рассчитаны по результатам электронной микроскопии (по фотографии) (рис. 41а) и составили 40×420 нм. Вторая модель (рис. 41в) была идентична модели захвата рамногалактуронана I клеточной стенки. Все граничные условия и особенности сетки были аналогичны модели, описанной выше.

Необходимые для моделирования константы Муни-Ривлина C_{01} и C_{10} для геля из рамногалактуронана I до встраивания в клеточную стенку волокон льна были рассчитаны по формулам (7) и (8) и составили для семи экспериментальных точек -206.9 Па и 1742.3 Па, соответственно.

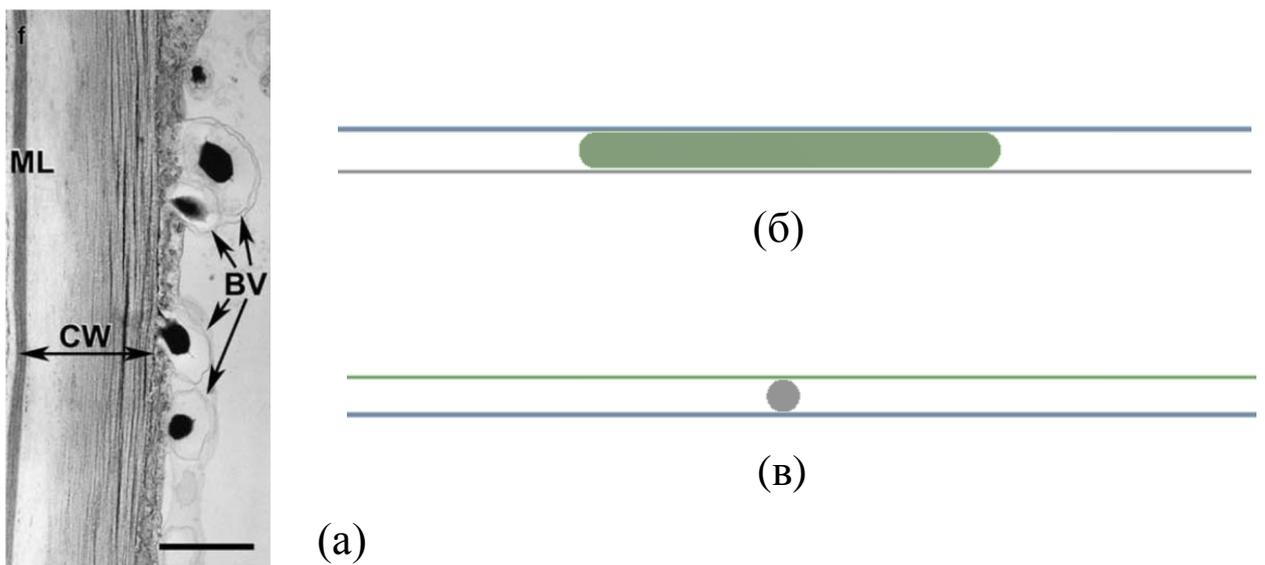


Рис. 41. Моделирование системы из расположенного между микрофибриллами целлюлозы рамногалактуронана I со свойствами и

параметрами, полученными для этого полисахарида до его встраивания в клеточную стенку: (а) продольный срез желатинозной клеточной стенки льна (ML – срединная пластинка, CW – клеточная стенка, BV – везикулы аппарата Гольджи; бар – 1 мкм; Salnikov et al., 2008), (б) первая исходная модельная конструкция, (в) вторая исходная конструкция.

Размер поры, образующейся при наличии высокомолекулярного рамногалактуронана I с рассчитанными по фотографии параметрами между микрофибриллами целлюлозы, составил 15 нм (рис. 42а), что вдвое меньше размера пор, образуемых при захвате микрофибриллами целлюлозы рамногалактуронана I, выделяемого только после их разрушения (рис. 40). Во второй модели размер пор также был ниже, чем для выделенного из клеточной стенки полисахарида, и составил 19 нм (рис. 42б). Следовательно, на размер пор, формируемых при отложении клеточной стенки, влияют не столько размеры частиц захватываемого рамногалактуронана I, сколько упруго-пластические свойства полимера. Таким образом, размер пор увеличивается по мере созревания желатинозного слоя, что согласуется с результатами, полученными для желатинозных волокон древесины натяжения тополя Чангом с соавторами (Chang et al., 2015).

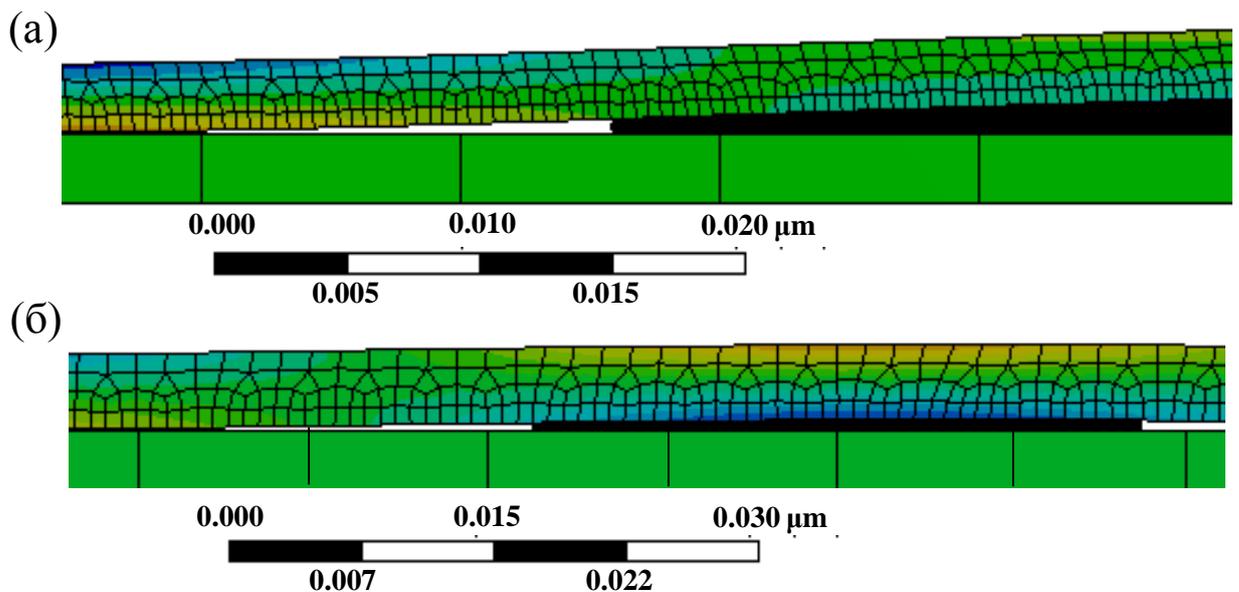


Рис. 42. Масштабное представление пор, формирующихся между микрофибриллами, при расположении между ними высокомолекулярного рамногалактуронана I со свойствами этого полисахарида до встраивания в

клеточную стенку волокон льна: (а) при наличии высокомолекулярного рамногалактуронана I с рассчитанными по фотографии параметрами (б) при наличии высокомолекулярного рамногалактуронана I с параметрами аналогичными клеточностеночному.

Таким образом, с помощью компьютерного моделирования было наглядно продемонстрировано, что при захвате гиперэластичного рамногалактуронана I с установленными механическими параметрами латерально взаимодействующими микрофибриллами целлюлозы, этот полисахарид не разрушается и не распределяется вдоль поверхности микрофибрилл при воздействии на систему давления, уровень которого соответствует тургорному давлению в растительной клетке. Свойства рамногалактуронана I позволяют сохранять ему компактность, что способствует повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основываясь на представленных в этой работе результатах и полученных ранее данных, можно выделить следующие характеристики исследуемого тканеспецифичного рамногалактуронана I желатинозных волокон и закономерности образования надмолекулярных структур этим полимером: 1) рамногалактуронан I волокон льна способен формировать гиперэластичный гель при физиологических концентрациях (4%) в результате действия эффекта, сопряженного с движением молекул воды; 2) этот полисахарид способен самоагрегировать и обладает тремя уровнями организации молекул; 3) способность к гелеобразованию и самоагрегации связана с наличием в образце рамногалактуронана I волокон льна молекул прочно удерживаемой воды, а также с отсутствием в структуре остова этого полисахарида фрагментов полигалактуронана; 4) рамногалактуронан I волокон льна способен поддерживать гидродинамический объем при гидролизе специфичными ферментами (Gur'janov et al., 2007; Микшина, 2009; Микшина и др., 2009) вплоть до фрагментов, содержащих десятую часть остова и 2% боковых галактановых цепей от исходного полисахарида, однако теряет эту способность при полном разрушении остова; 5) надмолекулярные образования рамногалактуронана I с установленными упруго-пластическими свойствами способны выдерживать давление, соответствующее тургорному давлению в клетке, сохраняя компактность и способствуя повышению эффективности натяжения микрофибрилл.

На основе всей совокупности данных, процесс формирования надмолекулярной структуры желатинозной клеточной стенки волокон льна можно представить следующим образом. Синтезированный в аппарате Гольджи рамногалактуронан I волокон, имеющий длинные галактановые цепи, секретируется за пределы плазмалеммы, где встраивается между микрофибриллами целлюлозы, предотвращая их латеральное взаимодействие сразу после формирования (Микшина, 2009). По мере развития волокна

«рыхлый» слой постепенно трансформируется в более «плотный» под действием β -галактозидазы, гидролизующей длинные боковые цепи рамногалактуронана I (Roach et al., 2011). При модификации рамногалактуронана I увеличивается возможность латерального взаимодействия микрофибрилл целлюлозы. Оставшийся между микрофибриллами «запечатанный» полисахарид создает в клеточной стенке натяжение микрофибрилл (Mellerowicz, Gorshkova, 2012) (рис. 43а). Отщепление боковых цепей рамногалактуронана I и сопутствующее этому процессу изменение упруго-пластических свойств этого полисахарида приводит к увеличению размера пор в желатинозной клеточной стенке (рис. 43б). Наличие особых свойств рамногалактуронана I желатинозных волокон льна, сопряженных с выполнением им функций в клеточной стенке, связано со способностью этого полисахарида к самоассоциации (рис. 43в).

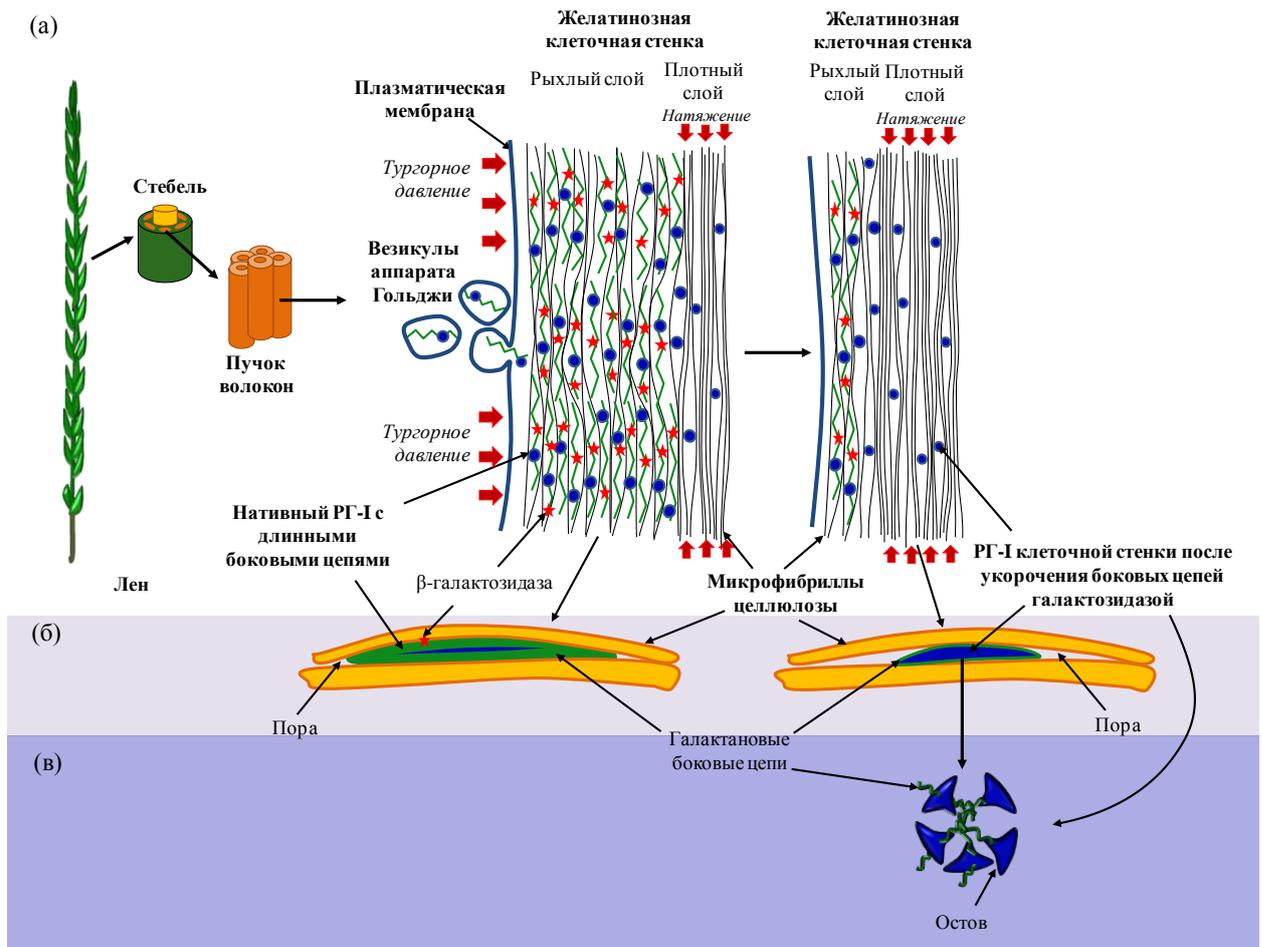


Рис. 43. Схема участия рамногалактуронана I желатинозных волокон льна в процессе формирования третичной клеточной стенки.

Характеристика сходного по структуре рамногалактуронана I как тканеспецифичного полисахарида третичной клеточной стенки в волокнах древесины натяжения тополя (Gorshkova et al., 2015) позволяет предполагать, что описанные в данной работе механизмы создания натяжения микрофибрилл целлюлозы служат основой функционирования желатинозных волокон, дифференцирующихся у разных видов растений в результате деятельности различных меристем и принадлежащих к различным тканям, то есть носят универсальный характер. Сформированная совокупность подходов для анализа свойств рамногалактуронанов может быть использована для характеристики широкого круга сложных полисахаридов и сопряжения их параметров с функциональной нагрузкой.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что рамногалактуронаны I третичной клеточной стенки волокон льна способны образовывать гели, обладающие гиперэластичными свойствами.
2. Показано, что рамногалактуронан I клеточной стенки волокон льна, в отличие от рамногалактуронана I первичной клеточной стенки картофеля, способен к самоассоциации и обладает тремя уровнями организации молекул (гидродинамические радиусы частиц: 3.5, 24 и 240 нм, соответственно).
3. Установлено, что в гелеобразующих образцах рамногалактуронанов I волокон льна присутствуют молекулы воды, более прочно удерживаемые полисахаридами по сравнению с не формирующим гель рамногалактуронаном I первичной клеточной стенки картофеля.
4. Показано, что значительным отличием структуры рамногалактуронана I клеточной стенки льна от рамногалактуронана I картофеля, не способного образовывать гели и ассоциаты, является отсутствие полигалактуроновой кислоты в остове рамногалактуронана I волокон льна.
5. Обнаружено, что для сохранения способности поддерживать гидродинамический объем фрагменты рамногалактуронанов I должны содержать в остове более двух углеводных остатков. Гидролиз остова рамногалактуронана I до димеров [рамноза - галактуроновая кислота] приводит к разрушению ассоциатов.
6. Показано, что рамногалактуронан I способен без потери компактности функционировать в условиях давления, соответствующему тургорному давлению в клетке, создавая эффективное натяжение микрофибрилл целлюлозы.
7. Модификация рамногалактуронана I после встраивания в клеточную стенку приводит к изменению механических свойств полисахарида. Различия в упруго-пластичных свойствах рамногалактуронана I волокон льна до и

после встраивания в клеточную стенку могут обуславливать изменение микроструктуры клеточной стенки по мере созревания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешина, Л. А. Современные представления о строении целлюлоз / Л. А. Алешина, С. В. Глазкова, Л. А. Луговская, М. В. Подойникова, А. Д. Фофанов, Е. В. Силина // Химия растительного сырья. – 2001. – №. 1. – С. 5–36.
2. Горшкова, Т. А. Биогенез растительных волокон / Т. А. Горшкова. – М.: Наука, 2009. – 260 с.
3. Волков, В. В. Определение формы частиц по данным малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния: Методическое пособие / В. В. Волков. – М., 2009. – 51.
4. Галлагер, Р. Метод конечных элементов. Основы / Р. Галлагер. – М.: Мир, 1984. – 428 с.
5. Горбулинский, А. А. Экспериментально-аналитическое определение характеристик эластомеров для моделирования процессов деформации тонкого листа эластичным рабочим инструментом / А. А. Горбулинский // Машиностроительные технологии. – 2013. – С. 1–13.
6. Горшкова, Т.А. Особый тип вторичной клеточной стенки, формируемый растительными волокнами / Т. А. Горшкова, О. П. Гурьянов, П. В. Микшина, Н. Н. Ибрагимова, Н. Е. Мокшина, В. В. Сальников, М. В. Агеева, С. И. Аменицкий, Т. Е. Чернова, С. Б. Чемикосова // Физиология растений. – 2010. – Т. 57. – №3. – С. 328-341.
7. Горшкова, Т.А. Пространственная структура полисахаридов растительных клеточных стенок и её функциональная значимость / Т. А. Горшкова, Л. В. Козлова, П. В. Микшина // Биохимия. – 2013. – Т.78. – №7. – С. 1069–1089.
8. Горшкова, Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система / Т.А. Горшкова. – М.: Наука, 2007. – 429 с.
9. Коробейников, С. Н. Нелинейное деформирование твердых тел / С. Н. Коробейников. – Новосибирск: Изд-во Сиб. отд-ния Рос. АН, 2000. – 262 с.

10. Ландау, Л. Д. Теоретическая физика / Л. Д. Ландау, Е. М. Лифшиц. – М.: Наука, 1987. – Т. VII. Теория упругости. – 248 с.
11. Левин, В.А. Избранные нелинейные задачи механики разрушения / Левин В.А., Морозов Е.М., Матвиенко Ю.Г. – М: Наука, Физматлит, 2004. – 407 с
12. Лотова, Л. И. Морфология и анатомия высших растений / Л. И. Лотова. – М.: Эдиториал УРСС, 2001. – 526 с.
13. Микшина, П. В. Свободная галактоза и галактозидазная активность в волокнах льна на разных стадиях формирования / П.В. Микшина, С.Б. Чемикосова, Н.Е. Мокшина, Н.Н. Ибрагимова, Т.А. Горшкова // Физиология растений. – 2009. – Т. 56. – № 1. – С. 1–11.
14. Микшина, П. В. Роль тканеспецифичного галактана в формировании надмолекулярной структуры клеточной стенки желатинозного типа: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.05 / Микшина Полина Владимировна. – Казань., 2009. – 24 с.
15. Николаев, С. В. 2013 Моделирование биомеханики и морфодинамики растений в пакете COMSOL / С. В. Николаев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/1. – С. 724-737.
16. Оводов, Ю. С. Современные представления о пектиновых веществах / Ю. С. Оводов // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35. – С. 293
17. Стренг, Г. Теория метода конечных элементов / Г. Стренг, Дж. Фикс. – М.: Мир, 1977. – 351 с.
18. Харламов, С. В. Современная диффузионно-упорядоченная спектроскопия ЯМР в химии супрамолекулярных систем: возможности и ограничения / С. В. Харламов, Ш. К. Латыпов // Успехи химии. – 2010. – Т. 79. - № 8. – С. 699–719.
19. Цундель, Г. Гидратация и межмолекулярное взаимодействие / Г. Цундель. – М.: Мир, 1972. – 382 с.
20. Шарова, Е. Клеточная стенка растений / Е. Шарова. – Спб.: Издательство Санкт-Петербургского университета, 2004. – 156 с.

21. Abasolo, W.P. 2009. Stress generation in aerial roots of *Ficus Elastica* (Moraceae) / W.P. Abasolo, M. Yoshida, H. Yamamoto, T. Okuyama // *IAWA Journal*. – 2009. – Vol. 30. – P. 216–224.
22. Abe, K. The influences of boiling and drying treatments on the behaviors of tension wood with gelatinous layers in *Zelkova serrata* / K. Abe, H. Yamamoto // *Journal of Wood Science*. – 2007. – Vol. 53. – P. 5–10.
23. Ageeva, M.V. Intrusive growth of flax phloem fibers is of intercalary type / M.V. Ageeva, B. Petrovska, H. Kiefietal // *Planta*. – 2005. – Vol. 222. – P. 565–574.
24. Albersheim, P. An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants / P. Albersheim, A.G. Darvill, M.A. O'Neill, H.A. Schols, A.G.J. Voragen // in *Pectins and pectinases*, Eds. Visser J., Voragen A.G.J. – The Netherlands: Amsterdam, Elsevier Publishers Amsterdam, 1996. – P. 47–55.
25. Alder, B.J. Phase Transition for a Hard Sphere System / B.J. Alder, T.E. Wainwright // *Journal of Chemical Physics*. – 1957. – Vol. 27. – P. 1208–1209.
26. Aspinall, G.O. Polysaccharides of soybeans. IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal / G.O. Aspinall, I.W. Cottrell, S.V. Egan, I.M. Morrison, J.L. Whyte // *Journal of the Chemical Society C: Organic*. – 1967. – P. 1071–1080.
27. Baba, K. Xyloglucan for generating tensile stress to bend tree stem / K. Baba, Y. W. Park, T. Kaku, R. Kaida, M. Takeuchi, M. Yoshida, Y. Hosoo, Y. Ojio, T. Okuyama, T. Taniguchi, Y. Ohmiya, T. Kondo, Z. Shani, O. Shoseyov, T. Awano, S. Serada, N. Norioka, S. Norioka, T. Hayashi // *Molecular Plant*. – 2009. – Vol. 2. – P. 893-903.
28. Bolduc, J.–F. Finite–element analysis of geometrical factors in micro–indentation of pollen tubes / J.–F. Bolduc, L.J. Lewis, C.–É. Aubin, A. Geitmann // *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*. – 2006. – Vol. 5. – P. 227–236.
29. Bootten, T.J. Solid–state ¹³C–NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains:

- a new model for xyloglucan–cellulose interactions in the cell wall / T.J. Bootten, P.J. Harris, L.D. Melton, R.H. Newman // *Journal of Experimental Botany*. – 2004. – Vol. 55. – № 397. – P. 571–83.
30. Bootten, T.J., Using solid–state ^{13}C NMR spectroscopy to study the molecular organisation of primary plant cell walls / T.J. Bootten, P.J. Harris, L.D. Melton, R.H. Newman // *Methods of Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 715. – P. 179–96.
31. Bos, H.L. The potential of flax fibres as reinforcement for composite materials / H.L. Bos. – Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, Proefschrift, 2004. – 193 p.
32. Bowling, A.J. Immunocytochemical characterization of tension wood: Gelatinous fibers contain more than just cellulose / A.J. Bowling, K.C. Vaughn // *American Journal Botany*. – 2008. – Vol. 5. – P. 655–663.
33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye–binding / M.M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
34. Brooks, B.R. CHARMM: The biomolecular simulation program / B.R. Brooks, C.L. Brooks, A.D. Mackerell Jr., L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Caflisch, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus // *Journal of Computational Chemistry*. – 2009. – Vol. 30. – № 10. – P. 1545–1614.
35. Burchard, W. Light scattering from polysaccharides as soft materials / W. Burchard // *Soft matter characterization*, Eds. R. Borsali, R. Pecora. – Netherlands: Springer, 2008. – P. 465–591.
36. Burgert, I. Properties of chemically and mechanically isolated fibres of spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Part 1: mechanical characterisation / I. Burgert, M. Eder, K. Fruhmann, J. Keckes, P. Fratzl, S.E. Stanzl–Tschegg // *Holzforschung*. – 2005. – Vol. 59. – P. 354–357.

37. Burkert, U. Molecular Mechanics / U. Burkert, N. L. Allinger // ACS Monograph 177, Washington: American Chemical Society, 1982. – 339 pp.
38. Bush, M.S. Pectic epitopes are differentially distributed in the cell walls of potato (*Solanum tuberosum*) tubers / M.S. Bush, M.C. McCann // *Physiologia Plantarum*. – 1999. – Vol. 107. – P. 201–213.
39. Bush, M.S. Developmental regulation of pectic epitopes during potato tuberisation / M.S. Bush, M. Marry, I.M. Huxham, M.C. Jarvis, M.C. McCann // *Planta*. – 2001. – Vol. 213. – P. 869–880.
40. Cael, J.J. Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Paper V. Normal coordinate analysis of cellulose I / J.J. Cael, K.H. Gardner, J.L. Koenig, J. Blackwell // *Journal of Chemical Physics*. – 1975. – Vol. 62. – № 3. – P. 1145–1153.
41. Caffall, K. H. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides / K. H. Caffall, D. Mohnen // *Carbohydrate research*. – 2009. – Vol. 344. – №. 14. – P. 1879–1900.
42. Cardenas, A. On the gelling behavior of “nopal” (*Opuntia ficusindica*) low methoxyl pectin / F. M. Goycoolea, M. Rinaudo // *Carbohydrate Polymers*. – 2008 – Vol. 73. – P. 212–222.
43. Carpita, N.C. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth / N.C. Carpita, D.M. Gibeaut // *The Plant Journal*. – 1993. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1–30.
44. Case, D. A. The Amber biomolecular simulation programs / D.A. Case, T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, R. J. Woods // *Journal of computational chemistry*. – 2005. – Vol. 26. – №. 16. – P. 1668–1688.
45. Chang, S. S. Mesoporosity as a new parameter for understanding tension stress generation in trees / S. S Chang, B. Clair, J. Ruelle, J. Beauchêne, F. Di Renzo, F. Quignard, G. J. Zhao, H. Yamamoto, J. Gril // *Journal of experimental botany*. – 2009. – Vol. 60. – №. 11. – P. 3023–3030.

46. Chang, S. S. Mesoporosity changes from cambium to mature tension wood: a new step toward the understanding of maturation stress generation in trees / S. S. Chang, F. Quignard, T. Almeras, B. Clair // *New Phytology*. – 2015. – Vol. 205. – № 3. – P. 1277–1287.
47. Chen, L. Investigation of macromolecule orientation in dry and hydrated walls of single onion epidermal cells by FTIR microspectroscopy / L. Chen, R. H. Wilson, M. C. McCann // *Journal of Molecular Structure*. – 1997. – Vol. 408. – P. 257–260.
48. Clair, B. Relationship between growth stress, mechanical–physical properties and proportion of fibre with gelatinous layer in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) / B. Clair, J. Ruelle, B. Thibaut // *Holzforschung*. – 2003. – Vol. 57. – №. 2. – P. 189–195.
49. Clair, B. Precautions for the structural analysis of the gelatinous layer in tension wood / B. Clair, J. Gril, K. I. Baba, B. Thibaut, J. Sugiyama // *IAWA Journal*. – 2005. – Vol. 26. – №. 2. – P. 189–195.
50. Clair, B. Tension Wood and Opposite Wood in 21 Tropical Rain Forest Species / B. Clair, J. Ruelle, J. Beauchêne, M. F. Prévost, M. Fournier // *Iawa Journal*. – 2006. – Vol. 27. – №. 3. – P. 329–338.
51. Clair, B. Characterization of a gel in the cell wall to elucidate the paradoxical shrinkage of tension wood / B. Clair, J. Gril, F. Di Renzo, H. Yamamoto, F. Quignard // *Biomacromolecules*. – 2008 – Vol. 9. – P. 494–498.
52. Clair, B. Maturation stress generation in poplar tension wood studied by synchrotron radiation microdiffraction / B. Clair, T. Alméras, G. Pilate, D. Jullien, J. Sugiyama, C. Riekkel // *Plant physiology*. – 2011. – Vol. 155. – №. 1. – P. 562–570.
53. Coenen, G. J. Identification of the connecting linkage between homo or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I / G. J. Coenen, E. J. Bakx, R. P. Verhoef, H. A. Schols, A. G. J. Voragen // *Carbohydrate Polymers*. – 2007. – Vol. 70. – №. 2. – P. 224–235.

54. Coimbra, M. A. FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts / M. A. Coimbra, A. Barros, D. N. Rutledge, I. Delgado // Carbohydrate Research. – 1999. – Vol. 317. – №. 1. – P. 145–154.
55. Cornell, W. D. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules / W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – Vol. 117. – №. 19. – P. 5179–5197.
56. Cosgrove, D. J. Wall extensibility: its nature, measurement, and relationship to plant cell growth / D. J. Cosgrove // New Phytol. – 1993. – Vol. 124. – P. 1–23.
57. Cosgrove, D. J. Measuring in vitro extensibility of growing plant cell walls / D. J. Cosgrove // The Plant Cell Wall. – Humana Press, 2011. – P. 291–303.
58. Crônier, D. Structure and chemical composition of bast fibers isolated from developing hemp stem / D. Crônier, B. Monties, B. Chabbert // Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – Vol. 53. – №. 21. – P. 8279–8289.
59. Davis, E. A. Isolation and an N.M.R. study of pectins from flax (*Linum usitatissimum* L.) / E. A. Davis, C. Derouet, C. Herve' du Penhoat, C. Morvan // Carbohydrate research. – 1990 – Vol. 197. – P. 205–215.
60. De Vries, J. A. Structural features of the neutral sugar side chains of apple pectic substances / J. A. De Vries, C. H. Den Uijl, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, W. Pilnik // Carbohydrate polymers. – 1982. – Vol. 3. – №. 3. – P. 193–205.
61. Deng, C. Selective chemical depolymerization of rhamnogalacturonans / C. Deng, M. A. O'Neill, W. S. York // Carbohydrate research. – 2006. – Vol. 341. – №. 4. – P. 474–484.
62. Dick-Pérez, M. Structure and interactions of plant cell-wall polysaccharides by two- and three-dimensional magic-angle-spinning solid-state NMR / M. Dick-Pérez, Y. Zhang, J. Hayes, A. Salazar, O. A. Zabolina, M. Hong // Biochemistry. – 2011. – Vol. 50. – №. 6. – P. 989–1000.
63. Dick-Perez, M. Multidimensional solid-state NMR studies of the structure and dynamics of pectic polysaccharides in uniformly ¹³C-labeled *Arabidopsis* primary

- cell walls/ M. Dick-Perez, T. Wang, A. Salazar, O. A. Zabolina, M. Hong // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2012. – Vol. 50. – №. 8. – P. 539–550
64. Donaldsson, L. Microfibril Angle: Measurement, Variation and Relationships – A Review / L. Donaldsson // *IAWA Journal*. – 2008. – Vol. 29. – № 4. – P. 345–386.
65. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton (1956). // *Analytical Chemistry*. – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.
66. Dunstan, D. E. Structure and rheology of the κ -carrageenan locust bean gum gels / D. E. Dunstan, Y. Chen, M. L. Liao, R. Salvatore, D. V. Boger, M. Prica // *Food Hydrocolloids*. – 2001. – Vol. 15. – №. 4. – P. 475–484.
67. Eder, M. The fracture behaviour of single wood fibres is governed by geometrical constraints: in situ ESEM studies on three fibre types / M. Eder, S. Stanzl-Tschegg, I. Burgert // *Wood science and technology*. – 2008. – Vol. 42. – №. 8. – P. 679–689.
68. Egholm, R. D. (2006) Stress-strain behavior in uniaxial compression of polymer gel beads / R. D. Egholm, S. F. Christensen, P. Szabo // *Journal of Application of Polymers Science*. – 2006. – Vol. 102. – P. 3037–3047.
69. Fahn, A. *Plant anatomy*. 4th edn. / A. Fahn. – Oxford: Pergamon Press, 1990
70. Fang, C. H. Growth stresses are highly controlled by the amount of G-layer in poplar tension wood / C. H. Fang, B. Clair, J. Gril, S. Q. Liu // *IAWA Journal*. – 2008. – Vol. 29. – №. 3. – P. 237–246.
71. Fayant, P. Finite element model of polar growth in pollen tubes / P. Fayant, O. Girlanda, Y. Chebli, C. É. Aubin, I. Villemure, A. Geitmann // *The Plant Cell*. – 2010. – Vol. 22. – №. 8. – P. 2579–2593.
72. Fisher, J. B. Anatomy of axis contraction in seedlings from a fire prone habitat / J. B. Fisher // *American Journal of Botany*. – 2008. – Vol. 95. – №. 11. – P. 1337–1348.

73. Fishman, M. L. The structure of high-methoxyl sugar acid gels of citrus pectin as determined by AFM / M.L. Fishman, P.H. Cooke // Carbohydrate Research. – 2009. – Vol. 344. – № 14. – P. 1792–1797.
74. Fissore, E. N. Characterisation of fiber obtained from pumpkin (*Cucumis moschata* Duch.) mesocarp through enzymatic treatment / E. N. Fissore, N. M. Ponce, C. A. Stortz, A. M. Rojas, L. N. Gerschenson // Food science and technology international. – 2007. – Vol. 13. – №. 2. – P. 141–151.
75. Flores, E. I. S. Hyperelastic finite element model for single wall carbon nanotubes in tension / E. S. Flores, S. Adhikari, M. I. Friswell, F. Scarpa // Computational Materials Science. – 2011. – Vol. 50. – №. 3. – P. 1083–1087.
76. Foston, M. NMR a critical tool to study the production of carbon fiber from lignin / M. Foston, G. A. Nunnery, X. Meng, Q. Sun, F. S. Baker, A. Ragauskas // Carbon. – 2013. – Vol. 52. – P. 65–73.
77. French, A. D. Computer modeling of carbohydrate molecules / A. D. French, J. W. Brady – American Chemical Society, 1990.
78. Funami, T. Effects of the proteinaceous moiety on the emulsifying properties of sugar beet pectin / T. Funami, G. Zhang, M. Hiroe, S. Noda, M. Nakauma, I. Asai, M. K. Cowman, S. Al-Assaf, G. O. Phillips // Food Hydrocolloids. – 2007. – Vol. 21. – №. 8. – P. 1319–1329.
79. Furuya, N. The chemical composition of the gelatinous layer from the tension wood of *Populus euroamericana* / N. Furuya, S. Takahashi, M. Miyazaki // Journal of the Japan Wood Research Society. – 1970. – Vol. 16. – №. 1. – P. 26–30.
80. Gao, Q. P. Further structural studies of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng* CA Meyer / Q. P. Gao, H. Kiyohara, H. Yamada // Carbohydrate research. – 1990. – Vol. 196. – P. 111–125.
81. Gardner, K. H. The structure of native cellulose / K. H. Gardner, Blackwell J. // Biopolymers. – 1974. – Vol. 13. – №. 10. – P. 1975–2001.
82. Geitmann, A. Mechanical modeling and structural analysis of the primary plant cell wall / A. Geitmann // Current opinion in plant biology. – 2010. – Vol. 13. – №. 6. – P. 693–699.

83. Geyer, A. NMR Analysis of Carbohydrate – Carbohydrate Interactions / A. Geyer // in NMR Spectroscopy of Glycoconjugates, Eds. Jiménez-Barbero J., Peters T. – Germany: Weinheim, Wiley-VCH, 2002. – P. 273–288.
84. Giannouli, P. Cryogelation of xanthan / P. Giannouli, E. R. Morris // Food Hydrocolloids. – 2003. – Vol. 17. – №. 4. – P. 495–501.
85. Gierlinger, N. Chemical imaging of poplar wood cell walls by confocal Raman microscopy / N. Gierlinger, M. Schwanninger // Plant Physiology. – 2006. – Vol. 140. – №. 4. – P. 1246-1254.
86. Gierlinger, N. Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging / N. Gierlinger, L. Sapei, O. Paris // Planta. – 2008. – Vol. 227. – №. 5. – P. 969-980.
87. Glass, D. C. REACH coarse-grained simulation of a cellulose fiber / D. C. Glass, K. Moritsugu, X. Cheng, J. C. Smith // Biomacromolecules. – 2012. – Vol. 13. – №. 9. – P. 2634–2644.
88. Gorshkova, T. A. Cell-wall polysaccharides of developing flax plants / T. A. Gorshkova, S. E. Wyatt, S.B. Chemikosova, V. V. Salnikov, D. M. Gibeaut M. R. Ibragimov, V. V. Lozovaya, N. C. Carpita // Plant Physiology. – 1996. – Vol. 110. – P. 721–729.
89. Gorshkova, T. A. Occurrence of cell-specific galactan is coinciding with bast fibre developmental transition in flax / T. A. Gorshkova, S. B. Chemikosova, V. V. Salnikov, N. V. Pavlencheva, O. P. Gurjanov, T. Stolle–Smits, J. E. G. van Dam // Ind Crops Products. –2004. –Vol. 19. – P. 217–224.
90. Gorshkova, T. A. Tissue-specific processes during cell-wall formation in flax fiber / T. A. Gorshkova, M. V. Ageeva, S. B. Chemikosova, V. V. Salnikov // Plant Biosystems. – 2005 – Vol. 139. – P. 88–92.
91. Gorshkova, T. Secondary cell-wall assembly in flax phloem fibres: role of galactans / T. Gorshkova, C. Morvan // Planta. – 2006. – Vol. 223. – №. 2. – P. 149–158.
92. Gorshkova, T. A. Pectins in secondary cell walls: modifications during cell wall assembly and maturation // T. A. Gorshkova, P. V. Mikshina, N. N. Ibragimova, N.

- E. Mokshina, T. E. Chernova, O. P. Gurjanov, S. B. Chemikosova / in *Pectins and Pectinases*, Eds. Schols H. A., Visser R. G. F., Voragen A. G. J. – The Netherlands: Wageningen, Academic Publishers, 2009. – P. 149–165.
93. Gorshkova, T. Plant fiber formation: state of the art, recent and expected progress, and open questions / T. Gorshkova, N. Brutch, B. Chabbert, M. Deyholos, T. Hayashi, S. Lev-Yadun, E. J. Mellerowicz, C. Morvan, G. Neutelingsi, G. Pilate // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2012. – Vol. 31. – № 3. – P. 201–228.
94. Gorshkova, T. Aspen tension wood fibers contain β -(1→4)-galactans and acidic arabinogalactans retained by cellulose microfibrils in gelatinous walls / T. Gorshkova, N. Mokshina, T. Chernova, N. Ibragimova, V. Salnikov, P. Mikshina, Th. Tryfona, A. Banasiak, P. Immerzeel, P. Dupree, E.J. Mellerowicz // *Plant Physiology*. – 2015. – in press (<http://dx.doi.org/10.1104/pp.15.00690>).
95. Gorzsas, A. Cell specific chemotyping and multivariate imaging by combined FT-IR microspectroscopy and OPLS analysis reveals the chemical landscape of secondary xylem / A. Gorzsas, H. Stenlund, P. Persson, J. Trygg, B. Sundberg // *The Plant Journal*. – 2011. – Vol. 66. – P. 903–914.
96. Grant, G. T. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model / G. T. Grant, E. R. Morris, D. A. Rees, P. J. Smith, D. Thom // *FEBS letters*. – 1973. – Vol. 32. – № 1. – P. 195–198.
97. Griess, G. A. The formation of small-pore gels by an electrically charged agarose derivative / G. A. Griess, K. B. Guiseley, M. M. Miller, R. A. Harris, P. Serwer // *Journal of Structural Biology*. – 1998. – Vol. 123. – № 2. – P. 134–142.
98. Groom, L. Mechanical properties of individual southern pine fibers. Part I: Determination and variability of stress–strain curves with respect to tree height and juvenility / L. Groom, L. Mott, S. Shaler // *Wood Fiber Science*. – 2002a. – Vol. 34. – № 1. – P. 14–27.
99. Guillon, F. Enzymic hydrolysis of the “hairy” fragments of sugar–beet pectins / F. Guillon, J. F. Thibault, F. M. Rombouts, A. G. Voragen, W. Pilnik // *Carbohydrate Research*. – 1989. – Vol. 190. – № 1. – P. 97–108.

100. Guillon, F. Oxidative cross-linking of chemically and enzymatically modified sugar-beet pectin / F. Guillon, J. F. Thibault // Carbohydrate polymers. – 1990. – Vol. 12. – №. 4. – P. 353–374.
101. Gulrez, S. K. H. Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications / S. K. H. Gulrez, G. O. Phillips, S. Al-Assaf // in Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications, Ed. A. Carpi. – Croatia: Rijeka, INTECH Open Access Publisher, 2011. – P. 117–150.
102. Gur'janov, O. P. MALDI-TOF MS evidence for the linking of flax bast fibre galactan to rhamnogalacturonan backbone / O. P. Gur'janov, T. A. Gorshkova, M. Kabel, H. A. Schols, J. E. van Dam // Carbohydrate polymers. – 2007. – Vol. 67. – №. 1. – P. 86–96.
103. Gurjanov, O. P. Polysaccharides, tightly bound to cellulose in cell wall of flax bast fibre: Isolation and identification / O. P. Gurjanov, N. N. Ibragimova, O. I. Gnezdilov, T. A. Gorshkova // Carbohydrate polymers. – 2008. – Vol. 72. – №. 4. – P. 719–729.
104. Hayot, C. M. Viscoelastic properties of cell walls of single living plant cells determined by dynamic nanoindentation / C. M. Hayot, E. Forouzesh, A. Goel, Z. Avramova, J. A. Turner // Journal of experimental botany. – 2012. – Vol. 63. – №. 7. – P. 2525–2540.
105. Hennink, W. E. Novel crosslinking methods to design hydrogels / W. E. Hennink, C. F. Van Nostrum // Advanced drug delivery reviews – 2002. – Vol. 64. – P. 223–236.
106. Herbert, E. G. Measuring the constitutive behavior of viscoelastic solids in the time and frequency domain using flat punch nanoindentation / E. G. Herbert, W. C. Oliver, A. Lumsdaine, G. M. Pharr // Journal of Materials Research. – 2009. – Vol. 24. – №. 03. – P. 626–637.
107. Hofstetter, K. Moisture uptake in native cellulose – the roles of different hydrogen bonds: a dynamic FT-IR study using deuterium exchange / K. Hofstetter, B. Hinterstoisser, L. Salmen // Cellulose. – 2006. – Vol. 13. – P. 131–145.

108. Hudson, S. D. Structure and Strength: Anisotropic Polyvinyl Alcohol Hydrogels and Spider Mite Silk Fibres: A thesis of the degree of Doctor of Philosophy / Stephen Donald Hudson. – London, Ontario, Canada, 2011. – 160 pp.
109. Ioelovich, M. Cellulose as a nanostructured polymer: a short review / M. Ioelovich // *BioResources*. – 2008. – Vol. 3. – №. 4. – P. 1403–1418.
110. Ishii, T. O-acetylated oligosaccharides from pectins of potato tuber cell walls / T. Ishii // *Plant physiology*. – 1997. – Vol. 113. – №. 4. – P. 1265–1272.
111. Jackson, C. L. Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure / C. L. Jackson, T. M. Dreaden, L. K. Theobald, N. M. Tran, T. L. Beal, M. Eid, C. L. Jackson // *Glycobiology*. – 2007. – Vol. 17. – № 8. – P. 805–819.
112. Jha, A. K. Hierarchically structured, hyaluronic acid-based hydrogel matrices via the covalent integration of microgels into macroscopic networks / M.S. Malik, M.C. Farach-Carson, R.L. Duncanb, X. Jia // *RSC J*. – 2010. – Vol. 6. – P. 5045–5055.
113. Kačuráková, M. Infrared study of arabinoxylans / M. Kačuráková, A. Ebringerova, J. Hirsch, Z. Hromadkova // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1994. – Vol. 66. – №. 3. – P. 423–427.
114. Kačuráková, M. Hydration properties of xylan-type structures: an FTIR study of xylooligosaccharides / M. Kačuráková, P. S. Belton, R. H. Wilson, J. Hirsch, A. Ebringerová // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1998. – Vol. 77. – №. 1. – P. 38–44.
115. Kačuráková, M. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies / M. Kačuráková, N. Wellner, A. Ebringerova, Z. Hromádková, R. H. Wilson, P. S. Belton // *Food Hydrocolloids*. – 1999. – Vol. 13. – №. 1. – P. 35–41.
116. Kacurakova, M. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses / M. Kacurakova, P. Capek, V. Sasinkova, N. Wellner, A. Ebringerova // *Carbohydrate Polymers*. – 2000. – Vol. 43. – №. 2. – P. 195–203.

117. Kačuráková, M. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates / M. Kačuráková, R. H. Wilson // *Carbohydrate Polymers*. – 2001. – Vol. 44. – №. 4. – P. 291–303.
118. Kählig, H. Analysis of carbohydrate mixtures by diffusion difference NMR spectroscopy / H. Kählig, K. Dietrich, S. Dorner // Springer Vienna. – 2002. – P. 239–248.
119. Kaku, T. Proteomic analysis of the G-layer in poplar tension wood / T. Kaku, S. Serada, K. I. Baba, F. Tanaka, T. Hayashi // *Journal of wood science*. – 2009. – Vol. 55. – №. 4. – P. 250–257.
120. Karimi-Varzaneh, H. A. Coarse-grained modeling for macromolecular chemistry / H. A. Karimi-Varzaneh, F. Müller-Plathe // *Multiscale Molecular Methods in Applied Chemistry*. – Springer Berlin Heidelberg – 2012. – P. 295–321.
121. Kastner, H. Structure formation in sugar containing pectin gels – influence of Ca²⁺ on the gelation of lowmethoxylated pectin at acidic pH / H. Kastner, U. Einhorn-Stoll, B. Senge. // *Food Hydrocolloids*. – 2012. – Vol. 27. – P. 42–49.
122. Kha, H. WallGen, software to construct layered cellulose-hemicellulose networks and predict their small deformation mechanics / H. Kha, S. C. Tuble, S. Kalyanasundaram, R. E. Williamson // *Plant physiology*. – 2010. – Vol. 152. – №. 2. – P. 774–786.
123. Kirschner K. N. GLYCAM06: generalizable biomolecular force field. Carbohydrates / K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel, J. González-Outeiriño, C. R. Daniels, B. L. Foley, R. J. Woods // *Journal of computational chemistry* – 2008. – Vol. 29. – №. 4. – P. 622–655.
124. Kokcharov, I. Structural Integrity Analysis / I. Kokcharov, A. Burov // Switzerland: Geneva, 2013. – 396 pp.
125. Kutschera, U. Cell elongation, turgor and osmotic pressure in developing sunflower hypocotyls / U. Kutschera, K. Köhler // *Journal of Experimental Botany*. – 1994. – Vol. 45. – №. 5. – P. 591–595.

126. Lau, J. M. Structure of backbone of rhamnogalacturonan I, A pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants / J. M. Lau, M. McNeil, A. G. Darvill, G. Alan, A. P. Darvill // Carbohydrate Research. – 1985. – Vol. 137. – P. 111–125.
127. Levitt, M. Computer simulation of protein folding, / M. Levitt, A. Warshel // Nature. – 1975. – Vol. 253. – №. 5494. – P. 694–698.
128. Lev–Yadun, S. Eccentric deposition of secondary xylem in stems of the climber *Ephedra campylopoda* (*Gnetales*) / S. Lev–Yadun // IAWA Journal. – 1999. – Vol. 20. – №. 2. – P. 165–170.
129. McCammon, J. A. Dynamics of folded proteins / J. A. McCammon, B. R. Gelin, M. Karplus // Nature. – 1977. – Vol. 267. – P. 585–590.
130. McCann, M. C. Direct visualization of cross–links in the primary plant cell wall / M. C. McCann, B. Wells, K. Roberts // Journal of Cell Sciences. – 1990. – Vol. 96. – P. 323–334.
131. McCann, M. C. Fourier transform infrared microspectroscopy is a new way to look at plant cell walls / M. C. McCann, , M. Hammouri, R. Wilson, P. Belton, K. Roberts // Plant Physiology. – 1992. – Vol. 100. – P. 1940– 1947.
132. McCann, M. C. Orientation of macromolecules in the walls of elongating carrot cells / M. C. McCann, N. J. Stacey, R. Wilson, K. Roberts // Journal of Cell Sciences. – 1993. – Vol. 106. – P. 1347–1356.
133. McCann, M. C. Architecture of the primary cell wall / McCann M. C., Roberts K. In The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form, Ed. Lloyd C. W. – Great Britain: London, Academic Press, 1991. – P. 109–129.
134. McNeil, M. Structure of plant cell walls X. Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension–cultured sycamore cells / M. McNeil, A. G. Darvill, P. Albersheim // Plant physiology. – 1980. – Vol. 66. – №. 6. – P. 1128–1134.
135. Mellerowicz, E. J. Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem / E. J. Mellerowicz, M. Baucher, B. Sundberg, W. Boerjan // Plant Cell Walls. – Springer Netherlands. – 2001. – P. 239–274.

136. Mellerowicz, E. J. Xyloglucan: the molecular muscle of trees / E. J. Mellerowicz, P. Immerzeel, T. Hayashi // *Annals of botany*. – 2008. – Vol. 102. – №. 5. – P. 659–665.
137. Mellerowicz, E. J. Tensional stress generation in gelatinous fibres: a review and possible mechanism based on cell–wall structure and composition / E. J. Mellerowicz, T. A. Gorshkova // *Journal of experimental botany*. – 2012. – Vol. 63. – №. 2. – P. 551–565.
138. Merker, J. High temperature mechanical properties of the platinum group metals / B. Fischer, A. Behrends, D. Freund, D. F. Lupton, J. Merker // *Platinum Metals Review*. – 2001. – Vol. 45. – №. 2. – P. 74–82.
139. Metropolis, N. Equation of state calculations by fast computing machines / N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, E. Teller // *The journal of chemical physics*. – 1953. – Vol. 21. – №. 6. – P. 1087–1092.
140. Mikshina, P. V. Structural details of pectic galactan from the secondary cell walls of flax (*Linum usitatissimum* L.) phloem fibres / P. V. Mikshina, O. P. Gurjanov, F. K. Mukhitova, A. A. Petrova, A. S. Shashkov, T. A. Gorshkova // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 87. – №. 1. – P. 853–861.
141. Mikshina, P. Cellulosic fibers: role of matrix polysaccharides in structure and function / P. Mikshina, T. Chernova, S. Chemikosova, N. Ibragimova, N. Mokshina, T. Gorshkova // in *Cellulose*, Eds. van de Ven, T., Godbout, L. – Croatia: Rijeka, InTech, 2013. – P. 91–112.
142. Mooney, C. Analysis of retted and non retted flax fibres by chemical and enzymatic means / C. Mooney, T. Stolle-Smits, H. Schols, E. de Jong, // *Journal of Biotechnology*. – 2001. – Vol. 89. – №. 2. – P. 205–216.
143. Mott, P. H. Limits to Poisson's ratio in isotropic materials / P. H. Mott, C. M. Roland // *Physical Review B*. – 2009. – Vol. 80. – №. 13. – P. 132104.
144. Müller, M. Direct investigation of the structural properties of tension wood cellulose microfibrils using microbeam X–ray fibre diffraction / M. Müller, M. Burghammer, J. Sugiyama // *Holzforschung*. – 2006. – Vol. 60. – P. 474–479.

145. Mutter, M. Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase / M. Mutter, C. M. Renard, G. Beldman, H. A. Schols, A. G. Voragen // Carbohydrate research. – 1998. – Vol. 311. – №. 3. – P. 155–164.
146. Nakamura, A. Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation / A. Nakamura, H. Furuta, H. Maeda, Y. Nagamatsu, A. Yoshimoto // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2001 – Vol. 65. – №. 10 – P. 2249–2258.
147. Naran, R. Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage / R. Naran, G. Chen, N. Carpita // Plant physiology. – 2008. – Vol. 148. – №. 1. – P. 132–141.
148. Nayar, V. T. Elastic and viscoelastic characterization of agar / V. T. Nayar, J. D. Weiland, C. S. Nelson, A. M. Hodge // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2012. – Vol. 7. – P. 60–68.
149. Newman, R.H. Molecular ordering of cellulose in apple cell walls / R. H. Newman, M.-A. Ha, L. D. and Melton // J. Agric. Food Chem. – 1994. – Vol. 42. – P. 1402–1406.
150. Newman, R. H. Solid-state ^{13}C nuclear magnetic resonance characterization of cellulose in the cell walls of Arabidopsis thaliana leaves / R. H. Newman, L. M. Davies, J. Harris // Plant Physiology. – 1996. – Vol. 111. – P. 475–485.
151. Newman, R.H. Estimation of the lateral dimensions of cellulose crystallites using ^{13}C NMR signal strengths / R.H. Newman // Solid State NMR. – 1999. – Vol. 15. – P. 21–29.
152. Newman, R. H. Molecular conformations at the cellulose–water interface / R. H. Newman, H. Roger, T. C. Davidson // Cellulose. – 2004. – Vol. 11. – №. 1. – P. 23–32.
153. Ngouemazong, E. D. Stiffness of Ca^{2+} -pectin gels: combined effect of degree and pattern of methyl esterification for various Ca^{2+} concentrations / E. D.

- Ngouemazong, R. P. Jolie, R. Cardinaels, A. Van Loey, P. Moldenaers, M. Hendrickx // *Carbohydrate Research*. – 2012. – V. 348. – P. 69-76.
154. Nikonenko, N. A. Analysis of the structure of carbohydrates with use of the regularized deconvolution method of vibrational spectra / N. A. Nikonenko, D. K. Buslov, N. I. Sushko, R.G. Zhibankov // *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* – 2002. – Vol. 4. – P. 13–16.
155. Nishikubo, N. Xyloglucan endo–transglycosylase (XET) functions in gelatinous layers of tension wood fibers in poplar – a glimpse into the mechanism of the balancing act of trees / N. Nishikubo, T. Awano A. Banasiak, V. Bourquin, F. Ibatullin, R. Funada // *Plant Cell Physiology*. – 2007. – Vol. 48. – P. 843–855.
156. Nishinari, K. Solution properties of pullulan / K. Nishinari, K. Kohyama, P. A. Williams, G. O. Phillips, W. Burchard, K. Ogino // *Macromolecules*. – 1991. – Vol. 24. – №. 20. – P. 5590–5593.
157. Norberg, P. H. Physical and chemical properties of the gelatinous layer in tension wood fibres of aspen (*Populus tremula* L.) / P. H. Norberg, H. Meier // *Holzforschung–International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*. – 1966. – Vol. 20. – №. 6. – P. 174–178.
158. O'Brien, A. Gelation of high–methoxyl pectin by enzymatic de–esterification in the presence of calcium–ions: a preliminary evaluation / A. B. O'Brien, K. Philp, E. R. Morris // *Carbohydrate Research*. – 2009. – Vol. 344. – P. 1818–1823.
159. Obolonkova, E. S. Formation and structures of anisotropic gels / E. S. Obolonkova, E. M. Belavtseva, E. E. Braudo, V. B. Tolstoguzov // *Colloid & Polymer Science*. – 1974. – Vol. 252. – №. 7. – P. 526–529.
160. Oechslin, R. Pectic substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I / R. Oechslin, M. V. Lutz, R. Amado // *Carbohydrate Polymers*. – 2003. – Vol. 51. – P. 301–310.
161. O'Neill, M. A. The composition and structure of plant primary cell walls / M. A. O'Neill, W. S. York // *The plant cell wall*. – 2003. – P. 1–54.

162. O'Neill, M. The pectic polysaccharides of primary cell walls / M. O'Neill, P. Albersheim, A. Darvill // *Methods of Plant Biochemistry*. – 1990. – Vol. 2. – P. 415-441.
163. Oomen, R. J. F. J. Towards unravelling the biological significance of the individual components of pectic hairy regions in plants / R. J. Oomen, J. P. Vincken, M. S. Bush, M. Skjøt, C. H. Doeswijk-Voragen, P. Ulvskov, A. G. J. Voragen, M. C. McCann, R. G. Visser // *Advances in pectin and pectinase research*. – Springer Netherlands. – 2003. – P. 15–34.
164. Park, H. Biodegradable hydrogels for drug delivery / H. Park, K. Park, W.S.W. Shalaby // *Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania, USA*. – 1993.
165. Peaucelle, A. Pectin-induced changes in cell wall mechanics underlie organ initiation in Arabidopsis / A. Peaucelle, S. A. Braybrook, L. Le Guillou, E. Bron, C. Kuhlemeier, H. Höfte // *Current biology*. – 2011. – Vol. 21. – №. 20. – P. 1720–1726.
166. Perez, S. The threedimensional structures of the pectic polysaccharides / S. Perez, K. Mazeau, C. H. Penhoat // *Plant Physiology. Biochem.* – 2000. – Vol. 38. – P. 37–55.
167. Perez, S. Conformations, Structures, and Morphologies of Celluloses / S. Perez, K. Mazeau // in *Polysaccharides, structure and functional versatility*, Ed. Dumitriu, S. USA: New York, 2005. – P. 41–68.
168. Perrone, P. Patterns of methyl and O-acetyl esterification in spinach pectins: new complexity / P. Perrone, C. M. Hewage, A. R. Thomson, K. Bailey, I. H. Sadler, S. C. Fry // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 60. – №. 1. – P. 67–77.
169. Politi, M. Useful applications of DOSY experiments for the study of mushroom polysaccharides // M. Politi, P. Groves, M. I. Chávez, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero // *Carbohydrate research*. – 2006. – Vol. 341. – №. 1. – P. 84–89.
170. Prade, R. A. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions / R.A. Prade, D.F. Zhan, P. Ayoubi, A. J. Mort // *Biotechnol. Genet. Eng.* – 1999. – Vol. 16. – P. 361–391.

171. Prodhan, A. Orientation of microfibrils and microtubules in developing tension-wood fibres of Japanese ash (*Fraxinus mandshurica* var. *japonica*) / A. Prodhan, R. Funada, J. Ohtani, H. Abe, K. Fukazawa // *Planta*. – 1995. – Vol. 196. – №. 3. – P. 577–585.
172. Ralet, M. C. Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases / M. C. Ralet, E. Bonnin, J. F. Thibault // *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. – 2001. – Vol. 753. – №. 1. – P. 157–166. Renard et al., 1995
173. Renard, C. M. G. C. Glucuronic acid directly linked to galacturonic acid in the rhamnogalacturonan backbone of beet pectins / C. M. G. C. Renard, M. J. Crépeau, J. F. Thibault // *European Journal of Biochemistry*. – 1999. – Vol. 266. – №. 2. – P. 566–574.
174. Ridley, B. L. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling / B. L. Ridley, M. A. O'Neill, D. Mohnen // *Phytochemistry*. – 2001. – Vol. 57. – №. 6. – P. 929–967.
175. Rihouey, C. Structural features of CDTA-soluble pectins from flax hypocotyls / C. Rihouey, C. Morvan, I. Borissova, A. Jauneau, M. Demarty, M. Jarvis // *Carbohydrate polymers*. – 1995. – Vol. 28. – №. 2. – P. 159–166.
176. Roach, M. J. Development of cellulosic secondary walls in flax fibers requires β -galactosidase / M. J. Roach, N. Y. Mokshina, A. Badhan, A. V. Snegireva, N. Hobson, M. K. Deyholos, T. A. Gorshkova // *Plant physiology*. – 2011. – Vol. 156. – №. 3. – P. 1351–1363.
177. Robertson, C. G. Effect of structural arrest on Poisson's ratio in nanoreinforced elastomers / C. G. Robertson, R. Bogoslovov, C. M. Roland // *Physical Review*. – 2007. – №. 75. – 05140317.
178. Ross, K. A. Analysis of the elastic modulus of agar gel by indentation / K. A. Ross, M. G. Scanlon // *Journal of Texture Studies*. – 1999. – Vol. 30. – P. 17–27.
179. Rosiak, J. M. Hydrogels and their medical applications / J. M. Rosiak, F. Yoshii // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. – 1999. – Vol. 151. – №. 1. – P. 56–64.

180. Rouquerol, F. Adsorption by powders and porous solids: principles, methodology and applications / Rouquerol F, Rouquerol J, Sing K. // USA: San Diego, Academic Press, 1999. – 467 pp.
181. Roylance, D. Engineering viscoelasticity / D. Roylance // Department of Materials Science and Engineering–Massachusetts Institute of Technology, Cambridge MA. – 2001. – Vol. 2139. – P. 1–37. Rubinstein, Colby, 2003
182. Ryden, P. Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II–borate complexes / P. Ryden, K. Sugimoto-Shirasu, A. C. Smith, K. Findlay, W. D. Reiter, M. C. McCann // Plant physiology. – 2003. – Vol. 132. – №. 2. – P. 1033–1040.
183. Salnikov, V. V. Homofusion of Golgi secretory vesicles in flax phloem fibers during formation of the gelatinous secondary cell wall / V.V. Salnikov, M. V. Ageeva, T.A. Gorshkova // Protoplasma. – 2008. – Vol. 233. – P. 269–273.
184. Satiat–Jeunemaitre, B. Redistribution of a Golgi glycoprotein in plant cells treated with Brefeldin A / B. Satiat–Jeunemaitre, C. Hawes // Journal of Cell Science. – 1992. – Vol. 103. – №. 4. – P. 1153–1166.
185. Saulnier, L. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans / L. Saulnier, J. F. Thibault // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1999. – Vol. 79. – №. 3. – P. 396–402.
186. Schols, H. A. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase / H. A. Schols, A. G. J. Voragen // Carbohydrate Research. – 1994. – Vol. 256. – №. 1. – P. 83–95.
187. Schols, H. A. Complex pectins: structure elucidation using enzymes / H. A. Schols, A. G. J. Voragen // Progress in biotechnology. – 1996. – Vol. 14. – P. 3–19.
188. Schols, H. A. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process / H. A. Schols, M. A. Posthumus, A. G. J. Voragen // Carbohydrate Research. – 1990. – Vol. 206. – №. 1. – P. 117–129.

189. Schols, H. A. Isolation and characterization of rhamnogalacturonan oligomers, liberated during degradation of pectic hairy regions by rhamnogalacturonase / H. A. Schols, A. G. J. Voragen, I. J. Colquhoun // *Carbohydrate research*. – 1994. – Vol. 256. – №. 1. – P. 97–111.
190. Sekine, Y. Dependence of structure of polymer side chain on water structure in hydrogels / Y. Sekine, H. Takagi, S. Sudo, Y. Kajiwara, H. Fukazawa, T. Ikeda–Fukazawa // *Polymer*. – 2014. – Vol. 55. – P. 6320–6324.
191. Sengkhampan N. Characterisation of cell wall polysaccharides from okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) / N. Sengkhampan, R. Verhoef, H. A. Schols, T. Sajjaanantakul, A. G. Voragen // *Carbohydrate Research*. – 2009. – Vol. 344. – №. 14. – P. 1824–1832.
192. Shibayama, M. Distribution analyses of multi-modal dynamic light scattering data / M. Shibayama, T. Karino, S. Okabe // *Polymer*. – 2006. – Vol. 47. – №. 18. – P. 6446–6456.
193. Simpson, A. J. Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy / A. J. Simpson // *Magnetic Resonance in Chemistry*. – 2002. – Vol. 40. – №. 13. – P. S72–S82.
194. Sivan, P. Occurrence of reaction xylem in the peduncle of *Couroupita guianensis* and *Kigelia pinnata* / P. Sivan, P. Mishra, K. S. Rao // *IAWA Journal*. – 2010. – Vol. 31. – P. – 203–216.
195. Soares, T. A. An improved nucleic-acid parameter set for the GROMOS force field / T. A. Soares P. H. Hünenberger, M. A. Kastholz, V. Kräutter, T. Lenz, R. D. Lins, C. Oostenbrink, W. F. van Gunsteren // *Journal of computational chemistry*. – 2005. – Vol. 26. – №. 7. – P. 725–737.
196. Šturcová, A. Structural details of crystalline cellulose from higher plants / A. Šturcová, I. His, D. C. Apperley, J. Sugiyama, M. C. Jarvis // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 5. – №. 4. – P. 1333–1339.

197. Šturcová, A. Elastic modulus and stress-transfer properties of tunicate cellulose whiskers / A. Šturcová, G. R. Davies, S. J. Eichhorn // *Biomacromolecules*. – 2005. – Vol. 6. – №. 2. – P. 1055-1061.
198. Sun, G. Z. Self-focusing of short intense pulses in plasmas / G. Z. Sun, E. Ott, Y. C. Lee, P. Guzdar // *Physics of Fluids (1958-1988)*. – 1987. – Vol. 30. – №. 2. – P. 526–532.
199. Sun, R. Fractionation and characterization of polysaccharides from abaca fibre / R. Sun, J. M. Fang, A. Goodwin, J. M. Lawther, A. J. Bolton // *Carbohydrate Polymers*. – 1998. – Vol. 37. – №. 4. – P. 351–359.
200. Suslov, D. Cellulose orientation determines mechanical anisotropy in onion epidermis cell walls / D. Suslov, J. P. Verbelen // *Journal of Experimental Botany*. – 2006. – Vol. 57. – №. 10. – P. 2183–2192.
201. Talmadge, K. W. The structure of plant cell walls I. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides / K. W. Talmadge, K. Keegstra, W. D. Bauer, P. Albersheim // *Plant Physiology*. – 1973. – Vol. 51. – №. 1. – P. 158–173.
202. Tang, S. Survival characteristics of corn seed during storage: II. Rate of seed deterioration / S. Tang, D. M. TeKrony, D. B. Egli, P. L. Cornelius // *Crop Science*. – 1999. – Vol. 39. – №. 5. – P. 1400–1406.
203. Thygesen, L. G. Dislocations in single hemp fibres—investigations into the relationship of structural distortions and tensile properties at the cell wall level / L. G. Thygesen, M. Eder, I. Burgert // *Journal of materials science*. – 2007. – Vol. 42. – №. 2. – P. 558–564.
204. Tomlinson, P.B. Development of gelatinous (reaction) fibers in stems of *Gnetum gnemon* (Gnetales) / P.B. Tomlinson // *American Journal of Botany*. – 2003. – Vol. 90. – № 7. – P. 965–972.
205. van de Vis, J. W. Purification and characterization of endo-1, 4- β -d-galactanases from *Aspergillus niger* and *Aspergillus aculeatus*: use in combination with arabinanases from *Aspergillus niger* in enzymic conversion of potato arabinogalactan / J. W. van de Vis, M. J. F. Searle-van Leeuwen, H. A. Siliha, F. J.

- M. Kormelink, A. G. J. Voragen // Carbohydrate polymers. – 1991. – Vol. 16. – №. 2. – P. 167–187.
206. van Gunsteren, W. F. Methods for calculation of free energies and binding constants: Successes and problems / W. F. Van Gunsteren, P. Weiner // Computer simulation of biomolecular systems: Theoretical and experimental applications. – Eds., Escom, Leiden, 1989 – P. 27–59.
207. van Gunsteren, W. F. Computation of free energy in practice: choice of approximations and accuracy limiting factors / W. F. van Gunsteren, T. C. Beutler, F. Fraternali, P. M. King, A. E. Mark, P. E. Smith // Computer simulation of biomolecular systems, theoretical and experimental applications. – 1993. – Vol. 2. – №. 3. – P. 15–348.
208. van Gunsteren, W. F. Biomolecular Simulation, the GROMOS96 Manual and User Guide / W. F. van Gunsteren, S. R. Billeter, A. A. Eising, P. A. Hunenberger, P. Kruger, A. E. Mark, W. R. P. Scott, I. G. Tironi. – Hochschulverlag AG der ETH: Zurich, 1996.
209. van Hazendonk, J. M. Structural analysis of acetylated hemicellulose polysaccharides from fibre flax (*Linum usitatissimum* L.) / J. M. van Hazendonk, E. J. Reinerik, P. de Waard, J. E. van Dam // Carbohydrate Research. – 1996. – Vol. 291. – P. 141–154.
210. Viel, S. Diffusion-ordered NMR spectroscopy: a versatile tool for the molecular weight determination of uncharged polysaccharides / S. Viel, D. Capitani, L. Mannina, A. Segre // Biomacromolecules. – 2003. – Vol. 4. – №. 6. – P. 1843–1847.
211. Vierhuis, E. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv koroneiki) at different ripening stages / E. Vierhuis, H. A. Schols, G. Beldman, A. G. J. Voragen // Carbohydrate Polymers. – 2000. – Vol. 43. – №. 1. – P. 11–21.
212. Viëtor, R. J. Conformational features of crystal-surface cellulose from higher plants / R. J. Viëtor, R. H. Newman, M. A. Ha, D. C. Apperley, M. C. Jarvis // The Plant Journal. – 2002. – Vol. 30. – №. 6. – P. 721–731.

213. Vincken, J. P. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture / J. P. Vincken, H. A. Schols, R. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. Voragen, R. G. Visser // *Plant physiology*. – 2003. – Vol. 132. – №. 4. – P. 1781-1789.
214. Vithanage, C.R. Rheological and structural properties of high-methoxyl esterified, low-methoxyl amidated pectin gels / C.R. Vithanage, M.J. Grimson, P.R. Wills, P. Harrison, B.G. Smith // *Journal of Texture Studies*. – 2010. – Vol. 41. – P. 899–927.
215. Voragen, A. G. J. Pectins / A.G.J. Voragen, W. Pilnik, J.F. Thibault, M.A.V. Axelos, C.M.G.C. Renard. – 1995.
216. Wada, M. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form / M. Wada, M. Ike, K. Tokuyasu // *Polymer Degradation and Stability*. – 2010. – Vol. 95. – №. 4. – P. 543–548.
217. Wang, T. Pectin–cellulose interactions in the Arabidopsis primary cell wall from two-dimensional magic-angle-spinning solid-state nuclear magnetic resonance / T. Wang, O. Zabolina, M. Hong // *Biochemistry*. – 2012. – Vol. 51. – №. 49. – P. 9846–9856.
218. Wang, Q. 2005 Carbohydrates. / Q. Wang, S.W. Cui // in *Food Chemistry, Physical Properties, and Applications*. – Ed. Cui, S.W., The Great Britain: London, CRC Press, 2005. – P. 219–261.
219. Wardrop, A. B. The nature of reaction wood. I. The structure and properties of tension wood fibres / A. B. Wardrop, H. E. Dadswell // *Aust. J. Sci. Res. B*. – 1948. – Vol. 1. – P. 1–16.
220. Warshel, A. Folding and stability of helical proteins: carp myogen / A. Warshel, M. Levitt // *Journal of molecular biology*. – 1976. – Vol. 106. – №. 2. – P. 421–437.
221. Wellner, N. FT-IR study of pectate and pectinate gels formed by divalent cations / N. Wellner, M. Kačuráková, A. Malovíková, R. H. Wilson, P. S. Belton // *Carbohydrate research*. – 1998. – Vol. 308. – №. 1. – P. 123-131.

222. Willats, W. G. T. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel / W. G. T. Willats, J. P. Knox, J. D. Mikkelsen // Trends in Food Science & Technology. – 2006. – Vol. 17. – №. 3. – P. 97-104.
223. Wu, D. H. An improved diffusion-ordered spectroscopy experiment incorporating bipolar-gradient pulses / D. H. Wu, A. D. Chen, C. S. Johnson // Journal of magnetic resonance, Series A. – 1995. – Vol. 115. – №. 2. – P. 260–264.
224. Yamamoto, H. Origin of the characteristic hygro-mechanical properties of the gelatinous layer in tension wood from Kunugi oak (*Quercus acutissima*) / H. Yamamoto, J. Ruelle, Y. Arakawa, M. Yoshida, B. Clair, J. Gril // Wood Science and Technology. – 2009. – Vol. 44. – P. 149–163.
225. Yapo, B. M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts / B. M. Yapo, C. Robert, I. Etienne, B. Wathelet, M. Paquot // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 100. – №. 4. – P. 1356–1364.
226. Yapo, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model / B. M. Yapo // Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86. – №. 2. – P. 373–385.
227. Yapo, B. M. Pectic Polysaccharides and Their Functional Properties / B. M. Yapo, D. Gnakri // Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology. – 2014. – P. 1729–1749.
228. Yi, H. Architecture-based multiscale computational modeling of plant cell wall mechanics to examine the hydrogen-bonding hypothesis of the cell wall network structure model / H. Yi, V. M. Puri // Plant physiology. – 2012. – Vol. 160. – №. 3. – P. 1281–1292.
229. Yoshida, M. Tensile growth stress and lignin distribution in the cell walls of yellow poplar, *Liriodendron tulipifera* Linn / M. Yoshida, H. Ohta, H. Yamamoto, T. Okuyama // Trees. – 2002. – Vol. 16. – №. 7. – P. 457–464.
230. Zimmermann, M. H. Tension wood in aerial roots of *Ficus benjamina* L. / M. H. Zimmermann, A. B. Wardrop, P. B. Tomlinson // Wood Science and Technology. – 1968. – №. 2. – P. 95–104.

231. Zimmermann, U. Direct turgor pressure measurements in individual leaf cells of *Tradescantia virginiana* / U. Zimmermann, D. Husken, E. D. Schulze // *Planta*. – 1980. – Vol. 149. – P. 445–453.