Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПОЛИСАХАРИДОВ ПРИРОДНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЛИЗЕЙ МЕТОДОМ КРИОСКОПИИ

Студент 2 курса группы 06-819
«16» июня 2020 г. _____ (Хабипов А.Р.)

Научный руководитель
к.б.н., доцент
«16» июня 2020 г. _____ (Горшков В.Ю.)

Научный консультант
к.б.н
«16» июня 2020 г. _____ (Сибгатуллин Т.А.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.х.н., профессор
«16» июня 2020 г. _____ (Аганов А.В.)

Казань-2020

Содержание

Введение 4

1. Обзор литературы 6

1.1 Биохимический состав слизи семян льна 6

1.2 Гидрогели: определение и история развития 7

1.2 Криопорометрия 9

1.3 Полисахариды в качестве криопротекторов 12

1.4 Основы метода криоскопии 17

2. Объекты и методы исследования 19

2.1 Приготовление слизи из семян льна 19

2.2 Ионообменная хроматография 19

2.3 Определение концентрации углеводов методом Дюбуа 22

2.4 Гель фильтрационная хроматография 22

2.5 Анионообменной хроматографии 23

2.6 Выделение полисахаридов AX, RG-I и AX+RG-I из слизи семян льна 24

2.7 Выделение полисахаридов AX_C и $RG-I_C$ 26

2.8 Криоскопия 27

3. Результаты и их обсуждение 29

3.1 Температура кристаллизации водных растворов фракции полисахаридов 29

3.2 Температура кристаллизации водных растворов моно- и полисахаридов 30

3.3 Влияние процесса хроматографического разделения на свойства полисахаридов 31

3.4 Осмоляльность полисахаридов 33
3.5 Криопорометрия 34
Заключение 35
Публикации 37
Список литературы 38

Введение

В настоящее время, семена льна используются не только в пищевой промышленности, но и в медицине. Образующаяся вокруг семени слизевая капсула на 80-85% состоит из полисахаридов, которые легко извлекаются водой. Природные полисахариды потенциально могут стать основой для создания гелеподобных систем с высокой биосовместимостью. Благодаря своей гибкой пористой сети биогидрогели обладают особыми свойствами, включая высокую влагоудерживающую способность и вязкость, могут подвергаться объемному расширению и усадке. Гидрогели широко используются в контактных линзах, биосенсорах, швах, стоматологических материалах, устройствах, контролирующих доставку лекарства и в криоконсервации.

В качестве объектов исследований использовался водный раствор полисахаридов из слизи семян льна: рамногалактуронан I (RG-I), арабиноксилан (AX) и их комплекса (AX+RG-I). Выделение фракций полисахаридов из слизи семян льна проводилось с помощью ионообменной хроматографии на колонке Sephadex A-25. Измерения температуры замерзания водных растворов полисахаридов, производили с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1.

Целью данной работы является: исследование взаимодействия полисахаридов, выделяемых из слизи семян льна, с водным окружением, используя метод криоскопии.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. установить температуру замерзания водных растворов полисахаридов в зависимости от их концентрации (0.5 мг/мл, 3 мг/мл, 7 мг/мл, 10 мг/мл);
2. сравнить температуру замерзания и осмоляльности фракций нативной слизи с водными растворами полисахаридов арабиноксилан (AX) и

рамногалактуронан I (RG-I), выделенных из семян льна, со стандартами полисахаридов $\mathrm{AX_C}$ и $\mathrm{RG-I}_C$, выделенных из семян пшеницы и стеблей картофеля, соответственно;

3. проверить влияние процедуры хроматографического разделения на свойства полисахаридов;
4. на основе криопорометрии для фракций слизи оценить размер пор, создаваемых полимерной сеткой, при концентрации полисахаридов 10 мг/мл.

1. Обзор литературы

1.1 Биохимический состав слизи семян льна

Лен — это древнейшая сельскохозяйственная культура, которое используется для выжимки масла, изготовления косметики, из стеблей получают волокно, идущее на изготовление одежды. В последнее время, стремительно увеличивается его нетрадиционное применение в пищевой промышленности и в медицине. Одной из характеристик покрытосеменных растений в том числе и льна, является способность образовывать слизь при добавлении воды. В медицине слизь семян льна используется при поражениях желудочно-кишечного тракта, повышенном холестерине в крови, атеросклерозе, диабете, нефрите и гормонозависимом раке [1].

Так же в странах Евросоюза, Канаде и США исследуются биокомпозитные материалы, целиком состоящие из растительного сырья, где в качестве укрепляющего компонента выступает волокно, а связующего — слизь семян льна [2].

Слизь образуется во вторичной клеточной стенке эпидермальных клеток оболочки семян льна. Благодаря своей гибкой пористой сети биогидрогели обладают особыми свойствами, включая высокую влагоудерживающую способность, вязкость и подвергаться объемному расширению, и усадке**.** Образующаяся вокруг семенной слизи капсула на 80-85% состоит из полисахаридов. Выявлено, что в состав слизи семян льна входят два основных высокомолекулярных полисахарида: Рамногалактуронан 1 (RG1) и Арабиноксилан (AX). В составе полисахаридов слизи содержится семь основных моносахаридов: ксилоза (Xyl), арабиноза (Ara), рамноза (Rha), галактуроновая кислота (GalA), галактоза (Gal), фукоза (Fuc) и глюкоза (Glc) [3]. Задача секреции полисахаридов, при попадании влаги образовывать некую капсулу и обеспечивать комфортную микросреду

для прорастания. В дополнении к этому, известно, что слизь семян льна «работает» в качестве питательного резерва и участвует в защите семян от микроорганизмов.

В семенах льна, слизь содержится только в тонкостенных клетках блестящей кожицы, которые очень просто извлекается водой. Слизь из семян льна получаем путем перемешивания в течение ночи, при комнатной температуре с соотношением дистиллированной воды и семян льна 8:1 [4].

1.2 Гидрогели: определение и история развития

Гель - это коллоидная система твердого характера, в которой дисперсное вещество (полимер, низкомолекулярный гелеобразователь или их комбинация) образует непрерывный, разветвленный, когерентный каркас, пронизанный системой (обычно жидкой), состоящей из единиц меньших, чем коллоидные образования. Гели сочетают в себе, жесткость с эластичностью [5], являясь уникальными материалами, которые хорошо известны в повседневной жизни и имеют широкий спектр применения в пищевой, медицинской, биоматериальной, косметической, сепарационной и других отраслях промышленности. Общепринято различать два типа гелей в зависимости от природы жидкой фазы: органогели, содержащие органический растворитель, и гидрогели, содержащие воду.

Гидрогели - это материалы с трехмерными, набухшими водой структурами, состоящими в основном гидрофильных полимеров, олигомеров, самостоятельно собранных из низкомолекулярного гелеобразователя [6]. Они становятся нерастворимыми из-за наличия химических или физических сшивок. Физические сшивки могут быть кристаллитами или слабыми взаимодействиями, образованными ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями или водородными связями. Перекрестные связи обеспечивают “жесткую” структуру сети и физическую целостность.

Благодаря своей гибкой пористой сети гидрогели обладают особыми свойствами, в том числе высокой водоудерживающей способностью, вязкостью и способностью подвергаться объемному расширению и усадке. С момента разработки (2-гидроксиметилметакрилат) гидрогеля в 1960-х годах, гидрогели рассматривались для использования в широком спектре биомедицинских и фармацевтических применений из-за их высокого содержания воды и, следовательно, превосходной биосовместимости. Классический гель обычно содержит менее 10% сшитого полимера или менее 1% низкомолекулярного гелеобразователя. В результате, внутри геля образуется большая межфазная область жидко-твердого тела, где растворенные вещества могут быть захвачены в поры, образованные твердым компонентом.

Гидрогель – это материал, восстанавливающий свою первоначальную форму, при снятии приложенного напряжения. С одной стороны, гели кажутся твердыми, но все же состоят преимущественно из жидкости в микроскопическом масштабе. Гидрогели широко используются в контактных линзах, биосенсорах, швах, стоматологических материалах и устройствах, контролирующих доставку лекарства. Так называемые чувствительные к стимулам гидрогели проявляют резкие изменения своих свойств в ответ на внешние изменения pH, температуры, ионной силы или природы набухающего агента, а также облучения и относятся к так называемым “умным” материалам, применяемым для точных приводов, датчиков, переключателей и т. д. [7]. Если движущими силами для гелеобразования являются только физические поперечные связи, то образующиеся гидрогели оказываются термореверсивными. Например, полимеры на основе полиакриловых и полиметакриловых каркасов демонстрируют такое поведение. С другой стороны, гели, образующиеся путем химического сшивания (например, полиэфиры, полиамиды и др.) вообще не являются термореверсивными [8].

Слизь семян чиа – можно рассмотреть, как пористый материал с трехмерной полимерной сетью [9]. По модели Брауншстейн-Тарр, релаксация протонов в слизи должна изменяться, как функция поверхностной релаксации и объемной релаксации. Объемная релаксация в слизи должна равняться релаксацией чистой воды, если в воде отсутствуют парамагнитные соединения.

1.2 Криопорометрия

Пористые материалы играют важную роль не только в природе, но и широко используются в промышленности. Они существуют в самых разнообразных формах: от биологических клеток до горных пород и катализаторов в химических реакторах. Для применения во многих областях, важно точно охарактеризовать свойства этих систем, такие как: общая пористость, распределение пор по размерам, удельная площадь поверхности, проницаемость, прорывное капиллярное давление и функция радиальной плотности.

Показано, что распределение размеров пор, полученное с помощью ЯМР-криопорометрии, выгодно отличается от распределения размеров пор, полученного с помощью других методов, таких как адсорбция газа (АГ), дифференциальная сканирующая калориметрия **(**ДСК – термопорометрия) и ртутная порометрия (РП). Применение ЯМР-криопорометрии включает в себя исследования силикагелей, костей, горных пород и многих других пористых материалов.

Наиболее часто используемые методы измерения объема пор (общего и удельного) и распределения их по размерам в диапазоне мезо- и макропор - это адсорбция газа и ртутная порометрия. Они дают различное распределение, ртутная порометрия измеряет диаметр отверстий пор. Очень часто предпочтение отдается неразрушающему методу измерения пористых

материалов, при этом ртутная порометрия в ходе процесса измерения повреждает матрицу пор и делает невозможным повторное использование образца. А методы газовой адсорбции, ЯМР и ДСК имеют непосредственное преимущество в том, что образцы остаются неповрежденными, поэтому они готовы к повторному измерению. Все три метода основаны на распределение жидкости в порах и измерении сдвига термодинамических свойств, вызванного наноструктуризацией [10].

Общая идея криопорометрии заключается в обнаружении сдвига температур фазового перехода для растворителя, заключенного в порах. Этот сдвиг может быть интерпретирован с точки зрения геометрии пор и может дать информацию о размере пор и их распределении, а в благоприятных случаях - о форме пор. Переход растворителя из твердого состояния в жидкое или наоборот, происходит, в зависимости от направления изменения температуры либо плавления, либо замерзания. Основной причиной смещения точек плавления и замерзания является создание границ раздела с ненулевым поверхностным натяжением [11]. Обычно ЯМР-криопорометрия опирается на одно частное уравнения Гиббса-Томсона, разработанное для случая цилиндрических пор с радиусом r. Джексон и Маккенна [12] выразили сдвиг точки плавления/замерзания пор Tm как:

$$\Delta Tm = Tm - T_0 = -\frac{k}{r} \qquad (1)$$

где k-постоянная материала, зависящая от молярного объема, v - поверхностной энергии твердого тела-жидкости, скрытой теплоты плавления (замерзания) ΔH и температуры плавления объемного растворителя T_0 [13].

ЯМР обеспечивает удобный метод для детектирования замерзания и плавления материалов, которое служит основой для ЯМР-криопорометрии. Калориметрия может быть выполнена, как с помощью дифференциального

термического анализа (ДТА), так и с помощью ДСК, причем последний метод чаще используется в порометрических приложениях. Таким образом, метод, названный термопорометрией, обычно включает в себя ДСК-детектирование плавления и замерзания в пористых материалах [11]. Следовательно, как одно из следствий, ДСК-термопорометрия обычно не может обнаружить небольших различий между объемными температурами и температурами перехода пор и поэтому имеет низкий (30 нм) максимальный предел обнаружения размера пор [14].

В ртутной порометрии измеряется объем жидкой ртути, проникающей в пористый образец в зависимости от приложенного внешнего давления. Внешнее давление необходимо, поскольку жидкая ртуть обычно плохо смачивается. Ртутная порометрия имеет два огромных преимущества перед методами газовой сорбции или ЯМР-криопорометрией. Во-первых, он может быть применен в очень широком диапазоне размеров пор от 3 нм до 300 μм, что более чем на два порядка превышает величину, достижимую с помощью ЯМР-криопорометрии. Это также быстрый метод, который позволяет получить результат менее чем за час [15]. Одним из технических недостатков метода является возможность деформирования материалов при высоком давлении, что часто наблюдается в виде резкого скачка вверх кривой интрузии. Метод ртутной порометрии особенно актуально для таких материалов, как бетон [16]. Ограничение связано с самой ртутью: так как это токсичное вещество и его применение становится все более и более узко направленным. Очистка исследуемого образца от ртути, также большая проблема [11].

1.3 Полисахариды в качестве криопротекторов

Растет использование углеводов в качестве криопротекторов. В статье были рассмотрены эффекты включения полисахаридов, выделенных из растений и микроводорослей, произрастающих на севере России, в распространённые криопротекторные растворы. Криопротекторные растворы, в частности, используются для сохранения белых кровяных телец (лейкоцитов) человека. В природе, при понижении температуры окружающей среды до -2 °C в большинстве растений, активируется процесс гидролиза олигосахаридов до криопротекторного моносахарида. При понижении температуры, простые белки образуют сложные агрегаты с углеводами для укрепления клеток растений. Данные агрегаты помогают снизить температуру кристаллизации льда, при низких температурах окружающей среды [17]. Углеводы повышают жизнеспособность клеток после размораживания и иногда используются в сочетании с диметилсульфоксидом, глицерином или 1,2 - пропандиолом. Хотя существует много информации об использовании моносахаридов (галактоза, глюкоза, манноза) и дисахаридов (мелибиоза, лактоза, трегалоза, сахароза) в качестве криопротекторов [18], имеются ограниченные данные о криопротекторном действии высокомолекулярных углеводов (олиго- и полисахаридов) [19].

Трудность выделения пектинов и пектиновых полисахаридов из растений в их нативном состоянии препятствовала их дальнейшему использованию в качестве криопротекторов в криобиологии. Современные достижения в области технологий, в настоящее время позволяют извлекать эту группу природных криопротекторов из растений и разрабатывать новые методы криоконсервации биологических образцов. Эти вещества водорастворимы, способны стабилизировать молекулы воды, не вызывают разрушение мембран и органелл, обладают противовоспалительным и

иммуномодулирующим действием, нетоксичны, а также, не имеют неприятного запаха [20].

Осмотическую концентрацию и температуру замерзания водных растворов полисахаридов измеряли с помощью криоскопического метода, результаты представлены в таблице 1. Осмолярность растворов полисахаридов при концентрации 0.2 % очень низкая, от 1 до 7 мМ/л. Осмолярность растворов глицерина (7%) и ДМСО (10%, 15%) значительно выше и составила 777, 2152 и 2324 мМ/л соответственно, а их температура замерзания составила -1,461°С, -3,945°С и -4,208°С соответственно. Для большинства исследованных полисахаридов их добавление в водный раствор глицерина приводит к увеличению осмолярности результирующего раствора. Например, осмолярность раствора глицерина, содержащего Лемнан, повышается почти в полтора раза до 1156 мМ/л, а температура его замерзания снижается до -2,141°С. Предполагается, что гидроксильные и карбоксильные группы пектиновых полисахаридов образуют водородные и сложноэфирные связи с гидроксильными группами глицерина, в конечном итоге, формируется гель, а пектины в свою очередь образуют равномерно распределенную трехмерную структуру в геле, где и содержится вода. Именно этот факт, вероятно, приводит к увеличению осмолярности раствора и способствует снижению его температуры замерзания.

Таблица 1 - Осмолярность и температура замерзания растворов полисахаридов

Раствор	Концентрация полисахаридов (%)	Осмолярность мМ/л	Точка замерзания °С
Лемнан	0.2	7	-0.012
Комаруман	0.2	2	-0.002

Продолжение таблицы 1

Бергенан	0.2	4	-0.008
Потамогетонан	0.2	4	-0.008
Танасетан	0.2	1	-0.002
Nostoc muscorum	0.2	1	-0.002
Scotiellopsis terrestris	0.2	1	-0.002
Глицерин (7%)	0	777	-1.461
Глицерин с Лемнаном	0.2	1156	-2.141
Глицерин с Комаруманом	0.2	931	-1.729
Глицерин с Бергенаном	0.2	894	-1.666
Глицерин с Потамогетонаном	0.2	886	-1.656
Глицерин с Танасетаном	0.2	834	-1.518
Глицерин с Scotiellopsis terrestris	0.2	816	-1.514
Глицерин с Nostoc muscorum	0.2	715	-1.338
ДМСО (10%)	0	2152	-3.945
ДМСО (15%)	0	2324	-4.208
ДМСО (10%) с Лемнаном	0.2	2109	-3.824
ДМСО (15%) с Лемнаном	0.2	2200	-4.120
ДМСО (10%) с Комаруманом	0.2	2188	-3.701
ДМСО (15%) с Комаруманом	0.2	2027	-4.154

Поскольку различные полисахариды по-разному влияют на температуру кристаллизации раствора глицерина, для оценки криопротекторного эффекта, при замораживании лейкоцитов человека были использованы пектиновые полисахариды, которые в большей степени

снижали температуру замерзания (Лемнан и Комаруман), и полисахариды (выдленные из зеленых микроводорослей Scotiellopsis terrestris (St) и цианобактерии (Nm) Nostoc muscorum), которые не изменяли температуру замерзания.

Таблица 2 - Процент выживаемости лейкоцитов, в растворе глицерина с различными видами полисахаридов, при температуре -10 °C

Консервирующий состав	Срок хранения (дни)	Количество лейкоцитов	Устойчивость к эозину	Количество гранулоцитов	Фагоцитарная активность нейтрофилов
Глицерин	1	90.3±1.7	96.2±1.5	57.2±2.6	Невозможно определить
Глицерин с Лемнаном	1	98.2±3.1	97.6±1.7	99.1±1.2	99.7±0.7
	2	86.1±0.9	73.0±12.8	67.8±15.8	70.1±9.5
	3	79.5±16.1	57.2±11.5	61.5±12.9	69.7±4.9
Глицерин с Комаруманом	1	70.0±3.0	59.3±7.6	54.3±14.8	Невозможно определить
Глицерин с Scotiellopsis terrestris	1	98.0±3.5	79.8±7.9	65.3±17.9	93.8±4.9
	2	70.0±5.3	73.2±8.8	43.0±7.5	Невозможно определить
	3	52.3±4.9	54.0±4.6	16.7±2.9	Невозможно определить
Глицерин с Nostoc muscorum	1	78.0±8.5	59.8±1.9	55.3±7.6	Невозможно определить

Было установлено, что применение 7% водного раствора глицерина в качестве криопротектора, не очень эффективна, после прогрева гранулоцитов, фагоцитарная активность лейкоцитов, значительно снижается результаты представлены в таблица 2. В то же время, полисахарид лемнан, добавляемый в раствор глицерина, гарантирует, что целостность клеток остается на уровне 60%, в течение всего периода хранения (3 дней). Лемнан

обеспечивает значительное повышение эффективности исходного криопротектора и его можно рассматривать как перспективный, внеклеточный криопротектор.

Полисахарид St из зеленой микроводоросли Scotiellopsis terrestris обеспечивает целостность клеток в течение 24 часов. Если клетки хранятся в течение более длительного времени в среде глицерин/St, жизнеспособность лейкоцитов падает.

Температура -80 °C недавно стала применяться для криоконсервации биоспецименов, наряду со сверхнизкой температурой -196 °C. Клеточный метаболизм значительно подавляется, достаточно для того, чтобы биоспецимены сохранили свою целостность, в морозильной камере при температуре -80 °C. Результаты показывают, что эффект сохранения клеток Лемнаном и Комаруманом был лучше, когда клетки были заморожены при температуре -80 °C.

Результаты подтверждают, что пектиновые полисахариды Лемнан из обыкновенной Ряски и Комаруман из болотной лапчатки способны понижать температуру замерзания основного криопротектора глицерина, а также обладают внеклеточным криопротекторным действием, способствующим сохранению целостности мембран лейкоцитов человека, при температурах ниже нуля. Главное отличие Лемнана и Комарумана от других исследованных полисахаридов, заключается, в сильно разветвленной структуре углеводной цепи. Это наиболее вероятное объяснение их криопротекторного эффекта [21].

1.4 Основы метода криоскопии

В основу работы осмометра-криоскопа ОСКР-1 заложен криоскопический метод, измерения понижения температуры замерзания (кристаллизации) раствора в сравнении с температурой замерзания чистого растворителя (воды).

Для разбавленных растворов вещества, растворимых только в жидкой фазе, изменения температуры замерзания линейно зависит от моляльности раствора:

$$\Delta t = K_{\text{зам}} \times m \qquad (2)$$

где m – концентрация растворенного вещества, выраженная в молях на 1000 г растворителя (молялность);

$K_{\text{зам}}$ - криоскопическая постоянная или моляльное понижение температуры замерзания, равное 1.8601°C.

Кривые замерзания (кристаллизации) растворителя воды и гипотетического раствора представлены на рисунке 1.

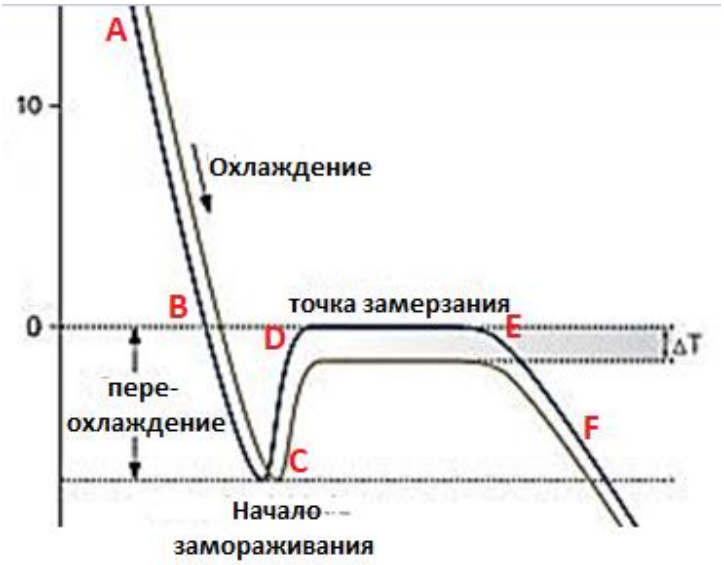

Рисунок 1 - Кривые замерзания [22].

Измерение температуры замерзания по криоскопическому методу реализуется в приборе по следующим принципу:

1. исследуемая проба (раствор или растворитель), температура которой в процессе охлаждения непрерывно контролируется термометром (участок ABC кривой охлаждения), переохлаждается до температуры $t_{\text{пер}}$ (точки C), лежащей ниже истинной температуры замерзания;
2. после чего интенсивным перемешиванием, запускается процесс льдообразования, который сопровождается бурным выделением теплоты плавления;
3. выделившееся тепло скачкообразно повышает температуру пробы на участке CD до равновесной температуры, характерное для данного раствора;
4. измерение температуры замерзания (кристаллизации), проводят на горизонтальном участке DE, так называемой «плато», которое характеризуется термодинамическим равновесием между жидкой и твердой фазами в растворе;
5. участок EF на кривых замерзания отображает процесс дальнейшего вымораживания растворителя [22].

2. Объекты и методы исследования

2.1 Приготовление слизи из семян льна

Очищенные семена льна, засыпали в колбу и заливали дистиллированной водой, в соотношение 1:8. Для предотвращения попадания грязи и пыли, колбу закрывали парафиновой пленкой. Полученная смесь, перемешивалась в течение ночи на шейкере с магнитными держателями. На следующий день, для отделения слизи от семян льна использовали нейлоновый фильтр, в итоге получили 100 мл чистой слизи.

Рисунок 2 - Семена льна

2.2 Ионообменная хроматография

Хроматография – один из наиболее современных методов для разделения и очистки белков, полипептидов, нуклеиновых кислот, полинуклеотидов и других заряженных биомолекул. Достоинствами метода являются – высокая разрешающая способность, высокая пропускная способность, простота и управляемость метода. Ионообменная хроматография принадлежит к жидкостно-твердофазной хроматографии,

подвижной фазой служит жидкость (элюент), а неподвижной фазой – твердое пористой вещество, которое называется сорбентом. Разделение в ионообменной хроматографии зависит от обратимой адсорбции заряженных молекул растворенного вещества к неподвижным ионообменным группам противоположного заряда. Большинство экспериментов по ионному обмену проводятся в пять основных этапов. Эти шаги схематично проиллюстрированы ниже.

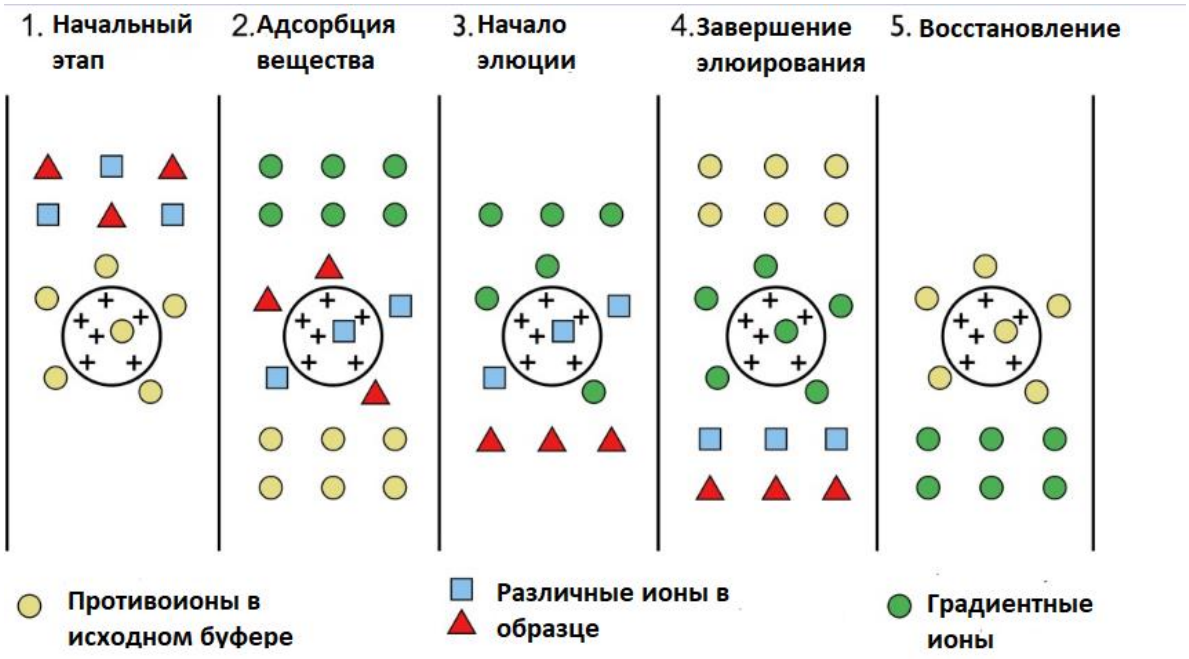

Рисунок 3 - Принцип работы ионообменной хроматографии [23]

Первая стадия - это уравновешивание, при котором ионообменник доводится до исходного состояния с точки зрения pH и ионной силы, что позволяет связывать нужные молекулы растворенного вещества. Обменные группы связаны в это время с обменными противоионами (обычно простыми анионами или катионами, такими как хлорид или натрий).

Вторая стадия - нанесение образца и адсорбция, при которой растворенные молекулы, несущие соответствующий заряд, вытесняют встречные ионы и

обратимо связываются с гелем. Несвязанные вещества могут быть вымыты из колонки с помощью стартового буфера.

На третьей стадии вещества выводятся из колонки путем изменений условий элюирования: увеличение ионной силы элюирующего буфера или изменение его pH. на рисунке 3 десорбция достигается введением увеличивающегося градиента концентрации соли, и растворенные молекулы высвобождаются из колонки в порядке их силы связывания, причем наиболее слабосвязанные вещества элюируются первыми.

Четвертая и пятая стадии - это удаление из колонки веществ, не элюированных веществ, и повторное уравновешивание в первоначальные условия для последующей очистки.

При выборе ионообменника желательно начать с его пористости. Для низкомолекулярных соединений (аминокислот, нуклеотидов, олигонуклеотидов) стоит обратить внимание на ионообменные смолы на основе полистирола. Во-вторых, для более крупных полипептидов и полинуклеотидов с молекулярной массой менее 10 000 можно применять ионообменные сефадексы: A-25 и C-25.

Разделение слизи семян льна на нейтральную и кислую фракциюполисахаридов, осуществлялось с помощью ионообменного хроматографического геля - QAE Sephadex A-25. Подвижная фаза (элюэнт) - 0.03/1.2M ацетат аммония (градиент)**,** со скоростью 1 мл/мин.

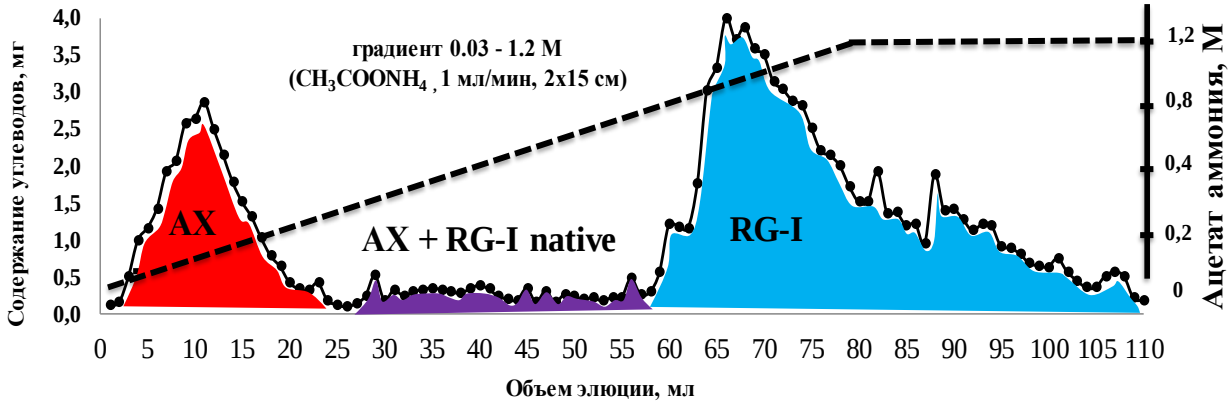

Рисунок 4 - Разделение слизи семян льна на нейтральную (Арабиноксилан) и кислую (Рамногалактуронан - 1) фракцию полисахаридов [24]

2.3 Определение концентрации углеводов методом Дюбуа

Концентрацию углеводов в водном растворе полисахаридов, определяли согласно методу (Dubois et al. 1956). Брали 200 мкл. исслед. р-ра + 200 мкл. 5% р-ра фенола + 1 мл конц. H_2SO_4 (10 мин) → 15 мин в водяной бане, определяем оптическую плотность, при λ=490 нм.

2.4 Гель фильтрационная хроматография

Для очистки водных растворов полисахаридов от низкомолекулярных соединений (солей и т.д.) использовали, гель фильтрационную хроматографию. Хроматографическую колонку заполнили гранулами геля (сефадекс) G-25, куда и внесли водный раствор полисахарида. Соединения, размер которых меньше, чем размер пор у сефадекса, задерживаются колонке. Следовательно, более крупные молекулы (полисахаридов) беспрепятственно проходить через колонну, не проникая в матрицу геля рисунок 5.

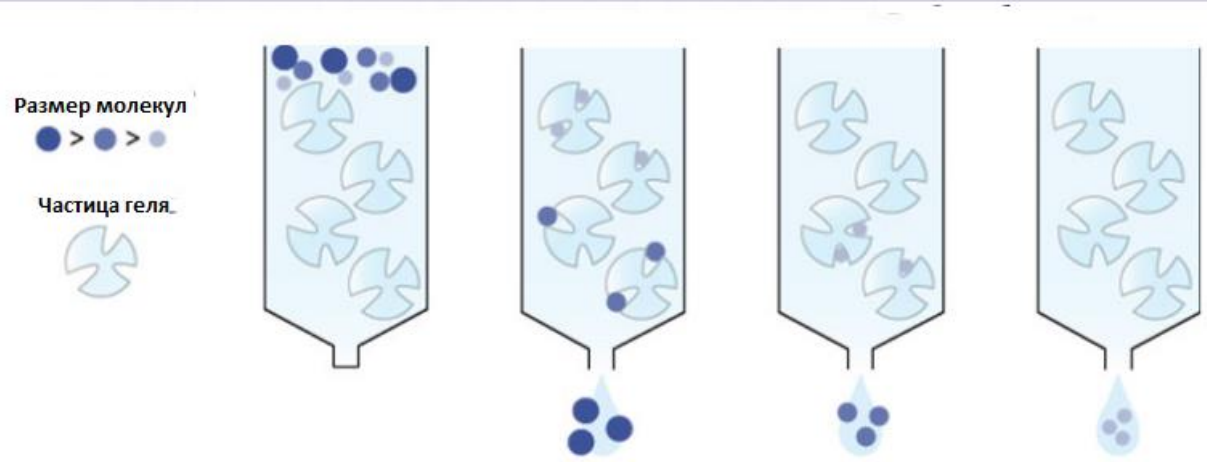

Рисунок 5 - Принцип проведения гель-фильтрационной хроматографии [25]

2.5 Анионообменной хроматографии

Разделение и детектирование моносахаридов проводили с помощью метода высокоэффективной анионообменной хроматографии (HPAEC) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США), используя импульсный амперометрический детектор (Dionex, США). Скорость элюирования 1 мл/мин. Температура колонки 30ºС. 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°С 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 Выделение полисахаридов АХ, RG-I и АХ+RG-I из слизи семян льна

Перед выделением полисахаридов из слизи семян льна, необходимо измерить концентрацию углеводов содержащегося в слизи и для этого использовали метод Дюбуа (методика измерений описана в параграфе 2.3), как оказалось в 100 мл слизи содержалось 640 мг углеводов. После чего, смешал 20 мл слизи семян льна с 80 мл дистиллированной воды и разделил получившуюся смесь, по 10 фальконам, с объемом по 10 мл каждый. Перед проведением ионообменной хроматографии, еще раз, в каждом фальконе измерил концентрацию углеводов методом Дюбуа, результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Концентрация углеводов в образцах

№ образца	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Концентрация мкг/мл	1034	1177	1209	1154	1296	1273	1217	1177	1225	1265

Для разделения слизи семян льна на нейтральную и кислую фракцию полисахаридов, происходило с помощью ионообменного хроматографического геля - QAE Sephadex A-25. Подвижная фаза (элюэнт) - 0.03/1.2M ацетат аммония (градиент)**,** со скоростью 1 мл/мин. В ионообменную хроматографическую колонку, постепенно заливался образец, объемом 10 мл и собирался “мертвый объем” в размере 8-9 мл (объем, отвечающий времени выхода не сорбируемого компонента).

С 1-21 минуту происходило выделение нейтрального полисахарида АХ, постепенно происходило увеличении градиента концентрации соли с

0.03 до 1.2М. С 22-55 минуту выделялась смесь полисахаридов АХ+RG-I, а в самом конце выделялся кислый полисахарид RG-1.

Полученные на предыдущем этапе фракции водных растворов полисахаридов, были сконцентрированы до 10 мл, при помощи вакуумного испарителя, при температуре 60 °С. Перед проведением гель фильтрационной хроматографии, провели оценку содержания низкомолекулярных соединений в наших образцах, методом кондуктометрии.

Таблица 4 - Содержание низкомолекулярных соединений до и после обессоливания по данным электропроводности

Образец	АХ до обессол.	RG-1 до обессол.	АХ после обессол.	RG-1после обессол.	H_2O
Содержание соли	42 mS	220 mS	1.7 mS	8.6 mS	42 μS

Для очистки водных растворов полисахаридов от низкомолекулярных соединений использовали гель фильтрационную колонку, заполненную гранулами геля (сефадекс) G-25, куда и вносили водный раствор полисахарида. Соединения, размер которых меньше, чем размер пор у сефадекса, задерживаются колонке. Следовательно, более крупные молекулы (полисахаридов) беспрепятственно проходили через колонну, не проникая в матрицу геля. По итогу, получили относительно чистый водный раствор полисахарида, который повторно концентрировали с помощью вакуумного испарителя, при температуре 60 °С до 1 мл.

2.7 Выделение полисахаридов AX_C и $RG-I_C$

Для проверки влияния процедуры хроматографического разделения на свойства полисахаридов, взяли готовые стандарты AX_C и $RG-I_C$, выделенные из семян пшеницы и стеблей картофеля, соответственно. Для получения водных растворов полисахаридов на электронных весах, взвешивали по 6 мг каждого из полисахаридов и растворяли в 10 мл дистиллированной воды.

Разделение водных растворов полисахаридов на нейтральную и кислую фракцию, осуществлялось с помощью ионообменного хроматографического геля - QAE Sephadex A-25. Подвижная фаза (элюэнт) - 0.03/1.2М ацетат аммония (градиент)**,** со скоростью 1 мл/мин. В ионообменную хроматографическую колонку, постепенно заливался образец AX_C, объемом 10 мл и собирался "мертвый объем" в размере 8-9 мл (объем, отвечающий времени выхода не сорбируемого компонента).

С 1-25 минуту происходило выделение нейтрального полисахарида АХ, после чего, эксперимент прекращался и колонка промывалась 200 мл 0.03М ацетатом аммония.

В ионообменную хроматографическую колонку, постепенно заливался 2 образец $RG-I_C$, объемом 10 мл и собирался "мертвый объем" в размере 8-9 мл. С 1-54 минуты собирался элюент, постепенно происходило увеличении градиента концентрации соли с 0.03 до 1.2М. И только с 55-110 минуту в фальконы собирали водный раствор полисахарида $RG-I_C$.

Полученные на предыдущем этапе фракции водных растворов полисахаридов, были сконцентрированы до 10 мл, при помощи вакуумного испарителя, при температуре 60 °С.

Таблица 5 - Содержание низкомолекулярных соединений в водном растворе полисахаридов после обессоливания по данным электропроводности

Образец	H_2O	$\mathrm{RG-I}_C$	AX_C
Содержание соли	42 μS	23 mS	1.6 mS

Для очистки водных растворов полисахаридов использовали гель фильтрационную колонку, заполненную гранулами геля (сефадекс) G-25, куда и вносили водный раствор полисахарида. Соединения, размер которых меньше, чем размер пор у сефадекса, задерживаются колонке. Следовательно, более крупные молекулы (полисахаридов) беспрепятственно проходили через колонну, не проникая в матрицу геля. По итогу, получили относительно чистый водный раствор полисахарида, который повторно концентрировали с помощью вакуумного испарителя при температуре 60 °C до 1 мл.

2.8 Криоскопия

Калибровка прибора осуществляется с помощью дистиллированной воды и калибровочному раствору с известной температурой замерзания. Средняя продолжительность однократного измерения в обоих режимах в рабочем диапазоне температур не более 3 минут, где рабочий объем пробы, не должен превышать 0.3 мл.

Абсолютная погрешность при измерении концентрации от 0 до 500 ммоль/кг H2O, соответствует 2 ммоль/кг H2O. А при концентрации от 500 до 2000 ммоль/кг H2O соответствует 10 ммоль/кг H2O.

Пределы допускаемой основной абсолютной погрешности при измерении температуры замерзания от 0.000°C до -0.930°C соответствует ±0,002°C. Абсолютная погрешность при температуре замерзания от -0.930°C до -3.720°C соответствует ±0.01°C, для температуры замерзания от -3.720 °C до -20 °C соответствует ±0.1 °C.

3. Результаты и их обсуждение

3.1 Температура кристаллизации водных растворов фракции полисахаридов

Как говорилось ранее, для измерения температуры кристаллизации водных растворов полисахаридов в диапазоне концентраций от 0.5 до 10 мг/мл, использовали прибор осмометр-криоскоп ОСКР-1.

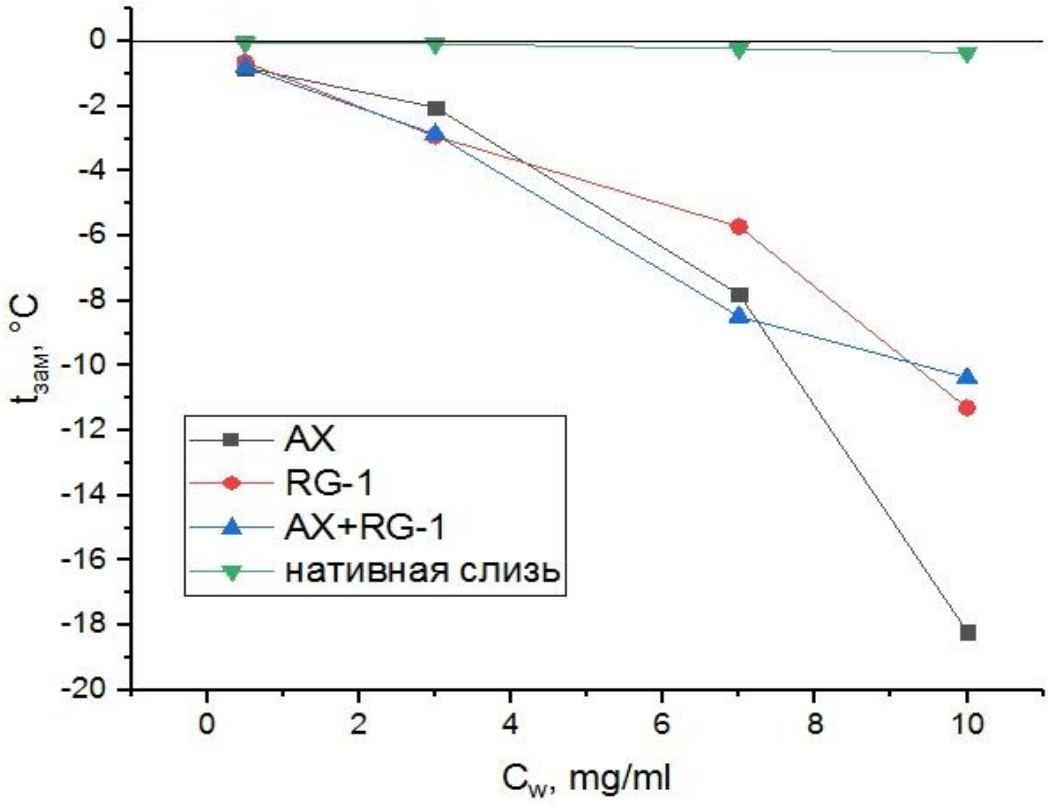

Рисунок 6 - Температуры замерзания водных растворов полисахаридов и нативной слизи

На основе исследования концентрационной зависимости температуры кристаллизации водных растворов полисахаридов в диапазоне от 0.5 до 10 мг/мл обнаружили существенное понижение температуры кристаллизации растворов по сравнению с дистиллированной водой, достигающее 18, 11 и 10

градусов для АХ, RG-I и АХ+RG-I, соответственно, при концентрации 10 мг/мл. При этом понижение температуры кристаллизации нативной слизи не превышает 0.5 градуса в том же диапазоне концентрации полисахаридов.

3.2 Температура кристаллизации водных растворов моно- и полисахаридов

Для получения водных растворов моносахаридов в концентрации 10 мг/мл, на электронных весах, взвешивали по 10 мг моносахарида и растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Исходя из таблицы 6, можно заметить, что температура кристаллизации водного раствора полисахарида АХ выделенного из слизи семян льна и водного раствора полисахарида $АХ_{С}$ выделенного из семян пшеницы существенно отличается. На основание этого, решили проверить влияние хроматографического разделения на свойства полисахаридов.

Таблица 6 - Температура кристаллизации водных растворов моно- и полисахаридов

Название	**Температура кристаллизации,** °C	**Молярная масса, кДа**
Rha	-0.113	0.164
Ara	-0.139	0.150
Gal	-0.116	0.180
Xyl	-0.132	0.150
Сахароза	-0.067	0.342
АХ слизи	-18.2	1314
RG-1 слизи	-11.3	1495
АХ+RG-1слизи (искуст)*	-10.37	1368
АХ+RG-1 слизи (нативн)	-15.2	1350
АХ (стандарт)	-0.019	266
RG-1 (стандарт)	-0.097	24
PGA (стандарт)	-0.062	90
АХ+RG-1(смесь стандартов)*	-0.062	145

*Приготовление водных растворов полисахаридов АХ+RG-1 слизи (искуст) и АХ+RG-1 (смесь стандартов) выполнялось в соотношение 50:50.

3.3 Влияние процесса хроматографического разделения на свойства полисахаридов

Провели сравнение с родственными полисахаридами других видов растений: стандартами AX_C и $RG-I_C$, выделенными из семян пшеницы и стеблей картофеля, соответственно. При концентрации 10 мг/мл температура кристаллизации водного раствора $RG-I_C$ составила порядка -0.1 °C, что

сравнимо с моносахаридами, а для $\mathrm{A}X_{\mathrm{C}}$ не отличалась в пределах погрешности от температуры кристаллизации растворителя. Проверка влияния процедуры хроматографического разделения на свойства полисахаридов показала, что после прохождения через ионообменную колонку температура кристаллизации растворов стандартов $\mathrm{A}X_{\mathrm{C}}$ и $\mathrm{RG-I}_C$ существенно не изменяется.

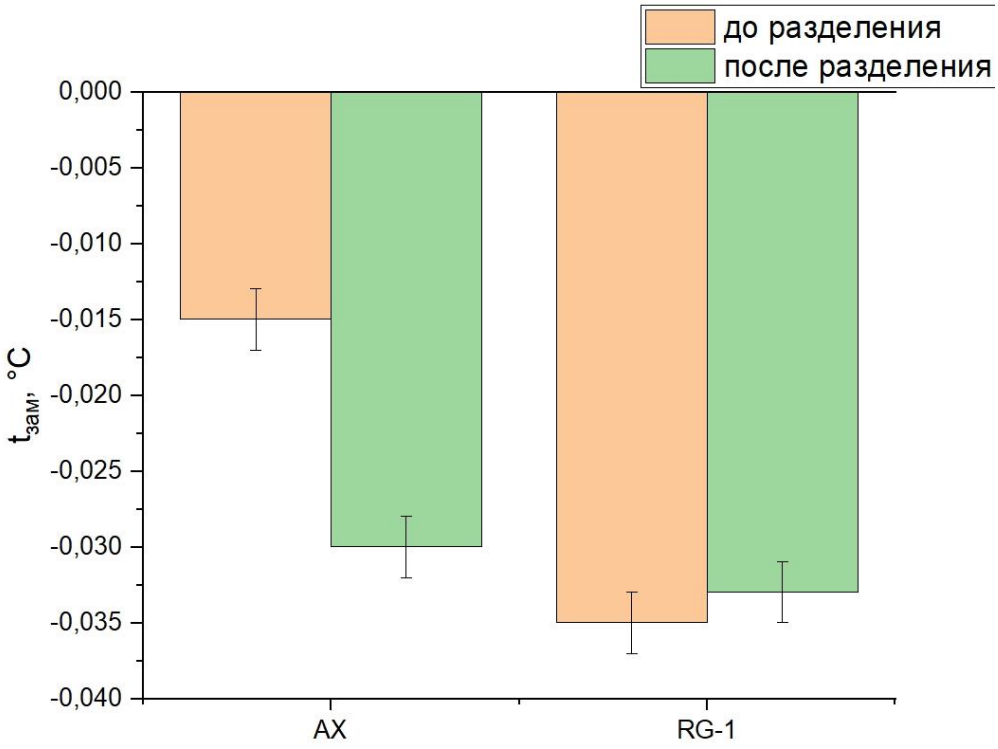

Рисунок 7 - Температура замерзания водных растворов полисахаридов $\mathrm{A}X_{\mathrm{C}}$ и $\mathrm{RG-I}_C$ в концентрации 2.2 мг/мл и 2.7 мг/мл

Проверка влияния процедуры хроматографического разделения на свойства полисахаридов показала, что после прохождения через ионообменную колонку температура кристаллизации растворов стандартов $\mathrm{A}X_{\mathrm{C}}$ и $\mathrm{RG-I}_C$ существенно не изменяется.

3.4 Осмоляльность полисахаридов

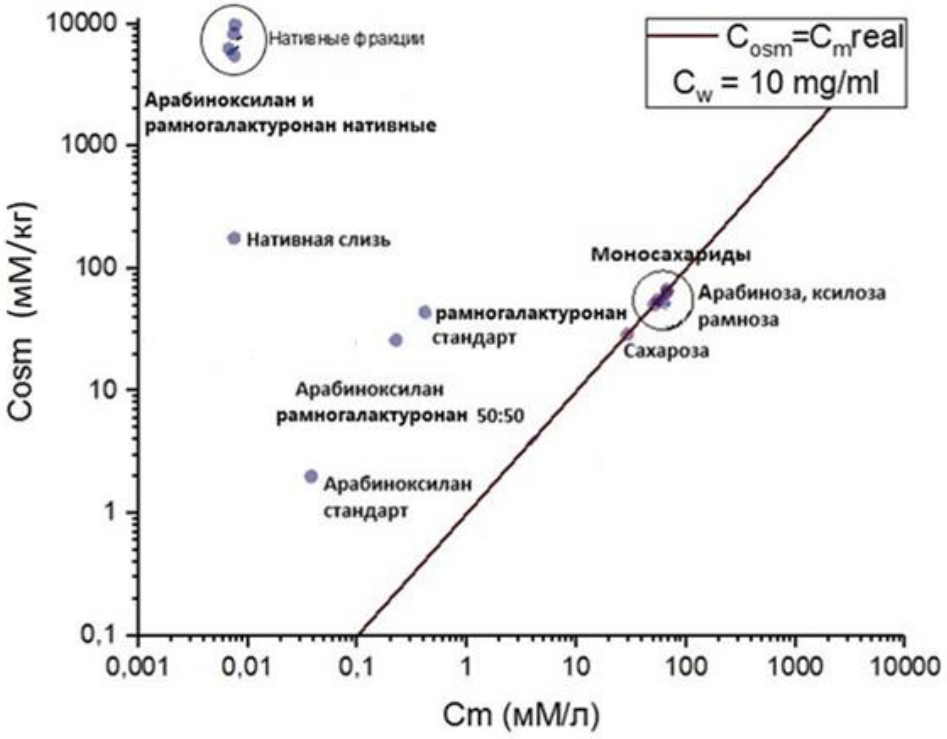

Рисунок 8 – Осмоляльность водных растворов моно- и полисахаридов, при концентрации 10 мг/мл

На основе рисунка 8, произведен сравнительный анализ измерений осмоляльной концентрации водных растворов полисахаридов, выделенных из слизи семян льна, со стандартами полисахаридов $АХ_С$ и $RG-I_C$ и со стандартами моносахаридов было выявлено:

1. Осмотичность водного раствора полисахарида выделенного из стеблей картофеля $RG-I_C$ приближенно совпадает с моносахаридами (арабиноза, рамноза, ксилоза и другие), которые входят в его состав.

2. Осмотичность водного раствора полисахарида АХ выделенного из семян пшеницы, значительно ниже, чем у моносахаридов, которые входят в его состав.

3. Осмотичность нативной слизи значительно превышает осмотичность нативных фракций полисахаридов.

3.5 Криопорометрия

Общий принцип криопорометрии заключается в обнаружении сдвига температур фазового перехода для растворителя, заключенного в порах. Этот сдвиг может быть интерпретирован с точки зрения геометрии пор и может дать информацию о размере пор и их распределении, а в благоприятных случаях - о форме пор.

На основание статьи Petrov O.V. et al. 2009 [11] мы предположили, что при концентрации водного раствора полисахаридов 10 мг/мл, образец напоминает гелеподобное вещество, внутри которого и образуется небольшая межфазная область жидко-твердого тела, где растворитель может быть захвачен в поры, образованный полисахаридами.

Таблица 7 – Теоретический размер пор в водных растворах полисахаридов, при концентрации 10 мг/мл

Образец	$T_{зам}$ °C	K, K/нм	R, нм
АХ слизи	-18.2	58.2	3.2
RG-1 слизи	-11.3	58.2	5.2
АХ+RG-1 слизи	-10.3	58.2	5.8

Зная температуру замерзания на основе таблицы 7, водных растворов полисахаридов АХ, RG-I и АХ+RG-I выделенных из слизи семян льна, решили определить теоретический размер пор в наших образцах. Поэтому, с

помощью формулы 1, рассчитали размер пор по $T_{зам}$ водных растворов полисахаридов, для концентрации 10 мг/мл, для воды k_{GT} = 58.2 K/нм.

Заключение

В выпускной квалификационной работе была поставлена цель, исследование взаимодействия полисахаридов, выделяемых из слизи семян льна, с водным окружением, используя метод криоскопии.

В качестве объектов исследований использовался водный раствор полисахаридов из слизи семян льна: рамногалактуронан I (RG-I), арабиноксилан (AX) и их комплекса (AX+RG-I). Выделение фракций полисахаридов из слизи семян льна проводилось с помощью ионообменной хроматографии на колонке Sephadex A-25. Измерения температуры замерзания водных растворов полисахаридов, производили с помощью осмометра-криоскопа ОСКР-1.

На основе исследования концентрационной зависимости температуры замерзания водных растворов полисахаридов в диапазоне от 0.5 до 10 мг/мл обнаружили существенное понижение температуры замерзания растворов по сравнению с дистиллированной водой, достигающее 18, 11 и 10 градусов для AX, RG-I и AX+RG-I, соответственно, при концентрации 10 мг/мл. При этом понижение температуры замерзания исходной слизи не превышает 0.5 градуса в том же диапазоне концентрации полисахаридов.

Провели сравнение с родственными полисахаридами других видов растений: стандартами AX_C и $RG-I_C$, выделенными из семян пшеницы и стеблей картофеля, соответственно. При концентрации 10 мг/мл температура замерзания водного раствора $RG-I_C$ составила порядка -0.1 °C, что сравнимо с моносахаридами, а для AX_C не отличалась в пределах погрешности от температуры замерзания растворителя. Проверка влияния процедуры хроматографического разделения на свойства полисахаридов

показала, что после прохождения через ионообменную колонку температура замерзания растворов стандартов $\mathrm{A}X_{\mathrm{C}}$ и $\mathrm{RG}-\mathrm{I}_{C}$ существенно не изменяется.

Обнаруженный эффект значительного понижения температуры замерзания водных растворов АХ, RG-I и АХ+RG-I, выделенных из слизи семян льна, свидетельствует о способности этих полисахаридов выступать в качестве криопротекторов даже в сравнительно малых (порядка 1%) концентрациях. Основной вклад в это понижение обеспечивается не коллигативными свойствами раствора, а взаимодействием воды с поверхностью пор, образуемых полимерной сеткой при переходе системы в гелеподобное состояние, проведена оценка размера пор.

Публикации

Хабипов, А.Р. Исследование свойств полисахаридов природных и модифицированных слизей методом криоскопии // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского федерального университета 2020 года: сб. тезисов. Казань: Изд-во Казан. Ун-та. (в печати).

Список литературы

1. Rubilar, M. Flaxseed as a Source of Functional Ingredients [Text] / M. Rubilar, C. Gutierrez, M. Verdugo, C. Shene, J.J. Sineiro // Soil Sci. Plant Nut. – 2010. – V.10. – P. 373–377.

2. Alix, S. Biocomposite materials from flax plants: Preparation and properties [Text] / S. Alix, S. Marais, C. Morvan, L. Lebrun // Composites Part A: Applied Science and Manufacturing. – 2008. – V.39. – P. 1793–1801.

3. Naran, R. Novel rhamnogalacturonan I and arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage [Text] / R. Naran, G. Chen, N.C. Carpita // Plant Physiol. - 2008. – V.148. - P. 132-141.

4. Пороховинова, Е.А Углеводный состав слизи из семян льна и его связь с морфологическими признаками [Текст] / Е.А. Пороховинова, А.В. Павлов, Н.Б. Брач и др. // Сельскохозяйственная биология. - 2017. - № 1. - С. 161-171.

5. Polymer gels: Fundamentals and biomedical applications / D. Derossi, K. Kajiwara, Y. Osada, A. Yamauchi // Polymers for Advanced Technologies. – 1991. – V.3. – P. 48.

6. Hydrogels / A.M. Lowman, N.A. Peppas. Encyclopedia of the controlled drug delivery. - 1999. – V.1. – P. 397–418.

7. Peppas, N.A. Physiologically Responsive Hydrogels [Text] / N.A Peppas // Journal of Bioactive and Compatible Polymers. – 1991. – V.6. - P. 241-246.

8. Bhattacharya, S. Advances in molecular hydrogels [Text] / S. Bhattacharya, U. Maitra, S. Mukhopadhyay, A. Srivastava // Molecular Gels; Weiss, R. G., Terech, P., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands. – 2006. – P. 613−647.

9. Brax, M. Effect of mucilage on water properties in the rhizosphere monitored by 1H-NMR relaxometry [Text] / Brax M., Buchmann, C., Schaumann, G.E // Microporous Mesoporous Mater. – 2017. - V.269. – P. 47–50.

10. Mitchell, J. Nuclear magnetic resonance cryoporometry [Text] / J. Mitchell, J. Beau W. Webber, J.H. Strange // Physics Reports. – 2008. – V.461. – P. 1–36.

11. Petrov, O.V. NMR cryoporometry: principles, applications and potential [Text] / O.V. Petrov, I. Furo // Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. – 2009. – V.54. – P. 97–122.

12. Jackson, C.L. The melting behavior of organic materials confined in porous solids [Text] / C.L. Jackson, G.B. McKenna // The Journal of Chemical Physics. – 1990. – V.93. – P. 9002–9011.

13. Shapiro, Y.E. Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach [Text] / Y.E. Shapiro // Progress in Polymer Science. - 2011. – V.36. - P. 1184-1253.

14. Handbook of Porous Solids / M. Stocker, in: F. Schuth, K.S.W. Sing, J. Weitkamp (Eds.), V.1, Wiley-VCH, Weinheim, 2002. – P. 371–394.

15. Gane, P.A.C. Comparison of NMR Cryoporometry, Mercury Intrusion Porosimetry, and DSC Thermoporosimetry in Characterizing Pore Size Distributions of Compressed Finely Ground Calcium Carbonate Structures [Text] / P.A.C. Gane, C.J. Ridgway, L. Esa et. al. // Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2004. – V.43. – P. 7920–7927.

16. Olson, R.A. Damage to the pore structure of hardened portland cement paste by mercury intrusion [Text] / R.A. Olson, C.M. Neubauer, H.M. Jennings // Journal of the American Ceramic Society. - 1997. – Vol. - 83. – P. 2454–2458

17. Белоус, А.М. Криобиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко. - М: Наукова думка, 1994. — 432 с.

18. Chaytor, J.L. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation [Text] / J.L. Chaytor, J.M Tokarew, L.K. Wu, et. al. // Glycobiology. – 2011. – V.22. – P. 123–133.

19. Solomina, O.N. Cryoprotective properties of some pectins [Text] / O.N Solomina, E.P. Svedentsov, O.O. Zaitseva, et. al. // Doklady Biological Sciences. – 2010. – V.430. – P. 20–22.

20. Zaitseva, O.O. Influence of pectins on NADPH oxidase and phagocytic activity of neutrophils during cryopreservation [Text] / O.O Zaitseva, T.V. Polezhaeva, A.N Khudyakov, et al. // CryoLetters. – 2013. - V.34. – P. 544–548.

21. Khudyakov, A.N. The Cryoprotectant Effect of Polysaccharides from Plants and Microalgae on Human White Blood Cells [Text] / A.N. Khudyakov, T.V. Polezhaeva, O.O. Zaitseva, et al. // Biopreservation and Biobanking. – 2015. – V.13. – P. 240–246.

22. The Theory of Osmolality and Freezing Point Measurement [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://www.news-medical.net/whitepaper/20171026/The-Theory-of-Osmolality-and-Freezing-Point-Measurement.aspx (Дата обращения: 18.04.2020)

23. Ion Exchange Chromatography [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://microbenotes.com/ion-exchange-chromatography/ (Дата обращения: 20.04.2020)

24. Полисахариды слизи, образуемой семенами льна при набухании: особенности строения и функциональная значимость [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://elibrary.ru/item.asp?id=32599123 (Дата обращения 15.05.19)

25. Gel Filtration Chromatography [Электронный ресурс] / Режим доступа: https://microbenotes.com/gel-filtration-chromatography (Дата обращения 15.03.20)