

**В.В. Манк, О.П.Мельник, В.В.Трачевский**

## **РОЛЬ ВОДЫ В ПРОЦЕССАХ СТРУКТУРООБРАЗОВАНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ**

Работа посвящена исследованию роли воды в стабилизации упорядоченной структуры биологической макромолекулы – полисахарида крахмала методами ЯМР и ИК-спектроскопии. Показано, что молекулы воды играют важную роль в образовании спиралеподобной структуры биополимера.

**Ключевые слова:** макромолекулы крахмала, водородные связи, ИК- и ЯМР - спектроскопия, квазикристаллическое состояние.

**Введение.** Природные полимеры, в отличие от синтетических, характеризуются частично упорядоченной спиральной структурой, которая формируется в процессе их синтеза и роста. Такая особенность биологических макромолекул обусловлена, прежде всего, их хиральным строением, сопряженным с существованием водородных связей с включенными в структуру молекулами воды.

Основные цепи биополимеров представляют собой последовательность С–С–С связей, образующих друг с другом определенные валентные углы, которые незначительно деформируются в процессе тепловых колебаний атомов и молекул. Вращение звеньев цепи вокруг направления соседних связей не свободно, а сводится к конформационным переходам с минимумом потенциальной энергии.

Отсутствие свободы вращения звеньев – следствие существования сильных взаимодействий между близко расположенными группами полимера [1, 2].

Устойчивость структуры биополимеров обеспечивают межфрагментные связи, максимальное количество которых образуется при свертывании полимерной цепи в конформации с оптимальным соотношением поверхности к объему и организацией координационной насыщенности донорных атомов функциональных групп и входящих в состав композиций молекул воды [2].

Каждая структурная модификация молекул биополимеров характеризуется набором жестких конформаций цепи. Это приводит к значительным отклонениям пространственной организации макромолекул от структуры клубка. Причины таких особенностей заключены в полифункциональности молекул биополимеров. Взаимодействие групп различной природы приводит к возникновению устойчивых внутримолекулярных связей. В простейших случаях эти связи обуславливают свернутые (приближающиеся к глобулярным) конформации цепи. В других случаях они приводят к возникновению конформационных состояний цепи, аналогичных линейным кристаллам.

Спиралевидная форма полимерной цепи обеспечивает ее наибольшую энергетическую стабильность. Для молекулы крахмала характерной является  $\alpha$ -спираль Полинга – Кори, в которой на каждый виток приходится 3,6 мономерного звена и в среднем три водородные связи, стабилизирующие виток [2, 3].

При сближении витки спирали полимерной цепи взаимодействуют между собой посредством водородных связей. Необходимо отметить, что даже в наиболее плотно свернутых состояниях макромолекул в атомно-молекулярной архитектуре существуют пустоты, соизмеримые с размерами молекул. Вода может заполнять такого рода пустоты в макромолекуле и, таким образом, становится составной частью макромолекулярной глобулы [2–4].

Макромолекулярная глобула размером  $R$  имеет центры, участвующие в образовании водородных связей двух различных типов. В наружном слое толщиной  $d$  и объемом  $4/3\pi [R^3 - (R-d)^3]$  находятся поверхностные центры макромолекулы биополимера [1], и любая боковая цепь, заключенная в этом объеме, является сольватированной. Во внутреннем сферическом объеме  $4/3\pi (R-d)^3$  содержатся активные центры. Боковые цепи макромолекулы, заключенные в этом объеме, не контактируют с растворителем, находясь в малополярном окружении.

При фиксированном значении  $d$  соотношение между внутренним и наружным объемами возрастает с увеличением  $R$ , так что число внутренних центров увеличивается с возрастанием размера свернутой глобулы. Однако в дальнейшем, при достижении критических размеров глобулы, число этих центров не изменяется [1].

Можно предполагать, что водородные связи между функциональными группами звеньев цепи несколько слабее связей,

образующихся между молекулами воды, связанными с активными центрами биополимера, и между молекулами воды в жидкой фазе.

Как известно, в диапазоне температур 40 – 70<sup>0</sup>С наблюдается изменение характера межмолекулярных взаимодействий в биомакромолекулах и происходит преобразование их упорядоченной структуры [1, 2, 5].

Целью данной работы было исследование роли воды в стабилизации упорядоченной структуры макромолекулы крахмала, который является одним из наиболее распространенных представителей биополимеров.

**Методика эксперимента.** Для проведения экспериментов готовили 10% суспензии нативного картофельного крахмала (36% амилозы) в дистиллированной воде и выдерживали их в термостате 30 мин при температуре 25, 70, 90<sup>0</sup>С. После этого образцы высушивали до достижения гидратного равновесия при комнатной температуре. Твердофазный остаток измельчали до получения порошка.

Спектры ИК - поглощения крахмалов регистрировали на Фурье - спектрометре Vector - 22 (Bruker, Германия). Для этого исследуемые образцы прессовали в таблетку с KBr.

Спектры ЯМР <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C твердых образцов и растворов крахмала в тяжелой воде записывали при комнатной температуре на импульсном спектрометре Avance - 400 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 400 МГц.

**Результаты и их обсуждение.** В ИК-спектрах крахмалов (рис.1) наблюдаются широкие полосы поглощения валентных колебаний гидроксильных групп в области  $3000 - 3700 \text{ см}^{-1}$ , а также ряд полос в низкочастотной области от  $2000$  до  $400 \text{ см}^{-1}$ , относящихся к колебаниям других групп молекул. Проявление всех типов ИК-поглощения гидроксильной группы зависит от того, к какому углеродному атому звена полимера присоединена гидроксильная группа – первичному, вторичному или третичному, является ли эта группа свободной или она связана внутримолекулярными или межмолекулярными водородными связями, какова сила этих водородных связей. Частота валентных колебаний убывает, а деформационных возрастает при усилении водородной связи. Смещение полос, связанных с группой ОН, которая является донором протонов, больше, чем смещение полос, связанных с группами – акцепторами протонов, (например,  $\text{C}=\text{O}$ ) [6].

Сопоставление ИК-спектров образцов крахмала, обработанных при различных температурах, показывает, что с повышением температуры полоса валентных колебаний групп ОН существенно сужается и смещается в высокочастотную область спектра. Это свидетельствует о том, что при тепловой обработке крахмала снижается доля структурно связанных молекул воды. Тепловое преобразование квазикристаллической структуры молекул крахмала, четко фиксируемое на рентгеновских дифрактограммах [5], связано с перераспределением в системе форм участия донорных атомов. Прочное связывание молекул воды внутри спиральной структуры

макромолекул обуславливает дополнительную устойчивость кристаллогидрата.

Незначительные изменения наблюдаются при тепловой обработке крахмала и в других областях ИК-спектра. Так, полоса при  $575\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует колебаниям цепочки  $\text{C} - \text{C} - \text{C}\dots$  связей [6–8], не обнаруживается уже при обработке образца при  $90^{\circ}\text{C}$  (рис 1, б). Это значит, что углеводородные цепочки получают свободу движений после изменения пространственной организации молекул. В результате увеличения «теплового напряжения» в местах слабых взаимодействий, удерживающих цепь, структура спирали трансформируется в развёрнутую форму макромолекулы.

В ИК-спектрах дальней области (NIR) наблюдаются полосы поглощения при  $5180$ ,  $4790$ ,  $4300$  и  $4000\text{ см}^{-1}$ , относящиеся к составным колебаниям молекул и обертонам [6, 7]. Незначительные изменения в спектрах образцов, подвергшихся тепловой обработке, характерны только для полосы  $4000\text{ см}^{-1}$ , интенсивность которой уменьшается, что также связано с изменениями характера колебаний  $\text{C} - \text{C} - \text{C}\dots$  связей, отмеченных выше.

Спектроскопия ЯМР является одним из основных методов получения информации о структуре и динамике воды вблизи границы раздела фаз. Большие различия в ширине и форме линий спектров магнитных ядер молекул, находящихся в фиксированном положении в пространстве и подвижных, позволяет количественно оценить долю

молекул в разных состояниях, в том числе в гетерогенных дисперсных системах [9–11].

В спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  воздушно-сухих образцов крахмала, обработанных при различных температурах, наблюдается широкая и узкая полосы поглощения протонов полисахарида и воды (рис. 2). Широкая полоса относится к протонам углеводородных фрагментов и воды, молекулы которой жестко фиксированы в пространстве твердой матрицы. Полуширина спектра молекул крахмала составляет  $\sim 4$  кГц, а кристаллизационной воды  $\sim 80$  кГц. В узкую линию полушириной  $\sim 1$  Гц дают вклад протоны подвижной воды, которая может находиться в разных состояниях в крахмале: адсорбционно- связанная, вода в капиллярах и свободная.

Соотношение интегральных интенсивностей узкой  $I_y$  и широкой  $I_{ш}$  линий ЯМР можно использовать для оценки доли молекул воды, жестко связанной в структуре кристаллогидрата полисахарида, и находящихся в движении. В случае отсутствия молекул воды в структуре кристаллогидрата соотношение узкой и широкой линий составляет  $1,8 \cdot 10^{-2}$   $w$ , где  $w$  – влажность образца в % вес [12]. Если часть воды  $n$  находится в структуре кристаллогидрата, а  $m$  – в подвижной фазе, причем  $n + m = 1$ , соотношение узкой и широкой полос поглощения составляет

$$\Theta = \frac{I_y}{I_{ш}} = \frac{1-n}{\frac{55,53}{w} + n} \quad (1)$$

Сопоставления параметров экспериментальных спектров образцов крахмала в соответствии с уравнением (1) дает информацию о количестве кристаллизационной воды в структуре полисахаридов при температуре их обработки  $20^{\circ}\text{C}$  – 1,4,  $70^{\circ}\text{C}$  – 1,23 и  $90^{\circ}\text{C}$ – 1,08. Параллельно с этим, согласно данным термического анализа, уменьшается общее количество воды в крахмале от 15% для исходного образца до 9% термообработанного при  $90^{\circ}\text{C}$ . Эти данные однозначно указывают на разрушение частично упорядоченной структуры крахмала при его нагревании выше  $60^{\circ}\text{C}$  с разделением фазы воды и полимера. К такому же результату пришли авторы [2] на основании анализа релаксационных характеристик ядер водорода в крахмалах. Можно сказать, что происходит плавление кристаллогидрата, сопровождающееся выделением определенного количества тепла, согласно данным ДСК [2, 13].

Эти выводы подтверждаются результатами анализа спектров ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  водных растворов исследуемых полисахаридов. Так, в протонных спектрах ЯМР растворов исходного крахмала (рис. 3) наблюдается практически одна интенсивная линия поглощения в области  $\delta = 5$  м.д., тогда как в спектрах растворов термообработанного при  $90^{\circ}\text{C}$  крахмала наряду с сигналом воды четко выделяются сигналы протонов полисахаридных звеньев. Это свидетельствует о свободных движениях отдельных звеньев полимера после преобразования его квазикристаллической структуры под действием температуры.

На рис. 4 представлены спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  растворов исходного и термообработанного при  $90^{\circ}\text{C}$  крахмала. Как и в протонных спектрах, при термообработке спектры становятся более разрешенными, что также связано с ростом подвижности углеводородных звеньев полимера после его разрушения. Здесь четко видны полосы поглощения отдельных типов ядер углерода звеньев полисахарида. Можно было ожидать заметных смещений сигналов ЯМР  $^{13}\text{C}$  после удаления кристаллогидратной воды из структуры крахмала. Однако при сравнении полученных и известных [14, 15] спектров крахмалов различного происхождения и отдельно для амилозы и амилопектина [16, 17] принципиальных различий не наблюдается. Это указывает на то, что образование водородных связей молекул воды с атомами кислорода звеньев полимера не существенно влияет на перераспределение электронной плотности вокруг атомов углерода.

Большого различия следовало ожидать при сравнении спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  амилозы и амилопектина, поскольку звенья этих полисахаридов различным образом связаны между собою в цепях. Так, амилоза представляет собой полимер, в котором глюкозидные звенья связаны между собой  $\alpha$  - 1,4 связями, а амилопектин –  $\alpha$  - 1,4 и 1,6 - связями.

Сходство спектров этих полимеров может свидетельствовать о незначительном изменении электронного окружения атомов углерода в центрах соединения звеньев полимера, в то время как, взаимодействие амилопектина и амилозы с азидом приводит к смещению сигнала ЯМР

углерода полисахарида в положении C-6 на 10 м.д., что свидетельствует о сильном изменении электронного окружения атома углерода при взаимодействии с азотом [15].

**Выводы.** Таким образом, проведенные исследования указывают на существование полимерных макромолекул крахмала в квазикристаллическом состоянии в форме спиралей, положение витков которых стабилизировано встроенными в виде мостиков молекулами воды. Повышение температуры выше  $60^{\circ}\text{C}$  приводит к ослаблению водородных связей между полимерными звеньями и молекулами воды, вследствие чего происходит структурная перестройка кристаллогидрата крахмала или его плавление. Освободившиеся из кристаллической структуры крахмала молекулы воды переходят в подвижную адсорбционную фазу.

Как известно, при повышении температуры прочность водородных связей в воде уменьшается, что приводит к разрушению структуры воды выше  $60^{\circ}\text{C}$ . Это явление относится к одному из аномальных свойств воды. Разрушение водородных связей может явиться причиной отмеченного выше поведения крахмалов и других биополимеров при высоких температурах.

**Резюме.** Работа посвящена дослідженню ролі води в стабілізації впорядкованої структури біологічної макромолекули – полісахариду крохмалю методами ЯМР та ІЧ-спектроскопії. Показано, що молекули

ВОДИ ВИКОНУЮТЬ ВАЖЛИВУ РОЛЬ В УТВОРЕННІ СПІРАЛЕПОДІБНОЇ СТРУКТУРИ біополімера.

V.V.Mank ,O.P. Melnyk, V.V.Trachevsky

**ROLE OF WATER IN THE PROCESS OF STRUCTURE OF  
BIOPOLYMERS**

Summary

This paper studies the role of water in stabilizing the ordered structure of biological macromolecules – polysaccharide starch by NMR and IR spectroscopy. It is shown that water molecules play an important role in the formation of spiral-like structures of biopolymers.

Key words: makromolekules starche, hydrid bonds, IR- and NMR spectroscopy, kvazykristalle state.

## Литература

1. Структура и стабильность биологических макромолекул / Под ред. М.В.Волькенштейна. – М.:Мир, 1973. – 584 с.
2. Starches : characterization, properties, and applications / Ed. C.A. Bertolini. – New York: Taylor and Francis Group, LLC, 2010. – 276 p.
3. Шульц Г., Ширмер Р Принципы структурной организации белков.. – М.:Мир, 1982. – 360 с.
4. Цветков В.Н., Эскин В.Е., Френкель С.Я. Структура макромолекул в растворах. – М.:Наука, 1964. – 720 с.
5. Мельник О.П., Манк В.В. Дослідження механізму золь-гель переходів у водних розчинах крохмалів. //Вопр. химии и хим.технологии. –2010. – №2. – С.49 – 52.
6. Накамото К. ИК - спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. – М.: Мир, 1991. – 536 с.
7. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – М.: Мир, 1965. – 209 с.
8. Рощина Е.В., Суконкина Е.Б., Литвяк В.В., Петюшев Н.Н., Москва В.В. Сравнительная характеристика спектроскопических свойств нативных и

- модифицированных крахмалов. //Хранение и переработка сельхозсырья. – 2009. – №5. – С. 56 – 59.
9. Воловенко Ю.М., Туров О.В. Ядерний магнітний резонанс. – К.: Ірпінь, 2007. – 480с.
  10. Манк В.В., Лебовка Н.И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах. – Киев: Наук. думка, 1988. – 202 с.
  11. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе. – Киев: Наук. думка, 2009. – 694 с.
  12. Манк В.В., Кобылинская Е.В., Ковбаса В.Н. Состояние воды в крахмале и его экструдатах по данным ЯМР. //Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 1999. – № 2. – С. 14 – 15.
  13. Берштейн В.А., Егоров В.М. Дифференциальная сканирующая калориметрия в физикохимии полимеров. – Л.: Химия, 1990. – 256 с.
  14. Moo-Yeol Baik, Dickinson L.C., Chinachoti P. Solid-state <sup>13</sup>C CP/MAS NMR studies on aging of starch in white bread. // Cereal Chem. –2002. – **83**. – P. 407 – 411.
  15. Justin Shey, Kevin M. Holtman, Rosalind Y. Wong. The azidation of starch. // Carbohydrate Polymers. – 2006. – **65**. – P. 529 – 534.
  16. Angela L. M. Smits, Frank C. Ruhnau, Johannes F. G. Vliegenthart. Ageing of starch based systems as observed with FT-IR and solid state NMR spectroscopy. // Starch/Stärke. – 1998. –**50**, N 11/12. – P. 478 – 483.
  17. Morgan K. R., Furneaux R. H., Stanley R. A. Observation by solid-state <sup>13</sup>C CP MAS NMR spectroscopy of the transformations of wheat starch

associated with the making and staling of bread. //Carbohydrate. Res. – 1992.

– 235. – P. 15 – 22.

Поступила в редакцию

**В.В. Манк, О.П.Мельник, В.В.Трачевский**  
**Роль воды в процессах структурообразования биополимеров**

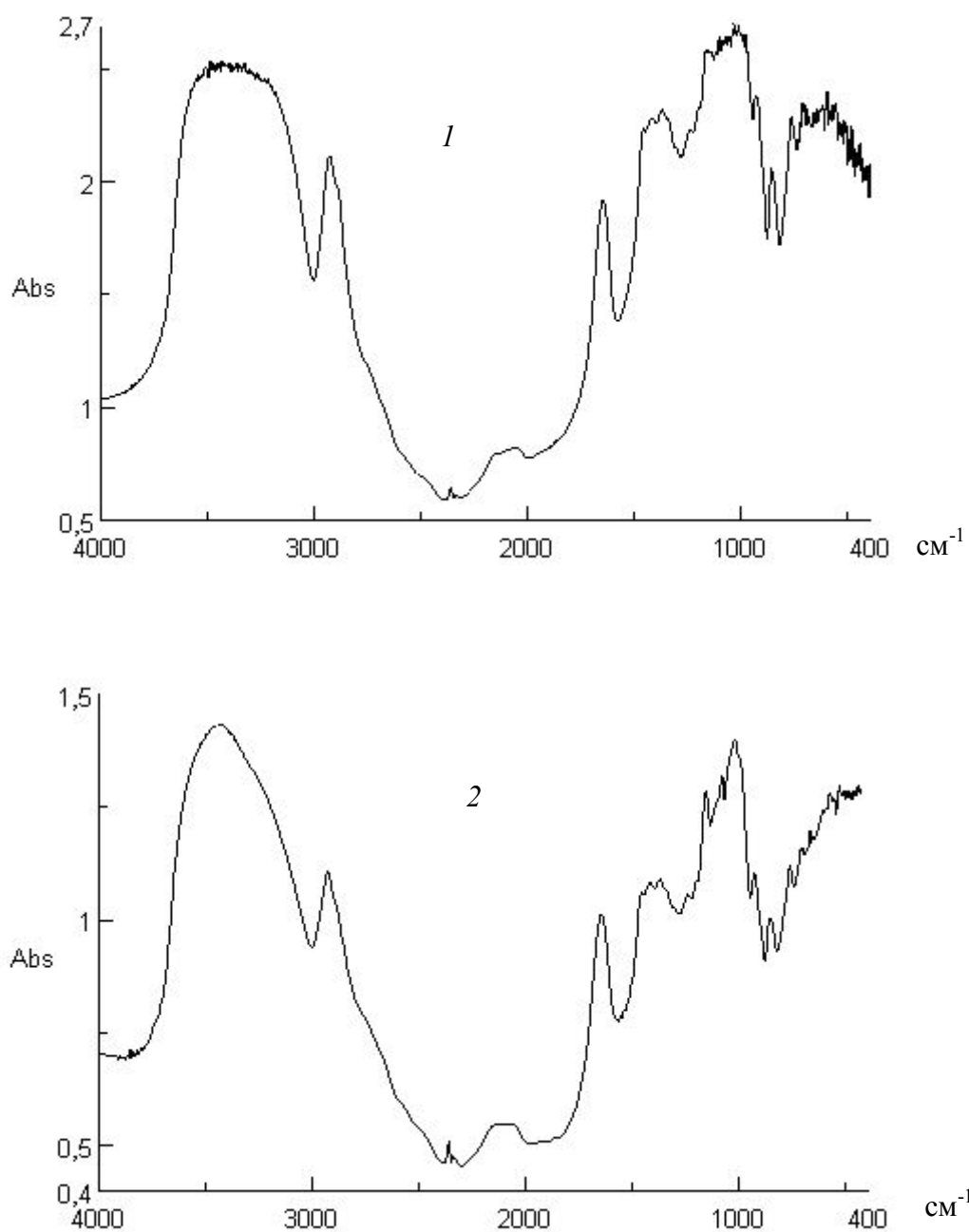


Рис.1 ИК-спектры картофельного крахмала: 1 – нативного, 2 – термообработанного при 90°C

**В.В. Манк, О.П.Мельник, В.В.Трачевский**  
**Роль воды в процессах структурообразования биополимеров**

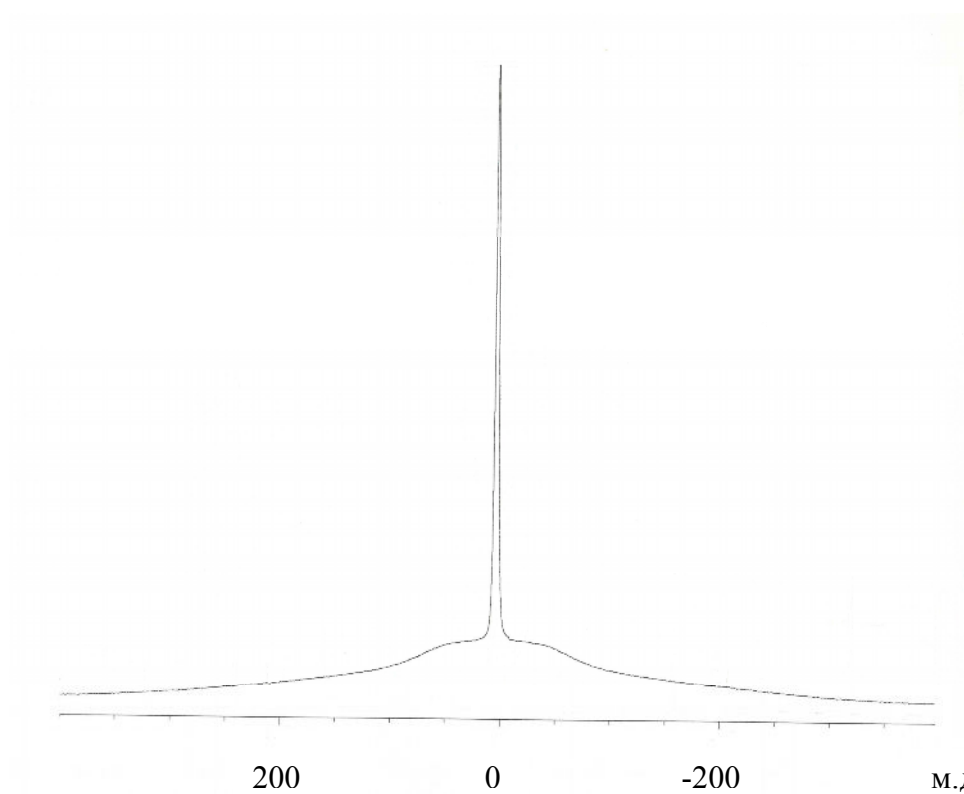


Рис.2 Характерный спектр ЯМР  $^1\text{H}$  воздушно-сухого образца нативного крахмала

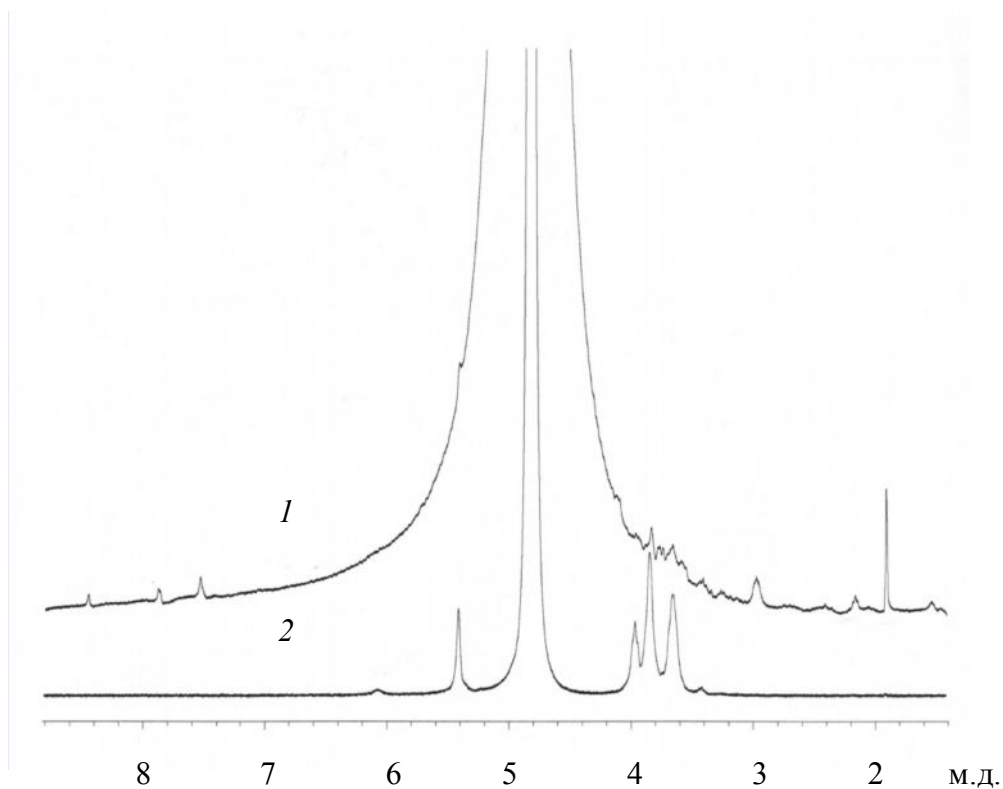


Рис.3 Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  водных растворов крахмалов: 1 – нативного, 2 – термообработанного при  $90^\circ\text{C}$

**В.В. Манк, О.П.Мельник, В.В.Трачевский**

**Роль воды в процессах структурообразования биополимеров**

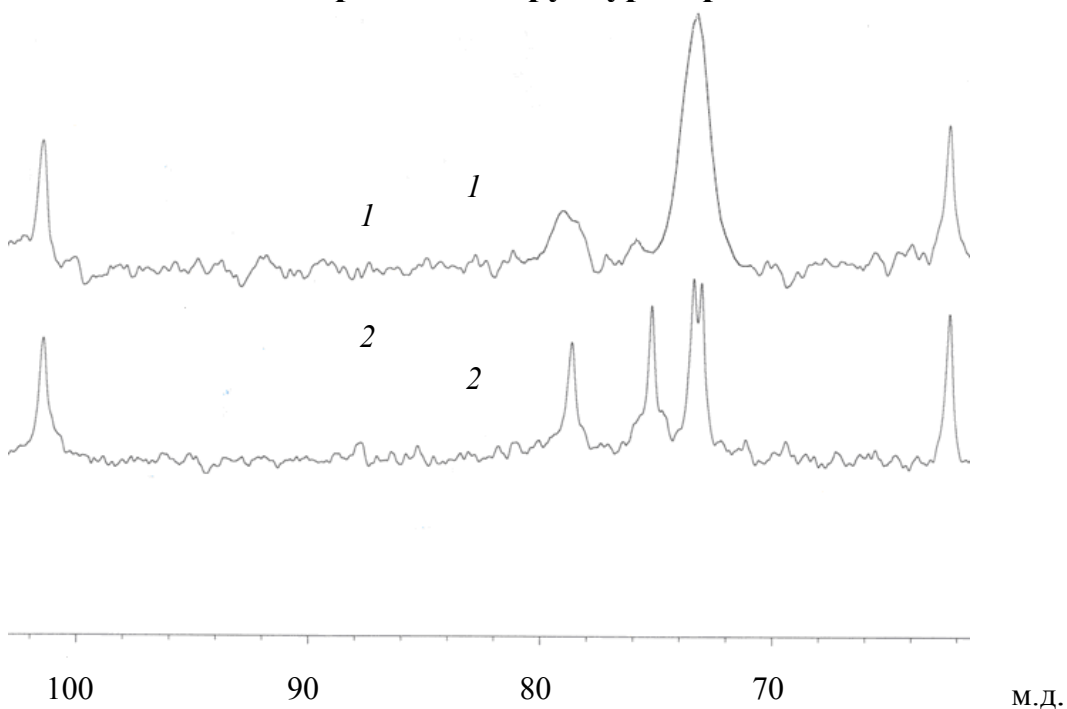


Рис.4 Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}$  водных растворов крахмалов: 1 – нативного, 2 – термообработанного при  $90^\circ\text{C}$

**В.В. Манк, О.П.Мельник, В.В.Трачевський**

## **РОЛЬ ВОДИ В ПРОЦЕСАХ СТРУКТУРОУТВОРЕННЯ**

### **БІОПОЛІМЕРОВ**

Робота присвячена дослідженню ролі води у стабілізації впорядкованої структури біологічної макромолекули – полісахарида крохмалю методами ЯМР та ІЧ-спектроскопії. Показано, що молекули води відіграють важливу роль в утворенні спіралеподібної структури біополімеру.

**Ключові слова:** макромолекули крохмалю, водневі зв'язки, ІЧ- та ЯМР - спектроскопія, квазікристалічний стан.