

УДК 541.64:547.992.3

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГНИНА КЛЕТОЧНЫХ ОБОЛОЧЕК

© 2000 г. А. П. Карманов*, Д. В. Матвеев*, Ю. Б. Монаков**

*Институт химии Коми научного центра Российской академии наук
167610 Сыктывкар, ул. Первомайская, 48

**Институт органической химии Уфимского научного центра Российской академии наук
450054 Уфа, пр. Октября, 71

Поступила в редакцию 15.04.1999 г.
Принята в печать 26.01.2000 г.

Проведено экспериментальное изучение макроструктуры лигнина клеточных оболочек древесины сосны методом просвечивающей электронной микроскопии. Полученные данные использованы для реконструкции динамики процесса лигнификации древесных клеток. Построены псевдофазовые портреты в пространствах различной размерности и вычислены корреляционные функции Хэвисайда. Показано, что лигнин вторичной клеточной стенки имеет фрактальную структуру. Высказано предположение, что процесс лигнификации протекает в динамическом режиме странного аттрактора с размерностью 3.7 ± 0.4 .

Лигнин – высокомолекулярное соединение, которое синтезируется и накапливается в клеточных оболочках почти всех наземных растений. В результате лигнификации клеточные стенки приобретают плотность и механическую прочность при сохранении эластичности и водопроницаемости, что обусловлено особенностями структурной организации природного лигнина [1].

Надмолекулярная структура лигнина [2, 3] не отличается большим разнообразием и характеризуется в основном наличием глобуллярных или продолговатых частиц – агрегатов макромолекул размером до 100 нм. Это обусловлено тем, что лигнин является аморфным полимером с нерегулярной, строго не зафиксированной и, в определенном смысле, случайной химической структурой. Согласно Сарканену [4], фундаментальным свойством природного лигнина является его гетерогенность и неупорядоченность на всех уровнях структурной организации.

Однако в последние годы были получены принципиально новые данные [5, 6], указывающие на наличие структурной упорядоченности лигнина. Выявление структурного порядка стало возможным в результате использования методов теории динамических систем. Образование лигнина и его отложение в клеточных оболочках является конечной стадией дифференциации клеток вторичной ксилемы, тем не менее изучение биосинтеза *in vi-*

vo

указывает на непрерывность процесса лигнификации в течение всего периода дифференциации клеточных стенок. Растительную клетку живого дерева, например трахеиду, можно рассматривать, следя Пригожину [7], как неравновесную пространственно распределенную химическую систему. В период лигнификации в ней существуют диффузионные потоки реагентов (мономерные предшественники лигнина, ферменты и т.д.) и одновременно протекают химические реакции образования мономерных феноксильных радикалов и их рекомбинация. Взаимодействие диффузии и химической реакции приводит к возникновению определенной пространственной макроструктуры лигнина, содержащей необходимую позиционную информацию [1, 3] для клеточной дифференциации, поэтому в структуре лигнина клеточных оболочек зашифрованы динамические закономерности процесса лигнификации.

В настоящей работе приведены результаты количественного анализа макроструктуры лигнина вторичной клеточной стенки древесины сосны по данным просвечивающей электронной микроскопии с целью получения информации о динамике лигнификации древесных клеток. Ранее нами [8] был предложен метод исследования количественного распределения лигнина в клеточных оболочках древесины, представляющий собой комбинацию электронной микроскопии, денситометрического анализа микрофотографий лигнин-

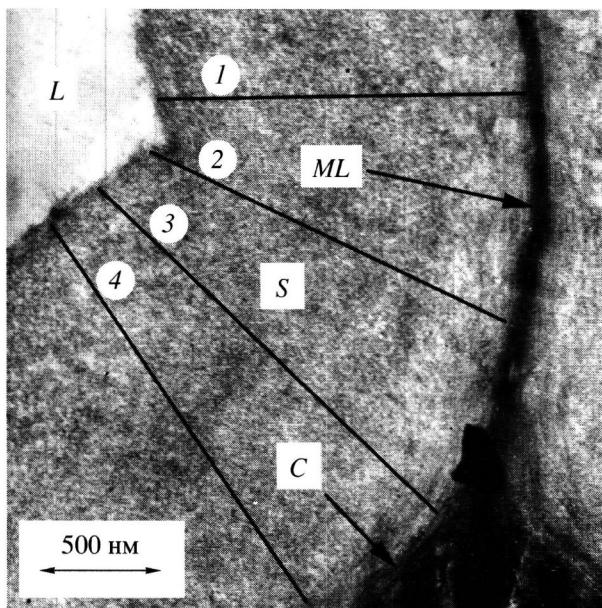


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение лигнинного скелета клеточной оболочки трахеиды сосновой древесины; *ML* – срединная пластина, *C* – уголковое утолщение, *S* – вторичная клеточная стенка, *L* – внутренняя полость (люмен). *1–4* – сечения сканирования.

ных скелетов и определение фрактальных параметров структуры. В этой работе сделана попытка развития указанного метода для извлечения информации о динамической предыстории лигнина, т.е. о динамике процесса лигнификации клеточной стенки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовали лигнинные скелеты древесины сосны *Pinus silvestris*, возраст дерева 85 лет. Образцы лигнинных скелетов получали по методу [9]. Для приготовления ультратонких срезов использовали ультрамикротом УМТП-1. Оттенение осуществляли платино-палладиевым сплавом. Съемки производили при помощи электронного микроскопа УЭМК-100к. Рабочее напряжение 80 кВ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 представлена микрофотография по-перечного среза лигнинного скелета трахеиды сосновой древесины. Лигнин вторичной клеточной стенки представляет собой достаточно рыхлую систему хаотически перемежающихся микрообластей различной плотности и размера (10–100 Å). Закономерности распределения частиц лигнина, т.е. макроструктура лигнина вторичной клеточной

стенки неизвестна; между тем именно макроструктура, как материальный отпечаток процесса лигнификации, содержит информацию о динамике процесса лигнификации. В связи с этим клеточную стенку следует рассматривать как пространственно распределенную систему. Для таких систем параметры состояния (в нашем случае концентрация лигнина) представляют собой поля в том смысле, что имеется непрерывная зависимость от пространственных координат. Чтобы установить, какой тип поведения, т.е. тип динамического аттрактора, демонстрирует исследуемая распределенная система, необходимо получить временную последовательность параметров состояния всего лишь в нескольких или даже в одной точке пространства системы [10]. Ключевой характеристикой для подобного рода диагностики может служить корреляционная размерность, вычисленная по временной последовательности с помощью алгоритма Грассберга-Прокаччии [11]. Можно ли решить подобную задачу, имея в своем распоряжении не временную серию, а пространственную последовательность? В работе [12] показано, что, даже для чрезвычайно сложных систем с хаотической динамикой подобная диагностика действительно возможна. Для этого достаточно иметь лишь фотографию, на которой зафиксирована пространственная структура, представляющая мгновение в жизни распределенной динамической системы. Таким образом, есть основания полагать, что анализ количественных данных, характеризующих структуру лигнинного скелета клеточной стенки трахеиды, позволит получить определенные сведения о динамике процесса лигнификации, которые пока невозможно извлечь никакими другими способами.

Как известно, фронт лигнификации (так называемая “стрела времени” [7]) направлен в радиальном направлении от внешнего слоя клеточной стенки (срединной пластины) к полости клетки (люмену) [1]. В связи с этим прежде всего нас интересуют закономерности распределения лигнина именно в радиальном направлении.

Для решения этой задачи фотоизображение (рис. 1) вводили в память компьютера в виде массива данных $h(x, y)$ (h – интенсивность объекта в точке с координатами x, y) и получали таким образом растровые изображения. Сечение по некоторой прямой x (радиальное направление) дает определенную серию чисел – пространственную последовательность. В графическом виде эта последовательность представляет денситограмму фотоизображения и характеризует распределение концентрации лигнина во вторичной клеточной стенке вдоль прямой x . С другой стороны,

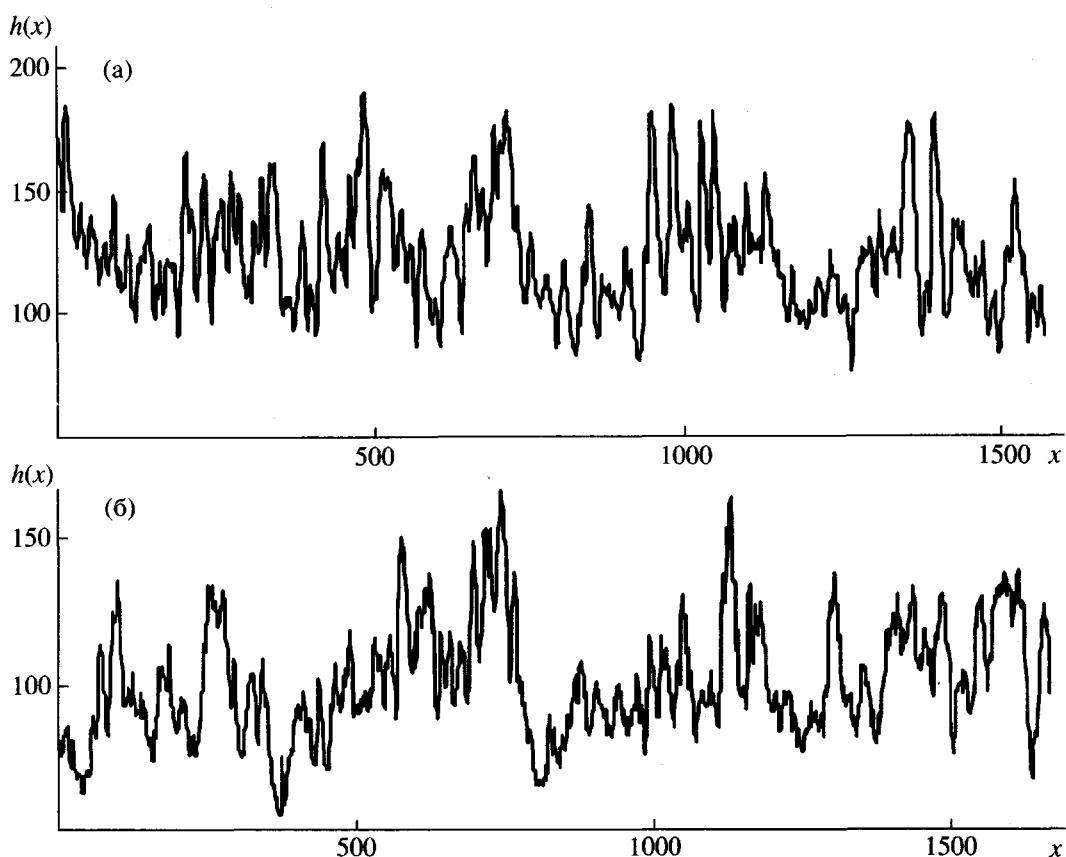


Рис. 2. Два примера распределения концентраций лигнина (в усл. ед.) во вторичной клеточной стенке (рис. 1) в направлении, перпендикулярном срединной пластиинке. а – сечение по прямой 1, б – по прямой 2. Единица по оси X соответствует 1 нм.

прямую можно рассматривать и как временную координату, учитывая направленность перемещения фронта лигнификации в клеточной стенке. На рис. 2 представлены примеры пространственных последовательностей. По каждому образцу лигнинного скелета получали не менее 10 последовательностей. Как видно из этих примеров, лигнин распределен в клеточной стенке отнюдь не равномерно: какие-либо видимые признаки упорядоченности отсутствуют. Можно предположить, что наблюдаемые последовательности являются либо хаотическими, либо квазипериодическими, когда имеются несколько независимых периодов с несоизмеримыми частотами. В последнем случае могут наблюдаться чрезвычайно сложные последовательности, которые воспринимаются как хаотические. Чтобы разобраться, к какому классу относится исследуемая система, воспользуемся методами теории динамических систем, включающих проверку самоподобия и

определение фрактальной размерности фазового портрета.

Для этого мысленно представим эволюцию системы (напомним, что речь идет о процессе лигнификации клеточной стенки) в некотором абстрактном пространстве, известном под названием фазового [13]. Как известно, в динамике фазовым пространством называется математическое пространство, координатами которого являются компоненты вектора состояния системы, другими словами, фазовое пространство включает в себя ансамбль существенных переменных динамической системы, причем время в явном виде в этот ансамбль не входит. Следует отметить, что в литературе уже используют понятие о химическом фазовом пространстве, координатами которого служат концентрации участвующих в химической реакции соединений. Последовательность принимаемых состояний системы в координатах существенных переменных называют фазовой траекторией. В тех случаях, когда в эксперименте невозможно отслеживать состояние системы по

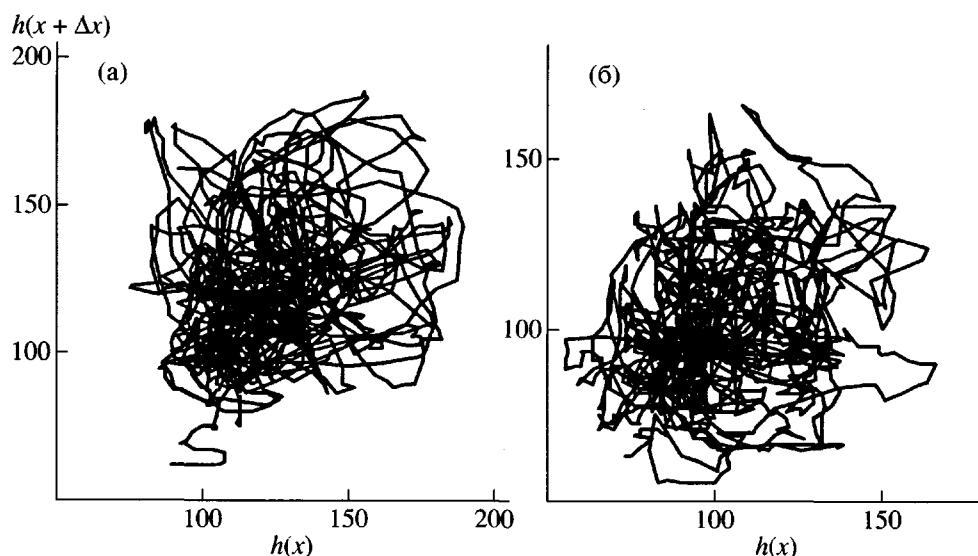


Рис. 3. Псевдофазовые портреты лигнификации, построенные по данным рис. 2а (а) и 2б (б).

всем координатам, используют понятие псевдофазового пространства. В частности, можно построить [13] зависимость экспериментально измеряемой концентрации $c(t)$ от ее же величины, но в другой момент времени, опережающий данный момент времени на постоянную величину Δt , т.е. зависимость $c(t) = f[c(t + \Delta t)]$. Последовательность состояний системы в этом случае определяет некоторую кривую, называемую псевдофазовым портретом, который позволяет идентифицировать динамическое поведение всей системы, поскольку полученная траектория несет в себе следы всех других участвовавших в реакции существенных переменных. Это позволяет безмодельным способом устанавливать ключевые особенности исследуемой реакции как динамической системы. Указанный подход был предложен Packard [14] и использован во многих динамических исследованиях под названием метода псевдофазового пространства или метода временных задержек.

Процедура математического анализа наших пространственных последовательностей аналогична анализу временных серий [13, 15]. При этом используют набор величин h , характеризующих концентрацию лигнина в N эквидистантных точках по пространственной оси x . Во-первых, строим псевдофазовые портреты. Во-вторых, вычисляем корреляционные функции Хэвисайда и определяем фрактальные размерности псевдофазовых траекторий. В-третьих, находим зависимость корреляционной размерности от размерности псевдофазового пространства. Реализация данного алгоритма

позволяет отличить бесструктурный хаос (например, белый шум) от детерминированного хаоса, установить тип и характеристики аттрактора, в частности его фрактальную размерность. Псевдофазовые портреты размерности больше двух получали все тем же методом Паккарда, при этом в качестве набора переменных, образующих фазовое (точнее псевдофазовое) пространство, использовали дискретные значения h :

$$\begin{aligned} & h(x) \\ & h(x + \Delta x) \\ & h(x + 2\Delta x) \\ & \vdots \\ & h(x + (D-1)\Delta x), \end{aligned}$$

где Δx – интервал между последовательными выборками значений h ; D – размерность пространства; в данном случае была выбрана величина $D = 20$, что в принципе достаточно для анализа поведения любых, реально существующих динамических систем.

На рис. 3 изображены двумерные псевдофазовые портреты лигнификации клеточной стенки по данным рис. 2, которые представляют собой зависимость переменной $h(x)$ от ее величины, но в других точках оси x , отстоящих от выбранных на постоянную величину Δx . Как видно из этих ри-

сунков, фазовые (псевдофазовые) траектории полностью неупорядочены, что свидетельствует о сложной динамике процесса лигнификации.

Примером простой динамики химической реакции может служить знаменитая реакция Белоусова–Жаботинского в режиме ритмических колебаний [16]. Фазовая траектория при этом представляет собой замкнутую линию, что соответствует динамическому режиму (аттрактору) типа предельный цикл. В данном случае уместно отметить, что для идентификации динамики этой реакции совсем не обязательно проведение измерений концентраций соответствующих реагентов и построения истинного фазового портрета. В ряде случаев (например, при проведении этой реакции в тонком слое в чашечке Петри) можно провести аналогичный нашему математический анализ цветных фотографий химической системы Белоусова–Жаботинского и прийти к тому же выводу. В работах [17, 18] при исследовании полимеризации кониферилового спирта и феруловой кислоты в системе пероксидаза – пероксид водорода (биосинтез лигнина *in vitro*) были обнаружены различные типы динамического поведения, в том числе колебательный (т.е. аттрактор типа предельный цикл) и хаотический режимы. Это означает, что при формировании микроструктуры лигнинного полимера на химическом уровне могут происходить различные явления самоорганизации, связанные с динамикой процесса. Отметим, хотя это выходит за рамки настоящей работы, что реализация того или иного типа динамического поведения определялась единственным фактором – скоростью подачи мономера в реакционную зону. Не исключено, что при биосинтезе лигнина *in situ* также происходят явления самоорганизации, влекущие за собой формирование упорядоченной макроструктуры лигнина в клеточных стенках.

Для выявления эффектов самоорганизации, так или иначе связанных с динамикой системы, необходим детальный анализ геометрического образа динамического режима – аттрактора, представляющего собой так называемое притягивающее множество траекторий системы в фазовом пространстве. Каждому типу динамического поведения соответствует свой аттрактор. Так, например, динамика обычной химической реакции отвечает аттрактору типа предельной точки. Регулярным колебаниям соответствует, как указывалось выше, устойчивый предельный цикл. Этим классическим аттрак-

торам отвечают классические геометрические области: точка, замкнутая кривая или поверхность в трехмерном фазовом пространстве. Хаотические колебания относятся к пока еще недостаточно изученному классу хаотических странных аттракторов. Станный аттрактор, как оказалось, связан с новым геометрическим объектом – фрактальным множеством.

Следующим этапом исследований является количественная характеристика псевдофазовых портретов (рис. 3). Для оценки закономерностей распределения точек, лежащих на псевдофазовых траекториях (точечного множества, поскольку траектория представляет собой совокупность N точек) в пространстве и для установления сходимости траекторий к некому аттрактору использована интегральная корреляционная функция

$$C(r) = \frac{1}{N^2} \sum_{i,j, i \neq j} \Theta(r - |x_i - x_j|),$$

где Θ – функция Хевисайда; N – число точек; x_i – точка фазового пространства с координатами $h(x), h(x + \Delta x), h(x + 2\Delta x), \dots, h(x + (D - 1)\Delta x)$; $|x_i - x_j|$ – расстояние от i -й точки до j -й точки; r – заданное расстояние от точки x_i , на котором ведется подсчет точек

$$\begin{cases} \Theta = 1, & \text{если } (r - |x_i - x_j|) > 0 \\ \Theta = 0, & \text{если } (r - |x_i - x_j|) \leq 0 \end{cases}$$

На рис. 4 представлена зависимость корреляционной функции от расстояния r в 1–20-мерном пространстве по данным рис. 3. Видно, что имеются достаточно протяженные участки, на которых эта зависимость линейна в соответствии с уравнением $\ln C(r) = d_c \ln(r)$ (параметр d_c – корреляционная фрактальная размерность). Это означает, что интегральная корреляционная функция анализируемого режима является инвариантной мерой, т.е. распределение множества точек (составной системы) в псевдофазовом пространстве подчиняется фрактальным закономерностям.

Наличие фрактальной структуры подтверждается также вычислением показателя Херста H , который является статистической характеристикой структуры и определяется согласно уравнению [19]

$$R/S = (\tau/2)^H$$

Здесь R – размах (разность максимального и минимального значения измеряемого параметра),

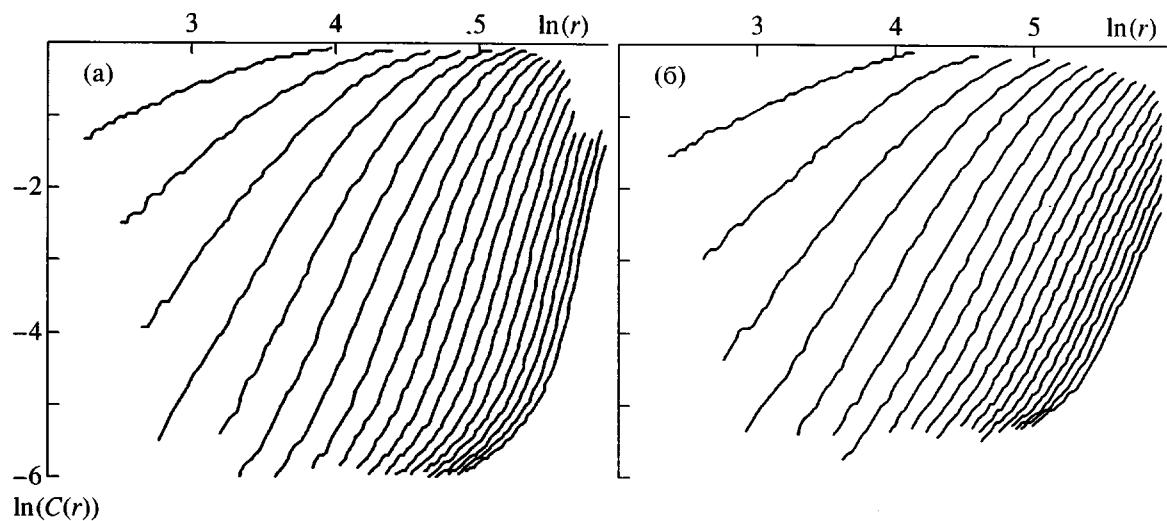


Рис. 4. Зависимости корреляционной функции $\ln C(r)$ от $\ln r$ для 1–20-мерного пространства, полученные по данным рис. 3а (а) и рис. 3б (б).

S – стандартное отклонение (корень квадратный от дисперсии), τ – временной интервал.

Значения $0.5 < H > 1$ характерны для систем с так называемым детерминированным хаосом, т.е. для систем, в которых имеется та или иная форма упорядоченности. В частности, для фрактального шума $H = 0.81 \pm 0.02$. Для случайной беспорядочной последовательности величина показателя Херста равна 0.5 [14]. Мы оценили величину показателя H для псевдофазовых портретов лигнификации клеточных оболочек (рис. 3), и она оказалась равной 0.87 ± 0.2 .

Указанные факты позволяют утверждать, что изучаемые пространственные последовательности и соответственно макроструктура лигнина вторичной клеточной оболочки характеризуется наличием внутреннего скрытого порядка, который определяется в настоящее время как фрактальный. Отсюда следует, что в процессе лигнификации клеточных оболочек происходит нелинейная самоорганизация с образованием упорядоченной структуры фрактального типа. В отличие от других, более простых вариантов самоорганизации, сопровождаемых образованием тривиальных, например, периодических структур, фрактальную структуру в природных объектах и процессах можно обнаружить и охарактеризовать лишь в фазовом пространстве, что и было показано выше.

Макроструктура лигнина клеточной стенки является материальным результатом процесса лигнификации содержит в себе информацию о динамике процесса. В связи с этим полученные данные позволяют сделать предположение о том, что временная

эволюция процесса лигнификации представляет собой устойчивое динамическое состояние, называемое хаотическим странным аттрактором, поскольку фрактальная структура – визитная карточка аттрактора указанного типа.

Определим корреляционную размерность этого аттрактора и выясним, какой размерности D должно быть пространство вложения для того, чтобы понять все топологические особенности аттрактора. Можно сказать, величина D есть размерность пространства, в котором “живет” данный аттрактор; соответственно для адекватного описания и моделирования динамики лигнификации необходимо будет составить систему из D дифференциальных уравнений.

Чтобы определить значение корреляционной размерности аттрактора d_c , мы строим псевдофазовые пространства все большей размерности и определяем размерности по линейному участку зависимости $\ln C(r) = d_c \ln(r)$ (рис. 4). Затем строим график зависимости размерности аттрактора d_c от размерности пространства вложения. Асимптотическое значение d_c представляет собой исключительную величину размерности аттрактора. На рис. 5 показана фрактальная размерность аттрактора как функция размерности пространства вложения, из которого видно, что зависимость d_c от D достаточно резко изменяет наклон, когда d_c достигает величины 3.7 ± 0.4 . Далее можно предположить, что минимальное число ключевых переменных, необходимых для моделирования динамики данного процесса, ограничивается величиной 4. Необходимо отметить, что при $D > 5$ величина d_c продол-

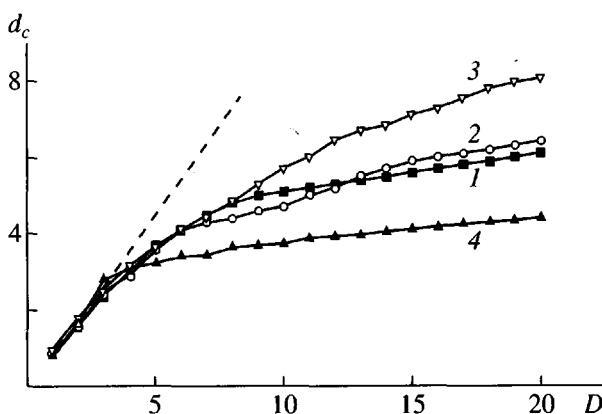


Рис. 5. Зависимости корреляционной размерности аттракторов лигнификации от размерности пространства вложения. 1–4 – зависимости для сечений 1–4 на рис. 1. Штриховая линия – зависимость для случайного процесса типа “белый шум”.

жает возрастать, а не выходит, как можно было ожидать, на плато. Не исключено, что в данном случае имеет место суперпозиция малоразмерного аттрактора лигнификации и некой шумовой компоненты, обусловленной, возможно, процедурой приготовления лигнинного скелета.

Как известно, для случайного беспорядочного процесса типа “белый шум” размерность фазовой траектории равна, в отличие от нашего случая, размерности пространства вложения (штриховая линия на рис. 5). В этом заключается коренное различие между динамикой лигнификации и случаем сигналом – шумом, поэтому эволюцию исследуемой системы можно рассматривать как проявление детерминистической динамики, обладающей аттрактором малой размерности.

Таким образом, при исследовании макроструктуры лигнина клеточных оболочек обнаружена структурная упорядоченность фрактального типа, которая указывает на то, что процесс лигнификации клеточной стенки протекает в динамическом режиме странного аттрактора с размерностью 3.7 ± 0.4 .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фенгел Д., Вегенер Г. Древесина (химия, ультраструктура, реакции). М.: Лесная пром-сть, 1994.
2. Берензон М.Ф., Богомолов Б.Д. // Химия древесины. 1977. № 1. С. 26.
3. Jayme G., Fengel D. // Holzforschung. 1961. B. 15. H. 4. S. 97.
4. Лигнины (структура, свойства и реакции) / Под ред. Сарканена К., Людвиги К. М.: Лесная пром-сть, 1975.
5. Карманов А.П., Монаков Ю.Б. // Высокомолек. соед. Б. 1996. Т. 38. № 9. С. 1631.
6. Karmanov A.P., Rakin V.I., Kusnetzov S.P., Monakov Yu.B. // VIII Int. Symp. On Wood and Pulping Chem. Helsinki, 1995. V. 2. P. 41.
7. Николис Г., Пригожин И. Познание сложного. М.: Мир, 1990.
8. Карманов А.П. Дис. ... д-ра хим. наук. Уфа: Ин-т орган. химии, 1995.
9. Давыдов В.Д., Тысячная Г.Я., Уляшева Г.Н. // Химия древесины. 1974. № 2. С. 86.
10. Tsimring L.S. // Phys. Rev. E. 1993. V. 48. № 5. P. 3446.
11. Grassberger P., Procaccia I. // Physica D. 1983. V. 9. P. 141.
12. Корзинов Л.Н., Рабинович М.И. / Изв.вузов. Прикладная нелинейная динамика. 1994. Т. 2. № 1. С. 59.
13. Moon F.C. Chaotic and Fractal Dynamics. New York; Chichester; Brisbane; Toronto; Singapore: Wiley, 1992.
14. Packard N.H., Crutchfield J.P., Farmer J.D., Shaw R.S. // Phys. Rev. Lett. 1980. V. 45. P. 712.
15. Karmanov A.P., Kuznetsov S.P., Matveev D.V. // V Eur. Symp. on Lignocellulosics and Pulp Proceedings. Aveiro, 1998. P. 149.
16. Баблоянц А. Молекулы, динамика и жизнь. М.: Мир, 1990.
17. Карманов А.П., Кузнецов С.П., Монаков Ю.Б. // Докл. РАН. 1995. Т. 342. № 2. С. 193.
18. Карманов А.П., Матвеев Д.В., Монаков Ю.Б. // Башкирский хим. журн. 1999. Т. 6. № 1. С. 35.
19. Feder J. // Fractals. New York: Plenum Press, 1988.

Characterization of Lignin from the Cell Membranes

A. P. Karmanov*, D. V. Matveev*, and Yu. B. Monakov**

* Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Sciences,
Pervomaiskaya ul. 48, Syktyvkar, 167610 Komi Republic, Russia

** Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
pr. Oktyabrya 71, Ufa, 450054 Bashkortostan, Russia

Abstract—Lignin macrostructure in the cell membranes of pine wood was investigated experimentally by transmission electron microscopy. The obtained data are used to reconstruct the lignification dynamics of wood cells. Pseudophase portraits were constructed in the spaces of various dimensions and the Heaviside correlation functions were calculated. Lignin of the secondary cell wall is demonstrated to have a fractal structure. The lignification is proposed to proceed in the dynamical mode of a strange attractor with a dimension of 3.7 ± 0.4 .