

На правах рукописи

УСМАНОВА СУРАЁ РАХМАТЖАНОВНА

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
С ЛАКТОГЛОБУЛИНАМИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

02.00.04 – физическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук



Душанбе – 2014

Работа выполнена в лаборатории «Химия высокомолекулярных соединений» Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан

**Научный
руководитель:**

Муҳидинов Зайниддин Камарович
доктор химических наук, профессор

**Официальные
оппоненты:**

Раджабов Умарали
доктор химических наук, доцент, зав.кафедрой фармацевтической и токсикологической химии Таджикского государственного медицинского университет им. Абуали ибн Сино

Хакимходжаев Сироджидин Нажмиддинович
кандидат химических наук, доцент кафедры органической и прикладной химии факультета биологии и химии Худжандского государственного университета им. академика Бабаджана Гафурова.

**Ведущая
организация:**

Таджикский национальный университет,
кафедра физической и коллоидной химии

Защита состоится: « 25 » февраля 2015 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 047.003.02 при Институте химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан по адресу: 734063 Республика Таджикистан, г. Душанбе, ул. Айни, 299/2. E-mail: gulchechra@list.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Института химии им. В.И. Никитина Академии наук Республики Таджикистан и на сайте Института химии им В.И. Никитина АН Республики Таджикистан www/chemistry.tj

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Касимова Г. Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Современная физическая и коллоидная химия дисперсных систем и поверхностных явлений объединяет огромное число процессов и закономерностей, свойственных гетерогенным – многофазным – системам. В таких системах действует комплекс относительно слабых сил, которые и определяют их физико-химические свойства. Это, в первую очередь, силы Ван-дер-Ваальса, затем водородные связи, донорно-акцепторные и гидрофобные взаимодействия. Притяжение полярных и неполярных частиц в водной среде лежит в основе мицеллообразования в растворах ПАВ, композиционной солюбилизации, адсорбции и комплексообразования между полисахаридами и белками, происходящими при формировании продуктов, необходимых для жизнедеятельности человека. Однако физическая и коллоидная химия рассматривает взаимодействие комплекса микроструктур, состоящих из молекул воды, протеинов, полисахаридов, жиров, липидов и неорганических веществ, с новой более прогрессивной точки зрения.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что взаимодействие между полисахаридами и протеинами может привести к образованию комплексов или коацерватов, которые применяются во многих областях, включая микрокапсулирование лекарств и иммобилизацию энзимов.

Основная задача при производстве таких продуктов, заключается в изучении образования комплексов с управляемым составом, структурой и физико-химическими свойствами.

Изучение взаимодействия протеина с полиэлектролитами в целом может пролить свет в понимание механизма связывания белков и природных полиэлектролитов таких, как ДНК в живых организмах и полисахаридов в растениях и пищевых продуктах.

Проведенные в этой области исследования носят разрозненный характер и не охватывают особенности комплексообразования белков молочной сыворотки, а именно лактоглобулинов, с различными пектинами. Исследования в данном направлении актуальны в связи с постоянно растущими потребностями фармацевтической промышленности в новых функциональных материалах на основе полидисперсных систем.

Цель исследования. Целью данной работы является изучение процессов комплексообразования белков молочной сыворотки с пектинами разного происхождения в водном растворе.

Задачами настоящего исследования были:

- изучение ионизационного равновесия в растворах лактоглобулинов и ПВ (пектиновые вещества), полученных из различного сырья в водном растворе и растворе электролита потенциометрическим титрованием;
- оценка важнейших физико-химических констант ионизации биополимеров (характеристическая константа ионизации и константа диссоциации) с использованием метода потенциометрического титрования и капиллярного электрофореза (КЭ);
- изучение процесса образования комплексов низкометилированных пектинов и концентрата белков молочной сыворотки (КБМС) методом потенциометрического титрования;
- количественное изучение растворимых комплексов КБМС с пектинами посредством метода КЭ;
- исследование особенностей образования нерастворимых комплексов различных ПВ с белками молочной сыворотки с использованием метода турбидиметрического титрования.

Работа проводилась в соответствии с планом НИР Института химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан «Поиск и создание новых полимерных материалов и биологически активных веществ на базе продуктов синтетического и растительного сырья» (Номер гос. регистрации 0106ТД414 от 15.03.1996 г.).

Научная новизна работы. Методом потенциометрического титрования изучено ионное равновесие в широкой области рН, ионной силы и концентрации в растворах исходных биополимеров (ПВ и КБМС) и их комплекса, определены характеристические константы диссоциации карбоксильных, амино- и имидазольных групп (pK_0) и изменения электростатической составляющей ΔpK_0 , дана оценка механизму процесса комплексообразования.

Продемонстрирована качественная картина образования комплекса между концентратом белков молочной сыворотки и НМ-пектина: при $pH > pI$ лактоглобулина взаимодействие происходит за счет отрицательного заряда сегментов цепи низкометилированного (НМ) пектина и положительно заряженных очажков молекул протеина.

Впервые методом КЭ изучен состав комплексов и установлено, что в комплексе с яблочным пектином участвуют 64,41% β -LgA, 33,52% β -Lg B, 1,57% α -La. С увеличением фракции КБМС происходит одновременное взаимодействие протеинов на поверхности комплекса друг с другом и кооперативное взаимодействие протеинов на поверхности уже сформировавшегося комплекса.

Получены нерастворимые комплексы НМ-пектина с КБМС и изучен механизм образования комплексов с использованием метода турбидиметрии. Показано, что на выход комплексов влияют СЭ пектина и его молекулярная масса.

Практическая значимость работы. Физико-химические константы могут быть использованы в справочниках по природным полимерам и в материалах на их основе, а также могут использоваться в учебниках для ВУЗов и в промышленных лабораториях. Знание по ионизации пектиновых веществ и β -лактоглобулина в зависимости от концентрации раствора и рН-среды, могут являться основой для использования пектиновых веществ и β -лактоглобулина в качестве природного полианиона при формировании новых композиционных материалов. Низкометилированные (НМ) пектины с белками образуют нерастворимые комплексы, являются уникальной природной полимерной системой для капсулирования лекарственных средств (ЛС) в дисперсной среде. Эти системы могут быть широко использованы при получении полимерных носителей лекарственных средств и терапевтических систем с адресной доставкой в определяемые участки пищеварительного тракта.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и 2 тезиса докладов.

Апробация работы. Результаты проделанной работы докладывались и обсуждались на Международной научно-практической конференции «Перспективы развития науки и образования в XXI веке» (Душанбе-2008); Международной конференции «Наноструктура в полисахаридах: формирование, структура, свойства, применение» (Ташкент-2008); 6-х Нумановских чтениях (Душанбе-2009); EPNOE 2009 «Polysaccharides as Source of Advanced Materials, Turku/Abo, Finland, Proceeding of 5th St. Petersburg Young Scientist Conferences. “Modern problem of Polymer Science” (St. Petersburg, Russia – 2009); Пятой Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2010» (Москва-2010); Республиканской научной конференции «Проблемы современной координационной химии» (Душанбе-2011); материалы Международной научной конференции «Инновационные Технологии комплексной переработки природных богатств Туркменистана», Ашгабат 19-20 Апреля 2012 г.

Вклад автора состоит в сборе литературных данных, постановке задач, подготовке и проведение экспериментальных данных, анализе полученных результатов.

Объем и структура работы. Диссертация представляет собой рукопись, объемом 100 страниц, состоит из введения и 3 глав, посвященных обзору

литературы, экспериментальной части, результатам исследований и их обсуждению, выводам. Иллюстрирована 20 рисунками, 1 схемой и 11 таблицами. Список использованной литературы включает 170 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Ионизация пектинов разного происхождения и лактоглобулинов молочной сыворотки в растворах

Пектин представляет собой гетерогенный полисахарид на основе комплекса линейных и разветвленных полимеров галактуроновой кислоты и рамнозы с боковыми ответвлениями из нейтральных полисахаридов. Основные характеристики пектиновых полисахаридов, использованные в данной работе, получены в нашей лаборатории по традиционной технологии ($T=85^{\circ}\text{C}$, 60 мин., $\text{pH } 1.8$) и представлены в табл.1.

Таблица 1

Характеристика пектинов

Пектины	ГА, %	СЭ, %	НС, %	M_w , KD	α
Яблочный (ЯП 85-60-1.8)	64.80	55.88	22.60	137.0	0.960
Апельсиновый (АП 85-60-1.8) (Цитрусовый)	77.76	70.74	17.93	257.0	0.698
Подсолнечник (ПП 85-60-1.8)	69.6	48.50	8.98	95.4	0.938

В зависимости от источника получения у пектиновых полисахаридов меняется углеводный состав: содержание галактуроновой кислоты (ГК), нейтральные сахара (НС), количество карбоксильных групп галактуроновой кислоты, как в свободной, так и в этерифицированной форме (СЭ), молекулярная масса (M_w) и конформация макромолекулы (α). Изменения структуры полисахаридов может по-разному влиять на силу меж- и внутримакромолекулярных взаимодействий заряженных групп, что приводит к изменению заряда на поверхности полииона. В связи с этим можно предполагать, что поведение пектинов в растворе, как полиэлектролитов, может проявляться в различной степени. Наиболее прямую и точную зависимость в установлении взаимосвязи структуры, функции и энергии внутримолекулярных взаимодействий в полиэлектролитах можно установить, вычислив электростатическую энергию, вызванную диссоциацией ионогенных групп в цепи. Однако в биополимерах для установления такой взаимосвязи крайне необходимо знать значение pK_a или

окислительно-восстановительного потенциала. В полиэлектролитах характеристическая pK (pK_0), экстраполированная до нулевого заряда в присутствии противоиона с определенной ионной силой раствора характеризует поведение полимера.

Потенциометрическое титрование проводилось с использованием лабораторного рН-метра (Metrohm 827 model, Germany). Растворы пектина, содержащие 3.44; 4.15; 3.67 мЭ/л соответственно, полученные из яблок (зеленые сорта, 2006, Таджикистан), апельсинов (2006, Турция) и подсолнечника (2005, Таджикистан) титровались 0.0105 н раствором NaOH при $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Для всех исследованных пектинов в точке перехода потенциометрического титрования происходит излом кривой зависимости рН от величины объема добавленной щелочи. Середина кривой появляется при одном и том же значении рН (7.0), а точки излома отличаются количеством титранта, пошедшего на ионизацию свободных карбоксильных групп, причем у пектинов апельсина, яблок и корзинок подсолнечника величина последней увеличивается и соответствует изменениям СЭ и молекулярной массы пектинов (табл.1). Исходя из этих кривых была вычислена кажущаяся константа диссоциации (pK_a), как функция степени диссоциации (α) согласно уравнению (1), при использовании коэффициента автодиссоциации α_{H^+} :

$$pK_a = pH + \log (1 - \alpha_t) / \alpha_t \quad (1),$$

при котором α_t является общей степенью диссоциации; $\alpha_t = \alpha_{H^+} + \alpha_N$, где α_{H^+} степень автодиссоциации карбоксильных групп в процессе титрования $\alpha_{H^+} = [H^+] / C_p$, (C_p - концентрация пектина, мЭ/л); α_N степень нейтрализации. В протонированной форме полимера, $\alpha_t = \alpha_{H^+}^0$, где $\alpha_{H^+}^0$ первоначальная степень ионизации кислотных групп.

Зависимость кажущейся pK_a от степени диссоциации α_t для пектинов, представленная на рис.1, была определена согласно теории Лифсон-Качальского, принимая во внимание, что:

$$pK_a = pK_0 + \Delta pK(\alpha) \quad (2),$$

$\Delta pK(\alpha)$ представляет вклад электростатических взаимодействий функциональных групп и определяется путем интегрирования площади под кривой $pK_a - f(\alpha)$. Для каждой использованной концентрации все три пектина вели себя как полиэлектролиты с низкой плотностью заряда (λ). Путем сопоставления теоретической кривой функции $\Delta pK - f(\alpha)$ и экспериментальной кривой функции $pK_a - f(\alpha)$, были найдены значения pK_0 для всех изучаемых пектинов, которые приведены в табл.2. Экспериментальные точки, соответствующие значениям $\alpha = 0.3 - 0.7$ для различных пектинов,

удовлетворительно совпадают с вычисленной кривой; несовпадение наблюдается для высоких значений α .

Рис.1. Зависимость pK_0 от степени диссоциации карбоксильной группы (α) в различных пектинах.

pK_0 для изученных пектинов, представленных в табл. 2., соответствуют значениям 3.05 - 3.34а, а для галактуроновой кислоты 3.40. Необходимо также отметить, что пектины не являются полимерами состоящими только из полигалактуроновых кислот (табл.1), распределение свободных карбоксильных групп хаотично вдоль цепи и отличается у разных пектинов.

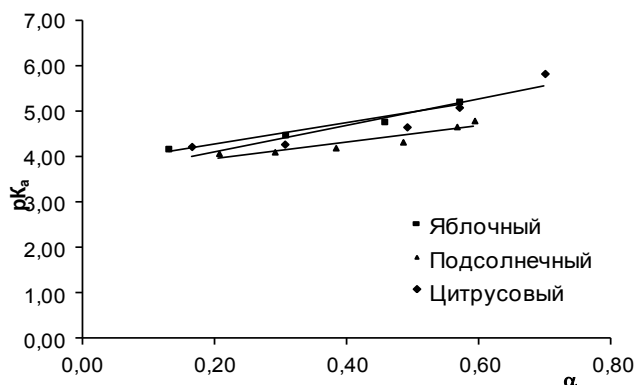


Таблица 2

Физико-химические характеристики различных пектинов

Источники пектина	Растворитель	D*, мл	Эквивалентная масса, г.моль	Qr**	pK_0	ΔpK_0
Яблоко	H ₂ O	0.55	727.0	152.63	3.78	0.44
	0,01MNaCl	0.75	533.0	208.13	3.34	
Апельсин	H ₂ O	0.35	1142.0	273.00	3.80	0.71
	0,01MNaCl	0.32	1333.0	234.00	3.09	
Подсолнечник	H ₂ O	0.68	588.0	192.10	3.28	0.23
	0,01MNaCl	0.74	540.0	209.05	3.05	

*количество 0,0369M NaOH пошедшее на нейтрализацию карбоксильных групп пектина; ** относительный заряд пектиновой цепи.

Значение pK_0 для пектинов апельсина и подсолнечника в солевом растворе близко к pK_0 мономерной галактуроновой кислоты. pK_0 пектинов не зависит от источника, концентрации, степени этерификации и молекулярной массы.

Полученные результаты в настоящей части работы с применением представленного подхода расчета pK_0 показали незначительное отличие в его значениях при использовании различных пектинов. Кроме того, из полученных данных следует, что pK_0 чувствительна к добавленному простому электролиту. Изменение электростатической составляющей ΔpK_0 для ряда пектинов -

подсолнечного, яблочного и цитрусового возрастает, соответственно с возрастанием M_w и СЭ.

Из данных потенциометрического титрования также были определены величины эквивалентного веса и плотность заряда относительно недиссоциированных карбоксильных групп пектина, используя уравнение (3), обычно применяемое для определения относительного заряда молекул протеина:

$$Qr = V_t N_t / (m/M) \quad (3),$$

где m - масса оттитрованного полимера (г), M - молекулярный вес (г.моль), N_t - концентрация титранта (моль/л), V_t - объем титранта, (мл).

Эти данные показывают, что апельсиновый пектин имеет больший заряд, чем остальные, и значение плотности заряда, найденное на единицу полииона, соответствует содержанию галактуроновых кислот в макромолекуле пектинов и их приведенной массе в ионизированной форме.

Лактоглобулины молочной сыворотки при кватернизации третичного атома азота образуют поликатионы, которые при соответствующих условиях могут образовывать полиэлектролитный комплекс с пектиновыми веществами. В связи с этим для расчета констант ионизации протеинов проводили потенциометрическое титрование карбоксильных групп и аминок групп в растворе концентрата белка молочной сыворотки (КБМС). Изучены кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп β -лактоглобулина (β -Lg) стандартного образца (Sigma), выделенного из молочной сыворотки белков сыворотки.

Для всех исследованных белков в точке перехода потенциометрического титрования наблюдается излом кривой зависимости рН от величины объема добавленной щелочи. Середина кривой появляется при одном и том же значении рН (5.2), а точки излома отличаются количеством титранта, пошедшего на ионизацию свободных карбоксильных групп. Кривые титрования карбоксильных групп, образцов β -Lg стандартного и концентрата отличились из-за примесей во втором образце, в то же время кривые титрования аминок (имидазольной) группы схожи для обоих образцов. Среди множества функциональных групп у белков только те функциональные группы ионизируются, которые находятся на поверхности, т.е. боковые карбоксильные и аминок группы, играющие важную роль в установлении нативной структуры и их поведении в растворе. Известно, что β -lg имеет 48 карбоксильных групп, находящихся в боковых частях, и две концевые группы, которые ионизируются при различных значениях рН раствора. В кислотной среде β -lg положительно заряженный, из-за электростатического отталкивания зарядов диссоциирует на

две субъединицы. Поэтому, экспериментальная кажущаяся константа ионизации -СООН β -lg отклоняется от линии, найденной для недиссоциированной молекулы. Исходя из этих кривых были вычислена кажущаяся константа диссоциации (pK_a), как функция степени диссоциации (α) согласно уравнению (1).

Зависимость кажущейся pK_a от степени диссоциации α_t для лактоглобулинов, представленная на рис. 2, которая была определена согласно уравнению (2).

Значения pK_0 найденные для всех изучаемых образцов лактоглобулинов приведены в табл. 3. Из данных потенциометрического титрования была определена величина плотности заряда относительно недиссоциированных карбоксильных групп биополимера, с использованием уравнения (3).

В результате добавления хлорида натрия к растворам лактоглобулинов происходит уменьшение значения pK_0 как для -СООН, так и для имидазольных групп, что является следствием электростатического взаимодействия фонового электролита (рис. 2, табл. 3). Ионизация кислых групп протеинов вносит большой вклад в устойчивость складчатой и развернутой пространственной структуры, чем ионизация основных групп. Действительно, как видно из данных таблицы, значения ΔpK_0 для -СООН групп в два раза больше имидазольных.

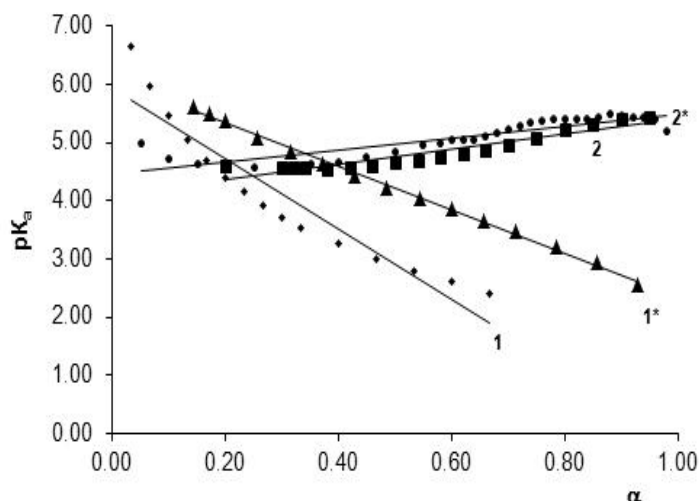


Рис.2. Зависимость pK_a от степени диссоциации α имидазольных и карбоксильных групп β -Lg: линии 1- и 1*- имидазольные группы в присутствии и отсутствии NaCl; 2- и 2*- карбоксильные группы в присутствии и отсутствии NaCl.

Согласно литературным данным, влияние фонового электролита на значение pK гистидинового остатка His-121 в присутствии соли чрезвычайно велико. В данном случае увеличение концентрации соли в растворе белков усиливает репульсивное (отталкивающее) кулоновское взаимодействие с другими основными группами. Однако в β -Lg гистидиновый остаток, который подвергается ионизации, находится на 156-м месте.

Как показали наши данные, влияние использованного фонового электролита на His-156 незначительно. Это говорит о том, что имидазольная группа у β -Lg является малодоступной к ионизации и проявляет слабую активность в процессе комплексообразования с пектинами.

Таблица 3

Величины D , Qr , pK_0 , ΔpK_0 для β -Lg

Функциональная группа протеина	Растворитель	D^* , мл	Эквивал. масса, г.моль	Qr	pK_0	ΔpK_0
β -Lg-имидазол	H ₂ O	-	-	25.7	6.07	0.15
β -Lg-имидазол	0.1NaCl	-	-	25.7	5.92	
β -Lg –COOH боковые	H ₂ O	0.72	1410	12.34	4.45	0.35
β -Lg-COOH боковые	0.1NaCl	2.85	356	48.86	4.10	
β -Lg –COOH концевые	H ₂ O				6.03	0.34
β -Lg-COOH концевые	0.1NaCl				6.37	
β -Lg-имидазол конц.	H ₂ O	-	-	25.7	7.47	-
β -Lg-COOHконц.	H ₂ O	0.44	2310	7.54	3.27	

* Количество 0.01NNaOH, пошедшее на нейтрализацию COOH

Приведенный вес и плотность заряда для образцов β -Lg были рассчитаны из объема титранта, пошедшего на нейтрализацию соответствующих групп. Изменение Qr β -Lg относительно изоэлектrolитической точки протеина было вычислено из уравнения (3) и подтверждает представленную гипотезу о характере равновесной ионизации данного полиэлектролита.

Таким образом, показано, что кривые титрования карбоксильных групп образцов β -Lg стандартного и концентрата отличаются между собой из-за небольшого содержания других белков во втором образце, в то же время кривые титрования имидазольной группы у них схожи. Из этих кривых была вычислена кажущиеся константа диссоциации (pK_a) как функция степени диссоциации (α). Численные значения pK_a для имидазольной группы β -Lg в водном растворе и в 0,1n растворе NaCl равны 6,07 и 5,92 соответственно. Зависимость величины pK_a от степени диссоциации для макромолекул лактоглобулинов показала, что все три образца вели себя как полиэлектролиты с низкой плотностью заряда.

Результаты представленного исследования могут пролить свет на процесс внутри- и межмолекулярного взаимодействия изученных пектиновых и

протеиновых полиэлектролитов и использованы для изучения их комплексообразования.

2. Нерастворимые комплексы пектиновых веществ и белков молочной сыворотки

В данной части работы изучено образование нерастворимых комплексов различных пектинов с КБМС при рН ниже изоэлектрической точки (рН 3.5) методами турбидиметрии, потенциометрии и кондуктометрии. Водный раствор пектина имел следующие характеристики: мутность 38.5 НТУ, рН 3.60, χ -193.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$. 0.25% раствор белков молочной сыворотки в ацетатном буфере: T_0 63.3 НТУ, рН 3.77, χ 3.73 mS/cm .

Таким образом, в выбранном интервале рН происходит образование нерастворимого пектин-белкового комплекса, заряд которого уменьшается по данным удельной электропроводности.

На рис. 3 представлены интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования в зависимости от объемной доли раствора пектина. Как видно из рис. 3 из интегральной кривой, мутность пектин-белкового комплекса с ростом объемной доли раствора пектина увеличивается и достигает предела. Дифференциальная кривая показывает, что скорость образования комплекса вначале увеличивается, затем падает. В точке максимума соотношение белок/пектин соответствует мольному соотношению 44:1, т.е. на 1 моль пектина приходится 44 моля лактоглобулина.



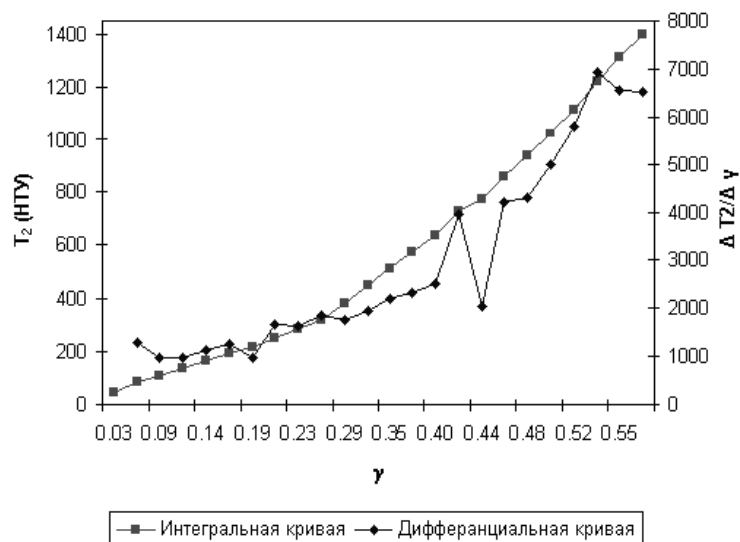
Рис. 3.
Интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования в зависимости от объемной доли раствора пектина

Методом турбидиметрии было изучено обратное титрование 0.25% раствора цитрусового пектина 0.25% раствором белков молочной сыворотки.

На рис. 4 приведены интегральная и дифференциальная кривые

турбидиметрического титрования в зависимости от объемной доли раствора белков молочной сыворотки.

Рис.4. Интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования в зависимости от объемной доли раствора белков молочной сыворотки.



Из данных интегральной кривой видно, что мутность пектин-

белкового комплекса по мере увеличения объемной доли раствора белков все время растет, не имея предела, и превышает максимальное значение мутности. Дифференциальная кривая показывает, что скорость образования комплекса все время увеличивается.

Такое поведение зависимости мутности пектин-белкового комплекса от объемной доли раствора белков вызвала необходимость исследования характера этой зависимости при взаимодействии различных соотношений растворов белков молочной сыворотки и пектина. Для решения данной задачи были приготовлены водный раствор белков молочной сыворотки и растворы пектинов, выделенных из корзинок подсолнечника, выжимок яблок, кожуры и мякоти цитрусовых.

В табл.3 приведены результаты исследования процесса комплексообразования пектинов и белков молочной сыворотки в 0.1% растворе методами турбидиметрии, потенциометрии и кондуктометрии. Как видно из табл. 3, в узком интервале рН происходит образование нерастворимых пектин-белковых комплексов, заряд которых уменьшается по данным удельной электропроводности.

На рис.5 представлены кривые зависимости мутности комплексов на основе изученных пектинов и белков молочной сыворотки в зависимости от γ .

Видно, что с ростом объемной доли раствора белков мутность плавно увеличивается, достигая предела при небольших значениях объемной доли белков (0.5) с цитрусовым пектином, а с яблочным пектином, достигая предела при $\gamma = 0.7$, уменьшается.

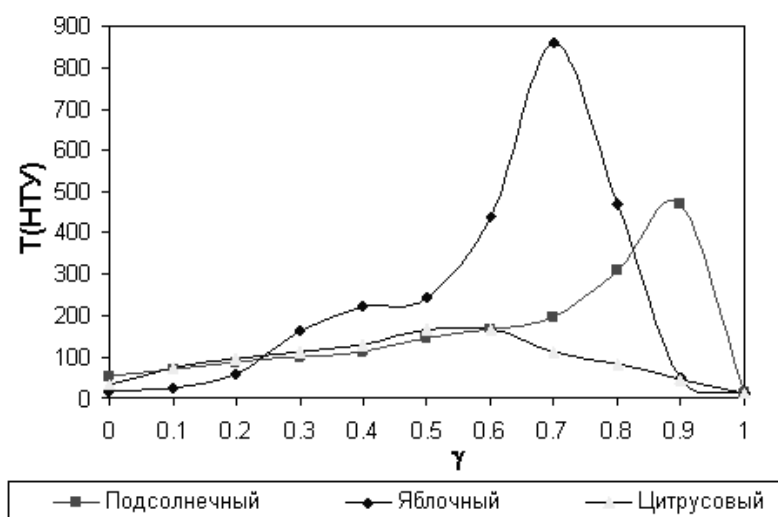
Характеристика комплексов на основе растворов подсолнечного, яблочного, цитрусового пектинов с белком молочной сыворотки

Г	Т (НТУ)			рН	χ, mS/cm		
	Подсол.	Ябл.	Цитрус.		Подсол.	Ябл.	Цитрус.
0	54.4	16.5	34.1	3.6	3.15	3.25	3.19
0.1	72.7	27	74.2	3.6	2.91	3.02	3.13
0.2	87.8	60.6	97.8	3.6	2.79	2.70	2.78
0.3	98.9	165	114.7	3.6	2.49	2.49	2.44
0.4	113.2	222	131.7	3.6	2.19	2.17	2.13
0.5	147.8	243.7	167.5	3.6	1.90	1.8	1.88
0.6	167.8	441.2	166.1	3.6	1.53	1.54	1.54
0.7	197.7	857.6	111	3.6	1.23	1.24	1.24
0.8	310.1	467.3	84.5	3.6	0.90	0.85	0.90
0.9	470.9	52	48.0	3.7	0.57	0.57	0.57
1	14.5	14.5	14.5	4.5	0.15	0.15	0.15

где $\gamma = V/(V+V_0)$ – объемная доля раствора белков

Рис. 5 Кривые зависимости мутности комплексов на основе исследованных пектинов и белков молочной сыворотки в зависимости от γ .

В случае с пектином подсолнечника выход растет до больших значений объемной доли (0.9), затем падает.



Такая закономерность хорошо согласуется со СЭ пектинов. Чем меньше СЭ, где имеется много свободных карбоксильных групп, тем больше требуется положительно заряженных белковых молекул для образования нерастворимого комплекса.

Сравнительная оценка кривых приведенных на рис. 5, показывает, что наибольшая мутность и, соответственно, выход наблюдаются у комплекса на

основе яблочного пектина. Вторым по величине мутности (выходу) является комплекс на основе подсолнечного пектина. Это указывает на то, что при близких значениях СЭ яблочного и подсолнечного пектинов мутность комплекса больше в системе пектина с высоким молекулярным весом. В данном случае у яблочного пектина M_w выше, чем у подсолнечного. Наименьшее значение мутности (выхода) отмечается у комплекса на основе цитрусового пектина, что, вероятно, связано с высокой степенью этерификации цитрусового пектина. Таким образом, процесс взаимодействия пектинов с белками молочной сыворотки, при образовании нерастворимых комплексов, связан с различием в структуре подсолнечного, яблочного и цитрусового пектинов. Кроме того, необходимо отметить, что для характеристики нерастворимых комплексов на основе пектина и различных белков, метод турбидиметрии является одним из быстрых и точных, что создает перспективу для его дальнейшего использования.

3. Исследование взаимодействия низкометилированных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки

В данной части работы обсуждается процесс образования комплексов низкометилированного пектина подсолнечника (ПВ ПП2М 85-2, ГК 68.8; СЭ 45.2; M_w 142.4) и КБМС методом потенциометрического титрования. КБМС был получен из подтворожной сыворотки методом ультрафильтрации. Состав и степень чистоты КБМС анализировали на капиллярном электрофорезе (Agilent HPCE G1600AX) с использованием компьютерной программы Agilent Chem Station Software B.02.01 SR2, представлен из: β -Lg А 37,35% ; β -Lg В 52,9%; и α -Lg 9,7%, соответственно.

С целью изучения взаимодействия сывороточного белка молока с пектином мы использовали КБМС и НМ-пектин при двух значениях рН 3.75 и 5.60 в растворе ацетатного буфера.

При кислом растворе рН (3.75), в системе протеин/пектин наблюдалось разделение фаз. Растворимая и нерастворимая фаза были разделены посредством центрифугирования при 4500g в течение 30 минут. Обе фазы были исследованы на содержание свободной фракции протеина и пектина, а также степени набухания нерастворимого комплекса. Таким образом, полученные данные приведены в таблице 4. Из данных таблицы следует, что выход нерастворимого комплекса с увеличением мольной доли протеина проходит через максимум при весовом 2:1 или мольном соотношениях КБМС/пектин 0.86.

Содержание фракции протеина и пектина в растворимых и нерастворимых комплексах и степень набухания нерастворимого комплекса

КБМС: Пектин моль/моль	Нерастворимая фаза				Растворимая фаза	
	Выход %	Фракция протеина %	Фракция пектина %	Степень набухания S_0	Фракция протеина %	Фракция пектина %
0.43	18.9	3.30	97,3	7.0	86.0	2.7
0.86	36.9	9.92	95.4	3.0	90.8	4.6
1.73	23.1	18.05	83.6	3.0	81.5	16.4
2.60	21.4	24.84	78.3	4.0	75.6	21.7

При низком соотношении КБМС/пектин комплексы имеют высокую степень набухания, с увеличением содержания протеина в комплексе степень их набухания уменьшается. При дальнейшем увеличении содержания белка, происходит увеличение фракции протеина и уменьшение фракции пектина в нерастворимой фазе, а в растворимой фазе наоборот. В нерастворимой фракции комплекса преобладают пектиновые макромолекулы (78 - 97%), растворимая фракция состоит от 75 до 90 % протеинов. Поскольку pK_0 ПП находится ниже значения исследуемого рН, то диссоциация карбоксильных групп подавляется положительно заряженными группами белков, что приводит к агрегативному разделению пектина.

Процесс формирования нерастворимых комплексов КБМС с различными пектинами методом турбидиметрии описан в предыдущей главе.

В данной части работы представлены результаты исследования растворимой части комплексов путем титрования кислых и основных групп протеина растворами щёлочи или кислоты соответственно. Растворы супернатанта после осаждения нерастворимой части титровались 0,1Н NaOH. Кривые потенциметрического титрования карбоксильных групп протеинов приведены на рис 6.

Как видно, при равном соотношении КБМС/НМПП количество титруемых групп уменьшается, а с увеличением доли белка кривые вновь смещаются в сторону увеличения и становятся близки с кривыми КБМС. В литературе было показано, что рН растворимого комплекса соответствует начальным точкам перегиба кривых титрования и обозначены рНс. Дальнейшее увеличение количества титранта приводит к фазовому разделению в системе.

При увеличении соотношения КБМС/НМПП рНс соответствовал значению

5.3 ± 0.1 , а количество титранта, необходимое для нейтрализации свободных карбоксильных групп полученных комплексов, возрастает от 1.85 мл до 2.9 мл. При pH 5.6, $pH > pI$ (изоэлектрической точки) лактоглобулинов было изучено комплексообразование КБМС с НМПП в водном растворе и в растворе, содержащем NaCl.

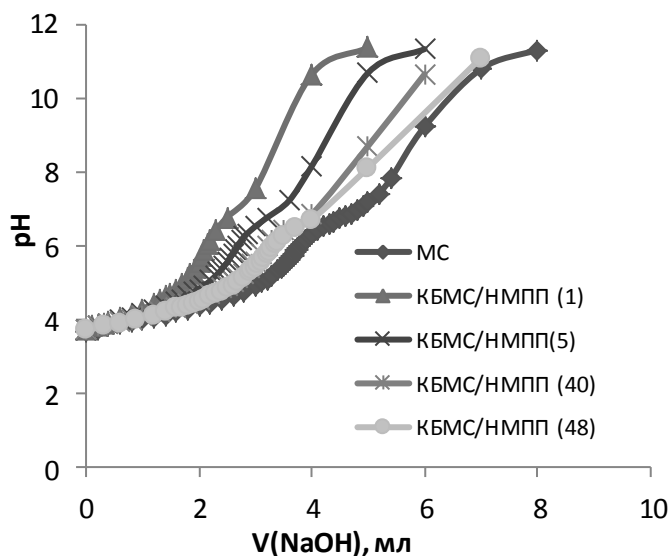
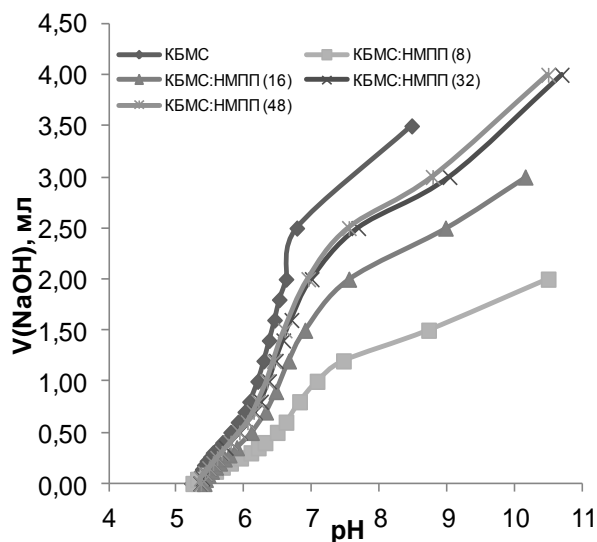


Рис.6. Кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп протеинов КБМС, β -Lg и комплексы КБМС с НМ-пектином. $pH_s = 5.3$

В дальнейшем мы проводили потенциометрическое и кондуктометрическое титрование растворимой фракции, используя раствор NaOH для кислотных и HCl для основных групп.

Рис. 7 отображает кривые титрования КБМС и КБМС/НМПП комплекса при разных соотношениях биополимеров при pH 5.6 с 0,1N NaOH без добавления электролита при ионной силе $I=0.01$ M.



Видно, что pH_s , независимо от соотношения биополимеров, находится в области pH 6.28.

Рис.7 Кривые титрования КБМС и КБМС/НМПП комплекса при разных соотношениях с 0,1N NaOH без добавления электролита при $I = 0.01$ M, $pH_s = 6.28$.

При pH 6.5 некоторые свободные карбоксильные группы пектина и протеина могли быть ионизированы или образовать комплекс, для нейтрализации которого требуется больше титранта, чем при pH 3,5. Данный факт, свидетельствует о том, что пектин и протеин в первом случае существуют в свободной форме (раствор супернатанта), а во втором случае они формируют комплекс. На нейтрализацию комплекса с низким соотношением биополимеров расходуется меньше титранта, чем при большем соотношении. Таким образом

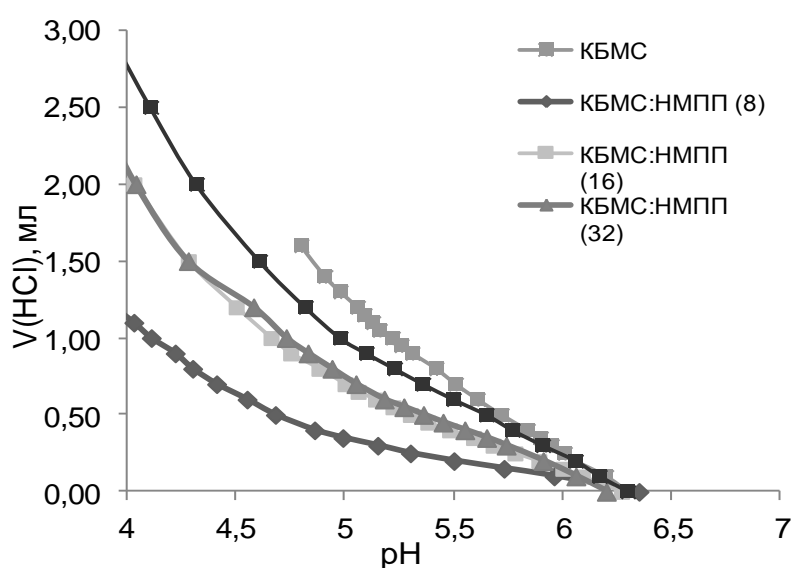
установлено, что комплексообразование между протеином и пектином проходит в 2 стадии: вначале образуется внутримолекулярный комплекс, где на молекулу пектина приходится до 8 протеина и размер комплекса сопоставим с размером молекулы пектина. На второй стадии образуется межмолекулярный комплекс (интерполиэлектролитный), через агрегацию первых.

При титровании основных (имидазольных) групп КБМС/НМПП раствором 0,1М НСІ образование комплекса не было отмечено: точка перегиба на кривой титрования (рис.8) отсутствовала.

Поэтому, для обнаружения рНс предварительно рН растворов в смеси биополимеров доводили до 7.5, затем смесь титровали раствором НСІ до рН 4.5, близкого к значению рКа пектина.

Рис. 8. Кривые титрования основных (имидазольных) групп КБМС /НМПП комплексов 0,1М НСІ.

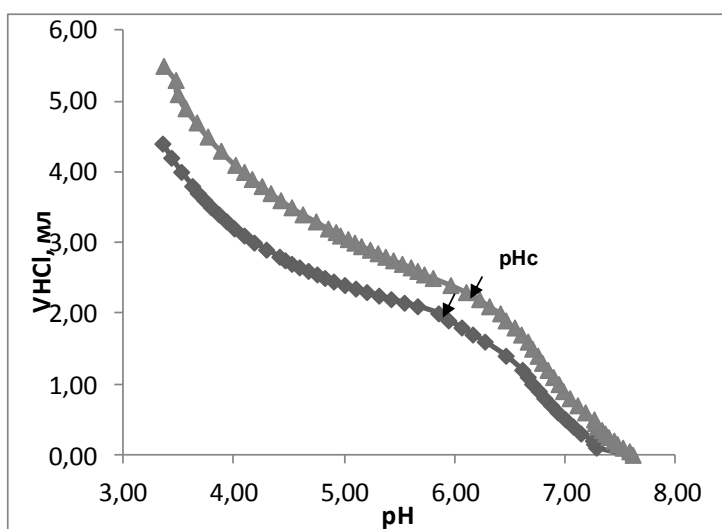
Для примера приведены кривые титрования аминогрупп (рис.9) для образцов β -Lg, КБМС и их комплексов с НМПП.



Как видно, рНс на кривых потенциометрического титрования комплекса чистого β -Lg с НМПП отличались от рНс и характера кривых титрования КБМС с пектином. Показано, что комплексообразование НМПП с β -Lg и КБМС отличается и происходит при различных рНс, хотя кривые титрования исходных белков одинаковые. Такое отличие в профилях кривых может быть связано с вовлечением альбумина и

лактоальбумина (α -La) в комплекс при использовании КБМС.

Рис. 9 Кривые титрования основных групп β -Lg, КБМС (\blacktriangle) и комплекса КБМС/НМПП 32 (\blacksquare) 0,1М НСІ.



Для того чтобы оценить роль электростатического взаимодействия и водородных связей на рНс, было изучено влияние низкомолекулярного электролита на процесс комплексообразования путем добавления 100мМ хлорида натрия к водному раствору биополимера. Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПП (32) 0,1М НСl без хлорида натрия ($I=0.07$) и с его добавлением ($I=0.17$) представлены на рис.10.

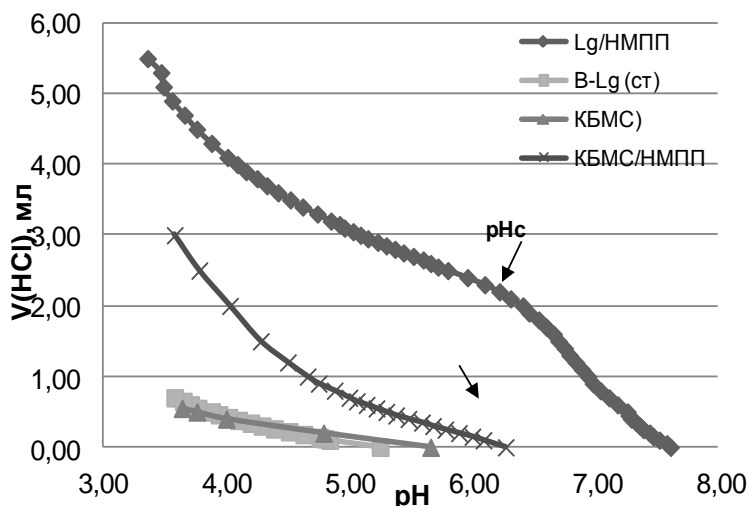


Рис. 10. Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПП (32) 0,1М НСl при $I=0.07$ (\blacktriangle); $I=0.17$ (\blacksquare).

Ионы натрия экранируют электростатическое взаимодействие между биополимерами. Добавление электролита ослабляет сдерживание H^+ ионов

комплексом, рНс уменьшается, и это означает, что ионы натрия ослабляют взаимодействие между протеином и пектином, что подтверждается изменением кажущейся рКа аминокислотных остатков протеина (рис.11) в присутствии хлорида натрия (рК₀ 8.72) и без (рК₀ 8.44) с высвобождением противоиона и воды.

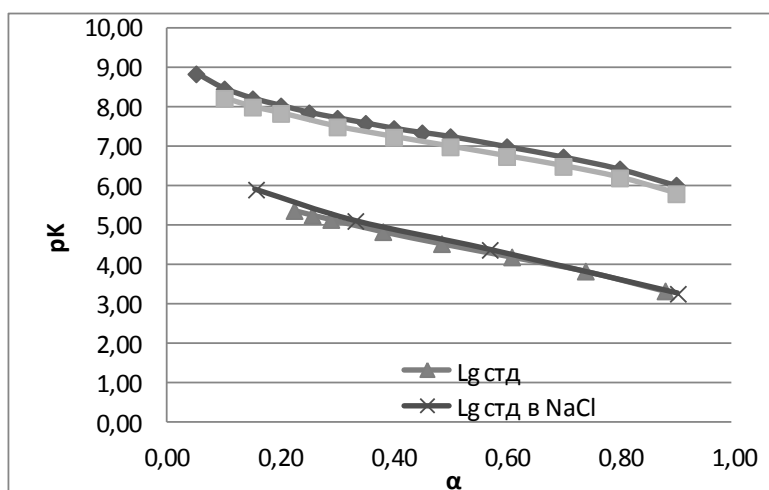


Рис. 11. Зависимость рКа от степени ионизации основных групп в комплексе КБМС/НМПП (32) с 0,1М НСl при $I=0.07$ (\blacktriangle); $I=0.17$ (\blacksquare).

Следовательно, процесс комплексообразования β -Lg с НМПП при рН 6.5 может быть обнаружен только методом потенциометрии. Поскольку суммарный заряд β -Lg

отрицательный при $pH > pI$, связывание β -Lg с НМПП при $pH > 5.6$ соответствует комплексообразованию “на неправильной стороне” pI . Электростатическое взаимодействие приводит к потере гибкости и подвижности полимерной цепи, но при этом реакция протекает за счет выигрыша энтальпии и энтропии, вызванных суммарным отрицательным зарядом биополимеров, при котором создаются

стабильные комплексы. В то же время с уменьшением pH_c до pH_f , при котором происходит фазовое разделение в системе, также образуются растворимые комплексы.

Таким образом, с использованием метода потенциометрического титрования продемонстрирован процесс образования растворимого комплекса между концентратом белков молочной сыворотки и НМ-пектина: при $pH > pI$ лактоглобулина взаимодействие происходит за счет отрицательного заряда сегментов цепи НМ-пектина и положительных зарядов локальных очажков молекул протеина. Образованию комплекса соответствует изгиб на кривых титрования (pH_c), который не зависит от соотношения биополимеров, а при повышении ионной силы происходит сдвиг pH_c , что способствует образованию стабильных комплексов.

4. Количественное изучение комплексов различных пектинов с изолированными сывороточными белками молока методами спектрофотометрии и капиллярного электрофореза

С целью количественного изучения взаимодействия КБМС с пектинами использовали метод капиллярного электрофореза (КЭ), анализируя несвязанную часть белков, прошедших через ультрафильтрационную мембрану.

В работе использовали очищенный образец сывороточных белков молока, полученный диаультрафильтрацией, так называемый изолят сывороточного белка (ИСБ), низкометилованный (НМ-) подсолнечный пектин, с содержанием ГК 66%; СЭ 47%; M_w 140 КД, высокометилованный (ВМ-) яблочный пектин: ГК 68%; СЭ 52%; M_w 130КД и ВМ-цитрусовый пектин: ГК 83%; СЭ 69%; M_w 65КД. Количественный состав ИБС, определённый разработанным нами методом, представлен 99.95% белков молочной сыворотки и состоит из 37.35% β -LgA, 52.9 β -LgB и 9.7% α -La (лактоальбумина).

Комплексное взаимодействие между ИСБ и различными пектинами проводили следующим способом: ИСБ и пектины растворяли в 5mM буферном растворе при pH 5,5. Растворы пектина были добавлены к раствору ИСБ для получения весового соотношения пектин/протеин от 1:5 до 1:30 или при молярном соотношении 1:20 - 1:300 соответственно, в ультрафильтрационной ячейке (Millipore Steril Aseptic System) с мешалкой на мембране УПМ-П (Владипор, Россия) пропускающей молекулы до 20 КД. Объем смесей был приравнен к 30 мл и pH 4,0, 5,5 и 7,0. Полученные растворы содержали 0,25% - 0,4% лактоглобулина и 0,025 - 0,125% пектина, взятые в весовых соотношениях. Пектин и его комплексы с ИСБ задерживались на мембране, в то время как несвязанные белки лактоглобулинов проходили через мембрану в фильтрат.

Количество белка в исходном растворе и фильтрате определяли методом Седмака и на КЭ на приборе 3D Agilent HPCEG 1600 AX с использованием компьютерной программы Agilent Chem Station Software B.02.01 SR2. Для разделения Lgs MC применяли кварцевый капилляр (uSIL-WAX) размером 95 см x 50 мкм и эффективной длиной 70.0 см. В качестве контроля использовали стандартные белки фирмы Sigma (β -лактоглобулин В 18,0 kDa, альбумин 66,0 kDa и α -лактоальбумин 14,0 kDa). Растворы белков готовили в 5мМ фосфатном буфере при pH 2.9 с добавлением 1М мочевины. Все растворы перед введением в капилляр электрофореза фильтровали через 0.45 мкм мембранный фильтр. В качестве ведущего электролита использовали 10мМ фосфатный буфер с pH2.9. Количество связанного белка с пектином рассчитывали по формуле:

$$A\% = ((m_{6r} - m_{6f}) / m_{6r}) * 100 \quad (4),$$

где M_{6r} - количество ИБС в исходном растворе; M_{6f} – количество ИБС в растворе фильтрата.

Величина заряда на поверхности комплекса относительно изоионной точки протеина в комплексе протеин/пектин была вычислена при модификации уравнения (3) и использовании массы протеина, пектина (M_{Lgs} и M_p) и молярной массы комплекса (M_c):

$$Qr = V_t N_t / ((m_{Lgs} + m_p) / M_c) \quad (5)$$

молярную массу комплекса (M_c) вычисляли по данным титрования:

$$M_c = (m_c * 1000) / (V_t * N_t) \quad (3),$$

V_t - объем титранта, пошедший на титрование свободных карбоксильных групп комплекса; N_t – концентрация титранта.

Принимая во внимание кооперативное связывание β -Lg с пектинами, мы проводили исследование взаимодействия в системе ИБС с тремя пектинами: НМ подсолнечным, ВМ-яблочным и ВМ-цитрусовым с высоким весовым соотношением ИБС/пектин от 1:5 до 1:28, соответственно равное молярному соотношению от 1:52 до 1:314. Все пектины показали высокую способность взаимодействовать с ИБС (А) при высоких соотношениях ИБС/пектин.

Как видно из представленных данных (табл. 5–7), характер связывания ИБС в комплекс у всех систем одинаковый: при низких соотношениях высокий, затем уменьшается и, снова возрастая, достигает максимального значения. Причем максимальное значение процента связывания в комплексе ИБС у всех пектинов одинаковое при максимальных соотношениях и равно 92%. Характер изменения относительного заряда на поверхности комплекса схож с предыдущим параметром и соответствует плотности заряда на поверхности пектина, который пропорционален СЭ пектина.

Таблица 5

Характеристика комплексов ИСБ с НМ-подсолнечным пектином при рН 5.5

М/М	м/м	m _б , мг	m _{бf} , мг	A, %	Qr	N, mols
1/52	1/5	55	14.4	73.77	0.602	38.36
1/104	1/9	110	64.5	41.26	0.372	42.91
1/209	1/18	88	42.2	52.00	0.493	108.68
1/314	1/28	132	10.2	92.20	0.890	289.51

Таблица 6

Характеристика комплексов ИСБ с ВМ-яблочным пектином при рН 5.5

М/М	м/м	m _б , мг	m _{бf} , мг	A, %	Qr	N, mols
1/41	1/4	50.7	22.3	56.0	0.448	22.96
1/55	1/8	110.0	64.5	36.4	0.323	20.02
1/166	1/16	81.0	46.6	42.5	0.400	70.55
1/250	1/24	122.0	10.2	91.6	0.879	229.00

Таблица 7

Характеристика комплексов ИСБ с ВМ-цитрусовым пектином при рН 5.5

М/М	м/м	m _б , мг	m _{бf} , мг	A, %	Qr	N, mols
1/21	1/4	52	-	100	0.802	21.00
1/42	1/8	110	33.5	67.8	0.604	28.48
1/84	1/16	83	52.7	36.6	0.345	30.74
1/126	1/25	125	10.2	91.8	0.88	115.67

Исследования показывают, что заряд с поверхности макромолекулы пектина постепенно переходит на поверхность протеина и соответствует количеству молей протеинов в комплексе (рис.14). Действительно, с увеличением фракции ИБС происходит одновременное взаимодействие протеинов на поверхности комплекса друг с другом, и в результате на поверхности интерполимерного комплекса остаются только молекулы протеина. Это указывает на кооперативное взаимодействие протеинов на поверхности уже сформированного комплекса. Кооперативный характер связывания пектинов растет в ряду ВМЦП, ВМЯП и НМПП. Однако количество связанного белка с пектином изменяется в обратном порядке.

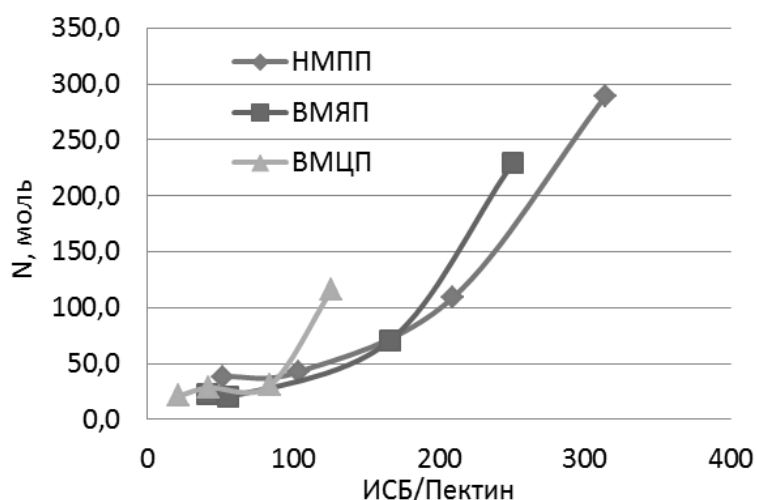


Рис. 12. Влияние соотношения ИСБ/пектин на количество связанных белков (N, моль)

Для количественной оценки и состава комплексов мы проводили анализ белкового состава в растворах фильтрата и ретентата капиллярным электрофорезом, пользуясь

покрытой капиллярной колонкой USIL-WAX (50.0 μm i.d., с общей длиной 95.0 см и эффективной длиной 70.0 см) на КЭ Agilent (США). Результаты анализа белкового состава растворов при комплексообразовании ИСБ с яблочным пектином при молярном соотношении 1:41 приведены в табл. 8.

Таблица 8

Белковый состав комплекса ИСБ с яблочным пектином при соотношении биополимеров 1:41, рН 5.5 и ионной силы 5 mM методом КЭ

Состав ИСБ	Кол-во, протеина в исх. рас мг	Кол-во свободного протеина в фильт-те, мг	%, ИСБ в комплексе	%, связанных протеинов от исходной смеси
β -Lg A	0.2661	0.0947	64.41	26.64
β -Lg B	0.3234	0.215	33.52	18.21
α -Lg	0.0587	0.0245	58.26	6.12
Всего	0.6686	0.3342		50.97

Процент связывания протеина пектином составляет 50.01%, что соответствует проценту связывания белков найденным методом Седмака (таб. 9). Состав ИСБ представлен фракциями: β -LgA 39,8%, β -Lg B 49.5%, и α -La 9.7%. Анализ данных КЭ показал, что из этого состава в комплексе с яблочным пектином участвовали 64,41% β -LgA, 33.52% β -Lg B, 58.28% α -La. Относительно низкое сродство β -LgB в комплексе по сравнению с β -LgA объясняется высокой плотностью заряда на протеине или его особенностью к конформационному изменению, которые не позволяют полимерной цепи кооперативно связываться друг с другом.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучено комплексообразование ПВ с КБМС методами потенциометрического титрования, турбидиметрии и КЭ, свидетельствующее об общности механизма комплексообразования противоположно заряженных полиионов макромолекулярных систем.

2. Изучено ионное равновесие в широкой области рН, ионной силы и концентрации в растворах исходных биополимеров (ПВ и КБМС) и их комплекса, определены характеристические константы диссоциации карбоксильных и аминок- и имидазольных групп (рК₀) и изменение электростатической составляющей ΔрК₀, дана оценка механизма процессу комплексообразования.

3. Найдены численные значения рК_а для имидазольной группы β-Lg в водном растворе и в 0,1н растворе NaCl, равные 6,07 и 5,92 соответственно. Зависимость величины рК_а от степени диссоциации для всех функциональных групп макромолекул лактоглобулинов показала, что они относятся к полиэлектrolитам с низкой плотностью заряда.

4. Получены нерастворимые комплексы НМ-пектина с КБМС и исследован механизм образования комплексов турбидиметрическим методом. Показано, что наибольшая мутность и, соответственно, выход наблюдается у комплекса на основе яблочного пектина, вторым обнаружен у подсолнечного пектина. Это указывает на то, что при близких значениях СЭ яблочного и подсолнечного пектинов, мутность комплекса больше у пектина с высоким молекулярным весом.

5. Показана применимость турбидиметрического титрования как быстрого метода характеристики нерастворимых комплексов пектина с различными белками.

6. На основе потенциометрического титрования растворимых комплексов продемонстрирована качественная картина образования комплекса между концентратом белков молочной сыворотки и НМ-пектина: при рН > рI лактоглобулина взаимодействие происходит за счет отрицательного заряда сегментов цепи НМ-пектина и положительных зарядов локальных очажков молекул протеина.

7. Впервые методом КЭ изучен состав комплексов и установлено, что в комплексе с яблочным пектином участвуют 64,41% β -LgA, 33,52% β-Lg B, 58,28% α-La, с увеличением фракции КБМС происходит одновременное взаимодействие протеинов на поверхности комплекса друг с другом, что указывает на кооперативное взаимодействие протеинов на поверхности уже сформировавшегося комплекса.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в научных журналах, определенных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации

Мухидинов, З.К. Потенциометрическое титрование β -лактоглобулина молочной сыворотки [Текст] / Мухидинов З.К., **Усманова С.Р.**, Тешаев Х.И., Шарифова З.Б., и другие. // ДАН РТ. Т.54.- 2011.- № 2.- С. 124-128.

1. **Усманова, С.Р.** Комплексы различных пектинов с белками молочной сыворотки при низких значениях рН методом турбидиметрии [Текст] / **Усманова С.Р.**, Мухидинов З.К., Каримов М.Б., Халиков Д.Х. // Вестник ТНУ. - 2011. - № 6 (70). - С. 48-54.

2. Тешаев, Х.И. Взаимодействие низкометилированных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки [Текст] / Тешаев Х.И., **Усманова С.Р.**, Шамсоро О., Джураева Ф.Н., Мухидинов З.К., Лиу Л.Ш. // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. - 2012.- №1. - С. 158-164.

Статьи, опубликованные в материалах конференций

4. Мухидинов, З.К. Биополимерные комплексы клеточных стенок растений: выделение и применение. [Текст] / Мухидинов З.К., **Усманова С.Р.**, Джонмуродов А.С., Касимова Г.Ф. и др.// В сб.: Материалы республиканской научной конференции: «Проблемы современной координационной химии». Душанбе, 13-14 января 2011 . - С. 209-210.

5. Касимова, Г.Ф., Мухидинов З.К., Усманова С.Р., Джонмуродов А.С. Биологически активные продукты из отходов производства Материалы Международной научной конференции «Инновационные Технологии комплексной переработки природных богатств Туркменистана». Ашгабат.- 19-20 Апреля 2012. - С. 343-346.

Разрешено к печати 17.12.2014 г.

Сдано в печать 19.12.2014 г.

Бумага офсетная. Формат 60 x 84 1/16.

Печать офсетная. Заказ №18. Тираж 100 экз.