

На правах рукописи

Бакулин Александр Валерьевич

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ
ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ С БЕЛКАМИ
И МЕЛАНИНАМИ**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе и бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва 2011

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биополимеры - высокомолекулярные природные соединения - являются структурной основой всех живых организмов и выполняют ключевые функции в процессах их жизнедеятельности. В настоящее время исследование и применение биополимеров, в том числе полисахаридов является одним из наиболее актуальных направлений фундаментальной и прикладной науки.

Особое место среди природных полимеров занимают хитин и его дезацетилированное производное – хитозан благодаря наличию уникальных физико-химических характеристик и биологических свойств, а также способности к биоразложению и низкой токсичности. Полисахаридная природа хитозана и присутствие реакционноспособных функциональных групп обеспечивает возможность разнообразных химических модификаций, позволяющих усиливать присущие им свойства или придавать новые в соответствии с предъявляемыми требованиями. Получение комплексов хитозана с другими биополимерами (белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и др.) также расширяет спектр его применения.

Известно, что в организмах членистоногих и базидальных грибов хитин находится в комплексе с другими биополимерами, такими как белки, гликаны, меланины. Это придает биоматериалу определенные структурно-функциональные свойства, необходимые организму для адаптации к условиям окружающей среды. Одним из малоизученных биополимеров является меланин. Характерной особенностью меланина является наличие высокостабильных парамагнитных центров, разнообразных функциональных групп, а также системы сопряженных связей в их молекулах. Эти особенности структуры определяют их фото-, радиопротекторные, антиоксидантные и другие свойства. В этой связи представляется интересным конструирование комплексов на основе хитозана и меланина, которые будут обладать свойствами, отличными от исходных биополимеров, что позволит использовать их в биотехнологии, медицине, для защиты окружающей среды и других областях.

Способность хитозана взаимодействовать с другими биополимерами с образованием комплексов может быть использована в различных областях науки и производства, например, для фракционирования белковых смесей.

В частности, в сфере производства молочных продуктов существует проблема переработки и утилизации молочной сыворотки (СМ), в виду большого содержания белка и других соединений. Несмотря на высокую пищевую ценность, белки сыворотки молока способны вызывать аллергические реакции, что особенно опасно для детей первых лет жизни. При этом наибольшими сенсibiliзирующими свойствами обладает β -лактоглобулин (β -ЛГ).

В этой связи удаление β -ЛГ из состава молочной сыворотки путем комплексообразования с хитозаном позволит осуществлять процесс производства профилактических и лечебно-профилактических смесей для детского питания в более мягких условиях, обеспечивающих сохранность пищевой ценности компонентов молочной сыворотки.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлось получение и исследование свойств комплексов хитозана и его производных с меланинами, а также разработка подхода, позволяющего избирательно удалять β -лактоглобулин из состава молочной сыворотки с помощью хитозана.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Исследовать особенности взаимодействия хитозана и его производных с меланинами;
2. Изучить физико-химические характеристики полученных хитозан-меланиновых комплексов;
3. Исследовать свойства хитозан-меланиновых комплексов;
4. Установить особенности взаимодействия хитозана и β -лактоглобулина и выбрать условия, обеспечивающие селективное извлечение β -ЛГ из смеси белков молочной сыворотки;
5. Разработать технологическую схему процесса переработки молочной сыворотки с использованием хитозана.

Научная новизна. В настоящей работе впервые рассмотрено получение комплексов хитозана и его производных с меланиновыми пигментами различного

происхождения. Определено влияние различных факторов на процесс комплексообразования. Исследованы физико-химические характеристики полученных комплексов с применением термогравиметрического, элементного анализа, а также с помощью метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Впервые описано явление самопроизвольного увеличения концентрации парамагнитных центров в структуре хитозан-меланинового комплекса с течением времени.

Изучена способность нерастворимых хитозан-меланиновых комплексов связывать из раствора радионуклиды (уран и стронций). Определены значения коэффициентов распределения, степени извлечения, а также емкость хитин/хитозан-меланиновых комплексов в виде порошка и гранулированного сорбента.

Исследованы антиокисидантные свойства водорастворимых комплексов производных хитозана и меланина. Изучена возможность комплексов ингибировать процесс разрушения ДНК фага λ продуктами пероксидазного окисления бензидина. Антигипоксические свойства комплексов были исследованы в условиях острой нормобарической гипоксии и гиперкапнии, острой гипоксической гипоксии, а также изучено влияние хитозан-меланиновых комплексов на физическую работоспособность.

В процессе работы исследованы особенности процесса комплексообразования хитозана и β -лактоглобулина, а также установлено влияние различных факторов на эффективность формирования нерастворимого хитозан-белкового комплекса. С помощью изотермической калориметрии установлены термодинамические параметры процесса комплексообразования.

На основании полученных исследований разработана технологическая схема переработки молочной сыворотки с использованием хитозана.

Практическая значимость работы. Получены сорбенты на основе хитин/хитозан-меланиновых комплексов в виде гранул и порошка, способные эффективно связывать радионуклиды из водных растворов. В связи с этим, хитин/хитозан-меланиновые комплексы могут быть рекомендованы для использования в процессах концентрирования радионуклидов из растворов при

реабилитации природных и техногенных сред, а также для мониторинга загрязнений водных объектов.

Эксперименты в условиях *in vivo*, выявили способность комплекса сульфосукциноил хитозан-меланин увеличивать выживаемость мышей в условиях недостатка кислорода, избытка углекислого газа, а также при нарушении потребления кислорода тканями. Поэтому данный комплекс может послужить основой для создания препаратов антигипоксического действия.

На основании проведенных исследований разработана и апробирована технологическая схема переработки молочной сыворотки с использованием хитозана пищевого ТУ 9289-067-00472124-03. Разработана технологическая инструкция на производство белкового продукта со сниженными аллергенными свойствами из смеси белков молочной сыворотки с помощью хитозана. Предлагаемый подход позволяет получить два функционально важных продукта: сыворотку молока со сниженными аллергенными свойствами (СМ-ГА) и β -лактоглобулин в индивидуальном виде.

Апробация работы. Основные результаты и отдельные положения работы представлены на следующих конференциях: 9th International Conference of the European Chitin Society (Italy, Venice, 2009), 15th Workshop “New aspects on chemistry and application of chitin and its derivatives” (Poland, Torun, 2009), Десятой Международной конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Нижний Новгород, 2010), XI Международной конференции молодых ученых «Пищевые технологии и биотехнологии», (Казань, 2010), Седьмых Шорыгинских чтениях (Московская обл. 2010), Научно-практической конференции «Инновационные технологии и оборудование в молочной промышленности (Воронеж 2010), 10th International Conference of the European Chitin Society EUCHIS`11 (St-Peterburg, 2011), IV Международной молодежной научной конференции «Экология-2011» (Архангельск, 2011), V Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Петрозаводск, 2011).

Работа получила премию им. П.П. Шорыгина в 2011 г. за лучшие разработки в области хитинологии, стала победителем программы «Участник Молодежного Научно-Инновационного Конкурса» («У.М.Н.И.К.») в 2010 г.

Личный вклад соискателя. Личный вклад автора заключается в проведении теоретических и экспериментальных исследований. Основные результаты работы получены лично автором при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 132 страницах машинописного текста и включают 32 рисунка и 10 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, раздела с обсуждением экспериментальных результатов, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 161 научного источника и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Основные результаты и их обсуждение

1. Исследование процесса комплексообразования хитозана и меланина

Меланины представляют собой высокомолекулярные полимеры нерегулярной структуры, относящиеся к классу конденсированных фенольных соединений. В зависимости от источника и способа получения состав пигментов является разнообразным, непостоянным, как и их молекулярная масса. В этой связи достаточно трудно дать характеристику полученных комплексов и установить механизм комплексообразования.

При добавлении 1% раствора меланина к 0,5% раствору хитозана наблюдалось образование плотного осадка. Полученный комплекс, в отличие от исходных биополимеров, не растворялся не только в водных растворах кислот и щелочей, но и в органических растворителях. Для понимания фундаментальных аспектов взаимодействия двух биополимеров было исследовано влияние на процесс комплексообразования рН среды, ионной силы раствора, молекулярной массы хитозана, и различных детергентов.

В процессе работы установлено, что в результате взаимодействия хитозана (M_n 18-500 кДа, СД 86%) и меланинов из разных источников происходит образование нерастворимого комплекса. При значении рН среды 4,5 агрегация частиц комплекса

наблюдалась быстрее и при меньших концентрациях полисахарида, чем при pH 6,2. Показано, что с ростом концентрации соли NaCl в растворе при pH 6,0 происходило увеличение количества образовавшегося комплекса, что свидетельствует о вкладе гидрофобного взаимодействия в процесс формирования комплекса.

Результаты исследований влияния различных детергентов на процесс взаимодействия хитозана и меланина показали, что присутствие в смеси как ионных (додецилсульфат натрия), так и неионных (Твин 20) детергентов сильно ингибировало образование нерастворимого комплекса.

Известно, что в структуре молекулы меланина присутствуют карбоксильные группы, аминогруппы, большое число о-хинонных, о-гидрохинонных и семихинонных групп. В этой связи возможно образование как ионных, гидрофобных, водородных так и ковалентных типов связей между хитозаном и меланином.

Следует отметить, что в случае использования частично замещенных производных хитозана с меланином образование нерастворимых комплексов не наблюдалось. Это может объясняться как уменьшением количества свободных аминогрупп в структуре молекул хитозана, так и снижением гидрофобного взаимодействия между двумя биополимерами.

В процессе работы установлено, что с ростом молекулярной массы хитозана количество связанного меланина из раствора снижается. Полученные результаты можно объяснить уменьшением количества участков связывания в молекуле хитозана из-за возникновения стерических затруднений в случае использования высокомолекулярного полисахарида.

1.2. Физико-химические характеристики хитозан-меланиновых комплексов

Полученные комплексы были охарактеризованы с использованием термогравиметрического анализа, а также метода электронного парамагнитного резонанса.

Подтверждением структурных изменений в молекулах хитозана и меланина при их комплексообразовании служат проведенные термогравиметрические исследования. Основные характеристики термического разложения образцов

хитозана (M_v 21 кДа, СД 86%), сукциноил-хитозана, меланина из трутовика плоского (*Ganoderma applanatum*) и их комплексов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Основные этапы термического разложения биополимеров и их комплексов

Вещество	Температурный интервал разложения, °С	Потеря веса, %	E_a кДж/моль
Хитозан	200-270	34,5	109
Сукциноил хитозан	25-100	10,6	91
	200-400	35,8	55
Меланин	200-350	42,2	79
	350-480	33,4	44
Нерастворимый комплекс			
Хитозан-Меланин	200-270	34,7	119
	350-480	21,8	-
Водорастворимый комплекс			
Сукциноил хитозан-Меланин	200-300	20,8	53
	300-360	17,9	26

При сравнении термограмм разложения хитозан-меланиновых комплексов с механическими смесями биополимеров, взятых в том же соотношении, обнаружен ряд существенных отличий, связанный с появлением дополнительных этапов деструкции и изменением энергетики процессов разрушения вещества.

Применение метода ЭПР позволило установить, что все исследованные хитозан-меланиновые комплексы и использованные для их получения меланины характеризуются интенсивным парамагнитным поглощением с g -фактором, равным $2,0035 \pm 0,003$ (близким к g -фактору свободного электрона), что позволяет предположить единую природу парамагнитных центров. Форма спектров была средней между лоуренцевой и гауссовой, что характерно для меланиновых пигментов. Ширина сигнала при этом составляла $\Delta H = 6,0-7,0$ Гс. Содержание парамагнитных центров в исследованных образцах комплексов и меланинов варьировало в пределах от 10^{17} до 10^{18} спин/г (рис. 1 А). Следует отметить, что количество стабильных свободных радикалов в комплексах было существенно выше, чем в механических смесях хитозана и меланина.

В процессе исследований был обнаружен факт увеличения концентрации парамагнитных центров во времени для хитозан-меланиновых комплексов в твердом

состоянии без какого-либо воздействия, в отличие от исходных биополимеров (рис. 1 Б).

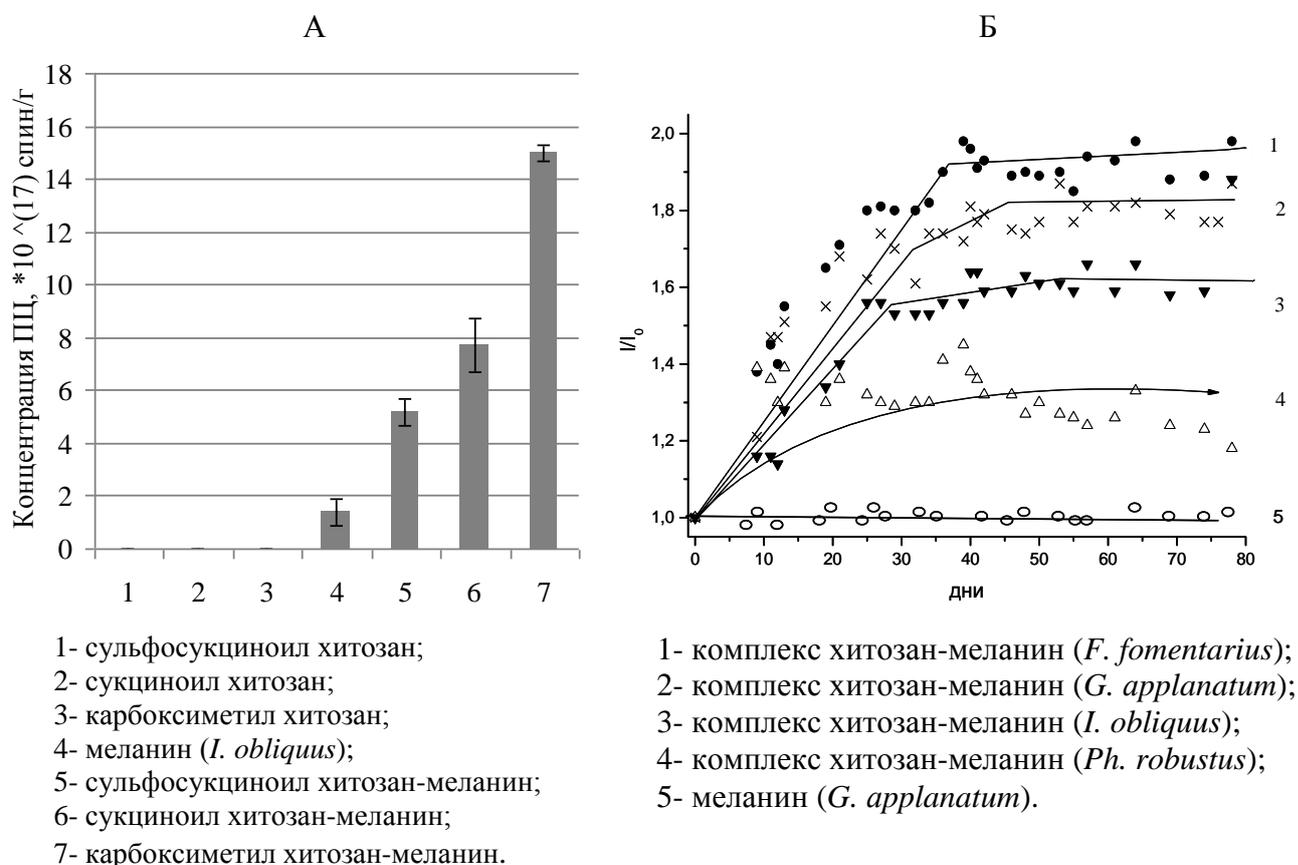


Рис. 1. (А) концентрация парамагнитных центров (ПЦ) водорастворимых комплексов и исходных биополимеров, (Б) зависимость интенсивности ЭПР-сигнала нерастворимых комплексов хитозан-меланин от времени.

Таким образом, взаимодействие хитозана и его модифицированных производных с меланинами приводит к формированию новой макроструктуры с отличительными физико-химическими характеристиками.

Ранее в литературе описана взаимосвязь биологических свойств меланина с наличием в его структуре парамагнитных центров (Britgton G. 1983, Аверьянов А.А. 1987, Щерба В.В. 2000). В этой связи увеличение концентрации ПМЦ в структуре полученных комплексов, по сравнению с исходным меланином, а также их нерастворимость открывает новые перспективы использования хитозан-меланиновых комплексов, например, для создания полупроводниковых материалов, экранов различного вида излучения, биосенсоров и т.д.

1.3. Свойства хитозан-меланиновых комплексов

1.3.1. Сорбционные свойства

Сорбционные свойства полученных нерастворимых хитозан-меланиновых комплексов и исходных биополимеров были изучены на примере связывания радионуклидов ^{233}U и ^{90}Sr из водных растворов. Для этого хитозан-меланиновые комплексы были сформированы в виде гранулированного сорбента (рис. 2).

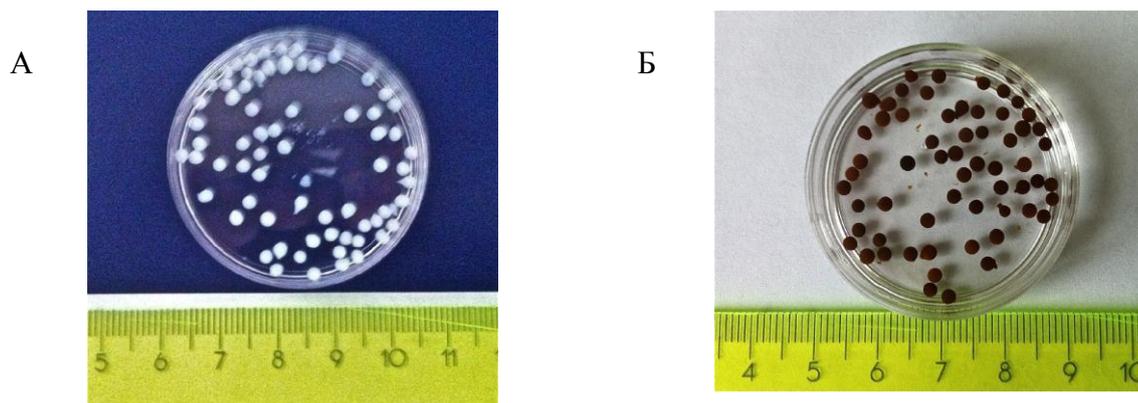


Рис. 2. А- хитозан (M_v 200 кДа, СД 86%), Б- хитозан-меланиновый комплекс в виде гранулированного сорбента

Известно, что важными показателями, характеризующими эффективность сорбции, являются коэффициенты распределения (K_d) и кинетика процесса. Определение K_d позволяет оценить потенциальную сорбционную способность вещества по отношению к тому или иному элементу, а данные по кинетике сорбции дают информацию о скорости протекания процесса. В ходе работы установлено, что сорбция ^{233}U и ^{90}Sr протекает довольно быстро, кинетическое равновесие устанавливается за 10 минут для всех исследованных образцов. В условиях равновесия определены коэффициенты распределения и степень извлечения радионуклидов из раствора для хитозана, хитозан-меланинового комплекса в виде гранулированного сорбента и порошка, а также для меланина (табл. 2). Порошкообразные хитозан-меланиновые комплексы обладали меньшей сорбционной емкостью, по сравнению с гранулированным сорбентом, что, вероятно, обусловлено меньшей удельной поверхностью частиц порошка.

Таблица 2

Сорбционные свойства биополимеров и их комплексов по отношению к ^{233}U и ^{90}Sr

Сорбент	Степень извлечения, α %		Коэффициент распределения, Кd мл/г		PCOE, a мг(^{233}U)/г
	^{233}U	^{90}Sr	^{233}U	^{90}Sr	
Хитозан (M_n 200 кДа, СД 86%)	79,6	14	390	17	-*
Меланин (<i>I. obliquus</i>)	86,3	86,2	-	-	21,5
Гранулы хитозана	63,8	19	176	24	15,9
Гранулы хитозан-меланинового комплекса	96,6	70,2	1580,9	930	50
Хитозан-меланиновый комплекс	97,5	63	3841,8	350	7,5
Хитин-меланиновый комплекс (<i>A. mellifera</i>)	98,1	86,5	5100	640	5

прим. PCOE- равновесная статическая обменная емкость, (-*) – не определялось

В работе также были исследованы сорбционные свойства природного хитин-меланинового комплекса, выделенного из кутикулы насекомых (пчела медоносная). Показано, что в условиях жесткой обработки сырья при выделении и очистке комплекса происходило разрушение меланина и, как следствие, снижение способности связывать радионуклиды из раствора, что говорит о превалирующем вкладе меланинового компонента в сорбционные свойства комплекса.

Важным преимуществом полученных сорбентов является их низкая зольность. Применение таких сорбентов позволит решать вопросы не только очистки от загрязнений водных объектов, но и компактирования отходов. Кроме того, возможность уменьшения объема может найти применение в аналитической практике при их использовании в разработке высокочувствительных методов аналитического определения радионуклидов в радиоэкологическом мониторинге.

1.3.2. Антиоксидантные свойства

Антиоксидантные свойства меланина, N-замещенных производных хитозана и их водорастворимых комплексов были исследованы с использованием амперометрического метода измерений массовой концентрации антиоксидантов в исследуемом образце, эквивалентное стандарту (галловой кислоте). Метод основан на измерении силы электрического тока, возникающего при окислении молекул антиоксиданта на поверхности рабочего электрода при потенциале 1,3 В. Результаты измерений антиоксидантной активности (АА) образцов представлены в таблице 3.

Антиоксидантная активность производных хитозана, меланина и их комплексов

№	Образец	Стандарт	pH	АА мг/г	СКО
1	Меланин (<i>I. obliquus</i>)	Галловая кислота	5,8	4,6	< 3%
2	Сульфосукциноил хитозан-меланин	Галловая кислота	5,8	4,7	< 3%
3	Сукциноил хитозан-меланин	Галловая кислота	5,8	4,9	< 3%
4	Карбоксиметил хитозан-меланин	Галловая кислота	5,8	6,7	< 3%
5	Сукциноил хитозан	Не обнаружена			
6	Сульфосукциноил хитозан	Не обнаружена			
7	N-карбоксиметил хитозан	Не обнаружена			

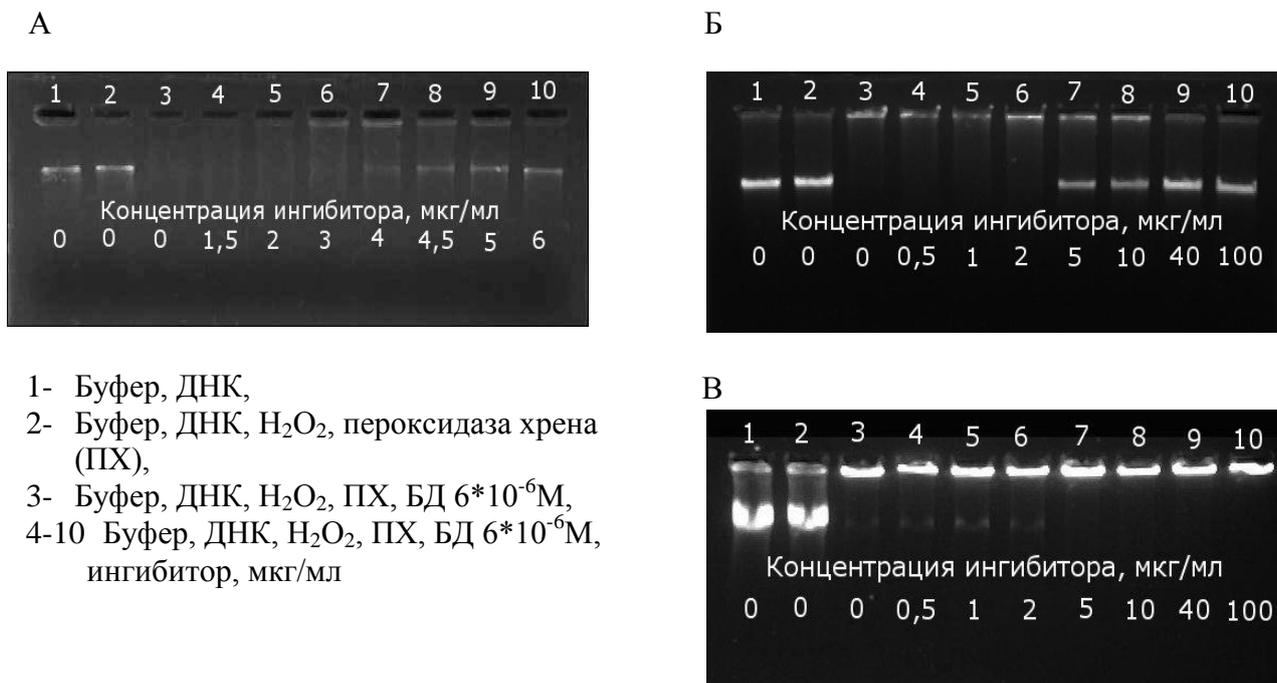
прим.: АА – общее количество антиоксидантов в одном грамме исследуемого вещества, эквивалентное количеству стандарта.

Таким образом, все полученные комплексы обладали более высокой АА, чем меланин, который является известным антиоксидантом (В.В. Щерба, 2000). Также установлено, что водорастворимые образцы хитозана не проявляли антиоксидантной активности. Полученные данные коррелируют с содержанием парамагнитных центров в комплексах (рис. 1 А). Можно предположить, что наличие в структуре комплекса стабильных радикалов определенным образом влияет на его антиоксидантные свойства.

1.3.3. Генопротекторные свойства

Большинство аминоксифенилов при их метаболической активации способны активно взаимодействовать с ДНК, вызывая в ней различные повреждения. В результате происходит образование межнитевых и перекрестных сшивок ДНК-ДНК.

В этой связи были изучены способность меланина, производных хитозана и их комплексов ингибировать процесс разрушения ДНК фага-λ продуктами пероксидазного окисления бензидина (БД). Установлено, что ДНК в результате действия продуктов БД ($6 \cdot 10^{-6} \text{M}$) перекрестно сшивается и накапливается в геле на старте (рис. 3, дорожка 3). Постепенное увеличение концентрации меланина (*I. obliquus*) (от 4,5 до 6 мкг/мл) и его комплексов с производными хитозана (от 5 до 100 мкг/мл) в реакционной среде приводило к уменьшению количества поврежденной ДНК продуктами окисления БД и восстановлению ее электрофоретической подвижности (рис.3).



- 1- Буфер, ДНК,
- 2- Буфер, ДНК, H₂O₂, пероксидаза хрена (ПХ),
- 3- Буфер, ДНК, H₂O₂, ПХ, БД 6*10⁻⁶М,
- 4-10 Буфер, ДНК, H₂O₂, ПХ, БД 6*10⁻⁶М, ингибитор, мкг/мл

Рис. 3. Влияние (А) меланина, (Б) комплекса сульфосукциноил хитозан-меланина, (В) сульфосукциноил хитозана на процесс образования шивков ДНК продуктами пероксидазного окисления БД в зависимости от концентрации ингибитора; рН 7,4, 0,1 М Трис-НСI, инкубация 1 час, t 37°C

Возможный механизм ингибирования процесса повреждения ДНК меланином и его комплексами с хитозаном заключается во взаимодействии ингибитора с радикальными продуктами окисления бензидина.

В результате исследований установлено, что наиболее выраженными генопротекторными свойствами обладал образец комплекса сульфосукциноил хитозан-меланин (рис.3 Б), наряду с самим меланином (рис.3 А) в концентрации от 5 мкг/мл. Остальные водорастворимые комплексы хитозана и меланина ингибировали повреждение ДНК в более высоких концентрациях (>40 мкг/мл). Следует отметить, что производные хитозана не только не препятствовали процессу повреждения ДНК, а наоборот, усиливали его (рис.3 В). Вероятно, это связано с образованием межмолекулярных комплексов производных хитозана с ДНК.

1.3.4. Антигипоксические свойства

Антигипоксическую активность меланина (*I. obliquus*), сульфосукциноил хитозана и их комплекса изучали на белых беспородных мышах самцах при введении исследуемых соединений за 1 час до проведения эксперимента.

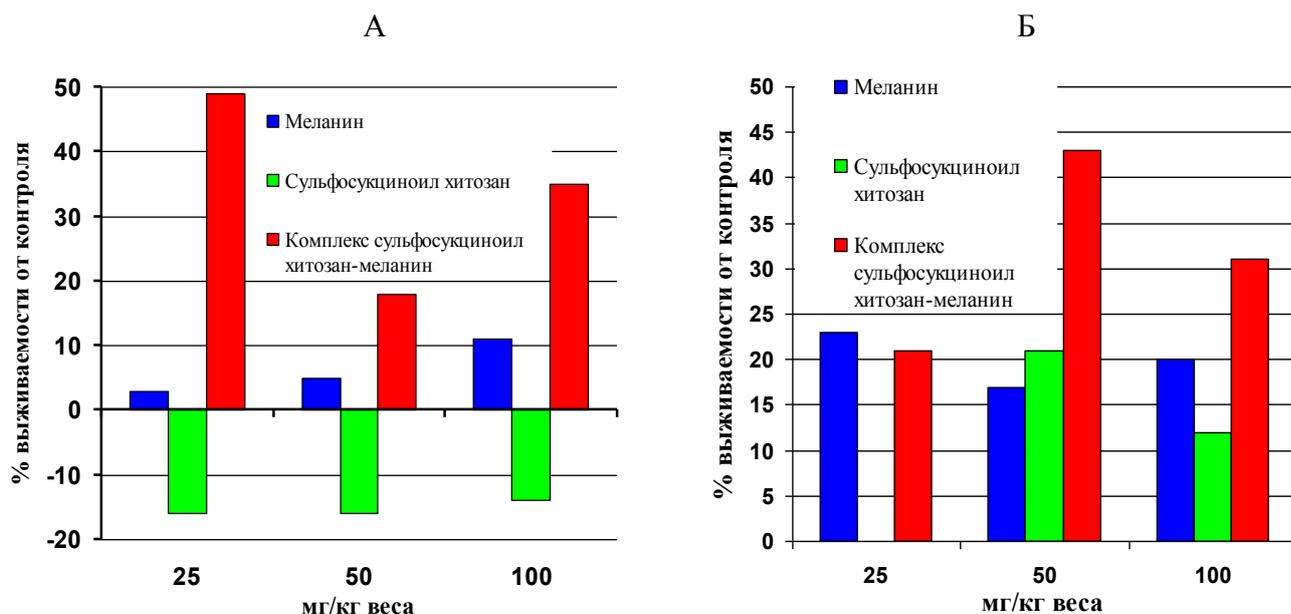


Рис. 4. Влияние введения меланина, сульфосукциноил хитозана и их комплекса на выживаемость мышей (А) в условиях недостатка кислорода и избытка CO₂ и (Б) при нарушении потребления кислорода тканями, вызванное подкожным введением раствора натрия нитропрусида в дозе 20 мг/кг (ЛД₁₀₀) по сравнению с контролем (p<0,05).

В результате эксперимента показано, что комплекс биополимеров проявлял наиболее выраженные антигипоксические свойства в выбранных условиях, в то время как сульфосукциноил хитозан снижал выживаемость мышей в условиях недостатка кислорода и избытка углекислого газа (рис.4). Следует, однако, отметить, что введение комплекса не приводило к выраженному повышению физической работоспособности в нормальных условиях. Вероятно, это обусловлено тем, что антигипоксическая активность соединений и их влияние на физическую работоспособность взаимно противоположны.

2. Использование хитозана для избирательного удаления β-лактоглобулина из состава молочной сыворотки.

В настоящее время, наряду с методами ультрафильтрации, хроматографического разделения, термообработки, высаливания, а также их сочетания, для выделения и фракционирования белков молочной сыворотки используют методы селективного соосаждения с использованием полисахаридов и их производных, а также синтетических полимеров. Главными недостатками ранее использованных полимеров являются низкая степень извлечения молочных белков и

недостаточная селективность процесса, кроме того, применение синтетических полимеров нежелательно для производства пищевых продуктов.

В этой связи представляется перспективным использование хитозана (ХТЗ) для выделения β -ЛГ из состава молочной сыворотки для получения продукта со сниженными сенсibiliзирующими свойствами.

2.1. Исследование взаимодействия хитозана с β -лактоглобулином.

На связывание β -ЛГ хитозаном могут оказывать влияние ряд факторов. Их изучение представляет интерес не только для понимания фундаментальных аспектов, лежащих в основе взаимодействия макромолекул, но и с практической точки зрения - выбора оптимальных условий для получения очищенных белковых препаратов. Такими факторами являются: концентрация и молекулярная масса полисахарида, рН и ионная сила раствора, время проведения процесса и др.

В результате добавления 0,5% раствора хитозана M_v 200 кДа к раствору β -ЛГ происходило образование опалесценции, связанное с формированием нерастворимого комплекса полисахарида с белком, достигающей максимума через 30 минут.

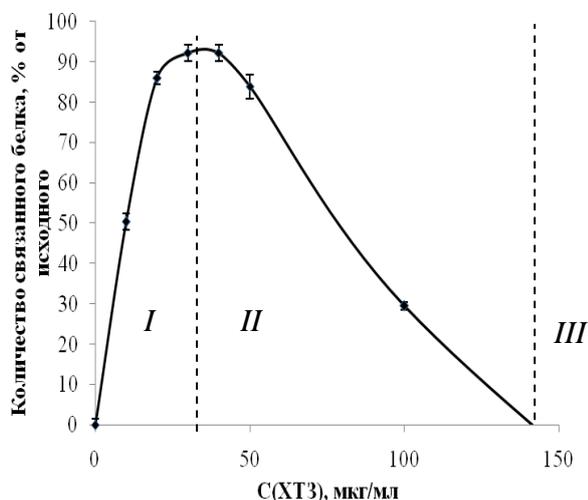


Рис. 5. Зависимость количества связанного белка (320 мкг/мл) от концентрации хитозана (M_v 200 кДа, СД 86%), рН 6,0 в 0,05М MES-NaOH буфере.

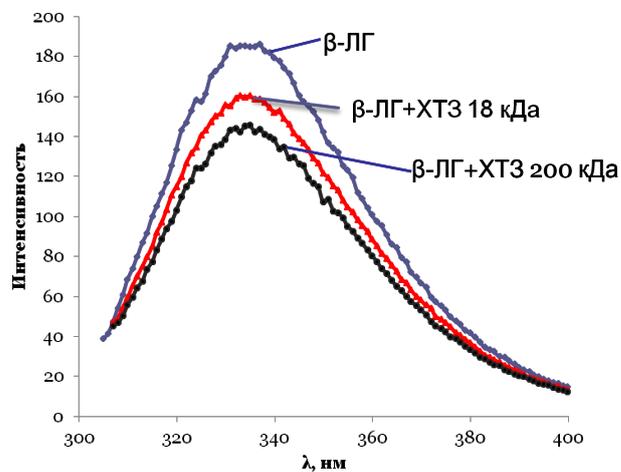


Рис. 6. Флуоресценция β -ЛГ и β -ЛГ с хитозаном, рН 6,2 в 0,05М MES-NaOH буфере. С (ХТЗ) 150 мкг/мл, С(белка) 320 мкг/мл.

Было показано, что образование нерастворимого хитозан-белкового комплекса происходило лишь при добавлении определенной концентрации полисахарида

(рис.5). В этой связи возникает вопрос, в каком виде происходит сосуществование хитозана и белка в растворе в области III (рис. 5).

Было установлено, что максимум флуоресценции белка наблюдался при длине волны 336 нм при t 24°C, рН 6,2 в 0,05M MES-NaOH буфере. При добавлении к раствору белка заданного количества хитозана (область III, рис. 5) происходило тушение флуоресценции белка (рис. 6). Это явление может объясняться межмолекулярным взаимодействием хитозана и β -ЛГ, приводящее к изменению пространственной конфигурации белка.

Методом изотермической калориметрии показано, что в области I (рис. 5) изменение энтальпии в процессе комплексообразования составило $\Delta H = -2,1$ ккал/моль в расчете на одно звено хитозана, тогда как последующее добавление хитозана в раствор белка (обл. II рис. 5) не приводило к изменению термодинамических параметров системы. Это может говорить о том, что диссоциации комплекса и образования новых типов взаимодействия не происходит.

На основании полученных данных можно предположить, что добавление хитозана к раствору β -ЛГ в концентрации выше оптимальной (1 : 10 в/в, хитозан : белок соответственно) происходит перераспределение молекул белка между цепями хитозана. При этом из-за избытка полисахарида не все функциональные группы хитозана принимают участие в образовании комплекса с белком, из-за чего способность к седиментации комплекса снижается и хитозан-белковый комплекс остается в растворе.

Другим фактором, оказывающим существенное влияние на процесс взаимодействия хитозан - β -ЛГ является молекулярная масса полисахарида. В ходе исследований было показано, что количество связанного белка из раствора увеличивалась с ростом молекулярной массы хитозана (рис. 7). Вероятно, такой эффект объясняется тем, что в случае использования хитозана с большей молекулярной массой способность к седиментации образующегося комплекса становится выше, чем при использовании низкомолекулярного полисахарида.

Размер и морфология частиц, сформированных из комплексов хитозан - β -ЛГ, были определены методом атомно-силовой микроскопии. Показано, что при взаимодействии хитозана M_v 200 кДа с β -ЛГ происходит образование

нерастворимых частиц размером 170 ± 50 нм с последующим формированием более крупных агрегатов (рис.8 А), тогда как размер частиц, полученных с использованием хитозана M_v 21 кДа, не превышает 100 нм (рис. 8 Б).

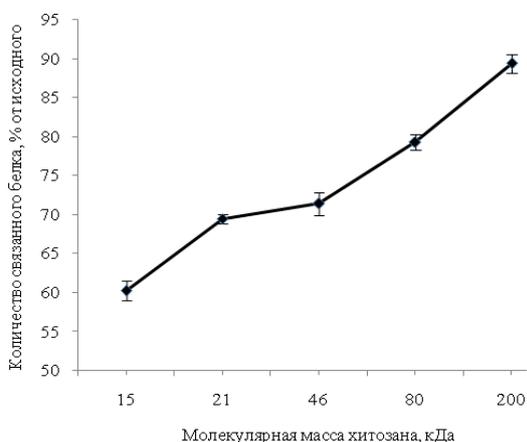


Рис.7. Эффективность связывания β -ЛГ в зависимости от молекулярной массы используемого хитозана; концентрация полисахарида 20 мкг/мл; β -лактоглобулина 200 мкг/мл; рН 6,2, буфер MES-NaOH 0,1М.

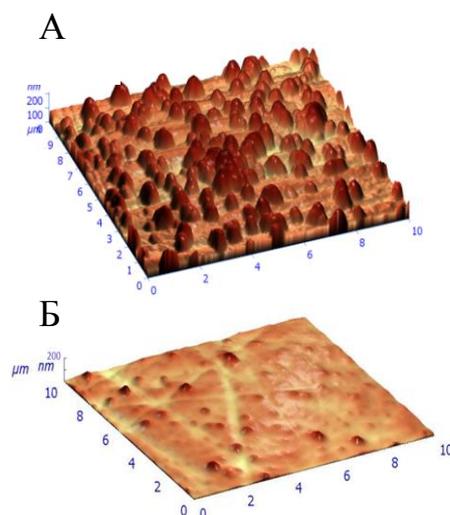


Рис. 8. Изображение частиц нерастворимого комплекса β -ЛГ с хитозаном M_v 200 кДа (А) и хитозаном M_v 21 кДа (Б), полученных с помощью атомно-силовой микроскопии

Также было установлено, что энтальпия процесса взаимодействия в пересчете на единичное звено полисахарида практически не изменяется в зависимости от молекулярной массы хитозана, что говорит об одинаковом типе связывания.

Фактор рН имеет большое значение для реализации многих межмолекулярных взаимодействий, поскольку влияет на ионизацию функциональных групп полимерных соединений. Исследование взаимодействия хитозана и β -ЛГ проводили в диапазоне рН от 5,2 до 6,2. В результате было установлено, что при рН среды 5,2 не происходило образование осадка, указывающего на формирование нерастворимого комплекса между белком и хитозаном. С ростом рН количество связанного белка хитозаном увеличивалась и достигала максимума при рН 6,2, при этом изменение энтальпии процесса наблюдалось от $\Delta H = -0,38$ ккал/моль при рН 5,5 до $\Delta H = -2,12$ ккал/моль при рН 6,2. Следует отметить, что в выбранном диапазоне хитозан находился в протонированной форме, а β -ЛГ, напротив, был заряжен отрицательно ($pI=5,2$). Полученные данные свидетельствуют о роли ионогенных

групп во взаимодействии биополимеров, однако, нельзя исключать существование и других типов связей.

Участие ионогенных групп в формировании нерастворимого комплекса хитозан - β -ЛГ удалось также подтвердить варьированием ионной силы раствора. Для этого процесс взаимодействия биополимеров был осуществлен в 0,1 М MES-NaOH буфере, pH 6,2 и концентрации NaCl от 0,01 М до 0,2 М. Показано, что наиболее эффективно хитозан связывается с белком при наименьшей ионной силе, в то время как в 0,2 М буфере образование нерастворимого комплекса не наблюдалось.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения предварительной стадии деминерализации молочной сыворотки для выделения β -ЛГ с помощью хитозана на производстве.

Таким образом установлено, что наиболее полное извлечение β -ЛГ из раствора (>90%) происходит при использовании высокомолекулярного хитозана (M_v 200 кДа, СД 86%) через 30 минут, в соотношении хитозан/белок 1/10 (в/в) соответственно, при pH среды 6,0-6,2 и минимальной ионной силе раствора. В этих условиях каждая субъединица белка связывается с 6 звеньями хитозана, при этом каждое звено имеет константу связывания с белком около $7,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H = -2,1 \text{ ккал/моль}$.

2.2 Влияние ранее выбранных параметров на селективность связывания β -ЛГ из раствора сывороточных белков.

Добавление хитозана (M_v 200 кДа, СД 86%) к 1% раствору концентрата сывороточных белков (КСБ) при pH 6,2 в 0,05 М карбонатном буфере приводило к образованию опалесценции, что связано с образованием нерастворимых хитозан-белковых комплексов. Максимальное связывание β -ЛГ (~90% от общего количества) с хитозаном наблюдалось при концентрации полисахарида в растворе, равной 0,5 мг/мл (рис.9). Однако помимо β -ЛГ происходило связывание с хитозаном и α -лактальбумина (α -ЛА) и БСА, но в значительно меньших количествах. После промывки осадка 0,05 М карбонатным буфером pH 6,0 α -ЛА и БСА удалялись из состава хитозан-белкового комплекса. Показано, что основным белком, связанным с хитозаном, является β -ЛГ (рис. 10).

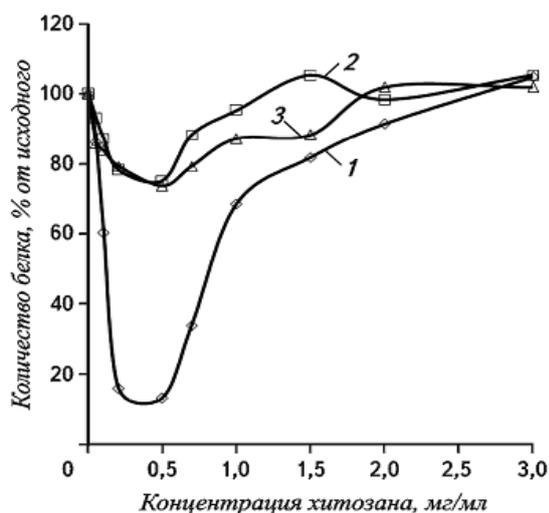


Рис. 9. Зависимость относительного содержания сывороточных белков в супернатанте от содержания хитозана в реакционной смеси: 1- β-ЛГ; 2- БСА; 3- α-ЛА

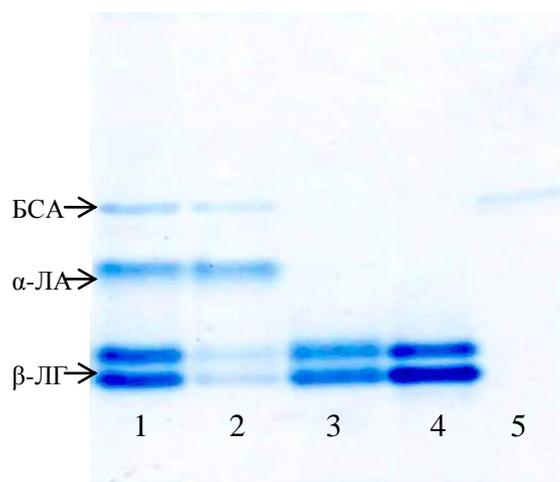


Рис. 10. Электрофореграмма раствора КСБ до и после обработки хитозаном: 1- КСБ (контроль); 2- КСБ после обработки хитозаном; 3- белок после разрушения нерастворимого комплекса; 4- стандарт β-ЛГ (Sigma); 5- стандарт БСА (Sigma).

Также было установлено, что, несмотря на различную эффективность образования нерастворимого хитозан-белкового комплекса, селективность связывания с β-ЛГ сохраняется при различных значениях молекулярной массы хитозана.

Таким образом, ранее выбранные условия позволяют обеспечить селективное выделение до 95% β-лактоглобулина из смеси белков сыворотки молока с помощью хитозана.

2.3 Использование хитозана для выделения β-лактоглобулина из молочной сыворотки.

Основными компонентами сухого вещества молочной сыворотки являются: лактоза, белки, жир, а также минеральная составляющая. Известно, что в определенных пределах соотношение компонентов, рН и другие характеристики молочной сыворотки могут варьировать. Также не исключено наличие белок-белковых агрегатов и других межмолекулярных взаимодействий. Все это может непосредственно влиять на эффективность селективного извлечения главного аллергена из состава молочной сыворотки.

Добавление полисахарида в частично деминерализованную молочную сыворотку приводило к образованию нерастворимых агрегатов. Однако полного

извлечения β -ЛГ из состава молочной сыворотки добиться не удалось во всем диапазоне выбранных концентраций (рис. 11 А)

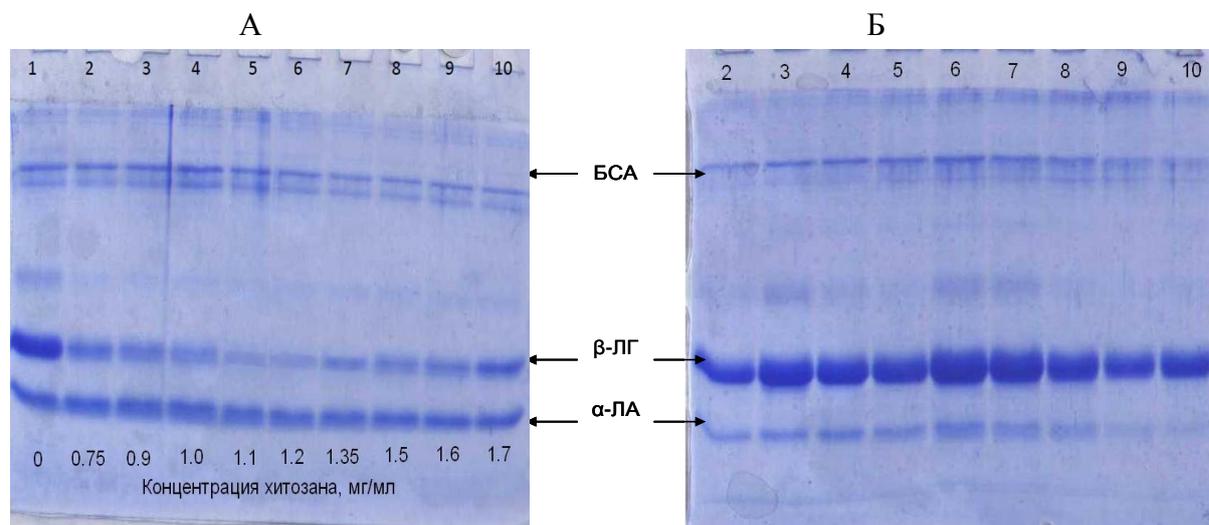


Рис. 11. Электрофореграмма (А) сыворотки молока после обработки хитозаном в разной концентрации и (Б) белков, связанных хитозаном соответственно.

В данном случае максимальное извлечение β -лактоглобулина из состава молочной сыворотки наблюдалось при концентрации хитозана 1,2 мг/мл (5:8 хитозан/белок, в/в), что существенно превышает значения, определенные для выделения β -ЛГ из раствора КСБ (1:8, в/в). Селективность процесса при этом также нарушалась (рис.11 Б). Эти затруднения могут быть обусловлены высоким содержанием солей в составе исходной сыворотки (содержание золы 7,3% против 2,1% в составе КСБ), что выдвигает дополнительные требования к процессу деминерализации сырья.

На основании проведенных исследований разработана технологическая схема переработки КСБ и молочной сыворотки с использованием хитозана (рис. 12). Данная схема была апробирована на предприятии ЗАО «Биопрогресс» и разработана технологическая инструкция на производство белкового продукта со сниженными аллергенными свойствами из смеси белков молочной сыворотки с помощью хитозана пищевого ТУ 9289-067-00472124-03. Использование данной схемы позволит селективно выделять главный аллерген из состава молочной сыворотки (либо КСБ, СДС) и в результате получать два функционально важных продукта: молочную сыворотку со сниженным аллергенным потенциалом (СМ-ГА) и β -лактоглобулин в индивидуальном виде, который может в дальнейшем

использоваться в пищевой промышленности (пенообразователь, эмульгатор). Также данная схема переработки предусматривает многократное использование хитозана после регенерации.

Предлагаемый подход может быть реализован на предприятиях пищевой промышленности без использования специализированного оборудования, больших временных и энергетических затрат.

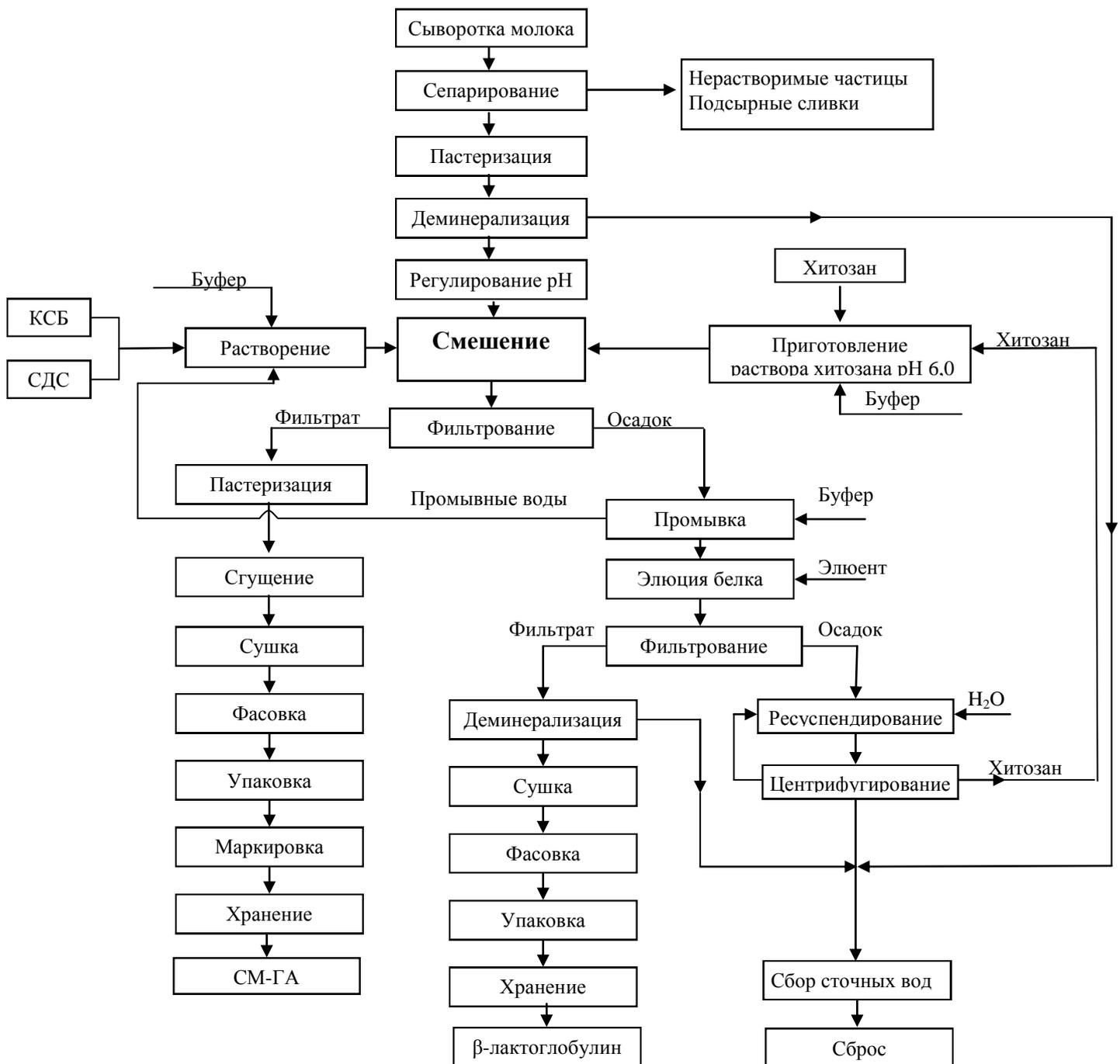


Рис. 12. Технологическая схема переработки молочной сыворотки с использованием хитозана, где СДС- сухая деминерализованная сыворотка, КСБ-концентрат сывороточных белков

ВЫВОДЫ

1. Исследован процесс взаимодействия хитозана с меланинами, приводящий к образованию стабильных комплексов.
2. Обнаружено увеличение концентрации парамагнитных центров на 90% в структуре хитозан-меланиновых комплексов в течение трех месяцев.
3. Показано, что хитозан-меланиновые комплексы способны связывать ^{233}U на 98% и ^{90}Sr на 70% из водных растворов.
4. Изучены антиоксидантные, генопротекторные и антигипоксические свойства водорастворимых хитозан-меланиновых комплексов.
5. Показана селективность извлечения β -лактоглобулина на 90% из раствора сывороточных белков с помощью хитозана.
6. Разработана и апробирована технологическая схема переработки молочной сыворотки (КСБ) с использованием хитозана.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Бакулин А.В.**, Гавриленко Н.В., Червяковский Е.М., Курченко В.П., Варламов В.П. Использование хитозана для выделения β -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки // Биотехнология. 2011. №1. С. 34-41.
2. **Бакулин А.В.**, Гавриленко Н.В., Червяковский Е.М., Курченко В.П., Варламов В.П. Использование хитозана ракообразных в технологии переработки молочной сыворотки // Рыбпром. 2010. № 4. С. 64-67.
3. **Бакулин А.В.**, Велешко И.Е., Румянцева Е.В., Левов А.Н., Бурмистрова Л.А., Хисматуллин Р.Г., Курченко В.П., Варламов В.П., Кривцов Н.И. Получение хитин-меланиновых комплексов из *Apis mellifera* и изучение возможности их использования в качестве сорбентов радионуклидов // Доклады РАСХН. 2011. №5. С. 48-51.

Публикации в других изданиях и материалах конференций:

1. **Bakulin A.**, Kurченко V., Gavrilenko N., Halavach T., Cherviakovsky E. Interaction of chitosan with whey proteins // New aspects on chemistry and application of chitin and its derivaties: Proc. 15th Workshop. Torun, Poland, 2009. P.1.

2. **Бакулин А. В.**, Гавриленко Н.В., Червяковский Е. М., Курченко В.П. Эффективность связывания белков молочной сыворотки с хитозаном // Труды Белорусского государственного университета. 2009. Т. 4, Ч. 2. С. 283-289.
3. **Бакулин А. В.**, Курченко В.П., Сушинская Н.В., Азарко И.И., Варламов В.П. Физико-химические характеристики хитозан-меланиновых комплексов // Труды Белорусского государственного университета. 2009. Т. 4, Ч. 2. С. 290-297.
4. Azarko I.I., **Bakulin A.V.**, Kozlova E.I., Kurchenko V.P., Ajayeva L.V. Paramagnetic properties of melanin pigments and their compounds with chitozan // Proc. 6 Int. conf. NEET. Zakopane, Poland, 2009. P.101.
5. Гавриленко Н.В., **Бакулин А.В.**, Хамашкеева М.Т., Курченко В.П., Варламов В.П. Некоторые особенности получения хитозан-меланиновых комплексов // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. X Международной конф. Нижний Новгород, 2010. С. 90-94.
6. **Бакулин А.В.**, Гавриленко Н.В., Курченко В.П., Варламов В.П. Взаимодействие хитозана с белками сыворотки молока // Пищевые технологии и биотехнологии: Мат. XI Международной конф. молодых ученых. Казань, 2010. С.155
7. Azarko I.I., **Bakulin A.V.**, Kozlova E.I., Kurchenko V.P., Ajayeva L.V. Melanin complexes as a radiation bioprotector // Proc. VIII Int. conf. ION. Kazimierz Dolny, Poland, 2010. P.118.
8. Велешко И.Е., Румянцева Е.В., Велешко А.Н., Гальбрайт Л.С., **Бакулин А.В.** Роль меланина в процессах взаимодействия с радионуклеидами в растворах // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Мат. X Международной конф. Нижний Новгород, 2010. С. 86-90.
9. Алиева Л.Р., **Бакулин А.В.**, Варламов В.П., Гавриленко Н.В., Червяковский Е.М., Курченко В.П. Особенности взаимодействия хитозанов с белками молочной сыворотки // Инновационные технологии и оборудование в молочной промышленности: Мат. научно-практической конф. Воронеж, 2010. С. 145.
10. **Bakulin A. V.**, Kurchenko V.P., Veleshko I.E., Rumyantseva E.V., Varlamov V.P. Construction of chitosan-melanin complexes and investigation of their properties// Proc. 10th Int. Conf. of the European Chitin Society EUCHIS`11. St-Peterburg, 2011. P. 19.

- 11.** Khismatoullin R. G. , **Bakulin A. V.**, Levov A.N. , Veleshko I.E., Rummyantseva E.V., Krivtsov N. I., Varlamov V.P. *Apis mellifera* as a perspective source of chitin and chitin-melanin complexes // Proc. 10th Int. Conf. of the European Chitin Society EUCHIS`11. St-Peterburg, 2011. P. 86.
- 12.** **Бакулин А.В.**, Велешко И.Е., Румянцева Е.В., Курченко В.П., Варламов В.П. Изучение взаимодействия хитин-меланиновых комплексов с радионуклидами в растворе // Экология-2011: Мат. IV Международной молодежной научной конф. Архангельск, 2011. С. 84.
- 13.** **Бакулин А.В.**, Гавриленко Н.В., Червяковский Е.М., Курченко В.П., Варламов В.П. Использование хитозана для выделения β -лактоглобулина из смеси белков сыворотки молока // Белки и пептиды: Мат. V Российского симпозиума. Петрозаводск, 2011. С. 267.