

Академия наук Республики Таджикистан

Институт химии им. В.И. Никитина

На правах рукописи

УСМАНОВА СУРАЁ РАХМАТЖАНОВНА

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ПЕКТИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
С ЛАКТОГЛОБУЛИНАМИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

02.00.04 – физическая химия

*Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук*

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Муҳидинов З. К.

Душанбе – 2014

О Г Л А В Л Е Н И Е

В В Е Д Е Н И Е	4
ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	8
1.1 Пектиновые полисахариды и их комплексы с белками	8
1.1.1. Полиэлектrolитические свойства пектиновых полисахаридов	10
1.1.2. Лактоглобулины из молочной сыворотки, их получение и характеристика	13
1.2. Получение и свойства макромолекулярных комплексов	14
1.2.1. Взаимодействие протеин - полисахарид в водном растворе	15
1.2.2. Комплексы протеин-полисахарид в гелях на поверхности раздела фаз - эмульсий	20
1.2.3. Взаимодействие белков с пектиновыми полисахаридами	22
ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	30
2.1. Характеристика исходных веществ	30
2.2. Выделение пектина из растительного сырья	30
2.3. Очистка пектиновых образцов	31
2.3.1. Очистка пектиновых веществ	31
2.3.2. Приготовление раствора пектинов	32
2.4. Количественные методы анализа пектиновых полисахаридов	32
2.4.1. Модифицированный титриметрический метод	32
2.4.2. Фотометрическое определение метоксильных групп	33
2.4.3. Метод определения уроновых кислот с помощью мета - гидрокси дифенильного метода	34
2.4.4. Молекулярный вес пектина	35
2.5. Количественные методы анализа β - лактоглобулина из молочной сыворотки	36

2.5.1. Выделение β - лактоглобулина из молочной сыворотки	36
2.5.2. Определение белка по методу Седмака	37
2.5.3. Определение белков методом капиллярного электрофореза	37
2.6. Методика разделения белков молочной сыворотки на гель-электрофорезе	38
2.7. Методика разделения белков молочной сыворотки на капиллярном электрофорезе	39
2.8. Приготовление исходных растворов	39
2.8.1. Приготовление раствора сывороточного белка β - лактоглобулина (β - LgC).	39
2.9. Приготовление буферных растворов	40
2.10. Потенциометрическое титрование	40
2.11. Турбидиметрическое титрование	41
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	42
3.1. Ионизационная равновесия в растворах пектинов разного происхождения и лактоглобулина молочной сыворотки	42
3.2. Нерастворимые комплексы пектиновых веществ и белков молочной сыворотки	54
3.3. Исследование взаимодействия низкометилованных НМ - пектинов с концентратом белков молочной сыворотки	63
3.4. Количественное изучение комплекса различных пектинов с изолированными сывороточными белками молока методами спектрофотометрии и капиллярного электрофореза	73
ВЫВОДЫ	80
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	82
ЛИТЕРАТУРА	83

ВВЕДЕНИЕ

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 осветить 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 методом;
- оценка важнейших физико-химических констант ионизации биополимеров (характеристическая константа ионизации и константа диссоциации) с использованием метода потенциометрического титрования и капиллярного электрофореза (КЭ);
- исследование особенностей образования нерастворимых комплексов различных ПВ с белками молочной сыворотки с использованием метода турбидиметрического титрования.
- 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;

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 концентраций в растворах исходных биополимеров (ПВ и КБМС) и их комплексов, 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 низкометилованного (НМ) пектина и положительно заряженных очажков молекул протеина.

Впервые методом капиллярного электрофореза изучен состав комплексов и установлено, что в комплексе с яблочным пектином участвуют 64.41 % β -LgA, 33.52 % β -LgB, 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 сформированного 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. Рассчитанные 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 промышленных лабораториях. Знание по ионизации пектиновых веществ и β -лактоглобулина в зависимости от концентрации раствора и pH - среды, могут являться основой для использования пектиновых веществ и β -лактоглобулина в качестве природного полианиона при формировании новых композиционных материалов. Низкометилованные (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 в рецензируемых журналах, которые входят в перечень ВАК РФ и 2 тезиса докладов международных конференций.

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 проведении экспериментальных данных, анализе полученных результатов, подготовке научных статей

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. Работа иллюстрирована 20 рисунками, 1 схемой и 11 таблицами. Список использованной литературы включает 170 наименований.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Пектиновые полисахариды и их комплексы с белками

В состав биологических систем (в организации живых клеток), пищевых и фармацевтических продуктах нового поколения входят полисахарид-протеиновые комплексы, и они образуют основу для получения функциональной пищи [1, 2]. В связи с этим, изучение и понимание механизмов, существующих в данных системах, открывает новый путь к созданию многочисленных и весьма полезных продуктов для человечества.

При производстве таких продуктов, основная задача физико-химических исследований заключается в разработке путей получения полисахаридно-протеиновых комплексов (однофазных и двухфазных) с заданным и регулируемым составом и физико-химическими свойствами (структурой, механическими и др.). Известно, что согласно современным представлениям полисахариды и белки, как основные биополимеры клеточной стенки растений участвуют в обеспечении узнавания и взаимодействия клеток, рецепторных свойств, а также защиты от инфекций.

В настоящее время имеются значимые достижения в установлении строения, физико-химических и биологических характеристик этих биополимеров. Также имеются вопросы, которые нужно решить для целенаправленного использования широкого класса природных полимеров как многофункциональной пищи для нужд человечества [3].

Пектиновые полисахариды (ПП) являются сложными по структуре и формированию клеточной стенки (КС) растений, включающие различные полимерные цепи из гомогалактуронана (HG), рамногалактуронана 1 (RG I), рамногалактуронана 2 (RG II), арабиногалактанов (AG), арабинана (AR) и других полисахаридов, связанных между собой и с другими полимерами клеточных стенок растений. ПП играют важную роль в росте и развитии растений, морфогенезе, защите и адгезии клеток, связывании ионов, гидратации и развитии плода [4, 5]. После их выделения из клеточной стенки, они становятся

незаменимым продуктом в жизнедеятельности человека. ПП можно представить в виде щеток, включающих коллекцию многообразных стилей, образованных из ворсинок, вовлеченных в формирование средней пластики клеточных стенок растений [6]. Природная разновидность этих стилей создает многообразие структур и свойств полисахаридов после их экстракции из растений. До недавнего времени было принято, что HG и RG цепи составляют основную цепь ПП (рис. 1.1.1 А). В настоящее время предложена альтернативная структура ПП, в которой HG представлена как длинная боковая цепь RGI (рис. 1.1.1 В) [6].

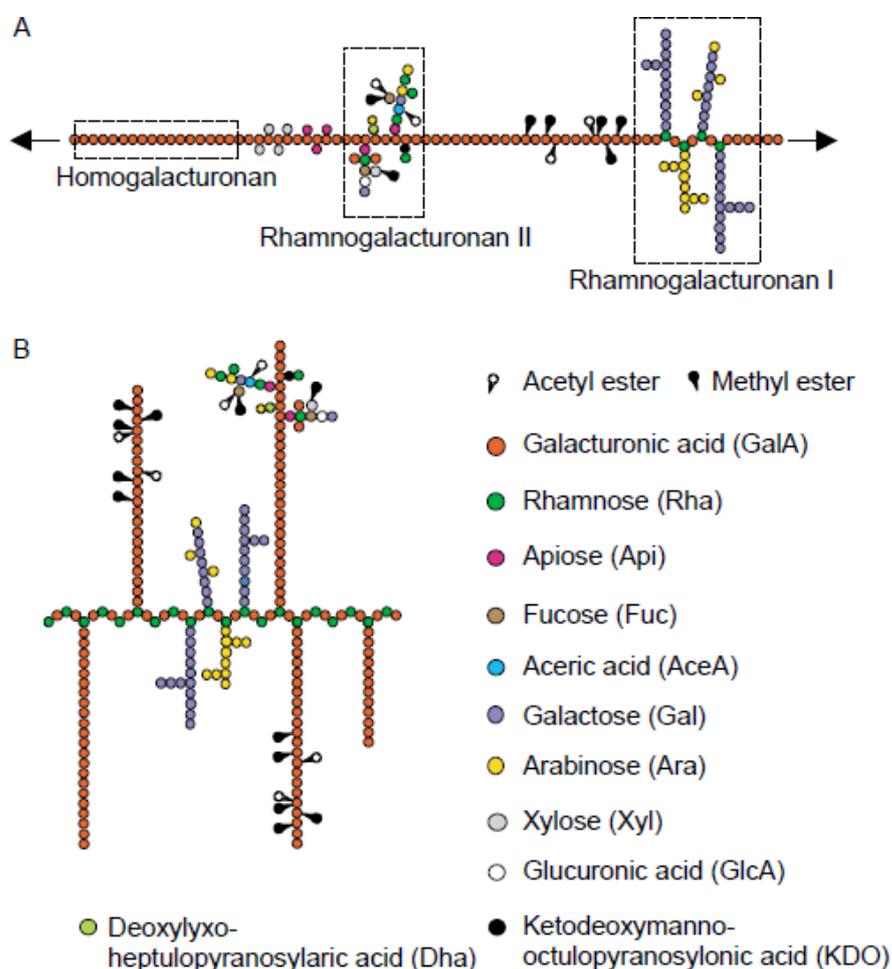


Рисунок 1.1.1. Предполагаемая (А) схематическая структура пектиновых полисахаридов, связанных между собой: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан I (RG-I) и рамногалактуронан II (RG-II) и альтернативная (В).

Исследования авторов [7-9] с использованием высокочувствительных изображений на уровне атомов, методами атомно-силовой микроскопии показали, что экстрагированные ПП в растворе находятся в виде агрегированных молекул даже в разбавленных растворах. В некоторых источниках они находятся в виде пектин-протеиновых комплексов, что уменьшает степень их агрегации [9].

Пектиновые полисахариды, в основном, получают из фруктовых выжимок, корзинок подсолнечника и свекловичного жома. Наибольшее количество пектина находится в кожуре, ламелях и сердцевине фруктов. Пектиновые вещества, полученные из различных растительных источников, отличаются по молекулярной массе, структуре и молекулярно-массовым распределением [10-12].

1.1.1. Полиэлектrolитические свойства пектиновых полисахаридов

Полиэлектrolитические свойства проявляются наличием свободных карбоксильных групп. ПП состоит в основном из полигалактуроновой кислоты, соединенных 1 - 4 связями (схема 1.1.1.1) [13].

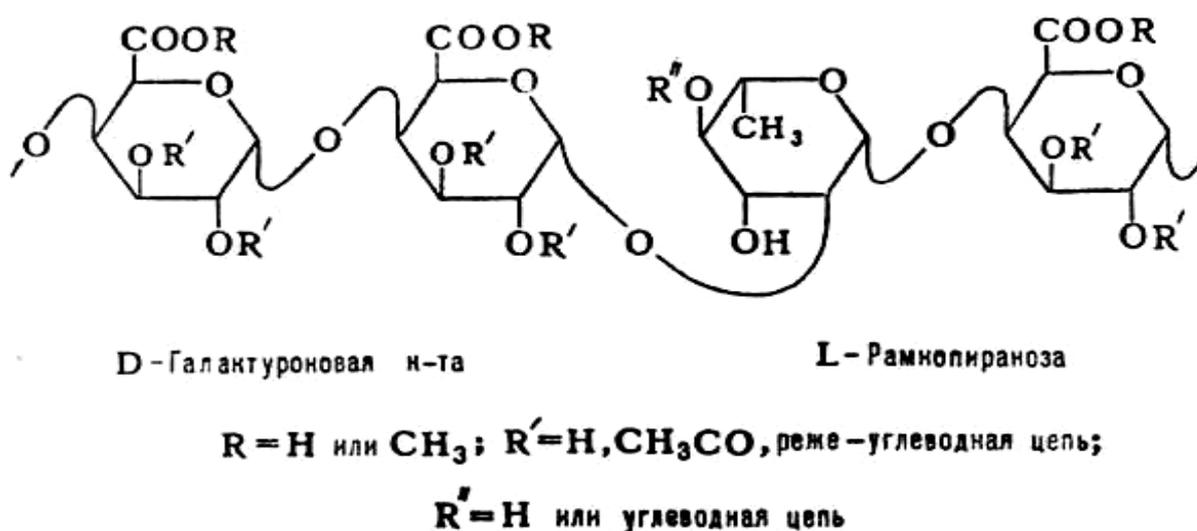


Схема 1.1.1.1 - Возможные состояния карбоксильных групп в уронидных составляющих пектинового полисахарида RG-I.

ПП относятся к группе реакционно-способных полимерных полиэлектролитов. Они обладают способностью связывать противоионы с образованием ионных пар полиэлектролитов и противоионов сложных комплексов [13].

Функциональные свойства ПП зависят от состояния карбоксильных групп в виде метильных и ацетильных эфиров, которые и делят ПП на низкометилированные (НМ-) со степенью этерификации (СЭ) до 50 % и высокометилированные (ВМ-), СЭ выше 50 % [14, 15].

Природные полимеры в том числе, полисахаридные электролиты, звенья которых содержат функциональные группы, способны к электролитической диссоциации [16]. Согласно общей теории растворов полиэлектролитов, для гибкого полииона электростатический потенциал данного иона и, следовательно, электростатическая составляющая его свободной энергии зависит от относительного расположения фиксированных зарядов. Относительное расположение зарядов полииона определяется степенью его свернутости, которая в свою очередь зависит от расположения окружающих его ионов.

В последнее время, при описании поведения полиэлектролитов широко используется теория Маннинга [17, 18, 19], основанная на модели стержня, где заряженная бесконечная цепь взаимодействует с малыми ионами (противоионами и коионами), присутствие которых в системе обусловлено кулоновским взаимодействием зарядов, называемом «связыванием ионной атмосферы». Из такого рассмотрения, в частности, следует, что большее связывание характерно для многозарядных и гидратированных ионов с малым радиусом [19]. Таким образом, процесс конформационного перехода можно рассматривать как равновесие между структурой, образованной внутримолекулярными связями, и конформацией, обусловленной электростатическими взаимодействиями, связанными с возрастанием плотности заряда на цепи полимера.

Особые свойства пектиновых полиэлектролитов проявляются в условиях, в которых их макромолекулы имеют локальные некомпенсированные заряды [19].

Эти свойства в основном определяются взаимодействием заряженных групп полиионов между собой и с окружающими их низкомолекулярными противоионами [20]. При ионизации макромолекул НМ-пектина происходят значительные конформационные изменения, обусловленные не только воздействием одноименных зарядов, но и разрушением или перераспределением водородных связей [21].

Конформационные изменения пектиновых молекул могут происходить в результате изменения соотношения метоксильных и карбоксильных групп, а также их порядка распределения по цепи макромолекулы. Совокупность данных, приведенных в работе [19], указывают на то, что с уменьшением, а именно степени этерификации, происходит переход спиральной структуры в клубок, а связывание ионов кальция приводит к обратному. При этом, важным является распределение свободных и этерифицированных групп. Все эти явления существенно сказываются на поведении пектиновых макромолекул в растворе, что не поддается объяснению существующими теориями полиэлектролитов и создают трудности [19] в исследовании их комплексообразования.

В концентрированных растворах ионогенных полисахаридов происходит усиление межмолекулярных взаимодействий с одновременным увеличением связывания противоионов и коионов полимерными матрицами. Согласно Рисс [22], можно выделить три типа связывания ионов: электростатическое, селективное и кооперативное. Естественно, что доля того или иного взаимодействия зависит, как от природы полисахарида, так и заряда соответствующих противоионов. Полученные экспериментальные данные [23, 24] свидетельствуют, что гелеобразующая способность пектиновых веществ зависит, главным образом, от молекулярной массы и степени этерификации. При изменении концентрации раствора процесс гелеобразования протекает в два этапа, димеризация макромолекул с участием ионов кальция и последующая их агрегация [19, 23-26].

Таким образом, в концентрированных растворах поведение анионных полисахаридов в основном определяются интенсивностью межмолекулярных

взаимодействий, которые стабилизируются ионами поливалентных металлов [19]. При соответствии конформационного состояния полимерных цепей в ди- и полимолекулярных агрегатах ионы металлов способствуют образованию прочных студней и гелей, что имеет важное практическое значение [19].

1.1.2. Лактоглобулины из молочной сыворотки, получение и характеристика

Самыми важными белками коровьего молока являются α -, β -, и κ -казеины, β - и α -лактоальбумины, сывороточный альбумин, тяжелые- и легкие фракции иммуноглобулины (Ig). Сывороточные белки в своем составе содержат β -Lg, α -Lg, иммуноглобулин, альбумин, лактоферрин, лактопероксидазу, лизоцим, и только в подсырной сыворотке – гликомакропептид [27-29]. Концентрат лактоглобулинов (LgC), как структурирующая добавка, широко используется в детском питании и в приготовлении кисломолочных продуктов (йогурты, пробиотики и т.п). β -лактоглобулины обладают свойством образовывать комплексы и гели с другими биополимерами, что является превосходным качеством при их использовании. α -Lg применяется как добавка к детскому питанию [30]. β -лактоглобулин коровьего молока представляет собой небольшую молекулу из 162 аминокислотных остатков с молекулярным весом 18.4 КД. В физиологических условиях он преимущественно находится в виде димера, но диссоциирует при снижении pH ниже 3, и в этих условиях остается довольно стабильным [31].

Имеются разные методы выделения β -LgC с применением ионообменной хроматографии [32, 33] и ультрафильтрации [34, 35]. Для характеристики компонентного состава концентрата лактоглобулинов в последнее время широко используется метод капиллярного электрофореза [36]. В лаборатории ВМС Института химии разработан селективный метод выделения лактоглобулинов из молочной сыворотки (МС) молочной фабрики «Саодат» г. Душанбе на основе ультрафильтрационного концентрата творожной сыворотки [37]. Этот метод используется для разделения казеина и альбумина молочной сыворотки от лактоглобулинов. Основные стадии этого метода включают подкисление

сыворотки до $pH=4.0$, центрифугирование, ультрафильтрацию горячей сыворотки на мембране PS/50 (Spectrum Lab. США) или УПМ-П (Владипор, Россия).

1.2. Получение и свойства макромолекулярных комплексов

Для полиэлектролитов реакция между катионо- и анионогенными макромолекулами (поликислотами, полиоснованиями и их солями) в водных растворах являются одной из наиболее интересных, которые приводят к образованию интерполимерных солей или, как их часто называют, полиэлектролитных комплексов (ПЭК) [21]. Согласно авторам [38-42] такая реакция в определенном смысле не имеет аналогий в химии низкомолекулярных соединений, так как ее полимерный продукт - ПЭК представляет собой соединение, стабильность которого обусловлена главным образом факторами энтропийной природы [20].

Комбинирование принципов комплексообразования и самоорганизации для создания многофункциональных и многокомпонентных полиэлектролитных систем является следующим этапом в исследовании ПЭК. В основе данного подхода лежит идея встраивания индивидуальных макромолекул (субъединиц) в надмолекулярные объекты с образованием новых структур со свойствами не характерными для отдельных компонентов [20]. Амфифильные ионогенные блок-сополимеры (блок-полиэлектролиты) служат прекрасным примером самоорганизующихся полиэлектролитов, образующих наноразмерные мицеллярные структуры типа «ядро-оболочка», одновременно включающие гидрофобные и гидрофильные домены. Согласно авторам [38, 39] формирование ПЭК за счет комплексообразования таких мицелл с противоположно заряженными полиионами является одним из способов усложнения структурной организации полиэлектролитных систем и придания им новых свойств.

Внимание исследователей и специалистов [41, 42] по коллоидной химии привлек тот факт, что при сливании водных полиэлектролитов, характеризующихся относительно низкой плотностью заряда на макромолекулах в определенных условиях происходит фазовое разделение и образование жидких коацерватов [20], например, желатина и гуммиарабика.

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

1.2.1. Взаимодействие протеин – полисахарид в водном растворе

В данной части обзора рассматривается взаимосвязь структуры и активности амфифильных биополимеров белков, полисахаридов и их смесей, через изучение влияния таких параметров, как соотношение биополимеров, рН и ионная сила раствора.

Взаимодействие между белками и полисахаридами исследовали с начала 19 века, когда Бежерин [43] изучал фазовое поведение смешанного раствора желатина и растворимого крахмала. Автором впервые было исследована термодинамическая «несовместимость» между белками и полисахаридами (10% - ный водный раствор желатина с 2 %-раствором агара и 10 %-раствором желатина с 10 % растворимым картофельным крахмалом). Раствор желатина был диспергирован в раствор крахмала, при нагревании или интенсивном перемешивании и образовалась двухфазная система. В последнее время термин «эмульсия вода-в-воде» был использован для описания таких дисперсий [44].

Ранее ученые разработали модели и теории для описания взаимодействия полимера и разделения фаз, которые происходят при смешивании растворов их полимеров. Взаимодействие между полимерами (белок-белковые, белково-полисахаридные или полисахарид-полисахаридные) в растворе и с растворителем будет регулировать растворимость и коастворимость биополимеров, вязко-упругих свойств конечной смеси и даже их поведение в разных поверхностях фаз (твердое тело-жидкость или жидкость-жидкость).

Природные биополимеры, в основном, состоят из белков и полисахаридов. Притяжение и отталкивание являются двумя основными типами взаимодействий, которые происходят между белком и полисахаридом в растворе и могут привести к формированию комплекса или расщеплению двух биополимеров

(термодинамическая несовместимость). По причине полиэлектролитического взаимодействия в растворе и их последствий на систему будут сильно зависеть от pH, ионной силы раствора, конформации, плотности заряда и концентрации биополимеров.

Взаимодействие белков с полиэлектролитами в основном происходит за счет электролитических сил, в то время как в некоторых случаях водородные [45] и гидрофобные [46] связи также могут присутствовать. Однако, когда кулоновские силы сильно ослабевают с увеличением ионной силы, гидрофобные силы взаимодействия становятся чувствительными к концентрации электролита [47].

По данным анализа результатов потенциометрического титрования и фронтального капиллярного электрофореза, основанных на определении расстояния взаимодействия заряженных участков цепи полимеров авторам [47] представлена модель взаимодействия β -Lg с сильным анионным полиэлектролитом-полистиренсульфонатом (ПСС) (рис 1.2.1.1).

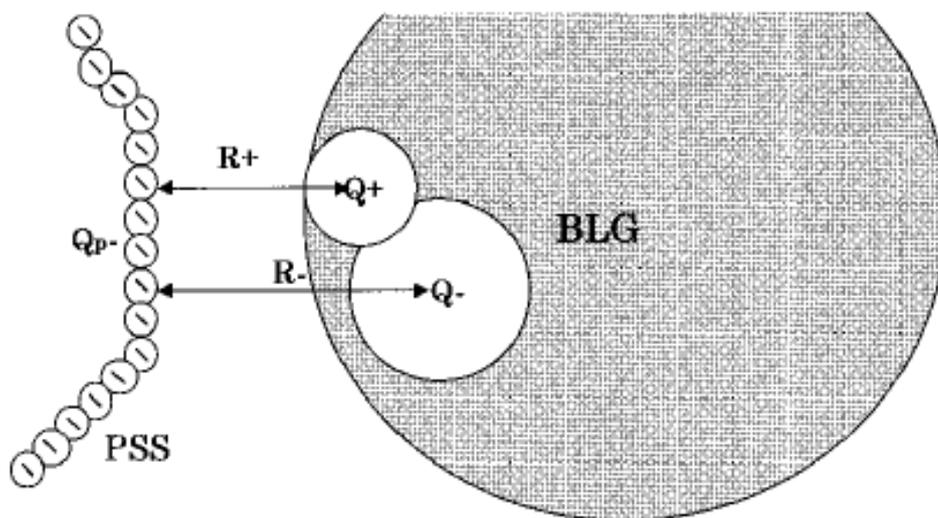


Рисунок 1.2.1.1 - Модель электростатического взаимодействия β -Lg с анионным полиэлектролитом ПСС, где Q_{p-} , Q^+ и Q^- - величины заряда на участке цепи полианиона и протеина, R^+ R^- - средние расстояния между положительным и отрицательным участками протеина и полииона соответственно.

В работах [48-50] многочисленные системы на основе биополимеров были описаны с точки зрения структуры, стабильности и реологических характеристик. Эти системы были представлены как термодинамические переходные состояния [48]. Сочетание двух различных биополимеров в водном растворе ведут себя в основном тремя способами: 1) совместная растворимость, 2) несовместимость, 3) комплекс коацервации (рис. 1.2.1.2) [50])

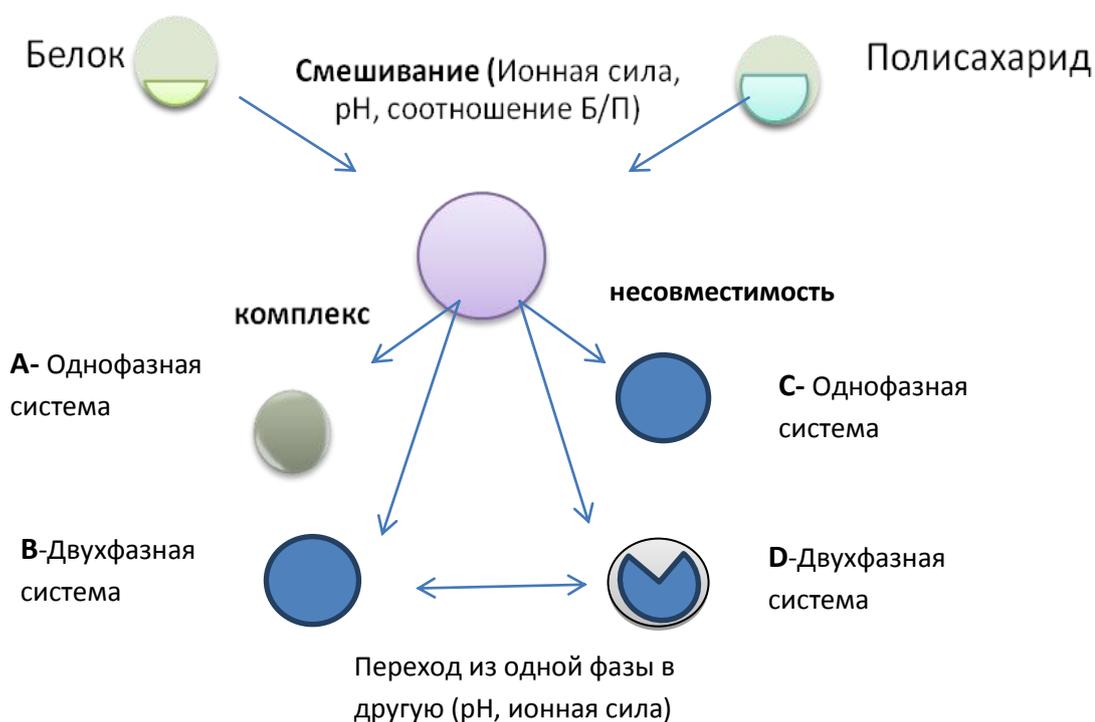


Рисунок 1.2.1.2 - Различные типы взаимодействий между протеинами и полисахаридами в водном растворе.

Между двумя заряженными биополимерами, как правило, комплексообразование - обратимый процесс в зависимости от рН и ионной силы раствора. При высокой ионной силе (0.2 - 0.3 моль/л), или при значениях рН выше ИТ белка, комплексы могут диссоциироваться. Тем не менее, электростатические взаимодействия между анионными полисахаридами и положительно

заряженными белками могут происходить при рН выше ИТ белка. Например, сульфатированный полисахарид (каррагинаны) и белки могут формировать комплексы при значениях рН выше ИТ белка (рис. 1.2.1.2).

Силы неэлектростатического характера в новых комплексах будут сильно влиять на его реологические свойства, а также на условие формирования геля. Биополимеры, взаимодействующие вместе образуют более или менее «зоны стыка» в зависимости от наличия и типа взаимодействия вовлеченных сегментов полимерных цепей. Контактные зоны между глобулярными белками в нативном состоянии и полисахаридами будут ограничены по сравнению с развернутыми и неупорядоченными белками, которые образуют более протяженные зоны межцепочечного стыка. Развернутая форма белков, как желатин, казеин формируют комплекс с анионными полисахаридами через большое количество связывающих участков, поэтому комплексы в данном случае будут практически нейтральными и нерастворимыми.

В работе [51] тройная система взаимодействия белка, полисахарида и воды описана с помощью псевдо-тройной фазовой диаграммы и представлена на рис. 1.2.1.3. Линия бинодали или граница сорастворимости разделяет однофазную область (ниже линии) от двухфазной области. При смешивании водных растворов белков и полисахаридов, смесь может оставаться однофазной или разделится на две фазы. Когда происходит разделение фаз в определенном составе двух полимеров (точка А), соответствующие линии связи (DB) дают в составе две отдельные фазы. Состав каждой фазы после того, как достигается равновесие, соответствует содержанию белок/полисахарид в точках D и B.

Для фазовых диаграмм систем белок – полисахарид-вода, в критической точке типичны низкое значение порога расслоения и высокое соотношение концентраций белка и полисахарида.

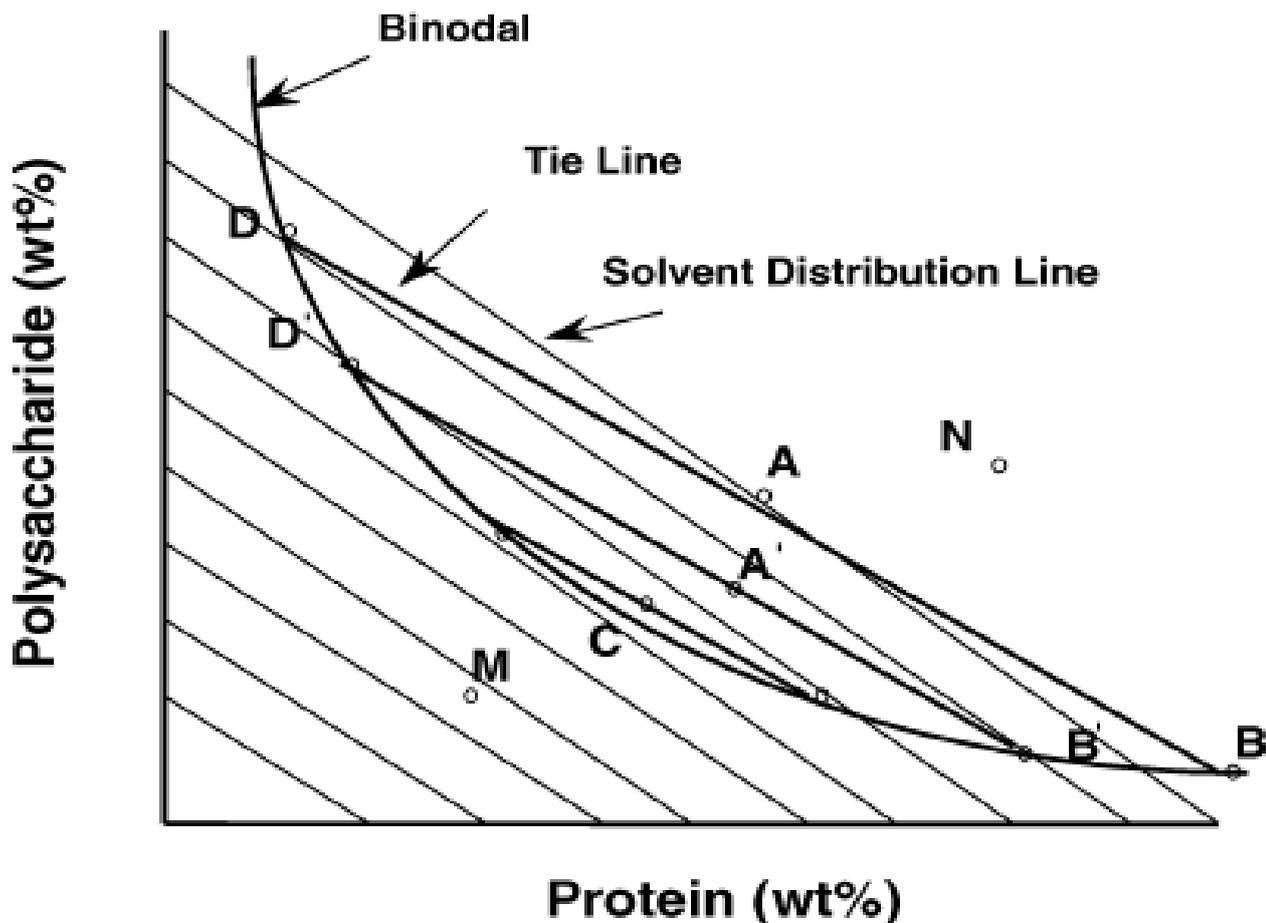


Рисунок 1.2.1.3 - Схематическая иллюстрация типичной псевдо-трехфазной диаграммы в системе протеин-полисахарид – вода.

Иными словами, системы белок-полисахарид-вода распадаются на фазы, резко различающиеся по концентрации макромолекулярных компонентов, а именно на высококонцентрированную фазу, обогащенную белком (содержание полисахарида - не выше 0.5 %), и разбавленную полисахаридную фазу. На этом явлении основан новый метод концентрирования растворов белков, названный безмембранным осмосом [52]. Он использован для концентрирования белков обезжиренного молока с помощью пектина.

1.2.2. Комплексы протеин–полисахарид в гелях на поверхности раздела фаз эмульсий

Переход в гелеобразное состояние в потоке частиц дисперсной фазы образуются белковые микроволокна. В зависимости от объемной доли дисперсной фазы можно получать как короткие, так и волокна бесконечной длины. В последнем случае, гелеобразованию предшествует коалесценция деформированных дисперсных частиц. Такой процесс назван безфильерным прядением [53]. Гранулированные продукты с различной степенью анизодиаметрии гранул могут быть получены при невысоких степенях деформации.

Если в гелеобразное состояние переходит дисперсионная среда, то возникают гели, наполненные жидкими цилиндрами, ориентированными в направлении потока, так называемые гели капиллярной структуры. Прочность таких гелей в поперечном направлении ориентации капилляров намного выше, чем в продольном, причем степень анизотропии прочности возрастает с увеличением скорости сдвига [54]. При высоких степенях наполнения непрерывная фаза представляет собой профилированные волокна. Наконец, возможен переход обеих фаз деформированной двухфазной жидкой системы в гелеобразное состояние. Таким путем получают анизотропные по механическим свойствам гели, наполненные волокнами, ориентированными в направлении деформации.

В работах [55-63] большое внимание уделено способности биополимеров или их комплексов в эмульсификации и стабилизации пищевых продуктов. Биополимеры и их комплексы, в этом аспекте с успехом могут заменить многие синтетические полимеры в современных изысканных продуктах. Белки, как известно, являются природными полимерными ПАВ. Полисахариды повышают вязкость среды, образуют гель и играют важную роль в стабилизации пищевых и фармацевтических продуктов, их называют гидроколлоидами.

При этом протеин-полисахаридные композиты находят применение в формировании и производстве современных пищевых и фармацевтических продуктов [55, 56, 59, 60, 62].

Дикенсон [63-65] утверждает, что лучший способ адсорбировать гидроколлоид на межповерхности фаз - связать их с белками. Белки являются ПАВ, состоящими из гибких гидрофобных и гидрофильных остатков, преимущественно адсорбирующихся на межповерхности и могут замещать гидроколлоид на поверхности раздела фаз. Гидроколлоиды, часто термодинамически несовместимые с адсорбированным белком, могут быть распределены на границе, только если они взаимодействуют с белком на поверхности. Их распространение на границе будет зависеть от характера этих взаимодействий. Сильные химические связи, а не слабые связи между ними, приведут к иному распределению поверхности [44, 48-50].

Комплексообразованию протеин – полисахаридов для стабилизации эмульсии посвящены патентные публикации. Запатентован процесс получения нерастворимых комплексов между желатин-алгинатом и желатин-алгинат-диметилцеллюлозы при рН выше ИТ желатина (4.7) для стабилизации эмульсии [66]. Растворимые комплексы также могут стабилизировать эмульсию, как показано авторами [67] с использованием сывороточных белков и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ).

Авторы [68] изучали поверхностную активность бычьего сывороточного альбумина (БСА) и БСА с декстраном при стабилизации эмульсии н-декан/вода путем оценки объемов сосуществующих фаз, полученных после их разделения, при центрифугировании в течение 50 мин. при 23 000 об/мин. Полное разделение фаз наблюдалось в эмульсии, приготовленной с 0.2 мас % БСА. Когда были использованы комплексы БСА-декстран при рН 6.0, концентрации биополимера равную 0.3 мас %, лишь 40 % декана отделилось после центрифугирования. Поскольку, эмульгирующие свойства комплексов сильно зависят от рН и ионной силы раствора, авторы пришли к выводу, что процесс стабилизации эмульсии является электростатическим. Даже когда оба биополимера имели отрицательный

заряд при рН 7.0 соотношение БСА/декстран сульфата 1:3 по весу), образовались растворимые комплексы с участием локальных электростатических взаимодействий высокозаряженного анионного полимера и положительно заряженного участка глобулярных белков. При измерении вязкости и эластичности были получены дополнительные подтверждения образования комплекса БСА и декстран сульфата на поверхности раздела фаз.

Аналогично предыдущему исследованию синергетический эффект комплекса протеин-полисахарид при стабилизации эмульсии были сообщён системе эмульсии масло в воде с комплексом казеина и кислым полисахаридом [69]. Комплексы, образованные с участием ковалентных связей, также проявили способность к стабилизации эмульсии [70]. Эмульсию олеиновая кислота/вода, приготовленную с конъюгатом из ковалентно связанных β - Lg и карбоксиметил декстран выдерживали при нагревании до 80 °С, показывая стабильную эмульсию [71].

В последнее время, большое внимание отводится влиянию высокого давления на способность глобулярных белков стабилизировать эмульсии [72-79]. Внутримолекулярные гидрофобные и электростатические взаимодействия у третичных и четвертичных структур глобулярных белков нарушаются с применением давления, что является важным с практической точки зрения. Как и при тепловой денатурации, эти молекулярные изменения могут привести к агрегации и гелеобразованию белков при соответствующих условиях. Хотя исследовано влияние высокого давления на различные полисахариды, однако только у пектинов обнаружены значительные изменения в реологических и физико-химических свойствах [79-83].

1.2.3. Взаимодействие белков с пектиновыми полисахаридами

Взаимное притяжение существует между протеинами и анионными полисахаридами, если данные компоненты являются энергетически совместимыми. Протеины, взаимодействующие с пектинами могут разделяться

на два класса, характеризующиеся «специфичными» и «неспецифичными» участками связывания. Эти комплексы или коацерваты, применяются во многих областях пищевой и фармацевтической промышленности, включая заменители жира, концентрирование белков, микроинкапсулирование ЛВ и иммобилизацию энзимов [1, 3, 49, 84-88].

Природа протеин-полисахаридных комплексов находится под воздействием энтропийных факторов (таких как структура и молекулярный вес биополимеров). На эти комплексы также влияют энтальпийные факторы, которые регулируются соотношением протеин/полисахарид, природой и плотностью зарядов на биополимерах. Согласно [89], показатель рН и ионная сила раствора также существенно влияют на электростатическое взаимодействие. Исследователи [90] отмечают, что комплексы β -Lg с пектином обладают медленной кинетикой связывания, что подтверждает существование двух стадий комплексообразования перехода от молекулярного в агрегированное состояние. Первая стадия соответствует образованию растворимых комплексов – интраполимеров между молекулами. Вторая включает агрегирование этих интраполимерных комплексов с образованием нерастворимых комплексов - межполимеров (теория Тайнака) [90, 91].

Ряд публикаций [89, 92-94], посвящены изучению взаимодействия пектина с белками. Тургеон с соавторами [89] выбрали метод потенциометрического титрования для изучения образования растворимых комплексов [20] различного соотношения между β - лактоглобулина (β - Lg) с НМ- и ВМ-пектинам. Полученные комплексы титровали 0.01Н соляной кислотой от рН 4.5 до 7. Природу связи определили взаимодействием на комплексы хлоридом натрия и мочевиной при различных температурах. Степень образования комплекса определили при фильтрации смеси растворов β - Lg с пектинами через мембрану, пропускающей вещества с молекулярным весом 10 КД. Мембраны с соответствующим размером пор использовались для извлечения несвязанного белка в растворе. Результаты проводимых исследований показали, что количество связанного β - Lg было больше в смеси с НМ-пектином, чем при использовании

ВМ-пектина. Так, при pH 4,5 в дистиллированной воде при соотношении β - Lg /пектин 4:1 было получено 96 % комплекса β - Lg/НМП и 78 % β - Lg/ВМП [20].

Исследование авторов [89, 93] показали, что комплексообразование β - Lg с НМ- и ВМ- пектинов при pH 4.0 в растворе 5мМ фосфата натрия происходит согласно теории Тайнаки в две стадии. В первой стадии на одну молекулу НМ - пектина приходились восемь β - Lg и на одну молекулу ВМ - пектина шесть β - Lg. На второй стадии процесс стехиометрии комплексов равнялся 16 и 15 β -Lg лигандов на молекулу пектина, соответственно. В первой стадии образуются растворимые интерполимерные комплексы, а во второй интерполимерные комплексы агрегируются с образованием нерастворимых межполимерных комплексов. Количество β - Lg (18 КД) связанной на каждой молекуле пектина (94.3 КД) при pH 4 - весьма высокое относительно соотношения молекулярных масс данных биополимеров. При тех же условиях, методом капиллярного электрофореза эти авторы [93] выявили, что при образовании интерполимерных комплексов его стехиометрия соответствует 21 и 13 молекул β -Lg на одну макромолекулу НМ- и ВМ пектинов, соответственно. Эти несоответствия, были объяснены поляризующим эффектом электрического поля при использовании метода капиллярного электрофореза в изучении комплексообразования между β - Lg и пектином, который способствовал диссоциации комплексов и позволил снизить, до некоторой степени, вклад водородных связей в комплексе.

В своих работах авторы [89] методом ультрафильтрации с использованием дестабилизирующих агентов показали, что взаимодействие между β -Lg и пектином происходит посредством ионной и водородной связи, поскольку гидрофобные взаимодействия были несущественными. Авторам удалось получить комплексы пектинов из разных источников с белками муки тритикале [94].

Определение количественных параметров связывания в системе биополимеров представляет трудную задачу из-за их одинаковых полиэлектролитических свойств. Согласно литературным данным, анионные полисахариды, как пектинаты, альгинаты и карбоксиметиллюлозы могут группироваться с полужесткими цепями биополимеров, которые формируют

водопроницаемый случайный (статистический) клубок биополимера в водной среде со значениями сегмента $K_{h\nu n} \sim 150 \text{ \AA}$ [95], $\sim 335 \text{ \AA}$ [96] и $\sim 340 \text{ \AA}$ [97]. Глобулярные протеины представлены в водной среде в форме твердых шаров [98]. Средний гидродинамический радиус для β - Lg мономера около 28 \AA и для димера 34 \AA был найден при помощи динамического светового рассеяния [99]. Поскольку для мономера, димера и тримера альбумина средний гидродинамический радиус составил 43 \AA , молекулы альбумина обладали большими супер молекулярными агрегатами среднего радиуса равного 1309 \AA .

Со стороны авторов [93] показано, что измерения термодинамических параметров, таких как, константа связывания, энтальпия, энтропия и стехиометрия связывания являются необходимыми для предоставления точной оценки условий связывания между пектинами и β - Lg. Следовательно, было проведено несколько количественных исследований при взаимодействии между β - лактоглобулином и пектинами.

Семенова и др. [98] показали, что взаимодействие глобулярного протеина с полисахаридами, обладающими различной конформацией величины поперечных вторых вириальных коэффициентов (A_{23}) могут быть близкими. В случае пектинатов и глобулина они обнаруживают большую разницу теоретических и экспериментальных значений A_{23} , указывающих на то, что данная область, занятая молекулами пектина является абсолютно неприемлемой для глобулярного протеина в водной среде. Однако, молекулы пектина могут иметь различную конформацию от упругого клубка до жесткого цилиндра в зависимости от его СЭ, ионизации карбоксильных групп и разветвления цепи [100]. Таким образом, принимая во внимание то гидродинамическое поведение различных пектиновых макромолекул, можно найти место для взаимодействия с глобулярными протеинами путем регулирования электростатических условий, вызванных рН и ионной силой.

Комплекс коацерватов пектина с β - Lg привлек к себе большое внимание. В частности, было изложено, что существует зависимость свойств поверхности слоев β - Lg и пектинов от последовательности адсорбции двух биополимеров на

поверхности раздела воздух-вода или масло-вода. Доказательство в поддержку о значительном различии в межфазовой структуре созданной двумя процессами адсорбции было получено путем спектроскопических и рефлективных методов [101].

Формирование комплекса между β - лактоглобулинами и различными пектинами изучены в пищевых системах, также выполнены многочисленные исследования. В данных исследованиях применялись ПП, которые были выделены из растительных материалов с помощью кислотной экстракции. Полученные таким методом ПП имеют структуру, преобладающую из α 1,4-связанных остатков D -галактуроновой кислоты [15]. ПП характеризуются, кроме, содержания ГК еще двумя параметрами: степенью метил - этерификации (СЭ) карбоксильных групп и распределением метоксильных групп по цепи ПП. Распределение метильных эфиров могут быть блочным (БР), что возможно исследовать путем гидролиза пектина с эндополигалактуроназой [102]. Высокое значение БР означает, что метоксильные группы распределены по блокам в цепи ПП, низкое значение случайное распределение (СР).

Сумарный заряд на пектиновых цепочках меняется в зависимости от СЭ и распределения метилированных карбоксильных групп. Распределение метоксильных групп в пектинах может быть блочным (БР) или хаотичным (ХР). Варьирование плотности локального заряда в пектиновых цепях, который не удается для синтетических полимеров, имеет ключевое значение в образовании комплекса между противоположно заряженными полимерами.

НМ-пектины являются полимерами с высоким суммарным зарядом и с высокой плотностью локального заряда. ВМ-пектины как ВМБР и ВМСР_имеют слабый суммарный заряд, но они обладают высокими и низкими плотностями локального заряда цепи, соответственно.

В работе [103] методом динамического рассеяния света (DLS) и потенциометрическим титрованием определены pH_C (pH образования растворимых комплексов β - Lg и пектина) и pH_f (pH , при котором происходит разделение фаз) в зависимости от ионной силы. Показано, что pH_C уменьшается с

увеличением ионной силы для всех пектинов и этот параметр был использован в теоретической модели, который показал, что плотность локального заряда пектина, чтобы контролировать возникновение комплекса. При увеличении ионной силы раствора, для НМ-пектин, величина pH_f проходит через максимум из-за экранирования одинаковых заряженных групп между молекулами β - Lg, связанных с НМ-пектином, в то время как электростатические взаимодействия между биополимерами были подавлены при более высокой ионной силе раствора.

Потенциометрическое титрование в изученных гомо-молекулярных растворах биополимеров и их смесей позволяют регулировать заряд в комплексах β - Lg с пектинами: Около pH 5.5 - 5.0 (pK_a) функциональные группы β -Lg ионизируются и появляются положительно заряженные молекулы β -Lg; при pH около 4.5 - 3.5 вблизи значения pK_a карбоксильных групп пектина, формируется отрицательный заряд на цепи пектина. Пектины с высокой плотностью заряда образуют комплексы с β - Lg при более высоких ионных силах, чем пектины с низкой плотностью, следовательно, такой пектин является предпочтительным в пищевых системах, где желательно образование электростатического комплекса между белком и пектином [103].

Взаимодействие между полисахаридами и белками влияет на стабильность и структуру продуктов [46]. Например, кислые молочные напитки стабилизированы пектинами для предотвращения самоосаждения белка при хранении продуктов [104, 105, 106], эмульсионные системы могут быть стабилизированы [107,108] или дестабилизированы [109] путем добавления полисахаридов. Стабильность пены может быть контролирована под влиянием полисахарид - белковых взаимодействий [110, 111, 112].

В системе белок-полисахарид, как правило, полисахарид несет отрицательный заряд, а знак заряда белка изменяется в зависимости от pH раствора. Макромолекулы сорастворимые, когда они отрицательно заряженные [113, 114, 115, 116]. Растворимые комплексы образуются, когда белок связывается с полисахаридом, формируя комплекс, на которых заряд имеет тот же знак, как и

на полисахариде. Растворимый комплекс стабилизируется электростатическим отталкиванием [110, 117]. Это может произойти уже в щелочной области ИТ белка, благодаря положительно заряженной области белковой макромолекулы [115], либо путем регулирования заряда в системе белок-полисахарид [118]. Разделение фаз происходит, когда заряд в комплексе белок-полисахарид нейтрален.

Отсутствие электростатического отталкивания между комплексами позволяет им агрегировать в результате макроскопического разделения фаз [114, 115, 116, 119]. pH_c является определяющей границей между биополимерами и их комплексами в растворимом состоянии. Начало образования комплекса контролируется взаимодействием одной молекулы белка и одной последовательности полимерных сегментов и, следовательно, независимо от соотношения белка и полисахарида [114, 120]. С увеличением ионной силы pH_c смещается в сторону меньших значений pH , в связи с экранированием электростатических сил притяжения [114, 121, 122, 116]. Для некоторых комбинаций белка и полиэлектролита с повышением ионной силы pH_c , также, может проходить через максимум, в зависимости от баланса между силами притяжения и отталкивания [122]. pH_f является переходной границей между растворимым и нерастворимым комплексами, при котором происходит разделение фаз. Оно зависит от соотношения белка и полисахарида, а также от ионной силы раствора [123, 114, 124]. Разделение фаз связано с нейтрализацией заряда на поверхности белок-полисахаридный комплекс, это означает, что изменение соотношения белок/полисахарид влияет на значения pH_f . Когда ионная сила увеличивается, pH_f уменьшается [114, 116, 124].

Глан и Ройлин [125] обнаружили, что кальций чувствительный ВМ- пектин образующий гель в присутствии ионов кальция и имеющий высокую степень БР), способен стабилизировать кисло- молочные напитки в то время как аналогичный ВМ - пектин с СР метоксильными группами не способен стабилизировать такие напитки.

Таким образом, на основе анализа, приведенных выше данных можно констатировать, что характер взаимодействия биополимеров в растворах в основном вызвано электростатическими силами и в меньшей степени водородными связями [20]. Взаимодействия белков с пектинами можно разделить на два класса, характеризующиеся «специфичными» и «неспецифичными» участками связывания.

Белки являются поверхностно-активными веществами, состоящими из гибких гидрофобных и гидрофильных остатков, преимущественно адсорбирующихся на межповерхности и могут замещать пектиновые гидроколлоиды на поверхности раздела фаз.

Данные комплексы или коацерваты могут быть полезными во многих областях пищевой и фармацевтической промышленности при замене жира, концентрировании белков, микроинкапсулировании ЛВ и иммобилизации энзимов. Изучение взаимодействия пектинов с β - Lg дает представление о механизме, лежащем в основе стабилизирующего действия ПП, так как ПП являются одним из основных функциональных ингредиентов многих пищевых систем, которые состоят из пены и эмульсии.

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Характеристика исходных веществ

Растворители, которые применяли в исследованиях, очищали по известным методикам. Использованные соли, кислоты, щелочи имели марку «х.ч» или «ч.д.а» производства «Реахим».

В качестве объектов исследования использовались пектины, полученных из яблок, апельсинов и корзинок подсолнечника [10, 132].

2.2. Выделение пектина из растительного сырья

Для получения качественного пектина в данной работе мы использовали метод быстрого гидролиза - экстракция пектина в автоклаве под давлением за короткий промежуток времени [126]. Набухшие яблочные выжимки помещают в автоклав, добавляют раствор соляной кислоты в соотношении сырье : кислота 1:20 и проводят гидролиз при $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $P = 1.5\text{ атм.}$ в течение 3-10 мин. Давление в автоклаве автоматически контролируется паровым инжектором (Паровой генератор МВА – 20D США). Пектиновый гидролизат отфильтровывают через плотный лавсан, полученный экстракт охлаждают, нейтрализуют до pH 3.5, отделяют микрогель (МГ) путем центрифугирования при скорости 4000 – 5000 об/мин. Далее, проводят осаждение раствора трехкратным количеством этилового спирта для выделения пектиновых веществ (ПВ). Оставшийся водно – спиртовой раствор упаривают на роторном испарителе, отделяя олигосахариды (ОС).

1. Лабораторный (традиционный) метод [127]. Гидролиз – экстракцию корзинок подсолнечника проводят в течение 60 минут, при температуре $85\text{ }^{\circ}\text{C}$, гидромодуле 1:20 и непрерывном перемешивании, используя в качестве экстрагента раствор соляной кислоты с $\text{pH} = 1.2$. Полученный экстракт отделяют от остатков клеточной стенки и разделяют на три фракции, названные: микрогель (МГ), пектиновые вещества (ПВ) и олигосахариды (ОС).

2. Метод быстрого гидролиза - экстракции пектина в автоклаве под давлением за короткий промежуток времени [128]. Набухшие корзинки подсолнечника помещают в автоклав, добавляют раствор соляной кислоты с $\text{pH} = 2.0$ в соотношении 1:20 и проводят гидролиз при $T = 120\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $P = 1.5\text{ атм.}$ в течение 3-10 мин. Давление в автоклаве автоматически контролируется паровым генератором (Паровой генератор МВА – 20D, США). Дальнейшее выделение фракций проводят по методу 1.

2.3. Очистка пектиновых образцов

2.3.1. Очистка пектиновых веществ

Очистка этанолом. ПВ обрабатывали смесью 70 %-ного $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, концентрированной HCl и воды в соотношении 14 : 3.6 : 2.4 в течение 24 часов при комнатной температуре. После этого промывали 70 %-ным спиртом до отрицательной реакции на Cl^- - ионы, затем 96%-ным этанолом и ацетоном и высушивали при температуре 40-60 $^{\circ}\text{C}$ [129].

Для удаления микрогеля 0.5 %-ный раствор пектина центрифугировали при 7100 об/мин в течение 1.5 час, или ультрацентрифугировали при 60 000 об/мин в течение 1 часа. Низкомолекулярные фракции ПВ отделяли с помощью ультрафильтрационной мембраны УПМ-100 на лабораторной ячейке при давлении 0.16 МПа. Лиофильно высушенный препарат пектина использовали для анализа [19].

Мембранная очистка ПВ. Наряду с методом осаждения для получения ПВ был использован метод диа- и ультрафильтрации с помощью мембраны УПМ-100 на лабораторной ячейке при давлении 0.16 МПа, с последующей лиофилизацией очищенных растворов ПВ [19, 21].

2.3.2. Приготовление раствора пектинов

На аналитических весах взвешивали точную навеску пектина, добавляли несколько капель этилового спирта для удаления пузырьков воздуха из полимера, затем добавляли небольшое количество дистиллированной воды или буферного раствора, перемешивали на магнитной мешалке при нагревании до 40 °С в течение 2 часов. Далее доводили объем раствора водой до 50 мл и перемешивали до полного растворения пектина. Полученный раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин. Осадок отделяли и высушивали при 60 – 70 °С в сушильном шкафу. Осадок взвешивали и рассчитывали концентрацию раствора по разнице взятой навески и массы осадка.

2.4. Количественные методы анализа пектиновых полисахаридов

2.4.1. Модифицированный титриметрический метод

Определение свободных карбоксильных групп [19, 130, 131]. Навеску (около 0.1 г) высушенного образца смачивали 96 %-ным этанолом (5 мл), добавляли 100 мл H₂O и перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения (1.5 - 2.0 час). Затем аликвоту (10 - 20 мл) титровали 0.01 н раствором гидроксида натрия потенциометрически до рН = 7.5. Содержание свободных гидроксильных групп (K_c) в процентах рассчитывали по формуле:

$$K_c = \frac{N_{\text{NOH}} \cdot V_{\text{NOH}} \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100, \quad (2.4.1.1)$$

где q- масса очищенного пектина, содержащаяся в аликвоте (1 мл 0,1Н раствора NaOH соответствует 0.0045 г карбоксильных групп) [20].

Определение этерифицированных карбоксильных групп [20, 130]. К оттитрованному раствору приливали точно 5 мл 0.1 Н раствора гидроксида натрия, плотно закрывали и оставляли на два часа при 20 – 40 °С для полного

омыления. Избыток щелочи оттитровывали 0.1Н раствором HCl потенциометрически до резкого скачка pH. Параллельно проводился холостой опыт. Содержание этерифицированных карбоксильных групп (Кэ) в процентах рассчитывали по формуле:

$$K_{\text{э}} = N_{\text{HCl}} \cdot \frac{(V_{\text{HCl}}^1 - V_{\text{HCl}}^{11}) \cdot 0,0045}{0,1q} \cdot 100 \quad (2.4.1.2)$$

где V_{HCl}^1 - объем раствора HCl нормальности N, израсходовавшегося на титрование холостого опыта;

V_{HCl}^{11} - объем раствора HCl, израсходовавшегося на титрование пробы;

q - масса ПВ, содержащегося в аликвоте, г.

2.4.2. Фотометрическое определение метоксильных групп

10 мг пектина растворяли в 8 мл 0.1 Н NaOH при комнатной температуре. Через 30 мин к щелочному раствору приливали 2 мл 2Н H₂SO₄, pH > 4.0. К 1 мл фильтрата приливали 1 мл 3×10^{-2} М KMnO₄ в 4.4 М H₃PO₄, смесь оставляли на 20 мин, затем приливали 0,5 мл свежеприготовленного 0.15 М водного раствора Na₂SO₃. К 1 мл обесцвеченного раствора добавляли 0.5 мл раствора хромотроповой кислоты (30 мг/мл) и 3.5 мл H₂SO₄ (82–96 %), охлажденной до 0° С. Смесь выдерживали в кипящей водяной бане 10 мин, охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при максимуме поглощения (570 нм) относительно нулевого раствора [20, 132].

Содержание метоксильных групп (CH₃O) в массовых процентах вычисляли по формуле:

$$\text{CH}_3\text{O} = \frac{D \cdot 100}{1,03 \cdot K \cdot l \cdot C_1} \quad (2.4.2.1)$$

где D - оптическая плотность раствора при 570 нм;

1 - толщина поглощающего слоя;

K - условный коэффициент поглощения, равный $6.1 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$;

C_1 - концентрация пектина в исходном растворе, мг/мл;

1.03- отношение молекулярных масс $M \text{ CH}_3\text{OH} / M \text{ CH}_3\text{O}$ [20, 132].

2.4.3. Метод определения уроновых кислот с помощью мета-гидрокси дифенильного метода

Используется готовый стандартный раствор ГК или образца ПВ с концентрацией 100 мкг/мл. Перед растворением стандарта или образца их необходимо поместить в вакуум на сутки. Работать можно максимум с 10-ю пробирками. Готовят серию растворов для построения калибровочной кривой: 25 %, 50 %, 75 %, 100 %.

В пробирку помещают 0.4 мл раствора, добавляют 40 мкл 4 молярного раствора сульфаминовой кислоты. Пробирки закрывают и перемешивают, далее, помещают их в сосуд с водой и льдом и осторожно приливают 2.5 мл раствора тетрабората в серной кислоте.

Пробирки встряхивают в охлажденной смеси и нагревают 15 минут в кипящей водяной бане. После этого, пробирки охлаждают в сосуде с водой и льдом в течение 1 – 1.5 часов. Далее, в пробирки добавляют 80 мкл 0.5 % - ного раствора метагидроксибифенила и оставляют на 3 минуты. После чего, пробирки перемешивают до появления окраски. Оптическую плотность измеряют при 525 нм (окраска стабильна в течение 13 минут). Содержание ГК вычисляют по формуле:

$$X = a \cdot V_2 \cdot V \cdot 100 / H \cdot V_3 \cdot V_1 \cdot 1000000 \quad (2.4.)$$

где a – содержание ГК в пробе, найденное по калибровочной кривой, мкг;

H – масса навески, г;

V – объем экстракта, полученного из навески, мл;

V_1 – объем, взятый для разведения, мл;

V_2 - объем, полученный после разведения, мл;

V_3 - объем пробы, взятой для реакции, мл;

100 – коэффициент перевода в проценты [19].

Построение калибровочной кривой ГК (м – гидроксид дифенильный метод).

Приготовлен стандартный раствор ГК с концентрацией 100 мкг/мл. Путем разбавления была приготовлена серия растворов для калибровки: 25 %, 50 %, 75 %, 100 %. Для повышения достоверности результатов также были приготовлены растворы: 20 %, 40 %, 60 %, 85 %. Дальнейшие исследования проводились по методу 2. На основании полученных данных строят калибровочную кривую ГК [133].

2.4.4. Молекулярный вес пектина

Молекулярный вес (M_w) пектина был определен методом эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ). В зависимости от вязкости раствора пектина, высушенный образец растворяют в 0.05 М NaNO_3 до конечной концентрации 1 или 2 мг/мл, центрифугируют при 20000 об/мин в течение 20 минут для отделения агрегированной фракции, и фильтруют через мембранный фильтр (0.45 мкм, MilliporeMillex – HN). Количество пробы (0.1 – 0.2 мл) и скорость потока элюента (0.8 мл/мин) задавалось с помощью программы Breez (Waters). Система доставки растворителя состоит из двухканального вакуумного дегазатора, насоса высокого давления (Waters 1515 IsocraticPump), и автоинжектора (717 PlusAutoInjector, Waters). Для разделения пектиновых полисахаридов использовали две колонки, содержащие PL -AquagelOH40 и PL-AquagelOH60. Молекулярная масса пектинов определялась с использованием программного обеспечения ASTRA 5.3.4.13 (WyattTechnology). Значения для M_w были получены на ЭЖХ с использованием универсальной калибровки. ЭЖХ колонки калибровались с использованием молекулярных стандартов Пуллулана (ShowaDenkoK.K., Japan) [134].

2.5. Количественные методы анализа β - лактоглобулина из молочной сыворотки

2.5.1. Выделение β - лактоглобулина из молочной сыворотки

Сывороточный белок молока β – лактоглобулин был выделен из молочной сыворотки Душанбинского молочного комбината Республики Таджикистан. Метод включает следующие стадии: подкисление сыворотки до pH 4.0, центрифугирование, ультрафильтрация горячей сыворотки на мембране, способной пропускать вещества с молекулярным весом ≤ 50 КД, для удаления остатков казеина и альбумина в ретенанте, с последующей ди-ультрафильтрацией на мембране, пропускающей вещества с молекулярным весом ≤ 10 КД, и выделение концентрата лактоглобулина. Для контроля содержания LgC был использован метод капиллярного электрофореза (КЭ) на приборе 3D Agilent HPCEG 1600 AX с использованием компьютерной программы Agilent Chem Station Software B.02.01 SR2 [135].

Затем его охлаждали до 5° С. Для удаления примесей, содержащихся в молочной сыворотке, в частности казеина и минеральных солей, ее отцентрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 минут. Далее деминерализацию проводили методом ультрафильтрации для удаления растворимых минеральных солей и лактозы. Ультрафильтрация проводилась в два этапа при P = 1.4 атм. На первом этапе молочную сыворотку (МС) пропустили через мембрану диаметром 0.2 мкм. Во втором этапе провели концентрирование МС, используя мембрану УАМ 175А°. Концентрацию белков определяли по методу Седмака, заранее построенным калибровочным графиком. Далее готовили колонку для ионно - обменной хроматографии. Брали колонку вместимостью 450 мл и заполняли 300 мл амберлитом ИРА - 400 (в набухшем виде). Регенерировали колонку 0.1 Н раствором NaOH, промывали её дистиллированной водой до нейтральной среды и пропускали 1 литр молочной сыворотки (C = 1.02 мг/мл). Затем промывали дистиллированной водой и элюировали 1М раствором NaCl, со

скоростью 6 мл/мин. Собрали элюат по 10 мл. Концентрацию белков определяли по методу Седмака, заранее построенным калибровочным графиком. По окончании колонку регенерировали фосфатным буфером (pH = 7), промыли дистиллированной водой и снова регенерировали 0.1N раствором NaOH с целью вторичного использования. Полученные фракции поставили на диализ и проверили на гель-электрофорезе качество сывороточного β - лактоглобулина [20].

2.5.2. Определение белка по методу Седмака

Степень чистоты концентрата β - лактоглобулина выделенного из молочной сыворотки [37] анализировали по методу Седмака [136]. 1.5 мл раствора препарата, содержащего 0.010-0.0150 мг испытуемого белка, помещают в пробирку, прибавляли 1.5 мл раствора кумасси ярко-голубого G -250, перемешивали и выдерживали при комнатной температуре в течении одинакового времени в интервале от 5 мин до 3 ч. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при двух длинах волн: 620 и 465 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовал смесь этих же реактивов без препарата и кумасси ярко-голубого G - 250. Калибровочный график строили в пределах концентраций от 0.005 до 0.150 мг стандартного образца белка, измеряя оптическую плотность растворов при 620 и 465 нм [20].

2.5.3. Определение белков методом капиллярного электрофореза

Степень чистоты концентрата β - лактоглобулина, выделенного из молочной сыворотки [37] определяли на капиллярном электрофорезе (3D Agilent HPCE G 1600 AX) с использованием компьютерной программы Agilent Chem Station Software B.02.01 SR2 (рис. 2.5.3.1) [135].

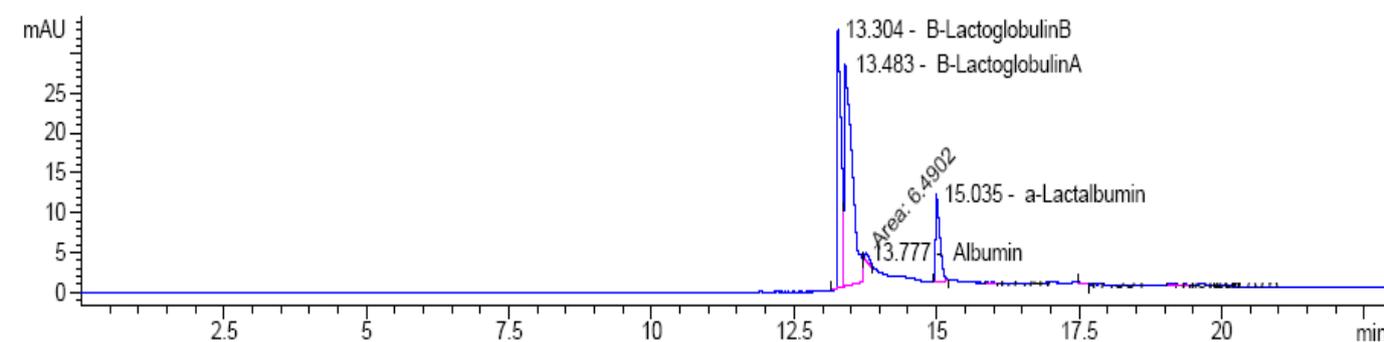


Рисунок 2.5.3.1 - Электрофорезграмма концентрата LgC, выделенного из МС. Условие электрофореза: Температура кассеты 22.0 °С; напряжение – 26.5 КВ; ток – 7.3 мА; ввод пробы гидродинамический 50 мбар/2 сек; детектирование – УФ с диодоматричным детектором (ДМД) при длине волны 200 нм.

2.6. Методика разделения белков молочной сыворотки на гель-электрофорезе

Для анализа белкового состава молочной сыворотки одним из достаточно информативных методов является электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Качественный состав белков сыворотки изучали методом вертикального электрофореза [137] в градиентном ПААГ (4-14 %), содержащем SDS-Na при pH 8.3. Используемая миниэлектрофоретическая система фирмы SIGMA дает существенно лучшие результаты и позволяет идентифицировать большое количество белковых фракций сыворотки, включая минорные компоненты, оценить общую картину белкового спектра и определить молекулярные массы белков. Молекулярные массы белков определяли по калибровочному графику, построенному из зависимости подвижности белков – стандартов фирмы SIGMA.

Для электрофоретического разделения белков молочной сыворотки использовали 14 % разделяющий и 4 % концентрирующий гели. В качестве электродного буфера использовали 0.025 М трис-глициновый буфер (pH 8.3). Образцы растворяли в буфере содержащим 0.44 М Трис-ОН, 0.1 % мМЕДТА, 10

% SDS-Na и 20 % β -меркаптоэтанола [20]. Электрофорез проводили при напряжении 120 В в течении 16-20 часов. Гель окрашивали в 0.25 % растворе Кумасси G - 250, фон отмывали водой от избытка красителя и высушивали между слоями целлофана [20].

2.7. Методика разделения белков молочной сыворотки на капиллярном электрофорезе

Метод мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ) объединяет электрофорез и хроматографию. МЭКХ получил наиболее широкое распространение среди других вариантов капиллярного электрофореза, в первую очередь, за счет способности разделять как ионогенные, так и незаряженные компоненты проб [20, 138].

Разделение белков проводили на капиллярном электрофорезе (3D Agilent HPCE G1600AX, фирмы Agilent Technologies, США) с использованием химически инертного капилляра с полимерным покрытием. Концентрация образца 1 мг/мл в 25 % - ном фосфатном буфере. Рабочий буфер - 200 мМ фосфат натрия, pH 2.0, 0.1 % додецилсульфат натрия (ДДСН). Образец растворяли в соотношении 1:3 в 1 % ДДСН, 5 % 2-меркаптоэтаноле, 2.5 мМ трис-глицине (pH 8.9), 10 % глицерине и кипятили в течение 5 мин при постоянном напряжении 10 кВ, обратной полярности к аноду. Можно наблюдать четкое разделение белков молочной сыворотки [20].

2.8. Приготовление исходных растворов

2.8.1. Приготовление раствора сывороточного белка β - лактоглобулина

На аналитических весах взвешивали 0.20 гр. белка (β -LgC), затем добавляли небольшое количество дистиллированной воды (20 мл), перемешивали на магнитной мешалке в течение 1 часа. Затем доводили дистиллированной воды до 50 мл и перемешивали до полного растворения белка (β - LgC). Полученный

раствор центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин. Осадок отделяли и высушивали при 60 °С в сушильном шкафу. Осадок взвешивали и рассчитывали концентрацию раствора по разнице взятой навески и массы осадка.

2.9. Приготовление буферных растворов

В работе использовались стандартные буферные растворы или готовились согласно таблицам «Справочника по аналитической химии» [139].

2.10. Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование [14,89,140] проводят путем добавления титранта небольшими порциями к исследуемому раствору. Отмечают объем титранта, при котором наблюдается резкое изменение потенциала индикаторного электрода. С учетом этого объема проводят более точное титрование, уменьшая порции титранта до отдельных капель [20].

Полученные данные позволяют построить кривую титрования в интегральной форме, а также в виде первой и второй производной.

Титрование начинали с рН исходного раствора с помощью прибора WTW GmbH Laboratory pH meter inoLab pH Level 1. Затем, добавляли определенные порции титранта, снижая его количество по мере приближения к точке нейтрализации. После прибавления каждой порции раствора титруемую жидкость перемешивали и выжидали некоторое время для достижения равновесия. Фиксировали объем добавленного титранта и соответствующую величину рН раствора [20].

2.11. Турбидиметрическое титрование

Готовили 0.25 % водный раствор апельсинового пектина (СЭ 38 %) и 0.25 % раствор белков молочной сыворотки, представляющего собой концентрат лактоглобулинов, полученного методом мембранной фильтрации в ацетатном буфере (рН 3.50). Определенное количество 0.25 % раствора белков молочной сыворотки помещали в стакан, добавляли при помешивании по 1 мл к 0.25 % раствора пектина. Содержимое стакана выливали в ампулу, которую помещали в измерительную ячейку турбидиметра 2100AN IS (фирма HACH, USA) и измеряли мутность T в НТУ при λ 455 нм. Обработка полученных данных проводилась по методике [141].

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Ионизационное равновесие в растворах пектинов разного происхождения и лактоглобулинов молочной сыворотки

В данной части работы представлены результаты потенциометрического титрования пектинов, полученных из различных растительных источников и лактоглобулинов молочной сыворотки в растворе.

В зависимости от источника получения у пектиновых полисахаридов меняется состав нейтральных полисахаридов и количество карбоксильных групп, как в свободной, так и в этерифицированной форме. Отсюда изменение в структуре может по-разному повлиять на силу меж- и внутримакромолекулярных взаимодействий заряженных групп, что приводит к изменению заряда на поверхности полииона. В этой связи, можно предполагать, что поведение пектинов в растворе полиэлектролитов может проявляться в различной степени. Пектин представляет собой гетерогенный полисахарид на основе комплекса линейных и разветвленных полимеров галактуроновой кислоты и рамнозы с боковыми ответвлениями из нейтральных полисахаридов. Наиболее прямую и точную зависимость в установлении взаимосвязи структуры, функции и энергии внутримолекулярных взаимодействий в полиэлектролитах можно найти в вычислении электростатической энергии, вызванной диссоциацией ионогенных групп в цепи. Особенно у биополимеров, в поиске такой взаимосвязи, крайне необходимо знание значения pK_a или окислительно-восстановительного потенциала [140]. Обычно у полиэлектролитов характеристическая pK (pK_0), экстраполированная до нулевого заряда в присутствии противоиона с определенной ионной силой раствора характеризует поведение полимера [142]. Величина pK_a непосредственно связана с эффективной плотностью локального заряда λ , которая была установлена Лифсоном-Качальским [143]:

$$\lambda = \alpha e^2 / D b k T, \quad (3.1.1)$$

pK_a , связанную с электростатическим потенциалом на поверхности стержня $\psi(a)$, можно представить в виде следующего уравнения:

$$pKa = pH + \log \frac{1-\alpha}{\alpha} = pK_o + 0.434 \frac{e\psi(a)}{kT}, \quad (3.1.2)$$

где α - степень диссоциации или ионизации и $\psi(a)$ - электростатический потенциал при минимуме расстояния функциональных групп в цепи (a).

Целью данного этапа работы является изучение ионного равновесия различных пектинов в растворах с использованием метода потенциометрического титрования.

Основные характеристики пектиновых полисахаридов, использованные в данной работе, получены в нашей лаборатории по традиционной технологии ($T=85$ °С, 60 мин., pH 1.8) [134] и представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1

Характеристика пектинов

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

Потенциометрическое титрование проводилось с использованием лабораторного pH - метра (Metrohm 827 model, Switzerland). Растворы пектина, содержащие 3.44; 4.15; 3.67 мЭ/л соответственно, полученных из яблок (зеленые сорта яблок, 2006, Таджикистан), апельсина (2006, Турция) и подсолнечника (2005, Таджикистан) титровались с помощью 0.0105 Н раствора NaOH при 25.0 ± 0.1 °С.

Кривые потенциометрического титрования для различных пектинов продемонстрированы на рисунке 3.1.1.

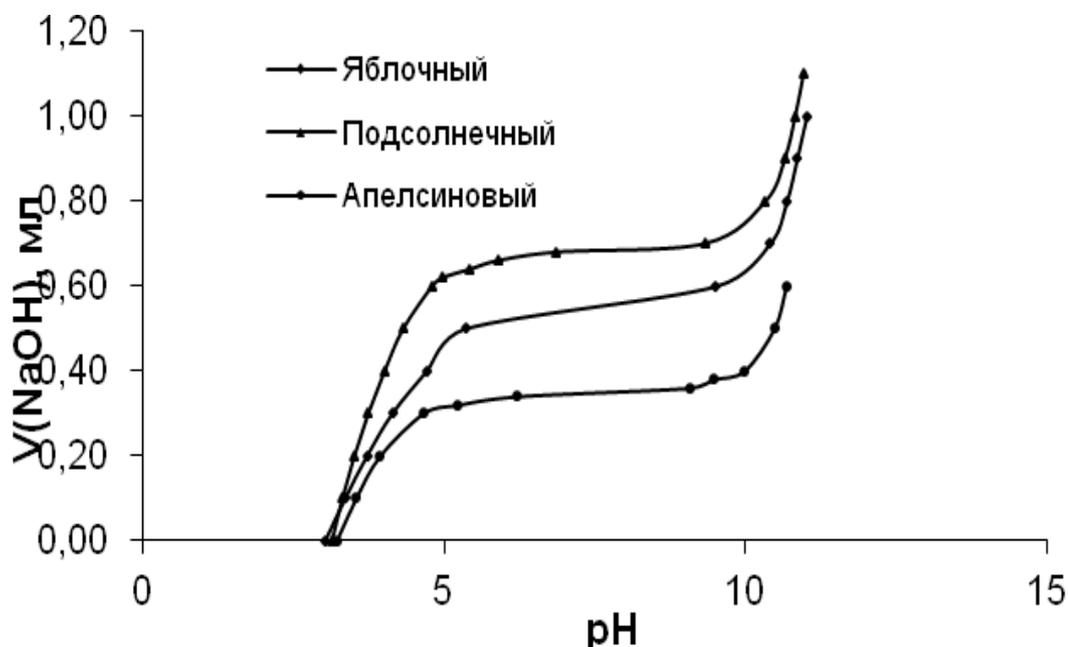


Рисунок 3.1.1 - Кривая титрований различных пектинов

Из представленного рисунка, для всех исследованных объектов в точке перехода потенциометрического титрования происходит излом кривой зависимости pH от величины объема добавленной щелочи [20]. Середина кривой появляется при одном и том же значении pH (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. 3.1.1) [148, 168].

Исходя из кривых исследованных объектов были вычислены кажущиеся константы диссоциации (pK_a), как функции степени диссоциации (α), согласно следующего уравнения:

$$pK_a = pH + \log (1-\alpha_t) / \alpha_t , \quad (3.1.3)$$

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. При протонированной форме полимера, $\alpha_t = \alpha_{H^+}$, где α_{H^+} первоначальная степень ионизации кислотных групп.

Зависимость кажущей pK_a от степени диссоциации α_t для пектинов, (на рис. 3.1.2), которая определена согласно теории Лифсон-Качальского, принимая во внимание что:

$$pK_a = pK_0 + \Delta pK(\alpha), \quad (3.1.4)$$

$\Delta pK(\alpha)$ здесь, 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).

Учитывая, что λ всегда ниже, чем λ_0 :

$$\lambda_0 = \frac{\text{Log } R/a}{1 + \text{Log } R/a} \quad (3.1.5)$$

где R - радиус полиэлектролита ($R = (\pi \cdot C \cdot N \cdot b \cdot 10^{-3})^{-1/2}$); C - концентрация полиэлектролита, мЭ/л; N - число Авогадро; b - длина мономера, равная 4.35 \AA [141]; a - минимальное расстояние заряженных групп в полимерной цепи, равная 6 \AA [142]; отсюда ΔpK можно вычислить из следующих уравнений (3.1.6) и (3.1.7):

$$\lambda = \frac{1 - \beta^2}{1 + \beta \coth \beta \text{Log } R/a}, \quad (3.1.6)$$

$$\Delta pK = -0.434 \text{Log} \left(\frac{a}{R^2} \cdot \frac{1 - \beta^2}{\lambda - 1 - \beta^2} \right); \quad (3.1.7)$$

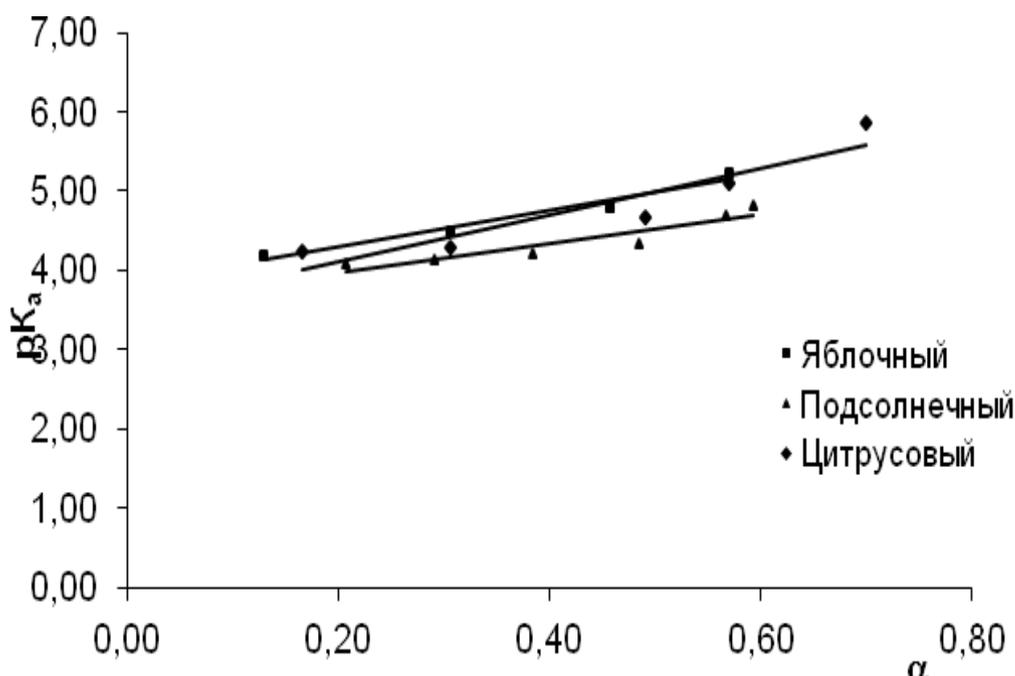


Рисунок 3.1.2 - Зависимость pK_a от степени диссоциации карбоксильной группы α в различных пектинах

В уравнении (3.1.6) β - постоянная интегрирования, которая вычислена в качестве функции λ для каждой концентрации и каждого значения α ($\lambda = \alpha\lambda_\infty$) уравнением (3.7). Кривая ΔpK может быть графически построена против α . Затем получают значения pK_0 путем сопоставления теоретической кривой функции $\Delta pK-f(\alpha)$ и экспериментальной кривых функций $pK_a-f(\alpha)$. Значение pK_0 для изученных пектинов в настоящей работе приведены в таблице 3.1.2, и соответствуют значениям pK_0 3.05 – 3.34, а также pK_0 для галактуроновой кислоты (3.40). Необходимо также отметить, что пектины не являются полимерами чисто полигалактуроновых кислот (табл. 3.1.1), распределение свободных карбоксильных групп хаотичны вдоль цепи и отличаются у разных пектинов.

Экспериментальные точки, соответствующие значениям $\alpha = 0.3 - 0.7$ для различных пектинов, удовлетворительно совпадают с вычисленной кривой; несовпадение наблюдается для высоких значений α .

Таблица 3.1.2.

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
	0.01 MNaCl	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
	0.01 MNaCl	0.74	540.0	209.05	3.05	

**количество 0.0369M NaOH, пошедшее на нейтрализацию карбоксильных групп пектина; ** относительный заряд пектиновой цепи.*

Метод Лифсон-Качальского применяется для жестких полиэлектролитов с регулярной плотностью заряда. Значение pK₀ для галактуроновой кислоты было найдено приблизительно равное 3.4 [145, 146]. Авторы Раванат и Ринаудо также показали, что олиго- и полигалактуроновые кислоты обладают одинаковым значением pK₀ (3.30 при 25 °C) [147].

Значения pK₀ для изученных пектинов (табл.3.1.2), соответствуют pK₀ 3.25 - 3.30, найденным для метилэтерифицированных пектинов с СЭ 55 %, 70 % и 90 % в работе [144]. Это значение для апельсиновых и подсолнечных пектинов в солевом растворе близко к pK₀ мономерной галактуроновой кислоты. Согласно данным [148,149], pK₀ пектинов не зависит от источника, концентрации, степени

этерификации и молекулярной массы. Полученные результаты 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 чувствительно к добавленному простому электролиту. Изменение электростатической составляющей ΔpK_0 для ряда пектинов – яблочного, подсолнечного, и апельсинового увеличивается соответственно с возрастанием степени этерификации и молекулярной массы.

Из данных, полученных методом потенциометрического титрования, также можно определить величину плотности заряда относительно недиссоциированных карбоксильных групп пектина, используя уравнение (3.1.8), которое обычно применяется для определения относительного заряда молекул протеина [150]:

$$Qr = CD/(A/B), \quad (3.1.8)$$

где A - масса оттитрованного полимера (г), B - молекулярный вес (г. моль), C - концентрация титранта (моль/л), D - объем титранта, (мл).

Эти данные четко показывают, что апельсиновый пектин является сильно заряженный молекулами, чем остальные, и значение плотности заряда, найденного на единицу полииона, соответствует содержанию галактуроновых кислот в макромолекуле пектинов и их приведенной массе в ионизированной форме.

Лактоглобулины молочной сыворотки при квартернизации третичного атома азота образуют поликатионы, которые при соответствующих условиях могут образовывать ИПЭК с ПВ [20]. В связи с этим, в этой части работы поставлена задача провести расчет констант ионизации полимера из данных по потенциометрическому титрованию. Изучены кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп β - лактоглобулина (β -Lg) стандартного образца (Sigma), концентрата β - Lg, выделенного из молочной сыворотки [20] и белков сыворотки. На рисунке 3.1.3 представлены кривые потенциометрического

титрования карбоксильных групп β - Lg стандартного образца (Sigma), концентрата β -Lg, выделенного из молочной сыворотки [37] и белков сыворотки. Как видно из представленного рисунка, для всех исследованных объектов в точке перехода потенциометрического титрования происходит излом кривой зависимости рН от величины объема добавленной щелочи [20]. Середина кривой появляется при одном и том же значении рН (5.2), а точки излома отличаются количеством титранта, использованного на ионизацию свободных карбоксильных групп.

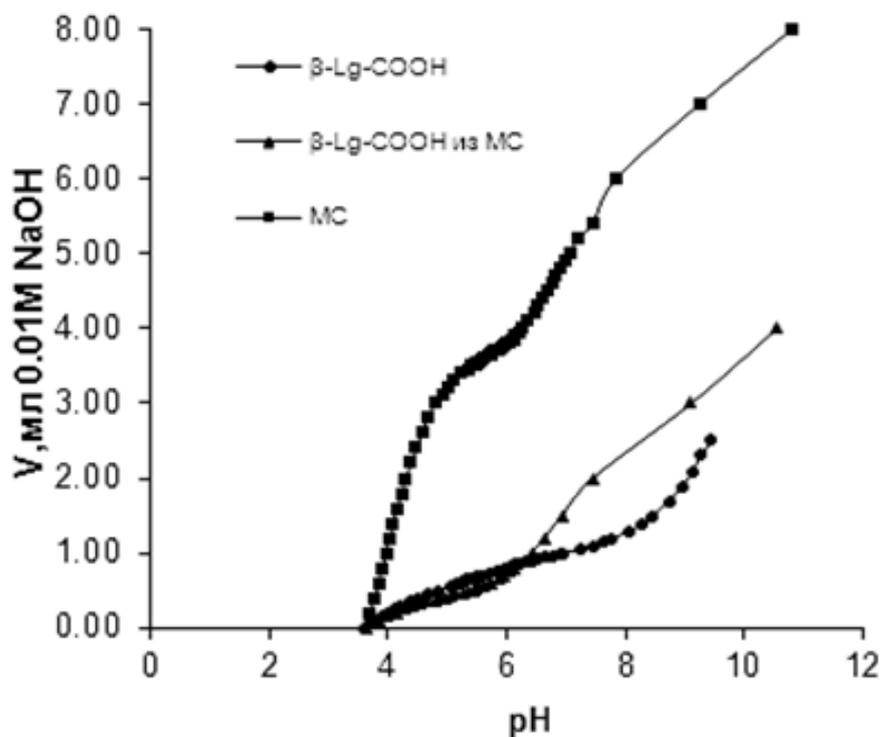


Рисунок 3.1.3 - Кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп стандартного и очищенного β - Lg и белков молочной сыворотки

Кривые титрования карбоксильных групп образцов β - Lg стандартного и концентрата отличаются (рис 3.1.3) как мы считаем из-за загрязнений во втором образце, в то же время кривые титрования имидазольной группы у них одинаковы для обоих образцов (рис. 3.1.4). Среди множеств функциональных групп белков только те ионизируются, которые находятся на поверхности, т.е. боковые карбоксильные и аминокгруппы, играющие важную роль в установлении нативной структуры и их

поведении в растворе [151]. Известно, что β - Lg имеет 48 карбоксильных групп, находящихся в боковых частях и две концевые группы [151], которые ионизируются при различных значениях pH раствора.

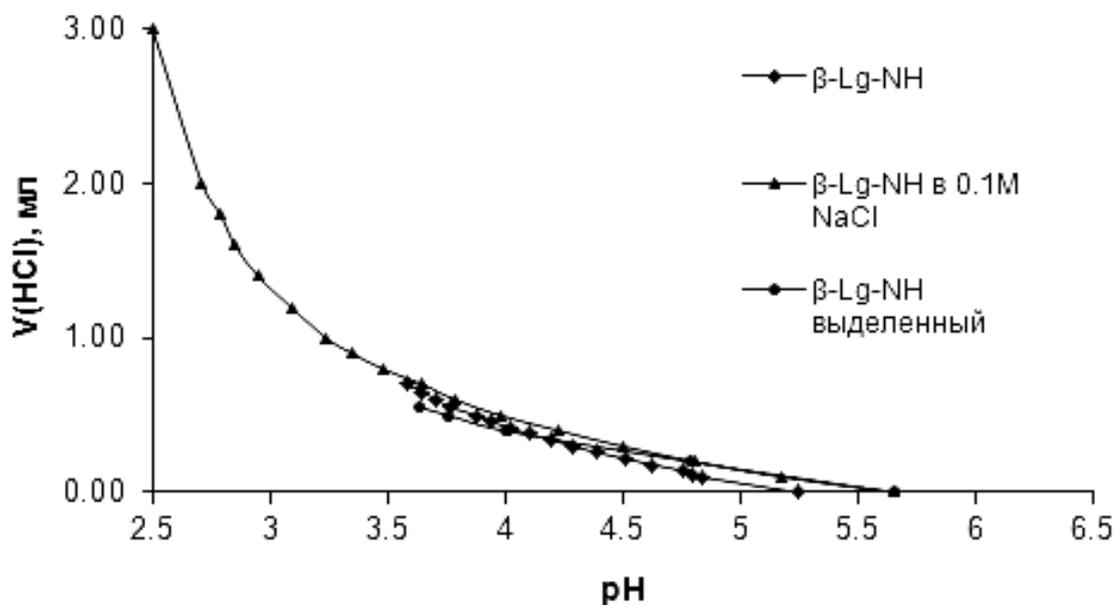


Рисунок 3.1.4 - Кривые потенциометрического титрования β - Lg соответственно для: имидазольных групп стандартного и изолированного β - Lg и β - Lg в присутствии 0.1 M NaCl

В кислотной среде β -Lg положительно заряженный, из-за электростатического отталкивания частиц диссоциирует на две субъединицы. Поэтому, экспериментальная кажущаяся константа ионизации - COOH β - Lg отклоняется от линии, найденной для недиссоциированной молекулы. Исходя из этих кривых согласно уравнению (3.1.4), были вычислены кажущиеся константы диссоциации (pK_a), как функции степени диссоциации (α). Зависимость кажущейся pK_a от степени диссоциации α_t для лактоглобулинов (рис. 3.1.5), определена согласно уравнению (3.1.4). ΔpK вычисляется с использованием уравнений (3.1.6) и (3.1.7).

Таким способом значения pK_0 найдены для всех изученных образцов лактоглобулинов и приводятся в таблице 3.1.3.

Кроме того используя данные потенциометрического титрования, также уравнение (3.1.8) можно определить величину плотности заряда относительно недиссоциированных карбоксильных групп биополимера.

Значения pK_0 для основных и концевых карбоксильных и имидазольных групп гистидинового остатка стандартного образца хорошо согласуются с известными данными [151].

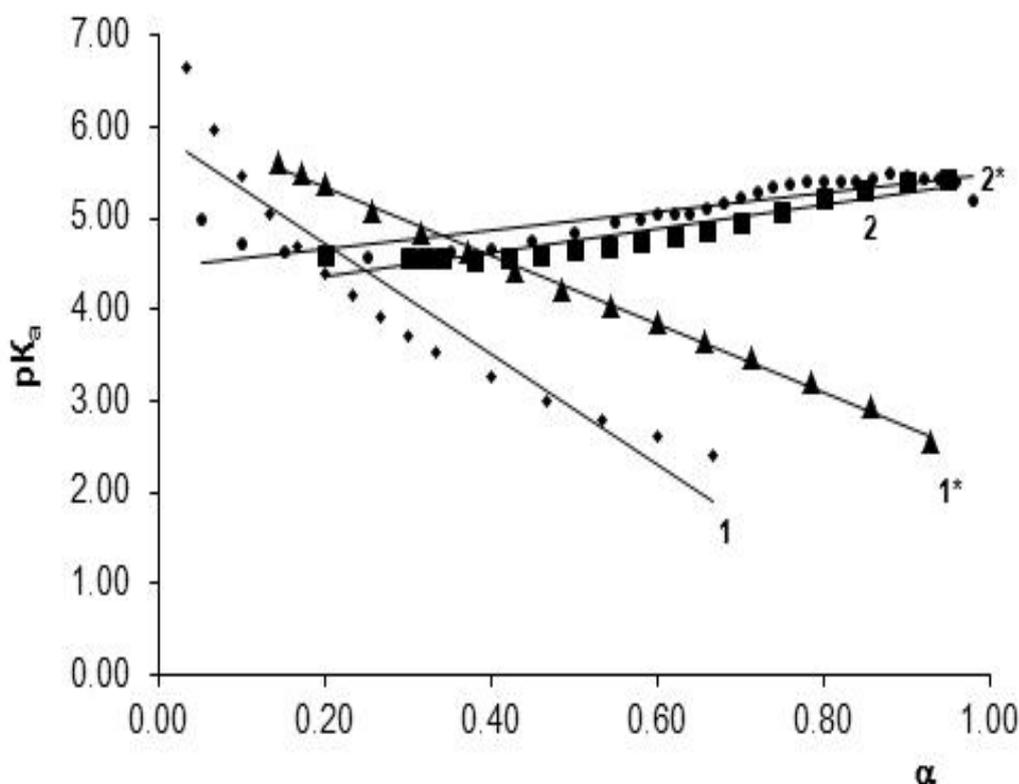


Рисунок 3.1.5 - Зависимость pK_a от степени диссоциации α имидазольных и карбоксильных групп в β - Lg: кривые 1- и 1*- имидазольные группы в присутствии и отсутствии NaCl соответственно, 2- и 2*- карбоксильные группы в присутствии и отсутствии NaCl. Концентрация раствора β - Lg – 2.1 мг/мл.

В результате добавления хлорида натрия к растворам лактоглобулинов происходит уменьшение значения pK_0 как для $-COOH$, так и для имидазольных групп, что является следствием электростатического взаимодействия фонового электролита (рис. 3.1.5, табл. 3.1.3).

Таблица 3.1.3

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

Функциональная группа протеина	Растворитель	Приведенная масса, моль/л	D^* , мл	Qr	pK_0	ΔpK_0
β - Lg-имидазол	H_2O	-	-	25.7	6.07	0.15
β - Lg-имидазол	0.1NaCl	-	-	25.7	5.92	
β - Lg $-COOH$ боковые	H_2O	1410	0.72	12.34	4.45	0.35
β - Lg- $COOH$ боковые	0.1NaCl	356	2.85	48.86	4.10	
β - Lg $-COOH$ концевые	H_2O				6.03	0.34
β - Lg- $COOH$ концевые	0.1NaCl				6.37	
β - Lg-имидазолконц.	H_2O	-	-	25.7	7.47	
β - Lg- $COOH$ конц.	H_2O	2310	0.44	7.54	3.27	

* Количество 0.01 N NaOH, пошедшее на нейтрализацию карбоксильных групп

Ионизация кислотных групп в протеинах вносит большой вклад в устойчивость складчатой и развернутой пространственной структуры, чем

ионизация основных групп. Каждое уменьшение значения pK_a в ионогенной группе в развернутом состоянии на единицу соответствует изменению свободной энергии нативной формы протеина на 1.4 ккал/моль [145]. Действительно, как видно из данных таблицы, значения ΔpK_0 для – COOH групп в два раза больше имидазольных. Согласно литературным данным [153] влияние фонового электролита на значение pK_a гистидинового остатка His-121 в присутствии соли, чрезвычайно велико. В данном случае увеличение концентрации соли в растворе белков усиливает репульсивные (отталкивающие) кулоновские взаимодействия с другими основными группами. Однако у β -Lg гистидиновый остаток, который подвергается ионизации, находится на 156-ом месте [154].

Как показали данные работы, 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.

Приведенная масса 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 (3.1.8) и подтверждает представленную гипотезу о характере равновесной ионизации данного полиэлектролита.

Таким образом, показано, что для всех исследованных объектов в точке перехода потенциометрического титрования происходит излом кривой зависимости pH от величины объема добавленной щелочи [20]. Кривые титрования карбоксильных групп образцов β - Lg стандартного и концентрата различаются между собой, из-за небольшого содержания других белков во втором образце В то же время кривые титрования имидазольной группы одинаковы для обоих образцов. Из этих кривых были вычислены кажущиеся константы диссоциации (pK_a), как функции степени диссоциации (α) согласно вышеприведенной методики. Численные значения pK_a для имидазольной группы β -Lg в водном растворе и в 0.1н 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 [20].

Результаты представленного исследования могут пролить свет на процесс внутри и межмолекулярного взаимодействия пектиновых и лактоглобулиновых полиэлектролитов, которые будут использованы для изучения их комплексообразования.

3.2. Нерастворимые комплексы пектиновых веществ и белков молочной сыворотки

Взаимодействия между полисахаридами и протеинами могут привести к образованию комплексов или коацерватов, которые применяются во многих биологических системах, включая микрокапсулирование и иммобилизацию энзимов. Однако до сих пор функциональная роль полисахаридно-протеиновых взаимодействий не полностью раскрыта. Полисахариды и протеины играют ключевую роль в формировании структуры и стабилизации дисперсной системы. Полисахариды используют в качестве стабилизаторов, а протеины в качестве эмульгаторов. По данным Диккинсона [155] устойчивость и текстура смесей биополимеров зависят не только от их функциональных свойств, а также от природы, силы взаимодействия полисахарида и протеина. В зависимости от силы взаимодействия комплексы могут быть растворимыми или в состоянии агрегированного фазового равновесия. Взаимное притяжение может возникать за счет электростатического, гидрофобного взаимодействия или водородных связей, которые в свою очередь приводят к комплексообразованию полисахаридов и протеинов. Результирующее влияние на комплексы оказывают энтропийные факторы – природа, структура и молекулярный вес биополимеров. Другие факторы имеют энтальпийный характер, их величина зависит от соотношения протеин/полисахарид, от природы и плотности зарядов биополимеров.

Показатели рН и ионная сила раствора также существенно влияют на электростатическое взаимодействие [156]. В исследованиях [157] отмечается, что комплексы β - Lg с пектином обладают медленной кинетикой связывания, что подтверждает существование двух стадий комплексообразования, переходя от молекулярного в агрегированное состояние. Первая стадия соответствует образованию растворимых комплексов – интраполимеров между молекулами. Вторая включает агрегирование этих интраполимерных комплексов с образованием нерастворимых комплексов - межполимеров (теория Тайнака) [157].

Проведенные исследования носят разрозненный характер и не охватывают особенности комплексообразования белков молочной сыворотки, а именно лактоглобулинов с различными пектинами.

В связи с этим, в данной работе изучено образование нерастворимых комплексов пектинов, выделенных из разного растительного сырья (яблочные выжимки, корзинки подсолнечника, кожура и мякоть апельсиновых) с белками молочной сыворотки 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 μ S/см. У 0.25 % раствора белков молочной сыворотки в ацетатном буфере: T_0 63.3 НТУ, рН 3.77, χ 3.73 mS/см. Данные турбидиметрического, потенциометрического и кондуктометрического титрований приведены в таблице 3.2.1, где V_0 30 мл - объем 0.25 % раствора сывороточного белков, γ - объемная доля 0.25 % апельсинового пектина, T_1 - мутность, обусловленная комплексом, T_2 - мутность с поправкой на разбавление раствором пектина.

Из представленной таблицы следует, что в выбранном интервале рН происходит образование нерастворимого пектин-белкового комплекса, заряд которого уменьшается по данным удельной электропроводности.

На рисунке 3.2.1 представлены интегральная и дифференциальная кривые турбидиметрического титрования в зависимости от объемной доли раствора

пектина. Как видно из этого рисунка, интегральной кривая показывает 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 моль лактоглобулинов.



Рисунок 3.2.1. Интегральная и дифференциальная кривые зависимости мутности пектино-белкового комплекса от объемной доли раствора пектина

Результаты турбидиметрического, потенциометрического и кондуктометрического титрований 0.25 % раствора сывороточных белков 0.25 % раствором цитрусового пектина

V, мл	$\gamma=V/(V+V_0)$	1- γ	$\Delta \gamma$	pH	κ , mS/cm	T	$T_1=T-T_0$	$T_2=T_1/(1-\gamma)$	ΔT_2	$\Delta T_2/\Delta \gamma$
1	0.03	0.97		3.66	3.65	147	83.7	86.5		
2	0.06	0.94	0.030	3.69	3.56	240	176.7	188.5	102.0	3372.5
3	0.09	0.91	0.028	3.69	3.49	324	260.7	286.8	98.3	3459.8
4	0.12	0.88	0.027	3.69	3.41	395	331.7	375.9	89.2	3334.5
5	0.14	0.86	0.025	3.69	3.33	401	337.7	394.0	18.1	716.2
6	0.17	0.83	0.024	3.69	3.25	525	461.7	554.0	160.1	6722.4
7	0.19	0.81	0.023	3.69	3.17	575	511.7	631.1	77.1	3421.3
8	0.21	0.79	0.021	3.69	3.11	626	562.7	712.8	81.7	3827.0
9	0.23	0.77	0.020	3.69	3.03	649	585.7	761.4	48.7	2403.6
10	0.25	0.75	0.019	3.69	2.97	671	607.7	810.3	48.9	2540.5
11	0.27	0.73	0.018	3.69	2.91	671	607.7	830.5	20.3	1107.4
12	0.29	0.71	0.017	3.69	2.86	661	597.7	836.8	6.3	359.1
13	0.30	0.70	0.017	3.69	2.8	650	586.7	840.9	4.2	250.2
14	0.32	0.68	0.016	3.69	2.75	641	577.7	847.3	6.4	400.9
15	0.33	0.67	0.015	3.69	2.69	635	571.7	857.6	10.3	676.9

Методом турбидиметрии было изучено обратное титрование 0.25 % раствора апельсинового пектина 0.25 % раствором белков молочной сыворотки. Для этого, растворяли в дистиллированной воде белок молочной сыворотки, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 минут. После этого, раствор доводили до концентрации 0.25 %. Апельсиновый пектин растворяли в 1/15 М ацетатного буфера (рН 3.50), центрифугировали при вышеуказанных условиях. Концентрация пектина составила 0.25 %. Прибавляя определенное количество 0.25 % раствора белков молочной сыворотки к 0.25 % раствору апельсинового пектина в ацетатном буфере, мутность измеряли на турбидиметре.

На рисунке 3.2.2 приведены интегральная и дифференциальная кривые зависимости мутности пектин-белкового комплекса от объемной доли раствора белков молочной сыворотки.

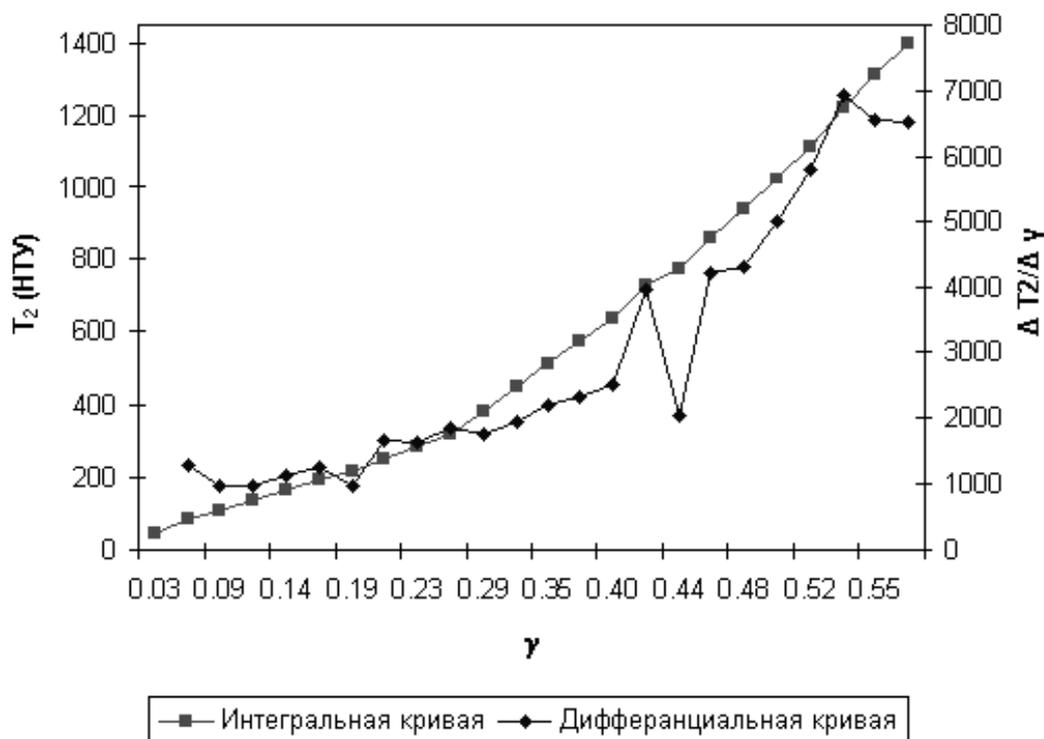


Рисунок 3.2.2. Интегральная и дифференциальная кривые зависимости мутности пектин-белкового комплекса от объемной доли раствора белков молочной сыворотки

Данные турбидиметрического титрования 0.25 % раствора апельсинового пектина 0.25 % раствором белков молочной сыворотки приведены в таблице 3.2.2, где V_0 - начальный объем 0.25 % раствора апельсинового пектина, равный 25 мл, T_0 -мутность 0.25 % раствора цитрусового пектина, равная 41 НТУ, мутность 0.25% раствора белков молочной сыворотки 38.3 НТУ. γ - объемная доля 0.25 % раствора белков молочной сыворотки.

Таблица 3.2.2

Результаты турбидиметрического титрования 0.25 % раствора цитрусового пектина 0,25 % раствором белков молочной сыворотки

$V, \text{мл}$	$\gamma = V / (V + V_0)$	$1 - \gamma$	$\Delta \gamma$	$T,$	$T_1 = T - T_0$	$T_2 = T_1 / (1 - \gamma)$	ΔT_2	$\Delta T_2 / \Delta \gamma$
1	0.03	0.97		84	43.0	44.4		
2	0.06	0.94	0.030	119	78.2	83.4	39.0	1288.9
3	0.09	0.91	0.028	142	100.8	110.9	27.5	966.8
4	0.12	0.88	0.027	162	120.8	136.9	26.0	973.4
5	0.14	0.86	0.025	183	141.5	165.1	28.2	1117.7
6	0.17	0.83	0.024	204	162.5	195.0	29.9	1256.5
7	0.19	0.81	0.023	217	176.0	217.1	22.1	979.8
8	0.21	0.79	0.021	240	199.4	252.6	35.5	1664.1
9	0.23	0.77	0.020	261	219.5	285.4	32.8	1619.2
10	0.25	0.75	0.019	282	240.7	320.9	35.6	1850.3
12	0.29	0.71	0.036	315	273.8	383.3	62.4	1746.8
14	0.32	0.68	0.032	346	304.7	446.9	63.6	1958.1
16	0.35	0.65	0.030	375	334.0	512.1	65.2	2200.8
18	0.38	0.63	0.027	400	359.3	574.9	62.7	2309.1
20	0.40	0.60	0.025	424	382.5	637.5	62.6	2504.8
22	0.42	0.58	0.023	462	420.5	728.9	91.4	3959.2

V, мл	$\gamma=V/(V+V_0)$	1- γ	$\Delta \gamma$	T,	$T_1=T-T_0$	$T_2= T_1/(1- \gamma)$	ΔT_2	$\Delta T_2/\Delta \gamma$
24	0.44	0.56	0.021	470	429.3	772.7	43.9	2053.3
26	0.46	0.54	0.020	500	458.8	856.4	83.7	4217.8
28	0.48	0.52	0.018	525	484.0	935.7	79.3	4293.1
30	0.50	0.50	0.017	552	511.0	1022.0	86.3	5003.5
32	0.52	0.48	0.016	581	539.8	1115.6	93.6	5802.4
34	0.53	0.47	0.015	613	572.0	1220.3	104.7	6922.8
36	0.55	0.45	0.014	638	597.1	1313.6	93.4	6572.1
38	0.56	0.44	0.013	659	618.0	1400.8	87.2	6521.1
40	0.571	0.429	0.013	697	633.2	1477.5	76.7	6082.2

По данным интегральной кривой хорошо видно, что мутность пектин - белкового комплекса по мере увеличения объемной доли раствора белков все время растет, не образуя 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 на рис. 3.2.2 делает необходимым изучить характер этой зависимости при взаимодействии любых соотношений растворов белков молочной сыворотки и пектина. Для решения данной задачи нами приготовлены водный раствор белков молочной сыворотки и растворы пектинов, выделенных из корзинок подсолнечника, выжимок яблок, кожуры и мякоти апельсинов.

Было проведено изучение комплексообразования при взаимодействии 0.1 % раствора пектина с 0.1 % раствором белков молочной сыворотки. Поскольку мутность пектин – белковых комплексов с ростом объемной доли раствора белков (рис. 3.2.2) все время увеличивается, не давая предела в отличие от рисунка 3.2.1,

их готовили, добавляя раствор белков молочной сыворотки в пектин. Помещали 0.1 % раствор пектина в ацетатном буфере (рН 3.50) в стаканчик, приливали при помешивании 0,1 % белок молочной сыворотки. Соотношение растворов бралось таким образом, чтобы общая концентрация полимеров была равна 0.1 %. Содержимое стаканчика выливали в ампулу, которую помещали в турбидиметр и измеряли мутность в НТУ. Параллельно проводилось определение рН и χ .

В таблице 3.2.3 приведены результаты изучения процесса комплексообразования при взаимодействии 0.1% раствора пектинов с 0.1 % раствором белков молочной сыворотки методами турбидиметрии, потенциометрии и кондуктометрии.

Таблица 3.2.3

Характеристики растворов подсолнечного, яблочного и цитрусового пектинов, белков молочной сыворотки и комплексов на их основе

γ	Т (НТУ)			рН	χ , mS/cm		
	Подсол.	Ябл.	Цитрус.		Подсол.	Ябл.	Цитрус.
0	54.4	16	34.1	3.6	3.15	3.15	3.19
0.1	72.7	27	74.2	3.6	2.91	2.91	3.13
0.2	87.8	60	97.8	3.6	2.79	2.79	2.78
0.3	98.9	16	114.7	3.6	2.49	2.49	2.44
0.4	113.2	22	131.7	3.6	2.19	2.19	2.13
0.5	147.8	24	167.5	3.6	1.90	1.90	1.88
0.6	167.8	44	166.1	3.6	1.53	1.53	1.54
0.7	197.7	85	111	3.6	1.23	1.23	1.24
0.8	310.1	46	84.5	3.6	0.90	0.90	0.90
0.9	470.9	52	48.0	3.7	0.57	0.57	0.57
1	14.5	14	14.5	4.5	0.15	0.15	0.15

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

Как видно из указанной таблицы, в узком интервале рН происходит образование нерастворимых пектин - белковых комплексов, заряд которых уменьшается по данным удельной электропроводности.

На рисунке 3.2.3 представлены кривые зависимости мутности комплексов на основе исследованных пектинов и белков молочной сыворотки в зависимости от объемной доли γ . Видно, что с ростом этой величины мутность плавно увеличивается, достигая предела при небольших значениях объемной доли белков (0.5) с апельсиновым пектином, а с яблочным пектином, достигая предела при $\gamma = 0.7$ и в дальнейшем уменьшается.

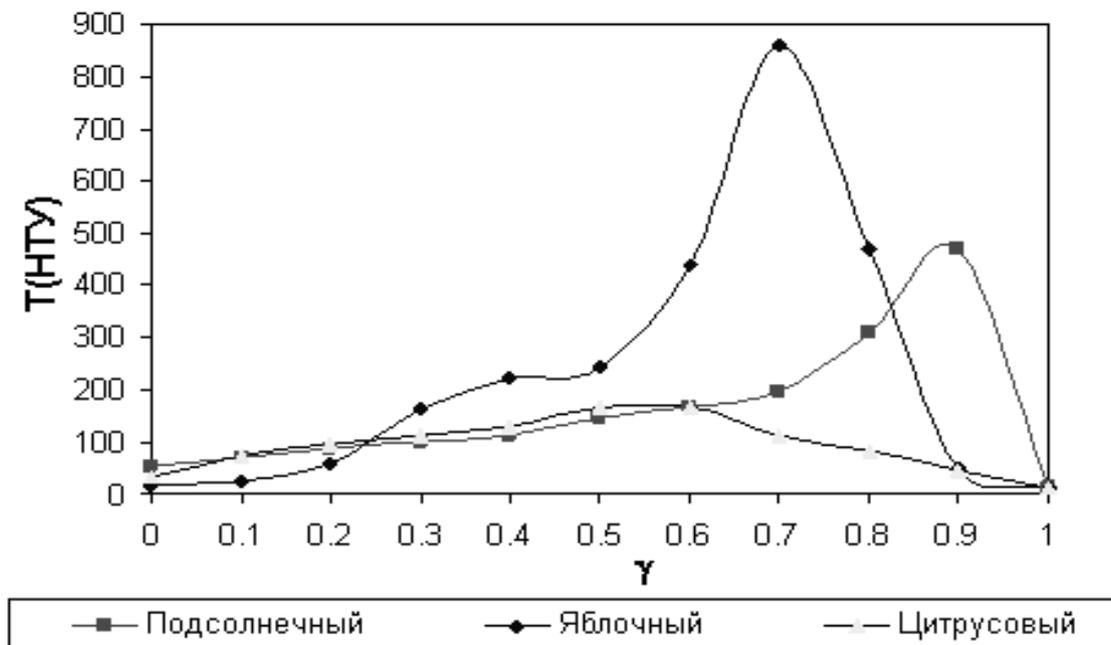


Рисунок 3.2.3 - Кривые зависимости мутности комплексов на основе исследованных пектинов и белков молочной сыворотки в зависимости от объемной доли белка γ

В случае с подсолнечным пектином возрастание выхода продолжается до больших значений объемной доли (0.9), затем падает. Такая закономерность хорошо согласуется со степенью этерификации (СЭ) пектинов. Чем меньше СЭ, где имеется много свободных карбоксильных групп, тем больше требуется

положительно заряженных белковых молекул для образования нерастворимого комплекса.

Сравнивая кривые, приведенные на рисунке 3.2.3. можно отметить, что наибольшая мутность и, соответственно, выход наблюдается 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 на основе того пектина, у кого выше молекулярный вес. В данном случае у яблочного пектина M_w выше, чем у подсолнечного. Наименьшим значением мутности (выхода) обладает комплекс на основе цитрусового пектина. Низкие значения мутности в последнем случае можно объяснить высокой степенью этерификации цитрусового пектина. Указанные выше различия в структуре подсолнечного, яблочного и цитрусового пектинов оказывают влияние на особенности их взаимодействия с белком молочной сыворотки при образовании нерастворимых комплексов. Кроме того, необходимо отметить, что турбидиметрический метод является быстрым для определения характеристики нерастворимых комплексов на основе пектина и различных белков [158].

3.3. Исследование взаимодействия низкометилованных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки

В данной части работы обсуждаются результаты изучения процессов образования комплексов низкометилованного пектина подсолнечника (ПдП 2М 85-2, ГК 68.8 %; СЭ 45.2 %; M_w 142.4 КД) и концентрата белков молочной сыворотки (КБМС) с помощью метода потенциометрического титрования. КБМС был получен из подтворожной сыворотки методом ультрафильтрации [37]. Его состав и степень чистоты анализировали на капиллярном электрофорезе (Agilent HPCE G1600AX) с использованием компьютерной программы Agilent ChemStation Software B.02.01 SR2. Для разделения лактоглобулинов молочной

сыворотки (МС) 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 КД, альбумин 66.0 КД и α - лактоальбумин 14.0 КД). Растворы белков готовили в 5 мМ фосфатном буфере при рН = 2.9 с добавлением 1М мочевины. Все растворы фильтровались через 0.45 мкм мембранный фильтр перед введением в капилляр электрофореза. В качестве ведущего электролита использовали 10 мМ фосфатный буфер с рН = 2.9. Количественный состав КБМС, полученный новым методом представляет собой 37.35 % β - Lg А; 52.9 % β - Lg В; и 9.7 % α - Lа соответственно.

Найденные значения pK_0 для основных и концевых карбоксильных и имидазольных групп гистидинового остатка стандартного образца β -Lg лактоглобулина (β - Lg) в работе [159] хорошо согласуются с известными данными [151].

С помощью потенциометрического титрования можно наблюдать за процессом комплексообразование путем титрования кислотных и основных групп протеина. Предполагается, что отрицательно заряженный НМ-пектин взаимодействует с β - Lg посредством карбоксильных, amino, имидазольных и гуанинных групп в пептидной цепи белка. Для того чтобы понять комплексообразование двух полиэлектролитов в растворе, важно представить модель полиионов в растворе [151]. Если достаточное количество нейтрального простого электролита, такого как хлорид натрия, добавлен в раствор полиэлектролита, структура полииона будет окружена цилиндрической ионной атмосферой и полимерный цепь приобретает более или менее спиральную конформацию.

С целью изучения взаимодействия сывороточного белка молока с пектином мы использовали КБМС и НМ-пектин из подсолнечника (ПдП2М 85-2, ГК 68.8%; СЭ 45.2 %; M_w 142.4 КД) при двух значениях рН 3.75 и 5.6 в растворе ацетатного буфера. Соответствующее количество раствора НМ-пектин (0.607 мг/мл) было добавлено к 5 мл раствора КБМС, содержащего 0.35 мг/мл белка, при температуре 24 °С для получения весового соотношения протеин/пектина 1:1, 2:1,

4:1 и 6:1 соответственно. Титрование проводили на рН метре 827 рН lab. Metrohm, электроды калибровались с помощью стандартных буферных растворов (Metrohm рН 4.00; 7.00; и 9.00). При кислом растворе рН (3.75), в системе протеин/пектина наблюдалось разделение фаз. Растворимая и нерастворимая фаза была разделена посредством центрифугирования при 4500 об/мин в течение 30 минут. Обе фазы были исследованы на содержания свободной фракции протеина и пектина, а также степени набухания нерастворимого комплекса. Полученные таким образом, данные приведены в таблице 3.3.1.

Из данной таблицы видно, что выход нерастворимого комплекса с увеличением мольной доли протеина проходит через максимум. Максимальный выход комплекса обнаружен при весовом 2:1 или мольном соотношении КБМС/пектин 0.86. При низком соотношении КБМС/пектин комплексы имеют высокую степень набухания, в то время как с увеличением содержания протеина в комплексе она уменьшается, а и при дальнейшем возрастании содержание белка не зависит от состава комплекса. Если в нерастворимой части комплекса преобладают пектиновые макромолекулы (78 – 97 %), то растворимая фракция состоит из 75 до 90 % протеинов. Поскольку pK_0 ПдП находится ниже этой точки, то диссоциация карбоксильных групп подавляется положительно заряженными группами белков, что приводит к агрегативному разделению пектина.

Процесс формирования нерастворимого комплекса КБМС с различными пектинами нами было изучено методом турбидиметрического титрования и описано в работе [160]. Поэтому в данной работе мы приводим только результаты исследования растворимой части комплексов путем титрования кислых и основных групп протеина растворами щёлочи или кислоты соответственно. Растворы супернатанта после осаждения нерастворимой части, титровались 0.1 N NaOH.

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	97.33	7.0	86.70	2.67
0.86	36.9	9.92	95.04	3.0	90.08	4.96
1.73	23.1	1.05	83.26	3.0	81.95	1.74
2.60	21.4	24.84	78.53	4.0	75.16	21.47

Кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп протеинов приведены на рисунке 3.3.1. Как видно, при равном соотношении КБМС/НМПдП количество титруемых групп уменьшается, а с увеличением доли белков кривые вновь смешаются в сторону увеличения и становятся близки с кривыми КБМС. Авторами [161] было показано, что рН растворимого комплекса соответствует начальным точкам перегиба кривых титрования и отмечены как рН_с. Дальнейшее увеличение количества титранта (рН смеси) приводит к фазовому разделению в системе.

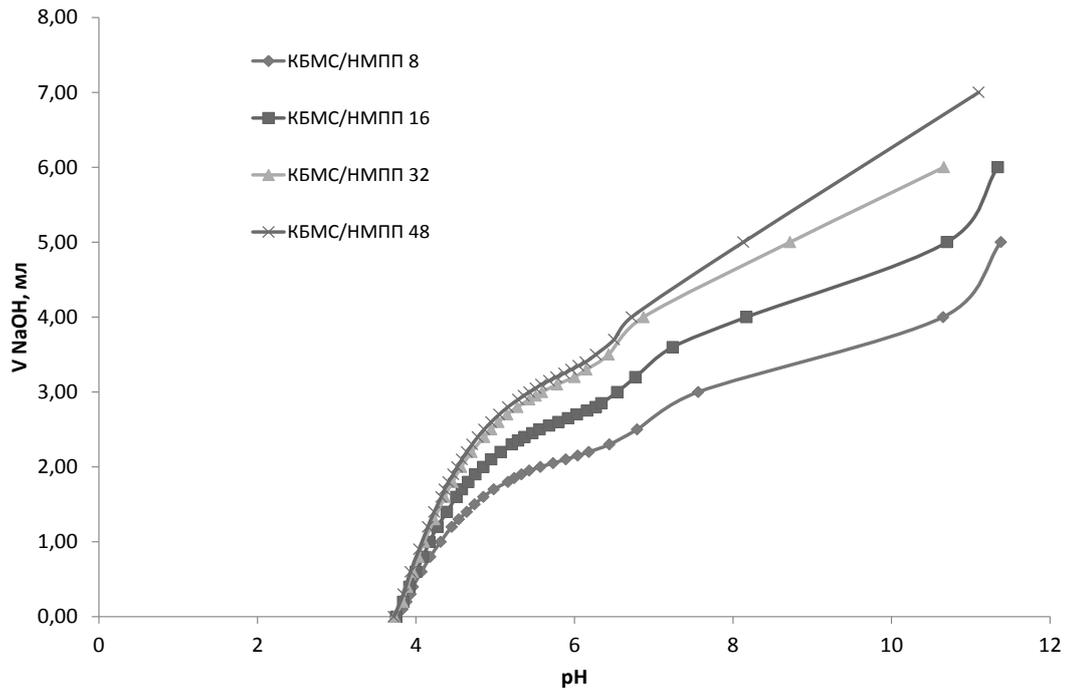


Рисунок 3.3.1 - Кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп протеинов КБМС, β -Lg и комплексов КБМС с НМ-пектином.

При увеличении соотношения КБМС/НМППдП, pH_c соответствовал значению 5.3 ± 0.1 , а количество титранта, необходимого для нейтрализации свободных карбоксильных групп, полученных комплексов, при этом возрос от 1.85 мл до 2.9 мл. При pH 5.6, $pH > ИТ$ (изоэлектрической точки) лактоглобулинов, было изучено комплексообразование КБМС с НМППдП в водном растворе и в растворе, содержащем NaCl. В дальнейшем, мы провели потенциометрическое и кондуктометрическое титрование растворимой фракции, используя раствор NaOH для кислотных и HCl для основных групп титрования.

В общем, в пределах исследованных экспериментальных условий не произошло никакой классической фазы разнесения, в отличие от pH 3.75. При смешивании двух полимеров, образовались либо опаловая одно-фазовая система,

либо чистая жидкая фаза с небольшим количеством осадка, зависимым от общей концентрации биополимера и их соотношения.

Рисунок 3.3.2 отображает кривые титрования КБМС и КБМС/НМПдП комплексов при разных соотношениях с 0.1 н NaOH без добавления электролита при ионной силе $I = 0.01$ М.

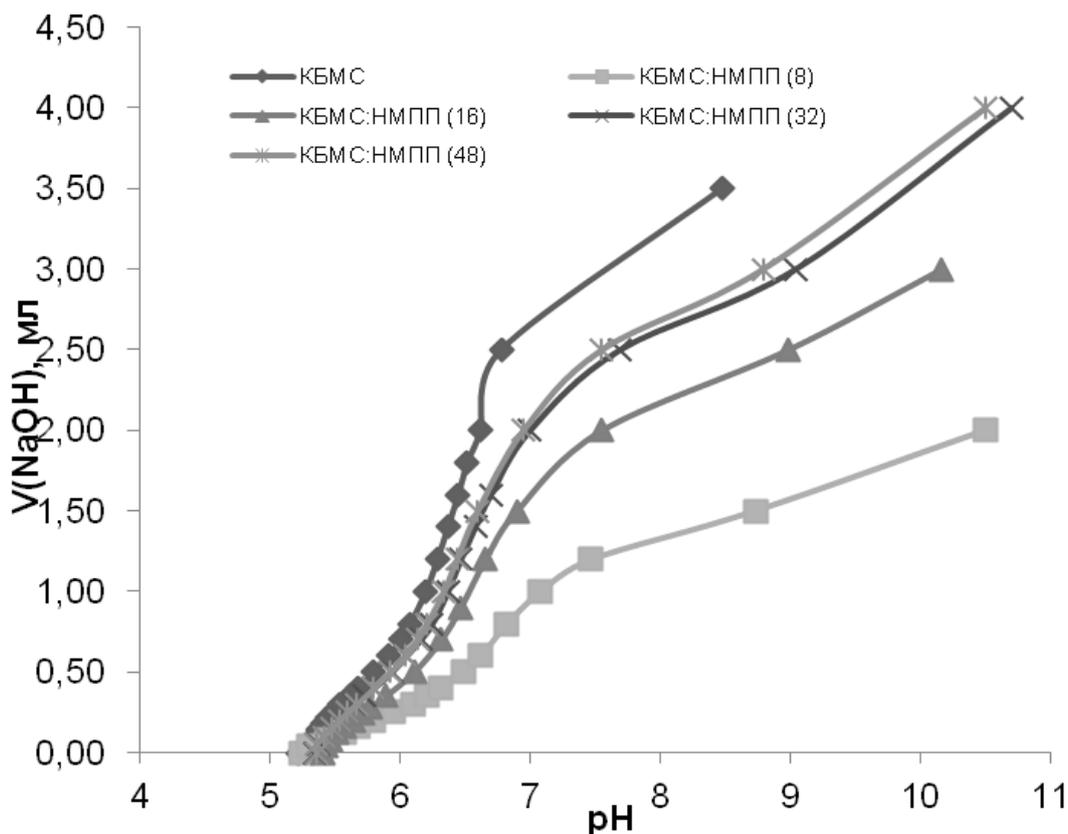


Рисунок 3.3.2 - Кривые титрования КБМС и КБМС/НМПдП комплексов при разных соотношениях с 0.1н NaOH без добавления электролита при $I = 0.01$ М, $pH_c = 6.28$.

Видно, что pH_c не зависимо от соотношения биополимеров находится в области pH 6.28. Такая закономерность была обнаружена в работе [162] при изучении комплексообразования в системе чистого β -Lg и НМ- и ВМ- пектина. При pH 6.5 некоторые свободные карбоксильные группы пектина и протеина

могли быть ионизированы или образовывали комплекс, нейтрализация которого потребует больше титранта, чем при pH 3.5. Данный факт, свидетельствующий о том, что пектин и протеин в первом случае существует в свободной форме (раствор супернатанта), а во втором - они формируют комплекс. На нейтрализацию комплекса с низким соотношением биополимеров расходуется меньше титранта, чем с большим. Известно [163,164], что комплексообразование между протеинами и пектином происходит в 2 стадии: в начале образуется внутримолекулярные комплексы, где на молекулу пектина приходится до 8 протеина и его размер (комплекса) сопоставим с размером молекулы пектина. Во второй стадии образуются межмолекулярный комплекс (интерполиэлектrolитный), через агрегации первых.

При титровании основных (имидазольных) групп КБМС/НМПдП раствором 0.1М HCl образование комплекса не было отмечено, так как точки перегиба на кривых титрования (рис. 3.3.3) не были заметными. Поэтому для обнаружения pH_c предварительно, pH растворов в смеси биополимеров было установлено при значении 7.5 с помощью раствора NaOH, и затем смесь титровали раствором HCl до значения 4.5 близкой к pK_a пектина.

Для примера приводим кривые титрования основных групп (рис. 3.3.4) для образцов β - Lg, КБМС и их комплексов с НМПдП. Как видно, pH_c на кривых потенциометрического титрования комплекса чистого β - Lg с НМПдП отличается от pH_c и характера кривых титрования КБМС с пектином. Указанный рисунок показывает на то, что комплексообразование НМПдП с β -Lg и КБМС отличается и происходит при различных pH_c , хотя кривые титрования исходных образцов одинаковые. Такое отличие в профилях кривых может быть из-за вовлечения альбумина и лактоальбумина (α - La) в комплекс при использовании КБМС.

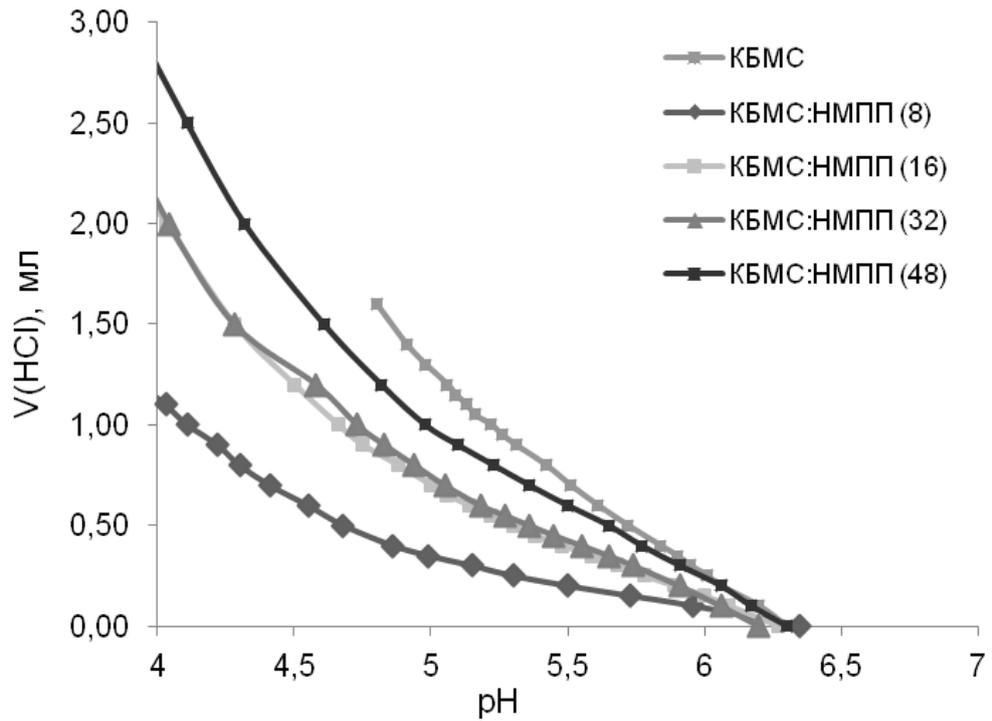


Рисунок 3.3.3 - Кривые титрования основных (имидазольных) групп
 KBMS /NMPP комплексов с 0.1М HCl

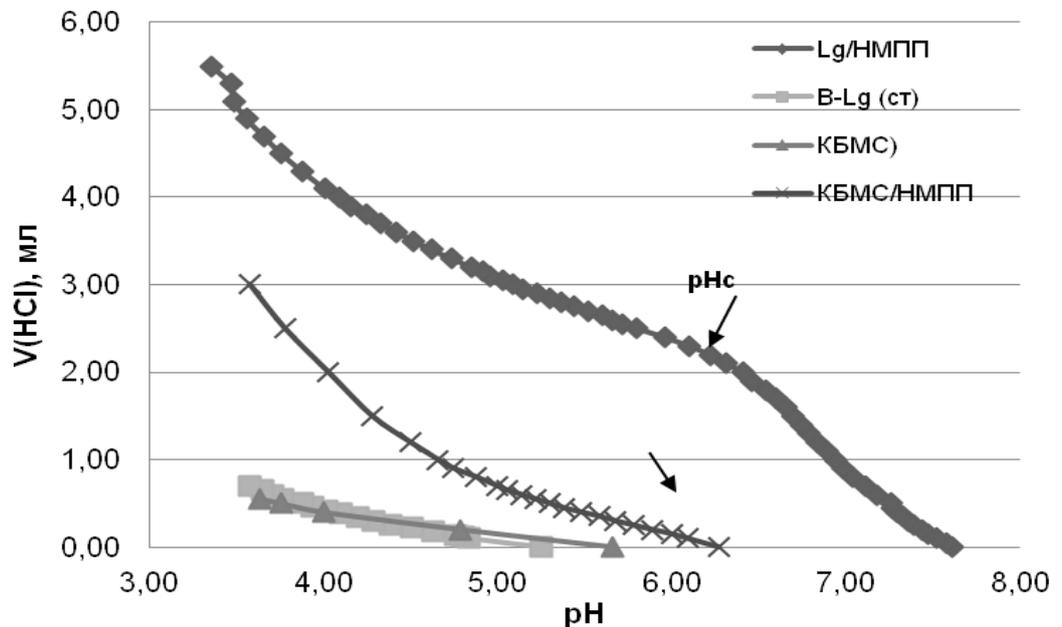


Рисунок 3.3.4 - Кривые титрования основных групп β - Lg, KBMS и
 комплекса KBMS/NMPP (32) с 0.1М HCl.

Для того, чтобы оценить роль электростатического взаимодействия и водородных связей на pH_c , было изучено влияние низкомолекулярного электролита на процесс комплексообразования путем добавления 100 mM хлорида натрия к водному раствору биополимера. Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПдП (32) с 0.1M HCl без добавления хлорида натрия ($I=0.07$) и с его добавлением ($I=0.17$) представлены на рисунке 3.3.5.

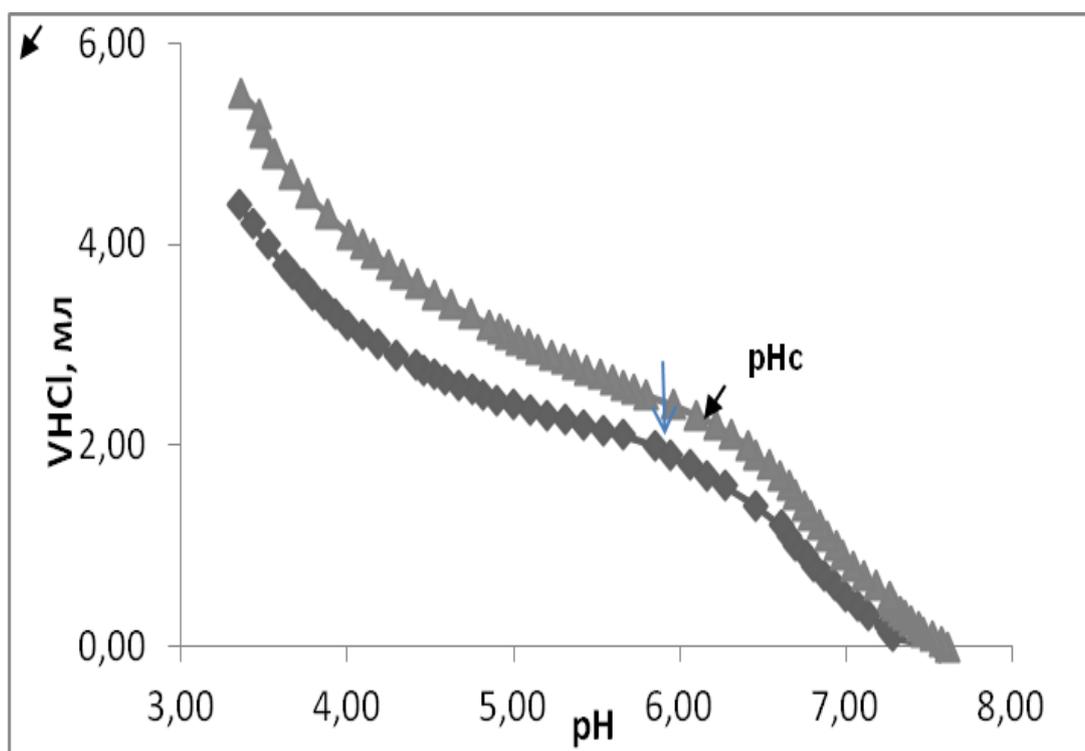


Рисунок 3.3.5 - Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПдП (32) с 0.1M HCl при $I=0.07$ (треугольники); $I=0.17$ (квадратные) точки.

Ионная природа хлорида натрия экранирует электростатическое взаимодействие между биополимерами. Добавление электролита ослабевает удержание H^+ ионов комплексом, pH_c уменьшается, и это означает, что ионы натрия уменьшают взаимодействие между протеином и пектином. Это также

подтверждает изменение кажущейся pK_a аминокислотных остатков протеина (рис. 3.3.6) в присутствии хлорида натрия (pK_0 8.72) и без (pK_0 8.44).

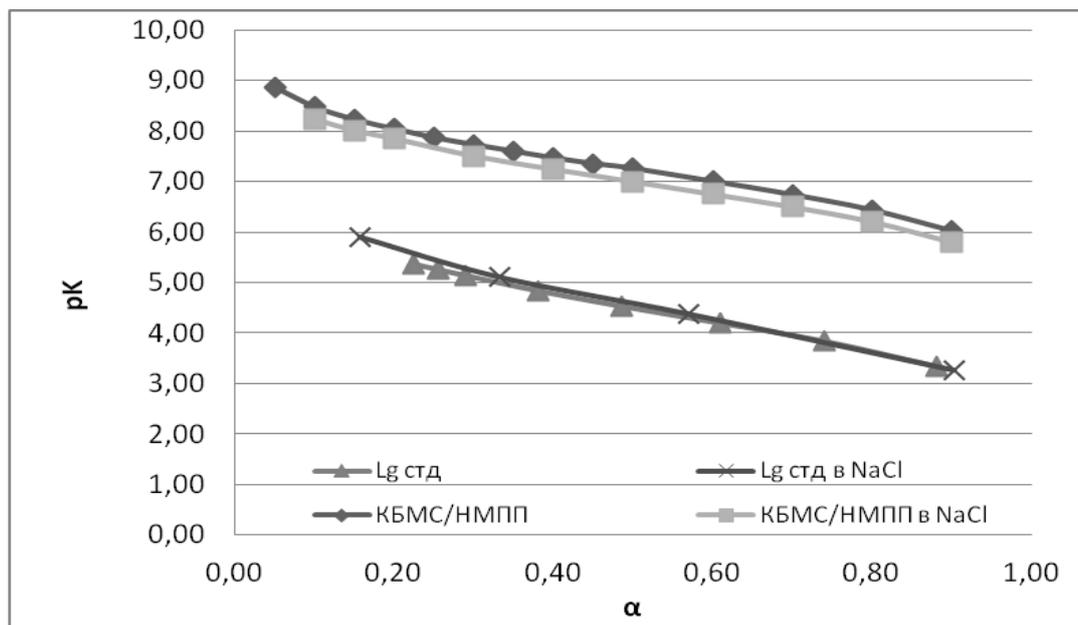


Рисунок 3.3.6 - Зависимость pK_a от степени ионизации основных групп в комплексе КБМС/НМПдП (32) с 0.1М НСl при $I=0.07$ (треугольники); $I=0.17$ (квадратные).

Поэтому, комплексообразование β -Lg с НМПдП при $pH = 6.5$ может быть изучено методом потенциометрического титрования, но не турбидиметрией. Поскольку суммарный заряд β -Lg является отрицательным при $pH > ИТ$, его связывание с НМПдП при $pH > 5.6$ соответствует комплексообразованию “на неправильной стороне” ИТ. Такое явление, т.е. когда оба биополимера отрицательно заряжены, были обнаружены между полисахаридами и белками в ряде других случаев [164,165,166,161,162]. Электростатическое взаимодействие приводит к потере гибкости и подвижности полимерной цепи, но при этом реакция протекает за счет выигрыша энтальпии и энтропии, вызванной суммарным отрицательным зарядом биополимеров.

Таким образом, потенциометрическое титрование растворимых комплексов продемонстрировало качественную картину образования комплекса между концентратом белков молочной сыворотки и НМ-пектина. При $pH > ИТ$ лактоглобулина взаимодействие происходит за счет отрицательного заряда

сегментов цепи НМ-пектина и положительных зарядов локальных очагов молекул протеина. Образование комплекса соответствует изгибу кривых титрования от pH_c . Этот параметр pH_c не зависит от соотношения биополимеров, ионная сила уменьшает её величину и способствует образованию стабильных комплексов.

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

Качественное изучение процесса комплексообразования между концентратом белков молочной сыворотки (КБМС) с различными пектинами посредством метода потенциометрического титрования было представлено в предыдущем разделе [167].

С целью количественного изучения взаимодействия КБМС с пектинами использован метод капиллярного электрофореза (КЭ), посредством анализа несвязанной части белков прошедших через ультрафильтрационную мембрану, как описано в работе [168] при изучении комплексообразования в системе β -лактоглобулин (Lg) с пептидами и цитрусовыми пектинами. В работе использовали очищенный образец сывороточных белков молока, полученный с применением диаультрафилтрации, так называемый изолят сывороточного белка (ИСБ), низкометилованный (НМ-) пектин подсолнечника с содержанием ГК 66 %; СЭ 47 %; M_w 140 КД; высокометилованный (ВМ-) яблочный пектин: ГК 68 %; СЭ 52 %; M_w 130 КД и ВМ-апельсиновый пектин: ГК 83 %; СЭ 69 %; M_w 65 КД. Количественный состав ИБС, полученный новым методом, представлен из 99.95 % белков молочной сыворотки и состоит из 37.35 % β - LgA, 52.9 β - LgB и 9.7 % α - La.

Комплексное взаимодействие между КБМС и различными пектинами проводили таким образом: КБМС и пектины растворяли в 5 mM буферном растворе при значениях pH 5.5. Растворы пектина были добавлены к раствору

КБМС для получения весового соотношения пектина/протеин от 1:5 до 1:30 или в молярном соотношении 1:20 - 1:300 соответственно, в ультрафильтрационной ячейке (Millipore Steril AsepticSystem) с мешалкой на мембране УПМ-П (Владипор, Россия), пропускающей молекулы с весом 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. Пектины и его комплексы с КБМС задерживались на мембране, в то время несвязанные белки лактоглобулина проходили через нее в фильтрат. Количество белка в исходном и в растворе фильтрата определяли методом Седмака [116] и на КЭ на приборе 3D Agilent HPCEG 1600AX с использованием компьютерной программы Agilent ChemStation Software B.02.01 SR2. Для разделения LgC 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 18.0 КД, альбумин 66.0 КД и α -лактоальбумин 14.0 КД). Растворы белков готовили в 5 мМ фосфатном буфере при pH = 2.9 с добавлением 1 М мочевины. Все растворы фильтровались через 0.45 мкм мембранный фильтр перед введением в капилляр электрофореза. В качестве ведущего электролита использовали 10 мМ фосфатный буфер с pH = 2.9 [37]. Количество связанного белка с пектином было определено с использованием уравнения :

$$A \% = ((m_{br} - m_{bf}) / m_{br}) \cdot 100, \quad (3.4.1)$$

где M_{br} - количество ИБС в исходном растворе; M_{bf} – количество ИБС в растворе фильтрата.

Величина заряда на поверхности комплекса относительно изоионной точки протеина в комплексе протеин/пектин была вычислена при использовании массы протеина, пектина (M_{Lgs} и M_p) [147] и молярной массы комплекса (M_c):

$$Qr = V_t N_i / ((m_{Lgs} + m_p) / M_c) \quad (3.4.2)$$

молярную массу комплекса (M_c) вычисляли из данных титрования:

$$M_c = (m_c \cdot 1000) / (V_t \cdot N_t), \quad (3.4.3)$$

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

Согласно теории Тайнаки [164], комплексы между протеинами и полиэлектролитами проходят в две стадии. Первая стадия соответствует образованию интраполимерного комплекса. Интраполимерный комплекс это соединение нескольких протеиновых молекул на одной цепи полиэлектролита. Во второй стадии происходит объединение интраполимерных комплексов, которые производят интерполимерные комплексы.

Тургеон с соавторами [156], показали, что комплексообразование β – Lg с НМ- и ВМ- пектинов при рН 4.0 в растворе 5 мМ фосфата натрия происходит согласно теории Тайнаки в две стадии. В первой стадии на одну молекулу НМ - пектина приходится восемь молекул β - Lg и на одну молекулу ВМ - пектина 6 β – Lg. Во втором процессе стехиометрии комплексов равнялись 16 и 15 β - Lg лигандов на молекулу пектина, соответственно. В первой стадии образуются растворимые интраполимерные комплексы, а во второй стадии интраполимерные комплексы агрегируются с образованием интерполимерных комплексов. Количество β - Lg (18 КД), связанной на каждой молекуле пектина (94.3 КД) при рН 4 - весьма высокое относительно молекулярных масс данных биополимеров. При тех же условиях, методом капиллярного электрофореза эти авторы [163] выявили, что при образовании интерполимерных комплексов его стехиометрия соответствует 21 и 13 молекул β –Lg на одну макромолекулы НМ- и ВМ пектинов соответственно. Это несоответствие в результате методов были объяснены поляризующим эффектом электрического поля при использовании метода КЭ в изучении комплексообразования между β – Lg и пектином [163], который способствовал диссоциации комплексов и позволил снизить, до некоторой степени, вклад водородных связей в комплексе.

Авторами [163] было показано, что вклад водородных связей в комплексообразование между протеинами и ВМ-пектином больше, чем в системе с НМ-пектинами. Взаимодействие образованное за счет функциональных групп пектина были сильнее в комплексах с НМ - пектином чем с ВМ - пектином, чем ниже СЭ пектина тем сильнее связывание. Это было показано в работе [170], с применением ультрафильтрации.

Комплексообразование между протеинами и полисахаридами, возможно, имеет кооперативный характер [166, 170]. Авторы [170] высокую кооперативность связывания в смеси β – Lg/НМ при рН 5,5 в присутствии 5 mM фосфатного буфера объясняют слабым зарядом на поверхности протеина, который способствуют объединению протеиновых макромолекул.

Принимая во внимание кооперативное связывание β - Lg с пектинами мы провели исследование взаимодействия в системе КБМС с тремя пектинами: НМ подсолнечника, ВМ-яблочного и ВМ - апельсинового с высоким весовым соотношении КБМС/пектин от 1:5 до 1:28, соответственно равное молярному соотношению от 1:52 до 1:314. Все изученные пектины показали свою высокую способность взаимодействовать с КБМС (А) при высоких соотношениях КБМС/пектин. Результаты представлены в таблицах 3.4.1- 3.4.4.

Таблица 3.4. 1

Характеристика комплексов КБМС с ВМ - яблочным пектином при рН 5.5

Весовое соот-ние ВМЯ/КБМС	м/м	m₆, мг	m_{6f}, мг	A, %	Q_r	N, моль
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

Характеристика комплексов КБМС с НМ-подсолнечным пектином
при pH 5.5

Весовое соот-ние НМП/КБМС	м/м	m₆, мг	m_{6f}, мг	A, %	Q_r	N, моль
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. 3.4.3

Характеристика комплексов КБМС с ВМ - цитрусовым пектином
при pH 5.5

Весовое соот-ние ВМЦ/КБМС	м/м	m₆, мг	m_{6f}, мг	A, %	Q_r	N, моль
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

Также приведены величины относительного заряда на поверхности (Q_r) КБМС/пектин комплекса, стехиометрия связывания КБМС/пектин.

Как видно из данных указанных таблиц характер изменения процента связывания КБМС в комплексе у всех изученных систем одинаковый: при низких соотношениях она высокая, затем, уменьшается и снова возрастая, достигает максимального значения. Причем, максимальное значение процента связывания в

комплексе КБМС у всех пектинов одинаково и равно 92 %. Характер изменения относительного заряда на поверхности комплекса одинаков с предыдущим параметром и соответствует плотности заряда на поверхности пектина, который пропорционален СЭ пектина.

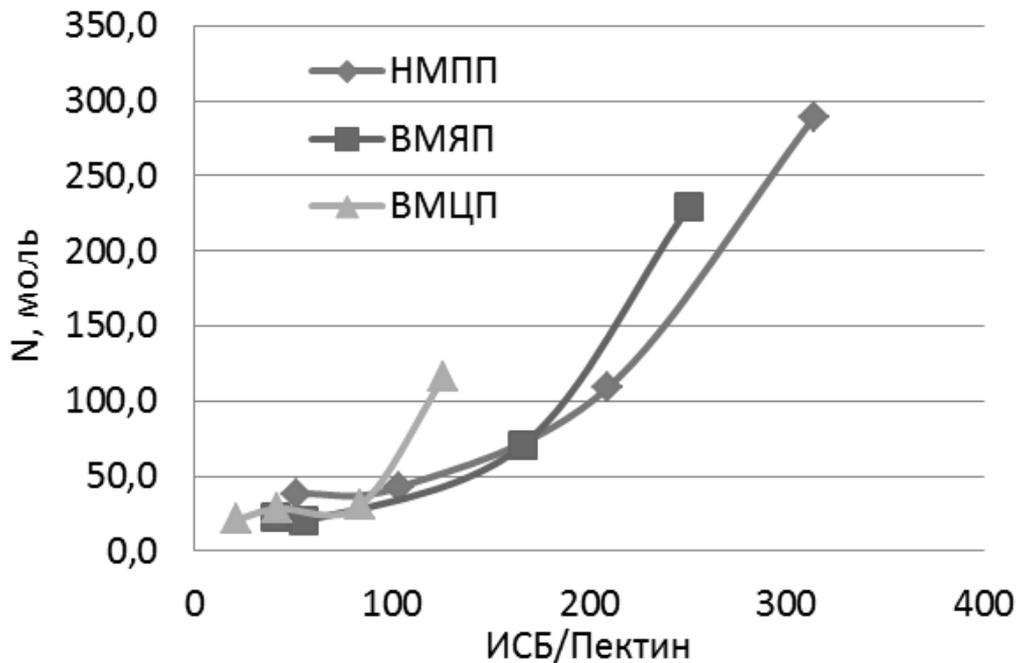


Рисунок 3.4.1 - Влияние соотношения ИСБ/пектин на количество связанных белков (N, моль)

Заряд от поверхности макромолекулы пектина постепенно переходит на поверхности протеинов и соответствует количеству молей протеинов в комплексе. Действительно, с увеличением фракции КБМС происходит одновременное взаимодействие протеинов на поверхности комплекса друг с другом, как было показано в работе [163], в результате, на поверхности интерполимерного комплекса остаются только молекулы протеина (рис. 3.4.1.) Это указывает на кооперативное взаимодействие протеинов на поверхности уже сформировавшегося комплекса. Кооперативный характер связывания у пектинов растет в ряду ВМЦП, ВМЯП и НМПП. Однако, количество связанного белка у пектинов изменяется в обратном порядке. Для количественной оценки и состава комплексов мы провели анализ белкового состава в растворах фильтрата и

ретентата капиллярным электрофорезом, пользуясь покрытой капиллярной колонкой USIL-WAX (50.0 μm , с общей длиной 95.0 см и эффективной - 70.0 см) на КЭ Agilent (США). Результаты анализа белкового состава растворов при комплексообразовании ИСБ с яблочным пектином с молярным соотношением 1:41 приведены в таблице 3.4.4. Процент связывания протеина пектином составляет 50.01 %, что соответствует проценту связывания белков найденным методом Седмака (табл. 3.4.2).

Для количественной оценки и состава комплексов мы провели анализ белкового состава в растворах фильтрата и ретентата капиллярным электрофорезом, пользуясь покрытой капиллярной колонкой USIL-WAX (50.0 μm т.е., с общей длиной 95.0 см и эффективной длиной 70.0 см) на КЭ Agilent (США). Результаты анализа белкового состава растворов при комплексообразовании КБМС с яблочным пектином с молярным соотношением 1:41 приведены в таблице 3.4.4. Процент связывания протеина пектином здесь составляет 50.01 %, что соответствует, проценту связывание белков найденным методом Седмака.

Таблица 3.4.4

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

Состав ИСБ	Кол-во, протеина в исх. рас. мг	Кол-во свободно протеина в фильт-те, мг	протеин/пектин в ретентате, мг	ИСБ в комплексе, %	связанных протеинов от исходной смеси, %
β -Lg A	0.2661	0.0947	0.1033	64.41	25.64
β -Lg B	0.3234	0.215	0.1335	33.52	16.21
α -Lg	0.0587	0.0245	0.037	58.26	5.12
Albumin	0.0204	0	0	0.00	3.05
Всего	0.6686	0.3342	0.2738		50.01

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 (pK_0) и изменение электростатической составляющей ΔpK_0 , дана оценка механизма процессу комплексообразования.

3. Найдены численные значения pK_a для имидазольной группы β - Lg в водном растворе и в 0.1 Н растворе NaCl, равные 6.07 и 5.92 соответственно. Зависимость величины pK_a от степени диссоциации для всех функциональных групп макромолекул лактоглобулинов показала, что они относятся к полиэлектролитам 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 $pH > ИТ$ 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 -Lg А, 33.52 % β -Lg В, 58.26 % α -Lg, 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 СОКРАЩЕНИЙ

БР	Блочное распределение
ВМП	Высокометилованный пектин
ГК	Галактуроновая кислота
M _w	Молекулярный вес
ИСБ	Изолят сывороточного белка
ИПЭК	Интерполиэлектrolитный комплекс
ИТ	Изоэлектрическая точка
КБМС	Концентрат белков молочной сыворотки
КЭ	Капиллярный электрофорез
МГ	Микрогель
МС	Молочная сыворотка
МЭКХ	Мицеллярная электрокинетическая хроматография
НС	Нейтральные сахара
НМП	Низкометилованный пектин
ОС	Олигосахариды
ПВ	Пектиновые вещества
ПААГ	Полиакриламидный гель
ПдП	Подсолнечный пектин
ПП	Пектиновый полисахарид
pK _a	Кажущаяся константа ионизации
pH _c	pH образование комплекса
СЭ	Степень этерификации
СР	Случайное распределение
Т	Мутность
ЦП	Цитрусовый пектин
ЭЖХ	Эксклюзионная жидкостная хроматография
ЯП	Яблочный пектин

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolstogulzov, V. B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. / V. B. Tolstogulzov // *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002. – 22. - P. 89-174.
2. Willats, W.G.T. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel / W.G.T Willats, J.P. Knox and J. D. Mikkelsen // *Trends in Food Science & Technology* 17. - 2006. - P. 97–104.
3. Мухидинов, З.К. ПЕКТИН - лечебно-профилактический продукт для здоровых и больных. / З.К. Мухидинов, Д.Х. Халиков // Монография, НПИЦентр. – Душанбе. 2005.- 60 с.
4. O’Neil, M. A. The plant cell wall. *Annual Plant Reviews.* / M. A. O’Neil & W. S. York In J. K. C. Rose (Ed.)// - Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003. – V.8. - P. 1–54.
5. Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* , 2008. – V.11. – P. 266–277.
6. Vincken, J.P. If Homogalacturonan were a side chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. / J.P. Vincken H.A. Schols, R.J. Oomen, McCann, P. Ulvskov, AG.J. Voragen, and R.G.F Visser. // *Plant Physiology*, August 2003. - V. 132. - № 4. - P. 1781–1789.
7. Fishman, M. L. Global Structures of High Methoxyl Pectin from Solution and in Gels. / M. L. Fishman, P. H. Cooke, H.K. Chau, D.R. Coffin. and. A. T. Hotchkiss. // *Biopolymers.* - 2007. – V.8. - P. 573.
8. Muhidinov, Z.K. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins. / Z.K. Muhidinov, M.L. Fishman, Kh.Kh. Avloev et al. // *Polymer Sciences Journal, Series A*, 2010. - V.52. - No 12. - P.1257-1263.
9. Kirby, A. R. Atomic force microscopy of tomato and sugar beet pectin molecules. / A.R. Kirby, A.J. MacDougall, V.J. Morris. // *Carbohydrate Polymers*, 2008. – V.71. - P. 640-647.

10. Мухидинов, З.К. Молекулярная масса пектинов полученных в автоклаве. / З.К. Мухидинов, М.Л. Fisman, Р.М. Горшкова и др. // Химический журнал Казахстана, спец. выпуск (21) октябр. - 2008. – Алматы. - С. 60-65.
11. Мухидинов, З.К. Анализ ММР пектинов, полученных в автоклаве. / З.К Мухидинов, М.Л. Fisman, Р.М. Горшкова и др.// Химический журнал Казахстана, спец. выпуск (21) октябр. – 2008. – Алматы. - С. 83-87.
12. Muhidinov, Z.K. Molar mass and molar mass distribution of pectin from different sources. / Z.K. Muhidinov, A.S. Nasridinov, R.M. Gorshkova, D.Kh. Khalikov, M. Fishman //Abstract Book, 14th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes (MMC), University of Helsinki, -Helsinki, Finland, August 14-17. – 2011. - P. 110.
13. Оводов С.Ю. Современные представления о пектиновых веществах. Обзорная статья, Биоорганическая химия. -2009. – Т. 35. - №3. – С.293-310.
14. Rinaldo, M. Physicochemical properties of pectins in solution and in gel sates. / M. Rinaldo, In J. Visser, & A. G. J. Voragen (Eds.). // Pectins and pectinases London: Elsevier, 1996. - P. 21–33.
15. Voragen, A. G. J. Pectins. / A. G. J. Voragen, W. Pilnik, J. F/ Thibault, M.A.V. Axelos & C.M.G.C. Renard, In A. M. Stephen (Ed.) // Food polysaccharides. -New York: Marcel Dekker. 1995. - P. 287–339.
16. Holliday L. In Ionic Polymers. / L. Holliday (Ed)//– Applied Science Publishers. - London. – 1975. P. 1.
17. Manning G.S. Limiting Laaws and conterion condensation in Polyelectrolyte solutions. I. Colligative Properties. – J. Chem. Phys, 1969. - V. 51. - №3. - P. 924-933.
18. Manning G.S. Limiting Laaws and conterion condensation in Polyelectrolyte solutions. II. Self –Diffusion of the of the small ions. – J. Chem. Phys, 1969. - V. 5. -1 №3. - P. 934-938.

19. Мухидинов, З.К. Физико-химические аспекты получения и производства пектиновых полисахаридов: дисс. док. хим. н: 02.00.04/ Мухидинов Зайниддин Камарович – Душанбе. - 2003.- 230 с.
20. Джураева, Ф.Н. Ионное равновесие в растворах пектиновых веществ и в их макромолекулярных комплексах: дисс. к. хим. н: 02.00.04/ Джураева Фируза Набиевна – Душанбе. - 2011. – 92 с.
21. Тешаев, Х.И. Поведение низкометилированных пектинов в растворе и изучение их гелеобразующих свойств с ионами поливалентных металлов: дисс. к. тех. н: 02.00.04/ Тешаев Хуршед Икромович – Душанбе. – 2004. - 96 с.
22. Rees D.A. Polysaccharide gels. A molecular view. – Chem. and Industry, 1972. - N 16. - P. 630-636.
23. Paoletti, S. Ionic effects on the conformation, equilibrium, properties, and rheology of pectate in aqueous solutions and gels. / S. Paoletti, A. Cesaro, F. Delben and A. Ciana // In Chemistry and Function of Pectins. Fishman and J.J. Jan (ed), ACS Symposium Series. 1986. – 310. - P.73-87.
24. Powel, D.A. Conformations and interactions of pectins. / D.A. Powel, E.R. Morris, M.T. Gidley, D.A. Rees // II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. – J.Mol.Biol, 1982. - V. 155. - № 4. - P. 517-531.
25. Grant G.T. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. / G.T. Grant, E.R. Morris., D.A. Rees, P.T.C. Smith, D. Thom. // FEBS Lett. 32. – 1973. – 195 p.
26. Kohn R. Binding of toxic cations to pectin, its oligomeric fragments and plant tissues. – Carbohydr.Polym, 1982. – V 2. - P.273-275.
27. De Wit, J. N. Functional Properties of Whey Proteins. In Developments in Dairy Chemistry. Fox, P. F., ed. Elsevier Applied Science. - New York. - 1989. - P.285-321.
28. EP1613172 Method for producing a whey protein concentrates enriched in β -lactoglobulin and texture enhancer based thereupon for use in dairy products.

29. Hambling, S.G. Advanced Dairy Chemistry: 1. Proteins, chapter: Beta-lactoglobulin. / S.G. Hambling, A.S. McAlpine, and L.Sawyer.// Elsevier Applied Science, 1992. – P.141–190.
30. Heine et al., WO 92/03468, Mar. - 1992. – 5.
31. Uhrinova, S., Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the beta-lactoglobulin dimer. / S. Uhrinova, M. H. Smith, G. B. Jameson, D. Uhrin, L. Sawyer, and P. N. Barlow. //Biochemistry 39: - 2000. – P.3565–3574.
32. Turhan, K.N. Whey Protein Isolate and α - Lactalbumin Recovery from Lactic Acid Whey Using Cation-Exchange Chromatography. / K.N. Turhan, M.R. Etzel // Journal of Food Science, 69:2 . – 2004. - P. 66–70.
33. WO Patent 110112. Methods and compositions involving whey protein isolates. Pub. 24.11.2005.
34. Зябрев А. Ф. Применение мембранных процессов при переработке молочных продуктов. Мембранные системы БИОКОН. Переработка молока, - 2001.- № 12. - С. 8-9.
35. EP1613172 Method for producing a whey protein concentrates enriched in β -lactoglobulin and texture enhancer based thereupon for use in dairy products.
36. Manso M. A., Catteano T. M., Borzaghi S. Journal of AOAC International, 2002. – 85. - № 5. - С.1090-1095.
37. Мухидинов, З.К. Концентрат лактоглобулинов из молочной сыворотки и методы их выделения. / З.К. Мухидинов, А.С. Джонмуродов, Х.И Тешаев и др. // Материалы тезисы докладов международной конференции Института Питания РТ. Ж. Здоровоохранения Таджикистана, 2009. - № 5. - С.44-49.
38. Зезин, А.Б. Новый класс комплексных водорастворимых полиэлектролитов. / А.Б. Зезин, В.А. Кабанов // Успехи химии. - 1982. - Т. 51. - № 9. – С.1447-1483.
39. Кабанов, В.А. Полиэлектролитные комплексы в растворе и в конденсированной фазе. // Усп. химии, 2005. - Т.74. - № 1. - С. 5-23.

40. Кабанов, А. В. Интерполиэлектrolитные комплексы нуклеиновых кислот как средство доставки генетического материала в клетку. / А. В. Кабанов, В.А. Кабанов // *Высокомолек. соед.* 1994. – Т.36. - № 2. – С.198-211.
41. Платэ, Н.А. Физиологически активные полимеры. / Н.А. Платэ, А.Е. Васильев.// – М.: Химия. - 1986. – 204 с.
42. Khokhlov, A.R. Collapse of polyelectrolyte networks induced by their interaction with oppositely charged surfactants. / A.R. Khokhlov, E.Yu. Kramerenko. // *Theory. Makromol. Chem., Theory Simul.* 1992. – V.1. – P.105-118.
43. Beijerinck, M.W. Ueber eine Eigentümlichkeit der Löslichen Stärke. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten.* – 1896. – V 2. – P.697–699
44. Tolstoguzov, V.B. Protein-Polysaccharide Interactions. In *Food Proteins and Their Applications*; Damodaran, S.; Paraf, A., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: - New York. – 1997. – P.171–200.
45. Xia, J. Protein-polyelectrolyte complexes. / J. Xia, P.L. Dubin, J. Bock, R.Davis, D.N.Schulz & C.Thies // *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, -Berlin: Springer, 1994. - P.247-271.
46. De Kruff C.G., Tuinier R. Polysaccharide protein interactions. *Food Hydrocolloids*, 2001. - 15. - P.555-563.
47. Hattori, T. Roles of Electrostatic Interaction and Polymer Structure in the Binding of B-Lactoglobulin to Anionic Polyelectrolytes. / T. Hattori, R. Hallberg and L. Paul, P.L. Dubin // *Measurement of Binding Constants by Frontal Analysis Continuous Capillary Electrophoresis. Langmuir*, 2000. – 16. – P. 9738-9743.
48. Tolstoguzov, V.B. Functional Properties of Food Proteins and Role of Protein-Polysaccharides Interaction. *Food Hydrocolloids* 1991. – V 4.- №6. - P. 429-468.
49. Doublier, J.L. Protein polysaccharide interaction. / J.L. Doublier, C. Garnier, D.Renard, C. Sanchez . // *Cur. Opin. Colloid Interface Sci*, 2000. - V 5.- P. 202.

50. Grinberg, V.Y. Thermodynamic Incompatibility of Proteins and Polysaccharides in Solutions. / V.Y. Grinberg, V.B. Tolstoguzov // Food Hydrocolloids, 1997. – V 11. - P.145–158.
51. Benichou, A. Protein-Polysaccharide Interactions for Stabilization of Food Emulsions. / A. Benichou, A. Aserin and N. Garti. // J. Dispersion Science and Technology, 2002. – V. 23. -№1–3. - P.93–123.
52. Antonov, Yu.A. Concentration of skimmed milk by membranless, isobaric osmosis. / Yu.A. Antonov, V.Ya. Grinberg, N.A. Zhuravsraya, V.B. Tolstoguzov // Carbohydr. Polym, 1982. - V. 2. - P. 81-90.
53. Tolstoguzov, V.B. Deformation of emulsion droplet in flows. / V.B. Tolstoguzov A.I. Mzhel'sky, V.Ya. Gulov // Colloid. and Polym. Sci., 1974. - V. 252. - P. 124-132.
54. Antonov, Yu.A. Liquid two-phase water-protein-polysaccharide systems and their processing into textured protein products. / Yu.A. Antonov, V.Ya. Grinberg, N.A. Zhuravskaya. V.B. Tolstoguzov //J. Text. Stud., 1980. - V. 11. - P. 199-215.
55. Charlambous, G. Spray dried emulsions. / G. Charlambous, G. Doxastakis //Food Emulsifiers: Chemistry, Technology, Functional Properties and Applications; Elsevier: Amsterdam, 1989. – P.495-509.
56. Krog, N. J. Food Emulsifiers. In Food Emulsions, 3rd ed.; Friberg, S., Larsson, K., Eds.; Dekker: - New York. - 1997. – P.141.
57. Calvo, P. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-copolyester nanocapsules and submiron-emulsions. / P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L Vila-Jato, M.J.Alonso. // Colloid Polym. Sci. 1997. - V.275. – P. 46-53.
58. Dickinson, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. Food Hydrocolloids 2003. - V.17. – P.25-40.
59. Garti, N. What can nature offer from an emulsifier point of view: Trends and progress? Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1999. – V.152. – P.125–146.

60. McClements, D. J. Role of hydrocolloids as food emulsifiers. / D.J. McClements, P.A. Williams, & G.O. Phillips (Eds.) // Gums and stabilizers for the food industry 12. UK: The Royal Society of Chemistry. 2003. - P. 120.
61. Ganzevles R.A. Manipulation of adsorption behavior at liquid interfaces by changing protein-polysaccharide electrostatic interactions. / R.A. Ganzevles, M. A. Cohen Stuart, van Boekel M.A.J.S., and De Jongh H.H.J. // in Food Colloids: Self-Assembly and Material Science, ed. E. Dickinson and M. E. Leser, Royal Society of Chemistry, Cambridge. – 2007. - P. 195-208.
62. McClements, D.J. Food Emulsions: Principles Practice and Techniques; CRC Press: Boca Raton, FL. – 1999.
63. Dickinson, E. Interfacial structure and stability of food emulsions as affected by protein–polysaccharide interactions. *Soft Matter*, 2008. – V.4. – P. 932–942.
64. Galazka, V.B. Effect of High Pressure on Ovalbumin-Polysaccharide Interactions. / V.B Galazka, E. Dickinson, D.A. Ledward // *High Pressure Research*, 2000. – V. 19 . -№1–6. – P.515–520.
65. Dickinson, E. The Role of Hydrocolloids in Stabilizing Particulate Dispersions and Emulsions. In *Gums and Stabilisers for the Food Industry*; Phillips, G.O.; Wedlock, D.J.; Williams, P.A., Eds.; IRL Press: Oxford, 1988. - V.4. – P.249–263.
66. Le Gloahec, V.C.H. Proteinous Compound and the Manufacture Thereof. US Patent 2,430,180, 1947.
67. Ganz, A.J. Protein-Polymer Complexes and Process. US Patent 3,407,076, 1968.
68. Larichev, N.A. Protein-Polysaccharide Complexes at the Interface. / N.A. Larichev, A.N. Gurov, V.B. Tolstoguzov. // I. Characteristics of Decane. *Water Emulsions Stabilized by Complexes of Bovine Serum Albumin with Dextran Sulfate*. *Colloids and Surfaces*, 1983. – V. 6. – P.27–34.
69. Tokaev, E.S. Properties of Oil/Water Emulsions Stabilized by Casein- Acid Polysaccharide Mixture. / E.S. Tokaev, A.N. Gurov, I.A. Rogov, V.B. Tolstogusov // *Nahrung* 1987. – V.31. – P. 825– 834.

70. Dickinson, E. Emulsion Stabilization by Protein-Polysaccharides Complexes. In Gums and Stabilisers for the Food Industry / E. Dickinson, V.B. Galazka, G.O. Phillips, D.J. Wedlock, P.A. Williams // Eds.; IRL Press: Oxford, 1992. - V. 6. - P.351–361.
71. Dickinson, E. Influence of High-Pressure Treatment on b-Lactoglobulin-Pectin Associations in Emulsions and Gels. / E. Dickinson, J.D. James // Food Hydrocolloids, 2000. – V. 14. – P.365–376.
72. Dickinson E. Effect of High-Pressure Treatment of Protein on the Rheology of Flocculated Emulsions Containing Protein and Polysaccharide. / E. Dickinson, K. Pawlowsky // Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1996. –V.44. – P.2992– 3000.
73. Galazka, V.B. Emulsifying Behaviour of 11S Globulin Vicia Faba in Mixtures with Sulphated Polysaccharides: Comparison of Thermal and High-Pressure Treatments./ V.B. Galazka, E. Dickinson, D.A. Ledward // Food Hydrocolloids, 1999. – V.13. – P.425–435.
74. Wang, Y.F. Protein Separation via Polyelectrolyte Coacervation: Selectivity and Efficiency. / Y.F. Wang, J.Y Gao, P.L. Dublin // Biotechnological Progress, 1996. - V. 12 (3). – P.356–362.
75. Masson, P. Pressure denaturation of proteins. / P. Masson, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans // Eds.; John Libbey Eurotext: In High Pressure and Biotechnology;- Paris, France. – 1992. - P.89-99.
76. Silva, J. L. Pressure stability of proteins. / J.L. Silva, G. Weber //Annu. Rev. Phys. Chem, 1993. - V.44. - P.89-113.
77. Van Camp, J. High pressure-induced gel formation of a whey protein and haemoglobin protein concentrate. / J. Van Camp, A.Huyghebaert // Lebensm. Wiss. Technol. 1995. - V.28. - P.111-117.
78. Funtenberger, S. Pressure-induced aggregation of α -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. / S. Funtenberger, E.Dumay, J-C.Cheftel // Lebensm. Wiss. Technol. 1995. - V.28. - P.410-418.

79. Galazka, V. B. Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of B-lactoglobulin. / V.B. Galazka, E.Dickinson, D.A. Ledward // Food Hydrocolloids 1996. - V.10. - P.213-219.
80. Jegouic, M. Barometric oligomerization in α -lactalbumin/ β -lactoglobulin mixtures. / M. Jegouic, V.Ya. Grinberg, A. Guingant, T.J. Haertle' // Agric. Food Chem. 1997. - V.45. - P.19-22.
81. Suzuki, T. High-pressure effects on texture of the low methoxyl pectin gel. In Proceedings of the 4th High Pressure Bioscience and Food Science Symposium; 1991. - P.205-209.
82. Gustin, D. Pectin gelification under HHP: gel properties and formation mechanisms. / D. Gustin, F. Bera, Q. Dumont de Chassart, B. Mertens. // In High Pressure Research in Bioscience and Biotechnology; Heremans, K., Ed.; Leuven University Press: Leuven, Belgium. - 1997. - P.195-198.
83. Gustin, D. Pectin gelification under HHP: gel properties and formation mechanisms. / D. Gustin, F. Bera, Q. Dumont de Chassart, B. Mertens. //In High Pressure Research in Bioscience and Biotechnology; Heremans, K., Ed.; Leuven University Press: Leuven, Belgium. - 1997. - P.199-200.
84. Kokufuta, E. Functional immobilized biocatalysts. Prog. Polym. Sci. 1992. -V .17. - P. 647-697.
85. Serov, A. N. Isolation of lactic whey proteins in the form of complexes with apple pectin. / A.N. Serov, Y.A. Antonov, V.B. Tolstoguzov. // Nahrung, 1985. - V.1. - P. 19-30.
86. Liu LS. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. / LS. Liu, ML. Fishman, KB. Hicks , M. Kende, G. Ruthel // Drug Delivery. - 2006. - V.13. - P. 417-423.
87. Muhidinov Z.K. Delivery System from biodegradable polymers for encapsulation of poor water soluble drugs. / Z.K. Muhidinov, J. Bobokalonov, Kh TeshaeV, et al. // 4th International Workshop on Specialty Polymers, 20-21 May 2011. - Almaty. - Kazakhstan. - P. 65

88. Касымова Г.Ф. Пектин-зеиновые микросферы как носители лекарственных средств. / Г.Ф. Касымова, Д.Т. Бобокалонов, Д.Х. Халиков и др. // Химико – Фармоцевтический журнал.- 2010.- Т. 44. - №100. – С.20-24.
89. Girard, M. Interbiopolymer complexing between B- lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. / M. Girard, S.L. Turgeon, S.F. Gauthier // Food Hydrocoll. 2002. – V.16. – P.585-591.
90. Tainaka, K.-I. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. J. Phys.Soc. Jpn. -1979. – V.46.- P. 1899-1906.
91. Tainaka, K.-I. Effect of counterions on complex coacervation. Biopolymers 1980. – V.19. – P.1289-1298.
92. Zaleska H. Apple pectin complexes with whey protein isolate / H. Zaleska, S.G. Ring, P. Tomasik // Food Hydrocolloids, 2000. - V.14. – P.377-38.
93. Girard, M. Quantification of the interactions between B-lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis. / M. Girard, S.L. Turgeon, S.F. Gauthier // J. Agric. Food Chem., 2003. – V.51. – P.6043-6049.
94. Донченко, Л. В. Технология пектина и пектинопродуктов: учеб. пособие / Л. В. Донченко // – М.: Дели, 2000. –254 с.
95. Plashchina, I.G., Polysaccharides: syntheses, modifications, and structure/property relations / I.G. Plashchina, M.G. Semenova, E.E. Braudo, & V.B. Tolstoguzov // Carbohydr. Polym, 1985. – V.5. - P.159-179.
96. Tanford, C. Physical Chemistry of Macromolecules.- Chapter 8.- Wiley. - New York. – 1961. - Ch. 8. – P. 526–58.
97. Smidsrod, G. Insame physical properties of alginate in solution and gel state. Trondheim: NTNf's Institute for Marine Biochemistry, 1973.
98. Semenova, M.G. The role of Biopolymer structure in interaction between unlike biopolymers in aqueose media. / M.G. Semenova and L.B. Savilova // Food Hdrcoll. 1998. V.-12. -№1. - P.65-75.

99. Stepan Podzimek. Dynamic Light Scattering for Protein Characterization. Wyatt Technology Corporation, <http://www.wyatt.com>.
100. Andrew, N.R, Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis / N.R. Andrew, M.R. Neil, J.M.D. Alistair, G.R. Steven, J. M. Victor // Carbohydrate Research, 2001. - V.331. – P. 337–342.
101. Ganzevles, R. A. Structure of mixed β -Lactoglobulin/pectin adsorbed layers at air/water interfaces: a spectroscopy study. / R.A. Ganzevlesi, R. Fokkink, T. van Vliet, M.A. Cohen Stuart and H.H.J de Jongh.// J. Colloid Interface Sci., 2008. – V. 317 .- P.137-147.
102. Daas, P. J. Investigation of the non-esterified galacturonic acid distribution in pectin with endopolygalacturonase. / P.J. Daas H., K. Meyer-Hansen, H.A. Schols, G.A. De Ruiter & A.G.J. Voragen // Carbohydrate Research, 1999. – V.318. - P.135-145.
103. Bram, L.H.M. Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and b-lactoglobulin. / L.H.M. Bram, Henk A. Sperber, Martien A. Schols, Cohen Stuart, Willem Norde, Alphons G.J. Voragen. // Food Hydrocolloids, 2009. - V.23. – P.765-772.
104. Glahn, P.E. Hydrocolloid stabilization of protein suspensions at low pH. Progress in food and nutrition science / P.E. Glahn, G.O. Phillips, D. J.Wedlock, & P. A. Williams // (Eds.) -Oxford, UK. -1982. - V.6. – P.171-177.
105. Laurent, M.A. Stabilization mechanism of acid dairy drinks (ADD) induced by pectin. / M.A. Laurent & P.Boulenguer // Food Hydrocolloids, 2003. – V. 17. – P.445-454.
106. Parker, A. Effect of the addition of high methoxy pectin on the rheology and colloidal stability of acid milk drinks./ A. Parker, P. Boulenguer, & T.P. Kravtchenko, K.Nishinari, & E.Doï (Eds). // Food hydrocolloids: Structures, properties, and functions, -New York., 1994. - P.307-312.

107. Guzey, D. Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by β -lactoglobulin–pectin membranes. / D. Guzey, H.-J. Kim, & D. J. McClements, // *Food Hydrocolloids*, 2004. - V.18. - № 6. – P.967-975.
108. Guzey, D. Impact of electrostatic interactions on formation and stability of emulsions containing oil droplets coated by β -lactoglobulin–pectin complexes. / D. Guzey, & D. J. McClements // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007. - V.55. - №2. - P.475-485.
109. Dickinson, E. Influence of k-carrageenan on the properties of a protein-stabilized emulsion. / E. Dickinson & K. Pawlowsky // *Food Hydrocolloids*, 1998. – V.12. – P.417-423.
110. Ganzevles, R.A. Modulating surface rheology by electrostatic protein/polysaccharide interactions./ R.A Ganzevles, K. Zinoviadou, T. Van Vliet, M. A. Cohen Stuart, & H. H. J. De Jongh// *Langmuir*. – 2006. - V.22. - №24. - P. 10089–10096.
111. Nunes, F. M. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. / F.M. Nunes, & M.A. Coimbra // *Carbohydrate Polymers*, 1998. - V.37. - №3. - P.283–285.
112. Schmitt, C. Effect of time on the interfacial and foaming properties of β -lactoglobulin/acacia gum electrostatic complexes and coacervates at pH 4.2. / C. Schmitt, T. Palma da Silva, C. Bovay, S. Rami-Shojaei, P. Frossard, E. Kolodziejczyk, et al. // *Langmuir*. – 2005. - V.21. - №17. - P.7786-7795.
113. Girard, M. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration / M. Girard, S.L. Turgeon & S. F Gauthier. // *Food Hydrocolloids*, 2002. - V.16. - №6. - P.585-591.
114. Mattison, K.W. Protein–polyelectrolyte phase boundaries. / K.W. Mattison, I. J. Brittain & P.L. Dubin // *Biotechnology Progress*, 1995. – V. 11. - P.632-637.

115. Park, J.M. Effects of protein charge heterogeneity in protein–polyelectrolyte complexation. / J. M. Park, B. B. Muhoberac, P.L. Dubin, & J. Xia // *Macromolecules*, 1992. - V.25. -№ 1. - P.290-295.
116. Weinbreck, F. Complex coacervation of whey proteins and gum arabic. / F. Weinbreck, R. De Vries, P. Schrooyen, & C.G. De Kruif // *Biomacromolecules*, 2003. - V. 4. -№ 2. - P.293-303.
117. Kaibara, K. pH-induced coacervation in complexes of bovine serum albumin and cationic polyelectrolytes. / K. Kaibara, T. Okazaki, H. B. Bohidar, & P. L. Dubin. // *Biomacromolecules*, 2000. - V. 1. - №1. - P.100-107.
118. Da Silva, F.L.B. On the complexation of proteins and polyelectrolytes. / F.L.B. Da Silva, M. Lund, B. Jonsson, & T. Akesson // *Journal of Physical Chemistry B*, 2006. - V. 110. -№ 9. – P.4459-4464.
119. Xia, J. Electrophoretic and quasi-elastic light scattering of soluble protein–polyelectrolyte complexes. / J. Xia, P.L. Dubin, Y. Kim, B.B. Muhoberac, & V.J. Klimkowski // *Journal of Physical Chemistry*, 1993. - V.97. -№ 17. - P. 4528-4534.
120. Weinbreck, F. Complexation of whey proteins with carrageenan. / F. Weinbreck, H. Nieuwenhuijse, G.W. Robijn, & C.G. De Kruif // *Journal of Agricultural and Food Ghemistry*, 2004. - V.52. - № 11. - P. 3550-3555.
121. Schmitt, C. Structure and technofunctional properties of protein–polysaccharide complexes: a review. / C. Schmitt, C. Sanchez, S. Desobry-Banon, & J. Hardy // *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1998. - V. 38. №8. - P.689-753.
122. Seyrek, E. Ionic strength dependence of protein– polyelectrolyte interactions. / E. Seyrek, P.L. Dubin, C. Tribet, & E.A. Gamble // *Biomacromolecules*, 2003. - V. 4. -№2. – P.273-282.
123. Cooper, C.L. Polyelectrolyte– protein complexes. / C. L. Cooper, P.L. Dubin, A.B. Kayitmazer, & S. Turksen // *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2005. – V.10. - P.52-78.

124. Wen, Y.P. Potentiometric studies of the interaction of bovine serum albumin and poly(dimethyldiallylammonium chloride). / Y.P. Wen, & P.L. Dubin // *Macromolecules*, 1997. - V.30. - № 25. – P.7856-7861.
125. Glahn, P.E. Properties and food uses of pectin fractions. Gums and stabilisers for the food industry. / P.E. Glahn, & C.G.O. Rolin, P.A.Philips, Wiliams, & D.J. Wedlock (Eds)// -Oxford: Oxford University Press, 1996. - V.8. - P.393–402.
126. Fishman L.M. Flash extraction of Pectin from Orange Albedo by steam injection. / L.M. Fishman. P.N. Walker, H.K. Chau and A.T. Hotchkiss // *Biomacromolecules*, 2003.- V.4.- P.880-889.
127. Халиков Д.Х. Кислотный гидролиз протопектина корзинки подсолнечника. / Д.Х. Халиков, З.К. Мухидинов, Х.Х. Авлоев // Доклады АН РТ. 1996. - Т. 39. № 11 – 12. - С. 76-80.
128. Fishman, M.L. Solvent effects on the molecular properties of pectins. / M.L. Fishman, H.K. Chau, F. Kolpak, J. J. Brady// *Agric. Food Chem.* 2001. - V.49. – P. 4494-4501.
129. Халиков, Д.Х. Некоторые кинетические особенности гидролиза протопектина. / Д.Х. Халиков, З.К. Мухидинов, М.Г. Асоев, В.А. Дегтярев. // *Химия природных соединений*. 1994. - №6. - С.787-793.
130. Афанасьев, С.П. Модификация титриметрического метода анализа пектиновых веществ./ С.П. Афанасьев, Э.П. Панова, Г.Н. Кацева, В.Я. Чирова // *Хим. Природ. Соед.* 1984. - №4. - С. 428-431.
131. CP Kelco Control methods// *Determination of degree of methyl esterification*, March 7. - 2001. - P.3.
132. Филипов, М.И. Фотометрическое определение метоксилных групп в пектиновых веществах. / М.И. Филипов, В.И. Кузминов // *Ж. Анал. Химии*. 1971. -Т. 26. - вып. 1.- С.143-146.
133. Метод определения уроновых кислот без включения нейтральных сахаров Филизетта – Кози. (Filisetti-cozzi T.M.C. С., Carpita

N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars // *Anal. Biochem.* 1991. - V.197. - P.157-162.

134. Muhidinov, Z.K. Physico-chemical characterization of pectic polysaccharides from various sources obtained by steam assisted flash extraction (SAFE) / Z.K. Muhidinov, Kh. Teshayev, A. Jonmurodov, D. Khalikov and M. Fishman // *Macromolecular Symposia*, 2012. – V. 317-318. - № 1. - P.142-148.

135. Бобокалонов, Д.Т. Характеристика лактоглобулинов молочной сыворотки методом капиллярного электрофореза. / Д.Т. Бобокалонов, М.Д. Халикова, А.С. Джонмуродов, З.К. Мухидинов // *Материалы VI-Нумановских чтений.* -Душанбе. - 2009. - С.109-111.

136. Фармакопея СССР XI. издание-2. Москва. «Медицина». 1990. - С. 30-32.

137. Petzold, G. Preparation and characterization of different polyelectrolyte complexes and their application as flocculants. / G. Petzold, A. Nebel, H. Buchhammer M.K. Lunkwitz // *Coll. Polym. Sci.* - 1998. - V. 276. - №2. - P.125-130.

138. Кабанов, В.А. Комплексообразование между комплементарными синтетическими полимерами и олигомерами в разбавленных растворах. / В.А. Кабанов, И.М. Паписов /. *Высокомолек. соед.* 1979. -Т. 21. №2. - С.243-281.

139. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. -М.: Химия - 1965. - 390 с.

140. Warshel, A. Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric. Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme. / A. Warshel, M. Levitt // *J. Mol. Biol.* 1976. - V.103. - P. 227-249.

141. Практикум по высокомолекулярным соединениям. -М.: Химия. - 1985. - 224 с.

142. Malovikova, A. "Viscosimetric Behavior of Na.Polygalacturonate in the Presence of Low Salt Content" *ACS Symposium Series 548.* / A. Malovikova M. Milas, M. Rinaudo, and R. Borsali // "Macro.Ions Characterization from Dilute Solutions to COMPLEX FLUIDS" 1994. - Ch. 24. - P. 297.

143. Lifson, S. The electrostatic free energy of polyelectrolyte solutions. Fully stretched macromolecules. / S. Lifson, A. Katchalsky. // *J. Polym. Sci.* 1954. - V.13. - P.43-55.
144. Rees, D.A. Polysaccharide conformation. Part VII. Model building computations for a,1, 4-galacturonan and the kinking function of L-rhamnose residues in pectic substances. / D.A. Rees, A.W. Wight // *J. Chem. Soc. B.* -1971. - P.1366-1371.
145. Rinaudo M.: In E. Selegny (Ed.). Polyelectrolytes, Reidel Publishing Company, Dordrecht (The Netherlands). 1974. -V.157. - P.193.
146. Kohn, R., Kovac, P. Dissociation constants of D-galacturonic and D-glucuronic acid and O-methyl derivatives. / R. Kohn, P. Kovac // *Chem. Zvesti.* 1978. - V. 32. - P.478-484.
147. Ravanat, G. Investigation on oligo. and polygalacturonic acid by potentiometry and circular dichroism. / G. Ravanat, M. Rinaudo // *Biopolymers.* 1980. - V.19. - P. 2209-2222.
148. Michel, F. Investigation on high-methoxyl pectins by potentiometry and viscometry. / F. Michel, J.L. Doublier, J.F. Thibault // *Prog. Fd. Nutr. Sci.* 1982. -V.6. - P.367-372.
149. Джураева Ф.Н. Ионизационное равновесие в водных растворах пектиновых веществ, полученных из различных источников растительных материалов. / Ф.Н. Джураева, З.К. Мухидинов, Д.Х. Халиков // Доклады АН РТ. Душанбе. - 2007. - Т.50. - №1. - С.41-45
150. Mattison, K.W. Complex formation between bovine serum albumin and strong polyelectrolytes: Effect of polymer charge density. / K.W. Mattison, P.I. Dubin, & I.J. Brittain // *Journal of Physical Chemistry B* (1998). -V.102. - P.3830-3836.
151. Creighton T.E. Proteins: Structures and molecular properties. 2nd ed.: W.H. Freeman & Co. -New York. - 1993.- P.147-148
152. Basch J.J. and Timasheff S.N. Hydrogen ion equilibria of the genetic variants of b-lactoglobulin. / J.J. Basch, S.N. Timasheff // *Archives of Biochemistry and Biophysics* Volume., 1967. - V. 118. - Issue 1. - P.37-47.

153. Anderson, D.E. pH- induced denaturation of proteins: a single salt bridge contributes 3-5 kcal/mol to the free energy of folding of T4 lysosyme. / D.E. Anderson, W.J. Becktel et all // *Biochemistry*. - 1990. - V.29. - P.2403-2408.
154. Lee, K. K. Electrostatic effects in hairy charged proteins: Salt sensitivity of pK_a values of histidines in staphylococcal nuclease. / K.K. Lee, C.A. Fitch, J. T. J. Lecomte and E.B. Moreno. // *Biochemistry*, 2002.- V.41. - P.5656-5667.
155. Dickinson, E. Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharides complexes. In Stephen AM (ed) / *Food Polysaccharides and their Applications*. -New York. 1995. - P. 501-515.
156. Girard, M. Thermodynamic parameters of β .lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry. / M. Girard, S.L. Turgeon. S.F. Gauthier // *J. Agric. Food Chem.*- 2003.- V. 51.- P. 4450-4554.
157. Tainaka, K.I. Effect of counterions on complex coacervation . *Biopolymers*. -1980. - V. 19. - P.1289-1298.
158. Усманова, С.Р. Комплексы различных пектинов с белками молочной сыворотки при низких значениях pH методом турбидиметрии / С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов, М.Б. Каримов, Д.Х. Халиков // *Вестник ТНУ*. - 2011. - № 6 (70). - С.48-54.
159. Мухидинов, З.К. Потенциометрическое титрование β - лактоглобулина молочной сыворотки. / З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, Х.И. Тешаев и др. // *Доклады АН РТ*. - 2011. - Т.54. - №2. - С.124-128.
160. Muhiddinov, Z. K. Some anomalous phenomena in hydrodynamic properties of pectin. / Z.K. Muhiddinov, D.Kh. Khalikov, M.G. Asoev, Ch.Ch. Avloev. // *Proceeding of the International Seminar on Polymer Science and Technology*.-Tehran. Iran, 1997. - V.1. - P.213-220.
161. Мухидинов З.К. Нерастворимые комплексы белков молочной сыворотки с различными пектинами. / З.К. Мухидинов, А.Ш. Штанчаев, А.С. Насриддинов и др. // *Доклады АН РТ*. -2008. - Т. 51. -№8. - С.607-614.

162. Wen, Y.P. Potentiometric studies of the interactions of bovine serum albumine and Poly (dimethyldiallylammonium chloride). / Y.P. Wen, P. L. Dubin. // *Macromolecules*. 1997. - V.30. - P.7856.
163. Girard, M. Interbiopolymercomplexing between β -lactoglobulin and low and high.methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. / M. Girard, S.L. Turgeon, S. Gauthier // *Food Hydrocolloids*. 2002. - V.16. – P.585–591.
164. Tainaka, K.I. Study of complex coacervation in low concentration by virial expansion method. I. Salt free systems. *J. Phys.Soc. Jpn.* 1979. - V.46. - P.189-1906.
165. Tainaka, K.I. Effect of counterions on complex coacervation. *Biopolymers*, 1980. -V.19. - P.1289 -1298.
166. Tolstogulzov V. B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages. *Crit. ReV.Biotechnol*, 2002. - V.22. - P.89-174.
167. Тешаев, Х.И. Взаимодействие низкометилованных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки. / Х.И. Тешаев, С.Р. Усманова, О. Шамсоро, Ф.Н. Джураева, З.К. Мухидинов, Л.Ш. Лиу. // *Вестник Воронежского Государственного университета Инженерных Технологий*, 2012. - №1. - С.158-164.
168. Girard, M. Quantification of the Interactions between β -Lactoglobulin and Pectin through Capillary Electrophoresis Analysis. / M. Girard, S.L. Turgeon, S.F. Gauthier. // *J. Agric. FoodChem*. 2003. - V.51. - P. 6043-6049.
169. Noiseux, I. Interaction between bovine β –Lg and peptides under different physicochemical condition. / I. Noiseux, S.F. Gauthier & S.L. Turgeon. // *J. Agric. Food Chem*. 2001. - V.50. - P. 1587-1592.
170. Li Y. Light scattering studies of the binding of bovine serum albumin to a cationic polyelectrolyte. / Y. Li, K. Mattison, P.L. Dubin, H.A. Havel, S.L. Edwards // *Biopolymers*, 1996. - V.38. - P.527-533.

