

УДК 543.554.2:547.962.4

Проректор по инновации и образовательным технологиям
Х.И. Тешаев,

(Технологический ун-т Таджикистана), тел. (99237) 234-79-90

науч. сотрудник С.Р. Усманова, соискатель О. Шамсоро,

профессор З.К. Мухидинов

(Институт химии им. В.И. Никитина АН Республики Таджикистан),

тел. (992) 918-723-24-78

Взаимодействие низкометилованных пектинов с концентратом белков молочной сыворотки

Методом потенциометрического титрования растворимых комплексов продемонстрирован процесс образования комплекса между концентратом белков молочной сыворотки и НМ-пектином: показано, что образованию комплекса соответствует изгиб на кривых титрования, рНс; рНс не зависит от соотношения биополимеров; ионная сила уменьшает рНс и способствует образованию стабильных комплексов; при $pH > pI$ лактоглобулина взаимодействие происходит за счет отрицательного заряда сегментов цепи НМ-пектина и положительных зарядов локальных очажков молекул протеина.

Potentiometric titration method was used to study quality complex formation between low methylated pectin and proteins concentrated from whey. It's shown that at $pH > IEP$ of the lactoglobulin the interaction occurs between negatively charged chains of LM-pectin and positively charged patches of polypeptide chains. The biopolymers ratio had no significant effect on the initial pH of soluble complex formation (pHc); addition of sodium chloride decreased pHc and pK_0 of complexes, which linked to electrostatic nature of complex formation between LM-pectin and whey proteins.

Ключевые слова: комплексообразование, НМ-пектин, концентрат белков молочной сыворотки, потенциометрическое титрование.

Белки и полисахариды играют ключевую роль в формировании структуры и стабилизации пищевой системы. В пищевых продуктах белки используются в качестве эмульгаторов, а полисахариды – в качестве стабилизаторов. Смеси обоих полимеров могут быть обнаружены в ингредиентах пищевых коллоидов широкого спектра, начиная с майонеза и заканчивая мороженым. По данным Диккенсона [1], устойчивость и текстура пищевых коллоидов, содержащих смеси биополимеров, зависят не только от функциональных свойств индивидуальных ингредиентов, но и от природы и силы взаимодействия протеин - полисахарид.

Вопросам комплексообразования в системе протеин-полисахарид посвящены многочисленные исследования [1-9]. Комплексы протеин - полисахарид могут быть растворимыми или коацерватами (явление, приводящее

к агрегированному разделению фаз из-за термодинамической несовместимости биополимеров, когда они несут одинаковый заряд). На природу этих комплексов влияют как энтропийные (структура и молекулярный вес), так и энтальпийные (соотношение биополимеров, природа и плотность заряда на них) факторы. Количественная оценка параметров связывания в данной системе чрезвычайно сложна, так как оба полимера имеют гетерогенную структуру. Поэтому данные по количественной оценке связывания протеин - полисахарид в литературе незначительны [9]. Указанные комплексы, или коацерваты, широко применяются в пищевой промышленности и биотехнологии, в частности как заменители жира [3], при выделении и концентрировании белков [5,8] и инкапсулировании лекарств [6]. Пектин представляет собой полимерную цепь, состоящую из звеньев галактуроновой кислоты, pK_0 которой колеблется от 2,9 до 3,3 [10].

© Тешаев Х.И., Усманова С.Р., Шамсоро О.,
Мухидинов З.К., 2012

В данной работе исследуется процесс образования комплексов низкометилованного пектина и концентрата белков молочной сыворотки (КБМС) с помощью метода потенциометрического титрования. КБМС был получен из творожной сыворотки методом ультрафильтрации [12]. Состав и степень чистоты КБМС 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 с эффективной длиной 70,0 см. В качестве контроля использовали стандартные белки фирмы Sigma (β -лактоглобулин В 18,0 kDa, альбумин 66,0 kDa и α -лактоальбумин 14,0 kDa). Растворы белков готовили в 5 mM фосфатном буфере при pH = 2,9 с добавлением 1 M мочевины. Все растворы перед введением в капилляр фильтровались через мембранный фильтр с размерами пор 0,45 мкм. В качестве ведущего электролита использовали 10 mM фосфатный буфер с pH = 2,9. Количественный состав КБМС, полученный данным методом, представлял: 37,35 % β -Lg А; 52,9 % β -Lg В; и 9,7 % α -Lg.

Найденные значения pK_a основных и концевых карбоксильных и имидазольных групп гистидинового остатка стандартного образца β -лактоглобулина (β -Lg) представлены в предыдущей работе [13] и хорошо согласуются с известными данными [14].

С помощью потенциометрического титрования можно наблюдать за процессом комплексообразования путем титрования кис-

лотных и основных групп протеина. Предполагается, что отрицательно заряженный НМ-пектин взаимодействует с β -Lg посредством карбоксильных, amino-, имидазольных- и гуаниновых групп в пептидной цепи белка. Для понимания механизма процесса комплексообразования двух полиэлектролитов в растворе необходимо создать модель полиионов в растворе [15]. Если достаточное количество нейтрального электролита, как хлорид натрия, добавить в раствор полиэлектролита, структура полииона будет окружена цилиндрической ионной сферой, и полимерная цепь приобретет более или менее спиральную конформацию.

С целью изучения взаимодействия сывороточного белка молока с пектином мы использовали КБМС и НМ-пектин из подсолнечника (НМПП 2М 85-2, ГК 68,8; СЭ 45,2; Mw 142,4) при двух значениях pH 3,75 и 5,6 в растворе ацетатного буфера. Соответствующее количество раствора НМ-пектина (0,607 мг/мл) было добавлено к 5 мл раствора КБМС, содержащего 0,35 мг/мл белка, при температуре 24 °C для получения весового соотношения протеин/пектин 1:1, 2:1, 4:1 и 6:1. Титрование проводили на pH-метре 827 pH lab. Metrohm, электроды калибровались с помощью стандартных буферных растворов (Metrohm pH 4,00; 7,00; и 9,00). В кислом растворе pH (3,75), в системе протеин/пектин наблюдалось разделение фаз. Растворимая и нерастворимая фазы были разделены центрифугированием при 4500 g в течение 30 мин. Обе фазы были исследованы на содержание свободных фракций протеина и пектина, а также степень набухания нерастворимого комплекса. Полученные результаты приведены в таблице

Т а б л и ц а

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

Соотношение 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	18,05	83,26	3.0	81,95	16,74
2.60	21,4	24,84	78,53	4.0	75,16	21,47

Из таблицы следует, что с увеличением мольной доли протеина выход нерастворимого комплекса проходит через максимум. Максимальный выход комплекса обнаружен при 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 степень их набухания уменьшается, при дальнейшем увеличении содержания белка состав комплекса не изменяется. Если в нерастворимой части комплекса преобладают пек-

тиновые макромолекулы (78-97 %), то растворимая фракция содержит от 75 до 90 % протеина. Поскольку pK_0 ПП 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 изучался методом турбидиметрического титрования как описано в работе [16]. Поэтому в данной работе мы приводим только результаты исследования растворимой части комплексов путем титрования кислых и основных групп протеина растворами щелочи или кисло-

ты. Полученные супернатанты после осаждения нерастворимой части титровались 0,1 н NaOH (рис. 1).

Как видно из рис. 1, при равном соотношении КБМС/НМПП количество титруемых групп уменьшается, и с увеличением доли белков кривые вновь смещаются в сторону увеличения и приближаются к кривым КБМС. Авторами [11] было показано, что pH растворимого комплекса соответствует начальной точке перегиба кривых титрования и обозначен как pHс. Дальнейшее увеличение количества титранта (т.е. pH смеси) приводит к фазовому разделению в системе.

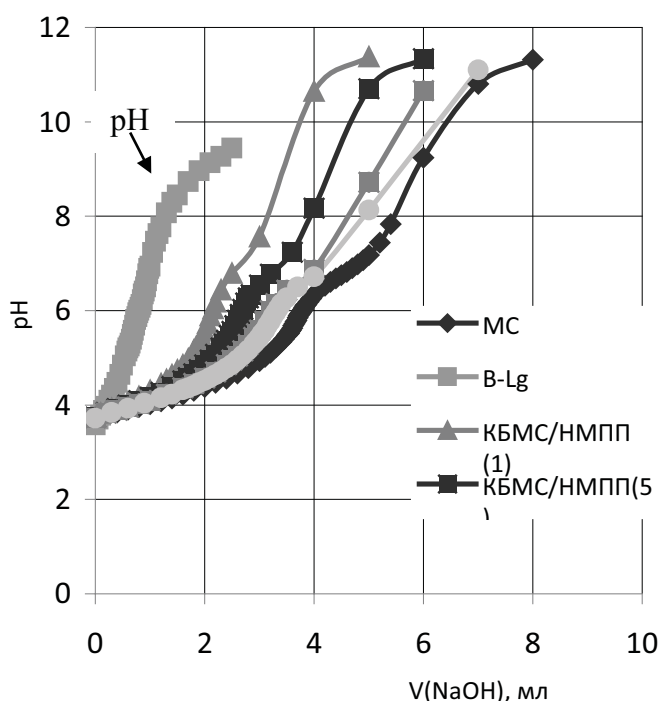


Рис. 1. Кривые потенциометрического титрования карбоксильных групп протеинов MC, β -Lg и комплекса КБМС с пектином

При увеличении соотношения КБМС/НМПП pH_c соответствовал значению $5,3 \pm 0,1$, а количество титранта, требующегося для нейтрализации свободных карбоксильных групп полученных комплексов, при этом возросло от 1,85 до 2,9 мл.

При pH 5,6 $pH > pI$ (изоэлектрической точки) лактоглобулинов было изучено комплексообразование КБМС с НМПП в водном растворе и в растворе, содержащем NaCl. В дальнейшем проводили потенциометрическое и кондуктометрическое титрование рас-

творимой фракции, используя раствор NaOH для кислотных и HCl – для основных групп.

В результате в пределах исследованных экспериментальных условий не обнаружено фазового разделения как при pH 3,75. При смешивании двух полимеров образовывалась либо опаловая однофазовая система, либо чистая жидкая фаза с небольшим количеством осадка, зависящего от общей концентрации биополимера и их соотношения (рис. 2).

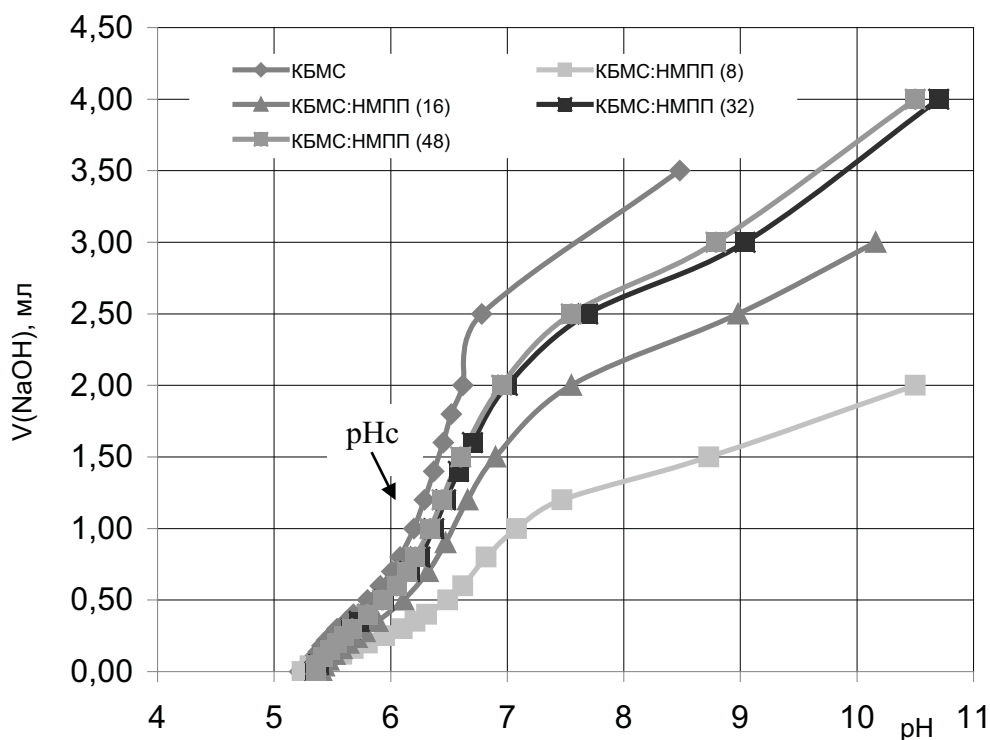


Рис. 2. Кривые титрования КБМС и КБМС/НМПП комплекса с 0,1N NaOH без добавления электролита при $I = 0,01$ M, $pH_c = 6,28$

Из рис. 2 видно, что pH_c , независимо от соотношения биополимеров, находится в области pH 6,28. Такая закономерность в образовании была обнаружена в работе [17] при изучении процесса комплексообразования в системе чистого β -Lg с НМ- и ВМ-пектинами. При pH 6,5 некоторые свободные карбоксильные группы пектина и протеина могут быть ионизированы или образовывать комплекс, на нейтрализацию которого требуется больше титранта, чем при pH 3,5. Данный факт свидетельствует о том, что пектин и протеин в первом случае существуют в свободной форме (раствор супернатанта), а во втором случае они формируют комплекс. На нейтрализацию комплекса с низким соотношением биополимеров расходуется меньше титранта, чем с большим. Известно [18,19], что комплексообразование между протеином и пектином происходит в 2 стадии: вначале образуется внутримолекулярный комплекс, где на молекулу пектина приходится до 8 молекул протеина, и

его размер сопоставим с размером молекулы пектина. На второй стадии образуется межмолекулярный комплекс (интерполиэлектrolитный), через агрегацию первого.

При титровании основных (имидазольных) групп КБМС/НМПП раствором 0,1 M HCl комплекс не образовывался, так как точка перегиба на кривых титрования (рис. 3) отсутствовала. Поэтому для обнаружения pH_c предварительно pH растворов в смеси биополимеров устанавливали до значения 7,5 раствором NaOH, затем смесь титровали раствором HCl до значения 4,5, близкого к значению pK_a пектина.

В качестве примера приведены кривые титрования аминокрупп (рис. 4) для образцов β -Lg, КБМС и их комплексов с НМПП. Как видно, pH_c на кривых потенциометрического титрования комплекса чистого β -Lg с НМПП отличается от pH_c кривых титрования КБМС с пектином.

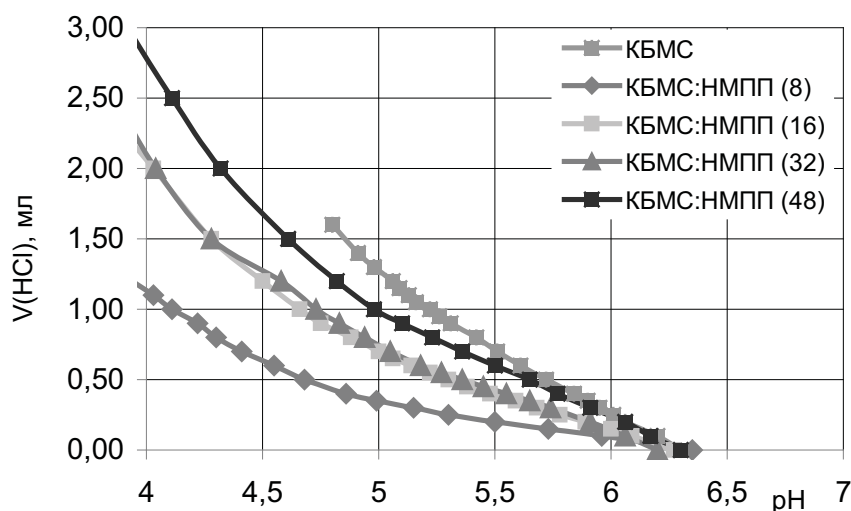


Рис. 3. Кривые титрования основных (имидазольных) групп КБМС/НМПП комплексов с 0,1М HCl.

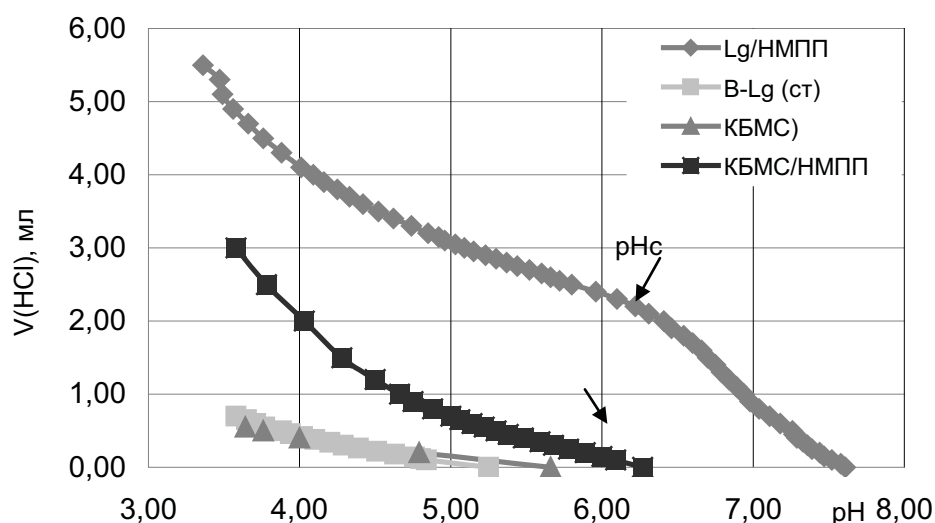


Рис. 4. Кривые титрования основных групп β -Lg, КБМС и комплекса КБМС/НМПП (32) с 0,1М HCl

Данные рис. 4 указывают на то, что комплексообразование НМПП с β -Lg и КБМС отличается и происходит при различных рНс, 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.

Для того чтобы оценить роль электростатического взаимодействия и водородных связей на рНс, было изучено влияние низкомолекулярного электролита на процесс ком-

плексообразования путем добавления 100 mM хлорида натрия к водному раствору биополимера. Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПП (32) с 0,1М HCl, без добавления хлорида натрия ($I = 0,07$) и с добавлением ($I = 0,17$) представлены на рис. 5.

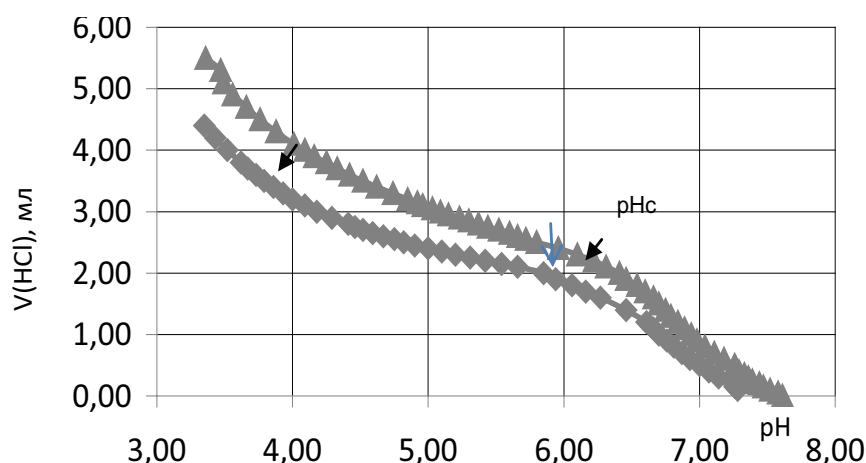


Рис. 5. Кривые титрования основных групп комплекса КБМС/НМПП (32) с 0,1М HCl при $I = 0,07$ (треугольники); $I = 0,17$ (квадраты)

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

протеином и пектином. Это также подтверждается изменением кажущейся pK_a аминокислотных остатков протеина (рис.6) в присутствии хлорида натрия (pK_0 8,72) и в отсутствие (pK_0 8,44) с высвобождением молекул противоиона и воды.

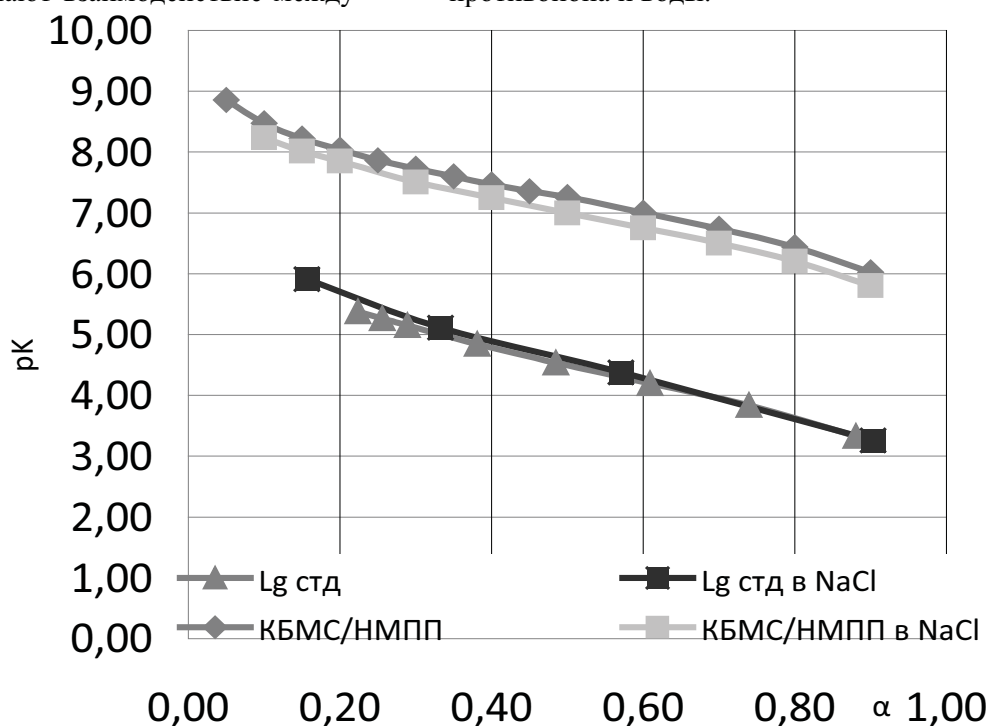


Рис. 6. Зависимость pK_a от степени ионизации основных групп в комплексе КБМС/НМПП (32) с 0,1 М HCl при $I = 0,07$ (треугольники); $I = 0,17$ (квадраты)

Поэтому комплексообразование β -Lg с LMP при $pH = 6,5$ может быть обнаружено методом потенциометрии, но не турбидиметрически. Поскольку суммарный заряд β -Lg отрицательный при $pH > pI$, связывание β -Lg с НМПП при $pH > 5,6$ соответствует комплек-

сообразованию “на неправильной стороне” pI . Такое явление, т.е. когда оба биополимера отрицательно заряжены, было обнаружено между полисахаридами и белками в ряде других исследований [4, 8, 9, 11, 17].

Электростатистическое 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, при которой создаются стабильные комплексы. В то же время с уменьшением рНс до рНф при рН 3,5 также образуются растворимые комплексы.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Dickinson E. Emulsion stabilization by polysaccharides and protein-polysaccharide complexes. In S.E. Stephen // *Food polysaccharides and their applications*. New York: Dekker. 1995. P. 501-515.
2. Tolstoguzov V.B. Protein-polysaccharide interactions // *Food proteins and applications*. Ed. Damodaran S., Paraf A. Dekker M. New York. 1997. P. 171-197.
3. Laneuville S.L., Paquin P., Turgeon S.L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes // *Food Hydrocoll.* 2000. V.14. P.305-314.
4. Mattison K.W., Dubin P.L., Brittain I.J. Complex formation between bovine serum albumin and 4strong polyelectrolytes: Effect of polymer chage density // *J. Phys. Chem. B*. 1998. V.102 (19). P.3830-3836
5. Dubin P.L., Gao J., Mattison K. Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes // *Sep. Purif. Methods*. 1994. V. 23. P. 1-16.
6. Burgess, D. J. Complex coacervation: micro-capsule formation. In *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*/ Dubin P.L., Bock J., Davis R.M., Schultz D., Thies C., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Germany. 1994. P. 285-325.
7. De Kruif C.G., Tuinier R. Polysaccharide protein interactions // *Food Hydrocolloids*. 2001. V. 15. P. 555-563.
8. Tolstogulzov V.B. Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods, and beverages // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2002. V. 22. P. 89-174.
9. Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F. Quantification of the interactions between β -lactoglobulin and pectin through capillary electrophoresis analysis // *J. Agric. and Food Chem.* 2003. V. 51. P. 6043-6049.
10. Rinaudo M. Comparison between experimental results obtained with hydroxylated polyacids and some theoretical models // *Polyelectrolytes*. V.1. Selegny ed./ D.Reidel Publ. Co., Dordrecht Holland/ Boston – USA. 1974. P.157-193.
11. Wen Y., Dubin P.L. Potentiometric studies of the interaction of bovine serum, albumin and poly (dimethyldiallylammonium chloride) // *Macromolecules*. 1997. V.30. P.7856-7861.
12. Мухидинов, З.К. Концентрат лактоглобулинов из молочной сыворотки и методы их выделения [Текст] / З.К. Мухидинов, А.С. Джонмуродов, Х.И. Тешаев [и др.] // *Журн. здрав. Таджикистана*. - 2009. - № 5. - С. 44-49.
13. Мухидинов, З.К. Потенциометрическое титрование β -лактоглобулина молочной сыворотки [Текст] / З.К. Мухидинов, С.Р. Усманова, Х.И. Тешаев [и др.] // *ДАН РТ*. - Т.54. - № 2. - С.124-128.
14. Creighton T.E. *Proteins: Structures und molecular properties*. 2nd ed. New York: W.H. Freeman & Co. 1993.
15. Muhiddinov Z.K., Khalikov D.Kh., Asoev M.G., Avloev Ch.Ch.. Some anomalous phenomena in hydrodynamic properties of pectin / *Proceeding of the International Seminar on Polymer Science and Technology*. Tehran, Iran. 1997. V.1. P.213-220.
16. Мухидинов, З.К., Нерастворимые комплексы белков молочной сыворотки с различными пектинами [Текст] / З.К. Мухидинов, А.Ш. Штанчаев, А.С. Насриддинов [и др.] // *ДАН РТ*. - 2008. - Т. 51. - № 8. - С. 607-614.
17. Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F. Thermodynamic parameters of β -lactoglobulin/pectin complexes assessed by isothermal titration calorimetry // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 4450-4455.
18. Girard M., Turgeon S.L., Gauthier S.F. Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration // *Food Hydrocolloids*. 2002. V. 16. P.585-591.
19. 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.